



Title	Dipeptidyl peptidase-IV阻害薬関連水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析及びマウスにおける抗BP180自然自己抗体の発見
Author(s)	眞井, 洋輔
Description	配架番号 : 2716
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14981号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14981
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93739
Type	doctoral thesis
File Information	MAI_Yosuke.pdf



学位論文

**Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連
水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析
及び
マウスにおける抗 BP180 自然自己抗体の発見**

**(Autoantibody profiling in dipeptidyl peptidase-
IV inhibitor-associated bullous pemphigoid
and
detection of anti-BP180 natural autoantibody in
mice)**

2022 年 3 月

北海道大学

眞井 洋輔

学位論文

**Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連
水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析
及び
マウスにおける抗 BP180 自然自己抗体の発見**

**(Autoantibody profiling in dipeptidyl peptidase-
IV inhibitor-associated bullous pemphigoid
and
detection of anti-BP180 natural autoantibody in
mice)**

2022 年 3 月

北海道大学

眞井 洋輔

目次

発表論文目録及び学会発表目録.....	1
要旨	2
略語表	6
緒言	7
水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid, BP).....	7
BP180 (17 型コラーゲン).....	9
第一章	11
緒言	12
実験方法.....	15
1. DPP4i-BP 症例の収集.....	15
2. リコンビナントタンパクの調製.....	18
3. 免疫染色	20
4. 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.....	20
5. ELISA	20
6. 統計解析	21
実験結果.....	22
1. 本研究に参加した DPP4i-BP 症例の特徴.....	22
2. DPP4i-BP 自己抗体は hBP180 の細胞外切断片に対して優位に反応する	25
3. LABD97 に対する IgG1 自己抗体は DPP4i-BP の主要な自己抗体である	26
考察.....	28
第二章	30
緒言	31
実験方法.....	33
1. 細胞培養	33
2. プラスミドの構築	33
3. リコンビナントタンパクの調製.....	34
4. マウスへの免疫	34
5. ハイブリドーマ細胞の作製.....	35

6. ハイブリドーマ細胞の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子の塩基配列決定	35
7. ELISA	35
8. 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.....	36
9. 蛍光抗体法	37
実験結果.....	38
1. 全長 mBP180 をマウスに免疫すると自己抗体を産生し, 皮膚の紅斑とびらんが誘発される	38
2. モノクローナル抗 mBP180 自己抗体の作製.....	42
3. 全長 mBP180 をマウスに免疫すると, mBP180 の細胞内ドメインと切断された細胞外領域を標的とする抗 mBP180 自己抗体が産生される	43
4. 抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体は mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域を標的とする	47
5. 抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体は germline 抗体である.....	50
考察.....	52
結論	54
謝辞	56
利益相反	57
引用文献.....	58

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。

Yosuke Mai, Wataru Nishie, Kentaro Izumi, Hiroshi Shimizu.

Preferential reactivity of dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid autoantibodies to the processed extracellular domain of BP180.

Frontiers in Immunology, 10: 1224, 2019. (Impact factor: 7.561)

Yosuke Mai, Kentaro Izumi, Shoko Mai, Wataru Nishie, Hideyuki Ujiie.

Detection of natural autoantibodies targeting shed ectodomain of BP180 in mice.

Journal of Investigative Dermatology, submitted. (Impact factor: 8.551)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Yosuke Mai, Kentaro Izumi, Wataru Nishie, Hiroshi Shimizu:

Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid autoantibodies preferentially target the non-NC16A extracellular domain of collagen XVII.

Satellite Symposium to the 46th Annual ESDR meeting, Munich, Germany, 2016.09.

Yosuke Mai, Wataru Nishie, Kentaro Izumi, Ellen Toyonaga, Hiroyuki Ikawa, Takayuki Mori, Mutsumi Beniko, Hiroshi Shimizu:

Detection of major epitopes for autoantibodies in dipeptidyl peptidase-IV inhibitors-associated bullous pemphigoid.

Poster session to International Investigative Dermatology 2018, Orland, America, 2018

眞井洋輔, 西江 渉, 泉健太郎, 清水 宏:

Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル.

第 416 回日本皮膚科学会北海道地方会 札幌, 2018. 12.

要旨

<研究 1, Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイルの解析>

【背景と目的】

水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP) は最多の自己免疫性水疱症である。BP では表皮基底細胞のヘミデスモソームを構成する BP180 に対して自己抗体を産生し、全身に浮腫性紅斑と緊満性水疱を生じる。近年、糖尿病治療薬である dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬 (dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, DPP4i) の内服に関連して発症する BP (DPP4i-associated BP, DPP4i-BP) が相次いで報告されている。以前我々は、DPP4i-BP は通常の BP と比較して浮腫性紅斑が乏しく、抗 BP180 自己抗体のエピトープも通常の BP と異なることを報告した。本研究では、DPP4i-BP の病態をより深く理解するため、DPP4i-BP の自己抗体プロファイルをより詳細に解析することとした。

【材料と方法】

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。全長 BP180 enzyme-linked immunosorbent assay の index 値が 60 以上で、BP180 NC16A chemiluminescent enzyme immunoassay が陰性の DPP4i-BP 18 症例を本研究のために使用した。ヒト BP180 (human BP180, hBP180) の全長、細胞内領域、C 末端領域、プラスミンによって切断された細胞外切断片の各リコンビナントタンパクを用いて自己抗体のエピトープ解析を行なった。また、検出した自己抗体の免疫グロブリンサブクラスを解析した。

【結果】

DPP4i-BP の自己抗体は、全長 hBP180 よりもプラスミンで切断された hBP180 の細胞外領域に強く反応することが明らかとなった。また、DPP4i-BP は全例 IgG1 サブクラスの抗 hBP180 細胞外切断片自己抗体を有していた。

【考察】

hBP180 は種々のタンパク分解酵素による切断を受ける。hBP180 の切断片は立体構造の変化により新たに出現するネオエピトープを有し、DPP4i-BP の自己抗体はそのネオエピトープを認識する。また、DPP4i-BP は炎症の乏しい臨床像を呈するが、DPP4i-BP の自己抗体は補体活性が高い IgG1 サブクラスが優位であり、DPP4i-BP では補体活性化が炎症を必ずしも惹起しないことが示唆された。

【結論】

DPP4i-BP の主要な自己抗体は hBP180 の切断された細胞外領域をエピトープとする IgG1 自己抗体であった.

＜研究 2, マウスにおける抗 BP180 自然自己抗体の発見＞

【背景と目的】

研究 1 では, DPP4i-BP は hBP180 の切断された細胞外領域に現れるネオエピトープを認識する自己抗体を有することを明らかにした. このような hBP180 の切断に伴うネオエピトープを標的とする自己抗体は, 線状 IgA 水疱性皮膚症などのその他の自己免疫性水疱症でも見られる. しかし, なぜこのような BP180 の切断に伴う自己抗体を有するかは明らかになっていない. BP180 に対する自己抗体産生のメカニズムを理解するため, マウス BP180 (mouse BP180, mBP180) をマウスに免疫し, どのような自己抗体を産生するのかを解析した.

【材料と方法】

mBP180 を SJL/J マウスに免疫し, 自己抗体産生と皮疹の有無を観察した. mBP180 を免疫したマウスの脾細胞を用いてハイブリドーマ細胞を樹立した. mBP180 の全長, 細胞内領域, NC14A 領域, プラスミンで切断した細胞外切断片を用いて, 樹立したハイブリドーマ細胞株が産生する自己抗体のエピトープ解析を行なった. また, 自己抗体の免疫グロブリンサブクラス解析を行った. 一つのハイブリドーマ細胞株における免疫グロブリン領域の塩基配列を決定した.

【結果】

mBP180 を免疫したマウスは, 抗 mBP180 自己抗体を産生し, BP 様の臨床像を呈した. mBP180 を免疫したマウスから mBP180 に対する自己抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を 6 つ樹立した. 樹立したハイブリドーマ細胞株が産生する自己抗体は, mBP180 の細胞内領域に対する IgG2 自己抗体と, mBP180 の細胞外切断片に対する IgM 自己抗体であった. 次に, mBP180 は切断によって 13 番目のコラーゲン領域にネオエピトープが生じることを発見した. 抗 mBP180 細胞外切断片 IgM 自己抗体は 13 番目のコラーゲン領域に存在する切断特異的なネオエピトープを標的とすることを明らかにした. また, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体の遺伝子配列は, germline 抗体遺伝子配列と同一であり, 抗 mBP180 細胞外切断片 IgM 自己抗体は自然自己抗体であることがわかった.

【考察】

マウスに mBP180 を免疫することにより, mBP180 の細胞内及び切断された細胞外領域に対する自己抗体を産生した. また, 産生された自己抗体はエピトープと免疫グロブリンサブクラスに関連があり, mBP180 は細胞内領域や細胞外切断片などの部位特異的な免疫反応を生じる可能性がある. 興味深いことに, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体は自然自己抗体であった. この

ような BP180 に対する自然自己抗体の存在意義は未だ明らかではないが, BP180 に対する自己抗体産生のメカニズムを解明する一端になるかもしれない.

【結論】

mBP180 を免疫したマウスは, mBP180 の細胞内領域に対する IgG2 自己抗体と, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体を産生した. mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体は mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域に存在する切断特異的なネオエピトープを認識する自然自己抗体であった.

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
BPDAI	Bullous Pemphigoid Disease Area Index
CLEIA	chemiluminescent enzyme immunoassay
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP4i	Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor
DPP4i-BP	DPP4i-associated BP
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
hBP180	human BP180
HRP	horseradish peroxidase
IMGT	ImMunoGeneTics
LABD	linear IgA bullous dermatosis
mBP180	mouse BP180
MMP	mucus membrane pemphigoid
NC14A	non-collagenous 14A domain
NC16A	non-collagenous 16A domain
NC16B	non-collagenous 16B domain
NC16C	non-collagenous 16C domain
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
OCT	Optimal Cutting Temperature
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

緒言

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid, BP)

類天疱瘡は、皮膚構成分子を標的とした自己抗体を伴う表皮下水疱形成を特徴とする疾患である。類天疱瘡の代表的なサブタイプとして、水疱性天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP), 線状 IgA 水疱性皮膚症 (linear IgA bullous dermatosis, LABD), 粘膜類天疱瘡 (mucous membrane pemphigoid, MMP), 及び後天性表皮水疱症がある (Egami et al., 2020; Schmidt and Zillikens, 2013). これらの類天疱瘡の中でも, 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 1), 水疱部の病理組織像は好酸球浸潤を伴う表皮下水疱を認める (図 2) (Nishie, 2014). BP 自己抗体は主に BP180 などの表皮基底細胞のヘミデスモソーム構成分子を標的とし, 表皮真皮境界部に沈着する (図 3) (Ishiko et al., 1993; Nishie, 2014).



図 1. 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。

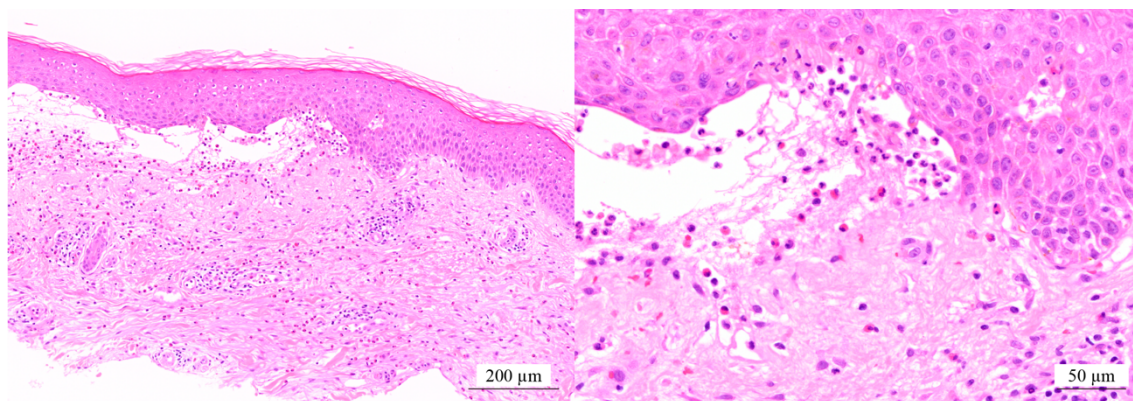


図 2. BP の病理組織像

表皮下裂隙を認め, 真皮に好酸球浸潤を伴う. スケールバーの長さは図中に提示した.

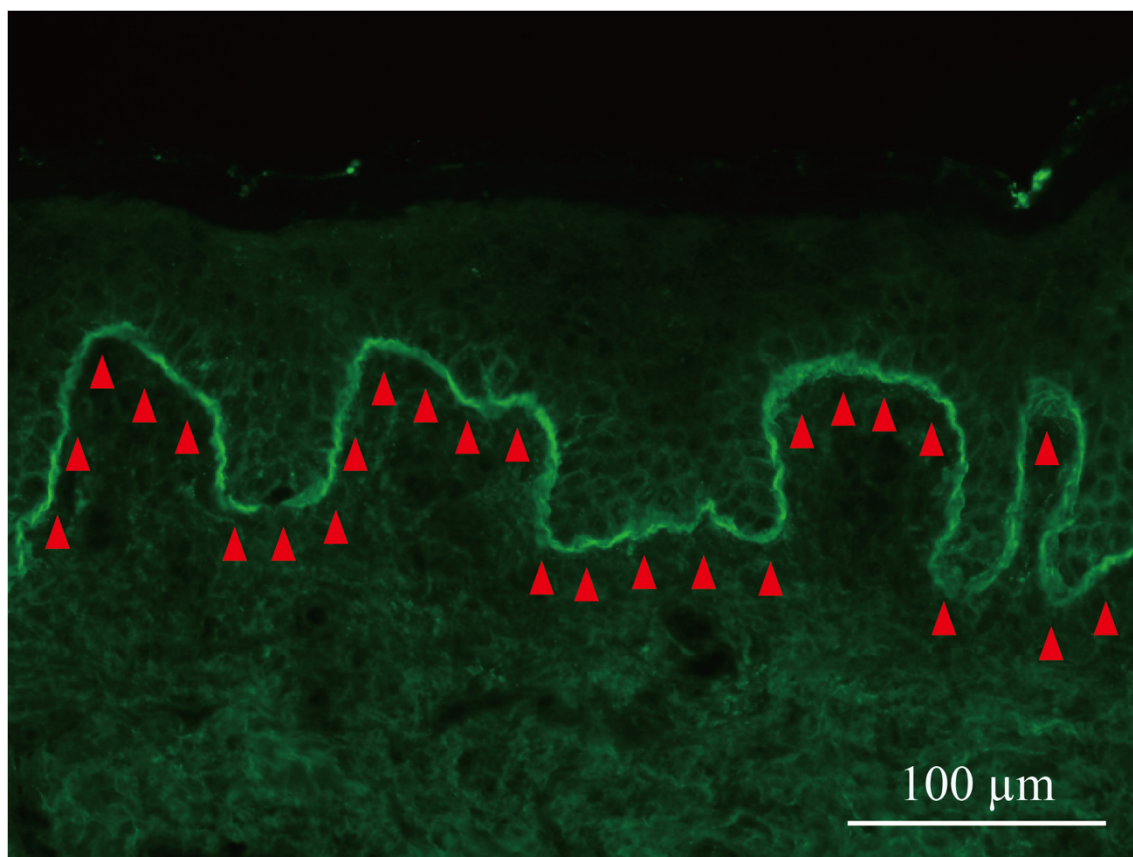


図 3. BP 患者皮膚における IgG 自己抗体の沈着

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 自己抗体の沈着を認める (赤三角). スケールバーの長さは 100 μm である.

BP180 (17 型コラーゲン)

BP180 (17 型コラーゲン) は表皮基底膜の主要構成分子の一つである (図 4) (Diaz et al., 1990; Giudice et al., 1992; Nishie et al., 2007). BP180 をコードする *COL17A1* 遺伝子の変異により BP180 の発現が消失すると、表皮真皮間接合は脆弱となり、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). また、BP180 は自己免疫性水疱症である BP の主要な自己抗体の標的抗原である (Diaz et al., 1990; Hofmann et al., 2002; Labib et al., 1986).

