HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遺伝子編集により単離したネイティブ自己抗原を用いた自己免疫性水疱症の新規診断法［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	眞井, 翔子
Description	配架番号：2783
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15465号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90013
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MAI_Shoko_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　眞井　翔子

学 位 論 文 題 名

遺伝子編集により単離したネイティブ自己抗原を用いた自己免疫性水疱症の新規診断法

（Novel diagnostic method for autoimmune bullous disease using native autoantigen isolated by gene editing）

【背景と目的】類天疱瘡群は、組織学上表皮下水疱形成を特徴とし、その自己抗体は、皮膚の表皮真皮境界部もしくは粘膜上皮と粘膜固有層間に存在する基底膜部タンパクを標的とする。類天疱瘡群は類天疱瘡と後天性表皮水疱症に大別され、類天疱瘡はその自己抗原と臨床症状により分類される。主な亜型として，水疱性天疱瘡（bullous pemphigoid, BP）、粘膜類天疱瘡（mucous membrane pemphigoid, MMP)がある。

BP、MMP においてはヘミデスモソーム(HD)タンパクである XVII 型コラーゲン (Type XVII collagen, COL17) が主要な自己抗原となる。特に BP において、その自己抗体の主要なエピトープは COL17 の細胞外領域の非コラーゲン領域である 16A（NC16A）ドメインであるため、大腸菌によって産生された NC16A ドメインのポリペプチドを利用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) は診断に広く利用されている。近年、本研究室では DDDDK-tag 付きリコンビナント全長 COL17 タンパク（recombinant COL17、rCOL17）を基質とする ELISA（rCOL17 ELISA）を確立した。rCOL17 ELISA は、COL17 のあらゆる領域を標的とする抗 COL17 自己抗体が検出可能である。特に dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬 (dipeptidyl peptidase-IV inhibitor、DPP4i)によって誘発された BP (DPP4i-associated BP、DPP4i-BP) の検出に有用である。しかし、これらに用いられているようなリコンビナントタンパクは、一般的に翻訳後修飾を欠くため、ネイティブな自己抗原と同等ではない。これらの違いは、リコンビナントタンパク質を利用したアッセイにおける自己抗体検出の障害となり得る。そこで、内在性の自己抗原としてネイティブな COL17 を用いたアッセイ系の確立を行い、リコンビナントタンパクとの比較を行うこととした。

近年、clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) による遺伝子編集を利用して、内在性遺伝子座へのタグ配列のノックインにより、ネイティブなタンパクへのタグ付けが可能となった。この付加したタグを利用することで生理的条件下に存在するネイティブなタンパクを取得可能となる。自己免疫疾患の診断における自己抗体検出アッセイ系においては、従来の過剰発現させたリコンビナントタンパクを用いた検出系と異なり、ネイティブなタンパク利用したアッセイ系の構築が可能となる。

よって、本研究ではネイティブな状態の COL17 として、不死化ケラチノサイトである HaCaT 細胞が内在性に持つ COL17 を取得することを試みた。HaCaT の内在性 COL17 に一般的なタグとして広く用いられている DDDDK-tag を付加し、タグを利用した免疫沈降法により精製を行い、取得したタンパクの解析を行うこととした。また、類天

疱瘡群の中にはCOL17以外のHDタンパクを自己抗原とする疾患が存在し、特にMMP患者はCOL17以外の様々なHD分子を標的とする自己抗体も有しているため、rCOL17 ELISAはすべてのMMP自己抗体を同定することはできない。そこで、内在性のネイティブな状態のCOL17を中心としたHDタンパクを一塊として取得し、その複合体を固相化抗原として用いた新規ELISAを作成し、MMP自己抗体の検出に有用であるかどうかを検証する。

【材料と方法】CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集により、*COL17A1*遺伝子座にDDDDK-tagをノックインしたHaCaT不死化ケラチノサイトを作製し、DDDDK-tagを用いた免疫沈降法を行う。それによりネイティブな自己抗原複合体を単離し、含まれているタンパクの解析を行う。次に、この複合体タンパク質を固相化抗原としたELISAシステムを作成する。BP、MMPの診断をそれぞれ満たす症例と健常人血清を本研究のために使用し、BP血清と健常人血清を用いて、カットオフ値を決定する。BP、MMP血清で全長COL17 ELISAとの比較を行う。また、DPP4i存在下で細胞培養を行い、薬剤による内在性COL17の抗原性の変化の有無について検討を行う。

【結果】CRISPR/Cas9によるHaCaTの内在性COL17へのタグ付けにより、ネイティブなCOL17だけではなく、COL17結合タンパクであるintegrin α6β4などのタンパクを含んだ自己抗原複合体を取得できた。また、このネイティブCOL17の複合体には全長のCOL17のみではなく、生理的に切断されたと考えられる短いCOL17断片も含まれていた。その複合体を固相化抗原とした新規ELISA（native COL17 ELISA、nCOL17 ELISA）を作成し、BPと健常人血清からROC解析を行い、カットオフ値を決定した。BP症例を用いたELISAではリコンビナントCOL17を基質として用いた場合と大きな差は見られなかったが、nCOL17 ELISA優位に反応した血清も見られ、それらの中ではCOL17断片に対して反応していた血清が見られた。また、55例のMMP症例に対してnCOL17 ELISAを施行したところ、感度と特異度はそれぞれ70.9%と87.5%であり、MMP自己抗体の検出において、従来の類天疱瘡の自己抗体検出系と比較してはるかに優れたものであった。また、DPP4i存在下で細胞培養を行い、その有無によるDPP4i-BP血清のnCOL17 ELISA index値の比較を行ったが有意な差は見られなかったため、DPP4iは直接COL17の抗原性変化をもたらしてはいないことがわかった。

【考察】本研究により、COL17を中心とした基底膜部タンパク複合体を一塊に取得可能となった。MMPの自己抗体は様々な自己抗原に反応するため、この自己抗原複合体を用いた新規ELISAはリコンビナントタンパク単独の検出系よりもMMPの自己抗体検出に有用であった。MMPのような自己抗体が様々な分子を標的とする自己免疫疾患では、抗原とタンパク質の複合体を分離することがより良い診断系の確立に役立つと考えられた。
CRISPR/Cas9によるHaCaTの内在性COL17へのタグ付けによる自己抗原回収は、他の内在性基底膜タンパクを回収する系と比較して、簡便でありタンパク精製可能であるため優れた系である。

【結論】
遺伝子編集によりCOL17を中心とした基底膜部タンパク複合体を一塊に取得可能となった。この自己抗原複合体を用いた新規ELISAはMMPの自己抗体検出に有用であった。