

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～ 2010

課題番号：20390308

研究課題名（和文）未だに未同定である IEN 型 IgA 天疱瘡と抗 p200 類天疱瘡の抗原解析

研究課題名（英文）Analysis of unidentified autoantigens for IEN type IgA pemphigus and anti-p200 pemphigoid

研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO TAKASHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20129597

研究成果の概要（和文）：プロテオミクス手技を用いて、抗p200類天疱瘡の抗原がラミニンガンマ1であることを証明し、そのリコンビナント蛋白を作成して、ELISA法を開発した。IEN型IgA天疱瘡の自己抗原がKU8細胞に高発現していることを示し、この培養細胞とプロテインMセファロースを用いた新しいIgA免疫沈降法を開発した。二次元電気泳動、免疫ブロット法、質量解析で、IgA secretory component を同定した。

研究成果の概要（英文）：We identified the autoantigen for anti-p200 pemphigoid as laminin gamma-1 by proteomics technique, produced recombinant proteins of laminin gamma-1, and established novel ELISA. We established new immunoprecipitation technique for IgA antibodies using protein M sepharose and cultured KU8 cells which were shown to produce plenty of autoantigen for IEN type IgA pemphigus. We identified the autoantigen as IgA secretory component by two-dimensional gel electrophoresis, immunoblotting and mass spectrometric analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究代表者の専門分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：プロテオーム、免疫学、蛋白質、遺伝子、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性水疱症は抗表皮細胞膜抗体を示す天疱瘡群と水疱性類天疱瘡を代表とする抗表皮基底膜部抗体を有する群に大別される。皮膚の最外層に存在する表皮の強固な構築には、デスモソームとヘミデスモソームによる強固な接着が重要である。最近の生化学的・分子生物学的研究の進歩により、すべての自己免疫性水疱症の抗原物質はデスモソームとヘミデスモソームの構成蛋白であることが明らかとなった。しかしながら、下記に述べるように、約 10 疾患の自己抗原が

明らかとなっていない。

自己免疫性水疱症は多彩な皮膚抗原に対する自己抗体によって皮膚が障害され水疱を形成する一連の皮膚疾患であり、現在異なった抗原に反応する多数の病型が知られている。天疱瘡群疾患では、通常、表皮細胞間接着を失い表皮内水疱を生じる（棘融解）。しかしながら、膿疱形成や表皮細胞壊死が著明な疾患もある。抗表皮基底膜部抗体を示す各種の疾患においては表皮と真皮間の接着が傷害されて表皮下水疱を生じる。各種自己免疫性水疱症の研究に関しても、分子生物学

的手法の急速な発展により、ここ数年で急速に変化してきており、多くの新しい自己免疫性水疱症の病型が知られるようになった。以下に各種自己免疫性水疱症の分類とその抗原をまとめる。

尋常性天疱瘡：粘膜優位型：Dsg3、粘膜・皮膚型：Dsg1+Dsg3  
増殖性天疱瘡：Dsg1+Dsg3  
落葉状天疱瘡、紅斑性天疱瘡：Dsg1  
疱疹状天疱瘡：大多数 Dsg1（一部 Dsg3）  
薬剤誘発性天疱瘡：未知、多様（？）  
PV・PF 移行型：Dsg1 and/or Dsg3  
腫瘍随伴性天疱瘡：Plectin, DPKI/II, BP230, EPL, PPL, 未知の p170, Dsg3, Dsg1  
IgA 天疱瘡：SPD (subcorneal pustular dermatosis) 型：Dsc1、  
IEN (intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis) 型：未知、IgA PV：Dsg3、IgA PF：Dsg1  
IgA/IgG 天疱瘡：Dsc1 (Dsc2/Dsc3)、その他  
Endemic pemphigus (Brazil, Tunisia, Colombia) Dsg1 ほか  
水疱性類天疱瘡：230kD 類天疱瘡抗原 (BP230)：180kD 類天疱瘡抗原 (BP180)  
妊娠性疱疹：180kD 類天疱瘡抗原 (BP180)  
癬痕性（粘膜）類天疱瘡：cicatricial pemphigoid (CP)、mucous membrane pemphigoid (MMP)  
BP180 型 MMP：180kD 類天疱瘡抗原 (BP180)  
抗ラミニン 5 型 MMP：ラミニン 5（エピリグリン）  
抗 p165 型 MMP：未知の p165  
眼癬痕性類天疱瘡 (Ocular CP)：未知、一部、beta4 インテグリン(?)  
線状 IgA 水疱性皮膚症：lamina lucida 型：97/120kD LAD1, sublamina densa 型：未知、一部 VII 型コラーゲン  
後天性表皮水疱症、水疱性 SLE：VII 型コラーゲン  
抗 p105 類天疱瘡：未知の p105  
抗 p200 類天疱瘡：未知の p200

しかしながら、未だ、その自己抗原が明らかでないものも多くある。その例として、

- (1) 薬剤誘発性天疱瘡の自己抗原
- (2) 腫瘍随伴性天疱瘡未知における p170
- (3) IEN 型 IgA 天疱瘡の自己抗原
- (4) IgA/IgG 天疱瘡の自己抗原
- (5) Endemic pemphigus (Brazil, Tunisia, Colombia) における自己抗原
- (6) 抗 p165 型 MMP における p165
- (7) 眼癬痕性類天疱瘡 (ocular CP) の自己抗原
- (8) sublamina densa 型線状 IgA 水疱性皮膚症の自己抗原
- (9) 抗 p105 類天疱瘡における未知の p105、

(10) 抗 p200 類天疱瘡における未知以上の p200 の 10 種が未だに不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の 10 種の未同定の抗原のうち、最も重要であり、かつ、私共の施設で長期に渡って他施設に先駆けて研究している、intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型 IgA 天疱瘡の自己抗原と抗 p200 類天疱瘡における未知の p200 の同定を目的とする。今研究では、各種の最新の免疫学的、生化学的、分子生物学的手法を用いるが、特に、有効なセファロースを用いた新規の免疫沈降法とプロテオミクスの技術を用いた蛋白同定の手技が最も重要である。

Intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型の IgA 天疱瘡抗原の同定を第一に試みる。IEN 型 IgA 天疱瘡は、臨床的にひまわりの花様の異型の膿疱性病変を示し、病理学的に表皮全層の膿疱形成を示し、蛍光抗体法で表皮全層の表皮細胞膜に反応する IgA 抗体を示す。抗原解析の第一歩として、未だ困難な手技である IgA の免疫沈降法を確立する。患者血清とジャカリンセファロースを用いて、抗原蛋白の蛋白バンドを得る。さらに、単離された蛋白バンドから蛋白を抽出して、プロテオミクスの手技を用いて、マスペクトロメトリーにより抗原蛋白を同定する。蛋白が未知のものであるときは、その cDNA を用いてリコンビナント蛋白を作成し、ウサギに免疫して、特異的抗体を作成し、その抗体が表皮の細胞膜に反応することを確認し、さらに、免疫電顕で、デスモソーム以外の部位に反応することを確かめる。さらに、その抗体を新生マウスに投与することにより、ヒトと同じ病変を作るかどうか検討する。

次に、未解明の自己免疫病である抗 p200 類天疱瘡の責任抗原 p200 を同定する。抗 p200 類天疱瘡は、1996 年に、私共が、第 1 例と第 2 例を報告した自己免疫性水疱症である。臨床的に尋常性乾癬に伴う水疱症を示す場合が多く小水疱型類天疱瘡の臨床を示すこともある。1M 食塩水剥離ヒト皮膚切片を用いた蛍光抗体間接法で真皮側に反応する IgG 抗基底膜部抗体を示す。真皮抽出液を用いた免疫ブロット法で 200 KDa 蛋白と反応する。

今回、我々は、当科で永年にわたり培った水疱症研究の知見と、プロテオミクス解析に用いられる技術力とを武器に、p200 を分離、精製し、一次構造の決定に挑む。すなわち、まず、各種のカラムを用いて、真皮抽出液の抗原を純粋化する。そのサンプルを用いた二次元電気泳動において、蛋白染色と免疫ブロット法の 2 枚のゲルを用いて、抗原蛋白のスポットを同定し、その部の蛋白を蛋白染色したゲルから切り出す。さらに、単離された蛋白

バンドから蛋白を抽出して、プロテオミクスの手技を用いて、マススペクトロメトリーにより抗原蛋白を同定する。蛋白が未知のものであるときは、その cDNA を用いてリコンビナント蛋白を作成し、ウサギに免疫して、特異的抗体を作成し、その抗体が表皮基底膜部に反応することを確認し、さらに、1M 食塩水剥離ヒト皮膚切片を用いた蛍光抗体間接法で真皮側に反応することを確認する。そして、免疫電顕で、この抗体が lamina lucida と lamina densa の境界部位に反応することを確認する。さらに、その抗体を新生マウスに投与することにより、ヒトと同じ病変を作るかどうかが検討する。さらに、遺伝子改変動物を用いた p200 の分子機能解析も視野に入れている。すなわち、得られた cDNA を用いて、この蛋白のゲノム DNA を単離し、それを用いてターゲットベクターを作成し、そのベクターを用いて ES 細胞から、ノックアウトマウスを作成する。そのマウスの皮膚の脆弱性を検索することにより、本蛋白が表皮基底膜部の接着に重要な物であることを確認する。

### 3. 研究の方法

2 種の自己免疫性水疱症に分けて研究を進める。

Intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型の IgA 天疱瘡の抗原解析。

私共は、以前、subcorneal pustular dermatosis (SPD) 型の IgA 天疱瘡の自己抗原が表皮のデスモソームの構成蛋白のひとつであるデスモコリン 1 であることを、COS-7 細胞-cDNA transfection 法によって明らかにした。しかしながら、もう一種の IgA 天疱瘡である、intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型の抗原は現在、全く、不明である。現在までに、金コロイド標識抗体を用いた postembedding 免疫電顕では、この抗体が反応する抗原は、デスモソーム以外の表皮細胞膜に存在していることが明らかになっている。このため、IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原は、現在まで知られているデスモソーム蛋白以外の未知の蛋白であると考えられている。

このため、先ず、未固定のケラチノサイト (KU-8 cell) の培養において、IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原が産生されていることを蛍光抗体法で確認する。現在まで、ヒト表皮抽出液や培養ケラチノサイトの抽出液を用いた免疫ブロット法では、その抗原が検出できないことが判明している。その原因は、IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原のエピトープ (抗原決定基) は、高次構造依存性であり、免疫ブロット法における強い条件では消失してしまうと考えられた。また、IgG 抗体の抗原の解析に用いられる Protein A は IgA 抗体には応用できない。そのため、新しい、IgA 抗体用の免疫沈降法

を開発する。すなわち、まず、ビオチンでケラチノサイト細胞膜蛋白を標識し、その蛋白を 1% Triton X-100 などの弱い条件で抽出したサンプルを用いて、IgA 抗体に特異的に反応する、新しいジャカリン-セファロースを用いた免疫沈降法を施行する。まず、Ku-8 細胞を培養し、未固定の dish 内で細胞表面を化学的にビオチンで標識する。その蛋白を 1% Triton X-100 を含んだ溶液で可溶化し、チューブ内で、ジャカリン-セファロースと反応させる。遠心により 6 回、洗浄後、遠心したサンプルにサンプルバッファーを加えて、煮沸し、蛋白を解離する。そのサンプルを SDS-PAGE 電気泳動で、蛋白を分離し、その蛋白をニトロセルロース膜に転写する。そのニトロセルロース膜をスキムミルクブロックし、peroxidase 標識 avidin と反応させ、沈降蛋白を同定する。この研究によって IEN 型 IgA 天疱瘡の反応する蛋白の分子量を同定する。その後、プロテオミクスの手技を用いて、抗原分子の同定を試みる。すなわち、回収分画を 1 次元電気泳動あるいは 2 次元電気泳動で展開しクマシー染色を行う。

一方、同様に電気泳動したゲルによりウェスタンブロット法で標的タンパクのバンドを同定し、その標的となる蛋白バンドをクマシー染色ゲルから切り出す。十分量のタンパクが得られない場合は、ゲル濾過クロマトグラフィで標的分子を含む分画を回収することも試みる。さらに、イオン交換クロマトグラフィ、疎水結合クロマトグラフィによる分画を追加することも考える。また、他動物種での交叉反応が得られた場合、その動物の皮膚から大量の材料を抽出し、同様に精製し、ビオチン化も同様に行う。ゲルから切り出して分離した蛋白を、ゲル内でトリプシン処理を行い、フラグメンテーションを行い、ペプチドを溶出する。マススペクトロメトリー解析により得られたパターンについて、ヒトゲノムデータベースから遺伝子のプロファイリングを行い、タンパクの 1 次構造を決定する。データベースから同定できない場合、アミノ酸シーケンシングを行うことも考慮する。

次に、抗 p200 類天疱瘡の抗原解析を行う。私共は、長年にわたり、尋常性乾癬に伴う水疱症、小水疱型類天疱瘡様水疱症、その他、異型の水疱症について検索し、多くの血清が 1M NaCl split skin を用いた蛍光抗体間接法で、真皮側に反応し、真皮抽出液を用いた免疫ブロット法により、200kDa 抗原 (p200) に特異的に反応することを見出し、抗 p200 類天疱瘡と名付けた。しかし、この p200 の性質は未だ不明である。この抗原の同定のために、先ず、真皮抽出液を用いた免疫ブロット法により、この血清を検索し、細胞外マトリクス蛋白に対する反応を比較することによ

り、候補となる蛋白を検出する。さらに、この血清を用いて、ケラチノサイト cDNA ライブラリーを免疫スクリーニングして、抗原の cDNA を単離することを試みる。

p200 に反応する多くの患者からなるべく多くの血清を採取し-20 度で保存する。この稀少な血清を、我々は既に十分量保有している。次いで、皮膚科、形成外科の手術で生じた余剰皮膚を回収、保存し、真皮抽出物を作成する。まず、2mM の EDTA-PBS 内で 24 時間反応させ、表皮と真皮を分離する。真皮を 8M 尿素で 2 時間反応させ、真皮抽出液を得る。そのサンプルを蒸留水で 48 時間透析し、そのサンプルを凍結乾燥する。水疱症の免疫学的診断に用いるため、我々は既にこの手法を技術的に確立している。真皮抽出物は凍結乾燥したまま使用時まで冷凍保存する。実験時には、真皮抽出物を解凍し緩衝液に溶解する。このサンプルにサンプルバッファーを加えて、加熱し、このサンプルを一次元 SDS-PAGE 電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 p200 類天疱瘡患者血清を反応させ、洗浄後、抗ヒト IgG ウサギ血清を反応させ、バンドを検出する。

プロテオミクス手技を用いた p200 の同定は以下の手技によって行う。すなわち、まず、真皮抽出液を、アセトン沈殿による分画により生成する。この方法で濃縮できない場合は、尿素、EDTA 加緩衝液に対する可溶性による分画等の手法で粗精製を行う。さらに、SDS-PAGE 電気泳動、ウエスタンプロット法で標的分子の精製度を確認しつつ条件を設定する。限外ろ過膜で洗浄、等電点分画で標的分画を回収する。回収分画を 2 次元電気泳動で展開しクマシー染色を行う。一方、ウエスタンプロット法で標的タンパクのバンドを同定する。標的となるバンドを切り出す。十分量のタンパクが得られない場合、ゲル濾過クロマトグラフィで標的分子を含む分画を回収する。さらに、イオン交換クロマトグラフィ、疎水結合クロマトグラフィによる分画を追加する。また、他動物種での交叉反応が得られた場合、大量の材料からの精製を同様に行う。ゲルから切り出して分離したタンパクを、ゲル内トリプシン処理、フラグメンテーションを行い、ペプチドを溶出する。マスマスペクトロメトリー解析により得られたパターンについて、ヒトゲノムデータベースから遺伝子のプロファイリングを行い、タンパクの 1 次構造を決定する。データベースから同定できない場合、アミノ酸シーケンシングを行う。

現在、免疫ブロット法・免疫沈降法、cDNA クローニング、プロテオミクスに用いる各種器具、各種のカラム、ELISA システム、サーマルサイクラー、DNA シーケンサー、共焦点レーザー顕微鏡、細胞分取機能を有する FACS

装置、超低温フリーザー、CO2 インキュベーターおよび超純水製造装置などほとんどの実験に必要な主要設備は揃っている。

#### 4. 研究成果

まず、プロテオミクス手技を用いて、抗 p200 類天疱瘡の抗原がラミニンガンマ 1 であることを証明した。その後、ラミニンガンマ 1 の C 末端部をコードする cDNA を PCR 法で単離し、その cDNA を大腸菌発現系ベクターに組み込み、リコンビナント蛋白を作成した。そのリコンビナント蛋白に対する患者血清の反応性を免疫ブロット法で確認し、このリコンビナント蛋白を用いた ELISA 法を作成した。さらに、より免疫性の強い部位を得るため、ラミニンガンマ 1 の全長をコードする cDNA を、3 分割して、PCR 法で単離した。その cDNA を大腸菌発現系ベクターに組み込み、リコンビナント蛋白を作成した。それぞれのリコンビナント蛋白に対する患者血清の反応性を免疫ブロット法で確認した。その後、これらのリコンビナント蛋白を用いた ELISA 法を作成し、現在、至適条件を検討中である。

IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原解析に関しては、まず、新しい IgA 抗体用の免疫沈降法を開発した。各種の培養細胞を、蛍光抗体法で検討し、KU8 細胞が最も多くの自己抗原蛋白を発現していることを見だし。この細胞を用いることを決定した。さらに、免疫沈降に用いる IgA に特異的に結合する担体を多数検討し、なかでもジャカリンセファロースとプロテイン M セファロースについて詳細に検討した。その結果、プロテイン M セファロースが最も特異的に IgA に結合することを見いだした。さらに、ビオチン標識細胞による一次元電気泳動を用いた免疫沈降法で、候補として、75kDa 付近に 2 種の候補蛋白を検出した。しかし、この方法では、免疫グロブリン蛋白と分離できなかったため、2 次元電気泳動法を用いて展開した蛋白で免疫ブロット法を行い、この蛋白スポットを質量解析で解析した。

その結果、ひとつはトランスフェリン関連膜蛋白であり、もうひとつは、IgA secretory component 関連蛋白であった。その後、この 2 種の蛋白の cDNA を PCR 法で単離した。その cDNA を有核細胞発現系ベクターに組み込み、各種の培養哺乳細胞に導入した。現在、発現した蛋白に対する、多くの患者血清の反応を検討し、これらの蛋白が真の自己抗体である可能性を検討中である。

#### 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 40 件)

① Rafei D, Müller R, Ishii N, Llamazares

M, Hashimoto T, Hertl M, Eming R: IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. Am J Pathol 178(2):718-23, 2011. 査読有.

- ② Groth S, Recke A, Vafia K, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Development of a simple ELISA for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. Br J Dermatol. Br J Dermatol 164(1):76-8, 2011. 査読有.
- ③ Dainichi T, Kurono S, Ohyama B, Ishii N, Sanzen N, Hayashi M, Shimono C, Taniguchi Y, Koga H, Karashima T, Yasumoto S, Zillikens Z, Sekiguchi K, Hashimoto T: Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. Proc Natl Acad Sci USA. 106(8):2800-2805, 2009. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ishii N, Teye K, Hamada T, Ishikawa T, Sakaguchi S, Fukuda S, Saruta H, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. Anti-desmocollin autoantibodies in pemphigus herpetiformis and pemphigus vegetans: IgG antibodies to desmocollin 1-3 are the key factor for their characteristic phenotypes. The 40<sup>th</sup> annual European Society for Dermatological Research meeting (Sep. 8-11, 2010, Helsinki, Finland)
- ② Hashimoto T. Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. The 4<sup>th</sup> Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian college of Dermatologists (Jun. 10-12, 2009, Sapporo)
- ③ Ishii N, Hayashi M, Shimono C, Taniguchi Y, Sanzen N, Karashima T, Yasumoto S, Sekiguchi K, Zillikens D, Hashimoto T. Laminin  $\gamma$  -1 is a major autoantigen in anti-p200 pemphigoid. The 5<sup>th</sup> International Investigative Dermatology (May 14-17, 2008, Kyoto)

[図書] (計 4 件)

- ① 橋本隆. 水疱症・膿疱性疾患. 標準皮膚科学 2010 年 第 9 版. 医学書院. pp. 192-220.
- ② 橋本隆. 先天性表皮水疱症. 今日の診断指針. 2010年 医学書院 pp.1561-63.
- ③ 橋本隆. 瘢痕性類天疱瘡の顔面病変. 皮膚科診療最前線シリーズ 顔の皮膚病最前線. 2009年 メディカルレビュー社 pp. 156-9.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto Takashi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 20129597

(2) 研究分担者

安元 慎一郎 (Yasumoto Shinichiro)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 10220162

辛島 正志 (Karashima Tadashi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 70211175

濱田 尚宏 (Hamada Takahiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 40320204

石井 文人 (Ishii Norito)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 80330827

(H21-22)

大日 輝記 (Dainichi Teruki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 20423543

(H20)

大山 文悟 (Ohyama Bungo)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 90461441

(H20-21)

