

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16357

研究課題名(和文) 粘膜類天疱瘡患者血中抗ラミニン332抗体のエピトープ解析

研究課題名(英文) Epitope analysis for anti-laminin 332 antibodies in sera from patients with mucous membrane pemphigoid

研究代表者

古賀 浩嗣 (Koga, Hiroshi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40461412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当初、粘膜類天疱瘡患者血中のラミニン332抗体のエピトープ解析を予定していたが、研究期間中に他のグループによって既に報告されたことにより、ラミニン332とVII型コラーゲンの結合部位の特定、および患者血中抗体による結合の阻害作用について研究を行った。結果、VII型コラーゲンとラミニン332の3鎖の結合部位はLE domainの中央部分にあることを同定した。今後、さらなる部位の特定と、患者血中抗体がその部位での結合を阻害しうるのであるかを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜類天疱瘡患者血中のラミニン332抗体が水疱を生じさせることは、実験的には証明されているが、具体的にどのような機序で水疱が生じるのかは明らかにされていない。今回、皮膚の接着に重要なラミニン332と7型コラーゲンの結合部位を特定し、その部位で抗体が両者の接着を阻害するかどうかを検討することで、水疱形成の機序を解明する研究となっている。この結果は、粘膜類天疱瘡患者において何故水疱が生じるのかを解明する一助となる。

研究成果の概要(英文)：While epitope analysis for anti-laminin 332 antibodies in sera from patients with mucous membrane pemphigoid was initially planned, other group reported a similar study during a period of this study. Therefore, we changed the purpose of this study to precise detection of the binding site on laminin beta 3 to type VII collagen. In result, we detected that the binding site was located in the mid portion of LE domain in laminin beta 3 using several recombinant proteins of laminin beta 3 and type VII collagen. We are planning to perform a precise detection of the site and evaluate the inhibitory effect of antibodies in the patients' sera on binding of laminin beta 3 and type VII collagen.

研究分野：自己免疫性水疱症

キーワード：ラミニン332 7型コラーゲン エピトープ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

粘膜類天疱瘡(MMP)は粘膜を主体とし、また皮膚にも水疱、びらんを生じる疾患である。以前は癬痕性類天疱瘡と呼称されており、病変は癬痕を残し治癒する事が特徴である。これが粘膜においては癒着を起こし、失明、咽頭狭窄といった合併症を引き起こし患者の QOL を著しく低下させる。治療に関してはステロイド全身投与やその他の免疫抑制剤が使用されるが、しばしば治療抵抗性であり、上記のような不可逆的な合併症を防ぐことができない場合もある。その為、より効果的な治療法の開発が待たれる。免疫学的には患者血中 IgG(または IgA)が基底膜部領域に沈着することが特徴である。これまでの報告では自己抗体として、抗 BP180 抗体、抗ラミニン 332 抗体、抗 BP230 抗体、抗インテグリン 6 4 抗体が患者血中より検出されているが、自己抗体のタイプから大きく抗 BP180 型 MMP と抗ラミニン 332 型 MMP に二分される。マウス実験においてラミニン 332 抗体が水疱を生じることは示されているが、この抗体がどのようにして水疱を形成するのか、そのメカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

当初は MMP 患者血中のラミニン 332 抗体の反応部位を詳細に検討することが本研究の目的であったが、同様の研究結果が研究期間中に他の研究グループから報告されたことにより (Cell-based immunofluorescence test applying recombinant laminin 332 for the serological differential diagnosis of pemphigoid)、研究目的の変更を行わざるを得なかった。ラミニン 332 は同じく基底膜部領域に存在する VII 型コラーゲンと結合することが知られており、過去の報告で、ラミニン 332 の 3 鎖にある LE domain で VII 型コラーゲンと結合することが示されている。そこで、LE domain 内のより詳細な結合部位を同定し、その部位で患者血中抗体による結合阻害が生じているのかを解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

上記目的のため、各種組み替え蛋白を作製し、その結合能を免疫沈降法で検討した。

(1)ラミニン 332 の 3 鎖組み替え蛋白の作製

ヒトラミニン 3 鎖全長、LE domain 全長、LE domain を 3 分割(LE-1, LE-2, LE-3)した配列を組み込んだプラスミドをそれぞれ作製した。

(2)VII 型コラーゲン組み替え蛋白の作製

過去の報告からラミニン 332 との結合には VII 型コラーゲンの NC1 domain が関与していることが示されており、NC1 domain の組み替え蛋白を作製した。

(3)免疫沈降法による結合能の評価

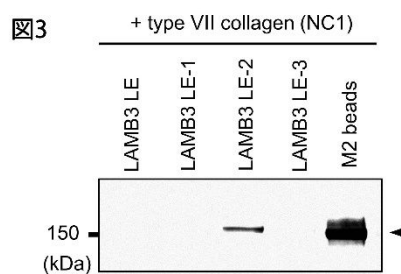
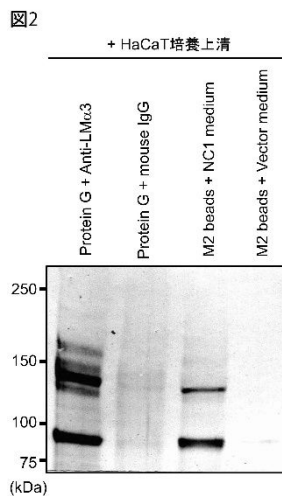
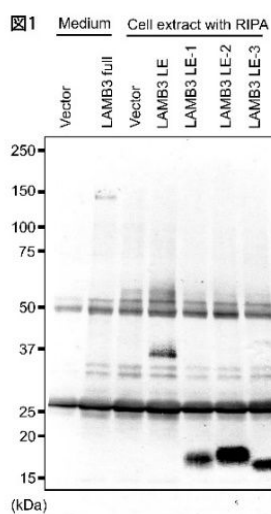
上記作製した組み替え蛋白を用いて免疫沈降法でラミニン 332 の 3 鎖の各部位と VII 型コラーゲンとの結合能を評価した。

4. 研究成果

(1)ヒトラミニン 3 鎖全長(LAMB3 full)、LE domain 全長(LAMB3 LE)、LE domain を 3 分割(LAMB3 LE-1, LE-2, LE-3)した配列を組み込んだプラスミドを作製し、哺乳細胞株である HEK293T 細胞へ遺伝子導入した。ヒトラミニン 3 鎖全長蛋白は培養上清中に、その他は細胞溶解液中にそれぞれ発現していることをウエスタンブロッティングで確認した(図 1)。

(2)VII 型コラーゲンの NC1 domain の配列を組み込んだプラスミドを作製し、大腸菌に遺伝子導入し蛋白を発現させた。しかしこの工程で大腸菌発現の VII 型コラーゲン組み替え蛋白はラミニン 3 鎖蛋白と結合しなかった。そのため、哺乳細胞用のプラスミドを再度作製し、HEK293T 細胞へ遺伝子導入した。目的蛋白が培養上清中に発現していることをウエスタンブロッティングで確認した。

(3)各ラミニン 332 の 3 鎖組み替え蛋白と大腸菌発現の VII 型コラーゲン NC1 domain 組み替え蛋白とで免疫沈降法を行ったが、いずれも結合を示さなかった。そこで、VII 型コラーゲン蛋白を哺乳細胞発現に変更した。ヒトケラチノサイト株である HaCaT 細胞の培養上清にはラミニン 332 が含まれる。これをラミニン 3 鎖抗体(anti-LMa3)と Protein G を使って免疫沈降を行うとラミニン 332 の結合が確認できる。これに代えて哺乳細胞株発現 VII 型コラーゲン NC1 ドメイン組み替え蛋白を含む培養上清(NC1 medium)と、その蛋白の FLAG 配列を認識する M2 beads を HaCaT 細胞の培養上清と免疫沈降を行うと、ラミニン 3 鎖抗体同様にラミニン 332 との結合を確認できた(図 2)。このことから作製した哺乳細胞株発現 VII 型コラーゲン組み替え蛋白はラミニン 332 と結合できることが確認できた。この VII 型コラーゲン蛋白を用いて、各種ラミニン 332 の 3 鎖組み替え蛋白との結合を免疫沈降法で確認したところ、LE domain の中央部分に位置する組み替え蛋白(LAMB3 LE-2)との結合が確認できた(図 3)。理論上、LE domain 全長組み替え蛋白とも結合すると考えるが、明らかなバンドとして同定できなかったのは結合効率の差によるものと考えた。



以上の結果から、ラミニン 332 の 3 鎖と VII 型コラーゲンの結合部位は LE domain の中央部分に位置することが示された。今後、組み替え蛋白または合成ペプチド等を用いて、さらに VII 型コラーゲンとの結合部位を特定していく予定である。また、その結合部位を患者血中のラミニン 332 抗体が阻害するかどうかについても今後検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kaneko R, Tsunemi Y, Nakamura K, Kuramochi A, Tsuchida T, Koga H, Hashimoto T.	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of concurrent intercellular IgA dermatosis and linear IgA/IgG bullous dermatosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Australas J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ajd.13264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koga H, Teye K, Ishii N, Nakama T.	4. 巻 46 (11)
2. 論文標題 Detachment of keratinocytes at the basement membrane zone caused by inhibitory effect of the antibodies from sera of mucous membrane pemphigoid patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1046 ~ 1048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koga H, Teye K, Yamashita K, Ishii N, Tsuruta D, Nakama T.	4. 巻 180 (5)
2. 論文標題 Detection of anti-type VII collagen IgE antibodies in epidermolysis bullosa acquisita.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1107 ~ 1113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjd.17310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koga H, Prost-Squarcioni C, Iwata H, Jonkman MF, Ludwig RJ, Bieber K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne).	6. 最初と最後の頁 362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2018.00362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwata H, Vorobyev A, Koga H, Recke A, Zillikens D, Prost-Squarcioni C, Ishii N, Hashimoto T, Ludwig RJ.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis.	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13023-018-0896-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Koga H, Kasprick A, Lopez R, Auli M, Pont M, Godessart N, Zillikens D, Bieber K, Ludwig RJ, Balague C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Therapeutic Effect of a Novel Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.01558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasumizu M, Imanishi H, Morita S, Fukuda A, Tateishi C, Koga H, Hashimoto T, Tsuruta D.	4. 巻 57(1)
2. 論文標題 A case of mucous membrane pemphigoid with IgG antibodies against the 3 and 2 subunits of laminin-332, and the C-terminal domain of BP180.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 86~88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijd.13829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa T, Hirako Y, Teye K, Tsuchisaka A, Koga H, Ishii N, Karashima T, Kaneda M, Oyu Y, Tateishi C, Sugawara K, Yonamine A, Shinkuma S, Shimizu H, Fukano H, Shimozato K, Nguyen NT, Marinkovich MP, Tsuruta D, Hashimoto T.	4. 巻 26(9)
2. 論文標題 Unique mouse monoclonal antibodies reactive with maturation-related epitopes on type VII collagen.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 811~819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bieber K, Koga H, Nishie W.	4. 巻 26 (12)
2. 論文標題 In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石井 文人 (ISHII Norito) (80330827)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究協力者	テイエ クエシ (TEYE Kwesi) (30599303)	久留米大学・付置研究所・助教 (37104)	