総 説

自己免疫と感染症の標的分子, デスモグレイン

天 谷 雅 行

Desmoglein, the target molecule in autoimmunity and infection

Masayuki AMAGAI

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

(Received May 28, 2006)

summary

To form the human body and maintain the integrity of its complex tissues, individual cells need to hold tightly to each other. The desmosome is the major type of intercellular adhesive junction, and has desmoglein (Dsg), a cadherin type cell-cell adhesion molecule, as a transmembrane component. Dsg is now known to be targeted in autoimmune diseases, infectious diseases, as well as inherited diseases. Patients with pemphigus, an autoimmune blistering disease of the skin and mucous membrane, have IgG autoantibodies directed against Dsg1 and Dsg3. A subset of patients with pemphigus have Dsg1/Dsg4 crossreacting IgG autoantibodies. Exfoliative toxins produced by *Staphylococcus aureus*, which causes Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) and bullous impetigo, specifically digest Dsg1. A subset of patients with SSSS develop a low titer of anti-Dsg1 IgG autoantibodies. A mutation in DSG1 gene causes striate palmoplantar keratoderma and a mutation in DSG4 gene causes inherited hypotrichosis. It is not clear why so many diseases are clustered in desmogleins, but there must be a reason for this. Studies on desmogleins will provide an important framework to understand the mysteries between autoimmunity and infection.

Key words——autoimmunity; skin infection; desmoglein; cadherin; autoantibody

抄 録

デスモゾームは様々な組織の複雑な構築の形成, 維持に重要な役割をしている。デスモゾームの膜構成蛋白として, カドヘリン型の細胞間接着因子デスモグレイン (Dsg) がある。Dsg は, 4 種のアイソフォームの存在が知られ, 自己免疫, 感染症, そして遺伝性疾患の標的蛋白あるいは原因遺伝子となっていることが明らかとなった。皮膚・粘膜に水疱, びらんを生じる天疱瘡は, Dsg1 と Dsg3 に対する IgG 自己抗体により生じる自己免疫性疾患である。近年, 天疱瘡の一部の患者では, Dsg1/Dsg4 交叉自己抗体が存在することも明らかにされた。ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) あるいは水疱性膿痂疹を起こす黄色ブドウ球菌産生外毒素 (ET) は, Dsg1 を特異的に切断するセリンプロテアーゼである。そして, SSSS 罹患後に低いながらも抗 Dsg1 IgG 自己抗体の産生が確認された。DSG1 遺伝子に変異があると線状掌蹠角化症となり, DSG4 遺伝子に変異がある先天性貧毛症となる。なぜ, これだけ多くの皮膚疾患が Dsg を標的としているのか明らかでない。しかし, Dsg を鍵として, 感染症との接点から自己免疫の発症機序が解明されることが期待される。

はじめに

デスモゾームは, 上皮系組織や心筋などに見られる細胞間接着装置の一つである。デスモゾームには, カドヘリン型接着因子であるデスモグレイン (Dsg) ならびにデスモコリン (Dsc) が膜貫通蛋白として発現している¹⁾。Dsg 分子の遺伝子が 90 年初頭として単離されて以来, 様々な疾患が Dsg を標的とすることが明らかにされた。特に, 重層扁平

平上皮に主に発現の見られる Dsg1, Dsg3, Dsg4 は, 自己免疫疾患, 皮膚感染症, ならびに遺伝性皮膚疾患の標的分子あるいは原因遺伝子となっていた。本稿では, Dsg と取り巻くこれらの疾患の最新知見について概説する。

I. デスモグレインを標的抗原とする
自己免疫性疾患, 天疱瘡

天疱瘡は, 尋常性天疱瘡, 落葉状天疱瘡, および腫瘍随伴性天疱瘡の 3 型に大きく分類される。ここでは, 古典的天疱瘡である尋常性天疱瘡と落葉状天

疱疹について触れる。

1964 年, Beutner と Jordon が蛍光抗体法による表皮細胞に対する自己抗体を発見し²⁾, 天疱瘡が皮膚特異的な自己免疫性疾患であるという現在の天疱瘡の概念の基本が確立した。天疱瘡は, 皮膚・粘膜に認められる自己免疫性水疱性疾患であり, 病理組織学的に表皮細胞間の接着が障害される結果生じる棘融解 (acantholysis) による表皮内水疱形成を認め, 免疫病理学的に表皮細胞膜表面に対する自己抗体が皮膚組織に沈着するあるいは血清中に認められることを特徴とする疾患とされる。天疱瘡標的抗原が明らかにされた現在では, 抗デスマoglein IgG 自己抗体による自己免疫性疾患と再定義することも可能である³⁾。尋常性天疱瘡抗原はデスマoglein 3 (Dsg3), 落葉状天疱瘡抗原はデスマoglein 1 (Dsg1) である^{4,5)}。

天疱瘡の基本的な水疱形成機序は, 自己抗体が表皮細胞間接着分子デスマoglein の機能を阻害するために細胞間の接着が障害され水疱ができると理解される。落葉状天疱瘡患者血清中には, 抗 Dsg1 IgG 抗体のみが認められる。尋常性天疱瘡のなかで粘膜病変を主症状とする粘膜優位型尋常性天疱瘡では, 抗 Dsg3 IgG 抗体のみを認める。粘膜のみならず, 皮膚にもびらん・水疱を広範囲に有する粘膜皮膚型尋常性天疱瘡では, 抗 Dsg3 IgG 抗体のみならず抗 Dsg1 IgG 抗体をも認める⁶⁾。

II. 天疱瘡モデルマウスの開発

従来までの自己免疫モデルマウスの作製法は, 種々の野生型マウスに様々の免疫アジュバントを用いて抗原蛋白を繰り返し免疫するという強制免疫が主な方法であった。この方法はマウスの系統あるいは使用するアジュバンドにより免疫応答が異なるため, 実際にモデルができるか否かは経験主義的な要素に頼らざる得なかった。また, 作成されたモデルマウスの自己免疫反応が一過性である場合も多く, 持続的な自己免疫状態が継続するものは少なかった。

我々は, 新しい発想法から臓器特異的な自己免疫疾患モデルマウスの作製法を考案した⁷⁾。自己抗原ノックアウトマウスでは, 免疫系が発生する過程において欠損している自己抗原と出会うことはない。従って, その自己抗原と反応性を持つリンパ球は除去されることも不活化されることもなく, 欠失している遺伝子産物に対する免疫寛容は成立していない。そこで, 自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞

(T・B 細胞) を, 自己抗原を発現しているマウスに移植する。すると, 移植された自己抗原ノックアウトマウス由来の T・B 細胞は, レシピエントマウスの中で内在性のものとして発現し続けている自己抗原と出会い, 持続的な自己免疫反応が起こることが期待される。

尋常性天疱瘡の標的抗原 Dsg3 を欠損した Dsg3^{-/-}マウスでは, Dsg3 に対する免疫寛容が成立していない。Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞 (T, B 細胞を混じる) を, Dsg3 を発現するレシピエントマウス (Rag2^{-/-}マウス) に移植すると, 4-7 日後には, レシピエントマウスの血中に抗 Dsg3 IgG 抗体が検出され, 抗体価は 21 日後にほぼピークに達し, 6 ヶ月以上にわたり抗体産生が持続的に認められた。レシピエントマウスは, 口腔内に広範囲にびらんを認め, びらんによる摂食障害を生じ, 体重減少を認めた。また, 体重減少を示す時期に一致して, 休止期被毛の脱毛も認めた。さらに, 一部のレシピエントマウスでは, 鼻周囲の通常掻破する部位, あるいは足趾など圧力がかかる部位に一致して痂皮を伴うびらんを認めた。レシピエントマウスの皮膚, 口腔粘膜, 食道などの重層扁平上皮には, 上皮細胞膜表面に IgG が沈着し, 天疱瘡に特徴的な病理学的所見である基底層直上での裂隙形成が認められた⁸⁾。これらのことにより, 作成されたマウスは, 肉眼的, 病理学的, 免疫学的に天疱瘡の特徴的な所見を有するマウスモデルであると結論された。

