



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein3 (DSG3) from the triton X-100 soluble pools, leading to the formation of DSG3-deleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells.

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青山, 裕美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/15070

氏名 (本籍)	青山 裕美 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1197 号
学位授与日付	平成 11 年 3 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein3 (DSG3) from the triton X-100 soluble pools, leading to the formation of DSG3-deleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells.
審査委員	(主査) 教授 北 島 康 雄 (副査) 教授 野 澤 義 則 教授 高 橋 優 三

論文内容の要旨

尋常性天疱瘡は自己免疫性水疱症である。病因抗体の抗原として表皮細胞間の接着構造(デスモゾーム)の構成分子であるデスモグレイン(Dsg)3が同定された。しかしながら抗体結合後水疱を形成するメカニズムは不明である。考えられるメカニズムとして①自己抗体が直接デスモグレインの結合を障害する, ②抗体結合後シグナル伝達経路を介し細胞生物学的にデスモゾーム結合が離解する, ③抗体結合後プラスミノーゲンアクチベーターを含む蛋白質質解酵素が分泌されデスモゾームの細胞外部分が分解されるという3つが挙げられる。申請者はこれまでに②の考えにもとづいて天疱瘡における水疱形成機序を検討してきた。すでにヒト正常表皮細胞や皮膚有棘細胞癌由来株(DJM-1)に天疱瘡抗体を作用させると, 20分後にDsg3がセリンリン酸化されDsg3とデスモゾーム構成分子であるプラゴグロビンとの結合性が低下する現象を観察している。申請者はこれらの現象に引き続いて生じるデスモゾーム構成分子の変化を検討するために, DJM-1細胞に天疱瘡抗体を作用させ, 天疱瘡抗体がDsg3に結合後に生じるDsg3を含むデスモゾーム構成分子の局在の変化を免疫プロット法および蛍光抗体染色法で観察した。

実験材料および方法

1) 抗体による刺激と細胞分画

培養したDJM-1細胞に血清からプロテインAセファロースカラムを用いて精製した天疱瘡IgGまたは正常ヒトIgGを0.3mg/mlになるように添加し, 20分間または, 30時間培養した後, 緩衝液A(1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5mM E64, PBS)で超音波処理し, 105,000G, 1時間超遠心後の上清を細胞質画分とした。沈渣をさらに1%Triton X-100含有緩衝液Aで超音波処理後超遠心した上清を膜画分, 沈渣を細胞骨格画分として分離した。細胞骨格画分にはデスモゾームが, 膜画分にはデスモゾームに組み込まれる前のデスモゾーム構成分子が含まれる。

2) 免疫プロット

それぞれの画分を1%SDS, 1%2-メルカプトエタノール, 10%グリセロール, 62mMトリス液pH6.8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, デスモゾーム構成分子であるDsg1, Dsg3, デスモプラキン(DPK)1, プラゴグロビン(PG), ケラチン8に対する抗体で免疫プロットを行った。検出にはECLディテクションシステム(アマシャム)を用いた。

3) 免疫染色

スライドガラス上に培養したDJM-1細胞を天疱瘡IgG刺激後, メタノール(-20°C 7分間)固定した。一次抗体としてDsg1, Dsg3, DPK1, PGおよびケラチン8に対する抗体で反応させた。二次抗体はDsg3の検出には抗ヒトIgG-ローダミンラベル, そのほかのデスモゾーム分子の検出には抗マウスIgG-FITCラベル抗体で二重染色し, 観察した。

結 果

1) 天疱瘡IgG結合によるDsg3の膜および細胞骨格画分からの消失

培養DJM-1細胞を天疱瘡IgGまたは正常ヒトIgGで20分間刺激し、細胞質、膜、細胞骨格画分に画分し、Dsg1, Dsg3, DPK1, PGおよびケラチン8の局在を免疫プロット法でそれぞれに対する抗体を用いて検討した。膜画分でDsg3のみが20分後および30時間後に消失していた。一方、細胞骨格画分からは、20分後には変化なく、30時間後にやはりDsg3のみが消失していた。そこで、この細胞骨格からの消失がデスモゾームからの消失を反映しているかどうか、蛍光抗体法で検討した。

2) 天疱瘡IgG30時間刺激によるDsg3のデスモゾームからの消失

培養DJM-1細胞を天疱瘡IgGまたは正常ヒトIgGで20分間または30時間刺激し、メタノール固定後、Dsg1, Dsg3, DPK1, PGおよびケラチン8の分布をそれぞれに対する抗体を用いて二重染色を行うことによって検討した。天疱瘡IgGで20分間刺激後では正常ヒトIgG刺激と同様にすべての分子が細胞間橋（デスモゾーム）に見られた。しかし、30時間後には、免疫プロットの結果と同様にDsg3のみが細胞間橋（デスモゾーム）から消失していた。

考 察

本研究で最も注目すべき点は、天疱瘡抗体結合によって、Dsg3のみがデスモゾームから消失することである。このことは、細胞膜でデスモゾームに組み込まれる材料として存在するDsg3が天疱瘡IgG結合後20分で消失すること、このとき細胞骨格画分やデスモゾームからは消失していないこと、しかし、30時間刺激後では、膜画分、細胞骨格画分、デスモゾームからも消失していることの3点から、天疱瘡IgG刺激後に新しく形成されるデスモゾームにDsg3が組み込まれないことを示唆している。

尋常性天疱瘡では基底層直上で表皮内裂隙が生じるが、Dsg3は基底層で主に分布し、上層ほどその発現が少なくなり、代わってDsg1が発現してくる。このことから、Dsg3に対する自己抗体に起因する尋常性天疱瘡では基底層直上で、Dsg1に対する自己抗体に起因する落葉状天疱瘡では顆粒層を中心に裂隙が生じるという現象が説明されている。実際、Dsg3ノックアウトマウスでは、摩擦部に基底層直上の裂隙が生じ、組織学的には尋常性天疱瘡に酷似する。従って、本研究は、尋常性天疱瘡においては自己抗体によってDsg3のみがデスモゾームから欠損するという後天的にDsg3のノックアウト状態が形成されている可能性を強く示唆している。このことは、尋常性天疱瘡において基底層直上で裂隙が生じることを説明すると思われる。

論文審査の結果の要旨

申請者青山裕美は、培養ケラチノサイトを用いて尋常性天疱瘡病因自己抗体がその抗原であるデスモゾーム接着分子デスモグレイニン3に結合すると、20分後にはそのプールから、30時間後にはデスモゾームから消失することを初めて見いだした。この結果は、天疱瘡における水疱形成機序のみならず、デスモグレイニン3の細胞間接着機能の制御機構の解明、さらに自己免疫性水疱症の病態解明に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein3 (DSG3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of DSG3-deleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells.

平成11年1月発行 Journal of Investigative Dermatology 112 : 67~71