

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08305

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡における炎症誘起機序の解明と新たな治療法の開発応用

研究課題名(英文) Development of the new treatment method by elucidating pathomechanism related to inflammation in bullous pemphigoid

研究代表者

鶴田 大輔 (Tsuruta, Daisuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90382043

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)：BP-IgG誘導性サイトカイン放出についてELISA法で調べたところ、0.06 mMのカルシウム含有培地で培養したケラチノサイトでは、normal-IgG投与下に比較してBP-IgG投与下のケラチノサイト培地ではIL-8及びGM-CSFのタンパク量が増加していた。mRNAについてはRNAシーケンスを行ったところ、0.06 mMカルシウム含有培地で、BP-IgG刺激後にIL-6とGM-CSFのmRNA発現が増加していた一方、1.8 mMカルシウム含有培地では、認めなかった。IL-8のmRNAは、いずれのカルシウム濃度でもmRNA発現の増加は認めなかった。今後は、このメカニズム解明の予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも水疱性類天疱瘡発症でのIL-6、IL-8などの関与は断片的に知られていたが、今回、ELISA法のみならずRNAシーケンスで網羅的に調べたことにより、新たにGM-CSFの関与についても調べる必要性があることがわかった。残念ながら、これらの放出を引き起こす、シグナル分子の解明には至らなかったものの、手法を検討して今後明らかにしていきたい。これらを解明することに難病指定されている水疱性類天疱瘡の新規治療法の解明の端緒となる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：The ELISA assay for BP-IgG-induced cytokine release showed that the protein levels of IL-8 and GM-CSF were increased in keratinocytes cultured in 0.06 mM calcium-containing medium under BP-IgG treatment compared to normal-IgG treatment. RNA sequencing for mRNA showed that IL-6 and GM-CSF mRNA expression was increased after BP-IgG stimulation in 0.06 mM calcium-containing medium, but not in 1.8 mM calcium-containing medium. mRNA for IL-8 was not increased at any calcium concentration. We plan to elucidate this mechanism in the future.

研究分野：自己免疫性水疱症

キーワード：類天疱瘡 発症機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (BP) は自己免疫性水疱症であり、厚生労働省難病指定疾患である。BP の自己抗体 (BP-IgG) のターゲットは、ヘミデスモソーム分子 BP180 と BP230 が知られ、中でも BP180 が主要抗原であることが知られている。BP の臨床的特徴としては、**多発する水疱と強い痒みをともなう炎症性紅斑の 2 つがある**。BP における**水疱発症機序**の解明は下記のように進んできた。まず、Liu らは、マウスに抗 BP180 抗体を投与する実験的 BP モデルを構築し (Liu et al. J. Clin. Invest., 1993)、さらに補体 C5 欠損マウスで同様の処理を行った場合に水疱が形成しないことを確認し、補体活性化を介した水疱形成機序 (補体経路) を提唱した (Liu et al. J. Clin. Invest., 1995)。一方で、補体の関与しない水疱形成機序 (非補体経路) もわれわれを含む複数のグループから証明されてきた。例えば、Kitajima らは、BP 患者組織で BP180 の内包化がみられること (Kitajima et al. Br. J. Dermatol., 1998) を示した。また、補体や好中球が無い in vitro 培養ケラチノサイトに BP-IgG を投与すると Iwata らは、ケラチノサイトとディッシュの接着力が低下すること (Iwata et al. J. Invest. Dermatol., 2009)、われわれはケラチノサイトの遊走促進が見られることを示した (Ozawa et al. J. Invest. Dermatol., 2010)。またわれわれは、GFP-BP180 を培養ケラチノサイトに遺伝子導入後、**BP-IgG を投与すると、ケラチノサイト細胞内への BP180 のマクロピノサイトーシスによる内包化が生じることを世界に先駆けて示した** (図 1) (Hiroyasu et al. Am. J. Pathol., 2013)。さらに、BP 類縁疾患でも患者由来 IgG により BP180 内包化が生じることも明らかにした (Naruse et al. Med. Mol. Morph., 2016)。これらの研究成果に引き続き、BP-IgG により細胞内に内包化された BP180 がユビキチン化され、おそらくプロテアソームにより分解される結果 (直接は示されていない) ケラチノサイトの接着力の低下が起こるのではないかと別のグループから提唱された (Ujiie et al. J. Immunol., 2013)。

一方で、BP 患者の水疱内容液や血液中にさまざまな炎症性サイトカインが生じることは知られているものの、BP の炎症性紅斑形成メカニズムの解明は遅れている。断片的なものとして、例えば、BP 患者血清には IgE 型 BP 抗体 (BP-IgE) が存在し、BP-IgE 抗体価と好酸球数・病勢との一致 (Ma et al. J. Dermatol. Sci., 2015)、CD69, CD11b, CCL26 などの好酸球活性化マーカーや IL-6, 8, 1 などの水疱内と血中での発現上昇 (Engmann et al. Acta Derm. Venereol., 2016)、BP 患者組織での Th17 細胞数の上昇 (Arakawa et al. Exp. Dermatol., 2011)、肥満細胞の脱顆粒 (Heimbach et al. J. Biol. Chem., 2011) などは知られているが、**炎症性紅斑の統合的な発症メカニズムの解明は行われていない**。

2. 研究の目的

先述のように、BP 患者の水疱や血液中でサイトカイン産生が亢進していることから、**サイトカイン産生に重要な働きを持つことが知られている炎症系 Pathway、特にその代表的なものである NF-kB の関与、また、それに重要な制御を果たすことが知られているユビキチン化機構を含む機構を解明することを目的とする。BP-IgG 結合後の BP180 内包化とそれに続くユビキチン化が NF-kB の活性化を通して炎症機転に関与する可能性は高いとの仮説を立てるに至った。しかしながら、その後の研究手法の発展に伴い、これらも含む Pathway を網羅的に解析することも可能となってきたので、そこにも挑戦することとした。**

3. 研究の方法

(1) 4 mg/mL の水疱性類天疱瘡患者血清抽出 IgG (BP-IgG) または PBS を、1.8 mM の

カルシウム含有培地で培養した初代培養ケラチノサイトに投与し、16 時間後の培地中のサイトカイン濃度を Proteome profiler cytokine antibody array kit®を用いて比較した。

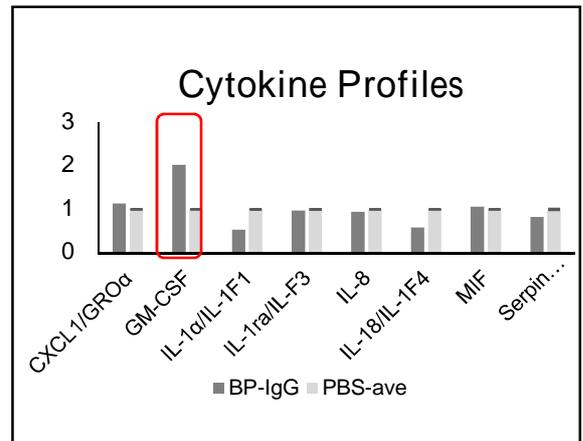
(2) 4 mg/mL の BP-IgG または normal-IgG を、1.8 mM または 0.06 mM のカルシウム含有培地で培養した初代培養ケラチノサイトに投与し、16 時間後の培地中の IL-6, IL-8, GM-CSF の濃度を ELISA を用いて定量化した。

(3) 4 mg/mL の BP-IgG または normal-IgG を、1.8 mM または 0.06 mM のカルシウム含有培地で培養した初代培養ケラチノサイトに投与し、16 時間後のメッセンジャーRNA 発現を、RNA シーケンスを用いて解析した。

4 . 研究成果

(1) BP-IgG 誘導性サイトカイン放出のスクリーニング

1.8 mM カルシウム含有培地下で BP-IgG 誘導性に放出されたサイトカインを同定するため、Proteome profiler cytokine antibody array kit®を用いて BP-IgG 刺激と PBS 刺激下の初代培養ケラチノサイトの培地中のサイトカインを比較した。GM-CSF の増加を認めた (図 1)。



(2) BP-IgG 誘導性サイトカインの定量化

BP-IgG 誘導性に放出された IL-8 と GM-CSF を定量化するため、1.8 mM または 0.06 mM カルシウム含有培地で培養した初代培養ケラチノサイトで、BP-IgG 刺激後の培地及び normal-IgG 刺激後の培地を、IL-8 及び GM-CSF の ELISA で解析した。図 2 に示すように、1.8 mM カルシウム含有培地で培養されたケラチノサイトでは両条件下で IL-8 及び GM-CSF の放出量に差がなかった。一方、0.06 mM のカルシウム含有培地で培養したケラチノサイトでは、normal-IgG 投与下に比較して BP-IgG

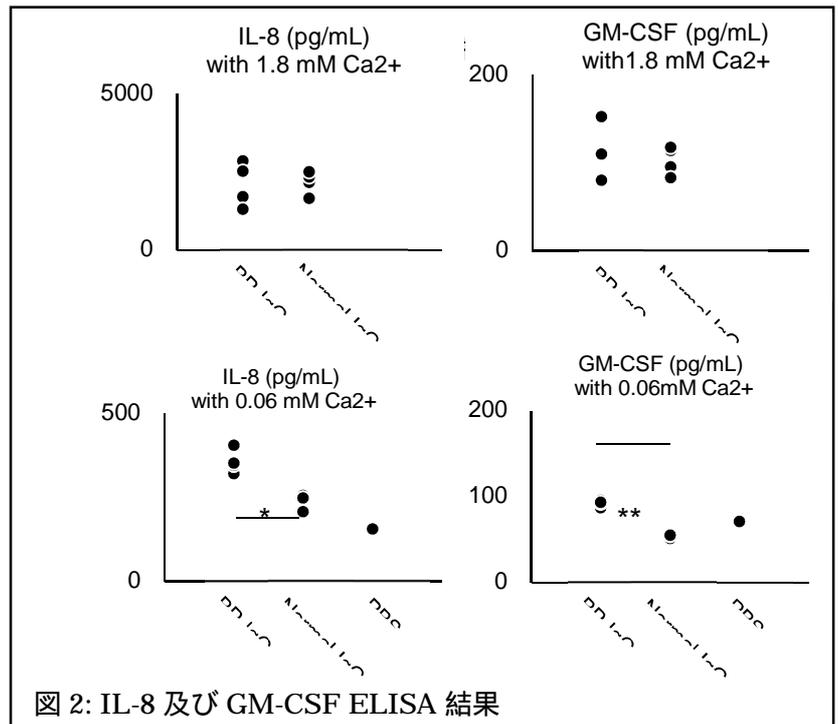


図 2: IL-8 及び GM-CSF ELISA 結果

投与下のケラチノサイト培地では IL-8 及び GM-CSF のタンパク量が增加していた。

(3) BP-IgG 誘導性トランスクリプトーム解析

BP-IgG 投与下の mRNA 発現を網羅的に検索するため、BP-IgG 刺激と normal-IgG 刺激下の培養ケラチノサイトの RNA シークエンスを行った。培養条件は 0.06 mM または 1.8 mM のカルシウム含有培地を用い、計 4 種類の条件を用いた。図 3 に示すように、それぞれに特徴的な遺伝子発現を認めた。0.06 mM カルシウム含有培地を用いた培養条件では、BP-IgG 刺激後に IL-6 と GM-CSF の mRNA 発現が増加していた。一方、1.8 mM カルシウム含有培地を用いた培養条件

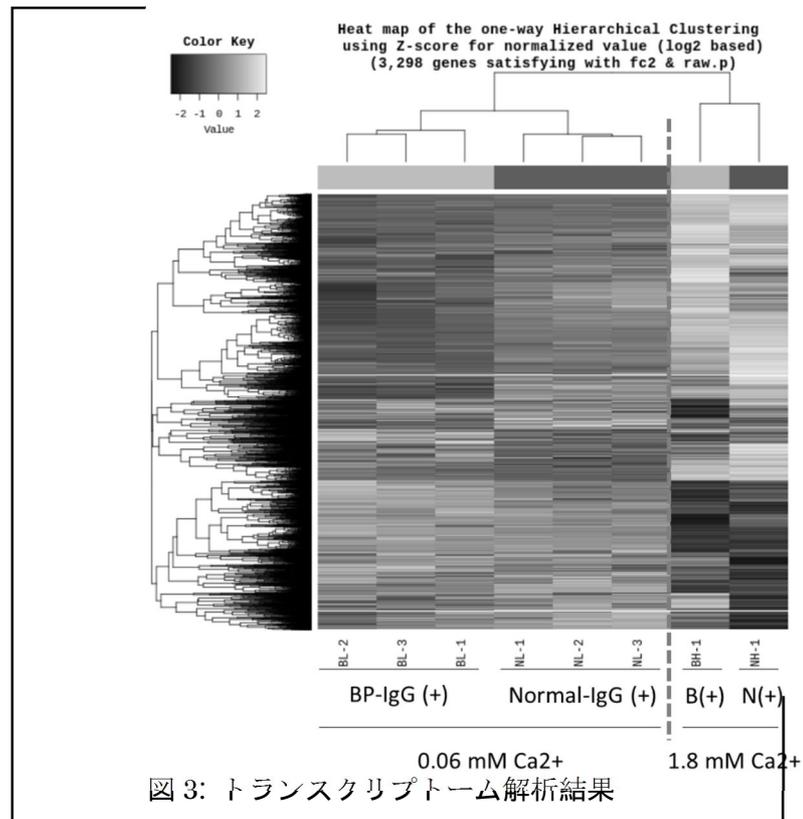


図 3: トランスクリプトーム解析結果

件では、BP-IgG 刺激後に IL-6 と GM-CSF の mRNA 発現の増加は認めなかった。IL-8 の mRNA は、いずれのカルシウム濃度でも mRNA 発現の増加は認めなかった。今後、BP-IgG 誘導性の IL-6 と GM-CSF の上流分子を同定するために、IL-6 と GM-CSF の mRNA 発現パターンと同様の挙動を示す遺伝子を阻害し、BP-IgG 誘導性の IL-6 及び GM-CSF の増加が阻害されるかを検証する予定である。

発表論文等

学会発表

廣保翔、廣保葵、鶴田大輔

BP-IgG 刺激に伴う角化細胞のサイトカイン発現の比較

第 86 回日本皮膚科学会東部支部学術大会

2022 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣保 翔
2. 発表標題 BP-IgG刺激に伴う角化細胞のサイトカイン発現の比較
3. 学会等名 第86回日本皮膚科学会東部支部学術大会
4. 発表年 2022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	徳永 文稔 (Tokunaga Fuminori) (00212069)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	

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