

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591625

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡発症初期メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidating the initial pathomechanism of bullous pemphigoid

研究代表者

鶴田 大輔(TSURUTA, DAISUKE)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90382043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡は抗原であるBP180とそれに対する自己抗体(BP-IgG)との結合に伴い、補体の活性化、好中球の遊走、好中球エラスターゼなどによるタンパク分解により水疱が形成されると報告されてきた。今回、Live cell imagingを用いて、自己抗体結合後、BP180の動態がどのように変化するかを調べた。結果として、BP-IgGにより、BP180は細胞質内にエンドサイトーシスで取り込まれ、それにより、細胞の接着力が低下すること、この機序はマクロピノサイトーシスによることもわかった。このことから、この新たにわかった機序を抑制する薬剤開発が水疱性類天疱瘡の新規治療につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathomechanism of the formation of bullae in bullous pemphigoid has been considered to be caused by 1) autoantibody (BP-IgG)-autoantigen (BP180) adhesion, 2) activation of complement, 3) migration of neutrophils and 4) proteolysis by neutrophil elastase. In this study, we performed live cell imaging of BP180-GFP after BP-IgG treatment on keratinocytes. The results suggested that BP180 was incorporated by macropinocytotic endocytosis pathway, and that the keratinocyte cell adhesion was weakened by this pathway. We consider that this newly found initial pathomechanism of bullous pemphigoid may be the future drug target. We will be able to inhibit macropinocytosis to cure bullous pemphigoid after the drug discovery affecting it.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：水疱性類天疱瘡

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (BP) は高齢者に多い自己免疫性水疱症である。BP の自己抗体 (BP-IgG) のターゲットはヘミデスモゾームタンパク抗原の BP180 および BP230 である。これまでの BP 発症機序に関する研究は主に動物モデルを用いてなされてきた。代表的なものとして、マウスにおける BP180 抗原ドメイン (NC14A domain) に対する抗体を他の動物で作製し、マウスに投与するモデル、ヒト健常者の凍結切片に患者自己抗体を滴下し、人工的水疱を形成させるモデルおよびヒトの BP180 を持つトランスジェニックマウスが用いられてきた。これらにより BP の病態形成には抗原と抗体の結合だけではなく、補体の活性化、好中球の遊走とそれにとまらうタンパク分解が必須であると予測されている。一方、北島らは免疫細胞の関与しない *in vitro* の系において BP-IgG 投与によりケラチノサイトの細胞接着の減弱が生じることを示した。また、我々も BP-IgG 投与にてケラチノサイトの細胞遊走が促進され、フォーカルコンタクトタンパクの挙動にも影響を与えることを示した。

2. 研究の目的

1 の事実からは BP 初期の発症機序として補体、炎症細胞の関与しない機構が存在し、それに伴い BP180 タンパクの局在・発現量が増加する可能性が推測される。そこで、今回我々は、BP-IgG 結合後の BP180 タンパクの挙動を *live cell imaging* を用いてヘミデスモゾーム分子の時間軸をとらえた動的研究で明らかにすることで、BP の発症機序におけるブラックボックスの内部機構を解明する研究計画を立案した。

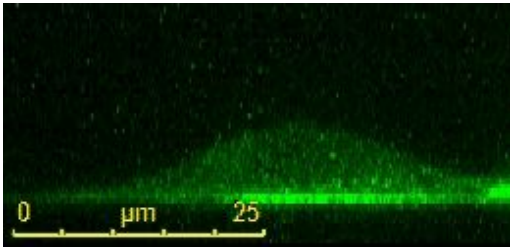
3. 研究の方法

GFP-BP180 ベクターを作成する。それを 804G 細胞あるいは正常ヒト表皮ケラチノサイトに遺伝子導入する。そして、共焦点レ-

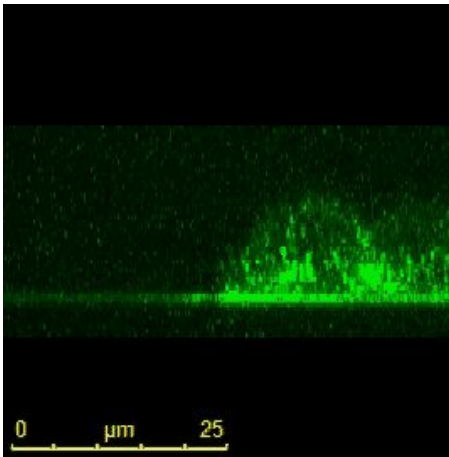
ザー顕微鏡で観察する。BP-IgG は Millex filter でろ過後、Protein G アフィニティークロマトグラフィーで抽出し、透析後濃縮する。この BP-IgG 投与後に GFP-BP180 を遺伝子導入した 804G 細胞と正常ヒト表皮ケラチノサイトでの GFP の動態を観察する。そしてその機序を調べる。

4. 研究成果

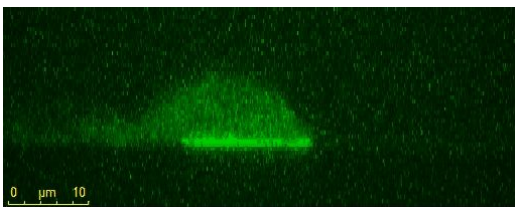
3D で観察したところ、BP180 は BP-IgG 非存在下では基底面に沿って分布し、細胞質内には存在しなかった。一方、BP-IgG を投与すると、この基底面にのみ存在した BP180 は数分で細胞質内に認められるようになり、その数は経時的に増数した。またこれにとまない、細胞の基底面との接着は弱くなり、進展していた細胞がラウンドシェープに変化した。これらの結果は 804G 細胞、正常ヒト表皮ケラチノサイトの両者で同様の結果であった。この細胞質内への移動はエンドサイトーシスによる取り込み現象であることが推察されたので、エンドサイトーシスの標識である、early endosomal antigen-1 と取り込まれた BP180 が共発現するかどうかを確認した。結果、共発現することがわかった。最後に、さまざまなエンドサイトーシスの阻害剤投与や、fluid-uptake assay を行い、このエンドサイトーシスがどのような機序で起こるのかを調べた。結果として、このエンドサイトーシスはマクロピノサイトーシス経路で起こっていることを示した。またこのマクロピノサイトーシスを阻害する薬剤は BP-IgG 投与による細胞と基質との接着力の低下を抑制することができた。これらの結果からは、水疱性類天疱瘡の初期メカニズムとしてマクロピノサイトーシスによる BP180 の細胞質内取り込み現象が関与することを示した。今後、これらをターゲットとした薬剤の開発が可能となることが示唆された。



BP-IgG 投与前の BP180 の分布



BP-IgG 投与後の BP180 の分布



マクロピノサイトーシス阻害剤投与により、BP-IgG のエンドサイトーシスは抑制された。

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5件)

Sho Hiroyasu, et al. Daisuke Tsuruta. Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. Am J Pathol 2013;182:828.
Takahiro Hamada, Daisuke Tsuruta, et al. How do keratinizing disorders and

blistering disorders overlap? Exp Dermatol 2013; 22:83.

Daisuke Tsuruta, et al. Unilateral bullous pemphigoid without erythema and eosinophil infiltration in a hemiplegic patient. J Dermatol 2012;39:787.

Masataka Arakawa, et al. Daisuke Tsuruta, Takashi Hashimoto. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. Exp Dermatol 2011;20:1022.

Takashi Hashimoto, Daisuke Tsuruta, et al. Demonstration of epitope spreading in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. J Invest Dermatol 2011;131:2175.

[学会発表](計5件)

Akiko Naruse, Daisuke Tsuruta, 他、 Anti-BP180-type mucous membrane pemphigoid IgG induces endocytosis of BP180/collagen XVII less frequently than bullous pemphigoid IgG. International Investigative Dermatology Meeting in 2013 (Edinburgh, UK) 2013/5/8-11.

Daisuke Tsuruta, 他、 Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. Joint Meeting of the Society for Skin Structure Research (SSSR) and the Society for Cutaneous Ultrastructure Research (SCUR) (Salzburg, Austria) 2013/5/12-14.

Sho Hiroyasu, Daisuke Tsuruta 他、 Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization through clathrin and caveolin-independent endocytic

pathway. The 72th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (Raleigh, USA) 2012/5/9-12.

鶴田 大輔 他、基底膜バリア破綻のイメージング、第 43 回日本臨床分子形態学会 (大阪市) 2012/9/9-10.

廣保 翔、鶴田 大輔 他、水疱性類天疱瘡 IgG 投与による上皮細胞 17 型コーゲンのマクロピノサイトーシス誘導、第 43 回日本結合組織学会学術大会・第 58 回マトリックス研究会大会合同学術集会 (別府市) 2011/6/10-11/

〔図書〕(計 3 件)

鶴田 大輔、中山書店、水疱性皮膚疾患発症機序の解明から最新の診断・治療法まで、2014、115

Daisuke Tsuruta 他、Humana Press、Molecular Diagnosis of Autoimmune Blistering Diseases, 2013,17

鶴田 大輔、文光堂、1 冊でわかる皮膚アレルギー、2012、361

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/Derma/report/reports-01.shtml>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴田 大輔 (TSURUTA, Daisuke)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90382043

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし