

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860861

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡における疾患特異的水疱形成機序の解明

研究課題名(英文)The blistering mechanisms in bullous pemphigoid

研究代表者

岩田 浩明(Iwata, Hiroaki)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：20397334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡は、自己免疫疾患のひとつである。自己抗体が基底細胞に存在する17型コラーゲン(COL17)に結合後に誘導する補体の活性化や炎症細胞浸潤が水疱形成に重要である。本研究では、自己抗体により基底細胞の自己抗原(COL17)が減少することが重要であり、細胞内に取り込まれ減少していく過程の一部を明らかにした。細胞内では多くのシグナルが次々と活性化されて、最終的にCOL17の取り込みが行われる。特にsmall GTPase関連のシグナルが密接に関与していることを示した。このシグナルの阻害は新しい治療になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune subepidermal blistering disease associated with autoantibodies to type XVII collagen (COL17). When keratinocytes are treated with BP-IgG, COL17 internalizes into cells by way of the macropinocytosis pathway. The inhibition of small GTPase family members Rac1 and Cdc42 was found to strongly repress COL17 internalization; additionally the Rho inhibitor also partially blocked the internalization. This depletion of COL17 from lateral-apical plasma membrane generates a significant shortage of COL17-supplementation to hemidesmosome, resulting in the formation of incomplete hemidesmosome lacking COL17.

研究分野：自己免疫性水疱症

キーワード：自己免疫 自己抗原 水疱性類天疱瘡 17型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性表皮下水疱症は、自己抗体が標的とする自己抗原の種類により複数に分類される。水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid: BP) は、基底細胞の細胞膜へミデスマゾームに存在する COL17 が主要抗原であり、従来、自己抗体が COL17 に結合後に補体が活性化され惹起された炎症細胞浸潤が基底細胞と基底膜との間 (lamina lucida) に水疱を形成するとされている。一方、同じ自己免疫性表皮下水疱症である後天性表皮水疱症は、基底膜下に存在する Anchoring fibril が主要抗原であり、BP 同様の機序で基底膜下 (sublamina densa) に水疱を形成する。両疾患の水疱形成機序は酷似すると考えられているが、水疱形成部位の違い (図1) を説明することは困難である。

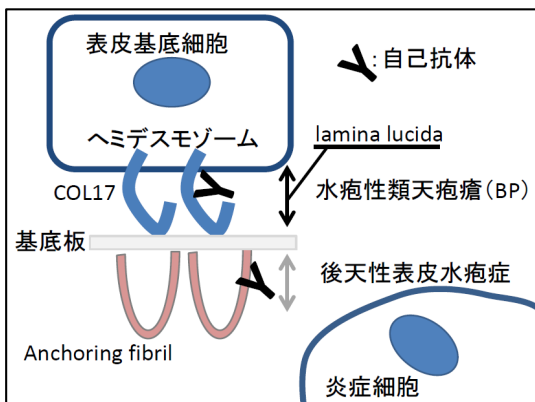


図1 自己免疫性表皮下水疱症の水疱部位

申請者らは、培養表皮細胞を用いて自己抗体が COL17 に結合し細胞内に取り込まれた結果 COL17 の発現が減少し、細胞接着力が減弱し水疱が形成されることを示した (Iwata H et al. *J Invest Dermatol* 2009)。この結果から、BP の水疱が基底細胞と基底膜との間に生じる理由は、表皮細胞内の COL17 の発現低下が大きく関与していると推測される。しかし、COL17 がどのように細胞内に取り込まれ分解・減少するメカニズムは全く不明である。

一般的にタンパク質の細胞内での分解は、大きく分けてプロテアソーム分解とオートファジー分解の二つ経路がある。最近、細胞

内のウイルス排除の機構に Trim21 という細胞質タンパクを介したプロテアソーム分解の関与が報告された。アデノウイルスは、ウイルス抗体との免疫複合体として細胞内に侵入し、細胞内で抗体の Fc 部分を介して Trim21 と結合する。その結果、ユビキチン経路を介してウイルス除去が行われる。興味深い点は、従来抗体は細胞外の特異免疫に関与するという認識であったが、細胞内における働きが証明されたことである。上記の事実に基づき、申請者らは BP においても COL17 と自己抗体が細胞内に取り込まれた後に Trim21 を介して COL17 の分解が行われ、それが BP における水疱形成に関与しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

