

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591337

研究課題名 (和文) 水疱性類天疱瘡の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名 (英文) Investigation of pathological mechanism of bullous pemphigoid and development of new treatment

研究代表者 清水 忠道 (SHIMIZU TADAMICHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号：70260396

研究成果の概要 (和文)：

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid; BP) の発症機序は自己抗体が結合した後から水疱形成に至る過程で、構造タンパク質—シグナル分子—サイトカイン/ケモカインの関与が想定される。今回我々はこの中のサイトカインに特に着目し病態の解明を試みた。まず水疱性類天疱瘡患者の血清および水疱液中で炎症性サイトカインの一つであるマクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor; MIF) が増加し、それが病勢と関連することを見いだした。次にこの MIF が水疱性類天疱瘡の発症と関与するかするため、抗マウス BP180 NC16a 抗体を作製し、この抗体を MIF トランスジェニックマウス、MIF ノックアウトマウスに投与し水疱性類天疱瘡の発症について検討した。その結果 MIF トランスジェニックマウスでは明らかな差がみられなかったが、MIF ノックアウトマウスでは水疱の形成は減少していた。以上より MIF は水疱性類天疱瘡の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Bullous pemphigoid (BP) is an inflammatory subepidermal blistering disease associated with an autoimmune response to two hemidesmosomal antigens, BP230 and BP180. We analyzed the role of cytokines in the pathogenesis of BP. We first found that the Macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in the serum and blister fluid were significantly elevated in BP patients and the serum MIF levels decreased in accordance with the improvement of BP. Liu *et al* have previously reported a murine model of BP, induced by a passive transfer of anti-mice BP180 NC16a antibodies. MIF transgenic (Tg) mice and MIF knockout (KO) mice were used to assess the potential role of MIF in the pathogenesis of BP in this murine model of BP. The blister formation in MIF TG mice showed no difference from that of WT mice after an injection of anti-mice BP180 NC16a antibodies. On the other hand, the blister formation in MIF KO mice markedly decreased in comparison with that of wild type mice after an injection of anti-mice BP180 NC16a antibodies. These results suggest that MIF might be involved in the pathogenesis of BP via both the inflammation of the epidermis and the infiltration of various cells, such as eosinophils,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：(1)水疱性類天疱瘡 (2)サイトカイン (3)ケモカイン (4)自己抗体 (5) MIF (6) 炎症 (7) 水疱 (8) エラスターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid; BP)の原因は表皮基底細胞のヘミデスモゾームに存在するBP180に対する自己抗体と考えられている。本疾患は自己抗体が直接細胞の接着を阻害する天疱瘡群と異なり、自己抗体がBP180、特に細胞外ドメインに存在するNC16a領域に結合したあと、補体の活性化が生じ、遊走してきた多核白血球が産生する蛋白分解酵素により基底膜が分解されることにより水疱が形成される。しかしこれだけで本病態がすべて説明できるわけではない。自己抗体結合後に表皮角化細胞と浸潤細胞の間をつなぐ各種サイトカイン/ケモカインの作用の解析などは、新規治療の開発のためにも必要となるものと考えられる。

(2) これまで類天疱瘡患者の血清および水疱液中ではIL-1 β 、2、5、6、8、10、TNF- α 、IFN- γ などのサイトカインや(Schmidt E et al, Arch Dermatol Res, 1996)、TARCやeotaxinなどのケモカインの上昇が報告されている(Saeki H et al, J Dermatol Sci, 2006、Frezolini A et al, Eur J Dermatol, 2002)。また患者由来の抗BP180抗体を用いた実験では、補体の活性化の他に培養角化細胞に対しIL-6やIL-8等の好中球遊走因子の産生を誘導することなども報告されている(Schmidt E et al, J Invest Dermatol, 2000)。以上の結果からも各種サイトカイン/ケモカインが水疱性類天疱瘡の病態の形成において重要な役割を担っていることは明らかであるが、自己抗体の結合からそれらの産生に至る機

序に関しては十分に解析されていない。

2. 研究の目的

(1)水疱性類天疱瘡の発症機序、特に自己抗体が結合した後から水疱形成に至る機序を解明することを目的とする。

(2)水疱形成過程で重要な役割を担っていると推測される炎症性サイトカインをターゲットとして、水疱性類天疱瘡の新しい治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1)対象とする炎症性サイトカインの選定
水疱性類天疱瘡の病態に関与する可能性のあるサイトカインを選定するため、患者血清および水疱液中の炎症性サイトカインを測定し、解析の対象とする炎症性サイトカインを決定する。

(2)抗マウスBP180 NC16a抗体の作製
Liuら(Liu Z et al, J Clin Invest, 1993)の方法に従い抗マウスBP180 NC16a抗体を作製し、水疱性類天疱瘡モデルマウスを樹立する。

(3)水疱性類天疱瘡の病態形成におけるMIFの関与の検討
MIFトランスジェニックやMIFノックアウトマウスに抗マウスBP180・NC16a抗体をpassive transferし水疱形成に関して臨床的、組織学的、免疫学的に正常マウスと比較検討する。

