

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591620

研究課題名(和文) 尋常性天疱瘡の分子病態・シグナル伝達解明とデスモソームの制御機構

研究課題名(英文) Analysis of blistering mechanism in pemphigus.

研究代表者

青山 裕美 (YUMI, AOYAMA)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90291393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡ではELISA法による抗体価のモニタリングが治療効果判定に実用化されている。現行ELISA法の精度を上げるためにEDTA-ELISA法で非立体構造に結合する抗体を測定し、現行ELISA法との差を立体構造抗体価とすることにより、より病勢を反映した検査法に改良した。本法は臨床症状との相関がより優れていた。寛解期の高抗体価症例抗体の病因性を推定するためにも有用である。他、病因性抗体を培養細胞に添加後、プロテオーム解析を行った。病因性抗体による棘融解誘導経路を解明したい。本疾患の自己抗体の病因エピトープや水疱形成機序を解明することは新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus is an intractable autoimmune blistering disease caused by IgG autoantibodies against the extracellular domains (ECs) of desmogleins (Dsgs). We have modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to detect only nonpathogenic anti-Dsg3 antibodies against the non-calcium (Ca<sup>2+</sup>)-dependent epitopes. Using this method, anti-Dsg3 serum antibodies against the Ca<sup>2+</sup>-dependent epitopes can be obtained. In this study, we examined the reliability of the ELISA-determined activities of anti-Dsg3 serum antibodies against the Ca<sup>2+</sup>-dependent epitopes in clinical cases and demonstrated a significant correlation between the ELISA-determined activities of anti-Dsg3 serum antibodies against the Ca<sup>2+</sup>-dependent conformational epitopes and the clinical disease activities of PV patients. The conformational Dsg3 ELISA index showed improved correlation to the disease activity when monitored in individual cases.

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：天疱瘡 自己免疫 ケラチノサイト

## 1. 研究の学術的背景

尋常性天疱瘡は、表皮細胞間接着因子デスマグレイン(Dsg)に対する自己抗体により発症する自己免疫性水疱症である。全身にびらん水疱を形成し、ステロイド剤全身投与を主体とする免疫抑制療法で年余にわたって治療する必要があり、年間300人が新規に発症し、うち70%が入院加療をうけている。

**病因性抗体検査法** 現在、Dsg抗体価は天疱瘡の重症度に基づく治療法選択および効果判定の主要基準の1つである。一般的に重症度と抗体価は相関するが例外も多く、その理由の一つとして現行ELISA法は病因性を反映しないことが挙げられ、抗体の病因性を評価する検査法が臨床現場で求められている。天疱瘡抗体の病因性に関与する因子の一つにエピトープの位置が挙げられている。Dsg3は、カルシウム依存性立体構造を介して結合し、この領域に結合する抗体は病原性が高いことが確認されている。Dsg3をEDTA処理するとCa結合が外れ立体構造が消失する。

**棘融解形成機序** 表皮間結合の低下(棘融解)は天疱瘡における疾患の本質でありその程度が重症度を左右する。自己抗体が棘融解を生じる機序には、直接障害説(デスマソームが抗体により分断されるという考え。) Dsg3欠損デスマソーム説(抗体がDsg3の分解消失を促進し、結合力の弱いDsg3欠損デスマソームを形成し、機械的な刺激や炎症によって棘融解が生じるという考え)細胞内シグナル伝達経路誘導説の3説があり、長年論争になっている。私達は、抗体が細胞内のシグナル伝達機構を活性化しDsg3の選択的な欠失によりDsg3欠損デスマソームが形成されることをはじめて明らかにした(Aoyama et al. J Invest Dermatol. 1999, Kitajima & Aoyama, Clin Rev Allergy Immunol. 2007, review)。これは「細胞接着分子の細胞外ド

メインに結合する自己抗体が表皮細胞内のシグナル伝達系を介して細胞生物学的に細胞接着を低下させる」という自己免疫性水疱症の病態解明研究分野に全く新しい領域を開くさきがけとなった。この10年間にDsg3欠損デスマソームが形成されることは広く認められてきたが、その詳細な機序と病的意義について引き続き解明し発表する必要がある。天疱瘡の水疱形成機序/細胞内伝達機構の解析結果は新たな表皮細胞の細胞接着・運動・増殖分化機能制御機構を追求することにつながる。さらにシグナル伝達を抑制する新規治療法の開発にも繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

1) **病因性抗体検査法** 検査方法の確立(抗体病因性との相関性)、臨床検体を用いた検査値と重症度との相関を検討する。病因性抗体のエピトープの解析を行う。

2) **棘融解形成機序** 病因性抗体による細胞内シグナル伝達機構を解析する。非病因性抗体の違いを比較検討する。

## 3. 研究の方法

1) **試料** 天疱瘡患者血清(50例) 非天疱瘡患者で抗Dsg抗体が検出された10例(慢性関節リウマチ(RA)6例、健常人1例、Bowen病1例、類天疱瘡(BP)1例、扁平苔癬1例)を対象とした。

### 2) 病因性抗体検査法

Dsgは細胞外ドメイン、1回膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなる。Dsg3細胞外ドメインにはCa<sup>2+</sup>依存性立体構造エピトープとCa<sup>2+</sup>非依存性構造エピトープが分布する。われわれは、Dsg3細胞外ドメインが固層化されたDsg3 ELISAプレートをethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)処理しCa<sup>2+</sup>をキレートすることでCa<sup>2+</sup>依存性立

体構造を変換し (EDTA-treated ELISA), 様々なエピトープのモノクローナル抗体の結合性を検討する. Dsg3 ELISA index value と EDTA-treated Dsg3 ELISA index value の差を算出することで得られる ELISA index value は, 病因性の高い抗体のみを反映する ELISA index value を計算値として得る. PV の病勢をより鋭敏に反映し治療効果判定の指標としての有用性を採血時の Pemphigus disease area index(PDAI)との相関を検討する. 適切な症例を抽出して Dissociation assay で細胞接着力との関連性を検討する. Dissociation assay は in vitro で PV 患者血清中に含まれる抗体の病因性を評価する方法である. まず, PV 患者血清より IgG 分画を精製し(PV-IgG), シート状に培養した DJM-1 細胞(human skin squamous cell carcinoma cell line)に加え, 抗体刺激をする. 抗体刺激後, シート状の培養細胞に物理的的刺激を加える. 抗体刺激により細胞間接着力が低下すると, シート状に培養された細胞は物理的的刺激に対し脆弱になり断片化をおこす. その断片数によって細胞間接着力低下能を評価し病因性を比較検討する. 病因性の高い PV-IgG では細胞は細かく断片化される. これにより抗体の病因性を定量する.

3) プロテオーム解析: 培養表皮細胞を病因性モノクローナル抗体 (mAb)AK23 と非病因性 mAbAK20 で刺激後可溶化し, 1D ゲルで分離後分子量ごとにゲルを切り出し, 消化後 LC-MS/MS でプロテオーム解析を行う。

#### 4. 研究成果

EC1-2 に結合する Dsg3 モノクローナル抗体と EC4-5 に結合する Dsg3 モノクローナル抗体の抗体価を検討した結果, EDTA 処理 Dsg3 ELISA 法の抗体値は EC45 ドメインに結合する抗体価を測定していることが明らかになり, 従来法 Dsg3ELISA 値-EDTA-ELISA 値は, 立体構造に

対する抗体価を示す. また, 患者血清を用いて得られた測定を行い, 病因性を Dissociation assay で検討したところ病因性を反映することが明らかになった. さらに, 採血時の PDAI のある 15 例 52 検体を用いて Dsg3 立体構造抗体価を測定しさらに PDAI との相関を解析した. 従来法と比較して立体構造抗体は PDAI との相関がより鋭敏になった. 寛解期で皮疹のない患者の血清抗体価を測定する目的で簡便で有用な情報が得られることがあきらかになった.

