原 著

正常口腔粘膜および表皮における水疱性類天疱瘡抗原 (BPAG I, BPAG II) の発現状態の相違について

神 部 芳 則   内 藤 浩 美   野 口 忠 秀
鈴 木 正 之*   赤 坂 庸 子

抄録：水疱性類天疱瘡はヘミデスマゾームの構成タンパクである BPAG I, BPAG II を抗原とする自己免疫性水疱症である。水疱性類天疱瘡では口腔症状が軽度である理由を明らかにする目的で口腔粘膜と皮膚での BPAG I, BPAG II の分布を検討した。1 次抗体として Pl-1, Pl-2 および NC16a 領域に対するポリクローナル抗体を使用した。抗 BPAG I 抗体での染色は口腔粘膜と皮膚で違いはなかった。抗 BPAG II 抗体による染色では皮膚では角化層を除く全層が染色されたが、頬粘膜は基底膜と基底細胞のみが染色され、舌背と歯肉は全層陰性であった。

キーワード：水疱性類天疱瘡, BPAG I, BPAG II, 口腔粘膜, 皮膚

緒 言

水疱性類天疱瘡はヘミデスマゾームの構成タンパクである Bullous pemphigoid antigen I (BPAG I, 230kD タンパク), Bullous pemphigoid antigen II (BPAG II, 180kD タンパク) を抗原とする自己免疫性水疱症である¹⁾。本疾患は皮膚に緊満性の水疱を多発し、皮膚症状が非常に強いのに対し、口腔症状は比較的軽度である。このように水疱性類天疱瘡では皮膚と口腔粘膜での症状の現れ方に大きな違いがあるが、このような違いを生じるためには生物学的な理由があるはずである。しかしながら、その理由について検討を加えた報告は現在までほとんどみられない。そこで、水疱性類天疱瘡における症状発現の相違の理由について、分子レベルで解明することを目的に、BPAG I および BPAG II の病原性エピトープに対する抗体を用いて、正常皮膚と口腔粘膜におけるその発現状態を蛍光抗体法を用いて比較し、臨床症状との関連について考察した。

方 法

1. 手術時に採取した臨床的に正常な皮膚および口腔粘膜(頬粘膜, 歯肉, 舌背)を直ちに OCT コンパウンドに埋入し、-80℃で保存した。患者は20歳代, 30歳代の女性でそれぞれの部位について3例ずつ使用した。

2. 抗 Pl-1, Pl-2 抗体および抗 NC16a 抗体の作製は下

記の方法で行った。

1) 細胞

今回の実験ではヒト有棘細胞癌由来の DJM-1 細胞を用いた。DJM-1 細胞を ϕ 10cm ディッシュ上に培養した。培地は Dulbecco's modified Eagle (DEM, GIBUCO) を用い、10% ウシ胎仔血清 (FBS, Bio Whittaker), 4 mM L-グルタミン, 100 μ g/ml ペニシリン G および、100 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシンを加えた。5% CO₂, 37℃ の条件下で subconfluent になるまで培養した。

2) 合成オリゴマー

既にクローニングされている塩基配列を基に BPAG II の NC16A1 (nt position 1615-1672)²⁾ と BPAG I の Pl-1 と Pl-2 を含む部位 (nt position 5581-5798)³⁾ に対するプライマーを作製した。作製は TAKARA に依頼した。

180F: CGCGGATCCAGGATCAGGAGGAGCATA

180R: CCGGAATTCGGTCCTTTTCTATTCTATC

230F: CGCGGATCCGTTTTGCTCCAGTGTGAAAT

230R: CCGGAATTCGGAATTGGACTTCTTTTCGGTA

3) RT-PCR

上記の条件で培養した DJM-1 細胞より TRIZOL™ LS Regent (GIBUCO BRL) を用いて total RNA を抽出した。10 μ g の total RNA より random heximer primer を使用した Super Script™ Preamplification System (GIBUCO BRM) を用いて cDNA を作成した。1 μ g の cDNA を 10 μ l の PCR 反応液 (0.2M Tris HCl (pH 8.3), 0.5M KCl, 20mM MgCl₂, 1.5mM dNTP, 0.01U/ μ l r-Taq enzyme (TAKARA), 0.6 μ M primer) に加え、

