

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書**

落葉状天疱瘡におけるデスモグレイン 1 抗体エピトープの病期による比較

分担研究者 青山裕美 川崎医科大学医学部皮膚科学 教授

【研究要旨】

落葉状天疱瘡は表皮細胞間接着因子デスモグレイン(Dsg) 1 に対する自己抗体による自己免疫性水疱症である。臨床症状が軽快するとともに抗体価も減少し、治療の指標として活用されている。しかしながら、寛解期でも抗体価の高い症例をしばしば経験する。われわれは、これまでに尋常性天疱瘡患者で、寛解期に検出される抗体はデスモグレインの結合部位以外の部位に結合し、エピトープのスクリーニングに EDTA 処理 Dsg3 ELISA 法を考案した。落葉状天疱瘡患者抗 Dsg1 抗体のエピトープを EDTA 処理 Dsg1 ELISA 法で検討した。

結果、落葉状天疱瘡患者血清の抗 Dsg1 抗体は活動性に拘わらず立体構造に結合した。Dsg1 は立体構造の中に接着に重要な部位とそうでない部位を有することが推察され、EDTA 処理 Dsg1 ELISA 法は落葉状天疱瘡患者血清の病因性スクリーニングには応用できないことが明らかになった。

研究協力者

岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合
研究科 皮膚科学
神谷浩二 浜松医科大学皮膚科
山上 淳 慶應義塾大学医学部皮膚科

A . 研究目的

背景：これまでにわれわれは Dsg 抗原 ELISA プレートに EDTA 処理しカルシウム依存性立体構造を変換（EDTA 処理 ELISA 法）することで、天疱瘡患者に検出される抗 Dsg 抗体のエピトープを区別し、病因性を区別できることを報告してきた。
目的：本研究では落葉状天疱瘡患者に検出される抗 Dsg1 抗体の臨床的特徴を調べ、EDTA 処理 ELISA 法がスクリーニング検査として使用可能か検討した。

B . 研究方法

EDTA 処理 ELISA 法
Dsg1 リコンビナントタンパクを固層化した ELISA プレートのマイクロカップを 0.5 mM EDTA にて室温 30 分処理をし、その後、従来の ELISA プロトコールに従い吸光度(OD450)を測定した。
（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、岡山大学倫理委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会で検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集した。

C . 研究結果

すでにエピトープのわかっているモノクローナル抗体を用いて、EDTA 処理した ELISA プレートへの結合性を検討した。

立体構造に結合する scFv 抗体と直線構造に結合する p23 抗体を用いて検討した。

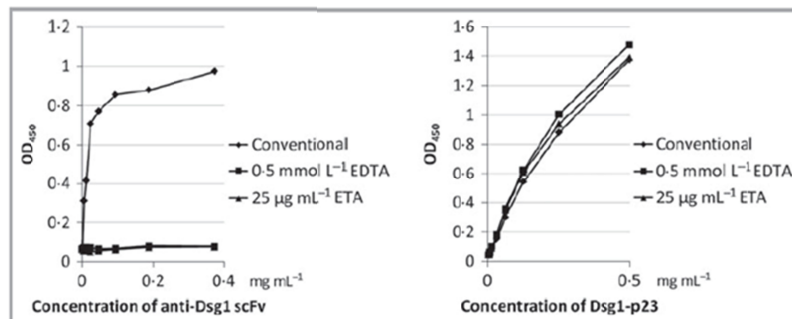
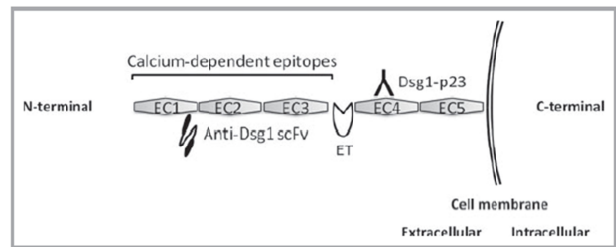


Fig 1. Affinities of antidesmoglein (anti-Dsg)1 single-chain variable fragment (scFv) and anti-Dsg1 monoclonal antibody (Dsg1-p23) to the 0.5 mmol L⁻¹ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated Dsg1 recombinant protein and 25 µg mL⁻¹ exfoliative toxin A (ETA)-treated Dsg1 recombinant protein. The affinity of anti-Dsg1 scFv diminished with the EDTA-treated and ET-treated Dsg1. In contrast, the affinity of Dsg1-p23 was not affected. OD₄₅₀, optical density at 450 nm.

EDTA 処理した Dsg1 ELISA プレートは、エピトープのスクリーニングに使用できることがわかった。

患者血清の検討 活動期 (A) の病因性の高い抗 Dsg1 抗体と寛解期 (I) の非病因性抗 Dsg1 抗体を含む患者血清を用いてエピトープをスクリーニングした。右図に示すように、5 症例でいずれの時期の血清も EC1-3 に結合する抗体が主体であることが明らかになった。

免疫沈降ウエスタンブロッティング法を用いたエピトープ解析さらに詳細なエピトープ解析をリコンビナントタンパクを用いた免疫沈降法で行った。

Table2 に示すように、免疫沈降法では活動期に立体構造と非立体構造に結合

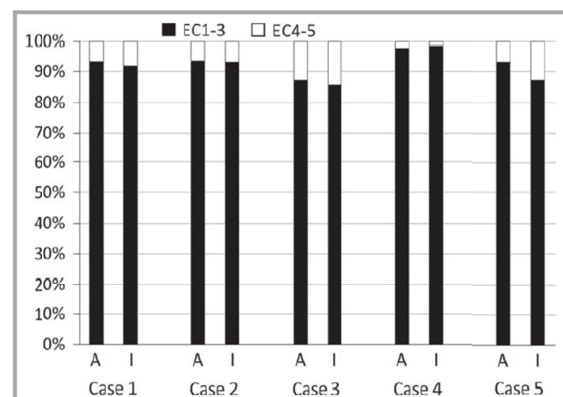


Fig 3. The ratios of antidesmoglein (anti-Dsg)1 antibodies recognizing extracellular domains (EC)1-3 and EC4-5 in the active and inactive phases. The antibodies recognizing EC1-3 were the predominant antibodies in all patients with pemphigus foliaceus in both the active phase (A) and the inactive phase (I).

する抗体が存在し、寛解期に立体構造に対する抗体のみが残存するという結果を得た。EDTA-ELISA 法の結果とは解離する結果であった。

Table 2 Summary of the desmoglein (Dsg)1 epitope profiles of the five patients with pemphigus foliaceus whose Dsg1 enzyme-linked immunosorbent assay index values were > 100 in the inactive phase

Patient	Age (years)/sex	Active phase					Inactive phase				
		EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
1	57/female	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	55/male	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	53/female	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4	67/female	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
5	45/female	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

EC, extracellular domain.

D . 考 察 および E . 結 論

落葉状天疱瘡では、寛解期に検出される抗 Dsg1 抗体のエピトープから病因性を推定する目的で EDTA-Dsg1ELISA 法を応用することはできないことが明らかになった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

1. Kamiya K, Aoyama Y, Yamasaki O, Kamata A, Yamagami J, Iwatsuki K, Tokura Y. Epitope analysis of antidesmoglein 1 autoantibodies from patients with pemphigus foliaceus across different activity stages. Br J Dermatol. 2015

学会発表

1. Kamiya K, Aoyama Y, Yamasaki O, Kamata A, Yamagami J, Iwatsuki K, Tokura Y. Epitope analysis of antidesmoglein 1 autoantibodies from patients with pemphigus foliaceus across different activity stages.JSID. 2015.Dec Okayama Japan

H . 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし