

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08278

研究課題名(和文)新規の天疱瘡抗体病的活性測定法による水疱形成機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of blister formation mechanism in pemphigus by a novel in vitro bead aggregation assay

研究代表者

石井 健 (ISHII, Ken)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：50296670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡は全身の皮膚、粘膜に水疱、びらんを生じる難治性の自己免疫性疾患である。自己抗体はデスモゾームに局在するカドヘリン型細胞接着因子のデスモグレイン(Dsg)1および3を標的としている。今回、組換えDsg、デスモコリン(Dsc)を固相化したビーズ凝集法を開発し、デスモゾーム接着においてDsgとDsc間のヘテロフィリックな結合が、Dsg同士、Dsc同士よりも強固な接着活性を持つことを確認した。また、天疱瘡自己抗体は、DsgとDsc間の接着を細胞内シグナルを介さず直接阻害することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天疱瘡の水疱形成において抗体によるDsgとDscのヘテロフィリック接着の直接阻害が重要であることを直接的に証明することができた。臨床応用としては、今回開発したビーズ凝集法は、天疱瘡の病勢を反映した検査法となる可能性がある。現在天疱瘡の疾患活動性の指標は、ELISAやCLEIA法で測定した抗体価が使用されている。抗体価は、抗原抗体反応を見るため、ときに、寛解期においても抗体価が高い症例があるなど疾患活動性と抗体価が一致しない症例も観察される。ビーズ凝集法はDsg/Dscの接着阻害活性を測定できるため天疱瘡の疾患活動性のより良い評価法と使用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus is an intractable autoimmune disease that causes blisters and erosions on the skin and mucous membranes. Autoantibodies target desmoglein (Dsg) 1 and 3, cadherin-type cell adhesion molecules localized at desmosomes. In this study, we developed bead aggregation assays using recombinant Dsg and desmocollin (Dsc) and confirmed that heterophilic binding between Dsg and Dsc has stronger adhesive activity. We also showed that pemphigus autoantibodies directly inhibit adhesion between Dsg and Dsc without intracellular signaling.

研究分野：皮膚科

キーワード：天疱瘡 細胞接着 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は、IgG型の自己抗体を介する自己免疫性水疱性疾患であり、尋常性天疱瘡(PV)と落葉状天疱瘡(PF)の2型に大別される。その自己抗原は、デスモゾームに存在するカドヘリン型の細胞接着因子であるデスモグレイン3(desmoglein 3, Dsg3)とDsg1である。血清中の抗Dsg1・IgGまたは抗Dsg3・IgG自己抗体が表皮細胞間接着阻害を誘導し、水疱形成すると理解されている。現在の天疱瘡の治療は、他の自己免疫性疾患と同様に副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤など免疫を非特異的に抑制する治療法が中心であり、副作用の面から疾患特異的治療が望まれている。

Dsgはデスモコリン(Dsc)と共にカドヘリン型の細胞接着因子であり、細胞接着装置の一つであるデスモゾームを構成する膜蛋白である。Dsg1-4、Dsc1-3のアイソフォームがあり、細胞外領域には、カドヘリンリピート領域が4つ連なった分子構造をしている(EC1-4)。向かい合うDsg分子同士が先端に位置するEC1領域でカルシウム依存性にホモフィリック結合し、もしくはDsgとDscがヘテロフィリック結合し、ジッパー様に連なっている構造をしていると考えられている。また、Dsg、Dscの分子構造解析が明らかになりDsgとDscのヘテロフィリックなトランス結合がデスモゾームにおける細胞間接着に重要であると考えられている。

天疱瘡の水疱形成機序としては、自己抗体がDsg分子接着面に結合することによる直接阻害、細胞内シグナル伝達による酵素の活性化、エンドサイトーシスなどによるデスモゾームからのDsg3分子の減少などが提唱されている。しかしながら培養細胞、モデルマウスなどの実験系毎に異なる機序が推察されており、天疱瘡の水疱形成機序は未解決である。

