

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K24134

研究課題名（和文）口腔内病変を生じた類天疱瘡患者の唾液中自己抗体の病原性解析

研究課題名（英文）Pathogenic analysis of autoantibodies in the saliva of patients with bullous pemphigoid presenting oral lesions

研究代表者

和田 麻友美（WADA, Mayumi）

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10846207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、唾液中に抗体が存在するという最近の知見に着目し、粘膜類天疱瘡（MMP）患者の唾液中に含まれる自己抗体を解析するものである。唾液中の自己抗体量が、口腔内の病勢と相関性があるのかなどについてはまだ報告がない。MMP患者の唾液を採取し、血清中の抗BP180抗体測定に用いられている検査キットを用いてELISA法を施行した。MMP患者の唾液においてIndex値は10以上を示し、陽性と判定された。また、粘膜症状の改善と連動し、吸光度の低下傾向が認められた。このことから、MMP患者は唾液中においても抗BP180抗体価の上昇が認められ、症状の変化とともに抗体価が変動する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMPやBP患者は高齢者も多く、また採血困難な患者などは一度の採血で何度も穿刺されることが予想され、精神的・肉体的な負担になっていると思われる。そのため、唾液中の抗体が血清中の抗体と同じように検出でき、評価することができるになれば、唾液採取のみの低侵襲な検査を診断の一助として利用することが可能になると考えられ、患者にとってもメリットとなる。これは歯科医師としてMMP患者の診療や病態解明を続けてきた申請者独自のアイデアに基づく研究である。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on recent findings regarding the presence of antibodies in saliva, and aims to analyze the autoantibodies present in the saliva of mucous membrane pemphigoid (MMP) patients. There have been no reports yet on whether the levels of autoantibodies in saliva correlate with oral disease progression. Saliva from MMP patients was collected and ELISA using a test kit designed for measuring anti-BP180 antibodies in serum was performed. In the saliva of patients with MMP, an Index value of 10 or higher was observed, indicating a positive result. Furthermore, a decrease in absorbance was noted to be associated with improvement in mucosal symptoms. This suggests that MMP patients may also show an increase in anti-BP180 antibody levels in their saliva, with the possibility of antibody levels fluctuating along with changes in symptoms.

研究分野：口腔外科

キーワード：水疱性類天疱瘡 粘膜類天疱瘡 自己抗体 血液 唾液

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid; BP) は、浮腫性紅斑と緊満性水疱を特徴とする自己免疫水疱症で、主に高齢者に好発する。免疫学的には、表皮基底細胞のヘミデスモゾーム構成分子である COL17/BP180 と BP230 に対する自己抗体を認め、主に COL17 の NC16A 領域に対する自己免疫反応が水疱形成の要因とされている。2007 年、ヒト COL17 を発現する遺伝子改変 (COL17 ヒト化) マウスが作製され、BP-IgG を COL17 ヒト化マウスへ投与することで皮膚の脆弱性を認めたことから、NC16A に対する BP-IgG の病原性が明らかとなった (Nishie, W. et al, Nature Medicine, 2007.)。一方、NC16A 以外の領域にも反応する BP-IgG も存在し、特に C 末端領域に対する自己抗体は、BP の類縁疾患である粘膜類天疱瘡 (mucous membrane pemphigoid; MMP) で認めることが多い。申請者は大学院時より、エピトープの異なる抗ヒト COL17 マウスモノクローナル IgG1 抗体を用い、抗原エピトープの違いによる抗 COL17 抗体の病原性について検討し、MMP の病態解明を続けている。研究により、C 末端部に対する抗体が粘膜特異的に病変を生じるわけではないということが証明された (Wada M, et al. Journal of Investigative Dermatology, 2016)。

MMP や一部の BP は口腔内症状を呈する。口腔内は常に唾液にさらされており、唾液中には血液由来の抗体が含まれている。BP や MMP で口腔粘膜に形成されるびらんは難治性であり、申請者は、「MMP や BP の口腔内病変の増悪因子のひとつとして、唾液中の抗体も関与しているのではないかと推測した。BP や MMP 患者の唾液中より IgA や IgG が検出された報告は認めるが、その病原性についての報告はない。また、損傷した上皮はバリア機能が欠落し、高分子タンパク質や細菌、ウイルスなどを通過させる (Marion, M. et. al, Journal of Cell Science, 2017.) ことが証明されており、BP や MMP によりびらんが生じた口腔粘膜上皮からの抗体侵入は可能なのではないかと予測した。

本研究は、唾液中に抗体が存在するという最近の知見に着目し、MMP 患者の唾液中に含まれる自己抗体を解析するものである。唾液中の自己抗体量が、口腔内の病勢と相関性があるのかなどについてはまだ報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、唾液中に抗 COL17 抗体が存在すること、血液中の自己抗体と同様に病勢により発現量に相関があることを確認し、BP や MMP に対し病原性をもつことを証明することである。

3. 研究の方法

(1) 唾液の採取と処理

血液検査・免疫染色 (Direct Immunofluorescence; DIF, Indirect Immunofluorescence; IIF) にて粘膜類天疱瘡と診断された患者の安静時唾液を 5mL 採取した。遠心分離し、上清をサンプルとして使用した。研究に使用する前に、サンプルを 37℃ で 1 時間インキュベートした。Negative control として用いた健常者の唾液も同様に処理した。

