

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461661

研究課題名(和文) プラスミンをターゲットとした水疱性類天疱瘡の発症機序解明

研究課題名(英文) Elucidating roles of plasmin in blister formation of bullous pemphigoid

研究代表者

中村 秀樹 (Nakamura, Hideki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助手

研究者番号：60435956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、自己免疫性水疱症のなかで最も患者数の多い水疱性類天疱瘡(Bullous pemphigoid, BP)の水疱形成機序を解明し、診断と新規治療法開発へ応用することである。BPでは多数の水疱を生じるが、患者水疱内容液にはBP患者自己抗体の標的となるCOL17を切断可能なプラスミンが豊富に存在する。本研究では、プラスミンによるCOL17の切断部位を同定し、切断されたCOL17の切断部を特異的に認識する抗体を作製した。その結果、一部のBP患者皮膚では、実際にプラスミンによってCOL17が切断されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering disease. The aim of this study is to address the pathogenic roles of plasmin, a protease present in blister fluids of BP, which is known to cleave COL17. We first identified cleavage sites of COL17 by plasmin, and based on this data, cleavage site-specific antibodies were generated. The antibodies revealed that COL17 is actually cleaved by plasmin in lesional skin of certain numbers of BP patients.

研究分野：皮膚科学

キーワード：水疱性類天疱瘡 プラスミン 17型コラーゲン

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 では、表皮真皮境界部接合を担う表皮基底細胞のヘミデスモゾーム構成成分のひとつである XVII 型コラーゲン (COL17) に対する自己抗体を生じるが、研究代表者らのグループは、自己抗原である COL17 をヒト化した遺伝子改変マウスを作製し、抗ヒト COL17 自己抗体が表皮真皮間接合の脆弱化を誘導可能であることを以前に報告している。(Nishie W, Nakamura H, et al. *Nature Medicine* 2007)。しかし BP に特徴的な臨床所見である“水疱”は動物モデルでも再現しないため水疱の発症機序は未だ十分に解明されていない。

近年、BP 患者の水疱内容液が生理的切断部位と異なる部位で COL17 を切断することが明らかになっている。この切断酵素は未だ不明だが、BP の病変部では“プラスミン”の発現が亢進しており、プラスミン自体が COL17 を切断可能であることから (Hofmann SC, et al. *J Invest Dermatol* 2009)、プラスミンが水疱形成機序の主役である可能性が高い。しかし、プラスミンによる COL17 の切断機構の詳細は、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BP の病態機序を解明し、診断や新規治療法の手掛かりとなる新知見を得ることであり、BP の水疱内容液に豊富に存在するプラスミンが COL17 を切断可能であることに着目した点が特徴である。具体的な目的は、(1) プラスミンによる COL17 の切断部位の同定、(2) プラスミン切断部位を特異的に認識する抗体の作製、(3) 切断部特異抗体を用いた BP 患者皮膚の解析、の 3 項目である。

3. 研究の方法

(1) プラスミンによる COL17 の切断部位の同定

HEK293 細胞を用い作製した全長のヒト COL17 リコンビナントタンパク (Wada M, Nakamura H, et al. *J Invest Dermatol* 2006, 文献 No.4) をプラスミンで切断し、切断された COL17 をマスペクトロメトリー (MS) で解析し切断部位の同定を行う。MS を施行する際、SDS-PAGE から切り出したバンドをトリプシン処理する必要がある。プラスミンとトリプシンによる切断部とを見分けるために、リコンビナント COL17 タンパクの遊離アミノ基を全てアセチル化し、トリプシンによる切断部を区別可能な状態にしておく (Nishie W, et al. *J Immunol* 2010)。

(2) プラスミン切断部位を特異的に認識する抗体の作製

上記 (1) で同定された COL17 の切断部位

から 8~10 アミノ酸のペプチドを合成し、野兎へ免疫する (Nishie W, et al. *J Immunol* 2010)。免疫後、プロテイン G あるいは抗原ペプチドを共有結合したセファロースビーズを用い抗体を精製する。

(3) 特異抗体の評価

上記 (2) で作製した切断部特異抗体が、全長の COL17 ではなくプラスミンで切断された COL17 を特異的に認識することを確認する。ウェスタンブロット法で全長とプラスミン切断した COL17 に対する反応性を確認するのに加え、正常ヒト皮膚を基質に用い蛍光抗体間接法で評価する。正常ヒト皮膚へ反応性が見られなかった場合、事前にスライドガラス上で作製した凍結皮膚切片を異なる濃度でプラスミン処理し、反応性に違いが生じるかについて検討を行う

(4) 特異抗体による BP 患者皮膚の解析

上記 (3) で、特異抗体がプラスミンによって切断された COL17 を特異的に認識することを確認後、BP 患者皮膚を基質に用いた蛍光抗体間接法を施行し、病変部皮膚で実際にプラスミンによって COL17 が切断されているか確認する。

4. 研究成果

(1) プラスミンによる COL17 の切断部位の同定

HEK293 細胞で作製した全長のヒト COL17 リコンビナントタンパクをプラスミンで切断し、SDS-PAGE 後にクマシー染色を行うと 120kDa と 97kDa の細胞外領域ポリペプチドが得られる (Nishimura M, Nakamura H, et al. *Hum Mol Genet* 2016, 文献 No.4)。遊離アミノ基を全てアセチル化したりコンビナント COL17 を同様にプラスミンで切断した結果、120kDa と 97kDa のタンパクを得ることができた (図 1A)。それぞれをゲルから切り出し、トリプシン処理後に LC-MS/MS 後、イオン化したペプチド断片集団の分子量を Mascot 解析した結果、508 番目のセリン (Ser⁵⁰⁸) が主な N 末端で、プラスミンは COL17 の NC16A 領域内で切断することが明らかとなった (図 1B)。

(2) プラスミン切断部位を特異的に認識する抗体の作製

プラスミンによる切断部 (N 末端 Ser⁵⁰⁸) は、COL17 の三量体形成が障害された際、ゴルジで Furin によって分解される際に生じる断端部と同一であった (Nishie W, et al, *J Bio Chem* 2012)。その際に抗体を作製した手法と同様に、切断端から 8 アミノ酸のペプチド (NH₂-SILPYGDS) を合成し、2 匹の野兎へ免疫した (図 1B)。8 週後の血清から免疫したペプチドを共有結合したセファロースビーズを用い、切断部位 (Ab-SILP) を作製した。

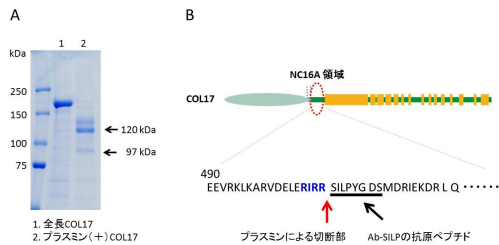


図1(A) プラスミンで切断しMS解析に用いたCOL17 (矢印)(B) プラスミンによる切断部位 (赤矢印) と Ab-SILP の認識部位。

(3) 切断部位特異抗体 Ab-SILP の評価

全長のリコンビナントCOL17タンパクとプラスミンで切断したタンパクを、切断部位特異抗体 Ab-SILP で免疫プロットを施行したところ、作製した抗体は全長COL17へは反応せず、120kDaと97kDaの細胞外領域へ特異的に反応することが確認できた(図2A)。Ab-SILPを0.5μg/ml、1.0μg/ml濃度で正常ヒト皮膚を基質として蛍光抗体間接法を施行しても表皮真皮境界部には反応しなかったが(図2B)正常ヒト皮膚を0.0025、0.005mg/ml濃度のプラスミンで30分間反応後に染色したところ、表皮真皮境界部へ反応した(図2C)。

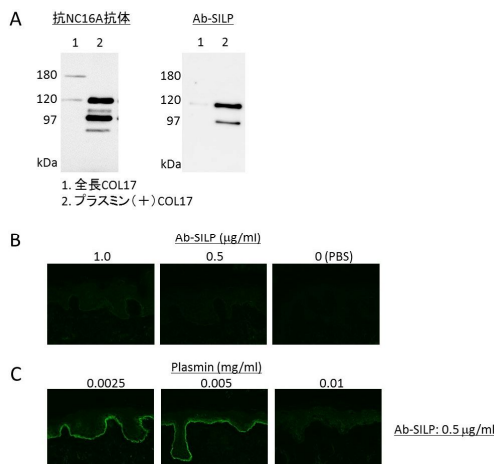


図2 プラスミンによるCOL17の切断

以上の結果から、切断部位特異抗体 Ab-SILP はプラスミンあるいは同様のセリンプロテアーゼで切断を受けたCOL17の細胞外領域を特異的に認識可能であることが明らかとなった。しかし正常ヒト皮膚を0.01mg/ml以上の濃度のプラスミンで処理すると、Ab-SILPの表皮真皮境界部への反応は消失した(図2C)。この結果は、強いプラスミン活性が生じるとSer⁵⁰⁸よりC末端側でもCOL17が切断され、Ab-SILPの反応性が消失するためと予測された。

(4) 特異抗体を用いたBP患者皮膚の解析

上記(3)の結果を踏まえ、15症例の水疱性類天疱瘡患者皮膚をAb-SILPで染色したところ、4名の水疱辺縁の表皮真皮境界部に

顆粒状あるいは一部線状の反応を認めた(図3)

