

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791185

研究課題名(和文)EBA患者100例の臨床像と自己抗体の抗原エピトープの関連性の検討

研究課題名(英文)The epidemiological and clinical aspects of 100 cases of EBA and their relevance to antigen epitopes recognized by autoantibodies

研究代表者

大塚 明奈 (OTSUKA, Haruna)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80569369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：後天性表皮水疱症(EBA)患者100例以上の血清学的な診断結果を解析し、エンボプラキンやデスモコリン、7型コラーゲンのNC1/2ドメインなどの免疫プロットを用いて、病因抗原の種類と組織分布の結果と臨床像との関連性について検討を加えて集計した。

真皮側IgAの沈着がみられるEBAとlinear IgA bullous dermatosis (LABD)との鑑別が出来るかどうかの検討を、蛍光抗体間接法を応用し蛍光オーバーレイ法を用いた共焦点レーザー走査顕微鏡による高解像度画像解析を用いて行った。4型コラーゲンの表皮側と真皮側にLABDとEBAの抗原がそれぞれ分布することが確認された。

研究成果の概要(英文)：Sera from over 100 epidermolysis bullosa acquisita (EBA) patients were immunologically tested. Autoantibodies to envoplakin, desmocolins, or NC1/2 domains of type 7 collagen were detected by immunoblots studies and indirect immunofluorescence studies. Histological distribution of the specified autoantigen was investigated in relevance to the epidemiological and clinical aspects of EBA.

To verify whether fluorescence overlay antigen mapping using laser scanning confocal microscopy (FOAM-LSCM) is useful to differentiate linear IgA bullous dermatosis (LABD) from EBA, the results utilizing FOAM-LSCM were compared with those of immunoblot studies. By FOAM-LSCM image analyses, IgA deposition was above type IV collagen, while IgA deposition was below type IV collagen. The results of FOAM-LSCM image analyses were consistent with those obtained on immunoblotting.

研究分野：皮膚科学

キーワード：臨床統計解析 分子疫学解析 蛍光抗体法 自己免疫疾患 水疱症 免疫プロット法 ELISA法

1. 研究開始当初の背景

(1) 後天性表皮水疱症(Epidermolysis bullosa acquisita, EBA)とは基底膜部と真皮をつなぐ係留線維(anchoring fibril)の型コラーゲン(type COL)に対するIgG型自己抗体により発症する自己免疫性水疱性疾患で、水疱性類天疱瘡より若い中高年で好発し機械的刺激により生じる水疱やびらんを主症状とする。

(2) Type COLの抗原エピトープ表皮真皮間基底膜内の接着構造を担う係留線維構成蛋白で3種の鎖からなり、トリプルヘリックス構造中央部に145kDaのコラーゲンドメイン(COL)、N末端側に145kDa非コラーゲンドメイン(NC1)、C末端側に34kDa非コラーゲンドメイン(NC2)がある。型コラーゲンはアンチパラレルtail-to-tail dimerを作りジスルフィド結合により横方向に集まりクロスバンド構造の係留線維になり、電顕でlamina densaのループとして認められるがダイマー構造両端のNC1に主要な抗原エピトープが存在する。自己抗体を高感度検出するELISAでは、抗NC2抗体も含めて検出できる。間接蛍光抗体法で水疱性類天疱瘡との鑑別が必要で、1M食塩水剥離皮膚切片を用いた蛍光抗体法や免疫プロット法も行われる。

(3) EBAの病型分類

主要病型分類

皮膚症状に異なる要素があり他の水疱症に類似する。EBAは炎症型と非炎症型の臨床サブタイプに分けられ非炎症型(古典型EBA)は脆弱で炎症を伴わない皮膚に軽微な刺激で容易に水疱・びらんを生じる。物理的刺激を受けやすい手指、四肢の皮膚や粘膜に好発する。炎症型は紅斑上に水疱形成する。また、粘膜が主で型コラーゲンに対する自己抗体陽性は粘膜類天疱瘡として再分類されている。

