

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591299

研究課題名（和文）天疱瘡抗体によるデスモグレイン 3 結合型 p120ctn 関連シグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文）The study of p120ctn-associated signal transduction pathway caused by pemphigus autoantibody.

研究代表者 青山 裕美 (AOYAMA YUMI)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90291393

研究成果の概要：

天疱瘡は、表皮細胞間接着構造であるデスモソームの構成成分であるデスモグレイン 3 に対する自己抗体により、表皮細胞間の接着が低下し全身の粘膜と皮膚にびらん水疱を形成する自己免疫性水疱症である。抗体が表皮細胞に結合後細胞内で生じる細胞生物学的反応の解析を、p120ctn 関連キナーゼ（Src,EGF,RhoA,Fer,Fyn）に着目して解析した。結果 1,Src キナーゼがデスモソーム構成分子の比率に影響を与えることが解明された。2.Dsg3 の細胞外ドメインの shedding が生じ MMP-9 の関連が示唆された。3.Rho A の活性型の増加が刺激直後に見られるが、Dsg3 の早期の分解には直接関与しないことが解明された。4. Dsg3 の早期の分解過程に p120ctn の結合性の変化が関与することが解明された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学：皮膚科学

キーワード：(1)表皮細胞 (2)デスモソーム (3)天疱瘡 (4)自己免疫性水疱症 (5)細胞接着

1. 研究開始当初の背景

尋常性天疱瘡患者由来 IgG および抗デスモグレイン (Dsg) 3 モノクロナル抗体 (mAb) による表皮細胞内に生じる細胞内シグナル伝達機構、特に Dsg3 の消失と Dsg3 欠損デスモソーム形成に着目して研究を進めていた。Dsg3 の消失と Dsg3 欠損デスモソ-

ム制御分子として p120ctn と p120ctn 関連キナーゼ (Src,EGF,RhoA,Fer,Fyn) に着目して研究を行った。研究過程において、Dsg3 が細胞外ドメインで分解することを見いだしたので、Dsg3 の分解制御機構に関する研究内容を追加し行った。

2. 研究の目的

Dsg3 細胞外ドメインにおける分解機構の解明について：Dsg3 の分解調節機構に関与する分子機構を解明し、阻害することによって、水疱形成を抑制する。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法によるデスマグレイン

(Dsg) 3 の分解産物の検出

培養細胞 (DJM-1 細胞) を天疱瘡 IgG および病原性の異なる AkmAb (0.3 mg/ml) で刺激後、PBS で洗い、タンパク質分解酵素阻害剤を加えた 1% Brij buffer (1% Brij 58, 20m M Tris[pH7.8], 150 mM NaCl, 5m M iodoacetamide) で可溶化した。Dsg3 の c 末を認識する抗体 (AHP319) を結合した proteinA ビーズで免疫沈降した。免疫沈降物をウエスタンブロッティングで検討した。

(2) 使用抗体 抗 Dsg3 モノクロナール抗体 (AK シリーズ 慶應大学医学部皮膚科天谷雅行教授より供与), AHP319 (serotech 社) Dsg3C 末端ポリクロナール抗体, BOS6 抗体 (200-229AA で免役したポリクロナール抗体を使用した)。

(3) Dsg3 と p120ctn の結合性の検討

DJM-1 細胞を天疱瘡 IgG および病原性の異なる AkmAb (0.3 mg/ml) で刺激後、方法 1 に記載した手法で、免疫沈降を行う際に刺激に用いた IgG がプロテイン A ビーズに吸着されるのを利用して、細胞膜上に発現し、抗体の結合を受けた Dsg3 のみを回収し、その細胞内ドメイン結合タンパク質を抗 p120ctn 抗体で検討した。

4. 研究成果

我々は本年度、候補分子 (Src, EGF, RhoA, Fer, Fyn) の活性化や、Dsg3 との結合性、また阻害剤による Dsg3 の分解を検討した。その結果以下課題 1-4 に示すような知見が得られた。なお課題

