

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：35303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461659
研究課題名(和文)天疱瘡の新規病因シグナル伝達経路の解析

研究課題名(英文)Cell signaling pathway in pemphigus.

研究代表者

青山 裕美 (Aoyama, Yumi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：90291393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性天疱瘡の病態シグナル伝達機構を解明するために、培養表皮細胞に病因性の異なる抗デスモグレイン3抗体を作用させ、プロテオーム解析を行った。得られた結果をタンパクレベルで確認した。結果、細胞骨格、細胞接着分子、小胞体ストレスに関連する分子の変動を認めた。臨床の現場では、非病因性抗体があることが知られている。しかし、自己抗体の病因性を検討する検査が実用化されていない。今回われわれは、現行の検査法を改良して病因性抗体を検出する系を構築した。

研究成果の概要(英文)： We have performed differential proteomic analysis of cultured keratinocyte stimulated with pathogenic/non-pathogenic anti-desmoglein3 antibody. Proteomic analysis and westernblotting analysis showed a significant enrichment of biological processes related to cell attachment, cytoskeleton organization, and ribosomal biogenesis.

We established novel method to detect pathogenic anti-Dsg3 antibody. The conformational Dsg3 ELISA index reflected the pathogenicity of anti-Dsg3 antibodies more accurately than the conventional Dsg3 ELISA index. Using both conventional and EDTA-treated ELISAs would be useful in monitoring the disease activity of PV.

研究分野：皮膚科

キーワード：天疱瘡 デスモグレイン3抗体 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) GeLC-MS 法を用いた天疱瘡の病因抗体によるシグナル経路の解析

天疱瘡抗体には病因性抗体と非病因性抗体があり、天疱瘡抗体刺激により p38MAPK や RhoA などを経たシグナル経路を介して細胞骨格に変化が生じること、同時に Dsg3 欠損デスモソームが形成され棘融解することが明らかにされている。

(2) 落葉状天疱瘡におけるデスモグレイン1抗体エピトープの病期による比較

落葉状天疱瘡は表皮細胞間接着因子デスモグレイン(Dsg)1に対する自己抗体による自己免疫性水疱症である。臨床症状が軽快するとともに抗体価も減少し、治療の指標として活用されている。しかしながら、寛解期でも抗体価の高い症例をしばしば経験する。これまでにわれわれは Dsg 抗原 ELISA プレートで EDTA 処理したカルシウム依存性立体構造を変換 (EDTA 処理 ELISA 法) することで、天疱瘡患者に検出される抗 Dsg 抗体のエピトープを区別し、病因性を区別できることを報告してきた。

2. 研究の目的

(1) われわれは、病因シグナルを解析し、治療の標的を見だし、病因性抗体の検出系を開発することを目的とした。

(2) 本研究では落葉状天疱瘡患者に検出される抗 Dsg1 抗体の臨床的特徴を調べ、EDTA 処理 ELISA 法がスクリーニング検査として使用可能か検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養表皮細胞を病因性モノクロナル抗体 (mAb) AK23 と非病因性 mAb AK20 で刺激後可溶性し、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。得られた結果をもとに、培養細胞系で候補分子の発現を確認する。

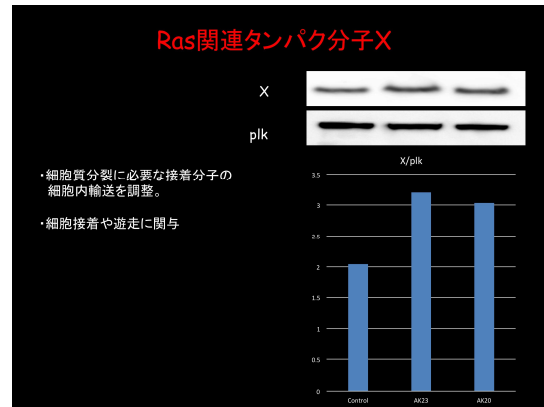
(2) EDTA 処理 ELISA 法

Dsg1 リコンビナントタンパクを固層化した ELISA プレートのマイクロカップを 0.5 mM EDTA にて室温 30 分処理をし、その後、従来の ELISA プロトコールに従い吸光度 (OD₄₅₀) を測定した。

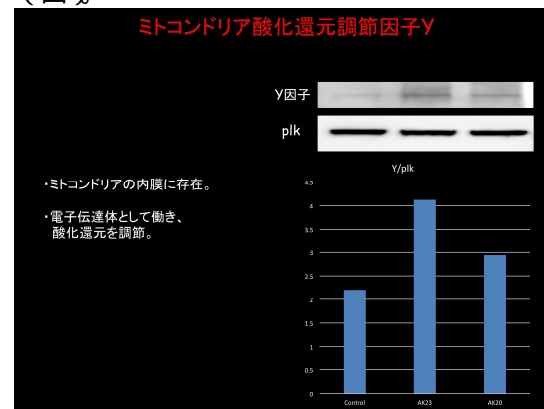
4. 研究成果

(1) 候補分子から実際に発現を確認できたものは、抗体は 40 種類に及ぶため、中で比較的差がみられた 2 分子について分子名は明らかにできないが、報告する。

Ras 関連タンパク分子 X AK23 と AK20 どちらでも増加していた。病変部位では、棘融解を起こした細胞や水疱底の基底細胞の上部に強く発現していた (図)。

