

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860905

研究課題名(和文)天疱瘡・類天疱瘡における自己免疫原因遺伝子AIRE発現調節機構の遺伝的検討

研究課題名(英文)Hereditary consideration of autoimmune disease related gene AIRE on pemphigus diseases and pemphigus-like diseases.

研究代表者

西川 竜平(NISHIKAWA, Ryuhei)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：30534531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：[背景]天疱瘡は現在未知の自己抗原も存在すると考えられている。

[目的]天疱瘡様の所見を示した患者血清中の新規自己抗原識別

[結果]天疱瘡様の症状を呈した患者由来の血清を用い、2次元電気泳動、immunoblottingおよび質量分析を行い患者血清中の自己抗体がEarly endosome antigen 1 (EEA1)と反応したものであることを確認した。さらに、我々は効率的に患者血清中の抗EEA1抗体を検出する目的でEEA1タンパク質全長をコードしたcDNAを使用し新規BIOCHIP分析法を開発した。その結果、最初の一例外を除いた天疱瘡患者のいずれからも抗EEA1抗体の存在を検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：The major antigens of typical pemphigus disease are desmoglein, desmocollins and a plakin proteins. However, there are novel antigen supposed to be studied to classify the pemphigus disease patients. We used immunoblotting using a serum from an atypical autoimmune bullous disease patient to detect autoantibody, which react with unknown 175 kDa protein. Subsequent studies using two-dimensional gel electrophoresis, immunoblotting and mass-spectrometry identified 175 kDa protein as early endosome antigen 1 (EEA1). This finding was confirmed by subsequent immunological studies, including immunofluorescence of skin and cultured keratinocyte and two-dimensional gel immunoblotting with anti-EEA1 monoclonal antibody and absorption studies using EEA1 recombinant protein. We also developed a novel BIOCHIP assay using full length EEA1 cDNA to detect anti-EEA1 antibodies. However, none of 35 pemphigus sera showed anti-EEA1 antibodies in the BIOCHIP assay except the serum from index case patient.

研究分野：医学(皮膚科学)

キーワード：Early endosome antigen 1 EEA1 天疱瘡 自己免疫疾患 BIOCHIP auto-antibody pemphigus disease autoimmune disease

1. 研究開始当初の背景

現在までに以下の患者由来ゲノミック DNA サンプルを取得し AIRE およびその上流配列の解析にあっている。尋常性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA41 サンプル(内訳: 男性 17 サンプル、女性 24 サンプル) 粘膜皮膚型尋常性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 3 サンプル(内訳: 男性 2 サンプル、女性 1 サンプル) 落葉状天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 35 サンプル(内訳: 男性 15 サンプル、女性 20 サンプル) 増殖性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 3 サンプル(内訳: 男性 1 サンプル、女性 2 サンプル) 粘膜優位型尋常性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 3 サンプル(内訳: 男性 2 サンプル、女性 1 サンプル) 口腔内優位型尋常性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 2 サンプル(男性 1 サンプル、女性 1 サンプル) 尋常性天疱瘡併発水疱性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 1 サンプル(内訳: 女性 1 サンプルのみ) 主要随伴性天疱瘡患者由来ゲノミック DNA サンプル 3 サンプル(内訳: 女性 3 サンプルのみ)。現在のところ約 8 kbp 程度の長い PCR 産物を prime STAR GXL Taq polymerase を用いて作製し AIRE タンパク質コーディング領域およびその上流領域の配列解析を行っているが、尋常性天疱瘡患者群において 1 例の AIRE2、AIRE3 における exon 8 plus ドメイン(Nagamine et al., 1997)に SNP を検出した例を除き、特に DNA あるいはデリーション領域などは認められていない。これを受け、天疱瘡患者由来ゲノムの AIRE 遺伝子領域周辺に特に SNP あるいはデリーションが見られなかった際のプロジェクトを開始した。

2. 研究の目的

本研究の初期段階として、我々は島根大学において IgG 自己抗体が角化細胞表面に吸着した形跡を持つ患者 1 例を得たことが本

研究の発端となっている。該当の IgG 自己抗体は 175 kDa たんぱく質を抗原とし、明確かつ特異的に反応がみられた。研究課程は後述するが、解析の結果この 175 kDa のたんぱく質は Early エンドソーム抗原 1 (Early endosome antigen 1; EEA1)であると特定された(11-13)。

これらの結果を受けて我々は EEA1 が天疱瘡の特定のサブセットの新規自己抗原である可能性を検討した。我々は抗 EEA1 抗体を検出する目的で新規分析法である BIOCHIP 法を開発し、天疱瘡の様々なタイプの患者血清がこの BIOCHIP 法により EEA1 組み換えタンパク質と反応するかどうかを検証することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 患者血清、抗体

この研究およびそれらの詳細な情報において使われたすべての患者血清は、Experimental Dermatology (EXD) 論文のサポート情報のテーブル S1 (表 S1) に記載されている。この研究において使用されたモノクローナルの抗体 (mAbs) のための詳細な情報および多クローンの抗体 (pAbs) は、テーブル S2 にまとめた。

(2) 組織病理学的解析

組織病理学的な解析を一般的な方法で行った。島根大学の 1 例のインデックスケースの患者組織を固定後パラフィン包埋を行い、ヘマトキシリン・エオシン染色後オリンパス社製の BX51 顕微鏡を用いて撮影した。

(3) 免疫蛍光染色 (IF)

皮膚生体組織検査サンプルの直接的な免疫蛍光染色、および様々な基質の間接的な免疫蛍光染色は、一般的な方法で行われた。

(4) 免疫プロットティング

正常ヒト表皮由来抽出物の免疫プロットティングを行った。用いた実験プロトコルについては以前に出版された論文をもとに修正を加えたものを使用した(14)。

(5) ELISAs

患者血清中の抗 Dsg1 および Dsg3 自己抗体は、商業的に入手可能な ELISA キットを用いて測定した (Mesacup : MBL、名古屋、日本) (15、16)。

(6) Dsc1、Dsc2、および Dsc3 に対し吸着する抗体の cDNA トランスフェクション方法

抗 Dsc1-3 抗体の cDNA トランスフェクションは以前に出版された論文に記載された手法で行った (9)。

(7) 175kDa のたんぱく質を使っている抗-175 kDa たんぱく質自己抗体のアフィニティ精製および免疫プロットングによる検出

抗 175 kDa たんぱく質抗体のアフィニティ精製は以前に出版された論文に記載された手法で行った (17)。

(8) EEA1 組み換えたんぱく質 (RP) を持つ抗-175 kDa たんぱく質抗体の吸収研究。培養細胞を用いたたんぱく質抽出および精製

正常ヒト表皮角化細胞 (CA10205n) は、東洋紡績株式会社 (大阪、日本) から購入した。培地は試薬を添加するタイプの培地を使用した (CA131K500 : 東洋紡績)。HaCaT 細胞は、5%CO₂ 37 °C の条件で、10%FBS 含有 RPMI 培地で培養した。80%コンフルエントになった細胞を PBS で 3 回すすぎ、セルスクレイパーを用いてこそぎ落とし回収した。細胞は 4 °C で、3 分間プロテアーゼカクテル (EASYPack : ロシュ社、東京) を含んだ PBS に懸濁し超音波処理によって粉碎した。さらに、上澄みおよびペレットを、20,000 × g で 4 °C 10 分の遠心分離後に回収した。可溶性の画分に分けたサンプルグループに対し、二次元電気泳動を行う準備として 2D fractionation kit (GE healthcare 社製) を使ってさらに細かく分別した。分別のための詳細な手続は EXD 論文のサポート

情報 Fig.S1 において図で説明しているためそちらを参照されたし。(9) **ポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動 (2D-PAGE) および免疫プロットング**

それぞれの画分のたんぱく質を、ReadyPrep 2D 精製キット (パイオラッド研究所製) によって精製し、その結果生じた沈澱物を、トリス-HCl (pH8.8) 60 mM、6 M 尿素、1m チオ尿素、3%CHAPS、および 1%TritonX-100 に溶解した。次に、ペレットは、200,000g で 4°C、20min の条件で超遠心機を用いて分離し、それぞれ 2D-PAGE にかけた。

(10) マススペクトロメトリー (MS) による蛋白分析

(11) ヒト EEA1 の cDNA のクローニングおよび哺乳類細胞株においてタンパク質発現が誘導可能なベクター遺伝子へのライゲーション (結合)

我々は、HaCaT 細胞を培養後 Qiagen 社製の RN-easy キット (Qiagen 社、Hilden、ドイツ) を用いトータル RNA を抽出し、逆転写酵素を使用して cDNA 合成を行った上で PCR を行うことで目的の cDNA を得た。

ヒト EEA1 タンパク質コード領域全長を含む cDNA を用いてライゲーションを行った。EEA1 のたんぱく質をコードしている領域の全長を含んでいる cDNA を、CMV プロモーターを持つ哺乳動物細胞に対するタンパク質発現誘導ベクターに挿入した。本報告において使用されたプライマー配列および PCR 条件については EXD 論文のサポート情報のテーブル S3 を参照されたし。

(12) COS7 細胞へのたんぱく質発現誘導ベクターを用いた形質転換および EEA1 組み換えタンパク質の単離

タンパク質発現ベクターは、Lipofectamine (ライフテクノロジー) を使って猿腎臓由来細胞株である COS7 細胞に形質転換し、発現したヒト EEA1 組み換えタ

ンパク質を細胞から抽出した。

(13)新規分析法である BIOCHIP 法の開発

上記材料と方法についての詳細は EXD 論文のサポート情報を参照されたし。

4. 研究成果

(1) インデックスケースの報告

1年以上の期間全身に水疱が見られる日本人男性患者が島根大学の患者として本報告のインデックスケースとして紹介するケースとなる。年齢は63歳 (Fig.1a, b)。患者はかゆみがあるとのコメントを残している。口頭あるいは視覚粘膜傷害はまったく見られなかった。該当患者は明白なリュウマチ、あるいは神経疾患の症状が見られなかった。

インデックスケース患者由来血清を用いた表皮生体組織切片サンプルにおける IgG の直接免疫蛍光染色結果は、角化細胞内で細胞質内の粒状の組織が染色されていることを示唆した。

インデックスケース血清を抗原抗体反応で解析したところ未知の 175 kDa たんぱく質と反応することが示唆された。

Dsg1 または Dsg3 へ反応する IgG 抗体は一般に販売されている ELISA キット (MBL) では検出できなかった。正常ヒト表皮細胞抽出物の免疫プロットングにより、約 175 kDa たんぱく質が患者血清と特異的に反応していることが示唆された。他の抗原である BP230 デスモプラキンを含む、envoplakin、periplakin、BP180、Dsg1、および Dsg3 に対しても患者血清が抗原抗体反応を示さないかどうか検証したが、特に反応は見られなかった。

そこで、この未知の 175 kDa のたんぱく質がいったいどのようなタンパク質なのかを同定する目的で我々は、培養した正常ヒト角化細胞抽出物を用いて患者血清を用いた免疫プロットングを行った。正常なヒト表皮、および培養された正常な培養ケラチノサ

イトの抽出物において、クマシーブリリアントブルー染色によって複数のたんぱく質バンドが出現したのに対し、インデックスケース血清は、両方の抽出物に対しちょうど同じ 175 kDa たんぱく質に対し反応する抗体を持っていることが示唆された。

(2)免疫プロットングにより検出された 175kDa のたんぱく質をもとに行った、抗体自体の親和性を利用した抗 175 kDa たんぱく質自己抗体の精製

(3) 2D-PAGE、免疫プロットング、およびマススペクトルメーターを用いた解析によるインデックスケース由来抗 175 kDa たんぱく質抗体の抗原推定

前述の 175 kDa たんぱく質を濃縮するため、正常角化細胞株からの可溶性のたんぱく質画分を用意した。2D fractionation キットを使うことでより目的のたんぱく質を精製することを試みた。インデックスケース血清の免疫プロットングは、可溶性のたんぱく質画分において 175 kDa たんぱく質に対し陽性反応を示した。これをうけ、可溶性のたんぱく質画分をさらに細かく分ける目的で二次元電気泳動を行う方針をとった (EXD 論文: Supplemental Fig. S1 および Fig.2a 参照のこと)。インデックスケース血清の免疫プロットング分析により画分 F2 と F3 において陽性反応がみられた (同: Fig.2b)。F3 画分がより強いシグナルを示したことから後述の二次元電気泳動実験に使用された。

2D-PAGE において、F3 画分を、分子質量範囲 50-350 kDa で PI 領域が 3-8 の等電のポイント (pI) 範囲で分析し、Orilole 染色されたゲルの pI 5 領域で目的の 175 kDa の大きさのたんぱく質の場所が検出された (同: Fig.2c の白い矢により示された部位)。同じ場所はまた、化学ルミネセンスにより検出された (同: Fig.2d、緑色のポイント)。この場所はゲルから目的のタンパク質が吸着し

た部位のみを切り出し、トリプシン消化した後に MALDI-TOF MS (AB SCIEX TOF/TOF 5800 システム ; フレイミングム、MA) を用いて MS 分析で分析した。場所のペプチドマスフィンガープリンティング検索により、31 のピーク中 17 のピークが EEA1 (アクセション番号 NP_003557) とマッチしていることが示唆された。Mascot score は 104 であり、全体配列の 13% がマッチしていることが示された。縦列型マススペクトロメトリ (MS / MS) イオン検索により 4 つのピークがヒト EEA1 のアミノ酸連続と同一であることも示唆された。

(4) 抗 EEA1 mAb あるいは患者血清を用いた皮膚由来培養細胞株に対する間接的免疫蛍光染色

(5) ヒト EEA1 タンパク質の生産を目的とした cDNA のクローニングおよび哺乳動物細胞株への組み換えによるタンパク質発現誘導

ヒトの EEA1 のたんぱく質全長をコードする cDNA は、テンプレートおよび哺乳動物に対するタンパク質発現誘導ベクター pcDNA3.1TM/myc-His (ライフテクノロジージャパン) に PCR により分離された HaCaT セル cDNA ライブラリクローンをライゲートすることで構築された (EDX 論文サポート情報の Fig.S2a 参照のこと)

(6) EEA1 組み換えタンパク質を用いたインデックスケース血清の吸収に関する研究

(7) EEA1 RP を発現誘導させた新規 BIOCHIP 分析法を用いた様々なタイプの天疱瘡患者由来血清およびインデックスケース、ポジティブなコントロール、健康人由来血清の検索

現在抗原抗体反応解析法として BIOCHIP 分析法が存在している (Euroimmun 社、リユーベック、ドイツ)。同システムを用いることにより、我々は EEA1 タンパク質をターゲットとした新規 IgG 抗体検査法を開発し

た。この BIOCHIP は、インデックスケース血清 (同: Fig.4b) およびポジティブコントロール血清に対し陽性反応を示した (テーブル S1 の患者 4) (同: Fig.4c)。しかし、インデックスケースを除いたどの天疱瘡患者血清も陽性反応を示さなかった。

(8) 成果の考察

抗 EEA1 自己抗体の最初の報告は亜急性皮膚エリテマトーデス患者において行われている (11, 19)。その後、抗 EEA1 自己抗体は、様々な膠原病および神経疾患の患者由来血清より検出されていることが報告されている (18, 20, 26)。

抗 EEA1 自己抗体を検出する手法としては、これまでに Luminex プラットフォームを使用するアドレッシブ・レーザービーズ・イムノアッセイ (ALBIA) が、開発されたとの報告がある (27)。EEA1 に対する ALBIA 解析は本研究の海外における共同研究者の一人である Marvin J. Fritzler 氏が開発に携わっており、少量の血清、高いスループット、短いターンアラウンド時間、および高感度であることなどいくつかの利点を持っている。ところで、天疱瘡の検査法としては間接的免疫蛍光 BIOCHIP 法があり、Dsg1、Dsg3、BP180、および BP230 を抗原として発現するタイプなどが開発されたと近年報告されている (28-30)。

