

令和元年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20585

研究課題名(和文) 粘膜類天疱瘡の唾液を用いた新規診断法の開発と抗原特異的発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of the novel diagnostic method on mucous membrane pemphigoid using saliva

研究代表者

安河内 篤 (YASUKOCHI, Atsushi)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：30724968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、類天疱瘡群の自己抗体標的抗原のうち、特にBP180に着目し、その発現制御機構の解析を行った。解析の経過で、類天疱瘡における基底膜構造の解離様式が、癌浸潤でみられる様式と類似していることが見出した。

さらに、口腔癌(歯肉癌、舌癌)細胞および組織検体、および正常舌組織におけるBP180の発現制御解析では、BP180発現制御にはmiR-203がp53非依存的に関与していることを突き止め、さらに、BP180、野生型p53、変異型p53、miR203の連関と発現制御の相互性をin vitroで詳細に解析した(Yasukochi A et al., J Biochem, 2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

類天疱瘡群は、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に対する自己抗体が生じることにより表皮下水疱を生じる自己免疫性水疱症疾患であるが、その自己抗体の標的抗原は多彩であり、具体的な疾患発症に関わる責任抗原は明確となっていない。病態解明に結びつくBP180の機能解析の進捗が滞っている理由に、BP180の発現制御機構やそのリガンドが解明されていないことが挙げられる。

本研究によって明らかとなった、新規のBP180発現制御機構は、ヘミデスモソームの解離が病態の主体である類天疱瘡のほか、癌浸潤機構や創傷治癒機転の解明にもつながり、様々な疾患に対する新たな治療標的を提示した。

研究成果の概要(英文)：This project focused on BP180 as one of the autoantibody target antigens of the pemphigoid group and analyzed regulation mechanism of its expression. In the course of analysis, it was found that the basement membrane structure dissociation in pemphigoid was similar to that seen in cancer invasion.

Therefore, we further analyzed expression control of BP180 in oral cancer (gingival and tongue cancer) cells and tissue samples compared with normal tongue tissue, and we have identified that miR-203 is involved in p53-independent control of BP180 expression. Furthermore, the interaction among BP180, wild-type p53, mutant p53, and miR203 was analyzed in vitro (Yasukochi A et al., J Biochem, 2019)

研究分野：口腔外科学

キーワード：粘膜類天疱瘡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

類天疱瘡群は、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に対する自己抗体（抗基底膜部抗体）が生じることにより表皮下水疱を生じる自己免疫性水疱症疾患である。

類天疱瘡の代表的疾患は皮膚主体に水疱を生じる水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid、以下BP）である。口腔粘膜にびらんを生じることがあっても重篤にはならない。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、同疾患のスクリーニングだけでなく病勢の把握までもが飛躍的に簡便かつ迅速に行えるようになった。

一方で、粘膜類天疱瘡は（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が、これまでに報告されてきただけでもその標的抗原は、BP180、BP230、ラミニン332、 $\alpha 6$ インテグリン、 $\beta 4$ インテグリン、コラーゲンVII等多彩であり、その標的抗原は明確となっていない。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。

病態解明に結びつく自己抗原について機能解析の進捗が滞っている理由に、それらの発現制御機構やそのリガンドが解明されていないことが挙げられる。

そこで、本研究は、標的抗原候補の中でも、特にBP180に着目し、その存在意義について新たな知見を得る研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究課題の経過で、申請者は、類天疱瘡患者に併発した歯肉癌を十数例観察する機会を得、類天疱瘡における基底膜構造の解離様式が、癌浸潤でみられる様式と類似していることを見出した。そこで、急遽、研究テーマを発展させ、口腔癌におけるBP180の局在とその存在意義、さらには、類天疱瘡と口腔癌発症の関連性についても解析を行った。

（癌の浸潤・転移には、細胞-細胞間および細胞-基質間接着の異常が深く関わっていることが想定される。ヘミデスモソームは、細胞-基質間接着装置の代表的なものであり、癌の浸潤・転移のほか、創傷治癒過程など、様々な生命現象における細胞運動時にも、この構造の接着解離が生じることが明らかとなっている。そのため、ヘミデスモソームの役割、またそれを構成する細胞接着分子の動態を理解することは、生命現象のみならず、類天疱瘡を含めた様々な病態形成の分子基盤を把握することに繋がることから、先ず、本研究課題の学術的基盤をなす当該蛋白質の発現機序解析を口腔癌組織や細胞を用いて解析することが優先された。）

3. 研究の方法

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株（NA、SAS）と歯肉癌細胞株（Ca9-22、Sa3）を用い、単層培養細胞およびスフェロイド三次元培養系にて、BP180の発現レベルと局在を確認した。続いて、BP180発現制御について、がmiRNA（miRNA）のひとつであるmiR-203およびp53遺伝子の過剰発現系・発現抑制系をつくり、BP180のmRNAおよび蛋白質発現との相関を詳細に調べた。さらに、BP180遺伝子プロモーター領域におけるmiR-203の結合予測部位の欠損コンストラクトを作成し、野生型と比較した際の、BP180の発現変動をルシフェラーゼアッセイで解析した。さらに、p53依存性の発現確認には、p53遺伝子の阻害剤であるピフィスリン α を用いた検証を行った。

また、実際のヒト口腔癌組織においても*in vitro*で証明された関係が成立しているか組織学的および分子生物学的解析を行うことで、BP180の発現制御機構を明らかにした。

4. 研究成果

口腔扁平上皮癌組織におけるBP180は、原発巣および所属リンパ節転移巣において、癌組織辺縁に一致した発現の亢進が認められ、他の癌種では報告されていない特徴的な局在パターンを示した。また、野生型p53活性をもつヒト口腔扁平上皮癌細胞株（NA、SAS）を用いた三次元培養実験において、BP180は、スフェロイド外部の基底膜成分の有無に関わらず、時間経過とともに辺縁に局在していくことが明らかとなり、その局在もp53の局在と一致していた（Fig.1）。

以上の結果から、BP180は口腔扁平上皮癌において、癌組織内部では発現が消失し、さらに（基底膜の有無に関わらず）辺縁部では発現が亢進するという、特徴的な発現パターンをp53活性依存的に示す可能性が明らかとなった（Fig.1）。

また、野生型 p53 活性をもたないヒト歯肉癌細胞株 (Ca9-22、Sa3) では、BP180 の発現制御が miR203 によって行われていることを証明した。

