

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 20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） Elucidation of the pathogenesis of bullous pemphigoid by molecular imaging of collagen XVII

研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：20443955

研究成果の概要（和文）：本研究により、水疱性類天疱瘡(BP)患者 IgG 自己抗体が表皮基底細胞膜上に発現している 17 型コラーゲン (COL17) へ結合したのち、ダイナミックに細胞内へ取りこまれることが明らかとなった。COL17 の細胞外領域は細胞膜近傍で切断されるが、BP の自己抗体が、切断された後に生じる新規抗原エпитープに対し反応するものがあることも解明した。更に、COL17 は、細胞外マトリクス中のラミニン 332 や IV 型コラーゲンと相互作用しており、表皮細胞は COL17 を切断しながら遊走することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients directly bind with collagen XVII (COL17) on the cell-surface, resulting in dynamic internalization of the complex into the cells. Furthermore, neoepitopes on the shed ectodomain of COL17 were found to be targeted by certain autoantibodies from BP patients. In addition, this study disclosed that migrating keratinocytes directly shed the COL17 which binds with other extracellular matrix proteins including laminin332 and collagen IV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学

## 1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid; BP) は、自己免疫性水疱症の中で最も患者数の多い疾患であり、表皮真皮間結合に非常に重要な働きを持つヘミデスモゾーム構成分子の1つである 17 型コラーゲン (COL17) に対する自己抗体により発症する。BP における表皮

下水疱形成機序については、これまで主に免疫したラットの抗血清を用いた実験系で行われており、補体の活性化に伴う各種酵素の働きが重要と考えられていた。一方、患者自己抗体と好中球のみを皮膚凍結組織切片上で反応させると表皮下水疱が生じることや、培養ヒト表皮細胞へ BP 患者 IgG を反応させ

ると IL-6, 8 が表皮細胞より誘導される点など、補体を介さない自己抗体自身の病原性を示唆する結果が報告されていた。しかし、COL17 に対する自己抗体自体の病原性については、BP の発症機序解明において本質的な事項であるにも関わらず充分に進んでいなかった。これは患者自己抗体を利用した実験系を構築するには限界があったことに起因していた。つまり、マウスとヒトの COL17 抗原エピトープ部位のアミノ酸配列が大きく異なるため、患者 IgG をマウスへ投与してもヒト IgG はマウス COL17 に結合せず、BP モデルとはなり得なかったためである。そこで研究代表者らは、*Col17* 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、更にこのマウスへヒト COL17 cDNA を導入することで、ヒト COL17 のみ表皮基底膜で発現する COL17 完全ヒト化マウスを作製した。この COL17 ヒト化新生児マウスへ BP 患者 IgG を投与すると、BP に類似した所見が再現可能であり、BP の病態解明と新規治療法開発に非常に有用であった。

研究開始当時、特定の分子の働きを生きのまま生体内で可視化して観察する分子イメージング研究が急速に発展していた。分子イメージングは、生命現象を分子の動きからダイナミックに観察することが可能であるため、疾患の病態生理や新規治療法開発に大きく貢献している。BP においても、自己抗原である COL17 を分子イメージングすることが可能となった場合、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出来、水疱形成における COL17 の切断など、BP の発症機序の解明がすすむと期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、BP の自己抗原である COL17 を分子イメージングし、BP の病態生理を解明することである。COL17 の分子イメージングが可能となった際は、BP 患者自己抗体が COL17 へ結合した際の変化と COL17 の切断を直接視覚的に捉えることが可能となる。従って本研究は、COL17 の細胞外領域切断と BP の発症との関連など、これまで未知の事項についても明らかとなることを目的とするものである。

## 3. 研究の方法

### (1) COL17 分子の蛍光イメージングの確立

COL17 分子の細胞内あるいは細胞外領域を、それぞれ GFP あるいは Ds-Red を標識した際、COL17 が生理機能を維持することが可能か明らかにする。GFP あるいは Ds-Red を COL17 cDNA の N 末端あるいは C 末端に繋げる形で pcDNA 発現ベクターへ遺伝子導入し、HEK293 細胞へトランスフェクションを行い、ライセートおよび培養上清タンパク中に発現した

COL17 タンパクをウェスタンブロットで確認する。

### (2) 蛍光標識 COL17 発現細胞の確立

上記 (1) で COL17 への蛍光標識を最適化したコンストラクトを、COL17 を発現していない表皮基底細胞へ遺伝子導入する。COL17 (-) 細胞として表皮水疱症患者由来細胞あるいは *Col17* 遺伝子ノックアウトマウス表皮基底細胞を用いる。遺伝子導入にはリポフェクションを用いるが、導入効率が悪い場合はレトロウイルスやレンチウイルスベクターの使用も検討する。

### (3) 蛍光標識した BP 患者 IgG のダイナミクス

プロテイン G カラムを用い、BP 患者血清あるいは血漿交換後廃液より IgG を精製する。精製 IgG を CF555 で赤色標識し表皮真皮境界部へ沈着することを確認後、培養表皮基底細胞と反応させる。反応後の標識 IgG の動態は、コンフォーカル蛍光顕微鏡 (オリンパス, Fv10i) でタイムラプス観察する。

### (4) 蛍光標識 BP-IgG と COL17 の分子イメージング

上記 (2) で作成した蛍光標識 COL17 発現表皮基底細胞へ、(3) で作成した標識 BP-IgG を反応させ、*in vitro* で抗原抗体反応を蛍光タイムラプス観察する。

### (5) 蛍光標識 COL17 発現遺伝子改変トランスジェニック (Tg) マウスの作成と応用

上記 (1) で作成した蛍光標識ヒト COL17 cDNA をケラチン 14 プロモーター下に発現するベクターを作成し、マウス受精卵前核へマイクロインジェクションする。得られた Tg マウス皮膚基底膜部に蛍光標識 COL17 タンパクの発現を確認後、ヘテロの *Col17* ノックアウトマウスと交配をすすめ、蛍光標識ヒト COL17 発現マウスを作製する。得られた蛍光標識ヒト COL17 発現マウスへ、上記 (3) で作成した蛍光標識 BP-IgG を投与し、*in vivo* での抗原抗体反応のダイナミクスを観察する。

### (6) COL17 細胞外領域切断の動態解明

切断された COL17 の細胞外領域のみを認識する抗体を作成する。COL17 の切断部位を同定後、切断部の 8~10 アミノ酸配列のペプチドを合成し家兎に免疫後、IgG を精製する。

## 4. 研究成果

### (1) COL17 分子の蛍光イメージングの確立

COL17 cDNA の N 末端あるいは C 末端に EGFP、Ds-Red をそれぞれ結合した結果、細胞内領域である N 末端を標識するとコラーゲンとしての 3 量体形成を阻害することなく、生理機能

を維持することが明らかとなった。一方、C末端に標識した場合、COL17 タンパク自体の発現量が非常に少なくなり蛍光標識には適さないことが判明した。

### (2) 蛍光標識 COL17 発現細胞の確立

上記(1)の結果を踏まえ、COL17 cDNA のN末端にGFPを融合タンパクとして発現するプラスミドを、COL17(-)表皮水疱症患者あるいはCol17遺伝子ノックアウトマウス由来培養表皮基底細胞へ遺伝子導入を行った。通常のリポフェクションでは殆ど遺伝子導入することが出来なかったため、エレクトロポレーション(Amaxa)を試みた。しかし、導入効率は20%程度であり細胞毒性も強かったため、安定発現株のクローニングには至らなかった。そのため、レトロウイルスベクターを用い遺伝子導入し、N末端にGFPが融合したCOL17を安定発現するCOL17(-)表皮水疱症患者由来培養表皮基底細胞株を多数得ることに成功した(図1)。一方、同様にレトロウイルスを用い、同じコンストラクトをCol17遺伝子ノックアウトマウス由来培養表皮基底細胞へ遺伝子導入したが、安定発現株を得ることは出来なかった。うまくいかなかった原因は不明である。

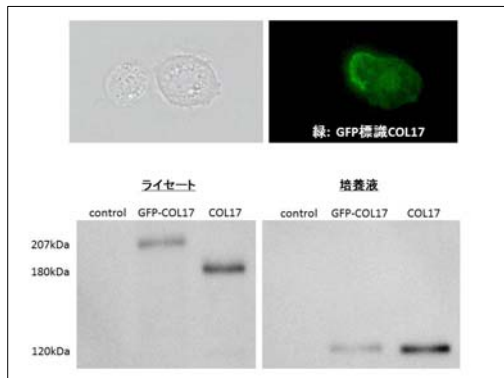


図1 表皮水疱症患者表皮基底細胞へ導入したGFP融合COL17

### (3) 蛍光標識 BP 患者 IgG のダイナミクス

直接赤色蛍光標識したBP患者IgGは、表皮真皮境界部に結合することを確認した。この蛍光標識IgGを培養正常ヒト角化細胞と反応させたところ、反応1時間後から細胞内へ取り込まれ、ダイナミックにinternalizationされることが判明した(図2)。

### (4) 蛍光標識 BP-IgG と COL17 の分子イメージング

上記(2)で作製した、N末端にGFPが融合したCOL17を安定発現するCOL17(-)表皮水疱症患者由来培養表皮基底細胞へ、(3)で作製した赤色標識BP患者IgGを反応させ

たところ、IgGがinternalizationされる際、COL17タンパクと複合体を形成して行われることが明らかになった。

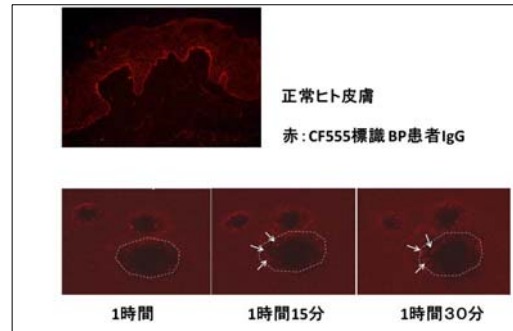


図2 赤色蛍光標識BP-IgGのダイナミクス

### (5) 蛍光標識 COL17 発現遺伝子改変 Tg マウスの作成と応用

上記(1)で作成した蛍光標識ヒトCOL17 cDNAはCMVプロモーターであるが、プロモーターをケラチン14プロモーターに変更する過程で構築作業に時間を要し、現在、発現ベクターをマウス受精卵前核へマイクロインジェクションしたところである。今後、Tgマウスを用い研究を継続、発展させていきたい。

### (6) COL17 細胞外領域切断の動態解明

COL17の細胞外領域を蛍光標識した場合、タンパク発現が低下したため、COL17の細胞外領域切断との関連の解明には異なるアプローチを要した。そのため、COL17が切断された後に切断部に生じる新しい抗原エピト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、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患者皮膚において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ピトープがBP発症に関与することを解明した(Nishie W, et al. J Immunol 2010)。更に、COL17は細胞外マトリクスでラミニン332やCOL4との相互作用し、表皮基底細胞が遊走する際、ダイナミックにCOL17を切断することも明らかにした(Nishie W, et al. Am J Pathol 2011、図3)。

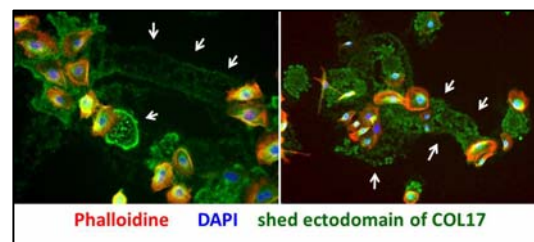


図3 COL17 を切断し遊走する表皮基底細胞

5. 主な発表論文等

(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 19 件)

1. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H: Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and-independent manner. *J Immunol*, in press. (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1003402
2. Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H: Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigoid successfully treated with dapsone. *Eur J Dermatol*, in press. (査読有)  
DOI: 10.1684/ejd.2012.1662
3. Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S, Natsuga K, Ujiie H, Yasui C, Tsuchiya K, Nishie W, Shimizu H: Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters: IgA and IgG autoantibodies target both laminin-332 and type XVII collagen. *Br J Dermatol*, in press. (査読有)  
DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10776.x
4. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, Shimizu H: 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, 2012. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.clim.2011.10.002
5. Ujiie H, Nishie W, Shimizu H: Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 29: 439-446, ix, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.det.2011.03.008
6. Nishie W, Kiritsi D, Nystrom A, Hofmann S C, Bruckner-Tuderman L: Dynamic interactions of epidermal collagen XVII with the extracellular matrix: laminin 332 as a major binding partner. *Am J Pathol* 179: 829-837, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.04.019
7. Kikuchi K, Natsuga K, Shinkuma S, Nishie W, Kajita S, Sato H, Shimizu H: Subepidermal blistering disease with 3 distinct autoantibodies: anti-BP230, anti-laminin gamma-1, and anti-laminin-332. *J Am Acad Dermatol* 65: 878-880, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.jaad.2010.09.719
8. Csorba K, Schmidt S, Florea F, Ishii N, Hashimoto T, Hertl M, Karpati S, Bruckner-Tuderman L, Nishie W, Sitaru C: Development of an ELISA for sensitive and specific detection of IgA autoantibodies against BP180 in pemphigoid diseases. *Orphanet J Rare Dis* 6: 31, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1186/1750-1172-6-31
9. Wang G, Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Kikuchi K, Li Q, Mcmillan J R, Morioka H, Sawamura D, Nakamura H, Shimizu H: Blockade of autoantibody-initiated tissue damage by using recombinant fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. *Am J Pathol* 176: 914-925, 2010. (査読有)  
DOI: 10.2353/ajpath.2010.090744
10. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shimizu H: What's new in bullous pemphigoid. *J Dermatol* 37: 194-204, 2010. (査読有)  
DOI: 10.1111/j.1346-8138.2009.00792.x
11. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Moriuchi R, Qiao H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H: A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *J Immunol* 184: 2166-2174, 2010. (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.0903101
12. Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke C W, Hofmann S C, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L: Ectodomain shedding generates Neopeptides on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid. *J Immunol* 185: 4938-4947, 2010. (査読有)

- 読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1001524
13. 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: 513-517, 2010. (査読有)  
DOI:  
10.1111/j.1365-2133.2009.09508.x
  14. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao H J, Morioka H, Shinkuma S, Natsuga K, Long H A, Nishie W, Shimizu H:  
Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model.  
J Immunol 185: 7746-7755, 2010. (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1000667
  15. Qiao H, Shibaki A, Long H A, Wang G, Li Q, Nishie W, Abe R, Akiyama M, Shimizu H, Memillan J R:  
Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38MAPK-dependent migration and cell signaling.  
J Invest Dermatol 129: 2288-2295, 2009. (査読有)  
DOI: 10.1038/jid.2009.20
  16. Nishie W, Sawamura D, Natsuga K, Shinkuma S, Goto M, Shibaki A, Ujiie H, Olasz E, Yancey K B, Shimizu H:  
A novel humanized neonatal autoimmune blistering skin disease model induced by maternally transferred antibodies.  
J Immunol 183: 4088-4093, 2009. (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.0800389
  17. Inokuma D, Kodama K, Natsuga K, Kasai M, Abe M, Nishie W, Abe R, Hashimoto T, Shimizu H:  
Autoantibodies against type XVII collagen C-terminal domain in a patient with bullous pemphigoid associated with psoriasis vulgaris.  
Br J Dermatol 160: 451-454, 2009. (査読有)  
DOI:  
10.1111/j.1365-2133.2008.08961.x
  18. Goto-Ohguchi Y, Nishie W, Akiyama M, Tateishi Y, Aoyagi S, Tsuji-Abe Y, Sawamura D, Ishii N, Hashimoto T,

- Shimizu H:  
A severe and refractory case of anti-p200 pemphigoid resulting in multiple skin ulcers and scar formation.  
Dermatology 218: 265-271, 2009. (査読有)  
DOI: 10.1159/000182268
19. Shinkuma S, Nishie W, Shibaki A, Sawamura D, Ito K, Tsuji-Abe Y, Natsuga K, Chan P T, Amagai M, Shimizu H:  
Cutaneous pemphigus vulgaris with skin features similar to the classic mucocutaneous type: a case report and review of the literature.  
Clin Exp Dermatol 33: 724-728, 2008. (査読有)  
DOI:  
10.1111/j.1365-2230.2008.02871.x

[学会発表] (計 6 件)

1. 西江 渉、氏家英之、新熊 悟、清水宏：  
Neoepitope on the blocked amino-terminus of the shed ectodomain of collagen XVII/BP180, a major autoantigen for bullous pemphigoid.  
第 19 回分子皮膚科フォーラム ホテル青森 (青森). 2012. 04.
2. Nishie, W, Franzke CW, Jacków J, Hofmann SC, Bruckner-Tuderman L  
Essential role of alpha-helical coiled-coils in the regulation of collagen XVII ectodomain shedding  
The 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Barcelona, Spain, 2011
3. 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, 2010.
4. 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 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 2010  
Nishie, W, Bruckner-Tuderman L:
5. 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 2010
6. Nishie, W, Has C, Bruckner-Tuderman L:  
Transmembrane collagen XVII:  
ectodomain shedding generates  
neo-epitopes  
Gordon Research Conference, Collagen,  
New London, NH, USA, July 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：20443955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし