HOKKAIDO UNIVERSITY

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ピトープ出現機序
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12937
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72069
Type	doctoral thesis
File Information	Ellen_Toyonaga.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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）

2017 年 12 月

北海道大学

豊永　愛恋

学位論文

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）

2017 年 12 月

北海道大学

豊永　愛恋

目　　次

発表論文目録及び学会発表目録・・・・・・・・・　1頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　3頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　13頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　14頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　31頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　51頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・　54頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　55頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　56頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Ellen Toyonaga, Wataru Nishie, Kentaro Izumi, Ken Natsuga, Hideyuki Ujiie, Hiroaki Iwata, Jun Yamagami, Yoshiaki Hirako, Daisuke Sawamura, Wataru Fujimoto, Hiroshi Shimizu

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

Journal of Investigative Dermatology, in press （Impact factor: 6.287）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Ellen Toyonaga, Wataru Nishie, Kentaro Izumi, Hideyuki Ujiie, Hiroshi Shimizu

   Loss of C-terminal domain induces neoepitopes on processed collagen XVII.
   Pathogenesis of Pemphigus and Pemphigoid Meeting （PPP 2016）
   Munich, Germany, Sep 6th, 2016

2. Ellen Toyonaga, Wataru Nishie, Kentaro Izumi, Hideyuki Ujiie, Hiroshi Shimizu

   Not only ectodomain shedding but also C-terminal cleavage induces neoepitopes on proteolyzed collagen XVII.
   The 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research （ESDR）
   Munish, Germany, Sep 9th, 2016

3. Ellen Toyonaga, Wataru Nishie, Kentaro Izumi, Hideyuki Ujiie, Hiroshi Shimizu

   C-terminal cleavage of collagen XVII induces neoepitopes which can be

recognized by autoantibodies of linear IgA bullous dermatosis.
The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology （JSID）
Sendai, Japan, Dec 9th, 2016

緒言

自己免疫性水疱症は近年、増加傾向にあり [1]、慢性に経過し全身に水疱・びらんを生じるため、感染症などで重篤な状態となることも稀でない。自己免疫性水疱症の病型は、表皮内水疱を形成する天疱瘡群と表皮下水疱を形成する類天疱瘡群に大別され [2,3]、類天疱瘡群には水疱性類天疱瘡（Bullous pemphigoid, BP）、粘膜類天疱瘡（Mucous membrane pemphigoid, MMP）、後天性表皮水疱症（Epidermolysis bullosa acquisita, EBA）などが含まれる [4]。類天疱瘡群の自己抗体は、皮膚の表皮真皮境界部あるいは粘膜上皮と粘膜固有層間に存在するヘミデスモゾームを含む基底膜部タンパクを標的とし、臨床症状と自己抗原の種類等により病型が決定される。一方、標的となる自己抗原が同一であっても、異なる臨床病態（病型）となることも知られており、例えばヘミデスモゾーム構成成分の一つである XVII 型コラーゲン（Type XVII collagen, COL17）は BP の主要な自己抗原であるが、時に MMP や線状 IgA 水疱性皮膚症（Linear IgA bullous dermatosis, LAD）の主要な自己抗原ともなりうる。同一タンパクが標的となるにもかかわらず、異なる病態を呈する詳細な機序はいまだ解明されていない。これまで異なる病態を呈する機序として、1）同一タンパクが標的となるが疾患により自己抗体の認識部位が異なるため、2）タンパクの修飾に伴う構造変化（抗原性の変化）を認識する性質の異なる自己抗体が出現するため、等の仮説が提唱されている。実際に、BP と MMP では、COL17 に対する主要な抗体結合部位が異なるという報告や [5–7]、線状 IgA 水疱性皮膚症においては、生体内の酵素（プロテアーゼ）により切断され抗原性が変化した COL17 を自己抗体が標的とすると推察されている [8–11]。

プロテアーゼによるタンパクの切断は主要な生理現象の一つであり、生体の機能維持にきわめて重要である。実際に、哺乳類ではプロテアーゼに関する遺伝子は全ゲノムの 2%近くにのぼるとされている [12]。生理的なタンパクの切断に異常が生じると、様々な疾患が生じることも明らかになっており、例えば、神経変性疾患であるアルツハイマー病では、アミロイド前駆体タンパクがαセクレターゼで切断されず、β および γ セクレターゼのみにより切断を受けると β アミロイドが産生される。この異常な β アミロイドが脳に沈着するとアルツハイマー病が発症すると言われている [13]。またムコ脂質症 II 型（I-cell disease, mucolipidosis II）、TNF 受容体関連周期性症候群なども異常なタンパク切断の結果により生じていることが近年の研究で明らかになっている [12,14]。これらの疾患からも、正常なタンパク切断の制御は哺乳類に必要不可欠であることが伺える。一方、タンパクの切断と自己免疫疾患との関連については十分解明されていないが、生理的あるいは病的に関わらず、タンパ

クやポリペプチドには、切断や構造変化に伴い新たな抗体結合部分が出現することが知られており、このようなタンパクの切断により新たに生じた抗原エピトープを neoepitopes（新規抗原エピトープ）と呼ぶ[15]。Neoepitopes は、時に自己免疫疾患における自己抗体の抗原となりうることが知られており、全身性エリテマトーデスでは、補体の C1q に対する抗体がしばしば検出されるが、自己抗体は流血中の C1q には結合せず複合体を作った C1q に反応することから、C1q の構造変化に伴い生じた neoepitope を認識すると予想されている[16]。線状 IgA 水疱性皮膚症では、COL17 の生理的あるいは異常な切断によって生じた neoepitopes に対する自己抗体が病態を引き起こす可能性が示唆されているが、詳細な機序は未だ不明である[8,9,17,18]。

本研究では、プロテアーゼの一つであるプラスミンで切断した COL17 をマウスへ免疫し、線状 IgA 水疱性皮膚症の自己抗体に類似した性質を有するモノクローナル抗体（mAb）の作成を試みた。作成した mAb と、線状 IgA 水疱性皮膚症患者の自己抗体を詳細に解析した結果、mAb と患者抗体はいずれも COL17 の C 末端部の切断により生じた neoepitopes を標的とすることを解明した。さらに、C 末端部を除いたリコンビナント COL17 を用いて、線状 IgA 水疱性皮膚症患者自己抗体を効率的に検出する ELISA 法を確立した。

XVII 型コラーゲン（Type XVII collagen, COL17）

ヒト XVII 型コラーゲン（COL17）は II 型膜貫通タンパクであり、15 個のコラーゲン領域と 16 個の非コラーゲン領域から構成される。同一の 3 つのα鎖がホモ三量体を形成する。COL17 は、1497 個のアミノ酸から構成され、分子量は約 180kDa である。アミノ末端（amino terminus, N 末端）が細胞質内、カルボキシル末端（carboxyl terminus, C 末端）が細胞外に存在する（図 1）。COL17 は、インテグリン α6/β4 と共に細胞膜を貫通し表皮真皮結合の重要な役割を担うヘミデスモソームを構成する（図 2）[19–22]。

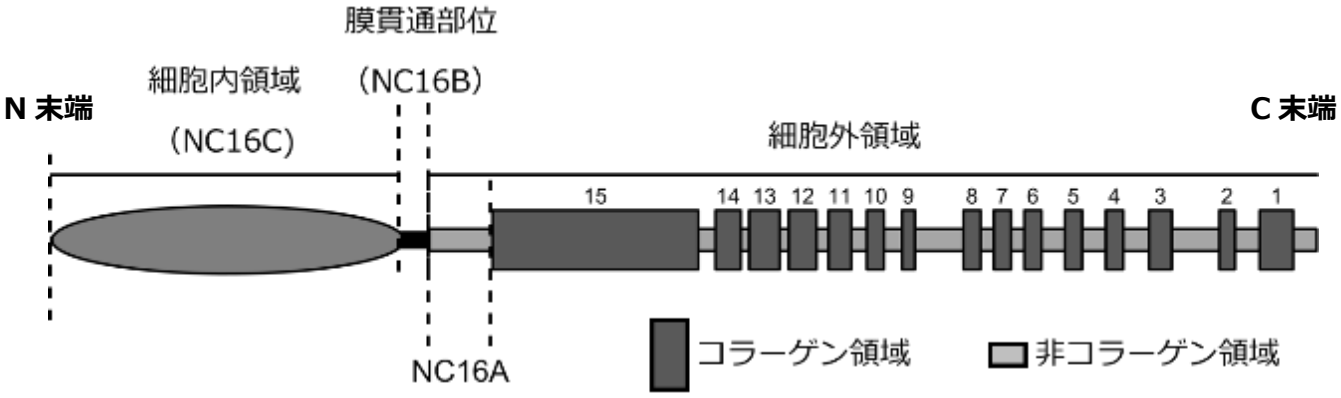

図 1　17 型コラーゲン（COL17）の模式図

COL17 は細胞内領域、膜貫通部位と細胞外領域より構成される。N 末端が細胞内に存在し、C 末端が細胞外に位置する。C 末端から数えて 15 個のコラーゲン領域と、それぞれの間に非コラーゲン領域が 16 個存在する。特に、最後の 16 番目非コラーゲン領域は細胞外領域 NC16A、膜貫通部位 NC16B、細胞内領域 NC16C に分類される。

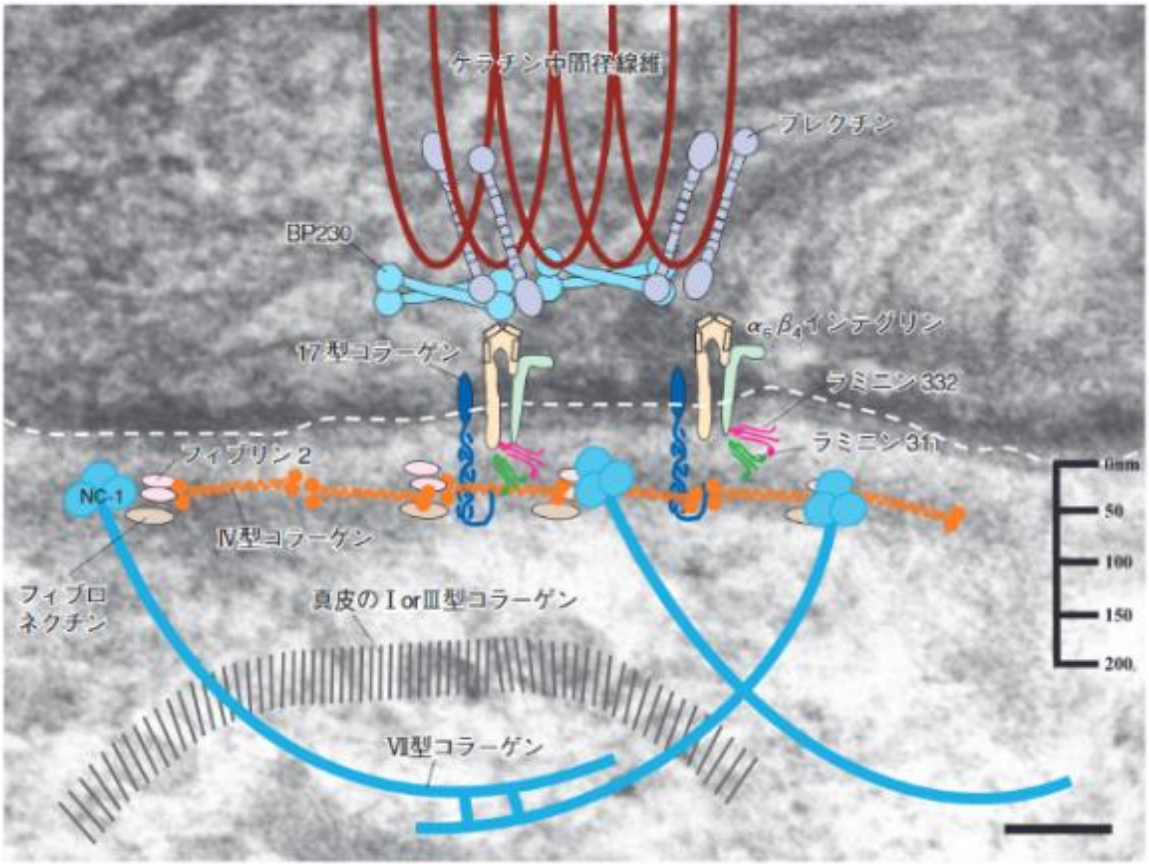

図 2　ヘミデスモソームと周辺の構造

あたらしい皮膚科学第 2 版（中山書店）より引用（表皮真皮境界部の電子顕微鏡写真に模式図を組み合わせた写真)。

表皮真皮境界部には、基底細胞と基底膜を接合するヘミデスモソームが存在する。ヘミデスモソームは細胞膜を貫通する COL17 と α6/β4 インテグリン、細胞内の BP230 など複数のタンパクにより構成される。

COL17 は遺伝性および自己免疫性表皮下水疱症に関わるタンパクであり [23–25]、COL17 をコードする *COL17A1* の遺伝子異常に伴う発現低下や消失により、ヒトでは先天性の接合部型表皮水疱症（junctional epidermolysis bullosa, JEB）の一型を発症する [26]。COL17 に対する自己抗体は、様々な自己免疫性表皮下水疱症で認められ、水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid, BP）、粘膜類天疱瘡（mucous membrane pemphigoid, MMP)、妊娠性類天疱瘡（pemphigoid gestationis)、そして線状 IgA 水疱性皮膚症（linear IgA bullous dermatosis）の発症因子と考えられている [4,19,20,27]。本邦における自己免疫性水疱症の中で最も頻度の高い BP では、COL17 の 16 番目の非コラーゲン（non-collagenous）領域である NC16A（non-collagenous 16A）領域が、主要な標的エピトープであることが報告されている [28–31]。

ヒトの COL17 はコラーゲン領域が 15 か所存在するが、マウスでは 13 か所であり、BP の主要な標的エピトープである COL17 の NC16A は、マウス COL17 の NC14A に相当する。ヒト COL17 NC16A 領域とマウス COL17 NC14A 領域のアミノ酸配列の相同性は 60%程度であるため [32]（図 3)、BP 患者の自己抗体はマウス COL17 を認識することができない。このため BP 患者自己抗体を野生型マウスへ投与しても、抗体はマウス COL17 を認識することが出来ず、水疱形成も生じない。本研究では、この異なる種間に存在する相同性の問題を解決するために、マウスを用いた病原性の評価実験は COL17 をヒト化したマウスを用いた [31]。

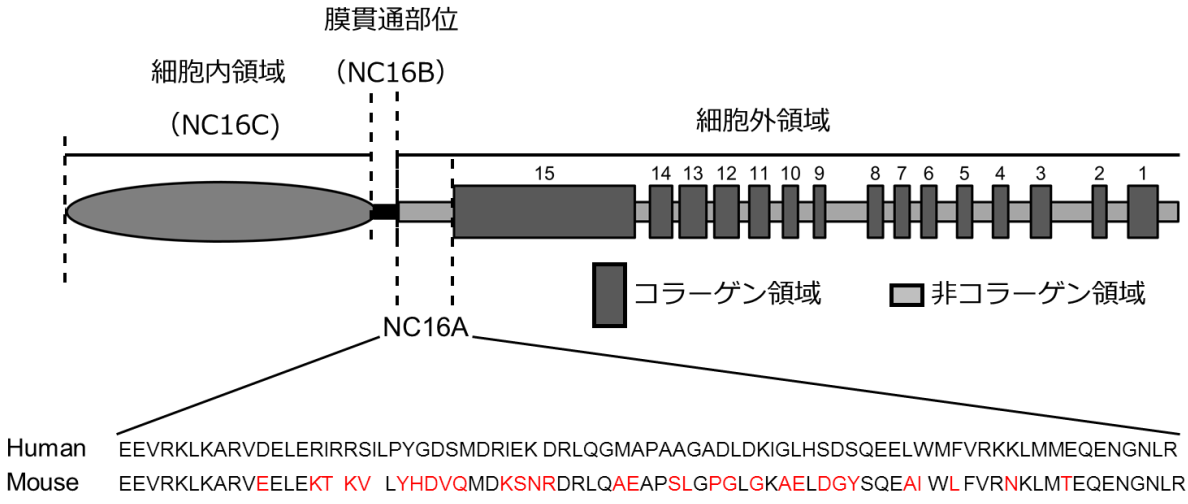

図 3　ヒト COL17 とマウス COL17 の相同性

文献 29 を一部改変　BP の主要抗原部位である NC16A のアミノ酸配列は、ヒトとマウスで約 60%の相同性である。赤字が異なるアミノ酸。

COL17 の切断にともなう neoepitopes 発現の可能性

COL17 には NC16A 領域および NC4 領域の 2 か所に生理的切断領域が存在することが明らかにされている [10,11,33–38]（図 4）。NC16A 領域に存在する切断部位は、セリンプロテアーゼの一つプラスミンや ADAM9/17 によって切断され、120kDa の細胞外断片 LAD-1 が生じる [33–38]（図 4）。このような現象は COL17 の ectodomain shedding（細胞外領域切断）として知られており、表皮基底細胞の遊走に関与していると推測されている [39]。一方、120kDa の細胞外断片 LAD-1 は、さらに C 末端から 23kDa 上流の NC4 領域内で切断を受け、97kDa の LABD97 の切断片が産生される [10,11]（図 4）。NC4 領域の生理的切断部位に遺伝子変異が生じ、生理的な COL17 の切断が阻害される JEB 症例では、基底膜が正常に構築できず、重層化を来す [40]。

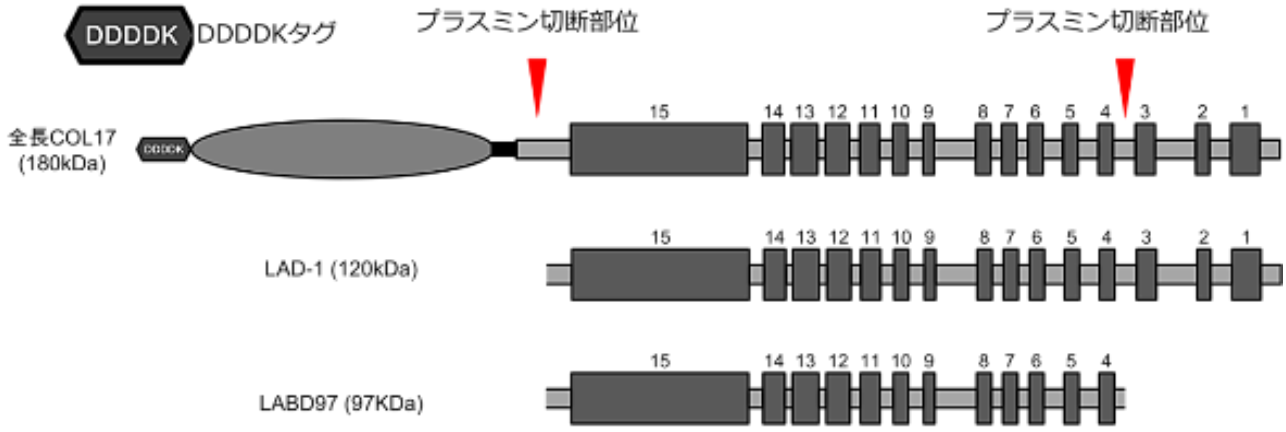

図 4　COL17 の切断により生じる LAD-1 と LABD97 の模式図

COL17 は NC16A 領域で切断を受けて 120kD の断片（LAD-1）となり、さらに NC4 領域付近の C 末端で切断を受けると 97kD の断片（LABD97）となる。本研究に用いたリコンビナントタンパクは、精製や検出の目的に N 末端に DDDDK タグを付着した。

▼　プラスミン切断部位

DDDDK　DDDDK タグ

COL17 の切断と自己免疫性水疱症との関係性は、neoepitopes の出現に着目した研究がなされている。これまで線状 IgA 水疱性皮膚症の自己抗体は、COL17 の切断された LAD-1 や LABD97 に反応する一方、全長の COL17 にはほとんど反応しないことが報告されている [8–11]。この事から、COL17 の切断が neoepitopes の出現と自己免疫性水疱症の発症に関与している可能性が示唆される。

COL17 が NC16A 領域でプラスミンにより切断を受けると、切断領域付近の抗原性が大きく変化し [37]、線状 IgA 水疱性皮膚症の自己抗体の約 20%は、BP 同様に COL17 の NC16A を標的とすることが報告されている [18]。一方、線状 IgA 水疱性皮膚症の自己抗体は NC16A 領域と 15 番コラーゲン領域の境界付近に結合する可能性や [41]、15 番コラーゲン領域が主な抗原部位であるとする報告もある [42]。以上より、COL17 の切断に伴い出現する neoepitopes は、予想よりも広い範囲で生じている可能性が想定される。

線状 IgA 水疱性皮膚症（linear IgA bullous dermatosis）

線状 IgA 水疱性皮膚症（linear IgA bullous dermatosis, LABD、同義語：線状 IgA 皮膚症、linear IgA dermatosis, 以下 LAD と略す）は、IgA クラスの自己抗体が原因となる比較的稀な自己免疫性水疱症である。一般的には幼少期や青年期に発症し [4,9,43]、臨床症状は多彩であるが、BP と同様に紅斑と緊満性水疱を呈したり、環状紅斑の辺縁に小水疱が集簇することが多い（図 5、上)。そう痒を伴うことが多く、口腔内を主体とする粘膜症状も伴う症例も多い。病理組織学的には、表皮真皮境界部に裂隙を形成し、真皮浅層から裂隙内に好中球を主体とした細胞浸潤を伴う（図 5、中)。免疫学的検査では、蛍光抗体直接法にて表皮真皮境界部に IgA 自己抗体が線状に沈着する点が特徴であり（図 5、下)、本疾患名の由来となっている。一方、最も頻度の高い自己免疫性水疱症である BP では、IgG が表皮真皮境界部に線状に沈着する点が異なる。血清中には表皮真皮境界部に対する IgA クラス自己抗体が存在するが、標的となる自己抗原は COL17 だけでなく、IV 型コラーゲン、VII 型コラーゲン、ラミニン 332 といった種々の表皮真皮間結合構成タンパクや細胞外マトリックスが報告されている [17,44]。なかでも、COL17 が最も頻度の高い自己抗原である。LAD の治療は自己抗体の産生抑制や好中球の機能を抑制する目的でダプソンやステロイド内服が行われるが、多くの場合、慢性に経過する。

BP では IgG クラス自己抗体が全長の COL17 を認識するに対し [45]、LAD の IgA クラスの自己抗体は、主に 120kD の LAD-1 や 97kDa の LABD97 など COL17 の切断されたタンパク（図４）を選択性に標的とすることが明らかとなっている [8–11,17,41]。しかし、COL17 の切断が LAD における neoepitopes の出現にどのように関与しているかの詳細は未だ不明である。

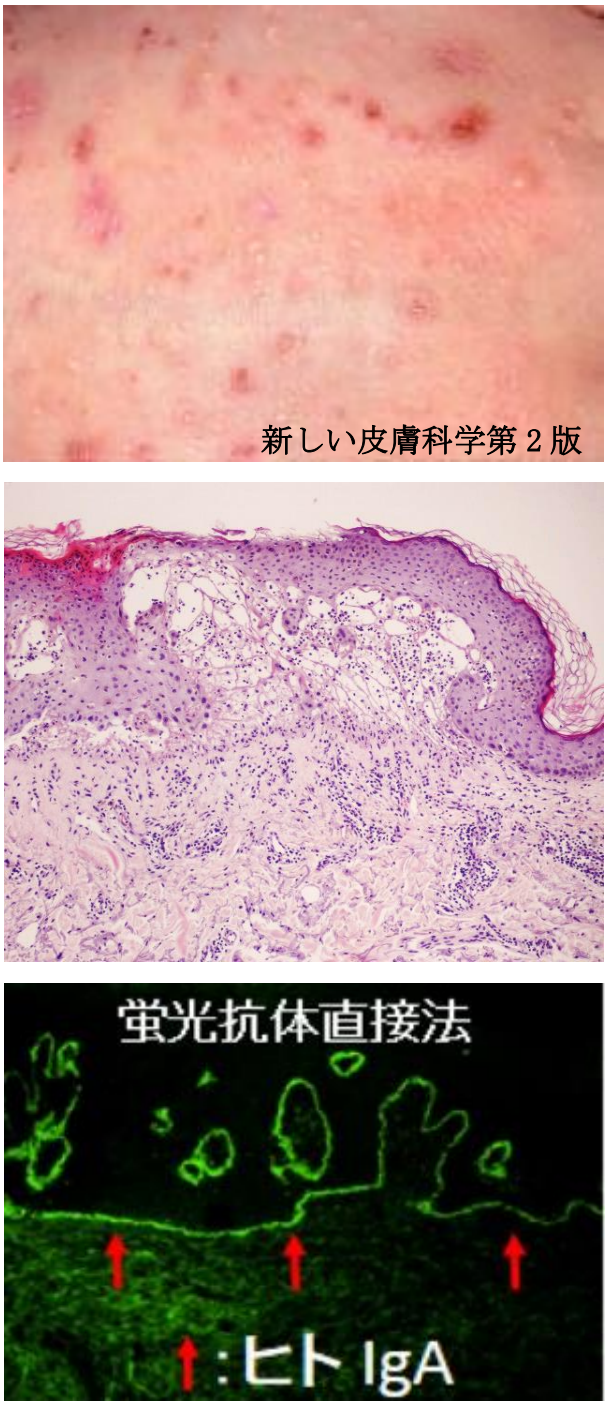

図５　線状 IgA 水疱性皮膚症の臨床および検査所見

（上）臨床的に紅斑と緊満性小水疱を認める。

（中）HE 染色で基底膜部に裂隙形成と好中球主体の細胞浸潤する。

（下）蛍光抗体直接法で基底膜部に IgA が線状に沈着する。

本研究の目的

1) リコンビナント COL17 から LAD-1 と LABD97 タンパクを作成し、マウスに免疫して LAD 患者自己抗体に類似する性質を持つ mAb を作成する。作成した mAb を用いて、COL17 の切断に伴う neoepitopes の出現機序を解明する。

2) LAD の発症機序を解明するため、作成した mAb を培養表皮基底細胞に添加、あるいは COL17 ヒト化マウスへ投与し病原性を検証する。

3) 全長 COL17 と C 末端が切断された COL17 を ELISA の基質に用いて、LAD 患者自己抗体の検出に応用する。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BP	Bullous pemphigoid
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
C 末端	Carboxyl-terminus, C-terminus
COL17	Type XVII collagen
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
HRP	Horseradish peroxidase
JEB	Junctional epidermolysis bullosa
LABD	Linear IgA bullous dermatosis
LAD	Linear IgA dermatosis
mAb	Monoclonal antibody
MMP	Mucous membrane pemphigoid
N 末端	Amino-terminus, N-terminus
NHEK	Normal human epidermal keratinocyte
NC	Non-collagenous
NC16A	Non-collagenous 16A
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
TBS	Tris buffered saline

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、参加者から書面による同意を得て施行した。臨床検体の取り扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認（15-025）を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した。遺伝子組み換え実験は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則した。またマウス実験は、ヘルシンキ宣言と国際医学団体協議会の「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」に即して行った。

1　LAD および BP 患者の血清サンプルの採取

LAD 患者（n=18）、BP 患者（n=16）から血清を採取した。LAD の診断は、臨床的に掻痒を伴う紅斑と皮膚や粘膜の水疱もしくはびらん形成、病理組織学的に好中球浸潤を伴う表皮真皮境界の裂隙、免疫学的に蛍光抗体直接法で表皮真皮結合部への線状の IgA 沈着を診断の根拠とした[4]。BP の診断は既報告の通り、臨床像、病理組織学的所見および免疫組織学的所見から総合的に診断した[4]。

2　Normal human keratinocytes（NHEKs）の樹立および培養

良性皮膚腫瘍の外科的切除によって得られた余剰な正常皮膚組織からnormal human epidermal keratinocytes（NHEKs）を作成した。採取した皮膚はPhosphate buffered saline（PBS）で洗浄後に脂肪を除去し、ディスパーゼI（合同酒精株式会社）2mlで一晩4°Cで静置した。表皮を剥離し、眼科剪刀で細かく刻んで0.25%トリプシン2mlに浸し、37°Cで7分静置した。その後、激しくピペッティングを行い、10% fetal bovine serum（FBS）含有PBS 8ml 加えた。セルストレーナー（BD Biosciences）で濾過後に遠心し、細胞成分をCnT-57（CELLnTEC）で溶解し培養した。本研究で用いた細胞の継代数は4回以内とした。

3　皮膚凍結切片の作成

クリオモルド・プラスチック包埋皿（サクラファンテックジャパン株式会社）に患者より採取した皮膚組織あるいは正常ヒト皮膚組織を入れ、クリオマウント（武藤化学株式会社）で充填した。ドライアイス上で急速に凍結し、固定台に載せて 5 μm の厚さで薄切して切片を作成し、蛍光抗体染色で使用した。

4　ヒトCOL17リコンビナントタンパクおよびGST融合タンパクの作成

4-1　　全長ヒト COL17 の作成

全長 COL17（NM_000494, Met[1] から Pro[1497]）リコンビナントタンパクを過去の報告に基づき Flp-In-293 細胞（Invitrogen）に全長 COL17 を含むベクターをトランスフェクションして作成および精製した [45]。

4-2　　C 末端を徐々に短くしたリコンビナントタンパの作成

C 末端を徐々に短くした 4 つのリコンビナントタンパク、COL17（Δ1-2）（Met[1] から Asp[1340]）、COL17（Δ1-6）（Met[1] から Arg[1174]）、COL17（Δ1-10）（Met[1] から Pro[977]）、COL17（Δ1-14）（Met[1] から Met[816]）[46]（図 6）を全長 COL17 の作成に用いたベクターを用いて過去の報告同様に作成および精製した [46]。

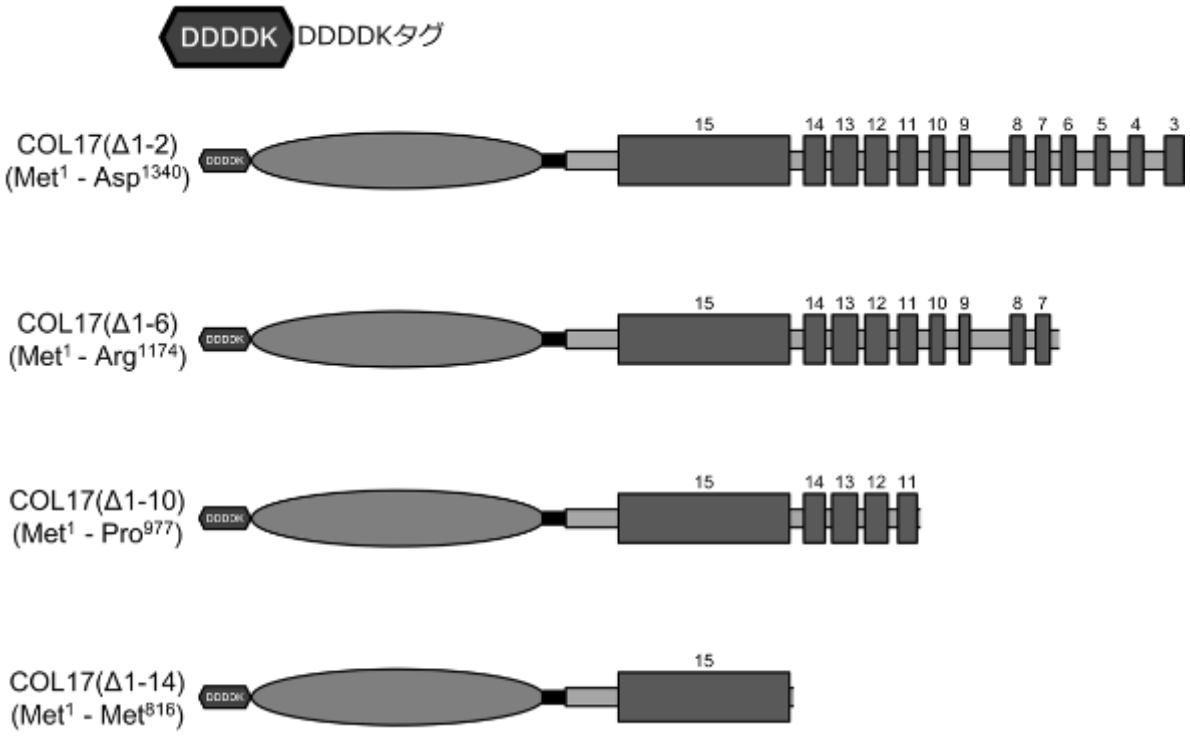

図 6　4 種類の C 末端を徐々に短くしたリコンビナントタンパクの模式図

4-3　ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域の GST 融合タンパクの作成

mAb hC17-ect15 のエピトープ同定のために、ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域を含めた領域（Glu^{547} から Gly^{827}）を 40-50 アミノ酸ずつに分けて（図 7）、それぞれのプライマーを作成した（表 1）。ヒト全長 COL17 の配列が組み込まれているベクターを鋳型にしそれぞれの配列を増幅したのち、pGEX6p-1 ベクター（GE Healthcare）に入れ、TOP10 大腸菌で増やし QIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen）で精製した。精製したベクターをさらに BL21 大腸菌に入れ、GST 融合タンパクを作成した。作成した 7 種類のタンパクをクマシーブルー染色と抗 GST 抗体（ab9085，Abcam）を用いてウエスタンブロットでタンパク発現を確認した。

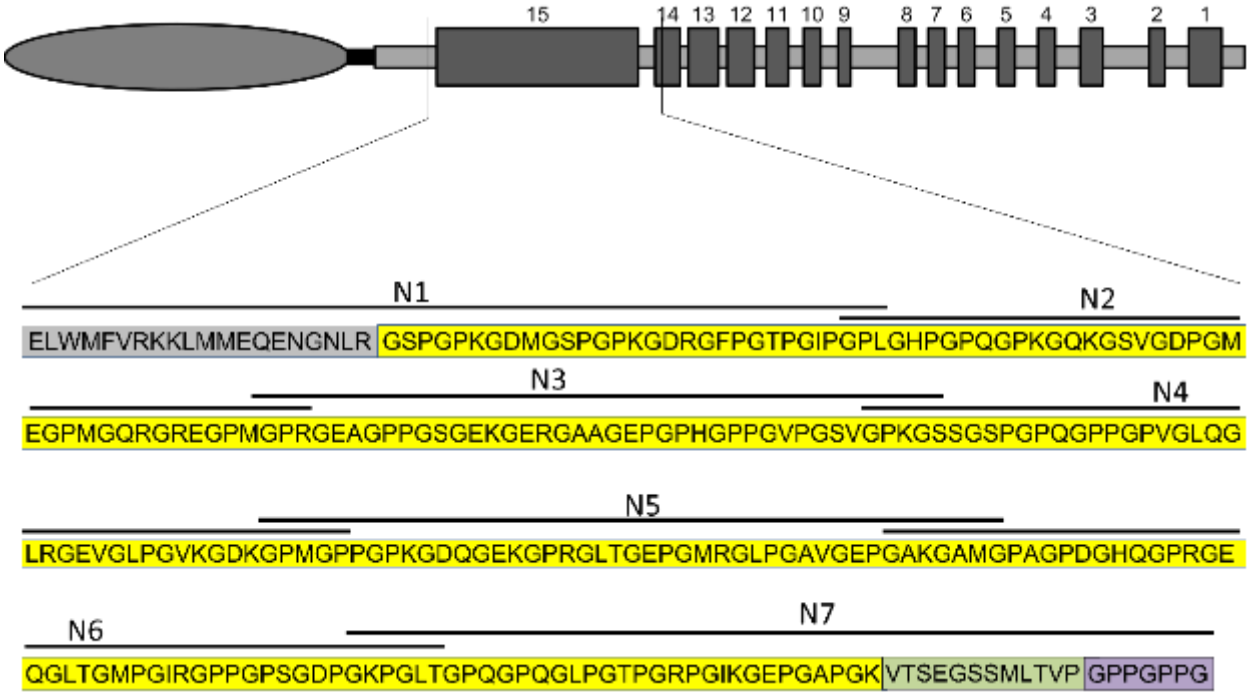

図 7　ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域の N1-N7 のペプチド断片

灰色：NC16A の途中からのアミノ酸配列

黄色：15 番コラーゲン領域のアミノ酸配列

緑：15 番非コラーゲン領域のアミノ酸配列

紫：14 番コラーゲン領域の一部のアミノ酸配列

N1: (aa547-596)

アミノ酸配列（上）、DNA 配列（下）：

E L W M F V R K K L M M E Q E N G N L

gga tcc gag ctc tgg atg ttc gtg agg aag aag cta atg atg gaa cag gaa aat gga aat ctc

R G S P G P K G D M G S P G P K G D R G F

cga gga agc cct ggc cct aaa ggt gac atg gga agt cca ggc cct aaa gga gat cga ggg ttc

P G T P G I P G P L

cct ggg act cca ggt atc cct ggg ccc ttg gcg gcc gca ata

プライマー：

N1-F: 5’-cca gga tcc gag ctc tgg atg ttc gtg agg aag -3’

N1-R: 5’-tat tgc ggc cgc caa ggg ccc agg gat acc tgg -3’

N2: (aa591-632)

アミノ酸配列（上）、DNA 配列（下）：

G I P G P L G H P G P Q G P K G Q K G

gga tcc ggt atc cct ggg ccc ttg ggc cac cca ggt cca caa gga cca aag ggt caa aaa ggc

S V G D P G M E G P M G Q R G R E G P M G

agc gtg gga gat cct ggc atg gaa ggc ccc atg ggc cag aga ggg cga gaa ggc ccc atg gga

P R

cct cgt gcg gcc gct tat

プライマー：

N2-F: 5’-att gga tcc ggt atc cct ggg ccc ttg ggc cac -3’

N2-R: 5’-ata agc ggc cgc acg agg tcc cat ggg gcc ttc -3’

N3: (aa627-669)

アミノ酸配列（上）、DNA 配列（下）：

G P M G P R G E A G P P G S G E K G E

gga tcc ggc ccc atg gga cct cgt ggt gag gca ggg cct cct gga tct gga gag aaa ggg gaa

R G A A G E P G P H G P P G V P G S V G P

aga ggg gct gct ggt gaa cca ggt cct cat ggc cca cct ggt gtc cca ggt tct gtg ggt ccc

K G S

aaa ggt tcc gcg gcc gca ata

プライマー：

N3-F: 5’- cca gga tcc ggc ccc atg gga cct cgt ggt gag -3’

N3-R: 5’-tat tgc ggc cgc gga acc ttt ggg acc cac aga -3’

N4: (aa665-706)

アミノ酸配列（上)、DNA 配列（下）:

G P K G S S G S P G P Q G P P G P V G L

gga tcc ggt ccc aaa ggt tcc agc ggc tct cct ggc cca cag ggc cct cca ggt cct gta ggt ctc

Q G L R G E V G L P G V K G D K G P M G P

caa ggg ctc cga ggt gaa gta gga ctt cct ggt gtc aaa ggt gac aaa gga cca atg gga cca

P

cca gcg gcc gct ttt

プライマー：

N4-F: 5'-tat gga tcc ggt ccc aaa ggt tcc agc -3'

N4-R: 5'-aaa agc ggc cgc tgg tgg tcc cat tgg tcc ttt -3'

N5: (aa701-743)

アミノ酸配列（上)、DNA 配列（下）:

G P M G P P G P K G D Q G E K G P R G

gga tcc gga cca atg gga cca cca gga ccc aaa ggt gac cag ggt gag aaa gga cct cga ggc

L T G E P G M R G L P G A V G E P G A K G

ctc aca ggc gag cct ggc atg aga ggt ttg cct ggt gct gtt ggt gag ccc ggg gct aaa gga

A M G

gca atg ggt gcg gcc gct cct

プライマー：

N5-F: 5'-tta gga tcc gga cca atg gga cca cca gga ccc -3'

N5-R: 5'-agg agc ggc cgc acc cat tgc tcc ttt agc ccc -3'

N6: (aa737-781)

アミノ酸配列（上)、DNA 配列（下）:

G A K G A M G P A G P D G H Q G P R G

gga tcc ggg gct aaa gga gca atg ggt cct gct ggc cca gac gga cac caa ggc cca aga ggt

E Q G L T G M P G I R G P P G P S G D P G

gaa caa ggt ctt act ggg atg cct gga atc cgt ggc cca cca gga cct tct gga gac cca gga

K P G L T

aag cca ggt ctc aca gcg gcc gct ttt

プライマー：

N6-F: 5'-ctc gga tcc ggg gct aaa gga gca atg ggt cct -3'

N6-R: 5'-aaa agc ggc cgc tgt gag acc tgg ctt tcc tgg -3'

N7: (aa776-827)

アミノ酸配列（上)、DNA 配列（下）:

G K P G L T G P Q G P Q G L P G T P G

gga tcc gga aag cca ggt ctc aca gga ccc cag gga cct cag gga ctt ccc ggt acc cct ggc

R P G I K G E P G A P G K I V T S E G S S

cga cca gga ata aaa ggt gaa cca gga gct cca ggc aag atc gtg act tcg gag ggg tca tcg

M L T V P G P P G P P G

atg ctc act gtc cca ggc ccc cca gga cct cct gga gcg gcc gct ttt

プライマー：

N7-F: 5'-ttt gga tcc gga aag cca ggt ctc aca gga ccc -3'

N7-R: 5'- aaa agc ggc cgc tcc agg agg tcc tgg ggg gcc-3'

表 1　ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域の DNA 配列とプライマー

四角形：プライマーに対応する DNA 配列

下線：制限酵素サイト　BamH I

点線：制限酵素サイト　Not I

4-4　15番コラーゲン領域を一部短縮したCOL17（Δ1-14)sの作成

mAb hC17-ect15 のエピトープ同定のために、15 番コラーゲン領域の一部を短縮した COL17（Δ1-14)s（Met[1] から Ala[738]）を作成した。4-2 で作成した、COL17（Δ1-14）（Met[1] から Met[816]）の配列が組み込まれたベクターを制限酵素 SmaI と ClaI で処理した後、T4 DNA Polymerase （Takara） を用いて両端の末端平滑化し、ライゲーションを行った。タンパクの作成と精製は全長 COL17 の作成および精製法と同様な方法で施行した。

5　プラスミン切断 COL17 リコンビナントタンパクの作成

上記にて作成したヒト全長 COL17 をヒトプラスミン（ab90928, Abcam）0.01 mg/ml、37℃、1 時間で処理し、120kDa の LAD-1 と 97kDa の LABD97 の切断タンパクを作成した。

6　COL17に対して異なる抗体結合部分を持つ抗体の作成（図8）

上記で作成した全長の COL17、LAD-1、LABD97 を用いて完全フロイントアジュバント（Sigma Aldrich）とともに皮下注射で免疫した BALB/cCrSlc マウス[40, 41, 45] の脾臓細胞を P3U1 細胞と融合させた[47]。11 種類のハイブリドーマが得られ、mAb hC17-ect15 と NC16A-4 を本研究に用いた。

また、ヒト COL17 の NC16A 上の Asp[522] から Gln[545] を認識する mAb TS39-3 も今回の検討に用いた[47]。それぞれの mAb は Ab-capcher Extra （ProteNova）を用いて、血清の含まない培地（Hybridoma-SFM, Gibco）から親和性精製した。生成した抗体は、Amicon Ultra Centrifugal Filters（10 K, Millipore）を用いて濃縮した。加えて、NC16A の Gln[545] から Met[557] を認識する mAb NC16A-3[11]（フライブルグ大学、Bruckner-Tuderman 教授から供与）、細胞外領域（Leu[645] から Pro[977]）を認識する mAb BMM62[41]（名古屋大学、平子先生より供与）、細胞内領域（Trp[155] から Arg[163]）を認識する mAb 1A8c[33] （名古屋大学、尾張部教授より供与）も今回の検討に使用した。マウス COL17 の NC14A 領域（Glu[499] から Arg[573]）を認識するウサギ由来のポリクローナル抗体 Mo-NC14A[48] を既報告に沿って作成した。

使用した抗COL17抗体の一覧

抗体名	抗原種	エピトープ
hC17-ect15	ヒト	15番コラーゲン領域（Glu^{645}からLeu^{684}）
TS39–3	ヒト	NC16A （Asp^{522} からGln^{545}）
BMM62	ヒト	細胞外 （Leu^{817}からPro^{977}）
1A8c	ヒト	細胞内 （Trp^{155} からArg^{163}）
NC16A-3	ヒト	NC16A （Gln^{545} からMet^{557}）
NC16A-4	ヒト	NC16A （Asp^{522} からGln^{545}）
Mo-NC14A	マウス	NC14A （Glu^{499} からArg^{573}） ポリクローナル抗体

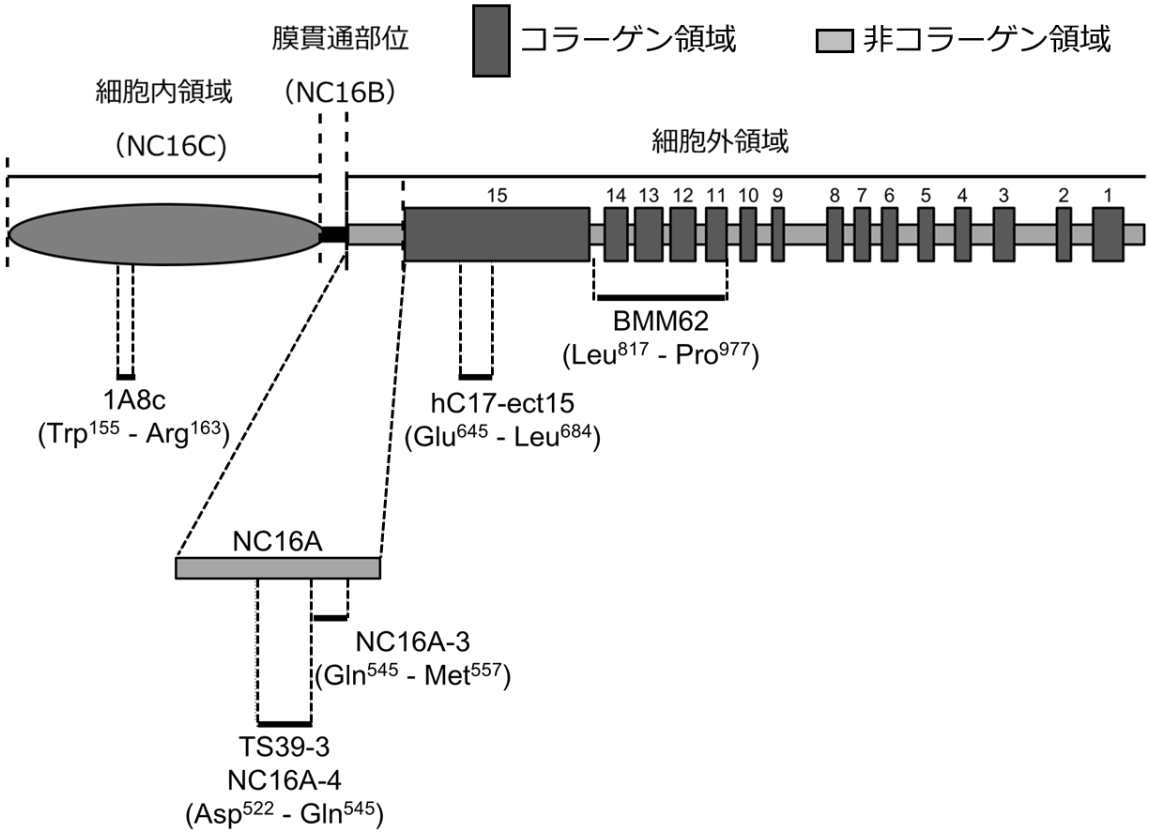

図８　各種抗体の認識部位の模式図

7　全長のマウス COL17 の作成および精製

ヒト全長 COL17 と同様にマウス全長 COL17 を作成した。

RNeasy mini kit（Qiagen）を用いて野生型マウスの皮膚から mRNA を抽出し、下記プライマーでマウス *Col17a1*　cDNA（NM_007732）を増幅した。

5’-CCTGAATTCCATCCGAGGGAGGAAGAGAG-3’

5’-TGAGACCAAATCACCCAGCGACACTAGT-3’

（一本下線は EcoRI、二本下線は SpeI 特異的領域）

PCR 産物を pBC SK(-) (Agilent Technologies)の EcoRI と SpeI 領域に挿入し、クローニングした。マウス COL17 の DNA 配列の N 末端に DDDDK タグの配列を挿入した合成遺伝子を作成した。合成遺伝子の N 末端に HindIII、C 末端に SbfI の制限酵素サイトを付した。pBC SK(-)に入ったマウス COL17 を HindIII と SbfI で制限酵素処理し、合成遺伝子を挿入した。続いて、HindIII と NotI でインサートを切り出し、pcDNA5/FRT（Invitrogen）の HindIII と NotI 領域に挿入し、ベクター（mCol17-pcDNA5/FRT）を作成した。mCol17-pcDNA5/FRT は Lipofectamine 2000（Thermo Fisher Scientific）を用いて pOG44（Invitrogen）と共に Flip-In 293 細胞（Invitrogen）にトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞は 10% FBS を含む DMEM（Invitrogen）で培養し、200 g/ml の hygromycin B （Invitrogen）で選択を行った。細胞上清を収集する 24 時間前にアスコルビン酸を最終濃度が 50 g/ml になるように添加した。培養細胞を Nonidet P-40 （Nacalai Tesque）、25 mM Tris-HCl （pH7.4）、protease inhibitor cocktail （Sigma-Aldrich）、10mM ethylenediaminetetraacetic acid を含む細胞溶解バッファーで処理することで細胞上清を作成し、最終的に DDDDK タグに対する磁化ビーズ含有抗体（M185-9, MBL）でリコンビナントタンパクの精製を行った。

