

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659547

研究課題名(和文) 180kDa 類天疱瘡抗原の切断と自己抗原性獲得機構

研究課題名(英文) The relationship between the ectodomain shedding of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen and its autoantigenicity

研究代表者

平子 善章 (Hirako, Yoshiaki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50377909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：180-kDa 類天疱瘡抗原(BP180)は細胞・基質間の接着装置ヘミデスモソームの膜貫通型タンパク質である。BP180は複数の自己免疫性表皮水疱症の抗原分子としても知られている。本研究では、プロテアーゼによるBP180の細胞外部分の切断とBP180の自己抗原性の獲得の関わりについて、自己免疫性皮膚疾患の一種である線状IgA水疱症(LAD)の患者血清を主に用いて解析をおこなった。その結果、切断によってBP180の細胞外部分の特定の領域に構造変化が生じて新規のエピトープが形成され、LAD自己抗体の主要な標的部位となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The 180-kDa bullous pemphigoid antigen (BP180) is a hemidesmosomal transmembrane protein. The ectodomain of BP180 is shed from keratinocyte cell surface by a proteolytic cleavage within the membrane-proximal non-collagenous 16th A (NC16A) domain. The autoantigen for the major type of linear IgA bullous dermatosis (LAD, lamina lucida type) is the shed ectodomain of BP180. However, why most LAD sera react with the shed ectodomain, but not with the intact BP180, is unknown. The aim of this study was to characterize the unique cleavage-dependent epitope(s) in the shed ectodomain. Four of the six LAD sera reacted mainly to the boundary region between the NC16A and the collagenous 15th (C15) domains. The results of this study indicate that the major epitopes for LAD sera is formed or exposed by a cleavage-induced conformational change, and are located at the boundary between the NC16A and C15 domains.

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表皮水疱症 類天疱瘡 コラーゲン 自己免疫疾患 プロセッシング ヘミデスモソーム

### 1. 研究開始当初の背景

(1)180-kDa 類天疱瘡抗原 (BP180) / XVII 型コラーゲンは細胞・基質間の接着装置ヘミデスモソームの膜貫通型タンパク質である。BP180 の細胞外部分は膜に近接した non-collagenous 16th A (NC16A) ドメイン中で切断される(図1、矢印)。この切断は ADAMs プロテアーゼファミリーによるものと考えられている。一方、NC16A ドメインは、BP180 を標的とする複数の自己免疫性皮膚疾患の主要な抗原部位としても知られていた。しかし、なぜ NC16A ドメインの自己抗原性が高いのか、その理由は現在も不明である。

(2)BP180 を主要な抗原とする自己免疫性皮膚疾患に lamina lucida 型の線状 IgA 水疱症 (LAD)がある。興味深い事に、LAD 患者血清は、切断によって生じた BP180 の細胞外断片とは反応するが全長分子とは反応しない事が知られている。しかし、LAD 自己抗体が認識する断片特異的なエピトープの性質については、はっきりした事はわかっていなかった。

(3)私たちはウシ角膜から単離したヘミデスモソーム画分をマウスに免疫することで、ヘミデスモソーム構成タンパク質に対する多数のモノクローナル抗体を得た。その中に、BP180 の細胞外部分の断片に特異的に反応するモノクローナル抗体 1337 を見出した。この 1337 抗体の特異な反応性は LAD 患者血清と非常によく似ているものと考えられた。

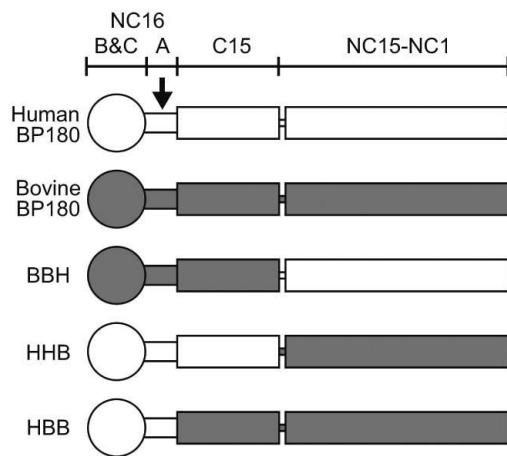


図1 BP180 タンパク質の模式図

### 2. 研究の目的

1337 抗体と LAD 自己抗体は、BP180 の切断された細胞外断片にのみ存在する特異なエピトープを認識していると思われる。断片特異的なエピトープについては、以下の様な3つの可能性が考えられた。切断後に断片上に付加される翻訳後修飾を含むエピトープ。切断によって新たに露出する N 末端アミノ酸残基を含むエピトープ。切断によって何らかの構造変化が引き起こされ、それが新規の

エピトープとなっている。本研究では、以上の作業仮説のもとに、この断片特異的なエピトープの位置と性質の解明を目的としておこなった。

### 3. 研究の方法

(1)1337 抗体と LAD 自己抗体のエピトープの位置を決定するために、様々な BP180 の細胞外部分の断片を融合タンパク質として大腸菌に産生させた。まず、ヒト扁平上皮癌由来の DJM-1 細胞とウシ乳腺由来の BMGE+H 細胞から cDNA を調製した。そこから、ヒト BP180 とウシ BP180 の全長 cDNA を増幅し、pT7Blue ベクターにサブクローニング後、DNA 配列を解析した (GenBank 登録番号: AB900156 (ウシ BP180)、AB900157 (ヒト BP180))。これら全長 cDNA をテンプレートに、特異的プライマーを用いて BP180 の細胞外部分断片をコードする cDNA を増幅し、融合タンパク質の発現用ベクターである pET32 ベクターにサブクローニングした。pET32 ベクターから産生される融合タンパク質には、N 末端に Thioredoxin がタグとして付加される。作製した pET32 コンストラクトで大腸菌口ゼッタ株を形質転換し、IPTG 誘導によって融合タンパク質を産生させた。

(2) 1337 抗体と LAD 自己抗体のエピトープの位置を決定するために、ヒトとウシのキメラ BP180 タンパク質をほ乳類細胞に発現 / 産生させ、培養液中に放出されるキメラ 120-kDa 細胞外断片を用いての解析もおこなった。まず、キメラ BP180 全長コードするコンストラクトを3種類作製した(図1)。キメラ BP180-BBH はウシ NC16 とウシ collagenous 15th (C15) とヒト NC15-NC1 の配列をもつ。キメラ BP180-HHB はヒト NC16 とヒト C15 とウシ NC15-NC1 の配列を、キメラ BP180-HBB はヒト NC16 とウシ C15 とウシ NC15-NC1 の配列をもつ。これらを pEBMulti ベクターにサブクローニングし、HeLa 細胞にトランスフェクトした。ピューロマイシン耐性により安定発現株を選択し、培養液から 120-kDa 細胞外断片を回収した。

(3)全長 BP180 タンパク質を含む細胞抽出液をプラスミンで限定分解した。ウシ全長 BP180 タンパク質はウシ BP180 を安定発現する HeLa 細胞から、ヒト全長 BP180 タンパク質は DJM-1 細胞から調製した。プラスミンによる分解産物を 1337 抗体および LAD 患者血清を用いたイムノプロット法により解析した。

### 4. 研究成果

(1)本研究では、まず、私たちが作製した断片特異的なモノクローナル抗体 (1337) の認識するエピトープの解析をおこなった。1337 抗体は、ウシ BP180 の全長タンパク質からプラスミン限定分解によって生じた

120-kDa および 97-kDa 断片と反応した。このことから、1337 抗体は、切断後に断片上に付加される翻訳後修飾を含むエピトープではなく、切断によって形成または露出が促進されるエピトープを認識していることが明らかとなった。

(2)1337 抗体はウシ BP180 とは反応するが、ヒト BP180 とは反応しない。そこで、ウシ-ヒトのキメラ BP180 に由来する 120-kDa 断片を用いて、1337 抗体との反応性を調べた。その結果、1337 抗体は BBH とは反応するが HBB または HBB に由来する 120-kDa 断片とは反応しない事が明らかとなった。このことから、1337 抗体のエピトープは NC16A ドメインに存在する事が明らかとなった。

(3)さらに 1337 抗体の認識するエピトープ位置を限定するため、大腸菌由来の NC16A ドメインと C15 ドメインからなる様々な融合タンパク質との反応を調べた。その結果、1337 抗体のエピトープは C15 ドメインとの境界部分に近い NC16A ドメインの C 末側 21 アミノ酸残基中に存在する事がわかった。また、予想に反して、N 末端に Thioredoxin タグの存在している融合タンパク質とも 1337 抗体は反応し得た事から、1337 抗体が認識しているエピトープには、切断によって新たに露出する N 末端アミノ酸残基が含まれていない事も明らかとなった。

(4)次に、20 例の LAD 血清から、ヒト BP180 の細胞外断片に対して特異的かつ比較的強く反応する 6 例の LAD 血清を選出した。また、これら選出した LAD 血清とウシ BP180 の細胞外断片との交差性を調べたところ、1 例のみがウシ断片と反応しなかった。

(5)選出した 6 例の LAD 血清はすべて全長ヒト BP180 からプラスミン限定分解によって生じた 97-kDa 断片と反応した。このことから、1337 抗体と同じく、LAD 自己抗体の多くは、切断後に断片上に付加される翻訳後修飾を含むエピトープではなく、切断によって形成または露出が促進されるエピトープを認識していることが明らかとなった。

(6)ウシ断片と交差反応しなかった 1 例の LAD 血清(LAD P14)を用いて、ウシ-ヒトのキメラ BP180 に由来する 120-kDa 断片との反応性を調べた。その結果、LAD P14 は HBB とは強く反応し、HBB とはごく弱く反応した。一方、BBH とは全く反応しなかった。このことから、LAD P14 の認識する主要なエピトープは C15 ドメインを含んでいることと、一部の LAD P14 の自己抗体は NC16A ドメインのアミノ酸配列から形成されるエピトープを認識する事がわかった。

(7)ヒト NC16A ドメインのみを含む融合タン

パク質と、ヒト NC16A ドメインと C15 を含む融合タンパク質、ヒト C15 ドメインのみを含む融合タンパク質を大腸菌に産生させ、LAD 血清との反応性を調べた。その結果、6 例中 4 例が、NC16A ドメインと C15 ドメインの境界部分に存在するエピトープを認識している事が明らかとなった。

本研究の結果から、LAD 自己抗体が認識する主要なエピトープは BP180 の細胞外部分の NC16A ドメインと C15 ドメインの境界部分に存在すること、また、このエピトープは、切断によって生じた構造変化によって形成 / 露出するエピトープであることが明らかとなった (図 2)。このような細胞外断片特異的な変化が LAD 発症の要因の一つであることは間違いないと考えられる。また、この切断依存的なエピトープは NC16A ドメインの C 末端部分から C15 ドメインの N 末端部分までの範囲に存在すると思われる。もしかすると、このような切断依存のエピトープは LAD だけでなく、BP180 の NC16A ドメインを主要な抗原部位とする他の表皮水疱症の病理とも関係している可能性がある。

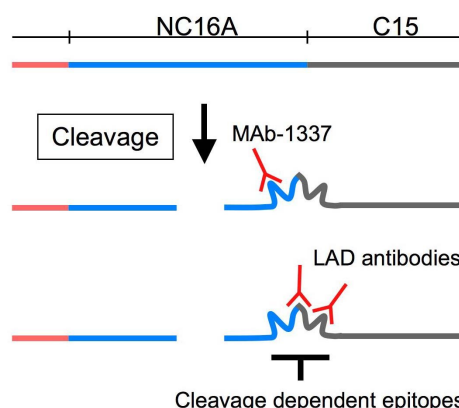


図 2 切断依存性的エピトープと抗体結合

## 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 2 件)

Hirako Y, Yonemoto Y, Yamauchi T, Nishizawa Y, Kawamoto Y, and Owaribe K. Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 査読有 324(2), 172-182, 2014, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.002

Li X, Qian H, Ishii N, Yamaya M, Fukuda H, Mukai H, Hirako Y, and Hashimoto T. A case of concurrent anti-laminin 1 pemphigoid and anti-laminin 332-type mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* 査読有 2014, doi: 10.1111/bjd.13113,

〔学会発表〕(計 5 件)

山内友恵、松下知嗣、橋本隆、平子善章 プロテアーゼ消化により XVII 型コラーゲンの細胞外部分には自己抗原性エピトープが形成される 第 46 回日本結合組織学会学術大会第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2014 年 6 月 6 日、名古屋

平子善章、米元裕貴、尾張部克志 Preparation of the hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma line DJM-1. 第 36 回日本研究皮膚科学会学術大会、2011 年 12 月 10 日、京都

十亀良介、平子善章、橋本隆 (掲載順 2 番目、省略 13 名) Large scale study defined human  $\alpha 4$  integrin as the major autoantigen for pure ocular mucous membrane pemphigoid. 第 36 回日本研究皮膚科学会学術大会、2011 年 12 月 10 日、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平子 善章 (HIRAKO, Yoshiaki)  
名古屋大学・大学院理学研究科・講師  
研究者番号：50377909

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし