慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	天疱瘡の新治療に向けたIgGサブクラス解析とIgG4除去療法
Sub Title	IgG subclass analysis and IgG4 depletion therapy for pemphigus
Author	船越, 建(Funakoshi, Takeru)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	天疱瘡は表皮細胞の細胞間接着因子であるデスモグレイン(Dsg)に対する自己抗体によって生じる疾患で、自己抗体についてのさまざまな解析が進められている。われわれが行った天疱瘡におけるIgGサブクラスの解析の結果、総IgG中のIgG4の割合の増加が示され、更に抗Dsg抗体のIgG4サブクラスの上昇が確認された。また、患者血清からIgG4を除去することによる病原性の低下を、表皮細胞解離アッセイで確認した。同一患者における疾患活動性とIgG4の相関について、疾患活動期・寛解期におけるIgG4を測定し複数の患者で検討した結果、Dsg特異的IgG4濃度は活動期で明らかに高いことが分かった(p=0.04)。 Pemphigus is an autoimmune blistering disease caused by circulating antibodies against desmogleins (Dsg) which are cell-cell adhesion protein in the epidermis. We recently established anti-Dsg IgG subclass ELISA method and we showed that Dsg-specific autoantibodies are enriched in IgG4. Addition to that total serum IgG4 was enriched in patients with pemphigus. Furthermore, IgG4 depletion of pemphigus sera reduced pathogenicity in a keratinocyte dissociation assay. The median serum concentration of Dsg-specific IgG4 was significantly higher in pemphigus patients during active disease compared to patients in remission(p=0.04). Memory B cell populations were enriched for surface-IgG4 positive cells in pemphigus compared to unaffected individuals. IgG4 could be depleted by immunoadsorption or by selective depletion of surface-IgG4 memory B cells, and which we have shown can be bound and hence potentially targeted based on surface IgG4 expression.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2013 課題番号：24791175 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791175seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９１１７５

研究課題名（和文）天疱瘡の新治療に向けたＩｇＧサブクラス解析とＩｇＧ４除去療法

研究課題名（英文）IgG subclass analysis and IgG4 depletion therapy for pemphigus

研究代表者
舩越　建（Funakoshi, Takeru）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：８０３６５３５３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,200,000円、（間接経費）　960,000円

研究成果の概要（和文）：天疱瘡は表皮細胞の細胞間接着因子であるデスモグレイン(Dsg)に対する自己抗体によって生じる疾患で、自己抗体についてのさまざまな解析が進められている。われわれが行った天疱瘡におけるIgGサブクラスの解析の結果、総IgG中のIgG4の割合の増加が示され、更に抗Dsg抗体のIgG4サブクラスの上昇が確認された。また、患者血清からIgG4を除去することによる病原性の低下を、表皮細胞解離アッセイで確認した。同一患者における疾患活動性とIgG4の相関について、疾患活動期・寛解期におけるIgG4を測定し複数の患者で検討した結果、Dsg特異的IgG4濃度は活動期で明らかに高いことが分かった(p=0.04)。

研究成果の概要（英文）：Pemphigus is an autoimmune blistering disease caused by circulating antibodies against desmogleins (Dsg) which are cell-cell adhesion protein in the epidermis. We recently established anti-Dsg IgG subclass ELISA method and we showed that Dsg-specific autoantibodies are enriched in IgG4. Addition to that total serum IgG4 was enriched in patients with pemphigus. Furthermore, IgG4 depletion of pemphigus sera reduced pathogenicity in a keratinocyte dissociation assay. The median serum concentration of Dsg-specific IgG4 was significantly higher in pemphigus patients during active disease compared to patients in remission(p=0.04). Memory B cell populations were enriched for surface-IgG4 positive cells in pemphigus compared to unaffected individuals.
IgG4 could be depleted by immunoadsorption or by selective depletion of surface-IgG4 memory B cells, and which we have shown can be bound and hence potentially targeted based on surface IgG4 expression.

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：天疱瘡　IgG4　治療

１．研究開始当初の背景

難病の一つである天疱瘡は、細胞間接着蛋白であるデスモグレイン(Dsg)に対する自己抗体によって皮膚と粘膜にのみ水疱・びらんを形成する自己免疫疾患である。すでに天疱瘡の水疱形成においては、Dsg に対する自己抗体のみにより生じることが示されている(Amagai M et al. J Clin Invest, 1992)。さらに、抗体の Fab 領域の先端に近い可変領域（V 領域）のみによって水疱が形成されることが明らかになっている(Ishii K et al. J Invest Dermatol, 2008)。抗体は Fab 領域の可変領域（V 領域）と V 領域以外の Fab 領域と Fc 領域からなる定常領域（C 領域）から構成されるが、これらの結果は、天疱瘡自己抗体の Fc 領域は水疱形成に必ずしも必要ないということを示している。そのため、過去の研究の多くは自己抗体の抗原認識部位である可変領域に注目して来たが、いまだに治療に応用できていないのが現状である。一方で、Fc 領域に関して明らかになっているのは天疱瘡患者の血中の主な病原性抗体が IgG であるということである。