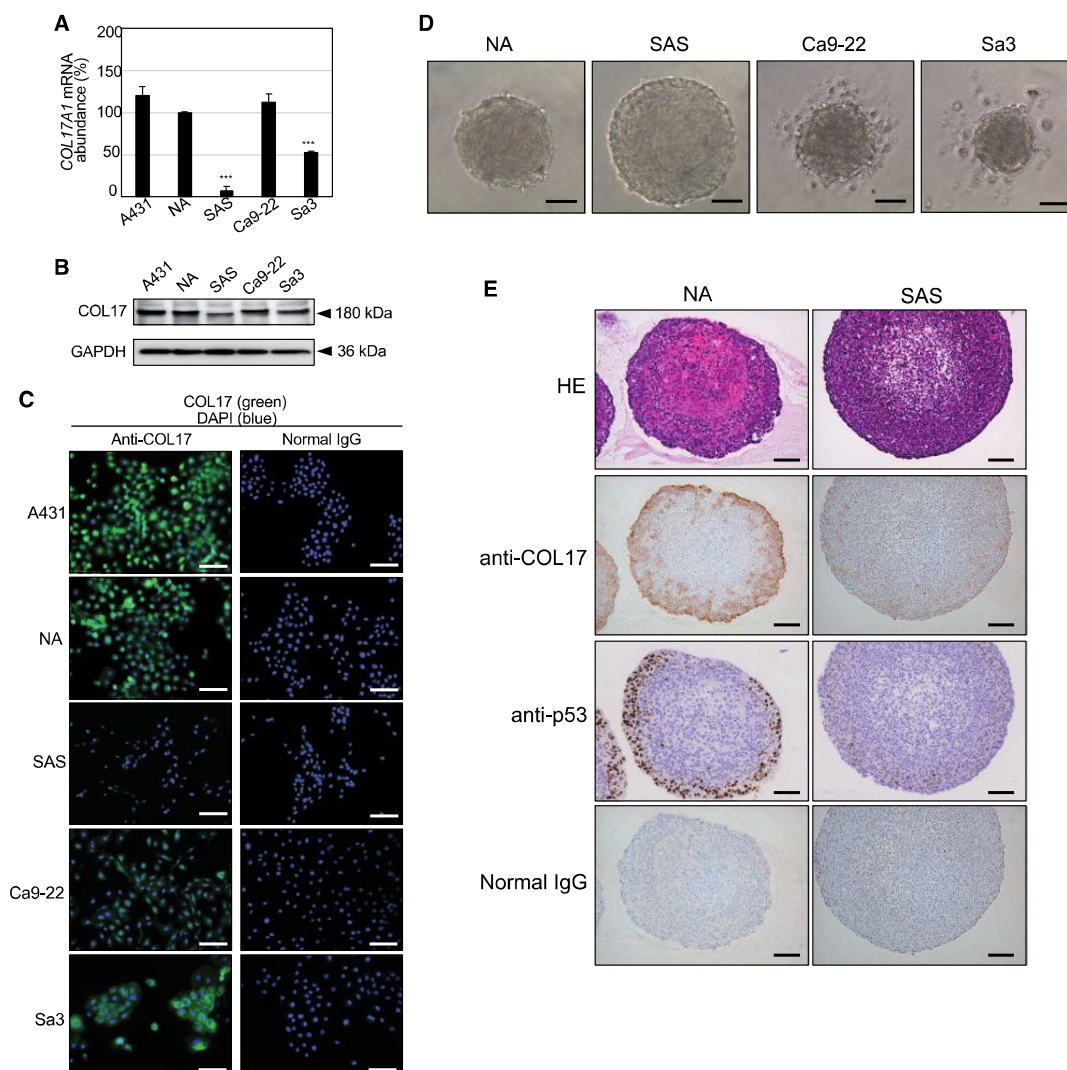


Fig. 1 Expression of COL17 in OSCC cell lines. (A) qPCR analysis of *COL17A1* expression in the NA, SAS, Ca9-22 and Sa3 cell lines. The A431 cell line was used as a positive control. Data were normalized to GAPDH and experiments were performed three times in duplicate. The values are expressed as the percentage of *COL17A1* abundance in NA. All quantitative data indicate the mean \pm SD. *** $P < 0.001$ versus NA (Student's *t*-test). (B) Immunoblot analysis of COL17 protein levels in the NA, SAS, Ca9-22 and Sa3 cell lines. The amount of protein loaded in each lane was 10 μ g. GAPDH was used as loading control and the experiments were performed three times. (C) Immunofluorescence showing COL17 protein localization in the NA, SAS, Ca9-22 and Sa3 cell lines. Experiments were performed three times in duplicate. Scale bars: 100 μ m. (D) Three-dimensional spheroid. After cells (5×10^3) were cultured in Nunclon Sphera 96U-Well Microplates (Thermo Fisher Scientific) for 48 h, they were observed using an optical microscope. Scale bars: 100 μ m. (E) Immunohistochemical analysis of the spheroids. Five days after cell seeding, NA and SAS spheroids embedded in iPGell (GenoStaff) were fixed with 4% PFA and then stained with haematoxylin and anti-COL17 and anti-p53 antibodies. Each paraffin section was 5- μ m thick. Scale bars: 100 μ m.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1 . **Yasukochi A**, Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakashima M, Nakamura S. Regulation of collagen type XVII expression by miR203a-3p in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biochem.* 2019 Mar 27. pii: mvz024. doi: 10.1093/jb/mvz024. (査読有)
- 2 . Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Hazekawa M, **Yasukochi A**, Nishinakagawa T, Ono K, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. miR-200c-3p spreads invasive capacity in human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Mol Carcinog.* 2018 Feb;57(2):295-302. doi: 10.1002/mc.22744. Epub 2017 Oct 31. (査読有)
- 3 . **Yasukochi A**, Teye K, Ishii N, Hahimoto T: Clinical and Immunological Studies of 332 Japanese Patients Tentatively Diagnosed as Anti-BP180-type Mucous Membrane Pemphigoid: A Novel BP180 C-terminal Domain Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Acta Derm.-Venereol.*, 2016 Aug 23;96(6):762-7. doi: 10.2340/00015555-2407. PMID: 26984589 (査読有)
- 4 . Hashimoto T, Tsuruta D, **Yasukochi A**, Imanishi H, Sekine H, Fujita T, Wanibuchi H, Gi M,

Kárpáti S, Sitaru C, Zone JJ, Endo D, Abe S, Nishino T, Koji T, Ishii N: Granular C3 Dermatitis. *Acta Derm.-Venereol.*, 2016 Aug 23;96(6):748-53. doi: 10.2340/00015555-2379. PMID: 26912390 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 安河内 (川久保) 友世、森岡政彦、櫛川舞、西中川拓也、安河内篤、中村誠司、中島学、miR-200c-3p による口腔扁平上皮癌の浸潤制御機構 (miR-200c-3p spreads invasive capacity in human oral squamous cell carcinoma microenvironment)、第 92 回日本薬理学会年会、2019 年 3 月 14 日～16 日、大阪)
2. **安河内篤**、森岡政彦、川久保-安河内友世、中島 学、中村 誠司、口腔扁平上皮癌における **BP180** の局在、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 16 日-2017 年 9 月 18 日、松本
3. 川久保-安河内友世、森岡政彦、**安河内篤**、中村 誠司、中島 学、非コード RNA による口腔癌の進展抑制、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 16 日-2017 年 9 月 18 日、松本
4. **Yasukochi A**, Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M, Nakamura S: **The significance of BP180 expression in oral squamous carcinoma cell invasion**, The 5th Congress of ASHNO, Mar 23-25, 2017, Bali, Indonesia
5. **Yasukochi A**, Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Obayashi K, Nakashima M, Nakamura S: **Link of BP180 bullous pemphigoid autoantigen to invasion of oral squamous carcinoma cell**, ANZHNCS Annual Scientific Meeting and the IFHNOS 2016 World Tour, Oct 25-27, 2016, Auckland, New Zealand

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。