



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

天疱瘡抗原デスマグレインの三次元エピトープ解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 関口, 麻衣子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2178

氏名(本籍)	関口 麻衣子(栃木県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第124号		
学位授与年月日	平成14年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	東京農工大学		
学位論文題目	天疱瘡抗原デスマグレインの三次元エピトープ解析		
審査委員	主査	東京農工大学 教授	岩崎 利郎
	副査	帯広畜産大学 教授	白幡 敏一
	副査	岩手大学 教授	岡田 幸助
	副査	東京農工大学 教授	神田 尚俊
	副査	岐阜大学 教授	北川 均

論文の内容の要旨

天疱瘡はヒトや動物に認められる自己免疫性皮膚疾患で、その標的抗原は表皮細胞間接着装置のデスモゾームを構成するデスマグレイン(Dsg)であると考えられている。天疱瘡は分子量160kDaのDsg1を標的抗原とする落葉状天疱瘡(PF)と分子量130kDaのDsg3を標的抗原とする尋常性天疱瘡(PV)に大別される。PFは臨床的に小水疱とびらん形成が皮膚に限局して発症し、血中に抗Dsg1抗体のみが出現する。PVは弛緩性水疱と難治性びらんが口腔などの粘膜上皮を主体に認められ、血中には抗Dsg3抗体が出現するが、PVではさらに粘膜のみならず皮膚にも広範囲の病変が出現するタイプがあり、この場合は抗Dsg3抗体に加え抗Dsg1抗体も出現する。ヒトではこのような抗体プロフィールを利用して、昆虫細胞を用いるバキュロウイルス発現系により作製したDsg1とDsg3の組換え蛋白を抗原とするELISAが開発され、鑑別診断に応用されている。動物でも、臨床的にPFは皮膚病変、PVは粘膜病変を認め、イヌの天疱瘡抗原としてPFでは130kDa、PVでは160kDaの蛋白を認識する自己抗体が証明されており、ヒトと同じく動物においても標的抗原はデスマグレインであると考えられている。特にイヌのPFは最も発生頻度の高い自己免疫性皮膚疾患として重要であるが、その標的抗原の詳細な解析、免疫学的診断法の確立および特異的治療法の開発など、いくつもの課題を抱えている。この研究では、ヒトで作製に成功している組換えデスマグレイン蛋白を利用して、ヒトデスマグレインの三次元エピトープ解析を行い、抗原特異的治療法の開発および病態発症機序

の解明のために有益な情報を得ることができた。

従来のエピトープマッピング法は、抗原を様々な大きさの断片として、免疫ブロット法により抗原抗体反応をみるものであった。しかし、この方法は抗原蛋白の変性を伴うため、アミノ酸の立体構造を解析することができない。天疱瘡では、自己抗体が立体構造を有するデスマグレインを認識して病態が発現することが分かっている。病原性抗体がデスマグレインのどの部位を認識するのか検索するために、Dsg1とDsg3のスワッピング分子を作製しPFおよびPV血清のCompetition ELISAを施行する三次元エピトープマッピング法を行った。Dsg1とDsg3のアミノ酸配列は高い相同性を有しており非常に類似した分子構造を持つと考えられているにもかかわらず、PFおよびPVの自己抗体はDsg1とDsg3のそれぞれを特異的に認識することが分かっている。そこで、Dsg1およびDsg3の細胞外領域を様々な断片とし、欠損領域に対応するDsg3またはDsg1の断片を補うことで細胞外領域全体の立体構造を保ちDsg1またはDsg3の一定領域における抗原特異性も保存したスワッピング分子を計10種類作製した。これらを用いてPFおよびPV血清中の自己抗体の反応をELISAにて検討した。まず、Dsg1またはDsg3の細胞外領域を3つの領域に分けて解析する4種類のスワッピング分子を用いて広域な三次元エピトープマッピングを行ったところ、Dsg1およびDsg3のどちらもN末端側1-161残基中に主要な三次元エピトープが局在すると考えられた。さらに、PF血清とDsg1の1-161残基を含む分子とを競合反応させた後に、新生仔マウスに投与すると水疱形成は認められなくなっていたことから、Dsg1の1-161残基中の三次元エピトープを認識する自己抗体が病原性を有することが示唆された。次にDsg1およびDsg3のN末端側1-161残基をさらに制限した、新たなスワッピング分子を6種類作製してCompetition ELISAを行い、より詳細な三次元エピトープマッピングを行ったところ、Dsg1の26-87残基、Dsg3の25-88残基に重要な三次元エピトープが局在すると考えられた。Dsg1およびDsg3でのこれらの領域を比較すると、非常に相同性が高く、両者の間でそれぞれのアイソトープ特異的配列は主に6カ所のみであった。つまり、自己抗体はこの領域内のこれら6カ所の配列のいずれかを特異的に認識していると考えられた。そこで、Dsg3分子内の6カ所の特異的配列に、1カ所ずつDsg1特異的配列を導入置換した6種類の変異Dsg3分子を作製し、PF血清についてさらにCompetition ELISAを行った。すると最もN末端側の特異的配列であった、25、28および29残基にDsg1特異的配列を導入した変異Dsg3分子で最も高い抗体吸収率が認められたことから、Dsg1の重要な三次元エピトープがこの配列に含まれると考えられた。この配列がデスマグレインの立体構造上どの部位に相当するのか特定するためには、デスマグレインの立体構造の解明を待たなければ

