

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10249

研究課題名（和文）水疱性類天疱瘡における抗BP180IgE抗体の動的解明

研究課題名（英文）Dynamic dissection of anti BP180 IgE antibodies in bullous pemphigoid

研究代表者

立石 千晴（TATEISHI, CHIHARU）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40597308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：水疱性類天疱瘡(BP)において、抗BP180IgE抗体がBP180と結合したのちに、抗BP180IgE抗体が内包化すること、および抗BP180IgE抗体がBP180と結合したのちに、BP180も内包化することをLive cell imaging法を用いて継時的に動的に観察することができた。これらの結果により、抗BP180IgE抗体が、BPの病態において何らかの関与を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水疱性類天疱瘡（BP）において抗BP180IgE抗体が、病態形成に何らかの関与を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In bullous pemphigoid (BP), it was possible to observe in a time-dependent fashion using Live cell imaging method that the anti BP IgE antibody binds with BP180, followed by the encapsulation of the anti BP180 IgE antibody, and that BP180 also encapsulates after the anti BP IgE antibody combines with BP180. These results suggest that anti BP180 IgE antibodies play a role in the pathogenesis of BP.

研究分野：皮膚科

キーワード：水疱性類天疱瘡 抗BP180IgE抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 水疱性類天疱瘡

自己免疫性水疱症（Bullous pemphigoid 以下 BP）は、皮膚を構成する細胞間接着分子に対する自己抗体が産生され、これにより細胞間の接着が障害され、水疱・びらん形成が生じる皮膚疾患群である。治療のために強い免疫抑制が必須であり、時として死に至る重篤な疾患である。自己免疫性水疱症は、抗表皮細胞膜抗体による天疱瘡群と抗表皮基底膜部抗体による類天疱瘡群に大別され、前者では表皮細胞間接着の障害を、後者では表皮真皮間接着の障害を生じる。BP は、患者の体液中にヘミデスモゾーム構成タンパクである 180kda 水疱性類天疱瘡抗原（BP180）及び 230kda 水疱性類天疱瘡抗原（BP230）に対する抗体が見出されることを特徴とし、高齢者に好発する最も頻度の高い自己免疫性水疱症である。近年の高齢化社会に伴い患者数が増加している。しかし、BP の発症機序については不明な点が多く、病態解明が望まれる。

(2) ヘミデスモゾーム

表皮角化細胞と基底膜の間の細胞-細胞外マトリクス結合は、ヘミデスモゾームといわれる接着機構によって行われている。BP180 および BP230 は、ヘミデスモゾームの構成分子の一つである（右図）。

(3) 抗BP180IgE抗体の病態への関与

2011 年 Fairly らは Normal Humna Epithelial Keratinocyte（以下 NHEK）を用いた細胞染色および電子顕微鏡を用いて、BP IgE 抗体が内包化されていることを報告した。近年 ELISA 法により BP

患者血清中に抗 BP180IgE 抗体が効率的に検出され、抗体価が病勢に相関するという複数の報告がある。ヒト化抗ヒト IgE モノクローナル抗体製剤である Omalizumab 投与により IgE 抗体値は高値のまま変化しなかったにもかかわらず水疱数が十分の一に減数した報告もある。

（Messingham et al, Immunol. Res;2014）これらの報告より抗 BP180IgE 抗体が BP の病態形成へ関与していることが考えられる。