- (1) COL17 の減少が lamina lucida での水疱形成に重要であるか検証した。
- (2) 皮膚器官培養とマウス実験で、COL17 の減少が lamina lucida で水疱形成に関与しているか検証した。
- (3) COL17 が取り込まれ、減少する主要経路を解明した。
- (4) BP では細胞内に取り込まれた自己抗体の働きは全く不明である。細胞内のウイルス除去メカニズムと同様に、自己抗体が Trim21 を介したユビキチン経路で COL17 を分解し水疱形成に関与しているか検証した (図2)。

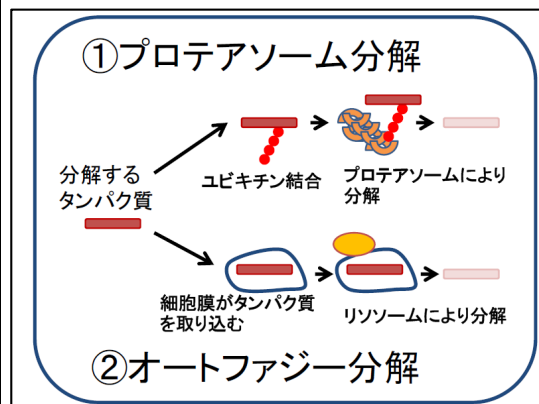


図2 細胞内におけるタンパク分解経路

3. 研究の方法

BPにおいて細胞内に取り込まれたCOL17と自己抗体が、どのような働きをしているかに着目し、(1)細胞内に取り込まれCOL17が減少するメカニズムを明らかにしてBPにおける疾患特異的な水疱形成機序を解明する。(2)次に培養細胞で細胞内のCOL17の減少メカニズムにおけるTrim21の関与を検討するためノックアウト細胞を用いて細胞内での自己免疫疾患におけるTrim21の働きを解明する。(3)続いて患者皮膚とマウス実験でも、培養細胞と同様に自己抗体の取り込みが生じて、基底膜部の接着の脆弱性への関与を検討する。(4)最後に、マウス実験でCOL17の減少がBPの疾患特異的な水疱形成に関与していることを示す。マウス実験では、COL17の減少を防止する治療開発を行う。

4. 研究成果

(1) マクロピノサイトーシス経路で取り込まれる際、small GTPaseシグナルの関与が重要である。COL17取り込みにおけるマクロピノサイトーシスはRac1、Cdc42の阻害剤により、細胞内への取り込みは抑制される。また、Rho阻害剤においても部分的に細胞内への取り込みを抑制した(図3)。このことから、BP-IgGがCOL17に結合後、複数のsmall GTPaseシグナルを介してCOL17は細胞内へと取り込まれると示唆される。また、われわれのグループでは、BP-IgG刺激によるユビキチン化されたCOL17が増加することも発見した。

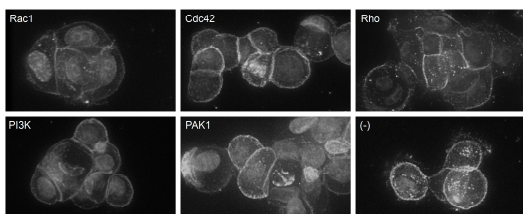


図3 small GTPaseがCOL17の細胞内取り込みシグナルとして関与する

(2) ユビキチン E3 リガーゼの一つ Trim21 はCOL17の細胞内分解には関与しないと推察する結果であった。Trim21のsiRNAを用いてHaCaT細胞でノックダウンを行ったところ、70%程度の減少を認めた(図4)。この細胞を用いてBP-IgG刺激によるCOL17の減少効果を検証したところ、コントロールと比べてほぼ影響が認めなかった。BP-IgG刺激を加えた培養細胞を2色の蛍光染色にてIgG(FITC)とTrim21(Rhodamin)の局在を検討したが、Trim21は主に核内に分布し、IgGは主に細胞質に認められ明らかな共局在は確認できなかった。