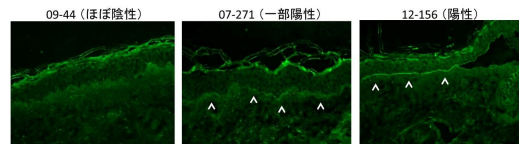


図3 Ab-SILPを用いたBP患者皮膚の蛍光抗体間接法(一部の症例を提示)表皮真皮境界部に陽性所見を認める(矢頭)

本研究により、プラスミンがCOL17のNC16A領域内のSer⁵⁰⁸のアミノ末端で切断することが明らかとなった。同部位は生理的に切断を受ける部位とは異なり、実際に正常ヒト皮膚では、Ser⁵⁰⁸のアミノ末端を標的とするAb-SILPは反応性を認めなかったことから、プラスミンによるCOL17の切断部位は非生理的部位に生じたことを示唆している。Ab-SILPはBP患者皮膚にも反応性を認め、BP病変においてもプラスミンあるいは類似したセリンプロテアーゼで切断を受けていることが明らかとなった。一方、Ab-SILPは15症例中11例のBP患者皮膚へは反応性を認めなかったが、この結果は他の切断酵素の関与のほか、強いプラスミン活性が病変部皮膚で生じたため反応性が消失した可能性が想定された。実際に正常ヒト皮膚をプラスミンで前処理後、Ab-SILPを用い蛍光抗体間接法を施行した結果では、高濃度のプラスミンを使用すると反応性が消失していた。本研究によって、プラスミンあるいは類似のセリンプロテアーゼがBPの水疱形成機序に重要な働きを担っていることが明らかとなった。今後BPに対する新規治療法開発を検討する際、セリンプロテアーゼを標的とする薬剤の有用性が期待される。

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 5件)

1. Wada M, Nishie W, Ujiie H, Izumi K, Iwata H, Natsuga K, Nakamura H, Kitagawa Y, Shimizu H: Epitope-Dependent Pathogenicity of Antibodies Targeting a Major Bullous Pemphigoid Autoantigen Collagen XVII/BP180. *J Invest Dermatol*, 査読有,136(5): 938-46, 2016 doi: 10.1016/j.jid.2015.11.030.
2. Nishimura M, Nishie W, Shirafuji Y, Natsuga K, Nakamura H, Sawamura D, Iwatsuki K, Shimizu H: Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation. *Hum Mol Genet*, 査読有, 15;25(2): 328-39,

2016

doi: 10.1093/hmg/ddv478.

- 3 . Toyonaga E, Nishie W, Komine M, Murata S, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Ohtsuki M, Shimizu H: Skipping exon in COL7A determines the clinical phenotypes of dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 査読有,172(4): 1141-1144, 2015
doi: 10.1111/bjd.13386.
- 4 . Nishie W, Natsuga K, Iwata H, Izumi K, Ujiie H, Toyonaga E, Hata H, Nakamura H, Shimizu H: Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *The Am J Pathol*, 査読有, 185(5): 1361-71, 2015
doi: 10.1016/j.ajpath.2015.01.012.
- 5 . Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Shibaki A, Shimizu H: Bullous Pemphigoid Autoantibodies Directly Induce Blister Formation without Complement Activation. *J Immunol*, 査読有, 193: 4415-4428, 2014
doi: 10.4049/jimmunol.1400095.

[学会発表](計 5件)

- 1 . Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Watanabe M, Kambe M, Hatamochi A, Kimura U, Suga Y, Shimizu H: A single laminin subunit deficiency alters other laminin expression depending on the mutated genes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology:Okayama,Japan,2015/1 2/11-13
- 2 . Nishie W, Natsuga K, Izumi K, Hata N, Nakamura H, Shimizu H: Context-dependent tight regulation of collagen XVII ectodomain shedding in skin. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology,Osaka,Japan,2014/12/12 -14
- 3 . Natsuga K, Nishimura M, Nakamura H, Nishie W, Shimizu H: One amino acid deletion in collagen XVII-binding domain of plectin with a truncation mutation underlies epidermolysis bullosa simplex. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Osaka, Japan, 2014/12/12-14
- 4 . Nishimura M, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Sawamura D, Iwatsuki K, Shimizu H: Essential role of collagen XVII in basement membrane formation and keratinocyt

e migration. The International Investigative Dermatology, Edinburg, UK, 2013/05/8-11

- 5 . Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Shibaki A, Nakamura H, Shimizu H: Bullous pemphigoid autoantibodies induce skin fragility in neonatal mice in a complement independent manner. The International Investigative Dermatology, Edinburg, UK,2013/05/ 8-11

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 秀樹 (NAKAMURA Hideki)
北海道大学・大学院医学研究科・助手
研究者番号：60435956

(2)研究分担者

西江 渉 (NISHIE Wataru)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20443955

夏賀 健 (NATSUGA Ken)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：70645457

清水 宏 (SHIMIZU Hiroshi)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00146672