(4) Live cell imaging 法

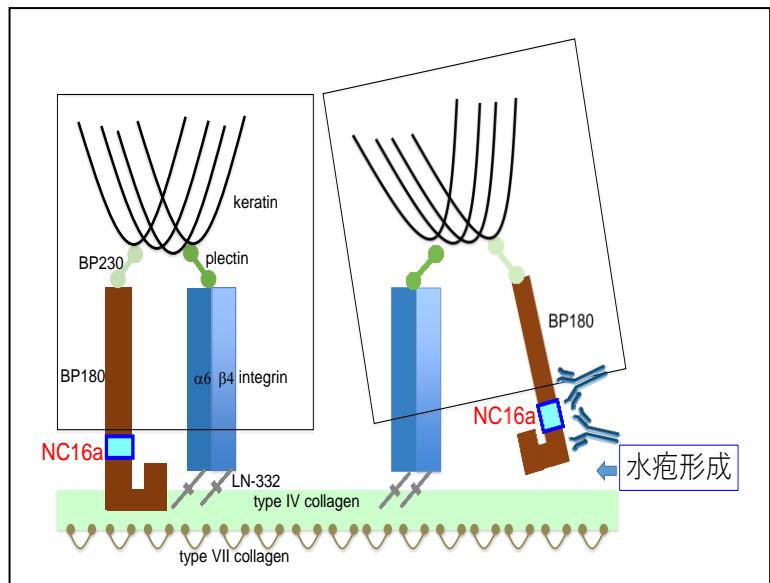
Live cell imaging 法とは、目的とするタンパクと GFP タンパクを融合させて発現させることにより、目的タンパクの細胞内での局在、運動を可視化する方法である。可視化されたタンパクを分子レベルで、観察することにより個々の生きた細胞において生命現象が“いつ”“どこで”“どのようなタイミング”で起こるのかを解明することができる。

(5) 水疱性類天疱瘡抗 BP180 抗体が BP180 へ結合した後の挙動の解析

2013 年研究分担者の鶴田らは、生きた細胞内で蛋白分子の動きを可視化する Live cell imaging 法を用いて、抗 BP180IgG 抗体が BP180 に結合した後の挙動を継続的に解析することに初めて成功し、抗 BP180IgG 抗体は、正常ヒト表皮角化細胞へ投与後、細胞内に内在化することを明らかにした。さらに抗 BP180IgG 抗体はマクロピノサイトーシスを通じて BP180 内在化と細胞接着力減弱を誘導することおよび内在化した BP180 は抗 BP180IgG 抗体と共局在することを報告した。（Hiroyasu et al. Am J Pathol 2013）さらに、抗 BP180 型粘膜類天疱瘡という BP 類縁疾患でも患者由来 IgG によってエンドサイトーシスが生じることを明らかにした（Naruse et al. Med. Mol. Morph. 2016）。

2. 研究の目的

水疱性類天疱瘡（BP）は、表皮基底膜部のヘミデスモゾーム分子 BP180 に対する自己抗体により、皮膚や粘膜に水疱・びらん・紅斑を生じる自己免疫性水疱症である。高齢化により患者数は増加し病態解明が切望される。我々は、生きた細胞内で蛋白分子の動きを可視化する Live cell



imaging 法を用いて、BP180 が抗 BP180IgG 抗体と結合し、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ細胞接着の低下がおこることが BP の重要な発症機序であることを世界に先駆けて示した。近年、抗 BP180IgE 抗体も BP の発症に関与するとの報告があいついでいるが詳細はわかっていない。今回我々は、Live cell imaging 法を用いて抗 BP180IgE 抗体が BP180 に対しどのような動態をとり、BP 発症にどのように関与するかを動的に解明することを目的とし研究を立案した。

3. 研究の方法

最初に、GFP-BP180 プラスミドを作成した。次に、作成した GFP-BP180 を正常ヒト表皮角化細胞あるいは 804G 細胞に遺伝子導入を行い、共焦点レーザー顕微鏡下に Live cell imaging 法を行った。アフィニティークロマトグラフィー法により、類天疱瘡患者血清中の IgE 抗体を分離し、患者 IgE 抗体投与後に Live cell imaging 法を行い、BP180 の動態を継時的に観察した。

4. 研究成果

(1) plasmid 作成

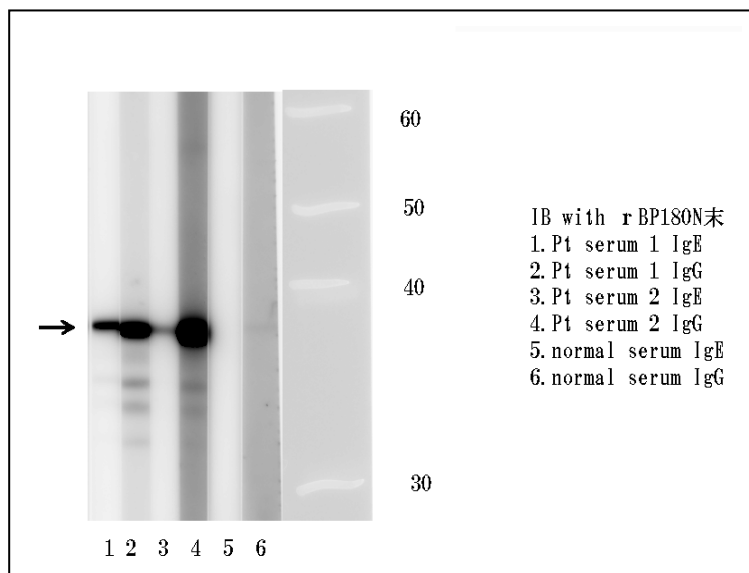
GFP-BP180 plasmid 作成。Green fluorescent protein (GFP)-BP180 ベクターを作製した。新生児表皮ケラチノサイトから RNA を抽出後、逆転写して cDNA を抽出。BP180 の両端プライマーを用いて PCR を行い BP180 cDNA を抽出。NT-GFP Fusion TOPO*TA Expression kit を用いて GFP-BP180 を作製することができた。

(2) Transfection

正常ヒト表皮角化細胞 (Normal Human Epidermal Keratinocytes / NHEK) またはラット膀胱癌由来 804G 細胞を 60mm ガラススライドの上に播種し 50-60% confluent の状態にする。遺伝子導入を行う 24 時間前に培養液を penicillin (PS) が含有されていないものに変更し、GFP-BP180 ベクターを Lipofectmaine2000 を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 6 時間後に通常培地に交換し、48 時間後に観察を開始した。

(3) 水疱性類天疱瘡患者血清から IgE を分離

当院皮膚科を受診した類天疱瘡患者で当研究に同意を得た患者血清を使用し、抗ヒト IgE 抗体を固層化したアフィニティカラムを作成し、IgE 抗体を精製した。BP 患者血清より IgE 抗体の抽出は、リコンビナント BP180N 末端蛋白を用いた免疫ブロット (左図) および NHEK 抽出蛋白で抗 BP180IgE 抗体を確認した。ELISA でも抗 BP180IgE 抗体を確認した。また、NHEK 抽出蛋白を用いたブロットでの 180KDa のバンドは、GST-NC16a による吸収実験で検出しないことを確認し、BP180 に特異的なバンドであることを示した。



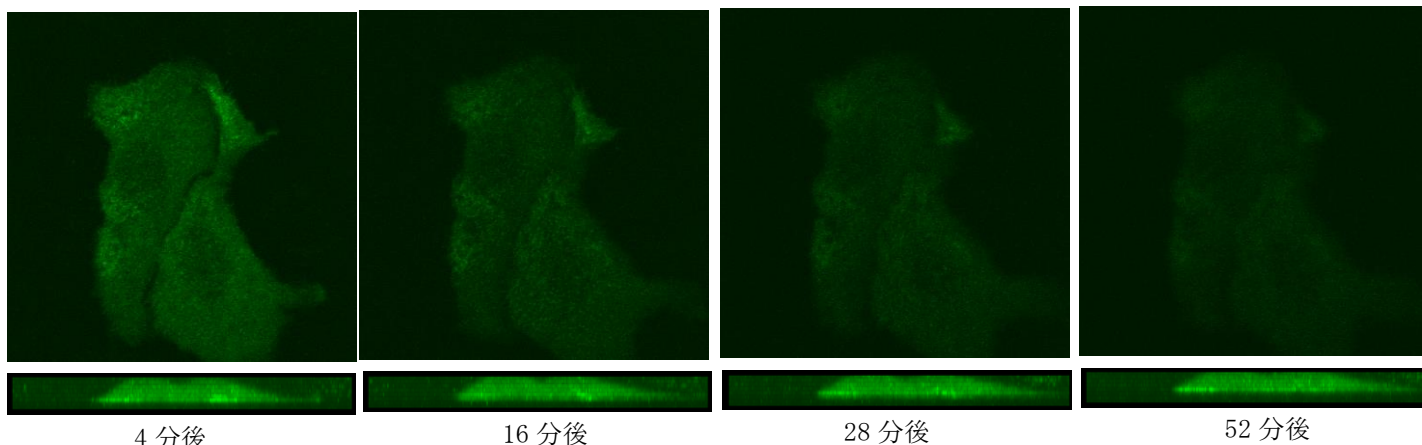
(4) Live cell imaging

患者 IgE 抗体投与後に Live cell imaging 法を行い、BP180 の動態を継時的に観察した。

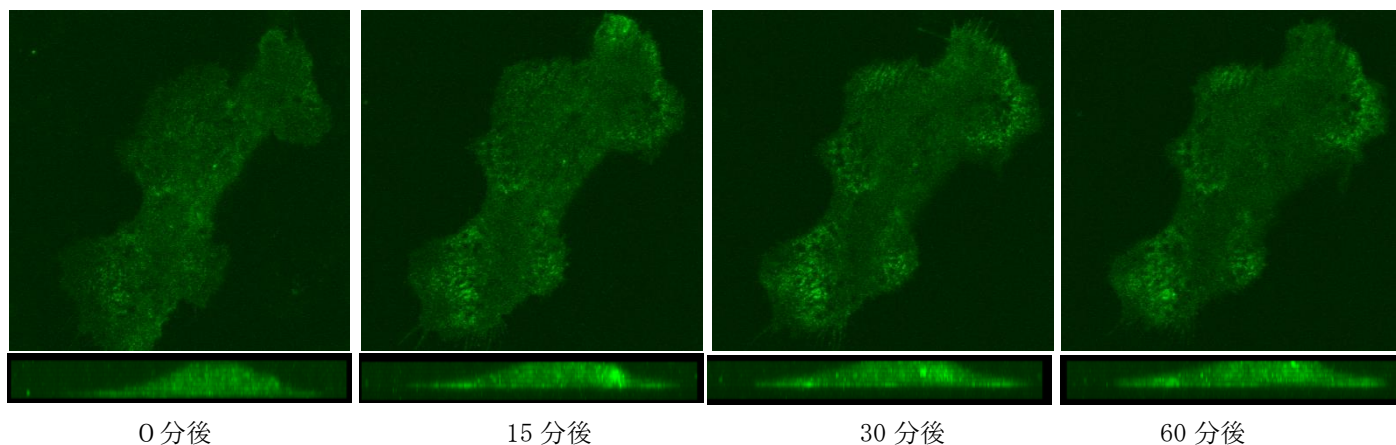
BP 患者 IgE 抗体誘導性の BP180 動態の機序を解明したところ、内包化を確認することができた。

(図上段) 抗 BP180IgE 抗体を添加したところ、16 分後から BP180 の内包化が確認でき、その後細胞の剥離も観察された。一方、コントロールである IgE 抗体を添加した場合 (図下段) には、内包化はみられず、細胞接着への影響はみとめられなかった。

抗 BP180IgE 抗体による GFP-BP180 の内在化



Control IgE



以上より、

- 抗 BPIgE 抗体が BP180 と結合したのちに、抗 BP180IgE 抗体が内包化することを Live cell imaging 法を用いて継時的に動的に観察することに成功した。
- 抗 BPIgE 抗体が BP180 と結合したのちに、BP180 も内包化することを Live cell imaging 法を用いて継時的に動的に観察することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小澤 俊幸 (Ozawa Toshiyuki) (50570602)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	鶴田 大輔 (Tsuruta Daisuke) (90382043)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	