8　部分的ヒト化マウス COL17 の作成

15 番コラーゲン領域のヒトとマウスの相同性を比較し、一部の相同性が低いことが判明した（図 9）。マウス COL17 の 14 番コラーゲン領域の一部（Asp^{652} から Pro^{691}）がヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域の一部（Glu^{645} から Leu^{684}）に置き換えられたリコンビナントタンパクを作成した。7 で作成したマウスの COL17 の DNA が入ったベクター（mCol17-pcDNA5/FRT）内に、ヒトの COL17 の合成 DNA（表 2）を組み込んだベクター（Ph-mCol17-pcDNA5/FRT）を作成し、全長マウス COL17 と同様にタンパクを発現させ精製した（図 10）。

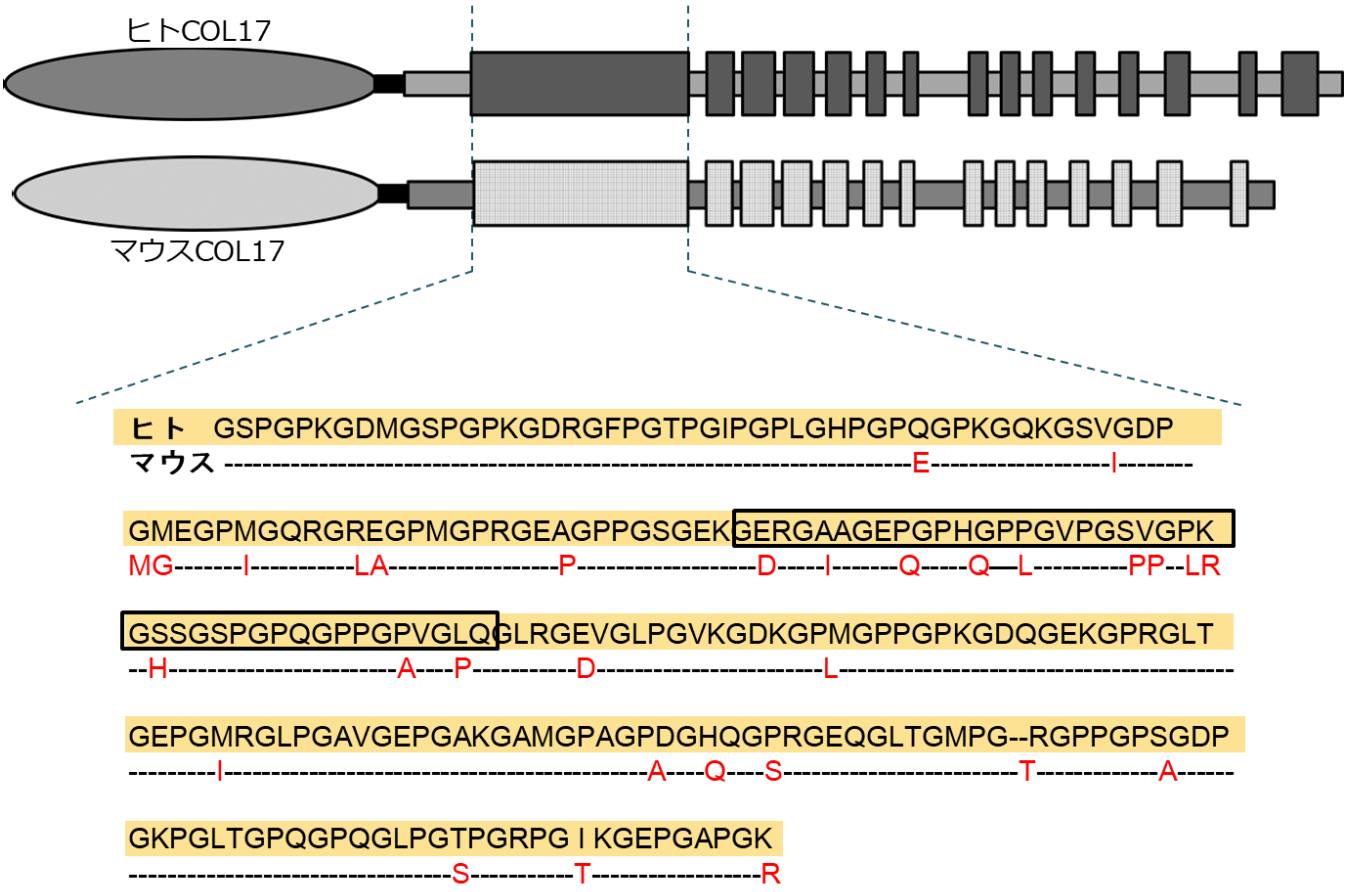

図 9　ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域のマウスとの相同性

ヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域に対応するマウス COL17 の 14 番コラーゲン領域の相同性比較。ヒトとマウスで約 87%の相同性である。赤字が異なるアミノ酸。四角部分は表 2 の灰色部分（本研究でヒト化した領域）に相当する。

GCGCATCGATCATATGCCGCTGACACCTGCCTGAAGGCAGATGTGAATGGAGACCTAAA
TACCGTGTCCACAAAGAGCAAGATGACCTCGGCAGAAAACCATGGCTACGACCGAGGTG
GCGGTGGTGGCAGAGGCAAAGGCGGAGGTGCTGGTGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGCG
CCAGTGGCGGTGGAGGAGCATGGGGGGCTGCACCAGCCTGGTGCCCCTGCGGCTCCTG
CTGCAGCTGGTGGAAGTGGCTGCTGGGCCTGCTGCTCACCTGGCTGCTGCTGCTGGGT
CTGCTCTTCGGCCTCATTGCTCTGGCGGAGGAGGTAAGAAAGCTGAAGGCCCGCGTGG
AGGAGCTGGAAAAGACCAAGGTGCTATATCATGACGTCCAGATGGACAAAAGCAACAGG
GACCGCCTCCAGGCCGAGGCACCCAGCCTGGGACCTGGATTAGGCAAGGCTGAGCTGG
ACGGCTACAGCCAGGAGGCCATCTGGCTGTTTGTAAGGAACAAGCTGATGACCGAGCAG
GAGAACGGGAATCTCAGAGGAAGTCCTGGTCCAAAAGGTGACATGGGGAGTCAAGGAC
CTAAAGGAGACCGAGGCCTTCCTGGGACCCCAGGTATCCCTGGGCCCCTGGGCCACCCT
GGCCCGGAAGGACCAAAGGGACAAAAAGGCAGCATTGGAGATCCTGGCATGGAAGGAC
CCATAGGCCAGAGAGGACTAGCAGGCCCCATGGGACCTCGTGGTGAACCCGGGCCTCC
TGGGTCTGGAGAGAAAGGGGAAAGAGGGGCTGCTGGTGAACCAGGTCCTCATGGCCCA
CCTGGTGTCCCAGGTTCTGTGGGTCCCAAAGGTTCCAGCGGCTCTCCTGGCCCACAGGG
CCCTCCAGGTCCTGTAGGTCTCCAAGGGCTCCGAGGTGACGTGGGACTTCCTGGTGTCA
AAGGTGACAAAGGACTCATGGGACCACCAGGACCCAAAGGTGACCAGGGTGAGAAGGG
ACCCAGAGGCCTCACAGGGGAGCCTGGCATTCGAGGTTTGCCTGGAGCTGTGGGTGAA
CCCGGAGCCAAAGGCGCAATGGGTCCGGCTGGCGCTGATGGACAGCAAGGTTCCAGAG
GTGAACAAGGCTTGACAGGGATGCCTGGAACCCGGGGCCCCCCAGGACCCGCTGGAGA
CCCAGGAAAGCCAGGTCTCACAGGACCCCAGGGACCTCAGGGACTTCCTGGTAGCCCT
GGCCGACCAGGGACTAAAGGCGAACCCGGCGCTCCCGGCAGAGTCATGACTTCAGAGG
GATCATCAACAATCACTGTGCCCGGACCTCCCGGACCTCCTGGTGCCATGGGTCCCCCA
GGACCTCCAGGGACGCCAGGTCCAGCTGGCCCTGCTGGTCTCCCAGGACAACAAGGCC
CACGAGGGGAGCCAGGACTTGCTGGTGACTCATTCCTAAGCAGTGGCAGCTCCATCTCT
GAGGTCCTCTCTGCCCAAGGTGTTGACTTACGAGGTCCCCCTGGCCCACCTGGCCCACG
AGGGCCACCAGGGCCTTCCATCCCAGGCCCGCCAGGACCCAGAGGTCCACCAGGGGAA
GGCGTACCAGGCCCACCCGGGCCACCAGGATCCGCGGCCGCACCG

表 2　部分的ヒト化マウス COL17（1,620 bp）の合成遺伝子配列

制限酵素部位　ClaI：緑 、NdeI：青、BamHI：赤 、NotI：紫、ヒト化配列：灰色

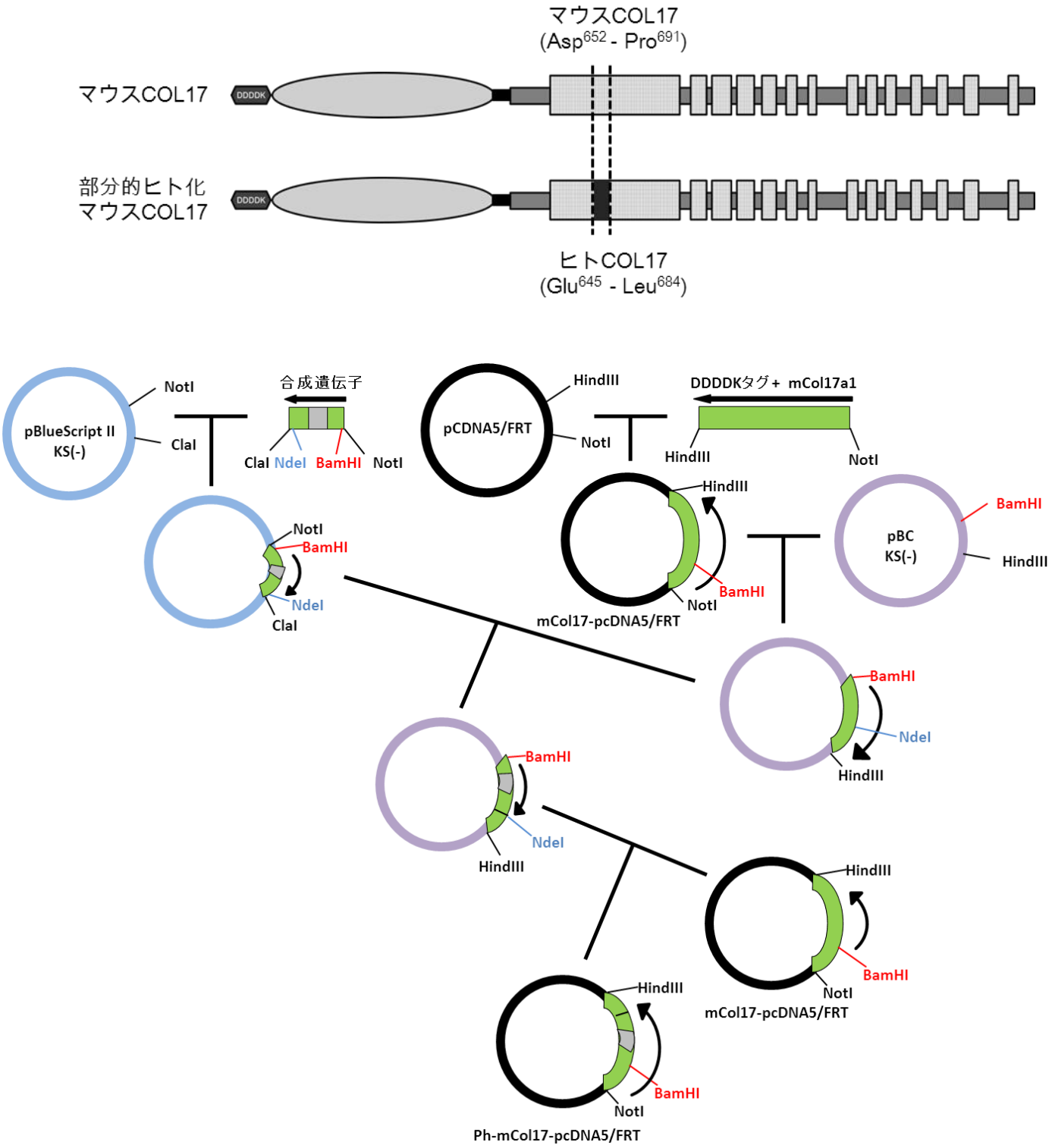

図10　部分的ヒト化マウスCOL17 の作成方法

（上）マウスCOL17の13番コラーゲン領域の一部（Asp652からPro691）をヒトCOL17の15番コラーゲン領域の一部（Glu645からLeu684）に置換。

（下）部分的ヒト化マウスCOLO17ベクター（Ph-mCol17-pcDNA5/FRT）の作成方法。

9　免疫染色

正常ヒト皮膚、正常マウス皮膚（C57BL/6J）、COL17を欠損している接合部型表皮水疱症患者（JEB）[49] 皮膚を用い、各種抗COL17抗体を一次抗体として免疫染色を行った。5μmに薄切した凍結切片を一次抗体（4度・一晩）に反応させ、1000倍希釈したFITC標識（Jackson ImmunoResearch Laboratories）、もしくはAlexa488標識抗マウスIgG抗体（Invitrogen）を二次抗体（室温・1時間）として染色した。また、作成したmAb hC17-ect15のIgGサブクラスを同定するために、一次抗体の後に100倍希釈した抗マウス IgG1、 IgG2a、IgG2b、IgG3（BD Biosciences）を二次抗体（室温・1時間）として用いて染色した。画像は蛍光顕微鏡（BX51, Olympus） もしくは共焦点レーザー顕微鏡 （FLUOVIEW FV1000-D, Olympus）を用いて撮像した。

10　蛍光抗体直接法

抗COL17抗体を投与したマウス皮膚を採取し、上記3のように凍結切片を作成した。投与した抗体の沈着を確認するために、1000倍希釈したAlexa488標識抗マウスIgG抗体（Invitrogen）を用いて室温・1時間にて染色した。画像は蛍光顕微鏡（BX51, Olympus）を用いて撮影した。

11　SDS－PAGEおよびWestern blotting

試料を 7% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動で分離し、ゲルをクマシーブルー染色もしくは、ニトロセルロース膜（Bio-Rad）への転写を行った。ニトロセルロース膜への転写後、メンブレンは室温で 30 分間 2% スキムミルクの入った Tris Buffered Saline（TBS）でブロッキングし、一次抗体を 4℃で一晩反応させた。翌日、ニトロセルロース膜を TBS にて洗浄後、二次抗体にて室温で 1 時間反応させた。一次抗体には COL17 の異なる部位を認識する複数の抗体、内部コントロールの 500 倍希釈した抗 β tubulin 抗体（ab6046, Abcam）、および 100 倍希釈した患者血清を用いた。二次抗体は 5000 倍希釈した horseradish perioxidase（HRP）標識二次抗体（抗マウス IgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories）、抗ヒト IgG もしくは抗ヒト IgA（Invitrogen）を用いた。二次抗体との反応後、Clarity Western ECL Substrate（Bio-Rad）で発色しシグナルを LAS4000（富士フィルム）にて検出した。

12　免疫沈降法

mAb hC17-ect15、TS39-3、マウス IgG1（MBL）と全長の COL17 および 4 つの C 末端が切断されたリコンビナントタンパク COL17（Δ1-2)、COL17（Δ1-6)、COL17（Δ1-10)、COL17（Δ1-14）との結合性を検証するために免疫沈降法を行った。Dynabeads Protein G （Novex, Life Technologies）を結合させた複数の抗体 mAb hC17-ect15、TS39-3、マウス IgG1 と作成したリコンビナントタンパクを常温にて 10 分間反応後、免疫沈降されたタンパクを SDS-PAGE で分離し、抗 DDDDK タグ抗体（M2, Sigma-Aldrich）を一次抗体として用い Western blotting 法を施行した。

