

# 表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達： 天疱瘡IgG 誘導表皮細胞間接着離開とカルシウムシグナル伝達

岐阜大学 医学部

北島 康雄・清島 真理子

The signal transduction involved in the regulation of cell-cell contacts is supposed to play an important role in keratinocyte differentiation. To elucidate signaling mechanisms to regulate keratinocyte functions, we employed pemphigus vulgaris (PV), which is a bullous disease caused by disruption of desmosomes (a cell-cell junction), as a model. In this disease, autoantibodies bind to the desmosomal junctional proteins, so that cell-cell detachment is induced. However, no precise mechanism for this phenomenon after the antibodies bind to the antigen has been known. In this study, the effects of PV-IgG on the intracellular concentrations of  $Ca^{++}$  and inositol 1,4,5-tris-phosphate and secretion of plasminogen activator (PA) were studied in cultured keratinocytes. PV-IgG caused increases in these second messengers and PA secretion, which were inhibited with phospholipase C (PLC) inhibitor; U73122. These results may suggest that PLC and  $Ca^{++}$  signaling pathway is involved in cell-cell detachment in PV.

## 要 約

天疱瘡および類天疱瘡において抗体が表皮細胞表面に結合後にどのような過程を経て水疱形成に至るかについては、最終段階でプラスミノゲンアクチベータが分泌され、プラスミンが活性化され、これによる細胞間接着の消化に関与するということが推察されているものの不明な点が多い。本研究では、抗体結合後の細胞内シグナル伝達を解析した。培養表皮細胞の培地に天疱瘡IgGを添加し、細胞内カルシウム、イノシトール1, 4, 5-三リン酸 ( $IP_3$ ) の濃度、プラスミノゲンアクチベータの分泌の変化を検討した。その結果、天疱瘡IgGでは8例中7例で20秒をピークとする一過

性の細胞内カルシウムの増加が観察された。この反応は、EGTA前処理により細胞外のカルシウムをキレートしても変化はなかった。したがって、細胞内プールよりのカルシウムの動員によって、細胞内カルシウムの一過性の増加を引き起こすことが示唆された。

一方、類天疱瘡IgG 8例中7例、健常人IgG 14例中12例では細胞内カルシウムは変化しなかった。さらに、この天疱瘡IgGは添加後20秒をピークとする $IP_3$ の産生を誘導した。この反応は類天疱瘡、正常IgGでは見られなかった。また、天疱瘡IgGによって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇、 $IP_3$ 産生の増加およびプラスミノゲンアクチベータの分泌増加がホスリパーゼC (PLC) 阻害剤であるU73122によって抑制された。このことから、天疱瘡IgGにより誘導されるシグナル伝達系にPLCが関与していることが示唆された。

以上から、自己抗体結合後の天疱瘡水疱形成メカニズムには、カルシウムを介したシグナル伝達系が関与している可能性が示唆された。また、天疱瘡と類天疱瘡の発症過程において明らかな差異があると考えられた。

Signal transduction involved in the regulation of cell-cell junction and differentiation in keratinocytes  
: Involvement of calcium signaling in pemphigus IgG induced acantholysis  
Yasuo Kitajima  
Department of Dermatology  
Gifu University School of Medicine



## はじめに

天疱瘡の水疱形成には抗デスモゾーム抗体が原因と考えられており、尋常性天疱瘡 (PV) では抗デスモグレイン III 抗体が、葉状天疱瘡 (PF) では抗デスモグレイン I 抗体がその発症に大きな役割を果たすことが知られている<sup>1-3)</sup>。しかし、これらの抗体が表皮細胞表面に結合した後に、如何なる機序によって、天疱瘡に特有な表皮の棘融解が生じるかについては不明な点が多い<sup>3)</sup>。ところで最近、Cキナーゼの阻害剤であるH7が、天疱瘡抗体による棘融解形成を抑制したという報告<sup>4)</sup>があり、天疱瘡の棘融解形成において、カルシウム-Cキナーゼを中心としたシグナル伝達メカニズムが関与することが示唆されている。そこで、われわれは天疱瘡抗体結合後の表皮細胞において細胞内カルシウムが変化するか否かについて検討した。

