

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09748

研究課題名(和文) 尋常性天疱瘡の病態における脂質ラフトの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of lipid rafts in the pathophysiology of pemphigus vulgaris

研究代表者

齋藤 昌孝 (Saito, Masataka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30306774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：デスモグレイン(Dsg)3以外のデスモゾーム関連蛋白について、細胞内シグナル分子と脂質ラフトとの関連性を明確に示すデータを得られていないものの、尋常性天疱瘡の病態においてDsg3分子のクラスター形成による脂質ラフトサイズの増大がシグナリングプラットフォームとして機能するために重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was suggested that enlargement of the size of lipid rafts as a result of clustering of desmoglein (Dsg) 3 molecules was significant to function as a signaling platform in the pathogenesis of pemphigus vulgaris, although the relationship among desmosomal proteins other than Dgs3, cellular signaling molecules and lipid rafts is yet to be elucidated.

研究分野：自己免疫性水疱症

キーワード：尋常性天疱瘡 デスモゾーム 脂質ラフト 細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

表皮細胞間で形成されるデスモゾームでは、細胞膜貫通蛋白である Dsg3 などのデスモゾームカドヘリンがアミノ末端同士で互いに結合することで表皮細胞間の強固な接着が維持される。そして、尋常性天疱瘡では、Dsg3 や Dsg1 に対する自己抗体によって、Dsg 分子の接着機能が障害され水疱形成に至るものと考えられている。自己抗体によって引き起こされるデスモゾームの接着障害および崩壊には、抗体による直接的な接着障害 (steric hindrance) に加えて、Dsg3 のエンドサイトーシスや細胞内シグナルが関与していることを示唆する報告が近年相次いでいる。中でも、特に注目されているのは p38 MAPK を中心としたシグナル伝達であり、p38 MAPK を阻害することによって、尋常性天疱瘡抗体による Dsg3 のエンドサイトーシスおよび細胞接着障害が抑制されることが *in vivo* においても示されている。すなわち、尋常性天疱瘡患者の自己抗体はポリクローナル抗体であり、Dsg3 分子の様々なエピトープに結合する抗体が混ざっているため、細胞膜表面において Dsg3 分子のクラスターを形成し、その結果 p38 MAPK 依存性に Dsg3 分子のエンドサイトーシスが惹起されることが本研究代表者らによって示された (図1)。

一方で、様々な細胞膜蛋白の抗体などによるクロスリンクは、エンドサイトーシスや細胞内シグナル発生を惹起し、しかもそれは細胞膜上の特別な領域である脂質ラフトにおいて生じることが数多く報告されている。本研究代表者らのこれまでの研究の中で、尋常性天疱瘡抗体による Dsg3 分子のエンドサイトーシスは脂質ラフト依存性に生じることが示されており (図2)、脂質ラフトを舞台とした細胞内シグナルに注目することによって、さらなる病態解明につながるのみならず、脂質ラフトあるいは関連するシグナル分子をターゲットとした新たな治療法の開発へ

図1 (Saito M, et al. PLoS One 2013)

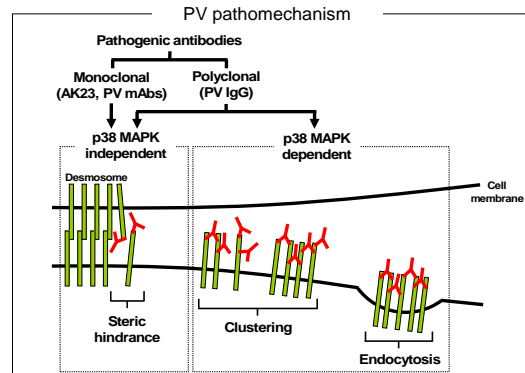
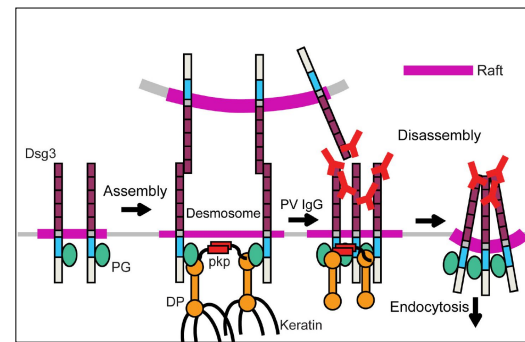


図2 (Stahley SN, Saito M, et al. PLoS One 2014)



とつながることが期待できる。現在は、尋常性天疱瘡に対してはステロイドによる非特異的免疫抑制治療が中心となっており、様々な副作用の問題がある。しかし、脂質ラフトを土台にして進む細胞内シグナルのカスケードの詳細が明らかになれば、その一部を特異的に抑制する薬剤を治療に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

脂質ラフトは細胞内シグナル発生におけるプラットフォームとして重要な役割を演じると考えられており、尋常性天疱瘡においても、p38 MAPK をはじめとした細胞内シグナルが病態に関与していることが明らかになっていることから、注目すべき構造と考えられる。本研究代表者らによってこれまでに、

