

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791291

研究課題名（和文） ファージ提示法を基礎技術とした天疱瘡における自己抗体の解析

研究課題名（英文） Analysis of autoantibodies in pemphigus using phage display

研究代表者

山上 淳 (YAMAGAMI JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80327618

研究成果の概要（和文）：

天疱瘡は、皮膚の角化細胞同士の接着分子であるデスマogleイン（Dsg）に対する自己抗体により生じる自己免疫疾患である。本研究では、ファージ提示法を用いたモノクローナル抗体の単離を基礎技術として、Dsg 前駆体（preDsg）に対する自己抗体の解析と天疱瘡における「病原性決定領域」の検討を行った。主な成果として、落葉状天疱瘡を風土病とするチュニジアの一部で、健常人でも preDsg に対して自己抗体が産生されることを示すことができたので、天疱瘡発症機序の解明につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：

Pemphigus is an autoimmune bullous disease caused by autoantibodies against desmoglein (Dsg), an adhesion molecule between keratinocytes. In this study, we tried to investigate autoantibodies against the precursor form of Dsg (preDsg) and the pathogenicity-determining regions in pemphigus using phage display. As a main achievement, we showed and analyzed anti-preDsg autoantibodies in healthy individuals in an area in Tunisia, where pemphigus foliaceus is endemic. Our detection may help to elucidate the development mechanism of pemphigus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、自己抗体、自己免疫

1. 研究開始当初の背景

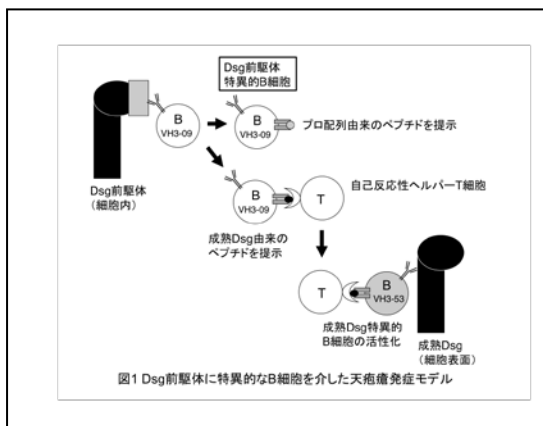
天疱瘡は、皮膚の角化細胞同士の接着分子であるデスマogleイン（Dsg）に対する自己抗体により生じる自己免疫疾患である。標的抗原である Dsg の遺伝子がクローニングされ、その cDNA から抗原の組み換え蛋白が作られるようになって以来、ELISA 法の開発や抗体エピトープの解析、天疱瘡モデルマウスの開発など、天疱瘡の病態の解明が進んでいる。しかし、自己抗体の具体的な作用については、天疱瘡患者の持つ抗 Dsg 抗体がポリクローナルであるため解析が困難であった。近年、複数の方法で Dsg に対するモノクローナ

ル抗体（mAb）が単離されるようになり、mAb ごとに異なる多様な抗原への反応性（エピトープ、抗原への親和性、病原性など）を利用して天疱瘡の病態を解明するためのアプローチが可能になってきた。申請者は、ファージ提示法を用いて天疱瘡患者の末梢血から Dsg に対する mAb を単離し、その性質の解析を行ってきた。その成果をもとに、1)Dsg の前駆体に対する自己抗体の解析、2)天疱瘡における「病原性決定領域」の検討、という 2 つの計画を立案した。

2. 研究の目的

(1) Dsg 前駆体に対する自己抗体の解析

Dsg は、小胞体で前駆体 (precursor Dsg: preDsg) として生成される時は、細胞内での重合を避けるために N 末端に分子間の結合を阻害するプロ配列が付着しているが、細胞表面に輸送される間にゴルジ体でプロテアーゼの作用を受けてプロ配列の部分がはずれて成熟タンパク (mature Dsg: matDsg) となり、デスモゾームを構成して細胞間接着に関与する。申請者らは、天疱瘡患者から細胞表面にある matDsg と細胞内にある preDsg の両方に対する mAb が単離されることに着目して、健康人の末梢血リンパ球からもファージ提示法を用いて preDsg に対する mAb が単離されることを報告し、健康人においても preDsg に特異的な B 細胞が存在して preDsg に対する抗体を産生している可能性を示した。この preDsg 特異的 B 細胞は、患者が天疱瘡を発症する (matDsg に対する抗体を産生する) 前の段階で、図 1 のように自己反応性 T 細胞に抗原提示するなどの重要な役割を果たしている可能性が考えられた。本研究では、天疱瘡発症前の段階における preDsg 特異的 B 細胞および preDsg に対する自己抗体の解析を進めることで、天疱瘡の発症における役割を究明することをめざした。



(2) 天疱瘡における「病原性決定領域」の検討

Dsg の細胞外ドメインは EC1 から EC5 に分かれており、特に EC1 は N 末端に位置し、Dsg 同士の接着に最も寄与すると考えられている。申請者が所属する研究室では、天疱瘡モデルマウスから複数の Dsg3 に対する mAb の分離に成功しており、その中でヒト Dsg3 に対しても強い病原性を発揮する mAb は、EC1 の N 末端に結合することがわかった。C-カドヘリンの結晶構造からは、この部分は向かい合うカドヘリン同士の結合にとって鍵と鍵穴のような構造になっていると推測され、同部に変異が起きると接着を保てなくな

ることから、カドヘリン同士の結合に不可欠な部分とされている。Dsg の結晶構造はまだ発表されていないが、アミノ酸配列上は鍵にあたる部分のトリプトファンと鍵穴にあたる部分の酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列は C-カドヘリンとの共通点が多く、Dsg においてもこの部分の結合における重要性は一致していると推測される。一方で、病原性のない抗体は Dsg3 の EC2 より C 末端側のエпитオプを認識することが示され、病原性のある mAb が結合する Dsg3 の EC1 の N 末端は、患者の体内においても自己抗体が結合することで水疱を起こす重要な部分 (“hot spot”) である可能性が高いと考えている。

また申請者らは、ファージ提示法を用いて複数の天疱瘡患者から分離した、病原性のある Dsg に対する mAb の間に共通の構造が見られることを示した。抗体の可変領域には、多様性に富み抗原との結合性を左右する相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) があるが、病原性のある mAb の間で、重鎖の CDR3 のアミノ酸配列 (トリプトファンと酸性アミノ酸からなる配列) に共通点が見られた。その配列の一部に変異を加えて反応性の変化を観察すると、病原性のある mAb のごく一部を置換するだけで病原性が失われることがわかり、特にトリプトファンが重要な役割を果たしていることが示された。

以上のことから、抗原側、抗体側のいずれにも、「病原性決定領域」 (“hot spot”) があることが示唆されている。本研究では、この “hot spot” を追究することによる天疱瘡の病態解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) Dsg 前駆体に対する自己抗体の解析

今まで用いられてきた Dsg 組み換えタンパクは、バキュロウイルス発現系を用いていたため preDsg と matDsg が混在しており、それぞれのタンパクに対する抗体のみを評価するのは困難であった。本研究では、哺乳動物細胞 (CHO 細胞) によるタンパク発現系を用いて、preDsg1 および matDsg1、preDsg3 および matDsg3 のみの組み換えタンパクを作成し、より精密な検討を行った。特に天疱瘡発症前の血清、健康人の血清から抗 Dsg1 抗体が検出された報告のある地域の血清、preDsg が大量に免疫系に暴露された可能性のある血清などを中心に、preDsg に特異的な抗体のスクリーニングを行った。

(2) 天疱瘡における「病原性決定領域」の検討

複数の天疱瘡患者の末梢血リンパ球から、ファージ提示法を用いて病原性のある mAb の単離を行った。

4. 研究成果

(1) Dsg 前駆体に対する自己抗体の解析

落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus; PF) が風土病であるチュニジアの一部では、しばしば健常人から Dsg1 に対する抗体が ELISA で検出される。蛍光抗体法で PF に特徴的な表皮細胞間の IgG 沈着を示さないことから、チュニジアの健常人は preDsg1 に対する抗体を持つと予測された (図 2)。

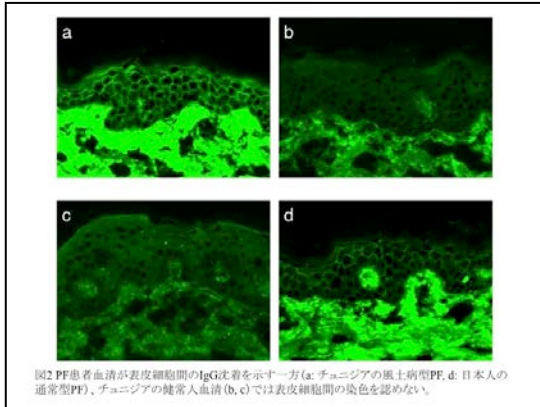


図2 PF患者血清が表皮細胞間のIgG沈着を示す一方(a:チュニジアの風土病型PF, d:日本人の通常型PF)、チュニジアの健常人血清(b, c)では表皮細胞間の染色を認めない。

さらに PF 発症前に見られる抗 Dsg1 抗体の特徴と意義を検討するため、CHO 細胞で作成した preDsg1 と matDsg1 の組み換えタンパクを用いて、チュニジア健常人 (n=16) および風土病型 PF 患者 (n=9)、日本人の通常型 PF 患者血清 (n=9) の反応性を免疫沈降法で評価した。チュニジア健常人における抗 Dsg1 抗体は、preDsg1 のみに反応するか、preDsg1 に対して matDsg1 よりも強い結合性を示した。一方で、すべてのチュニジア人および日本人の PF 血清は、preDsg1 と matDsg1 に同等の反応もしくは matDsg1 により強い反応性を示した (図 3)。

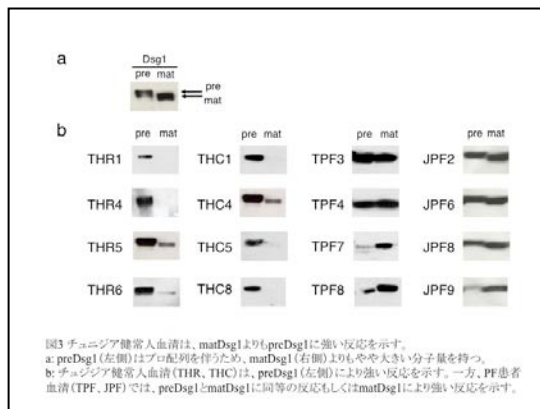


図3 チュニジア健常人血清は、matDsg1よりpreDsg1に強い反応を示す。
a: preDsg1(左側)はプロ配列を伴うため、matDsg1(右側)よりもやや大きい分子を持つ。
b: チュニジア健常人血清(THR, THC)は、preDsg1(左側)により強い反応を示す。一方、PF患者血清(TPF, JPF)では、preDsg1とmatDsg1に同等の反応もしくはmatDsg1により強い反応を示す。

またチュニジア健常人における抗 Dsg1 抗体のエピトープは、Dsg1 の C 末端に近い EC3 から EC5 が中心であったが、チュニジア人の PF では細胞外ドメイン全体に広がっており、発症時には N 末端の EC1 と EC2 にも反応性

が拡大していた (図 4)。

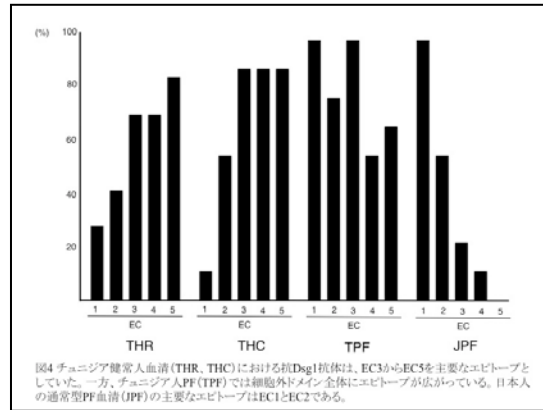


図4 チュニジア健常人血清(THR, THC)における抗Dsg1抗体は、EC3からEC5を主要なエピトープとしていた。一方、チュニジア人PF(TPF)では細胞外ドメイン全体にエピトープが広がっている。日本人の通常型PF血清(JPF)の主要なエピトープはEC1とEC2である。

この結果から、近年の研究で示唆されてきた健常人における preDsg 特異的 B 細胞の存在を支持するとともに、状況により preDsg に対する自己抗体も産生されうることを示した点で意義深いと考えられた。またチュニジア人の風土病型 PF で、発症時に Dsg1 分子 N 末端の EC1 と EC2 に反応性が拡大したのに対して、日本人の通常型 PF では発症と同時に Dsg1 の N 末端に対する自己抗体が出現していたことから、通常型と風土病型の PF では発症機序が異なる可能性が示唆された。

(2) 天疱瘡における「病原性決定領域」の検討

複数の天疱瘡患者から末梢血リンパ球を分離し、B 細胞表面に発現している膜型 IgG の cDNA のライブラリーを構築した。現在、Dsg に結合する mAb を選別中である。

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 2 件)

1. Toumi A, Saleh MA, Yamagami J, Abida O,

Kallel M, Masmoudi A, Marki S, Turki H, Hachiya T, Kuroda K, Stanley JR, Masmoudi H, Amagai M

Autoimmune reactivity against precursor form of desmoglein 1 in healthy Tunisians in the area of endemic pemphigus foliaceus.

Journal of Dermatological Science 70: 19-25, 2013; 査読有り

doi:10.1016/j.jdermsci.2013.02.002

2. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Shirakata Y,

Hashimoto K, Amagai M

Pathogenic anti-desmoglein 3 mAbs cloned from a paraneoplastic pemphigus patient by phage display.

Journal of Investigative Dermatology 132: 1141-1148, 2012; 査読有り
doi: 10.1038/jid.2011.449.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Toumi A, Saleh MA, Yamagami J, Abida O, Kallel M, Masmoudi A, Marki S, Turki H, Hachiya T, Kuroda K, Stanley JR, Masmoudi H, Amagai M

Antibodies against desmoglein 1 in healthy Tunisians in the area of endemic pemphigus foliaceus are mostly against the precursor molecule.

The 75th Annual meeting of Society for Investigative Dermatology, 平成24年5月9日, ノースカロライナ州ローリー, 米国)

2. 山上淳, Toumi A, Saleh MA, 蜂矢隆久, 黒田慶子, Stanley JR, Masmoudi H, 天谷雅行
風土病型落葉状天疱瘡の発症前におけるデスマoglein 1前駆体に対する抗体
第19回分子皮膚科学フォーラム, 平成24年4月13日, 青森)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山上 淳 (YAMAGAMI JUN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80327618