ばならない。しかし、同じカドヘリンファミリーであり結晶解析の進んでいるE-カドヘリンの立体構造に照らし合わせてみると、25、28および29残基は細胞膜上で隣接する分子がホモダイマーを形成し、向き合っている最もN末端側（遠位）のドメインに含まれていることが分かった。デスマグレインが同様の構造であれば、この部位に自己抗体が結合することにより細胞間接着機能が障害され、水疱形成が誘導される可能性が考えられた。

この研究により解明されたエピトープ局在部位の組換え分子を作製し、カラムに充填すれば、抗原特異的血漿交換療法などの新しい治療法開発が考えられ、さらにこの結果をイヌで応用することにより、ヒトと動物の天疱瘡発症機序の解析をより発展させることができると思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

天疱瘡はヒトや動物に認められる自己免疫性皮膚疾患で、その標的抗原は表皮細胞間接着のデスマゾームを構成するデスマグレイン(Dsg)であると考えられている。天疱瘡は分子量 160kDa の Dsg1 を標的抗原とする落葉状天疱瘡(PF)と分子量 130kDa の Dsg3 を標的抗原とする尋常性天疱瘡(PV)に大別される。PF は臨床的に小水疱とびらん形成が皮膚に限局して発症し、血中に抗 Dsg1 抗体のみが出現する。PV は弛緩性水疱と難治性びらんが口腔などの粘膜上皮を主体に認められ、血中には抗 Dsg3 抗体が出現するが、PV ではさらに粘膜のみならず皮膚にも広範囲の病変が出現するタイプがあり、この場合は抗 Dsg3 抗体に加え抗 Dsg1 抗体も出現する。ヒトではこの様な抗体プロフィールを利用して、昆虫細胞を用いるバキュロウイルス発現系により作製した Dsg1 と Dsg3 の組換え蛋白を抗原とする ELISA が開発され、鑑別診断に応用されている。動物でも、臨床的に PF は皮膚病変、PV は粘膜病変を認め、イヌの天疱瘡抗原として PF では 130kDa、PV では 160kDa の蛋白を認識する自己抗体が証明されており、ヒトと同じく動物においても標的抗原はデスマグレインであると考えられている。特にイヌの PF は最も発生頻度の高い自己免疫性皮膚疾患として重要であるが、その標的抗原の詳細な解析、免疫学的診断法の確立および特異的治療法の開発など、いくつもの課題を抱えている。この研究では組換えデスマグレイン蛋白を用いて、ヒトデスマグレインの三次元エピトープ解析を行い、抗原特異的治療法の開発および病態発症機序の解明のために有益な情報を得ることができた。

従来のエピトープマッピング法は、抗原蛋白の変性を伴うため、アミノ酸の立体構造を解析することができない。天疱瘡では、自己抗体が立体構造を有するデスマグレインを認識して病態が発現することが分かっている。病原性抗体がデスマグレインのどの部位を認識するのか検索するために、Dsg1 と Dsg3 のスワッピング分子を作製し PF および PV 血清の Competition ELISA を施工する三次元エピトープマッピング法を行った。Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域を様々な断片とし、欠損領域に対応する Dsg3 または Dsg1 の断片を補い、立体構造を保ち、抗原特異性を保存したスワッピング分子を計 10 種類作製した。これらを用いて PF および PV 血清中の自己抗体の反応を ELISA にて検討した。Dsg1 および Dsg3 のどちらも N 末端側 1-161 残基中に主要な三次元エピトープが局在すると考えられた。さらに、PF 血清と Dsg1 の 1-161 残基を含む分子とを競合反応させた後に、新生仔マウスに投与すると水疱形成は消失したため Dsg1 の 1-161 残基中の三次元エピトープを認識する自己抗体が病原性を有することが示唆された。次に Dsg1 および Dsg3 の N 末端側 1-161 残基をさらに制限した分子で、より詳細な三次元エピトープマッピングを行ったところ、Dsg1 の 26-87 残基、Dsg3 の 25-88 残基に重要な三次元エピトープが局在すると考えられた。Dsg3 分子内

の6カ所の特異的配列に、1カ所ずつ Dsg1 特異的配列を導入置換した6種類の変異 Dsg3 分子を作製し、PF 血清についてさらに Competition ELISA を行った。すると 25、28 および 29 残基に Dsg1 特異的配列を導入した変異 Dsg 分子で最も高い抗体吸収率が認められたことから、Dsg1 の重要な三次元エピトープがこの配列に含まれると考えられた。

この研究により抗原特異的血漿交換療法などの新しい治療法開発が考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins
著 者 名: Sekiguchi Maiko, Futei Yuko, Fujii Yoshiko, Iwasaki Toshiro, Nishikawa Takeji, Amagai Masayuki
学術雑誌名: The Journal of Immunology に発表
巻・号・頁・発行年: 167(9): 5439 - 5448, 2001

既発表学術論文

- 1) 題 目: Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris
著 者 名: Futei Yuko, Amagai Masayuki, Sekiguchi Maiko, Nishifuji Koji, Fujii Yoshiko, Nishikawa Takeji
学術雑誌名: The Journal of Investigative Dermatology に発表
巻・号・頁・発行年: 115(5): 829 - 834, 2000