

図 3

血清標準法試料と16倍希釈血清試料のDsg3・ELISA値。標準法では飽和して観察できない治療経過によるDsg3抗体価の減少が16倍希釈することによって観察されるようになった。

7) 天疱瘡抗体はデスモソーム形成の構造的阻害をしないで デスモグレイン3欠損デスモソームを作るという証拠

分担研究者：北 島 康 雄（岐阜大学医学部皮膚科）

共同研究者：辻 村 有 紀、佐 藤 美 貴、青 山 裕 美
（岐阜大学医学部皮膚科）

要 約

天疱瘡自己抗体（PV-IgG）結合後棘融解までのデスモソーム消失機序を明らかにするために、 Ca^{2+} 依存性デスモソーム形成過程に対する PV-IgG の影響を研究した。正常ヒトケラチノサイト、DJM-1 を低 Ca^{2+} （0.3mM）で120時間培養した後、PV-IgG 添加30分後および30時間後、高 Ca^{2+} （1.2mM）にシフトし、2時間後デスモソーム分子に対する抗体を用いて蛍光抗体、免疫電顕、免疫ブロットでデスモソームの形成状態を観察した。PV-IgG 添加30分反応させても Ca^{2+} シフト後 PV-IgG が結合したままの半デスモソームは向かい合って会合しデスモソームを形成した。すなわち、PV-IgG はデスモソーム形成を阻害しなかった。PV-IgG 添加30時間後に Ca^{2+} シフトした試料は Dsg3 欠損デスモソームを形成した。このとき Dsg3 は昨年度の研究結果から半デスモソームに取り込まれないでエンドサイトーシス、分解されていると推測された。

は じ め に

天疱瘡抗体（PV-IgG）がデスモソーム構成分子 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^{2+} 流入³⁾と protein kinase C（PKC）の活性化⁴⁾が30秒以内に生じ、これがプラスミノゲンアクチベータの分泌につながることを⁵⁾を報告した¹⁾。

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 はデスモソームに限局して分布し、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¹⁶⁾。さらにその PV-IgG 結合後の Dsg3 の動態を検討したところ、PV-IgG の結合20分で、Dsg3 がリン酸化され、分解され¹⁷⁾、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¹⁸⁾。このとき、PG、DPK、Dsg1 の分布は変化なかった。

そこで、本研究では、正常ヒトケラチノサイトおよび培養 DJM-1 細胞（ヒト扁平上皮細胞癌）

を用いて、天疱瘡抗体が半デスモソームに結合することが、そのカップリングによってデスモソームを形成することを阻害するかどうか検討した。

方 法

1) 細胞の培養

正常ヒトケラチノサイト（クラボウ）およびヒト扁平上皮癌細胞から分離した DJM-1 細胞を、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、100ng/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¹⁹⁾。継代後、コンフルエントになった細胞を低 (0.05mM) Ca^{2+} 培地で 120 時間培養した後実験に用いた。

2) 半デスモソームへの PV-IgG の結合

低カルシウム培養ケラチノサイトはデスモソームを形成しないで、半デスモソームを形成している²⁾。この状態に天疱瘡抗体を結合させるために補体を非動化した血清を 10% になるようにまたは PV-IgG (全 IgG で 0.2-0.3mg/ml) を添加し、30 分または 30 時間培養し、 Ca^{2+} を添加し高 Ca^{2+} 培地にスイッチした。ついで、メタノールで固定し、蛍光抗体法で接着分子の動態を観察した。

3) 接着分子の蛍光抗体方による観察

カバーガラス上に培養した細胞をメタノールで固定した後、抗 E-カドヘリン抗体 (モノクローナル; HECD-1)、抗デスモコリン 3 抗体 (モノクローナル; Dsc3-U114)、抗デスモプラキン抗体 (モノクローナル; DP2.17)、抗デスモグレイン 3 抗体 (ポリクローナル・アフィニティ精製; AHP319) とそれぞれに対する FITC ラベルで染色した⁴⁾。

4) Dsg3 分布解析のための免疫電顕法

上記のように低 Ca^{2+} で 120 時間培養した DJM-1 細胞の培地に天疱瘡血清 (Dsg3 とのみ反応することを免疫プロット、Dsg1,3 ELISA で確認した) を添加し、5 分間のみ反応させ、フレッシュ培地で 3 回洗浄後、抗ヒト IgG-5nm 金粒子結合抗体でさらに 5 分間培養した後、高 Ca^{2+} スイッチを行った。2 時間後に細胞を 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、2% グルタルアルデヒド、2% オスミウム酸固定し、常法に従ってエボン 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²⁾。

結果と考察

1. 天疱瘡抗体は Ca^{2+} でスイッチ依存性デスモソーム形成を阻害しない

低 Ca^{2+} 培養細胞 (正常ヒトケラチノサイト、DJM-1 細胞) の Dsg3、Dpk、Dsc3、E-Cad はそれぞれ、細胞内に点状あるいは均質に分布して、細胞間には分布していない (図 1)。これは、高 Ca^{2+} 培養細胞ではすべて細胞間に線状あるいは点線状に分布し細胞接着が存在することを示していることと対称的である。この状態に天疱瘡抗体を添加して 30 分間培養しても基本的にこれらの分子の分布に変化はなかった (図なし)。

このような状態に天疱瘡を添加し、30分後に高Ca²⁺スイッチを行い、2時間培養したところ、すべての分子が細胞間に線状または点線状に配列した。このことは、天疱瘡抗体の存在下にもかかわらず、E-Cadの再配列はアドヘレンス・ジャンクションの形成を、そのほかの分子の線状配列はデスモソームの形成を示唆している。

この試料の抗ヒトIgG-FTIC抗体と、抗Dsg3ウサギ抗体、抗ウサギIgG-ローダミン抗体で2重染色したところこれらの抗体は共存したので、確かに天疱瘡IgGが結合したままデスモソームが形成されたことを示唆している。このことは次のように免疫電顕でも確かめられた。

2. 免疫電顕による天疱瘡IgG結合半デスモソームのデスモソーム形成会合

低Ca²⁺で120時間培養したDJM-1細胞の培地に天疱瘡血清(Dsg3とのみ反応する)を添加し、5分間のみ反応させ、フレッシュ培地で3回洗浄後、抗ヒトIgG-5nm金粒子結合抗体でさらに5分間培養した後、高Ca²⁺スイッチを行った。その結果、PV-IgG(5nm金粒子)の結合した半デスモソーム構造とそれらが会合してデスモソームになった構造が観察された(図3)。このことは、PV-IgGが結合したまま向かい合った半デスモソームが結合してデスモソームを形成したことを示唆している。

すなわち、PV-IgGさらには5nm金粒子結合の二次抗体さえもデスモソーム形成を阻害しないことを示唆している。

3. 長時間天疱瘡抗体処理低Ca²⁺細胞はCa²⁺スイッチでDsg3欠損デスモソームを形成する

低Ca²⁺培養細胞(正常ヒトケラチノサイト)にPV-IgGを添加し30時間培養後高Ca²⁺培地にスイッチしたところ、Dsg3は細胞内または細胞表面に点状に分布したままであったが、Dpk、Dsc3、E-Cadはそれぞれ細胞間に点状あるいは点線状に再配列した。このことはDsg3欠損デスモソームの形成を示唆している。また、PV-IgGがE-Cadの細胞間への再配列に影響を与えなかったことは、アドヘレンス・ジャンクションの形成にも影響を与えなかったことを示唆している。

お わ り に

低-高Ca²⁺スイッチデスモソーム形成において、天疱瘡抗体がデスモソーム形成を阻害しなかったことは、天疱瘡抗体がDsg3に結合することが単純に構造阻害によるデスモソーム崩壊・棘融解を生じるのではないことを示唆している。このことは天疱瘡抗体のDsg3との結合から水疱形成までの過程の複雑さを示唆している。

参考文献

- 1) Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M: Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: Involvement of protein kinase C. JID Symposium Proceedings 4:137-144, 1999
- 2) 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.

- 3) Esaki C, Seishima M, Yamada T, Osada K, 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.
- 4) Osada K, Seishima 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.
- 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 antibody-binding 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 auto-antibodies 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 post-embedding immunoelectron microscopic study. *Br J Dermatol* 136:878-883, 1997
- 16) Sato M, Aoyama Y, Kitajima Y: Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 80:1583-1592, 2000
- 17) Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y: A pathogenic autoantibody, pemphigus IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* 29:2233-2240, 1999
- 18) Aoyama Y, Kitajima Y: Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human

squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *J Invest Dermatol* 112:67-71, 1999

- 19) Kitajima Y, Inoue I, 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

Evidence that Pemphigus Vulgaris IgG Causes no Steric Hindrance in Desmosome Formation, but Forms Desmoglein 3-Deficient Desmosomes.

Yasuo Kitajima, Yuki Tsujimura, Miki Sato and Yumi Aoyama,

Department of Dermatology, Gifu Univ. School of Medicine

When keratinocytes (KC) are grown in low Ca^{++} (0.05mM) medium, they produce no desmosomes (DS) but continuously form "half-DS", which are endocytotically internalized without forming DS. However, they couple with each other to form DS within 2 h when Ca^{++} is switched to high (1.2mM). We examined effects of pemphigus IgG (PV-IgG) on this Ca^{++} induced-coupling of "half-DS" to form DS. Low Ca^{++} -grown normal human keratinocytes (NHK) and human squamous cell carcinoma (DJM-1) cells were pre-treated with PV-IgG or normal human IgG for 30 min or 30 h in low Ca^{++} , and Ca^{++} concentration in the medium was switched up to high. After 2-h incubation in high- Ca^{++} -switched medium, these cells were studied by immuno-fluorescence (IF), immunoelectron microscopy (IEM) and western blot analysis using anti-Dsg3, Dsg1/2, desmocollin 3 (Dsc3), and desmoplakin 1/2 (Dpk) antibodies. Low Ca^{++} -grown cells contained Dsg3, Dpk and Dsc3, but not Dsg1/2, in cytoskeleton fractions as detected by western blotting and showed their punctate distribution in the cytoplasm and/or on the cell membrane but not at cell-cell contacts by IF. IEM revealed binding of PV-IgG on the "half-DS" on the cell surface of low Ca^{++} -cells. High- Ca^{++} switched cells after pre-treated with PV-IgG for 30 min in low Ca^{++} showed linear dots of Dsg3 at cell-cell contacts, whereas high- Ca^{++} switched cells pre-treated with PV-IgG for 30 h in low Ca^{++} showed no linear, but a random punctate distribution of Dsg3 in the cells. In contrast, Dsc3 and DPK showed linear dots at cell-cell contacts in both 30-min and 30-h pre-treated cells with PV-IgG, suggesting desmosome formation after high- Ca^{++} -switch. When low Ca^{++} cells were treated PV-IgG for 5 min and labeled with anti-human IgG-5 nm gold antibody for 5 min in low Ca^{++} medium and followed by incubation in high Ca^{++} for 2 h, gold-labels were detected on the newly formed DS as well as "half-DS". These results suggest that PV-IgG causes no steric hindrance in DS formation, but forms Dsg3-deficient DS.