自治医科大学歯科口腔外科学講座 (主任: 赤坂庸子教授)

*自治医科大学皮膚科学講座 (主任: 中川秀巳教授)

〔受付: 9月10日, 1999, 受理: 11月10日, 1999〕

Fig. 1 Immunolocalization of BPAG I (PI-1, PI-2) in normal skin (S), normal buccal mucosa (B), normal gingiva (G) and normal tongue dorsal mucosa (T). Intense staining was observed at the basement membrane, and less intense staining was detected at the cell membrane and cytoplasm of all cell layers from basal cell layer to keratinized cell layer. This staining pattern was same between oral mucosa and skin (original $\times 200$).

92℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分加熱した。計 30 サイクル反応させた。その後アガロースゲルを用いて抽出し, ECoR I と BamH I を用いて消化した。

4) GST fusion protein の作成

PCR 産物を BamH I / ECoR I site で pGEX-2T (pharmacia) に挿入した。この pGEX-2T を E. coli strain 21 (pharmacia) に感染させた。この E. coli strain 21 の産生した BPAG II または BPAG I GST fusion protein を GST gene fusion system (pharmacia) のマニュアルにしたがって抽出した。

5) BPAG II または抗 BPAG I GST fusion protein に対する抗体の作成

上記の BPAG II および BPAG I GST fusion protein (10mg/ml) を 1 回 0.5mg 6 回ウサギに注射して抗血清を作成した。抗血清の作成は埼玉実験動物に依頼した。抗血清の抗体価は BPAG II および BPAG I GST fusion protein を抗原とした ELISA 法にてチェックした。各々の抗血清を DEAE Affi-Gel Blue カラムと Protein G カラムを用いて IgG に分離精製した。その後 GST セファロースカラムを通して GST に対する抗体を吸着した。

3. 蛍光抗体法

6 μ m の凍結切片を作成し, poly-L-lysine でコートしたスライドグラスに付着させ, 10% 正常山羊血清を含む

PBS でブロッキングし, 上記の 1 次抗体をかけ, 室温 20 分反応させた。次に FITC 標識抗ウサギ抗体 (Cappel, F/P ratio: 3~6mol/mol) と室温 20 分反応させた。共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSMGB-200, Olympus) にて観察した。

結 果

1. 抗 PI-1, PI-2 抗体による染色

皮膚を抗 PI-1, PI-2 抗体で染色した結果, 基底膜で染色がやや強く, 基底層から有棘層, 顆粒層の細胞膜と細胞質が染色された (Fig. 1)。角化層はほぼ均一に無構造な染色像を示した。歯肉, 頬粘膜, 舌背の上皮でも皮膚と同様な染色を示し, 基底膜がやや強く, 基底層から角化層までの全層にわたり細胞膜と細胞質が染色された (Fig. 1)。

2. 抗 NC16a 抗体による染色

抗 NC16a 抗体を用いた皮膚の染色像は, 基底膜が最も強く染色され, 基底層から有棘層, 顆粒層にかけて細胞膜が明瞭に染色された (Fig. 2)。これに対し, 頬粘膜では基底膜と基底細胞の細胞膜のみが明瞭に染色された (Fig. 3)。しかしながら, 歯肉と舌背の上皮では明らかな染色部位はみられず, 基底膜も染色されなかった (Fig. 4, 5)。

抗 PI-1, PI-2 抗体および抗 NC16a 抗体による染色の結果は今回使用した全ての症例で同じ結果が得られた。

Fig. 2 Immunolocalization of BPAG II (Nc16a) in normal skin.

Intense staining was observed at the basement membrane, and the cell membrane of basal cells, spinous cells and granular cells was also positively stained ($\times 200$).

Fig. 3 Immunolocalization of BPAG II (Nc16a) in normal buccal mucosa.

Intense staining was localized at the basement membrane and cell membrane of basal cells ($\times 200$).

