HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The differences of collagen XVII between the oral mucosa and the skin discover the pathogenesis of oral lesions in pemphigoid [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	鎌口, 真由美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13491号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73981
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mayumi_Kamaguchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　鎌口　真由美

学　位　論　文　題　名

The differences of collagen XVII between the oral mucosa and the skin discover the pathogenesis of oral lesions in pemphigoid

（17 型コラーゲンに着目した類天疱瘡における口腔内水疱形成機序の解明）

17 型コラーゲン（COL17, 別名 BP180）はヘミデスモゾームの構成成分の一つで膜貫通型蛋白であり、自己免疫疾患の一つである類天疱瘡（Pemphigoid）の標的抗原として知られている。類天疱瘡は、基底膜部蛋白に対する自己抗体により皮膚や粘膜に水疱・びらんを形成する自己免疫性水疱症である。主に皮膚に症状を呈する水疱性類天疱瘡（Bullous pemphigoid: BP）と、粘膜主体の粘膜類天疱瘡（Mucous membrane pemphigoid: MMP）に大別される。BP は、全身皮膚に掻痒を伴う緊満性水疱を生じ、患者の約 20%で口腔粘膜病変を認める。COL17 の NC16A 領域に対する抗体が病原性を有する。一方、MMP は口腔粘膜などの粘膜優位に水疱・びらんを呈し、COL17 の C 末端が主な標的抗原とされている。BP における皮膚病変の病態機序に関する研究は多くあるが、口腔内病変の発症機序に着目した基礎研究は非常に少ない。特に、BP と MMP は COL17 を標的抗原とするにもかかわらず、なぜ皮膚と粘膜と部位特異的な病変を呈するのかという問題に明確な答えを示した研究は無い。さらに、口腔粘膜と皮膚の違いについて、角化（分化）の違いを検索した報告はあるものの、両者に存在する基底膜部蛋白について詳細に検索した報告はない。そこで我々は、皮膚と口腔粘膜の COL17 の相違が BP と MMP の部位特異的な病変の出現に関連しているのではないかと推察した。本研究は、類天疱瘡における皮膚と粘膜における主病変の違いが生じる機序解明の一助となると考えられる。

まず、臨床から基礎への橋渡し研究として、口腔粘膜基質を用いた MMP の自己抗体と自己抗原

の検出を試みた。MMP の自己抗体価は BP に比較して低値であることが多いため、血清中の自己抗体検出が難しく、診断に難渋する原因の一つとなっている。MMP は粘膜主体の病変を呈するにもかかわらず、診断のために行われる蛍光抗体間接法は正常口腔粘膜ではなく正常皮膚が用いられてきた。そこで口腔粘膜基質を用いた蛍光抗体間接法および口腔粘膜ケラチノサイト（OKCs）を用いた免疫ブロット法を行い皮膚基質と比較した。MMP20 例中、口腔粘膜基質を用いた場合、蛍光抗体間接法での陽性率が皮膚の 35%（7/20）に比較して、85%（17/20）と優位に向上した。さらに OKCs を用いた免疫ブロット法では抗原同定率が皮膚ケラチノサイト（SKCs）の 10%（2/20）に比較し、55%（11/20）優位に上昇した。これらの結果から、口腔粘膜基質は MMP の自己抗体検出率および抗原同定率を優位に上昇させ、診断に有用であることを示した (Kamaguchi M et al. Br J Dermatol 2018)。

次に、COL17 を含む基底膜部蛋白における口腔粘膜と皮膚の相違の検索を行うことで、類天疱瘡の口腔内水疱機序の解明を試みた。免疫染色法により口腔粘膜と皮膚の基底膜蛋白（COL17, Laminin 332, Integrin α6/β4, COL7）の比較を行った。OKCs と SKCs における基底膜部蛋白の mRNA 発現量および蛋白発現量を RT-qPCR 法と免疫ブロット法で比較した。免疫染色では、COL17 は皮膚に比較して口腔粘膜で強く染色された。OKCs における COL17 の mRNA および蛋白発現量は、SKCs に比較し優位に高値であった。また、OKCs における COL17 の高発現は、細胞接着能が口腔粘膜で優位に高いことに相関した。BP の病原抗体（COL17-NC16A）で培養細胞に刺激すると、COL17 が細胞内に取り込まれ、分解・減少することが報告されている（Iwata H, et al. *J Invest Dermatol*, 2009.）。そこで、OKCs と SKCs を COL17 に対するモノクローナル抗体（mAb）で刺激し、COL17 の発現量変化を検討した。本研究では、COL17 に対する2種類の mAbs で刺激した。COL17-NC16A 領域に対する mAbs（TS39-3）単独で刺激すると、COL17 の減少は OKCs に比較し SKCs で顕著であり、OKCs での COL17 の高発現が COL17 の減少を補償していた。さらに、既報告では COL17 の C 末端に対する mAb（C17-C1）は病原性がないとされている（Wada M,

et al. *J Invest Dermatol*, 2016)。しかし今回、TS39-3 とともに C17-C1 で刺激することで、COL17 の減少が増強された。これは COL17 の C 末端に対する抗体の新たな病原性を示唆している。本結果から、口腔粘膜における COL17 の高発現は抗 COL17 抗体による COL17 の減少を補償していることが明らかになった。これは BP における皮膚病変が有意になることに寄与していると考えられた (Kamaguchi M et al. J Invest Dermatol 2018)。

類天疱瘡の類似疾患である天疱瘡の水疱形成機序の一つとして、自己抗原であるデスモグレイン同士の結合が自己抗体によって阻害され、表皮間に水疱を形成するという構造阻害（Steric hindrance）が報告されている（Tsunoda K, et al. J immunol. 2003）。Steric hindrance は水疱形成に炎症反応を必要としないことが特徴である。MMP の病変部の病理組織学的像では BP に比較して炎症性細胞浸潤が少ないことに着目し、MMP における水疱形成機序にも、炎症反応を伴わない構造阻害が関与しているのではないかと想定した。そこで、COL17 と細胞外基質の主成分である COL4 との結合に着目した。まず、COL17 と COL4 の直接結合を比較するため OKCs と SKCs の細胞溶解液と COL17 に対する mAbs を用いた免疫沈降法を行った。SKCs では、TS39-3 および C17-C1 で免疫沈降すると両者の mAbs で COL4 が共沈降された。一方、OKCs では TS39-3 で免疫沈降した場合 COL4 が共沈降にもかかわらず、C17-C1 では COL4 は共沈降されなかった。この結果から、COL17 と COL4 の直接結合が C17-C1 により阻害されている可能性が示唆された。次に、COL17 の C 末端に対する抗体が COL17 と COL4 の結合を阻害するか検証した。精製 COL4 とリコンビナント COL17 で結合実験を行い、C17-C1 を作用させたところ両者の結合量が優位に減少した。さらに MMP 患者 IgG においても同様に COL4 と COL17 の結合を優位に阻害した。これらの結果から、MMP における炎症細胞浸潤が少ない口腔内水疱形成には、COL17-C 末端に対する抗体による COL17 と COL4 の構造阻害が関連していることが強く示唆された (Kamaguchi M et al. Lab Invest. 2018)。