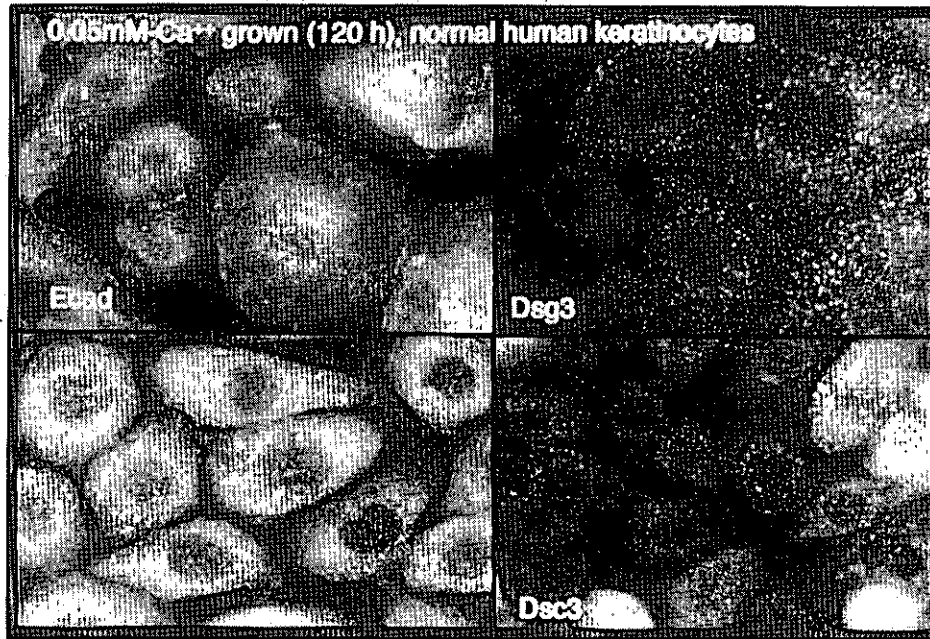


図1

低 Ca^{2+} 120時間培養正常ヒトケラチノサイト。E-カドヘリン (Ecad)、デスモグレイン3 (Dsg3)、デスモプラキン (Dpk)、デスモコリン3 (Dsc3) はそれぞれ細胞内に点状あるいは均質に分布していて、細胞間 (接着部) には分布していない。

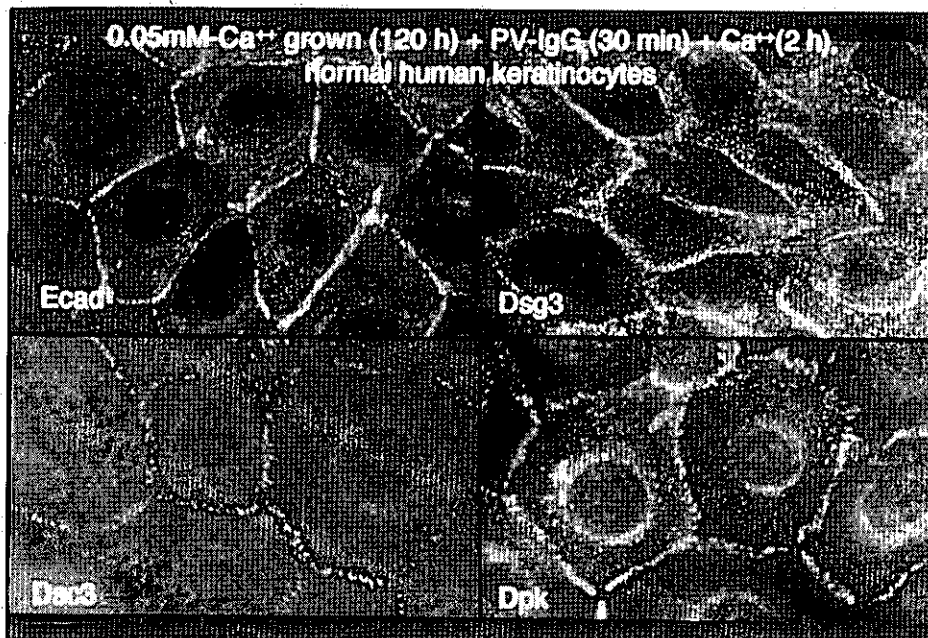
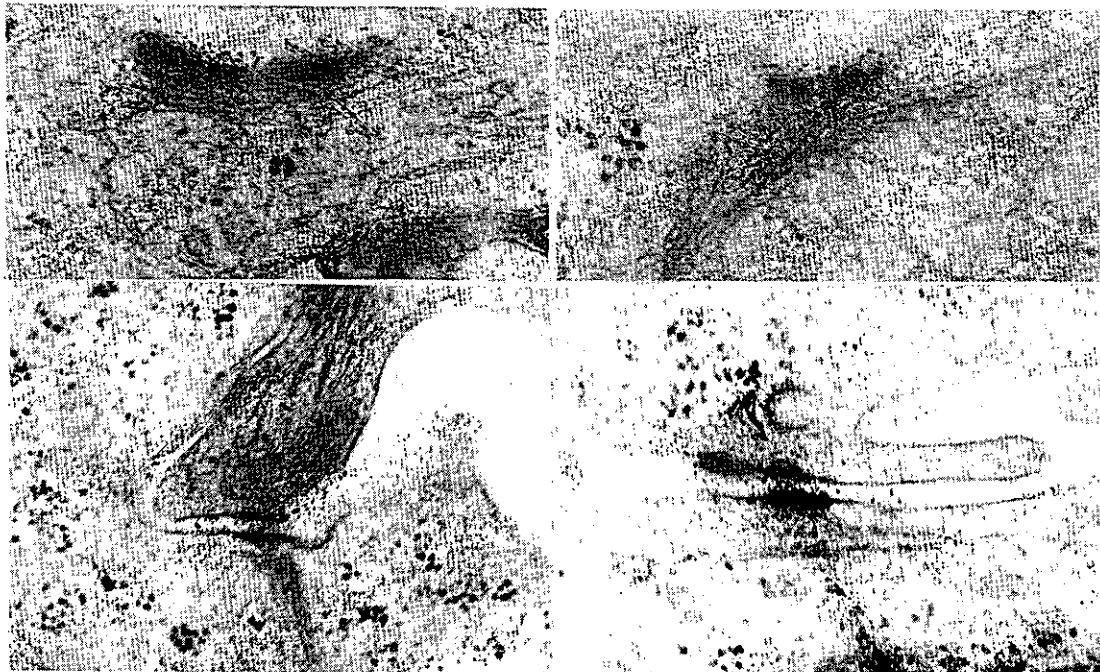


図2

低 Ca^{2+} 120時間培養成上皮とケラチノサイトにPV-IgG添加30分後、 Ca^{2+} スイッチを行って、正常 Ca^{2+} 培養2時間後の試料。E-カドヘリン (Ecad)、デスモグレイン3 (Dsg3)、デスモプラキン (Dpk)、デスモコリン3 (Dsc3) はすべて細胞間に点線状に再配列している。これは天疱瘡IgG存在下でも、 Ca^{2+} スイッチによってアドヘレンス・ジャンクション、デスモソームの形成を示唆している。



Low Ca^{2+} -grown DJM-1 cells were treated with PV-IgG, which binds only to Dsg3, For 5min, following by 5-min treatment with anti-human IgG-5nm gold, then exposed to high Ca^{2+} -medium for 2 hr, then finally fixed.

図 3

天疱瘡 IgG がデスモソーム形成阻害をしないことを示唆する免疫電顕所見。低 Ca^{2+} 培養細胞に天疱瘡 IgG 添加 5 分後洗浄し、抗ヒト IgG-5nm 金粒子結合二次抗体で 5 分間染色し、洗浄後 Ca^{2+} スイッチして 2 時間培養した DJM-1 細胞。半デスモソーム構造に充分 PV-IgG 結合していることを示す金粒子が見られる (上段)。また、PV-IgG が結合したデスモソームが見られる。これは PV-IgG が結合したままの半デスモソームが会合してデスモソームになったことを示唆している。

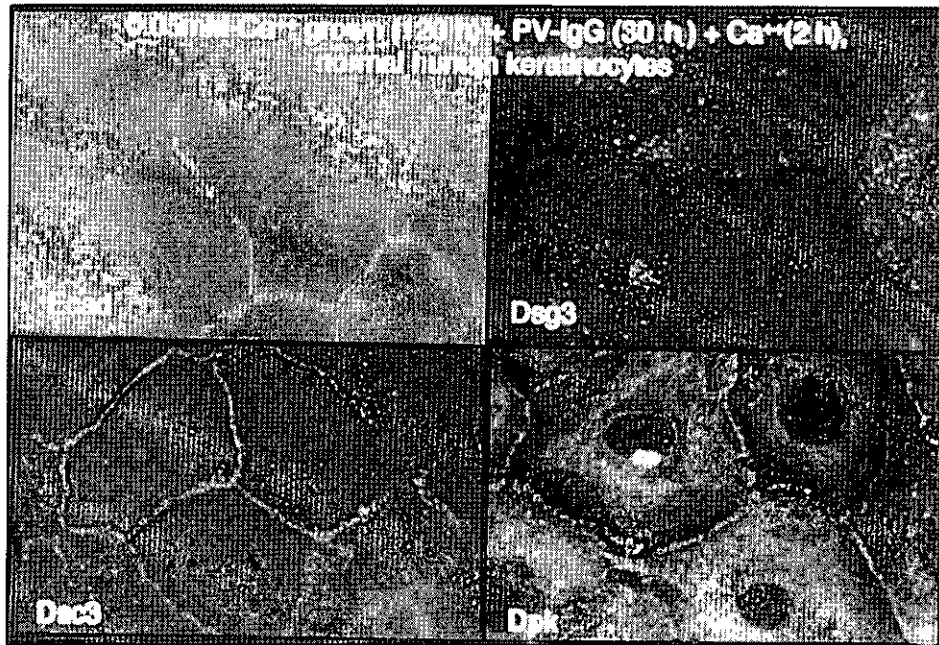


図4

低 Ca^{2+} 120時間培養成上皮とケラチノサイトにPV-IgG添加30時間後、 Ca^{2+} スイッチを行って、正常 Ca^{2+} 培養2時間後の試料。E-カドヘリン (Ecad)、デスモプラキン (Dpk)、デスモコリン3 (Dsc3) はすべて細胞間に点線状に再配列しているが、デスモグレイン3 (Dsg3) は細胞質に残ったままで細胞間接着に分布していない。これは天疱瘡IgG存在下30時間では、 Ca^{2+} スイッチによってアドヘレンス・ジャンクション、デスモソームは形成されるが、そのデスモソームにはDsg3を含まないことを示唆している。

8) Desmoglein 1 と Desmoglein 3 の dominant negative mutant の細胞接着への影響の違い

研究協力者：橋本 公二（愛媛大学医学部皮膚科）

要 旨

我々は表皮ケラチノサイトの細胞接着における classic cadherin, desmosomal cadherin の機能を検討するため、細胞外ドメインを欠失した E-cadherin, desmoglein3, desmocollin3a の変異体 (Ecad Δ EC, Dsg3 Δ EC, Dsc3a Δ EC) 組換えアデノウィルスベクター (Ad) を Cre/loxP system により作製し、HaCaT 細胞に感染したところ、Dsg Δ EC によりデスモゾームの破壊が、Ecad Δ EC、あるいは Dsc3a Δ EC ではアドヘレンスジャンクションとデスモゾームの両方の破壊が認められた。すなわち desmocollin はアドヘレンスジャンクションとデスモゾームをつなげる働きをしていることをすでに報告した。本年度は、同様の方法を用いて desmoglein1 の変異体 (Dsg1 Δ EC) を発見する Ad を作製し、Dsg1 Δ EC と Dsg3 Δ EC の違いを検討した。変異体の発現レベルが高いときでは Dsg1 Δ EC、Dsg3 Δ EC ともにケラチンの凝集およびデスモプラキンの細胞質での染色が認められた。すなわち、デスモゾームの形成が抑制された。しかし、変異体の発現レベルが低いときには Dsg3 Δ EC では部分的にデスモゾームの形成が抑制されたにすぎなかった。これらの結果より Dsg1 Δ EC のデスモゾームを破壊する能力は Dsg3 Δ EC より強く Dsg1 と Dsg3 のデスモゾームの形成能力に違いがある可能性が示唆された。

