

- leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes. *J Invest Dermatol* 112 : 67-71, 1999.
- 17) Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, et al : Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137 : 1091-1102, 1997.
- 18) Amagai M, Hashimoto T, Hashimoto K, Kitajima Y, Ymada T, Ohya K, Iwatani H, Nishikawa T : Usefulness of enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmoglein 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999, in press.
- 19) Kitajima Y, Inoue S, Nagao S, Nagata K, Yaoita H, Nozawa Y : Biphasic effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the cell morphology of low calcium-grown human epidermal carcinoma cells : involvement of translocation and down regulation of protein kinase C. *Cancer Res.* 48 : 964-970, 1988.

EFFECTS OF PEMPHIGUS IgG ON DYNAMIC REMODELING OF DESMOSOMES DURING LATERAL MIGRATION OF KERATINOCYTES IN A CELL-CULTURE WOUND HEALING SYSTEM.

Yasuo Kitajima, Takahiro Yamada, Yumi Aoyama. Dept of Dermatol.
Gifu Univ. School of Med., Gifu, Japan

The desmosome (DS) is composed of transmembrane desmosomal cadherins, i. e., desmogleins (Dsg) and desmocollins (Dsc), and intracellular plaque proteins, i. e., plakins and catenins (plakophilin and plakoglobin : PG). During wound healing, it is speculated that keratinocytes must generate dynamic DS remodeling so that they can migrate laterally and cover the wound surface. However, no evidence of the dynamic reorganization of DS during keratinocyte migration has been presented and PV-IgG effects on it have not yet studied so far. To address this question, we produced a dynamic cell-migration condition by cutting cultured cell colonies to form many ditches (1.2 μ m wide) with a pipette chip and examined time-dependent alterations of quantities of individual desmosomal components during resurfacing the wound ditches. After wound ditches were made on the colonies of DJM-1 cells (a human squamous carcinoma cell line) at confluence, cells were incubated with normal human IgG or PV-IgG for 0.5, 1, 4, 24, and 48 hr. The wound ditches were filled with migrated cells at 48 hr after wounding. Harvested cells were homogenized and fractionated into phosphate buffered saline soluble (cytosol), Triton X-100 (TX) soluble (roughly membrane) and TX insoluble (cytoskeletons) fractions, and subjected to immunoblotting using monoclonal or affinity purified polyclonal antibodies to Dsg1, Dsg3, desmoplakin (DPK) and PG. The quantities of TX soluble Dsg1 and Dsg3 decreased dramatically already at 30 min and until 24 hr, and were recovered at 48 hr, whereas those in cytoskeleton fractions were principally constant. More dramatically, cytosol DPK and TX soluble PG decreased, and those in cytoskeletons

clearly indicate that DS components in pools before integrated into DS rapidly and transiently decreased during cell-migration, although those in cytoskeleton fractions are rather constant, suggesting that DS are subjected to a dynamic remodeling during keratinocyte migration on wound healing. When PV-IgG was added in this keratinocyte wound healing system, the ratio of Dsg3/Dsg1 was dramatically reduced 48 hr after wounding compared to that of normal IgG treated wounded cultures. This suggests that PV-IgG exerts more profound effects on the desmosomes of migrating keratinocytes.

