



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15465
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91591
Type	doctoral thesis
File Information	MAI_Shoko.pdf



学位論文

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)**

2023年3月

北海道大学

眞井 翔子

学位論文

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)**

2023年3月

北海道大学

眞井 翔子

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1
要旨	2
略語表	5
緒言	7
実験方法	21
実験結果	26
考察	49
結論	53
謝辞	54
利益相反	55
引用文献	56

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shoko Mai, Kentaro Izumi*, Yosuke Mai, Ken Natsuga, Norito Ishii, Daisuke Sawamura, Franziska Schauer, Dimitra Kiritsi, Wataru Nishie, Hideyuki Ujiie:
Native autoantigen complex detects pemphigoid autoantibodies.
JID Innov (Impact factor: -), in press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Shoko Mai, Yosuke Mai, Kentaro Izumi, Norito Ishii, Daisuke Sawamura, Franziska Schauer, Dimitra Kiritsi, Wataru Nishie*:
Detection of bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid autoantibodies using native BP180/integrin $\alpha6\beta4$ complexes from keratinocytes.
The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Nagoya, Japan, 2020.12.

Shoko Mai, Kentaro Izumi*, Yosuke Mai, Ken Natsuga, Norito Ishii, Daisuke Sawamura, Franziska Schauer, Dimitra Kiritsi, Wataru Nishie, Hideyuki Ujiie:
A novel ELISA which uses an isolated native autoantigen complex to detect mucous membrane pemphigoid autoantibodies.
The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Nagasaki, Japan, 2022.12.

要旨

【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пит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 $\alpha 6\beta 4$ 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 Receiver operating characteristic (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 86.7% 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。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

BP	Bullous pemphigoid
BMZ	Basement membrane zone
BPDAI	Bullous Pemphigoid Disease Area Index
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CLEIA	Chemiluminescent enzyme immunoassay
COL17	Type XVII collagen
COL7	Type VII collagen
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cas9	CRISPR-associated protein 9
C 末端	Carboxyl terminus, C-terminus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP4i	Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor
DPP4i-BP	DPP4i-associated BP
E-cad	E-cadherin
ECM	Extracellular matrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
gRNA	Guide RNA
HD	Hemidesmosome
HRP	Horseradish peroxidase
ITG	Integrin
IP	Immunoprecipitation
KC	Keratinocyte
LABD	Linear IgA bullous dermatosis
MMP	Mucus membrane pemphigoid
nCOL17	Native COL17
NC16A	Non-collagenous 16A domain
NC16B	Non-collagenous 16B domain
NC16C	Non-collagenous 16C domain

N 末端	Amino terminus, N-terminus
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
ROC	Receiver operating characteristic
rCOL17	Recombinant COL17
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ssDNA	Single-strand DNA

緒言

自己免疫性水疱症は、全身に水疱やびらんを生じる難治性皮膚疾患である。自己免疫性水疱症は、組織学上、表皮下水疱形成を特徴とする類天疱瘡群と表皮内水疱を形成する天疱瘡群に大別される (Amber et al., 2018; Kershenovich et al., 2014)。類天疱瘡群の自己抗体は、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る。そして類天疱瘡はその自己抗原と臨床症状によりさらに分類され、主なサブタイプとして、水疱性天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP)、粘膜類天疱瘡 (mucous membrane pemphigoid, MMP) が存在し、その他にも線状 IgA 水疱性皮膚症 (linear IgA bullous dermatosis, LABD)、妊娠性類天疱瘡、抗ラミニン γ 1 類天疱瘡などがある (Egami et al., 2020; Schmidt and Zillikens, 2013)。

BP、MMP、LABD、妊娠性類天疱瘡などにおいては 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пит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 (Giudice et al., 1993)、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 (Kobayashi et al., 2002)。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 (Izumi et al., 2016)。rCOL17 ELISA は、COL17 のあらゆる領域を標的とする抗 COL17 自己抗体を検出することが可能である (Izumi et al., 2016)。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) の自己抗体は COL17 の細胞外領域を標的とすることが多いため有用である (Izumi et al., 2016)。このように自己抗体の検出は、自己免疫疾患を正しく診断するために不可欠であり、様々な自己免疫疾患において、ELISA、chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) またはウェスタンブロットティングの基質としてリコンビナント自己抗原が使用されてきた (Schmitt and Papisch, 2002)。しかし、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 (Doyle and Mamula, 2002)。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 (Ran et al. 2013) 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 (Lackner et al., 2015)。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。よって、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を利用したアッセイ系の構築が可能となる。そこで、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 を取得するために、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、回収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 以外のヘミデスモソーム (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 (Du et al., 2022)、rCOL17 ELISA はすべての MMP 自己抗体を検出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、それを用いた検出系の確立により MMP 自己抗体の検出効率向上を試みた。

まず、本章では、COL17、BP、DPP4i-BP、MMP について概説し、本研究の目的を述べる。

XVII型コラーゲン (Type XVII collagen, COL17)

皮膚は人体最大の臓器であり、外界とのバリア機能を担う重要な組織である。最外層である表皮とその下層である真皮の間の、表皮基底膜部に存在するHDが表皮-真皮境界部の接着に重要な役割を果たす(McMillan et al., 2003)。HDは多数の分子から構成されるが、XVII型コラーゲン (Type XVII collagen, COL17)はその主要な構成分子である(Diaz et al., 1990; Giudice et al., 1992; Nishie et al., 2007)。先天的にはCOL17をコードする *COL17A1* 遺伝子変異により、表皮真皮間接合の脆弱性が生じ、外的刺激で容易に水疱を形成する接合部型表皮水疱症を発症する(Condrat et al., 2019; Has et al., 2020; Nishie et al., 2007)。後天的にはCOL17に対する自己抗体により表皮真皮間の接着が解離することで表皮下水疱を生じる自己免疫性水疱症である水疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid, BP)を発症する(Balding et al., 1996; Diaz et al., 1990; Hofmann et al., 2002; Labib et al., 1986; Oyama et al., 2006; Schmidt et al., 2001)。これらのことから、COL17が表皮真皮間の接着に重要な役割を担っていることが示唆される。

COL17は膜貫通型コラーゲンファミリーに属し、分子量180kDaの α 鎖が3本会合したホモ三量体である(Franzke et al., 2005; Hirako et al., 1996)。COL17はアミノ末端(amino terminus, N末端)が細胞質内、カルボキシル末端(carboxyl terminus, C末端)が細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)に存在する(Franzke et al., 2003; Giudice et al., 1992)。COL17は16個の非コラーゲン領域とそれに挟まれた15個のコラーゲン領域から成る(図1)(Giudice et al., 1992)。また、COL17の三次構造は縦に長く、in vivoではC末端に柔軟なループ構造を持つ(Nonaka et al., 2000)。

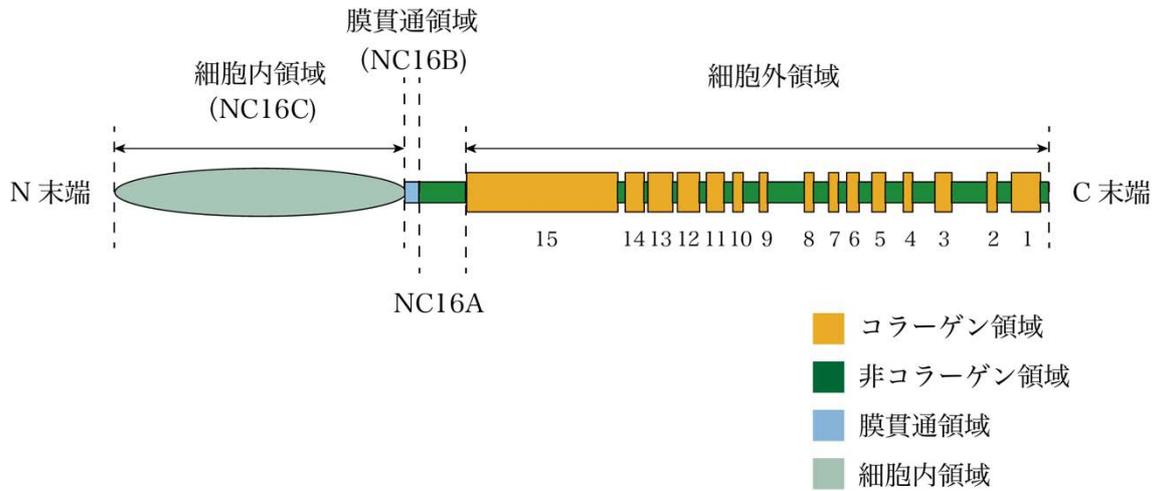


図 1. COL17 の模式図

COL17 は細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域から構成される。N 末端が細胞内に、C 末端が細胞外に存在する。非コラーゲン領域が 16 個と、それに挟まれた 15 個のコラーゲン領域が存在する。C 末端側から数えて 16 番目の非コラーゲン領域は細胞外領域 NC16A、膜貫通領域 NC16B、細胞内領域 NC16C に分類される。

COL17 は、HD において複数の結合パートナーが存在する。COL17 は HD において integrin (ITG) $\alpha 6 \beta 4$ と同じく細胞膜を貫通し、その細胞内に存在する BP230 (Hopkinson and Jones, 2000; Koster et al., 2003)、plectin (Koster et al., 2003; Natsuga et al., 2017) および ITG $\beta 4$ と相互作用する (Aho and Uitto, 1998; Hamill et al., 2011; Koster et al., 2003; Schaapveld et al., 1998)。また、COL17 の細胞外ドメインは ITG $\alpha 6$ (Hopkinson et al., 1995)、laminin-332 (Nishimura et al., 2016; Tasanen et al., 2004) や ECM 中に存在する IV 型コラーゲン (Kamaguchi and Iwata, 2019; Nishie et al., 2011) と相互作用している (図 2)。

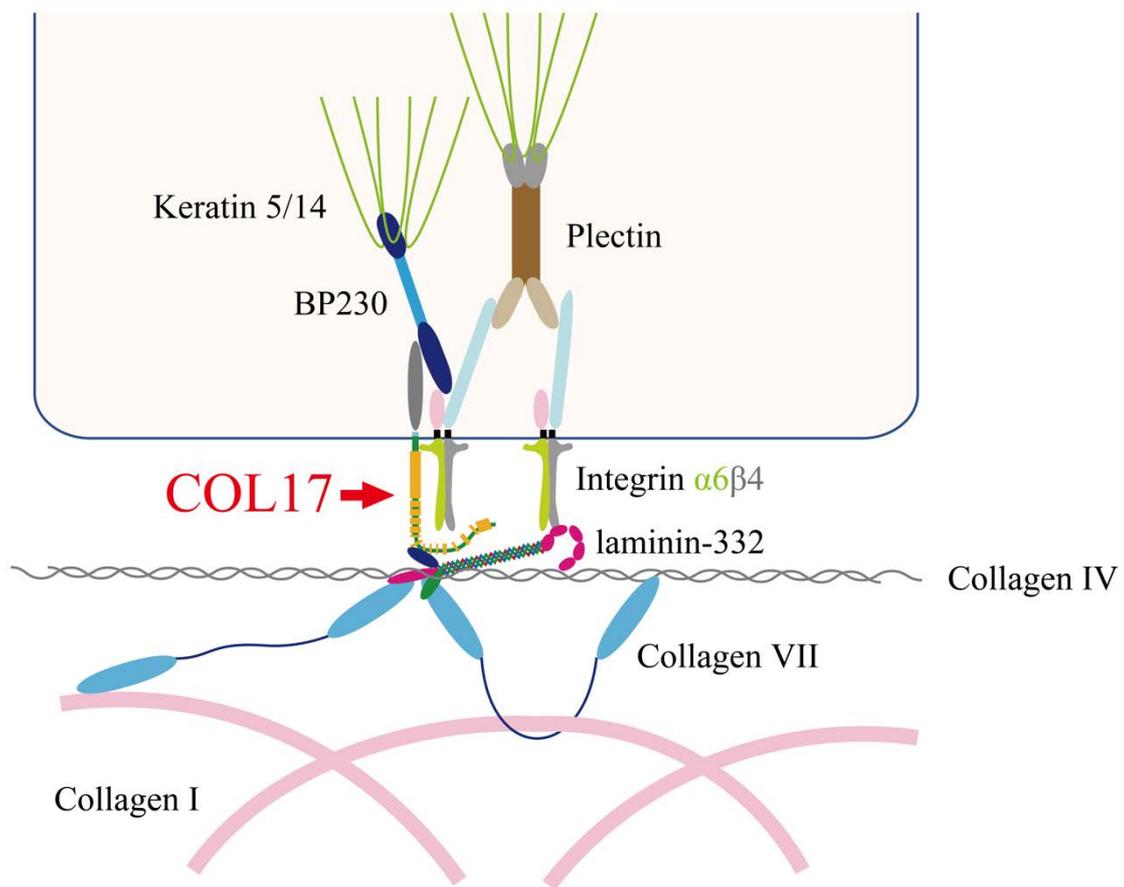


図 2. 表皮基底膜部の構成分子
(Nishie, 2014) から抜粋し、一部改変した。

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid, BP)

BP は本邦で最多の自己免疫性水疱症である (Egami et al., 2020; Schmidt and Zillikens, 2013)。BP は全身に浮腫性紅斑と緊満性水疱を呈し (図 3), 水疱部の病理組織像は好酸球浸潤を伴う表皮下水疱を呈する (図 4) (Nishie, 2014)。BP 自己抗体は主に表皮基底膜部 (basement membrane zone、BMZ) を標的とするため、蛍光抗体直接法にて表皮真皮境界部に沿った IgG の沈着を確認することができる (図 5) (Ishiko et al., 1993; Nishie, 2014)。BP 自己抗体は、免疫学的には COL17、BP230 のいずれか一方あるいは両方を標的とする (Schmidt and Zillikens, 2013)。臨床症状、病理組織学検査、及び免疫学的所見に基づいて BP の診断がなされる (表 1) (Ujiie et al., 2019a)。また重症度評価は水疱性類天疱瘡における皮膚病変の重症度スコアリングツールである Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI) を用いる (表 2) (Murrell et al., 2012)。免疫学的特徴としては、BP 自己抗体の 80~90% は、COL17 の細胞外領域の非コラーゲン領域である 16A (NC16A) ドメインを認識する自己抗体を有する (Kobayashi et al., 2002; Matsumura et al., 1996; Schmidt and Zillikens, 2013)。その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 ELISA は特に BP の診断に広く利用され、BP 患者における NC16A ELISA の感度は 84.4%、特異度は 98.9%となっている (Kobayashi et al. 2002)。



図 3. BP の臨床像

躯幹四肢に浮腫性紅斑を伴う水疱形成を認める。

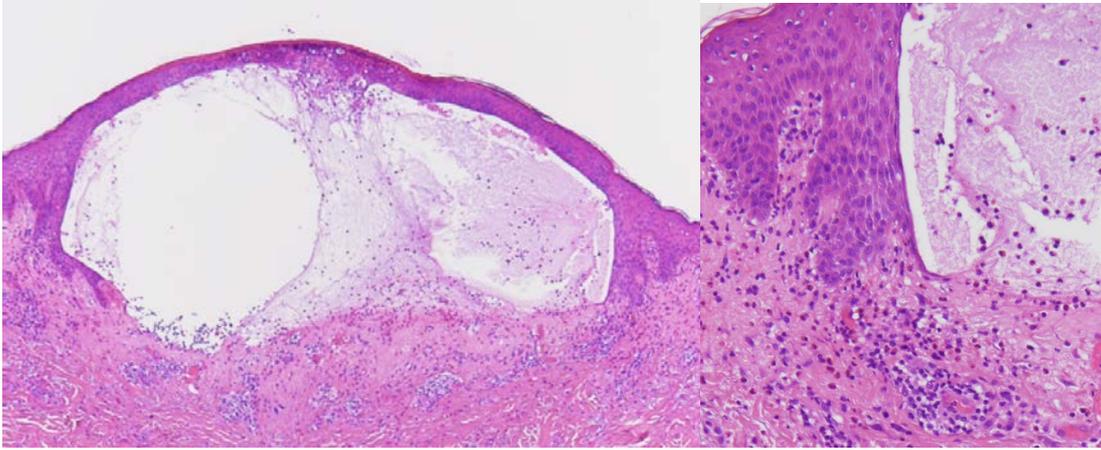


図 4. BP の病理組織像

表皮下裂隙を認め, 真皮に好酸球浸潤を伴う。

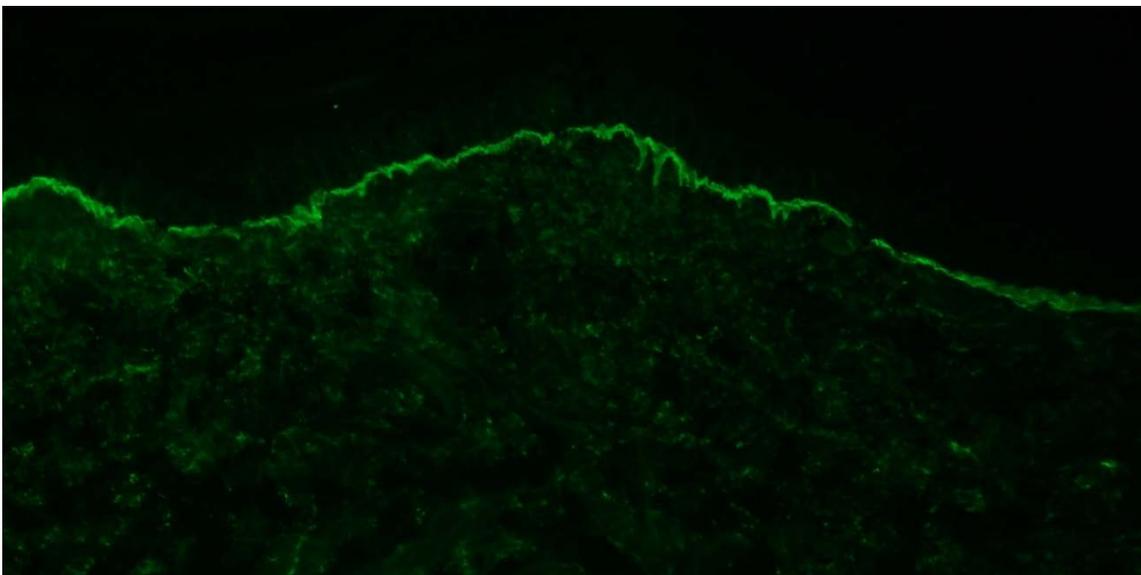


図 5. BP 患者皮膚における IgG 自己抗体の沈着

患者皮膚中の自己抗体沈着を検出する蛍光抗体直接法により, 表皮真皮境界部に IgG 自己抗体の線状沈着を認める。

表 1. BP の診断基準

A 症状
1. 皮膚に多発する、瘙痒性紅斑.
2. 皮膚に多発する、緊満性水疱及びびらん.
3. 口腔粘膜を含む粘膜部の非感染性水疱及びびらん.
B. 検査所見
1. 病理組織学的診断項目
1) 表皮下水疱を認める.
2. 免疫学的診断項目
1) 蛍光抗体直接法により、皮膚の表皮基底膜部に IgG、あるいは補体の沈着を認める.
2) 蛍光抗体間接法により、血中の抗表皮基底膜部抗体 (IgG) を検出する. あるいは、ELISA (CLEIA) 法により、血中の抗 BP180 抗体 (IgG)、 抗 BP230 抗体 (IgG) あるいは抗 VII 型コラーゲン抗体 (IgG) を検出する.
C. 鑑別疾患
以下の疾患を鑑別する.
表皮水疱症、虫刺症、蕁麻疹様血管炎、ポルフィリン症、多形紅斑、薬疹、アミロイドーシス、水疱型エリテマトーデス.
< 診断のカテゴリー >
Definite: 以下の①又は②を満たすもの
① : A のうち 1 項目以上かつ B-1 かつ B-2 のうち 1 項目以上を満たし、C の鑑別すべき疾患を除外したもの.
② : A のうち 1 項目以上かつ B-2 の 2 項目を満たし、C の鑑別すべき疾患を除外したもの.

