

機関番号：3 2 6 4 3

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 1 3 2 8

研究課題名（和文）天疱瘡モノクローナル一本鎖抗体を用いた新規の客観的重症度評価法の開発

研究課題名（英文）Development of new objective methods to assess disease activity in pemphigus using monoclonal single-chain- variable-fragment antibodies

研究代表者

石井 健 (KEN ISHII)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：5 0 2 9 6 6 7 0

研究成果の概要（和文）：

天疱瘡の重症度を客観的に測定、評価する方法の開発を目的として、落葉状天疱瘡患者からファージディスプレイ法を用いて単離してきた多数のモノクローナル抗デスモグレイン(Dsg) 1 抗体の詳細なエピトープ解析を行った。天疱瘡患者血清中の自己抗体が認識するデスモグレイン分子上の主要な部位が明らかになった。また、多くの症例において主要認識部位に対する抗体の反応性が病勢と相関する傾向にあった。本研究の成果は、天疱瘡の重症度を客観的に評価する方法の開発につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In order to develop new objective methods to assess the disease activity in pemphigus, we performed the detailed characterization of repertoires of monoclonal anti-desmoglein (Dsg) 1 autoantibodies isolated from a pemphigus foliaceus patient by phage display. Major epitopes on desmoglein bound by autoantibodies in many pemphigus patients were uncovered. The reactivity against the epitopes by pemphigus sera correlates with the disease activity. These findings will facilitate the development of new objective methods to assess the disease activity in pemphigus patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

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：皮膚科学、皮膚診断学、自己免疫性疾患

1. 研究開始当初の背景

落葉状天疱瘡は、抗体を介する自己免疫性

水疱性疾患であり、その自己抗原は、デスモゾームに存在するカドヘリン型の細胞接着

因子であるデスマグレイン 1 (Dsg1) である。落葉状天疱瘡血清中の抗 Dsg1・IgG 自己抗体が表皮細胞間接着阻害を誘導し、水疱形成すると理解されている。落葉状天疱瘡の現在の治療は、他の自己免疫性疾患と同様に副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤など免疫を非特異的に抑制する治療法が中心である。将来的に、より病気特異的な治療法を開発するには、病気を誘導する自己抗体の詳細な解析が必要不可欠である。

申請者らは、自己抗体の詳細な解析を目的として、ファージディスプレイ技術を用いて落葉状天疱瘡患者リンパ球よりファージ抗体ライブラリを作成し、抗 Dsg1・モノクローナル一本鎖抗体を複数単離し、自己抗体レパートリを作成した。そして、病的活性を有する抗 Dsg1 抗体を 2 種類単離するのに世界に先駆けて成功している。(Ishii K et al. J Invest Dermatol, 2008) また、天疱瘡抗体には多様性があり、病的活性を持つ抗体、持たない抗体があることを証明した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、単離された病的モノクローナル抗体の詳細なエピトープ解析と、また、それらの病的モノクローナル抗体を用いて、天疱瘡患者血清の病的エピトープへの反応性を評価する方法を開発することである。そして、最終的には、天疱瘡の重症度を客観的に測定、評価する方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- 1) 病的活性を有する抗 Dsg1 抗体のエピトープの同定。Dsg1/Dsg3 ドメインスワッピング蛋白、または、ポイント変異を導入した Dsg1 蛋白によるエピトープマッピング。
- 2) 落葉状天疱瘡患者血清の病的エピトープへの反応性の検討と病勢の相関性を解析する。competition ELISA 法、epitope masking

により天疱瘡血清中病的抗体のみを測定する。

- 3) 病的抗体が Dsg1 に結合する反応をブロックするペプチドまたは、抗イデオタイプ抗体の単離。

4. 研究成果

天疱瘡の重症度を客観的に測定、評価する方法の開発を目的として、落葉状天疱瘡患者からファージディスプレイ法を用いて単離してきた多数のモノクローナル抗デスマグレイン 1 抗体の詳細なエピトープ解析を行った。

天疱瘡自己抗原であるデスマグレイン (Dsg) は前駆体 pro-Dsg の形で生成され、プロセッシング (前駆体切断) により細胞間接着機能を持つ成熟 Dsg (mature-Dsg) となる。病的活性を持つ抗 Dsg1 モノクローナル抗体は、mature-Dsg1 のみに結合した。病的活性を持たない抗 Dsg1 モノクローナル抗体は、proDsg と matureDsg の両者、もしくは、proDsg のみを認識した。さらに、詳細なエピトープ解析により、病的活性を有する抗体はデスマグレインのアミノ末端側を認識していることが判明した。

さらに、競合 ELISA 法を用いて、PF、PV 患者血清が病的活性を持つ抗 Dsg1. モノクローナル抗体が認識するエピトープと共通の部位を認識するか検討する。まず、PF、PV 血清を competitor として用いて抗 Dsg1 モノクローナル抗体の結合が阻害されるかを確認する。また逆に、一本鎖抗体を competitor として用いて、一本鎖抗体を加えることにより天疱瘡血清の Dsg1 への反応性が阻害されるかどうかを検討する。天疱瘡自己抗体の大部分は、Dsg プロセッシングで露呈される部位を認識した。この結果は、天疱瘡における水疱形成機序を理解するのに役立つ。すなわち、

病的抗体がデスモグレインに結合することにより直接デスモグレインの細胞接着機能を阻害することにより水疱形成を誘導するという仮説を支持するものである。

天疱瘡患者血清中自己抗体の mature-Dsg および pro-Dsg に対する反応性の経時的推移と病勢との相関を検討した。多くの症例において、mature-Dsg に対する反応性がより病勢を反映する傾向が認められた。少数の症例において、pro-Dsg に対する反応性が病勢と相関しない症例が認められた。従って、mature-Dsg のみを抗原とした ELISA 法はより病勢を反映した検査法になると考えられた。

また、病的活性を有する抗体を用いてファージ抗体ライブラリをスクリーニングし、病的抗体の抗原結合部位に結合する抗イデオタイプ抗体の候補が数個単離されてきており、病原性の阻害活性に関して検討中である。

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 5 件)

- ①Yamagami J, Payne AS, Kacir S, Ishii K, Siegel DL, Stanley JR. Homologous regions of autoantibody heavy chain complementarity-determining region 3 (H-CDR3) in patients with pemphigus cause pathogenicity. *J Clin Invest.* 120(11):4111-7, 2010. 11. (査読有)
- ②Chan PT, Ohyama B, Nishifuji K, Yoshida K, Ishii K, Hashimoto T, Amagai M. Immune response towards amino-terminus of desmoglein 1 prevails across different activity stages in nonendemic pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol.* 162(6):1242-50, 2010. 06. (査読有)
- ③Yamagami J, Kacir S, Ishii K, Payne AS, Siegel DL, Stanley JR. Antibodies to the

desmoglein 1 precursor proprotein but not to the mature cell surface protein cloned from individuals without pemphigus. *J Immunol.* 183(9):5615-21, 2009. 11. (査読有)

- ④Yokouchi M, Saleh MA, Kuroda K, Hachiya T, Stanley JR, Amagai M, Ishii K. Pathogenic epitopes of autoantibodies in pemphigus reside in the amino-terminal adhesive region of desmogleins which are unmasked by proteolytic processing of prosequence. *J Invest Dermatol.* 129: 2156-216 2009. 09. (査読有)
- ⑤Ishii K, Lin C, Siegel DL, Stanley JR. Isolation of Pathogenic Monoclonal Anti-Desmoglein 1 Human Antibodies by Phage Display of Pemphigus Foliaceus Autoantibodies. *J Invest Dermatol.* 128(4): 939-948, 2008. 04. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ①石井健
天疱瘡における ELISA 法による血清診断と PDAI による重症度判定
シンポジウム 3 「自己免疫水疱症の診断・治療 2010」
第 62 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、倉敷、2010. 10. 24
- ②Ishii K, Yokouchi M, Saleh MA, Amagai M. The majority of anti-desmoglein autoantibodies in pemphigus target epitopes which are unmasked by proteolytic processing of prosequence. The 4th joint meeting of Japanese dermatology association and Australasian college of Dermatologists, Sapporo, Japan, 2009. 07.
- ③ Ishii K, Pathogenic pemphigus

autoantibodies target the amino-terminal adhesive sites of desmogleins which are unmasked by proteolytic processing of prosequence. International Pemphigus Meeting, Berne, Switzerland, 2009. 06

④ 石井 健、横内麻里子、Marwah Adly、黒田慶子、蜂矢隆久、天谷雅行
デスマogleイン (Dsg) ELISA 法の改良を目指した天疱瘡自己抗体の病的エピトープの解析 第822回日本皮膚科学会東京支部研究地方会, 東京, 2008. 12

⑤ Ishii K, Adly M, Yokouchi M, Stanley JR, Amagai M: Two pathogenic anti-desmoglein 1 (Dsg1) monoclonal antibodies isolated from one pemphigus foliaceus (PF) patient define major Dsg1 epitopes recognized by most pemphigus patients. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, Japan, 2008. 05

⑥ Yokouchi M, Ishii K, Stanley JR, Amagai M. Proteolytic processing of precursor desmoglein 1 (Dsg1) unmasks pathogenic epitopes. Post IID 2008 satellite international meeting on autoimmune bullous diseases, Otsu, Japan, 2008. 05.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 健 (ISHII KEN)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号: 50591328

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし