

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860973

研究課題名(和文) 哺乳類細胞発現系組み換え蛋白質を使った天疱瘡のドメイン特異的ELISA法の確立

研究課題名(英文) Establishment of domain specific Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for pemphigus using recombinant proteins expressed by mammalian cells.

研究代表者

大山 文悟(OHYAMA, Bungo)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90461441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡は自己免疫性水疱症で、抗原であるデスモグレイン(Dsg)1、Dsg3、デスモコリン(Dsc)1、およびDsc3の細胞外領域のEC(extracellular)1からEC5の5つの領域に自己抗体が反応し、各Dsg(あるいはDsc)間の表皮細胞間接着が失われ水疱を形成する。

本研究ではバキュロウイルス発現系を発展させ、より生体に近い蛋白質である哺乳細胞からDsg(あるいはDsc)組み換え蛋白質を用いて、患者自己抗体が反応するエピトープを簡便に検査できるELISA法の確立を目指した。その研究成果の論文報告を行い、更に哺乳細胞発現系を用いたデスモコリンELISAを確立し論文報告した。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus is autoimmune blistering disease caused by autoantibodies. Autoantibodies react with extracellular domains of desmoglein (Dsg) 1, Dsg3, desmocollin 1, and Dsc3 as antigens, and then cause blisters by abolished the adhesion between Dsg and Dsc proteins.

We attempted to establish domain specific Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for pemphigus using recombinant proteins expressed by mammalian cells, because recombinant proteins of mammalian expression system keeps higher-order structures of protein than baculovirus insect expression system. We released some interesting data about epitopes which autoantibodies reacted against Dsg EC domains in three reports, and have established of IgA ELISAs of mammalian recombinant proteins of human Dsc 1-3.

研究分野：皮膚科学

キーワード：自己免疫性水疱症 エピトープ解析 ドメイン特異的ELISA法 哺乳類細胞発現系組み換え蛋白質 昆虫細胞発現系組み換え蛋白質

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性水疱症には異なった自己抗原に反応する多くの疾患が含まれ、それぞれ疾患により治療法が異なるため確実な診断が重要である。そのうちの一つである尋常性および落葉状天疱瘡は、抗原 cDNA を用いた ELISA 法が開発され、現在、保険収載され診断、治療に広く用いられる。現在使用されている天疱瘡診断用の ELISA 法は、バキュロウイルス発現系を用いたデスマグレインの細胞外領域の組み換えタンパク質を基質として作製されている。申請者は、過去にデスマグレイン 2 の各細胞外領域を、デスマグレイン 1 あるいは 3 の細胞外領域に置換した組み換えタンパク質を作製し、詳細なエピトープ解析を行い、論文報告を行った。

2. 研究の目的

デスマグレイン 2 の各細胞外領域を、デスマグレイン 1 あるいは 3 の細胞外領域に置換した組み換えタンパク質は、バキュロウイルスによる昆虫細胞発現系であり、時に適切な翻訳後修飾を受けずに発現し、非特異的な反応が起こりうる点がある点が完全に否定できない点に問題点があった。そこで、本研究では、これらの組み換えタンパク質を新規に哺乳類細胞発現系を用いて 25 種類作製し、診断のみならず治療効果判定などに有意なツールとなる事が期待されるデスマグレインならびにデスマコリンの細胞外ドメイン特異的 ELISA を作製する事を目的とした。

3. 研究の方法

バキュロウイルス昆虫細胞発現系用に設計したヒトデスマグレイン (Dsg) 2 の EC1 から EC5 の各細胞外ドメインを Dsg1 (あるいは Dsg3) の EC1 から EC5 の各細胞外ドメインに置換した Dsg1 EC (あるいは Dsg3 EC)/Dsg2 組み換えタンパク質の cDNA コンストラクトを哺乳類細胞発現系用にサブクローニングを行う。

更に、同じ手法を用いて、Dsg2 の EC1 から EC5 の各細胞外ドメインをデスマコリン (Dsc1) (あるいは Dsc3) の EC1 から EC5 の各細胞外ドメインに置換した哺乳類細胞発現系用の Dsc1 EC (あるいは Dsc3 EC)/Dsg2 組み換えタンパク質の cDNA のクローニングも行う。cDNA を哺乳類細胞に形質転換し、組み換えタンパク質を作製する。哺乳類細胞発現系には、高次元構造を保つ組み換えタンパク質を発現することが期待できる CHO (Chinese hamster ovary) 細胞を用いる。その後哺乳類細胞発現系による組み換えタンパク質と、これまで我々が作製した昆虫細胞発現によ

る組み換えタンパク質を用いて、天疱瘡患者血清が反応するエピトープを比較検討する。哺乳類細胞発現系による組み換えタンパク質の大量作製を行い、各種天疱瘡の自己抗体が反応するエピトープの解析を行う。

Dsg1 EC1/Dsg2、Dsg1 EC2/Dsg2、Dsg1 EC3/Dsg2、Dsg1 EC4/Dsg2、Dsg1 EC5/Dsg2、Dsg3 EC1/Dsg2、Dsg3 EC2/Dsg2、Dsg3 EC3/Dsg2、Dsg3 EC4/Dsg2、Dsg3 EC5/Dsg2、Dsc1 EC1/Dsg2、Dsc1 EC2/Dsg2、Dsc1 EC3/Dsg2、Dsc1 EC4/Dsg2、Dsc1 EC5/Dsg2、Dsc2 EC1/Dsg2、Dsc2 EC2/Dsg2、Dsc2 EC3/Dsg2、Dsc2 EC4/Dsg2、Dsc2 EC5/Dsg2、Dsc3 EC1/Dsg2、Dsc3 EC2/Dsg2、Dsc3 EC3/Dsg2、Dsc3 EC4/Dsg2、Dsc3 EC5/Dsg2 を基質として細胞外ドメイン ELISA システムの開発を行う。

4. 研究成果

バキュロウイルスによる細胞発現系と哺乳類細胞発現系による反応性の相違を確認するための前準備としてバキュロウイルス発現系による各種組み換えタンパク質の大量作製を試みたが、バキュロウイルス抗体価が著明に低下しており、組み換えタンパク質の発現が非常に少ない事が判明した。そのためにも安定した昆虫細胞組み換えタンパク質発現のためにウイルス抗体価を上げる作業から始めたため、計画よりも進行が遅れた。

本研究では、哺乳動物系発現系にドメイン特異的 ELISA の確立を行う予定であるが、まずは、安定供給が可能となった昆虫細胞発現系組み換えタンパク質を使用しドメイン特異的 ELISA の確立に計画を変更した。昆虫細胞発現系組み換えタンパク質は、修飾語翻訳が不安定で、組み換えタンパク質に前駆体を生じ、本来自己抗体が認識しないエピトープに反応する可能性があった。しかしながら、近年キレート剤である EDTA で前処理し、昆虫細胞発現系組み換えタンパク質の立体構造変化させることで、非病原性自己抗体のみを検出する手法が考案された。この手法を用いて、EDTA 未処理と EDTA 前処理の ELISA 値を差し引く事で病原性のある抗体のエピトープと非病原性自己抗体のエピトープの解析を行う事が可能となり、現在すでに保険収載されている哺乳類細胞発現系組み換えタンパク質から作製された全長 Dsg ELISA 法と組み合わせることでより正確なエピトープ解析を行う事が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 11 件)

1) Establishment of IgA ELISAs of mammalian

- recombinant proteins of human desmogleins 1-3.
Teye K, Numata S, Ohzono A, **Ohyama B**, Tsuchisaka A, Koga H, Hachiya T, Tsuruta D, Ishii N, Hashimoto T.
J Dermatol Sci. 2016 Jul;83(1):75-77. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.04.001. Epub 2016 Apr 7. 査読有
- 2) Summary of results of serological tests and diagnoses for 4774 cases of various autoimmune bullous diseases consulted to Kurume University.
Hashimoto T, Tsuruta D, Koga H, Fukuda S, **Ohyama B**, Komai A, Karashima T, Ohata C, Teye K, Ishii N.
Br J Dermatol. 2016 Apr 23. doi: 10.1111/bjd.14692. 査読有
- 3) Four cases of mucous membrane pemphigoid with clinical features of oral lichen planus.
Fukuda A, Himejima A, Tsuruta D, Koga H, **Ohyama B**, Morita S, Hashimoto T.
Int J Dermatol. 2016 Jun;55(6):657-665. doi: 10.1111/ijd.12884. Epub 2015 Sep 4. 査読有
- 4) Anti-desmoglein autoantibodies in nonclassical pemphigus.
Ishii N, Teye K, Fukuda S, Uehara R, Hachiya T, Koga H, Tsuchisaka A, Numata S, **Ohyama B**, Tateishi C, Tsuruta D, Furumura M, Hattori S, Kawakami T, Ohata C, Hashimoto T.
Br J Dermatol. 2015 Jul;173(1):59-68. doi: 10.1111/bjd.13711. Epub 2015 May 28. 査読有
- 5) Antibodies to the amino-terminal domain of desmoglein 1 are retained during transition from pemphigus vulgaris to pemphigus foliaceus.
España A, Koga H, Suárez-Fernández R, Ohata C, Ishii N, Irarrazaval I, Teye K, **Ohyama B**, Hashimoto T.
Eur J Dermatol. 2014 Mar-Apr;24(2):174-179. doi: 10.1684/ejd.2014.2277. 査読有
- 6) Clinical and immunological profiles in 17 Japanese patients with drug-induced pemphigus studied at Kurume University.
Yoshimura K, Ishii N, Hamada T, Abe T, Ono F, Hashikawa K, Fukuda S, **Ohyama B**, Koga H, Sogame R, Teye K, Ochiai T, Nakajima H, Nakajima K, Iijima S, Kanzaki M, Kojima K, Nagatani T, Fujimoto W, Karashima T, Nakama T, Ohata C, Furumura M, Tsuruta D, Hashimoto T.
Br J Dermatol. 2014 Sep;171(3):544-553. doi: 10.1111/bjd.12925. Epub 2014 Aug 27. 査読有
- 7) Detection of autoantibodies to precursor **proteins** of desmogleins in sera of a patient with Bowen carcinoma.
Demitsu T, Yamada T, Nakamura S, Kakurai M, Dohmoto T, Kamiya K, Aoyama Y, Iwatsuki K, Yamagami J, **Ohyama B**, Ohata C, Koga H, Hashimoto T.
Acta Derm Venereol. 2014 Sep;94(5):601-603. doi: 10.2340/00015555-1776. 査読有
- 8) **大山 文悟**;「自己免疫性水疱症の診断法」: Monthly Book Derma no.222, P1-6, 2014. 査読無
- 9) Two cases of pemphigus vegetans with IgG anti-desmoglein 3 antibodies.
Saruta H, Ishii N, Teye K, Ono F, **Ohyama B**, Koga H, Ohata C, Furumura M, Tsuruta D, Hashimoto T.
JAMA Dermatol. 2013 Oct;149(10):1209-1213. doi: 10.1001/jamadermatol.2013.5244. 査読有
- 10) Unique herpetiform bullous dermatosis with IgG antibodies to desmogleins 1/3 and LAD-1.
Ueda A, Ishii N, Teye K, Dainichi T, **Ohyama B**, Hamada T, Tsuruta D, Kamioka N, Mitsui K, Hosaka H, Soh I, Nakada T, Hashimoto T.
Br J Dermatol. 2013 Sep;169(3):719-721. doi: 10.1111/bjd.12398. 査読有
- 11) Desmoglein 3, its pathogenicity and a possibility for therapeutic target in pemphigus vulgaris.
Koga H, Tsuruta D, **Ohyama B**, Ishii N, Hamada T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T.
Expert Opin Ther Targets. 2013 Mar;17(3):293-306. doi:10.1517/14728222.2013.744823. Epub 2013 Jan 8. 査読有

〔図書〕(計 3 件)

- 1) **大山 文悟** ; 「腫瘍随伴性天疱瘡」 : 皮膚疾患最新の治療 2015-2016, 南江堂, P119, 2015.
- 2) **大山 文悟** ; 「落葉状天疱瘡」 : 免疫症候群 (第2版)(1) - その他の免疫疾患を含めて -, 465-469, 2015
- 3) **大山 文悟** ; 「水疱性類天疱瘡および類縁疾患の血清学的診断法」 : 皮膚科臨床アセット 19 中山書店 : P86-91, 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大山 文悟 (OHYAMA Bungo)
久留米大学・医学部皮膚科・講師
研究者番号 : 90461441