4. 研究成果

(1) 我々は類天疱瘡患者の血清および水疱液中で炎症性サイトカインの一つであるマクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor; MIF) が増加し、それが病勢と関連することを見いだした (Asano Y et al, J Dermatol Sci, 2008)。MIF はアレルギー性疾患との関連も多数報告されており、また好酸球の分化や増殖とも強く関連していることから類天疱瘡においても病態に強く関与していることが示唆される。以上の結果より、炎症性サイトカインである MIF に焦点をあて、水疱性類天疱瘡のモデルマウスを用いてその関与について検討した。

(2) Liu ら (Liu Z et al, J Clin Invest, 1993) により報告された方法にしたがい抗マウス BP180・NC16a を認識するポリクローナル抗体を作成した。この抗体をマウスに passive transfer した後 24 時間で組織学的、免疫学的に水疱性類天疱瘡類似の病変を再現することが可能となった。

(3) MIF トランスジェニックマウスに抗マウス BP180・NC16a 抗体を passive transfer し、水疱性類天疱瘡病変の形成に関して検討したところ、コントロールとして用いた正常マウスと明らかな差はみられなかった。また組織学的所見でも有意な差は観察されなかった。

(4) MIF ノックアウトマウスに抗マウス BP180・NC16a 抗体を passive transfer し、水疱性類天疱瘡病変の形成に関して検討したところ、投与した抗体は表皮基底膜部に沈着したものの、臨床的、組織学的に水疱の形成がみられなかった。また組織学的に表皮下から真皮上層への好中球、リンパ球などの炎症細胞浸潤は抗体投与後の正常マウスと比較し著明に減少していた。

(結論) Leu らは抗マウス BP180 NC16a 抗体を用いた水疱性類天疱瘡モデルマウスにおいてその病態形成に好中球および好中球由来のエラスターゼが重要であると報告している。今回の研究の結果 MIF ノックアウトマウスにおいて抗マウス BP180 NC16a 抗体投与するも水疱形成はみられず、また組織学的に好中球の浸潤は著明に減少していた。以上より MIF は水疱性類天疱瘡の病態形成における好中球浸潤に関与している可能性が示唆された。さらにこの MIF の制御は病態形成初期の好中球の遊走を阻害できる可能性があり今後治療のターゲットとなりうることが期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Makino T, Furuichi M, Asano Y, Shimizu T. A novel mutation of the KRT 10 gene in a Japanese patient with epidermolytic ichthyosis. J Dermatol (in press) 査読有
- ② Yoshihisa Y, Makino T, Honda A, Matsunaga K, Abe R, Norisugi O, Shimizu H, Shimizu T. Macrophage migration inhibitory factor is essential for eosinophil recruitment in allergen-induced skin inflammation. J Invest Dermatol. 131:925-31, 2011. 査読有
- ③ Enomoto A, Yoshihisa Y, Yamakoshi T, Rehman MR, Norisugi O, Hara H, Matsunaga K, Makino T, Nishihira J, Shimizu T. UVB radiation induces macrophage migration inhibitory factor-mediated melanogenesis through

- activation of PAR-2 and SCF in keratinocytes. *Am J Pathol.* 178: 679-687, 2011. 査読有
- ④ Asano Y, Makino T, Ishida W, Furuichi M, Shimizu T. Detection of epidermal transglutaminase but not tissue transglutaminase in Japanese patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol.* 164:883-884, 2011. 査読有
- ⑤ Yoshihisa Y, Honda A, Zhao QL, Makino T, Abe R, Matsui K, Shimizu H, Miyamoto Y, Kondo T. Shimizu T. Protective effects of platinum nanoparticles against UV-light-induced epidermal inflammation. *Exp Dermatol* 19:1000-1006, 2010. 査読有
- ⑥ Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:14345-14350, 2010. 査読有
- ⑦ Furuichi M, Makino T, Matsunaga K, Hamade E, Yokoi H, Shimizu T. Usefulness of sebum check film in the measuring of sebum secretion. *Arch Dermatol Res* 302: 657-660, 2010. 査読有
- ⑧ Yoshihisa Y, Furuichi M, Rehman MR, Makino T, Shimizu T. The traditional Japanese formula keishibukuryogan inhibits the production of inflammatory cytokines by dermal endothelial cells. *Mediators Inflamm* 2010: 804298, 2010. 査読有
- ⑨ Honda A, Abe R, Yoshihisa Y, Makino T, Matsunaga K, Nishihira J, Shimizu H, Shimizu T. Deficient deletion of apoptotic cells by macrophage migration inhibitory factor (MIF) overexpression accelerates photocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 30: 1597-1605, 2009. 査読有
- ⑩ Hamasaka A, Abe R, Koyama Y, Yoshioka N, Fujita Y, Hoshina D, Sasaki M, Hirasawa T, Onodera S, Ohshima S, Leng L, Bucala R, Nishihira J, Shimizu T, Shimizu H. DNA-vaccination against macrophage migration inhibitory factor improves atopic dermatitis in murine models. *J Allergy Clin Immunol* 124:90-99, 2009. 査読有
- ⑪ Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, Nishihira J, Yamagishi S, Iwakura Y, Shimizu H, Shimizu T. Interleukin-1 β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci.* 49: 63-72, 2008. 査読有
- ⑫ Asano Y, Makino T, Norisugi O, Watanabe H, Abe R, Shimizu H, Shimizu T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 49: 95-97, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Yoshihisa Y, Zhao QL, Makino T, Matsui K, Miyamoto Y, Kondo T, Shimizu T. Protective effects of platinum nanoparticles against UV-light-induced epidermal

