

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08316

研究課題名（和文）新規水疱性類天疱瘡モデルマウスを用いた抗BP230自己抗体の解析

研究課題名（英文）Analysis of BP230 autoantibodies using a novel mouse model of bullous pemphigoid

研究代表者

澤村 大輔（SAWAMURA, Daisuke）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60196334

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）：水疱性類天疱瘡において、細胞内蛋白であるBP230が自己抗原となる機序は解明されていない。申請者は、新しいBP230水疱性類天疱瘡モデルマウスの作成に成功した。そのモデルマウスを用いて、自己抗体の詳細な解析や類天疱瘡の病態解明を行うことが、本研究の目的であった。本研究では、そのモデルマウスにおけるBP230に対する自己抗体の病原性やエピトープの検討、いろいろなペプチドで免疫した時の病変の出現の有無、動物モデルを用いた水疱性類天疱瘡の治療実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

比較的頻度の高い抗BP180自己抗体を有する水疱性類天疱瘡は、その発症機構について詳細に検討され明らかにされてきた。それに比較して、抗BP230自己抗体を有する水疱性類天疱瘡は、頻度は低く、その臨床的特徴から最近注目され、その発症機構の解明が急がれている。今回我々が行った本研究により、抗BP230自己抗体の本質が明らかとなり、抗BP230型の本症の臨床的な特徴、またどのような治療が適するのか、など皮膚科の臨床に直結する卓越した結果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In bullous pemphigoid, mechanism where cytoplasmic protein BP230 become autoantigen is unknown. We succeeded in generation of a new BP230 model mouse. The purposes of this study were detailed analysis of autoantibodies and elucidation of pathogenesis of bullous pemphigoid. In this study, we examined pathogenicity and epitope of BP230 antibodies, investigated skin lesions after immunization of different peptides, and evaluated several therapies using the model mouse.

研究分野：皮膚科学

キーワード：類天疱瘡 自己抗体 自己免疫性疾患 基底膜 自己抗体 水疱 高齢者 皮膚

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡は、高齢者に高発する最も頻度の高い自己免疫性水疱症であり、全身に表皮下水疱が多発する重篤な疾患である。本症患者には、皮膚の基底膜を認識する抗基底膜抗体が存在する。その自己抗体が認識する基底膜蛋白は、BP180 と BP230 である。抗体分子は細胞膜を簡単に通過できないので、基底細胞の膜貫通蛋白である BP180 が自己抗原となることは理解しやすく、実際に多くの患者で、自己抗体は膜貫通部分に近い NC16A ドメインを認識している。さらに、動物モデルを用いた研究で、BP180 を認識する自己抗体が病態に密接に関与していることが示されている。それに比較して、細胞内蛋白 BP230 に対する抗体に関しては、本症の病態に直接関与するのかは明らかではない。我々のグループは表皮のみで Bp230 が欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。次に、神経・筋にはなく表皮特有のドメインペプチドである、BP230 の C 末端リコンビナントペプチドで免疫した後に、リンパ球を免疫不全マウス (Rag2^{-/-}) に移植した。その結果、2 週間後からびらんや水疱を発症し、免疫学的解析で BP230 への自己抗体を検出し、水疱性類天疱瘡の新規モデルマウスの作成に成功している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、今回の水疱性類天疱瘡モデルを用いて、抗 BP230 自己抗体の詳細な解析や BP230 抗体を有する類天疱瘡の病態解明を行うことである。本研究により、抗 BP230 自己抗体の本質が明らかとなり、本自己抗体の BP230 のどのドメインを標的とするものが高い病原性を持つのか、抗 BP230 型の本症の臨床的な特徴またどのような治療が適するのか、など、皮膚科の臨床に直結する卓越した結果が期待できる。さらに注目される点は、自己抗原が細胞内にあることであり、細胞内に自己抗原を持つ病態不明の自己免疫性疾患も多くあり、それらの疾患の病態解明への学術的な波及性もあると確信する。

3. 研究の方法

本モデルマウスにおける BP230 に対する自己抗体の病原性やエピトープの検討：今回の Bp230 が欠損するコンディショナルノックアウトマウスに、BP230 の C 末端ペプチドで免疫した後に、リンパ球を免疫不全マウスに移植して作成したモデルマウスの脾細胞を採取する。それらの細胞とマウス骨髄腫細胞株を PEG にて融合し、HAT 培地で選択を行った。限界希釈法と BP230 の C 末端リ

コンビナントペプチドの ELISA を組み合わせて、陽性クローンのクローニングを行った。得られたモノクローナル抗体を新生仔マウスの皮下あるいは腹腔に投与し、病変を誘発の有無を臨床と蛍光抗体にて確認した。

BP230 の異なるペプチドで免疫した時の病変の出現の有無：水疱性類天疱瘡患者にある抗 BP230 抗体のエピトープの解析をおこなうと、BP230 の C 末端に優位に反応するが N 末端や中心部に反応する抗体も存在する。実際に、それらの抗体の病原性を確かめる方法がないので、どの抗体が発症に関与しているのかは不明である。そこで、BP230 のすべての領域を網羅するリコンビナントペプチドで、ノックアウトマウスを免疫し、脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに投与して、病変の有無を確認した。

本動物モデルを用いた水疱性類天疱瘡の治療実験：近年、Hayakawa ら(2016年)は、本症患者 153 例の自己抗体の解析から、41 例が抗 BP180 抗体のみ、67 例が両方の抗体を、47 例が抗 BP230 抗体のみを持つ、と報告した。さらに、抗 BP230 抗体のみの症例は、症状が軽く、各種治療に対する反応もいいとしている。そこで、今回えられたモデルマウスを用いて、ステロイド、IVIg、各種免疫抑制剤の治療効果を検討した。

4. 研究成果

令和 3 から 4 年度は、そのモデルマウスにおける BP230 に対する自己抗体の病原性やエピトープの解析を行った。モデルマウスの脾細胞とマウス骨髄腫細胞株を融合し、ハイブリドーマ陽性クローンを得た。その後、陽性クローンのエピトープの解析をペプチドマイクロアレイ法にて行った。これによって、本症においても陽性クローンが存在することが考察された。さらに、外傷、UVB 照射、接触皮膚炎が、モデルマウス誘発や症状の重症化に関与するかを確かめた。臨床的には本症が外傷、UVB 照射、接触皮膚炎に関与されることが考えられた。

令和 5 年度は、このモデルマウスを用いて、あたらしい治療剤である、抗 IL17 抗体や抗 IL23 抗体の治療効果を検討した。実際に、臨床に用いられている治療法が適切であることが考察された。近年、BP230 遺伝子変異で生ずる単純型表皮水疱症の存在が報告された。そこで、遺伝子編集の技術を用いて単純に、表皮特有ドメインに一致するエクソンに、数塩基を挿入し点変異マウス作成を試みた。まだ明確な症状は得られなかった。さらに研究を進めることを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mai Y, Izumi K, Sawada K, Akasaka E, Mai S, Sawamura D, Ihara K, Nakaji S, Nishie W.	4. 巻 142
2. 論文標題 A 1,035-Subject Study Suggesting a History of Bone Fracture as a Possible Factor Associated with the Development of Anti-BP180 Autoantibodies.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 984-987.e3.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.11.028.	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 Ujiie H, Yamagami J, Takahashi H, Izumi K, Iwata H, Wang G, Sawamura D, Amagai M, Zillikens D.	4. 巻 104
2. 論文標題 The pathogeneses of pemphigus and pemphigoid diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 154-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.11.003.	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 該当する
1. 著者名 Minakawa S, Matsuzaki Y, Hashimoto T, Ishii N, Nishie W, Sawamura D.	4. 巻 29
2. 論文標題 A Case of Possible Concurrence of Dermatitis Herpetiformis and Linear Immunoglobulin A / Immunoglobulin G Bullous Dermatitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Dermatovenerol Croat.	6. 最初と最後の頁 116-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 S, Matsuzaki Y, Hashimoto T, Ishii N, Nishie W, Nakazawa M, Sawamura D.	4. 巻 30
2. 論文標題 A Case of Anti-BP180-type Mucous Membrane Pemphigoid with IgG and IgA Autoantibodies Showing Distinct Reactivities.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Dermatovenerol Croat	6. 最初と最後の頁 54-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kogawa K, Matsuzaki Y, Kimura A, Minakawa S, Nakano H, Ito K, Kijima H, Sawamura D.	4. 巻 108
2. 論文標題 Ultraviolet B irradiation leads to the development of experimental bullous pemphigoid targeting BPAG1e.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 112-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.12.001	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 Mai S, Izumi K, Mai Y, Natsuga K, Ishii N, Sawamura D, Schauer F, Kiritsi D, Nishie W, Ujiie H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Native Autoantigen Complex Detects Pemphigoid Autoantibodies.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JID Innov	6. 最初と最後の頁 100193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xjidi.2023.100193.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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・医学研究科・准教授 (11101)	
研究分担者	中野 創 (NAKANO Hajime) (90281922)	弘前大学・医学研究科・准教授 (11101)	削除：2023年6月28日

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