

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591628

研究課題名(和文) 詳細な自己抗体解析による腫瘍随伴性天疱瘡の病態解明

研究課題名(英文) detailed characterization of autoantibodies in paraneoplastic pemphigus by phage display

研究代表者

石井 健 (ISHII, Ken)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：50296670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：難治性である腫瘍随伴性天疱瘡の病態解明を目的として、ファージディスプレイ技術を用いて患者リンパ球より抗デスモグレイン3(desmoglein 3, Dsg3)モノクローナル一本鎖抗体を複数単離し自己抗体の詳細な解析を行った。アミノ酸配列により単離された抗体は4群に分類された。抗体はDsg3の中央部のEC2-3領域を認識していた。また、3つの抗体が細胞接着阻害活性を持っており、抗体により細胞接着阻害活性に違いがあることが明らかになった。単離されたモノクローナル抗体は患者血清中の抗体の特性を反映しており、腫瘍随伴性天疱瘡の病態解明に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To study the pathogenic mechanism of paraneoplastic pemphigus(PNP), we used phage display to clone monoclonal anti-Dsg3 antibodies from a PNP patient. We isolated 20 unique Dsg3-reactive mAbs, which we classified into four groups according to amino acid sequence. Pathogenic assay showed that three antibodies displayed pathogenic activity in blister formation with different potencies. Epitope mapping showed that these pathogenic mAbs bound Ca(2+)-dependent conformational epitopes in the middle portion of the extracellular region of Dsg3. These mAbs reflect the unique polyclonal nature of anti-Dsg3 antibodies in PNP and represent an important tool for detailing the pathophysiological mechanisms of blister formation in PNP.

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 自己免疫性疾患 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は、抗体を介する自己免疫性水疱性疾患であり、尋常性天疱瘡 (PV) と落葉状天疱瘡 (PF) の2型に大別される。その自己抗原は、それぞれデスモグレイン 3 (desmoglein 3, Dsg3) と Dsg1 であり、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。また、新しく提唱された疾患群として腫瘍随伴性天疱瘡 (paraneoplastic pemphigus, PNP) がある。腫瘍随伴性天疱瘡は、悪性または良性の血液系腫瘍 (主にリンパ球系増殖性疾患) に伴い、びらんを主体とする重篤な粘膜病変と多彩な皮膚症状を呈し、その臨床経過は予後不良のことが多い。デスモグレインおよびプラキン分子に対する IgG 自己抗体を有する。

申請者は、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、尋常性天疱瘡、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 Dsg3 および、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、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

本研究では天疱瘡のもうひとつの亜型である腫瘍随伴性天疱瘡に注目し、自己抗体の詳細な解析を通じてこの難治性疾患の病態解明を目的とする。

具体的には 1) 腫瘍随伴性天疱瘡のファージ抗体ライブラリの免疫化学的特性と抗体遺伝子解析 2) 腫瘍随伴性天疱瘡患者の血清を用いたエピトープマッピング 3) 尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡との比較を行う。以上のことを施行することにより腫瘍随伴性天疱瘡の発症機序が明らかになりより疾患特異的治療の開発に役立つことが期待される。

## 3. 研究の方法

1) 腫瘍随伴性天疱瘡のファージ抗体ライブラリの作成と抗デスモグレイン 3 モノクローナル抗体の単離

腫瘍随伴性天疱瘡患者より単離した末梢血単核球より mRNA を抽出、ファージディスプレイ技術をもちいてイムノグロブリンの重鎖、軽鎖をリンカーで連結した一本鎖抗体をファージ表面に提示するファージ抗体のライブラリを作成する。この抗体ライブラリを Dsg3 ELISA プレートを用いて Dsg3 に反応するファージ抗体を単離する。

2) ファージ抗体の免疫化学的特性と抗体遺伝子解析

ファージ抗体を可溶性の一本鎖抗体に変換した後、個々のモノクローナル抗体の 1. 免疫化学的特性 (デスモグレイン 3 上のエピトープなど) 2. 病的活性 3. 抗体遺伝子の解析を行う。

免疫化学的特性は、ヒト皮膚、マウス皮膚を用いた蛍光抗体法、Dsg3 ELISA 等で検討する。また、Dsg 3 上のエピトープマッピングを Dsg1/Dsg3 ドメインスワッピング蛋白、または、点変異を導入した Dsg 3 蛋白を用いた免疫沈降法を使って行う。これらの Dsg1/Dsg3 ドメインスワッピング分子、点変異を導入した Dsg1 蛋白は、パキキュロウイルス発現系をもちいて作成する。病的活性は、新生仔マウスに抗体を皮下注射、または、器官培養ヒト皮膚に注射することにより水疱形成が生じるか否かで判定する。抗体遺伝子の解析は、得られたファージ抗体の phagemid をシークエンスし胎児型免疫グロブリン遺伝子断片の由来を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 腫瘍随伴性天疱瘡患者より単離した末梢血単核球より mRNA を抽出、ファージディスプレイ技術をもちいてイムノグロブリンの重鎖、軽鎖をリンカーで連結した一本鎖抗体をファージ表面に提示するファージ抗体のライブラリを作成した。この抗体ライブラリを Dsg3 ELISA プレートを用いて Dsg3 に反応するファージ抗体を 20 個単離した。

(2) 重鎖の CDR 3 のアミノ酸配列により単離された抗体は、4 群に分類された。また、抗体遺伝子の解析によると 3 つの抗体群は VH1-46 を 1 抗体群は VH1-2 遺伝子を使用していることが明らかになった。尋常性天疱瘡抗体のいくつかは同じ VH 1 - 46 遺伝子由来であることから、腫瘍随伴性天疱瘡抗 Dsg 3 抗体においても限られた抗体遺伝子を利用していることが判明した。

(3) 抗体の免疫化学特性、病的活性を検討するためファージ抗体から可溶性一本鎖抗体を作成し検討を行った。すべての抗体は Dsg3 に反応した。

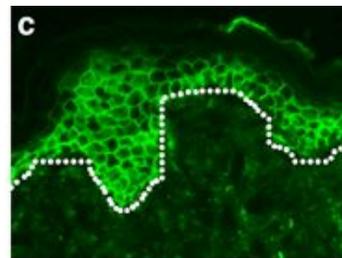


図 1 PNP モノクローナル抗体の蛍光抗体法。血清と同様に表皮細胞表面に反応する。

エピトープ解析を Dsg2/Dsg3 ドメインスワップ蛋白を用いた免疫沈降法で解析を行った。2 つの PNP 抗体は EC2 領域、1 つの PNP 抗体は Dsg3 の EC3 領域を認識していた。(図 2) この結果は、尋常性天疱瘡の病原性のある抗体はアミノ末端の EC1 領域を認識することと違っており、尋常性天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡の免疫応答の相違が明らかになった。

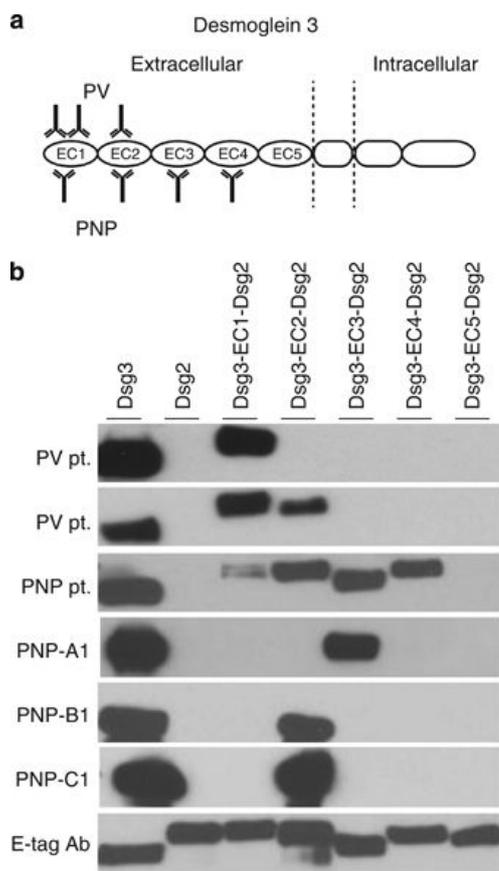


図 2 . 腫瘍随伴性天疱瘡抗体のエピトープ解析

(4) また、器官培養ヒト皮膚を用いた病的活性測定法、また培養ケラチノサイトを用いた病的活性測定法により 3 つの抗体が細胞接着阻害活性を持っていることが判明した。定量的に細胞接着阻害活性を測定すると、抗体により細胞接着阻害活性に違いがあることが明らかになった。尋常性天疱瘡抗体と比較すると 3 種の腫瘍随伴性天疱瘡抗体の細胞接着阻害活性は低いと考えられた。

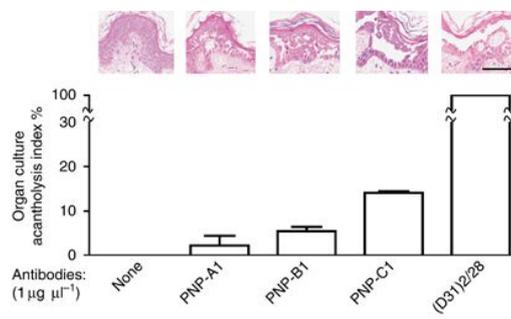


図 3. 器官培養ヒト皮膚病的活性測定法。3 種類の PNP 抗体は水疱形成能を有していた。

これらの単離されたモノクローナル抗体は腫瘍随伴性天疱瘡の患者血清中の抗体の特性を反映しており、また、尋常性天疱瘡との自己免疫反応の相違を検討することが可能となった。これらの抗体を用いて腫瘍随伴性天疱瘡の病態解明、Dsg のより細胞接着機能の解明に役立つと考えられた。

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 4 件)

1. Takeichi T, Sugiura K, Arai H, Ishii K, Kono M, Akiyama M. Sporadic VACTERL Association in a Japanese Family with Sjögren-Larsson Syndrome. *Acta Derm Venereol.* 93(5):579-580 2013.09 査読有 doi: 10.2340/00015555-1526.
2. Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci.* 査読有 71(2):89-99,2013.08 doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.021.
3. 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. *J Invest Dermatol.* 査読有 132(4):1141-1148.2012.04 doi: 10.1038/jid.2011.449.
4. Saleh MA, Ishii K, Kim YJ, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M: Development of NC1 and NC2 domains of Type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J Dermatol Sci.* 62(3):169-175,

2011.06

doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.03.003. 査読有

なし。

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 市村知佳、陳怡如、高田裕子、石井健、峯村佐和子、石井文人、橋本隆、石河晃：喉頭粘膜病変を主症状とした抗ラミニン 3 3 2 型粘膜類天疱瘡の 1 例 第 3 5 会水疱症研究会, 大分, 2013.10.19-20

2. 小原芙美子, 橋本由起, 漆畑真理, 鷺崎久美子, 石井健, 関東裕美, 石河晃：骨髄異形成症候群に合併した抗 p200 類天疱瘡の 1 例.第 34 回水疱症研究会,青森,2012.10.6

3. Saleh M, Ken Ishii, Jun Yamagami, Takahisa Hachiya, Masayuki Amagai Analysis of epitope profile of autoantibodies in pemphigus vulgaris using domain-swapped Dsg3/Dsg2 ELISAs 42nd Annual European Society of Dermatology Research Meeting 19-22 Sept, 2012 Venice, Italy

4. Ishii K.

What 's new in bullous disease?

What 's new session , 22nd World Congress of Dermatology, Seoul Korea 2011.05.24-29.

5. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, Amagai M Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites 71th Annual meeting for The Society For Investigative Dermatology. Phoenix, 2011.05.4-7

〔図書〕(計 1 件)

1. Ishii K, Amagai M: In vitro pathogenicity assay for anti-desmoglein autoantibodies in pemphigus. Molecular Dermatology Methods and Protocols Methods Mol Biol. Vol. 961:219-225. 2013.01.Springer Science

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 健 (ISHII, Ken)  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号： 50296670

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者