

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08286

研究課題名（和文）230kDa類天疱瘡抗原1の接着因子としての機能解析と免疫原性獲得機序の究明

研究課題名（英文）Functional analyses of 230-kDa bullous pemphigoid antigen 1 as cell adhesion molecules and immunogenic epitopes

研究代表者

会津 隆幸（Aizu, Takayuki）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00400135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：水疱性類天疱瘡は、表皮細胞ヘミデスモゾームに対する自己免疫性水疱症である。主要免疫原であるBP180のNC16Aの他に、BP230に対する自己抗体が認識されることがある。しかし、その詳細な作用機序は不明である。本研究では、BP230欠損マウスを用い、BP230タンパクの創傷治癒過程における役割を解析した。また、抗BP230抗体を作成、皮膚において表皮下水疱形成の働きがあることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BP230を標的とした表皮水疱症の疾患モデルマウスは存在せず、皮膚ヘミデスモゾームにおけるBP230の役割を明らかにすることができ、また水疱性類天疱瘡の発症機序とその病態を解明することができた。既存の治療に難渋するBP患者への新規治療法確立への道標となりうる。

研究成果の概要（英文）：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering disease that targets the hemidesmosome, containing BP180 and BP230 protein. Whereas the role of anti-BP180 antibodies has been characterized, the pathogenicity of anti-BP230 antibodies remains unclear. In this study, we analyzed the effect of BP230 protein on wound-healing using BP230-knockout mice. Furthermore, we confirmed that anti-BP230 antibodies generated subepidermal blisters in the murine skin.

研究分野：皮膚科

キーワード：水疱性類天疱瘡 BP230 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

ヒトの最外層に位置する皮膚は、表皮細胞がお互いに接着して何層にもなる重層上皮を構成し、外的刺激の侵入を防いでいる。また表皮下端は、複数のタンパクから構成されているヘミデスモゾーム (HD) で真皮と接着し、皮膚の恒常性を保っている。その HD に機能不全が生じると先天性表皮水疱症が発症し、また構成タンパクに自己免疫が働くと、後天性表皮水疱症や水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid: BP) が発症する。BP は、高齢者に多く発症する自己免疫性疾患で、HD 構成タンパクである BP180 タンパクの NC16A 領域に対する自己抗体が多くの患者で証明されている。一方、BP180 以外のタンパクに対しても自己抗体を有し、また時として BP180 に対する抗体を持たず BP230 (bullous pemphigoid antigen-1:BPAG1) に対応する自己抗体を産生することもある。BP230 の遺伝子は、複数の isotype タンパクをコードしている。isotype-a (BPAG1-a) は主に神経、isotype-b (BPAG1-b) は筋組織、isotype-e (BPAG1-e) は BP230 であり、表皮細胞の HD で発現している。BP230 欠損マウスの作成を試みると、他の isotype タンパクにも影響が及び、不随運動であるジストニア症状が現れ数週間でそのノックアウト (knockout:KO) マウスは亡くなり、研究に支障が生じる。そこで、表皮基底細胞でのみ発現するリコンビナーゼである Cre を発現させ、表皮細胞でのみ BPAG1 遺伝子を KO するマウス (BP230-KO マウス) を作成した。BP230-KO マウスは生下時には異常が見られず、生後 10 週あたりから耳介のびらん、炎症が出現、徐々に瘢痕形成が顕著になる。BP230 欠損における HD の崩壊による表皮下水疱、瘢痕治癒の繰り返しによる変化、もしくは表皮の基盤である HD の脆弱性による表皮細胞間の解離、外的刺激の侵入による炎症反応の可能性が考えられる。そこで申請者らは、この BP230-KO マウスを用いて表皮水疱症の発生、ならびに引き起こされる炎症、アレルギー反応の機序を解明するとともに、抗 BP230 抗体の BP 発症に関わる役割についても究明する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HD の脆弱性をもたらす皮膚バリアの破綻、炎症発症のメカニズムを解明するとともに、BP 発症における抗 BP230 抗体の発現機序、水疱形成への関わりを解明することである。BPAG1-e (BP230) を標的とした表皮水疱症の疾患モデルマウスは存在せず、世界に先駆けて HD における BP230 の役割を明らかにすることができ、また BP の発症機序とその病態を解明することができる。既存の治療に難渋する BP 患者への新規治療法確立への道標となりうる斬新な研究テーマである。

3. 研究の方法

(1) BP230 タンパク欠損による表皮水疱症発症の疾患モデルマウスの確立

表皮基底細胞でのみ Cre を発現する K5-Cre マウスと BP230 conditional マウスと交配を繰り返し、表皮基底細胞でのみ BP230 を KO するマウス (BP230-KO) を作成。

BP230-KO マウス背部皮膚を採取、蛍光直接法で基底膜部の BP230 タンパク欠損を確認。

皮膚から表皮のみを回収、ウエスタンブロット法でも BP230 タンパク欠損を証明。

BP230-KO マウスを経時的に観察、びらん、紅斑発症時期を統計学的に集計する。

紅斑、びらん面を皮膚生検、光学顕微鏡下で表皮水疱症と同様の所見の有無を確認。

(2) 表皮細胞遊走能の変化ならびに創傷治癒への影響

BP230-KO マウス由来表皮細胞を培養し、その遊走能をタイムラプスで撮影、正常表皮細胞と比較、検討。

直接蛍光抗体法で、BP180 など HD 構成タンパクの発現ならびにその局在を確認。

BP230-KO マウス背部皮膚に人工的 6mm の皮膚欠損を作成、上皮化まで経時的観察。

適宜皮膚生検を行い、潰瘍底の伸長する表皮細胞の HD 構成タンパクの発現を免疫組織化学染色で確認。

(3) BP230 タンパクを標的とした BP 発症モデルマウスの作成

マウス BP230 タンパクをコードするエクソン 24 をクローニング、タンパク発現ベクターを作成、大腸菌に形質転換させ、そのタンパクを回収。

BP230-KO マウス皮内に 2 週に 1 回投与、8 週後に抗血清を回収。

ELISA 法でそのタンパクに対する抗体産生を確認。

C57BL/6 マウス背部皮膚に抗血清を投与、後日皮膚生検を施行、直接蛍光抗体法で表皮基底膜に抗体、補体の沈着を確認。

4. 研究成果

(1) BP230 タンパク欠損による表皮水疱症発症の疾患モデルマウスの確立

マウスの全組織で BP230 を KO したところ、生後 2 週あたりからジストニア症状が出現し、短命

であった(図1)。

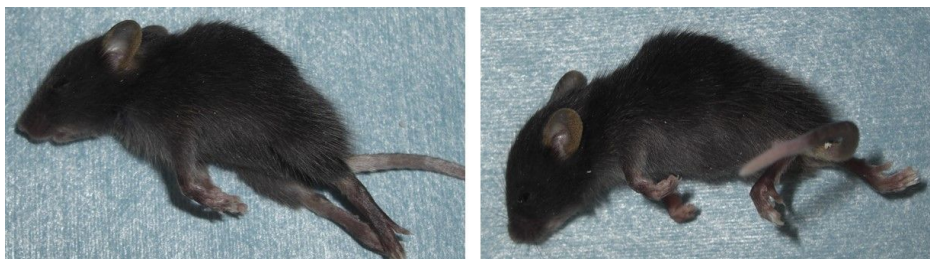
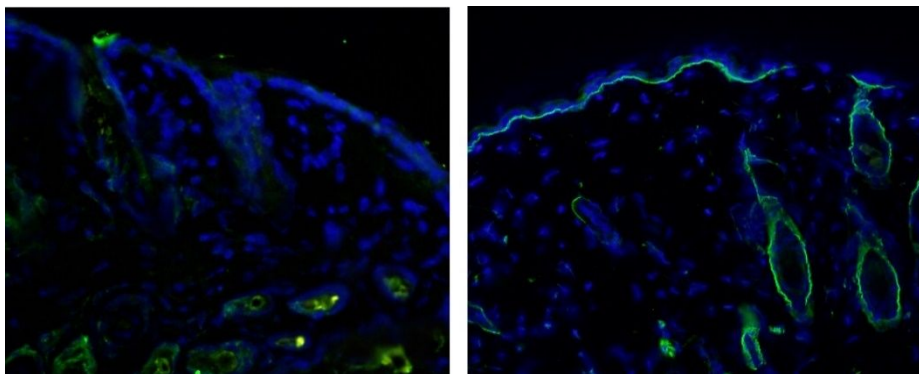


図1

そこで、皮膚のみでBP230を欠損するKOマウスを作成したところ、ジストニア症状は出ず長期生存可能となった。マウス背部皮膚、抗BP230抗体を用いて蛍光抗体法を行ったところ、本来あるべき表皮真皮境界部の染色性は消失しており、表皮細胞におけるBP230タンパク発現の欠損を確認した(図2)。

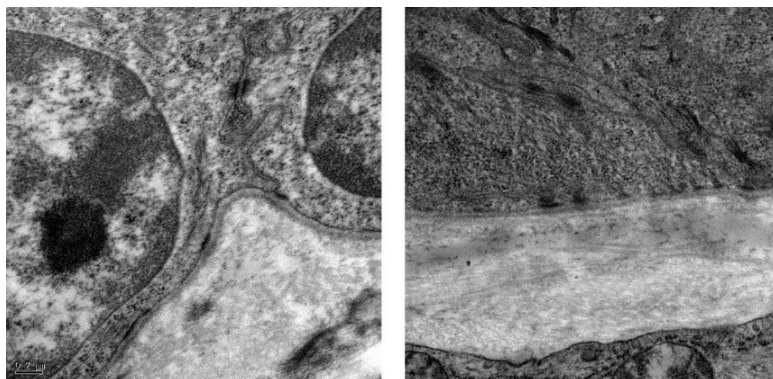


BP230-KO

正常マウス

図2

BP230-KOマウスの背部皮膚を光学顕微鏡で確認したところ、明らかな表皮下水疱、裂隙は観察できなかった。一方、電子顕微鏡で観察したところ、ヘミデスモゾーム構造で見られるinner plaqueの消失を確認した(図3)。BP230-KOマウスの背部皮膚におけるデスモゾーム構造には明らかな変化は認められなかった。



BP230-KO

正常マウス

図3

(2) 表皮細胞遊走能の変化ならびに創傷治癒への影響

BP230-KOマウス由来培養表皮細胞が、正常表皮細胞より高い遊走能を有していることを確認した(図4)。

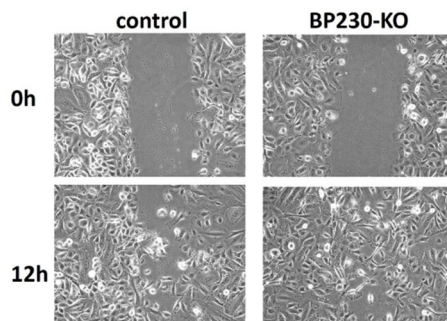
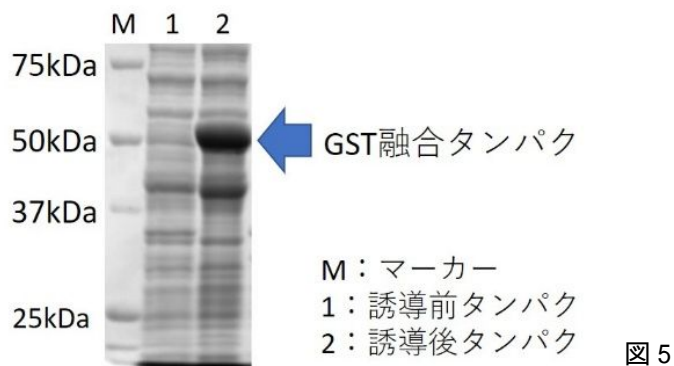


図4

そこで、BP230-K0 マウス背部皮膚に人工的に 6mm の皮膚欠損を作成、上皮化までの過程を経時的に観察したが、正常マウスとの比較で有意な差は観察できなかった。また、タンパク発現に関しても差異を認めなかった。

(3) BP230 タンパクを標的とした BP 発症モデルマウスの作成

マウス BP230 タンパクをコードしているエクソン 24 をクローニング、タンパク発現ベクターを作成、大腸菌に形質転換させ、そのタンパクを回収した (図 5)。



精製したリコンビナントタンパクを、BP230-K0 マウス皮内に 2 週に 1 回投与、8 週後に抗血清を回収、ELISA 法で抗体産生を確認した。

その抗血清を正常マウスに投与したところ、表皮下水疱とともに表皮下に IgG の沈着が確認された (図 6)。

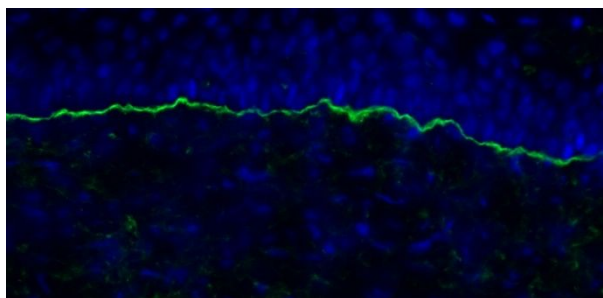


図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuzaki Y, Minakawa S, Sagara C, Takiyoshi N, Nakano H, Sawamura D.	4. 巻 28
2. 論文標題 Spontaneous remission of methotrexate-associated lymphoproliferative disorder with Epstein-Barr virus type II latency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Dermatol	6. 最初と最後の頁 693 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2018.3372	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 -
1. 著者名 Matsuzaki Yasushi, Takahashi Mika, Minakawa Satoko, Jin Kayo, Nakano Hajime, Sawamura Daisuke	4. 巻 57
2. 論文標題 Cutaneous collagenous vasculopathy induced by the vascular endothelial growth factor receptor inhibitor axitinib	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e167 ~ e169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijd.14243	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 -
1. 著者名 Jin Kayo, Matsuzaki Yasushi, Akasaka Eijiro, Fukui Tomohisa, Sagara Chihiro, Nakano Hajime, Sawamura Daisuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Irreversible bilateral cyanosis of the hands caused by hypothenar hammer syndrome with systemic sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2018.3311	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 -
1. 著者名 Minakawa Satoko, Matsuzaki Yasushi, Terui Kiminori, Kayaba Hiroyuki, Sawamura Daisuke	4. 巻 45
2. 論文標題 Tuberculous granuloma developed 9 years after bacillus Calmette-Guérin vaccination in a patient with immunodeficiency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e293 ~ e295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14468	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 -

1. 著者名 Nishikawa Yohei, Matsuzaki Yasushi, Kimura Kazuyuki, Rokunohe Akiko, Nakano Hajime, Sawamura Daisuke	4. 巻 56
2. 論文標題 Modulation of Stimulator of Interferon Genes (STING) Expression by Interferon- in Human Keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Genetics	6. 最初と最後の頁 93 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10528-017-9832-7	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 -

1. 著者名 Matsui Akinobu, Akasaka Eijiro, Rokunohe Daiki, Matsuzaki Yasushi, Sawamura Daisuke, Nakano Hajime	4. 巻 93
2. 論文標題 The first Japanese case of familial porphyria cutanea tarda diagnosed by a UROD mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 65 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.11.004	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 -

1. 著者名 Minakawa Satoko, Matsuzaki Yasushi, Hashimoto Takashi, Ishii Norito, Nishie Wataru, Kayaba Hiroyuki, Sawamura Daisuke	4. 巻 47
2. 論文標題 Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor associated anti laminin 1 (p200) pemphigoid in a patient with psoriasis vulgaris	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e25-e26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minakawa Satoko, Matsuzaki Yasushi, Yamaguchi Sayaka, Takahashi Kenzo, Kayaba Hiroyuki, Sawamura Daisuke	4. 巻 46
2. 論文標題 Pediculus humanus capitis: Pyrethroid resistance and utility of scanning electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e418-e419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minakawa Satoko, Matsuzaki Yasushi, Nakagawa Kouichi, Kaneko Takahide, Akasaka Eijiro, Nomura Kazuo, Sawamura Daisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Two cases of ichthyosis and their EPR analyses of stratum corneum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cutaneous Immunology and Allergy	6. 最初と最後の頁 84-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cia2.12057	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 -

1. 著者名 Takahashi Mika, Matsuzaki Yasushi, Nakano Hajime, Sawamura Daisuke	4. 巻 47
2. 論文標題 Partial spontaneous regression of pediatric large fibroblastic connective tissue nevus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e232 ~ e234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15320	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 -

1. 著者名 Murakami Manabu, Toyama Yuichi, Yonekura Manabu, Ohba Takayoshi, Matsuzaki Yasushi, Sawamura Daisuke, Murakami Agnieszka M., Nishi Miyuki, Itagaki Shirou, Tomita Hirofumi, Takeshima Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Decreased cardiac pacemaking and attenuated α -adrenergic response in TRIC-A knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244254	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 -

1. 著者名 Fukui Tomohisa, Akasaka Eijiro, Rokunohe Daiki, Matsuzaki Yasushi, Sawamura Daisuke, Kabashima Kenji, Nakano Hajime	4. 巻 100
2. 論文標題 Analysis of the mechanism underlying a mild phenotype of hereditary coproporphyrria due to a homozygous missense mutation in the transcription initiation codon of the coproporphyrinogen III oxidase gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 156 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.06.006	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 -

1. 著者名 Nakaminami Hidemasa, Ozawa Kazuya, Sasai Nao, Ikeda Masami, Nemoto Osamu, Baba Naoko, Matsuzaki Yasushi, Sawamura Daisuke, Shimoe Fumiko, Inaba Yoichi, Kobayashi Yoko, Kawasaki Satoru, Ueki Toru, Funatsu Sakae, Shirahama Shigeho, Noguchi Norihisa	4. 巻 47
2. 論文標題 Current status of Pantone? Valentine leukocidin positive methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from patients with skin and soft tissue infections in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1280 ~ 1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15506	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 会津隆幸、滝吉典子、原 憲司、是川あゆ美、金子高英、中野 創、澤村大輔、櫻庭裕丈
2. 発表標題 ニボルマブ+イビリムマブ併用療法により小腸炎を生じた肛門部悪性黒色腫
3. 学会等名 第35回日本皮膚悪 性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島康爾、澤村大輔、福井智久、相樂千尋、会津隆幸、中野 創
2. 発表標題 爪下有棘細胞癌
3. 学会等名 第35回日本 皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子高英、福井智久、相樂千尋、滝吉典子、六戸大樹、会津隆幸、澤村大輔、須賀 康
2. 発表標題 Dabrafenib+Trametinib併用療法によって生じた発熱性好中球減少症
3. 学会等名 第35回日本 皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 会津 隆幸、是川あゆ美、原 憲司、滝吉典子、金子高英、中野 創、澤村大輔、高畑淳子
2. 発表標題 ニボルマブ+イピリムマブ併用療法中に唾液量の低下をきたした悪性黒色腫
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相樂千尋、会津隆幸、中野 創、澤村大輔
2. 発表標題 白色海綿状母斑の1例
3. 学会等名 日本皮膚科学会東北六県合同学術大会第386回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相樂千尋、会津隆幸、中野 創、澤村大輔
2. 発表標題 白色海綿状母斑の1例
3. 学会等名 第34回角化症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川未雪、相樂千尋、福士花恋、会津隆幸、中野 創、澤村大輔、山形和史
2. 発表標題 ランダム皮膚生検が診断に有用であったintravascular large B-cell lymphoma
3. 学会等名 日本皮膚科学会青森地方会第387回例会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	松崎 康司 (Matsuzaki Yasushi) (50322946)	弘前大学・医学部附属病院・講師 (11101)	

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
---------	---------