尋常性天疱瘡抗体が細胞膜の脂質ラフト依存性に Dsg3 分子のエンドサイトーシスが生じること、またデスモゾーム自体が脂質ラフトと関連した構造体であることが示されたため、今後の研究課題としては、表皮細胞接着ならびに尋常性天疱瘡の病態における脂質ラフトの役割を様々な細胞内シグナルの活性化の有無に着目して解析することが挙げられる。本研究においては、細胞表面に分布する Dsg3 分子が尋常性天疱瘡抗体によりクロスリンク(クラスター形成)される結果、Dsg3 分子や他のデスモゾーム関連蛋白と脂質ラフトとの関連性が強まり、p38 MAPK を含めた一連の細胞内シグナルが惹起されるのではないかという仮説を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

尋常性天疱瘡の病態における脂質ラフトの役割を示すため、尋常性天疱瘡抗体の存在下、すなわち Dsg3 分子がクロスリンクされた際に、Dsg3 ならびに他のデスモゾーム関連蛋白の脂質ラフトへの分布にどのような変化がみられるのか形態学および生化学的解析を行う。尋常性天疱瘡の病態に深く関与すると考えられる Dsg3 のエンドサイトーシスが脂質ラフトを舞台として生じることから、その際に脂質ラフトと他のデスモゾーム関連蛋白や様々な細胞内シグナル分子との共局在を超解像蛍光顕微鏡によって解析する。また、生化学的解析は、前研究と同様にシヨ糖密度勾配遠心分離法を中心として行う。さらに、細胞内シグナルに関連する各種酵素の阻害剤によって、脂質ラフトにどのような変化が生じ、Dsg3 のエンドサイトーシスにどのような影響がもたらされるかを明らかにする。

4. 研究成果

本研究代表者らのこれまでの研究で、尋常性天疱瘡抗体が細胞膜の脂質ラフト依存性に Dsg3 分子のエンドサイトーシスを引き起こすこと、またデスモゾーム自体が脂質ラフトと関連した構造物であることが示されている。また、脂質ラフトが破壊されると、尋常性天疱瘡患者血清中の抗 Dsg3 抗体によって引き起こされるデスモゾームの分解が抑制されることも判明している。そこで本研究では、尋常性天疱瘡の病態における脂質ラフトの役割を明らかにすることを目的として、尋常性天疱瘡抗体によって Dsg3 分子がクロスリンクされることで、Dsg3 および他のデスモゾーム関連蛋白の脂質ラフトへの分布に変化がみられるかどうかを形態学的ならびに生化学的に解析することを試みた。さらに、様々な細胞内シグナルのプラットフォームと考えられている脂質ラフトに注目して、Dsg3 への尋常性天疱瘡抗体の結合による細胞内シグナル発生と脂質ラフトとの関連性を明らかにし、尋常性天疱瘡の病態に関わるシグナル分子を同定することも本研究の目的とした。Dsg3 以外のデスモゾーム関連蛋白と脂質ラフトとの関連性や、デスモゾーム関連蛋白や細胞内シグナル分子と脂質ラフトとの形態学的な共局在を明確に示すデータを得るには至っていないものの、Dsg3 分子のクラスター形成による脂質ラフトサイズの増大がシグナリングプラットフォームとして機能するために重要であることが示唆されることから、条件設定のさらなる検討が必要と思われる。また、尋常性天疱瘡で注目されている p38MAPK の上流にある脂質ラフト関連シグナル分子の同定についても今後検討していきたいと考えている。なお、尋常性天疱瘡の治療において有効性の高いステロイドがデスモゾーム関連蛋白に及ぼす影響について解析したところ、様々な濃度のプレドニゾロン (PSL) の存在下に *in vitro*

dissociation assay で、培地中の PSL 濃度が 0.001mM の時に水疱形成抑制効果が最も高かった。その機序を解明するため、培養ヒト角化細胞に PSL を加えて Dsg3、デスモコリン、デスモプラキン、プラコグロビン、プラコフィリンといったデスモゾーム関連蛋白の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で解析した結果、Dsg3 の mRNA は生食を加えた時に比べて有意に上昇しており、新生仔マウスを用いた *in vivo* の実験系では、PSL 投与に伴って Dsg3、Dsg1、プラコフィリン、デスモプラキンの mRNA が、用量依存性に上昇していた。以上の結果から、ステロイドの投与によりデスモゾームを構成する蛋白の発現が増えることで自己抗体による水疱形成が抑制されることが示唆され、脂質ラフト上でのそれらの蛋白の挙動についても今後検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 昌孝 (SAITO, Masataka)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30306774

(2)研究分担者

山上 淳 (YAMAGAMI, Jun)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80327618

(3)研究協力者

アンドリュー P. コワルチェック
(KOWALCZYK, AP)
米国エモリー大学・医学部・教授