

# 表皮細胞間接着分子の発現増強条件と皮膚機能の総合的検討

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

山上 淳

This study aimed to comprehensively evaluate skin function by examining the conditions for enhancing the expression of epidermal intercellular adhesion molecules. Our results suggested the effect of steroid administration on enhancing desmoglein expression and would help with understanding the adhesive function of epidermal cells. Steroid effects on other molecules making up desmosomes, cytoskeleton and other barrier structures, and compounds other than steroids are expected to be clarified on the basis of this study when the exhaustive search system of mRNA expression, which are still underway, is set up. The ultimate goal of this study is the accumulation of information needed to maintain skin health for a longer period of time, and the conditions for maintaining skin with a stronger adhesion function. Because epidermal cell-cell adhesion is an important basic function of the skin, we are going on our efforts to disseminate new information about the direction of skin care. From another point of view, it was very meaningful to obtain new knowledge directly related to the pathogenesis and treatment of pemphigus and pemphigoid, state-designated intractable diseases. We have been able to collect information on epidermal cells not only from healthy skin but also from diseased skin that has caused blisters and erosions from various angles, and would like to contribute to cosmetology, which is expected to become more diversified in the future.

## 1. 緒言

表皮細胞同士の接着にはデスモゾームが大きな役割を果たしている。デスモゾームでは、細胞外でデスモグレイン(Dsg) およびデスモコリンといったデスモゾーマルカドヘリンと呼ばれる細胞接着分子同士が結合し、細胞膜部で内側からプラコグロビン、デスモプラキン、プラコフィリンといった細胞裏打ちタンパクに支えられることで、表皮細胞間接着が保持されている。天疱瘡は、主にDsgに対する自己抗体によってデスモゾームの機能が障害されることにより、粘膜・皮膚に水疱・びらんを生じる自己免疫疾患である。我々は、これまで天疱瘡の診療・研究に従事してきたが、天疱瘡に罹患した皮膚が副腎皮質ステロイドの外用によって上皮化が促進され、治癒する症例を多数経験してきた。従来より、副腎皮質ステロイドの天疱瘡に対する作用機序として、原因となる自己抗体の産生を低下させる免疫抑制作用が主に考えられてきた。しかし、抗体産生細胞への作用のみであれば、効果発現までに時間がかかるのに対して、ステロイド外用剤の皮膚症状への効果は投与開始後数日で現れることは、多くの皮膚科医の知るところである。そのため、抗体産生細胞への作用以外に、水疱形成を抑制し上皮化を促進させる機序が関与している可能性が示唆されてきた。



Comprehensive study on the skin function and conditions for enhancing the expression of epidermal cell-cell adhesion molecules

Jun Yamagami

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

これまでに行われてきた研究の結果からは、天疱瘡において自己抗体が抗原に結合してから水疱形成に至るまでの機序として、大きく2つの説が考えられている。1) 自己抗体の結合によりDsgの機能を空間的に直接阻害するsteric hindrance説と、2) 自己抗体がDsgに結合することで細胞内シグナルを誘導してDsgのリン酸化を介して細胞膜上から細胞内に引き込まれる、あるいはp38MAPKなどによって二次的に活性化されたプロテアーゼにより棘融解が惹起されるというシグナル伝達説である。近年、病原性のあるモノクローナル抗体がシグナル非依存性に水疱を形成する一方で、ポリクローナルな抗体からなる天疱瘡患者血清はp38MAPKを介してDsgを凝集させてエンドサイトーシスを起こすことがわかってきており、患者内では上記の2つの機序が混在しながら水疱形成を起こしていると考えられる<sup>1,2)</sup>。これを受けて、副腎皮質ステロイドの作用として、1) 表皮角化細胞におけるDsgなどのタンパク発現に対する影響、2) シグナル伝達に対する影響があることが予想された。以上のような背景から、副腎皮質ステロイドの濃度などを中心に、表皮細胞間接着に関わる遺伝子およびタンパクの発現を増強させる条件を検討することにより、皮膚機能を総合的に評価することを目的として、本研究を計画した。

また、天疱瘡はDsgに対する自己抗体によって表皮細胞間接着が傷害されて水疱が形成される疾患だが、同様の機序で皮膚および粘膜に水疱および紅斑を生じる自己免疫疾患に水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid; BP) がある。表皮基底膜部 (basement membrane zone; BMZ) の構成タンパクであるBP180 (XVII型コラーゲン) およびBP230に対するIgG自己抗体が原因で、BP患者の皮膚ではBMZへのIgG・補体の線状沈着を認め、血清からはこれらの自己

抗原特異的なIgG抗体が検出される。加えて、一部のBP患者でBP180 特異的な血清中のIgE抗体や、BMZへのIgEの沈着を認めたという報告が以前より散見され、BPにおける水疱および紅斑の形成、病態へのIgEの関与が示唆されてきている。本研究で、表皮内に水疱を形成する天疱瘡との対比として、表皮下に水疱を生じるBPでのIgGおよびIgEの病態における役割を比較検討することで、皮膚機能の総合的理解が深まることが考えられた。

## 2. 方法

### 2.1. 培養表皮角化細胞における細胞接着分子発現条件の検討

ステロイドおよび他の化合物の表皮細胞への影響を評価するため、培養したヒト表皮角化細胞を用いたin vitroの系を用いた。基礎的な実験として、培養したヒト表皮角化細胞にさまざまな濃度および種類の副腎皮質ステロイド(プレドニゾロン、ヒドロコルチゾン)を加え、Dsg1およびDsg3、デスモコリン、デスモプラキン、プラコフィリン、プラコグロビンといったデスモゾームを構成する分子のmRNA発現の経時的変化、また培地中の副腎皮質ステロイド含有濃度との関連性についてリアルタイムPCR法で評価した。

### 2.2. 抗Dsg3抗体の水疱形成抑制作用の検討

ステロイドの用量および時間経過の条件検討の後に、各化合物存在下における抗Dsg3抗体の水疱形成作用の変化を検討した。我々の研究室では、抗体の水疱形成能を定量的に評価する系として、培養ヒト角化細胞に表皮剥奪毒素(exfoliative toxin A; ETA)を入れてDsg1の接着機能を消失させた後に、抗Dsg3抗体を加えてピペッティングによる機械的ストレスを与えた際の細胞断片数を測定するin vitro dissociation assayが確立されている。さらに天疱瘡患者の血清、天疱瘡患者およびモデルマウス由来の多様な病原性を有するDsg3に結合するモノクローナル抗体を多数所有しており、in vitro dissociation assayで加えた抗体の種類およびステロイドの濃度に応じて、シグナル伝達物質およびデスモゾーム構成タンパクのmRNA発現を検討した。

### 2.3. 水疱性類天疱瘡の水疱形成におけるIgEの役割の検討

皮膚BMZへのIgEの沈着とBPの病態との関連を調べるため、当科で皮膚生検を行い、BPと診断された53例の患者の凍結皮膚切片を直接蛍光抗体法(direct immunofluorescence; DIF)によりIgEで染色した。診断時に未治療だった症例に関しては、臨床症状スコアであるbullous pemphigoid disease area index (BPDAI) とIgE

の皮膚への沈着との関連を検討した。BPDAIのスコアは、びらん/水疱(erosion/blister)、紅斑/膨疹(erythema/urticaria)に分けて記録されているので、IgEのBMZへの沈着が皮膚症状として水疱と紅斑のどちらに寄与したのかを、ある程度判別することが可能と考えられた。

## 3. 結果

培養したヒト表皮角化細胞に水疱形成を誘導するDsg3に対するモノクローナル抗体(AK23)を加えて細胞接着障害の程度を観察するin vitro dissociation assayを用いて、接着分子の発現および機能に対するステロイドの作用を観察した。0.00001mMから1mMまでの濃度のプレドニゾロン(PSL)およびヒドロコルチゾンの存在下で検討したところ、培地中のPSL濃度が0.001mMの時に、AK23によって生じる細胞断片の数が最も小さくなり、水疱形成抑制効果が最も高いと推測された。ヒドロキノンでも0.1mMの存在下で水疱形成抑制効果が見られたが、臨床現場で天疱瘡に対して第一選択で投与されるPSLを用いて実験を続けることとした。

水疱形成抑制の機序を解明するため、培養ヒト角化細胞に0.0001mMから0.1mMまでの濃度のPSLを加え、Dsg、デスモコリン、デスモプラキン、プラコグロビン、プラコフィリンといったデスモゾームを構成する分子のmRNA発現をリアルタイムPCR法で検討した。デスモコリン、デスモプラキン、プラコグロビン、プラコフィリン、Dsg1に関しては、PSL存在下での変化は観察されなかったが、Dsg3のmRNAは、PSL添加後8時間後から12時間後にかけて、生食を加えた時に比べて有意に上昇していることがわかった。ただし、ピークのPSL濃度は0.0001mMで、in vitro dissociation assayにおけるピークである0.001mMと異なっていた。