はじめに

表皮細胞間接着機構の主なものには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種類のデスモゾームカドヘリンにより形成される。我々はこれまでに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について明らかにしてきた。すなわち、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デスモコリンが担っていることを明らかにした。一方、デスモグレインにはデスモグレイン1とデスモグレイン3が表皮においては主に発現されているが、それぞれのデスモゾーム形成における機能は明らかとなっていない。そこで、それぞれの変異体をアデノウィルスベクターを用いて HaCaT 細胞に導入し、デスモゾーム形成にかかわる機能の差について検討した。

方 法

デスモグレイン1およびデスモグレイン3の細胞外領域を欠失させた変異体を発現するアデノウィルスベクター (AdexDsg1 Δ EC, AdexDsg3 Δ EC) は斎藤らの方法に準じ作製した (図1)。HaCaT 細胞は DMEM 培地にて培養した。アドヘレンスジャンクションの形成の評価は β カテニンを染色することにより、また、デスモゾームの形成の評価はケラチン、デスモプラキンを蛍光抗体法で染色することにより判定した。変異体蛋白の発現は抗 myc 抗体でウェスタンブロッ

トを行うことにより確認した。

結 果

AdexDsg1 Δ EC、AdexDsg3 Δ ECをHaCaT細胞にMOI (multiplicity of infection) を変えて感染させ、変異体蛋白の発現をウェスタンブロット法にて確認した。確認には抗myc抗体を使用した。コントロールウィルスであるAdex1wでは抗myc抗体で検出できるバンドは見られなかった。AdexDsg1 Δ EC、AdexDsg3 Δ ECともMOI=10にてそれぞれ相当するバンドがみられ、変異体蛋白が発現していることが確認された。MOI=30ではMOI=10に比べバンドが濃く検出され、MOI依存性に蛋白が発現していることを確認した。AdexDsg1 Δ EC、AdexDsg3 Δ EC間では等量のMOIで比較した場合、有為な差は認められなかった(図2)。AdexDsg1 Δ EC、AdexDsg3 Δ ECによる細胞形態に及ぼす影響について位相差顕微鏡にて検討したところ、MOI=30では明らかな細胞毒性は認めなかった(図3)。次に、アドヘレンスジャンクションに与える影響について β カテニンを指標に蛍光抗体法にて観察した。 β カテニンはAdexDsg1 Δ EC、AdexDsg3 Δ ECとも細胞間に一致して染色されており、アドヘレンスジャンクションはほぼ正常に形成されていると思われた。変異体蛋白は上記と同様にmycによる染色態度で評価したが、やはり細胞間に染色されており変異体蛋白が細胞間に発現していることが確認されその発現量は両者間では差は見られなかった(図4)。さらにデスモゾームの形成をケラチン繊維の細胞間へのインサクション、デスモゾームの裏打ち蛋白であるデスモプラキンの発現による検討した。コントロールウィルスではデスモプラキンは細胞間に発現しており、ケラチン繊維のインサクションも良好に認められておりデスモゾームが良好に形成されていると考えられた。AdexDsg1 Δ ECではMOI=10、30ともデスモプラキンは細胞質に彌漫性に染色され、また、ケラチン繊維の細胞間へのインサクションも認められず、デスモゾームの形成が阻害されていた。AdexDsg3 Δ ECではMOI=30ではAdexDsg1 Δ ECと同様デスモゾームの形成は阻害されていたが、MOI=10ではその阻害効果は十分ではなかった(図5)。細胞間のデスモプラキンの発現をmycの発現で割った値、すなわち変異体発現量に対するデスモゾームの量を共焦点レーザー顕微鏡を用いて定量した結果、AdexDsg1 Δ ECではMOI=10という少量の変異体蛋白においてもデスモゾームの形成阻害が認められたが、AdexDsg3 Δ ECではMOI=10では完全には抑制されなかった(図6)。言い換えると、デスモゾームの形成阻害効果はデスモグレイン1のほうが強いと思われた。

結 語

デスモグレイン1とデスモグレイン3ではその表皮における分布、局在において明らかな相違があることが報告されていたが、機能については明らかとなっていなかった。今回我々は表皮角化細胞におけるデスモグレイン1とデスモグレイン3の機能の差につきアデノウィルスベクターを用いて解析を行った。デスモゾームの形成においてはデスモグレイン1のほうがデスモグレイン3より強いことが示唆され、デスモゾームをターゲットとする天疱瘡の発症機序を明らかにするためには重要なデータとなりうると考えた。

謝 辞

本研究に協力していただいた、愛媛大学医学部皮膚科、花川靖、白方裕司先生、ならびに慶應

義塾大学医学部皮膚科、天谷雅行先生に深謝いたします。

参考文献

1. Amagai M: Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11:319-352, 1996
2. Amagai M, Fujimori T, Masunaga T, Shimizu H, Nishikawa T, Shimizu N, Takeichi M, Hashimoto T: Delayed assembly desmosomes in keratinocytes with disrupted classic-cadherin-mediate cell adhesion by a dominant negative mutant. *J Invest Dermatol* 104:27-32, 1995
3. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci* 113:1803-11, 2000

英文抄録

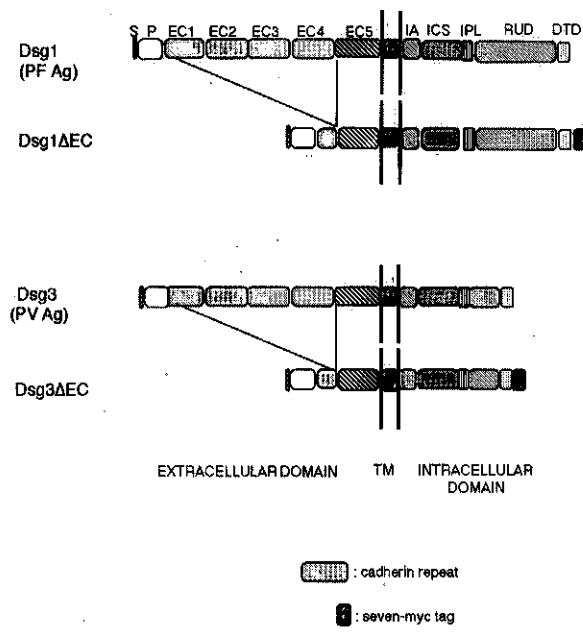
Different effects of dominant-negative desmoglein 1 and desmoglein 3 mutants on desmosome formation

Koji Hashimoto

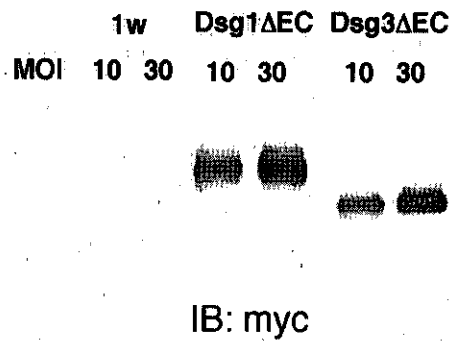
Department of Dermatology, Ehime University School of Medicine, Shitukawa, Shigenobucho, Onsegun, Ehime 791-0295, Japan

ABSTRACT

The desmoglein (Dsg), of which there are three subtypes (Dsg1, Dsg2, and Dsg3) in humans, plays an important role in the formation of desmosomes. Dsg1 is found primarily in the spinous and granular cell-layers of the epidermis and Dsg3 is localized in the basal and suprabasal cell-layers. We used dominant-negative mutants to study the involvement of Dsg1 and Dsg3 in desmosome formation. We constructed recombinant adenoviruses (Ad) containing Dsg1 and Dsg3 derivatives partly lacking the extracellular domain (Dsg1 Δ EC and Dsg3 Δ EC, respectively), in combination with the Cre-loxP Ad system to circumvent the potential toxicity of mutants for virus-producing cells. During low-level expression of Dsg3 Δ EC in transfected cells, keratin insertion at cell-cell contact sites, while low-level expression of Dsg1 Δ EC resulted in complete inhibition of keratin insertion at the cell-cell contact sites and desmoplakin was stained, not in cell-cell contact sites, but in perinuclear dots. These results indicate that the dominant negative effect of Dsg1 Δ EC on desmosome formation was stronger than that of Dsg3 Δ EC. Our finding provides biological evidence that Dsg1 and Dsg3 play a different functional role in cell-cell adhesion of keratinocytes.



☒ 1



☒ 2

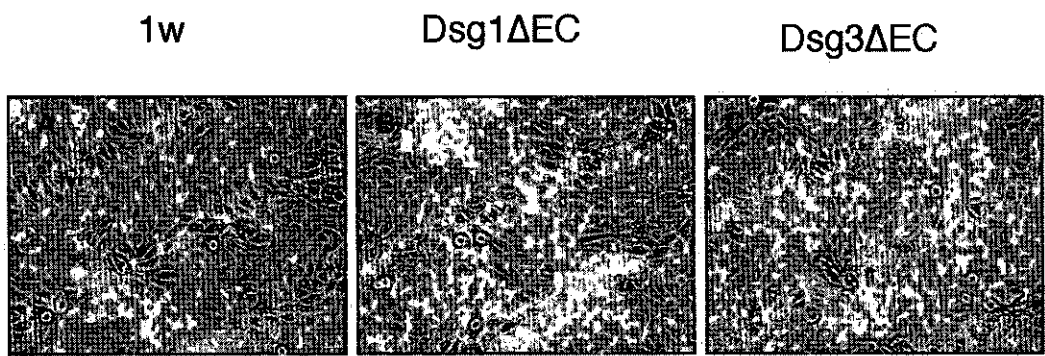


図 3

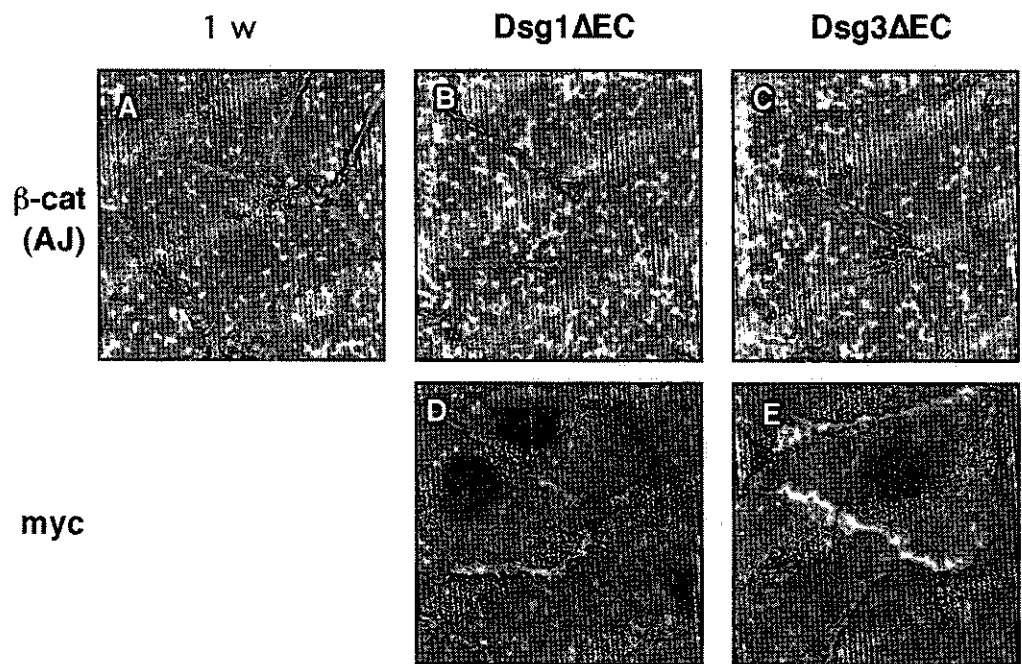


図 4

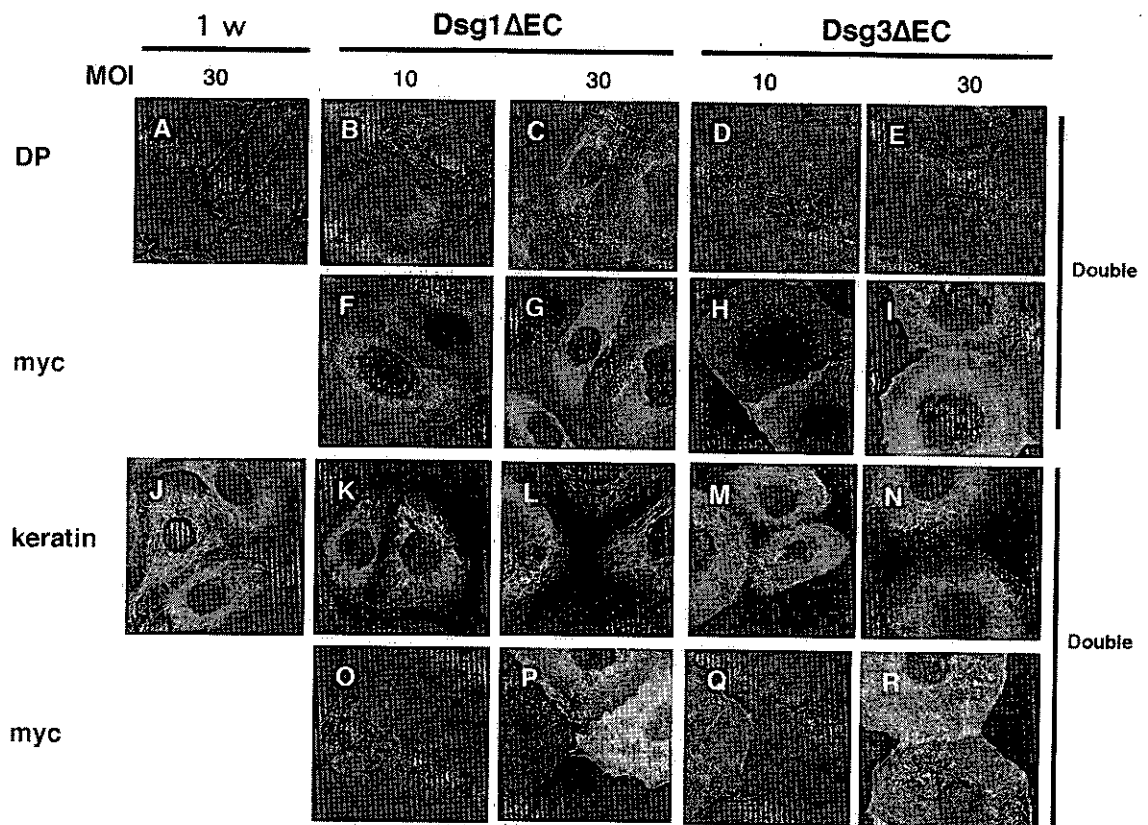


图 5

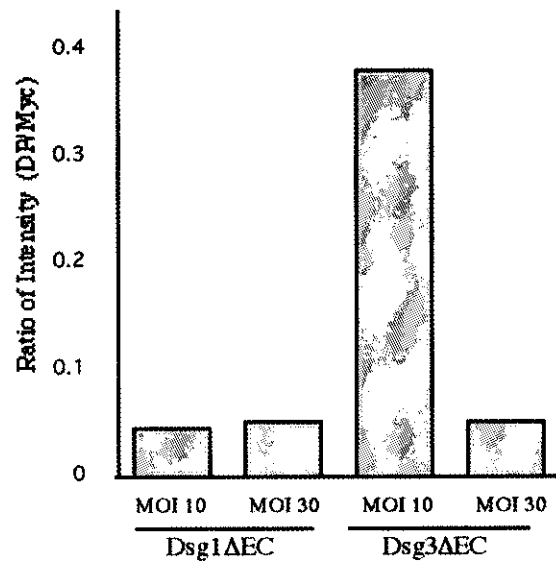


图 6

VI. 追 記

天疱瘡抗体価を含まない天疱瘡の重症度判定基準作成 ならびに表皮水疱症診断基準改訂の試み

研究協力員：池 田 志 孝（順天堂大学医学部皮膚科）

旧 班 長：橋 本 功（青森労災病院）

班 長：小 川 秀 興（順天堂大学医学部皮膚科）

記

天疱瘡抗体価を含む天疱瘡の重症度判定基準は、抗体価測定技術差などにより影響を受ける他、観察当日にスコアを算定できない欠点がある。また表皮水疱症では、種々の病型における原因遺伝子が発見され、診断に際しては遺伝子診断の情報を基に行われる傾向にある。そのため、現在上記2つの課題について改訂を試みた。現在再改訂の必要の有無につき班員の意見を求めている。

天疱瘡抗体価を含まない天疱瘡の重症度判定基準案（平成12年度） a

項目 スコア	皮膚病変の面積 b	Nikolsky 現象	水疱の新生数/日	口腔粘膜病変
3	15%以上	顕 著	5 個以上	30%以上
2	5 - 15%程度	陽 性	1 - 5 個	5 - 30%
1	5 %まで	一部に僅か	時々 c	5 %以下
0	な し	な し	な し	な し

a : 天疱瘡診断基準を満たす症例について、各項目に該当する所見のスコアを合計し、別表に従い重症度を判定する。

b : 全体表面に対する比率 (%)。

c : 毎日ではないが、一週間のうち時折新生水疱の見られるもの。

天疱瘡の重症度判定表

重 症 度	合計スコア
軽 症	4 点以下
中 等 症	5 ~ 7 点
重 症	8 点以上

厚生省特定疾患表皮水疱症（接合部型ないし栄養障害型）診断書（平成12年度改訂案）

I. 対象疾患（接合部型ないし栄養障害型表皮水疱症）であるか否かの診断

A. 臨床的診断項目

- ①軽微な機械的刺激により皮膚（ときには粘膜）に容易に水疱を生ずる。 はい・いいえ
②薬剤・感染・光線過敏・自己免疫による水疱症を除外できる。 はい・いいえ
③水疱・びらの治癒後に瘢痕または皮膚萎縮を残す。 はい・いいえ
④原則として乳幼児に発症する。 はい・いいえ

