

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17760

研究課題名(和文) DPP-4阻害薬関連水疱性類天疱瘡の発症機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of the mechanism of DPP-4 inhibitor-related bullous pemphigoid

研究代表者

鄭 ビョウ (Zheng, Miao)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：50833802

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)：水疱性類天疱瘡(BP)は表皮基底膜部に存在するBP180に対する自己抗体によって生じる自己免疫性水疱症で、糖尿病治療薬であるDPP-4阻害薬服用患者に本症が好発することが知られている。本研究においてDPP-4阻害薬関連BP患者の末梢血リンパ球は健康人リンパ球よりもDPP-4阻害薬によってTh2サイトカインを産生しやすくなる傾向がみられた。また、BP患者病変部皮膚ではDPP-4(CD26)陽性のT細胞や線維芽細胞が健康皮膚より多く見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、DPP-4阻害薬によってBP患者のT細胞のTh1/Th2バランスがTh2に傾きやすいこと、つまりBP患者ではDPP-4阻害薬によって自己抗体が産生されやすい状態になりやすいことを示唆している。また、BP患者の皮膚ではT細胞や線維芽細胞がDPP-4(CD26)を発現していることから、DPP-4阻害薬がこれらの細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。以上は、DPP-4阻害薬がBPを誘導する機序の解明に資する結果であり、今後の更なる病態解明に向けて基礎的なデータとなる。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering disease which is caused by antibodies to BP180. It is well known that DPP-4 inhibitors, drugs for type 2 diabetes mellitus, can induce BP. In this study, we found that PBMCs from DPP-4 inhibitor-related BP patients tend to produce Th2 cytokines compared to those from normal individuals when they are treated with DPP-4 inhibitors. We also demonstrated that more CD26 (DPP-4) positive T cells and fibroblasts exist in lesional skin of BP compared to normal skin.

研究分野：皮膚科学

キーワード：水疱性類天疱瘡 DPP-4阻害薬 サイトカイン CD26 T細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の病態形成における免疫学的機序は徐々に明らかになりつつあるが、発症機構すなわち免疫自己寛容が破綻する機序は未だ大部分が不明である。水疱性類天疱瘡 (BP) は表皮基底膜部に存在する BP180 タンパクの特異的 NC16a 領域に対する自己抗体によって紅斑や水疱が生じる自己免疫性水疱症であるが、自己抗体が産生される機序は不明である。近年、糖尿病治療薬である DPP-4 阻害薬服用患者に BP が生じることが知られるようになってきた。DPP-4 阻害薬はインスリン分泌促進ホルモンの分解酵素阻害薬であり、糖尿病の第一選択薬として広く使用されている。フランスや本邦の薬剤副作用報告履歴の大規模調査によると、DPP-4 阻害薬服用糖尿病患者は対照群に比べ BP 発症率が有意に高かった (Bene J, et al. *Br J Dermatol* 2016; Arai M, et al. *Diabetes Care* 2018)。

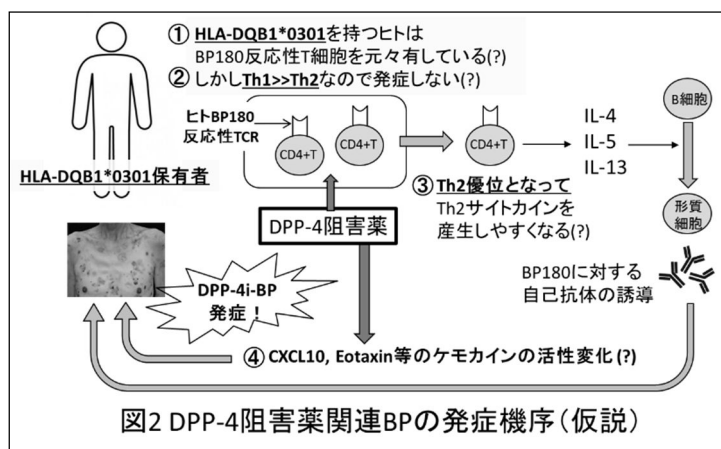
我々のグループでは最近、非炎症型 DPP-4 阻害薬関連 BP 患者では HLA-DQB1*03:01 が 86% で陽性であり、健常人 (18% 陽性) と比較して極めて高頻度であることを突き止めた (オッズ比 27.9, $P=5.86 \times 10^{-11}$) (Ujiie H, et al. *J Invest Dermatol* 2018) (図 1)。しかし、HLA-DQB1*03:01 を有する DPP-4 阻害薬服用糖尿病患者のうち BP を発症するのは 1% 未満であると推定されることから、HLA にその他の複数の要因が加わることで本症を発症すると予想している。本研究課題の「問い」は、DPP-4 阻害薬服用患者において、DPP-4 阻害薬により自己抗体が誘導される機序は何か? という点である。

DPP-4 阻害薬のターゲットとなる DPP-4 は別名 CD26 と呼ばれ、T リンパ球 (特に Th1 と Th17) の活性化に重要な役割を果たしている (Waumans Y, et al. *Front Immunol* 2015)。また、DPP-4 は様々なケモカインの活性を変化させる (Metzemaekers M, et al. *Front Immunol* 2016)。欧米の研究によると、HLA-DQB1*03:01 は白色人種の粘膜類天疱瘡患者で保有率が有意に高い (Delgado JC, et al. *PNAS* 1996)。

また、HLA-DQB1*03:01 を有する健常人血中には BP180 反応性 T 細胞が存在するものの、それが Th1 優位であるため BP 発症に至らないと報告されている (Büdingner L, et al. *J Clin Invest* 1998)。以上より、HLA-DQB1*03:01 をもつ健常人の一部には BP180 反応性 T リンパ球が存在し、DPP-4 阻害薬を内服することでそれらが Th2 優位となり、各種ケモカインの活性変化と相まって自己抗体産生および BP 発症に至るのではないかと、という仮説を立てた (図 2)。



図1 「非炎症型」DPP-4阻害薬関連BPは HLA-DQB1*03:01の保有率が極めて高い



また、DPP-4(CD26)は T 細胞や線維芽細胞、およびその他の上皮細胞に広く発現している (Ishii T, et al. *PNAS* 2001, Mah W, et al. *Am J Pathol* 2017, Arwert EN, et al. *Oncogene* 2012)。過去の研究では、CD26 は多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫疾患に関与することが報告されており (Cordero OJ, et al. *Rheumatol Int* 2001)、免疫系において T 細胞の活性化に関与するとの報告もある (Ohnuma K, et al. *Trends Immunol* 2008)。これらのことは、DPP-4i-BP 患者における T 細胞の CD26 発現パターンを解析することが、その発症機序解明につながる可能性を示唆している。また、CD26 は創傷治癒過程での活性化線維芽細胞において発現が亢進していたとの報告がなされている (Mah W, et al. *Am J Pathol* 2017)。よって、線維芽細胞での CD26 発現パターンを解析することにより、DPP-4i-BP の病態解明の一助となる可能性がある。以上より、DPP-4i-BP および通常型 BP(cBP)患者での T 細胞、線維芽細胞における CD26 発現解析、さらには好酸球数および BP の臨床的評価である Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPD AI) との関連性を解析することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DPP-4 阻害薬により BP 自己抗体が誘導される機序を、HLA-DQB1*03:01 をもつヒトにおける BP180 反応性 T リンパ球の有無の解析や Th1/Th2 バランスの解析、BP 患者病変部皮膚における DPP-4 の発現解析によって明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) HLA-DQB1*03:01 をもつヒトにおける BP180 反応性 T リンパ球の有無の解析

HLA-DQB1*03:01 をもつ水疱性類天疱瘡 (BP) 患者 2 名から PBMC を採取し、96 well plate に 3×10^5 個の PBMC を入れ、全長 BP180 リコンビナントタンパク $5 \mu\text{g/ml}$ および $10 \mu\text{g/ml}$ を加えて刺激した。陽性コントロールとして、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で PBMC を刺激した。陰性コントロールとして無刺激群を置いた。

(2) DPP-4 阻害薬による Th1/Th2 バランスの変化の解析

次に、DPP-4 阻害薬による T リンパ球の免疫応答の変化を解析した。まず、DPP-4 阻害薬関連 BP 患者 (n=6) 及び健常人 (n=9) から PBMC を採取し 1×10^6 個の PBMC を DPP-4 阻害薬 (Sitagliptin 10mg/ml , Vildagliptin 20mg/ml) を加えたうえで PHA で T リンパ球を 48 時間刺激した。刺激後更に 48 時間培養し、PMA+Ionomycin で刺激して CD4+T 細胞からのサイトカイン産生をフローサイトメトリー法で解析した。

(3) DPP-4i-BP および cBP 患者の皮膚検体での、T 細胞、線維芽細胞の CD26 発現解析

cBP 群 (n=25) および DPP-4i-BP 群 (n=26)、対照群 (アミロイドーシス疑い: n=10) の各患者について皮膚検体を採取した。それぞれの皮膚検体をホルマリン固定し、パラフィン包埋後、 $3 \mu\text{m}$ の厚さで組織切片を作成した。組織切片は、T 細胞のマーカーである CD3、および線維芽細胞のマーカーである vimentin を標的として、抗 CD26 抗体 + 抗 CD3 抗体、抗 CD26 抗体 + 抗 vimentin 抗体の組み合わせで免疫二重染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて撮影した。抗 CD26 抗体は新規の抗体を順天堂大学波多野良先生より供与頂いた (Hatano R, et al. *PLoS One* 2019)。各タンパクの陽性細胞数については、ImageJ を用いて解析した。解析の範囲として、標本中の CD3 陽性 T 細胞が密に集合した 5 か所、さらには真皮乳頭層 (papillary dermis) と真皮網状層 (reticular dermis) のそれぞれで無作為に 5 か所を選択した。これにより、CD3 陽性 T 細胞中の CD26 陽性細胞数および線維芽細胞中の CD26 陽性細胞数を解析した。

(4) BP 患者病変部皮膚組織中の CD26 発現と好酸球数との関連の検討

同一検体から上記と同様の手順で得られた標本切片について、HE 染色を施行し、真皮に浸潤する好酸球数を解析した。これにより、上記で得られた結果と好酸球数との関連について検討した。

(5) BP 患者病変部皮膚組織中の CD26 発現と Bullous pemphigoid disease area index (BPDAI) の解析

皮膚検体を採取した患者について、皮膚生検時の BPDAI を電子カルテより抽出した。そして、上記で得られた結果と BPDAI との関連性に関して検討した。

4. 研究成果

(1) HLA-DQB1*03:01 をもつヒトにおける BP180 反応性 T リンパ球の有無の解析

抗 CD3/CD28 抗体刺激群では十分な刺激が得られたものの、全長 BP180 リコンビナントタンパク刺激群では 2 例とも反応がみられなかった。

(2) DPP-4 阻害薬による Th1/Th2 バランスの変化の解析

Sitagliptin 投与群では、DPP-4 阻害薬関連 BP 患者 6 例中 4 例 (66.7%) で IL-4 の産生が増加したが、健常人では 9 例中 2 例 (22.2%) に留まっていた。一方、Vildagliptin 投与群では、DPP-4 阻害薬関連 BP 患者 6 例中 3 例 (50%) で IL-4 の産生が増加したが、健常人では 9 例中 3 例 (33.3%) に留まっていた。以上、DPP-4 阻害薬関連 BP 患者の PBMC は DPP-4 阻害薬によって Th2 に偏る傾向がみられた。

(3) DPP-4i-BP および cBP 患者の皮膚検体での、T 細胞、線維芽細胞の CD26 発現解析

cBP 群 (n=25) および DPP-4i-BP 群 (n=26)、対照群 (n=10) の各患者について皮膚検体を採取した。組織切片は、抗 CD26 抗体 + 抗 CD3 抗体、抗 CD26 抗体 + 抗 vimentin 抗体の各組み合わせで免疫二

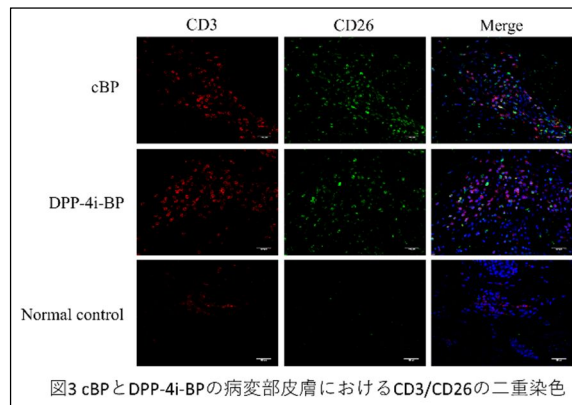


図3 cBPとDPP-4i-BPの病変部皮膚におけるCD3/CD26の二重染色

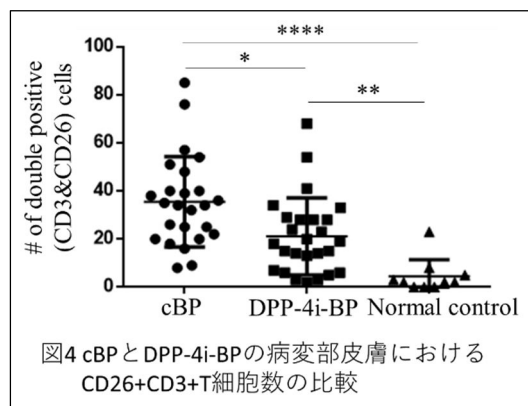


図4 cBPとDPP-4i-BPの病変部皮膚におけるCD26+CD3+T細胞数の比較

重染色を行い、各タンパク質の陽性細胞数について解析した。CD26+CD3+T 細胞数は、対照群と比較して cBP および DPP-4i-BP 群で共に優位に増加していた。また、cBP 群と DPP-4i-BP 群の両方で CD26+CD3+T 細胞数を比較したところ、前者で優位に増加していた(図 3,4)。次に、CD26+vimentin+線維芽細胞数は、対照群と比較して cBP および DPP-4i-BP 群で共に優位な増加を示した(図 5,6)。また、真皮乳頭層(papillary dermis)と真皮網状層(reticular dermis)の比較では、前者で優位な増加を認めた。

(4) BP 患者病変部皮膚組織中の CD26 発現と好酸球数との関連の検討

上記(3)と同一検体から、同様の手順を用いて切片を作成し HE 染色を行った。皮膚に浸潤する好酸球数について cBP 群と DPP-4i-BP 群を比較したところ、真皮乳頭層(papillary dermis)において前者の優位な増加がみられた。また、上記(3)で得られた各群での CD26+CD3+T 細胞数および CD26+vimentin+線維芽細胞数と HE 染色で得られた各群における好酸球数との相関を Spearman の順位相関係数で解析したが、各群での CD26+CD3+T 細胞数および CD26+vimentin+線維芽細胞数は共に好酸球数との相関を認めなかった。

(5) BP 患者病変部皮膚組織中の CD26 発現と Bullous pemphigoid disease area index(BPDAI)の解析

上記(3)で得られた各群での CD26+CD3+T 細胞数および CD26+vimentin+線維芽細胞数について、各群における BPDAI との相関を解析した。Spearman の順位相関係数を作成したところ、CD26+CD3+T 細胞数、CD26+vimentin+線維芽細胞数はいずれも BPDAI の水疱および紅斑のスコアと相関を示さなかった。

【考察】

HLA-DQB1*03:01 をもつヒトにおける BP180 反応性 T リンパ球の有無の解析を行ったところ、予想に反して BP 患者 PBMC は全長 BP180 リコンビナントタンパクに反応しなかった。原因として、全長 BP180 リコンビナントタンパクで刺激を入れるためにはこのタンパクが PBMC に含まれる抗原提示細胞に取り込まれて、T 細胞に抗原提示する必要があるが、全長 BP180 リコンビナントタンパクが 180kDa と大きいためうまく取り込まれていない可能性が考えられた。今後、DPP-4i-BP 患者自己抗体の BP180 タンパク内の標的部位を絞り込み、その部分の小さなリコンビナントタンパクを作成して同様の検討を行う予定である。

一方、DPP-4 阻害薬関連 BP 患者及び健常人の PBMC に DPP-4 阻害薬を加えて刺激しサイトカイン産生を解析する実験では、DPP-4 阻害薬関連 BP 患者では健常人より DPP-4 阻害薬の影響を受けて Th2 サイトカインを産生しやすくなる傾向がみられた。これは、図 2 の仮説をサポートする結果である。今後症例数を増やし、慎重に検討して最終的な結論を出したい。

BP 病変部皮膚では、CD26+CD3+T 細胞数は cBP 群が DPP-4i-BP 群よりも優位に増加しており、標本における全 CD26 陽性細胞中の CD26 + T 細胞数の割合も、同様に cBP 群で優位に増加していた(data not shown)。CD26 は、免疫系において T 細胞活性化に関与するという報告があることから、今回の結果より、cBP 患者の皮膚でより強い T 細胞の活性化が生じていると考えられた。このことは、DPP-4i-BP 患者では cBP 患者と比較して、非炎症型の割合が多く、紅斑が比較的少ないという表現型と矛盾しない。今後は他の皮膚疾患でも同様の検討を行い、BP での結果と比較していく。

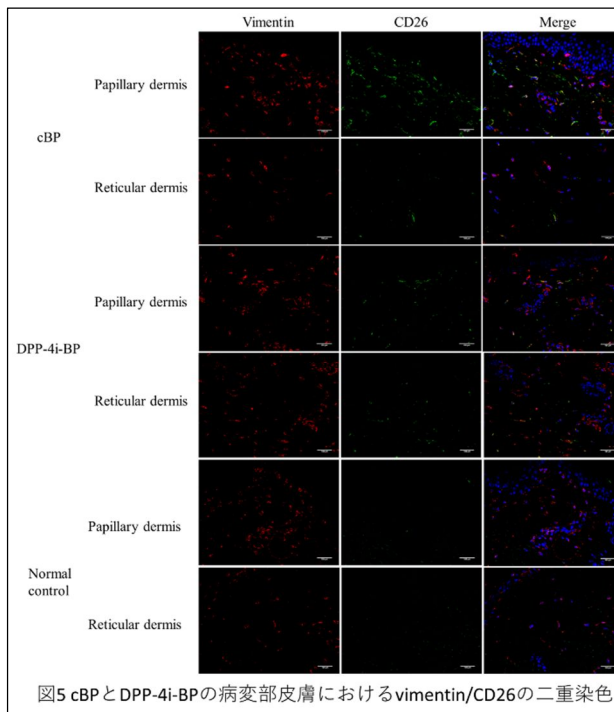


図5 cBPとDPP-4i-BPの病変部皮膚におけるvimentin/CD26の二重染色

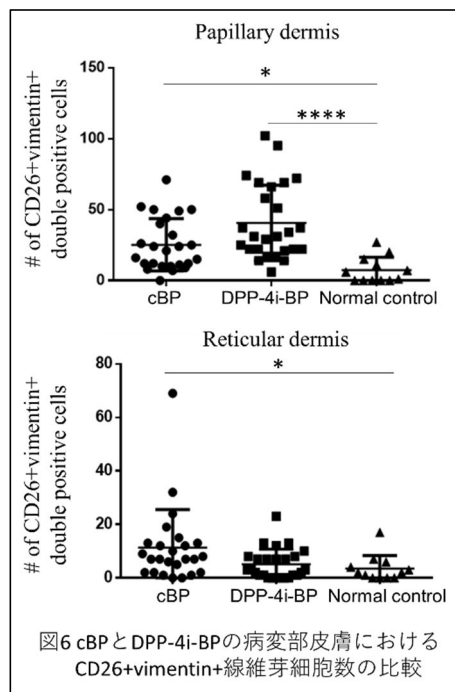


図6 cBPとDPP-4i-BPの病変部皮膚におけるCD26+vimentin+線維芽細胞数の比較

さらに BP 病変部皮膚では CD26 陽性の活性化線維芽細胞も増加していた。今回は水疱部で検討したため、線維芽細胞は創傷治癒のために活性化していた可能性がある。DPP-4i-BP は cBP に比べて癒痕形成しやすい傾向があり(未公表データ)今回の知見と関連している可能性もある。DPP-4 阻害薬が BP 患者の水疱形成後の創傷治癒に与える影響につき、今後、非水疱部の皮膚検体を用いて更に検討を進めていく。

BPDAI での水疱および紅斑のスコアと CD26+T 細胞、CD26+線維芽細胞数との関連は本研究では認められず、また好酸球数との関連も認められなかった。これは、皮膚局所での CD26 発現は全身の炎症状態を直接的に反映していないためと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ken Muramatsu, Miao Zheng, Norihiro Yoshimoto, Takamasa Ito, Inkin Ujiie, Hiroaki Iwata, Hiroshi Shimizu, Hideyuki Ujiie	4. 巻 100
2. 論文標題 Regulatory T cell subsets in bullous pemphigoid and dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-associated bullous pemphigoid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 23 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miao Zheng, Ryo Hatano, Norihiro Yoshimoto, Ken Muramatsu, Takamasa Ito, Chikao Morimoto, Hideyuki Ujiie
2. 発表標題 Increase of CD26-positive T cells and fibroblasts in bullous pemphigoid and dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-related bullous pemphigoid
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------	---------