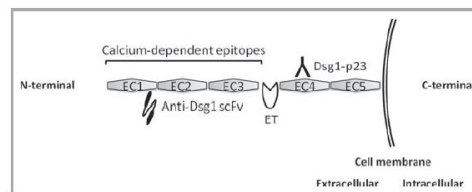


ミトコンドリア酸化還元調節因子 Y AK23 と AK20 どちらでも増加していた。棘融解を起こしている細胞で強く染色性が增强していた (図)。



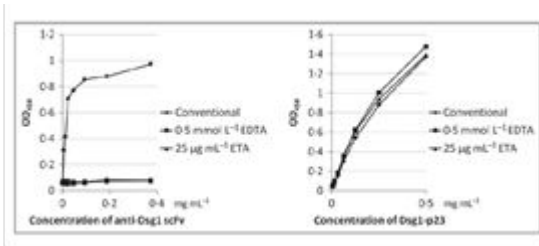
今回差がみられた分子が棘融解に直接関与しているかが検討課題である。天疱瘡培養モデル系で、質量分析法を用いて、分子の分解系に着目したプロトマップ法による解析を開始し、タンパクレベルで結果の再現性を見当している。量と局在のみならず、機能解析を組み合わせるにより、より中心的な役割をする病因シグナル伝達経路を解析していきたい。

(2) すでにエピトープのわかっているモノクロナル抗体を用いて、EDTA 処理した



ELISA plate への結合性を検討した。

立体構造に結合する scFv 抗体と直線構造に結合する p23 抗体を用いて検討した。



EDTA 処理した Dsg1 ELISAplate は、エピソードのスクリーニングに使用できることがわかった。

患者血清の検討 活動期 (A) の病因性の高い抗 Dsg1 抗体と寛解期 (I) の非病因性抗 Dsg1 抗体を含む患者血清を用いてエピソードをスクリーニングした。立体構造に結合する割合を 直線構造に結合する割合を示す。下図に示すように、5 症例でいずれの時期の血清も立体構造 EC1-3 に結合する抗体が主体であることが明らかになった。病因性の違いが見いだされなかった。

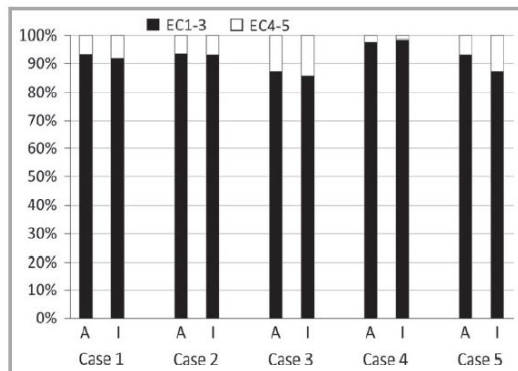


Fig 3. The ratios of antidesmoglein (anti-Dsg)1 antibodies recognizing extracellular domains (EC)1-3 and EC4-5 in the active and inactive phases. The antibodies recognizing EC1-3 were the predominant antibodies in all patients with pemphigus foliaceus in both the active phase (A) and the inactive phase (I).

まとめ 落葉状天疱瘡では、寛解期に検出される抗 Dsg1 抗体のエピソードから病因性を推定する目的で EDTA-Dsg1ELISA 法を応用することはできないことが明らかになった。

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)

論文発表 [雑誌論文](計 5 件)

: Kamiya K, Aoyama Y, Yamasaki O, Kamata A, Yamagami J, Iwatsuki K, Tokura Y. Epitope analysis of antidesmoglein 1

autoantibodies from patients with pemphigus foliaceus across different activity stages. Br J Dermatol. 174(1):113-9.

doi: 10.1111/bjd.14098. 2016 査読あり

: Kamiya K, Aoyama Y, Noda K, Miyake T, Yamaguchi M, Hamada T, Tokura Y, Iwatsuki K. Possible correlation of IgE autoantibody to BP180 with disease activity in bullous pemphigoid. J Dermatol Sci. 78(1):77-9. 2015 doi:

10.1016/j.jdermsci.2015.02.009.査読あり

: Kamiya K, Aoyama Y, Yamaguchi M, Tokura Y, Iwatsuki K. Detection of autoantibodies against the calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 by ethylenediaminetetraacetic acid-treated enzyme-linked immunosorbent assay with mammalian cell expression system. J Dermatol. 42(8):825-7. 2015 doi:

10.1111/1346-8138.12906.査読あり

: Kamiya K, Aoyama Y, Yamaguchi M, Ukida A, Mizuno-Ikeda K, Fujii K, Hamada T, Tokura Y, Iwatsuki K. Clues to diagnosis for unusual mucosal pemphigus demonstrating undetectable anti-desmoglein 3 serum antibodies by routine tests. J Dermatol. 42(6):572-9. doi:

10.1111/1346-8138.12872. 2015 査読あり

: Kamiya K, Aoyama Y, Wakashima C, Kudo T, Nakajima K, Sano S, Ishii N, Teye K, Hashimoto T, Iwatsuki K, Tokura Y. Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3. J Dermatol.

43(4):429-31. 2016 doi:

10.1111/1346-8138.13086. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

: Kamiya K, Aoyama Y, Yamasaki O,
Kamata A, Yamagami J, Iwatsuki K, Tokura
Y. Epitope analysis of antidesmoglein 1
autoantibodies from patients with pemphigus
foliaceus across different activity stages.
JSID. 2015.Dec 12. Okayama Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青山 裕美 (Yumi Aoyama)
川崎医科大学・医学部・皮膚科学・教授
研究者番号: 90291393

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

神谷 浩二 (Koji Kamiya)
自治医科大学・皮膚科・講師

藤井 一恭 (Kazuyasu Fujii)

鹿児島大学医学部・皮膚科学教室・講師
研究者番号: 70452571

近藤 格 (T. Kondo)

国立がん研究センター研究所・希少がん研究
分野・分野長
研究者番号: 30284061

山口 麻里 (Mari Yamaguchi)

岡山大学 大学院生