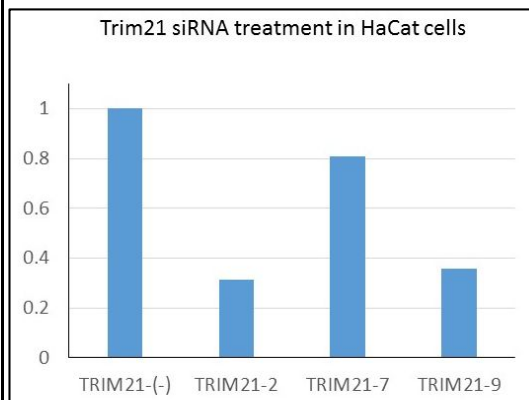


図4 Trim21のsiRNAのノックダウン効率の検証

(3) 患者皮膚において水疱形成部位を特定するために基底膜タンパクの抗原マッピングを行ったところ、病変部の皮膚ではCOL17の減少のみでなく他の基底膜タンパク(6インテグリン、4型コラーゲンなど)も同様に減少していた(図5)。水疱部位での4型コラーゲンの分布で水疱形成部位を特定することを試みたが、組織の破壊が強く判定は困難であった。正常ヒト皮膚を用いたex vivoによる実験においても自己抗体を反応させた後、正常ヒト好中球を添加する

と、活性化した好中球から放出される種々のタンパク分解酵素により患者皮膚と同様に COL17 のみでなく他の基底膜タンパクも分解されることが示された。このため 4 型コラーゲンをを用いた水疱形成部位の同定は困難と推察した。

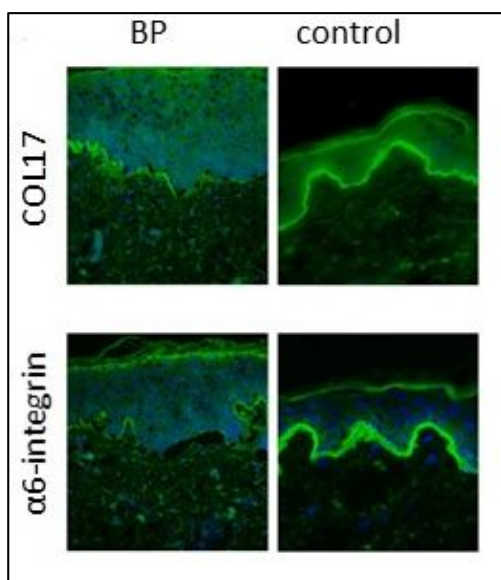


図 5 患者皮膚における COL17 とインテグリンの蛍光染色結果

- (4) マウスに抗 COL17 抗体を投与して COL17 の減少を検証することは、現在も条件検討を繰り返している段階であり結果には至っていない。本研究の(1)の結果で得られた、様々な細胞内シグナルの阻害剤を用いた治療応用のため正常マウス皮膚を用いた ex vivo で検証を行っており、BP-IgG 刺激による COL17 細胞内への取り込みを抑制していると推察する結果が得られているため、追試実験を行っている。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Iwata H, Imafuku K, Izumi K, Wada M,

Natsuga K, Ujiie H, Nishie W, Shimizu H:

Autoantibodies to parts of type XVII collagen outside of the non-collageneous 16A domain lead to mild bullous pemphigoid due to the non-depletion of autoantigen

The 45th annual meeting of the European Society for Dermatological Research.

2015.9.9-2015.9.12

Postillion Convention Centre-WTC (Rotterdam, The Netherland)

今福恵輔、岩田浩明、泉健太郎、夏賀健、氏家英之、西江 渉、清水 宏
抗 NC16A 抗体を有さない軽症の水疱性類天疱瘡の 1 例

第 114 回日本皮膚科学会総会

2015 年 5 月 29 日-2015 年 5 月 31 日、
パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 浩明 (Iwata Hiroaki)

北海道大学・北海道大学病院・特任助教

研究者番号：20397334

(2)研究分担者

なし