

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659538

研究課題名（和文） 切断部位特異抗体を応用した水疱性類天疱瘡の新規診断ツール開発

研究課題名（英文） Production of a novel diagnostic tool for bullous pemphigoid using cleavage site-specific antibodies.

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）：本研究の目的は、自己免疫性水疱症である水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid, BP）の病態メカニズムを解明し、早期診断の手がかりとなる新知見を得ることである。BPでは水疱が多数生じるが、BPの水疱内容液が自己抗原であるCOL17タンパクを切断することが知られている。本研究によって、高度に精製されたリコンビナントヒトCOL17タンパクの作製が可能となり、実際にBP患者水疱内容液により、リコンビナントタンパクが細胞膜近傍のNC16A領域で切断されることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering disease. The aim of this study is to clarify the pathogenesis of BP, which may be useful for early and accurate diagnosis. To address this, we aimed at the finding that blister fluid of BP patients can cleave the collagen XVII (COL17) which is an autoantigen for BP. We have established a method to obtain highly purified recombinant COL17, which was actually cleaved by blister fluid from BP patients within the juxtamembranous NC16A domain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：皮膚診断学

1. 研究開始当初の背景

Bullous pemphigoid (BP)は、自己免疫性水疱症患者の中で最も患者数が多く、重症化した場合は死に至ることのある疾患である。BPの自己抗原は、真皮表皮境界部に存在する17型コラーゲン(COL17)であり、患者IgG自己抗体がCOL17に結合することで水疱形成が生じる(Nishie et al. Nat Med 13: 378, 2007)。これまでIgG自己抗体がCOL17へ結合した後の水疱形成メカニズムとして、補体活性化とその後に惹起される炎症細胞浸潤が重要と考えられていたが、近年、補体活性化を介さない発症機序の可能性も報告されていた(Iwata et al. J Invest Dermatol, 129:919, 2009)。従って、BPにお

ける水疱形成メカニズムは、未だ不明な点が多い。膜通過型コラーゲンであるCOL17は、細胞外領域が膜近傍で切断を受けるが、研究者らは、NC16Aドメインで生じる生理的切断部位を明らかにした。そして、切断部を特異的に認識する抗体を作製し、BP患者水疱内容液が生理的切断部位とは異なる部位でCOL17を切断されることを示した(Nishie et al. J Immunol 185, 4938, 2010)。これらの背景から、BPの水疱内容液がCOL17を切断する部位を特定することが可能となった際は、BPの発症メカニズム解明が進むほか、切断部位をターゲットとする抗体を用い、COL17の切断を病変部で特定できる可能性があると予想された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BPの病態メカニズムを解明し、早期診断の手がかりとなる新知見を得ることである。特に、自己抗原であるCOL17がBPの水疱内容液により切断される点に着目した点が特徴である。具体的な目的として、(1) ヒト細胞からリコンビナントヒトCOL17タンパクを作製すること、(2) BP水疱内容液によりリコンビナントCOL17が切断を受けることを示すこと、(3) BP水疱内容液によって切断されたCOL17の切断部位を解明すること、(4) 生理的とは異なる非生理的な切断部位を特異的に認識する抗体を作製し、BPの発症メカニズムを解明すること、の4点が挙げられる。

3. 研究の方法

(1) リコンビナントCOL17タンパクの作製

ヒトCOL17 cDNAを発現ベクターpcDNAへ組み込み、HEK293細胞へ遺伝子導入後、安定発現株をクローニングする。ウエスタンブロットを用いてCOL17タンパクの安定発現を確認後、抗COL17抗体を用い免疫沈降法によりタンパクの精製を行う。精製タンパクは、クマシーブルー染色等で3量体の形成などカラーゲンタンパクとしての機能を確認する。抗COL17抗体による精製がうまくいかない場合、N末端にFLAGタンパクで融合したヒトCOL17 cDNAを同様に導入し、抗FLAG抗体を用いる。

(2) BP水疱内容液によるリコンビナントCOL17タンパクの切断

精製したリコンビナントCOL17タンパクとBP患者水疱内容液を反応させ、NC16A領域で切断されたか確認する。NC16A領域で切断を受けた場合、180kDaの全長タンパクと120kDaの細胞外領域タンパクの2本のバンドが得られる予定である。