天疱瘡の血中抗体を検出する方法は、蛍光抗体法、ELISA法などがある。抗体価は概ね病勢と並行して推移するが、抗原抗体反応をみる検査法のため、病気の重症度と抗体価が相関しないことがある。そのため、自己抗体の病的活性すなわち細胞接着阻害活性を直接測定する検査法が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、デスモグレインとデスモコリンの組換え蛋白を作成し、ビーズに固相化したビーズ凝集法を構築し、天疱瘡自己抗体の接着阻害活性を簡便に測定する検査法を開発する。さらに、この検査法を利用し、天疱瘡の水疱形成機序として、自己抗体がDsg分子接着面に結合することによる直接接着阻害または細胞内シグナル伝達による間接的接着阻害がより重要かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Dsg、Dsc組換え蛋白の作成と Dsg、Dscによる接着機能の解析

DsgおよびDscの細胞接着機能活性を測定するため、落葉状天疱瘡の自己抗原であるDsg1の細胞外領域とIgGの定常領域とヒスチジンタグを結合した組換え蛋白を作成する。さらにDsg3とDsc1とDsc3の組換え蛋白を同様に作成する。それらのプラスミドを293細胞に導入し組換え蛋白を作成し、Talon アフィニティカラムを用いて精製する。これらの精製した組換え蛋白をプロテインGビーズに固相化し、ビーズ凝集反応で接着機能を解析する。Dsg1単独、Dsc1単独、Dsg1固相化したビーズとDsc1ビーズを混合し

たもので凝集反応が起こるかを観察する。凝集の程度は、顕微鏡で観察し、凝集塊の大きさで確認する。

(2) モノクローナルDsg抗体による凝集抑制活性の測定

抗体による凝集抑制活性を測定するため、既に単離してあるDsg1モノクローナル抗体を用いて測定系の検証をする。病的活性のある抗Dsg1抗体(PF1-8-15, PF1-8-2)と非病原性抗Dsg1抗体が複数単離されている。これらの抗体は重鎖と軽鎖の可変領域をリンカーで結合した一本鎖抗体の形で単離されている。これらの抗体をDsgとDscを固相化したビーズに添加し凝集抑制が生じるか検討する。

(3) 患者血清の凝集抑制活性の測定

次に落葉状天疱瘡の血清を用いて凝集抑制活性を測定する。まず、病勢が強い時期の血清10例程度を測定する。IgG自己抗体は2価であるためIgG抗体による架橋による影響も予想されるため、Dsg1固相化ビーズ単独、Dsg1ビーズ、Dsc1ビーズを混ぜた系の2種類の凝集反応を比較して自己抗体による凝集抑制活性を測定する。さらに、病勢の強い時期と、寛解期の血清を比較し、病勢と相関するかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 組換えDsgとDscを用いたビーズ凝集法

Dsg1のみを固相化したビーズ、Dsc1のみを固相化したビーズでは弱い凝集しか認められないのに対し、両者を混合すると大きなビーズ凝集塊が認められた。このことからDsg同士、Dsc同士の接着よりも、Dsg1とDsc1のヘテロフィリックな結合のほうが強固であることが確認された。Dsg3、Dsc3でも同様の結果であった。

(2) 天疱瘡抗体は Dsg/Dscのヘテロフィリック結合を直接阻害する

天疱瘡抗体がDsg/Dscのヘテロフィリックな接着を直接阻害するかをみるために、まず、PF患者から単離された抗Dsg1モノクローナル抗体および天疱瘡モデルマウスより単離された抗Dsg3モノクローナル抗体を用いて検討した。病原性を持つ抗Dsg1抗体は、Dsg1のEC1領域の接着面を認識し、一方で非病原性抗Dsg1モノクローナル抗体は、Dsg1のEC3領域を認識する。

病的活性のある抗Dsg1抗体を添加するとDsg1/Dsc1ビーズ凝集が抑制されることが観察され、天疱瘡抗体は、Dsg1・Dsc1のヘテロ結合を抑制されていることが明らかになった。一方、病的活性の持たない抗体を加えても凝集抑制はかからなかった。ビーズ凝集法は非細胞系のため、PF抗体は、Dsg1/Dsc1ヘテロフィリック結合を細胞内シグナルを介さずに阻害することが判明した。また、このビーズ凝集法は病原性のある抗体、無い抗体を区別することができることを示している。抗Dsg3抗体に関しても同様の結果であった。

次に、PF血清8例とPV血清8例をDsg1/Dsc1ビーズ凝集法とDsg3/Dsc3のビーズ凝集法でそれぞれ検討したところ、全例でDsg/Dscのビーズ凝集が抑制された。天疱瘡血中にはDsgとDsc間のヘテロフィリックなトランス結合を細胞内シグナルを介さずに阻害する自己抗体があることが証明された。また、疾患活動性の強い時期、寛解期の血清で凝集抑制効果を比較してみると、ビーズ凝集抑制効果は寛解期で疾患活動性が強い時期より低下しているのが観察された。このことからDsg/Dscのヘテロフィリック接着を直接阻害する抗体が、天疱瘡の病態に関与していることが強く示唆された。

(3) 考案

天疱瘡の水疱形成においてDsgの接着機能の直接阻害機序が関与していることは、病的活性を持つ天疱瘡自己抗体の多くは、Dsgの接着面のあるアミノ末端のEC1領域を認識していること、Dsg1、Dsg3遺伝子欠失マウスでは天疱瘡と同様の表皮内水疱がみられることなどから推測されてきていたが直接の証明はなかった。今回の研究結果は、天疱瘡の水疱形成において抗体によるDsgとDscのヘテロフィリック接着の直接阻害が重要であることを直接的に証明することができた。

臨床応用としては、今回開発したビーズ凝集法は、天疱瘡の病勢を反映した検査法となる可能性がある。現在天疱瘡の疾患活動性の指標は、ELISAやCLEIA法で測定した抗体価が使用されている。抗体価は、抗原抗体反応を見るため、ときに、寛解期においても抗体価が高い症例があるなど疾患活動性と抗体価が一致しない症例も観察される。ビーズ凝集法はDsg/Dscの接着阻害活性を測定できるため天疱瘡の疾患活動性のより良い評価法と使用できる可能性もあり、現在検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishii Ken, Yoshida Kenji, Stanley John R., Yamagami Jun, Amagai Masayuki, Ishiko Akira	4. 巻 140
2. 論文標題 Pemphigus Vulgaris and Foliaceous IgG Autoantibodies Directly Block Heterophilic Transinteraction between Desmoglein and Desmocollin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1919 ~ 1926.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao W.L., Ishii K., Egami S., Xu Z., Funakoshi T., Takahashi H., Tanikawa A., Ishiko A., Amagai M., Yamagami J.	4. 巻 36
2. 論文標題 Analysis of clinical characteristics, prognosis and antibody pathogenicity of pemphigus patients positive for anti desmoglein IgG autoantibodies in remission: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 271 ~ 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.17770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ken Ishii, Jun Yamagami, Masayuki Amagai, John R Stanley, Akira Ishiko
2. 発表標題 Pemphigus vulgaris IgG autoantibodies directly inhibit heterophilic desmoglein 3-desmocollin 3 adhesion by steric hindrance
3. 学会等名 77th Annual Meeting of Society of investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Ishii, Kenji Yoshida, Jun Yamagami, Masayuki Amagai, John R Stanley, Akira Ishiko
2. 発表標題 Pemphigus autoantibodies directly inhibit heterophilic desmoglein -desmocollin adhesion by steric hindrance
3. 学会等名 44th Annual meeting of Japanese society of investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishii K, Yoshida K, JR. Stanley , Ishiko A.
2. 発表標題 Pemphigus foliaceus IgG autoantibodies block heterophilic trans-interaction of desmoglein 1 and desmocollin 1 without intracellular signaling.
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井 健, 吉田憲司, John R.Stanley, 石河 晃
2. 発表標題 落葉状天疱瘡自己抗体はデスモグレイン1とデスモコリン1のトランス結合を阻害する .
3. 学会等名 第40回水疱症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 健、吉田憲司、山上淳、天谷雅行、John Stanley、石河晃
2. 発表標題 組換えデスモグレイン、デスモコリンを用いた天疱瘡抗体病的活性評価法の開発
3. 学会等名 119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------