III. 水疱形成を誘導する病的モノクローナル抗体の単離

天疱瘡患者では, 同程度の抗体価を認めても, 症状が重い人と軽い人がいる。必ずしも, 重い人の抗体価が高いわけではなく, 抗体価のみが重症度と関連するわけではない。では, 同じ抗 Dsg3 抗体でも, 抗体により質的な違いがあるのだろうか。患者血清を解析しても, 血清に複数の抗 Dsg3 抗体を混じるポリクローナル抗体であるため, 解析が困難である。そこで, 天疱瘡モデルマウスが病的活性を持つ抗体を産生していることに注目して, 天疱瘡モデルマウスから複数の抗 Dsg3 IgG モノクローナル抗体の単離を行い, その病的活性と抗体の認識する 3 次元エピトープの関係を解析した⁹⁾。

天疱瘡モデルマウスから, 8 種の抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK mAb) が得られた。各 AK mAb のハイブリドーマ細胞をレシピエントマウス

の腹腔内に接種し, レシピエントマウスにおける天疱瘡の表現型出現の有無を検討した (図 1). その結果, 全ての AK mAb において粘膜上皮の細胞膜表面への IgG 抗体の *in vivo* 沈着が確認されたが, AK23 mAb のみで基底層直上の裂隙の形成が見られ, 天疱瘡モデルマウスと同様の表現型が誘導された. 従って, *in vivo* において Dsg3 と結合できる抗体間にも質的な差があり, 病原性の強さに違いがあることが実証された.

さらに, 各 AK mAb の Dsg3 分子上の 3 次元エピトープを, Dsg1/Dsg3 キメラ分子および点突然変異分子を用いて解析した. 明らかな病原性を示さなかった AK mAb は Dsg3 の細胞外領域の中央部から C 末端側 (細胞膜側) を認識し, AK23 mAb は N 末端側のアミノ酸 V3, K7, P8, D59 を認識していた. これらのアミノ酸は, カドヘリン分子間が接

着する接着面を形成し, 機能上重要な部位である¹⁰⁾. これらの事実により, 天疱瘡患者間における重症度の違いがみられる分子的機序のひとつとして, 抗体の認識するエピトープが関与することを初めて実証することができた (図 2).

IV. Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニック (B Tr) マウスの作成および Dsg3 に対する B 細胞トレランス獲得機序の解明

自己反応性 B 細胞に対する末梢トレランスの機序は, 未だ不明な点が多い. 前述したように得られた AK mAb より, Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウス (B Tr) を作成し, B 細胞トレランス獲得機序の解明を試みた¹¹⁾. 水疱形成などの明らかな病原性を有しない AK7 mAb を産生する AK7 ハイブリドーマ細胞より RNA を精製し, 一本鎖抗体 (scFv) の技術にて AK7-scFv を作成し, H 鎖, L 鎖の変換領域の塩基配列を決定した. 得られた塩基配列に, それぞれの鎖に特異的なプロモータ, 定常領域を組み合わせ, IgM をバックボーンとしたベクターを作成した. 得られたベクターを用い H 鎖, L 鎖を有するマウス (AK7-LH1), もしくは H 鎖のみを有するマウス (AK7-H18) を C57Bl/6 遺伝的背景のもとにて作成した. なお H 鎖は IgM^a のアロタイプを用いた. 従って C57Bl/6 の H 鎖は IgM^b で有るため, アロタイプ特異的な抗体を用いることによりトランスジェン発現 B 細胞と内在性 B 細胞を区別することができる.

Dsg3 は, 皮膚, 粘膜に発現しているが, 骨髄に発現していないことより, Dsg3 特異的な B 細胞は骨髄では検出されるが, 末梢リンパ組織で脾臓, リンパ節では検出されないと当初予想された. ところが, AK7-LH1 マウスを解析したところ, IgM^a 陽性細胞は, 骨髄のみならず, 脾臓, リンパ節でも認められた (図 3). これらの IgM^a 陽性の B 細胞は, Dsg3 との反応性を有していることも確認された. さらに, AK7-LH1 マウス脾細胞は抗 IgM 抗体, rDsg3 にて刺激することにより, 細胞内 Ca 濃度の一過性の上昇がみられた. また, 野生型マウス, AK7-LH1 マウス, AK7-H18 マウスの血中総 IgM 濃度, 抗 Dsg3-IgM 抗体価を検討したところ, 総 IgM 濃度はマウス間に優位差を認めなかったが, 抗 Dsg3-IgM 抗体は, 有意に AK7-LH1 マウスのみ高い抗体価を示した. さらに, AK7-LH1 マウスでは直接蛍光抗体法により粘膜上皮細胞間への抗

図 1 成体マウスを用いたハイブリドーマの腹腔内接種による病原性の確認.

AK23 ハイブリドーマを接種したマウスでは, 口周囲 (a), 眼周囲 (b) にびらんおよび脱毛, 背部 (c) の脱毛が見られ, 天疱瘡モデルマウスと同様の表現型を認めた. AK19 ハイブリドーマを接種したマウスでは, 明らかな腹水貯溜を認めるにもかかわらず, 天疱瘡の表現型は認められなかった (d). Tsunoda et al, J Immunol 170: 2170-78, 2003 より改変

図 2 抗 Dsg3 抗体病的活性の強度とエピトープ.

水疱形成能が強い AK23 mAb は, Dsg3 分子の機能上重要な Dsg 分子同士が接する接着面に結合し, 水疱形成能が弱い他の AK mAb は機能上あまり重要でない他の領域に結合する.

図3 AK7 Dsg3 特異的 B 細胞は、末梢リンパ組織において存在する。

AK7-LH1, ならびに野生型マウス (C57Bl/6) の骨髄, 脾臓, リンパ節の B 細胞を示す. AK7-LH1 マウスにて x を発現している B 細胞は、骨髄だけではなく、脾臓, リンパ節にも認められた. Ota et al, Int Immunol 16: 1487-98, 2004 より改変.

IgM 抗体の in vivo での沈着が確認された. 以上の結果より AK7-Dsg3 特異的 B 細胞は、トレランスによる排除機構から逃れ、末梢において除去されることも、不活化されることもなく存在することが明らかにされた.

今後、病的活性を持つ AK23 mAb の可変領域から同様に B Tr マウスを作成し、末梢リンパ組織における Dsg3 特異的 B 細胞の挙動を解析し、Dsg3 に対する B 細胞トレランスのメカニズムが解明されることが期待される.

V. 新規デスモグレイン, Dsg4 に対する天疱瘡自己抗体の反応

1990 年に最初のデスモグレイン cDNA がウシから単離がされ¹²⁾, 続けて 3 種のデスモグレインが同定されて以来, 10 年以上にもわたりデスモグレインのアイソフォームは, Dsg1, Dsg2, Dsg3 の 3 種であるとされてきた. DSG 遺伝子は第 18 染色体上にクラスターを形成し存在している. ゲノムプロジェクトによりヒト染色体の全塩基配列が解明され, デスモグレイン遺伝子クラスターにもう一つの遺伝子の存在が明らかにされた¹³⁾. さらに, DSG4 遺伝子に変異があると, 先天的貧毛症となることも明らかにされ, Dsg4 が毛嚢形成に重要な役割をしていることが示唆された¹³⁾.

この 4 種のアイソフォームは, 特徴的な組織発現をヒトで示す. Dsg2 はデスモソームを有する全ての組織において発現が認められるが, Dsg1 と Dsg3 の発現は主に重層扁平上皮に局限して認められる. Dsg4 は, 主に毛嚢において発現が認められる. 表皮では, Dsg1 の発現はほぼ全層において認めら

れ, 上層に行くに従いその発現が強くなる傾向があるのに対し, Dsg3 の発現は基底層と傍基底層に局限して認められる. 一方, 口腔粘膜上皮では, Dsg3 が上皮のほぼ全層に強く発現するのに対し, Dsg1 は基底層を除く全層に弱く発現する. これに対し, Dsg2 は表皮や粘膜上皮の基底層に局限して, また Dsg4 は表皮の顆粒層と口腔粘膜上皮の上層において, それぞれ極弱く発現していると考えられている.

天疱瘡患者血清と組換え Dsg4 蛋白の反応性を免疫沈殿法を用いて検討したところ, 落葉状天疱瘡ならびに粘膜皮膚型尋常性天疱瘡の患者血清が反応したが, 粘膜優位型尋常性天疱瘡ならびに正常人血清とは反応性を示さなかった¹⁴⁾. 落葉状天疱瘡ならびに粘膜皮膚型尋常性天疱瘡の患者血清は, ともに抗 Dsg1 抗体を含んでいるために, 抗 Dsg1 抗体との交叉反応性が検討された. すると, Dsg4 と天疱瘡血清の反応性は, Dsg1 抗体を組換え Dsg1 蛋白で吸収除去してしまうと消失することが確認された. Dsg4 蛋白で抗 Dsg4 抗体を吸収除去しても Dsg1 との反応性は保たれた. さらに, Dsg4 蛋白カラムで, Dsg4 と反応する IgG 自己抗体を精製し, さらに Dsg1 と Dsg4 との反応性を検討すると, Dsg4 のみならず Dsg1 にも反応することも確認された. 以上の結果から, 天疱瘡血清のなかで Dsg4 と反応性を示すものは存在するが, 一部の抗 Dsg1 抗体の Dsg4 への交叉反応によることが示された (図 4)¹⁴⁾.

では, 他のアイソフォーム間の明かな交叉反応は知られていないのに, なぜ Dsg4/Dsg1 に交叉反応を示す自己抗体が存在するのであろうか. 抗 Dsg4/Dsg1 交叉自己抗体の存在の発見は, 天疱瘡におけ

図4 天疱瘡における抗 Dsg4 IgG 抗体の存在.

天疱瘡において、抗 Dsg1 IgG 抗体と抗 Dsg3 IgG 抗体の存在は知られていたが、抗 Dsg4 IgG 抗体の存在が明らかとなった。しかし、抗 Dsg4 IgG 抗体は、抗 Dsg1 IgG 抗体の一部が交叉反応を示すことで存在することが確認された。

る自己抗体産生機序の解明にあたり、重要な鍵となるかもしれない。

VI. デスモグレインを標的とする皮膚感染症、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群および水疱性膿痂疹

ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS) は、黄色ブドウ球菌の産生する外毒素 (exfoliative toxin, ET) により水疱形成が誘導される疾患である。SSSS は、主に乳幼児に罹患しやすく、特に新生児では重症化し、免疫不全を伴う成人にも認められる。口囲、鼻周囲、眼囲の潮紅、水疱、痂皮が生じ、顔面は軽度浮腫状になる。その後、全身皮膚が広範囲にシート状に剥離し、浅達性熱傷様となる。表皮は摩擦により容易に剥離し (ニコルスキー現象)、塗れたティッシュペーパー状になる。咽頭、鼻孔、眼脂などに黄色ブドウ球菌が検出され、ブドウ球菌の産生した ET が血流を介し全身皮膚に至り、表皮上層の顆粒層のレベルで裂隙を生じると考えられている。SSSS を全身型とすると、部分型が水疱性膿痂疹 (bullous impetigo) である。水疱性膿痂疹では、局所で菌が増殖し、ET による水疱形成を感染周囲に認める。

SSSS および水疱性膿痂疹の水疱形成における ET の役割は、1970 年に Melish と Glasgow の実験により明らかにされている¹⁵⁾。患者より分離された ET 産生黄色ブドウ球菌の懸濁液を新生仔マウスに投与すると、数時間後にマウスに皮膚剥脱が認められる。しかし以来約 30 年間、ET の水疱形成の分子メカニズムは不明のままであった。

図5 黄色ブドウ球菌毒素と落葉状天疱瘡 IgG 自己抗体投与により誘導される水疱の病理学的所見. 両者で共に、表皮細胞の壊死を伴わず、表皮上層で水疱形成が認められ、同一の病理学的所見を呈する。

ところが、落葉状天疱瘡と SSSS を比較してみると実に多くの共通点を有していることに気が付いた。落葉状天疱瘡も SSSS も皮膚以外の他の臓器は侵されず、粘膜に病変を見ず、皮膚にのみ病変が限られている疾患である。病理組織学的には、ともに表皮上層のレベルで表皮細胞間の接着が障害され、水疱が形成されている。水疱には表皮細胞の壊死を伴わない。落葉状天疱瘡の患者血清から IgG を精製して新生仔マウスに投与すると水疱形成が誘導され、ET を新生仔マウスに投与すると、やはり水疱が誘導される。さらに、新生仔マウスに誘導された水疱の病理組織学的所見は全く見分けがつかない程、酷似している (図 5)。これらの臨床、病理学的な観察事項は、ET の標的蛋白は Dsg1 であるということを示唆している。

ET には、A 型と B 型の 2 種が知られており、まず A 型 (ETA) を用いて実験を施行した。ETA および生食を新生仔マウスに投与した後に、皮膚の Dsg1 と Dsg3 の発現を免疫染色で検討してみると、Dsg3 の発現は ETA 投与により全く影響を受けないが、Dsg1 の発現は ETA 投与により消失しているのが認められた。免疫ブロット法により Dsg1 および Dsg3 の分子量を検討してみると、Dsg1 のみが ETA を投与により 113 kD に分解されていた。さらに、Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域のみを組換え蛋白としてバキュロウイルスの発現系を用いて作成し、in vitro において ETA が Dsg1 を分解できるか検討した。すると、濃度依存性に、ETA は組換え Dsg1 を分解するのに対して、組換え Dsg3 には全く影響を受けないことが示された。以上の結果より、ETA は、落葉状天疱瘡抗原である Dsg1 を特異的に認識し、切断することが結論された¹⁶⁾。同様の手法により、もうひとつの血清型である ETB も、ETA 同様に、Dsg1 と特異的に認識し、切断す

ることが確認された¹⁷⁾.

表皮剥脱性毒素は現在知られている血清型以外に新しい型が存在する. 皮膚感染症から分離培養された黄色ブドウ球菌の遺伝子から, ETA, ETB と相同性を示す ETD が単離された. ETD を組換え蛋白として産生し, 新生仔マウスに投与したところ水疱形成が誘導された. さらに, ETD を投与したマウスの皮膚において, Dsg1, Dsg3 を蛍光抗体法にて染色してみると, Dsg3 の染色性は影響を受けないものの, Dsg1 の染色性は消失した. さらに, 組換え Dsg1, Dsg3 蛋白と ETD を *in vitro* で反応させてみると, ETD は Dsg1 を特異的に, 濃度依存性に切断することが確認された. 従って, ETA, ETB のみならず, 新しく発見された ETD においても, 水疱形成における分子機構は同一であることが明らかにされた¹⁸⁾.

さらに, ETD が陽性である黄色ブドウ球菌の分離された原疾患を見てみると, 興味深いことに, 21 例中 20 例は膿痂疹以外の感染症から分離されており, 膿痂疹から分離されたのはたった 1 例のみであった. 従って, SSSS 及び水疱性膿痂疹における水疱形成を誘導すると思われる表皮剥脱性毒素が, それ以外の皮膚感染症においても何らかの病的役割をしている可能性が示唆された.

VII. ET の Dsg1 消化における分子メカニズムの解明

ETA と ETB の結晶構造解析に関する過去の報告により, ETA と ETB とともに基質蛋白のグルタミン酸の直後を切断するグルタミン酸特異的セリンプロ

テアーゼである可能性が予測された^{19,20)}. しかし ET の基質が当時は不明であったことから, その活性を証明することが出来なかった. そこで, ET による Dsg1 分子上の切断部位について解析を行った. ヒトおよびマウス Dsg1 の組換え蛋白を 3 種の ET (ETA, ETB, ETD) と *in vitro* で反応させ, 切断された Dsg1 分子の切断端のペプチド配列解析を行った. その結果 3 種の ET とともに, Dsg1 の細胞外領域のうち EC3-EC4 間に存在する 381 番目のグルタミン酸の直後を特異的に切断することが示された (図 6)²¹⁾.

続いて, ET による Dsg1 の切断がセリンプロテアーゼ活性によるものかどうか検討するために, 3 種類の ET について, セリンプロテアーゼの触媒中心となるセリン残基をアラニンに変異させた変異 ET を作製し, *in vitro* における組換えヒト Dsg1 の切断活性について検討を行った. その結果 3 種の変異 ET とともに, *in vitro* における組換え Dsg1 の切断活性を消失していた²¹⁾. 続いて ETA が Dsg1 に対し特異的に結合するか検討するため, 変異 ETA をマウス皮膚の生組織と反応させ, 固定後に変異 ETA および Dsg1 の組織内分布を蛍光抗体法により観察した. その結果, 変異 ETA がマウス表皮細胞間に結合するとともに, 組織中における変異 ETA の分布は Dsg1 の発現分布と一致していた²¹⁾. さらに 3 種の変異 ET とバキュロウイルス発現系で作製した組換えヒト Dsg とを *in vitro* で反応させたところ, 3 種の変異 ET とともに組換えヒト Dsg1 と結合したのに対し, 組換え Dsg3 とは結合しなかった.

図 6 デスモグレイン 1 の分子構造と ET の切断部位. デスモグレインは細胞膜を 1 回貫通する膜蛋白で, 細胞外領域は約 110 アミノ酸からなるいわゆるカドヘリンリピートがタンデムに 5 回 (EC1 から EC5) 繰り返す. ETA, ETB, および ETD すべては, N 末から 381 番目のグルタミン酸 (E) の直後で Dsg1 を切断する.

さらに Dsg1 分子上の ETA 結合領域を解析するために, ETA による切断端直前のアミノ酸配列をほぼ完全に保存しながらも, ETA により切断されないイヌ Dsg1 とヒト Dsg1 とのスワッピング分子ならびに点変異導入蛋白が作製された. それぞれの蛋白と ETA との反応を解析してみると, ETA と Dsg1 の結合には, Dsg1 切断端より約 110 アミノ酸上流に存在する EC3 ドメイン上の 5 残基が重要であることが示された²²⁾.

以上の結果により, 黄色ブドウ球菌の産生する 3 種類の ET とともに, Dsg1 分子上の 1 カ所, すなわち第 381 番目のグルタミン酸の直後を特異的に, かつ直接切断する活性を持つセリンプロテアーゼであることが証明された. したがって, ET は, 単一の基質蛋白のある 1 カ所のみを特異的に切断する, 極めて基質特異性の高いプロテアーゼである. 黄色ブドウ球菌は, 増殖するために, 表皮のバリアをたった一分子でとばしてしまう分子ナイフを獲得していたことになる²³⁾.

VIII. ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) 感染後の Dsg1 に対する免疫応答

ET の標的分子が同定されたことにより, 皮膚感染症における標的分子が, 自己免疫性疾患の標的抗原と同一であることを示していることにもなる. 従って, しばしば話題とされる感染症と自己免疫の観点から Dsg1 を見てみることにした. すなわち, SSSS あるいは水疱性膿痂疹患児では, 黄色ブドウ球菌が産生する ET により Dsg1 が切断されるが, その切断された Dsg1 が免疫源となり, Dsg1 に対する自己免疫反応を惹起する可能性はないか検討した²⁴⁾.

ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS), およびその部分症である水疱性膿痂疹 (BI) に罹患した

患児からペア血清を採取し, Dsg1 に対する抗体産生の有無を ELISA 法, 免疫ブロット法を用いて検討した. 30 例の SSSS 患児のうち, 6 例 (20%) の患児で, 罹患後 7 日以降に, 抗 Dsg3 IgG 抗体の産生は全く認められないにもかかわらず, 低抗体価の抗 Dsg1 IgG 抗体の産生が認められた (図 7). 12 例の BI 患児では, 明らかな抗 Dsg1 IgG 抗体の産生は認められなかった. BI では, 病変部が一部の皮膚に局限しているために, 抗体産生を惹起するにいたらなかったのではないかと考えられた. Dsg1 に対する自己免疫疾患である落葉状天疱瘡を発症するには, さらなる遺伝的要因, 環境要因などの未同定の因子が必要であるが, Dsg1 を修飾する感染症が自己免疫反応を惹起しうることが示された.

ブラジルのある未開発地域において落葉状天疱瘡が風土病的に多発することが知られている (fogo selvagem)²⁵⁾. 未だに自己免疫疾患が多発する理由は明らかになっていないが, 慢性に ET 産生ブドウ球菌に感染することにより, Dsg1 に対する自己免疫疾患が惹起され続ける結果, fogo selvagem が発症している可能性も考えられる.

これらの結果は, 皮膚感染症が自己抗原を修飾し, 自己免疫反応の引き金になりうるということが初めて示され, 自己免疫発症機序を解明する上で有用な知見を供した.

最 後 に

1964 年に天疱瘡の自己抗体が発見され, 約 40 年の歳月が流れている. その間, その標的抗原がデスマグレインと同定され, ELISA 法による血清診断も容易となった. 自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞移植による天疱瘡モデルマウスが開発され, 自己抗体産生のメカニズムの解析が可能となった. さらに, SSSS および水疱性膿痂疹を起こす黄色ブド

図 7 SSSS 罹患後の抗 Dsg1 抗体産生. ELISA 法(a)および免疫ブロット法(b)により, SSSS 罹患後に抗 Dsg1 抗体が抗体価は低いにも関わらず産生されたことが示された. Anzai et al, J. Invest Dermatol 129: 2139-41, 2006 より改変

ウ球菌毒素 ET の標的となっていることも示された。さらに、社会問題となっている自己免疫疾患、アレルギー疾患の克服を目指して、デスモグレインというひとつの分子を通して、より普遍的な免疫現象が見えてくることを願っている。

文 献

- Green, K. J. and C. A. Gaudry, : Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**(3) : 208–216, 2000.
- Beutner, E. H. and R. E. Jordon, : Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med*, **117**(505) : 505–510, 1964.
- Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J. R. Stanley, : Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, **67**(5) : 869–877, 1991.
- Stanley, J. R. : Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. *Adv Immunol*, **53** : 291–325, 1993.
- Amagai, M., Pemphigus, in *Dermatology*, J. Bologna, et al., Editors. 2003, Harcourt Health Sciences : London. p. 449–462.
- Amagai, M., et al. : The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol*, **40** : 167–170, 1999.
- Amagai, M., et al. : Use of autoantigen knock-out mice to develop an active autoimmune disease model of pemphigus. *J Clin Invest*, **105** : 625–631, 2000.
- Ohyama, M., et al. : Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, **118** : 199–204, 2002.
- Tsunoda, K., et al. : Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol*, **170** : 2170–2178, 2003.
- Boggon, T. J., et al. : C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, **296** : 1308–1313, 2002.
- Ota, T., et al. : Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. *Int Immunol*, **16**(10) : 1487–1495, 2004.
- Koch, P. J., et al. : Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol*, **53**(1) : 1–12, 1990.
- Kljuic, A., et al. : Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion : evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*, **113**(2) : 249–260, 2003.
- Nagasaka, T., et al. : Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest*, **114**(10) : 1484–1492, 2004.
- Melish, M. E. and L. A. Glasgow, : The staphylococcal scalded skin syndrome : Development of an experimental model. *N Engl J Med*, **282** : 1114–1119, 1970.
- Amagai, M., et al. : Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome targets desmoglein 1. *Nature Medicine*, **6**(11) : 1275–1277, 2000.
- Amagai, M., et al. : Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. *J Invest Dermatol*, **118** : 845–850, 2002.
- Yamaguchi, T., et al. : Identification of Staphylococcus aureus etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun*, **70**(10) : 5835–5845, 2002.
- Vath, G. M., et al. : The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease. *Biochemistry*, **36**(7) : 1559–1566, 1997.
- Papageorgiou, A.C., et al. : Structural similarities and differences in Staphylococcus aureus exfoliative toxins A and B as revealed by their crystal structures. *Protein Sci*, **9**(3) : 610–618, 2000.
- Hanakawa, Y., et al. : Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest*, **110**(1) : 53–60, 2002.
- Hanakawa, Y., et al. : Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. *J Biol Chem*, **279**(7) : 5268–5277, 2004.
- Amagai, M. : Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol*,

- 48** : 244–252, 2003.
- 24) Anzai, H., J. R. Stanley, and M. Amagai, : Production of Low Titers of Anti-Desmoglein 1 IgG Autoantibodies in Some Patients with Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. *J Invest Dermatol*, **126**(9) : 2139–41, 2006.
- 25) Warren, S. J., et al. : The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. *N Engl J Med*, **343**(1) : 23–30, 2000.