(2) は既に投稿中であるが、課題 1, 3, 4 は投稿準備中もしくは継続して研究中のため結果を示す図の掲載を控える。

課題 1, Src キナーゼによるデスマグレイン構成分子の比率への影響。

抗体刺激後に Src キナーゼの活性化の報告がある。さらに我々は培養表皮細胞に wound scratch をすると細胞の消失した空間に細胞が移動を開始した細胞で特異的に Src の活性が観察され、天疱瘡抗体誘導 Dsg3 の分解が著明に増加することを確認している。そこで、Src キナーゼの活性化型を表皮細胞に Transfection して、デスマグレイン構成蛋白質の比率の変化を検討した。結果 Dsg3 は軽度減少、Dsg2 が著明に減少した。Dsg3 と Dsg2 の細胞外ドメインの分解機構が異なることが示唆された。

課題 2. Dsg3 の細胞外ドメインの shedding 機構。

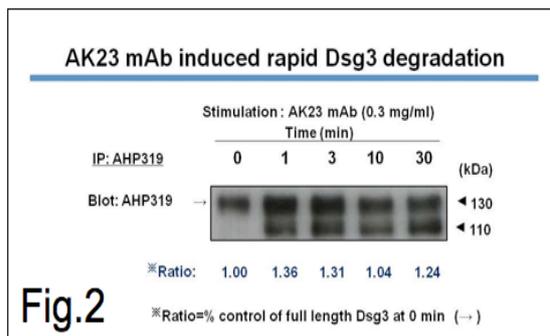
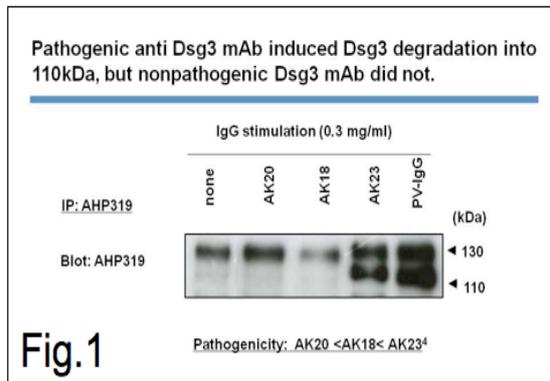
(1) 異なるエピトープと病原性を持つ抗 Dsg3 抗体による Dsg3 の分解。

DJM-1 細胞をサブコンフレントの状態に培養し、病原性の低い AK20, 18, 病原性の高い AK23mAb と天疱瘡 (PV) IgG を 0.3 mg/ml の濃度で 10 分間刺激した。細胞を 1% Brij buffer で可溶化し、Dsg3 の C 末を認識する Dsg3 抗体を用いた免疫沈降法で Dsg3 の分解産物を検出した。病原性の高い AK23mAb と天疱瘡 (PV) IgG で刺激したときだけ全長 Dsg3 (130kDa) に加え 110kDa の分解産物を検出した (Fig.1)。

(2) AK23 抗体刺激により誘導される Dsg3 の分解の時間経過における変化。

DJM-1 細胞をサブコンフレントの状態に培養し、病原性の高い AK23mAb を 0.3 mg/ml の濃度で 30 分間まで刺激した。細胞を 1% Brij buffer で可溶化し、結果 1 と同様に免疫沈降法で Dsg3 の分解産物を検

出した。AK23 刺激 1 分後から 110kDa の分解産物が検出され 30 分の間分解産物の量が増加し、全長 Dsg3 の量が減少していた (Fig. 2)。



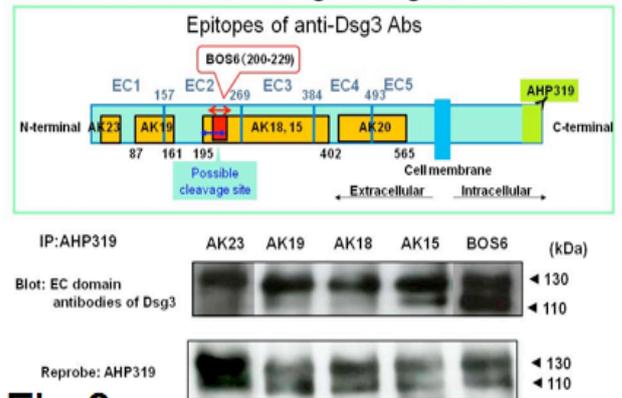
(3)AK23 抗体による Dsg3 の分解部位の検討。

110kDa の Dsg3 分解産物を異なるエпитープをもつ (Fig.3 上) Dsg3 抗体でウエスタンブロッティングした (Fig.3 下)。AK23,19,18mAb は 130kDa のみを認識し、AK15mAb と BOS6pAb は 130kDa と 110kDa を共に認識した。