臨床的特徴とエピトーププロファイル関連付けの現状

非炎症型、炎症型と異なるエピトーププロファイルの関連は、NC1ドメインとその他のドメインに対する抗体陽性例で異なる臨床的表現型も考えられるが不明である。可能性として、NC1以外に結合する自己抗体は補体の活性化と炎症細胞浸潤を起こす原因として炎症型になることが考えられる

(4) EBA患者血清の集積と臨床病型分類、検査結果の解析の重要性
病理組織学的には表皮下水疱を示す。古典型では炎症所見は少ないが、炎症型では著明な炎症性細胞浸潤がみられる。蛍光抗体直接法で表皮基底膜部へのIgG、C3の線状沈着を

みる。蛍光抗体間接法で血中にIgG抗表皮基底膜部抗体を認め、1M食塩水剥離皮膚の真皮側に反応する。免疫電顕にて基板あるいは係留線維と反応し、真皮抽出液の免疫プロット法でVII型コラーゲンと反応する。臨床症状、蛍光抗体法所見で診断するが、最終診断は免疫電顕による抗原の局在しないし生化学的な抗原の同定による。共焦点レーザー顕微鏡による蛍光抗体法の微細な抗原局在の同定も有用である。

2. 研究の目的

(1) 上記の背景とこれまでの研究成果を元に、本研究では当科に全国の医療施設から集積されたEBA患者の臨床症状や検査所見に関するデータについてまとめ、患者血清の抗原スクリーニング結果も含め解析し特徴付けと臨床型との関連性を探る。

(2) NC1のエピトープの局在(ホットスポット)検索を目的とし型コラーゲンNC1ドメインに対する自己抗体陽性症例を選別し、複数のリコンビナント蛋白を作り免疫プロット法、ELISA、ELISPOT法にて反応性を調べる。

3. 研究の方法

(1) EBA症例(保存血清100検体以上)の臨床的、免疫学的検討

自己抗体の検出など発症病態の特徴を見出し、臨床所見との関連性を検討する。特徴的臨床像をもった症例抽出と血清学的分類を試みる。

真皮抽出液やリコンビナント蛋白を基質とした免疫プロット法および免疫電顕法を用いて、各症例で検出される自己抗原を特徴づける。

ルーチンのHE染色、直接蛍光抗体法、間接蛍光抗体法(IIF)、split-skin IIFなどの結果をもとに解析と臨床病型との関連性の検討を行う。

免疫学的検索(免疫プロット法、ELISA法、免疫電顕、共焦点レーザー顕微鏡等)による、患者血清中の抗型コラーゲン抗体を含めた種々の抗体についての検討をする。得られた結果と患者背景、臨床上的特徴の関連性について検討を行う。

解析する臨床的特徴、検査のリストは下記の通り。

発症経過、年齢、性別、水疱の大きさ、性状、分布、数、癢痒、合併症、治療法、経過予後 HE(表皮下水疱、浸潤細胞、IIF(BMZ, IgG/A/M)、ss-IIF(epidermal/dermal IgG/A)、DIF(IgG/A/M/C3)、epidermal IB(Dsg1/3、

Periplakin190kD, Emboplakin210kDa, Dsc100kDa), Dermal IB(200kDa, 290kDa, IgG/A), Laminin322, IgG/A, HaCat(LAD) IgG/A, ELISA(BP180/230, Dsg1/3, Col NC1/2)、IB(rNC1/2protein), immunoelectron microscopy(anti NC1, NC2 Ab)など。

NC1 ドメインに対する抗体陽性の症例の患者血清 50 例以上を用いた抗型コラーゲンの詳細なエピトープマッピング(イムノブロット、ELISA、ELISPOT を使用)を試みる。ホットスポットの有無や複数のホットスポットがあれば臨床像と相互関連があるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 患者背景と診断基準

1997~2012 年で後天性表皮水疱症(EBA)と診断された患者 130 名について検討した。EBA の血清学的診断基準として、1M 食塩水剥離ヒト皮膚切片を用いた IIF(split skin IIF)で真皮側に IgG 沈着を認める症例のうち、臨床症状が EBA 古典型あるいは炎症型を示し、かつ/または、免疫ブロット法で 290 kDa 陽性である場合に EBA と診断した。

(2) 発症年齢、性差

4 歳~94 歳で平均は 56.02 歳と中高年者に多くみられたが、10 代以下の小児例も 4.6% の 6 症例認めた。男女比は 1:1.04 でありほぼ同数であった(図 1)。

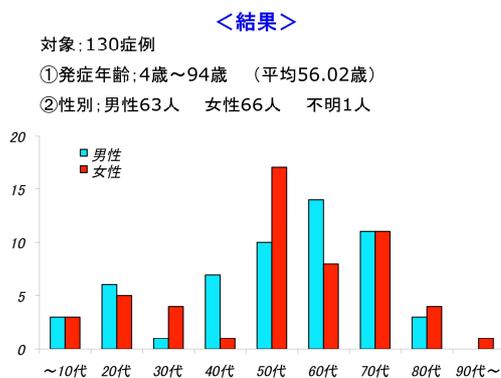


図 1 発症年齢と性差

(3) 皮膚病変の臨床症状の検討

不明 31 例を除いた 99 例の中で、紅斑ありの記載があったものは 49 例、紅斑なしは 50 例であった。また、紅斑の有無に関わらず、粘膜病変のある症例は粘膜疹のない症例数のそれぞれおよそ 1.8 倍であった。紅斑を有する症例を炎症型 EBA、紅斑を認めず水疱・び

らん優位のもの、古典型(非炎症性)EBA に該当すると考えた(図 2)。

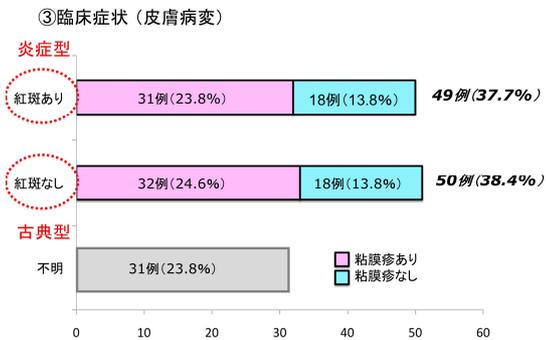


図 2 皮膚病変の臨床症状

(4) 粘膜病変に着目した臨床症状の検討

99 例中、75 例、75.8% の症例で粘膜病変を認めた。粘膜病変のみを有するものが 99 例中 12 例(約 12%)であった。重複も含め、粘膜病変の内訳は、口腔粘膜病変が最多で、全体の 73% (74 例)。詳細に臨床症状判明症例では、硬口蓋・軟口蓋病変 9 例、舌病変や口唇病変 8 例、頬粘膜病変 4 例、歯肉病変 3 例であった。眼粘膜部は 5 例、外陰部が 8 例であった。その他 11 例が咽頭、喉頭、食道粘膜部であった。また粘膜病変のみで内訳は、ほぼ全例が口腔粘膜であり、1 例眼粘膜病変のみであった。粘膜病変のみを認めた症例を粘膜類天疱瘡型とした(図 3)。

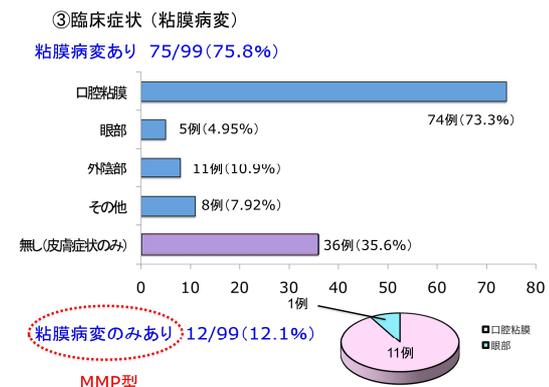


図 3 粘膜病変

(5) 免疫学的検査

IIF の結果、118 例が IgG で陽性で、うち 2 例が IgA と IgG 両方で陽性。12 例は IgA、IgG 両方陰性であった。ss-IIF においては 100% が真皮側に IgG 陽性であり、そのうち約 1 割の 16 症例で真皮側に加えて、表皮側の IgG や真皮・表皮側に IgG と IgA 抗体が両方検出された(図 4)。

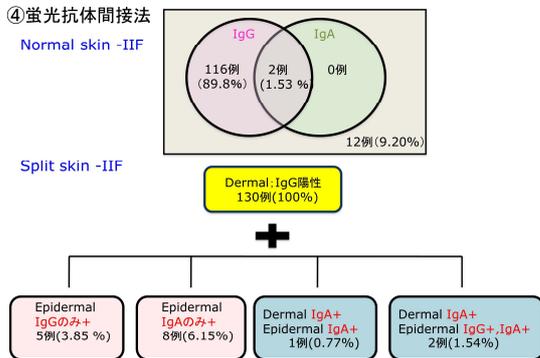


図4 IIFの結果

免疫プロット法では、290 kDa のバンドが認められたのは 130 例中 96 例(73.8%)で 290 kDa 単独は 68 例(52%)と半数以上であった。28 例は複数のバンドが検出された。96 例について抗 7 型コラーゲン抗体の ELISA 法を行い陽性は 74 例(77%)であった。免疫プロットの 290 kDa バンド陽性と 7 型コラーゲン ELISA 値の陽性率の相関性を検討し、両者が陽性の割合は 65%であった。290kDa 陰性で 7 型コラーゲン ELISA 陽性は 12 例、7 型コラーゲン ELISA 陰性で 290 kDa 陽性は 7 例であった。ELISA の平均値は 1.508 (290kDa 陽性、7 型コラーゲン陰性の 7 例)、54.31 (290kDa 陰性、7 型コラーゲン陽性の 12 例)であった(図 5)。

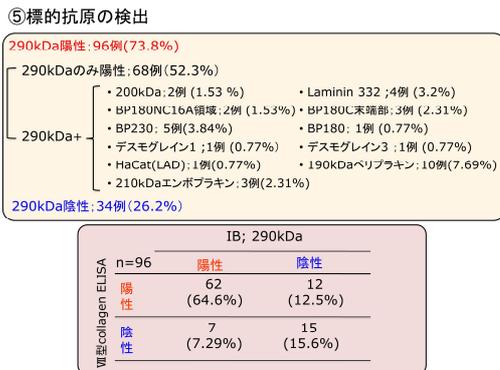


図5 免疫プロット法の結果

(6) 治療法についての解析

検討したところ情報を得た 82 例のうち、ステロイド内服せずに、MINO+NAD、アクロマイシン+NAD、DDS、MINO+コルヒチン、ステロイド外用などの加療を行った症例は 7 例であり、その他は PSL 内服で 75 例(94%)であった。この 75 例中 32 例がステロイド内服のみで、43 例は DDS、NAD + MINO、コルヒチンなど様々な内服薬や、ステロイド点滴などを併用していた。治療の転帰は、ステロイドを内服なしの群 7 例中 2 例軽快 3 例不変、ステロイド内服単独群 32 例中 15 例軽快 12 例不変、ステロイド内服とその他併用群 43 例中、15 例軽快 26 例不変であった(図 6)。

⑥ 治療 n=82

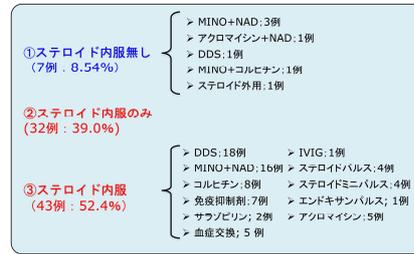


図6 治療法の解析

(7) これまでの報告症例のデータとの比較 発症年齢は一般的にあらゆる年齢層で見られ 40~50 歳代が多く報告されている。L. Delgado らの報告では、EBA12 例中、10 代以下は 3 例、25%であるが、一般的には発症好発年齢は成人期以降 40~50 歳代であり、小児例は比較的稀と考えられた。今回の統計では、発症年齢は 4 歳~94 歳(平均 56.02 歳)、10 代以下は 6 例(4.6%)認め、男女比は 1:1.02 と性差はなかった。古典型 EBA と炎症型 EBA の比率は 1:2 と報告されており、自験例でもほぼ同等であった。粘膜病変を半数が有すると報告されており自験例でも 75%に粘膜病変が認められた。粘膜類天疱瘡は本来、口腔粘膜のみの粘膜病変を有する自己免疫水疱症として位置づけられるが、その標的抗原は 7 型コラーゲンも含めラミニン 332 や BP180 NC16a 領域など多種多様である。今回は、粘膜病変のみ認めた 12%の 12 症例については、その抗原蛋白から粘膜類天疱瘡と考えても良いが、血清学的に EBA の特徴も有したため、粘膜類天疱瘡型 EBA として便宜上分類した。海外の文献においても粘膜類天疱瘡型 EBA は報告されているが、その多くは粘膜類天疱瘡に分類されるべきと考えられている。

(8) 自己免疫性水疱性疾患との合併

EBA は抗 p-200 類天疱瘡や抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡、水疱性類天疱瘡などの自己免疫性水疱性疾患と合併する報告も散見されるが、今回は複数の自己抗原を検出した際に、その臨床症状に差異や特異的な所見は見出せなかった。

(9) ELISA 法の評価

自験例 28 例でも、290 kDa 以外の 200kDa ラミニン 332、BP180NC16a など複数の自己抗原を検出した。抗 7 型コラーゲン抗体の ELISA 法の感度は 93.8%、特異度は 98.1%との報告があり、自験例でも ELISA 法の感度は 89.9%を示し、免疫プロットと比較して僅かに ELISA 法の感度の方が高いことが示された。

(10) 蛍光オーバーレイ法共焦点レーザー

スキャン顕微鏡を用いた高解像度画像解析 1M NaCl 処理によって、表皮と真皮を分離した皮膚を基質とした蛍光抗体間接法を用いた解析方法を応用して、真皮側 IgA の沈着が

みられる EBA と linear IgA bullous dermatosis (LABD)との鑑別が出来るかどうかについての検討も加えて。蛍光オーバーレイ法を用いた共焦点レーザー顕微鏡による高解像度の画像解析を行った。4 型コラーゲンの表皮側と真皮側に LABD と EBA の抗原がそれぞれ分布することが画像上で有意な差をもって確認できた。

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 1 件)

大塚明奈, 石井文人, 小野文武, 濱田尚宏, 大畑千佳, 古村南夫, 橋本 隆: 14 年間の観察中、落葉状天疱瘡に水疱性類天疱瘡を合併した例, Visual Dermatology 査読無 12:1069-1071, 2013

[学会発表](計 1 件)

大塚明奈, 古賀浩嗣, 福田俊平, 石井文人, 濱田尚宏, 大畑千佳, 古村南夫, 橋本 隆: 当科で検討した後天性表皮水疱症のまとめ, 第 34 回水疱症研究会, 2012 年 10 月 6 日 ~ 10 月 7 日, 弘前市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大塚明奈 (OTSUKA Haruna)

久留米大学・医学部皮膚科・助教

研究者番号: 80569369