

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30日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791299

研究課題名（和文）IEN型IgA天疱瘡と基底板上部型線状IgA水疱性皮膚症の未知抗原の同定

研究課題名（英文）Analysis of the autoantigen for IEN type of IgA pemphigus and sublamina densa type of linear IgA Dermatitis

研究代表者

土坂 享成 (TUCHISAKA ATUNARI)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：50599313

研究成果の概要（和文）

Intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型 IgA 天疱瘡は、抗原が同定されていない自己免疫性水疱症の一つである。このような IgA を自己抗体とする抗原の同定は、非常な困難が伴う。通常の免疫ブロットでの検索が不可能であり、免疫沈降法も従来の方法は、IgG 抗体に対するシステムがほとんどであり、IgA 抗体に対する抗原の解析には使用することができない。そこで本研究では、IgA と高い親和性を有するアガロースビーズを用いた新しい免疫沈降法を開発することより目的抗原の分離を行い、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ことにした。IEN 型 IgA 天疱瘡患者血清と、抗原産生を確認した KU-8 細胞を用いて免疫沈降を行った結果、患者血清に特異的なバンドを検出し、質量解析により、このバンドの蛋白が transmembrane secretory component (TSC) であることを確認した。蛍光抗体法により皮膚表皮における TSC の存在を確認したことと、TSC が膜貫通蛋白の一種であり、IgA の輸送に関与する蛋白であることから、TSC を IEN 型 IgA 天疱瘡抗原の候補蛋白として、数種類の TSC リコンビナント蛋白を作製して様々な実験を行った。この結果、TSC は IgA との結合能力を有するが、患者血清中の抗体との抗原-抗体反応は認められなかった。このことから、TSC は IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原でないことが確認された。また、IgA 抗体に対する抗原の検索に際して、TSC がその検索を阻害する可能性も示された。最後に、IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原ではなかったが、皮膚表皮において TSC の存在が認められたことから、TSC が表皮において何らかの役割を果たしている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）

In this study, to identify unknown autoantigen for intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis type IgA pemphigus (IEN), we performed a new immunoprecipitation (IP), in which biotinylated KU-8 cell extract was precipitated by peptide M agarose, that has specific binding ability to human IgA. By the IP combined with mass spectrometry, we identified transmembrane secretory component (TSC) as a candidate. TSC was attractive as an antigen for IEN, because TSC delivers IgA in the mucosae. Polyclonal antibody (pAb) to TSC

reacted with the epidermis in immunofluorescence (IF). We isolated human TSC cDNAs by PCR using KU-8 cell mRNA, and produced full-length eukaryotic TSC recombinant protein (RP) in COS-7 cells. Surprisingly, the full length TSC RP was recognized by both IEN IgA and normal IgA in both IP and IF studies, indicating that TSC has general binding ability to IgA. To detect antigen-specific binding by IEN IgA, we prepared several TSC cDNA constructs lacking N- or C-terminal region. All TSC pAb, IEN IgA and normal IgA reacted with TSC RPs without C-terminus, like full length TSC. In contrast, TSC RP without N-terminus was recognized by TSC pAb but not by normal IgA, indicating that this RP lacks IgA-binding domain. However, IEN IgA also lost binding ability to this RP, suggesting that IEN IgA did not react with TSC via antigen-antibody reactivity. Nevertheless, this study should be important, because this is the first study to show the presence of TSC in keratinocytes and to indicate the important role of TSC in immunity not only in the mucosae but also in the skin. Therefore, the TSC cDNA clones should be useful tools for the future studies of TSC functions in the epidermis. This study also indicates that TSC may hamper detection of antigens for IgA autoantibodies.

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：①皮膚診断学 ②皮膚正科学 ③免疫沈降

1. 研究開始当初の背景

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。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。自己免疫学的機序により、前者では表皮細胞間接着の障害を、後者では表皮真皮間接着の障害を生ずる。

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。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は、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。

IgA 抗表皮細胞膜自己抗体を示す IgA 天疱瘡は、大きく subcorneal pustular dermatosis (SPD) 型と intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型に分けられる。SPD 型は病理学的に角層下に膿疱を認め、IEN 型はひまわりの花様と称される膿疱性皮疹を呈する。蛍光抗体法における IgA 抗表皮細胞抗体は、SPD 型では表皮上層のみに反応し、IEN 型では表皮全層に反応する。これまでの

研究により、SPD 型の IgA 天疱瘡の自己抗原はデスマコリン 1 であることが当講座において証明された。しかし、IEN 型の IgA 天疱瘡の抗原は未だ同定には至っていない。これは、IgA 抗体の検出技術が進んでいないことに起因する。しかし、免疫電顕の結果から、デスマソーム部以外に存在する細胞膜蛋白である可能性が示唆されている。

一方、同様に IgA を自己抗体とする線状 IgA 水疱性皮膚症は、症状としては疱疹状皮膚炎と類似することが多いが、直接蛍光抗体法により基底膜部への IgA の線状沈着が認められることから疱疹状皮膚炎とは区別されている。線状 IgA 水疱性皮膚症は、透明層型 (lamina lucida 型) と基板下部型 (sublamina densa 型) の 2 つに分類される。透明層型は、食塩水剥離皮膚を用いた間接抗体法で表皮側に結合する IgA が検出され、その抗原蛋白は BP180 の分解産物であることが証明されている。基板下部型は、真皮側に結合する IgA が検出されるが、その標的抗原は不明であり、VII 型コラーゲンに対する IgA を検出する症例が少数あるのみである。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、各種の免疫学的、生化学的、分子生物学的手法を駆使することにより、新たな IgA 自己抗体に対する抗原の解析方法を開発して、従来では検出が困難であった問題を克服し、IEN 型 IgA 天疱瘡の自己抗原を同定することを目的とする。そして、本研究で確立する新しい解析方法が、他の未知抗原解析に応用可能であるかを確認するため、同様に IgA を自己抗体とする基板下部型線状 IgA 水疱性皮膚症の抗原解析を行う。

3. 研究の方法

通常免疫ブロット法を用いた検索では、IgA 自己抗体の抗原を検出することは不可能であることが分かっており、この抗原が免疫ブロット法では検出することができない、高次構造依存性の抗原であることが想定される。通常、このような抗原を検出する手法として免疫沈降法が一般的に使用される。しかし、現在汎用されている本方法は、IgG 抗体に対するシステムがほとんどであり、本疾患のような IgA 自己抗体に対する抗原の解析には使用することができない。そこで本研究では、IgA と高い親和性を有するペプチド M アガロースビーズを用いた新しい免疫沈降法を開発することにより、IgA 抗体が反応する自己抗原の同定を試みた。免疫沈降法で得られた患者血清に特異的に反応する蛋白を、二次元電気泳動等により分離した後、質量解析により候補蛋白を選定した。その後、一般的な分子生物学的手法に基づき、実験供与細胞から total-RNA を抽出し、RT-PCR により、その候補蛋白の cDNA をクローニングした。得られた cDNA を発現ベクターに組み込み、各種の細胞に導入した後、蛍光抗体法や免疫沈降法等により、候補蛋白が抗原であるか否かを検討した。

4. 研究成果

これまでの検討の結果、3 つの IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原候補蛋白を新しく開発した免疫沈降法により見つけ、リコンビナント蛋白等を使った様々な検討を行ったが、IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原である可能性は低いという結果となった。また、候補蛋白の一つとして見つけた transmembrane secretory component (TSC) は、患者血清のみならず正常者血清の IgA と結合するため、この蛋白が免疫沈

降法を用いた IgA 抗体に対する自己抗原の解析に障害となる可能性が予想された。実際、様々な条件で行った免疫沈降のほぼ全てにおいて、TSC と思われる反応が患者・正常者血清双方で認められた。これらのことから、免疫沈降法とは別の方法による抗原検索が必要と考えられる。一方で、分子生物学・生化学的に皮膚における TSC の存在が証明された。今後、皮膚における TSC の役割を調べる上で、抗原解析のために作成した種々の TSC リコンビナント蛋白の発現ベクター等が役に立つと思われる。

基板下部型線状 IgA 水疱性皮膚症の抗原解析では、当初の予定では IEN 型 IgA 天疱瘡の抗原解析によって確立した免疫沈降法を応用することになっていた。しかしながら、これまでに様々な細胞株を調べたが、この疾患の抗原を産生している細胞株を見つけることが出来なかった。真皮抽出液での免疫沈降も考えたが、真皮抽出液は強力な界面活性剤を使用することで作製することでしか得られないため、免疫沈降には不適である。また、サンプルとしての真皮にも限りがある。そのため、仮に免疫沈降を行うにしても、その条件検討を十分に行うことが出来ないと考えられた。これらの理由から免疫沈降法での解析は難しいと判断したため、まず始めに真皮抽出液での免疫ブロットによる解析を試みた。その結果、特異的なバンドが幾つかの患者血清において認められたため、このバンドの MS 解析を行ったところ、Prolagin (PRELP) であることが判明した。そして、この蛋白のリコンビナント蛋白を作製して免疫ブロットを行ったところ、患者血清において反応が認められた。今後、更に検討を行い、この蛋白が抗原であるか否かを確認していく予定である。

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 1 件) (査読付き)

(1) Tsuchisaka A, Ishii N, Hamada T, Sogame R, Koga H, Tsuruta D, Ohata C, Furumura M, and Hashimoto T. Polymeric immunoglobulin receptor hampers identification of IgA antibodies-reactive epidermal autoantigen
PLOS ONE
submitted at 4.23.2013

[学会発表] (計 3 件)

(1) 土坂享成、石井文人、古賀浩嗣、濱田尚宏、大畑千佳、古村南夫、橋本隆。
自己免疫性水疱症の新規自己抗原同定。
第 20 回分子皮膚科学フォーラム
2013 年 4 月 12-13
東京

(2) Tsuchisaka A, Ishii N, Koga H, Hamada T, Ohata C, Furumura M, and Hashimoto T. An attempt to identify antigen for IgA pemphigus accidentally showed the presence of transmembrane secretory component in keratinocytes.
The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology.
December 7-9.2012
Okinawa, Japan.

(3) Tsuchisaka A, Ishii N, and Hashimoto T.
Analysis of autoantigen for IgA-related bullous skin diseases.
International Mini Symposium for Bullous Diseases in Kurume.
October 14. 2011
Kurume, Japan.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

土坂 享成 (TUCHISAKA ATUNARI)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：50599313

(2)研究分担者

該当者なし

研究者番号：