(3) 切断部位の同定

BP患者水疱内容液と反応後に生じた120kDaの細胞外領域をクマシー染色後に切り出しし、マスマスペクトロメトリーを用い切断部のアミノ酸配列を同定する。

(4) 非生理的切断部位特異抗体の作製

非生理的切断部位より8~10アミノ酸のペプチドを合成し野兎へ免疫する。免疫後、プロテインGビーズあるいは抗原ペプチド結合ビーズを用い抗体精製を行う。

4. 研究成果

(1) リコンビナントCOL17タンパクの作製

COL17のNC16A領域を特異的に認識するモノクローナル抗体(Ujiie H, et al. 未発表データ)を用い免疫沈降を行ったところ、

極めて高い精製度でCOL17タンパクが得られた(図1)。

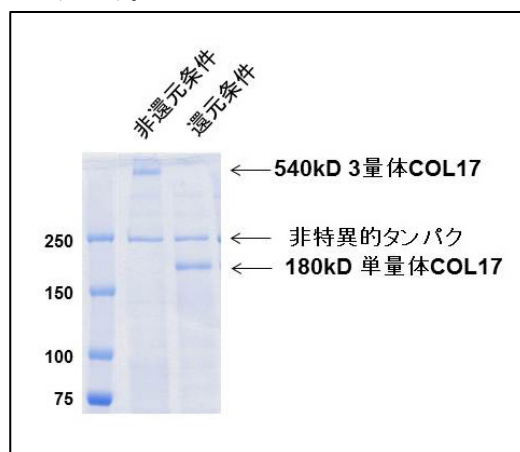


図1 抗NC16A抗体により精製されたCOL17 (クマシーブルー染色)

しかし、抗NC16A抗体とCOL17タンパクとの結合が非常に強く、低酸、高アルカリ、リチウム、抗原ペプチド等による溶出を試みたが、いずれの溶出に対し抵抗性であった。そのため、FLAGタグを有するCOL17タンパク精製に着手し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降を行い、各種条件検討した結果、極めて純度が高いヒトCOL17タンパクの精製に成功した。精製ヒトCOL17タンパクは、非還元状態では3本鎖を呈するため540kDa (180kDa x 3本)を呈し、還元状態では180kDaに同定出来た(図2)。

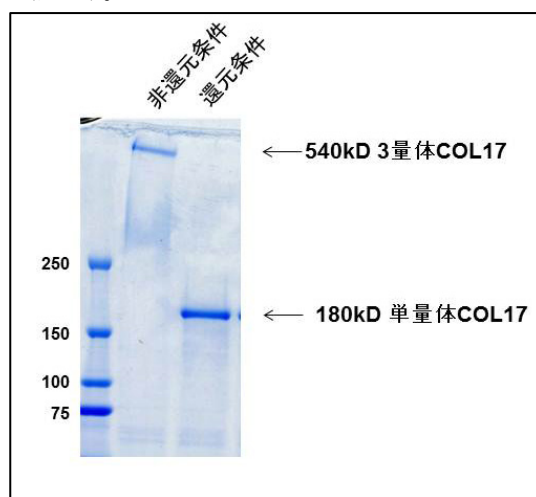


図2 抗FLAG抗体により精製されたCOL17 (クマシーブルー染色)

(2) BP水疱内容液によるリコンビナントCOL17タンパクの切断

上記(1)で精製したヒトCOL17タンパクを4例のBP水疱内容液と反応させ、COL17 NC16Aに対するモノクローナル抗体(NC16A-3)を用いたウエスタンブロットを

施行した。その結果、いずれにおいても120kDaのバンドを検出し、NC16Aで切断を受けることが確認できた。

(3)、(4) 切断部位の同定と非生理的切断部位特異抗体の作製

上記の様に、BP水疱内容液はリコンビナントヒトCOL17タンパクのNC16A領域で切断可能であるが、マスペクトロメトリーを用いた切断部位の同定には、クマシーブルー染色でターゲットとなるタンパクを切り出しする必要がある。BP水疱内容液中には予想以上に多くのタンパクが含まれており、切断を受け生じる120kDaのCOL17細胞外領域タンパク付近にも多くの交雑タンパクを認めた。そのため、マスペクトロメトリーによる解析は困難であり、非生理的切断部位の特定には至らなかった。従って、非生理的切断部位特異抗体の作製には至らなかった。

本研究により、BP水疱内容液により生じたCOL17の切断部位特定には至らなかったが、効率よくBPの自己抗体であるヒトCOL17タンパク精製が可能となった点が大きな進歩である。これまで研究者らは、COL17が3量体を形成した際、単量体との分子量の違いを応用しSDS-PAGEから直接タンパクを精製する手法や、イオン交換法等によるCOL17の精製を試みていたが、いずれも煩雑で時間を要するものであった(Nishie W, et al. J Immunol 2010)。COL17は膜通過コラーゲンであるため精製が極めて困難であり、これまで精製度の高く3量体を維持したリコンビナントタンパクに成功した報告は無い。従って本研究は、大きな進展を遂げたといえる。今後、本研究で作製したヒトリコンビナントCOL17タンパクが、BPの発症メカニズム解明等に、大いに応用されるものと期待される。

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8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 pemphigus 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

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 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

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