## 材料と方法

### IgG の精製

尋常性天疱瘡 (PV) 5例、葉状天疱瘡 (PF) 3例、水疱性類天疱瘡 (BP) 8例および健康人 (N) 14例の血清より、ハイトラップープロテインA-アフィニティーカラム (ファルマシア社) を用いてIgG画分を得た。IgGの精度については免疫電気泳動で確認した。なお、天疱瘡および類天疱瘡の診断は、臨床症状、病理組織、直接および間接免疫蛍光法、さらに、ヒト表皮細胞あるいはDJM-1細胞を基質としたウエスタンブロット法によって行われた (表1)。

### 細胞内カルシウム濃度の測定<sup>5)</sup>

ヒト表皮細胞およびDJM-1細胞を継代した後2日間、1.0mMカルシウム入りイーグル培養液で培養し、subconfluentな状態で測定を行った。5 $\mu$ Mフラ2/AM (同仁化学) を37 $^{\circ}$ Cで1時間加えることにより、フラ2を細胞内に取り込ませ、洗浄後、精

表 1 Effects of IgGs from PV, PF, BP and normal sera on [Ca<sup>2+</sup>]

	Age	Sex	IF	IB	Ca <sup>2+</sup> Res		Age	Sex	Ca <sup>2+</sup> Res		
PV	1	34	F	>40x	130KD	+	Nor	1	37	F	-
	2	U	F	>40x	130KD	-		2	60	M	+
	3	65	M	>40x	130KD	+		3	57	F	-
PF								4	46	F	-
	1	41	F	>640x	150KD	+		5	51	F	-
	2	55	M	ND	-	+		6	33	F	-
	3	57	F	>40x	150KD	+		7	42	M	-
								8	45	M	-
BP	1	30	M	>40x	180KD	-		9	30	F	+
	2	U	F	>40x	180KD	+		10	35	F	-
	3	U	F	640x	230KD	-		11	43	M	-
	4	69	F	640x	230KD	-		12	63	M	-
	5	60	F	ND	180KD	-		13	69	M	-
	6	43	F	ND	180, 230KD	-		14	70	F	-
	7	75	M	ND	180, 230KD	-					
	8	65	M	ND	180KD	-					

製したIgG (1mg/ml) を培養液に添加し、アーガス100-イメージング蛍光顕微鏡および画像解析装置 (浜松ホトニクス) を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を検討した。

### イノシトール、1、4、5三リン酸の測定<sup>6)</sup>

1.8mMカルシウムを含有するイーグル培養液で培養したヒト表皮細胞の培養液にIgGを加え、一定時間後に10%過塩素酸により反応を停止した。IP<sub>3</sub>の定量はIP<sub>3</sub>特異的結合蛋白質を含むIP<sub>3</sub>アッセイキット (アマシャム) を用いて行った。

### プラスミノゲン・アクチベーター活性の測定

DJM-1細胞の培養液にIgGおよびU73122 (10<sup>-4</sup>-10<sup>-5</sup>M) を添加した。コントロールとしてU73122の不活性アナログであるU73343 (10<sup>-5</sup>M) を添加した。その9、15、24および36時間後に培養液を採取し、液中に含まれるプラスミノゲン・アクチベーター (PA) 活性をtwo-step amidolytic assay<sup>7、8)</sup>を用いて測定した。

## 結 果

### 天疱瘡および類天疱瘡IgGによる細胞内カルシウム濃度の変化

無刺激時の細胞内カルシウム濃度は98.8 $\pm$ 20.2nM (n=85) であった。IgG添加後の変化をみるとPVIgG 5例中4例、PF 3例全例でヒト表皮細

