

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

吉田憲司より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 572 号

学位申請者 : よし だ けん じ
吉 田 憲 司

学位審査論文 : Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering

(非病原性落葉状天疱瘡 IgG 抗体は p38MAPK 依存性デスモグレイ
ン 1 凝集を介して病原性落葉状天疱瘡 IgG 抗体による水
疱形成に相乗的役割を果たす)

著 者 : Kenji Yoshida, Ken Ishii, Atsushi Shimizu, Mariko Yokouchi, Masayuki
Amagai, Ken Shiraishi, Yuji Shirakata, John R Stanley, Akira Ishiko

公 表 誌 : Journal of Dermatological Science DOI:10.1016/j.jdermsci.2016.12.010

論文内容の要旨 :

<背景、目的>落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus : PF) はデスモソームを構成する細胞接着分子であるデスモグレイン 1 (desmoglein 1 : Dsg1) に対する自己抗体によって表皮浅層に水疱を生ずる自己免疫性水疱症である。天疱瘡の水疱形成機序として抗 Dsg 抗体による Dsg の分子結合が直接阻害されることにより細胞接着障害をきたすメカニズム (steric hindrance 説) と p38MAPK などの細胞内シグナルを介して Dsg の clustering、endocytosis や分解が起こり間接的に細胞接着障害をきたすメカニズムの 2 つが考えられている。これまでに、PF 患者血清からファージディスプレイ法を用いて単離した一本鎖 (single-chain variable fragment: scFv) 抗 Dsg1 モノクローナル抗体 (抗 Dsg1 mAb) の解析から、抗 Dsg1 抗体は、単独で水疱形成可能な病原性抗体と単独では水疱形成不可能な非病原性抗体からなるポリクローナル抗体であることが解明された。しかし、PF の水疱形成における非病原性抗体の存在意義、p38MAPK 関与の有無は解明されていない。本研究では抗 Dsg1 mAb 単独と抗 Dsg1 mAb を複数混合した場合における水疱形成、デスモソーム関連分子の分布の変化、デスモソームの構造変化、病原活性を比較することで PF の水疱形成機序を解析した。

<材料と方法>患者血清の状態を反映するために一本鎖の scFv 抗 Dsg1 mAb から二本鎖の抗 Dsg1 IgG mAb を作成した。本研究では Dsg1 の extra cellular (EC) 1 ドメインを認識し trans-interaction 阻害を起こす 1 種類の病原性 (pathogenic : P) mAb

と EC2、EC3 のそれぞれを認識する 2 種類の異なる非病原性 (Non-pathogenic : NP) mAb を使用した。ヒト皮膚器官培養系を用いて P IgG mAb 単独、NP IgG mAb 単独とこれらの混合物(P+NP IgG mAb)をヒト皮膚に注射し、22 時間培養後に形態学的に検討した。すなわち、水疱形成の有無を病理組織で、IgG 沈着部位とデスモソーム関連蛋白の局在変化を共焦点顕微鏡で、デスモソームの構造変化を電子顕微鏡で観察した。さらに、それぞれのパターンにおける細胞間接着阻害活性の違いを、培養表皮細胞シートを用いた dissociation assay で比較した。

<結果>

1. P+NP IgG mAb は Dsg1 clustering を誘導した。

ヒト皮膚器官培養系では、P IgG mAb 単独の場合、表皮浅層に水疱形成があり、IgG と Dsg1 は表皮細胞表面に線状分布した。NP IgG mAb 単独の場合、IgG と Dsg1 は同様に細胞表面に線状分布したが水疱形成は無かった。一方、P+NP IgG mAb の場合、表皮浅層の水疱形成に加えて、IgG と Dsg1 の clustering が表皮下層で誘導された。

2. P+NP IgG mAb は P IgG mAb 単独よりも顕著なデスモソームの構造変化を起こした。

デスモソームの長さを電子顕微鏡で観察すると、P+NP IgG mAb は P IgG mAb 単独と比較して基底層・有棘層におけるデスモソーム長を優位に短縮し、構造変化を起こした。顆粒層では抗 Dsg1 IgG mAb を投与した全てでコントロールより短縮しているものの、抗 Dsg1 IgG mAb 単独と混合物の間に優位差は見られなかった。

3. Dsg1 clustering は P 抗体による向かい合う Dsg1 分子の分子間接着面の直接阻害 (trans-interaction 阻害) と NP IgG 抗体による隣り合う Dsg1 分子同士の cross-linking が必要である。

Dsg1 clustering のメカニズムを解明するために二本鎖 IgG 型抗体と一本鎖 scFv 抗体の様々な混合パターンで Dsg1 clustering 形成の有無を比較した。Dsg1 clustering は NP IgG 抗体による Dsg1 同士の cross-linking だけでなく、P 抗体による Dsg1 の trans-interaction 阻害が必須であった。

4. Dsg1 clustering は p38MAPK 依存性であるが、水疱形成には必須ではない。

ヒト皮膚器官培養系で p38MAPK を阻害すると、Dsg1 clustering 形成は抑制された。しかし、P IgG mAb 単独、P+NP IgG mAb のいずれにおいても p38MAPK 阻害では水疱形成の抑制はできなかった。つまり、Dsg1 clustering は p38MAPK 依存性であるが水疱形成には必須ではないことが ex vivo で示された。

5. P+NP IgG mAb は p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering を介して細胞間接着阻害活性を増強する。

Dissociation assay で細胞間接着阻害活性を測定すると、NP mAb 単独の場合はコントロールと同等であった。P IgG mAb 単独の場合、NP IgG mAb 単独と比較して 3 倍高値であった。一方、Dsg1 clustering が誘導された P+NP IgG mAb では、P IgG mAb よりも優位に細胞間接着阻害活性が増強した。しかし、Dsg1 clustering が誘導されない P IgG mAb + NP scFv mAb では、P IgG mAb と同等であった。つまり、Dsg1 clustering は細胞間接着阻害活性を増強した。また、dissociation assay で p38MAPK 阻害をすると、P IgG mAb 単独による細胞間接着阻害活性に変化はみられなかったが、P+NP IgG mAb では細胞間接着阻害活性が部分的に減弱して P IgG mAb 単独と同等となった。さらに、培養細胞を観察すると p38MAPK 阻害により P+NP IgG mAb による Dsg1 clustering は抑制されていた。つまり、p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering は細胞間接着阻害を増強するが、水疱形成には必ずしも必要でないことが in vitro でも示された。

<結論>単独では水疱形成を起こさない NP 抗体は P 抗体と共に p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering を介してデスモソーム構造変化を促進することで細胞間接着阻害を増強し、水疱形成に相乗的な役割をはたしていることが示された。しかし、p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering の抑制だけでは水疱形成を阻害できなかった。つまり、p38MAPK 非依存性の P 抗体による trans-interaction 阻害が水疱形成には必要である。P IgG 抗体だけでなく、NP IgG 抗体も p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering を介して PF の水疱形成に関与する。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 572 号	氏 名	吉 田 憲 司
学位審査担当者	主 査	澁 谷 和 俊
	副 査	川 合 眞 一
	副 査	赤 坂 喜 清
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	亀 田 秀 人

学位審査論文の審査結果の要旨 :

平成 29 年 2 月 28 日 (火) 15:00-16:00 医学部第 2 セミナー室にて、5 名の審査委員の出席の下で学位審査が行われた。

研究概要：従前、不明であった落葉状天疱瘡 (PF) の水疱形成に関わる抗デスモグレイン 1 単クローン抗体 (抗 Dsg1 mAb) の役割を明確にするために、抗 Dsg1 mAb 単独と抗 Dsg1 mAb を複数混合した場合における水疱形成、Dsg1 の分布変化、デスモソームの構造変化ならびに細胞接着阻害活性を比較した。主な結果は次の通り：①病原性抗 Dsg1 mAb 単独あるいは非病原性抗 Dsg1 mAb 単独を注射した場合、前者でのみ水疱形成が観察された。②病原性と非病原性抗 Dsg1 mAb の混合物を注射した場合、水疱形成に加えて表皮下層優位に Dsg1 分子の凝集 (clustering) が誘導された。③Dsg1 分子の凝集 (clustering) が誘導される場合、超微形態的にはデスモソームの短縮が生ずる。④p38MAPK の阻害により Dsg1 clustering は抑制されるが、病原性抗体単独ならびに病原性と非病原性抗体の混合した場合の水疱形成は抑制されない。⑤dissociation assay により p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering は細胞接着性を低下させるが水疱形成には必須ではない。以上の結果より、PF における水疱の形成過程では、病原性抗体による Dsg1 の trans-interaction 構造阻害に加えて、非病原性抗体が病原性抗体と共に p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering を誘導することでデスモソームの構造変化を促進し、細胞間接着阻害を増強することが水疱形成に相乗効果を与えている可能性が示唆された。

質疑応答：主な質問は次の通り：尋常性天疱瘡 (PV) と落葉状天疱瘡 (PF) の臨床的並びに組織学的相違点、Dsg1 clustering の本体、Dsg1 clustering と臨床症状との関係、抗 Dsg1 抗体はデスモソームへの沈着の形態、実験手技と再現性、結果に対するシグナル伝達の考え方など。申請者は、全ての質問に対して、研究デザインの限界にも触れながら、明確に回答した。また、関連する推論についても適切に言及した。

審議：本研究は、落葉状天疱瘡では病原性抗体だけでなく、非病原性抗体も水疱形成に関与していることを解明した極めて有意義なものであり、学位授与に十分相当するものと審査委員全員一致で認定した。