

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591639

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡の病態関連モノクローナル抗体の単離と新規診断法・治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of IgG monoclonal antibodies associated with the pathogenesis of bullous pemphigoid and development of a new therapy targeting the antibodies.

研究代表者

清水 忠道 (Shimizu, Tadamichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：70260396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は水疱性類天疱瘡(BP)患者リンパ球からBPの病態形成に強く関与するモノクローナル抗体を同定し、この抗体を標的とした治療の開発を目的とする。まず複数のBP患者から得た血清を用いて抗BP抗体のプロファイルを確認した。次にBP患者の末梢血単核球を用いて順次抗体発現細胞を同定した。これらの細胞から得た抗体可変部cDNAを含む発現ベクター作製し、それを導入した細胞の培養上清よりモノクローナル抗体を得た。得られた抗体のひとつは542-566アミノ酸を特異的に認識した。これは提供患者血清のプロファイルと一致していた。現在、この抗体の水疱形成能の検証と更なる抗体の獲得を継続している。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering disease caused by IgG autoantibodies against the NC16a domain of BP180. In this study, we attempted to isolate IgG monoclonal antibodies against NC16a and identify epitopes strongly associated with the pathogenesis of BP. Antigen-specific antibody-secreting cells (ASCs) were collected from the patient's peripheral blood monocytes using an Immunospot array assay on a chip (ISAAC). IgG variable region cDNA was amplified from each ASC and ligated to an expression vector. Monoclonal antibodies were obtained from the culture supernatant of HEK293T cells transfected with the expression vectors. These monoclonal antibodies specifically recognized 542-566 amino acid residues of BP180. We performed to examine whether the antibodies induce blister formation in the human skin and to obtain other types of monoclonal antibodies from BP patients. In addition, we plan to develop a new therapy targeting disease-related antibodies.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：水疱性類天疱瘡 モノクローナル抗体 タイプ17コラーゲン ISAAC法 BP180

1. 研究開始当初の背景

高齢者に好発する自己免疫性水疱症の一つであり、全身性に紅斑と緊満性水疱が多発し、病理組織学的には表皮下水疱と水疱内および真皮上層への好酸球・リンパ球などの浸潤を特徴とする。本疾患の原因は表皮基底細胞のヘミデスモソームに存在する BP180 (type XII collagen) に対する自己抗体と考えられている。本疾患は自己抗体が直接細胞の接着を阻害する天疱瘡群と異なり、自己抗体が BP180、特に細胞外ドメインに存在する NC16a 領域 (490-562 アミノ酸) に結合したあと、補体の活性化が生じ、遊走してきた多核白血球が産生する蛋白分解酵素により基底膜が分解されることにより水疱が形成される (図 1)。BP の診断は蛍光抗体法、免疫プロット法、NC16a 領域を抗原とした Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法が用いられている。特に ELISA 法は特異度、鋭敏度とも優れており、またその値が病勢を反映することから現在臨床の場で広く用いられている。しかし、ELISA 法で検出されない症例 (Zenzo GD et al. J Invest Dermatol 2003; Mariotti F et al. Br J Dermatol 2004) も報告されており、NC16a 以外の領域に対する抗体の存在も知られている。さらに NC16a 領域と反応はするものの血中抗体価と重症度が相関しない患者もときに存在する。これは患者が有する自己抗体がポリクローナルであり、NC16a と反応する抗体の中でも病態に強く関与するものとしなないものが混在していることが原因であると思われる。このことは NC16a 領域内のアミノ酸 507-520 に対するリコンビナント Fab 抗体が BP の発症を抑制するとの報告 (wang G et al. Am J Pathol 2010) により支持されると考えられる。最近、マイクロアレイチップを使い末梢血より迅速にかつ効果的に抗原特異的抗体を分泌する細胞 (antigen-specific antibody secreting cells; ASCs) を単一細胞レベルで単離する方法 (Immunospot array assay on a chip; ISAAC) を研究分担者である岸等が開発した (Jin A et al. Nat Med 2009)。ISAAC 法により B 型肝炎患者やインフルエンザ患者の末梢血よりウイルスに対する中和抗体を産生する ASCs を同定し、約 1 週間でモノクローナル抗体の獲得に成功しており、抗体療法における非常に有用な技術として注目されている (ISAAC の詳細については後述する)。

2. 研究の目的

今回、水疱性類天疱瘡患者リンパ球から ISAAC 法により BP180NC16a 領域を標的とする ASCs を単離して各細胞より産生されるモノクローナル抗体を獲得する。このモノクローナル抗体をもちいて病態の形成に強く関与するエピトープを同定する。さらに、同定されたエピトープを用いてより鋭敏に病勢を反映する検査システムの構築やこのエピト

ープを認識する抗体を標的とした特異的な抗体治療の開発を試みる。

3. 研究の方法

水疱性類天疱瘡患者末梢血からのモノクローナル抗体の分離

(1) リコンビナント BP180NC16a タンパク質の作製

正常ヒト皮膚 cDNA を鋳型とした RT-PCR 法により得た BP180NC16a 領域の cDNA を pENTR/Directional-TOPO vector に導入し、塩基配列を確認後 Gateway System を用いて大腸菌用 GST 融合発現ベクターである pDEST15 vector に組み替える。このベクターを用いて大腸菌内でリコンビナントタンパク質を誘導し、グルタチオンセファロースで精製したタンパク質を以後の実験に用いる。

(2) ELISA 用 BP180NC16a ペプチドの作製

BP180 の NC16a 領域をさらに 491-510 アミノ酸、507-525 アミノ酸、522-545 アミノ酸、542-566 アミノ酸の 4 つの領域に分け、それぞれのペプチドを作製する。

(3) BP 患者からの PBMCs の採取

臨床症状、組織学的所見、蛍光抗体法所見で BP と診断され、さらに ELISA 法により血清 BP180NC16a 抗体が検出された患者の末梢血より PBMCs を採取する。未治療の患者、約 10 名からの PBMCs の採取を目標とする。末梢血から PBMCs の分離はリンポセパールを用いる。得られた PBMCs はリコンビナント BP180NC16a 蛋白を用いた ELISPOT 解析により、抗体産生細胞の有無を確認する。

(4) ISAAC 法による BP180NC16a 領域を標的とする ASCs の同定

ELISPOT 解析で抗体産生が確認できた PBMCs を用いて、Jin A らの方法に従い (Jin A et al. Nat Med 2009) ISAAC 法を行う。ISAAC 法の概略は以下の通りである。BP180NC16a タンパク質でコーティングした直径 10 μm 深さ 15 μm のマイクロウェルに解析する細胞を入れ 3 時間培養し、抗原特異的抗体をチップ表面にトラップする。その後 Cy3 標識抗 IgG 抗体をチップに加え反応させる。抗原特異的抗体を Cy3 で、細胞を Oregon Green で標識し蛍光顕微鏡下で抗原特異的抗体の産生を確認する。

(5) モノクローナル抗体の獲得

ISAAC 法により抗体産生が確認された細胞は個々に回収され、それぞれ抗体鎖、鎖鎖に対するプライマーを用いた単一細胞 5' -RACE 法 (Ozawa T et al. Biotech 2006) により抗体可変部 cDNA を増幅させ、抗体重鎖 (H 鎖) や軽鎖 (L 鎖) の定常部領域を含有する発現ベクターに導入する。この H 鎖と L 鎖の両方の発現ベクターを HEK293T 細胞に共導入し細胞内で発現させることによりモノクローナル抗体を獲得する。

モノクローナル抗体の反応性の検証

(1) リコンビナント BP180NC16a を用いた

ELISA 法、ヒト正常皮膚を用いた蛍光抗体法、BP180NC16a タンパク質および表皮角化細胞抽出タンパク質を用いたウェスタン解析により ISAAC により得られたモノクローナル抗体が BP180NC16a を認識するかを確認する。

(2)モノクローナル抗体認識エピトープの同定

BP180NC16a を認識することが確認できた抗体は、次にそれぞれの抗体が認識するエピトープを同定する。BP180NC16a 領域を約 15 アミノ酸毎に分割し各々のペプチドを合成する。この合成ペプチドを用いた ELISA 法を行い各モノクローナル抗体が認識するエピトープを決定する。

モノクローナル抗体の病態形成能の検証

認識するエピトープ毎にモノクローナル抗体を分類し、病態形成に關与する抗体を同定する。健常人ボランティアより書面による同意を得た後、正常皮膚を採取する。得られた皮膚を nu/nu マウス背部に移植し、皮膚の生着後マウスの腹腔内に各モノクローナル抗体を投与する。

24~48 時間後、水疱形成の有無を確認する。その後マウスより皮膚を採取し、組織学的検討および免疫学的検討を行い、病態形成能を持つモノクローナル抗体を同定する。

4. 研究成果

(1)BP 患者から PBMCs の獲得

BP 患者 12 名より書面による同意を得た後、PBMCs 採取した。同時に患者血清も採取した。

(2)BP 患者血清を用いた抗体プロファイルの検討

PBMCs を採取した際に得られた血清を用いて BP180NC16a 蛋白質や BP180NC16a 領域を分割した各ペプチドを抗原とした ELISA 法を行った。その結果いずれの患者血清も複数のペプチドと反応し、また最も強く反応するペプチドも患者ごとに異なっていた。以上より BP 患者が複数の種類の抗体を有すること、患者ごとに認識するエピトープが異なる抗体を有することが確認された。尚、この過程で非典型的な臨床像や抗体を有していた患者は英文誌に報告し以後の解析には用いなかった (Matsui et al. Eur J Dermatol 2014, Hara et al. Eur J Dermatol 2014)。

(3)PBMCs からのモノクローナル抗体の単離
まず 1 名の患者 PBMCs (1×10^7 個) から ISSAC 法を用いて抗 BP180NC16a 抗体を産生している ASCs を 8 個同定した。それぞれの細胞から RT-PCR 法により IgG 抗体可変部 cDNA を増幅させ、各抗体重鎖(H鎖)や軽鎖(L鎖)を定常部領域を含有する発現ベクターに導入し、合計 240 の発現ベクターを作製した。H鎖とL鎖のコンストラクトを様々な組み合わせで HEK293T 細胞で共発現させ、その上清をリコ

ンビナント BP180NC16a 蛋白質を用いた ELISA 法に適用しモノクローナル抗体を産生している細胞をひとつ獲得した。モノクローナル抗体を産生したコンストラクトに関しては、抗体可変領域の塩基配列も確認した。

さらに多くのモノクローナル抗体を得るため他の BP 患者の PBMCs を用いて同様の実験を継続している。

(4)モノクローナル抗体の特性の解析

得られたモノクローナル抗体が認識するエピトープを同定するため BP180NC16a 領域の各種ペプチドを用いて ELISA 法を施行した。その結果、本抗体は 542-566 アミノ酸と反応した。これはこの PBMCs の提供患者の血清が最も強く反応したペプチドと一致していた。さらに、この抗体を用いて蛍光抗体間接法、ウェスタン解析を施行したが陽性所見は得られなかった。これは ELISA 法の結果から得られた細胞上清中の抗体価が低かった可能性が考えられたため、現在発現ベクター導入細胞を大量培養し大量の培養上清を濃縮し抗体の濃度を高めることを試みている。

(5)まとめと今後の展開

これまで BP180NC16a 領域を認識するモノクローナル抗体はひとつのみ得られている。現在他の BP 患者の PBMCs から抗体の獲得が継続されている。今後 BP180NC16a 領域の異なる部位を認識する抗体が得られた後、病態形成における機能の差異について比較検討し、病態形成や病勢に強く關与するエピトープ・抗体を同定する。将来的にはこれらの情報に基づき、より病勢を鋭敏に反映する検査キットや病態關連抗体を標的とした新規治療法の開発を目指す。

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9件)

Hara H, Makino T, Matsui K, Takegami Y, Koga H, Fukuda S, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T: Unusual bullous pemphigoid without infiltration of inflammatory cells in the skin lesions. Eur J Dermatol. 査読有(in press)

Makino T, Seki Y, Hara H, Mizawa M, Matsui K, Shimizu K, Shimizu T: Induction of skin lesions by ultraviolet B irradiation in a case of pemphigus erythematosus. Acta Derma Venereol. 査読有(in press)

doi: 10.2340/00015555-1781.

Matsui K, Makino T, Takegami Y, Murayama S, Seki Y, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T: Bullous pemphigoid with IgG anti-LAD-1

antibodies. *Eur J Dermatol.* 査読有
24:275-276, 2014.
doi: 10.1684/ejd.2014.2322.

Yoshihisa Y, Norisugi O, Matsunaga K, Nishihira J, Shimizu T.: Involvement of MIF in Basement Membrane Damage in Chronically UVB- Exposed Skin in Mice. *PLoS One* 9: e89569, 査読有 2014.
doi: 10.1371/journal.pone.0089569.

Norisugi O, Yoshihisa Y, Shimizu K, Shimizu T.: In vitro cytokine expression by PBMCs in herbal drug-induced skin eruption. *Acta Derma Venereol.* 査読有 94:58-62, 2014.
doi: 10.2340/00015555-1631.

Takegami Y, Makino T., Matsui K, Ueda C, Fukuda S, Hashimoto T, Shimizu T.: Coexistence of antilaminin-332-type mucous membrane pemphigoid, lamina lucida-type linear IgA bullous dermatosis and Sjogren syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 査読有 38:194-196, 2013.
doi: 10.1111/ced.12030.

Yamakoshi T, Andoh T, Makino T., Kuraishi Y, Shimizu T.: Clinical and histopathological features of itch in patients with alopecia areata patients. *Acta Derma Venereol.* 査読有 93: 575-576, 2013.
doi: 10.2340/00015555-1613.

Makino T., Furuichi M., Asano Y., Shimizu T.: A novel mutation of the KRT 10 gene in a Japanese patient with epidermolytic ichthyosis. *J. Dermatol.*, 査読有 39: 87-89, 2012.
doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01234.x.

Yoshihisa Y., Hassan M.A., Furusawa Y., Tabuchi Y., Kondo T., and Shimizu T.: Alkannin, HSP70 inducer, protects against UVB-induced apoptosis in human keratinocytes. *PLoS One*, 7: e47903, 査読有 2012.
doi: 10.1371/journal.pone.0047903.

〔学会発表〕(計 7 件)

Shimizu T., Yamakoshi T, Norisugi O. Successful treatment of lichen amyloidosis using CO2 surgical laser. World Laserology Congress, Joint Congress of The 5th International Phototherapy Association (IPTA), International Society for Laser Surgery and Medicine (ISLSM), World Federation of Societies for Laser Medicine and Surgery (WFLSMS) ; 2013 Sep 20-21 ; Vilnius, Lithuania.

Takegami Y, Makino T., Matsui K, Ueda C, Fukuda S, Hashimoto T, Shimizu T. Coexistence of antilaminin-332-type mucous membrane pemphigoid, lamina lucida-type linear IgA bullous dermatosis and Sjogren syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 2013 Mar ; 38 (2) : 194-6.

原 寛, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 竹上與志昌, 古賀浩嗣, 福田俊平, 石井文人, 橋本隆, 清水忠道. 好中球優位の細胞浸潤を認めた水疱性類天疱瘡の 2 例. 第 438 回日本皮膚科学会北陸地方会 ; 2013 Jun 23 ; 金沢 .

関 友里, 牧野輝彦, 原 寛, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. 紫外線曝露により増悪した紅斑性天疱瘡の 2 例. 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 ; 2013 Nov 2 - 3 ; 名古屋 .

竹上與志昌, 牧野輝彦, 上田智恵子, 松井恒太郎, 清水忠道. 福田俊平, 橋本 隆: 抗ラミニン 3 抗体と抗 LAD-1 抗体を検出した粘膜類天疱瘡の 1 例. 第 432 回日本皮膚科学会北陸地方会, 2011, 12, 11, 福井 .

清水忠道. アトピー性皮膚炎と眼疾患 炎症性サイトカイン MIF との関連 . 第 2 回眼と全身疾患セミナー in 札幌 (特別講演) ; 2013 Dec 18 ; 札幌 .

Makino T., Yamamoto M., Yamakoshi T., Rahaman MR., Hibino T., and Shimizu T.: An analysis of profilaggrin N-terminal fragment function in keratinocyte terminal differentiation. The 72nd Annual Meeting the Society for Investigative Dermatology, 2012, 5, 9-12, Raleigh, North Carolina USA.

〔図書〕(計 4 件)

Shimizu T., Kondo T. Editors. Cellular Response to Physical and Chemical Stress and Therapeutic Applications. New York : Nova Science Publishers, Inc; 2013. p. 1-204.

Yoshihisa Y, Shimizu T.: HSP70 inducers protect against ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. “Cellular Response to Physical and Chemical Stress and Therapeutic Applications” edited by Tadamichi Shimizu and Takashi Kondo, 83-99, Nova Science Publishers, Inc, New York. 2013.

Yoshihisa Y, Shimizu T. Platinum: Compounds Production and Applications. Nova Science Publishers, Inc, New York: edited by Varennikov L, Yedemsky E; 2013. Chapter 5, Platinum nanoparticle and

inflammation; p. 115-22.

Shimizu T.: Macrophage migration inhibitory factor overexpression accelerates photocarcinogenesis in the skin. p143-156, "Skin Cancers- Risk Factors, Prevention and Therapy", edited by Caterina AM La Porta. InTech Publisher, Rijeka, 2011.

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 忠道 (SHIMIZU TADAMICHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授
研究者番号：70260396

(2) 研究分担者

岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号：60186210

(3) 研究分担者

牧野 輝彦 (MAKINO TERUHIKO)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号：90359711