表 2. BP の重症度判定基準

部位	びらん/水疱 点数	膨疹/紅斑 点数
頭部・顔面	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
頸部	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
胸部	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
左上肢	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
右上肢	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
手	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
腹部	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
陰部	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
背部・臀部	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
左下肢	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
右下肢	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
足	0・1・2・3・5・10	0・1・2・3・5・10
合計	/120	/120

部位	びらん/水疱 点数
眼	0・1・2・3・5・10
鼻腔	0・1・2・3・5・10
頬粘膜	0・1・2・3・5・10
硬口蓋	0・1・2・3・5・10
軟口蓋	0・1・2・3・5・10
上歯肉	0・1・2・3・5・10
下歯肉	0・1・2・3・5・10
舌	0・1・2・3・5・10
口腔底	0・1・2・3・5・10
口唇	0・1・2・3・5・10
後咽頭	0・1・2・3・5・10
外陰部	0・1・2・3・5・10
合計	/120

皮膚:びらん/水疱

0点 = なし

1点 = 1～3個かつ長径 1cm 以上の皮疹はない

2点 = 1～3個かつ長径 1cm 以上の皮疹が 1個以上

3点 = 4個以上かつ長径 2cm 以上の皮疹はない

5点 = 4個以上かつ長径 2cm 以上の皮疹が 1個以上

10点 = 4個以上かつ長径 5cm 以上の皮疹が 1個以上

または領域の全体に認める. 注: 上皮化した部分は含まない

皮膚:膨疹/紅斑

0点 = なし

1点 = 1～3個かつ長径 6cm 以上の皮疹はない

2点 = 1～3個かつ長径 6cm 以上の皮疹が 1個以上

3点 = 4個以上あるいは長径 10cm 以上の皮疹が 1個以上

5点 = 4個以上かつ長径 25cm 以上の皮疹が 1個以上

10点 = 4個以上かつ長径 50cm 以上の皮疹が 1個以上

または領域の全体に認める. 注: 炎症後の色素沈着は含まない

粘膜:びらん/水疱

0点 = なし

1点 = 1個

2点 = 2～3個

5点 = 4個以上または長径 2cm 以上の粘膜疹が 2個以上

10点 = 領域の全体に認める

下記①～③でそれぞれ判定を行い, 最も高い重症度を採用する

①皮膚:びらん/水疱の合計スコア

1. 軽症 ≤14点

2. 中等症 15～34点

3. 重症 ≥35点

②皮膚:膨疹/紅斑の合計スコア

1. 軽症 ≤19点

2. 中等症 20～34点

3. 重症 ≥35点

③粘膜:びらん/水疱の合計スコア

1. 軽症 ≤9点

2. 中等症 10～24点

DPP4 阻害薬関連水疱性類天疱瘡 (DPP4i-associated BP、DPP4i-BP)

糖尿病治療薬として広く使用されている dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬 (dipeptidyl peptidase-IV inhibitor、DPP4i) を投与された糖尿病患者における症例報告が 2012 年に Skandalis らにより最初になされ (Skandalis et al., 2012)、それ以来 DPP4i により誘発された BP (DPP4i-associated BP、DPP4i-BP) の報告が様々な国から、使用可能な全ての DPP4i について多数報告されている (Arai et al., 2018; Tasanen et al., 2019)。2016 年には、フランスの Pharmacovigilance Database を調査した研究では、DPP4i 内服と BP 発症との間に強い関連があると指摘された。(Béné et al., 2016)。また、DPP4i 製剤の中でも特に vildagliptin の投与が BP 発症の最も高いリスクを示した (Arai et al., 2018; Kridin and Bergman, 2018; Kridin and Cohen, 2018; Ständer et al., 2021; Varpuluoma et al., 2018)。

興味深いことに、過去に我々や他のグループによって、日本人の DPP4i-BP 患者は、特有の臨床的・免疫学的特徴を示すことが明らかとなった (Horikawa et al., 2018; Mai et al., 2018; Ujiie et al., 2018)。典型的な BP 患者が、NC16A に対する自己抗体を持つが (Kobayashi et al., 2002)、DPP4i-BP の自己抗体は NC16A 領域に反応しないことが多く (Ujiie et al., 2018)、COL17 細胞外領域の非 NC16A 領域を標的とする傾向がある (Izumi et al., 2016; Mai et al., 2019)。

さらに、典型的な BP 患者は浮腫性紅斑を伴う緊満性水疱を呈するが、DPP4i-BP は紅斑の乏しい臨床像を呈する傾向にあり(図 6)、病理組織学的にも表皮下裂隙の周囲に浸潤する好酸球などの炎症細胞は乏しい (Horikawa et al., 2018; Ujiie et al., 2018)。BPDAI (Murrell et al., 2012) では、DPP4i-BP 患者は典型的な BP 患者と比べて、びらん/水疱のスコアに有意な差はないが、膨疹/紅斑のスコアが有意に低い (Horikawa et al., 2018; Ujiie et al., 2018)。なお、COL17 の非 NC16A 領域を標的とする抗 COL17 自己抗体を有する BP も非炎症性表現型を示す傾向がある (Izumi et al., 2016)。このように DPP4i 内服による BP 発症リスクの増加や臨床的および免疫学的特徴に関する多数の報告があるにも関わらず、DPP4i 投与による BP 発症メカニズムについては未だ明らかになっていない。



図 6. DPP4i-BP の臨床像

通常の BP と比較し、DPP4i-BP は浮腫性紅斑の乏しい臨床像を呈する.

粘膜類天疱瘡 (mucous membrane pemphigoid, MMP)

粘膜類天疱瘡 (mucous membrane pemphigoid, MMP) は、以前は癒痕性類天疱瘡 (cicatricial pemphigoid) と呼ばれていた稀な自己免疫性水疱症で、主として口腔粘膜、眼球結膜、鼻腔、咽頭、喉頭、食道、肛門、外陰部などの開口部粘膜に病変を生じる疾患であり、皮膚病変は全く認めないかごくわずかである (図 7) (Schmidt and Zillikens, 2013)。特に、結膜の癒痕化はしばしば視力障害を引き起こし、失明に至ることもある (Saw and Dart 2008)。

MMP 自己抗体は、COL17 (Chan et al., 1991)、laminin-332 (Chan et al., 1997)、type VII collagen (COL7) (Chan et al., 2002)、ITG α 6 β 4 (Rashid et al., 2006a)などの様々な BMZ タンパク質を標的としており、標的抗原の多様性と血中の自己抗体価が低いことが正確な診断を困難としている。1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法 (図 8) は、患者血清中の自己抗体が 1 M 食塩水によって人工的に剥離された正常ヒト皮膚の表皮側か真皮側に反応するかを調べることで、患者血清中の自己抗体の標的抗原を推測する方法である (Gammon et al., 1984)。表皮側に反応した場合は COL17、BP230、ITG α 6 β 4 などが標的抗原であり、真皮側に反応した場合は laminin-332、COL7 などが標的抗原である (Schmidt and Zillikens, 2013)。これによりある程度自己抗原を絞り込むことができる。

MMP 自己抗体の 75% は COL17 と反応するが (Oyama et al., 2006)、主に COL17 細胞外ドメインの C 末端領域と反応する傾向がある (Hayakawa et al., 2014)。そのため、COL17 NC16A ポリペプチドを用いた従来の ELISA では、抗 COL17 型 MMP 患者であっても 31% の自己抗体しか検出できない (Yasukochi et al., 2016)。Laminin-332 (以前は laminin-5 または epiligrin と呼ばれていた) は α 3、 β 3、 γ 2 のサブユニットで構成され、MMP 患者の 25% が laminin-332 に対する自己抗体を持つ (Chan et al., 1997)。BP230 は、MMP 症例の 10-30% で報告されているが (Du et al., 2022)、そのほとんどは同時に COL17 に対する自己抗体を有する (Inoue et al., 2016)。ITG α 6 β 4 はヘテロ二量体の膜貫通型 HD 接着分子で、120 kDa の α 6 サブユニットと 205 kDa の β 4 サブユニットから構成される。COL7 は、基底膜を裏打ちするアンカーリングフィブリルの主成分で、laminin-332 と真皮コラーゲンを繋いでおり、290 kDa の 3 本の α 1 鎖からなり、三重らせん構造を形成している。COL7 は MMP の標的抗原としては稀であり、その自己抗体は MMP 血清の約 4% で検出される (Cozzani et al., 2014)。



図 7. MMP の臨床像

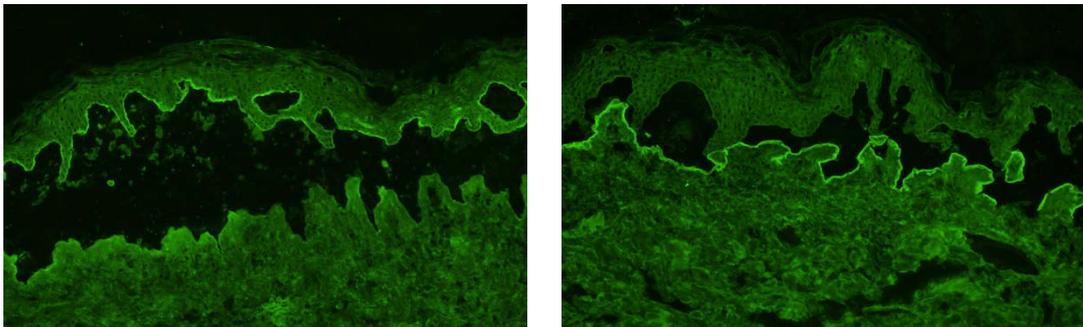


図 8. 1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法

(左) 表皮側に陽性、(右) 真皮側に陽性

本研究の目的

BP、DPP4i-BP、MMP の自己抗体検出について現在一般的に用いられている ELISA は、リコンビナントタンパクを利用したものしかない。そのため本研究では、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術による内因性タンパクへのタグ付け (Lackner et al. 2015) を利用することで、ケラチノサイト(KC)の内在性 *COL17A1* 遺伝子に DDDDK-tag を挿入してネイティブ COL17(native COL17、nCOL17)を複合体として単離することを試みる。単離した nCOL17 複合体の解析を行い、nCOL17 複合体を基質として用いた新規 ELISA を確立し、その新規 ELISA を用い薬剤による COL17 の抗原性変化の検討や、特に MMP 自己抗体を効率的に検出できるかについて解析を行う。

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、参加者から書面による同意を得て試行した。臨床検体の取り扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認 (承認番号:015-025) を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した。遺伝子組換え実験は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則した。

1. CRISPR-associated protein 9 (Cas9) 発現 HaCaT

不死化した表皮細胞 (keratinocyte, KC) である HaCaT (Boukamp et al., 1988) に pLenti-EF1a-Cas9-Puro レンチウイルス (Applied biological materials Inc.) を感染させた。HaCaT は 10% 牛胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) 中で培養し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピューロマイシン (Thermo Fisher Scientific) 下で抗生物質耐性クローンとして Cas9 を安定発現している HaCaT (Cas9+) HaCaT) を選択した。すべての培養は、5% CO₂、37°C 加湿インキュベーターで維持した。タンパク質サンプルは、5×ローディングバッファー (0.25 M Tris-HCl; 8% SDS; 30% glycerol; 0.02% bromophenol blue; 0.3 M β -mercaptoethanol; pH 6.8) で 95°C、5 分間変性させた。サンプルは 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 電気泳動で分離し、0.2 μm のニトロセルロース膜 (BioRad) に転写した。転写したニトロセルロース膜は、トリス緩衝生理食塩水で希釈した 2% スキムミルクを用いて室温で 30 分間ブロックした。一次抗体としてウサギ抗 Cas9 (632607, Clontech, 1:1,000 希釈)、ウサギ抗 beta-tubulin (ab6046, Abcam, 1:3,000 希釈) を 4°C で 16 時間インキュベートした。二次抗体として、抗ウサギ IgG (Invitrogen) を 2% スキムミルク PBS で希釈 (1:5,000) し、室温で 1 時間反応させた。シグナルは Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad) を用いて可視化し、LAS-4000 mini-Imager (Fujifilm) で検出した。

2. gRNA と一本鎖ヌクレオチド鋳型の構築

COL17A1 ゲノム配列 (NG_007069.1) の exon 2 を標的とし、5' 端に DDDDK-tag を挿入するため、Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>) により guide RNA (gRNA) (5'-TCCTGCAGGTGGCTATGGTA-3') を設計した。DDDDK-tag 配列と 3' 及び 5' にホモロジーアームを有する一本鎖オリゴヌクレオチドは以下のように合成した (System Biosciences)。

5'-

ACAATGATAAGTATGACTATCATGGTTTCTGATTTTTCTCCTGCAGGTGGCTGC
GGCCGCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGATGTAACCAAGAAA
AACAAACGAGATGGAAGTCACTGAGAGAA

-3'

(下線部:NotI、太字部:DDDDK-tag)。

RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造元のプロトコルにしたがって gRNA と鋳型 single strand DNA (ssDNA) を Cas9(+) HaCaT に共導入した。導入後、HaCaT は低密度でプレーティングし、単離したコロニーを得た。

3. 免疫染色

細胞をスライドチャンバー (ibidi) 上で 48 時間培養した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドにより 10 分間室温で固定した。PBS 中の 0.1% Triton X-100 を用いて室温で 20 分間透過処理した後、3%ウシ血清アルブミン含有 PBS で 30 分間インキュベートし、10 mM グリシン含有 PBS で 1 回洗浄した。一次抗体抗として抗 DDDDK (FLAG-M2, Sigma-Aldrich, 1:500 希釈) および抗 COL17 NC16A (11-NC16A, 最終濃度 1 μ g/ml) (Natsuga et al., 2012) を用いて室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体として、ヤギ抗マウス IgG Alexa Fluor 546 (Invitrogen A11003, 1:1,000 希釈) およびヤギ抗ラビット IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A21206, 1:1,000 希釈) を用いて室温で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 3 回、5 分間の洗浄を行った。細胞核の染色のため DAPI (Life Technologies) を使用した。BX-51 正立顕微鏡 (Olympus) で写真撮影を行った。

4. nCOL17、rCOL17 の単離

rCOL17 は既報告の Flp-In 293 システム (Invitrogen) を用いて作製した (Izumi et al., 2016)。HaCaT 細胞および HEK293TN 細胞 (System Biosciences) をコンフルエントになるまで増殖させた。細胞溶解は、溶解バッファー (1% (v/v) nonidet P-40 (Nacalai Tesque)、25mM Tris-HCL (pH7.4)、100 mM NaCl、10mM EDTA、1:100 希釈プロテアーゼ阻害剤カクテル (P8340, Sigma-Aldrich)) を使用して調製した。全細胞溶解液を 13,000 rpm、4 °C で 20 分間遠心分離し、抗 DDDDK-tag mAb-マグネティックビーズ (MBL) で免疫沈降させ、続いて DDDDK ペプチド (Sigma-Aldrich) で溶出させた。

5. ウェスタンブロッティング及びクマシーブリリアントブルー染色

タンパク質サンプルは、5×ローディングバッファー (0.25 M Tris-HCl; 8% SDS; 30% glycerol; 0.02% bromophenol blue; 0.3 M β -mercaptoethanol; pH 6.8) で 95°C、5 分間変性させた。サンプルは 7 または 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE

電気泳動で分離し、0.2 μm のニトロセルロース膜 (BioRad) に転写した。転写したニトロセルロース膜は、トリス緩衝生理食塩水で希釈した 2% スキムミルクを用いて室温で 30 分間ブロックした。一次抗体としてウサギ抗ヒト COL17 抗体 (Ujiie et al. 2014)、マウス抗 DDDDK 抗体 (FLAG-M2, Sigma-Aldrich, 1:1,000 希釈)、ウサギ抗 ITG α 6 抗体 (HPA012696, Cell Signaling, 1:1,000 希釈)、マウス抗 ITG β 4 抗体 (sc-514426, Santa Cruz Biotechnology, 1:100 希釈) またはウサギ抗 E-cad 抗体 (24E10, Cell Signaling, 1:1,000 希釈) を室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体として、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) または抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を 2% スキムミルク PBS で希釈 (1:5,000) し、室温で 1 時間反応させた。シグナルは Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad) を用いて可視化し、LAS-4000 mini-Imager (Fujifilm) で検出した。CBB 染色では、7% もしくは 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE でタンパクサンプルを分離した。ゲルを 50% メタノールと 10% 酢酸を用いて室温で 30 分間固定した。超純水で洗浄した後、ゲルを 0.25% の Coomassie Blue R-250 (TCI) 液中に浸し、室温で一晩染色した。その後、ゲルを 10% 酢酸で脱色した。超純水で洗浄後、GT-D1000 (EPSON) でゲルをスキャンして撮像した。

6. 質量分析

装置は、液体クロマトグラフィー (EASY-nLC, Thermo Fisher Scientific) に分析用カラム (NTCC-360/75-3-125, Nikkyo Technos) を取り付け、Thermo LTQ Orbitrap Discovery 質量分析装置 (Thermo Fisher Scientific) に連結した。サンプル 4 μl をカラムに導入し、バッファ A (97.9% H_2O 、2% アセトニトリル、0.1% ギ酸) およびバッファ B (10% H_2O 、90% アセトニトリル、0.1% ギ酸) の 2 種類のバッファーを流速 300 nL/min で用いた (0-20 分: 0-35% バッファー B; 20-35 分: 35-95% バッファー B)。Orbitrap から 400 から 1600 m/z の質量分析データを取得した。データは Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) で取得、処理した。

7. BP、DPP4i-BP、MMP 症例の収集

BP については、他施設から当科へ rCOL17 ELISA の検査目的に送付された血清もしくは当科を受診した患者の血清で、研究に使用する同意を得た症例のうち、臨床症状、病理組織学検査、及び免疫学的所見に基づいた BP の診断 (表 1) (Ujiie et al., 2019a) を満たした血清を使用した。本研究の BP 症例は全て 1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法で表皮側に反応することを確認した。また、BP の診断を満たし、BP 発症時に DPP4i を内服している症例を DPP4i-BP と定義した。

MMP については、他施設から当科へ rCOL17 ELISA の検査目的に送付された血清もしくは当科を受診した患者の血清で、研究に使用する同意を得た症例のうち、粘膜

症状が主体で直接蛍光抗体法もしくは 1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法 (Gammon et al., 1984) で陽性を認めた血清 55 例を使用した。

1 M 食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法では、正常なヒト皮膚を 4°C の 1 M 食塩水溶液に 48 時間以上浸漬した。その後、Optimal Cutting Temperature (Muto Pure Chemicals) を用いて瞬間凍結し、5 μ m の凍結切片を作成し、風乾後、PBS で 10 倍以上に希釈した患者血清と 37°C で 40 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗ヒト IgG 抗体 (希釈率 1:100) (Dako Cytomation) を用いて、37°C で 30 分間反応させた。PBS で洗浄した後、切片を Fluoromount-G (SouthernBiotech) で封入した。蛍光画像は BX-51 正立顕微鏡 (Olympus) で撮影した。

8. ELISA

rCOL17 ELISA は、既報告の方法に若干の変更を加えて行った (Izumi et al., 2016)。96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に 1 μ g/well のタンパクを 50 mM 炭酸緩衝液 (pH9.5) でコーティングした後、Blocking Reagent for ELISA (Roche) を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。PBS で 1:100 に希釈した患者血清を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、プレートを PBS で 1:10,000 に希釈した HRP 結合抗ヒト IgG 抗体と室温で 1 時間インキュベートした。その後、プレートを基質溶液である 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride single solution (Thermo Fisher Scientific) と反応させた。発色後、0.12 N 塩酸を加えて反応を停止させ、相関波長を 620 nm に設定したマイクロプレートリーダー (Tecan Austria GmbH) で 450 nm の吸光度を測定した。ELISA index 値は以下の式で定義した: $\text{index 値} = (\text{被検血清の OD}_{450} - \text{陰性コントロールの OD}_{450}) / (\text{陽性コントロールの OD}_{450} - \text{陰性コントロールの OD}_{450}) \times 100$ 。陽性コントロールは COL17 の NC16A ドメインと反応する BP のプール血清、陰性コントロールは健常者の血清を用いた。抗 BP230 もしくは抗 COL7 自己抗体の検出は BP230 ELISA kit (MBL) と COL17 ELISA kit (MBL) を用いた。

9. リコンビナント ITG α 6, ITG β 4 の作製

ITG α 6 の全コード領域を含む complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) (NM_000210.2) を人工合成し pcDNA5/FRT (Invitrogen) 発現ベクターに挿入した。ITG β 4 (NM_000213) cDNA を購入し、pcDNA3.1 発現ベクターに乗せかえを行った。ITG α 6 と ITG β 4 は C 末端に DDDDK でタグ付けした。DDDDK-ITG α 6 を有する pcDNA5/FRT 発現ベクターは、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) により Flp-In 293 細胞 (Invitrogen) に pOG44 (Invitrogen) と共にトランスフェクションした。DDDDK-ITG β 4 を有する pcDNA3.1 発現ベクターは、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) により HEK293TN 細胞 (System Biosciences) にトランスフェクションした。これらの細胞のうち、DDDDK-

ITG α 6 または ITG β 4 を安定に発現するものを抗生剤によるセレクションを行い、安定的に発現しているクローンを選択した。それらをコンフルエントになるまで培養し、溶解し、免疫沈降した。サンプルは 7% gel で SDS-PAGE で行い、その後クマシーブリリアントブルー染色とウェスタンブロッティングを行った。転写後、膜を 2% スキムミルクでブロックし、その後、ウサギ抗 ITG α 6 IgG 抗体またはマウス抗 ITG β 4 抗体または DDDDK IgG 抗体と室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体は、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) または抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を 2% スキムミルク PBS で希釈 (1:5,000) し、室温で 1 時間反応させた。

10. 精製 laminin-332 ウェスタンブロッティング

精製 laminin-332 は、資生堂ライフサイエンス研究センター天野博士より譲り受け使用した (Amano et al., 1999; Tsunenaga et al., 1998)。サンプルは 7% gel で SDS-PAGE で行い、その後ウェスタンブロッティングを行った。メンブレンへ転写後、2% スキムミルクでブロックし、その後、ウサギ抗 laminin5 抗体 (ab14509, abcam, 1:1,000) と室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体は、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を 2% スキムミルク PBS で希釈 (1:5,000) し、室温で 1 時間反応させた。

11. DPP4i 存在下での DDDDK-COL17 HaCaT の培養

DDDDK-COL17 HaCaT 細胞をコンフルエントになるよう培養後、DPP4 阻害薬である vildagliptin (Sigma-Aldrich) を添加し培養した。Vildagliptin の濃度は 100 μ M とし (Asakura et al. 2016) 10% FBS 含有 DMEM (Invitrogen) 中で 48 時間培養した。上記のように細胞ライセートから nCOL17 を単離した。

12. 統計解析

すべての統計解析は、Graph Pad Prism 9.3 (GraphPad Software) を用いて行った。非 BP 対照群と BP または MMP 患者を、Mann-Whitney 検定により nCOL17 ELISA index 値および rCOL17 ELISA index 値で比較検討した。ROC 解析を行い、non-BP と BP または MMP の間のカットオフ値、特異度、感度を決定した。BP 血清の nCOL17 ELISA と rCOL17 ELISA index の関連性を Pearson's correlation and linear regression analysis で検討した。P 値は、0.05 未満を有意差ありとみなし、*: $0.01 < p < 0.05$ 、**: $0.001 < p < 0.01$ 、****: $p < 0.0001$ で示した。

実験結果

1. HaCaT の *COL17A1* 遺伝子への DDDDK-tag 配列の挿入

まず、レンチウイルスベクター系を用いて、Cas9 タンパク質を安定的に発現する HaCaT 細胞 (Cas9(+)) HaCaT) の樹立を行った。選択したクローンについてウェスタンブロットティングにより Cas9 の発現を確認し (図 9)、通常の KC の形態と同様の敷石状の形態を有する Cas9(+)) クローンを単離した (図 9)。

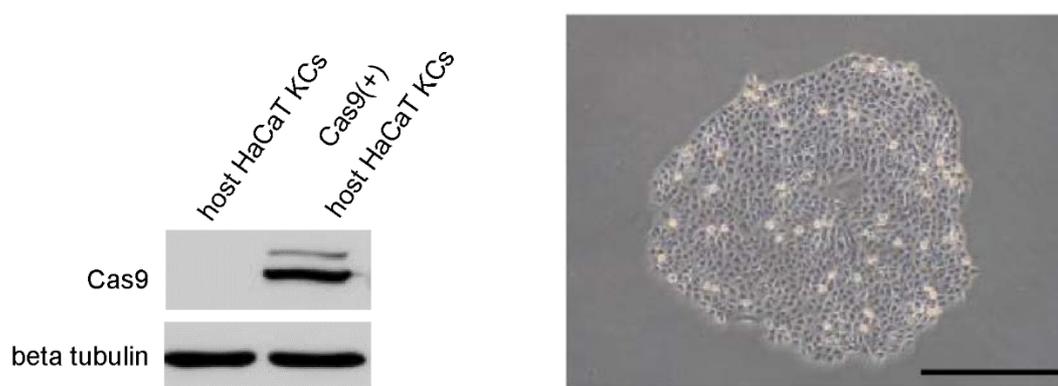


図 9. Cas9 発現 HaCaT

(左) ウェスタンブロットティングによりピューロマイシン耐性によって選択された Cas9 を安定的に発現する HaCaT (Cas9(+)) HaCaT) の Cas9 発現を確認した。

(右) 単離された Cas9(+)) HaCaT のうち、敷石状の様相を呈したものを選択した。スケールバーは 500 μm を表す。

Cas9(+)) HaCaT に *COL17A1* 遺伝子の exon 2 を標的とする gRNA を導入し、Cas9 による DNA の二本鎖切断 (double strand break, DSB) を生じさせ、同時に左右それぞれ 50 bp のホモロジーアームで挟まれた DDDDK-tag を含む 1 本鎖ヌクレオチドをドナーテンプレートとして用いて Cas9(+)) HaCaT にトランスフェクションし (図 10)、DNA 修復機構の一種である homology-directed repair (HDR) を利用して DDDDK-tag がノックインされた COL17 を発現する 1 クローン (DDDDK-COL17 HaCaT) を得た (図 11)。この DDDDK-COL17 HaCaT では、免疫染色で COL17 と DDDDK-tag の共局在化が確認された (図 12)。

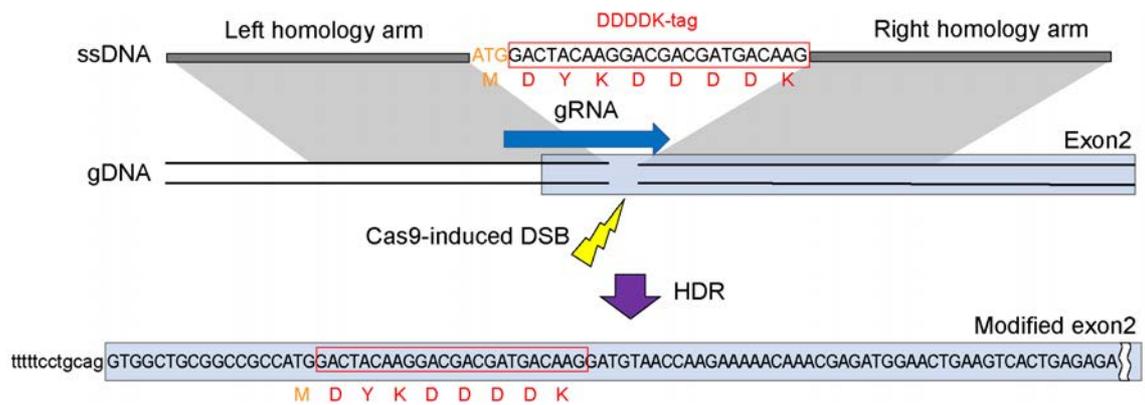


図 10. CRISPR/Cas9 による *COL17A1* の exon2 への DDDDK-tag の挿入
 Cas9(+) HaCaT での gRNA による DNA 二本鎖切断後に、ドナーテンプレート ssDNA により遺伝子修復機構を利用することで *COL17A1* 遺伝子のエクソン 2 への DDDDK-tag 配列のノックインを行った。

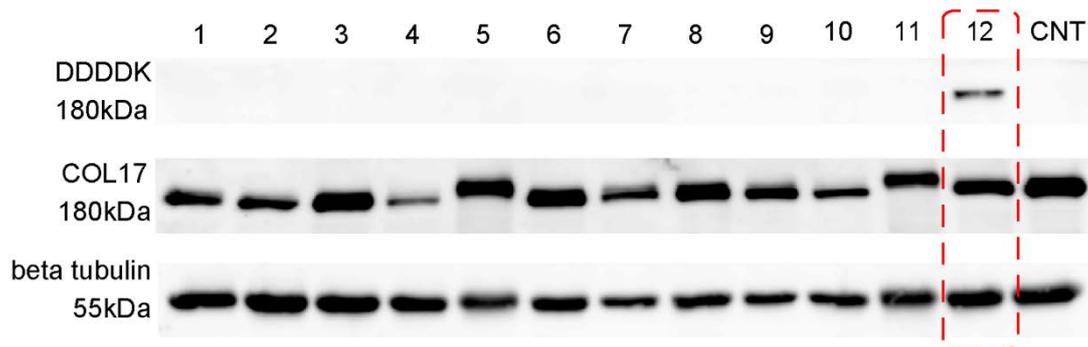


図 11. DDDDK-COL17 の発現を確認した

DDDDK-tag を HaCaT の *COL17A1* 遺伝子にノックインすることで HaCaT のネイティブな COL17 タンパクはウェスタンブロッティングにより、抗 DDDDK 抗体と抗 COL17 抗体のいずれにも陽性を示した (No.12)。No.1-12 はトランスフェクションしたクローンを、CNT は Cas9(+) HaCaT を示す。

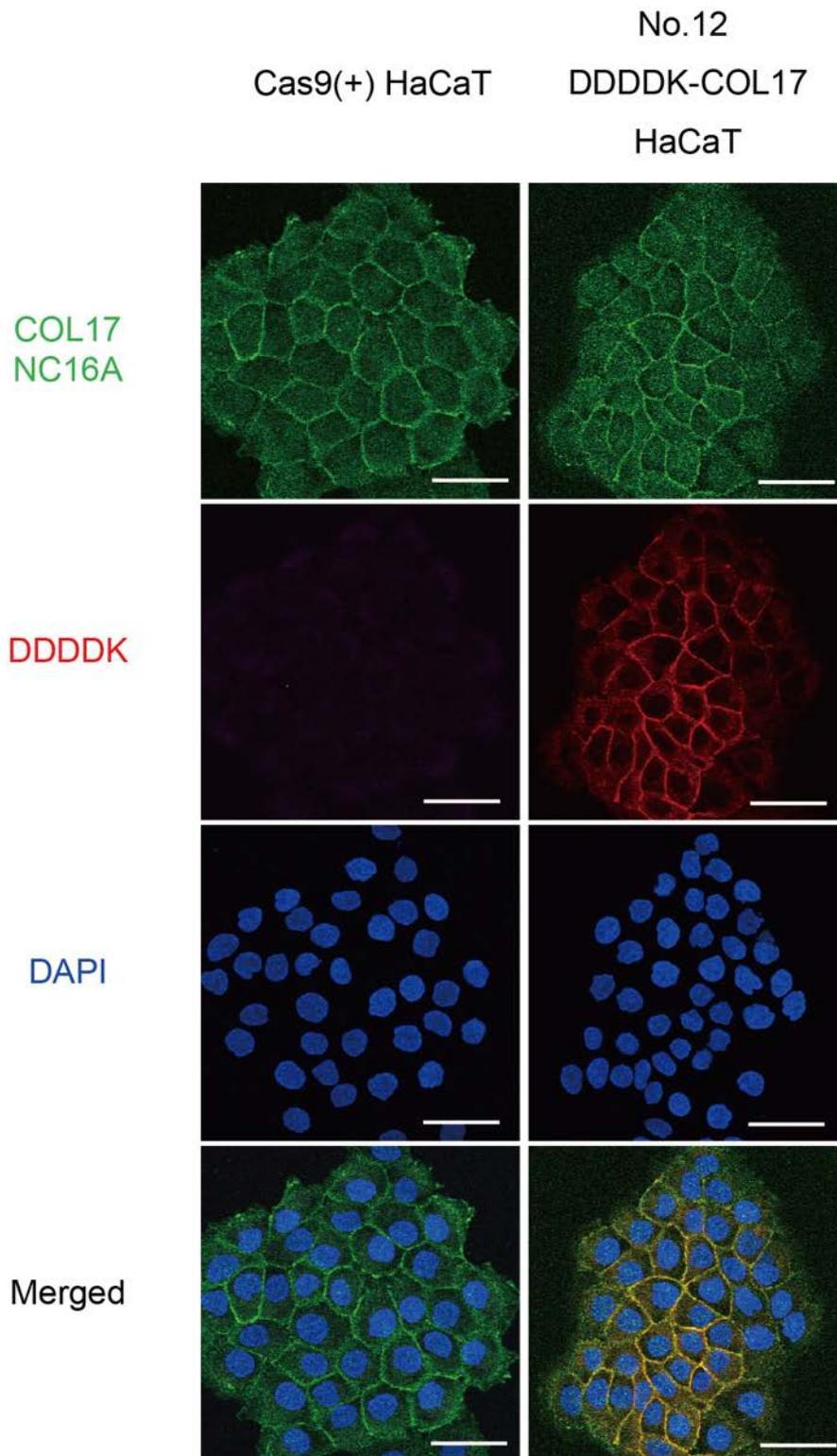


図 12. DDDDK と COL17 の細胞膜での共局在
HaCaT の免疫蛍光染色像。No.12 は、COL17 NC16A と共局在する DDDDK シグナルを示した。スケールバーは 50 μm を示す。

