

助成番号 26-2-34

濃縮ヘミデスモゾーム免疫ブロット法による自己免疫性水疱症の診断

大阪市立大学大学院医学研究科 皮膚病態学

林 大輔

1. 諸言

水疱症は先天性と後天性に大別される。後天的に発病し、免疫学的異常により、自己抗体が表皮細胞膜または真皮表皮境界部の抗原分子に作用し皮膚、粘膜に水疱が生じる病気を自己免疫性水疱症という。全身に水疱、びらんが出現し、日常生活レベルを著しく低下させる。中高年に好発する疾患であり、天疱瘡、類天疱瘡、後天性表皮水疱症は厚生労働省の指定難病となっている。

表皮下に水疱を形成する疾患としては水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状 IgA 水疱症、抗ラミニン γ 1 類天疱瘡などが挙げられる。標的抗原は BP180、BP230（ともに水疱性類天疱瘡）、ラミニン 332、インテグリン β 4（粘膜類天疱瘡）、VII型コラーゲン（後天性表皮水疱症）、LAD1（線状 IgA 水疱症）、ラミニン γ 1（抗ラミニン γ 1 類天疱瘡）など多岐に渡り、それぞれは真皮表皮境界部に存在する蛋白である。ただ現状ではこれらの抗原同定にヒト表皮抽出液、ヒト真皮抽出液を用いた免疫ブロット法（immunoblot : IB）、それぞれのリコンビナント蛋白を用いた IB、HaCaT 細胞の上清液を用いた IB、BP180、BP230、VII型コラーゲンの ELISA 法、CLEIA 法などの多数の検査を実施せねばならず、実施できる施設も限られたものとなっている。また商品化されていない試料が多々あること、作成にヒトの正常皮膚が必要な物もあり安定して試料を調達するのが困難な場合がある。

本研究は類天疱瘡などの表皮下に水疱を作る水疱症に関して濃縮ヘミデスモゾーム（HD-rich fraction）を用いた IB による網羅的な診断の開発を目的とする。

2. 方法

2.1 細胞抽出

DJM-1 細胞をシャーレに撒きイーグル最小必須培地に 400 ng/mL ハイドロコルチゾン、20 ng/mL の表皮成長因子、2 mM のグルタミン、10% Fetal Calf Serum (FCS) を加えたもので 80-100% コンフルエントになるまで培養した。培地をカルシウム無添加の Keratinocyte Growth Medium (KGM) に交換し、10-14 日間培養した。こうして得られた細

胞をリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline：PBS）で十分に洗浄後、20mMの水酸化アンモニウムで5分処理し、浮遊物を廃棄した。PBSで3回洗浄、0.1% Triton X-100の入ったPBSで5分間処理し、細胞膜の破片を可溶化して除去、再度PBSで3回洗浄した。最後に5×SDSサンプルバッファーで溶解し搔爬し抽出した。今回は名古屋大学の平子善章先生に頂いた抽出液を使用した。

2.2 ウェスタンブロット

3-8%ゲルにインキュベートし150V、1時間電気泳動した。150V、4°C、一昼夜ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルクで1時間ブロッキングした。

当科で保存している患者血清を反応させた。患者血清の内訳は水疱性類天疱瘡（BP180型3例、230型3例）、ラミニン332型粘膜類天疱瘡2例、後天性表皮水疱症3例、抗ラミニン γ 1類天疱瘡2例、線状IgA水疱症2例であった。1次抗体は患者血清と3%スキムミルク1:10で作成し、4°Cで一昼夜反応させた。2次抗体はhorseradish peroxidase（HRP）Human IgGとスキムミルク3%を1:1000で作成し、室温で1時間反応させた。直接発色を行い、結果を得た。

3.結果

BP180型の水疱性類天疱瘡は3例中3例、BP230型水疱性類天疱瘡は3例中3例、ラミニン332型粘膜類天疱瘡は2例中0例、後天性表皮水疱症は3例中1例、抗ラミニン γ 1類天疱瘡は2例中1例、線状IgA水疱症は2例中0例が陽性であった。

4.考察

ヘミデスモゾームは表皮基底層の細胞に存在し、基板と結合することにより真皮表皮の接着に関与している。構成蛋白としては膜蛋白質であるBP180やインテグリン β 4、インテグリン α 6、細胞内蛋白質であるBP230やプレクチンなどで構成されている。HD-rich fractionはヒトの有棘細胞癌の細胞に由来するDJM-1細胞から抽出する。HD-rich fractionはプレクチン、BP180、BP230、ラミニン332、LAD1、インテグリン β 4及びインテグリン α 6が含まれる¹⁾。推薦者と研究協力者は粘膜類天疱瘡に対してのHD-rich fraction IBを用いて、ヘミデスモゾームに存在するインテグリン β 4が粘膜類天疱瘡の標的抗原であることを以前に示している²⁾。今回の結果はHD-rich fractionに存在する蛋白でも反応性に違いが見られた。また以前より含まれることが示されていないVII型コラーゲンでは患者血清でも反応性は見られなかった。今後患者血清数を増やすことや、従来検査法との反応性の違いを検討する必要があると考える。

5.結語

今回HD-rich fraction を用いた免疫ブロットを自己免疫性水疱症の患者血清で行うことによって網羅的な検査を行える可能性が高まった。また今後反応性の違いを検討することによって実臨床への応用が可能になると考える。

6.文献

- 1) Yoshiaki Hirako, Yuki Yonemoto, Tomoe Yamauchi, Yuji Nishizawa, Yoshiyuki Kawamoto, Katsushi Owaribe. Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Exp Cell Res.* 2014; 324(2):172-82. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.002. Epub 2014 Apr 12.
- 2) Xiaoguang Li, Hua Qian, Ryosuke Sogame, Yoshiaki Hirako, Daisuke Tsuruta, Norito Ishii. Integrin $\beta 4$ is a major target antigen in pure ocular mucous membrane pemphigoid. *Eur J Dermatol.* 2016; 26(3):247-53. doi: 10.1684/ejd.2016.2772

7.成果発表

今後学会発表、論文記載を行う予定。