

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16318

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡におけるIgE自己抗体を介した紅斑形成機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of erythema formation via IgE autoantibodies in bullous pemphigoid

研究代表者

泉 健太郎 (IZUMI, Kentaro)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：50793668

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)：著しい痒みを伴い水疱や紅斑が全身に生じる水疱性類天疱瘡患者(BP)では血液中の好塩基球の活性化がみられた。好塩基球の膜表面に存在するBP-IgE自己抗体と自己抗原である17型コラーゲンの結合に基づいてBPにおける好塩基球の活性化が起こっている可能性が示唆された。17型コラーゲンは通常表皮基底膜部に局在しているが、BP患者の一部では病変部皮膚において17型コラーゲンが真皮上層に滴落している所見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて水疱性類天疱瘡(BP)の血中好塩基球の活性化が17型コラーゲン-IgE自己抗体の結合に基づいて生じた可能性が示唆された。好塩基球の活性化は脱顆粒に引き続いて起こるケミカル・メディエーターの放出を介して血管透過性の亢進や皮膚炎症を惹起することから、17型コラーゲンとBP-IgE自己抗体の抗原-抗体反応がBPの病態に関与している可能性が考えられた。未だ、ステロイドの全身投与が治療の第一選択であるBPにおいてBP-IgE自己抗体を介した好塩基球の活性化がBPの新規治療法に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is clinically characterized by blisters and erythema with pruritis. We found that basophils were activated in the peripheral blood from BP patients. It was suggested that basophil activation was based on the binding of type XVII collagen and BP-IgE autoantibody. Although type XVII collagen express along the basement membrane zone of epidermis under the steady state, we found that type XVII collagen was also localized in the superficial dermis in the lesional skin from a part of BP patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：皮膚病態学 自己免疫 水疱症 水疱性類天疱瘡 基底膜タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 水疱性類天疱瘡における紅斑の有無は自己抗体プロファイルと関連する

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid, BP) は、自己抗体が主に表皮真皮間接合を担う 17 型コラーゲン (Collagen XVII, COL17) を標的とする自己免疫疾患である。COL17 の中でも NC16A 領域が主要な病原エピトープであり、BP 患者の約 80-90% において抗 NC16A-IgG を検出する (Kobayashi M, et al. J Dermatol Sci. 2002)。しかし、BP 患者血清中には、COL17 の NC16A 領域以外の部位を標的とする IgG 自己抗体も存在する (Di Zenzo G, et al. J Invest Dermatol. 2011)。

近年申請者らは、121 例の BP 患者の表現型と IgG 自己抗体のエピトープ解析を行ったところ、NC16A 自己抗体を検出する症例では臨床的、著明な浮腫性紅斑を伴う水疱を呈するとともに病理組織学的に水疱辺縁に多数の好酸球が浸潤する表現型を呈することを発見した。一方、NC16A 領域以外の部位に対する IgG 自己抗体のみを検出する BP 症例では臨床的な浮腫性紅斑や病理組織学的な真皮上層の好酸球浸潤のいずれも乏しいことを明らかとした。従って BP では、自己抗体プロファイルと表現型が関連している可能性が示唆された (Izumi K, et al J Invest Dermatol. 2016)。

(2) BP の紅斑形成には抗 COL17-IgE 自己抗体の関与が想定される

BP では抗 COL17-IgG 自己抗体の他に抗 COL17-IgE 自己抗体が血中や病変部皮膚で検出されることが知られている。ヒト皮膚を植皮したヌードマウスへ抗 COL17-IgE を投与すると膨疹様紅斑を再現可能であり (Fairley JA, et al. J Invest Dermatol. 2007) BP における紅斑形成機序の一つに抗 COL17-IgE 自己抗体の関与が推測されている。一方、近年申請者らの報告によると BP 病変部皮膚の表皮基底膜部における抗 COL17-IgE 自己抗体の検出率は 18% であり、それほど高くはない (Moriuchi R, et al. J Dermatol Sci. 2015)。これは血清中に含まれる IgE は非常に微量であり、多くは肥満細胞や好塩基球などの膜上で Fc 受容体 (Fc RI) と結合しているためと予想されている。既報告においても BP 病変部皮膚の真皮内で肥満細胞表面に IgE が局在する所見を確認できる (Dimson OG, et al. J Invest Dermatol. 2003)。

(3) 真皮内での抗 COL17-IgE と COL17 の結合にプロテアーゼによる COL17 の切断が必要か?

真皮内に存在する肥満細胞や好塩基球上に抗 COL17-IgE が発現しているとしても、COL17 は表皮真皮接合部に発現する分子であり、COL17 が真皮内細胞へ直接結合することは不可能である。しかし申請者らは抗 COL17 ポリクローナル抗体を用いると真皮内に浸潤する細胞上に COL17 が局在する現象を確認しており (Nishie W, et al. J Immunol. 2010) 抗 COL17 ものクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) によっても同様の現象を確認した。真皮内に COL17 が局在する機序は未だ不明だが、COL17 は種々のプロテアーゼにより切断を受けることが知られている。BP の水疱内容液中にはセリンプロテアーゼの一種であるプラスミンが存在するため (Hofmann SC, et al. J Invest Dermatol. 2009) 切断を受けた COL17 の細胞外領域が細胞膜上から遊離した可能性も推測される。

以上より申請者は、肥満細胞などの細胞膜表面に発現する抗 COL17-IgE に COL17 が結合するためにはプロテアーゼによる COL17 の切断とそれに続発する COL17 断片の真皮への遊離が必要では? との仮説を立てた。申請者らは、ヒト COL17 の NC16A 領域に対する mAb (Ujiie H, et al. J Immunol. 2014) や、C 末端領域を認識する mAb (Wada M, et al. J Invest Dermatol. 2016) 切断を受けた COL17 を認識する mAb (Toyonaga, et al. J Invest Dermatol. 2017) など多数の mAb を作成しており、真皮細胞上で確認された COL17 がどのようなものか詳細な構造解析が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水疱性類天疱瘡 (BP) の紅斑形成に抗 COL17-IgE 自己抗体の関与および COL17 の切断・局在変化の関与を解明することである。最初に、COL17 の各断片特異的な mAb を用い BP 病変部皮膚を解析し、紅斑を伴う BP、紅斑を伴わない BP において各 mAb の染色パターンから BP 患者病変部皮膚における COL17 の構造と局在の違いを明らかにする。次に、臨床症状の異なる BP 患者血中の好塩基球と領域特異的 COL17 タンパク (NC16A) を反応させ、好塩基球の活性化を解析することで、細胞レベルで抗 COL17-IgE が紅斑にどの様に関与するか解明する。更に申請者らが保有する BP モデルマウスを用い、COL17 のプロテアーゼ切断に伴う局在の変化と BP における紅斑形成との関連を解明する。

3. 研究の方法

(1) COL17 リコンビナントタンパクを用いた好塩基球活性化試験による抗 COL17-IgE 自己抗体の検出

好塩基球活性化試験は、IgE 依存型アレルギー反応の臨床症状と一致性が高く、抗原 (アレルゲン) による好塩基球細胞表面の活性化マーカー (CD203c) の変化を、フローサイトメーターによって解析する手法である。IgE 依存型アレルギー反応は、肥満細胞に発現する IgE 受容体に結合している IgE に特異抗原が結合することで肥満細胞が活性化し、細胞内に蓄積するヒスタ

ミンなどを脱顆粒する。BP においては臨床的な紅斑形成に関与していることが推測される。肥満細胞は血液中に存在しないため、その反応を血液検体で調べることはできない。ただし、同様の反応は血中に存在する好塩基球でも生じ、細胞表面上の IgE 自己抗体に特異抗原が結合すると好塩基球の活性化マーカーである CD203c の発現亢進が見られる。そのため好塩基球を標的とすることで抗原特異的 IgE 自己抗体と特異抗原との反応を血液で検査することが可能となる。BP 患者から採血し、好塩基球と COL17 上の NC16A リコンビナントタンパクあるいは COL17 全長タンパクを反応させ、フローサイトメトリーにて好塩基球の活性化マーカーである CD203c の発現を確認することで血中抗 COL17-IgE の有無を評価する。集積した BP 症例を臨床的スコアリングシステムである bullous pemphigoid disease area index (BPDAI, Murrell DF, et al. J Am Acad Dermatol. 2012) に基づいて紅斑や水疱の重症度を点数化する。そして紅斑や水疱の重症度と COL17 特異的な好塩基球の活性化の相関について統計解析する。

(2) BP 患者病変部皮膚における COL17 の構造・局在の相違について蛍光抗体法での解析

COL17 の領域特異的抗体 (細胞内領域認識抗体 (ab1864115)、細胞外領域に位置する主要な病原エピトープである NC16A 領域認識抗体 (TS39-3)、同じく細胞外領域に位置するコラーゲンドメイン 15 認識抗体 (No11)、コラーゲンドメイン 12 認識抗体 (BMM)) を用いて BP 患者病変部皮膚を基質とした蛍光抗体法を行うことで、COL17 の局在およびその構造について評価を行う。

(3) 質量分析法 (Mass spectrometry, MS) を用いたプラスミンによる COL17 切断部位の同定

BP 病変部皮膚での蛍光抗体法による COL17 の局在を評価する上で、COL17 に対するプロテアーゼによる切断部位の同定、特に BP においてはプラスミンにより切断された COL17 の正確な切断部位を把握することが重要である。