胞、DJM-1細胞ともに20秒をピークとする、一過性のカルシウム濃度の上昇とその後のゆっくりとした下降が観察され、4~5分後には無刺激時の値に復した。PVIgG 1例では、両細胞ともカルシウム濃度は5分後まで変化しなかった。BPIgG添加後には8例中7例でカルシウム濃度に変化はみられなかった。1例ではPVあるいはPFIgG添加時と同様の変化が観察された。正常(N) IgGを添加した際には14例中12例でヒト表皮細胞、DJM-1細胞ともに反応はみられなかった。しかし、2例では一過性に細胞内カルシウムが増加した(図1)。

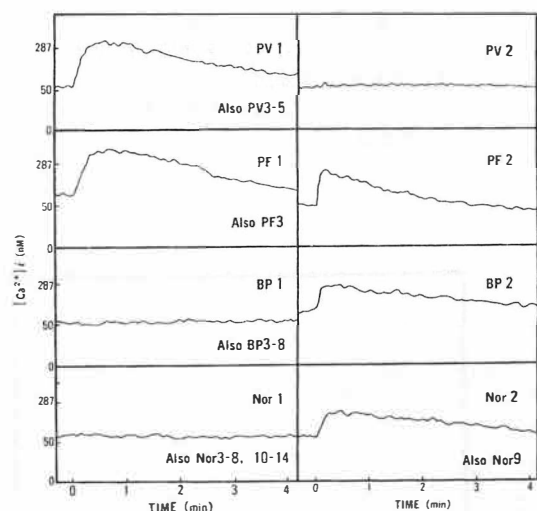


図1. 各種IgG添加後の細胞内Ca<sup>2+</sup>の変動、  
PV: 尋常性天疱瘡IgG、  
PF: 落葉上天疱瘡IgG、  
BP: 類天疱瘡IgG、  
Nor: 正常ヒトIgG、数字は症例番号

このような細胞内カルシウム濃度の変化を数量的に表すために、ピーク時におけるカルシウム濃度の増加量およびピークのみられない例ではIgG添加20秒後の増加量の平均を求めた。その結果、天疱瘡IgGでは99.9±63.9nM (n=8)、類天疱瘡では15.0±42.4nM (n=8)、健常人IgGでは15.1±36.8nM (n=14)であり、天疱瘡IgGは健常人および類天疱瘡IgGと比較して有意に細胞内カルシウム濃度を上昇させる (P<0.001) ことが明らかに

なった。このような天疱瘡IgGによる細胞内カルシウムの一過性の増加が細胞外からのカルシウムの流入によるのかという点について検討した。0.1mMEGTAを含む、すなわち細胞外カルシウムをキレートした培養液で5分間前処理した後に天疱瘡IgGを加えたところ、1.8mMの場合と同様の変化を示した(図2)。

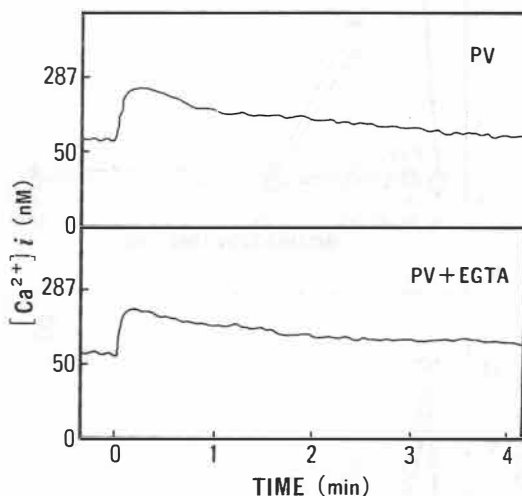


図2. PVIgG添加後の細胞内Ca<sup>2+</sup>の動員に対する細胞外Ca<sup>2+</sup>除去の影響  
PV: 尋常性天疱瘡IgGのみ添加、  
PV+EGTA: EGTAを添加したのちに尋常性天疱瘡IgGを添加

### 天疱瘡IgGによるIP<sub>3</sub>量の変化

PV, PF, BPおよび正常(N) IgGの各々症例1、2について、添加後のDJM-1細胞内IP<sub>3</sub>量の変化を検討したところ、細胞内カルシウムが増加反応を示した症例であるPVI、PF1、BP2、N2のIgGを添加した際には、IP<sub>3</sub>は20秒をピークとして一過性の上昇を示し、その後2分後には添加前の値に戻った。一方、細胞内カルシウムの変化を引き起こさなかったPV症例2、PF2、BP1およびN1のIgGを添加した場合にはIP<sub>3</sub>量は変化しなかった(図3A、B)。

### 天疱瘡IgGによる細胞内カルシウム濃度およびIP<sub>3</sub>産生増加に対するU73122の影響

天疱瘡IgGによる細胞内カルシウム濃度の一過

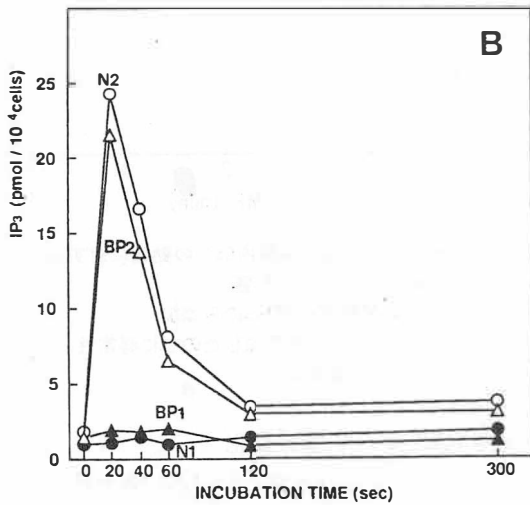
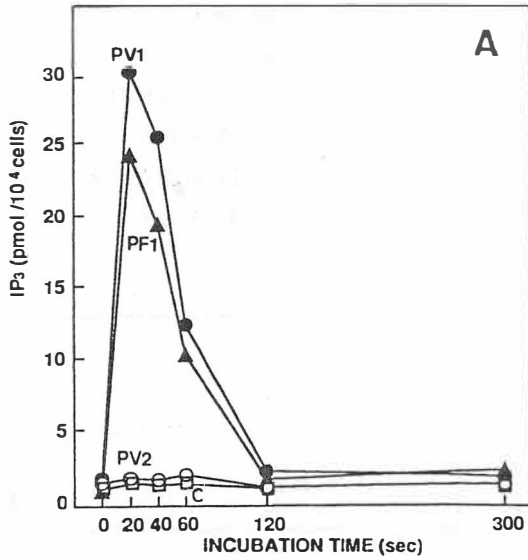


図3A. PV及びPF1IgG添加後の細胞内IP<sub>3</sub>の変動  
 PV: 尋常性天疱瘡IgG、  
 PF: 落葉上天疱瘡IgG、数字は症例番号  
 3B. 一過性細胞内カルシウム上昇を来したBP  
 及びNor IgG添加後の細胞内IP<sub>3</sub>の変動  
 BP: 類天疱瘡IgG、正常ヒトIgG、  
 数字は症例番号

性の上昇(図4a, b)は1 $\mu$ M(c)あるいは10 $\mu$ M(d)  
 U73122を30分前処理することにより抑制された。  
 また、5分間前処理によっても抑制された(e)。  
 しかし、10 $\mu$ M U73343では抑制されなかった(f)。  
 さらに、天疱瘡IgG添加後のIP<sub>3</sub>産生増加も

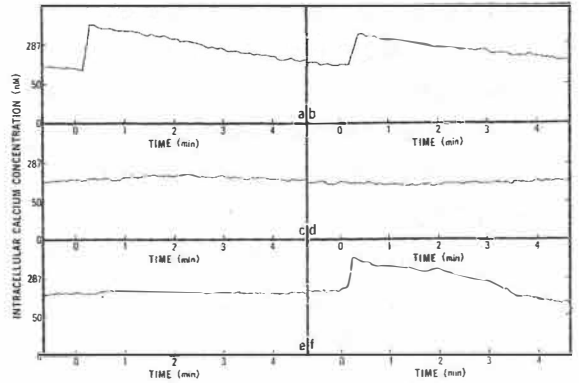


図4. PV IgG誘導による細胞内Ca<sup>2+</sup>増加に対する  
 U73122の影響 a: MEM, b: 0.01%DMSO,  
 c: 1 $\mu$ M U73122, d: 10 $\mu$ M U73122,  
 f: 10 $\mu$ M U73343, 各々を添加した30分  
 後に天疱瘡IgGを添加,  
 e: 10 $\mu$ M U73122を添加5分後に天疱瘡  
 IgGを添加

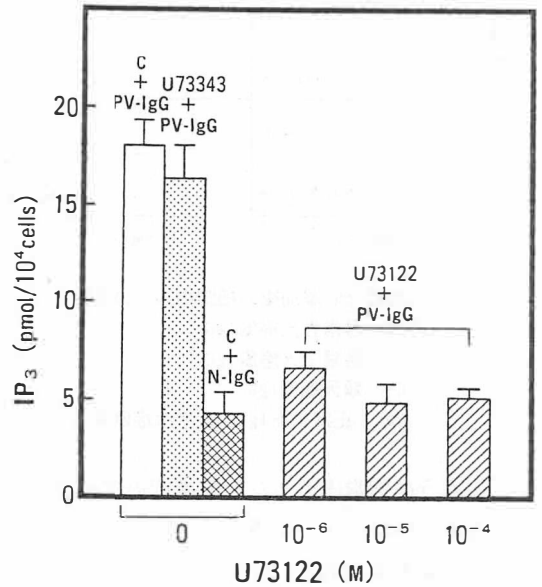


図5. U73122による、天疱瘡IgG誘導性IP<sub>3</sub>産生の  
 抑制  
 C+PV-IgG: 0.01%DMSO+天疱瘡IgG、  
 U73343+PV-IgG: 10 $\mu$ M U73343+天疱瘡IgG、  
 C+N-IgG: 0.01%DMSO+正常ヒトIgG、  
 U73122+PV-IgG: 各濃度のU73122+天疱瘡IgG、  
 各々IgG添加20秒後のIP<sub>3</sub>量を表す。

U73122 ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) 30分前処理により抑制された。しかし、U73343 ( $10^{-5}$  M) では抑制されなかった (図5)。

#### 天疱瘡IgGによるプラスミノゲン・アクチベーター (PA) 分泌増加に対するU73122の影響

天疱瘡IgGは類天疱瘡IgG および正常ヒトIgGと比較して、24および48時間後に有意にPA分泌を増加させた ( $p < 0.005$ )。この増加はU73122 ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$  M) により抑制された ( $P < 0.005$ ) が、U73343では抑制されなかった (図6)。

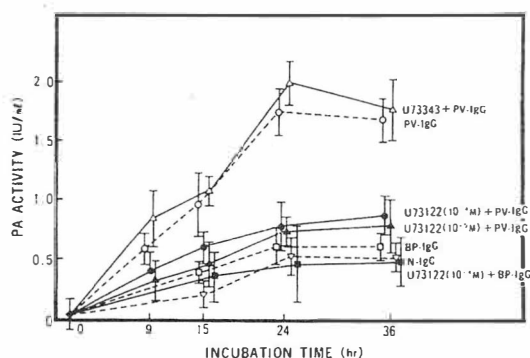


図 6、天疱瘡IgGによるプラスミノゲンアクチベーター分泌に対するU73122の影響

PV-IgG: 天疱瘡IgG、  
BP-IgG: 類天疱瘡IgG  
N-IgG: 正常ヒトIgG

## 考案

今回の研究結果から、天疱瘡IgGはヒト表皮細胞内においてカルシウムの急速な一過性の上昇を引き起こすことが明らかになった。ところで、一般に細胞内カルシウムの上昇は細胞外からの流入と小胞体などの細胞内プールからの動員<sup>9)</sup>が考えられており、また、小胞体よりのカルシウムの動員は $IP_3$ によって誘導されることがすでに明らかになっている<sup>9)</sup>。天疱瘡IgGによる場合には $IP_3$ 量が一過性に増加していること、細胞外カルシウムをキレートした際にも細胞内カルシウムは天疱瘡IgGにより上昇がみられたことから、天疱瘡IgGによって誘導される細胞内カルシウムの一過性の増

加は、細胞内プールからの動員であると考えられた。天疱瘡8例中1例ではこのような反応がみられなかったが、その原因については不明であり、今後検討したい。

類天疱瘡8例中7例のIgGでは細胞内カルシウム濃度の変化はみられなかった。したがって、天疱瘡と類天疱瘡では、デスマゾームとヘミデスマゾームという抗体の標的となる構造が異なるのみならず、各々の抗体が細胞表面に付着後から水疱形成に至る過程に差異のあることが示唆された<sup>10)</sup>。しかし、類天疱瘡の1例 (症例2)、健康人の2例においても天疱瘡と同様な細胞内カルシウム増加がみられた。IgG分画には抗デスマゾーム抗体以外にも多数の種類の抗体が存在する可能性があり、これらの抗体に対して反応した可能性は否定できない。しかし、ニトロセルロース膜上の類天疱瘡抗原によって、BP症例2IgGから類天疱瘡抗体を吸収し、そのIgGを添加した際には、細胞内カルシウムは変化しなかった。したがって、一部の類天疱瘡においては、水疱形成の過程で細胞内カルシウムの変化が関与している可能性が考えられた。

さらに、ホスホリパーゼC (PLC) の阻害剤であるU73122を用いて、天疱瘡IgGが表皮細胞表面に結合後に起こるカルシウムを中心としたシグナル伝達系にPLCが関与していることを示した。

このように本研究は、天疱瘡においては抗体が細胞表面に付着した後に、PLCの活性化および $IP_3$ 産生を介して細胞内プールよりカルシウムの動員がおり、細胞内でカルシウムが一過性に増加することを示した<sup>11, 12)</sup>が、PLCによって $IP_3$ と同時に産生される1,2ジアシルグリセロールの量的変化あるいはCキナーゼの活性化、さらにはリン酸化される蛋白質があるのかなど未解決の点を多く残している。今後これらの点について検討したい。

## 文献

- 1) 北島康雄：皮膚臨床、35 1177-1186 1993
- 2) 北島康雄：医学のあゆみ、174 95-99 1995

- 3) 北島康雄 : 皮膚病診療、17 1024-1028 1995
- 4) Kowalewski C et al : *Eur J Dermatol*, 4 238-242 1994
- 5) Seishima M et al : *Arch Dermatol Res*, 285 397-401 1993
- 6) Seishima M et al : *Biochem Biophys Res Commun*, 156 1077-1082 1988
- 7) Leytus SP et al : *Biochemistry*, 20 4307-4314 1981
- 8) Cramer FM et al : *Exp Dermatol*, 2 239-246 1993
- 9) Nishizuka Y : *Science*, 258 607-612 1992
- 10) Kitajima Y et al : *Dermatology*, 189 46-49 1994
- 11) Seishima M et al : *J Invest Dermatol*, 104 33-37 1995
- 12) Kitajima Y : *Eur J Dermatol* 6 1996 in press