- inflammation. The Society for Investigative Dermatology, 70th Annual Meeting May 5-8, 2010. Atlanta, Georgia
- ② Enomoto A, Yoshihisa Y, Norisugi O, Matsunaga K, Makino T, Nishihira J, Shimizu T. The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in UVB-induced melanogenesis in the skin. The Society for Investigative Dermatology, 70th Annual Meeting May 5-8, 2010. Atlanta, Georgia
- ③ Yamakoshi T, Makino T, Ueda C, Shimizu T. Identification and characterization of trichohyalin-like (TCHHL1), a novel S100 fused-type protein in human skin. The Society for Investigative Dermatology, 70th Annual Meeting May 5-8, 2010. Atlanta, Georgia
- ④ Makino T, Yamakoshi T, Furuichi M, Huh NH, Shimizu T. Ultraviolet B irradiation induces the expression of hornein, a member of the S100 fused-type protein family in human skin. The Society for Investigative Dermatology, 70th Annual Meeting May 5-8, 2010. Atlanta, Georgia
- ⑤ Shimizu T. (Plenary Lecture) MIF and skin diseases: an overview. International symposium of MIF. May 20, 2009. Sapporo.
- ⑥ Shimizu T. (Hot Topics) Ultraviolet-induced damage in the Skin: Implication for Inflammatory Cytokine. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. July 10-12, 2009. Sapporo.
- ⑦ Makino T, Yamakoshi T, Inoue S, Noguchi M, Huh NH, Shimizu T. Expression profile of a profilaggrin-like protein, hornerin, in oral mucosa. The Society for Investigative Dermatology, 69th Annual Meeting May 6-9, 2009. Montreal, Canada.
- ⑧ Makino T, Hongo K, Ichida F, Shimizu T. A case of fibromuscular dysplasia with livedo racemosa. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. 2009. July-10-12, Sapporo.
- ⑨ Makino T, Yamakoshi T, Inoue S, Noguchi M, Huh NH, Shimizu T. Expression analysis of hornerin, a member of the S100 fused-type protein family in oral mucosa with the disorders. The 39th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. 9-12 September 2009, Budapest.
- ⑩ Makino T, Furuichi M, Watanabe H, Yamakoshi T, Shimizu M, Yoshihisa Y, Shimizu T: Keishibukuryogan decreases the disease activity and the level of serum Th2 type chemokines and MIF in atopic dermatitis. 5th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis, 2008, 5, 11-13, 2008, Kyoto.
- ⑪ Makino T, Takahashi M, Huh NH, Shimizu T: Expression profile of a profilaggrin-like protein, hornerin, in human skin disorders and in differentiating normal human

keratinocytes. The International Investigative Dermatology, 2008, May, 14-17, Kyoto.

- ⑫ Honda A, Makino T, Yoshihisa Y, Abe R, Shimizu H, Miyamoto Y, Shimizu T: Protective effect against UV-light-induced skin inflammation with topically applied platinum nanoparticles in mice. The International Investigative Dermatology, 2008, 5, 14-17, Kyoto.
- ⑬ Abe R, Yamagishi S, Fujita Y, Sasaki M, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T, Shimizu T, Bucala R, Shimizu H: Topical application of anti-angiogenic peptides based on pigment epithelium-derived factor can improve psoriasis (Mini symposium). The International Investigative Dermatology, 2008, 5, 14-17, Kyoto.

[図書] (計 1 件)

- ① Shimizu T. Ultraviolet-induced damage in the skin and cornea: Implication for inflammatory cytokine, macrophage migration inhibitory factor. *Chapter 6* “Environmental Regulation: Evaluation, Compliance and Economic Impact”, by Diederik Meijer and Phillipus De Jong (Ed.), 538-547, Text book of NY Nova Science Publishers, Inc, New York, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：機能性シート及びその製造方法。
発明者：清水忠道，松永憲治，ほか
権利者：国立大学法人富山大学

種類：番号：特願 2011-006431 号

出願年月日：2011年1月14日

国内外の別：国内

名称：皮膚カテプシンの分析方法，皮膚の光ストレスの判定方法およびそのためのキット。

発明者：山口昌樹，清水忠道，牧野 輝彦

権利者：国立大学法人富山大学

種類：番号：特願 2008-53577 号

出願年月日：2008年3月4日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：局所医薬組成物

発明者：清水忠道、清水宏

権利者：清水忠道、清水宏。

種類：特許第 4578067 号

取得年月日：2010 年 9 月 3 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/index.html> (富山大学皮膚科)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 忠道 (SHIMIZU TADAMICHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部
(医学)・教授
研究者番号：70260396

(2) 研究分担者

牧野 輝彦 (MAKINO TERUHIKO)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：90359711