考 察

自己免疫性水疱症の1つである尋常性天疱瘡では多くの症例で口腔粘膜にびらんを生じ, 口腔症状はしばしば皮膚症状に先行する¹⁾。このように尋常性天疱瘡の場合は, 皮膚に比べ口腔粘膜に症状が発現しやすい傾向がある。その理由の1つとして, 水疱形成過程に重要なタンパク分解酵素であるプラスミンに対する感受性が口腔粘膜上皮細胞と表皮細胞では異なり, 口腔粘膜上皮細胞の方が感受性が高いことをわれわれは示した⁴⁾。また, 最近, Shirakata ら⁵⁾は尋常性天疱瘡の抗原であるデスモグレイン3が皮膚に比べ口腔粘膜上皮で強く発現し, 皮膚にのみ症状を現す落葉状天疱瘡の抗原であるデスモグレイン1は逆に口腔粘

Fig. 4 Immunolocalization of BPAG II (Nc16a) in normal tongue dorsal mucosa.

There was no positive staining ($\times 200$).

Fig. 5 Immunolocalization of BPAG II (Nc16a) in normal gingiva.

There was no positive staining ($\times 200$).

膜上皮よりも皮膚に強く発現していることを示し, われわれも同様の結果を報告した⁶⁾。一方, 水疱性類天疱瘡は尋常性天疱瘡の場合とは逆に皮膚症状が極めて強く, 口腔粘膜症状は軽度である。

水疱性類天疱瘡の抗原としては従来から 180kD と 230kD の2つのタンパクが考えられてきた⁷⁾。現在, 230kD タンパクは BPAG I (Bullous pemphigoid Antigen I), 180kD タンパクは BPAG II と呼ばれ, 共にヘミデスモゾームを構成する分子である。cDNA の解析により BPAG I はヘミデスモゾーム接着板に存在する細胞内タンパクであり, BPAG II は膜貫通型のタンパクで直接細胞外マトリックスと結合することが示されている⁸⁾。また, 新生マウスに抗マウス BPAG II ウサギ抗体を投与することにより類天疱瘡の病変を再現できることが示され, BPAG II が病因に重要な意味をもっていると考えられ

た⁹⁾。さらに BPAG II の細胞外部位で細胞膜に近い部位の NC16a 領域が水疱性類天疱瘡の主要な病原性エピトープであることが明らかにされている¹⁰⁾。また、BPAG II の細胞外の先端に近い部位は癬痕性類天疱瘡の抗原部位であることも示されている⁸⁾。一方、細胞内タンパクである BPAG I の病因的意味は不明であるものの、多くの水疱性類天疱瘡患者血清が BPAG I の PI-1 および PI-2 領域と反応することから BPAG I の病原性エピトープとしては PI-1, PI-2 領域と考えられている³⁾。

今回、水疱性類天疱瘡の病原性エピトープに対する抗体を用いて、皮膚と口腔粘膜での反応性を比較した結果、PI-1, PI-2 の染色状態は皮膚と口腔粘膜で特に違いはみられなかった。しかし、NC16a の染色状態は皮膚と口腔粘膜で大きく違っていた。今回の結果は蛍光抗体法によるものであるため厳密には定量的なことは言えない。しかし、同一条件で染色を行い、同一条件で写真撮影を行い明らかな相違を認めた。

水疱性類天疱瘡の口腔症状については、口腔に症状を認めた 20 例の症状を検討し、症状を認めた部位は頬粘膜が 65% と最も多く、次いで口蓋が 50% で、舌背 (15%)、口唇 (10%)、歯肉 (0%) にはほとんど症状を認めなかったことを既にわれわれは報告した¹¹⁾。

以上の結果から、口腔粘膜では BPAG II の NC16a 領域の発現が弱いため、これを認識する自己抗体がヘミデスマゾームに結合できないと考えられる。このことが水疱性類天疱瘡で口腔症状が軽度である理由の 1 つと思われた。NC16a 領域のアミノ酸配列が皮膚と口腔粘膜上皮で異なるのか、あるいは他の分子によって NC16a 領域がマスクされていることなどが考えられ、このことは皮膚と口腔粘膜では上皮細胞—基質間の接着機構の違いを示唆する重要な所見と考えられる。今後さらに分子レベルでの研究を継続して行う予定である。

文 献

- 1) 神部芳則, 赤坂庸子: 口腔粘膜に生じる自己免疫性水疱症。—細胞接着と水疱形成の分子機構— 日口粘誌 4: 25-43,

1998.

