



Title	線状IgA水疱性皮膚症自己抗体が標的とするXVII型コラーゲンの抗原エпитープ出現機序〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	豊永, 愛恋
Description	配架番号 : 2351
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12937号
Issue Date	2017-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68601
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ellen_Toyonaga_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 豊永 愛恋

学 位 論 文 題 名

線状 IgA 水疱性皮膚症自己抗体が標的とする XVII 型コラーゲンの抗原エピトープ出現機序

(C-terminal processing of collagen XVII induces neoepitopes for linear IgA dermatosis autoantibodies)

【背景と目的】

生理的、病的に関わらず、各種プロテアーゼで切断されたタンパクやポリペプチド上には新たな抗体結合部分が出現することがあり、このような過程で生じた新規抗体結合部分は neoepitopes と呼ばれる。自己免疫性水疱症の一部でも、表皮真皮結合タンパクの切断によって生じた neoepitopes を標的とする自己抗体を認めることが知られているが、neoepitopes の出現機序やこれらを標的とする自己抗体の病原性は殆ど解明されていない。XVII 型コラーゲン (COL17) は、自己免疫性水疱症のなかで最も頻度の高い水疱性類天疱瘡 (BP) 患者 IgG クラス自己抗体の主要な標的抗原である。BP 患者 IgG は、主にプロセッシングをうけていない COL17 を認識するのに対し、類似の自己免疫性水疱症である線状 IgA 水疱性皮膚症 (LAD) の IgA クラスの自己抗体は、COL17 が切断された 120kD の LAD-1 タンパクと 97kDa の LABD97 タンパクを選択的に標的とする。COL17 の生理的切断が LAD における neoepitopes の出現にどのように関与しているか詳細は不明である。

本研究では、LAD-1 と LABD97 を含む COL17 のリコンビナントタンパクを用い、LAD 患者と類似したモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、COL17 の切断に伴う neoepitopes の出現機序の解明を試みた。得られた研究結果を基に LAD 患者自己抗体が特異的に認識する neoepitopes を発現するリコンビナントタンパクを用い、LAD の新規診断ツールの開発も目指した。さらに、LAD 患者と類似した mAb の病原性を、*in vitro* と *in vivo* の実験系で明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

LAD 患者 (n=18)、BP 患者 (n=16) から血清を採取した。ヒト全長 COL17 は Flp-In-293 細胞で作成し、さらにこの全長 COL17 のベクターから polymerase chain reaction (PCR) 法で 4 種類の C 末端から段階的に短くしたリコンビナント COL17 タンパクを作成した。研究を通して mAb hC17-ect15 (ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域)、mAb TS39-3 (ヒト NC16A)、mAb BMM62 (ヒト COL17 細胞外領域)、mAb 1A8c (ヒト COL17 細胞内領域)、mAb NC16-3 (ヒト COL17 の NC16A)、mAb NC16A-4 (ヒト COL17 の NC16A)、Mo-NC14A (マウス NC14A, ポリクローナル) の 7 つの抗体を使用した。これらの COL17 の様々な部位を認識する抗体を用い、ウエスタンブロットや ELISA、免疫蛍光染色で抗体と抗原タンパクの結合性質を評価した。

また、neoepitopes に対する抗体の病原性を評価するために、mAb の培養細胞への投与、

および COL17 ヒト化マウスの耳介皮下へ投与し評価した。

【結果】

LAD 患者の血清を一次抗体として用い、ウエスタンブロットにて COL17 に対する反応性を検討した。18 人中 11 人の LAD 患者血清がヒト COL17 をプラスミンで切断し作製した LAD-1 と LABD97 に強く反応し、全長のヒト COL17 には反応しなかった。LAD-1 と LABD97 を免疫して作成した COL17 に対する mAb hC17-ect15 も同様であった。

また mAb hC17-ect15 を用い、C 末端から様々な長さで発現させた変異 COL17 との反応性をウエスタンブロットで検討したところ、全長の COL17 には明らかな親和性は見られず、C 末端がある程度欠損したタンパクに対して親和性が確認された。mAb hC17-ect15 はヒト COL17 を特異的に認識する点を応用し、マウス COL17 の一部をヒト COL17 の配列に置き換えた、部分的ヒト化マウス COL17 リコンビナントタンパクを用い、ウエスタンブロット法で抗原マッピングを行った。その結果、mAb hC17-ect15 は、ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域を標的とすることを確認した。

次に、LAD 患者の血清を用いて、同様に C 末端から徐々に短くした複数のヒト COL17 のリコンビナントタンパクとの反応性をウエスタンブロットで確認したところ、mAb hC17-ect15 同様、LAD 患者自己抗体も C 末端が切断されたヒト COL17 に反応しやすいことが明らかとなった。また ELISA を用いて LAD 患者自己抗体の全長 COL17 への反応性と C 末端が欠損した COL17 への反応性を比較したところ、C 末端が欠損した COL17 への反応性が有意に高かった。

最後に、mAb hC17-ect15 が実際に LAD と同様に臨床症状を引き起こしうるのか確認する目的で、培養表皮細胞に投与し刺激したが、BP 患者自己抗体で観察されるような COL17 の減少は認めなかった。また、COL17 ヒト化マウスに投与したが、水疱や皮膚の脆弱性など明らかな病原性は認めなかった。

【考察】

今回作成した mAb hC17-ect15 は、LAD 自己抗体によく似た特徴を有している。本抗体を用いて検討したところ、COL17 は NC16A 内の切断だけではなく、C 末端が切断されると 15 番コラーゲン領域に neoepitopes が出現しうることを明らかにした。興味深い点は、neoepitopes が生じた 15 番コラーゲン領域は切断を受ける NC16A や C 末端から遠く離れた部位に存在することである。この結果から、COL17 に部分的な切断が生じた際、ダイナミックな立体構造変化が広範囲に生じ、neoepitopes の出現に至ったことが予想される。本研究結果から、C 末端を欠損したリコンビナント COL17 を用い、LAD 抗体の簡便かつ効率的な同定が可能な新規 ELISA 法の確立に成功した。

一方、今回の研究では、LAD 患者抗体の病原性や、作成した mAb hC17-ect15 の病原性について最終的な結論を出すことはできなかった。mAb hC17-ect15 のアイソタイプを IgA に変更することで病原性を示すことができる可能性があり、今後の研究課題として検討を続けていきたい。

【結論】

LAD 患者の自己抗体が認識する COL17 上の neoepitopes の出現は、NC16A の切断のみではなく、C 末端切断でも生じる。この neoepitopes は切断端から離れた部位に生じるため、COL17 が切断を受けると広範囲にわたり立体構造の変化を生じ得る。その際に生じる neoepitopes が自己抗体の標的となり、LAD の病態の一因となっている可能性が考えられた。