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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　眞井 翔子

主査　　教授　　石田　晋
審査担当者　副査　　准教授　矢口　裕章
副査　　教授　　村上　正晃

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）

本研究では遺伝子編集を利用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。得られた COL17 は integrin $\alpha 6\beta 4$ などの結合タンパクとともに自己抗原複合体として取得・精製され、それを基質とした新規 ELISA を確立した。様々な表皮基底膜部タンパクを標的とする自己免疫性水疱症である粘膜類天疱瘡（MMP）は、一般的に血中抗体価が低いため検出・定量が困難であるが、本 ELISA は複数の自己抗原複合体を基質として用いているため、既存の検出系と比較し高効率で MMP の自己抗体を検出することが可能であった。

審査にあたり、副査の矢口准教授からは、HEK293 細胞は COL17 を発現していないのかという質問があった。これに対し申請者は、HEK293 細胞は COL17 を発現しておらず、HaCaT 細胞は皮膚の角化細胞由来の cell line であり、より native な状態の COL17 を発現していると考えられ、今回の研究では HaCaT 細胞を利用したと回答した。副査の村上教授からは、基底膜の構成分子を各々リコンビナントタンパクとして取得し、混合して基質として用いるのは可能なのか、その系と今回の系とはどちらがより優れているのか、全ての MMP 自己抗体を検出することは可能なのかという質問があった。それに対して申請者はリコンビナント COL17 と integrin $\alpha 6\beta 4$ は取得精製可能であり、laminin-332 も利用可能であるが、BP230 や COL7 などの分子量の大きいタンパクについては全長を取得するのが難しいため、エピトープとされる一部のみを用いるのは可能である。そして MMP 自己抗体は主に基底膜部のタンパク 6 つのタンパクに対する自己抗体を持つため、それらの 6 つを全て含むような ELISA が作成できれば理論上 MMP 自己抗体は検出可能であると回答し

た。しかし MMP は一般的に血清中の自己抗体量が少ない場合が多く、血中の自己抗体がゼロの場合もあるためそのような症例では検出は難しいことを回答した。また、今回作成した新規 ELISA で検出できなかった MMP 症例があった理由は何かという質問があった。それに対して申請者は、今回の ELISA では MMP 自己抗体がターゲットとする laminin-332、BP230、COL7 を自己抗原複合体として取得できず、それらのタンパクに対する自己抗体を持つ MMP は検出できないと回答した。主査の石田教授からは、複数の自己抗原に対して自己抗体を有するような症例と単一エピトープの自己抗体のみを持つ症例では臨床像とは異なるのかという質問があった。これに対して申請者は BP、DPP4i-BP、線状 IgA 水疱性皮膚症の例を挙げ、単一分子についてもそのエピトープによって臨床像が異なっており、基底膜部のどのタンパクのどのエピトープに対する自己抗体かによって臨床像は異なると回答した。今回用いた MMP の中には複数の自己抗原に対する反応を示した症例もあったが、単一のエピトープのものとの臨床像の重症度などの比較は今後の課題であると回答した。また、HEK293 でリコンビナントタンパクを取得する場合と比較して native な自己抗原複合体として得る場合の効率はどうか、また再現性はどうかという質問があった。これに対して申請者は cell line 確立後は同様の過程で培養とタンパク精製が可能であるが、native な COL17 は強制発現させた場合より発現量が少ないため取得できるタンパク量は 1/10 オーダーとなると回答した。また、複数回 native COL17 の精製産物を確認しているが、取れてくる量や結合タンパクには不安定性は見られなかったと回答した。また、リコンビナントタンパクとの比較で、翻訳後修飾などは検討したのかという質問があり、申請者は native COL17 は 160kDa や 120kDa の切断を受けたと考えられる断片が含まれていたことと、native COL17 複合体に含まれていた integrin $\alpha 6\beta 4$ は、そのリコンビナントタンパクよりも分子量が大きくなっており、リン酸化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けた可能性が考えられると回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。