B. 光学顕微鏡的診断項目

水疱初発位置は、表皮内ではなく、表皮下である。 はい・いいえ

C. 電子顕微鏡的診断項目

水疱初発位置は、表皮内ではなく、接合部または真皮内である。 はい・いいえ

II. 判定および診断（該当項目に○を付ける）

1. 乳幼児の場合

A①②④のすべてを満たし、かつB、Cのいずれかひとつ以上を満たすものを対象疾患とする。

2. 乳幼児以外の場合

A①②③④のすべてを満たし、かつB、Cのいずれかひとつ以上を満たすものを対象疾患とする。

参考：表皮水疱症とは、何らかの素因により、日常生活で外力の加わる部位に水疱が反復して生ずることを主な臨床症状とする一群の疾患である。症状により、単純型、接合部型および栄養障害型に分けられるが、昭和61年度より後2者が治療研究事業の対象疾患とされている。

III. 病型に関する診断（該当項目に○を付ける）

A. 電顕検索により水疱初発位置が確定されている場合

- ①水疱初発位置が接合部であるもの——接合部型
②水疱初発位置が真皮内である場合
a. 家族内に患者が2人以上発生している場合
ア. 患者が親子関係にあるもの——優性栄養障害型
イ. 患者が同胞関係にあるもの——劣性栄養障害型
b. 家族内に患者が1人のみ（孤発例）の場合
ア. 指間癒着又は歯牙病変が著しいもの——劣性栄養障害型
イ. 指間癒着又は歯牙病変が著しくないもの——優性栄養障害型

B. 電顕検索により水疱初発位置が確定されていない場合

- ①家族内に患者が2人以上発生している場合
a. 患者が親子関係にあるもの——優性栄養障害型
b. 患者が同胞関係にあるもの
ア. 指間癒着又は歯牙病変が著しいもの——劣性栄養障害型
イ. 指間癒着又は歯牙病変が著しくないもの——接合部型
②家族内に患者が1人のみ（孤発例）の場合
a. 水疱治癒後に皮膚萎縮を残し、歯牙形成不全を伴うもの——接合部型
b. 水疱治癒後に瘢痕をのこす場合
ア. 指間癒着又は歯牙病変が著しいもの——劣性栄養障害型

イ. 指間癒着又は歯牙病変が著しくないもの———優性栄養障害型

C. 遺伝子検索による確定診断

①VII型コラーゲン遺伝子の変異が罹患者の親子で見られるもの———優性栄養障害型

②VII型コラーゲン遺伝子の変異が孤発例で見られ、両親にはみられないもの——優性栄養障害型

③2つの対立VII型コラーゲン遺伝子の変異が孤立・同胞例で見られ、

または非罹患者両親に各々1つの対立遺伝子変異が見られるもの———劣性栄養障害型

④ラミニン5の各サブユニット ($\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$) またはインテグリン

$\alpha 6 \cdot \beta 4$ 、180kd 類天疱瘡抗原遺伝子のいずれかに変異のみられるもの——接合部型

参考：劣性栄養障害型ではVII型コラーゲン遺伝子の変異形式と重症度にある程度の相関があることが判明している。

VII. 平成12年度事業報告

平成12年度第1回総会

日時：平成12年6月23日（金）

会場：東京ガーデンパレス

9：30～11：20 講演会

11：20～13：00 打ち合わせ会議兼昼食会

13：00～16：20 講演会

- 1) 天疱瘡に対する血漿交換療法の ELISA 法による評価
八幡陽子、白方裕司、橋本公二（愛媛大）
- 2) リコンビナントデスマグレイン 1,3ELISA 法インデックス値天疱瘡患者の臨床経過と血清試料の適正希釈倍率
辻村有紀、青山裕美、山田孝宏、北島康雄（岐阜大）
- 3) バキュロウイルス発現系を用いたヒトデスマコリン（Dsc）1,2,3 リコンビナント蛋白の作製
橋本 隆、永田祥子（久留米大）
- 4) 尋常性天疱瘡抗原 Dsg3 の3次元エピトープマッピング
天谷雅行、布袋祐子、西川武二（慶應大）
- 5) 培養 DJM-1 細胞における低 Ca^{2+} —高 Ca^{2+} スイッチによるデスマコリン3のリン酸化とデスマグレイン3との結合
青山裕美、佐藤美貴、北島康雄（岐阜大）
- 6) 栄養障害型表皮水疱症：病態に基づいた治療指針作成の試み
玉井克人、千葉容子、橋本 功（弘前大）池田志孝、小川秀興（順天堂大）
- 7) Ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome (ED/SFS) と acantholytic epidermolysis bullosa (EB)
三橋善比古、阿部優子、木根淵智子、斉藤寛幸、片桐美之、近藤慈夫（山形大）
- 8) 培養臍帯上皮細胞の重層化の試み—表皮水疱症治療への基礎的研究—
溝口将之、須賀 康、池田志孝、小川秀興（順天堂大）
- 9) 長期保存型非ウイルスベクターの開発
金田安史（大阪大遺伝子治療）
- 10) 膿疱性乾癬治療指針作成の検討
田上八朗（東北大）、○小澤 明、梅澤慶紀（東海大）、川嶋利端、清水 宏（北海道大）、池田志孝、小川秀興（順天堂大）
- 11) 和歌山医大における小児汎発性膿疱性乾癬の検討
櫻根幹久、阪口 順、上出康二、古川福実（和歌山医大）
- 12) 膿疱性乾癬の表皮構築：尋常性乾癬、アトピー性皮膚炎苔癬化局面との比較
飯塚 一、本間 大、岸部麻里、山本明美、高橋英俊（旭川医大）