

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860976

研究課題名(和文)腫瘍随伴性天疱瘡における自己免疫発症と水疱形成機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of break immune tolerance and blister formation in paraneoplastic pemphigus.

研究代表者

夏秋 洋平 (NATSUAKI, Yohei)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40389309

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)：腫瘍随伴性天疱瘡(Paraneoplastic pemphigus: PNP)108例を詳細に解析し、新規特異自己抗原であるA2ML1に対する自己抗体がPNPの病原性自己抗体の一つである可能性を示し、また随伴する腫瘍による自己抗体産生の可能性を示した。さらに、表皮細胞内結合分子であるエピプラキンに対する抗体ならびに患者血清を用いて肺組織への反応性を検討することで、エピプラキンがPNPの主要な病原性自己抗原の一つであり、かつPNP関連閉塞性細気管支炎の発症に寄与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 108 cases of paraneoplastic pemphigus (PNP) in detail. We indicated the possibility that autoantibody for A2ML1 which is newly specific autoantigen was one of the pathogenic autoantibody of PNP. Furthermore, we indicated the possibility of the autoantibody production from associated tumor. Additionally, we indicated that epiplakin (EPPK) which is a plakin protein was one of the major PNP pathogenetic autoantigens and was related to PNP-related bronchiolitis obliterans (BO). The presence of anti-EPPK antibodies was significantly related to the development of BO and higher mortality. Therefore, detection of anti-EPPK antibodies may lead to more extensive treatments to avoid the development of fatal PNP-related BO.

研究分野：皮膚科学

キーワード：腫瘍随伴性天疱瘡 自己抗原 A2ML1 エピプラキン 免疫プロット法 免疫沈降法 閉塞性細気管支炎

1. 研究開始当初の背景

(1)

腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP) は、種々の悪性・良性新生物を合併する難治性重症天疱瘡である。PNP 血清はデスマグレイン 3/1、プレクチンプレクチン、デスマプラキン 1/2、BP230 に反応する。Cornified cell envelope (CE) は表皮角化過程の構造的に強固な最終産物で、多くの構成蛋白からなり、私共はエンボプラキン、ペリプラキンが PNP 抗原であることを明らかにした。近年これに加えて、私共はプラキンファミリーの alpha-2-macroglobuline-like-1 (A2ML1) とエピプラキンを新規自己抗原として同定した。デスマプラキン類似構造をもつプラキンファミリーは、デスマゾーム・ヘミデスマゾームの細胞内で接着板を構築、ケラチン中間径フィラメント (IF) との結合を担う。

(2)

A2ML1 はプロテアーゼインヒビターで、上皮、胸腺、精巣で発現し、170kDa の抗原蛋白が A2ML1 であることが報告された。正常ヒト皮膚組織切片およびラット膀胱組織切片を用いた免疫蛍光抗体法 (IF) では、A2ML1 はヒト皮膚では顆粒層に発現が認められた。培養正常表皮培養細胞を用いた dissociation assay で抗 A2ML1 抗体による細胞接着の低下を認め、培養上清を用いた zymography で、プラスミン活性の増強が認められことから、PNP では、抗 A2ML1 抗体により A2ML1 が阻害され、プラスミンが活性化されることが、その病因に関与している可能性が示唆されている。

(3)

EPPK は IF との相互作用が知られ、表皮角化細胞分化で発現が増加し、ケラチンを結束し細胞骨格維持に関わるが、ノックダウンマウスでは異常 phenotype が確認されず、デスマゾーム領域にあるものの細胞接着への関与が少なく、マウス皮膚では組織発生的異常がない。しかし、PNP の約 20% に致死性閉塞性細気管支炎 (BO) 様肺病変が出現し、培養肺胞上皮細胞の IP・IB で、血清抗体がプラキンファミリーに反応し、皮膚類似の肺病変が推測される。更に約 70 例の日本人 PNP 患者統計で、20-30% に BO 様肺病変があり、EPPK を含めたプラキンファミリーは PNP 関連 BO の病態に関わる可能性が高い。

