

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591634

研究課題名(和文) 170kD腫瘍随伴性天疱瘡など7種の未知自己免疫性水疱症抗原のプロテオミクス解析

研究課題名(英文) Analysis of unknown autoantigen for autoimmune bullous disease.

研究代表者

荒川 正崇 (Arakawa, Masataka)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70441623

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)：未だ自己抗原が明らかでない自己免疫性水疱症について、それら未知の自己抗原を同定することを目的とした。

薬剤誘発性天疱瘡の原因薬剤と皮疹の関連性を検討し、約半数は落葉状天疱瘡の臨床症状であり、多くはDsg1抗体を検出し、チオール基関連の薬剤に起因した。眼型粘膜類天疱瘡の自己抗原の同定にて、多くの血清がヘミデスモソームの構成蛋白であるインテグリンベータ4に反応した。腫瘍随伴性天疱瘡(PNP)患者血清中のA2ML1抗原に対する自己抗体に関して、蛍光抗体染色にて、p170がA2ML1であることを示唆する結果を得た。抗A2ML1抗体の検索は、病態把握に有用となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported characteristics of 17 drug-induced pemphigus (DIP) patients for their clinical manifestations, causative drugs and the results of ELISA and immunoblotting (IB). This study indicated that the majority of the DIP cases studied showed pemphigus foliaceus-type phenotype with anti-Dsg1 autoantibodies, caused by thiol-containing drugs. We determined autoantigen for large number of pure ocular mucous membrane pemphigoid (pure OMMP) patients by IB using newly established hemidesmosome-rich fraction. We suggested that, although antigens for pure OMMP are heterogeneous, β 4 integrin is the major and possibly most important autoantigen.

We tested a large number of paraneoplastic pemphigus (PNP) sera by various methods to assess how frequently anti-A2ML1 autoantibodies are detected in PNP. Our results demonstrated that autoantibodies to A2ML1 are frequently and specifically detected and may play a pathogenic role 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：皮膚診断学 皮膚免疫学 自己免疫性水疱症 薬剤誘発性天疱瘡 粘膜類天疱瘡 腫瘍随伴性天疱瘡

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層に存在する表皮の強固な構築には、デスモソームとヘミデスモソームによる強固な接着が重要である。現在、表皮細胞間接着にはデスモソームが、表皮基底膜部接着にはヘミデスモソームが最も重要な役割を果たしていると考えられている。最近の生化学的・分子生物学的研究の進歩により、全ての自己免疫性水疱症の抗原物質はデスモソームとヘミデスモソームの構成蛋白であることが明らかとなった。

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 (anti-keratinocyte cell surface antibody) を示す天疱瘡群と水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid: BP) を代表とする抗表皮基底膜部抗体 (anti-epidermal basement membrane zone antibody: anti-BMZ antibody) 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 (pemphigus) 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 (棘融解 acantholysis)。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か水疱を生じる。各種自己免疫性水疱症の研究に関しても、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。このように、現在、非常に多数の自己免疫性水疱症が知られており、その多くにおいて、その自己抗原が明らかとなっているが、未だ、その自己抗原が明らかでないものも多く存在する。その例と

して、(1) 薬剤誘発性天疱瘡の自己抗原、(2) 腫瘍随伴性天疱瘡未知における p170、(3) IEN 型 IgA 天疱瘡の自己抗原、(4) IgA/IgG 天疱瘡の自己抗原、(5) Endemic pemphigus (Brazil, Tunisia, Colombia) における自己抗原、(6) 抗 p165 型 MMP における p165、(7) 眼癬痕性類天疱瘡 (ocular MMP) の自己抗原、(8) sublamina densa 型線状 IgA 水疱性皮膚症の自己抗原、(9) 抗 p105 類天疱瘡における未知の p105、(10) 抗 p200 類天疱瘡における未知の p200 の 10 種などが未だに不明であった。

2. 研究の目的

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用いて、上記の自己免疫性水疱症の未知の自己抗原を同定することを目的とする。

これらの抗原が同定されることにより、それら疾患群に関する研究の発展のみならず、診断/治療に大きく貢献できることが期待できる。

3. 研究の方法

各種の免疫学的、生化学的、分子生物学的手法を用いて、数種の未知抗原の同定を行う。基本的には、免疫プロット法や免疫沈降法、あるいはその組み合わせによりまず蛋白の解明を進めていく。さらに、蛋白の同定には、基本的に、プロテオミクス手技を主体に研究し、主に、二次元電気泳動、免疫プロット法、質量分析法を用いて、高原蛋白を同定する。また、必要に応じて、抗原が産生されている細胞/組織より cDNA ライブラリーを作製し、cDNA transfection 法や免疫スクリーニング等の手法を用いて抗原解析を試みると同時に、リコンビナント蛋白を作製して、抗原蛋白の確認研究を行う。

4. 研究成果

(1)

薬剤誘発性天疱瘡と考えられる多数の症例について、その原因薬剤と皮疹の関連性を明確にする。その後、各症例の血清を用いて、表皮抽出液の免疫ブロット法、Dsg1/Dsg3 ELISA、免疫沈降法を施行して抗原を明らかにする。薬剤誘発性天疱瘡と考えられる症例について、症例追加を行い、その原因薬剤と皮疹の関連性を検討し、各症例の血清を用いて、蛍光抗体法、表皮抽出液の免疫ブロット法 (IB)、ELISA 等を施行して抗原抗体解析と臨床学的検討を行った。約半数は落葉状天疱瘡の臨床症状であり、その他に疱疹状天疱瘡や亜型の天疱瘡の臨床を呈した。多くは Dsg 1 抗体を検出し、チオール基関連の薬剤に起因した。

(2)

眼粘膜のみの病変を示し、瘢痕を残して失明に至る疾患が眼粘膜類天疱瘡 (ocular MMP) である。この疾患の抗原として 45kDa 蛋白の報告があるが、その真偽は不明である。また、ocular MMP の一部はインテグリン-β4 に反応するとする報告もある。先ず、多数の ocular MMP 血清と表皮抽出液を用いた免疫ブロット法により検索し、45kDa 蛋白あるいはインテグリン-β4 と反応するかどうか検討する。眼型粘膜類天疱瘡の自己抗原の同定を試みにおいて、症例追加を行い、患者血清と多くのヘミデスモソーム蛋白が濃縮している画分を用いた免疫ブロット法を用いて、多くの血清がヘミデスモソームの重要な構成蛋白であるインテグリンβ4 に反応した。またインテグリンβ4 の細胞内ドメインのリコンビナント蛋白を精製し、それを用いた免疫ブロット法で、多くの血清がインテグリンβ4 の細胞内ドメインに反応した。

(3)

腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP) 患者血清中の A2ML1 (170kDa) 抗原に対する自己抗体に関して多岐にわたる研究を行った。蛍光抗体染色においては、患者血清を用いても同様の発現パターンを示し、p170 が A2ML1 であることを強く示唆する結果を得た。さらに、PNP における抗 A2ML1 抗体の検索は、病態把握に有用となる可能性が示唆された。さらにリコンビナント A2ML1 タンパクを用いた免疫沈降法-免疫ブロット法 (IP-IB 法) と、NHK cell extracts を用いた non-reducing-IB にて検出を行った。またブラキファミリー蛋白であるエピブラキンも PNP 自己抗体である可能性を考え、PNP 患者血清と、平常ヒト表皮抽出液及びヒトの有棘細胞癌から分離された KU-8 細胞の抽出液を用いた IB を行い検討した。また KU-8 細胞及び正常ヒト細気管支 (NNSAE) 細胞の抽出液で IP-IB 法を行った。表皮抽出液と KU-8 細胞抽出液での IB では、PNP 患者血清におけるエピブラキンに対する反応は確認できなかった。この結果から、エピブラキンの高次構造上のエピトープに反応している可能性を考え、KU-8 細胞抽出液で IP-IB を行ったところ、PNP 患者血清でエピブラキンの反応を確認した。

(4)

多数の IgG/IgA 天疱瘡血清を Cos7 トランスフェクション法にて、Dsg1/Dsg3 のみならず、デスモコリン 1-3 にも反応することを示した。デスモコリン cDNA を用いて、デスモコリンの細胞外ドメインを有するバキュロクロンを作製し、産生したりコンビナント蛋白を用いて、ELISA 法でデスモコリンに反応することを確認した。

我々がこれまでに行ってきた研究の実施状況を踏まえた、当該研究の独創性・特色と

しては、我々は現在まで、種々の生化学・分子生物学的研究手技を用いて、各種自己免疫性水疱症の検討を行ない研究成果を報告してきた、当施設は多数の自己免疫性水疱症血清を保存し、その血清の反応する抗原につき種々の免疫学的・生化学的方法により解析しており、これらの技術では世界に先んじている、また、当施設では、国内外の当分野の研究者と共同研究を施行し、すでに多くの自己免疫性水疱症抗原の cDNA を保有しており、本研究を施行する上で非常に有利である、また、デスモソームおよびヘミデスモソームの異常と関連している可能性のある多くの症例から皮膚および血清サンプルを採取して保存してある。このように当施設は本研究に必要な人的また計画的な準備、DNAなどのサンプル、設備は完全に整っている。この分野の研究は皮膚科において最もホットな分野であり、その成果が直接患者の診断・治療に結びつくことから、非常に有意義なものとする。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

6．研究組織

(1)研究代表者

荒川 正崇 (ARAKAWA, Masataka)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 70441623

(2)研究分担者

土坂 享成 (TSUCHISAKA, Atsunari)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号 : 50599313

橋本 隆 (HASHIMOTO, Takashi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号 : 20129597