

高齢者に好発する自己免疫性水疱症の画期的診断法の確立

北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室

准教授 西江 渉

(共同研究者)

北海道大学大学院学研究院 大学院生 眞井 洋輔

北海道大学大学院学研究院 客員研究員 泉 健太郎

はじめに

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid, BP) は、皮膚の表皮真皮間接合を担う BP180 と BP230 を標的とする血中自己抗体が存在し、全身の皮膚と粘膜に水疱やびらんを生じる、最も頻度の高い自己免疫性水疱症である。高齢者に好発するため、近年の高齢化社会を背景に患者数は増加傾向にある。治療の主体は副腎皮質ステロイドホルモンの全身投与であり、合併症等で不幸な転機となる症例も稀でないため、早期に診断し治療を開始することが重要である。BP の診断は、臨床所見と病理組織所見に加え自己抗体の同定が必須である。BP180 を標的とする IgG クラス自己抗体 (BP-IgG) に対する自己抗体価は病勢と一致する症例が多く、80 ～ 85% の BP-IgG は、細胞膜近傍の細胞外領域に存在する BP180 上の NC16A 領域 (BP180-NC16A) を標的とする⁽¹⁾。この点を応用し、遺伝子導入した大腸菌由来である BP180-NC16A リコンビナントタンパクが、BP-IgG の同定に応用されている (BP180 NC16A ELISA 法)⁽²⁾。一方、研究者らは、遺伝子導入した哺乳類細胞 (HEK293 細胞) からリコンビナントタンパクとして精製した全長の BP180 (180kDa) を用いた BP-IgG の同定法 (全長 BP180 ELISA) を開発した⁽³⁾。これら診断法は、BP-IgG 同定に非常に有用だが、皮膚の表皮細胞で発現している BP180 タンパクを使用している訳ではない。リン酸化や糖鎖修飾など、標的臓器特異的に修飾された BP180 を BP-IgG が標的としている場合、リコンビナントタンパクでは同定できない可能性も予想される。従って、表皮細胞の BP180 を精製し、BP-IgG を同定する ELISA 法の基質として使用することが理想的だが、BP180 は II 型膜貫通タンパク (XVII 型コラーゲン) であり、単離と精製は極めて困難である。本研究の目的は、ゲノム編集を応用し培養表皮細胞から単離・精製した全長 BP180 タンパクを用いた新規 ELISA 法を開発することである。

結 果

1. 不死化培養表皮細胞 (HaCaT 細胞) の COL17A1 遺伝子への FLAG タグ配列の挿入

BP180 をコードする COL17A1 遺伝子のエクソン 2 に存在する翻訳開始コドン を 標 的 と

するガイドRNA (gRNA) と、FLAG配列の上流と下流にそれぞれ50塩基のホモロジーアームを持つ合成1本鎖DNA (ssDNA) を、Cas9安定発現HaCaTへLipofectamin RNAimax (Thermo Fisher Scientific) でコトランスフェクションし、12クローンを採取した。それぞれ細胞ライセートを、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロット法で解析したところ、180kDaの陽性バンドを1クローンに認め、N末端にFLAG配列が挿入されたBP180発現クローンを同定した (図1 A)。そこで蛍光抗体法で抗FLAG抗体、抗BP180抗体を用い細胞を免疫染色したところ、予想どおりFLAG抗原とBP180が共局在していた (図1 B)。次に、研究者らが過去に報告した方法で⁽³⁾、N末端にFLAG配列を持つBP180を精製したところ、HaCaT細胞由来のBP180タンパクの精製 (HaCaT-BP180) に成功した (図2 A)。BP180タンパクはFLAGペプチドで溶出しているため、複合体を形成している場合は結合タンパクも同時に精製されていると予想される。そこで、BP180以外にクマシー染色で同定した、240kD、130kD、120kDのタンパクをそれぞれ質量分析 (LC-MS/MS) で解析したところ、Integrin β 4、Desmoglein 1/3、Integrin α 6、Cadherin 1を確認した。このうちウェスタンブロット法によって、Integrin β 4がBP180と結合した状態で精製されていることが判明した (図2 B)。