(4)

BO は、病理学的には constrictive bronchiolitis であり、臨床的にステロイド治療抵抗性で不可逆性の閉塞性肺機能障害

を伴う疾患である。臨床的には、BO は膠原病、感染症、健康食品の副作用などに合併し発症することが近年知られているが、最近臓器移植の重篤な肺合併症として注目され自己免疫疾患で paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome (PAMS) のひとつとしての研究が進められている。

(5)

PNP 随伴腫瘍細胞の自己抗体産生能については国外で数件報告があり、腫瘍化 B 細胞の immunoglobulin heavy chain を RT-PCR、DNA シークエンス、in-situ ハイブリダイゼーション解析し、Castleman 腫瘍の自己抗体産生能が示唆されている。また、PNP 随伴胸腺腫と濾胞樹状細胞肉腫から分離・培養した細胞の自己抗体産生能が示唆され、随伴腫瘍が PNP の自己抗体を産生する可能性が示唆されている。これについては、随伴腫瘍の自己抗体産生説、腫瘍抗原との交差反応による自己反応性 T 細胞増殖、epitope spreading の自己免疫応答拡大が多彩な自己抗体産生に関わると推測される。根治的治療として PNP で腫瘍切除すると一部患者に PNP 改善と抗体価低下がみられ、随伴腫瘍由来の抗体の関与が示唆される。

2. 研究の目的

(1)

本研究では、随伴腫瘍由来の培養細胞を用いた免疫プロット法 (IB) や免疫沈降法 (IP-IB) を用いて、エピプラキンと A2ML1 への反応性を検討し、関連を検討する。

(2)

腫瘍単独罹患患者の腫瘍細胞抽出液でも IB と IP-IB を行い、PNP 随伴腫瘍細胞との反応性を比較し双方の抗体産生能、蛋白 2 種の病因抗原の可能性を調べる。

(3)

本研究で更に多種類の随伴腫瘍について検体数を増やし検証し、PNP 患者における自己抗体産生機序の解明を促進できるとともに、この病態の予後の診断 / 治療の改善に貢献することを目的とする。

(4)

BO は臓器移植の重篤な肺合併症として注目され自己免疫疾患で PAMS のひとつとしての研究が進められており、これらの試料の渉猟については、免疫組織染色、腫瘍細胞培養など多方面の実験に使える形で、凍結保存、固定法の選択、生標本採取など、各々の腫瘍

について目的に合った方法で、それぞれの疾患から複数の患者の試料を集め、免疫病理組織学的検討を行う。

3. 研究の方法

(1)

PNP 患者の生体試料の渉獵と診断、皮膚病理組織学的データの解析。

(2)

ヒト表皮抽出液と KU8 cell line の培養細胞抽出液を基質とした IB。

(3)

腫瘍細胞抽出液による IB。

(4)

腫瘍細胞由来の培養細胞上清とヒト表皮抽出液による IP-IB。

(5)

PNP の合併腫瘍、合併肺病変 (B0) についての病理学的解析。

4. 研究成果

(1)-

当院で解析した PNP は 1997 年～2014 年で計 108 例であり、臨床症状は記載のあった 88 例中 82 例で口腔粘膜病変を、35 例で眼病変を、9 例で鼻腔病変を、28 例で性器粘膜病変を認め、粘膜のみに症状を認めたのは 24 例であった。皮膚病変が見られた 61 例では 37 例で紅斑、25 例で水疱、9 例で尋常性天疱瘡様皮疹、5 例で扁平苔癬様皮疹が見られ、14 例は多彩な皮膚病変を呈した。随伴腫瘍は悪性リンパ腫 43 例に次いで Castleman 腫瘍 16 例、固形癌 12 例、胸腺腫 9 例、肉腫 6 例であった。また、20 例に B0 の合併が見られ、4 例が死亡した。

(1)-

病理組織学検査を行った 64 例では 34 例で表皮内水疱、9 例で表皮下水疱、38 例で表皮棘融解、29 例で表皮細胞壊死を認めた。DIF を行った 54 例では 44 例で表皮細胞膜に IgG あるいは C3 の沈着を、35 例で表皮基底層部への沈着を認めた。ラット膀胱上皮を用いた IIF では抗細胞膜 IgG 自己抗体が 72 例で検出され、抗基底膜 IgG 自己抗体は 7 例で検出された。

(2)-

ヒト表皮抽出液を基質とした IB では全例が 210kDa と 190kDa に反応し、10 例で 230kDa に、10 例で 130kDa に、4 例で 180kDa に反応した。

(2)-

KU8 cell line の培養細胞抽出液を基質とした IP-IB では解析した 50 例中 11 例が 450kDa (EPPK) に反応し、また培養ヒト表皮細胞抽出液を基質とした IB では解析した 58 例中 22 例が 170kDa (A2ML1) に反応し、COS7 cell line の培養細胞抽出液を基質とした IP-IB では 58 例中 40 例が A2ML1 に反応し、抗 A2ML1 自己抗体が PNP の病原性自己抗体の一つである可能性を示唆した。

(3)

随伴腫瘍を摘出した 1 例で摘出腫瘍の培養細胞上清とヒト表皮抽出液を用いた IB を行ったところ 210kD に反応し、随伴腫瘍による自己抗体産生の可能性を示唆した。

(4)

48 例の日本人 PNP 患者血清で KU-8 cell line の培養細胞抽出液を基質とした IP-IB を行ったところ、35 例が EPPK に反応し、抗 EPPK 自己抗体の存在と B0 の合併ならびに死亡率との間に有意な相関が認められた。健常人ならびに B0 患者の肺の組織で抗 EPPK ポリクローナル抗体を用いた免疫染色及び蛍光抗体法を行ったところ、肺胞細胞、特に細気管支上皮細胞に EPPK が検出され、培養ヒト小気道上皮細胞を基質とした IP-IB では EPPK に反応した。マウスに抗 EPPK ポリクローナル抗体を投与したところ、病理学的に皮膚では変化が見られなかったのに対し、肺では気管支上皮周囲への単核球浸潤と細胞外マトリックスの析出を伴う上皮細胞の棘融解を認め、細胞接着の消失が示唆され、これらの結果から、EPPK は PNP の主要な病原性自己抗原の一つであり、PNP 関連 B0 発症への寄与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1.

Tsuchisaka A, Numata S, Teye K, Natsuaki Y, Kawakami T, Takeda Y, Wang W, Ishikawa K, Goto M, Koga H, Sogame R, Ishii N, Takamori S, Hoshino T, Brandt O, Pas HH, Fujiwara S, Hashimoto T.
Epiplakin is a paraneoplastic pemphigus autoantigen and related to bronchiolitis

obliterans in Japanese patients.
J Invest Dermatol. 136(2): 399-408, 2016
(査読有)
doi: 10.1038/JID.2015.408.

2.
夏秋洋平. 腫瘍随伴性天疱瘡における最新
の知見. BIO Clinica. 31(2): 81-82, 2016
(査読無)

3.
Numata S, Teye K, Tsuruta D, Sogame R,
Ishii N, Koga H, Natsuaki Y, Tsuchisaka A,
Hamada T, Karashima T, Nakama T, Furumura
M, Ohata C, Kawakami T, Schepens I,
Borradori L, Hashimoto T.
Anti-alpha-2-macroglobulin-like-1
autoantibodies are detected frequently
and may be pathogenic in paraneoplastic
pemphigus.
J Invest Dermatol. 133(7): 1785-1793, 2013
(査読有)
doi: 10.1038/jid.2013.65.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

夏秋 洋平 (NATSUAKI Yohei)
久留米大学・医学部皮膚科・助教
研究者番号：40389309