110kDa が細胞外 EC2 ドメインで切断されるならば、EC1 を含む断片が細胞培養中に放出されると考え、DJM-1 細胞を AK23 で刺激し培養液を AK23mAb で免疫沈降を行い AK23mAb でウエスタンブロッティングを行った。未刺激時には約 30kDa

の短い断片が検出され AK23mAb 刺激により増加した。

AK23 mAb induced cleavage of Dsg3 at EC2 domain



(4)MMP-9 阻害剤とチロシンキナーゼ阻害剤 (PP-1) は Dsg3 の分解を部分的に阻害した。

これまでにアポトーシスの過程で Dsg3 が MMP9 によって切断されるという報告があったので、AK23 によって誘導される Dsg3 の切断に MMP-9 が関与するかどうか確認した。培養 DJM-1 細胞の培地中に MMP-9 阻害剤を加え 1 時間後に AK23mAb で刺激した。同様に免疫沈降法で Dsg3 の分解産物の産生を確認した。MMP-9 阻害剤添加により 110kDa-Dsg3 の産生が部分的に抑制された。チロシンキナーゼ抑制剤である genistein, PP-1 前処理後 PP-1 は部分的に分解を抑制したが genistein は抑制効果がなかった。

(5)AK23mAb による MMP-9 の活性の時間的推移。培養 DJM-1 細胞に AK23mAb (0.3 mg/ml) を加え 1 から 24 時間後の MMP-9 の活性を測定した。MMP-9 の活性は刺激後 1 時間以内では未刺激と差がなく活性の増加はわずかで、24 時間後には AK23mAb 刺激により 1.0 ng/ml に活性が増加し、未刺激サンプルに比較し有意な変化であった (Fig.4)

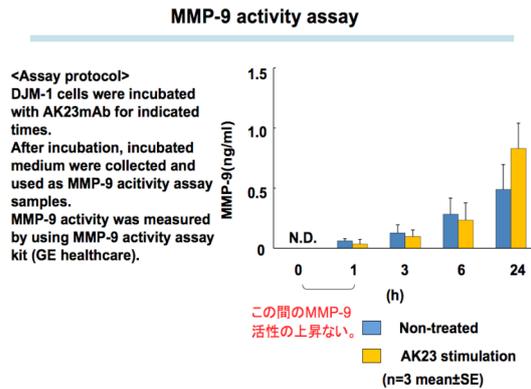


Fig4

課題 3. Rho A と Dsg3 の早期の分解との関連。

RhoA の関与に関する検討 抗体刺激後 10 から 30 分後に RhoA の活性型が増加し 120 分後に刺激前の状態に回復した。Dsg3 の細胞膜からの分解に p120ctn が関与し、p120ctn は RhoA を不活化することより、RhoA 活性を阻害した状態で抗体刺激を加え Dsg3 の量を検討した。Dsg3 は RhoA の活性の変化に拘わらず抗体刺激により分解した。さらに RhoA の野生型、活性型、不活性型を細胞内に導入し RhoA の活性の変化による Dsg3 の発現の変化を検討したところ、不活性型 RhoAN19 により Dsg3 と β catenin の発現低下を観察した。RhoA の活性化は Dsg3 の分解に関与せず、長時間の不活性化はアクチン細胞骨格のリモデリングの阻害を介してアドヘレンスジャンクションとデスモソームに影響を与えている可能性が高い。これらの結果から、デスモソームの形成分解に Src と RhoA の直接もしくは間接的な関与が示唆される。さらに天疱瘡の新規治療開発に向け、解析を続ける予定である。

課題 4 . Dsg3 の早期の分解過程に p120ctn の結合性の変化が関与する。

天疱瘡抗体結合後、細胞膜上に発現し抗体が

結合した Dsg3 のみを選択的に proteinA で回収し、結合タンパク質を検討したところ、早期に p120ctn の離解が観察された。現在、その調節機構についてさらに詳細に解析中である。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Iwata H, Kamio N, Aoyama Y, Yamamoto Y, Hirako Y, Owaribe K, Kitajima Y : IgG from patients with bullous pemphigoid depletes cultured keratinocytes of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (type XVII collagen) and weakens cell attachment. *J Invest Dermatol* 129:919-26, 2009.
2. Aoyama Y, Nomura M, Yamanaka S, Ogawa Y, Kitajima Y : Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala xenobiotica* in a non-Hodgkin lymphoma patient. *Med Mycol* 47:95-9, 2009
3. Aoyama Y, Yamamoto Y, Yamaguchi F, Kitajima Y : Low to high Ca²⁺-switch causes phosphorylation and association of desmocollin 3 with plakoglobin and desmoglein 3 in cultured keratinocytes. *Exp Dermatol* 18:404-8 2009
4. Iwata H, Aoyama Y, Kamiya H, Ichiki Y, Kitajima Y : Spindle cell squamous cell carcinoma showing epithelial-mesenchymal transition. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23:214-5, 2009
5. Iwata H, Hiramitsu Y, Aoyama Y, Kit

ajima Y : A case of anti-p200 pemphigoid; evidence for a different pathway in neutrophil recruitment compared to bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 160:462-4, 2009

6.Kanno M, Aoyama Y, Isa Y, Yamamoto Y, Kitajima Y : p120 catenin is associated with desmogleins when desmosomes are assembled in high-Ca²⁺ medium but not when disassembled in low-Ca²⁺ medium in DJM-1 cells. *J Dermatol* 35:317-24, 2008

7.Kanno M, Isa Y, Aoyama Y, Yamamoto Y, Nagai M, Ozawa M, Kitajima Y : p120-catenin is a novel desmoglein 3 interacting partner: identification of the p120-catenin association site of desmoglein 3. *Exp Cell Res* 314:1683-92, 2008

8.Aoyama Y, Nagasawa C, Nagai M, Kitajima Y : Severe pemphigus vulgaris: successful combination therapy of plasmapheresis followed by intravenous high-dose immunoglobulin to prevent rebound increase in pathogenic IgG. *Eur J Dermatol* 18:557-60, 2008

9.Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y : Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem* 282:17866-76, 2007

10.Shu E, Yamamoto Y, Aoyama Y, Kitajima Y : Intraperitoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes epidermal keratinocytes of desmoglein 3 associated with generation of acantholysis. *Arch Dermatol Res* 299:165-7, 2007

11.Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y : No activation of urokinase plasminogen activator by anti-desmoglein 3 monoclonal IgG antibodies in cultured human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 47:119-25, 2007

12.Aoyama Y, Asai K, Hioki K, Funato M, Kondo N, Kitajima Y : Herpes gestationis in a mother and newborn: immunoclinical perspectives based on a weekly follow-up of the enzyme-linked immunosorbent assay index of a bullous pemphigoid antigen noncollagenous domain. *Arch Dermatol* 143:1168-72, 2007

13.Iwata H, Aoyama Y, Esaki C, Kitajima Y: Cicatricial pemphigoid with prominent alopecia. *Eur J Dermatol* 17:338-9, 2007

14.Suzuki N, Suzuki T, Inagaki K, Ito S, Kono M, Horikawa T, Fujiwara S, Ishiko A, Matsunaga K, Aoyama Y, Tosa ki-Ichikawa H, Tomita Y : Ten novel mutations of the ADAR1 gene in Japanese patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Invest Dermatol* 127:309-11, 2007

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Isa Y, Aoyama Y, Nagai M, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y: Pemphigus IgG and pathogenic monoclonal anti-desmoglein 3 antibody induced cleavage of extracellular domain of membrane-pooled desmoglein 3 during endocytosis. International Investigative Dermatology 2008. Kyoto, 2008 年 5 月 17 日

2. Aoyama Y, Isa Y, Kanno M, Ozawa M, Kitajima Y: p120-catenin associates indirectly with Desmoglein 3, recruits it to the plasma membrane and stabilizes it at the cell surface. International Investigative Dermatology 2008. Kyoto, 2008 年 5 月 17 日

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 裕美

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90291393

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