本研究において我々は、EEA1 をターゲットとした新規間接的免疫蛍光 BIOCHIP 分析法を開発した (31-33) が、この BIOCHIP 分析法は ELISA あるいは ALBIA と比較するといくつかの長所を持っている (27, 34, 35)。それは、蛍光顕微鏡さえあれば大型の装置を必要としないコストパフォーマンスや、ELISA プロトコルよりも簡便な染色プロトコルのみで定性性を示すことが可能である点などである。この新規 EEA1 BIOCHIP 解析法を用いることで、我々は様々なタイプの天疱瘡患者由来血清より抗 EEA1 抗体を検

出することを試みた。

この BIOCHIP 分析法により、島根大学における皮膚疾患患者由来インデックスケース血清および膠原病患者由来血清のポジティブなコントロール血清は、クリアな陽性反応を示し、分析法の有用性を確認した。しかし、島根大学のインデックスケースを除いた久留米大学を中心とした天疱瘡患者由来血清サンプルでは陰性を示したことから、天疱瘡およびその類縁疾患においては抗 EEA1 抗体が共通の抗体ではないことを示した。

しかしながら、このたび我々が国際的な共同研究の枠組みを構築した上で開発した新規 BIOCHIP 分析法を用いることにより、抗 EEA1 自己抗体の検出が簡便になり、これまでとは異なる種類の自己免疫疾患の検出が容易になることが予測される。さらに付け加えるならばこの分析法は、皮膚疾患にとどまらず、膠原病をはじめとした様々な自己免疫疾患の患者血清中に存在する抗 EEA1 抗体をスクリーニングするために使用されるべきであるとも考えている。

(9) 参考文献

各文章のカッコ内の番号は既に出版された *Experimental Dermatology* 論文に記載された参考文献番号に対応している。詳細は論文の参考文献欄を参考にされたし。

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)[査読あり]

Ryuhei Nishikawa, Hitoshi Takahashi, Mitsuhiko Matsuda, Kaoru Imaoka, Masahiro Ogawa, Kwesi Teye, Atsunari Tsuchisaka, Hiroshi Koga, Lars Komorowski, Christian Probst, Takahisa Hachiya, Marvin J. Fritzler, Norito Ishii, Chika Ohata, Minao Furumura, Rafal P. Krol, Yoshinao Muro, Eishin Morita and Takashi Hashimoto "Anti-early endosome antigen 1 autoantibodies were detected in a pemphigus-like patient but not in the majority of pemphigus diseases".

Experimental Dermatology. (2016) May; 25 (5): pp 368-74 doi: 10.1111/exd.12981.

[学会発表](計 1 件)

発表者名 Ryuhei Nishikawa, Hitoshi Takahashi, Mitsuhiko Matsuda, Kaoru Imaoka, Masahiro Ogawa, Kwesi Teye, Atsunari Tsuchisaka, Hiroshi Koga, Lars Komorowski, Christian Probst, Takahisa Hachiya, Marvin J. Fritzler, Norito Ishii, Chika Ohata, Minao Furumura, Rafal P. Krol, Yoshinao Muro, Eishin Morita and Takashi Hashimoto 発表表題 "Anti-EEA-1 autoantibodies in pemphigus diseases"
学会名: Symposium on Immunology. 発表年月日: 2014 年 11 月 14 日 発表場所 会場名: Main office building, Conference Room 2 and 3 at Kurume university School of Medicine, (Fukuoka, Kurume)]

[その他]

ホームページ等

九州大学・農学研究院 生命機能科学部門
システム生物学講座のホームページ
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/crt/>

久留米大学皮膚細胞生物学研究所のご説明
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/hifusaibou/>

上原記念生命科学研究所研究報告書
Vol.23
https://ueharazaidan.yoshida-p.net/houkoku/Vol.23/pdf/163_report.pdf

上原記念生命科学研究所報告集は本研究において出版された 170 kDa 周辺の EEA1 分子探索が求められた背景について記載された報告集にあたる。腫瘍随伴性天疱瘡の未知の p170 プロジェクト全体像についての概要を 2009 年に述べられたもので本プロジェクトについての大枠を知る上で重要な記述が掲載されている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者 西川 竜平

(NISHIKAWA, Ryuhei)

九州大学農学研究院生命機能科学部門
システム生物学講座細胞制御工学分野・学術研究員

(現 一般社団法人 医食同源・生命科学研究所 代表理事)

研究者番号: 30534531