BP180 は II 型膜貫通タンパクのコラーゲンであり (Franzke et al., 2003), ヒトの BP180 (human BP180, hBP180) は 15 個のコラーゲン領域と 16 個の非コラーゲン領域から成る (図 5) (Giudice et al., 1992). 一方, マウスの mBP180 は 14 個のコラーゲン領域と 15 個の非コラーゲン領域で構成される (図 5) (Kang et al., 2019).

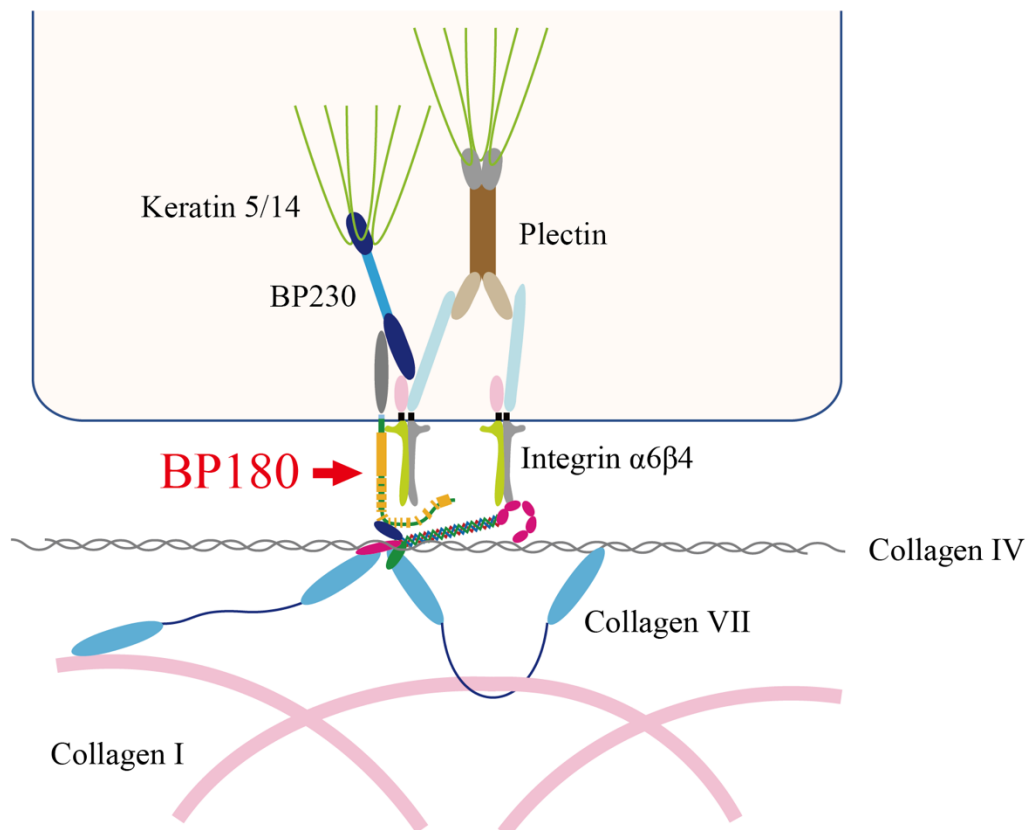
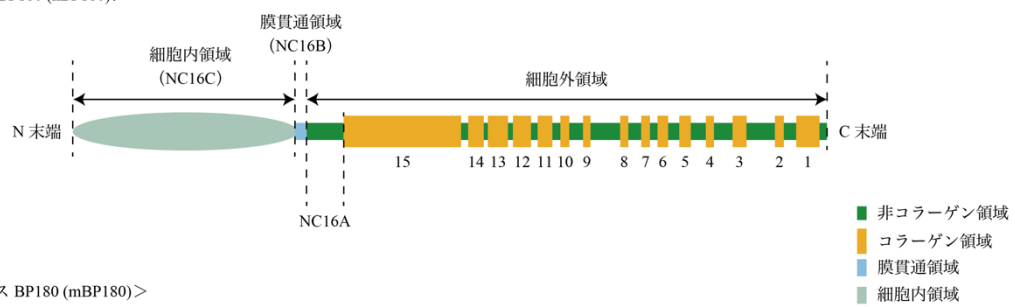


図 4. 表皮基底膜部の構成分子
(Nishie, 2014) から抜粋し、一部改変した.

<ヒト BP180 (hBP180)>



<マウス BP180 (mBP180)>

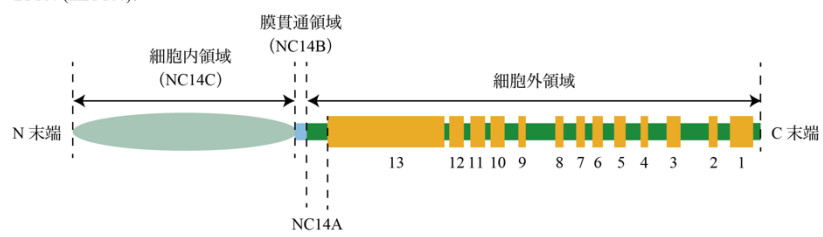


図 5. BP180 の模式図

第一章

Dipeptidyl peptidase-IV 阻害薬関連 水疱性類天疱瘡の自己抗体プロファイル解析

**(Autoantibody profiling in dipeptidyl peptidase-
IV inhibitor-associated bullous pemphigoid)**

緒言

近年、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) は BP を誘発することが知られている (Skandalis et al., 2012; Tasanen et al., 2019). 2012 年に初めて DPP4i 内服中に BP を発症した例が報告され, 2016 年にフランスの Pharmacovigilance Database に基づいた解析から DPP4i 内服と BP 発症との間に強い関連性があると指摘された (Béné et al., 2016). その後, フィンランド (Varpuoluoma et al., 2018), スイス及びフランス (Benzaquen et al., 2018), イスラエル (Kridin and Bergman, 2018), 日本 (Arai et al., 2018) の後ろ向き症例対照研究でも, DPP4i 内服は BP 発症に関連していることが明らかとなった. DPP4i の中でも 特にビルダグリプチンの投与が BP 発症リスクの増加と関連することが確認された (Kridin and Bergman, 2018; Kridin and Cohen, 2018; Ständer et al., 2021; Varpuoluoma et al., 2018). 以上のように, DPP4i 内服に伴う BP 発症リスクの増加については多数の報告があるにも関わらず, DPP4i 投与が BP 発症を引き起こすメカニズムについては未だ明らかになっていない.

過去に我々や他のグループによって, 日本人の DPP4i 関連 BP (DPP4i-associated BP, 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). 一般的な BP 患者の 80-90%が, hBP180 の細胞外領域の非コラーゲン領域である, non-collagenous 16A domain (NC16A) に対する自己抗体を持つ (Kobayashi et al., 2002). 一方, DPP4i-BP の自己抗体は NC16A 領域に反応しないことが多い (Ujiie et al., 2018).

また, 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の炎症細胞浸潤は乏しい (図 7) (Horikawa et al., 2018; Ujiie et al., 2018). 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) (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).

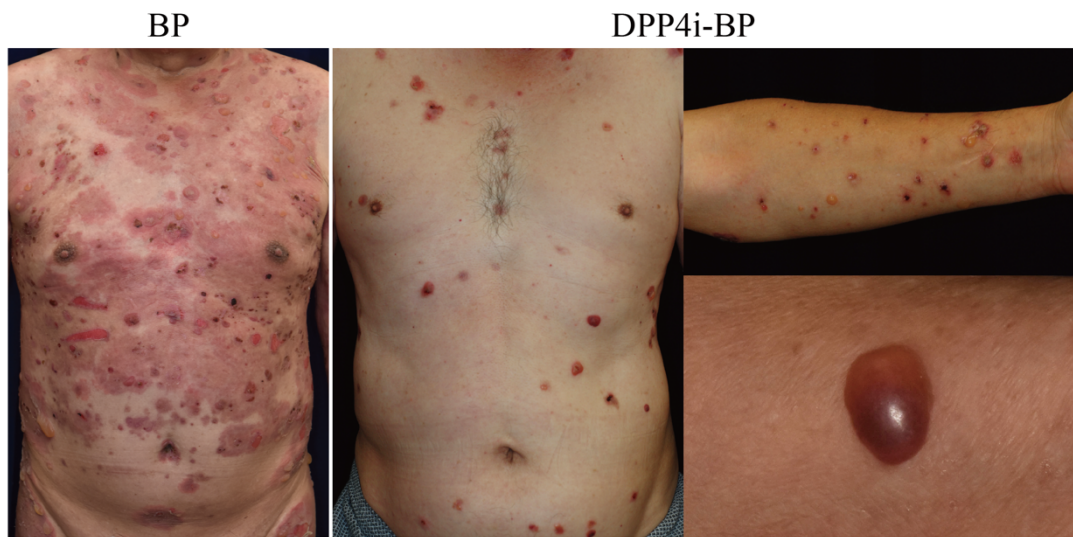


図 6. 通常の BP と DPP4i-BP の臨床像

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.

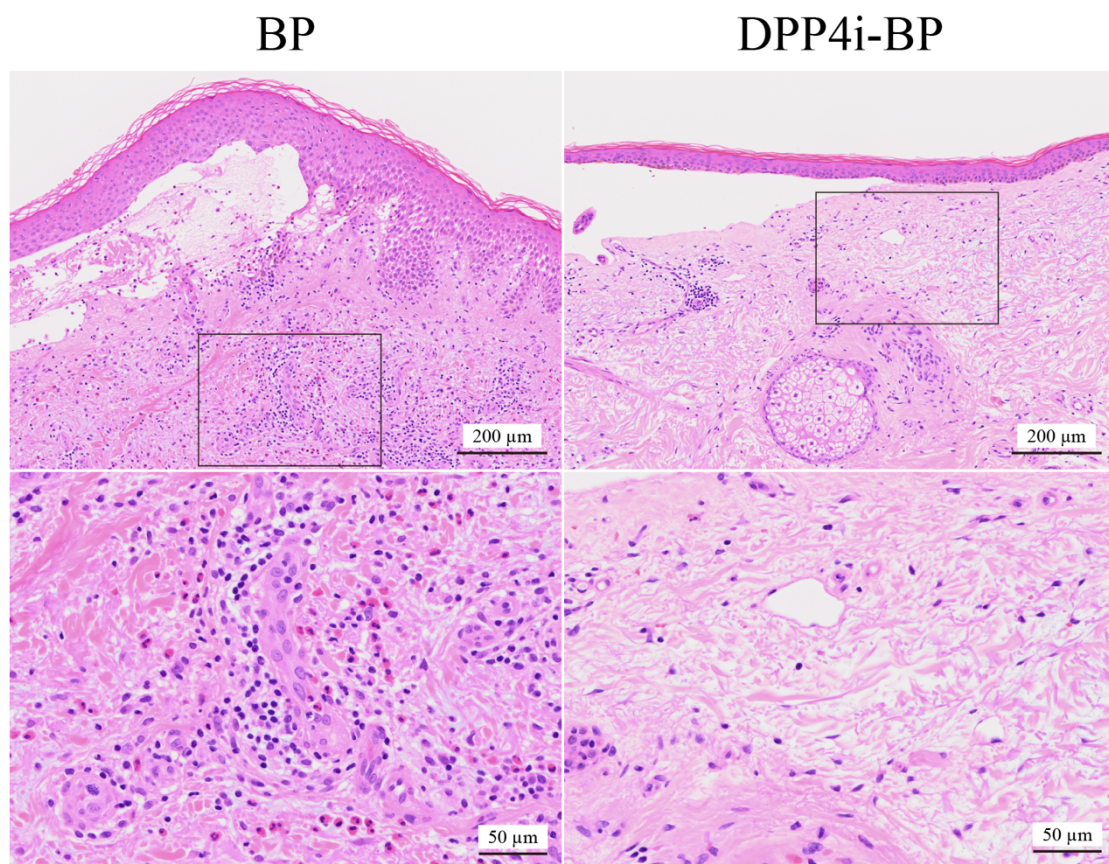


図 7. 通常の BP と DPP4i-BP の病理組織像

DPP4i-BP の病理組織では真皮の好酸球浸潤が乏しい. スケールバーの長さは図中に提示した.

以上より, DPP4i-BP は通常の BP とは異なる臨床像を呈し, その臨床像は DPP4i-BP 自己抗体の免疫学的特徴と関連する可能性がある. 本研究の目的は, DPP4i-BP 患者血中でみられる NC16A 以外の領域に対する抗 BP180 抗体が, BP180 のどの領域に結合するかを明らかにすることである.

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：016-0061）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. DPP4i-BP 症例の収集

2016-2017 年に他施設から当院へ全長 BP180 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の検査目的に血清が送られ、全長 BP180 ELISA が陽性で研究に使用する同意を得た症例を 71 例集めた。そのうち、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 の診断を満たし（表 1）(Ujiie et al., 2019)、且つ BP 発症時に DPP4i 内服していた症例を DPP4i-BP と定義した。DPP4i-BP 症例の中で、全長 hBP180 ELISA の index 値が 60 以上で、BP180 NC16A chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) が陰性の 18 症例を本研究のために使用した。皮疹は BPDAI に基づいて重症度をスコア化した（表 2）(Murrell et al., 2012)。使用した症例からの血清が BP180 以外に対する自己抗体を有している可能性を確認するため、1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法を行なった (Gammon et al., 1984)。この 1 M 食塩水剥離皮膚蛍光抗体間接法は、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光源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 BP180, BP230, Integrin $\alpha 6 \beta 4$ などが自己抗原であり、真皮側に反応した場合は Laminin 332, Laminin $\gamma 1$, 7 型コラーゲンなどが自己抗原である (Schmidt and Zillikens, 2013)。本研究の DPP4i-BP 症例は全て 1 M NaCl 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（図 8）。

表 1. BP の診断基準

A 症状
1. 皮膚に多発する, 痒痒性紅斑.
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

	びらん/水疱	膨疹/紅斑
部位	点数	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

粘膜	びらん/水疱
部位	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

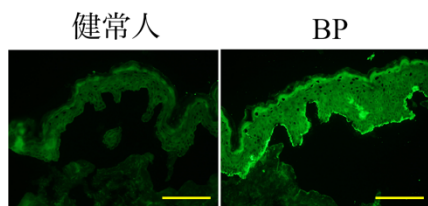
3. 重 症 ≥35 点

③粘膜：びらん/水疱の合計スコア

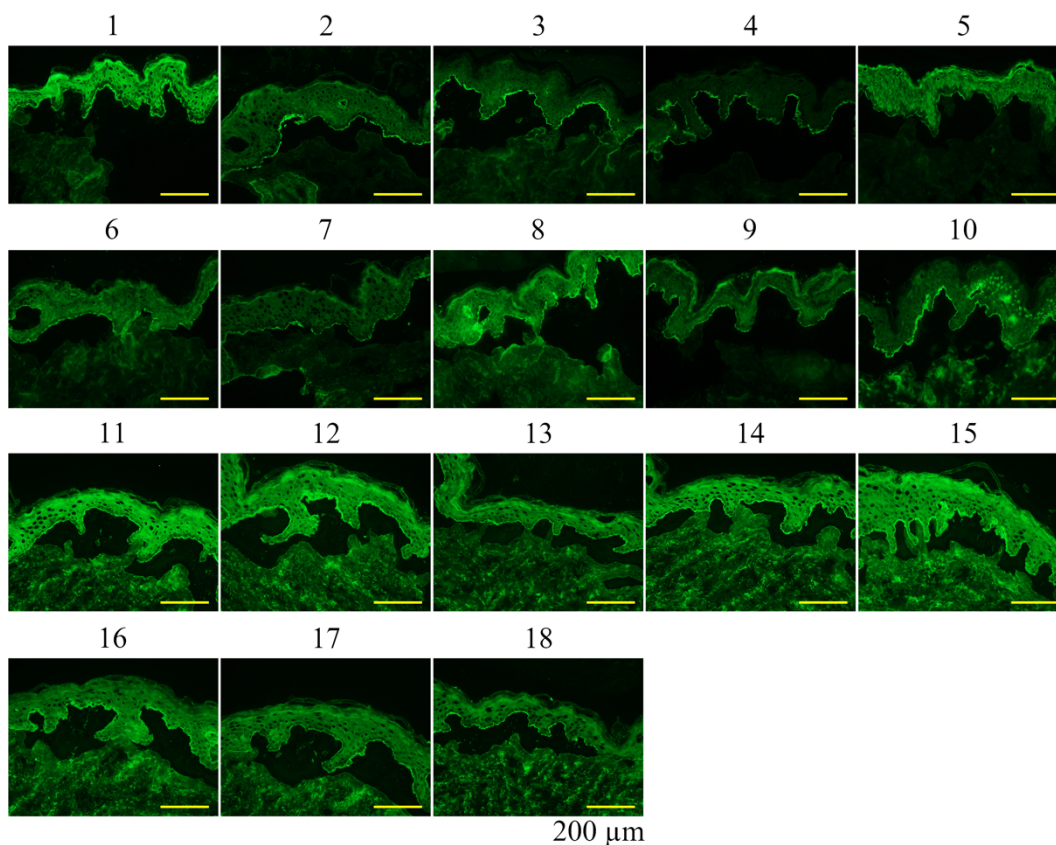
1. 軽 症 ≤9 点

2. 中等症 10～24 点

<コントロール>



<DPP4i-BP>



200 μ m

図 8. 1 M NaCl 剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法

陰性コントロールである健常人血清は表皮側, 真皮側のいずれも反応しなかった. 陽性コントロールである BP 血清は表皮側のみに反応した. 本研究の DPP4i-BP 症例は全て BP と同様に表皮側のみに反応した. スケールバーは 200 μ m である.

2. リコンビナントタンパクの調製

全長 hBP180 リコンビナントタンパクと, hBP180 の細胞内領域及び C 末端領域に対応するリコンビナントタンパクを, 既報告の Flp-In 293 システム (Invitrogen) を用いて作製した (Izumi et al., 2016). 全長 hBP180 はプラスミン 10 μ g/mL

(Sigma Aldrich), 37°C, 1 時間の条件で切断し, 120 kDa (LAD-1) 及び 97 kDa (LABD97) の hBP180 細胞外断片を作成した (Izumi et al. 2016). 作成したそれぞれのタンパクの模式図を図 9 に示す. ウェスタンブロッティングで使用した全長 hBP180 とプラスミンで切断した細胞外断片の混合液は, 予めクマシーブリリアントブルー染色でそれぞれ等量になるように混合した (図 10).

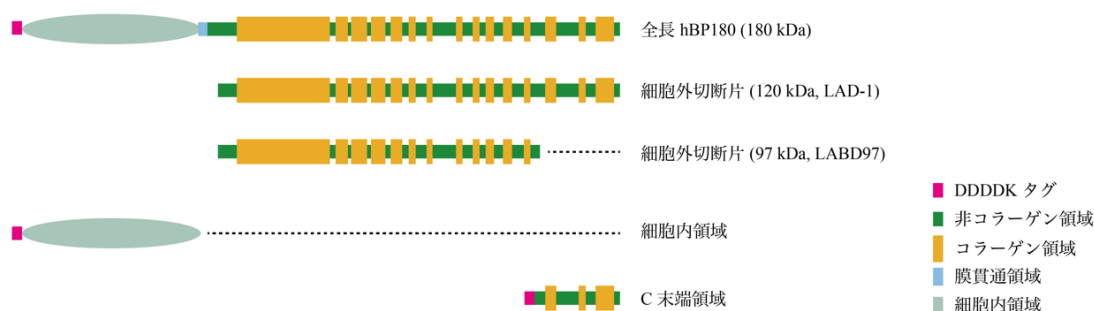


図 9. 作成したリコンビナントタンパクの模式図

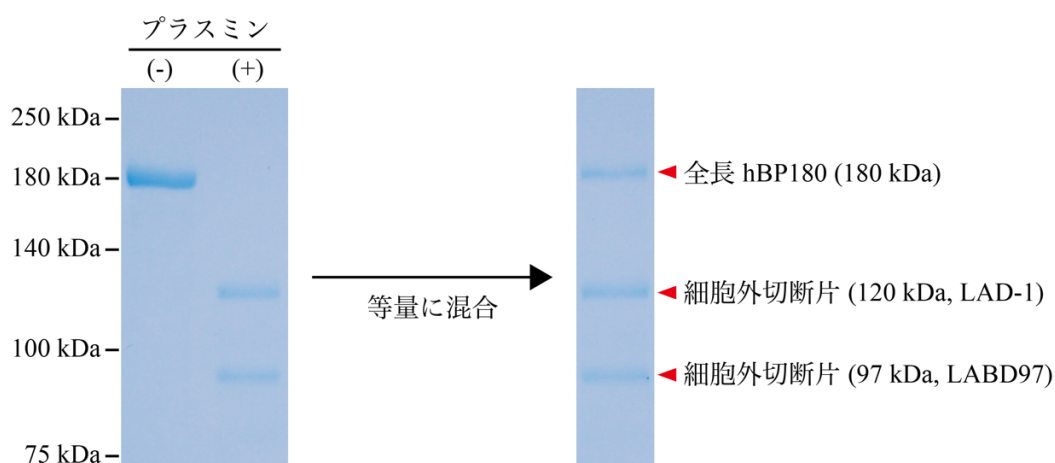


図 10. 全長 hBP180 及び細胞外切断片の混合

左図のクマシーブリリアントブルー染色では, プラスミン (-) では全長 hBP180 に相当する 180 kDa にバンドが見られるが, プラスミン (+) では切断された hBP180 に相当する 120 kDa と 97 kDa にバンドを認めた. 右図は, 180 kDa の全長 hBP180 と切断片である 120 kDa, 97 kDa を等量になるように混合した溶液のクマシーブリリアントブルー染色である.

3. 免疫染色

1 M NaCl 剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法では, 正常なヒトの皮膚を 1 M NaCl 溶液で 48 時間, 4°C で処理した. その後, Optimal Cutting Temperature (OCT) (Muto Pure Chemicals) を用いて瞬間凍結し, 5 μ m 幅の凍結切片を作成した. その後, 切片を患者血清 (希釈率 1:10-20) と 37°C で 40 分間反応させた. リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, 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.

4. 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, 7% または 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 電気泳動で分離した. そのゲルを 0.2 μ m のニトロセルロース膜 (Bio Rad) 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. 2% スキムミルクで 1:200 に希釈した患者血清と室温で 1 時間インキュベートした後, 2% スキムミルクで希釈した HRP 標識した抗ヒト IgG 抗体 (1:1,000) (Dako Cytomation), 抗ヒト IgG1 抗体 (1:500) (Thermo Fisher Scientific), または抗ヒト IgG4 抗体 (1:5000) (Thermo Fisher Scientific) を室温で 1 時間反応させた. 陽性コントロールは抗 DDDDK 抗体 (抗 FLAG M2-HRP 抗体, Sigma-Aldrich) を室温で 1 時間反応させた. シグナルは Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad) を用いて可視化した. 各タンパク質バンドのシグナルは, Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて定量した. 各バンドの相対シグナルは, 180 kDa バンド (全長 hBP180 に相当) のシグナルを元に算出した. 症例 No.11 は, 180 kDa バンドのシグナルが微弱であったため, 除外した. クマシーブリリアントブルー染色では, 7% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE でタンパク質サンプルを分離した. ゲルは 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.

5. ELISA

全長 hBP180 を用いた 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 の全長 hBP180 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

した患者血清で置換し、室温で1時間反応させた。洗浄後、プレートをPBSで1:500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'-tetramthylbenzidine 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。抗BP230自己抗体の検出はBP230 ELISA kit (MBL) を用いた。

6. 統計解析

統計解析はGraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて行った。データは二元配置分散分析を行った後、Tukeyの多重比較検定を用いて分析した。 p 値は、*: $0.01 < p < 0.05$, **: $0.001 < p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$ で示した。

実験結果

1. 本研究に参加した DPP4i-BP 症例の特徴

本研究に参加した DPP4i-BP 症例の臨床的及び免疫学的特徴を表 3, 4 に示す. 患者皮膚中の自己抗体を検出する蛍光抗体直接法では, 全例で表皮真皮境界部に IgG または C3 の沈着を認めた. 平均年齢は 78.8 歳 (57 歳から 93 歳までの範囲) で, 女性男性比は 6 : 12 と男性が多かった. 全長 BP180 ELISA の平均抗体価は 108.2 index 値であった (60.9 index 値から 171.7 index 値までの範囲, カットオフ値 < 4.64 index 値). 抗 BP230 自己抗体は, BP230 ELISA (カットオフ値 < 9.0 index 値) で 2 例 (11.1%) 検出された (表 4). 内服している DPP4i の内訳はビルダグリプチンが最も多く (38.9%), 次いでテネリグリプチン (33.3%), シタグリプチン (27.8%) の順であった (表 5).

表 3. DPP4i-BP 症例のリスト

No	年齢	性別	全長 BP180 ELISA	BP230 ELISA	DPP4i	蛍光抗体直接法	BPDAI
1	55-60	男	94.4	2.3	テネリグリプチン	IgG, C3	-
2	75-80	男	86.6	1.5	ビルダグリプチン, テネリグリプチン, シタグリプチン	IgG, C3	-
3	90-95	男	150.6	2.3	アナグリプチン	IgG, IgA, IgM, C3	52-7-0
4	90-95	女	130.6	3.4	ビルダグリプチン	IgG, C3	-
5	70-75	男	103.8	1.7	テネリグリプチン, ビルダグリプチン	IgG, C3	-
6	80-85	男	102.3	4.7	ビルダグリプチン	IgG, C3	-
7	65-70	男	60.93	0.4	シタグリプチン	IgG, C3	-
8	85-90	女	109.9	1.7	テネリグリプチン	IgG, IgM, C3	-
9	80-85	女	171.7	1.1	オマリグリプチン	C3	-
10	90-95	女	98.9	20.3	アログリプチン, シタグリプチン	IgG, C3	-
11	85-90	男	113.2	1.9	テネリグリプチン	IgG, C3	7-6-0
12	55-60	女	139	2.6	ビルダグリプチン	IgG, C3	9-7-15
13	70-75	男	81.7	4.1	ビルダグリプチン, シタグリプチン	IgG, IgA, C3	13-0-0
14	85-90	男	111.2	3.3	アログリプチン, リナグリプチン	IgG, IgA, IgM, C3	38-0-0
15	70-74	男	103.7	14.3	ビルダグリプチン	IgG, C3	46-3-0
16	75-80	男	84.5	2.5	テネリグリプチン	IgG C3	-
17	50-60	女	79.5	2.3	アナグリプチン, リナグリプチン	IgG, C3	-
18	90-95	男	125.4	3.7	シタグリプチン, リナグリプチン	IgG, C3	-

表 4. DPP4i-BP 症例の要約

DPP4i-BP 症例	
年齢, 平均値 (範囲)	78.8 (57-93) 歳
女性/男性比	6 例/12 例
全長 BP180 ELISA, 平均値 (範囲)	108.2 (60.9-171) index 値
BP180 NC16A CLEIA, 陽性率	0 例 (0%)
BP230 ELISA, 平均値 (範囲)	4.2 (1.1-20.3) index 値
BP230 ELISA, 陽性率	2 例(11.1%)

表 5. DPP4i 内服の内訳

DPP4i	内訳
ビルダグリブチン	7 (38.9%)
テネリグリブチン	6 (33.3%)
シタグリブチン	5 (27.8%)
リナグリブチン	3 (16.7%)
アログリブチン	2 (11.1%)
アナグリブチン	2 (11.1%)
オマリグリブチン	1 (5.6%)

2. DPP4i-BP 自己抗体は hBP180 の細胞外切断片に対して優位に反応する

DPP4i-BP における IgG 自己抗体のエピトープを同定するため、全長 hBP180, 細胞外切断片, C 末端領域を用いてウェスタンブロッティングを行った (図 11-13). その結果, BP180 の細胞内領域を標的とした自己抗体が検出されたのは 1 例のみで, C 末端領域を標的とした自己抗体が検出された症例は認めなかった (図 11-12). 全長 hBP180 とプラスミンで切断した hBP180 の切断片である 120 kDa (LAD-1) 及び 97 kDa (LABD97) タンパクの混合液を用いたウェスタンブロッティングでは, 症例 No. 11 を除く全ての症例の IgG 自己抗体が全長 hBP180 に反応した (図 11). 興味深いことに, DPP4i-BP IgG 自己抗体は全長 hBP180 よりもその切断片である LAD-1, LABD97 に対してより強い反応性を示した (図 13-14). 対照的に, 通常の BP の自己抗体は, 各タンパクに対して同等に反応した (図 13-14).

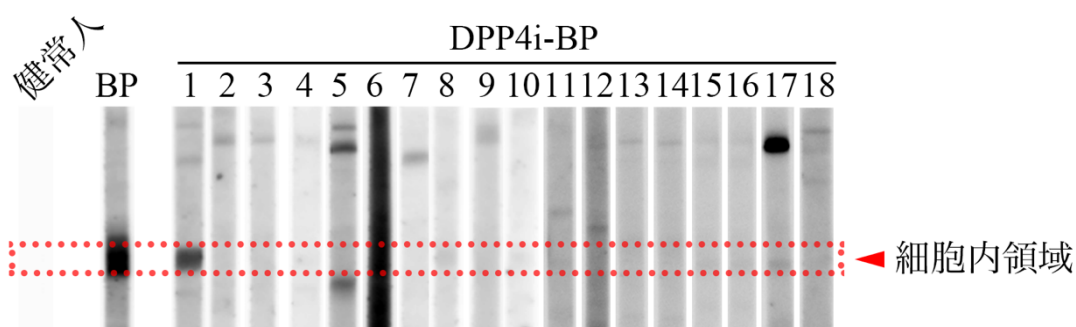


図 11. hBP180 細胞内領域を用いたウェスタンブロッティング

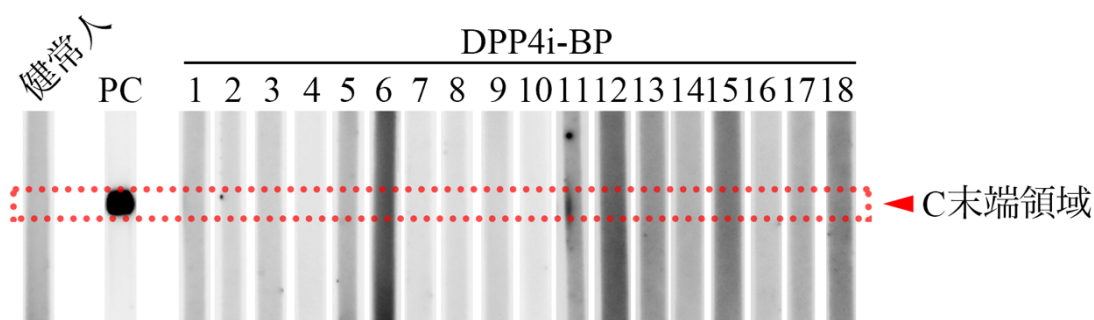


図 12. hBP180 C 末端領域を用いたウェスタンブロッティング
陽性コントロールは抗 DDDDK 抗体で検出した。

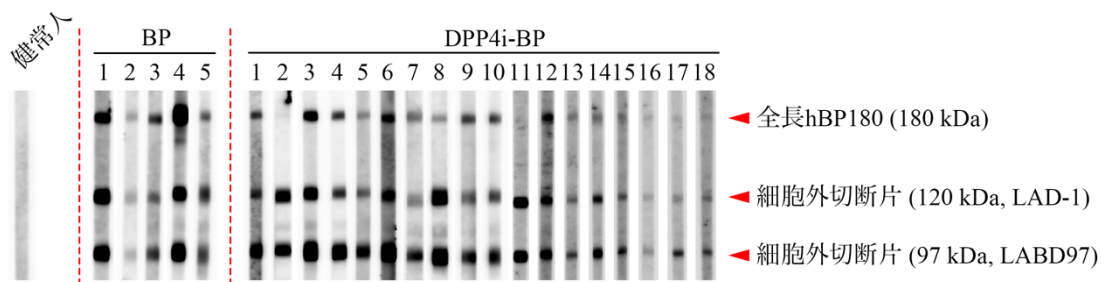


図 13. 全長 hBP180 と細胞外切断片を用いたウェスタンブロッティング

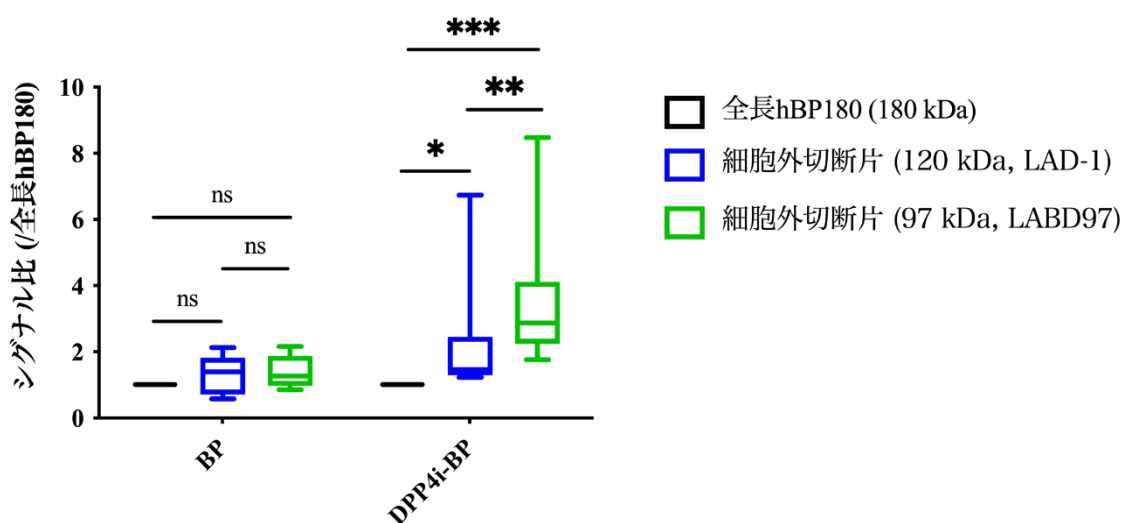


図 14. hBP180 の細胞外切断片に対する反応性

シグナル比は全長 hBP180 のシグナルを元に Fiji で算出された。データは二元配置分散分析を行った後, Tukey の多重比較検定を用いて分析した。p 値は, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $0.001 < p < 0.01$, ***: $p < 0.0001$ で示した。

3. LABD97 に対する IgG1 自己抗体は DPP4i-BP の主要な自己抗体である

BP の IgG 自己抗体の主要なサブクラスは IgG1 と IgG4 であることが知られている (Sitaru et al., 2007)。そこで, 全長 hBP180, LAD-1 及び LABD97 に対する IgG1 及び IgG4 自己抗体の反応性を評価した (図 15-16)。本研究の DPP4i-BP 症例は全て全長 hBP180, LAD-1 及び LABD97 を標的とした IgG1 自己抗体を有していたが, それらの IgG1 自己抗体は LABD97 に対してより強く反応した (図 15)。一方, 全長 hBP180, LAD-1 及び LABD97 を標的とする IgG4 自己抗体を有している DPP4i-BP 症例は 18 例中 7 例 (38.9%) であった (図 16)。これらの結果は, hBP180 の細胞外切断片である LABD97 に対する IgG1 自己抗体が DPP4i-BP の主要な自己抗体であることを示唆している。

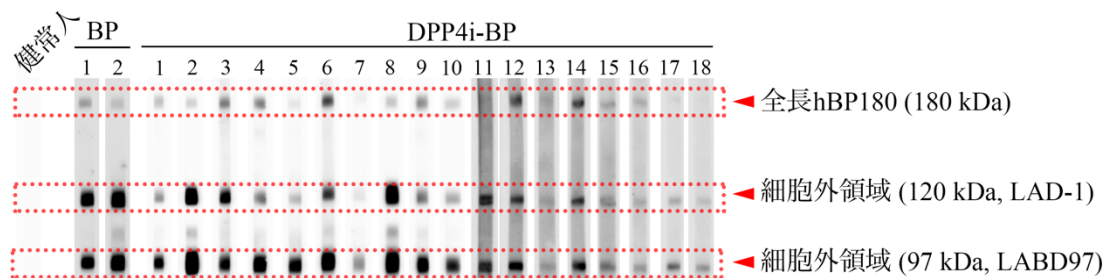


図 15. IgG1 自己抗体のウェスタンブロッティング

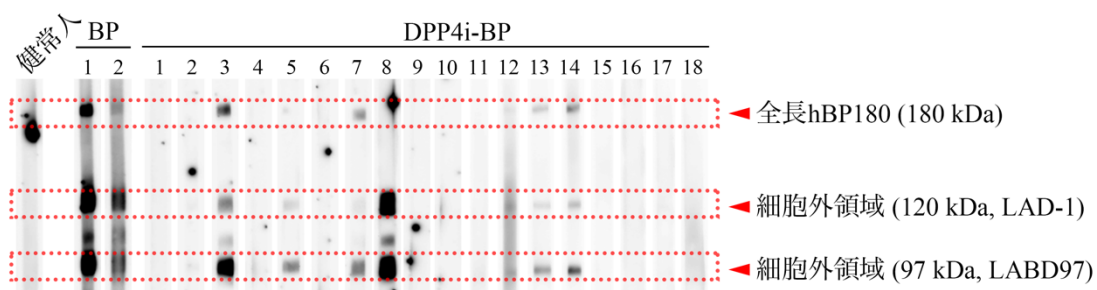


図 16. IgG4 自己抗体のウェスタンブロッティング

考察

本研究では DPP4i-BP 症例 18 例の自己抗体を解析し、全ての症例の自己抗体は hBP180 の切断された細胞外領域に対して反応した。興味深いことに、DPP4i-BP 自己抗体は特に hBP180 細胞外切断片である LABD97 に強く反応することが判明した。このような細胞外切断片に強く反応する自己抗体の特徴は、水疱性類天疱瘡の類縁疾患である LABD にも見られる。LABD 自己抗体は全長 hBP180 には反応せず、その細胞外切断片である LAD-1 と LABD97 に選択的に反応する (Marinkovich et al., 1996; Zone et al., 1990)。BP180 は、いくつかのプロテアーゼによって切断され、hBP180 NC16A 内の切断で LAD-1 が産生される (Franzke et al., 2002; Hofmann et al., 2009)。また、LAD-1 のさらに C 末端を欠失させると LABD97 が生成される (Hofmann et al., 2009)。このような BP180 の切断は分子構造変化を引き起こし、ネイティブな全長 hBP180 には露出されない新たなエпитープであるネオエピトープが出現する (Hashimoto et al., 2017; Nie et al., 2000; Toyonaga et al., 2017; Yamauchi et al., 2014)。過去の研究では、hBP180 の 15 番目のコラーゲン領域やその近傍の領域を標的とした抗体は、全長 hBP180 よりも LAD-1 や LABD97 に強く反応するとの報告がある (Nie et al., 2000; Yamauchi et al., 2014)。さらに、我々の過去の研究では、hBP180 の C 末端の切断により hBP180 の 15 番目のコラーゲン領域上にネオエピトープが生じることを明らかにした (Toyonaga et al., 2017)。今後の課題として、DPP4i-BP 自己抗体が標的とするネオエピトープが hBP180 のどの領域に存在するか検討する必要がある。

また、本研究の全ての症例は LABD97 に強く反応する IgG1 自己抗体を有していた。一方、IgG4 自己抗体は 38.9% の症例にのみ認めた。これらの結果から、LABD97 を標的とする IgG1 自己抗体が DPP4i-BP の主要な自己抗体と考える。BP における IgG1 自己抗体は、補体の活性化を介して炎症を惹起すると考えられている (Dainichi et al., 2017; Zuo et al., 2016)。一方、DPP4i-BP は、真皮表皮接合部で C3 沈着を認めるが、非 DPP4i-BP に比べて蕁麻疹様紅斑が少なく、浸潤する好酸球も少ないという非炎症性の臨床像を呈する傾向にある (Horikawa et al., 2018; Mai et al., 2018; Takama et al., 2018; Ujiie et al., 2018)。本研究で得られた、DPP4i-BP は IgG1 自己抗体が優位であるという結果は、これまでの IgG1 自己抗体が補体を介して BP の炎症を惹起するという仮説とは異なる (Dainichi et al., 2017)。この問題を解決するためにはさらなる研究が必要であるが、本研究では DPP4i-BP において炎症を誘発するには補体の活性化だけでは不十分であることを示唆している。

BPにおけるIgG4自己抗体の病原性は未だ議論がある。IgG4は補体活性化能がなく、マウスモデルではIgG4自己抗体がBPの発症に対して保護的な役割を果たしている(Zuo et al., 2016)。一方、IgG4 BP自己抗体は、白血球依存性に真皮表皮結合を離解させることが実験的に示されている(Mihai et al., 2007)。また、IgG4自己抗体のみ有するBP症例も報告されている(Dainichi et al., 2016)。このIgG4自己抗体のみのBPは炎症の乏しい臨床像を呈することから、IgG4自己抗体はBPの補体依存性炎症とは異なる病態に寄与している可能性がある。補体非依存性の病態として、表皮細胞における抗体依存性のBP180の枯渇化、Fc依存性の好中球の活性化、あるいは白血球依存性の真皮表皮の離解がある(Dainichi et al., 2017; Mihai et al., 2007; Zhao et al., 2006)。今回のDPP4i-BPの自己抗体解析では、IgG4自己抗体はIgG1自己抗体と同様にLABD97に強く反応した。しかし、LABD97及び全長hBP180に対するIgG4自己抗体の陽性率は、IgG1自己抗体の陽性率よりも低く、特に全長hBP180に対するIgG4の陽性率が低かった。この相違は、DPP4i-BPにおいてIgG1自己抗体の出現がIgG4自己抗体の出現よりも先行している可能性を示唆している。

第二章

マウスにおける抗 **BP180** 自然自己抗体の発見

(Detection of anti-BP180 natural autoantibody in mice)

緒言

第一章では, DPP4i-BP が hBP180 の切断された細胞外領域に生じるネオエピトープを認識する自己抗体を有することを明らかにした. このような hBP180 の切断に伴うネオエピトープを標的とする自己抗体は, LABD などのその他の自己免疫性水疱症でも見られる (Nie et al., 2000; Toyonaga et al., 2017). しかし, なぜこのような BP180 の切断に伴う自己抗体を有するかは明らかになっていない.

興味深いことに, 抗 BP180 自己抗体の免疫学的特徴は, これらの類天疱瘡サブタイプ間で異なる (Egami et al., 2020; Schmidt and Zillikens, 2013). NC16A 領域を標的とする抗 BP180 自己抗体を持つ BP は, 蕁麻疹様紅斑を生じる炎症の強い臨床像を呈する傾向がある (Egami et al., 2020; Izumi et al., 2016; Nakama et al., 2018; Schmidt and Zillikens, 2013; Ujiie et al., 2018). 一方, BP180 の非 NC16A 領域を標的とする自己抗体を持つ BP は, 炎症が乏しく紅斑も軽度である臨床像を特徴とする (Izumi et al., 2016; Nakama et al., 2018; Ujiie et al., 2018). 粘膜病変が主体の MMP では, BP180 の C 末端領域を標的とした自己抗体が存在することが知られている (Balding et al., 1996; Hayakawa et al., 2014; Schmidt et al., 2001). これらの知見から, 抗 BP180 自己抗体は多様なエピトープとそれに伴う多様な臨床表現型を持つことが示唆される. しかし, BP180 に対する自己免疫寛容が破綻する際に BP180 のどの領域がエピトープとなりやすいかは未だ明らかになっていない.

これまでの研究で, BP180 に対する抗体を誘発し, BP に類似した症状を発症するマウスモデルが確立されている. hBP180 を発現させたマウス皮膚を野生型マウスに移植して免疫すると, 抗 hBP180 自己抗体の産生が誘導される (Olasz et al., 2007; Ujiie et al., 2010). さらに, この hBP180 を発現させたマウス皮膚を移植した野生型マウス脾細胞から分離した CD4⁺T 細胞は, ナイーブ B 細胞を活性化して hBP180 自己抗体を産生する (Ujiie et al., 2012). しかし, hBP180 はマウスにとっては外来抗原であるため, 自己寛容が破綻した結果としての抗体の産生とは異なる. hBP180 NC16A 領域に相当するマウス BP180 (mBP180) の non-collagenous NC14A domain (NC14A) のリコンビナントタンパクを繰り返しマウスに免疫すると, 抗 mBP180 NC14A 自己抗体が生じる (Hirose et al., 2011). しかし, 以上の研究では, BP180 のどの領域が抗 BP180 自己抗体を産生しやすいかは不明のままであった.

一方, mBP180 の NC14A を遺伝的に欠失させると, 抗 mBP180 自己抗体産生さ

れることから, mBP180 の構造異常が抗 mBP180 自己抗体産生の引き金になり得ることが示唆された (Hurskainen et al., 2015). また, 制御性 T 細胞機能不全のマウスでは抗 mBP180 自己抗体が誘導される (Muramatsu et al., 2018). 興味深いことに, このような免疫寛容に異常があるマウスで産生される自己抗体は, mBP180 の非 NC14A 領域を標的としている (Muramatsu et al., 2018). しかし, これらの抗 mBP180 自己抗体のエピトープは詳細には解析されていない. 以上のことから, これまでの研究では BP180 のどの領域が自己抗体を産生しやすいかは明らかになっていない.

本研究では, 全長 mBP180 をマウスに免疫し, マウスに抗 mBP180 自己抗体を産生させた. 免疫したマウスからハイブリドーマ細胞を作製し, 産生された抗 mBP180 自己抗体のエピトープを解析することで, マウスにおいてどのような抗 mBP180 自己抗体が産生されるかを解析した.

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則る。動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に基づき、北海道大学の承認 (承認番号：14-0058 及び 20-0131) を得た。また、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. 細胞培養

Flp-In 293 細胞 (Invitrogen) を、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen) と 1x Antibiotic-Antimycotic Mixed Solution (Nacalai Tasque) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Nacalai Tasque) を用いて、加湿した 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養した。Sp2/0-Arg 細胞 (ATCC) は、ClonalCell-HY Medium A (STEMCELL) を用いて、37°C, 5%CO₂ の加湿下で培養した。ハイブリドーマ細胞は、15% FBS と 1x Antibiotic-Antimycotic Mixed Solution (Nacalai Tasque) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Nacalai Tasque) 1640 培地で、37°C, 5% CO₂ の加湿下で培養した。モノクローナル自己抗体の回収時は、ハイブリドーマ細胞を Hybridoma-SFM (Gibco) 培地を用いて 37°C, 5%CO₂ の加湿下で培養した。

2. プラスミドの構築

全長 mBP180 リコンビナントタンパクを産生するプラスミドは、以前の報告時に作製した (Toyonaga et al., 2017)。作製手順は、野生型マウスの皮膚から単離した mRNA を鋳型とし、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により *Coll17a1* cDNA (NM_007732) を増幅した。DDDDK-tag 配列をマウス *Coll17a1* cDNA の N 末端に挿入した後、pcDNA5/FRT の HindIII 及び NotI 部位に挿入して mBP180 pcDNA5/FRT を作製した。mBP180 細胞内領域リコンビナントタンパクを作製するため、mBP180 pcDNA5/FRT を鋳型として、表 6 のフォワードプライマー (mBP180_IC_F) とリバースプライマー (mBP180_IC_R) を使用して PCR で増幅した。増幅した PCR 産物を、pcDNA5/FRT の HindIII 及び BamHI サイトに導入し、これを mBP180 IC pcDNA5/FRT とした。また、mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域を欠損させたリコンビナントタンパク (mBP180 delC13) の作成のため、mBP180 pcDNA5/FRT を鋳型として、表 6 のプライマーペア (mBP180_delC13_F1 及び mBP180_delC13_R1, mBP180_delC13_F2 及び mBP180_delC13_R2) で PCR を試行した。得られた PCR 産物を用いて、in vivo assembly cloning により mBP180 delC13 を発現するプラスミドを得た (mBP180 delC13 pcDNA5/FRT) (García-Nafria et al.2016)。mBP180 NC14A リコンビナントタンパク作成のためのプラスミドは

GenScript で合成した. mBP180 NC14A リコンビナントタンパクは His タグを C 末端領域に含み, pGEX-6P-1 をベクターとして利用した (mBP180 NC14A pGEX-6P-1).

表 6. mBP180 遺伝子改変プラスミド作成に用いたプライマー

プライマー名	配列 (5'→3')
mBP180_IC_F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
mBP180_IC_R	GTAGGATCCTCACCCTCCACCAGCTGCAGC
mBP180_delC13_F1	CCATTGCTACAGGCATCGTG
mBP180_delC13_R1	GATGATCCCTCTGAAGTCATTCTGAGATTCCCGTTCTCCT
mBP180_delC13_F2	ATGACTTCAGAGGGATCATCA
mBP180_delC13_R2	CACGATGCCTGTAGCAATGG

3. リコンビナントタンパクの調製

mBP180 pcDNA5/FRT, mBP180 IC pcDNA5/FRT 及び mBP180 delC14 pcDNA5/FRT をそれぞれ pOG44 (Invitrogen) と共に, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて Flp-In 293 細胞に導入した. 形質導入された細胞は, 10% FBS を含む DMEM を用いて, 200 µg/mL のハイグロマイシン B (Invitrogen) を用いて選択した. 全長 mBP180 または mBP180 を修飾したタンパクを安定的に発現している Flp-In-293 細胞を, 1% Nonidet P-40 (Nacalai Tesque), 0.1 M NaCl (Fujifilm), 25 mM Tris-HCl (pH7.4), 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (Dojindo), 及び 1:100 に希釈したプロテアーゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich) を含む溶解液を用いて, 氷上で 30 分間溶解した. 細胞溶解液を抗 DDDDK-tag-マグネティックビーズ (MBL) で免疫沈降させた後, DDDDK ペプチド (Sigma-Aldrich) で溶出させた. プラスミン 1 mU/mL を 37°C で 1 時間処理し, プラスミンで切断した mBP180 細胞外切断片を調製した. mBP180 NC14A pGEX-6P-1 は BL21 コンピテント細胞へ形質転換させた. 形質転換した BL21 細胞から, Overnight Expression Autoinduction System 1 (Novagen) を用いてタンパク発現を誘導した. BL21 細胞は B-PER II (Thermo Scientific) で溶解し, 4°C, 13,000 rpm, 5 分遠心した. ペレットは 4 M 尿素と 10% のドデシル硫酸ナトリウムを含むサンプル緩衝液で溶解した.

4. マウスへの免疫

雌の SJL/J マウスを Charles River Laboratories Japan から購入した. SJL/J マウスに mBP180 1 µg と TiterMax (Sigma-Aldrich) を混合し, 4 週間間隔で 2 回免疫した. 血清は初回免疫日, 初回免疫から 2 週間後及び 4 週間後に採取した. サンプルは -80°C で保存した.

5. ハイブリドーマ細胞の作製

mBP180 を免疫したマウスの脾臓細胞を Sp2/0-Ag14 細胞と融合させ, ClonaCell-HY Hybrdioma kit (STEMCELL) のプロトコールに従ってハイブリドーマを作成した. 手順は, 免疫したマウスから脾臓を取り出し, 40 μ m のメッシュで個細胞に懸濁した. 脾臓細胞と Sp2/0-Arg14 細胞をポリエチレングリコールで融合させ, ヒポキサンチン, アミノプテリン, チミジンを含有した ClonaCell-HY Cloning Medium D (STEMCELL) でハイブリドーマを選択した. その後, 各ハイブリドーマの培養上清を全長 mBP180 ELISA でスクリーニングし, 得られた mBP180 ELISA 陽性ハイブリドーマ株を本研究で使用した. ハイブリドーマ細胞が産生する抗体の免疫グロブリンサブクラスは Rapid Monoclonal Antibody Isotyping kit (Antigen) を用いて調べた. 手順は, PBS で 50 倍に希釈したハイブリドーマ細胞の培養液 100 μ L を Sample Well に添加し, 5 分インキュベーションして, 抗体の免疫グロブリンサブクラスを確認した.

6. ハイブリドーマ細胞の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子の塩基配列決定

ハイブリドーマ細胞の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子の塩基配列決定は, GenScript 社によって行われた. まず, ハイブリドーマ細胞から, TRIzol Reagent (Ambion) のプロトコールに従って RNA を単離した. RNA は, PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) のプロトコールに従い, アイソタイプ特異的なアンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを用いて cDNA に逆転写した. V_H 領域及び V_L 領域の抗体断片は GenScript 社の Rapid amplification of cDNA ends により増幅した. 増幅された抗体遺伝子断片を別々にクローニングした. コロニーPCR を行い, 正しいサイズの挿入物を持つクローンをスクリーニングした. 各フラグメントについて, 正しいサイズのインサートを持つ 5 つ以上のコロニーの配列を決定した. 複数クローンの配列をアラインメントし, クローン間のコンセンサス配列を得た. 免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子配列は, ImMunoGeneTics (IMGT) (Giudicelli et al.2006) のリファレンス遺伝子配列に対して, IgBLAST (Ye et al.2013) でアラインメントした.

7. ELISA

抗 mBP180 自己抗体を検出するために, 96 ウェルマイクロプレート (BD Biosciences) に, 50 mM 炭酸緩衝液 (pH9.5) に溶解した全長 mBP180 50 ng/well を 4°C で一晩コーティングした. その後, マイクロプレートを PBS に溶解した 2% ウシ血清アルブミンを用いて室温で 2 時間ブロッキングした. 同プレートをハイブリドーマ上清と一緒に室温で 1 時間インキュベートした. PBS で洗浄した後, プレートを 1:20000 に希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識ウサギポリクロー

ナル抗マウス IgG 抗体 (DAKO) と室温で 1 時間インキュベートした. PBS で洗浄後, 基質液 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/hydrogen peroxide (MBL) を室温で 30 分インキュベートし, 1.0 N 硫酸を加えて反応を停止した. 基準波長は 620 nm とし, マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した (Tecan Sales Austria GmbH).

8. 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

作成したリコンビナントタンパクを, 7%または 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した. ゲルを 0.2 μ m のニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に転写した. 転写したニトロセルロース膜を 2%スキムミルク中に 30 分間室温でブロッキングした後, 一次抗体 (表 7) と 4°Cで一晩インキュベートした. トリス緩衝生理食塩水で 3 回洗浄した後, ニトロセルロース膜を 1:5000 に希釈した各 HRP 標識二次抗体 (表 8) とインキュベートした. トリス緩衝生理食塩水で 3 回洗浄した後, Clarity Western ECL Substrate(Bio-Rad) で発色した. クマシーブリリアントブルー染色の手順は, 7% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で作成したリコンビナントタンパクを分離した. ゲルは 50%メタノールと 10%酢酸で 30 分間, 室温で固定した. 超純水で洗浄した後, ゲルを 0.25%の Coomassie Blue R-250 液中に一晩室温で染色した. その後, ゲルを 10%酢酸で脱色した. 超純水で洗浄後, GT-D1000 でゲルをスキャンして撮像した.

表 7. ウェスタンブロッティングで使用した一次抗体

抗体名	動物種	希釈	備考
HRP-anti-FLAG-M2 antibody	マウス	1:2000	Sigma-Aldrich から購入.
Anti-Mo-NC14A antibody	ウサギ	1:5000	mBP180 Glu ⁴⁹⁹ -Arg ⁵⁷³ を標的. (Nishie et al., 2015)
1F3-1	マウス	1:500	本研究で作成した.
1D3-1	マウス	1:500	本研究で作成した.
1H2-2	マウス	1:500	本研究で作成した.
10C1-1	マウス	1:500	本研究で作成した.
12B1-2	マウス	1:500	本研究で作成した.
9F-2	マウス	1:500	本研究で作成した.

表 8. ウェスタンブロッティングで用いた二次抗体

抗体名	動物種	希釈	備考
HRP-anti-mouse IgG antibody	ヤギ	1:5000	Jackson Immuno Research から購入.
HRP-anti-rabbit IgG antibody	ヤギ	1:5000	Invitrogen から購入.

9. 蛍光抗体法

免疫したマウスの尾部皮膚サンプルを用いて蛍光抗体直接法を行った。皮膚サンプルを OCT に浸して瞬間凍結し、5 μm 幅の凍結切片を作成した。同切片を-20°Cのアセトンで 10 分間固定した。固定した皮膚切片はヤギ血清 (Wako) を用いて 30 分間室温でブロッキングした。次に、Alexa Fluor 488 標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (希釈率 1:1000, Invitrogen) を用いて 37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、Fluoromount-G で封入した。蛍光抗体間接法では、SLC から購入した C57BL/6J 雄マウスの尾部皮膚サンプルを OCT に浸し、5 μm の凍結切片を作成した。切片を免疫マウス血清 (希釈率 1:100) または産生モノクローナル自己抗体 (1F3-1, 1D3-1, 1H2-2, 10C1-1, 12B1-2, 9F-2, 希釈率 1:100) と 37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、切片を Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体 (希釈率 1:1000) または FITC 標識抗マウス C3 抗体 (希釈率 1:1000, MP Biomedical) と 37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、切片を Fluoromount-G で封入した。蛍光画像は、BX-51 正立顕微鏡で撮影した。

実験結果

1. 全長 mBP180 をマウスに免疫すると自己抗体を産生し, 皮膚の紅斑とびらんが誘発される

SJL/J マウスに全長 mBP180 を4週間の間隔で2回免疫した(図 17). 健常マウスの皮膚を基質とした蛍光抗体間接法で, mBP180 を免疫したマウスの血清が皮膚の表皮基底膜に反応することを確認した(図 18). 18 週目までの皮疹の経過を観察した結果, mBP180 免疫マウスの 55.6% (5/9) に皮膚の紅斑とびらんが見られた(図 19). 紅斑を生じた耳の病理組織では, 組織学的に表皮下裂隙を認めた(図 20). mBP180 免疫マウスの皮膚を用いた蛍光抗体直接法で, 78% (7/9) のマウスで表皮基底膜部に IgG の沈着が認められた(図 21).

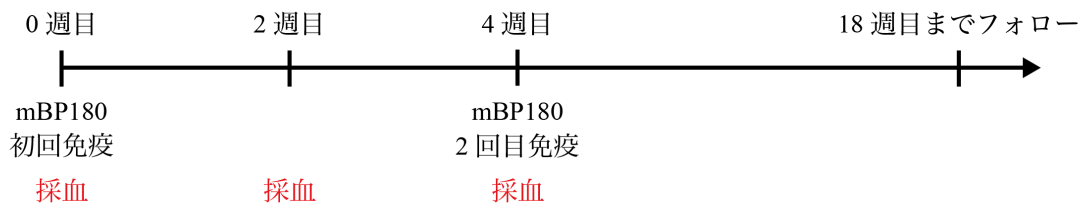


図 17. マウスへの免疫

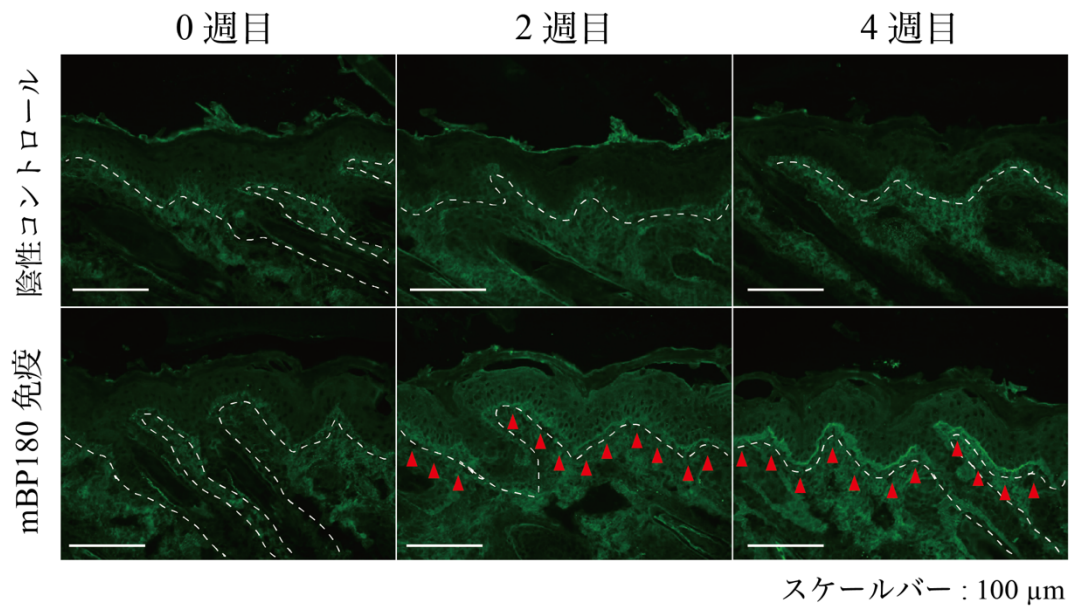


図 18. 免疫したマウスの血清を用いた蛍光抗体間接法

点線は表皮真皮境界部を示し, 赤矢印は自己抗体が表皮真皮境界部に反応している部位を指す. mBP180 免疫マウスは免疫 2 週間後から表皮真皮境界部に反応する自己抗体産生を認めた. スケールバーは 100 μm である.

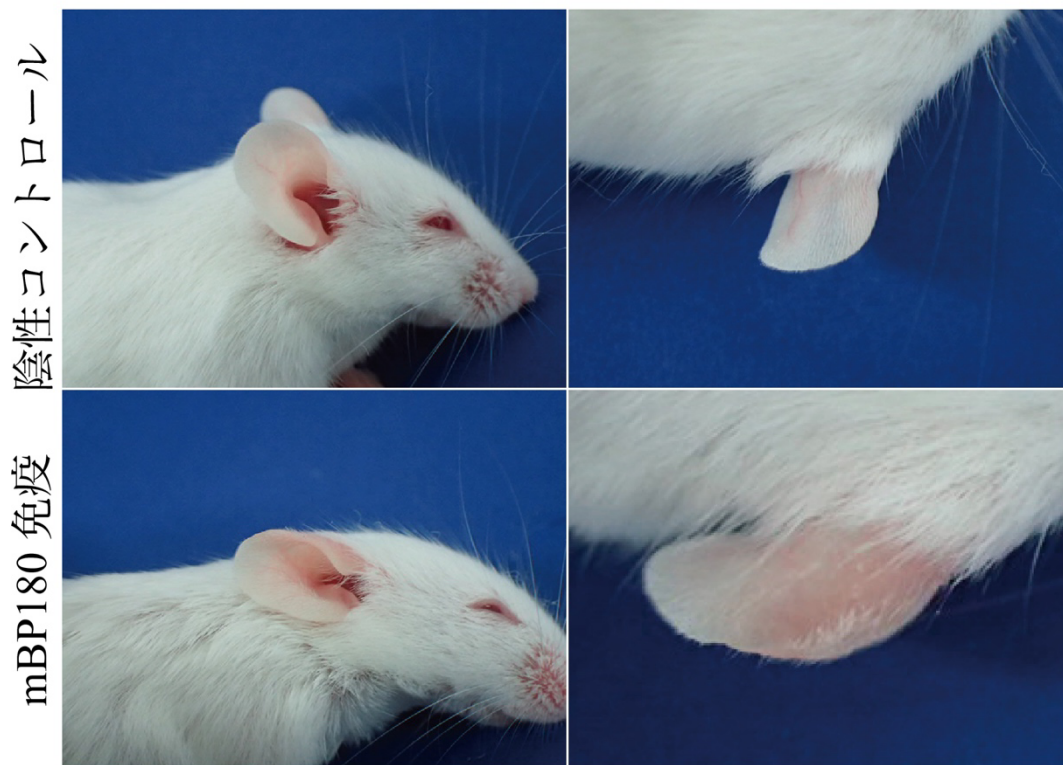


図 19. 免疫したマウスの臨床像
mBP180 免疫マウスの耳には紅斑を認めた.

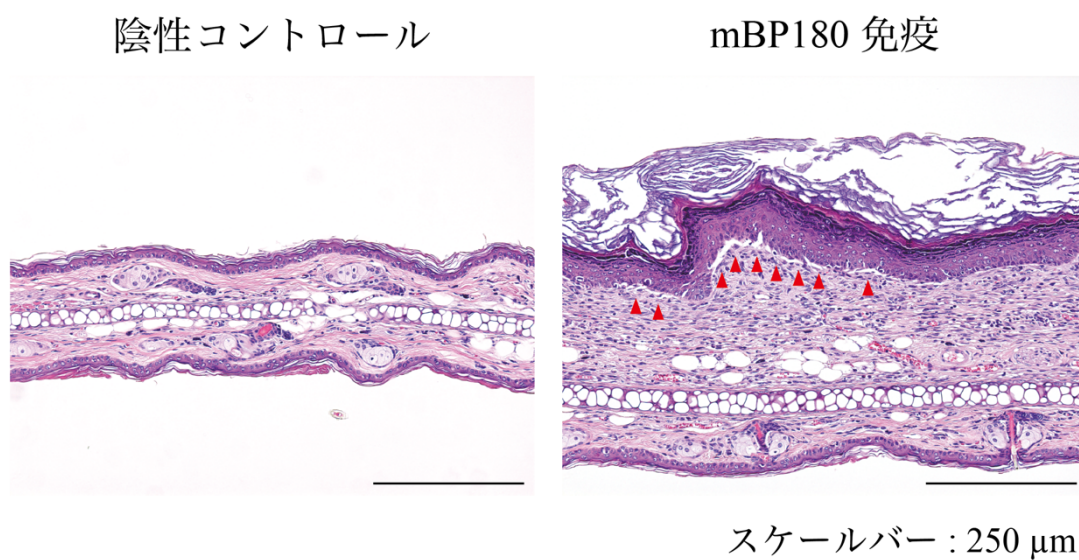


図 20. 免疫したマウスの病理組織
mBP180 免疫マウスの耳の紅斑部位から病理組織では, 表皮真皮裂隙を認めた.

赤矢印は表皮真皮裂隙部を指す. スケールバーは 250 μm である.

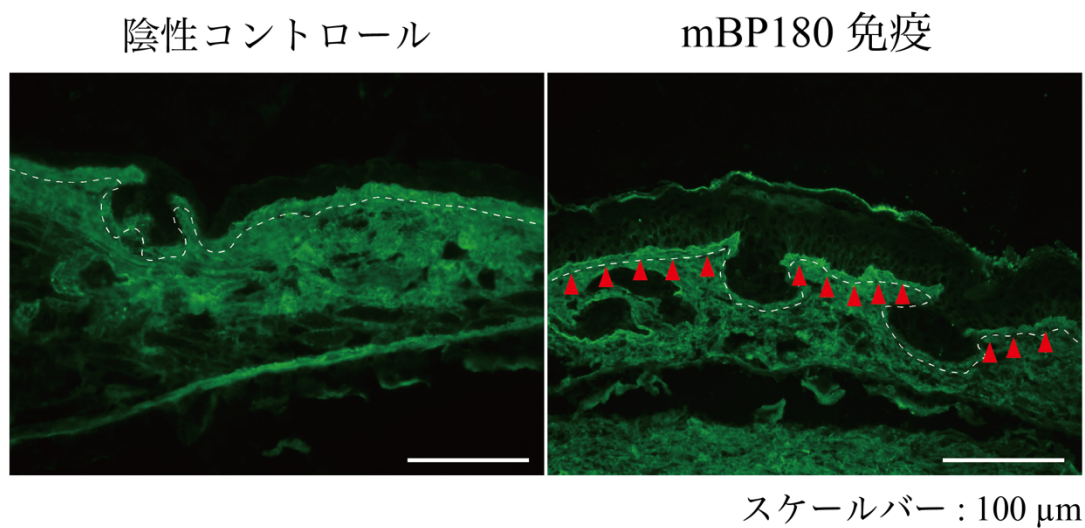


図 21. 免疫したマウスの蛍光抗体直接法

mBP180 免疫マウスは表皮真皮境界部に自己抗体産生の沈着を認めた. 点線は表皮真皮境界部を示し, 赤矢印は自己抗体が表皮真皮境界部に沈着している部位を指す. スケールバーは 100 μm である.

2. モノクローナル抗 mBP180 自己抗体の作製

全長 mBP180 をマウスに免疫することにより産生される自己抗体の免疫学的特徴を評価するために、mBP180 免疫マウスからハイブリドーマ細胞を作製した (図 22). 作成したハイブリドーマ細胞のうち、全長 mBP180 ELISA で陽性となる 6 つのハイブリドーマ細胞株を樹立した. 正常なマウス皮膚を用いた蛍光抗体間接法で、これら 6 種類のモノクローナル自己抗体 (1F3-1, 1D3-1, 1H2-2, 12B1-2, 10C1-1, 9F-2) がマウスの表皮基底膜部に反応することを確認した (図 23).

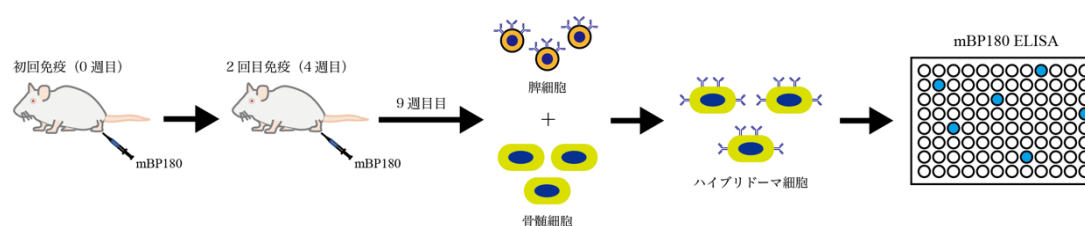


図 22. ハイブリドーマ細胞の樹立

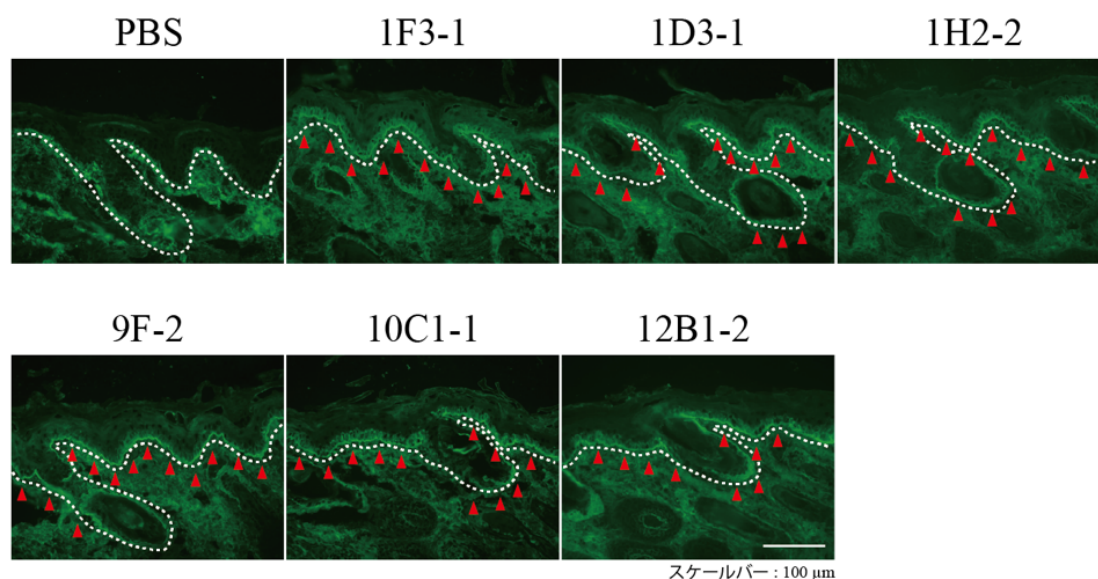


図 23. 樹立したハイブリドーマ細胞から得た自己抗体の蛍光抗体間接法

正常マウス皮膚を基質とした自己抗体検出法である蛍光抗体間接法の結果を示す。樹立した自己抗体は正常マウス皮膚の表皮真皮境界部に反応した。点線は表皮真皮境界部を示し、赤矢印は自己抗体が表皮真皮境界部に反応する部位を指す。スケールバーは 100 μm である。

3. 全長 mBP180 をマウスに免疫すると, mBP180 の細胞内ドメインと切断された細胞外領域を標的とする抗 mBP180 自己抗体が産生される

樹立したモノクローナル自己抗体のエピトープを明らかにするため, 全長 mBP180, mBP180 の NC14A 領域, 細胞内領域のリコンビナントタンパク, プラスミンで切断した細胞外切断片を用意した (図 24-25). 全長 mBP180 とプラスミンで切断された mBP180 細胞外切断片を混合したタンパクを用いてウェスタンブロッティングを行った (図 26). 結果, 6 つのモノクローナル抗体のうち, 4 つのクローン (1F3-1, 1H2-2, 10C1-1, 9F-2) は mBP180 の全長のみに反応し, 2 つのクローン (1D3-1, 12B1-2) は mBP180 の細胞外切断片に特異的に反応した (図 26). また, 全ての自己抗体は mBP180 の NC14A 領域には反応しなかった (図 27). mBP180 の細胞質内領域を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ, 4 つのモノクローナル抗体, 1F3-1, 1H2-2, 10C1-1, 9F-2 のエピトープが mBP180 の細胞内領域上にあることがわかった (図 28).

< マウス BP180 >

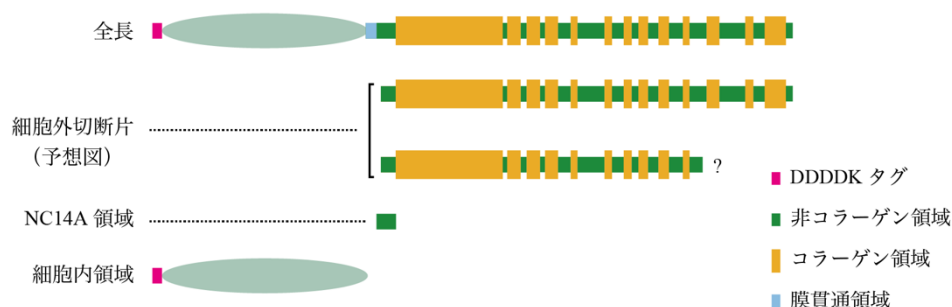


図 24. mBP180 の領域毎のリコンビナントタンパク

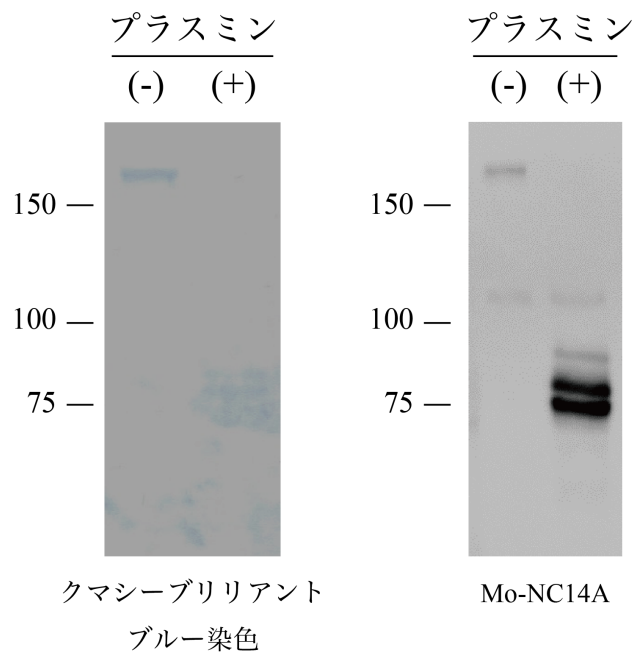


図 25. mBP180 細胞外切断片タンパクのクマシーブリリアントブルー染色とウェスタンプロットティング

左図はクマシーブリリアントブルー染色で, 右図は抗 BP180 NC14A 抗体を用いたウェスタンプロットティングである. プラスミン (-) では全長 mBP180 に相当する 180 kDa にバンドが見られるが, プラスミン (+) で切断された mBP180 は 60-120 kDa に切断片のバンドを認めた.

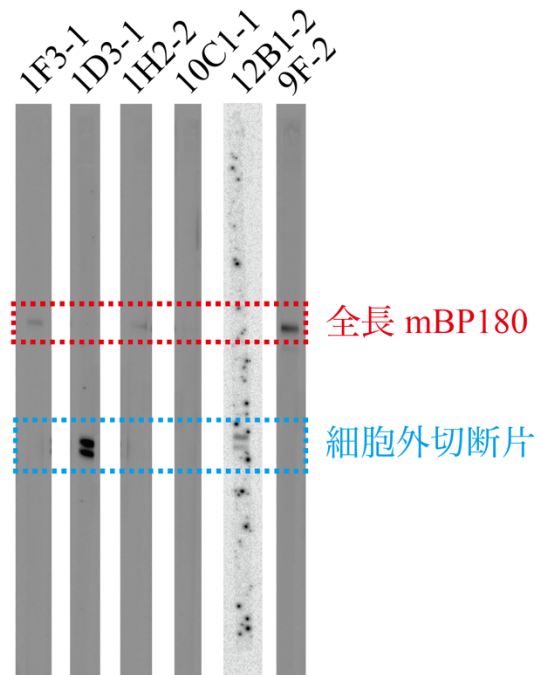


図 26. 全長 mBP180 と細胞外切断片のウェスタンプロット

全長 mBP180 とプラスミンで切断した細胞外切断片を混合して流したウェスタンプロットを行なった。1F3-1, 1H2-2, 10C1-1 及び 9F-2 は全長 mBP180 にのみ反応したが, 1D3-1 と 12B1-2 は細胞外切断片のみに反応した。

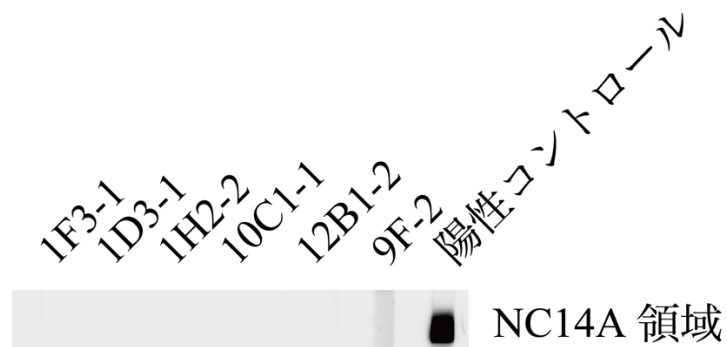


図 27. mBP180 NC14A 領域を用いたウェスタンプロット

陽性コントロールは抗 DDDDK 抗体を使用した。

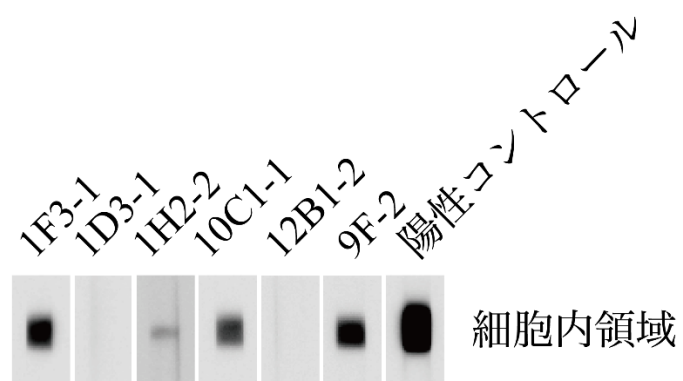


図 28. mBP180 細胞内領域を用いたウェスタンブロット
陽性コントロールは抗 DDDDK 抗体を使用した.

4. 抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体は mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域を標的とする

1D3-1 と 12B1-2 は全長 mBP180 には反応せず、プラスミンで切断した mBP180 の細胞外切断片にのみ反応した。以前我々は、hBP180 の 15 番目のコラーゲン領域に、mBP180 の切断によって生じるネオエピトープが存在することを報告した (Toyonaga et al.2017)。そこで我々は、hBP180 の 15 番目のコラーゲン領域に相当する mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域を欠損させた mBP180 タンパク (C13 欠損 mBP180) を作製した (図 29)。まず、プラスミンが C13 欠損 mBP180 を切断することを確認した (図 30)。次に、1D3-1 及び 12B1-2 は C13 欠損 mBP180 細胞外切断片には反応せず、通常の mBP180 細胞外切断片に反応することを明らかにした (図 31)。以上のデータから、1D3-1 及び 12B1-2 自己抗体が mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域に存在する、切断特異的なネオエピトープを標的としていることが明らかとなった。

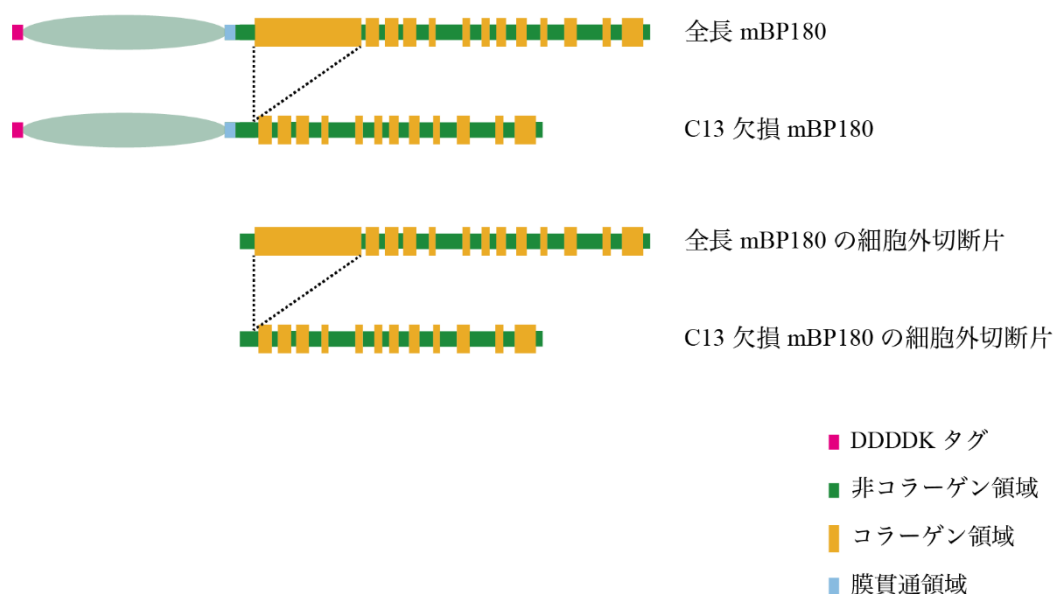


図 29. C13 欠損 mBP180 の模式図

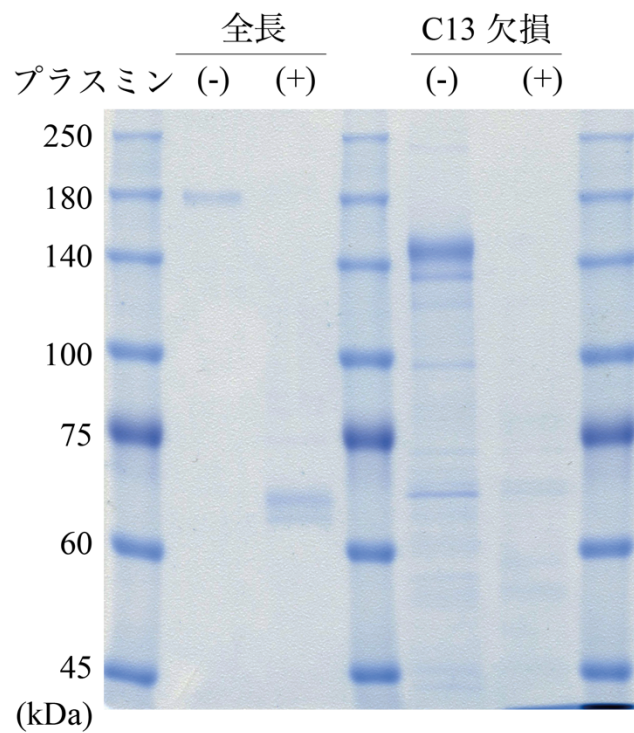


図 30. C13 欠損 mBP180 のクマシーブリリアントブルー染色

通常の全長 mBP180 では, プラスミン (-) で全長 mBP180 に対応する 180 kDa のバンドが見えるが, プラスミン (+) では 60-120 kDa に mBP180 切断片のバンドを認めた. 同様に, C13 欠損 mBP180 では, プラスミン (-) で 150 kDa 付近にバンドがあるが, プラスミン (+) では 45-100 kDa に C13 欠損 mBP180 の切断片のバンドを認めた.

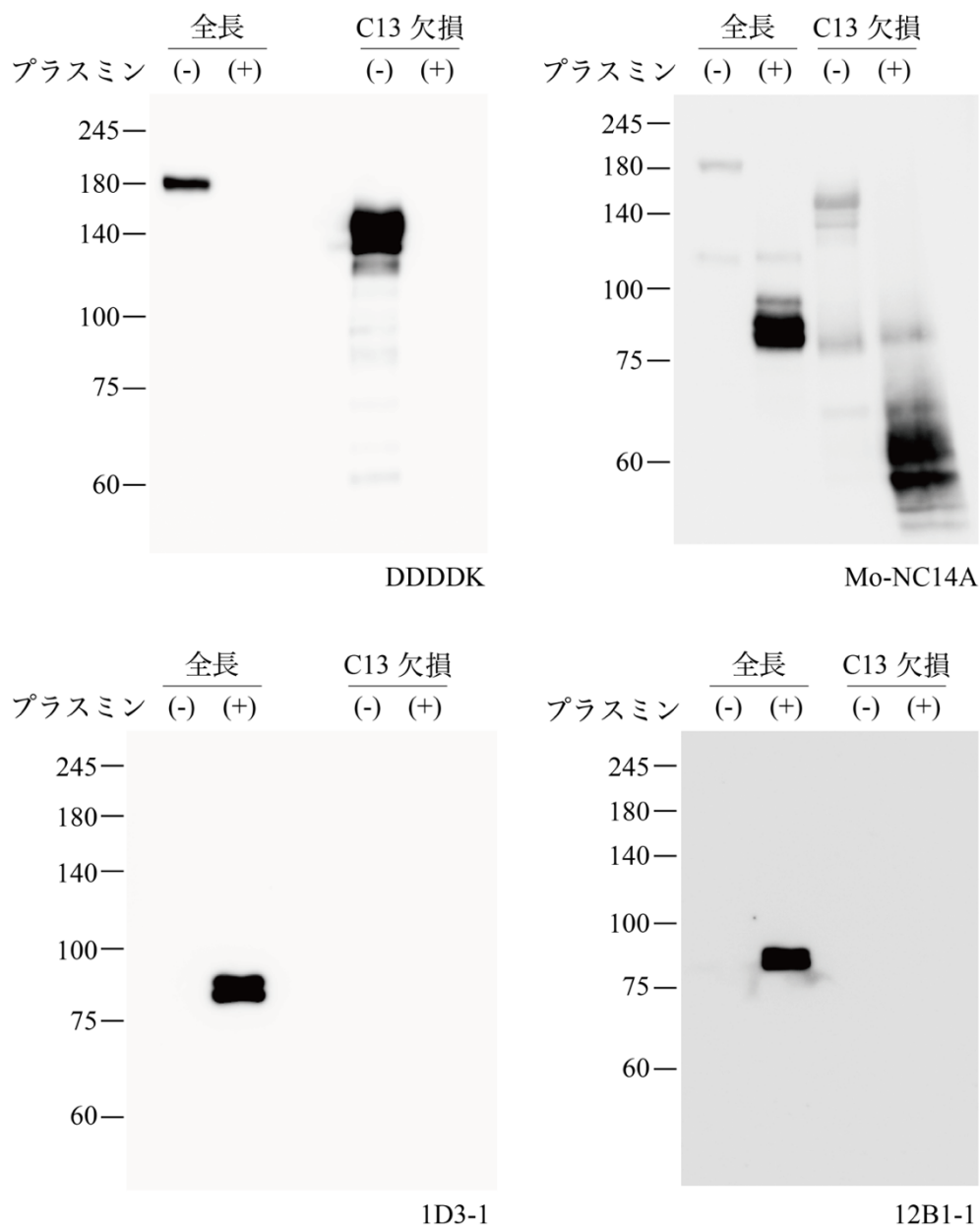


図 31. C13 欠損 mBP180 を用いたウェスタンブロッティング

左上図は抗 DDDDK 抗体, 右上図は抗 BP180 NC14A 抗体 (Mo-NC14A), 左下図は 1D3-1 自己抗体, 右下図は 12B1-1 自己抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった. 抗 BP180 NC14A 抗体のウェスタンブロッティングでは, 全長及び C13 欠損の mBP180 のプラスミン (+) に細胞外切断片のバンドを認めた. 一方, 1D3-1 自己抗体, 12B1-2 自己抗体のウェスタンブロッティングでは, 全長 mBP180 のプラスミン (+) は細胞外切断片のバンドがあるが, C13 欠損 mBP180 のプラスミン (+) の細胞外切断片のバンドはなかった.

5. 抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体は germline 抗体である

Rapid Monoclonal Antibody Isotyping kit (Antigen) を用いて作成した抗 mBP180 自己抗体のサブクラスを解析したところ, mBP180 細胞内領域を標的とするモノクローナル自己抗体のサブクラスは, IgG2 サブクラスである IgG2b, IgG2c であることがわかった (表 9). 一方, mBP180 細胞外切断片を標的とするモノクローナル自己抗体のサブクラスは IgM であった (表 9). また, IgM 抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体を産生する 1D3-1 ハイブリドーマ細胞株の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖をコードする cDNA の塩基配列をシークエンスしたところ, 1D3-1 ハイブリドーマ細胞の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の配列には germline のレファレンス配列と比較して変異が見られなかった (図 32). これらのデータから, 1D3-1 は体細胞突然変異を伴わない germline 抗体であることが明らかになった.

表 9. 作成したモノクローナル自己抗体のまとめ

自己抗体	抗原結合部位	免疫グロブリンサブクラス
1H2-2	細胞内ドメイン	IgG2b
10C1-1	細胞内ドメイン	IgG2c
1F3-1	細胞内ドメイン	IgG2c
9F-2	細胞内ドメイン	IgG2c
1D3-1	細胞外切断片	IgM
12B1-2	細胞外切断片	IgM

<重鎖>

Amino acids		<-----F R I - I M G T----->																																		
1D3-1	1	C	A	G	G	T	C	C	A	A	C	T	G	C	A	G	C	C	T	G	G	G	G	C	T	G	A	A	G	C	C	T	G	G	G	45
IGHV1-64*01	1	C	A	G	G	T	C	C	A	A	C	T	G	C	A	G	C	C	T	G	G	G	G	C	T	G	A	A	G	C	C	T	G	G	G	45
		<-----C D R 1 - I M G T----->																																		
		S	A	K	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	G	G	C	T	A	C	T	T	T	C	A	C	C				90	
		S	G	T	T	C	A	G	T	G	A	A	G	T	T	G	T	C	C	T	G	C	A	A	G	G	C	T	T	C	A	C	C		90	
		<-----F R 2 - I M G T----->																																		
Amino acids		S	Y	W	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	A	G	C	C	T	G	G	A	C	A	G	G	C	T	T				135	
1D3-1	91	S	Y	W	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	A	G	C	C	T	G	G	A	C	A	G	G	C	T	T			135		
IGHV1-64*01	91	S	Y	W	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	A	G	C	C	T	G	G	A	C	A	G	G	C	T	T			135		
		<-----C D R 2 - I M G T----->																																		
		E	W	I	G	M	I	H	P	N	S	G	S	T	A	N	Y	T	A	N	Y	T	A	C	T	T	T	C	A	C	C				180	
		E	G	A	G	T	G	A	M	I	T	C	A	T	C	C	T	A	N	S	A	G	T	G	G	T	A	G	T	A	C	T	A	C	180	
		<-----F R 3 - I M G T----->																																		
Amino acids		N	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	T	C	C	T	G	G	A	C	A	G	G	C	T	T				225		
1D3-1	181	A	A	T	A	G	A	A	G	T	F	C	A	A	G	A	G	C	A	C	T	G	A	C	T	G	T	A	G	A	A	G	T	C	225	
IGHV1-64*01	181	A	A	T	A	G	A	A	G	T	F	C	A	A	G	A	G	C	A	C	T	G	A	C	T	G	T	A	G	A	A	G	T	C	225	
		<-----C D R 3 - I M G T----->																																		
		T	C	C	A	S	C	A	C	A	T	M	G	A	C	A	C	T	C	A	G	C	A	G	C	L	T	G	A	C	A	T	S	E	D	270
		T	C	C	A	S	C	A	C	A	T	M	G	A	C	A	C	T	C	A	G	C	A	G	C	L	T	G	A	C	A	T	S	E	D	270
		<-----F R 4 - I M G T----->																																		
Amino acids		T	C	T	G	C	G	T	C	T	A	T	T	G	A	C	A	G	A	G	T	T	T	G	A	C	T	T	T	G	D	Y	T	W	315	
1D3-1	271	T	C	T	G	C	G	T	C	T	A	T	T	G	A	C	A	G	A	G	T	T	T	G	A	C	T	T	T	G	D	Y	T	W	315	
IGHV1-64*01	271	T	C	T	G	C	G	T	C	T	A	T	T	G	A	C	A	G	A	G	T	T	T	G	A	C	T	T	T	G	D	Y	T	W	315	
IGHD4-1*01	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10		
IGHJ2*01	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17		
		<-----F R 4 - I M G T----->																																		
Amino acids		G	Q	G	A	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	A	G	T	C	C	A	T	C	A											402	
1D3-1	316	G	Q	G	A	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	A	G	T	C	C	A	T	C	A										402		
IGHJ2*01	18	G	Q	G	A	C	C	A	C	T	C	T	C	A	C	A	G	T	C	C	A	T	C	A										47		

<軽鎖>

		<-----F R I - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	1	C	A	A	T	T	G	T	T	C	T	C	A	C	C	A	G	C	A	T	C	A	T	G	T	C	T	G	C	A	T	C	C	A	45	
IGKV4-57*01	1	1	C	A	A	T	T	G	T	T	C	T	C	A	C	C	A	G	C	A	T	C	A	T	G	T	C	T	G	C	A	T	C	C	A	45	
		<-----C D R 1 - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	91	G	E	K	V	T	I	T	C	S	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	90		
IGKV4-57*01	91	91	G	E	K	V	T	I	T	C	S	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	90		
		<-----F R 2 - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	91	Y	M	H	W	F	Q	Q	K	C	A	G	C	T	S	P	K	L	A	G	C	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	135	
IGKV4-57*01	91	91	Y	M	H	W	F	Q	Q	K	C	A	G	C	T	S	P	K	L	A	G	C	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	135	
		<-----C D R 2 - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	181	W	I	Y	A	G	C	A	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	C	G	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	180	
IGKV4-57*01	181	181	W	I	Y	A	G	C	A	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	C	G	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	180	
		<-----F R 3 - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	181	F	S	G	S	G	S	G	T	S	G	T	S	L	T	I	S	A	G	C	T	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	225	
IGKV4-57*01	181	181	F	S	G	S	G	S	G	T	S	G	T	S	L	T	I	S	A	G	C	T	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	225	
		<-----C D R 3 - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	271	R	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	R	A	G	G	T	G	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	315	
IGKV4-57*01	271	271	R	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	R	A	G	G	T	G	C	T	G	G	A	C	C	T	G	G	A	C	C	315	
IGKJ2*01	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35		
		<-----F R 4 - I M G T----->																																			
Amino acids	1D3-1	316	A	A	A	318																															
IGKJ2*01	36	36	A	A	A	38																															

図 32. 1D3-1 自己抗体を産生するハイブリドーマ細胞の免疫グロブリン遺伝子 1D3-1 の重鎖 V, D, J 遺伝子はそれぞれ IGHV1-64*01, IGHD4-1*01, IGHJ2*01 レファレンス配列とマッチした. 1D3-1 の軽鎖 V, J 遺伝子はそれぞれ IGKV4-57*01, IGKJ2*01 レファレンス配列とマッチした. 赤点はレファレンス遺伝子と一致する塩基であることを表し, 横線はレファレンス配列とのギャップを表す.

考察

本研究では、全長 mBP180 を免疫したマウスから抗 mBP180 細胞内領域自己抗体と抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体を樹立した。抗 mBP180 細胞内領域自己抗体のサブクラスは IgG2 であり、抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体のサブクラスは IgM であった。IgM 抗 mBP180 細胞外切断部自己抗体は、mBP180 の細胞外切断断片を認識するが、全長 mBP180 は認識しなかった。表皮基底細胞は生理的に BP180 を切断しており (Franzke et al.2003; Franzke et al.2002; Jacków et al.2016b; Jacków et al.2016a; Marinkovich et al.1996), 切断された BP180 細胞外領域が継続的に供給されることで、免疫寛容が高まる可能性がある。一方、BP180 細胞内領域の露出は生体内では異常な状況であると考えられ、免疫寛容の破綻につながる可能性がある。その結果、BP180 細胞外切断片を標的とする自己抗体は IgM のままで、BP180 細胞内領域に反応する自己抗体は IgM から IgG にクラススイッチしている可能性がある。

抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体は mBP180 の細胞外切断片に生じるネオエピトープを認識した。エピトープは線状エピトープと構造依存性エピトープに区別される (Huang and Honda, 2006)。線状エピトープは連続したアミノ酸配列で構成されるが、構造依存性エピトープはいくつかの不連続なアミノ酸配列が抗原の本来の構造で折り畳まれることにより構成される (Barlow et al., 1986; Huang and Honda, 2006)。いくつかのコラーゲンタンパクは構造依存性エピトープを持つことが知られており、我々は hBP180 の切断により、hBP180 の 15 番目のコラーゲン領域上に立体構造依存的なネオエピトープが生じることを明らかにした (Toyonaga et al.2017)。また、臨床的にはこの構造依存性ネオエピトープが LABD の自己抗原になり得る (Toyonaga et al.2017)。本研究では、hBP180 の 15 番目のコラーゲン領域に対応する mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域を欠損させた C13 欠損 mBP180 の細胞外切断片に対して、今回樹立した抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体が反応しなかった。この結果は、今回樹立した抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体のエピトープが mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域にあることを意味する。また、抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体が全長 mBP180 には反応せず、細胞外切断片のみに反応することから、抗 mBP180 細胞外切断片自己抗体のエピトープは構造依存性エピトープであることが示唆される。つまり、mBP180 は hBP180 と同様の構造依存性エピトープが 13 番目のコラーゲンにあることが明らかとなった。

興味深いことに、抗 mBP180 細胞外切断片 IgM 自己抗体の 1 つのクローンである 1D3-1 は、体細胞突然変異を伴わない germline 抗体であった。このような germline 抗体は「自然抗体」と呼ばれている。自然抗体は抗原曝露経験のない生体に見られ、germline にコードされた免疫グロブリンと定義される (Holodick et al. 2017; Reyneveld et al. 2020)。自然抗体は多糖類のような繰り返し構造を認識し (Li et al., 1983; Toropainen et al., 2005)、感染症に対する免疫防御において極めて重要な役割を果たしている (Holodick et al. 2017; Reyneveld et al. 2020)。また、自然抗体の一部に自然自己抗体が存在することが明らかになった (Coutinho et al., 1995)。自然自己抗体は細胞内に発現する自己抗原及び細胞膜上に発現する自己抗原と反応することが知られている (Coutinho et al., 1995)。自然自己抗体は、アポトーシスを起こした細胞が露出するネオエピトープに結合して、貪食などを介した死滅細胞のクリアランスを促進し、免疫シグナル伝達経路を抑制する (Grönwall et al., 2012)。今回発見された抗 BP180 自己抗体の機能や病原性についてはまだ不明であるが、mBP180 細胞外切断片を標的とした自然自己抗体が少なくともマウスには存在し得ること、そして今回発見した自然自己抗体は LABD 自己抗体と類似したエピトープを共有していることが明らかになった。注目すべき点として、抗 mBP180 細胞外切断片自然自己抗体は繰り返し配列であるコイルドコイル構造を有するコラーゲン領域を認識しており、コイルドコイル構造は様々な微生物に対する生体防御のための抗体を誘発することが知られている (Gustchina et al., 2013; Jiang et al., 2016; Tripet et al., 2006)。IgM 自己抗体のみの類天疱瘡患者も報告されており (Boch et al. 2021; Omland and Gniadecki 2015; Suchniak et al. 2002; Tazudeen et al. 2015)、IgM 類天疱瘡患者の IgM 自己抗体は hBP180 細胞外切断片を標的とする (Boch et al. 2021)。IgM BP180 自己抗体の病原性についてはまだ明らかではないが、今回の抗 mBP180 細胞外切断片 IgM 自然自己抗体の発見は、BP180 に対する自己抗体産生のメカニズムを解明する一端になると考える。

結論

第一章の研究からは以下の新知見を得られた.

1. DPP4i-BP の主要な自己抗体は hBP180 細胞外切断片である LABD97 に対して強く反応した.
2. DPP4i-BP は炎症の乏しい臨床像を呈するが, 自己抗体の主要なサブクラスは IgG1 であった.

このような DPP4i-BP 自己抗体の特徴を明らかにしたことは, 通常の BP と異なる臨床像を呈する DPP4i-BP の病態の理解へと繋がる.

また, hBP180 細胞外切断片に対する自己抗体は, LABD などのその他の自己免疫性水疱症でも見られる (Nie et al., 2000; Toyonaga et al., 2017). しかし, なぜこのような BP180 の切断に伴う自己抗体を有するかは明らかになっていない.

そこで我々は, mBP180 をマウスに免疫した際に産生される抗 mBP180 自己抗体を解析する第二章の研究を行なった.

第二章の研究からは以下の新知見を得られた.

1. mBP180 を免疫したマウスは, mBP180 の細胞内領域に対する IgG2 自己抗体と, mBP180 の切断された細胞外領域に対する IgM 自己抗体を産生した.
2. mBP180 細胞外切断片に対する IgM 自己抗体は, mBP180 の 13 番目のコラーゲン領域に存在する切断特異的なネオエピトープを認識した.
3. mBP180 細胞外切断片に対する IgM 自己抗体は自然自己抗体であった.

DPP4i-BP や LABD で見られる抗 BP180 細胞外切断片自己抗体がマウスの自然自己抗体として存在することは, DPP4i-BP や LABD の自己抗体がどのように産生されるかを考える重要な手がかりとなる. 本研究で発見した mBP180 細胞外切断片に対する自然自己抗体が, マウスのみならずヒトでも存在するのかを今後調べる必要がある.

今後の課題として, mBP180 細胞外切断片に対する自然自己抗体の存在意義を明らかにすることが挙げられる. 自然自己抗体は死滅細胞のクリアランスなど, 免疫シグナル伝達経路を抑制することが知られており, mBP180 細胞外切断片に対する自然自己抗体が皮膚における免疫調整機能を持つ可能性などを今後解明する予定である.

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北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 西江渉客員教授, 泉健太郎助教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

- 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.
- Barlow, D.J., Edwards, M.S., and Thornton, J.M. (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322, 747–748.
- 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. *Brit J Dermatol* 175, 296–301.
- Benzaquen, M., Borradori, L., Berbis, P., Cazzaniga, S., Valero, R., Richard, M.-A., and Feldmeyer, L. (2018). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a risk factor for bullous pemphigoid: Retrospective multicenter case-control study from France and Switzerland. *J Am Acad Dermatol* 78, 1090–1096.
- 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.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., and Avrameas, S. (1995). Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7, 812–818.
- Dainichi, T., Nishie, W., Yamagami, Y., Sonobe, H., Ujiie, H., Kaku, Y., and Kabashima, K. (2016). Bullous pemphigoid suggestive of complement-independent blister formation with anti-BP180 IgG4 autoantibodies. *Brit J Dermatol* 175, 187–190.

Dainichi, T., Chow, Z., and Kabashima, K. (2017). IgG4, complement, and the mechanisms of blister formation in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 88, 265–270.

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.

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.

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.

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.

Grönwall, C., Vas, J., and Silverman, G.J. (2012). Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol* 3, 66.

Gustchina, E., Li, M., Ghirlando, R., Schuck, P., Louis, J.M., Pierson, J., Rao, P., Subramaniam, S., Gustchina, A., Clore, G.M., et al. (2013). Complexes of Neutralizing and Non-Neutralizing Affinity Matured Fabs with a Mimetic of the Internal Trimeric Coiled-Coil of HIV-1 gp41. *Plos One* 8, e78187.

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. *Brit J Dermatol* 183, 614–627.

Hashimoto, T., Ishii, N., and Tsuruta, D. (2017). Production of Neoepitopes by Dynamic Structural Changes on BP180/Type XVII Collagen. *J Invest Dermatol* 137, 2462–2464.

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.

Hirose, M., Recke, A., Beckmann, T., Shimizu, A., Ishiko, A., Bieber, K., Westermann, J., Zillikens, D., Schmidt, E., and Ludwig, R.J. (2011). Repetitive Immunization Breaks Tolerance to Type XVII Collagen and Leads to Bullous Pemphigoid in Mice. *J Immunol* 187, 1176–1183.

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.

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. *Brit J Dermatol* 178, 1462–1463.

Huang, J., and Honda, W. (2006). CED: a conformational epitope database. *Bmc Immunol* 7, 7.

Hurskainen, T., Kokkonen, N., Sormunen, R., Jackow, J., Löffek, S., Soininen, R., Franzke, C.-W., Bruckner-Tuderman, L., and Tasanen, K. (2015). Deletion of the Major

Bullous Pemphigoid Epitope Region of Collagen XVII Induces Blistering, Autoimmunization, and Itching in Mice. *J Invest Dermatol* 135, 1303–1310.

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.

Jiang, Z., Gera, L., Mant, C.T., Hirsch, B., Yan, Z., Shortt, J.A., Pollock, D.D., Qian, Z., Holmes, K.V., and Hodges, R.S. (2016). Platform technology to generate broadly cross-reactive antibodies to α -helical epitopes in hemagglutinin proteins from influenza A viruses. *Peptide Sci* 106, 144–159.

Kang, S., Amagai, M., Bruckner, A.L., Enk, A.H., Margolis, D.J., McMichael, A.J., and Orringer, J.S. (2019). *Fitzpatrick's Dermatology* (McGraw-Hill).

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.

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.

Li, X.-Y., Nolte, R., and Vogt, W. (1983). Natural Antibodies against a Polysaccharide (Bo) from Sugar Cane Mediate its Complement-Activating Effect. *Immunobiology* 164, 110–117.

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. *Brit J Dermatol* 179, 790–791.

Mai, Y., Nishie, W., Izumi, K., and Shimizu, H. (2019). Preferential Reactivity of Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid Autoantibodies to the Processed Extracellular Domains of BP180. *Front Immunol* 10, 1224.

Marinkovich, M.P., Taylor, T.B., Keene, D.R., Burgeson, R.E., and Zone, J.J. (1996). LAD-1, the Linear IgA Bullous Dermatitis Autoantigen, Is a Novel 120-kDa Anchoring Filament Protein Synthesized by Epidermal Cells. *J Invest Dermatol* 106, 734–738.

Mihai, S., Chiriac, M.T., Herrero-González, J.E., Goodall, M., Jefferis, R., Savage, C.O.S., Zillikens, D., and Sitaru, C. (2007). IgG4 autoantibodies induce dermal–epidermal separation. *J Cell Mol Med* 11, 1117–1128.

Muramatsu, K., Ujiie, H., Kobayashi, I., Nishie, W., Izumi, K., Ito, T., Yoshimoto, N., Natsuga, K., Iwata, H., and Shimizu, H. (2018). Regulatory T-cell dysfunction induces autoantibodies to bullous pemphigoid antigens in mice and human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 142, 1818–1830.e6.

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.

Nakama, K., Koga, H., Ishii, N., Ohata, C., Hashimoto, T., and Nakama, T. (2018). Clinical and Immunological Profiles of 14 Patients With Bullous Pemphigoid Without IgG Autoantibodies to the BP180 NC16A Domain. *Jama Dermatol* 154, 347.

Nie, Z., Nagata, Y., Joubert, S., Hashimoto, T., Hirako, Y., Owaribe, K., and Kitajima, Y. (2000). IgA Antibodies of Linear IgA Bullous Dermatitis Recognize the 15th Collagenous Domain of BP180. *J Invest Dermatol* 115, 1164–1166.

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., Natsuga, K., Iwata, H., Izumi, K., Ujiie, H., Toyonaga, E., Hata, H., Nakamura, H., and Shimizu, H. (2015). Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *Am J Pathology* 185, 1361–1371.

Olasz, E.B., Roh, J., Yee, C.L., Arita, K., Akiyama, M., Shimizu, H., Vogel, J.C., and Yancey, K.B. (2007). Human Bullous Pemphigoid Antigen 2 Transgenic Skin Elicits Specific IgG in Wild-Type Mice. *J Invest Dermatol* 127, 2807–2817.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682.

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. *Brit J Dermatol* 145, 778–783.

Sitaru, C., Mihai, S., and Zillikens, D. (2007). The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res* 299, 1–8.

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.

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.

Takama, H., Yoshida, M., Izumi, K., Yanagishita, T., Muto, J., Ohshima, Y., Nishie, W., Shimizu, H., Akiyama, M., and Watanabe, D. (2018). Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor-associated Bullous Pemphigoid: Recurrence with Epitope Spreading. *Acta Dermato Venereol* 98, 983–984.

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

Toropainen, M., Saarinen, L., Wedege, E., Bolstad, K., Michaelsen, T.E., Aase, A., and Käyhty, H. (2005). Protection by Natural Human Immunoglobulin M Antibody to Meningococcal Serogroup B Capsular Polysaccharide in the Infant Rat Protection Assay Is Independent of Complement-Mediated Bacterial Lysis. *Infect Immun* 73, 4694–4703.

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.

Tripet, B., Kao, D.J., Jeffers, S.A., Holmes, K.V., and Hodges, R.S. (2006). Template-based coiled-coil antigens elicit neutralizing antibodies to the SARS-coronavirus. *J Struct Biol* 155, 176–194.

Ujiie, H., Shibaki, A., Nishie, W., Sawamura, D., Wang, G., Tateishi, Y., Li, Q., Moriuchi, R., Qiao, H., Nakamura, H., et al. (2010). A Novel Active Mouse Model for Bullous Pemphigoid Targeting Humanized Pathogenic Antigen. *J Immunol* 184, 2166–2174.

Ujiie, H., Shibaki, A., Nishie, W., Shinkuma, S., Moriuchi, R., Qiao, H., and Shimizu, H. (2012). Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4⁺ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clin Immunol* 142, 167–175.

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. (2019). Japanese guidelines for the management of pemphigoid (including epidermolysis bullosa acquisita). *J Dermatology* 46, 1102–1135.

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.

Yamauchi, T., Matsushita, S., Hashimoto, T., and Hirako, Y. (2014). Major cleavage-dependent epitopes for linear IgA bullous dermatosis are formed at the boundary between the non-collagenous 16A and collagenous 15 domains of BP180. *J Dermatol Sci* 76, 25–33.

Zhao, M., Trimbege, M.E., Li, N., Diaz, L.A., Shapiro, S.D., and Liu, Z. (2006). Role of FcRs in Animal Model of Autoimmune Bullous Pemphigoid. *J Immunol* 177, 3398–3405.

Zone, J.J., Taylor, T.B., Kadunce, D.P., and Meyer, L.J. (1990). Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J Clin Invest* 85, 812–820.

Zuo, Y., Evangelista, F., Culton, D., Guilabert, A., Lin, L., Li, N., Diaz, L., and Liu, Z. (2016). IgG4 autoantibodies are inhibitory in the autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Autoimmun* 73, 111–119.