そもそも、抗体は定常領域（C 領域）の違いにより、IgG、IgA、IgM、IgE、IgD のアイソタイプに分けられ、IgG はさらに 4 つの IgG サブクラス（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）に分けられる。C 領域に関する解析において、実際の抗体の病原性は IgG サブクラスのうち IgG4 と関連していることも示されている。それを説明する事実の一つとして、疾患活動期の天疱瘡患者においては Dsg に対する IgG1、IgG4 の両方が見られるのに対し、寛解期においては IgG1 のみが見られている(Bhol K et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, Warren SJ et al. J Invest Dermatol, 2003)。一方、Dsg に対する IgG2、IgG3 は、疾患活動期とは関連していない(Futei Y et al. J Dermatol Sci, 2001, Torzecka JD et al. Arch Dermatol Res, 2007)。加えて、天疱瘡の風土病であるブラジル天疱瘡において、IgG4 特異的 Dsg ELISA は総 IgG Dsg ELISA と比較して高い感度と特異度を示している(Qaqish BF et al. J Invest Dermatol, 2008)。これらの研究結果より、天疱瘡患者において IgG4 が疾患活動性に特徴的な血清データであるということが示唆されている。

天疱瘡は治療なしでは死に至る病気である。現在、ステロイドを中心とした治療によりほとんどの患者を救命できるようになったが、これまでに治療が十分に確立したとは言い難い。また多くの治療は免疫抑制に頼っており、重篤な感染症や二次性の悪性腫瘍といった副作用を生じる可能性を有している。それゆえに、自己免疫に関する多くの先端研究は、病原性抗体を同定し、これを標的として治療することに向けられている。

われわれが着目した IgG4 は、慢性刺激によって産生される。IgG1 欠損とは異なり、IgG4 欠損による免疫能への悪影響がないことから、IgG4 除去は人体にとって安全に行える治療手段であると考えられる。しかしながら、まだ IgG4 除去による天疱瘡への治療効果は明らかになっていない。

２．研究の目的

天疱瘡の病原性自己抗体の除去を選択的に行うことが可能になれば、免疫抑制療法が主流である天疱瘡治療は大きく飛躍を遂げる。抗体の抗原認識部位である可変領域ではなく、われわれは抗体の不変領域に着目し、IgG4 が病原性と相関していると考えた。天疱瘡患者の IgG サブクラスの解析、自己抗体のサブクラス解析、IgG4 陽性メモリーB 細胞の解析を行うとともに、IgG4 除去による病原性の変化を検証することを目的とした。将来的には IgG4 除去療法、または抗 IgG4 抗体治療により、免疫抑制を伴わない安全かつ有効な治療を実現することを目標とし、研究を実施した。

３．研究の方法

本研究の目標は、天疱瘡患者の IgG4 を選択的に低下させる治療法を確立するための基礎実験を行うことにある。第一段階として、天疱瘡患者、健常人の IgG サブクラスの解析を行い、さらに天疱瘡患者の天疱瘡抗体（抗 Dsg 抗体）の IgG サブクラスを IgG1 と IgG4 について解析した。抗 Dsg-IgG サブクラスの解析には、モノクローナル抗体を用いて間接的に定量する方法と、Dsg カラムによる天疱瘡抗体の除去前後の IgG サブクラスを測定するという二通りの方法を用いて検証した。また、同一患者における疾患活動性と IgG4 の相関についても解析可能な症例について検討した。第二段階として、天疱瘡患者血清から IgG サブクラスの選択的除去を行う前後の病原性を評価した。選択的除去のためには IgG および IgG4 を吸着するカラムを作成し、カラムにより吸着されない抗体と吸着される抗体の量について IgG サブクラス解析を行った。これらの抗体を用いた病原性の評価には、Dsg ELISA 法による定量に加え、正常ヒト皮膚を用いた実験と、培養表皮シートを用いた実験とを相互に行い検証した。さらに、治療後の再発症例と健常人より IgG4 陽性メモリーB 細胞の解析を行った。

４．研究成果

(1) IgG サブクラスを測定可能な商業ベースのキットを用いて尋常性天疱瘡(Pemphigus vulgaris: PV)患者、落葉状天疱瘡(Pemphigus

foliaceus: PF)患者と健常人の血清総 IgG に占める各サブクラスの定量を行った。IgG サブクラスについて PV、PF 患者と健常人を比較すると、血清総 IgG，IgG1，IgG2，IgG3 には差がみられなかったが、血清総 IgG4 のみが有意差をもって増加していた（図１）。

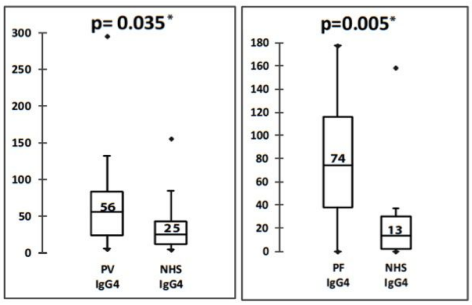

図１　天疱瘡患者と健常人の IgG4 の比較
　天疱瘡患者における血清 IgG4 の上昇が確認されたが、他のサブクラスにおける変化はみられなかった。(左：PV 27 例 対 健常人 23 例、右：PF 16 例 対 健常人 12 例、単位：mg/dL)

(2) 天疱瘡患者から得られたモノクローナル抗体(IgG1)をもとに Dsg1，Dsg3 に対する IgG4 モノクローナル抗体を作成した。これらの抗体を用いて、Dsg1、Dsg3 がウェルに固相化されたプレートを用いた ELISA 法で標準曲線を作成し、PV 27 例、PF 16 例の抗 Dsg-IgG1、-IgG4 を測定した。PV 患者の IgG4 に占める抗 Dsg3-IgG4 の割合は 0.11～67.0%(中央値 7.1%)であった。IgG1 に占める抗 Dsg3-IgG1 の割合の中央値は 0.5%であり、有意な差がみられた（図２）。PF 患者においても検証したところ、それぞれ 4.2%、1.2%と IgG4 の割合が高かった。

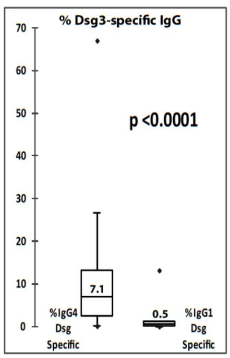

図２　PV 患者における抗 Dsg3-IgG1 と IgG4 の比較
　PV 27 例における Dsg3 に対する自己抗体について IgG1 と IgG4 のサブクラスを測定した結果、IgG4 が有意に上昇していることが明らかになった(p<0.0001)。

(3) 3 例の PV 患者血清からカラムを用いて IgG4 のみを除去し、IgG4 除去前後の病原性の変化および精製した IgG4 の病原性の比較を、表皮細胞解離アッセイを用いて行った。IgG4 の除去前と比較したところ、除去後では表皮細胞解離アッセイで病原性を平均 81%減少させていた。さらに吸着除去したカラムから精製した IgG4 が他の血清 IgG 画分よりも病原性があることが示された。なお、正常ヒト皮膚を用いた実験では病原性の評価はできなかった。

(4) 同一患者における疾患活動性と IgG4 の相関について、疾患活動期・寛解期における IgG4 を測定し複数の患者で検討した結果、Dsg 特異的 IgG4 濃度は活動期で明らかに高いことが分かった(図３)。IgG4 が病勢の指標になりうることが示された。

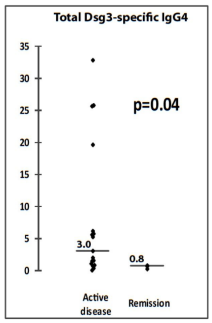

図３　病勢と抗 Dsg3-IgG4 の比較
　疾患活動期と寛解期における抗 Dsg3-IgG4 値を比較すると、疾患活動期で有意に高いことがわかった(活動期中央値 3.0mg/dL，寛解期中央値 0.8mg/dL，p=0.04)。

(5) IgG4 を治療の標的として考える場合には、IgG4 吸着もしくは IgG4 産生 B 細胞を除去する方法がある。再発症例における末梢血中のメモリーB 細胞を測定するため、フローサイトメトリーで解析した。メモリーB 細胞(CD27+/CD19+ or CD20+)のうち、IgG4 陽性細胞の割合は再発症例において高く、健常人においては低値であるという傾向がみられている。さらに解析を予定している。

　以上の結果から、天疱瘡の活動期における IgG4、抗 Dsg-IgG4 の上昇が示され、IgG4 もしくは IgG4 産生 B 細胞を標的とした治療が臨床応用された際に有効である可能性が示唆された。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
　なし

６．研究組織
(1)研究代表者
舩越　建（FUNAKOSHI TAKERU）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80365353