(2) 唾液中の抗 COL17 抗体の測定

唾液中の抗体の測定は血清中の抗体測定で臨床応用されている抗体キット (MESACUP™BO180 テスト®; MBL) を用いて ELISA 法で行った。唾液サンプルは過去の報告 (Ali S, et al. British Journal of Dermatology, 2015) を参考に、10 倍希釈して実験に使用した。ELISA は酵素反応停止後 20 分以内にマイクロプレートリーダーで波長 450nm の吸光度を測定し各項目の平均値を算出した。抗体キットに記載されている計算式にて Index 値を算出し、Index 値 9 以上を陽性、9 未満を陰性と判定した。

4. 研究成果

MMP 患者の ELISA 結果の 1 例を示す (図 1、図 2)。各 Index 値は、negative control (キット付属の標準液) = 0、positive control (キット付属の標準液) = 100、MMP 患者唾液 1 (X 年) = 12.6、MMP 患者唾液 2 (X+1 年) = 10.6、negative control 1 (健常人唾液) = -0.5、negative control 2 (健常人唾液) = -0.9 であった (図 3)。患者唾液はいずれも Index 値 9 以上を認めており、唾液中に抗 COL17 抗体が存在していることが示唆された。カルテ上、時点に比べ 時点では患者の自覚症状の軽減を認めており、病勢と唾液中の抗体量には相関がある可能性も考えられたが、今後は MMPDAI (Murrell DF, et al. J Am Acad Dermatol, 2015.)

を用いるなど臨床症状を現す客観的な指標を用いる必要があると思われた。

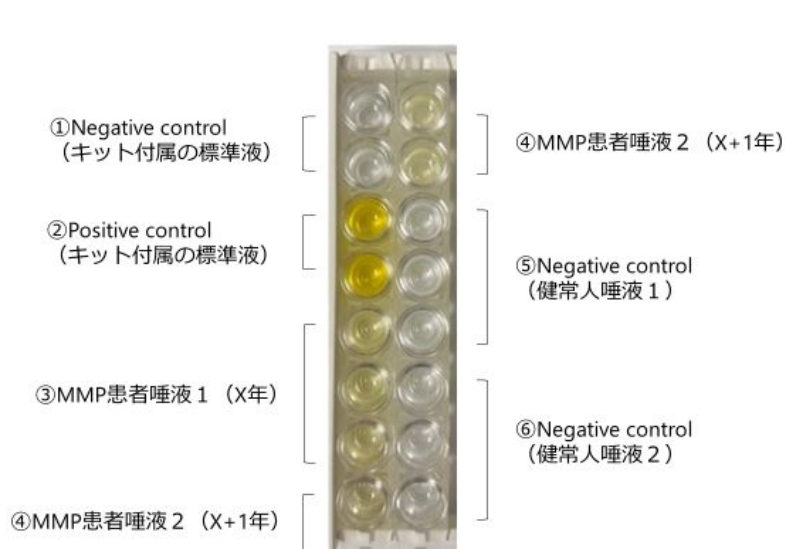


図1 ELISA 反応後のマイクロプレート

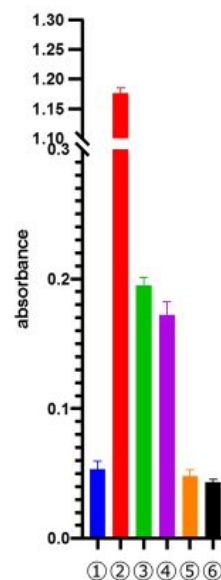


図2 吸光度の違い

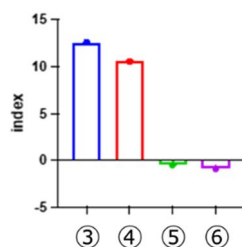


図3 Index 値

今後の展望としては、口腔内にも病変を生じる BP (もしくは MMP) と、皮膚のみに病変を生じる BP で唾液中の抗体量に差があるかを調査することが挙げられる。唾液中の抗体が口腔内の症状の増悪因子となる可能性について調査し、口腔内症状軽減のための治療法を模索していきたい。また、皮膚粘膜類天疱瘡の自己抗原は先にも述べたように、COL17 の NC16A 領域以外にもエピトープを持つ可能性が示唆されている。唾液中の抗体でも同様の傾向がみられるのか、NC16A に対する抗体と NC16A 領域以外に対する抗体のどちらが口腔内の病勢に関連しているのかに関してはこれまでに報告がなく、今後明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 WADA Mayumi、MAKINO Shujiroh、TAKANO Masashi、SATO Takehiko、KITAGAWA Yoshimasa	4. 巻 65
2. 論文標題 Free-fibula transplantation for medication-related osteonecrosis of the jaw in a patient treated with sunitinib and bisphosphonate : a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 757 ~ 762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.65.757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中村 裕介、佐藤 淳、和田 麻友美、北川 善政	4. 巻 71
2. 論文標題 真性リドカインアレルギーが疑われた患者の抜歯経験	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 173 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11277/stomatology.71.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田麻友美、佐藤 明、浅香卓哉、北川善政	
2. 発表標題 上顎智歯抜歯時に上顎骨骨折を認めた1例	
3. 学会等名 第22回 日本口腔顎顔面外傷学会 総会・学術大会	
4. 発表年 2021年	

1. 発表者名 和田麻友美、佐藤明、吉川和人、浅香卓哉、坂田健一郎、北川善政	
2. 発表標題 口腔再建手術における手術部位感染の臨床的検討	
3. 学会等名 第68回 日本口腔外科学会総会・学術大会	
4. 発表年 2023年	

〔図書〕 計1件

1．著者名 Jun Sato, Mayumi Wada, Riyu Koguchi, Takumi Shimura, Tougou Tanabe, Ruri Hayashibe, Yoshimasa Kitagawa	4．発行年 2023年
2．出版社 JAPANESE STOMATOLOGICAL SOCIETY	5．総ページ数 30
3．書名 Oral Science in Japan	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------