- 2) Giudice GJ, Wilsky KC, Anhalt GJ, et al.: Development of an ELISA to detect anti-BP 180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J Invest Dermatol* 102: 878-881, 1994.
- 3) Joyce Rico M, Korman NJ, Stanley JR, et al.: IgG antibodies from patients with bullous pemphigoid bind to localized epitopes on synthetic peptides encoded by bullous pemphigoid antigen cDNA. *J Immunol* 145: 3728-3733, 1990.
- 4) Jinbu Y, Kitajima Y, Koto S, et al.: Different effects of pemphigus antibody and plasmin on the distribution of keratin intermediate filaments and desmoplakins between cultured oral and epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 8: 115-119, 1992.
- 5) Shirakata Y, Amagai M, Hanakawa Y, et al.: Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 110: 76-78, 1998.
- 6) 神部芳則: 口腔粘膜における細胞間接着機構ならびにその異常によって生じる口腔粘膜病変に関する研究 (抄). 第 53 回日本口腔科学会総会プログラム抄録集 110-111, 1999.
- 7) Suzuki M, Harada S, Kanazawa K, et al.: Relationship between antigens and IgG subclasses in bullous pemphigoid. *Autoimmunity* 18: 217-25, 1994.
- 8) 橋本 隆: 自己免疫性水疱症と細胞接着分子. 医学のあゆみ 187: 68-72, 1998.
- 9) Liu Z, Diaz LA, Troy AF, et al.: A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, Bp180. *J Clin Invest* 92: 2480-2488, 1993.
- 10) Matsumura K, Amagai M, Nishikawa T, et al.: The majority of bullous pemphigoid and herpes gestations serum samples react with the NC16a domain of the 180-kD bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol Res* 288: 507-509, 1996.
- 11) Jinbu Y, Koyano H, Noguchi T, et al.: Comparative study of the intraoral distribution of the lesions with bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Jpn J Oral Diag Oral Med* 8: 511-515, 1995.

別冊請求先: 神部芳則 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1
自治医科大学歯科口腔外科学講座

Difference in Expression of Bullous Pemphigoid Antigen (BPAG I, BPAG II) between Normal Oral Mucosa and Skin

Yoshinori JINBU, Hiromi NAITO, Tadahide NOGUCHI,
Masayuki SUZUKI* and Yoko AKASAKA

Department. of Dentistry and Oral Surgery, Jichi Medical School
(Chief: Prof. Yoko AKASAKA)

*Department. of Dermatology, Jichi Medical School
(Chief: Prof. Hidemi NAKAGAWA)

J. Jpn. Oral Muc. Membr., 5 : 49~53, 1999

Abstract : Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune bullous disease characterized by the presence of circulating autoantibodies specific for hemidesmosomal proteins ; BPAG I (230 kD protein) and BPAG II (180 kD protein). In order to explain why oral lesions are seldom seen in BP patients, the distribution of BPAG I and BPAG II in oral mucosa and skin was investigated. [Methods] Normal oral mucosa (gingiva, buccal mucosa, tongue dorsal mucosa n=3) and skin (n=3) were obtained during surgery, and cryosections were prepared. First antibodies were rabbit polyclonal antibodies against synthetic peptides of P1-1, P1-2 and NC16a. [Results] There were no differences in the staining pattern of BPAG I between oral mucosa and skin. All layers except the keratinized layer were stained by anti-BPAG II antibody in skin. However, positive staining was observed only of the basal cells in buccal mucosa and no staining in the tongue and gingiva showing a significant difference in the expression pattern of BPAG II between oral mucosa and skin.

Key words : Bullous pemphigoid, BPAG I, BPAG II, Oral Mucosa, Skin.

Reprint requests to Yoshinori JINBU, Department of Dentistry and Oral Surgery, Jichi Medical School, Yakushiji 3311-1, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan.

[Received September 10, 1999 : Accepted November 10, 1999]