図1

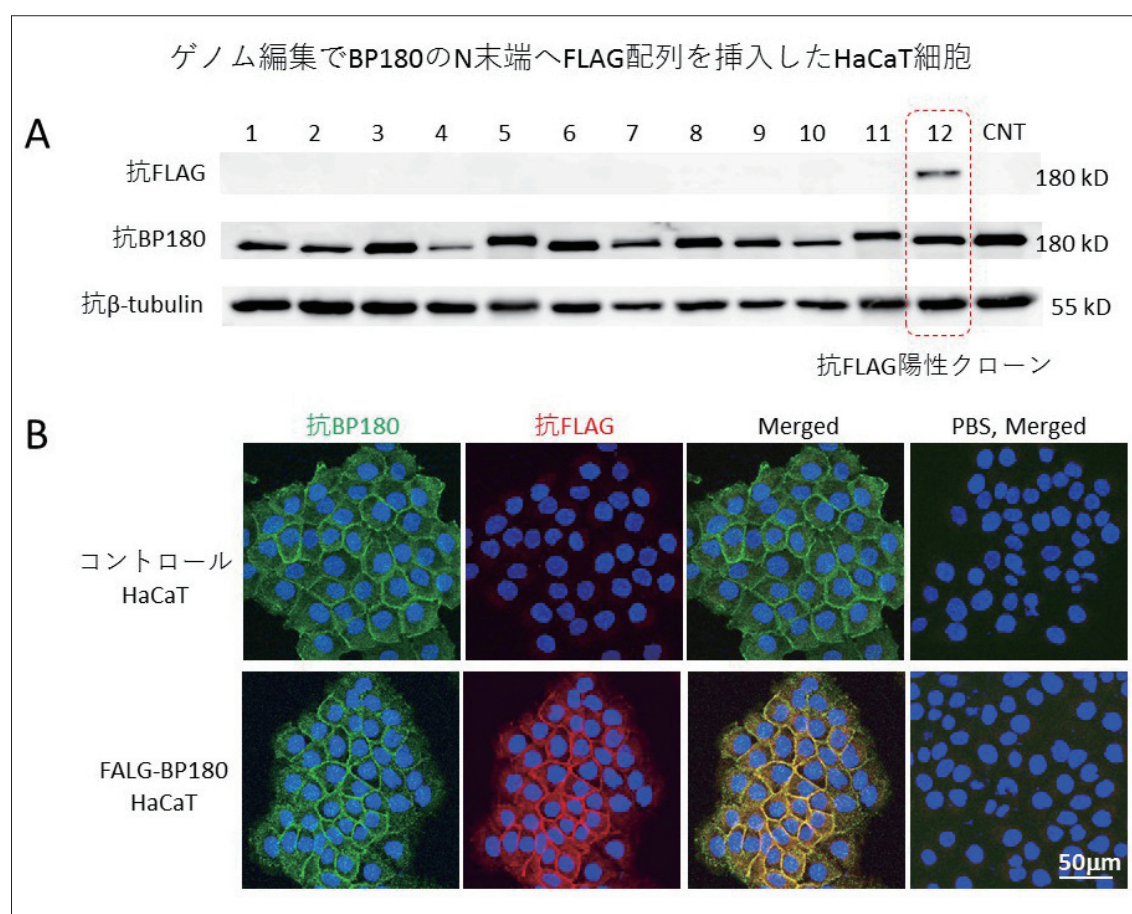
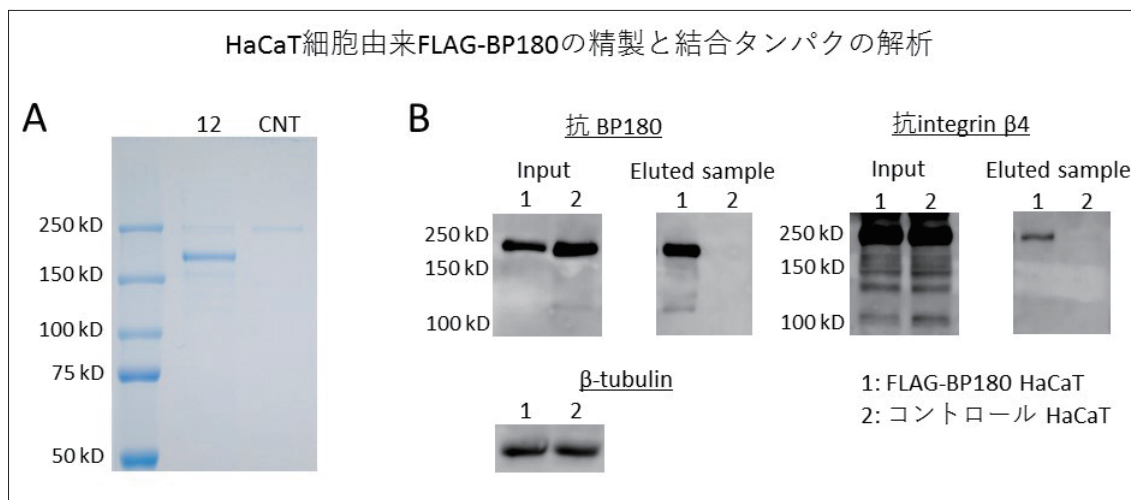


図2



考 察

遺伝子導入したHEK293から精製した全長リコンビナントBP180タンパクと、HaCaT由来BP180タンパクのBP-IgG同定率は、ほぼ同様であった。一方、リコンビナントBP180よりHaCaT由来BP180へ強く反応するBP-IgGは（図3の左上方の検体など）、翻訳後修飾されたBP180抗原あるいはBP180との結合タンパクを標的としていることが予想される。詳細は現在解析中だが、未だ知られていないBP抗原が同定される可能性が高い。遺伝子導入によって作製したリコンビナントタンパクと、自己抗体が標的とする実際の細胞から精製した自己抗原を比較検討したものは本研究が初めてであり、今後、他の多くの自己免疫疾患へ応用されていくと予想される。

要 約

ゲノム編集を応用し、培養表皮細胞のBP180へFLAGタグと導入することで、表皮細胞からBP自己抗原であるBP180の精製に成功した。遺伝子導入したHEK293細胞で作製したリコンビナントBP180と表皮細胞由来BP180へのBP-IgGの反応性を比較検討した結果、表皮細胞由来BP180へ強く反応する症例を同定した。この様な症例のBP-IgGは、翻訳後修飾されたBP180抗原あるいはBP180との結合タンパクを標的としていると予想した。

文 献

1. Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 109: 573-9, 1997.
2. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 30: 224-32, 2002.
3. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Shimizu H. Autoantibody profile differentiates between inflammatory and noninflammatory bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 136: 2201-10, 2016.