これらの結果を受けて、複数の天疱瘡患者血清およびAK23以外のモノクローナル抗体(AK23よりも病原性の弱いAK18、落葉状天疱瘡患者から単離されたDsg1のみに反応するPF1-8-15など)の水疱形成機能を抑制させる効果を示す、表皮角化細胞培養中のPSL濃度を調査しながら、その機序を解明するためのリアルタイムPCRの条件について、現在検討を重ねている。

また、BP患者53例の皮膚凍結標本を用いてDIFでBMZへのIgEの沈着を調べた。53例中10例(18.9%)でBMZへの強いIgE沈着(IgE+群)、13例(24.5%)でBMZへの顆粒状の弱いIgE沈着を認め(IgE±群)、両群を合わせると23例(43.4%)となっていた。次に53例のうち、診断時に未治療だった15例に関して臨床症状スコアであるBPDAIを比較した。IgE+の症例群では、沈着を認めなかった症例(IgE-群)に比べて有意にびらん/水疱のBPDAIスコアが高かった一方で(IgE+;  $38.0 \pm 20.8$ , IgE-;  $18.0$

± 11.2,  $p < 0.05$ )、膨疹／紅斑のBPDAIスコアには有意差を認めなかった。さらに、IgE+またはIgE±の症例群では、IgE-の症候群に比べてステロイド内服開始後にびらん／水疱のBPDAIスコアが治療前の25%以下に減少するまでにより長く時間がかかり、ステロイド治療に対する反応性の低さが示唆された (IgE+およびIgE±;  $20 \pm 8.0$  [日]、IgE-;  $9.4 \pm 3.8$  [日]、 $p < 0.05$ )。またIgE+の症例群では、IgE±およびIgE-の症例群に比べて、ELISA法で測定した血清中のBP180特異的IgE抗体価が有意に高かった ( $p < 0.05$ )<sup>3)</sup>。

#### 4. 考 察

本研究の結果から、ステロイドの投与によりDsg3のmRNA発現が上昇し、細胞間接着が補強されることにより、自己抗体による水疱形成が抑制されることが示唆された。これまでの研究でも、培養細胞をステロイドで処理してから天疱瘡血清を加えた後の、デスモゾームの構成因子の発現を検討することが行われていたが、本研究ではsteric hinderance説に基づき、直接的に細胞間接着を障害するモノクローナル抗体における機序に関する理解が深まった点が非常に意義深い。

Dsg分子の細胞内取り込みを調節する因子として、protein kinase C (PKC)、RhoA、c-myc、プラコグロビンなどのシグナル伝達経路の関与がこれまでに言及されており、よく知られているp38MAPKの活性化機構とともに、さらなる検討を進めていく予定である。今後の実験の精度を高めるとともに、ステロイド投与からの時間経過、ステロイドの種類の違い、天疱瘡血清およびモノクローナル抗体の病原性の違いなどが、デスモゾーム構成分子のmRNA発現にどのように作用するか検討を進め、水疱形成機序に特化した治療標的を探索していきたいと考えている。

BPでの成果に目を向けると、BP180に特異的なIgEの抗体価とBPの病勢の関連を検討した報告は過去にも存在する。以前の研究や蕁麻疹でのIgEの役割から、IgE自己抗体はBPの紅斑の形成に関わっていることが予想された。しかし、今回の結果でBMZへのIgEの沈着は、BPDAIの膨疹／紅斑スコアよりもびらん／水疱のスコアとの関連が見られたため、紅斑よりもむしろ水疱の形成と増悪および治療抵抗性に関係していることが示された。今回の研究では、DIFで皮膚のBMZに結合しているIgEを検出して評価することが重要なポイントとなっている。ただし、BPにおける自己抗体の最も重要な標的タンパクであるBP180に特異的なIgEを検出できるELISAとは異なり、抗体の特異性についてはDIFのみでは判定できない。今回は、DIFとELISAの結果と組み合わせることにより、IgE自己抗体のBPの病態における役割について、より精度の

高い検討が可能となったと考えられる。BPの診断基準には、IgGおよび補体(C3)のBMZへの沈着が含まれているが、実際のBPの病態においてIgGとIgEのどちらの関与がより大きいのか、というのは非常に興味深い疑問点である。今回の研究のみからは結論づけることはできないが、臨床症状を比較した15例においては、全例で典型的なBPと同様にBMZへのIgGおよびC3の沈着が見られており、それに加えてIgEのBMZへの沈着が生じることで、さらなる症状の増悪および治療抵抗性につながっている可能性が推測された。ただ、今回の研究ではIgEのBMZへの沈着は陽性、弱陽性、陰性の3段階で評価しているのに対し、IgGの沈着は陽性、陰性の2段階でしか評価していないのは問題点と考えられた。今後は、これまでの臨床・研究であまり注目されてこなかったBMZへのIgGの沈着量にも着目して、IgG沈着の定量法を確立するとともに臨床症状スコアとの関連があるかなど、多方面から検討すべきであろう。

一般的にIgEはFce受容体を介して免疫応答を起し、肥満細胞の脱顆粒などを通じて臨床症状を生じると考えられている。今回の研究の結果からは、その経路とは別に、生体内で自己抗原に直接結合したIgEが、水疱形成を通じてBPの発症および増悪に関与する可能性が示唆された。BMZに沈着しているIgEが水疱を起す機序については、現時点で明確な解答があるわけではないが、過去の報告からはBMZに存在しているIgEによりBP180の細胞内移行が起こり、表皮真皮間の接着強度が低下すること、さらに皮膚への好酸球や好中球の浸潤が促進され、タンパク分解が誘導されて水疱が形成されることなどが考えられる。実際に、BP患者の血清や水疱液中で、IL-4やIL-5などのTh2関連のサイトカインの上昇はしばしば認められるため、いわゆるアレルギー疾患を起す何らかの反応が、BPの発症に関連している可能性はあり、そのカスケードの中でIgEが大きな役割を果たしている可能性が示唆されている。実際に、IgEに対するモノクローナル抗体であるオマリズマブは、主に血清IgE高値、好酸球増多を認めるBPの症例に奏効した報告がある<sup>4)</sup>。今後BMZに沈着するIgE抗体に関連した病態生理の解明により、抗IgE抗体をはじめとして、BP患者に対するより安全で有効な、ステロイドに依存しない新規治療法の確立が期待される。

#### 5. 統 括

本研究は、表皮細胞間接着分子の発現増強条件の検討から総合的に皮膚機能を評価する計画であり、ステロイドの投与によるDsg発現増強の効果を確認できたことは、大きな成果であったと考えられる。めざしていたマイクロアレイのセットアップは研究期間内には間に合わなかったため、デスモゾームを構成する他の分子、細胞骨格や他のバリア

構造を司る分子、ステロイド以外の化合物の影響などについては、現在も進めている理想的な条件検討が終わった段階で、今後解明されることが期待される。表皮細胞間接着は皮膚の重要な基礎機能であり、本研究の最終的な目的は、より強固な接着機能を持つ皮膚を保つための条件、長く皮膚の健康を維持するために必要な情報の蓄積である。スキンケアの方向性に関する新しい情報を発信できるように、努力を続けたいと考えている。

また別の視点から考えると、天疱瘡・類天疱瘡という国指定難病の病態・治療に直結する新知見が得られたことは、非常に有意義であった。健康な皮膚だけでなく水疱・びらんを生じた病的な皮膚からも、表皮細胞の情報を多角的に収集できたことは大きく、今後ますます多様化が求められるコスメトロジーに少しでも貢献できればと考えている。

#### (引用文献)

- 1) Saito M, Stahley SN, Caughman CY et al. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One* 2012; 7 (12) : e50696
- 2) Yoshida K, Ishii K, Shimizu A et al. Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. *J Dermatol Sci* 2017; 85 (3) : 197-207
- 3) Kamata A, Kurihara Y, Funakoshi T et al. Basement membrane zone IgE deposition is associated with bullous pemphigoid disease severity and treatment results. *Br J Dermatol* 2019; doi: 10.1111/bjd.18364. [Epub ahead of print]
- 4) Balakirski G, Alkhateeb A, Merk HF et al. Successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab as corticosteroid-sparing agent: report of two cases and review of literature. *J Eur Acad Dermatol Veneol* 2016; 30 (10) : 1778-82