プラスミンによる COL17 切断部位を同定するため、まず HEK293 細胞を用いて作成したヒト COL17 全長リコンビナントタンパク (分子量 180kDa) にプラスミンを反応させ、in vitro にてプラスミンによる COL17 の切断を行う。プラスミン切断により生じた 120kDa, 97kDa の COL17 切断片を質量分析法に提出し、COL17 切断部位を同定する。

4. 研究成果

(1) COL17 リコンビナントタンパクを用いた好塩基球活性化試験による抗 COL17-IgE 自己抗体の検出

特異抗原と BP-IgE 自己抗体の結合刺激による好塩基球細胞表面の活性化マーカー (CD203c) の発現量の変化をフローサイトメーターにて定量・解析する好塩基球活性化試験を行った。健康人と比較し、疾患活動期における BP 患者末梢血中の好塩基球では CD203c の有意な発現亢進がみられた。しかし、疾患活動期においては NC16A 領域・COL17 刺激による CD203c の発現亢進は明らかではなかった。

本研究当初は、疾患活動期での BP 患者末梢血好塩基球の CD203c 発現量と臨床的な紅斑が重症な症例にて CD203c の発現が亢進していることが確認され、両者の相関が推察されたが、その後解析のためのサンプル数を増加すると統計学的な有意差は見られなくなった。CD203c の発現量と水疱の重症度についても同様であった。しかし、抗 NC16A 自己抗体価と CD203c の発現量には相関がみられた。

前述の通り、疾患活動期には COL17 刺激による CD203c 発現の亢進は明らかではなかったが、疾患寛解期にある BP 患者の中には COL17 刺激により CD203c 発現の亢進を認める症例を確認し、自己抗原特異的な好塩基球の活性化が BP 患者末梢血中で起こっている可能性が示唆された。

(2) BP 患者病変部皮膚における COL17 の構造・局在の相違について蛍光抗体法での解析

BP の発症と主要な自己抗原である COL17 のプロセッシングとの相関について検討するために健康人皮膚および BP 患者皮膚を基質とし、COL17 の種々のエピトープを認識する抗体を用いて免疫染色を行った。COL17 の検出に際し、細胞内領域認識抗体 (ab1864115)、細胞外領域に位置する主要な病原エピトープである非コラーゲンドメイン 16A 認識抗体 (TS39-3)、同じく細胞外領域に位置するコラーゲンドメイン 15 認識抗体 (No11)、コラーゲンドメイン 12 認識抗体 (BMM) を用いた。健康人皮膚および BP 患者皮膚のいずれにおいても表皮真皮境界部に線状に分布する COL17 を全ての抗体にて検出した。BP 患者病変部皮膚に対し、真皮上層での COL17 分布について検証したところ、ab1864115 では COL17 を検出し得なかった、しかし TS39-3、No11、BMM を用いた際には一部の BP 患者において真皮上層に円形に染色される COL17 の分布を確認した。一方、健康人皮膚においてはいずれの抗体においても真皮上層に COL17 の分布を疑う所見を認めなかった。以上より、BP 患者皮膚と健康人皮膚において COL17 の分布様式に差異がある可能性が示唆された。

(3) 質量分析法 (Mass spectrometry, MS) を用いたプラスミンによる COL17 切断部位の同定

BP 末梢血中を循環する好塩基球が BP-IgE 自己抗体を介して COL17 と結合し、活性化するためには表皮基底細胞にて発現する COL17 がプロテアーゼなどで切断を受け、血管内へ移動する必要がある。BP-IgG 自己抗体が COL17 に結合すると表皮角化細胞からプラスミノージェンアクチベ

ーターが分泌されることが知られており、実際 BP の水疱内容液中にプラスミンや COL17 の切断片が検出される。そのためプラスミンは COL17 の切断に関与するプロテアーゼの一つと考えられている。今回 *in vitro* にて COL17 リコンビナントタンパクをプラスミンと反応して得られた分解産物（120kDa、97kDa）を質量分析法に提出し、その切断部位の同定を試みた。

質量分析法の結果、120kDa、97kDa 分解産物のいずれも COL17 の細胞外領域に位置する NC16A 領域の N 末端側でプラスミンによる切断を受けていることが明らかとなった。

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 Izumi Kentaro, Nishie Wataru, Mai Yosuke, Ujiie Hideyuki, Iwata Hiroaki, Natsuga Ken, Shimizu Hiroshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of dermatological science	6. 最初と最後の頁 247 ~ 248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2017.07.005	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 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Izumi, Wataru Nishie, Yosuke Mai, Mayumi Wada, Ken Natsuga, Hideyuki Ujiie, Hiroaki Iwata, Jun Yamagami, Hiroshi Shimizu
2. 発表標題 Autoantibody profile differentiates between inflammatory and noninflammatory bullous pemphigoid
3. 学会等名 The 42nd annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----