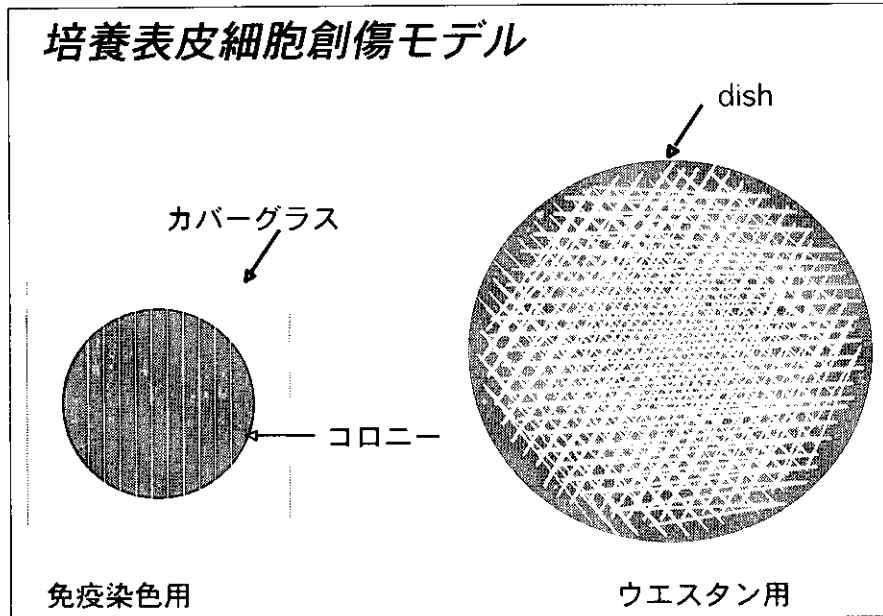


図1 DJM-1細胞の培養創傷モデル

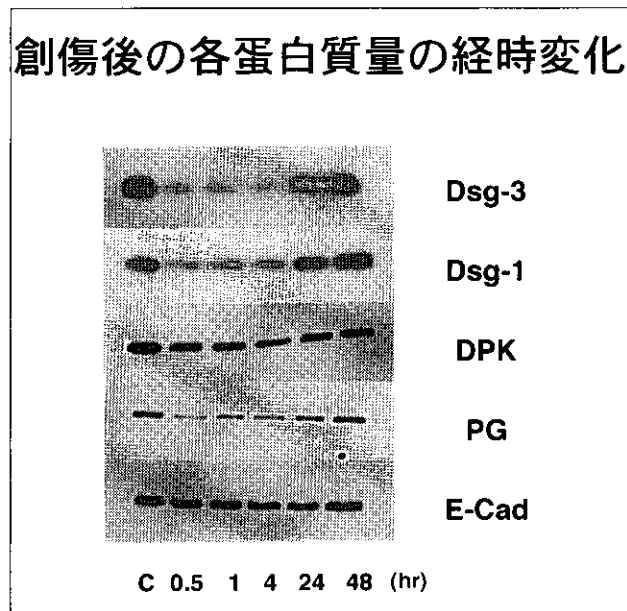


図2 DJM-1細胞創傷培養モデルの治癒過程におけるデスモソ-ム構成分子の量的変化

細胞分画における各蛋白の増減

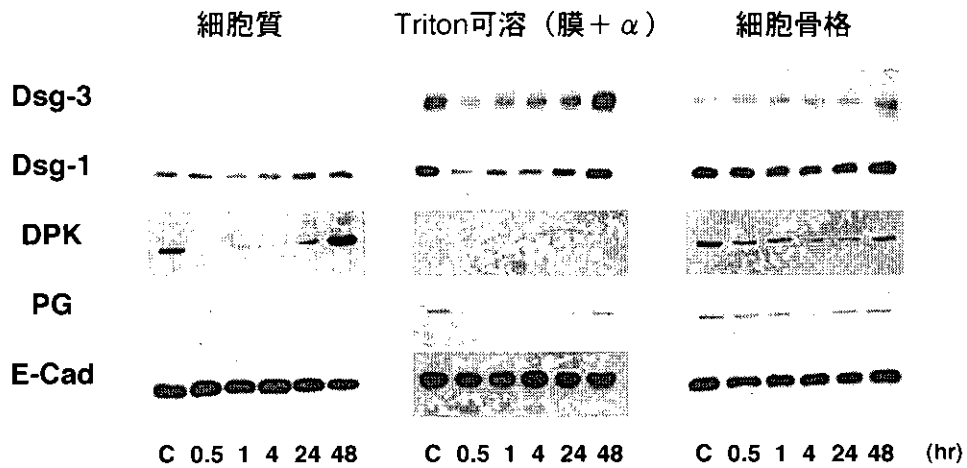


図3 DJM-1細胞創傷培養モデルの治癒過程時デスモソーム構成分子の細胞分画における量的変化。創傷群各時間における。細胞質画分、PBS不溶性-Triton X-100不溶性（細胞骨格）画分、細胞骨格画分の、Dsg3、Dsg1、PG、DPKに対する抗体による免疫プロット。

細胞分画における各蛋白の増減 ～～天疱瘡血清の影響

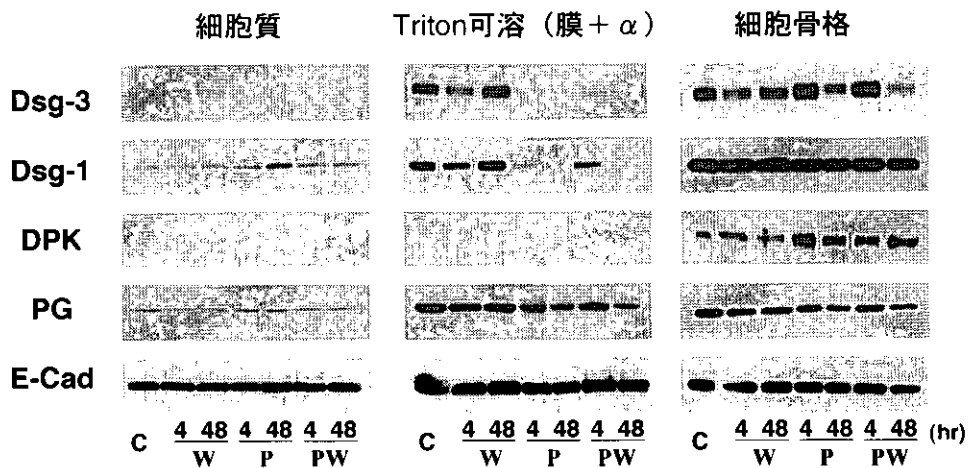


図4 DJM-1細胞創傷培養モデルの治癒過程時デスモソーム構成分子の細胞分画における量的変化に対するPV-IgG刺激の影響。細胞質画分、PBS不溶性-Triton X-100不溶性（細胞骨格）画分、細胞骨格画分の、Dsg3、Dsg1、PG、DPKに対する抗体による免疫プロット。細胞骨格画分でPV-IgG添加群において、非創傷群（Pの48）より創傷群（PWの48）でより著明に減少している。48時間後の細胞骨格におけるDsg1、DPKの減少が全く見られない。すなわち、DSの数の減少はないかあっても微小であることを示唆する。

8) Desmoglein 3, desmocollin 3, plakoglobin は 複合体を作り細胞膜に存在する

分担研究者：北 島 康 雄（岐阜大学医学部皮膚科）

共同研究者：青 山 裕 美、佐 藤 美 貴（岐阜大学皮膚科）

キーワード：天疱瘡、デスモソーム、デスモグレイン、デスモコリン、ケラチノサイト

抄 録

〔目的〕我々は先に天疱瘡抗体（PV-IgG）が desmoglein 3（Dsg3）に結合すると、Dsg3 が 20 分で可溶性画分から、32 時間で desmosome（DS）から消失することを報告した。PV-IgG が Dsg3 に結合しても desmoplakin（PG）、plakoglobin（PG）、Dsg1 は影響を受けなかったが、desmoglein 3（Dsg3）は不定であった。そこで、Dsc3 と Dsg3 が DS に組み込まれる前に結合している可能性について検討した。〔方法〕培養 DJM-1 細胞（ヒト扁平上皮細胞癌）を用いて、1）Dsg3 と Dsc3 に対する抗体による二重染色免疫電子顕微鏡法で細胞膜上の両分子の分布を観察した。2）細胞の 1% Triton X-100 可溶性画分から Dsg3、Dsc3 に対する抗体で免疫沈降を行い両者の結合性を検討した。〔結果と考察〕二重染色免疫電顕を行ったところ、Dsg3、Dsc3 は細胞膜上にケラチン線維と結合しない状態で同一小斑状に共存し、両分子は極めて近い位置に存在していると思われた。一方、1% Triton X-100、Tris, Ph7.4 可溶化画分からの免疫沈降実験では、抗 Dsc3 抗体では、Dsg3 と PG が共沈した。これは Dsg3、Dsc3、PG が安定した Triton X-100 可溶性複合体を形成していることを示唆する。しかし、抗 Dsg3 抗体（AHP319）では PG は共沈したが Dsc3 はしなかった。これはエピトープが Dsc3 結合のためマスクされるためかも知れない。〔結論〕Dsg3、Dsc3 は細胞膜上でデスモソームに組み込まれる前に直接あるいは間接的に結合している可能性が高い。

は じ め に

天疱瘡抗体（PV-IgG）がデスモソーム（DS）構成分子 desmoglein3（Dsg3）に結合した後の水疱形成に至る機序は不明である。我々は水疱形成機序に関して抗体と Dsg3 との結合で惹起される細胞内シグナル伝達の観点から培養ケラチノサイト（KC）と癌（DJM-1）細胞を用いて研究してきた（1）。これまでに PV-IgG の Dsg3 への結合によって、イノシトールリン脂質代謝回転（PI-turnover）亢進（2）と Ca^{++} 流入（3）と protein kinase C（PKC）の活性化が 30 秒以内に生じ（4）、これがプラスミノゲンアクチベータの分泌につながる（5）を報告した。

一方、Dsg3 の細胞表面の分布については、モルモット表皮のトリプシン処理遊離細胞を用いたフェリチンラベル法（6）、マウス表皮を用いたペルオキシダーゼ法（7）、培養マウス表皮ケラチノサイトおよび患者皮膚を用いた金ラベル法（8）、また、患者皮膚のペルオキシダーゼ法（9）による観察結果から、デスモソームとそれ以外の細胞膜表面に分布していることが報告されてきた。しかし、最近では Dsg3 はデスモソームに局限して分布し、非デスモソーム細胞膜表面にはほとんど分布していないという報告が多い（10-15）。また、PV-IgG の結合後 Dsg3 の運命については、細胞内に取り込まれると言う報告（6、7）もあるが、不明な点が多い。我々は

昨年度の研究ではこの点に注目し、Dsg3 の非デスモソーム細胞膜表面での分布様態を検討し、Dsg3 はデスモソームに組み込まれる前には、ケラチン線維と結合しない小斑状とケラチン線維の結合した小斑状（半デスモソーム状）に分布していることを確認した。さらにその PV-IgG 結合後の Dsg3 の分布を検討したところ、PV-IgG の結合 20 分で、Dsg3 のみが膜画分から消失し、30 時間後には膜画分、細胞骨格画分両者から消失した。このとき、PG、DPK、Dsg1 の分布は変化なかったが、Dsc3 は不安定であった。このことは、Dsg3 と Dsc3 の直接的間接的な結合の存在を疑わせた。

そこで、本研究では、培養 DJM-1 細胞（ヒト扁平上皮細胞癌）を用いて、Dsc3 と Dsg3 が DS に組み込まれる前に結合している可能性について検討した。

材 料 と 方 法

1) IgG の精製

尋常性天疱瘡 3 例、および健常人の血清より、ハイトラップープロテイン A-アフィニティカラム（ファルマシア）を用いて IgG 分画を得た。尋常性天疱瘡の診断は臨床症状、直接免疫蛍光抗体法、間接免疫蛍光法およびイムノブロット法によって行われた。また、抗体の Dsg3 への結合性は、リコンビナント Dsg3 を基質にした ELSA 法（18）によって確認し、Dsg1 に対する抗体活性のない血清を用いた。

2) 細胞の培養

ヒト扁平上皮癌細胞から分離した DJM-1 細胞（17）を、Eagle's essential medium (MEM), 0.09mM Ca^{2+} , 0.4ug/ml ハイドロコチゾン、10ng/ml EGF, 84ng/ml コレラトキシン、100units/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、10%FCS を含む培地中で 10mm シャーレ内で培養した。継代後、コンフルエントになった細胞を 1.87mM Ca^{2+} 培地で 1-3 日間培養した後実験に用いた。

3) Dsg3 分布解析のための免疫電顕法

上記のように培養した DJM-1 細胞を 3%パラホルムアルデヒド固定（0.1M リン酸緩衝液、pH7.4）液で 3 分間固定後、PV-IgG で 4℃12 時間反応させた。ついで洗浄後、Dsc3 の細胞外に領域にエピソードを持つモノクローナル抗体（Dsc3-U114）で同様に 12 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として 10nm 金粒子標識抗ヒト IgG 抗体（10nmG-IgG）、5nm 金ラベル抗マウス IgG 抗体で数時間反応し Dsg3 と Dsc3 の二重ラベルを行った。その後 2%グルタルアルデヒド、2%オスミウム酸固定し、常法に従ってエポン 812 に包埋し、薄切した。超薄切片は酢酸ウラニウム、酢酸鉛で後染色した後観察した。

4) 抗 Dsg3、Dsc3 抗体による免疫沈降

培養した DJM-1 細胞を 1% Triton X-100 Tris buffered saline (TBS) で可溶化し、1,500rpm で 10 分間遠心分離した上清に、抗体を結合させた Protein G/sephose ビーズを加え、4℃で 2 時間浸透（回転）した。その後、1% Triton X-100 TBS で 5 回洗浄し、SDS-sample buffer で 100℃ 3 分可溶化し、SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) をこない、免疫ブロットを以下の定法に従って行った。

5) 免疫プロットによる解析

免疫プロット用試料を2%SDS, 10%2-βメルカプトエタノール、30%グリセロール、0.25M トリス液 (pH. 6.8) に溶解 (98°C、5分) 後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し (1レーンあたり30gのサンプル)、その後ニトロセルロース膜に転写した。この膜を、一次抗体として抗デスモソーム構成分子である Dsg1、Dsg3、DPK、PG に対する抗体で免疫プロットを行った。検出は ECL デイテクションシステム (アマシャム) を用いて発色した。

結果と考察

1. DJM-1 細胞表面上の Dsg3、Dsc3 の分布

培養 DJM-1 細胞を固定したのち、その Dsg3 と Dsc3 の分布を二重免疫電子顕微鏡法で観察した。その結果、Dsg3 を示す 10nm 金粒子と Dsc3 を示す 5nm 金粒子はデスモソームはもちろんであるが非デスモソーム細胞膜 (デスモソームとデスモソームの間の細胞膜) 上に両サイズの粒子数個づつからなる微小な凝集塊として分布していた (図1)。

この二重免疫電子顕微鏡の結果、すなわち Dsg3 と Dsc3 とがデスモソームのないフリーの細胞膜表面で極めて近接した状態に分布していることは、それぞれの分子が一回膜通過型分子であることから、互いに側方で直接的あるいは間接的に結合していることを、形態学的に示唆している。この結果から免疫沈降実験を行うことにした。

2. 抗 Dsg3、Dsc3 抗体による免疫沈降

1% Triton X-100、Tris, pH7.4 可溶化画分からの免疫沈降実験では、抗 Dsc3 抗体では、Dsg3 と PG が共沈した。これは Dsg3、Dsc3、PG が安定した Triton X-100 可溶性複合体を形成していることを示唆する。このことは、少なくともこの二分子は antiparallel または parallel で直接あるいは何らかの分子を介して間接的に結合していることを示唆している。しかし、免疫電子顕微鏡の結果を考えあわせると側方 (parallel に) 関係していると思われる。

一方、抗 Dsg3 抗体 (AHP319) では PG は共沈したが Dsc3 はしなかった。これはエピトープが Dsc3 結合のためマスクされるためかも知れない。この点は今後の研究課題である。

以上から、Dsg3、Dsc3 は細胞膜上でデスモソームに組み込まれる前に直接あるいは間接的に側方方向で結合している可能性が高い。

参考文献

- 1) Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1, 4, 5-trisphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J. Invest. Dermatol* 104 : 33-37, 1995.
- 2) Esaki C, Seishima M, Yamada T, Osada K, and Kitajima Y. Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1, 4, 5,-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J. Invest. Dermatol* 105 : 329-333, 1995.
- 3) Osada K, Seichima M, Kitajima Y. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108 : 482-487, 1997.

- 4) Kitajima Y : Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous diseases. *Eur J Dermatol* 6 : 399-405, 1996.
- 5) Seishima M, Satoh S, Nojiri M, Osada K, Kitajima Y : Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109 : 650-655, 1997.
- 6) Takigawa M, Imamura S, Ofuji S : Surface distribution of pemphigus antibodybinding substance(s) on isolated guinea pig epidermal cells. An immunoferritin electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 71 : 182-185, 1978.
- 7) Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, Diaz LA, Anhalt GJ : Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice : a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol* 84 : 41-46, 1985.
- 8) Jones JC, Yokoo KM, Goldman RD : A cell surface desmosome associated component : identification of tissue-specific cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 7283-7286, 1986.
- 9) Bedane C, Prost C, Thomine E, Intrator L, Joly P, Caux F, Blecker M, Bernard P, Leboutet MJ, Tron F, Lauret P, Bonnetblanc JM, Dubertret L : Binding of autoantibodies is not restricted to desmosomes in pemphigus vulgaris : Comparison of 14 cases of pemphigus vulgaris and 10 cases of pemphigus foliaceus studied by Western immunoblot and immunoelectron microscopy. *Arch Dermatol Res* 288 : 343-352, 1996.
- 10) Jones JCR, Yokoo KM, Goldman RD : Further analysis of pemphigus autoantibodies and their use in studies on the heterogeneity, structure and function of desmosomes. *J Cell Biol* 102 : 1109-1117, 1986.
- 11) Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley JR : Pemphigus Vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is located within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol* 122 : 409-415, 1993.
- 12) Iwatsuki K, Takigawa M, Imaizumi S, Yamada M : In vivo binding site of pemphigus vulgaris antibodies and their fate during acantholysis. *J Am Acad Dermatol* 20 : 578-582, 1989.
- 13) Iwatsuki K, Takigawa M, Jin F, Yamada M : Ultrastructural binding site of pemphigus foliaceus autoantibodies : comparison with pemphigus vulgaris. *J Cutan Pathol* 18 : 160-163, 1991.
- 14) Akiyama M, Hashimoto T, Sugiura M, Nishikawa T : Ultrastructural localization of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens in cultured human squamous carcinoma cells. *Br J Dermatol* 125 : 233-237, 1991.
- 15) Zhou S, Ferguson DJP, Allen J, Wojnarowska F : The location of binding sites of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies : a postembedding immunoelectron microscopic study. *Br J Dermatol* 136 : 878-883, 1997.
- 16) Amagi M, Hashimoto T, Hashimoto K, Kitajima Y, Yamada T, Ohya K, Iwatani H, Nishikawa T : Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmoglein 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 199, in press.
- 17) Kitajima Y, Inoue S, Nagao S, Nagata K, Yaoita H, Nozawa Y : Biphasic effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the cell morphology of low calcium-grown human epidermal carcinoma cells : involvement of translocation and down regulation of protein kinase C. *Cancer Res* 48 : 964-970, 1988.
- 18) Aoyama Y, Kitajima Y : Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid breakdown of free desmoglein 3 (Dsg3), leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes. *J Invest Dermatol* 112 : 67-71, 1999.

**DESMOGLEIN 3 IS DIRECTLY OR INDECTLY BOUND
WITH DESMOCOLLIN 3 AND FORMS THEIR LATERAL
AGGREGATIONS ON THE PLASMA MEMBTANE BEFORE
INTEGRATED INTO DESMOSOMES.**

Yasuo Kitajima, Yumi Aoyama, Miki Sato. Dept of Dermatol.
Gifu Univ. School of Med., Gifu, Japan

The core adhesive region of desmosome (DS) consists of DS cadherins, desmogleins (Dsg) and desmocollins (Dsc), both of which include three isoforms (i. e., Dsg1-3 and Dsc1-3). Although Dsg3 and Dsc3 are known to colocalize at desmosomes, it is not yet known whether they are associated before integrated into desmosomes on the plasma membrane. To address this question, we carried out immunoprecipitation and immunoelectron microscopy using affinity-purified polyclonal anti-Dsg3 (AHP319), monoclonal anti-Dsc3 (Dsc3-U114) and antiplakoglobin (PG) (PG5.1) antibodies in human squamous cell carcinoma cell line (DJM-1). Cell extracts in a 20 mM Tris buffer at pH 7.4 containing 1% Triton X100 were immunoprecipitated with anti-Dsc3 monoclonal antibody, which is confirmed to contain no anti-Dsg3 activity using recombinant Dsg3 expressed by baculovirus, and subjected to immunoblotting with anti-Dsg3, anti-Dsc3 and anti-PG antibodies. Dsc3-immunoprecipitates contained Dsg3 and PG, suggesting that Dsg3, Dsc3 and PG form stable complexes. However, anti-Dsg3 antibody, AHP319, did not coimmunoprecipitate Dsc3, whereas it did PG. This may be due to that epitopes of Dsg3 to the antibody may be masked by forming complexes with Dsc3. In order to test whether these complexes are from DS or from those before integrated into DS, we performed double-staining immunoelectron microscopy using pemphigus vulgaris IgG (which is confirmed to react to only Dsg3 by immunoblotting) and anti-Dsc3 antibodies. As well as on the core regions of DS, they colocalized as small clusters consisting of 10 to 30 gold particles on the non-DS plasma membrane without attachment of keratin intermediate filaments. These data indicate that Dsg3 and Dsc3 are directly or indirectly associated and colocalize as small clusters on the plasma membrane before bound to keratin intermediate filaments and integrated into DS.



図1 DJM-1細胞表面上のDsg3、Dsc3の分布

培養DJM-1細胞の抗Dsg3と抗Dsc3、二重免疫電子顕微鏡法で前者は10nm金粒子抗ヒトIgG、後者は5nm金粒子抗マウスIgGでラベルした。その結果、Dsg3を示す10nm金粒子とDsc3を示す5nm金粒子はデスモソーム(a)はもちろんであるが非デスモソーム細胞膜(デスモソームとデスモソームの間の細胞膜)上(b)に両サイズの金粒子数個づつからなる微小な凝集塊として分布していた。

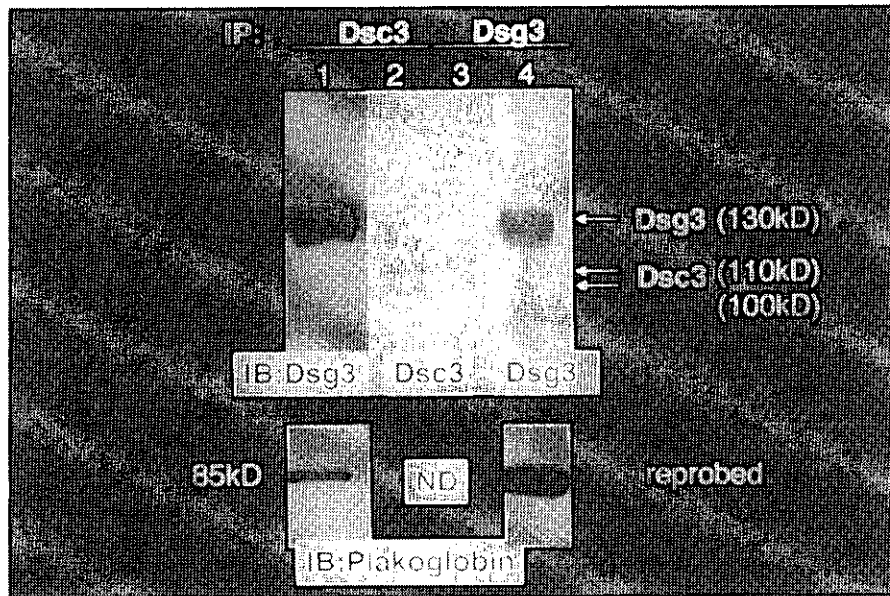


図2 2、抗 Dsg3、Dsc3 抗体による免疫沈降

抗 Dsc3 抗体で、Dsg3 と PG が共沈している。抗 Dsg3 抗体 (AHP319) では PG は共沈しているが、Dsc3 はしていない。

9) デスモゾームカドヘリン変異体導入による 天疱瘡水疱形成機序の検討

研究協力者：橋本 公二（愛媛大学皮膚科）

KEYWORD = 尋常性天疱瘡、E-cadherin、Desmoglein、desmocollin

目 的

表皮細胞間接着機構における E-カドヘリン、デスモグレイン、デスモコリンの機能解析を目的とした。

方 法

細胞外ドメインを欠失した E-cadherin、desmoglein3、desmocollin3 の変異体 (E-cad Δ EC, Dsg3 Δ EC, Dsc3 Δ EC) をアデノウイルスベクターにより E-cadherin を発現しアドヘレンスジャンクションのみを形成する LEC5 cell に導入し、変異体の LEC5 cell への細胞間接着に与える影響を観察した。

結 果

b-catenin をアドヘレンスジャンクションのマーカーとして染色したところ E-cad Δ EC あるいは Dsc3 Δ EC ではアドヘレンスジャンクションの破壊が認められた。また、cell aggregation assay により、E-cad Δ EC あるいは Dsc3 Δ EC は LEC5 細胞の cell aggregates の形成を抑制し、アドヘレンスジャンクションに直接働くことがわかった。

結 論

デスモコリンはアドヘレンスジャンクションに直接影響を及ぼすことからデスモコリンはアドヘレンスジャンクションとデスモゾームへの伝達蛋白として橋渡しの働きをしている可能性が示唆された。

ET=Effect of desmosomal cadherin mutants

AU=Hashimoto Koji

AD=Ehime University School of Medicine, Department of Dermatology

AB=[Purpose]

Our purpose is to examine the function of E-cadherin, desmoglein and desmocollin in cell-cell adhesion system.

[Method]

We studied the effect of extracellular domain deleted-mutants of E-cadherin, desmoglein3, desmocollin3 (E-cad Δ EC, Dsg3 Δ EC, Dsc3 Δ EC) on LEC5 cell. First, we studied the efficiency of adenovirus vector on LEC5 cell by use of GFP. Then we studied the effect of the mutants on b-catenin by immunofluorescence staining. In addition, cell aggregation assay

was performed to examine the mutants direct effects on adherens junction.

[Results]

At a MOI of 100, almost 100% of LEC5 cells expressed exogenous GFP protein. Dsc3 Δ EC Ad changed the staining pattern of b-catenin from cell-cell junction to cytoplasmic portion. Cell aggregation assay revealed that Dsc3 Δ EC disrupted adherens junction formation in LEC5 cell.

[Conclusion]

These results suggest that desmocollin may associate with adherens junction components and play a bridging role between adherens junction and desmosome.