2. HaCaT からの nCOL17 複合体の単離

DDDDK-COL17 HaCaT の樹立により、DDDDK-tag が付加されたネイティブな COL17 である nCOL17 を免疫沈降法により精製することができた (図 13)。nCOL17 の CBB 染色では、180 kDa の COL17 だけでなく、さらに 250 kDa、160 kDa、130 kDa、120 kDa の付近のバンドも確認された (図 13)。

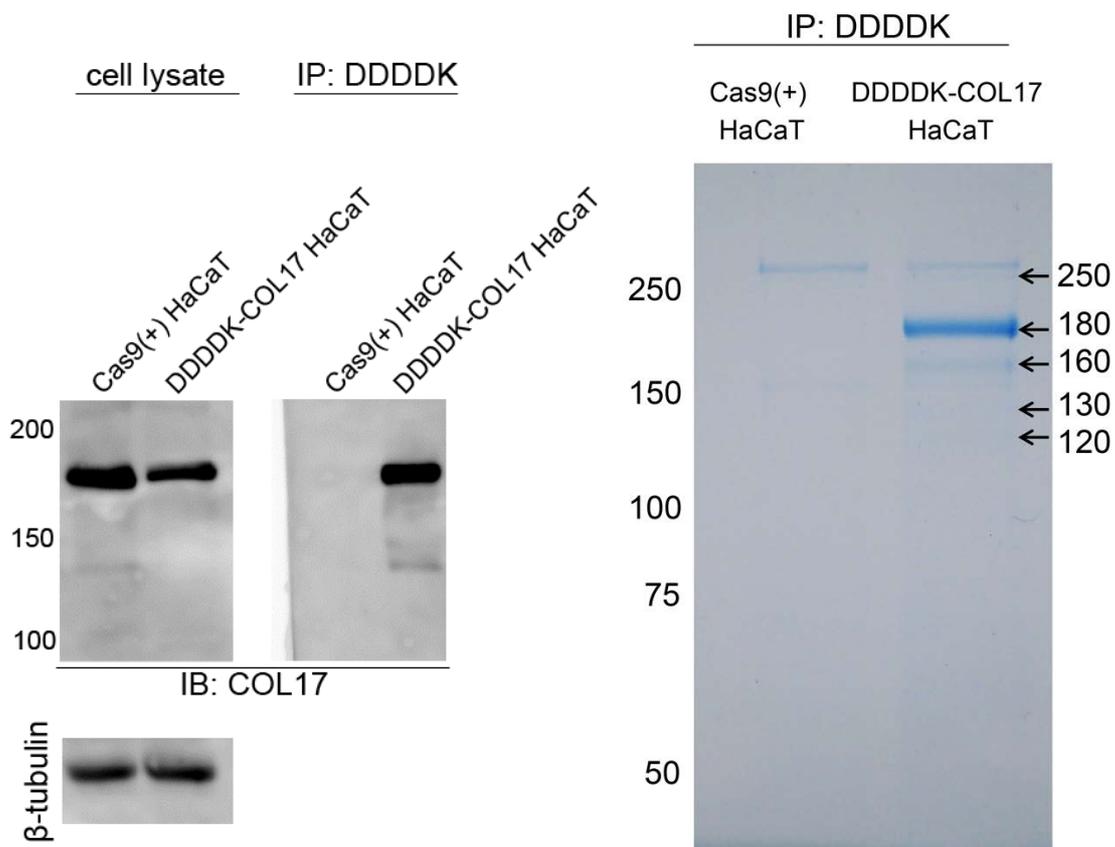


図 13. nCOL17 自己抗原複合体

(左) 抗 COL17 抗体を用いたウェスタンブロッティングで、Cas9(+) HaCaT と DDDDK-COL17 HaCaT 細胞ライセートの両方で内因性 COL17 が検出された。抗 DDDDK 抗体で免疫沈降させた最終産物では、DDDDK-COL17 HaCaT にのみ陽性バンドが検出された。

(右) 免疫沈降した DDDDK-COL17 HaCaT の CBB 染色では、180kDa バンドだけでなく、さらに 250、160、130、120kDa 付近のバンド (矢印) も確認された。

質量分析により、これらのバンドは、COL17 と ITG α 6、ITG β 4、desmoglein-1、desmoglein-3、desmocolin-1、E-cadherin (E-cad) などの細胞接着分子であった(表 3)。

表 3. nCOL17 の質量分析

Band	Description	Score	Coverage (%)
250kDa	Integrin β 4	54.23	14.49
180kDa	COL17	174.41	25.32
160kDa	COL17	412.52	28.88
130kDa	Desmoglein-1	39.37	15.35
130kDa	Desmoglein-3	38.83	19.32
130kDa	Desmocolin-1	32.91	11.07
130kDa	Integrin α 6	26.70	12.04
120kDa	COL17	143.41	20.91
120kDa	Integrin α 6	44.31	20.88
120kDa	E-cadherin	14.01	7.82

質量分析で検出されたタンパクのうち、ITG α 6、ITG β 4、E-cad はウェスタンブロットティングにより確認できた(図 14)。しかし、ウェスタンブロットティングでは、BP230、desmoglein-1、desmoglein-3、desmocolin-1、laminin-332 は検出できなかった。また、興味深いことに、nCOL17 には抗 DDDDK-tag 抗体によって検出された 160 kDa と 120kDa 付近の COL17 の断片が含まれていたが、rCOL17 ではほとんど検出されなかった(図 14)。この短いタンパク質は、COL17 の C 末端を認識する抗体(Ujii et al.2014)によっても同定され(図 14)、これらの短い COL17 バンドは COL17 の切断型もしくは短い転写産物バリエーションであると示唆された。これらの COL17 の断片は細胞ライセートではバンドが目立たず、免疫沈降による濃縮により短い COL17 断片が検出可能となったと考えられる(図 14)。

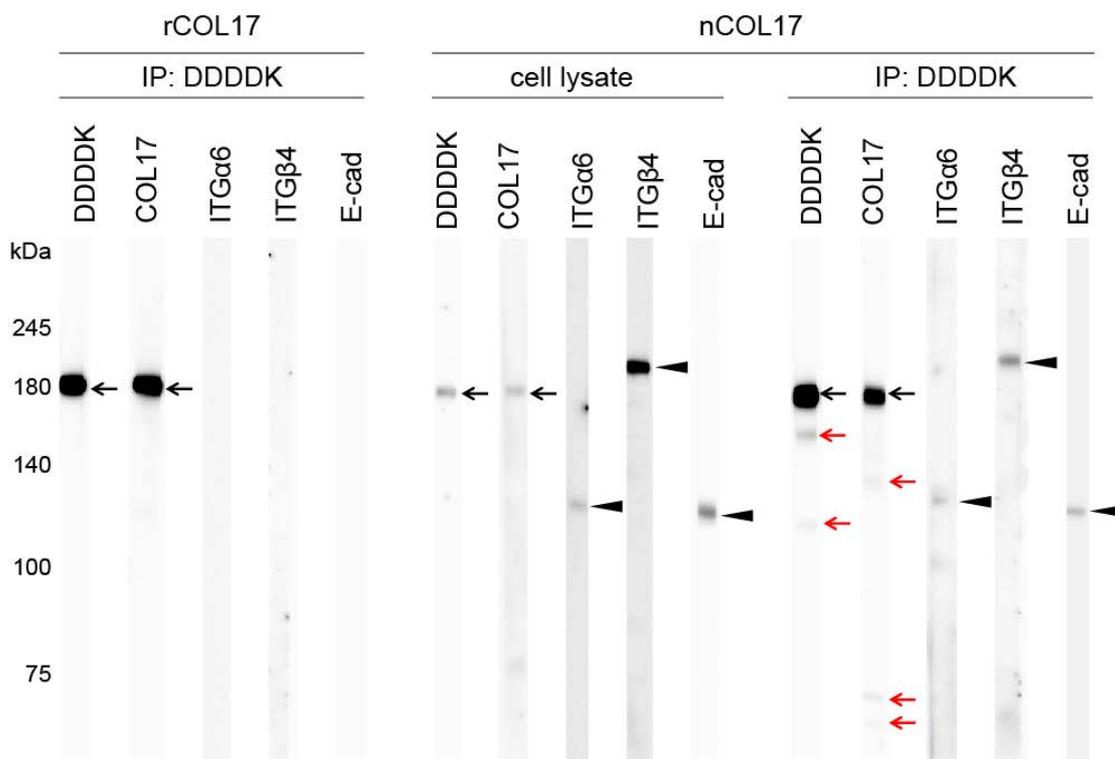


図 14. rCOL17とnCOL17の含有タンパク質の比較

nCOL17では、完全長 COL17(黒矢印)、切断された COL17(赤矢印)、ITGα6/b4、E-cad(黒矢印)の複合体が確認された。

これらの結果は、nCOL17がKCにおいて他の接着分子と複合体を形成しており、その複合体は免疫沈降によりタンパク質複合体として取得できることを示すものである。

3. BP 自己抗体と HaCaT 由来の nCOL17 の反応

我々は、nCOL17とその複合体に含まれる結合分子をELISAの基質として用いることで、全長COL17のみをELISAの基質とするよりもBPの診断感度を向上させると仮定した。DDDDK-COL17 HaCaT由来のnCOL17自己抗原複合体を基質としたELISA(以下:nCOL17 ELISA)を作製し、比較対照として、リコンビナント全長COL17を基質としたELISAであるrCOL17 ELISA (Izumi et al., 2016)を用いて検討を行った。BP患者30名と年齢をマッチさせた非BP患者30名の血清を使用し、receiver operating characteristic (ROC)解析を行なった(図15)。次に、同じサンプルセットを用いて、nCOL17 ELISAを施行し、同様にROC解析を実施した(図15)。ROC解析の結果、nCOL17 ELISAのカットオフ値は10.25と決定し、感度90.0%、特異度86.7%であった。

これらのデータは、nCOL17 ELISA が BP 自己抗体の検出においては、rCOL17 ELISA と同等であるが優越性はないことを示している。

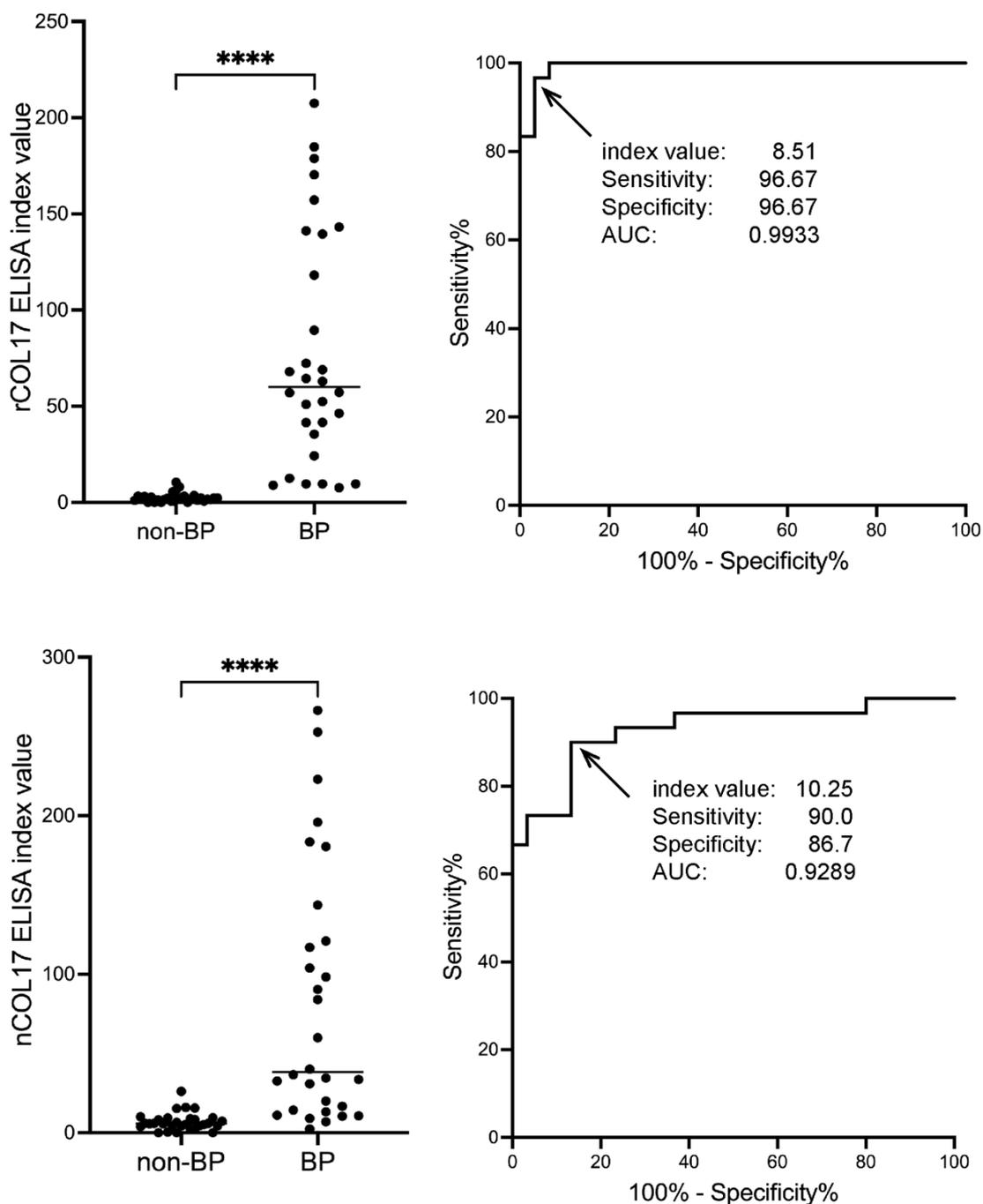


図 15. rCOL17 と nCOL17 ELISA の ROC 解析

(上)rCOL17 ELISA index 値の散布図と ROC 解析。

(下)nCOL17 ELISA index 値の散布図とROC 解析。これにより cut-off 値を決定した。
次に、nCOL17 複合体は rCOL17 よりも多様な自己抗体を捕らえることができるのかという仮説を立てた。この仮説を検証するために、別の BP 血清 (n = 50) を用いて、rCOL17 ELISA と nCOL17 ELISA を実施した。45/50 (88.0%) の血清が nCOL17 ELISA で陽性、46/50 (92.0%) の血清が rCOL17 ELISA で陽性であり、図 16 で示した結果と合致する結果であった。また、nCOL17 ELISA index 値は rCOL17 ELISA index 値と有意に相関したが ($R^2 = 0.8531$, $p < 0.0001$)、一部の血清は、rCOL17 よりも nCOL17 の方が高い ELISA index 値を示した(図 16)。

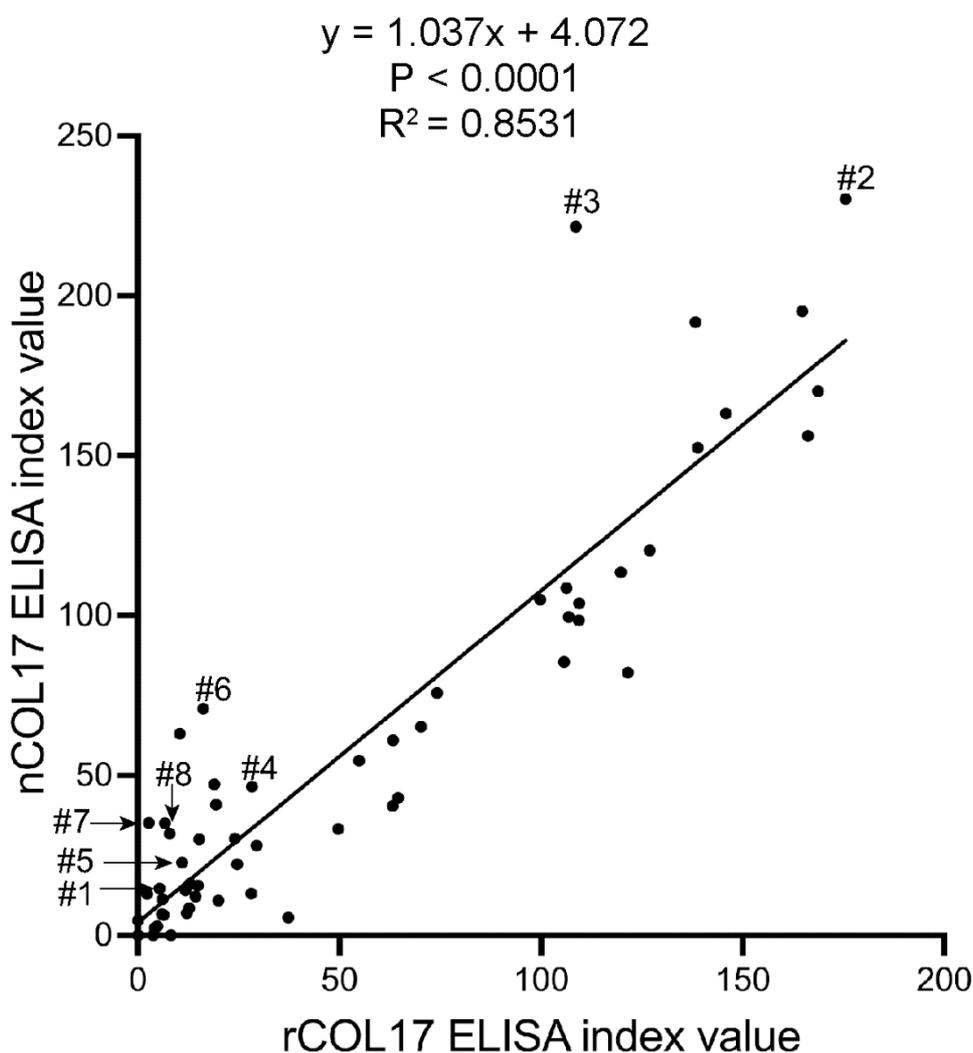


図 16. BP での rCOL17 ELISA vs. nCOL17 ELISA

BP 血清 (n = 50) の rCOL17 ELISA index 値と nCOL17 ELISA index 値の散布図。
#1-8: ウェスタンブロッティングで使用した BP 血清

続いて仮説を検証するために、nCOL17 ELISA が rCOL17 ELISA よりも高い index 値を示した血清を使用して、ウェスタンブロッティングを行った(図 17)。これらの血清の一部(#2、#5、#8)は、全長 COL17 だけでなく、短い COL17 断片も標的にしていた(図 17)。これらのデータは、nCOL17 複合体は 全長 COL17 以外のプロセッシングを受けた又は転写バリエーションに対する自己抗体を検出し得ることを明らかにした。

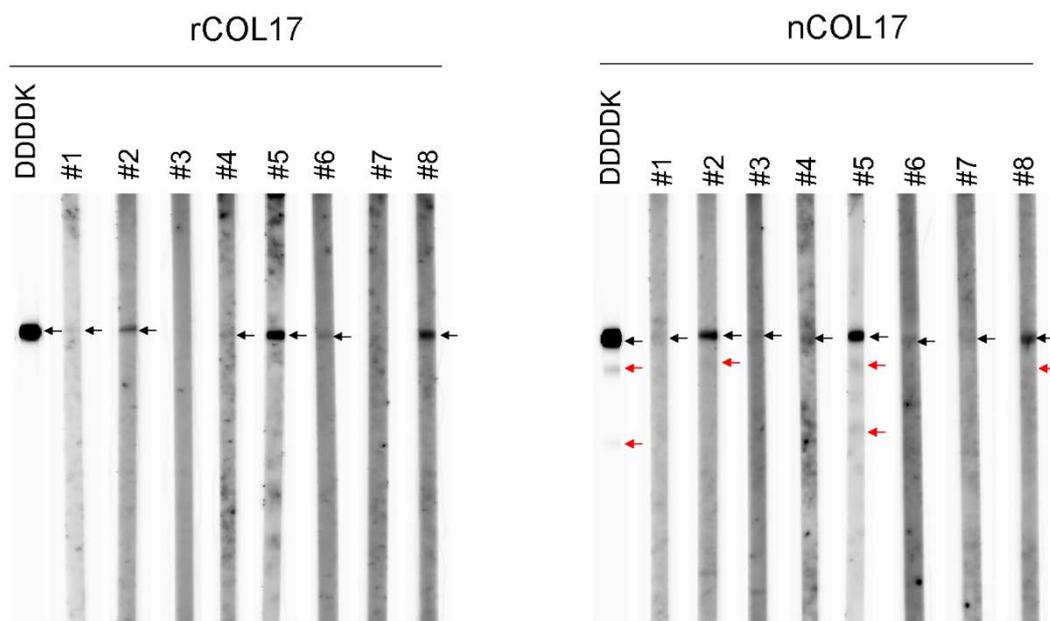


図 17. nCOL17 に強く反応する BP 血清でのウェスタンブロッティング

nCOL17 ELISA 優位な BP 血清は、COL17 の 180kDa(黒矢印)だけでなく、その他の COL17 の断片のバンド(赤矢印)にも陽性であることが確認された

4. DPP4i 処理は COL17 の抗原性に影響を与えなかった

DPP4i は、BP を誘発することが知られている薬剤であるが、その作用機序はまだ解明されていない。DPP4i-BP 自己抗体は、従来の BP とは異なるエピトープを標的とすることから (Izumi et al., 2016)、DPP4i は COL17 の抗原性に特異的に作用するのではないかと推測された。この仮説を検証するため、DDDDK-COL17 HaCaT を DPP4i である vildagliptin 存在下で培養し、細胞溶解液からネイティブな COL17 を単離した。その結果、11 例の DPP4i-BP 血清を用いた ELISA では、vildagliptin 処理 nCOL17、非処理 nCOL17 間で有意差は見られなかった (図 18)。これらの結果は、DPP4i の添加が COL17 の抗原性に直接影響しないことを示唆している。

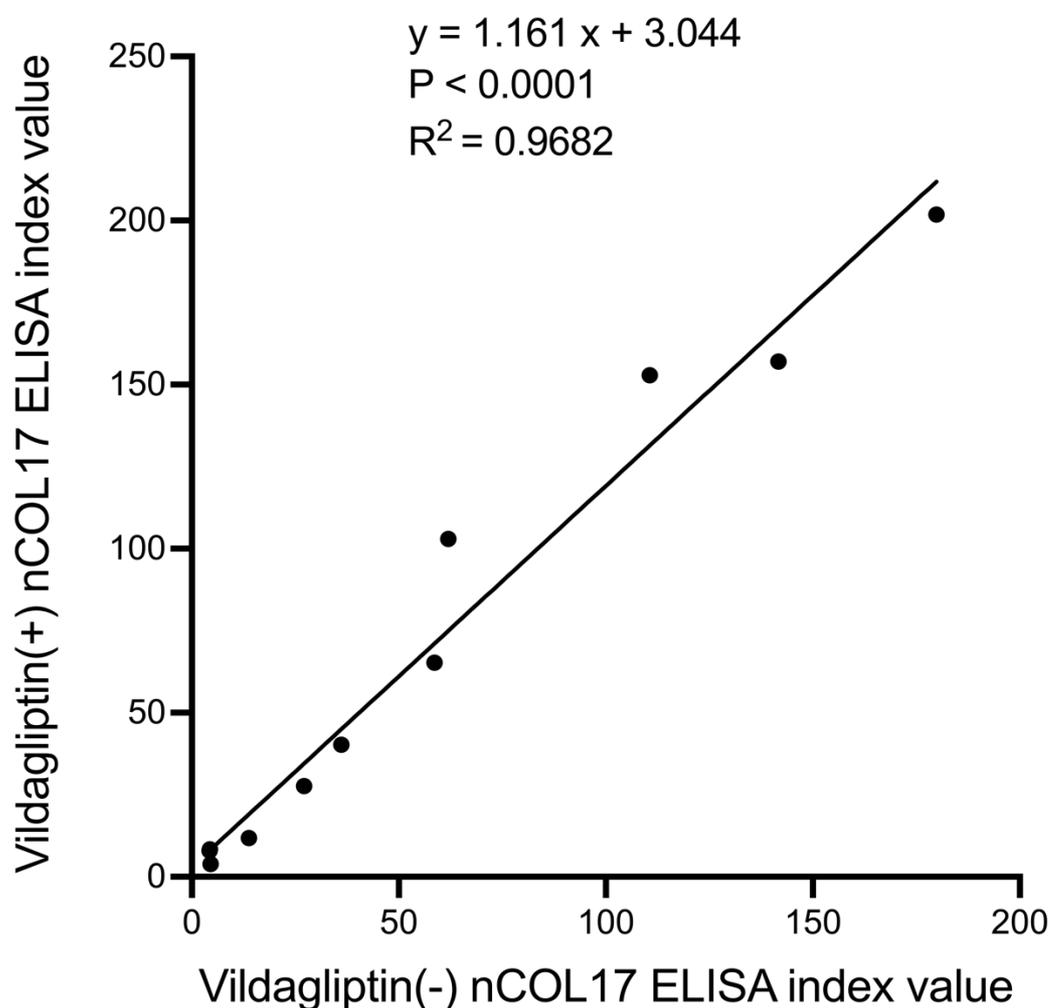


図 18. nCOL17 ELISA index 値の Vildagliptin 処理の有無による比較

5. nCOL17 ELISA は rCOL17 ELISA に比べ、MMP 自己抗体の検出において優れている

MMP は自己抗原の不均一性が大きいいため、nCOL17 は BP よりも MMP の診断感度をより向上させる可能性があると考えた。55 名の MMP 血清 (28 症例のフライブルグ大学病院からの血清を含む) を用いた。興味深いことに、MMP 血清のうち 26/55 (47.3%) のみが rCOL17 ELISA で陽性となり、これは以前の当研究室の研究結果 (Izumi et al., 2017) と一致したが、MMP 血清のうち 39/55 (70.9%) は nCOL17 ELISA で陽性となり、MMP 血清が rCOL17 よりも nCOL17 に有意に反応することが示された (図 19)。MMP 血清は、両 ELISA 法ともに陽性である群 (r+n+) (n=25)、nCOL17 ELISA のみ陽性である群 (r-n+) (n=14)、rCOL17 ELISA のみ陽性である群 (r+n-) (n=1)、両 ELISA 法とも陰性である群 (r-n-) (n=15) の 4 群に分類された。nCOL17 および rCOL17 ELISA の2つで高い ELISA 値を示した MMP (r+n+ MMP) の血清は、COL17 単体に対する自己抗体を有していることが予想され、確かに図 16 で得られた BP 近似線に沿って分布していた。一方で、14 症例の MMP は nCOL17 に対してより強く反応しており、nCOL17 ELISA は rCOL17 ELISA よりも MMP 自己抗体の検出においてより優れていることを示している。

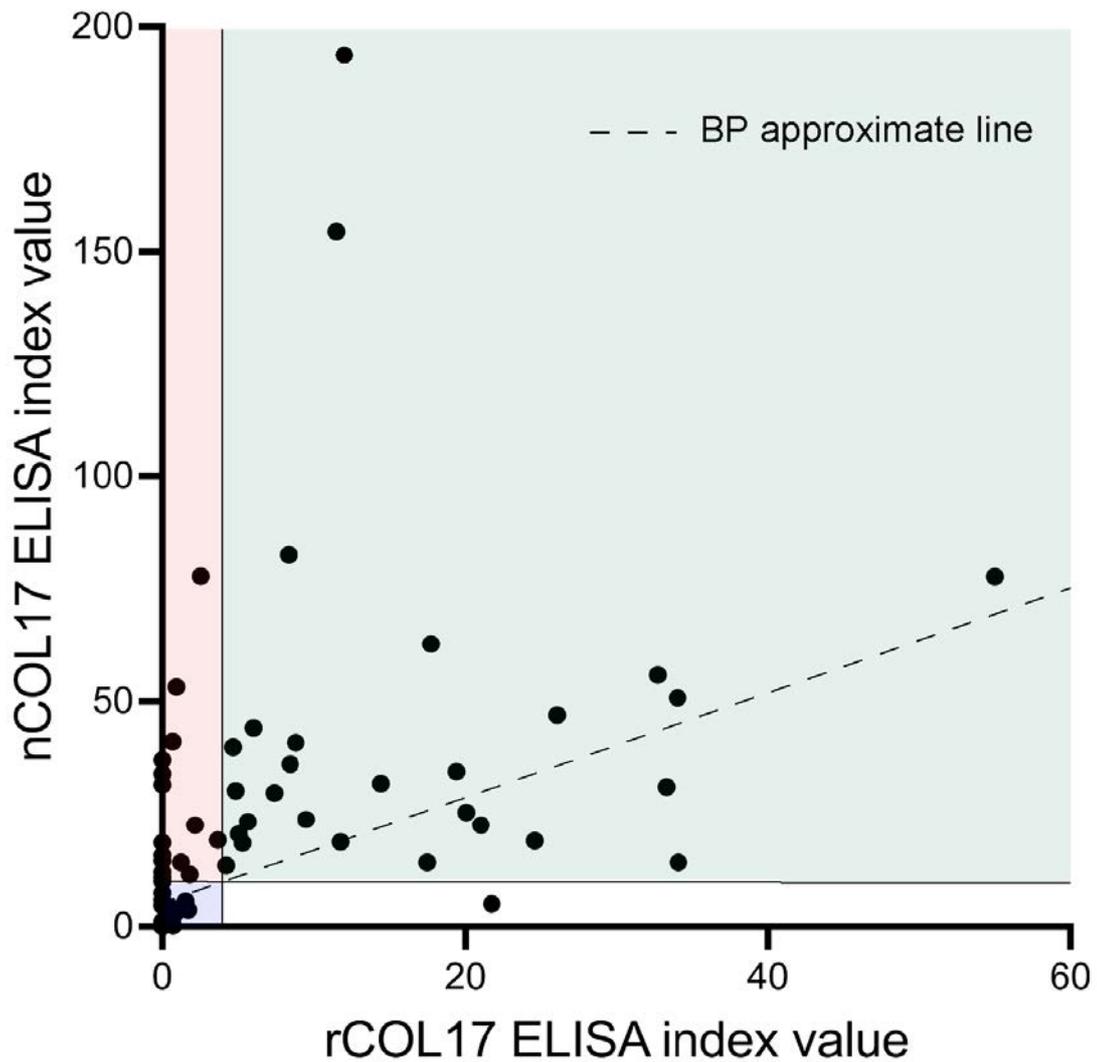


図 19. MMP 血清での rCOL17 ELISA vs. nCOL17 ELISA

MMP 血清の rCOL17 ELISA index 値と nCOL17 ELISA index 値の散布図 (n=55)。BP の診断における各 ELISA のカットオフ値に基づき、緑色の領域は両 ELISA とも陽性 (r+n+)、赤色は nCOL17 ELISA のみ陽性 (r-n+)、白色は rCOL17 ELISA のみ陽性 (r+n-)、青色は両 ELISA とも陰性 (r-n-) を示す。

2つのELISAの結果に従った55のMMP症例の各グループの臨床的特徴を表4に示す(r+n-サンプルのデータは示していない)。各グループに特異的な臨床症状は明らかではなかった。

表 4. 2つの ELISA による MMP 症例の分類

	N	Age	ELISA			Involvement sites, n (%)					
			rCOL17 mean	nCOL17 mean	NC16A n (%)	oral	ocular	nasal	pharyngeal	anogenital	other sites
r+n+	25	64.1	16.85	40.12	16 (64)	25 (100)	3 (12)	2 (8)	5 (20)	1 (4)	5 (20)
r-n+	14	69.2	1.14	26.89	4 (29)	11 (79)	5 (36)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	6 (43)
r-n-	15	65.7	0.36	3.46	4 (27)	13 (87)	4 (27)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	3 (20)

r+n+:rCOL17 ELISA 陽性、nCOL17 ELISA 陽性。

r-n+:rCOL17 ELISA 陰性、nCOL17 ELISA 陽性。

r-n-:rCOL17 ELISA 陰性、nCOL17 ELISA 陰性。

各 MMP 群の免疫学的特徴をさらに明確にするために、MMP 血清 (n = 55) を用いて nCOL17 のウェスタンブロッティングを行った (図 20)。r+n+ MMP 血清の 23/25 (92.0%) は 180 kDa COL17 と強く反応し、r-n+ MMP 血清の 7/14 (50.0%) と r-n- MMP 血清の 5/15 (33.3%) は比較的弱いバンドを示した。注目すべきは、180 kDa 以外の様々な分子量のバンドが多く、MMP 血清で観察されたことで、これらの MMP 血清はプロセッシングされた COL17 や COL17 以外の分子に対する自己抗体を持っていることが示唆された。

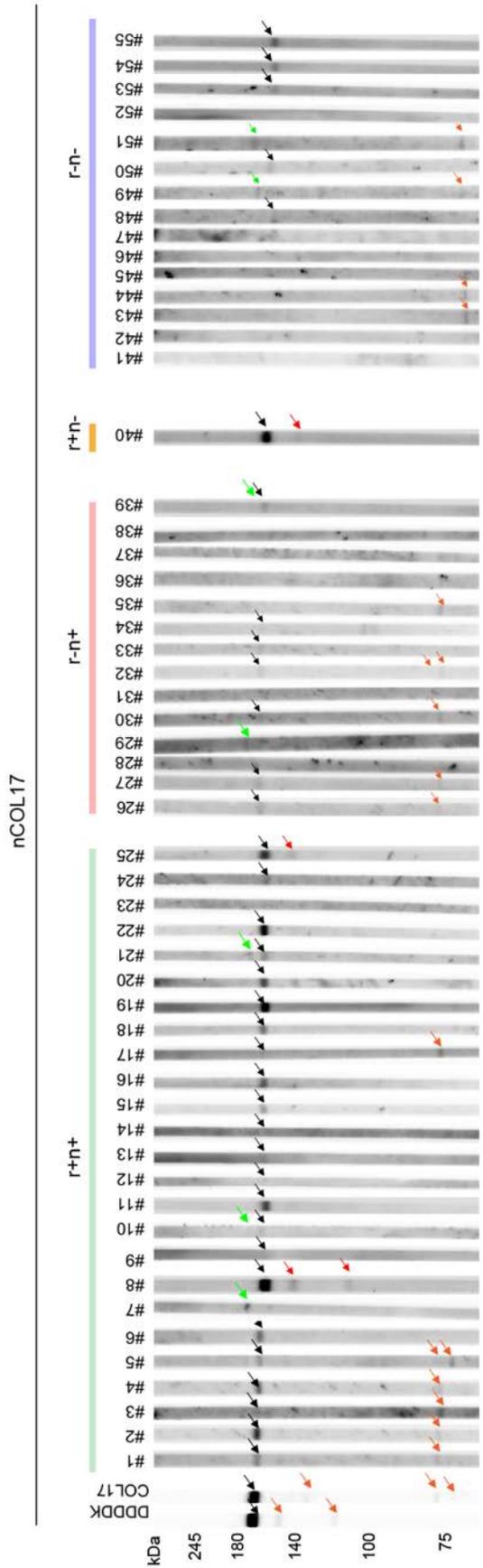


図 20. MMP 血清の nCOL17 に対する反応

MMP 血清を用い、nCOL17 を基質としたウェスタンブロットイング。180kDa の COL17 (黒矢印)のほか、その他のエクストラバンド (赤矢印)、約 205kDa の ITGβ4 (緑矢印)が観察された。
 DDDDK: 抗 DDDDK 抗体、COL17: 抗 COL17 抗体、#1-55: MMP 血清。

6. nCOL17 と特異的に反応する MMP 自己抗体は、ITG α 6 β 4 を標的としている可能性がある

単離された nCOL17 は ITG α 6 β 4 と複合体を形成していることから(図 13、図 14)、nCOL17 ELISA と優位に反応する MMP 血清は ITG α 6 β 4 と反応する可能性が考えられた。この仮説を検証するために、全長 ITG α 6 および ITG β 4 タンパク質の DDDDK-tag 付きリコンビナントを作製した(図 21)。

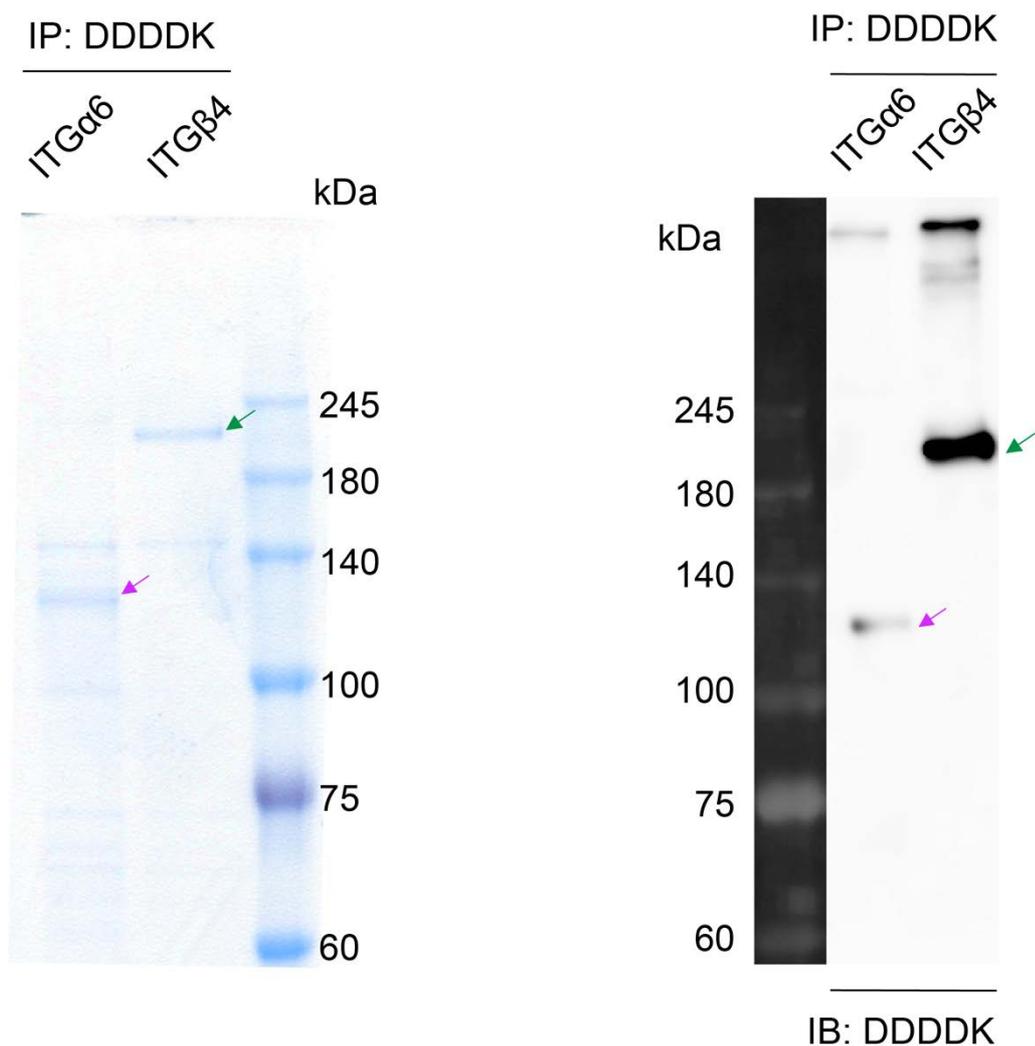


図 21. リコンビナント ITG α 6 および ITG β 4

リコンビナント ITG α 6 および ITG β 4 のクマシーブリリアントブルー染色とウェスタンブロットティング。紫矢印は全長 ITG α 6、緑矢印は ITG β 4 を示す。

これらのリコンビナントタンパクを用いたウェスタンブロッティングを全ての MMP 血清を使用して行った(図 22、図 23)。15/55 の MMP 血清(27.3%)が ITG α 6(5 例)または ITG β 4(10 例)と反応し、そのうち 10/15 例が nCOL17 ELISA 陽性であり、5 例は r-n+ MMP であった。ITG β 4 と反応した 10 例のうち 6 例が、図 21 で緑矢印で示した 205kDa 付近にバンドがみられており、これは nCOL17 に結合していた内在性の ITG β 4 と反応していたものと考えられる。また、r-n+ MMP の血清#29 はリコンビナント ITG β 4 には反応はみられなかったが、nCOL17 のウェスタンブロッティングで緑矢印で示した 205 kDa 付近にバンドがみられており、内在性の ITG β 4 にのみ反応したと考えられる。このように、r-n+ MMP には、nCOL17 に結合していた ITG α 6 β 4 に対して反応した症例が含まれていた。

また、興味深いことに、リコンビナント ITG α 6 または ITG β 4 と反応した MMP 血清のうち、9/15 の MMP 血清は 180kDa の COL17 にも陽性であり、複数の自己抗原に対する抗体を持つことが示された。

ITGα6

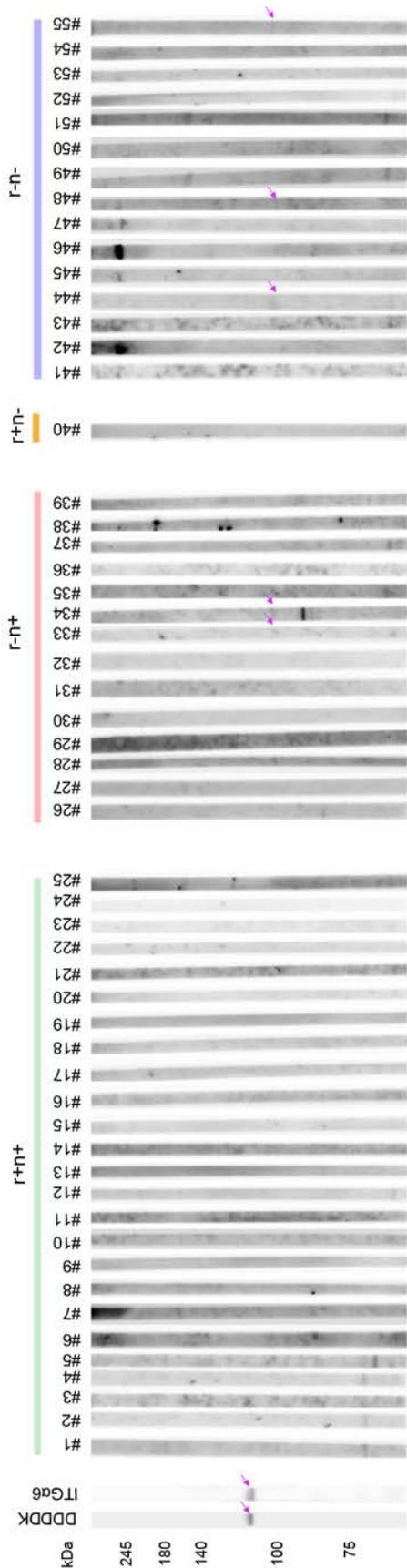


図 22. MMP 血清のリコンビナント ITGα6 に対する反応
MMP 血清を用い、リコンビナント全長 ITGα6 を基質としたウェスタンブロッティング。
ITGα6: 抗 ITGα6 抗体、#1-55: MMP 血清。紫の矢印は ITGα6 に対する陽性反応性を示す。

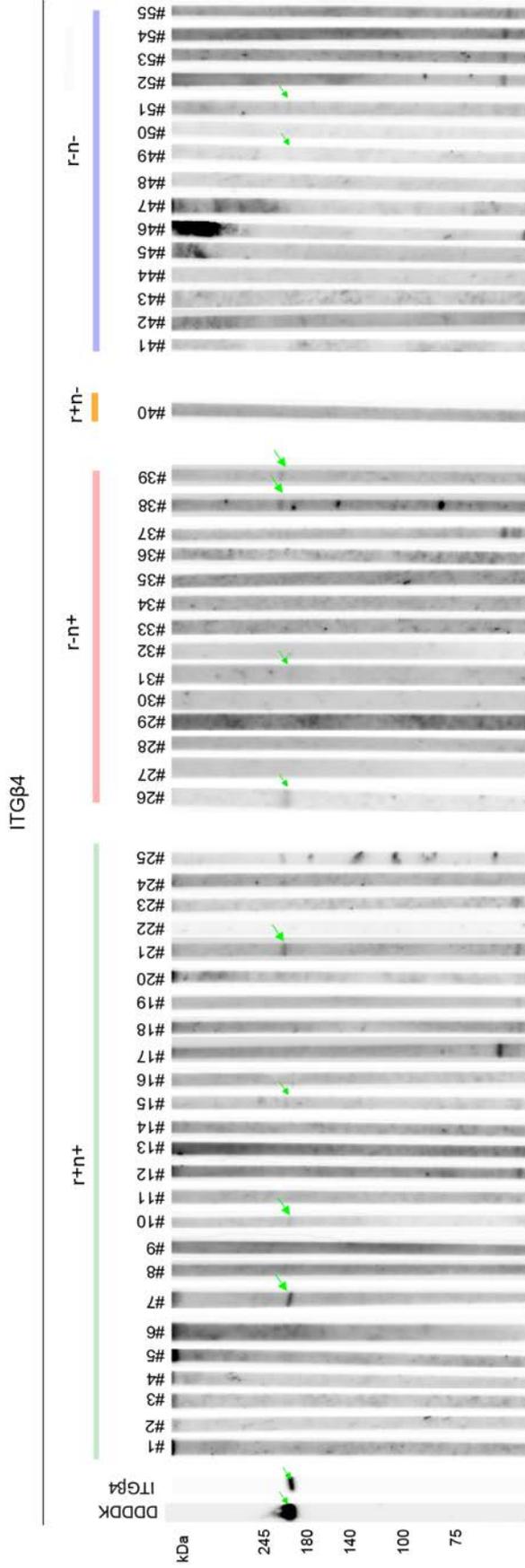


図 23. MMP 血清の ITGβ4 に対する反応
 MMP 血清を用い、リコンビナント全長 ITGβ4 を基質としたウェスタンブロットイング。
 ITGβ4: 抗 ITGβ4 抗体、#1-55: MMP 血清。緑矢印は ITGβ4 に対する陽性反応性を示す。

これらの nCOL17 ELISA と rCOL17 ELISA の結果から MMP は、1) COL17 を主な標的とする症例と、2) ITG α 6 β 4 を含む他の分子を標的とする症例の 2 群に分類できることがわかった。rCOL17 ELISA と nCOL17 ELISA の組み合わせにより、これらの MMP サブタイプの区別が可能である。

自己抗原と表現型の相関については、血清中の ITG α 6 に対する自己抗体は口腔内病変と (Leverkus et al., 2001; Rashid et al., 2006a, 2006b)、ITG β 4 に対する自己抗体は結膜疾患と関連する (Chan et al., 1999; Rashid et al., 2006a; Yeh et al., 2004) ことが報告されている。しかし、本研究では、ITG α 6 β 4 に対する自己抗体の有無と臨床所見との間に関連は認められなかった(表 5、表 6)。

表 5. ITG α 6 陽性の MMP5 例

	ウェスタンブロッティング	罹患部位		
	COL17	oral	ocular	皮膚
#33	+	-	+	-
#34	+	+	-	-
#44	-	+	+	-
#48	+	+	-	+
#55	+	+	-	-

+ : 陽性, - : 陰性

表 6. ITGβ4 陽性の MMP10 例

	ウェスタンブロッティング	罹患部位		
	COL17	oral	ocular	皮膚
#7	-	+	-	-
#10	+	+	+	+
#15	+	+	-	-
#21	-	+	-	-
#26	+	+	+	-
#31	-	-	+	+
#38	-	+	-	+
#39	+	+	-	-
#49	-	+	+	-
#51	-	+	-	-

+: 陽性, -: 陰性

7. MMP は複数の自己抗原を持つ

MMP の自己抗原は nCOL17 に含まれていない laminin-332 や BP230、COL7 も主要な自己抗原として知られているため、MMP 55 例に対し、精製 laminin-332 を利用したウェスタンブロッティング (図 24) と BP230 ELISA、COL7 ELISA を行った。その結果、BP230 に対して 6/55 例、COL7 に対して 3/55 例、laminin-332 に対して 14/55 例の MMP が陽性を示した (表 7)。nCOL17 の結果とは相関はみられず、これは BP230、COL7、laminin-332 は nCOL17 には含まれていないことと一致する。BP230 に対して陽性を示した 6 例の MMP は、いずれの症例でも COL17 に対しても陽性であり、MMP における BP230 陽性症例は COL17 に対する反応と関連するという以前の報告と合致する (Inoue et al., 2016)。また、laminin-332 陽性となった MMP 症例のうち、3/14 のみが laminin-332 単独陽性であり、それ以外の症例は 8 例が COL17 にも反応し、5 例が ITG α 6 β 4 にも反応し 3 例が BP230 にも反応した。このことは laminin-332 陽性の MMP では laminin-332 のみに反応するものと、複数の laminin-332 以外の自己抗原に対して反応する自己抗体をもつという報告と合致する (Qian et al., 2021)。

利用可能な自己抗体検出系での MMP 自己抗体の検出を行った結果を表 7 に示したが、nCOL17 ELISA は最も検出率が高いことが示された。

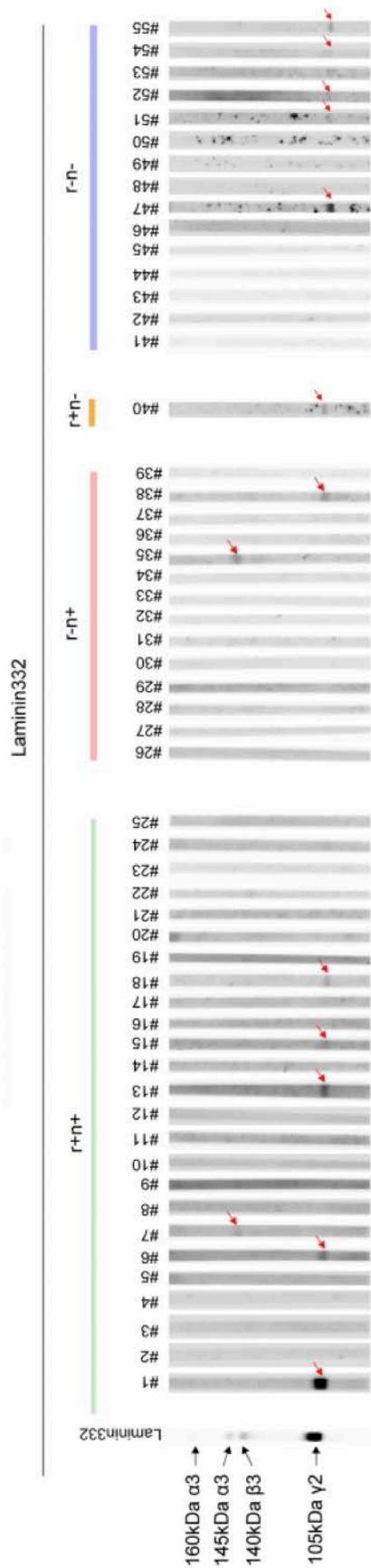


図 24. MMP の laminin-332 に対する反応
 抗 laminin-5 抗体では 165 kDa と 145 kDa の $\alpha 3$ 、140 kDa の $\beta 3$ 、105 kDa の $\gamma 2$ のバンドが確認できた。
 #1-55: MMP 血清。赤矢印は Laminin-332 に対する反応を示す。

表 7. MMP の各自己抗体検出系に対する反応性

	ssIIF		ELISA/CLEIA							V			
	epidermal	dermal	NC16A	rCOL17	nCOL17	BP230	COL7	COL17	ITGα6	ITGβ4	laminin-332		
												ITGα6	ITGβ4
r+n+	14	1	16	25	25	4	3	23	0	4	6		
	56.0%	4.0%	64.0%	100.0%	100.0%	16.0%	12.0%	92.0%	0.0%	16.0%	24.0%		
r-n+	10	0	4	0	14	1	0	7	2	4	2		
	71.4%	0.0%	28.6%	0.0%	100.0%	7.1%	0.0%	50.0%	14.3%	28.6%	14.3%		
r-n-	8	1	4	0	0	1	0	5	3	2	5		
	53.0%	6.7%	26.7%	0.0%	0.0%	6.7%	0.0%	33.3%	20.0%	13.3%	33.3%		
r+n-	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1		
total	33	2	25	26	39	6	3	36	5	10	14		
	60.0%	3.6%	45.5%	47.3%	70.9%	10.9%	5.5%	65.5%	9.1%	18.2%	25.5%		

考察

本研究では、遺伝子編集を利用して nCOL17 複合体を単離することに成功した。nCOL17 複合体は、全長 COL17、プロセッシング COL17、ITG α 6 β 4 を含む様々な自己抗原を保持していた。我々の予想とは異なり、質量分析およびウェスタンブロットティングでは、nCOL17 複合体中には BP230 や laminin-332 が検出されなかった。このことは COL17 が生理的条件下において、ITG α 6 β 4 とより強固に結合している可能性がある。また、他の一つの可能性として、nCOL17 複合体が HD 様構造を形成した後、不溶化が進み、細胞溶解液からの免疫沈降が困難になった可能性が挙げられる。ULTRARIPA kit for Lipid Raft (BioDynamics Laboratory Inc.) やアンモニア溶液を用いて HD 様複合体の可溶化を試みたが、BP230 や laminin-332 は検出できなかった。nCOL17 複合体を BP230 と laminin-332 を含んだ状態で保持・精製するためには、さらなる条件検討が必要である。用いた MMP 血清について nCOL17 に含まれない BP230、COL7、laminin-332 をそれぞれ調べたところ、BP230 は 6/55 (10.9%)、COL7 は 3/55 (5.5%)、laminin-332 は 14/55 (25.5%) が陽性であり (表 7)、その割合は既知の結果と概ね合致した (Schmidt and Zillikens, 2013)。このように、今回精製し取得した nCOL17 に含まれなかった COL17 結合分子も MMP 自己抗体のターゲットとなるため、さらに複数の分子を含んだ COL17 自己抗原複合体の取得は重要である。

ネイティブな HD の単離は容易ではないが、Owaribe らは約 30 年前にウシ角膜から HD を豊富に含む画分を単離することに成功した (Owaribe et al., 1991)。最近では、培養ヒト扁平上皮癌細胞株 DJM-1 から HD に富む画分を単離する別の方法が報告されている (Hirako et al., 2014)。この方法では、DJM-1 細胞を低カルシウム条件下で培養し、アンモニア水処理により細胞層を除去し、培養皿に残った HD を SDS-PAGE サンプルバッファーを用いて直接可溶化し回収する (Hirako et al., 2014)。どちらの方法でも、回収された溶液には表皮基底膜部の主要成分である COL17, BP 230, Plectin, ITG β 4, ITG α 6, Laminin 332, COL17 を含んでおり (Hirako et al. 2014; Owaribe et al. 1991)、類天疱瘡自己抗体検出アッセイの基質として価値があると言える。しかし、ウシ角膜を用いる方法では角膜の取得は困難であり、また、HD 回収にはいくつかの煩雑な手順を踏まなければならない。また、ヒト扁平上皮癌細胞株の培養細胞から HD を取得する方法では、HDs 関連タンパク質のみを分離できないため、ELISA の基質として使用することは不可能であった。これに対し、今回開発した方法は、複雑な構造を形成するネイティブな自己抗原を簡便に取得し精製できる点で優れている。

nCOL17 複合体を用いた新規 ELISA システムを確立し、他の自己抗体検出系との比較を行ったところ、rCOL17 ELISA のみならず NC16A ELISA や 1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法などの既存の自己抗体検出系よりも MMP 自己抗体の検出において

最も優れており、この nCOL17 ELISA は MMP の診断に有用であることが示された。また、rCOL17 ELISA と nCOL17 ELISA の結果から MMP を分類することができ、両者が陽性の MMP は COL17 型の MMP、rCOL17 ELISA のみ陽性の MMP は nCOL17 複合体に含まれる COL17 以外のタンパクに対して反応している場合があることが示された。

5/39 (12.8%) の MMP 自己抗体が、nCOL17 ELISA では陽性であったにもかかわらず、nCOL17 や ITG α 6 β 4 に対するウェスタンブロッティングでは反応を示さなかった。これら 5 例の血清のうち 2 例は、1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法で表皮側に反応したことから、nCOL17 自己抗原複合体は COL17 と ITG α 6 β 4 以外の未知の自己抗原を含む可能性が示唆された。これまでの研究で、45kDa (Smith et al., 1993) および 168 kDa (Ghohestani et al., 1996) のタンパク質が MMP と関連していることが示されているが、これらのタンパク質がどの分子であるかは依然として不明である (Du et al., 2022)。このように未知の MMP 自己抗原の同定には、今後さらなる研究が必要である。

MMP 自己抗体は、COL17 や ITG α 6 β 4 を標的とすることに加えて、COL17 結合分子である BP230 や laminin-332 (Schmidt and Zillikens 2013) も標的とするものがある。本研究で用いた MMP においても、個々の MMP 血清は高い割合で複数の自己抗原に反応しており、MMP は個々の患者においても複数の HD 分子に対する自己抗体を産生することが示された。興味深いことに、BP や MMP を含む自己免疫性水疱症ではエピトープスプレディングが起こることが知られている (Didona and Di Zenzo, 2018)。エピトープスプレディングとは、エピトープの特異性が最初の標的から拡散し、同じ分子の他のエピトープ (分子内エピトープスプレディング) や同じ組織内の他の分子 (分子間エピトープスプレディング) へ時間経過とともに広がり、抗体の抗原認識に多様性が生じる現象である (Chan et al., 1998; Didona and Di Zenzo, 2018)。BP では、NC16A から COL17 の他の領域のエピトープへの分子内エピトープスプレディングや、COL17 から BP230 への分子間エピトープスプレディングが知られている

(Ujiie et al., 2019b; Di Zenzo et al., 2011)。COL17 の C 末端と laminin-332 は物理的に相互作用するため (Yasukochi et al. 2016)、MMP では COL17 から laminin-332、laminin-332 から COL17 へのエピトープスプレディングが想定されている (Yasukochi et al. 2016)。このように、MMP の自己抗体の多様性は分子間エピトープスプレディングと関連している可能性があり、nCOL17 の多数の自己抗原を含むという特性は、エピトープスプレディングした自己抗体を含めて検出できるという点でも優れている。MMP のエピトープスプレディングについては、まだ解明されていない点が多く、nCOL17 はその病態解明の一助となり得る。

nCOL17 と rCOL17 の顕著な違いは、前者が生理的環境下で HaCaT において翻訳後修飾されていることである。我々は、いくつかの BP 血清が rCOL17 ELISA よりも nCOL17 ELISA に有意に反応し、全長 COL17 だけでなく、COL17 の短型 (約 160kDa)

も認識することを見いだした(図 17)。これらのデータは、特異的 BP 自己抗体が COL17 の切断された断片を標的とする可能性があるという報告した以前の研究 (Franzke et al., 2002; Hofmann et al., 2009; Nishie et al., 2010)と一致し、nCOL17 ELISA が生理的に修飾された COL17 を標的とする自己抗体の検出に有用であることを示している。すなわち、本研究は、生理学的に切断された COL17 の抗原性を指摘しており、これは、COL17のC末端切断がその抗原性に大きく影響するという我々の研究 (Toyonaga et al., 2017)とも一致する。今後、リン酸化やグリコシル化など他の翻訳後修飾の COL17 抗原性への関与について、我々の nCOL17 システムを用いて検討する予定である。

また、今回 DPP4i による COL17 の抗原性変化の検討を行った。nCOL17 への DPP4i 処理による COL17 の抗原性変化は見られなかったが、このように薬剤によるネイティブな COL17 の変化を観察することができるため、本研究で確立したネイティブ自己抗原取得方法はこの点においても非常に有用である。

結論として、我々は、類天疱瘡疾患のネイティブな自己抗原複合体を分離するための新規かつ簡便な方法を開発した(図 25)。今回開発した nCOL17 ELISA では、COL17 だけでなく、ITG α 6 β 4 を含む COL17 結合性自己抗原を標的とする MMP 自己抗体の検出が可能である。

また、本法は他の自己免疫疾患への応用が期待される。例えば、天疱瘡の自己抗体は、desmoglein-1/3、desmoplakin (Amagai et al. 1991; Koulu et al. 1984; Oursler et al. 1992) など、様々なデスモソームタンパク質を標的としている。また、これらの分子はヘミデスモソームタンパク質と同様に複合体を形成している (Delva et al. 2009)。したがって、本研究で行ったように、1つの遺伝子にタグを付けることによって、HaCaT KCs からネイティブなデスモソームタンパク質複合体を単離することが可能であると考えられる。

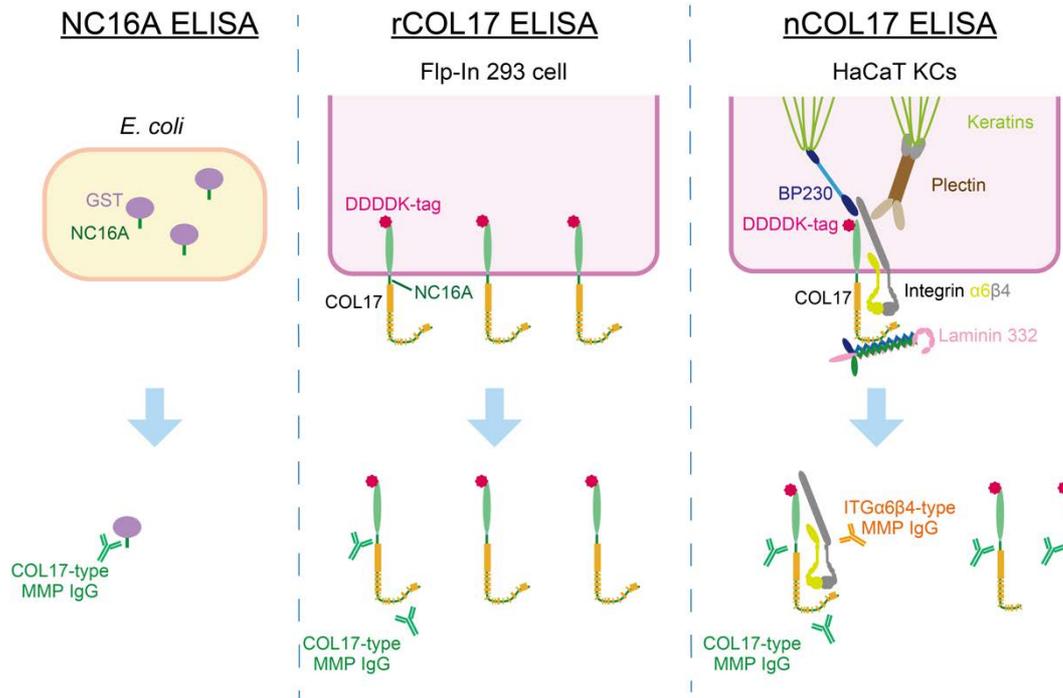


図 25. COL17 に対する自己抗体を検出するための各種 ELISA の比較

本研究で作製した nCOL17 ELISA と NC16A ELISA、rCOL17 ELISA の模式図。

結論

本研究では以下の新知見を得た。

- ・遺伝子編集を利用して内在性 COL17 遺伝子座へのタグ配列のノックインにより、内在性全長 COL17 を得ることに成功した。また内在性 COL17 だけでなく生理的プロセッシングを受けた COL17 や COL17 の結合分子である ITG α 6 β 4 を含む nCOL17 複合体を単離することが可能となった。

- ・DPP4i 処理した内在性 COL17 について、DPP4i-BP 自己抗体の反応性に違いは見られなかった。よって、DPP4i はそれ自体の作用では COL17 の抗原性に変化をもたらさないことが判明した。

- ・BP 自己抗体には全長 COL17 だけでなく生理的プロセッシングを受けた COL17 に対しても反応するものがあり、rCOL17 ELISA よりも nCOL17 ELISA 優位に反応する症例がみられた。

- ・MMP の自己抗原は複数存在するため自己抗原複合体を用いた nCOL17 ELISA は、MMP の診断感度をより向上させた。他の自己抗体検出系と比較したところ、MMP の自己抗体検出系において、最も優れた結果を示した。

- ・MMP は個々の患者においても複数の自己抗体を持つことが確認された。

本研究で確立した nCOL17 ELISA は特に MMP の診断において非常に有用な自己抗体検出方法である。また、nCOL17 によって BP や MMP の特徴を明らかにしたことは、今後の病態解明について重要な手がかりとなる。

今後の課題として、laminin-332 や BP230 など nCOL17 に含まれてこなかった COL17 結合分子を含んだ自己抗原精製方法の確立が望まれる。また、本研究で遺伝子編集による内在性自己抗原を複合体として取得可能であることが示されたため、天疱瘡など他の自己免疫性水疱症への応用が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を与えてくださった、多くの御指導と御助言を賜りました北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 故清水宏名誉教授、並びに氏家英之教授へ深甚なる謝意を表します。そして、直接御指導いただきました西江渉先生、泉健太郎講師に心より深謝致します。そして、本研究にご協力いただきました自己免疫性水疱症患者の皆様にも深く御礼申し上げます。最後に、北海道大大学院医学研究院皮膚科学教室の全ての教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aho, S., and Uitto, J. (1998). Direct interaction between the intracellular domains of bullous pemphigoid antigen 2 (BP180) and beta 4 integrin, hemidesmosomal components of basal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 694–699.

Amano, S., Nishiyama, T., and Burgesson, R.E. (1999). A specific and sensitive ELISA for laminin 5. *J Immunol Methods* 224, 161–169.

Amber, K.T., Murrell, D.F., Schmidt, E., Joly, P., and Borradori, L. (2018). Autoimmune Subepidermal Bullous Diseases of the Skin and Mucosae: Clinical Features, Diagnosis, and Management. *Clin Rev Allerg Immunol* 54, 26–51.

Arai, M., Shirakawa, J., Konishi, H., Sagawa, N., and Terauchi, Y. (2018). Bullous Pemphigoid and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors: A Disproportionality Analysis Based on the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Diabetes Care* 41, e130–e132.

Balding, S.D., Prost, C., Diaz, L.A., Bernard, P., Bedane, C., Aberdam, D., and Giudice, G.J. (1996). Cicatricial Pemphigoid Autoantibodies React with Multiple Sites on the BP180 Extracellular Domain. *J Invest Dermatol* 106, 141–146.

Béné, J., Moulis, G., Bennani, I., Auffret, M., Coupe, P., Babai, S., Hillaire-Buys, D., Micallef, J., Gautier, S., and Centres, the F.A. of R.P. (2016). Bullous pemphigoid and dipeptidyl peptidase IV inhibitors: a case–noncase study in the French Pharmacovigilance Database. *Br J Dermatol* 175, 296–301.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biology* 106, 761–771.

Chan, L.S., Soong, H.K., Foster, C.S., Hammerberg, C., and Cooper, K.D. (1991). Ocular Cicatricial Pemphigoid Occurring as a Sequela of Stevens-Johnson Syndrome. *Jama* 266, 1543–1546.

Chan, L.S., Majmudar, A.A., Tran, H.H., Meier, F., Schaumburg-Lever, G., Chen, M., Anhalt, G., Woodley, D.T., and Marinkovich, M.P. (1997). Laminin-6 and laminin-5 are

recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 108, 848–853.

Chan, L.S., Vanderlugt, C.J., Hashimoto, T., Nishikawa, T., Zone, J.J., Black, M.M., Wojnarowska, F., Stevens, S.R., Chen, M., Fairley, J.A., et al. (1998). Epitope Spreading: Lessons From Autoimmune Skin Diseases. *J Invest Dermatol* 110, 103–109.

Chan, L.S., Ahmed, A.R., Anhalt, G.J., Bernauer, W., Cooper, K.D., Elder, M.J., Fine, J.-D., Foster, C.S., Ghohestani, R., Hashimoto, T., et al. (2002). The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol* 138, 370–379.

Chan, R.Y., Bhol, K., Tesavibul, N., Letko, E., Simmons, R.K., Foster, C.S., and Ahmed, A.R. (1999). The role of antibody to human beta4 integrin in conjunctival basement membrane separation: possible in vitro model for ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2283–2290.

Condrat, I., He, Y., Cosgarea, R., and Has, C. (2019). Junctional Epidermolysis Bullosa: Allelic Heterogeneity and Mutation Stratification for Precision Medicine. *Frontiers Medicine* 5, 363.

Cozzani, E., Di Zenzo, G., Calabresi, V., Carrozzo, M., Burlando, M., Longanesi, L., Cerri, A., Caproni, M., Sera, F., Antiga, E., et al. (2014). Autoantibody Profile of a Cohort of 78 Italian Patients with Mucous Membrane Pemphigoid: Correlation Between Reactivity Profile and Clinical Involvement. *Acta Dermato Venereol* 96, 768–773.

Diaz, L.A., Ratrie, H., Saunders, W.S., Futamura, S., Squiquera, H.L., Anhalt, G.J., and Giudice, G.J. (1990). Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 86, 1088–1094.

Didona, D., and Di Zenzo, G. (2018). Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Front Immunol* 9, 779.

Doyle, H.A., and Mamula, M.J. (2002). Posttranslational protein modifications: new flavors in the menu of autoantigens. *Current Opinion in Rheumatology* 14, 244–249.

- Du, G., Patzelt, S., Beek, N. van, and Schmidt, E. (2022). Mucous membrane pemphigoid. *Autoimmun Rev* 21, 103036.
- Egami, S., Yamagami, J., and Amagai, M. (2020). Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immun* 145, 1031–1047.
- Franzke, C., Tasanen, K., Schäcke, H., Zhou, Z., Tryggvason, K., Mauch, C., Zigrino, P., Sunnarborg, S., Lee, D.C., Fahrenholz, F., et al. (2002). Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J* 21, 5026–5035.
- Franzke, C.-W., Tasanen, K., Schumann, H., and Bruckner-Tuderman, L. (2003). Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol* 22, 299–309.
- Franzke, C.-W., Bruckner, P., and Bruckner-Tuderman, L. (2005). Collagenous Transmembrane Proteins: Recent Insights into Biology and Pathology. *J Biol Chem* 280, 4005–4008.
- Gammon, W.R., Briggaman, R.A., Inman, A.O., Queen, L.L., and Wheeler, C.E. (1984). Differentiating Anti-Lamina Lucida and Anti-Sublamina Densa Anti-BMZ Antibodies by Indirect Immunofluorescence on 1.0 M Sodium Chloride-Separated Skin. *J Invest Dermatol* 82, 139–144.
- Ghohestani, R.F., Nicolas, J.F., Rousselle, P., and Claudy, A.L. (1996). Identification of A 168-kDa Mucosal Antigen In A Subset of Patients With Cicatricial Pemphigoid. *J Invest Dermatol* 107, 136–139.
- Giudice, G.J., Emery, D.J., and Diaz, L.A. (1992). Cloning and Primary Structural Analysis of the Bullous Pemphigoid Autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 99, 243–250.
- Giudice, G.J., Emery, D.J., Zelickson, B.D., Anhalt, G.J., Liu, Z., and Diaz, L.A. (1993). Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol Baltim Md* 150, 5742–5750.
- Hamill, K.J., Hopkinson, S.B., Jonkman, M.F., and Jones, J.C.R. (2011). Type XVII Collagen Regulates Lamellipod Stability, Cell Motility, and Signaling to Rac1 by

Targeting Bullous Pemphigoid Antigen 1e to $\alpha\beta 4$ Integrin. *J Biol Chem* 286, 26768–26780.

Has, C., Bauer, J.W., Bodemer, C., Bolling, M.C., Bruckner-Tuderman, L., Diem, A., Fine, J. -D., Heagerty, A., Hovnanian, A., Marinkovich, M.P., et al. (2020). Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol* 183, 614–627.

Hayakawa, T., Furumura, M., Fukano, H., Li, X., Ishii, N., Hamada, T., Ohata, C., Tsuruta, D., Shimozato, K., and Hashimoto, T. (2014). Diagnosis of oral mucous membrane pemphigoid by means of combined serologic testing. *Oral Surg Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology* 117, 483–496.

Hirako, Y., Usukura, J., Nishizawa, Y., and Owaribe, K. (1996). Demonstration of the Molecular Shape of BP180, a 180-kDa Bullous Pemphigoid Antigen and Its Potential for Trimer Formation. *J Biol Chem* 271, 13739–13745.

Hirako, Y., Yonemoto, Y., Yamauchi, T., Nishizawa, Y., Kawamoto, Y., and Owaribe, K. (2014). Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 324, 172–182.

Hofmann, S.C., Thoma-Uszynski, S., Stauber, A., Schuler, G., Hertl, M., Hunziker, T., Bernard, P., Koebnick, C., and Borradori, L. (2002). Severity and Phenotype of Bullous Pemphigoid Relate to Autoantibody Profile Against the NH₂- and COOH-Terminal Regions of the BP180 Ectodomain. *J Invest Dermatol* 119, 1065–1073.

Hofmann, S.C., Voith, U., Schönau, V., Sorokin, L., Bruckner-Tuderman, L., and Franzke, C.-W. (2009). Plasmin Plays a Role in the In Vitro Generation of the Linear IgA Dermatitis Antigen LADB97. *J Invest Dermatol* 129, 1730–1739.

Hopkinson, S.B., and Jones, J.C.R. (2000). The N Terminus of the Transmembrane Protein BP180 Interacts with the N-terminal Domain of BP230, Thereby Mediating Keratin Cytoskeleton Anchorage to the Cell Surface at the Site of the Hemidesmosome. *Mol Biol Cell* 11, 277–286.

Hopkinson, S.B., Baker, S.E., and Jones, J.C. (1995). Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and

evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *J Cell Biology* 130, 117–125.

Horikawa, H., Kurihara, Y., Funakoshi, T., Umegaki-Arao, N., Takahashi, H., Kubo, A., Tanikawa, A., Kodani, N., Minami, Y., Meguro, S., et al. (2018). Unique clinical and serological features of bullous pemphigoid associated with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Br J Dermatol* 178, 1462–1463.

Inoue, T., Yagami, A., Iwata, Y., Ishii, N., Hashimoto, T., and Matsunaga, K. (2016). Mucous membrane pemphigoid reactive only with BP230. *J Dermatology* 43, 1228–1229.

Ishiko, A., Shimizu, H., Kikuchi, A., Ebihara, T., Hashimoto, T., and Nishikawa, T. (1993). Human autoantibodies against the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) bind only to the intracellular domain of the hemidesmosome, whereas those against the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2) bind along the plasma membrane of the hemidesmosome in normal human and swine skin. *J Clin Invest* 91, 1608–1615.

Izumi, K., Nishie, W., Mai, Y., Wada, M., Natsuga, K., Ujiie, H., Iwata, H., Yamagami, J., and Shimizu, H. (2016). Autoantibody Profile Differentiates between Inflammatory and Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol* 136, 2201–2210.

Izumi, K., Nishie, W., Mai, Y., Ujiie, H., Iwata, H., Natsuga, K., and Shimizu, H. (2017). Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay. *J Dermatol Sci* 88, 247–248.

Kamaguchi, M., and Iwata, H. (2019). The Diagnosis and Blistering Mechanisms of Mucous Membrane Pemphigoid. *Front Immunol* 10, 34.

Kershenovich, R., Hodak, E., and Mimouni, D. (2014). Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev* 13, 477–481.

Kobayashi, M., Amagai, M., Kuroda-Kinoshita, K., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Nishikawa, T. (2002). BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 30, 224–232.

Koster, J., Geerts, D., Favre, B., Borradori, L., and Sonnenberg, A. (2003). Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin $\alpha 6\beta 4$ important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* 116, 387–399.

Kridin, K., and Bergman, R. (2018). Association of Bullous Pemphigoid With Dipeptidyl-Peptidase 4 Inhibitors in Patients With Diabetes: Estimating the Risk of the New Agents and Characterizing the Patients. *Jama Dermatol* 154, 1152.

Kridin, K., and Cohen, A.D. (2018). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitor-associated bullous pemphigoid: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 85, 501–503.

Labib, R.S., Anhalt, G.J., Patel, H.P., Mutasim, D.F., and Diaz, L.A. (1986). Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol Baltim Md* 1950 136, 1231–1235.

Lackner, D.H., Carré, A., Guzzardo, P.M., Banning, C., Mangena, R., Henley, T., Oberndorfer, S., Gapp, B.V., Nijman, S.M.B., Brummelkamp, T.R., et al. (2015). A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nat Commun* 6, 10237.

Leverkus, M., Bhol, K., Hirako, Y., Pas, H., Sitaru, C., Baier, G., Bröcker, E., Jonkman, M.F., Ahmed, A.R., and Zillikens, D. (2001). Cicatricial pemphigoid with circulating autoantibodies to $\beta 4$ integrin, bullous pemphigoid 180 and bullous pemphigoid 230. *Br J Dermatol* 145, 998–1004.

Mai, Y., Nishie, W., Izumi, K., Yoshimoto, N., Morita, Y., Watanabe, M., Toyonaga, E., Ujiie, H., Iwata, H., Fujita, Y., et al. (2018). Detection of anti-BP180 NC16A autoantibodies after the onset of dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid: a report of three patients. *Br J Dermatol* 179, 790–791.

Mai, Y., Ujiie, H., Higashi, T., Yamagami, J., Iwata, H., and Shimizu, H. (2019). Autoantibodies undetectable by chemiluminescent enzyme immunoassay require extended antigen–antibody reaction time for detection. *Br J Dermatol* 180, 215–216.

Matsumura, K., Amagai, M., Nishikawa, T., and Hashimoto, T. (1996). The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol Res* 288, 507–509.

McMillan, J.R., Akiyama, M., and Shimizu, H. (2003). Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* 31, 169–177.

Murrell, D.F., Daniel, B.S., Joly, P., Borradori, L., Amagai, M., Hashimoto, T., Caux, F., Marinovic, B., Sinha, A.A., Hertl, M., et al. (2012). Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: Recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol* 66, 479–485.

Natsuga, K., Nishie, W., Shinkuma, S., Ujiie, H., Nishimura, M., Sawamura, D., and Shimizu, H. (2012). Antibodies to Pathogenic Epitopes on Type XVII Collagen Cause Skin Fragility in a Complement-Dependent and -Independent Manner. *J Immunol* 188, 5792–5799.

Natsuga, K., Nishie, W., Nishimura, M., Shinkuma, S., Watanabe, M., Izumi, K., Nakamura, H., Hirako, Y., and Shimizu, H. (2017). Loss of interaction between plectin and type XVII collagen results in epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat* 38, 1666–1670.

Nishie, W. (2014). Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: An autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J Dermatol Sci* 73, 179–186.

Nishie, W., Sawamura, D., Goto, M., Ito, K., Shibaki, A., McMillan, J.R., Sakai, K., Nakamura, H., Olasz, E., Yancey, K.B., et al. (2007). Humanization of autoantigen. *Nat Med* 13, 378–383.

Nishie, W., Lamer, S., Schlosser, A., Licarete, E., Franzke, C.-W., Hofmann, S.C., Jackow, J., Sitaru, C., and Bruckner-Tuderman, L. (2010). Ectodomain Shedding Generates Neoepitopes on Collagen XVII, the Major Autoantigen for Bullous Pemphigoid. *J Immunol* 185, 4938–4947.

Nishie, W., Kiritsi, D., Nyström, A., Hofmann, S.C., and Bruckner-Tuderman, L. (2011). Dynamic Interactions of Epidermal Collagen XVII with the Extracellular Matrix Laminin 332 as a Major Binding Partner. *Am J Pathology* 179, 829–837.

Nishimura, M., Nishie, W., Shirafuji, Y., Shinkuma, S., Natsuga, K., Nakamura, H., Sawamura, D., Iwatsuki, K., and Shimizu, H. (2016). Extracellular cleavage of collagen

XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation. *Hum Mol Genet* 25, 328–339.

Nonaka, S., Ishiko, A., Masunaga, T., Nishikawa, T., Akiyama, M., Owaribe, K., and Shimizu, H. (2000). The Extracellular Domain of BPAG2 has a Loop Structure in the Carboxy Terminal Flexible Tail In Vivo. *J Invest Dermatol* 115, 889–892.

Owaribe, K., Nishizawa, Y., and Franke, W.W. (1991). Isolation and characterization of hemidesmosomes from bovine corneal epithelial cells. *Exp Cell Res* 192, 622–630.

Oyama, N., Setterfield, J.F., Powell, A.M., Sakuma-Oyama, Y., Albert, S., Bhogal, B.S., Vaughan, R.W., Kaneko, F., Challacombe, S.J., and Black, M.M. (2006). Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol* 154, 90–98.

Qian, H., Natsuaki, Y., Koga, H., Kawakami, T., Tateishi, C., Tsuruta, D., Ishii, N., Li, X., and Hashimoto, T. (2021). The Second Study of Clinical and Immunological Findings in Anti-laminin 332-Type Mucous Membrane Pemphigoid Examined at Kurume University—Diagnosis Criteria Suggested by Summary of 133 Cases. *Front Immunol* 12, 771766.

Rashid, K.A., Gürcan, H.M., and Ahmed, A.R. (2006a). Antigen Specificity in Subsets of Mucous Membrane Pemphigoid. *J Invest Dermatol* 126, 2631–2636.

Rashid, K.A., Stern, J.N.H., and Ahmed, A.R. (2006b). Identification of an Epitope within Human Integrin $\alpha 6$ Subunit for the Binding of Autoantibody and Its Role in Basement Membrane Separation in Oral Pemphigoid. *J Immunol* 176, 1968–1977.

Schaapveld, R.Q.J., Borradori, L., Geerts, D., Leusden, M.R. van, Kuikman, I., Nievers, M.G., Niessen, C.M., Steenbergen, R.D.M., Snijders, P.J.F., and Sonnenberg, A. (1998). Hemidesmosome Formation Is Initiated by the $\beta 4$ Integrin Subunit, Requires Complex Formation of $\beta 4$ and HD1/Plectin, and Involves a Direct Interaction between $\beta 4$ and the Bullous Pemphigoid Antigen 180. *J Cell Biology* 142, 271–284.

Schmidt, E., and Zillikens, D. (2013). Pemphigoid diseases. *Lancet* 381, 320–332.

Schmidt, E., Skrobek, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Messer, G., Bröcker, E., Yancey, K.B., and Zillikens, D. (2001). Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol* 145, 778–783.

Schmitt, J., and Papisch, W. (2002). Recombinant autoantigens. *Autoimmun Rev* 1, 79–88.

Skandalis, K., Spirova, M., Gaitanis, G., Tsartsarakis, A., and Bassukas, I.D. (2012). Drug-induced bullous pemphigoid in diabetes mellitus patients receiving dipeptidyl peptidase-IV inhibitors plus metformin. *J Eur Acad Dermatol* 26, 249–253.

Smith, E.P., Taylor, T.B., Meyer, L.J., and Zone, J.J. (1993). Identification of a Basement Membrane Zone Antigen Reactive with Circulating IgA Antibody in Ocular Cicatricial Pemphigoid. *J Invest Dermatol* 101, 619–623.

Ständer, S., Schmidt, E., Zillikens, D., Ludwig, R.J., and Kridin, K. (2021). More Severe Erosive Phenotype Despite Lower Circulating Autoantibody Levels in Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor (DPP4i)-Associated Bullous Pemphigoid: A Retrospective Cohort Study. *Am J Clin Dermatol* 22, 117–127.

Tasanen, K., Tunggal, L., Chometon, G., Bruckner-Tuderman, L., and Aumailley, M. (2004). Keratinocytes from Patients Lacking Collagen XVII Display a Migratory Phenotype. *Am J Pathology* 164, 2027–2038.

Tasanen, K., Varpuluoma, O., and Nishie, W. (2019). Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid. *Front Immunol* 10, 1238.

Toyonaga, E., Nishie, W., Izumi, K., Natsuga, K., Ujiie, H., Iwata, H., Yamagami, J., Hirako, Y., Sawamura, D., Fujimoto, W., et al. (2017). C-Terminal Processing of Collagen XVII Induces Neoepitopes for Linear IgA Dermatitis Autoantibodies. *J Invest Dermatol* 137, 2552–2559.

Tsunenaga, M., Adachi, E., Amano, S., Burgeson, R.E., and Nishiyama, T. (1998). Laminin 5 can promote assembly of the lamina densa in the skin equivalent model. *Matrix Biol* 17, 603–613.

Ujiie, H., Muramatsu, K., Mushiroda, T., Ozeki, T., Miyoshi, H., Iwata, H., Nakamura, A., Nomoto, H., Cho, K.Y., Sato, N., et al. (2018). HLA-DQB1*03:01 as a Biomarker for Genetic Susceptibility to Bullous Pemphigoid Induced by DPP-4 Inhibitors. *J Invest Dermatol* 138, 1201–1204.

Ujiie, H., Iwata, H., Yamagami, J., Nakama, T., Aoyama, Y., Ikeda, S., Ishii, N., Iwatsuki, K., Kurosawa, M., Sawamura, D., et al. (2019a). Japanese guidelines for the management of pemphigoid (including epidermolysis bullosa acquisita). *J Dermatology* 46, 1102–1135.

Ujiie, H., Yoshimoto, N., Natsuga, K., Muramatsu, K., Iwata, H., Nishie, W., and Shimizu, H. (2019b). Immune Reaction to Type XVII Collagen Induces Intramolecular and Intermolecular Epitope Spreading in Experimental Bullous Pemphigoid Models. *Front Immunol* 10, 1410.

Varpuluoma, O., Försti, A.-K., Jokelainen, J., Turpeinen, M., Timonen, M., Huilaja, L., and Tasanen, K. (2018). Vildagliptin significantly increases the risk of bullous pemphigoid: A Finnish nationwide registry study. *J Invest Dermatol* 138, 1659–1661.

Yasukochi, A., Teye, K., Ishii, N., and Hashimoto, T. (2016). Clinical and Immunological Studies of 332 Japanese Patients Tentatively Diagnosed as Anti-BP180-type Mucous Membrane Pemphigoid: A Novel BP180 C-terminal Domain Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Acta Dermato Venereol* 96, 762–767.

Yeh, S.W., Usman, A.Q., and Ahmed, A.R. (2004). Profile of autoantibody to basement membrane zone proteins in patients with mucous membrane pemphigoid: long-term follow up and influence of therapy. *Clin Immunol* 112, 268–272.

Di Zenzo, G., Thoma-Uszynski, S., Calabresi, V., Fontao, L., Hofmann, S.C., Lacour, J.-P., Sera, F., Bruckner-Tuderman, L., Zambruno, G., Borradori, L., et al. (2011). Demonstration of Epitope-Spreading Phenomena in Bullous Pemphigoid: Results of a Prospective Multicenter Study. *J Invest Dermatol* 131, 2271–2280.