

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17334

研究課題名（和文）水疱性類天疱瘡においてDPP-4阻害薬が免疫寛容の破綻に及ぼす影響についての研究

研究課題名（英文）Research of the effects of DPP-4 inhibitor on the dysruption of self tolerance in bullous pemphigoid

研究代表者

泉 健太郎（Izumi, Kentaro）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50793668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：BP180ヒト化マウスに対して全長BP180リコンビナントタンパクを用いて免疫することにより、眼周囲や耳に水疱性類天疱瘡類似の皮膚病変を誘発した。その際DPP-4阻害薬であるvildagliptin投与群と非投与群に分けて皮膚病変の発症率や重症度を比較したが、群間に有意差を認めなかった。免疫により産生される抗BP180抗体の誘導率と抗体価についても比較したが、群間に有意差を認めなかった。誘導される自己抗体のエピトープに違いがあるか検証するため詳細なエピトープマッピングを行ったところ、vildagliptin投与群では自己抗体エピトープがBP180の細胞外領域に局限していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水疱性類天疱瘡は高齢者に好発する指定難病であるが、その詳細な発症機序はいまだ不明である。近年2型糖尿病治療のための本邦における第一選択薬であるDPP-4阻害薬投与に関連する水疱性類天疱瘡が問題となっている。本研究ではBP180に対する免疫寛容の破綻の際にDPP-4阻害薬の投与を行うことで非投与時と異なる免疫応答が生じる結果、誘導される自己抗体のエピトープに変化が生じる可能性があることが明らかとなった。本研究で得られた知見がDPP-4阻害薬関連水疱性類天疱瘡の発症機序の解明の一助になるとともに、より安全な2型糖尿病治療の遂行を実現可能にするためのさらなる研究の礎になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Immunisation of BP180 humanised mice with full-length BP180 recombinant protein induced bullous pemphigoid-like skin lesions around the eyes and ears. The incidence and severity of skin lesions were compared between the DPP-4 inhibitor vildagliptin-treated and non-treated groups, but no significant differences were found between the groups. The induction rate and antibody titer of anti-BP180 antibodies produced by immunisation were also compared, but no significant differences were found between the groups. Detailed epitope mapping was performed to verify whether there were differences in the epitopes of the autoantibodies induced, and found that in the vildagliptin-treated group the autoantibody epitopes were confined to the extracellular region of BP180.

研究分野：皮膚科学

キーワード：水疱性類天疱瘡 自己免疫疾患 17型コラーゲン 自己抗体 DPP-4阻害薬 ELISA 自己免疫寛容 BP180

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (BP) は、高齢者に好発する自己免疫性水疱症である。表皮真皮間接合を担うヘミデスモソームを構成する分子である BP180 や BP230 が BP 自己抗原であることが知られており、BP180 の中でも NC16a 領域が BP の主要な病原エピトープであると考えられている。近年、2 型糖尿病治療薬である dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4) 阻害薬の投与に関連した BP の報告例が相次いでいることに加え、欧州を中心とした大規模な疫学研究により、DPP-4 阻害薬の投与と BP 発症の強い因果関係が示唆されていること、さらにはや通常発症の BP と比較した際に異なる臨床像や自己抗体エピトープを呈することなどから DPP-4 阻害薬関連 BP に対する関心が高まっている。しかし、DPP-4 阻害薬が BP180 に対する自己免疫寛容の破綻ひいては BP の発症にどのように作用するかは未だ全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、“なぜ特定の個体で BP が発症するのか？”という BP 発症についての根幹をなす謎を解き明かすことを目的としている。そこで DPP-4 阻害薬の投与が BP180 に対する免疫寛容の破綻と BP の発症に関与していることに着目し、BP180 ヒト化マウスを全長ヒト BP180 リコンビナントタンパクにより強制免疫した後に DPP-4 阻害薬の投与実験を行う。DPP-4 阻害薬が BP180 を標的とする自己抗体の誘導と皮膚症状の惹起にどのような影響を及ぼすかを検証することを通じて DPP-4 阻害薬関連水疱性類天疱瘡の発症メカニズムの解明に寄与する新知見を得ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト BP マウスモデルによる DPP-4 阻害薬の自己免疫寛容破綻に対する影響の評価

4 週齢の BP180 ヒト化マウス (Nishie, et al. Nat Med 2007) を DPP-4 阻害薬である vildagliptin 投与群と非投与群に分け、それぞれの Foot pads に対し、ヒト BP180 全長タンパクを 0 週、2 週の 2 回、皮下投与する。初回免疫の 10 週間後に皮膚症状の評価・採血を行った。

(2) BP 自己抗体の抗体価およびエピトープと BP 重症度の相関解析

上述のように BP モデルから経時的に採取した血清を用いて NC16A・BP180 全長 ELISA 法にて抗体価を測定した。また BP180 の細胞内領域や C 末端領域、プラスミンにより切断した BP180 の切断片 (120kDa、97kDa) などの領域特異的ペプチドを用いたウエスタンブロットティングにより自己抗体のエピトープマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) 4 週齢の BP180 ヒト化マウスに対し、ヒト BP180 全長リコンビナントタンパク (hBP180) を用いて免疫する BP アクティブモデルマウスを vildagliptin 投与群と非投与群 (hBP180 immunization 群) に分け、皮膚症状の罹患面積を比較した。vildagliptin 投与群 (hBP180 immunization + vildagliptin 群) では非投与群と比較し罹患面積は高い傾向を示すも、hBP180 免疫を行っていない vildagliptin 投与群においても皮疹を認めたため、統計学的な有意差を見出すことはできなかった (図 1)。

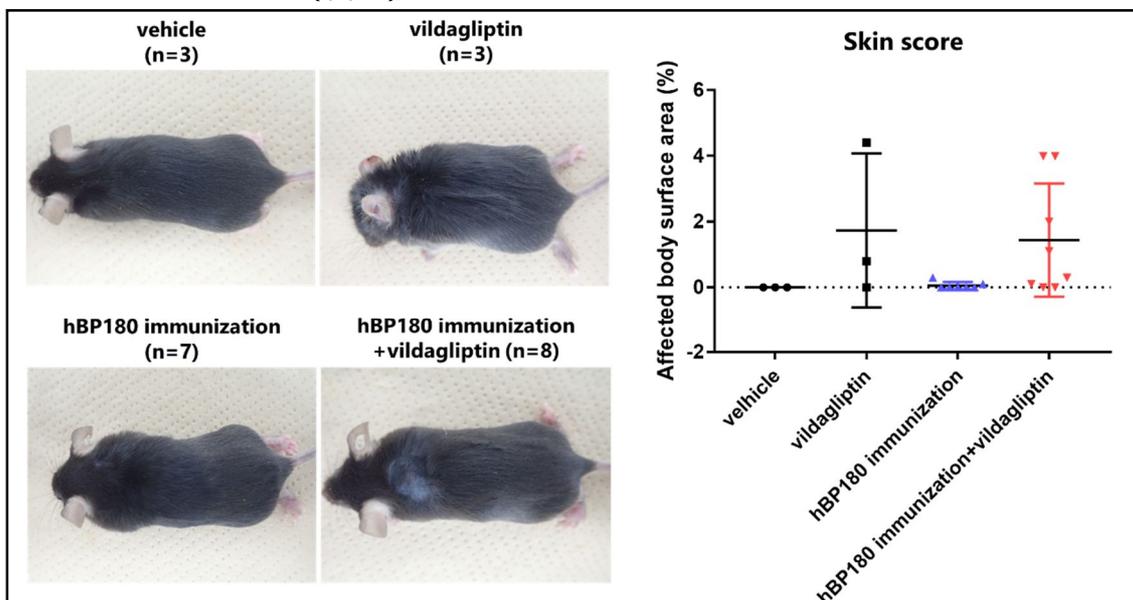


図 1 hBP180 全長タンパクによる BP180 ヒト化マウスへの強制免疫と vildagliptin 投与実験

(2) 初回免疫 10 週後に採取した血清サンプル中の抗 hBP180IgG 抗体価を BP180NC16AELISA および BP180 全長 ELISA (BP180-FL ELISA) を用いて測定した。皮膚症状の重症度とは対照的に血清中抗 NC16A-IgG や抗 hBP180-FL IgG は陰性対照 (vehicle 群や vildagliptin 群) において検出されなかった。一方 hBP180immunization 群および hBP180immunization + vildagliptin 群はいずれも抗 NC16A-IgG や抗 hBP180-FL IgG を検出するも、そのいずれの抗体価においても明らかな差は認めなかった (図 2)。

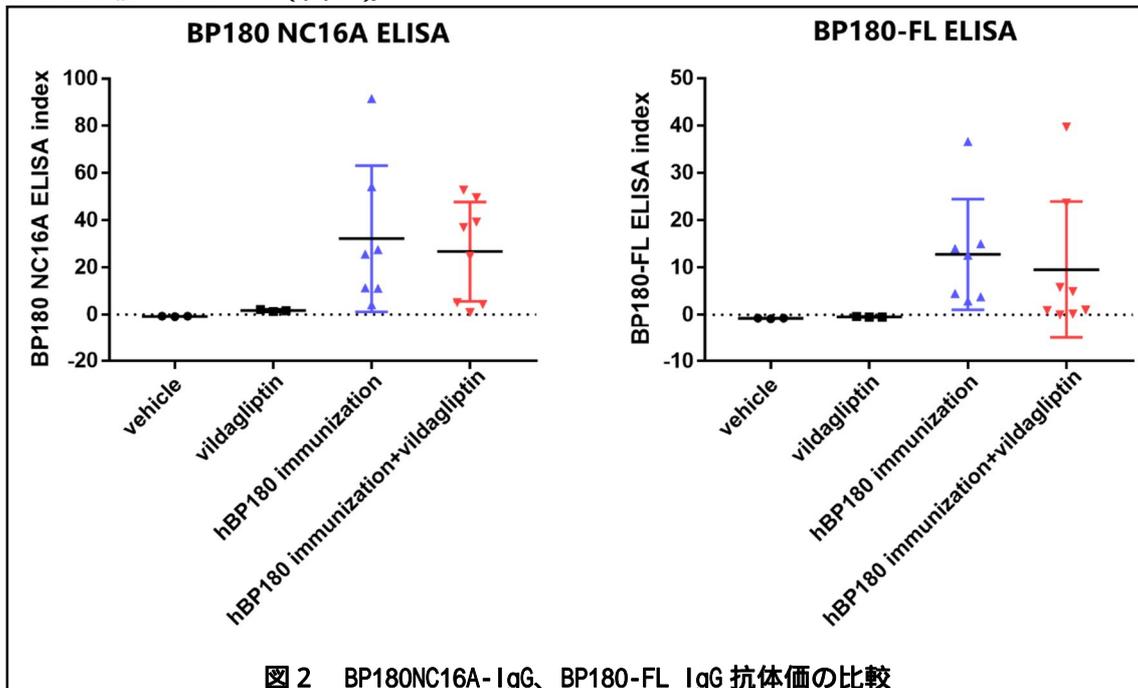


図 2 BP180NC16A-IgG、BP180-FL IgG 抗体価の比較

誘導された抗 BP180 の詳細なエピーマップングを行うために BP180 の細胞内領域を用いたウエスタンブロットを施行した (図 3)

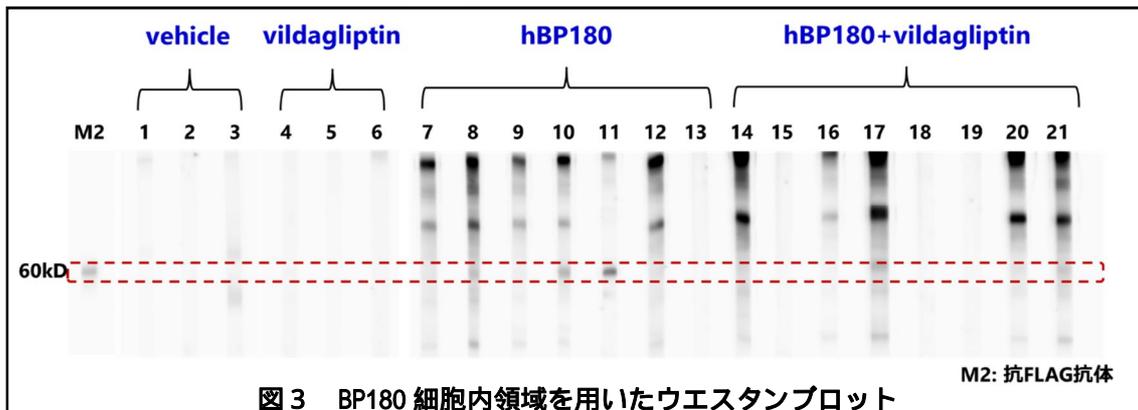


図 3 BP180 細胞内領域を用いたウエスタンブロット

hBP180immunization 群では 3/7 で細胞内領域に対するバンドを確認することができた、一方、hBP180immunization + vildagliptin 群では細胞内領域に対する反応性は認めなかった (0/8)。引き続き BP180 細胞外領域を基質として用いたウエスタンブロットを施行した (図 4)。

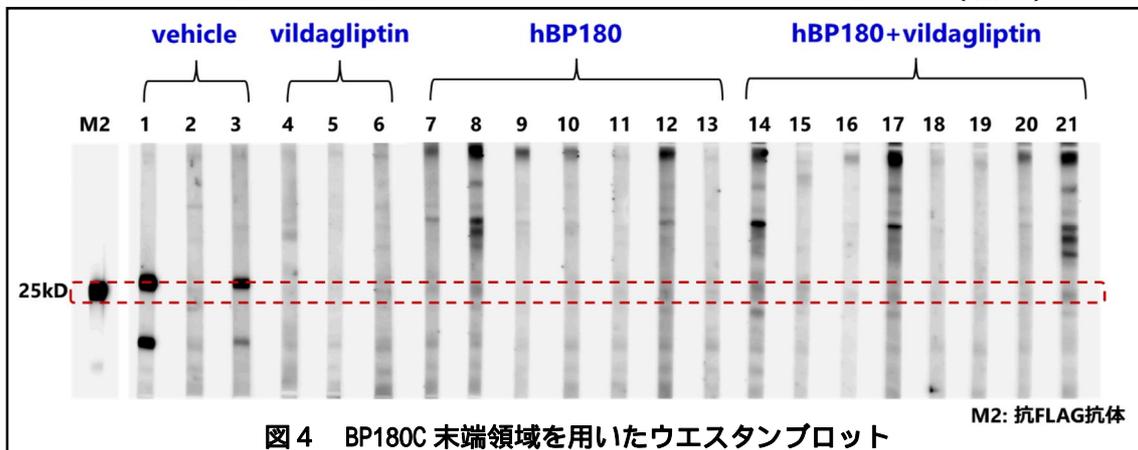
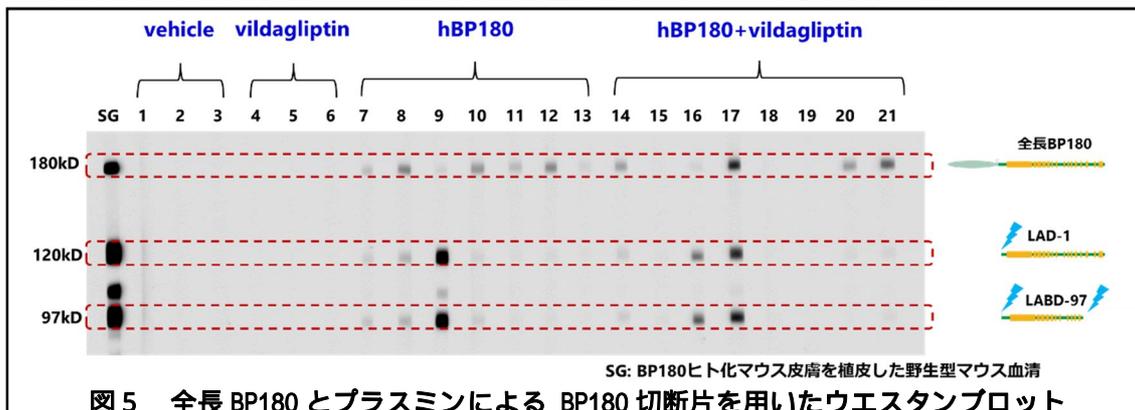


図 4 BP180C 末端領域を用いたウエスタンブロット

結果として hBP180immunization 群では 1/7 で C 末端領域に対するバンドを確認することができた、一方、hBP180immunization + vildagliptin 群では 2/8 でバンドを確認したことから、BP180C 末端領域に対する反応性については明らかな差異は群間において認めなかった。



**図5 全長BP180とプラスミンによるBP180切断片を用いたウエスタンブロット**

BP180の細胞内領域やC末端領域ではカバーすることができないBP180の中間部分に対する反応性の違いについて検証するため、BP180全長およびプラスミンによる切断片(120kDa; LAD-1, 97kDa; LABD-97)のmixtureを用いたウエスタンブロットを施行した(図5)。hBP180immunization群ではすべてのマウス(7/7)で全長BP180に対する反応性を呈し、LAD-1に5/7、LABD-97に対し4/7で反応性を認めた。hBP180immunization + vildagliptin群では5/8と大部分のマウスにおいて全長BP180に対する反応性を呈し、LAD-1に5/8、LABD-97に対し5/8で反応性を認め、両群で類似の反応性を示すことを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉健太郎
2. 発表標題 水疱性類天疱瘡においてDPP-4阻害薬が 免疫寛容の破綻に及ぼす影響についての研究
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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

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			
フィンランド	Oulu University			
ドイツ	Freiburg University			