はじめに

皮細胞間接着機構の主なものにアドヘレンスジャンクションとデスモゾームが挙げられる。アドヘレンスジャンクションは、古典的カドヘリンに分類される E-カドヘリンにより形成され、デスモゾームはデスモグレインとデスモコリンの 2 種類デスモゾームカドヘリンにより形成される。過去の報告によりデスモゾームの形成にはまずアドヘレンスジャンクションの形成が必要であることがわかっている。しかしながらデスモゾーム形成におけるデスモグレインとデスモコリンの機能および相互関係はほとんど未知である。我々は、表皮細胞間接着機構における E-カドヘリン、デスモグレイ、デスモコリンの機能解析を目的とし、E-カドヘリン、デスモグレイン 3、デスモコリン 3 の細胞外部領域を一部欠失させた cDNA (E-cad Δ EC, Dsg3 Δ EC, Dsc3 Δ EC) を発現するアデノウイルスベクターを Cre/loxP 法を用いて作製した。これら変異体を HaCaT 細胞に発現したところ Dsg3 Δ EC はデスモゾームのみを破壊し、Dsc3 Δ EC はデスモゾームとアドヘレンスジャンクションの両方を破壊することがわかった。この Dsc3 Δ EC のアドヘレンスジャンクションへの効果が直接アドヘレンスジャンクションに起こっているのか、あるいはデスモゾームを介して起こっているのか調べることを目的とした。

対象と方法

E-カドヘリン、デスモグレイン 3、デスモコリン 3 の細胞外部領域を一部欠失した変異体を組み込んだアデノウイルスベクターを Cre 発現アデノウイルスベクターと同時に E-カドヘリンを発現しアドヘレンスジャンクションのみを形成する LEC5 cell に感染させ、変異体を発現させることにより変異体のアドヘレンスジャンクションとへの影響を調べた。まず LEC5 cell への導入効率を調べるために GFP 発現アデノウイルスベクターを用いた。導入効率確認後アドヘレンスジャンクションのマーカーとして b-catenin の染色を行いその変化を観察した。また cell aggregation assay 法を行い変異体の cell aggregates 形成への影響を調べた。

結 果

GFP 発現アデノウイルスベクターを用いたところ HaCaT 細胞に比べて LEC5 細胞への導入効率は低かったが MOI を 100 まであげることによりほぼ 100% の細胞に外来遺伝子を導入することが可能であることがわかった。続いてそれぞれの変異体を発現し b-catenin の染色を行ったところ Dsg3 Δ EC では変化が認められなかったが、Dsc3 Δ EC の発現により b-catenin は細胞間ではなく細胞質にび漫性に染まった。また、cell aggregation assay 法により Dsc3 Δ EC は cell

aggregates の形成を抑制し Dsc3 Δ EC がアドヘレンスジャンクションの形成を抑制していることがわかった。

考 按 ・ 結 論

Dsc3 Δ EC はアドヘレンスジャンクションの形成をデスモゾームを介することなく直接抑制していることがわかった。このことはデスモコリンがアドヘレンスジャンクションの形成蛋白と関連していることを示唆しており、デスモゾームの形成にまずアドヘレンスジャンクションの形成が必要であるという過去の報告と併せて考えるとデスモコリンはアドヘレンスジャンクションからデスモゾームへの伝達蛋白として橋渡しの働きをしている可能性が推測された。

参考文献

- 1) Amagai M: Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11 : 319-352, 1996
- 2) Amagai M et al: Delayed assembly desmosomes in keratinocytes with disrupted classic-cadherin-mediated cell adhesion by a dominant negative mutant. *J Invest Dermatol* 104 : 27-32, 1995

謝 辞

慶應義塾大学医学部皮膚科天谷雅行先生ならびに当教室の白方裕司、花川靖先生に深謝致します。

10) 悪性腫瘍を合併した自己免疫性水疱症の抗原特異性 —正常ヒト表皮抽出物を用いたイムノブロット法による検索—

研究協力者：村 松 勉（奈良医科大皮膚科）

要 約

悪性腫瘍を合併した 14 例の類天疱瘡および悪性腫瘍を合併していない 23 例の類天疱瘡について、その血中抗体の抗原特異性を正常ヒト表皮抽出物を用いたイムノブロット法により検索した。その結果、230kD および 180kD の抗原蛋白に対して、両群の患者の血中抗体はほぼ同様の反応性を示した。

はじめに

天疱瘡および類天疱瘡をはじめとする自己免疫性水疱症例では、悪性腫瘍を合併しやすいのか否かについては議論のあるところである^{1, 2)}。Ogawa ら³⁾は、本邦においては天疱瘡、類天疱瘡ともに同年齢の対照群と比較して、悪性腫瘍の合併率が有意に高いとの報告をしている。1990 年に Anhalt ら⁴⁾は、主にリンフォーマなどの血液系の腫瘍を高率に合併し、特異的な臨床症状および免疫学的所見を呈する一群の症例を paraneoplastic pemphigus の病名のもとに報告している。最近では英国のグループにより、抗ラミニン 5 抗体を有する肺の小細胞癌の症例が paraneoplastic cicatricial pemphigoid の病名のもとに報告されている⁵⁾。しかし、現在までのところ、水疱性類天疱瘡においては paraneoplastic の病名を冠した症例の報告はみられず、また、悪性腫瘍を合併した多数例での類天疱瘡症例における血中抗体について検討した報告はない。今回、悪性腫瘍を合併した類天疱瘡例での、血中の自己抗体の抗原特異性について、正常ヒト表皮抽出物でのイムノブロット法を用いて検索したので報告する。

材 料 と 方 法

血清

悪性腫瘍を合併した 14 例の類天疱瘡（胃癌 4 例、乳癌 2 例、食道癌、直腸癌、胆嚢癌、喉頭癌、肺癌、前立腺癌、外毛根鞘癌、悪性黒色腫の各 1 例）および悪性腫瘍を合併していない 23 例の類天疱瘡について検索を行った。これらの類天疱瘡の症例は皮疹部の生検では組織学的に表皮下水疱の像を呈し、蛍光抗体直接法では表皮の基底膜部に IgG と C3 の沈着、あるいは、いずれか一方の沈着が認められた。また、1 M の食塩水で表皮と真皮を分離した正常ヒト皮膚を基質として用いた蛍光抗体間接法で、全症例とも表皮側に IgG の線状蛍光を認めた。また、対照として 3 人の正常血清を使用した。

正常ヒト表皮抽出物の調製

皮膚外科の際に得られた正常ヒト皮膚を患者さんの同意のもとに使用した。これらの皮膚組織より脂肪組織および真皮をできる限り剥離した後、4℃の 1 M の食塩水中に 72 時間浸漬した。食塩水中に浸漬した皮膚組織よりピンセットで表皮シートを剥離した。得られた表皮シートを液体窒素で瞬間凍結した後、物理的に粉末状に破碎した。これらの表皮破碎物に蛋白質分解酵素阻

害剤および2%のSDSを含む抽出液を加えてsonicationを行った。次に、3,000rpmで10分間遠心した後、その上清を回収した。これらの上清を100℃で5分間煮沸した後、-70℃のフリーザー中に使用時まで保存した。

イムノプロット法

得られた表皮抽出物を6%のポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を3%のスキムミルクを含むトリス塩酸緩衝液でブロッキングした後、50倍希釈した患者血清と室温で4時間反応させた。次に、100倍希釈したペルオキシダーゼ標識の抗ヒトIgGウサギ血清と室温で3時間反応させ、4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素水を用いて発色させた。

結 果

悪性腫瘍を合併した14例の類天疱瘡での結果を表1および表2に示した。230kDと180kDに陽性バンドを認めた例は14例中6例(43%)、230kDのみに陽性バンドを認めた例は14例中2例(14%)、180kDのみに陽性バンドを認めた例は14例中5例(36%)あり、陽性バンドが認められなかった例が1例あった。悪性腫瘍を合併していない類天疱瘡例での結果を表3に示した。非合併例では230kDと180kDに陽性バンドを認めた例は23例中13例(57%)、230kDのみに陽性バンドを認めた例は23例中3例(13%)、180kDのみに陽性バンドを認めた例が23例中7例(30%)あった。一方、3例の正常血清では、いずれも陽性バンドは認められなかった。

考 按

類天疱瘡は60歳以上の高齢者に好発することより、必ずしも悪性腫瘍を合併しやすくはないとする意見もある6)。一方、類天疱瘡の患者血清中の抗基底膜部抗体に関して、悪性腫瘍を合併した症例では抗体価が陰性あるいは低値であるとの報告もある7, 8)。現在までのところ、類天疱瘡の症例についてはparaneoplastic pemphigusのように、悪性腫瘍を合併する例に特異的な自己抗体は報告されていない。類天疱瘡の抗原蛋白には、細胞質内に局在する分子量が230kDのBP230と、細胞膜貫通性の蛋白である分子量が180kDのBP180が存在することが明らかにされている。マウスでの実験モデルにおいてはこれらの抗原蛋白のうち、BP180の細胞外部分の細胞膜貫通部に近い非コラーゲン部分であるNC16Aドメインが病原性エпитープであることが証明されている9)。

ところで、前立腺癌においては、BP230は種々の程度の発現が認められるが、BP180はその発現が完全に消失するとの報告がある10)。さらに、皮膚の悪性腫瘍である基底細胞癌や有棘細胞癌ではBP180の発現が減弱するとの報告もある11)。今回の実験結果では、悪性腫瘍を合併した類天疱瘡例と悪性腫瘍を合併していない類天疱瘡例の間には、その血中抗体のBP180に対する反応性に関しては特に大きな差異は認められなかった。

BP180のリコンビナント蛋白を用いたイムノプロット法では、癩痕性類天疱瘡例ではBP180の種々の部位に反応性を有するとの報告がある12)。しかし、悪性腫瘍を合併した類天疱瘡例ではその血中抗体が、BP180のどのドメインに反応しやすいのか、また、悪性腫瘍を合併していない例との比較検討もなされていない。今後、BP180のリコンビナント蛋白を用いたイムノプロット法により、以上の点について検索を進める予定である。

参考文献

- 1) Callen JP. Internal disorders associated with bullous disease of the skin. A critical review. *J Am Acad Dermatol* 1980; 3 : 107-119.
- 2) Venning VA, Wojnarowska F. The association of bullous pemphigoid and malignant disease : a case-control study. *Br J Dermatol* 1990; 123 : 439-445.
- 3) Ogawa H, Sakuma M, Morioka S et al. The incidence of internal malignancies in pemphigus and bullous pemphigoid in Japan. *J Dermatol Sci* 1995; 9 : 136-141.
- 4) Anhalt GJ, Kim S-C, Stanley JR et al. Paraneoplastic pemphigus : an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323 : 1729-1735.
- 5) Setterfield J, Shirlaw PJ, Lazarova Z et al. Paraneoplastic cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 1999; 141 : 127-131.
- 6) Lindelof B, Islam N, Ekland G, Arfors L. Pemphigoid and cancer. *Arch Dermatol* 1990; 126 : 66-68.
- 7) Hodge L, Marsden RA, Black MM et al. Bullous pemphigoid : the frequency of mucosal involvement and concurrent malignancy related to indirect immunofluorescence findings. *Br J Dermatol* 1981; 105 : 65-69.
- 8) Venencie PY, Rogers III RS, Schroeter AL. Bullous pemphigoid and malignancies : relationship to indirect immunofluorescent findings. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1984; 64 : 316-319.
- 9) Liu z, Diaz LA, Troy J et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using autoantibodies generated against the hemidesmosome antigen BP180. *J Clin Invest* 1993; 92 : 2480-2485.
- 10) Nagle RB, Knox JD, Wolf C et al. Adhesion molecules, extracellular matrix, and proteases in prostate carcinoma. *J Cell Biochem* 1994; 19 (Suppl.) : 232-237.
- 11) Fairley JA, Heintz PW, Neuburg M et al. Expression pattern of the bullous pemphigoid-180 antigen in normal and neoplastic epithelia. *Br J Dermatol* 1995; 133, 385-391.
- 12) Balding SD, Prost C, Diaz LA et al. Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* 1996; 106 : 141-146.

表1 イムノブロット法の結果

症例	悪性腫瘍	230kD	180kD
1	胃 癌	-	+
2	直 腸 癌	-	+
3	胃 癌	-	+
4	乳 癌	+	-
5	胃 癌	-	-
6	胃 癌	+	+
7	乳 癌	+	+
8	肺 癌	-	+
9	悪 性 黒 色 腫	+	+
10	胆 嚢 癌	-	+
11	喉 頭 癌	+	+
12	食 道 癌	+	+
13	外 毛 根 鞘 癌	+	-
14	前 立 腺 癌	+	+

表2 悪性腫瘍合併例

	230kD (+)	230kD (-)
180kD (+)	6 / 14 (43%)	5 / 14 (36%)
180kD (-)	2 / 14 (14%)	1 / 14 (7%)

表3 悪性腫瘍非合併例

	230kD (+)	230kD (-)
180kD (+)	13 / 23 (57%)	7 / 23 (30%)
180kD (-)	3 / 23 (13%)	0 / 23 (0%)

11) 悪性腫瘍を合併した自己免疫性水疱症の抗原特異性 —BP180のリコンビナント蛋白を用いたイムノプロット法による検索—

研究協力者：村 松 勉（奈良医科大皮膚科）

要 約

悪性腫瘍を合併した14例の類天疱瘡および悪性腫瘍を合併していない23例の類天疱瘡について、その血中抗体の抗原特異性をBP180のリコンビナント蛋白を用いたイムノプロット法により検索した。その結果、悪性腫瘍を合併している類天疱瘡例では、悪性腫瘍を合併していない類天疱瘡例に比べ、BP180のC末端部に反応する抗体を有する例がより多いことが明らかになった。

はじめに

天疱瘡や類天疱瘡などの自己免疫性水疱症では悪性腫瘍を合併しやすいとの報告がある¹⁾。特に類天疱瘡は60歳以上の高齢者に好発することより、悪性腫瘍の合併の有無には注意を払う必要があると考えられる。現在のところ、類天疱瘡の抗原蛋白には細胞内に局在する230kDの蛋白（BP230）と細胞膜貫通性の蛋白である180kDの蛋白（BP180）が存在することが知られている。マウスを用いた実験モデルでは類天疱瘡においてはBP180のNC16Aドメインが病原性エピトープであるとされている²⁾。今回、悪性腫瘍を合併する類天疱瘡患者の血中抗体のリコンビナントBP180に対する反応性について、悪性腫瘍を合併していない類天疱瘡例と比較検討したところ、興味ある所見が得られたので若干の考察を加えて報告する。

材 料 と 方 法

血 清

悪性腫瘍を合併した14例の類天疱瘡（胃癌4例、乳癌2例、食道癌、直腸癌、胆嚢癌、喉頭癌、肺癌、前立腺癌、外毛根鞘癌、悪性黒色腫の各1例）および悪性腫瘍を合併していない23例の類天疱瘡について検索を行った。これらの類天疱瘡の症例は皮疹部の生検では組織学的に表皮下水疱の像を呈し、蛍光抗体直接法では表皮の基底膜部にIgGとC3の沈着、あるいは、いずれか一方の沈着が認められた。また、1Mの食塩水で表皮と真皮を分離した正常ヒト皮膚を基質として用いた蛍光抗体間接法で、全症例とも表皮側にIgGの線状蛍光を認めた。また、対照として3人の正常血清を使用した。

リコンビナント蛋白の調製

180kDの類天疱瘡抗原（BP180）のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）リコンビナント蛋白を産生するE.coliはBalding博士より供与された³⁾。今回は、BP180の病原性エピトープとされるNC16Aドメインにある42個のアミノ酸を含むGST-リコンビナント蛋白であるSΔ1、および、BP180のC末端部の49個のアミノ酸を含むGST-リコンビナント蛋白である4575を以前と同様の方法¹⁾を用いて調製した。

イムノプロット法

S Δ 1、4575 およびリコンビナント GST を 12% のポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を 3% のスキムミルクを含むトリス塩酸緩衝液でブロッキングした後、50 倍希釈した患者血清と室温で 4 時間反応させた。次に、100 倍希釈したペルオキシダーゼ標識の抗ヒト IgG ウサギ血清と室温で 3 時間反応させ、4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素水を用いて発色させた。

結 果

悪性腫瘍を合併した類天疱瘡 14 例の結果を表 1 および表 2 に示した。悪性腫瘍を合併した類天疱瘡例では、14 例中 4 例 (29%) が S Δ 1 と 4575 の両方に陽性反応を示し、14 例中 6 例 (43%) が S Δ 1 のみに陽性反応を示した。また、合併例では、14 例中 1 例 (7%) が 4575 のみに陽性反応を示したが、S Δ 1 および 4575 のいずれとも反応しない例が 14 例中 3 例 (21%) 存在した。一方、悪性腫瘍を合併していない類天疱瘡例では、23 例中 3 例 (13%) が S Δ 1 と 4575 の両方に陽性反応を示し、23 例中 19 例 (83%) が S Δ 1 のみに陽性反応を示した。また、非合併例では 4575 のみに陽性反応を示した例はなく、S Δ 1 と 4575 のいずれとも反応しなかった例が 23 例中 1 例 (4%) 存在した (表 3)。なお、すべての血清はリコンビナント GST とは陽性反応を示さず、3 例の正常血清ではいずれも陽性バンドは認められなかった。

考 按

類天疱瘡をはじめとする自己免疫性水疱症と悪性腫瘍との合併に関しては種々の考え方がある。一般に、自己免疫疾患を有する患者には腫瘍免疫を含めた免疫異常が存在し、また、自己免疫疾患の治療に長期間にわたり投与される免疫抑制剤がさらに腫瘍免疫異常を助長させる可能性も考えられる。一方、悪性腫瘍細胞そのものから自己免疫性水疱症の抗原蛋白が分泌されることより、自己抗体が産生され、そのことにより水疱病変が発症するのではないかとの報告もある⁵⁾。ところで、BP180 は細胞膜貫通性の蛋白であり、その C 末端部は細胞外より真皮側に存在するとされている⁶⁾。今回のイムノプロット法での検索により、BP180 の C 末端部の 49 個のアミノ酸を含むリコンビナント蛋白である 4575 との反応性は、悪性腫瘍合併例では 14 例中 5 例 (36%) が陽性反応を示したのに対し、非合併例では 23 例中 3 例 (13%) のみに陽性反応がみられた。今後、より多くの症例での検索が必要と思われるが、悪性腫瘍を合併した類天疱瘡では、非合併例と比較し、BP180 の C 末端部に陽性反応を示す血中抗体を有する例がより多いことが示唆された。悪性腫瘍を合併する類天疱瘡例では、BP180 の C 末端部に対する自己抗体がより高頻度に検出されるのかの理由は不明であるが、前立腺癌⁷⁾ や皮膚癌⁸⁾ では BP230 ではなく BP180 の発現が消失あるいは減弱するとの報告もあることより、悪性腫瘍と類天疱瘡との関連性を考えるうえで興味ある所見と思われる。

参考文献

- 1) Ogawa H, Sakuma M, Morioka S et al. The incidence of internal malignancies in pemphigus and bullous pemphigoid in Japan. *J Dermatol Sci* 1995; 9: 136-141.
- 2) Liu z, Diaz LA, Troy J et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous