

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19706

研究課題名(和文) 抗ラミニン332抗体が生ずる皮膚基底膜脆弱性の機序解明

研究課題名(英文) Investigation for a mechanism of skin fragility induced by anti-laminin 332 antibody

研究代表者

古賀 浩嗣 (KOGA, Hiroshi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40461412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜類天疱瘡患者血中で検出される抗ラミニン332抗体の水疱形成機序を解明するために、患者由来抗ラミニン332抗体存在下のヒト皮膚凍結切片組織、表皮細胞株であるHaCaT細胞の接着能を評価した。ヒト皮膚凍結切片では水疱形成はみられなかったが、HaCaT細胞は抗体存在下に培養プレート上での細胞接着が障害された。一方でラミニン332の細胞での蛋白量は減少しておらず、このことからラミニン332抗体による細胞接着の障害にはラミニン332蛋白分解による蛋白減少によるものではなく、抗体による直接的な細胞接着障害も関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated adhesive capacity disrupted by anti-laminin 332 antibodies from patients with mucous membrane pemphigoid (MMP) in absence of cell immunity in vitro to elucidate a mechanism of skin fragility in the patients. Detachment of HaCaT cells, a keratinocyte cell line was observed in the presence of monoclonal or patients' sera-derived anti-laminin 332 antibody, whereas dermal-epidermal separation was not observed on cryosection of human skin in the presence of anti-laminin 332 antibody without leukocytes. Levels of protein expression of laminin 332 in the presence of anti-laminin 332 in HaCaT cells did not decrease compared to that in the absent of the antibodies detected by immunofluorescence and western blotting. These data suggested that protein interaction in hemidesmosome disrupted directly by anti-laminin 332 may be involved in a mechanism of skin fragility observed in MMP with anti-laminin 332 antibodies.

研究分野：皮膚科

キーワード：粘膜類天疱瘡 ラミニン332 自己抗体 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

粘膜類天疱瘡(MMP)は皮膚または粘膜に水疱、びらんを生じる疾患であり、粘膜病変は口腔(特に歯肉)、眼粘膜、その他外陰部、肛門周囲、咽頭、食道、鼻粘膜と広範囲に生じうる。以前は癬痕性類天疱瘡と呼称されており、病変は癬痕を残す事が特徴である。これが粘膜においては癒着を起こし、失明、咽頭狭窄といった合併症を引き起こし患者の QOL を著しく低下させる。

血清学的には患者血中 IgG(または IgA)が基底膜部領域に沈着することが特徴であり、この抗体の基底膜への結合が症状を引き起こすと考えられているが、そのメカニズムに

ついては未だ解明されていない。これまでの報告では自己抗体として、抗 BP180 抗体、抗ラミニン 332、抗 BP230 抗体、抗インテグリン 6 4 抗体が患者血中より検出されているが、自己抗体のタイプから大きく抗 BP180 型 MMP と抗ラミニン 332 型 MMP に二分される。

治療においてはステロイド内服が主体となっているが、しばしば治療抵抗性であり、より疾患特異的な有効な治療法の開発が期待される。しかしながら上述のように抗体がどのようにして水疱形成を起こすのか、その病態機序は未だよく解明されていない。

抗ラミニン 332 型 MMP のモデルマウスとして、ヒトケラチノサイトより精製したラミニン 332 を抗原とした抗ラミニン 332 抗体をマウスへ投与することで本疾患患者と類似した症状を呈するものがある。興味深いことに、MMP が分類される類天疱瘡群の他の疾患動物モデルと異なり、抗ラミニン 332 抗体は Fc 部位を欠いた Fab フラグメントのみであっても症状を誘発することができる。Fc 部位は好中球や T 細胞といった Fc レセプターを発現している免疫細胞の活性化に必要であり、また補体の古典的経路に必要な C1q 結合に必要である。他の類天疱瘡動物モデルとして知られる水疱性類天疱瘡、後天性表皮水疱症の疾患モデルマウスではこの Fc レセプターシグナルによる好中球などの免疫細胞の活性化、それに続く Reactive Oxygen Species やプロテアーゼの放出、サイトカインの産生が病態形成に重要であると報告されており、この点において他の類天疱瘡疾患と抗ラミニン 332 型 MMP は異なった病態が存在していることが考えられる。

## 2. 研究の目的

今までの報告から、ラミニン 332 型 MMP においては抗体による免疫細胞、補体の活性化よりも、抗体による直接的な蛋白結合の障害が病態に関与している可能性を考えた。本研究ではこの仮説に基づいてラミニン 332 抗体による細胞接着障害について実験を行う。

## 3. 研究の方法

患者由来の抗ラミニン 332 抗体による免疫細胞非依存性の水疱形成能の評価

類天疱瘡自己抗体の水疱形成能を *ex vivo*

で評価する手法として既に確立されている Cryosection assay の変法を用いる。これは Jonkman らが 2009 年に J Invest Dermatol に報告した方法であり、具体的にはサンプル血清をヒト皮膚凍結切片上で反応させ、免疫複合体を形成させた後に、好中球を切片上で反応させることで抗原結合後の Fc レセプターを介した好中球の活性化を誘導して表皮基底膜部で水疱を形成させるものである。本実験では免疫細胞非依存性の水疱形成能を評価するために好中球を反応させる工程を省いた変法で行う。つまり、免疫複合体の形成、沈着のみで水疱が形成できるかを評価する。

表皮細胞株におけるラミニン 332 抗体投与後の接着能の評価

表皮細胞株である HaCaT 細胞を単層培養し、そこに患者由来のラミニン 332 抗体を添加する。24 時間後に培養プレート上に結合している細胞数を色素を用いた定量法で計測する。

ラミニン 332 抗体存在下におけるラミニン 332 蛋白の発現量の評価

上記で細胞接着が障害されることを証明した後に、それが細胞膜上での蛋白減少によって起こるのか、それとも直接的なパートナー蛋白との結合の障害によって起こるのかを見るために、細胞でのラミニン 332 蛋白の発現量を蛍光抗体法およびウエスタンブロッティングで評価する。

## 4. 研究成果

まず抗ラミニン 332 抗体による免疫細胞非依存性の水疱形成能の評価を行った。具体的にはヒト包皮凍結切片上にラミニン 332 抗体を 0.02 mg/ml の濃度で添加し、37 °C で 24 時間反応させた。光学顕微鏡下に裂隙形成の有無を確認したが、切片上で裂隙は生じなかった。

次に表皮ケラチノサイトの細胞株である HaCaT 細胞を用いた *in vitro* の実験を行った。培養プレート上の HaCaT 細胞にラミニン 332 モノクローナル抗体 (5 mcg/ml, 10 mcg/ml, 50 mcg/ml) およびラミニン 332 抗体陽性患者から精製した IgG (50 mcg/ml, 150 mcg/ml, 300 mcg/ml) を添加し、18-24 時間培養し、洗浄後にプレート上に残存する細胞数を色素で可視化して計測したところ、非添加細胞(コントロール)と比較してラミニン 332 抗体、患者由来ラミニン 332 IgG 抗体添加細胞では接着細胞数の減少を認めた。

細胞接着の低下がラミニン 332 の発現低下によるものかを検証するため、同条件下で培養した細胞を蛍光標識したラミニン 332 抗体で染色し、蛍光強度から発現量を比較したが非添加細胞に比べて各抗体添加細胞でも有意な低下はみられなかった。またウエスタンブロッティングによる検出においてもラミニン 332 量は有意な低下はみられず、これらの結果からラミニン 332 抗体による細胞接着障害はラミニン 332 蛋白分解に

よる蛋白減少によるものではなく、抗体による直接的な細胞接着障害による機序がある可能性が示唆された。

ラミニン 332 は表皮基底膜部領域において 7 型コラーゲン等と結合することが知られている。今後は自己抗体がこれらの結合パートナーとの結合を障害しうるのかを検討したいと考えている。

#### 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 17 件)

1. Ohashi M, Takagi H, Mizutani Y, Seishima M, Koga H, Hashimoto T. A case of pemphigoid with IgG autoantibodies to the 3 subunit of laminin 332 associated with psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol* 2017; 27(3):306-307. (査読有)
2. Hayakawa T, Hirako Y, Teye K, Tsuchisaka A, Koga H, Ishii N, Karashima T, Kaneda M, Oyu Y, Tateishi C, Sugawara K, Yonamine A, Shinkuma S, Shimizu H, Fukano H, Shimozato K, Nguyen NT, Marinkovich MP, Tsuruta D, Hashimoto T. Unique mouse monoclonal antibodies reactive with maturation-related epitopes on type VII collagen. *Exp Dermatol* 2017; 26(9):811-819. (査読有)
3. Schmidt E, Spindler V, Eming R, Amagai M, Antonicelli F, Baines JF, Belheouane M, Bernard P, Borradori L, Caproni M, Di Zenzo G, Grando S, Harman K, Jonkman MF, Koga H, Ludwig RJ, Kowalczyk AP, Müller EJ, Nishie W, Pas H, Payne AS, Sadik CD, Seppänen A, Setterfield J, Shimizu H, Sinha AA, Sprecher E, Sticherling M, Ujiie H, Zillikens D, Hertl M, Waschke J. Meeting Report of the Pathogenesis of Pemphigus and Pemphigoid Meeting in Munich, September 2016. *J Invest Dermatol* 2017; 137(6):1199-1203. (査読有)
4. Koga H, Ishii N, Hashimoto T, Nakama T. Case of shift from linear immunoglobulin A bullous dermatosis to pemphigus herpetiformis for a short period of time. *J Dermatol* 2017; 44(2):189-193. (査読有)
5. Mai Y, Ujiie H, Nishimura M, Koga H, Maya Y, Shiba-Tokuchi K, Fujita Y, Iwata H, Mikawa Y, Shimizu H. Chemiluminescent enzyme immunoassay failed to detect anti-desmoglein 3 antibodies in a case of pemphigus vulgaris. *J Dermatol* 2017; 44(10):e242-e243. (査読有)
6. Bieber K, Koga H, Nishie W. In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases. *Exp Dermatol* 2017; 26(12):1163-1170. (査読有)
7. Fukuda A, Himejima A, Tsuruta D, Koga H, Ohyama B, Morita S, Hashimoto T. Four cases of mucous membrane pemphigoid with clinical features of oral lichen planus. *Int J Dermatol* 2016; 55(6):657-65. (査読有)
8. 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* 2016; 136(2):399-408. (査読有)
9. Nishikawa R, Takahashi H, Matsuda M, Imaoka K, Ogawa M, Teye K, Tsuchisaka A, Koga H, Komorowski L, Probst C, Hachiya T, Fritzler MJ, Ishii N, Ohata C, Furumura M, Krol RP, Muro Y, Morita E, Hashimoto T. Anti-early endosome antigen 1 autoantibodies were detected in a pemphigus-like patient but not in the majority of pemphigus diseases. *Exp Dermatol*. 2016; 25(5):368-74. (査読有)

10. Hayakawa T, Teye K, Hachiya T, Uehara R, Hashiguchi M, Kawakami T, Li X, Tsuchisaka A, Ohara K, Sogame R, Koga H, Hamada T, Ohata C, Furumura M, Ishii N, Fukano H, Shimozato K, Hashimoto T. Clinical and immunological profiles of anti-BP230-type bullous pemphigoid: Restriction of epitopes to the C-terminal domain of BP230, shown by novel ELISAs of BP230-domain specific recombinant proteins. *Eur J Dermatol*. 2016; 26(2):155-63. (査読有)
11. Li X, Qian H, Sogame R, Hirako Y, Tsuruta D, Ishii N, Koga H, Tsuchisaka A, Jin Z, Tsubota K, Fukumoto A, Sotozono C, Kinoshita S, Hashimoto T. Integrin  $\alpha 4$  is a major target antigen in pure ocular mucous membrane pemphigoid. *Eur J Dermatol*. 2016; 26(3):247-53. (査読有)
12. Witte M, Koga H, Hashimoto T, Ludwig RJ, Bieber K. Discovering potential drug-targets for personalized treatment of autoimmune disorders - what we learn from epidermolysis bullosa acquisita. *Expert Opin Ther Targets*. 2016; 20(8):985-98. (査読有)
13. Imanishi A, Imanishi H, Hiroyasu S, Ozawa T, Koga H, Ishii N, Kitajima Y, Hashimoto T, Tsuruta D. Anti-BP180-type mucous membrane pemphigoid immunoglobulin G shows heterogeneity of internalization of BP180/collagen XVII into keratinocyte cytoplasm. *Med Mol Morphol*. 2016; 49(2):89-97. (査読有)
14. Koga H, Recke A, Vidarsson G, Pas HH, Jonkman MF, Hashimoto T, Kasprick A, Ghorbanalipoor S, Tenor H, Zillikens D, Ludwig RJ. PDE4 inhibition as potential treatment of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol*. 2016; 136(11):2211-2220. (査読有)
15. Hashimoto T, Tsuruta D, Koga H, Fukuda S, Ohyama B, Komai A, Karashima T, Ohata C, Teye K, Ishii N. Summary of results of serological tests and diagnoses for 4774 cases of various autoimmune bullous diseases consulted to Kurume University. *Br J Dermatol*. 2016; 175(5):953-965. (査読有)
16. Teye K, Numata S, Ishii N, Krol RP, Tsuchisaka A, Hamada T, Koga H, Karashima T, Ohata C, Tsuruta D, Saya H, Haftek M, Hashimoto T. Isolation of All CD44 Transcripts in Human Epidermis and Regulation of Their Expression by Various Agents. *PLoS One*. 2016; 11(8):e0160952. (査読有)
17. Teye K, Numata S, Ohzono A, Ohyama B, Tsuchisaka A, Koga H, Hachiya T, Tsuruta D, Ishii N, Hashimoto T. Establishment of IgA ELISAs of mammalian recombinant proteins of human desmocollins 1-3. *J Dermatol Sci*. 2016; 83(1):75-7. (査読有)

(学会発表) (計 0 件)

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古賀 浩嗣 (KOGA, Hiroshi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 40461412