

自己評価報告書

平成23年 4月26日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20689021

研究課題名 (和文) 17 型コラーゲンの分子イメージングによる水疱性類天疱瘡の病態メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Elucidating pathomechanism for bullous pemphigoid by molecular imaging of collagen XVII.

研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20443955

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：生体分子、細胞・組織、タンパク質、酵素、応用動物

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、自己免疫性水疱症の中で最も患者数の多い水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid; BP) の病態メカニズムを解明する事である。その手法として、BP の自己抗原であり表皮基底細胞ヘミデスモゾーム構成分子の1つの XVII 型コラーゲン (COL17) を分子イメージングするという方法を用いた。本研究により、BP 患者自己抗体が COL17 分子へ結合した際の COL17 分子の動態を直接視覚的に捉えることが可能となり、BP 患者自己抗体による COL17 に対する直接的病原性有無の解明のほか、自己抗体により切断された COL17 断片の生理学的機能などを解明することが可能となる。

2. 研究の進捗状況

COL17 の細胞内および細胞外領域を EGFP あるいは Ds-Red により標識したコンストラクトを作製し、HEK293 あるいは COS7 細胞へトランスフェクションを行った。いずれのコンストラクトも細胞内での発現を確認出来たが、COL17 の細胞外に標識タンパクを融合すると膜タンパクとして発現されないことが明らかとなった。そのため、COL17 の細胞内領域の動態解明には、EGFP を標識した EGFP-COL17 を用いることとした。COL17 発現 (-) 患者由来表皮細胞を不死化し、EGFP-COL17 をレトロウイルスにより遺伝子導入したところ、標識タンパクの発現が確認された。現在、BP 患者 IgG 投与による COL17 細胞内領域の動態解明と、EGFP-COL17 発現マウス作成をすすめている。

COL17 の細胞外領域へ蛍光標識した場合、コラーゲンとしての機能が抑制されたため、

COL17 が切断された後に切断部に生じる新しい抗原エпитープを特異的に認識する、“COL17 細胞外領域特異的抗体”作製を試みた。プロテオミクス技術を応用し、COL17 の切断部位を解明した。そして、切断部位特異抗体 (Ab HK139) を作製したところ、HK139 は切断後の COL17 を極めて特異的に認識することが明らかになった。その結果、HK139 抗体を用いることで BP 患者皮膚における COL17 の細胞外領域の動態を解明することが可能となり、切断後に出現する抗原エпитープが BP 発症に関与することを解明した。現在、COL17 細胞外領域特異的抗体 HK139 を更に発展・応用し、COL17 と細胞外マトリクスタンパクであるラミニン 332 や COL4 との相互作用機序解明も進めている。

3. 現在までの達成度

②概ね順調に進展している。

COL17 細胞外領域の蛍光標識がうまくいかなかった点を除き、概ね、当初の計画通りに進展している。COL17 細胞外領域特異的抗体は極めて有用であり、当初想定していなかった研究成果も得られた。

4. 今後の研究の推進方策

EGFP-COL17 コンストラクトを発現する、COL17 発現 (-) 患者由来の不死化表皮細胞を用い、BP の自己抗体による水疱形成機序の解明を進めていく。また、EGFP-COL17 コンストラクトを発現する遺伝子改変マウス作成も継続し、COL17 細胞外領域特異的抗体 HK139 を用い、COL17 と細胞外マトリクスタンパクとの相互作用機序解明を進める。

5. 代表的な研究成果
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Nishie W, Kiritsi D, Nyström A, Hofmann S, Bruckner-Tuderman L.
Dynamic Interactions of Epidermal Collagen XVII with the Extracellular Matrix: Laminin 332 as a Major Binding Partner.
Am J Pathol, in press. 査読有
2. Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke C, Hofmann S, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L.
Ectodomain shedding generates neoepitopes on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid.
J Immunol 185:4938-47, 2010. 査読有
3. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Shibata M, Nishimura M, Hashimoto T, Shimizu H.
Circulating IgA and IgE autoantibodies in antilaminin-332 mucous membrane pemphigoid.
Br J Dermatol 162:513-7, 2010. 査読有
4. Natsuga K, Nishie W, Arita K, Shinkuma S, Nakamura H, Kubota S, Imakado S, Akiyama M, Shimizu H.
Complete paternal isodisomy of chromosome 17 in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia.
J Invest Dermatol 130:2671-4, 2010. 査読有
5. Nishie W, Sawamura D, Natsuga K, Shinkuma S, Goto M, Shibaki A, Ujiie H, Olasz E, Yancey KB, Shimizu H.
A novel humanized neonatal autoimmune blistering skin disease model induced by maternally transferred antibodies.
J Immunol 183: 4088-93, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Nishie W, Bruckner-Tuderman L.
Role of distinctive proteins interacting with collagen XVII in extracellular matrix.
The 35th Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, Wakayama, December 3rd 2010.
2. Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke CW, Hofmann SC, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L.

Novel cleavage sites and specific neoepitopes on shed ectodomain of collagen XVII/BP180: role in autoimmune blistering diseases.
The 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, September 10th 2010.

3. Nishie W, Bruckner-Tuderman L.
Dynamics of shed ectodomain of collagen XVII on extracellular matrix
Annual Meeting of the German and British Societies for Matrix Biology, Frankfurt / Main Germany, March 18th 2010.
4. Nishie W, Has C, Bruckner-Tuderman L.
Transmembrane collagen XVII: ectodomain shedding generates neo-epitopes.
Gordon Research Conference, Collagen, New London, NH, USA, July 20th 2009.