HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dipeptidyl peptidase-IV阻害薬関連水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析及びマウスにおける抗BP180自然自己抗体の発見［全文の要約］
Author(s)	眞井, 洋輔
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2716 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14981号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86078
Type	doctoral thesis
File Information	MAI_Yosuke_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連
水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析
及び
マウスにおける抗 BP180 自然自己抗体の発見

(Autoantibody profiling in dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid and detection of anti-BP180 natural autoantibody in mice)

2022 年 3 月

北海道大学

眞井 洋輔

学位論文(要約)

Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連
水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析
及び
マウスにおける抗 BP180 自然自己抗体の発見

(Autoantibody profiling in dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid and detection of anti-BP180 natural autoantibody in mice)

2022 年 3 月
北海道大学
眞井 洋輔

＜研究 1, Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイルの解析＞

【背景と目的】

水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP) は最多の自己免疫性水疱症である. BP では表皮基底細胞のヘミデスモソームを構成する BP180 に対して自己抗体を産生し, 全身に浮腫性紅斑と緊満性水疱を生じる. 近年, 糖尿病治療薬である dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬 (dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, DPP4i) の内服に関連して発症する BP (DPP4i-associated BP, DPP4i-BP) が相次いで報告されている. 以前我々は, DPP4i-BP は通常の BP と比較して浮腫性紅斑が乏しく, 抗 BP180 自己抗体のエピトープも通常の BP と異なることを報告した. 本研究では, DPP4i-BP の病態をより深く理解するため, DPP4i-BP の自己抗体プロファイルをより詳細に解析することとした.

【材料と方法】

BP の診断を満たし, BP 発症時に DPP4i を内服している症例を DPP4i-BP と定義した. 全長 BP180 enzyme-linked immunosorbent assay の index 値が 60 以上で, BP180 NC16A chemiluminescent enzyme immunoassay が陰性の DPP4i-BP 18 症例を本研究のために使用した. ヒト BP180 (human BP180, hBP180) の全長, 細胞内領域, C 末端領域, プラスミンによって切断された細胞外切断片の各リコンビナントタンパクを作成し, western blot による自己抗体のエピトープ解析を行なった. また, 通常の BP では IgG1 と IgG4 のサブクラスが優位であることが知られており, 検出した DPP4i-BP 自己抗体の免疫グロブリンサブクラスを解析した.

【結果】

DPP4i-BP の自己抗体は, 全長 hBP180 よりもプラスミンで切断された hBP180 の細胞外領域に強く反応することが明らかとなった. 一方, hBP180 の細胞内領域または C 末端領域に対する自己抗体はほとんど検出されなかった. また, DPP4i-BP は全例 IgG1 サブクラスの抗 hBP180 細胞外切断片自己抗体を有しており, IgG4 サブクラスの自己抗体は半数程度のみであった.

【考察】

hBP180 は種々のタンパク分解酵素による切断を受ける. hBP180 の切断片は立体構造の変化により新たに出現するネオエピトープを有し, DPP4i-BP の自己抗体はそのネオエピトープを認識する. また, DPP4i-BP は炎症の乏しい臨床像を呈するが, DPP4i-BP の自己抗体は補体活性能が高い IgG1 サブクラスが優位であり,

DPP4i-BP では補体活性化が炎症を必ずしも惹起しないことが示唆された. また, 通常の BP とは異なるこの DPP4i-BP の自己抗体プロファイルは, DPP4i が BP を誘発するメカニズムを理解する手かがりとなり得る.

【結論】

DPP4i-BP の主要な自己抗体は hBP180 の切断された細胞外領域をエピトープとする IgG1 自己抗体であった.

＜研究 2, マウスにおける抗 BP180 自然自己抗体の発見＞

【背景と目的】

研究 1 では, DPP4i-BP は hBP180 の切断された細胞外領域に現れるネオエピトープを認識する自己抗体を有することを明らかにした. このような hBP180 の切断に伴うネオエピトープを標的とする自己抗体は, 線状 IgA 水疱性皮膚症などのその他の自己免疫性水疱症でも見られる. しかし, なぜこのような BP180 の切断に伴う自己抗体を有するかは明らかになっていない. BP180 に対する自己抗体産生のメカニズムを理解するため, マウス BP180 (mouse BP180, mBP180) をマウスに免疫し, どのような自己抗体を産生するのかを解析した.

【材料と方法】

mBP180 の全長リコンビナントタンパクを作成し, mBP180 全長リコンビナントタンパクを SJL/J マウスに免疫して, 自己抗体産生と皮疹の有無を観察した. mBP180 を免疫したマウスの脾細胞を用いてハイブリドーマ細胞を樹立した. mBP180 の全長, 細胞内領域, NC14A 領域のリコンビナントタンパク及びプラスミンで切断した細胞外切断片を作成して, 樹立したハイブリドーマ細胞株が産生する自己抗体のエピトープ解析を western blot を用いて行なった. また, 自己抗体の免疫グロブリンサブクラス解析を行った. 一つのハイブリドーマ細胞株における免疫グロブリン領域の塩基配列を決定した.

【結果】

mBP180 を免疫したマウスは自己抗体を産生し, 自己抗体は表皮真皮境界部に沈着した. また, 免疫したマウスは BP 様の臨床像を呈し, 組織学的にも表皮下裂隙を形成した. mBP180 を免疫したマウスから mBP180 に対する自己抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を 6 つ樹立した. 樹立したハイブリドーマ細胞株が産生する自己抗体は, mBP180 の細胞内領域に対する IgG2 自己抗体と, mBP180 の細胞外切断片に対する IgM 自己抗体であった. 次に, mBP180 は切断によって 13 番目のコラーゲン領域にネオエピトープが生じることを発見した. 抗 mBP180 細胞外切断片 IgM 自己抗体は 13 番目のコラーゲン領域に存在する切断特異的なネオエピトープを標的とすることを明らかにした. また, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体の遺伝子配列は, germline 抗体遺伝子配列と同一であり, 抗 mBP180 細胞外切断片 IgM 自己抗体は自然自己抗体であることがわかった.

【考察】

マウスに全長 mBP180 リコンビナントタンパクを免疫する新たな BP モデルマウスを作成した. マウスは mBP180 を免疫することにより, mBP180 の細胞内及び切断された細胞外領域に対する自己抗体を産生した. また, 産生された自己抗体はエピトープと免疫グロブリンサブクラスに関連があり, mBP180 は細胞内領域や細胞外切断片などの部位特異的な免疫反応を生じる可能性がある. 興味深いことに, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体は germline 抗体遺伝子配列と同一であり, 自然自己抗体であった. また, この自然自己抗体は mBP180 のコラーゲン領域を認識し, このようなコイルドコイル構造は様々な微生物に対する生体防御のための自然抗体を誘発することが知られている. 今回発見した BP180 に対する自然自己抗体の存在意義は未だ明らかではないが, BP180 に対する自己抗体産生のメカニズムを解明する一端になるかもしれない.

【結論】

mBP180 を免疫したマウスは, mBP180 の細胞内領域に対する IgG2 自己抗体と, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体を産生した. mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体は mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域に存在する切断特異的なネオエピトープを認識する自然自己抗体であった.