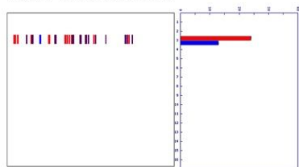
全国から, 臨床的に皮疹が軽微か消失している Dsg3 抗体価の高い症例の測定依頼を受けている. 結果的に, 患者抗体の病因性抗体価は治療方針の決定と, 病態への理解を深める野に役立っている. 今後, 実用化する必要を感じている. 本研究は, 臨床現場のニーズを満たす基礎研究として非常に意義がある. JAMA dermatology2014 中で, 従来 ELISA 法と PDAI の解離を説明する論文として高い評価を受けた.

プロテオーム解析 得られたタンパクのデータを今後解析していく.

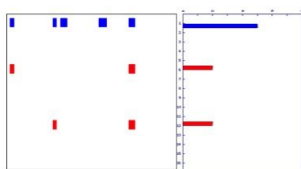
代表的なデータを図 1 に示す. 病因性が低い AK20 抗体(赤左で上)と病因性が高い AK23 抗体処理サンプル(青右で下)を各々比較していく. 図 1 に示すように発現量に差があるものは, 刺激により産生量に差がある可能性があり, 分子量に差があるものは, 刺激後に分解経路が活性化されている可能性がある. 今後 候補分子のデータについてそれぞれ解析を行っていく予定である.

図1 解析データの1例

1. AK20 vs AK23 刺激時で発現が異なる分子



2. AK20 vs AK23 刺激時で発現量と分子量が異なる分子



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1: Demitsu T, Yamada T, Nakamura S, Kakurai M, Dohmoto T, Kamiya K, Aoyama Y, Iwatsuki K, Yamagami J, Ohya B, Ohata C, Koga H, Hashimoto T. Detection of Autoantibodies to Precursor Proteins of Desmogleins in Sera of a Patient with Bowen Carcinoma. Acta Derm Venereol. 2014 doi: 10.2340/00015555-1776. (査読有り)

2: Ono S, Tanioka M, Tanizaki H, Fujisawa A, Koga H, Hashimoto T, Kamiya K, Aoyama Y, Iwatsuki K, Miyachi Y. Concurrence of autoantibodies to bullous pemphigoid antigens and desmoglein 3: analysis of pathogenic and nonpathogenic antibodies. Br J Dermatol. 2013 168(6):1357-60. doi: 10.1111/bjd.12143. (査読有り)

3: Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Iwatsuki K. A higher correlation of the antibody activities against the calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 quantified by ethylenediaminetetraacetic acid-treated enzyme-linked immunosorbent assay with clinical disease activities of pemphigus

vulgaris. J Dermatol Sci. 2013 70(3):190-5. doi: 10.1016/j.jdermsci. (査読有り)

4: Kamiya K, Aoyama Y, Kawase K, Schmidt E, Zillikens D, Kitajima Y, Iwatsuki K. Case of subepidermal blistering disease with autoantibodies to both laminin- $\gamma$ 1 and laminin- $\alpha$ 3. J Dermatol. 2013 40(6):491-2.

doi:10.1111/1346-8138.12127. (査読有り)

5: Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Hisata K, Iwatsuki K.

Detection of antibodies against the non-calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris and their pathogenic significance. Br J Dermatol. 2012 167(2):252-61. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10929.x. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

1. Koji Kamiya, Yumi Aoyama, Yoshinori Shirafuji, Toshihisa Hamada, Shin Morizane, Kazuyasu Fujii, Keiji Iwatsuki. The epitopes and IgG subclasses of anti-desmoglein antibodies detected in individuals without pemphigus. 第36回日本研究皮膚科学会学術大会・総会 2011年12月11日京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 裕美 (AOYAMA YUMI)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授 90291393

研究分担者 なし

連携研究者 なし