

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861762

研究課題名(和文) 粘膜類天疱瘡とBP180 C末端部との関連検討および新規診断法への応用

研究課題名(英文) A study of novel BP180 C-terminal domain ELISA on mucous membrane pemphigoid

研究代表者

安河内 篤 (Yasukochi, Atsushi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30724968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜類天疱瘡(MMP)は、口腔粘膜、眼粘膜等の粘膜が優位に障害される自己免疫性水疱症疾患である。その標的抗原は多彩であり明確でないため、正確な診断が困難である。本研究では、血清学的および臨床学的にBP180型MMPと診断された332症例を用い、同疾患の新規診断法を探究するとともに臨床学的統計を行った。同疾患は女性の発症率が高かった。口腔粘膜の発症率は85.5%であり、皮膚の発症率は41.0%であった。治療はステロイド内服療法が多かった。今回新規に開発したBP180 C末端部ELISAでMMP患者血清の陽性率は高く、BP180C末端部ELISAがMMP診断の一助となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis of anti-BP180-type mucous membrane pemphigoid (BP180-MMP) is frustrated by the difficulty of detecting BP180 reactivity. 332 patients were tentatively diagnosed with BP180-MMP. Clinically, a predominance of female patients was diagnosed. Oral mucosal and cutaneous lesions were found in 85.5% and 41.0% of patients, respectively, and frequent treatments were systemic steroids. Various immunological methods, including a newly developed BP180 C-terminal domain enzyme-linked immunoassay (BP180CT ELISA), revealed frequent reactivity with BP180 C-terminal on MMP patients. This large study of patients with suspected BP180-MMP indicates the difficulty of diagnosis of BP180-MMP and the diagnostic usefulness of BP180 CT ELISA.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔外科学

1. 研究開始当初の背景

類天疱瘡群は表皮真皮間結合が障害され、表皮下水疱を生じる自己免疫性水疱症疾患である。本疾患群は、表皮真皮間結合部の接着機構であるヘミデスモソームを構成する分子(図1)に対する自己抗体(抗基底膜部抗体)が生じることにより発症する(文献1)。

同疾患群の診断に際しては、臨床所見、各種抗原タンパクを用いた免疫プロット法(IG)や蛍光抗体直接法(DIF)、蛍光抗体間接法(IIF)、1M食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法(split skin IIF)などを行い、臨床症状と併せて総合的に判断しなければならない。これらの実験手技はそれぞれ100µL単位の比較的多量の患者血清を必要とするとともに、信頼性の高い結果を得るために、相応の設備や複雑な実験手技、経験が必要である。

主に皮膚に表皮下水疱を生じる水疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid, BP)では、その標的抗原がBP180(180 kDa bullous pemphigoid antigen)のnon-collagen 16A(NC16A)領域およびBP230(230 kDa bullous pemphigoid antigen)であることが明らかとなり、同抗原に対する自己抗体を検出するELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)が開発され(BP180 NC16A ELISA)、同疾患のスクリーニングおよび病勢の把握が飛躍的に簡便かつ迅速に行えるようになった(文献2)。一方で粘膜類天疱瘡(mucous membrane pemphigoid、以下MMP)は、口腔粘膜、眼粘膜等の粘膜が優位に障害される疾患である(文献3)が、抗原は、BP180、BP230、Laminin 332、α6 integrin、β4 integrin、Type VII collagen等多彩であり(表、文献1)、その標的抗原は明確でない。そのため診断は従来通り、臨床学的、血清学的、病理学的所見から総合的に判断しなければならない。

MMP患者の75%程度は抗BP180型MMP(BP180MMP)と診断される(文献1)が、同患者血清のBP180 NC16A ELISAにおける陽性率は低く、BP180分子のNC16A領域以外の部分が抗BP180MMPの標的抗原である可能性が示唆されている(文献4)。BP180MMP患者血清の30-40%がBP180 NC16A領域よりC末端側(細胞外領域側)に対する反応性を持つこと(文献4)さらに、MMP患者血清にはBP180 C末端部に対するIgG抗体だけでなく、IgA自己抗体が存在すること(文献5)が報告された。また血清中にIgGおよびIgAの両抗体クラスを有するとき、重症度が高いことも報告されている(文献6)。これらの報告は、BP180 C末端部の自己抗体を検出することによって、MMPの診断および病勢の把握が可能となることを示唆する。しかしながら、これらの報告は免疫プロット法によるもの、かつ、少数の症例による解析結果である。したがって

ELISAのような、より簡便かつ定量化可能、少量の血清で一度に多数の血清を検索可能な方法による検証が必要とされている。

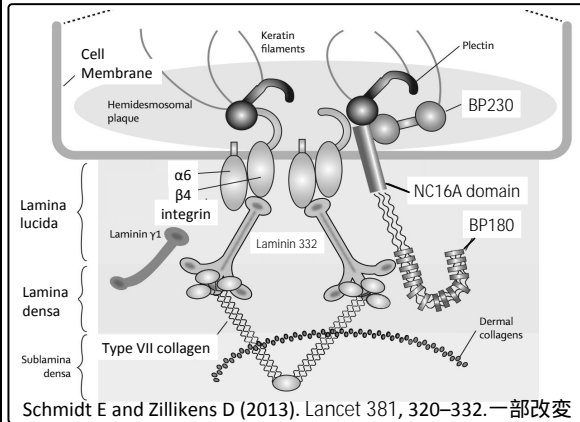


図1. 表皮真皮間結合

表1. 粘膜類天疱瘡と水疱性類天疱瘡の標的抗原

	抗体クラス	標的抗原
粘膜類天疱瘡	IgG	BP180
		BP230
	IgA	Laminin 332
		6 integrin
MMP		4 integrin
		Type VII collagen
水疱性類天疱瘡	IgG	BP180 (NC16A)
		BP230
BP		

<引用文献>

- (1) Schmidt, E. and Zillikens, D. (2013). *Lancet*, 381, 320-332.
- (2) 藤本 亘 (2009). 西日皮膚, 71 巻, 2 号, 164-179.
- (3) Chan, L. et al. (2002). *Arch Dermatol*, 138, 370-379.
- (4) Lee, J. B. et al. (2003). *J Dermatol. Sci.*, 32, 59-64.
- (5) Nie, Z. and Hashimoto, T. (1999). *J Invest. Dermatol.*, 112, 254-255.
- (6) Oyama, N. et al. (2006). *Br J Dermatol.*, 154, 90-98.

2. 研究の目的

本研究では、主にこれまでに同疾患との関連性が指摘されているBP180 C末端部領域に着目する。まずBP180 C末端部リコンビナントタンパクを用いたELISA(BP180 CT ELISA)を開発、確立し、多数のMMP患者血清を用いてBP180 CT ELISAを行い、MMPと同抗原との関連を検索し、同ELISAがMMPの新規診断法となりうるか、検討する。さらに臨床情報も同時に解析し、同ELISAが病勢の把握、発症部位との関連、さらには予後予測のためのバイオマーカー

となりうるかを明らかにすると共に、的確な治療を行う足がかりとする。

3. 研究の方法

(1) 使用する MMP 患者血清

本研究では 1997 年から 2013 年までの間に国内外の施設より診断依頼のため久留米大学皮膚科学教室に送付され、DIF、IIF、split-skin IIF 等の検索を行い、臨床学的特徴と併せて BP180MMP と診断された 332 検体を用いた。この検体数は、本邦で発症する MMP 患者の大半を占めるものと思われ、本邦のあらゆるパターンの MMP を網羅した検体群であると考えることができる。

(2) BP180 C 末端部リコンビナントタンパクの作製

BP180 タンパクの細胞外ドメインのうち

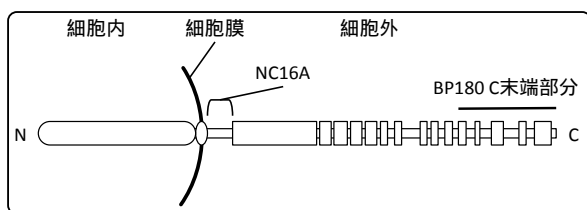


図2. BP180の構造

NC16A を含まない BP180 C 末端部分 (図 2) リコンビナントタンパクを大腸菌発現系を用いて作製した。

(3) BP180 C 末端部 ELISA (BP180 CT ELISA) の開発

十分な量の BP180 C 末端部リコンビナントタンパク作製後、患者血清中の BP180 C 末端部に対する自己抗体を検出する BP180CT ELISA (図 3) を開発した。あらかじめ免疫プロット法にて BP180 C 末端部リコンビナントタンパクに反応性を有する血清を検索し、ポジティブコントロールとして用いた。また、健常者血清も同時にスクリーニングし、ネガティブコントロールとした。2 次抗体として、抗ヒト IgG 抗体だけでなく、抗ヒト IgA 抗体を用いて、患者血清中の BP180 C 末端部 IgG 自己抗体および IgA 自己抗体を検出・定量

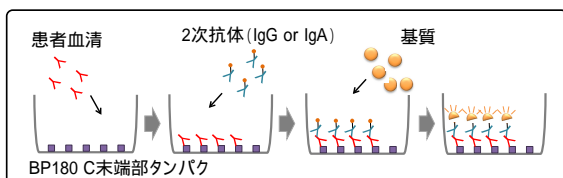


図3. ELISA (抗体測定系)

化可能な ELISA (BP180CT ELISA (G) および BP180CT ELISA (A)) を作成した。

(4) BP180 CT ELISA の施行

多数 MMP 患者血清を用いて BP180 CT ELISA を施行した。臨床的に粘膜優位に水疱を生じた患者かつ split skin IIF 法にて表皮側に陽性であり、BP180MMP と診断され、血清が使用可能であった 252 検体を用いた。

(5) 統計学的解析

BP180 CT ELISA の結果が MMP の新規診断法となりうるかどうか統計学的解析を行った。さらに BP180 NC16A ELISA、BP230 ELISA 等の従来の検索法との関連を検討した。

(6) 他の水疱症との鑑別

BP180 CT ELISA が他の自己免疫性水疱症と鑑別可能かどうかを、すでに診断・保存されている水疱性類天疱瘡 (BP)、Laminin 332 型 MMP (Laminin 332 MMP) 尋常性天疱瘡 (PV)、落葉状天疱瘡 (PF) などの天疱瘡群、基底膜部のコラーゲン VII を標的抗原とする後天性表皮水疱症 (EBA) などの各種自己免疫性水疱症疾患血清を用いて検討した。

(7) BP180MMP の血清学的特徴および臨床特徴解析

332 症例の BP180MMP 患者の血清学的特徴および発症部位、治療法などの臨床特徴を統計解析した。

4. 研究成果

(1) BP180CT ELISA

44 人の健常群を用いてカットオフ値の設定を行った。カットオフ値は健常群の OD 値の平均値に標準偏差の 3 倍の値を加えたもの (Mean+3SD) とし、IgG のカットオフ値は 0.269、IgA は 0.135 とした。

続いて BP180CT ELISA の有用性について BP180MMP 患者血清を用いて検討した。BP180CT ELISA (G) 陽性数は 100/252 (39.7%)、BP180CT ELISA (A) 陽性数は 60/252 (23.8%) であった。また、両 ELISA のどちらも陽性であったものは 36/252 (14.3%)、どちらか一方に陽性を示したものは 124/252 (49.2%) とほぼ半数を示した (表 2)。一方、従来の BP180 NC16a ELISA (IgG) の陽性数は 69/224 (30.8%) と BP180CT の陽性率に比べて低かった。

表 2. BP180MMP 患者での BP180 CT ELISA 陽性数

	IgG		計
	陰性	陽性	
IgA	陰性 128 (50.8%)	64 (25.4%)	192 (76.2%)
	陽性 24 (9.6%)	36 (14.3%)	60 (23.8%)
計	152 (60.3%)	100 (39.7%)	252 (100%)

(2) 他の水疱症との鑑別

続いて他の水疱症患者血清を用いて BP180CT ELISA を行い、疾患特異性を検討した (図 3)。BP180MMP 患者の BP180CT ELISA (G) 値は他の水疱性疾患と比べて優位に高値であった。IgA について、BP180MMP では BP を除くすべての水疱性疾患と有意であった。

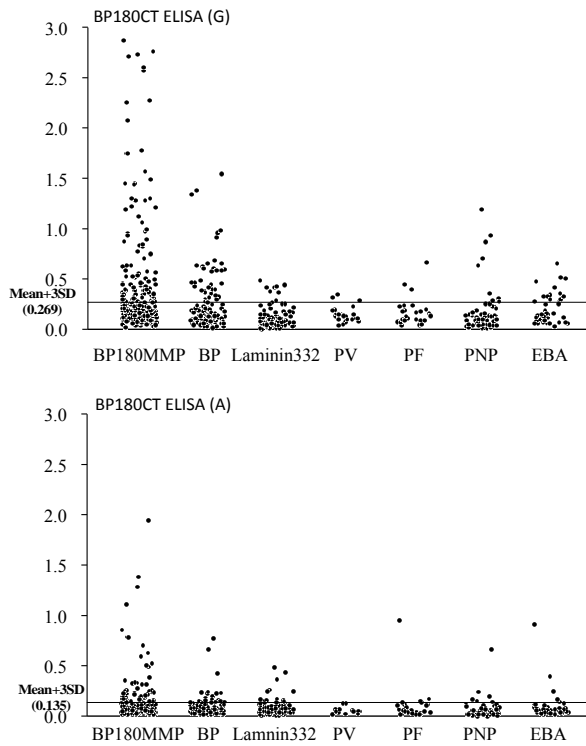


図3. 他の水疱症患者血清との比較

また、各種 ELISA の結果と BP180MMP 患者、Laminin 332 MMP 患者、BP 患者を比較した。BP180C 末端部への陽性率は ELISA、IB ともに BP180MMP で最も高く、BP では BP180 NC16a、BP230 に対する陽性率が高かった。Laminin332 MMP ではいずれの陽性率も低かった。

(4) BP180MMP 患者の血清学的特徴

(a) DIF

表皮基底層 (BMZ) における IgG 陽性数は 108/132 症例、IgA 陽性数は 47/71 症例、IgM 陽性数は 14/40 症例であった。IgG、IgA、IgM のいずれかに陽性であった症例は DIF 施行した 142 症例のうち 127 症例であった。また、陽性症例では全症例に BMZ 上に線状沈着を認めた。C3 沈着は 127 症例中 110 症例に認めた。自己抗体 (IgG、IgA、IgM) と C3 両者の沈着を認めたものは DIF 施行した 127 症例のうち 98 症例であった。

また、ICS (細胞間) に自己抗体の沈着を認めたものは IgG 7/64 症例、IgA 1/45 症例、IgM 0/26 症例であった。

(b) IIF

BMZ に陽性を示した症例は IgG 132/319 症例、IgA 26/285 症例であった。一方で、ICS に反応した症例は IgG 7/194 症例、IgA 0/248 症例であった。

1 M 食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法 (split skin IIF) では、IgG 207/317、IgA 151/282 症例が表皮側に陽性であった。また真皮側に陽性であった症例が IgG 62/317 症例、IgA 4/282 症例であった。

(c) IB

BP180 NC16a リコンビナントタンパクを用いた IB では IgG 26% (86/316)、IgA 2% (4/241) が陽性であった。BP180CT では IgG 43% (118/274)、IgA 8% (17/221) が陽性であった。また BP180 NC16a BP180CT のいずれか一方に陽性であった症例は IgG 50% (159/321)、IgA 9% (21/248) であった。

(3) BP180MMP 患者の臨床学的特徴

前述の通り BP180MMP と診断された 332 症例を対象患者とした。

男女比は男性 120 (39.0%)、女性 188 (61.0%) と女性が男性の 1.5 倍であった。血清診断時の平均年齢は男女ともに 66 歳程度であり、性差は認めなかった。

発症部位については、粘膜単独発症症例は 200 症例 (60.2%)、皮膚と併発している症例は 132 (39.8%) 症例であった。粘膜においては、口腔粘膜の発症数が最も高く、ついで眼粘膜、咽頭粘膜、喉頭粘膜、陰部粘膜、食道粘膜、鼻腔粘膜の順に多く報告された。口腔粘膜のうちでは歯肉粘膜に発症することが多く、次いで頬粘膜、口蓋粘膜、口唇粘膜、舌粘膜の順であった。口腔粘膜のみに発症したものは 106 症例であり、全体の 3 分の 1 程度を占めていた。また眼粘膜のみに症状を認めた ocular MMP は 29 症例あった。

血清採取時の患者の基礎疾患について、何らかの既往を有する患者は 106 症例、既往なしの患者は 9 症例、不明 217 症例であった。最も多かった疾患は高血圧症を有する患者であり、ついで悪性腫瘍、糖尿病の順であった。悪性腫瘍については前立腺がん、肺がんなどの固形癌患者がほとんどであった。

治療内容について、記載があったものは 149 症例であった。そのうち 97 症例で PSL 内服治療が行われ、そのうち 60 症例は PSL 単独投与であった。残り 37 症例は DDS や免疫抑制剤との併用療法であった。また、ミノマイシン、抗アレルギー薬、テトラサイクリン、免疫抑制剤、ニコチン酸アミド、漢方は PSL 等の他の薬剤との併用投与が主であった。また、PSL 内服等にて効果の乏しかった患者についてはステロイドパルス療法、IVIg、血漿交換療法が行われていた。

これらの研究結果より、BP180MMP の発症率は女性が高く、またその発症部位は口腔粘膜が最も多く 85.5% であり、皮膚に併発した症例も 41.0% あった。治療法としてはステロイド内服療法、テトラサイクリン/ミノサイクリン、ジアフェニルスルホン (DDS) が多いことが明らかとなった。

今回開発した BP180CT ELISA を含め様々な血清学的実験の結果、MMP 患者血清が BP180C 末端部もしくは BP180 NC16a 部に反応することを明らかにした。またその病態には IgG だけでなく IgA も関与している

ことが明らかとなった。

本研究結果は病態発症メカニズムの解明への足がかりになるとともに、疾患特異的な治療法開発に寄与するものと思われる。

5. 主な発表論文等（研究代表者には下線）
〔雑誌論文〕（計7件）

1. **Yasukochi, A.**, Teye, K., Ishii, N., Hahimoto, T. (2016) Clinical and Immunological Study of 332 Japanese Patients Tentatively Diagnosed with Anti-BP180-type Mucous Membrane Pemphigoid: A Novel BP180 C-terminal Domain Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Acta Dermato-Venereologica* doi: 10.2340/00015555-2407. (査読有)
2. Hashimoto, T., Tsuruta, D., **Yasukochi, A.**, Imanishi, H., Sekine, H., Fujita, T., Wanibuchi, H., Gi, M., Karpati, S., Sitaru, C., Zone, J.J., Endo, D., Abe, S., Nishino, T., Koji, T., Ishii, N. (2016) Granular C3 Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica* doi: 10.2340/00015555-2379. (査読有)
3. Uchiyama, M., Mitsushashi, Y., Tsuboi, R., Ishii, N., Hayakawa, T., **Yasukochi, A.**, Hashimoto, T. (2015) Anti-BP180-type oral mucous membrane pemphigoid reactive to both NC16a and C-terminal domains. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 81:637-9. doi: 10.4103/0378-6323.168330. (査読有)
4. Ishida, S., Takahashi, K., Kanaoka, M., Okawa, T., Tateishi, C., **Yasukochi, A.**, Ishii, N., Li, X., Hashimoto, T., Aihara, M. (2015) Case of subepidermal autoimmune bullous disease with psoriasis vulgaris reacting to both BP180 C-terminal domain and laminin gamma-1. *J. Dermatol.* 42:391-393. doi: 10.1111/1346-8138.12801. (査読有)
5. Tsuchisaka, A., Kawano, H., **Yasukochi, A.**, Teye, K., Ishii, N., Koga, H., Sogame, R., Ohzono, A., Krol, R.P., Kawakami, T., Furumura, M., Ohata, C., Li, X. and Hashimoto, T. (2014) Immunological and Statistical Studies of Anti-BP180 Antibodies in Paraneoplastic Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 134: 2283-2287. doi: 10.1038/jid.2014.151. (査読有)
6. Sekiya, A., Kodera, M., Yamaoka, T., Iwata, Y., Usuda, T., Ohzono, A., **Yasukochi, A.**, Koga, H., Ishii, N., Hashimoto, T., (2014) A case of lichen planus pemphigoides with autoantibodies to the NC16a and C-terminal domains of BP180 and to desmoglein-1. *Br. J. Dermatol.* 171: 1230-1235. doi: 10.1111/bjd.13097. (査読有)
7. Miyamoto, S., Chikazu, D., Yasuda, T., Enomoto, A., Oh-I, T., Hirako, Y., Tsuchisaka, A., **Yasukochi, A.**, Sogame, R., Teye, K., Koga, H., Ishii, N., Qian, H., Li, X., Hashimoto, T. (2014) A case of oral mucous membrane pemphigoid with IgG antibodies to integrin $\alpha 6\beta 4$. *Br. J. Dermatol.* 171:1555-1557. doi: 10.1111/bjd.13113. (査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

安河内 篤 (YASUKOCHI, Atsushi)
九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員
研究者番号: 30724968