

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659534

研究課題名(和文) 各種自己抗体を介したラミニン・インテグリン接着機構障害による水疱形成機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms for blister formation via autoantibodies-mediated interference of adhesion system of laminins and integrins

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20129597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：新しいヘミデスモソーム濃縮画分(プレクチン、BP230、BP180、ラミニン332、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ4を豊富に含む)を用いた免疫ブロット法において、眼型粘膜類天疱瘡患者血清はインテグリンベータ4に反応し、さらに、インテグリンベータ4のリコンビナント蛋白にも反応した。また、ラミニン332型粘膜類天疱瘡患者血清はラミニン332の各鎖に反応した。以上から、眼型粘膜類天疱瘡患者血清はインテグリンベータ4に対する自己抗体を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：By novel immunoblotting using newly established hemidesmosome-rich fraction, in which BP230, BP180, laminin 332, integrin alpha 6, integrin beta 4 are concentrated, IgG antibodies in the sera from patients with pure ocular mucous membrane pemphigoid (MMP) reacted specifically with integrin beta 4, as well as recombinant protein of integrin beta 4. IgG antibodies in the sera from patients with anti-laminin 332 MMP reacted with 3 laminin 332 subunits in various patterns. These results indicated that major autoantigen for pure ocular MMP is integrin beta 4. In addition, the novel immunoblotting using newly established hemidesmosome-rich fraction should be a useful tool to detect various autoantigen present at epidermal basement membrane zone, including integrin beta 4 and laminin 332.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：眼型粘膜類天疱瘡 インテグリンベータ4 ヘミデスモソーム

1. 研究開始当初の背景

各種の自己免疫性表皮下水疱症は表皮ケラチノサイトの表皮基底膜部構成蛋白を抗原とする自己免疫疾患である。最も頻度の高い自己免疫性表皮下水疱症である水疱性類天疱瘡は BP180 と BP230 に反応する。また、後天性表皮水疱症は、VII 型コラーゲンが自己抗原である。その他の、多くの粘膜類天疱瘡と線状 IgA 水疱性皮膚症は BP180 に反応する。

これに対して、一部の粘膜類天疱瘡はラミニン 332 に反応することが知られ、また、最近、私共はラミニンガンマ 1 に反応する抗ラミニンガンマ 1 (p 2 0 0) 類天疱瘡の存在を示した。

しかし、上記以外のラミニン鎖や各種のインテグリンに反応する自己抗体については十分な研究がなされていない。

2. 研究の目的

私共は近年、各種のラミニンとインテグリンが新しい自己抗原になりうることを示してきた。特に、ラミニンガンマ 1 が抗ラミニンガンマ 1 (p 2 0 0) 類天疱瘡の自己抗原であることを世界に先駆けて証明し、インテグリンベータ 4 が眼型粘膜類天疱瘡の抗原であることを示してきた。

本研究では、これらの抗体の存在を確認する検査法を確立するとともに、水疱形成機序におけるこれらの自己抗体の病原性を検討する。すなわち、ラミニン・インテグリン結合が自己抗体により直接阻害される可能性を、細胞生物学・生化学的に検討する。この研究は、これらの新しい水疱性皮膚疾患の診断と治療に重要であると同時に、表皮の接着分子の機能の基礎的研究にも寄与するものである。

3. 研究の方法

久留米大学医学部皮膚科学講座には多くの自己免疫性水疱症の血清バンクがあり、抗 p200 類天疱瘡は 100 例以上、眼粘膜類天疱瘡は約 40 例の血清を渉猟している。まず、ヒトケラチノサイト培養細胞から得られた新しいヘミデスモソーム分画を単離する方法を確立する。その後、このヘミデスモソーム分画と患者血清を用いて免疫プロット法などを施行し、多くのラミニン、インテグリンに対するモノクローナル抗体との反応の比較から、抗 p200 類天疱瘡、眼および口腔内粘膜類天疱瘡患者血清が、ラミニンやインテグリンベータ 4 などに特異的に反応することを確認する。

次に、各種のラミニンやインテグリンの各種のリコンビナント蛋白を作製し、そのリコンビナント蛋白を用いた免疫プロット法や ELISA 法を確立する。

さらに、この患者血清および特異ウサギ抗体と培養細胞を用いた *ex vivo* 実験、細胞 dissociation 法などで、各種ラミニン、インテグリンに対する自己抗体の病原性を検討する。さらに、そのリコンビナント蛋白および特異ウサギ抗体を用いたマウスモデルを確立し、その解析から、さらに病態の解明を進める。

4. 研究成果

眼型粘膜類天疱瘡患者血清において、従来の抽出液やリコンビナント蛋白を用いた免疫プロット法では自己抗体を検出することができないことを踏まえ、まずヒトケラチノサイト培養細胞から、基底膜部のみを残す方法を用いて、豊富なヘミデスモソーム蛋白が濃縮している画分の単離法を確立した。この抽出液は、ヘミデスモソーム構成蛋白であるプレクチン、BP230、BP180、ラミニン 332、インテグリンアルファ 6、インテグリンベータ

タ4を豊富に含んでおり、特にインテグリンアルファ6、インテグリンベータ4への反応を確認するのに有用な抽出液である。我々は、患者血清とこの新たな基質を用いて免疫ブロット法を施行し、半数以上の患者血清がインテグリンベータ4に反応することを見いだした。次に、同方法を用いて、眼粘膜類天疱瘡以外の多くの天疱瘡、類天疱瘡群の患者血清を用い免疫ブロット法を行ったが、少数のBP180型粘膜類天疱瘡とラミニン332型粘膜類天疱瘡患者血清を除き、ほぼどの自己免疫性水疱症においてもインテグリンベータ4との反応は見られなかった。

さらに、眼粘膜類天疱瘡患者血清がインテグリンベータ4のどのエピトープと反応しているか確認するため、ヒトケラチノサイト培養細胞由来のインテグリンベータ4細胞内ドメインのリコンビナント蛋白を作製した。この細胞内ドメインのリコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法で、6割以上の患者血清が反応を示したのに対し、追加して行ったインテグリンベータ4細胞外ドメインのリコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法ではほぼ反応は認められなかった。以上から、眼型粘膜類天疱瘡患者血清はインテグリンベータ4の細胞内ドメインに対する自己抗体を有していることが示唆された。以上から、まず、インテグリンベータ4が眼型粘膜類天疱瘡の主要な自己抗原であることを証明した。

次に、多くの抗ラミニン332型粘膜類天疱瘡および抗ラミニンガンマ1(p200)類天疱瘡の血清について、ヘミデスモソーム画分および各種のラミニン鎖特異的リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法を施行した。この研究により、特に、抗ラミニンガンマ1(p200)類天疱瘡の一部が、ラミニンガンマ1に加えて、他のラミニン、特にラミニンアルファ2に効率に反応することを示した。この研究は、ラミニンアルファ2

が自己抗原になりうることを示した初の研究であり、現在、さらに詳細に検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Ludwig RJ, Borradori L, Diaz LA, Hashimoto T, Hertl M, Ibrahim SM, Jonkman MF, Kitajima Y, Murrell DF, Schmidt E, Shimizu H, Stanley JR, Woodley D, Zillikens D: From epidemiology and genetics to diagnostics, outcome measures and novel treatments in autoimmune bullous diseases. *J Invest Dermatol*, 2014 in press (査読有)

2. Tsuchisaka A, Kawano H, Yasukochi A, Teye K, Ishii N, Koga H, Sogame R, Ohzono A, Krol RP, Kawakami T, Furumura M, Ohata C, Li X, Hashimoto T: Immunological and Statistical Studies of Anti-BP180 Antibodies in Paraneoplastic Pemphigus. *J Invest Dermatol*, 2014. (査読有)
doi: 10.1038/jid.2014.151

3. Florea F, Bernards C, Caproni M, Kleindienst J, Hashimoto T, Koch M, Sitaru C: Ex Vivo Pathogenicity of Anti-Laminin gamma1 Autoantibodies. *Am J Pathol* 184(2):494-506, 2014. (査読有)
doi: 10.1016/j.ajpath.2013.10.019

4. Tsuruta D, Dainichi T, Hamada T, Ishii N, Hashimoto T: Molecular diagnosis of autoimmune blistering diseases. *Methods Mol Biol* 961:17-32, 2013. (査読有)

doi: 10.1007/978-1-62703-227-8_2.

5. Sakaguchi M, Bito T, Oda Y, Kikusawa A, Nishigori C, Munetsugu T, Yokozeki H, Itotani Y, Niguma T, Tsuruta D, Tateishi C, Ishii N, Koga H, Hashimoto T: Three Cases of Linear IgA/IgG Bullous Dermatitis Showing IgA and IgG Reactivity With Multiple Antigens, Particularly Laminin-332. *JAMA Dermatol* 149(11):1308-1313, 2013. (査読有)
doi: 10.1001/jamadermatol.2013.5691.

6. Koga H, Ishii N, Dainichi T, Tsuruta D, Hamada T, Ohata C, Karashima T, Furumura M, Hashimoto T: An attempt to develop mouse model for anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol Sci* 70(2):108-115, 2013. (査読有)
doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.001

7. Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Aoyama Y, Kitajima Y, Hashimoto T, Jones JC, Tsuruta D: Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. *Am J Pathol* 182(3):828-840, 2013. (査読有)
doi: 10.1016/j.ajpath.2012.11.029

8. Vafia K, Groth S, Beckmann T, Hirose M, Dworschak J, Recke A, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E: Pathogenicity of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *PLoS One* 7(7):e41769, 2012. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0041769

9. Hashimoto T, Ishii N, Ohata C, Furumura M: Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease. *J Pathol* 228(1):1-7, 2012.

(査読有)

doi: 10.1002/path.4062.

10. Di Zenzo G, Di Lullo G, Corti D, Calabresi V, Sinistro A, Vanzetta F, Didona B, Cianchini G, Hertl M, Eming R, Amagai M, Ohyama B, Hashimoto T, Sloostra J, Sallusto F, Zambruno G, Lanzavecchia A: Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *J Clin Invest* 122(10):3781-3790, 2012. (査読有)
doi: 10.1172/JCI64413

[学会発表](計7件)

1. Hashimoto T: Identification of novel autoantigens and new classification in autoimmune bullous diseases. The 30-year Anniversary Symposium of Department of Dermatology, Gangnam Severance Hospital (Aug.30-Sep.1, 2013.Korea)

2. Hashimoto T: Identification of autoantigens and development of modern serological diagnostics for various autoimmune blistering skin diseases (poster).
78th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology Immunity & Tolerance (May 29-June 3, 2013.NY)

3. Hashimoto T, Ishii N, Tsuchisaka A, Natsuaki Y, Teye K, Numata S: New classification of autoimmune bullous diseases. *Takashi Hashimoto (Japan)* International preIID 2013 Satellite Meeting on Autoimmune Bullous Diseases (AIBD) (May5-13, 2013. Lubeck)

4. Hayakawa T, Hirako Y, Teye K, Hamada T,

Ishii N, Furumura M, Tsuruta D, Tateishi C, Shinkuma S, Shimizu H, Fukano H, Shimozato K, Owaribe K, Hashimoto T: Isolation of mouse monoclonal antibodies reactive with maturation-related unique epitope(s) on human type VII collagen. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (December 7-9, 2012. Okinawa)

5. Tsuchisaka A, Ishii N, Koga H, Hamada T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T: An attempt to identify antigen for IgA pemphigus accidentally showed the presence of transmembrane secretory component in keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (December 7-9, 2012, Okinawa)

6. Teye K, Ishii N, Koga H, Hamada T, Karashima T, Numata S, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T: Newly developed IgA ELISAs of eukaryotic recombinant proteins of desmogleins 1-3 are more sensitive and specific than baculoprotein ELISAs. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (December 7-9, 2012. Okinawa)

7. Ohata C, Koga H, Ohyama B, Ishii N, Hamada T, Furumura M, Hashimoto T: Molecular studies of six pemphigus vulgaris cases in remission stage showed paradoxical changes of high titer anti-desmoglein 3 antibodies. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (December 7-9, 2012. Okinawa)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO, Takashi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20129597

(2) 研究分担者

濱田 尚宏 (HAMADA, Takahiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40320204

石井 文人 (ISHII, Norito)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：80330827

土坂 享成 (TSUCHISAKA, Atsunari)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：50599313

テイエ クエシ (TEYE, Kwesi)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：30599303