

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461664

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡における水疱維持・治癒機構に関する動的解明研究

研究課題名(英文)Dynamics of cellular components of bullae in bullous pemphigoid

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：培養表皮細胞にBP-IgGを投与した際のhemidesmosome(HD)接着低下に伴うfocal adhesion (FA)の代償機構について調べた。結果として、BP-IgG投与に伴い、HD構成分子発現の低下と反比例してFA発現の上昇を認めた。このことは、過去に血管内皮細胞において見られた、細胞に対する物理的的刺激に対するFAの代償的抵抗であると考えられた。一方、BP180の時間経過に伴う発現回復とそれに伴うFAの動態、具体的な接着力の増強については、認めることはできなかった。理由としては、HD接着はFA接着よりはるかに強固なため、FAによる代償的接着力増強を検出できなかったためと考えている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the compensation of focal adhesion (FA) adhesion after disruption of hemidesmosomes (HD) by bullous pemphigoid (BP-IgG) onto keratinocyte cell culture. The results suggested that expression of FA was inversely up-regulated after down-regulation of HD by BP-IgG, chronologically. The size of FA was increased and the dynamics of FA was decreased after BP-IgG treatment onto keratinocyte by several experiments. This phenomenon maybe explained by compensatory up-regulation of "strength of attachment" by FA from weekend "strength of attachment" by HD. On the other hand, we cannot directly see "strength of attachment" by FAs in itself. We consider that the "strength of attachment" by FA is too weak to be detected by conventional analytical method by us. We have a plan to see it after development of new equipments in the future.

研究分野：皮膚科学

キーワード：focal adhesion BP-IgG 水疱性類天疱瘡

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性水疱症は大きく、天疱瘡群と類天疱瘡群に分かれる。水疱性類天疱瘡 (BP) は高齢者に多い自己免疫性水疱性皮膚症であり、代表的な類天疱瘡群の疾患である。

病理組織学的には表皮下水疱を呈する。蛍光抗体直接法により、患者血清 IgG が基底膜部に沈着することで診断される。BP の自己抗体 (BP-IgG) のターゲットは BP180 (17 型コラーゲン) と BP230 である (Ishiko, J Clin Invest 1993)。中でも BP180 が BP の主要抗原であることが知られている。この BP180 を基質とした Enzyme-linked-immunosorbent assay により、血清学的にも BP と診断される。

治療は、副腎皮質ステロイドを中心とした免疫抑制療法、ニコチン酸アミドートトラサイクリン併用療法、血漿交換療法、免疫グロブリン大量療法などが選択される。治療に関するガイドラインも確立された (氏家ら、日本皮膚科学会雑誌、印刷中)。しかしながら、副腎皮質ステロイドには皮膚萎縮、多毛を始めとする皮膚の副作用以外に、糖尿病、骨粗鬆症、逆流性食道炎、易感染性などの全身性の高度の副作用が多く、免疫機序、生化学的機序を始めとする発症メカニズムのさらなる解明とそれに立脚した新規薬剤の開発が必須となっている。また、高齢者に多い疾患である性質上、その他の、免疫抑制剤を始めとする治療も安全であるとは言い難く、さらなる治療法の解明が必須である。

これまで BP 発症メカニズムとしては補体の活性化 好中球の遊走 好中球からのタンパク分解酵素による水疱形成が広く知られてきた (Liu et al. J Clin Invest 1993, 1995, 1997, 2000, 補体経路)。実際に、抗炎症薬投与が、BP 治療の一つとして有効であることも広く知られていることから、この説の根拠となってきた。一方、われわれも含めて、補体の関与しない、BP180 の自己抗体結合後の細胞質内移動による接着力の低下による水疱形成説 (非補体経路) も知られるようになってきた。

具体的には、これまでの報告でも、1) 補体 C4 欠損の BP 患者が存在する (Shiraishi S, et al. Br J Dermatol 1991), 2) BP 患者皮膚で、BP180 の細胞質内分布が見られること (Kitajima Y, Br J Dermatol 1998), 3) 補体、好中球の存在しない、In vitro のシステムで、BP-IgG 接着後、ケラチノサイトの培養 Dish との接着性が低下する (Iwata H, et al. J Invest Dermatol 2009), 4) F (ab')₂ という、補体結合部位を持たない抗体断片をヒト化 BP マウスに投与しても擦過水疱はおきる (Natsuga K 2012) ことは示されてきた。

われわれが、これらの背景を元に、Live cell imaging の手法を用いて詳細に調べると、BP180 は BP-IgG 結合後の自己抗体による細胞質内遊走は、マクロピノサイトーシスによるエンドサイトーシスにより生じることがわかり、報告した (Hiroyasu S, et al, Am J Pathol 2013)。このことから、水疱性類天疱瘡の発症メカニズムとしては、補体経路と非補体経路の両者が共存していることを示唆する。具体的には、BP180 に対する BP-IgG の結合 BP180 のマクロピノサイトーシスによるエンドサイトーシスにての細胞質内内包化 基底面に残存する BP180 と BP-IgG による補体の活性化 好中球遊走 タンパク分解酵素による、接着力の弱った平面での水疱形成という、初期水疱形成メカニズムが推測される。

一方で、BP180 の内包化後 1) その他のヘミデスモソームタンパクはどのような挙動を示すか、2) われわれが以前に相互作用を示したもう一つのケラチノサイトー基底膜接着機構、Focal adhesion はどのような挙動を示すかについては明らかではない。これらの挙動を詳細に解明することにより、さらなる水疱性類天疱瘡の発症メカニズムを解明し、これらを制御することによる、水疱性類天疱瘡新規治療方法獲得を目指した研究を立案した。

2. 研究の目的

BP の発症機序をさらに解明し、新規治療法を開発することを目指して、これまでのわれわれの研究経験を活かした研究を行う。具体的には BP-IgG (自己抗体) 結合後、エンドサイトーシスされてからの BP180 と Focal adhesion 分子 (Zyxin) の両者を Dual color live cell imaging で可視化して挙動解析を行う。そのことにより、ヘミデスモソーム分子と Focal adhesion 分子の相互作用を詳細に見つけることができると推測される。そして、このことにより、水疱性類天疱瘡発症機序の詳細な解明とそれを制御することによる、新規水疱性類天疱瘡治療法を獲得することが目的である。

3. 研究の方法

GFP-BP180 および PmKate2-zyxin ベクターを表皮ケラチノサイトに Dual transfection した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3 次元観察する (X-Y 観察、Z 観察)。顕微鏡観察、解析方法は過去のわれわれの論文を参考とする (Tsuruta D et al. FASEB J 2002, Tsuruta D et al. Cell Motil Cytoskel 2003, Tsuruta D and Jones JC J Cell Sci 2003, Ozawa T et al. J Invest Dermatol 2010, Hiroyasu S, et al. Am J Pathol 2013)。

それにより、自己抗体結合後のヘミデスモゾーム分子 BP180 と Focal adhesion 分子 Zyxin の挙動を明らかにする。また、両者の相互作用についても解明する。経時変化を可能な限り追跡する。長時間の蛍光観察に耐えうる顕微鏡システム、観察条件、培養条件についても検討を加える。

4. 研究成果

BP-IgG をケラチノサイト培養カルチャーに投与し、経時的に投与後 6 時間まで観察することが可能となった。

結果として、BP-IgG 投与後、ヘミデスモゾーム分子と Focal adhesion 分子を同時追跡することが可能となった。

本来、focal adhesion 分子は非常に早いタイムフレームで Centripetal な運動を示すことを過去に示してきたが (Tsuruta D et al. FASEB J 2002), 図に示すように、BP-IgG 投与により BP180 分子が細胞内に Internalization する過程では、focal adhesion 分子は、Attachment plane で肥大化し、Centripetal な動態も遅くなることが示された。また、本来、focal adhesion 分子は Z 面では定常状態では細胞内への取り込みを示すことが知られているが (Gu Z et al. J Cell Biol 2011), BP-IgG 投与下では、BP180 分子が内包化される一方、focal adhesion 分子は接着面にとどまることも示された。

このことから、Focal adhesion はヘミデスモゾーム内包化にともなう細胞接着力の低下を代償する動態を示すのではないかと推察された。

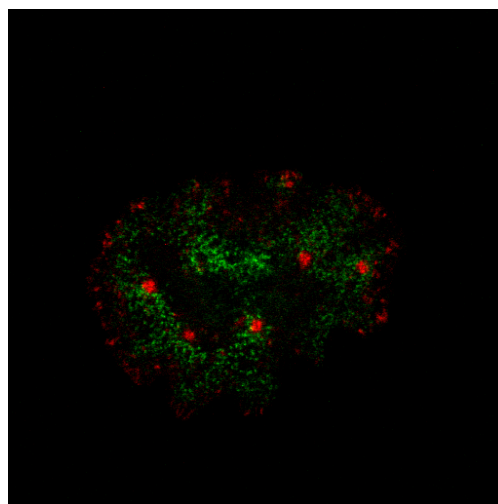
一方で、当初計画していた、Focal adhesion そのものの肥大化、動態の低下に伴う、接着力の低下を直接的に測定することはできなかった。これは、ケラチノサイトではヘミデスモゾーム接着が Focal adhesion 接着力よりも遥かに強力であるために、その弱い接着力の大小を測定することに難があったと考えられる。

この件については、将来的に Devise の開発、実験方法のさらなる改良を待つこととする。

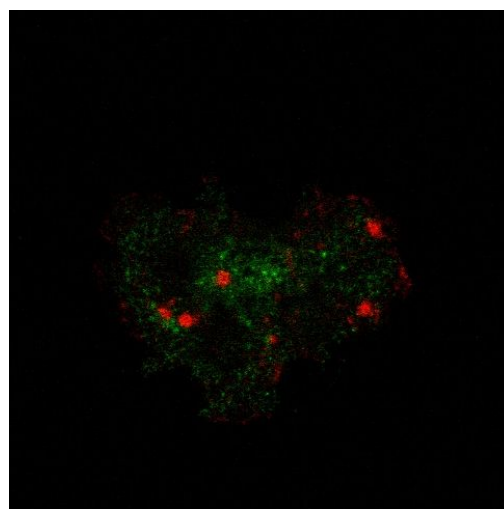
また、Focal adhesion の代償的肥大化のメカニズム、動態の低下のメカニズムの解析まで、次の研究で踏み込んでいければと考えている。

今回の研究で、ヘミデスモゾーム-Focal adhesion の分子間での相互作用を示すことができた。今後は、これらを制御することにより、新たな治療法が開発されるのではないかと考えている。

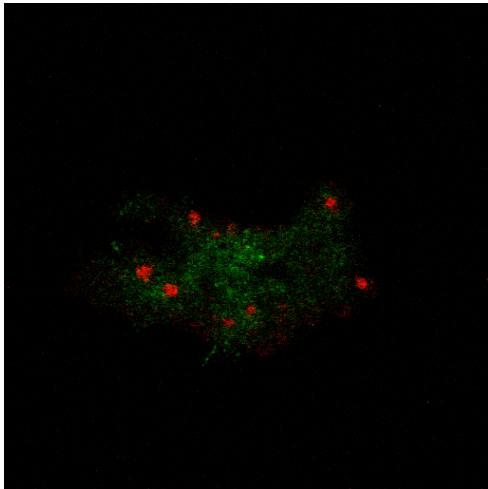
(図) Dual color imaging (GFP-BP180, PmKate2-zyxin) によるヘミデスモゾームタンパクと focal adhesion タンパクの同時可視化。



投与前 (0h) X-Y 観察。緑 : BP180, 赤 : Zyxin

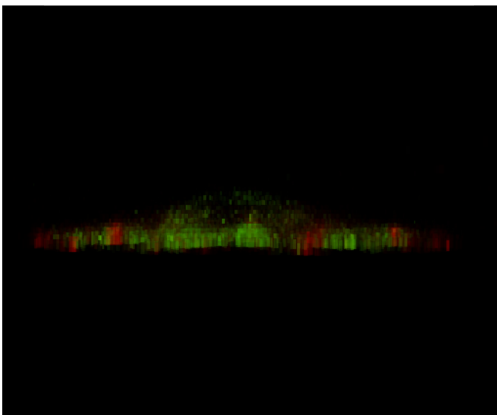


投与後 (3h) X-Y 観察。緑 : BP180, 赤 : Zyxin

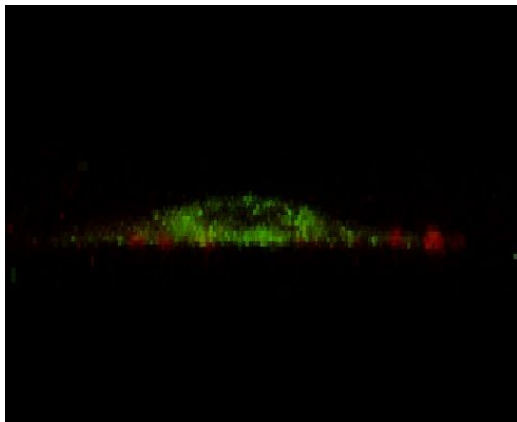


投与後(6h)X-Y観察。緑:BP180,赤:Zyxin

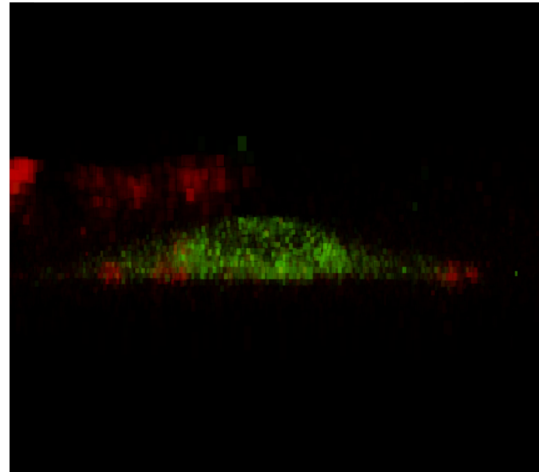
投与前と比較し、Zyxin (Focal adhesion 分子)のサイズが大きくなっていることがわかる。



投与前(0h)Z観察。緑:BP180,赤:Zyxin



投与後(3h)Z観察。緑:BP180,赤:Zyxin



投与後(6h)Z観察。緑:BP180,赤:Zyxin

投与前と比較し、Zyxin (Focal adhesion 分子)のサイズが大きくなっていることがわかる。また、BP180は細胞質内に内包化されている一方、Focal adhesion 分子は基底面にとどまっていることがわかる。

〔その他〕

ホームページ等

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

5. 主な発表論文等
なし。

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

小澤 俊幸 (OZAWA, Toshiyuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 50570602