13　Enzyme linked immunosorbent assay （ELISA）

11 種類の抗 COL17 抗体を産生するハイブリドーマの培地中に含まれる抗体を、COL17 の NC16A を認識する市販 ELISA をキット（MESACUP BP180 ELISA kit, MBL）を用いて解析した。ハイブリドーマの培地は 10 倍希釈で室温にて 1 時間反応させ、PBS にて洗浄後に 20000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて室温にて 30 分反応させた。PBS にて洗浄後に基質溶液（3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/ hydrogen peroxide; TMB/H_2O_2（KPL）を用いて発色させた。発色反応は 0.12 M の塩酸で停止させ、マイクロプレートリーダー（TECAN Austria GmbH） を用いて 450nm の吸光度を測定した。COL17-NC16A に反応のない mAb hC17-ect15、COL17-NC16A に反応する mAb NC16A-4 を本研究に用いた。

また、mAb hC17-ect15、TS39-3、NC16A-4、BMM62 のそれぞれの抗体を用いて、全長ヒト COL17 および C 末端が切断された COL17（Δ1-6)、COL17（Δ1-10)、COL17（Δ1-14）に対する反応性の違いを検証するために ELISA 法にて検証した。4 種類のリコンビナントタンパクを各 1μg /well にて 96 ウェルプレート（Thermo Fisher Scientific）にコーティングバッファー（50mM carbonate buffer pH9.5）を用いて一晩固定した。非特異的結合を低減する目的で 2%のウシ血清アルブミン含有 PBS で室温、2 時間ブロッキング後、LAD 患者の血清を 100 倍希釈したものを室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを PBS にてよく洗浄し、5000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。

同様な方法で、LAD 患者血清と正常人血清の全長ヒト COL17 と COL17（Δ1-6）に対する反応性を ELISA で検証した。その際、LAD 患者の血清を 100 倍希釈したものを室温で 1 時間反応させた後、5000 倍希釈した HRP 標識抗ヒト IgA 抗体を室温で 1 時間反応させた。

13-1　タンパクコーティング量の決定

タンパクのコーティング量を決定するために、それぞれのリコンビナントタンパクを段階希釈し 96-well プレートにコーティングした。DDDDK タグに対する抗体を一次抗体として用い ELSIA 法で検出した。1well あたり 5μg/ml×100μl で COL17（Δ1-2）以外の全長 COL17、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14）の飽和に近づいていたためコーティング量は 5μg/ml×100μl と決定した（図 11）。COL17（Δ1-2）は、濃度を上げても他のタンパクと同程度の吸光度が得られないため除外することとした。

コーティングタンパクは分子量が異なるため ELISA での反応性を比較測定するために、DDDDK タグに対する抗体の結果をもとに下記のように標準化を行った。

例：全長 COL17 に対する COL17 抗体の OD 値の補正

$$\frac{\text{〔全長 COL17　COL17 抗体 OD〕}}{\text{〔全長 COL17　DDDDK タグ OD〕} \;/\; \text{〔COL17（Δ1-14）DDDDK タグ OD〕}}$$

COL17（Δ1-14）の抗 DDDDK タグ抗体の OD 値を基準値として各タンパクの抗 DDDDK タグ抗体による OD 値を補正。さらに、COL17 に対する抗体の OD 値を補正した。

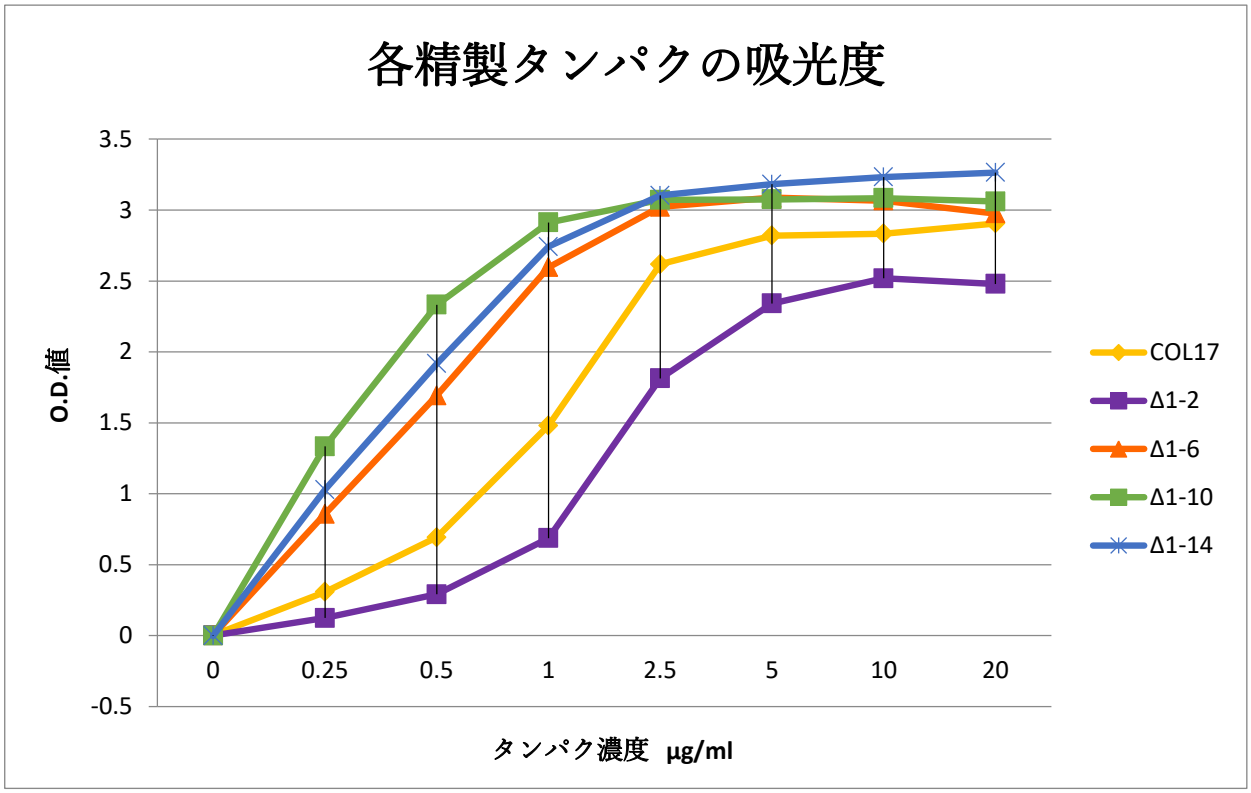

図 11　至適タンパクコーティング量の決定

Bradford 法によるタンパク濃度結果に基づいて、各タンパクを段階希釈してコーティングし抗 DDDDK タグ抗体（一次抗体、10000 倍希釈）、HRP 標識抗マウス IgG 抗体（二次抗体、50000 倍希釈）にて ELISA を施行。

14　COL17 ヒト化マウスへの mAb の投与

COL17 ヒト化マウスは、表皮に発現するマウス COL17 を欠失させ、代わりにヒト COL17 を発現させたマウスである [31]。このマウスの耳介皮下に、100 μg/50 μl の mAb hC17-ect15、50 μg/50 μl の TS39-3 および、100 μg/50 μl のマウス IgG1 抗体（コントロール）を投与し、48 時間後に弱い摩擦を加えて表皮の剥離を確認した [31,47,50]。物理的せん断力は耳介の表皮を伸ばし、同じ研究者が 3 度繰り返して与えた。表皮剥離の有無を評価した後、耳介を採取し蛍光抗体直接法にて抗体の沈着を確認した。

15　培養 NHEKs に対する mAb の反応性の確認

40%コンフルエントの NHEKs を CnT-Prime 培地から 10%FBS を付加した DMEM 培地に変更して 24 時間後に、2.5 μg/ml の mAb hC17-ect15、マウス IgG1 抗体、TS39-3 を投与しそれぞれ 1.5 時間後、3.0 時間後、 6.0 時間刺激した。その後、細胞溶解液を回収して、Western blotting にて COL17 の量を定量した [50,51]。

16　統計学的解析

統計学的解析はR version 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, http://www.R-project.org/) を用いた。全長COL17とCOL17（Δ1-6）のELISAの光学濃度の比較検討にはWelchのt検定および、対応のあるt検定を行った。P値は0.05未満を有意水準とした。

実験結果

1　プラスミン処理により全長 COL17 は切断を受ける

作成した全長ヒト COL17 をプラスミン処理した。処理後、180kDa の全長 COL17 は、97kDa（LABD97）と 120kDa（LAD-1）に切断された（図 12）。

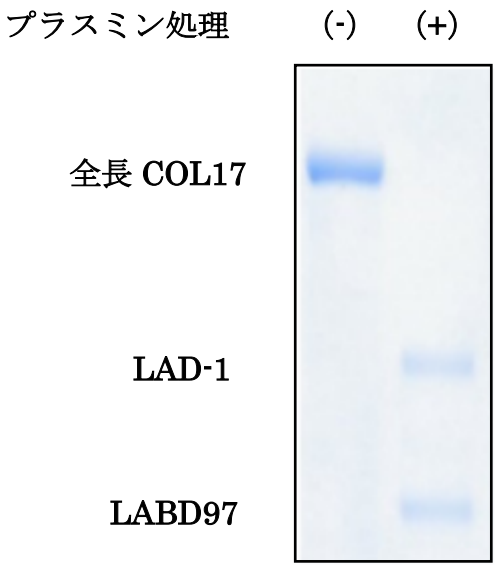

図 12　プラスミン処理による COL17 の切断

プラスミン処理の前後で COL17 の分子量の変化を SDS-PAGE に流した後にクマシーブルー染色した。

180kDa の全長 COL17（左レーン）は、プラスミン処理により 120kDa の LAD-1 と 97kDa の LABD97（右レーン）に切断された。

2　LAD 患者自己抗体は COL17 をプラスミン処理した LAD-1 および LABD97 を特異的に認識する

LAD 患者自己抗体は、全長 COL17 には反応が乏しく、切断を受けた後の COL17（LAD-1 および LABD97）に特異的に反応する [8–11,17,41]。リコンビナント COL17 をプラスミン処理した LAD-1 および LABD97 でも同様の所見が得られるかを確認した。全長 COL17（180kDa）、プラスミン処理した LAD-1（120kDa）および LABD97（97kDa）を SDS-PAGE で分離した後、LAD 患者 18 人、BP 患者 16 人の血清を一次抗体として用い、Western blotting にて反応性を確認した。

18 人中 11 人の LAD 患者自己抗体がリコンビナントヒト COL17 から切断された LAD-1 や LABD97 と反応し、全長 COL17 には反応しなかった。一方、16 人の BP 患者自己抗体は全長 COL17、LAD-1、LABD97 全てに反応性を示した（図 13）。興味深い予想外の結果として、症例 2、5、7 および 10 の LAD 患者自己抗体は LAD-1 より LABD97 に強い反応性を示したことが挙げられる（図 13）。LABD97 は LAD-1 の C 末端が更に切断され生じるタンパクであることから、COL17 の C 末端部のプロセッシングが neoepitope の出現に関与することを示唆すると予想された。

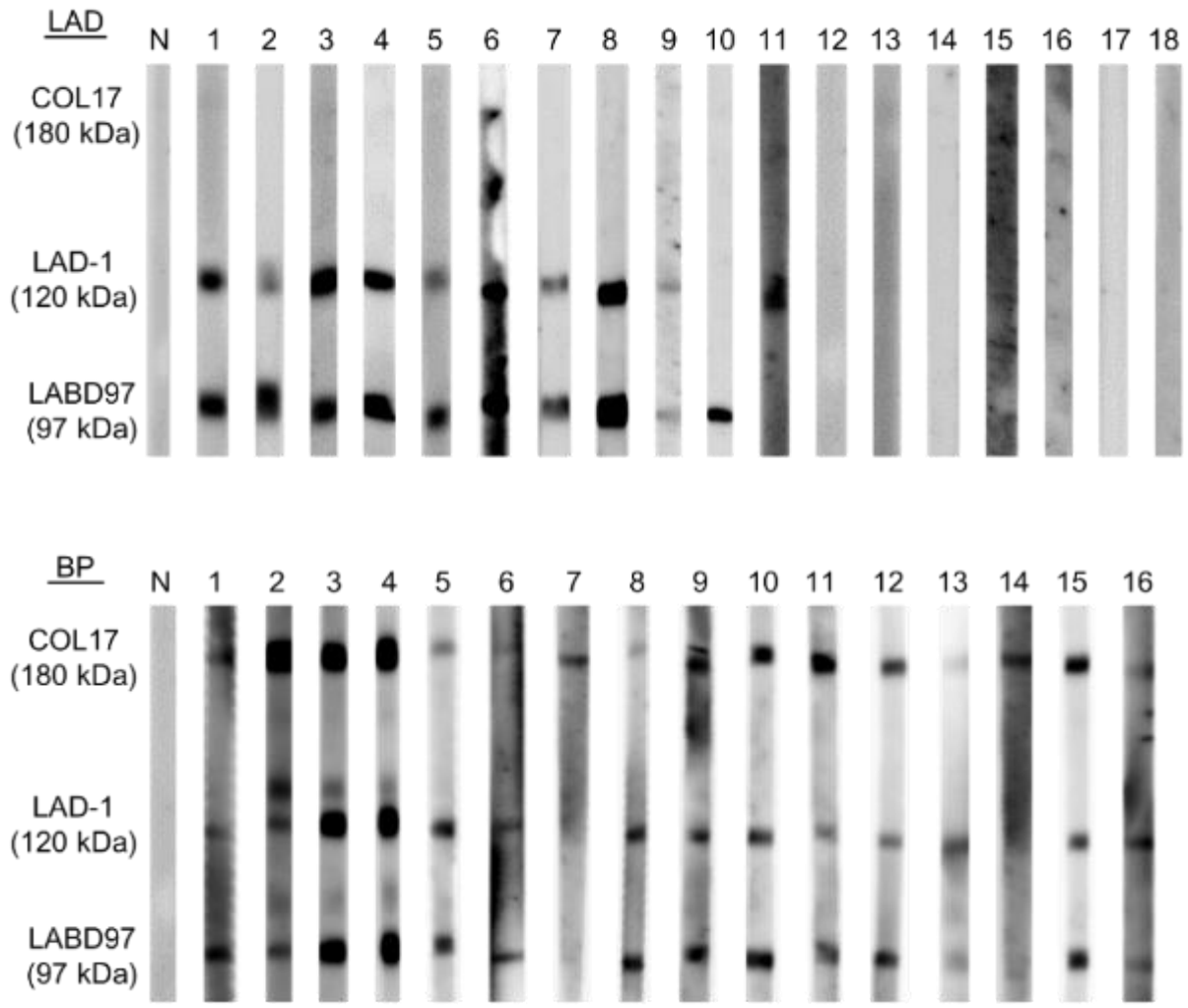

図 13　LAD および BP の患者血清を用いた COL17 に対する反応性の違い

Western blotting で分離した 3 つのタンパク（COL17、LAD-1、LABD97）に対する患者自己抗体の反応性を示す。症例 2、5、7 および 10 の LAD 患者自己抗体は LAD-1 より LABD97 に強い反応性を示している。

3　mAb hC17-ect15 は、LAD-1 および LABD97 を特異的に認識する

プラスミンで処理した COL17（LAD-1 および LABD97）にて免疫したマウスから 11 種類のハイブリドーマを得た。この中から、NC16A の ELISA でスクリーニングで反応のない mAb hC17-ect15 が neoepitopes を認識する抗体である可能性があるため本研究に用いた。まず、得られた抗体の COL17 に対する反応を Western blotting で検証したところ、LAD 患者自己抗体と同様に全長 COL17 には反応せず、プラスミン処理した LAD-1 および LABD97 に特異的に反応した（図 14）。一方、同じく細胞外領域を認識する mAb BMM62 は全長 COL17 およびプラスミン処理した COL17 いずれにも反応した。

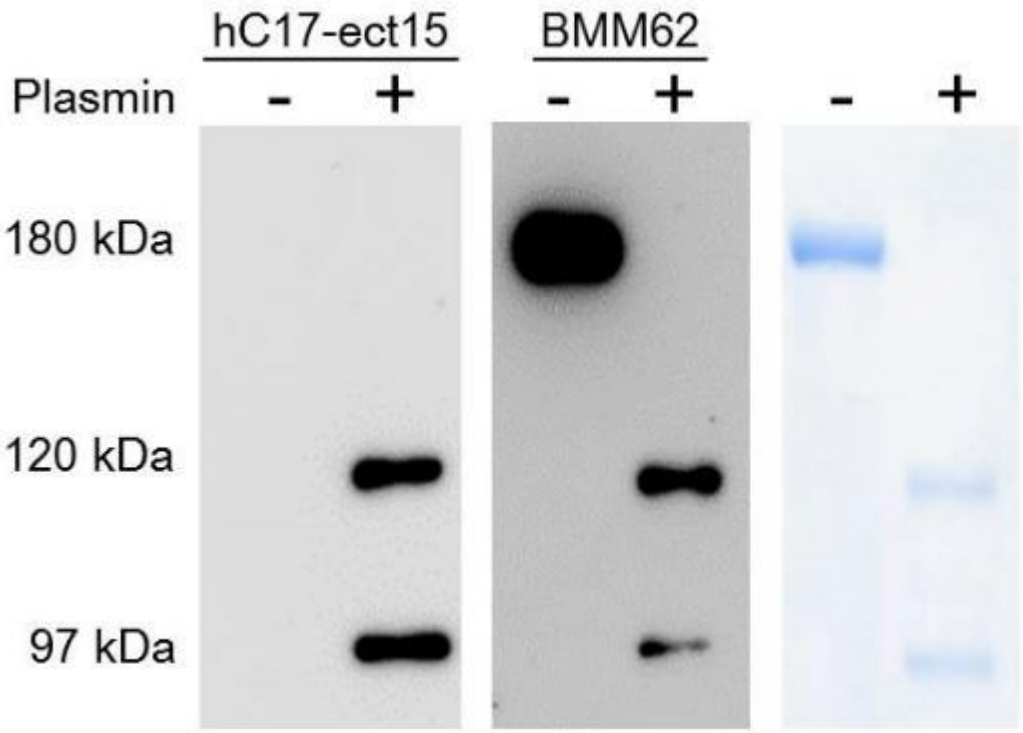

図 14　mAb hC17-ect15 を用いた COL17 に対する反応性の違い

（左）全長 COL17 とプラスミン処理した COL17 により生じる LAD-1、LABD97 に対する mAb hC17-ect15 の反応。

（中）mAb BMM62 の反応。

（右）全長 COL17 とプラスミン処理した COL17 により生じる LAD-1、LABD97 のクマシーブルー染色。

4　mAb hC17-ect15 はヒト COL17 を特異的に認識するマウス IgG1 サブクラスである

mAb hC17-ect15 の染色性を正常人の皮膚、マウスの皮膚、JEB 患者の皮膚で確認した。mAb hC17-ect15 は、正常人の皮膚では表皮真皮結合部に沿って染色を認めたが、マウス皮膚あるいは COL17 を遺伝的に欠損している JEB 患者の皮膚では、表皮真皮結合への染色は認められなかった（図 15）。以上から、mAb hC17-ect15 はヒト COL17 を特異的に認識する抗体であることが確認できた。

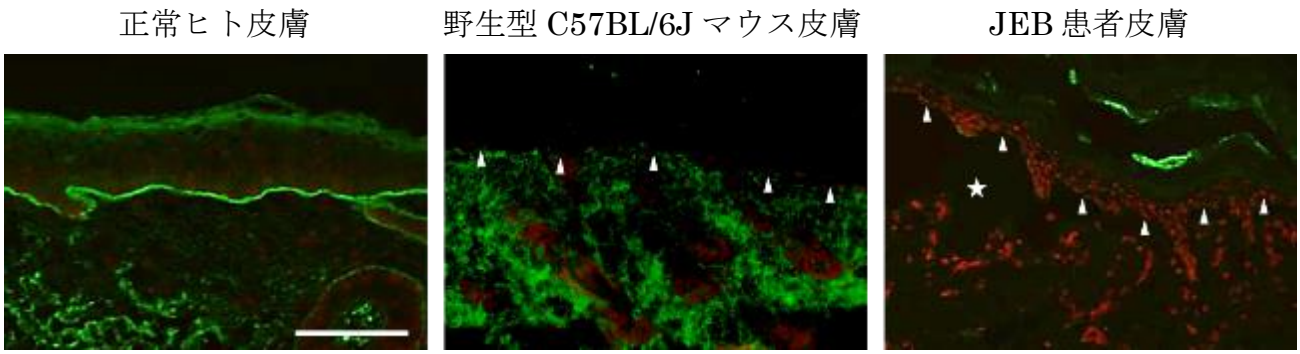

図 15　mAb hC17-ect15 のヒトおよびマウス皮膚に対する反応性

マウスおよび JEB 患者図中の矢頭は表皮真皮境界部を示す。JEB 患者では表皮真皮間結合が一部離開し、水疱（★）を形成している。mAb hC17-ect15 は正常ヒト皮膚のみに反応している。スケールバー 100μm。

正常人の皮膚を用いて二次抗体をマウス IgG サブクラスに対する抗体に変更して、mAb hC17-ect15 のサブクラスを同定した。その結果、mAb hC17-ect15 は IgG1 サブクラスであることが分かった（図 16）。

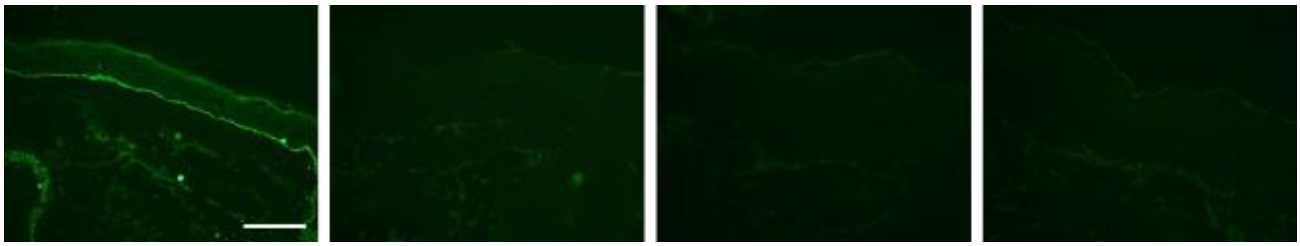

図 16　mAb hC17-ect15 のサブクラス同定

二次抗体をマウス IgG サブクラスに変更した。IgG1 に対する二次抗体でのみ、表皮真皮結合への mAb hC17-ect15 の染色を認める。スケールバー 100μm。

5　mAb hC17-ect15 が標的とする抗原は皮膚基底膜部のみに存在する

既報告では全長 COL17 は表皮真皮結合部（基底膜部）のみでなく、基底細胞の側面や上面にも存在することが知られている [33,37]。2 の結果で示したように切断された COL17 を特異的に認識する mAb hC17-ect15 と全長 COL17 を認識する mAb 1A8c を用いて COL17 の染色性を詳細に比較検討したところ、既報告と同様、mAb 1A8c は表皮真皮結合部に加えて、基底細胞の細胞質にも染色性を認めた。一方 mAb hC17-ect15 は、表皮真皮境界部にのみ線状の染色性を示した（図 17）。以上の結果から、生理的に切断された COL17 は基底膜部のみに存在することが示唆された。

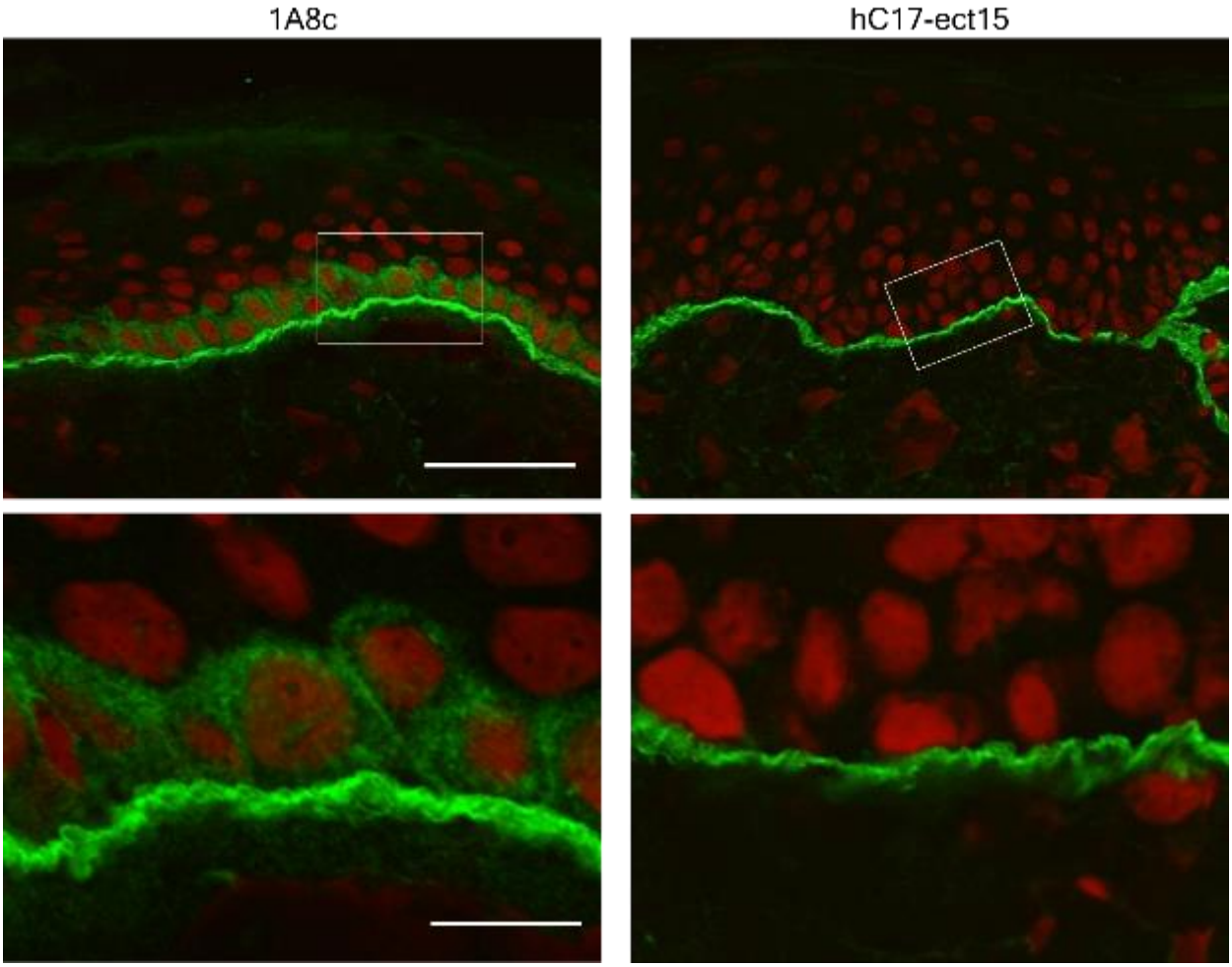

図 17　mAb hC17-ect15 の正常ヒト皮膚における染色性

正常人の皮膚を 1A8c および mAb hC17-ect15 を一次抗体として、免疫染色を行った。上段のスケールバーは 50μm、下段のスケールバーは 15μm。

6　mAb hC17-ect15 はヒト COL17 の 15 番目コラーゲン領域を認識する

6-1　mAb hC17-ect15 の抗体結合部位（エピトープ）を同定するため、全長 COL17 および C 末端が切断された 4 つのタンパクを用いて Western blotting を行った。リコンビナントタンパクの細胞内ドメインの N 末端に付加されている DDDDK タグに対する抗体は、5 つのタンパクすべてに反応したが、mAb hC17-ect15 は全長 COL17 および COL17（Δ1-2）に対して反応せず COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14）と反応した。一方、mAb BMM62 は 15 番非コラーゲン領域よりも C 末端に抗体結合部分を持つ抗体であり、全長 COL17 から COL17（Δ1-2）、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）まで同様の親和性を示した（図 18）。

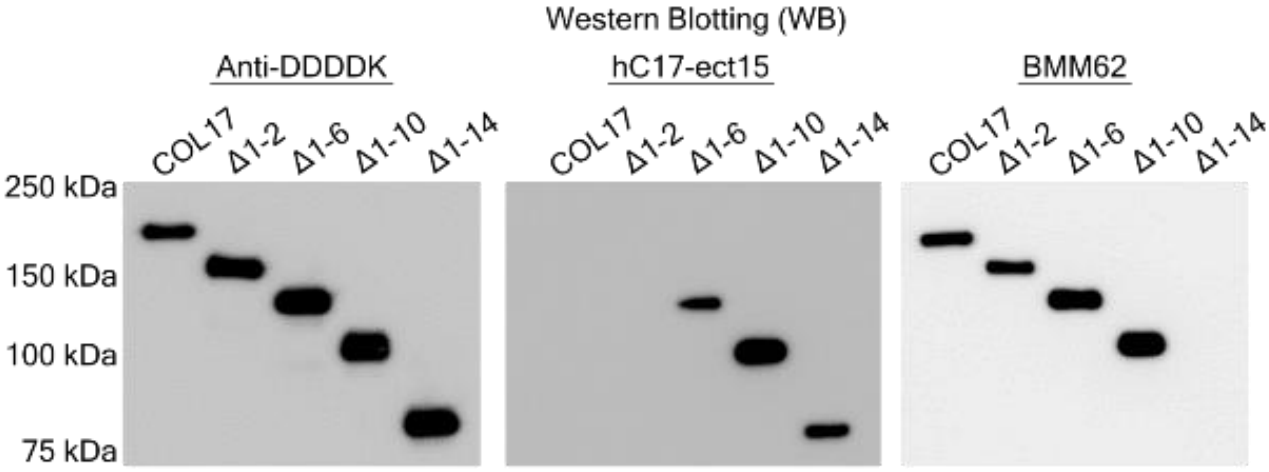

図 18　C 末端切断 COL17 に対する mAb hC17-ect15 の反応性

全長 COL17、および C 末端が切断された 4 つのタンパクに対する Western blotting の結果を示す。DDDDK タグ抗体はすべてのタンパクに結合し、mAb hC17-ect15 は全長 COL17 および COL17（Δ1-2）には反応せず、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14）と反応した。

6-2　ここまでの結果から、細胞内を欠損した LAD-1、LABD97 また C 末端を欠損させた COL17（Δ1-14）に Western blotting で反応し、ヒト COL17-NC16A ドメインに対する ELISA で反応しないことから mAb hC17-ect15 のエピトープが 15 番コラーゲン領域の可能性が高いことが推察された。そこで 15 番コラーゲン領域の断片を大腸菌で GST 融合タンパクとして作成した。GST 融合タンパクは抗 GST 抗体を 1 次抗体としてタンパクの産生を確認したところ、N1 と N6 は発現を確認できなかったが、N2, 3, 4, 5, 7 は発現されていた（図 19、左）。作成した 15 番コラーゲン領域を断片化した GST 融合タンパクを用いて Western blotting を行った（図 19、中）。しかし、mAb hC17-ect15 は、いずれにも反応しなかった（図 19、右）。この結果から mAb hC17-ect15 は、大腸菌由来のタンパクでは生じない立体構造に伴うエピトープを認識している可能性を考えた。

図 19　15 番コラーゲン領域のペプチド断片用いた Western blotting

（左）大腸菌にて産生されたタンパクのクマシーブルー染色。

△ GST のみ（約 25kDa）　▲ GST 融合タンパク

（中）各タンパクの抗 GST 抗体による Western blotting。

（右）mAb hC17-ect15 は大腸菌にて作成した 15 番コラーゲン領域を断片化したタンパクには反応しなかった。

6-3　合成ペプチドでは詳細なエピトープの同定ができなかったため、更に 15 番コラーゲン領域の 236 塩基（78 アミノ酸）に相当する部位を短くしたリコンビナント COL17（Δ1-14)s（Met^{1} から Ala^{738}）を HEK293 細胞で作成した。Western blotting では 15 番コラーゲン領域の一部を削っても、mAb hC17-ect15 は反応を認めた（図 20)。ここまでの結果から、mAb hC17-ect15 のエピトープは NC16A より C 末端の Gly^{567} から Ala^{738} の間にあると同定できた。

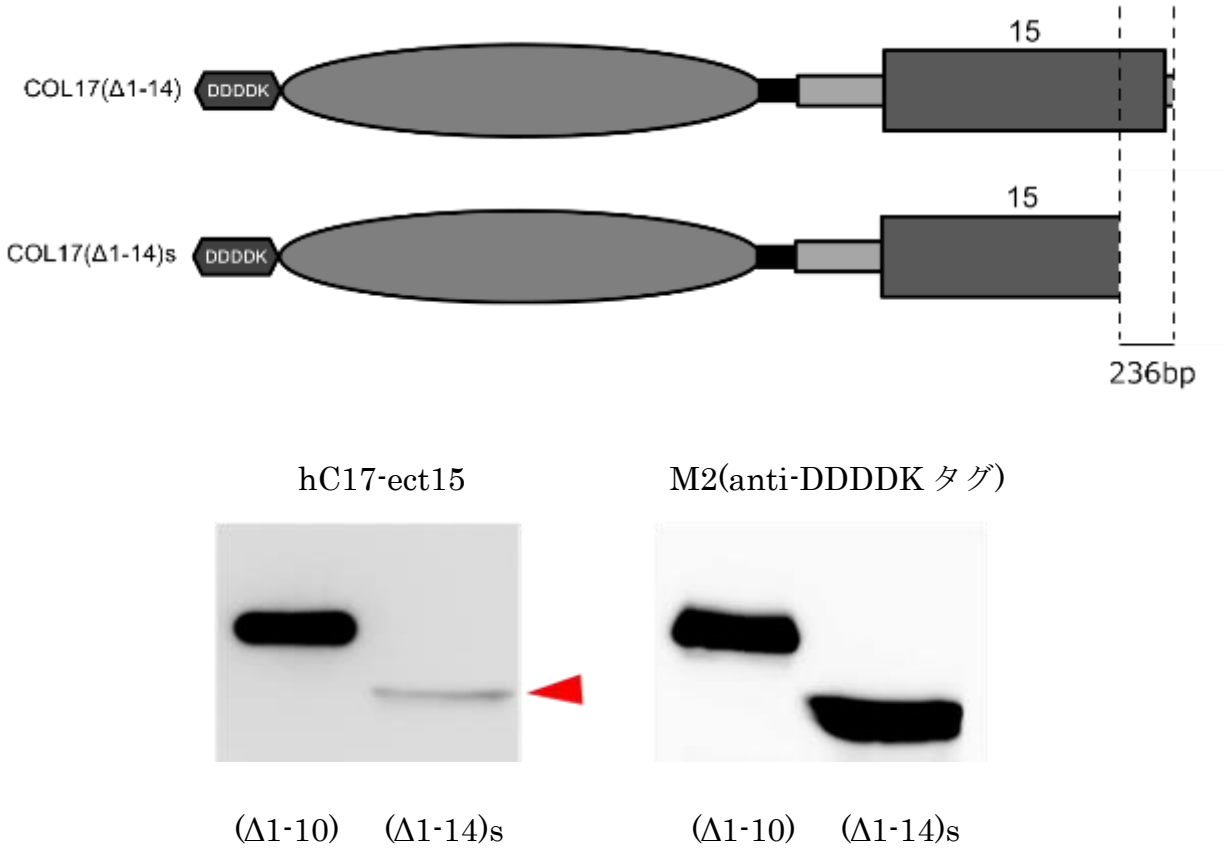

図 20　15 番コラーゲン領域の一部を短くした COL17 を用いた Western blotting

（上）COL17（Δ1-14）からさらに C 末端を 236 塩基（78 アミノ酸）短くした COL17　(Δ1-14)s を作成した。

（下）COL17（Δ1-10）と COL17　(Δ1-14)s 両方に mAb hC17-ect15 は反応した。

6-4　ここまでの結果で mAb hC17-ect1 のエピトープは、15 番コラーゲン領域の N 末端付近であることが示唆された。さらに詳細にエピトープの同定を試みた。15 番コラーゲン領域のヒトとマウスの相同性を比較したところ、N 末端側の一部の相同性が低いことが判明した（図 9)。そこでマウスの 13 番コラーゲン領域の一部（Asp^{652} から Pro^{691}）をヒトの 15 番コラーゲン領域の一部（Glu^{645} から Leu^{684}）と置き換えた部分的ヒト化 COL17 リコンビナントタンパクを作成した（図 10)。

マウスの COL17 の NC14A を標的とする Mo-NC14A 抗体は、マウス COL17、プラスミン処理した LAD-1 および LABD97 いずれにも反応を示した（図 21、左上)。また、部分的ヒト化 COL17 に対してもプラスミン処理の有無にかかわらず認識した（図 21、左下)。一方、mAb hC17-ect15 はマウス COL17 には一切反応せず（図 21、右上)、部分的ヒト化 COL17 のプラスミン処理した LAD-1 および LABD97 のみを認識した（図 21、右下)。このことから、置き換えられたヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域の一部分に mAb hC17-ect15 のエピトープが存在していることが確認された。また、mAb hC17-ect15 は全長の部分的ヒト化 COL17 は認識せず切断された COL17 のみ認識する点は、これまでの実験結果と矛盾していなかった。

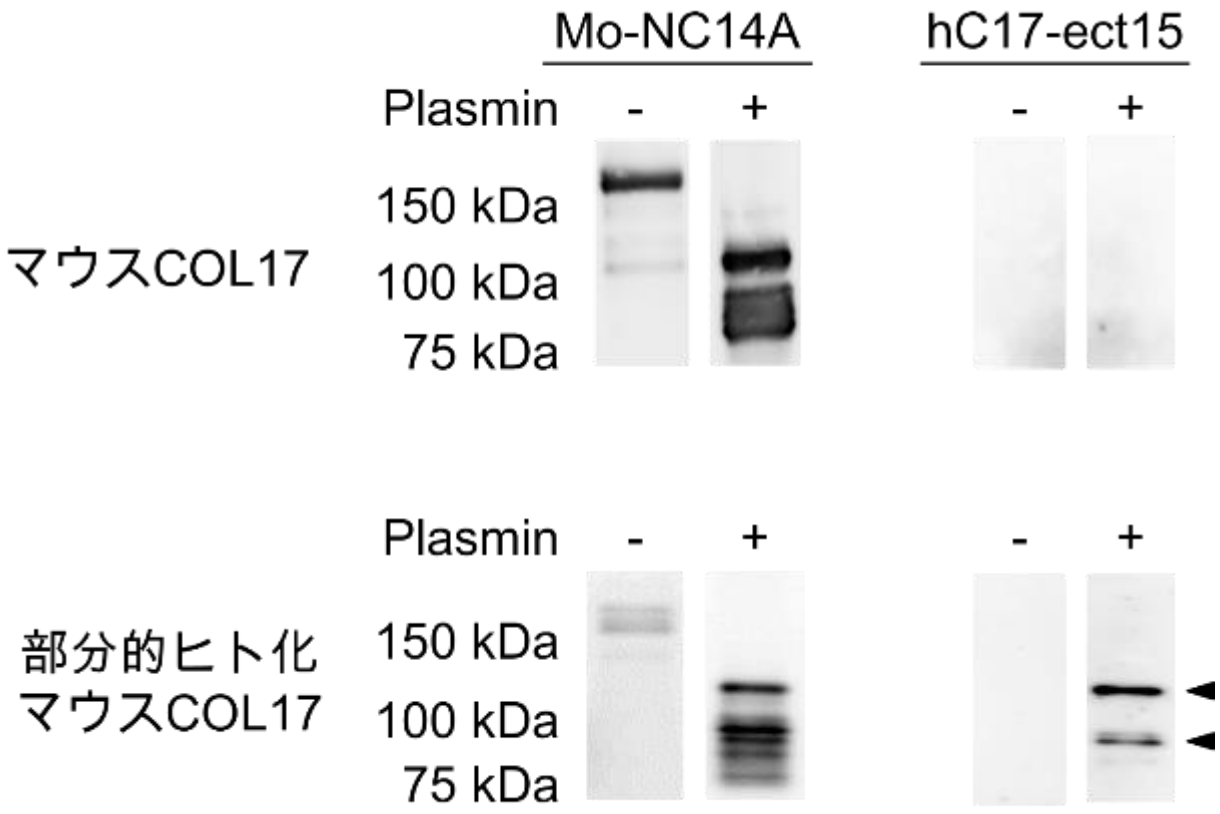

図 21　部分的ヒト化 COL17 を用いた Western blotting

（上）マウス COL17 のプラスミン処理前後のタンパクを基質とし、Mo-NC14A と mAb hC17-ect15 を用いた Western blotting。Mo-NC14A は全長マウス COL17 およびプラスミン処理 LAD-1、LABD97 すべてに反応するが、mAb hC17-ect15 はマウス COL17 には全長、プラスミン処理いずれにも反応しない。

（下）部分的ヒト化 COL17 およびプラスミン処理した場合、Mo-NC14A は同じく全長マウス COL17 およびプラスミン処理 LAD-1、LABD97 すべてに反応するが、mAb hC17-ect15 はマウス COL17 には全長に反応せず、プラスミン処理した LAD-1、LABD97 のみに反応した。

7　COL17 C 末端部の切断は 15 番コラーゲン領域に neoepitopes を生じる

ここまでの結果から、mAb hC17-ect15 はヒト COL17 の 15 番コラーゲン領域の（Glu^{645} から Leu^{684}）にエピトープがあることが証明された。

6-1 と 6-2 の結果、切断端より離れた領域にエピトープが出現することおよび大腸菌産生タンパクとは結合しないことから mAb hC17-ect15 は立体構造に伴うエピトープを認識している可能性が示唆された。しかし、一般的に SDS などの強い還元条件下でタンパクは立体構造を失い、理論上 Western blotting で立体構造に伴うエピトープは検出できないと考えられる。

7-1 そこで、立体構造が保持される免疫沈降法と ELISA 法にて検証した。全長の COL17 および、C 末端が切断された 4 つのリコンビナントタンパク、COL17（Δ1-2）、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14）に対して、免疫沈降法と ELISA 法で mAb hC17-ect15 の親和性を確認し、Western blotting との結果に相違があるかどうかを確認した。各 COL17 タンパクを mAb TS39-3、hC17-ect15、mIgG1 で免疫沈降後、抗 DDDDK タグ抗体で沈降されたタンパクを Western blotting にて検出したところ、mAb hC17-ect15 は、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14）と効率の良い免疫沈降反応が見られた。一方、全長 COL17 や COL17（Δ1-2）とは反応性は低かった（図 22）。一方、mAb TS39-3 は、切断の有無に関わらずいずれのタンパクとも結合性を示した。

また、結果 1 の LAD 患者自己抗体の検討で興味深いことに、No.2、5、7、10 の LAD 患者自己抗体は LAD-1 に比べ、LADB97 により強い結合を示した。LABD97 は 120kDa の LAD-1 がさらに C 末端の NC4 で切断されたものであり [40]、C 末端切断されることにより neoepitopes が出現した。つまり、一部の LAD 患者自己抗体においても mAb hC17-ect15 同様に、C 末端切断により生じた立体構造エピトープを認識する可能性がある。

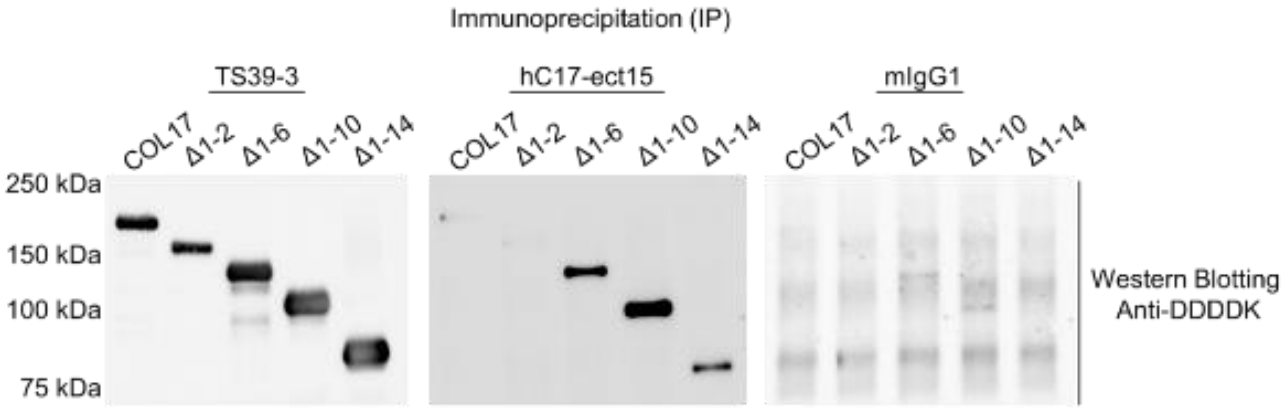

図 22　C 末端切断 COL17 を用いた免疫沈降法

全長 COL17、C 末端を徐々に短くした COL17 に対して、mAb TS39-3、hC17-ect15、mIgG1 で免疫沈降を行い、抗 DDDDK タグ抗体で Western blotting を行った。

7-2　続いて、全長 COL17 と C 末端が切断されたタンパクを基質として ELISA 法を行った。今回得られた 11 種類のハイブリドーマの中から、NC16A の ELISA にて反応した mAb NC16A-4 と反応しない mAb hC17-ect15 を使用し、また、mAb TS39-3 および BMM62 を比較のため用いた。免疫沈降法の結果同様に、mAb hC17-ect15 は C 末端が切断されたリコンビナント COL17 で濃度依存性に高い Optical density（OD）値を示し、全長 COL17 ではやや低い OD 値を示した（図 23）。mAbs TS39-3 や BMM62 は、C 末端切断の有無に関わらず全長 COL17 に対する同様の親和性を示していた。一方、mAb NC16A-4 は全長にはある程度の反応性を示したが、C 末端が切断された COL17 には明らかな反応性を認めなかった。

この結果は、C 末端切断により新たな抗体結合部分が出現する mAb hC17-ect15 のような抗体が存在する一方で、C 末端切断は抗体結合部分に一切影響を与えない抗体 mAbs TS39-3、BMM62 のような抗体、さらに C 末端切断によってむしろ抗体の親和性が著しく低下するような mAb NC16A-4 が存在することが明らかになった。

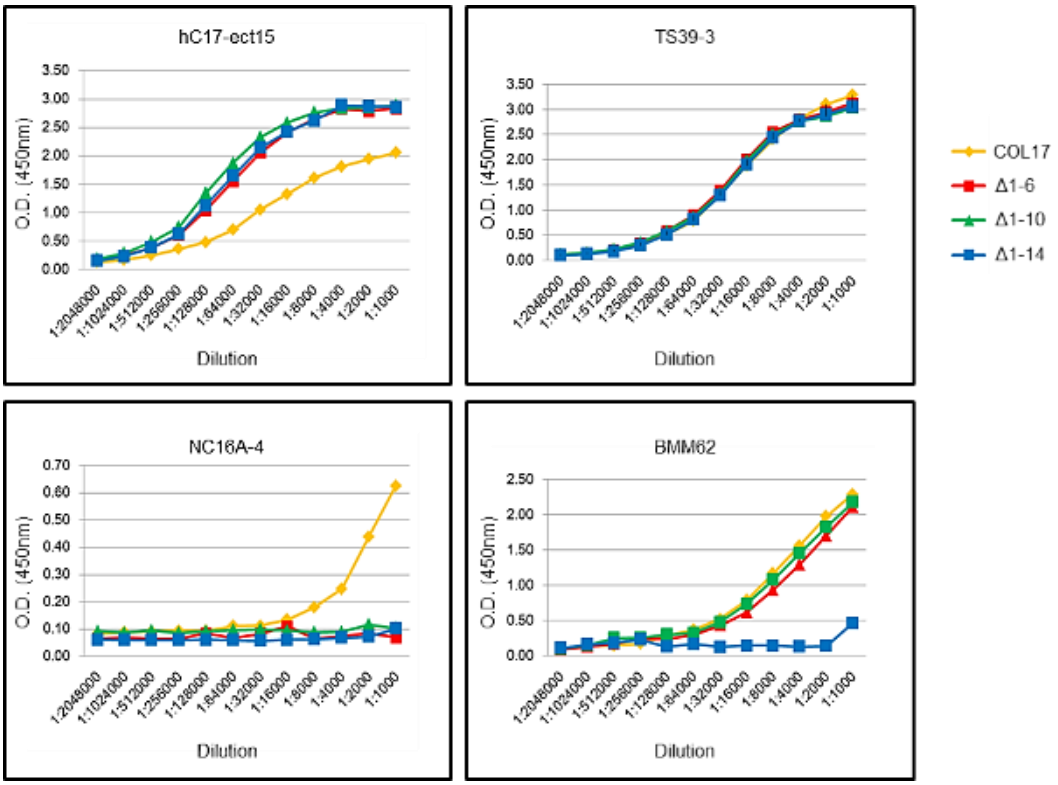

図 23　C 末端切断 COL17 を用いた ELISA 法

全長 COL17、C 末端を徐々に短くした COL17 に対して、mAb TS39-3、hC17-ect15、NC16A-4、BMM62 で ELISA 法を行った。

8　LAD 患者自己抗体は C 末端切断により生じる neoepitopes を標的にする

mAb hC17-ect15 は Western blotting で COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14）に対し強い反応を示したことは免疫沈降法でも同様に認められ、これらの結果から、C 末端を切断した COL17 に対する Western blotting と免疫沈降法の結果は相関性が認めた。このことは Western blotting においても C 末端の切断にともなう構造変化が保持されていることが示唆された。

そこで、LAD 患者の血清 6 名を用い COL17 のリコンビナントタンパクとの反応性を Western blotting で確認した。自己抗体の反応性は全長 COL17 および、ほとんどの C 末端が切断された COL17（Δ1-14）には非常に弱い反応しか見られなかったのに対し、COL17（Δ1-2）、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）には強い結合性を示した（図 24）。これらの結果から、C 末端の切断により出現した neoepitopes が LAD 患者自己抗体の標的となりうることが示唆された。

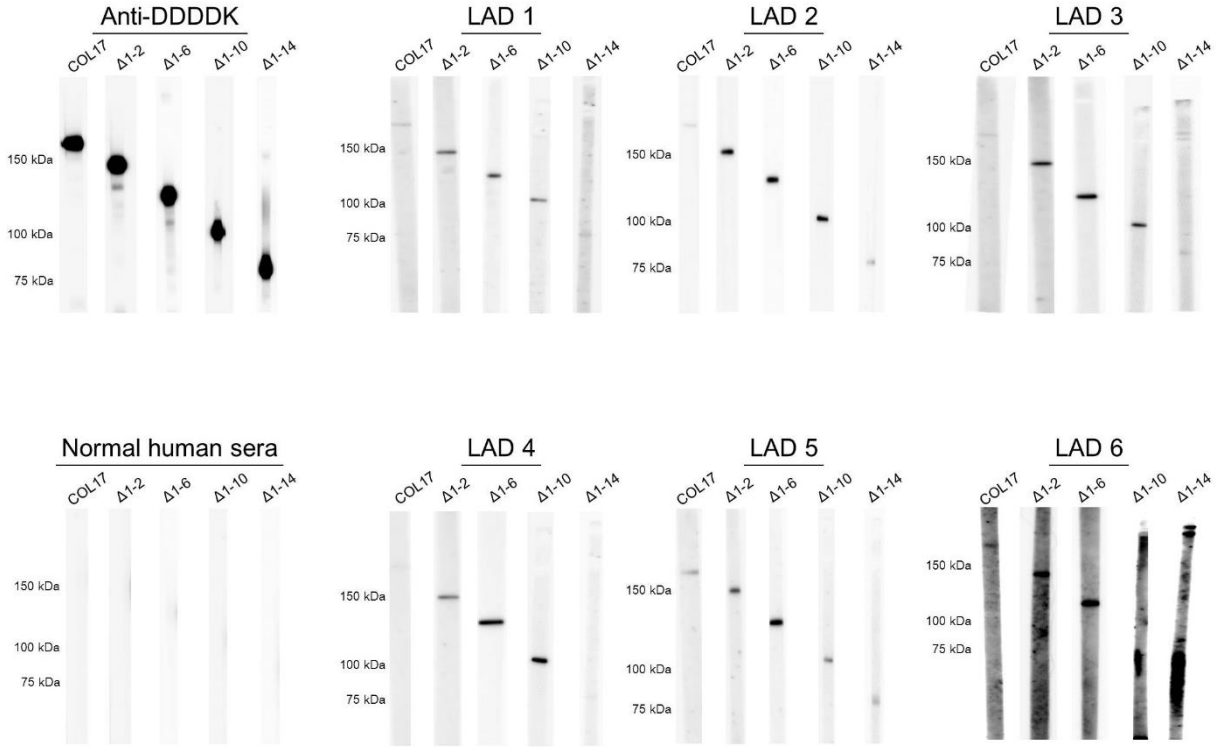

図 24　C 末端切断 COL17 に対する LAD 患者自己抗体の反応性

LAD に患者血清を用いた、全長 COL17、および C 末端が切断された 4 つのタンパクに対する Western blotting の結果。抗 DDDDK タグ抗体はすべてのタンパクに結合し、正常血清はいずれとも反応しない。LAD 患者自己抗体は全長 COL17 に対する反応が低下し、COL17（Δ1-2）、COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）に強く反応する。

9　C 末端が切断された COL17（Δ1-6）-ELISA は全長 COL17-ELISA より効率的に LAD の自己抗体を検出する

これまでの結果から、C 末端が切断されたリコンビナント COL17 を用いた ELISA は、LAD 患者自己抗体の検出に有用ではないかと仮説を立てた。

そこで、全長の COL17（Met[1] から Pro[1497]）および C 末端が切断された COL17（Δ1-6）（Met[1] から Arg[1174]）を ELISA の基質として用い、LAD-1 もしくは LABD97 に反応性を示した 9 人の LAD 患者血清と正常人の血清を対象として検証した。その結果、LAD 患者血清は正常人の血清と較べ、全長 COL17、リコンビナント COL17（Δ1-6）いずれにも高い反応性を示した（図 25、左と中）。LAD 患者自己抗体の全長 COL17 への反応性と COL17（Δ1-6）への反応性を比較したところ、COL17（Δ1-6）への反応性が有意に高かった（p=0.017）（図 25、右）。

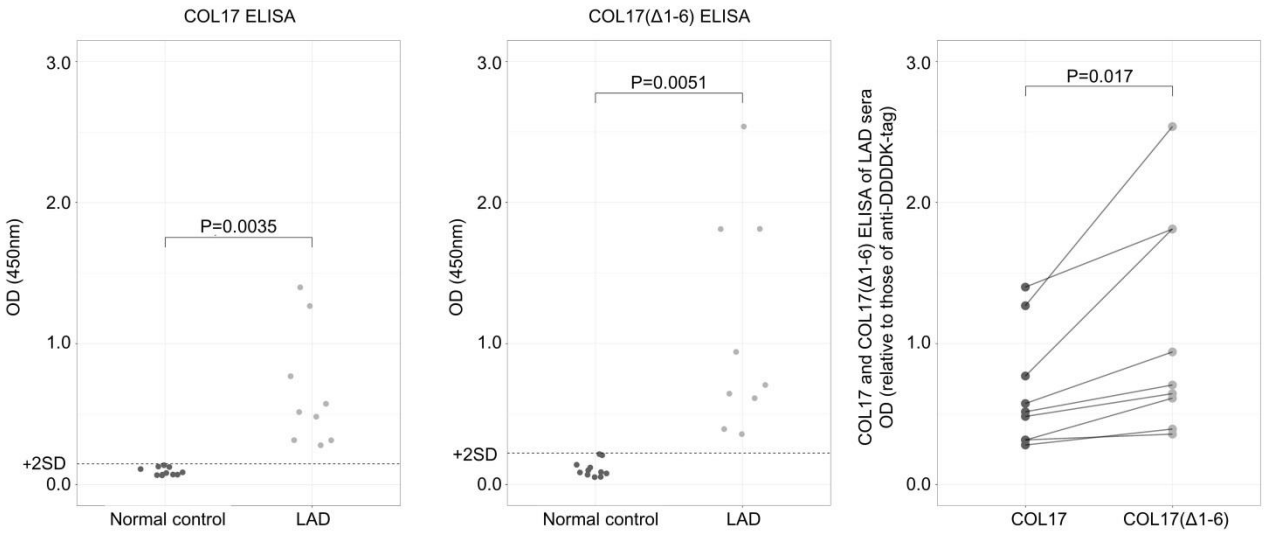

図 25　COL17（Δ1-6）と全長 COL17 を用いた ELISA 法による LAD 患者自己抗体の検出

LAD 患者血清は、健常人と比較していずれのタンパクを基質としても OD の上昇を認めた（左：全長 COL17、中：COL17（Δ1-6））。

（右）OD の上昇は、COL17（Δ1-6）を用いた ELISA で有意に高かった（p＝0.017）。

10　mAb hC17-ect15 は NHEKs の COL17 発現量に影響しない

作成した LAD 患者自己抗体と類似した性質を持つ mAb hC17-ect15 が、LAD 患者自己抗体と同様に病原性を示すか *in vitro* と *in vivo* で検証した。

10-1　mAb hC17-ect15 および TS39-3 の皮膚に対する染色性の違いを比較

最初に、mAb hC17-ect15 および mAb TS39-3 の正常ヒト皮膚への反応性について検証した。1 mg/ml のそれぞれの抗体を段階希釈し、蛍光抗体間接法にて抗体価を測定したところ、いずれの抗体も 40000 倍希釈まで正常ヒト皮膚に反応した（図 26）。以上の結果からいずれの抗体も組織への沈着は同程度であることを確認した。

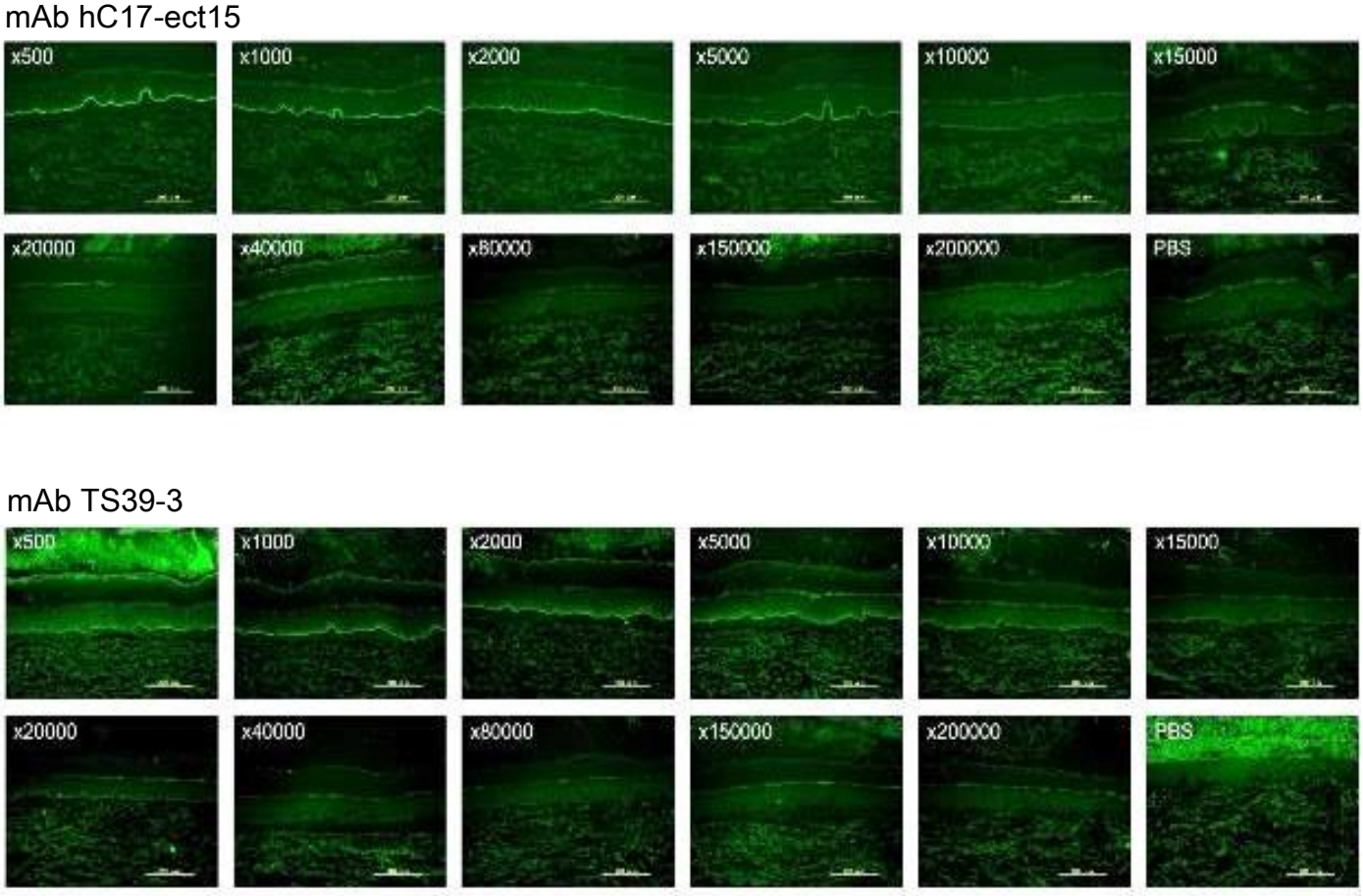

図 26　hC17-ect15 および TS39-3 の正常皮膚に対する染色性

一次抗体を段階希釈した mAb hC17-ect15 および mAb TS39-3 を用いて、二次抗体を Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体にて検出した。

10-2　mAb hC17-ect15 を培養 NHEKs へ投与しても COL17 発現量は変化しない

BP では、患者自己抗体を NHEKs に添加すると COL17 に結合後、細胞内に取り込まれて分解され、COL17 の発現量が減少することが報告されている [50–52]。この COL17 の減少が BP の病態に関与していると考えられているため、mAb hC17-ect15 を NHEKs に添加した際の COL17 発現量の変化を検証した。その結果、病原性を有する NC16A を標的とする mAb TS39-3 は、添加から 1.5 時間から明らかな COL17 の減少を認めた。一方、mAb hC17-ect15 は未刺激の NHEKs や正常マウス IgG1 と同様に COL17 量に全く影響を与えなかった（図 27）。以上の *in vitro* の結果から、mAb hC17-ect15 は病原性がない可能性が示唆されたため、続いて *in vivo* での検証を行った。

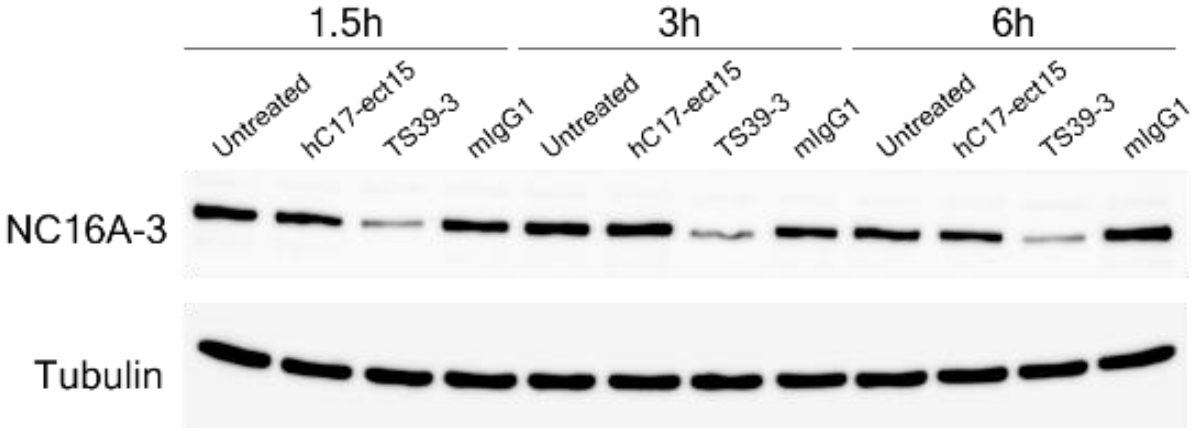

図 27　mAb hC17-ect15 刺激による NHEKs の COL17 量的変化

40%コンフルエントの NHEKs に mAb hC17-ect15、TS39-3、正常マウス IgG1（mIgG1）にて 1.5－3－6 時間刺激をした。細胞溶解液を回収し、Western blotting で COL17 の量を比較した。COL17 は NC16A-3 で検出、Tubulin：内部コントロール。

11　mAb hC17-ect15 はマウスに投与しても病原性を示さない

自己免疫性水疱症の自己抗体の病原性を確認する手段として、マウスに投与し皮膚の脆弱性を確認する方法がある[31,47,53]。しかし、mAb hC17-ect15 はヒト COL17 を特異的に認識するため、野生型マウス（C57BL/6J）に投与しても抗体が反応しない。そこで、COL17 ヒト化マウス[31]に投与して mAb hC17-ect15 の病原性を検証した。

11-1　至適抗体投与量の決定

至適抗体投与量を検討するため、COL17 ヒト化マウスに 25-50-100μg の mAb TS39-3 抗体を耳介へ投与し脆弱性を評価した（図 28）。50μg で脆弱性が観察されたため、投与量は 1 箇所あたり 50μg とした。

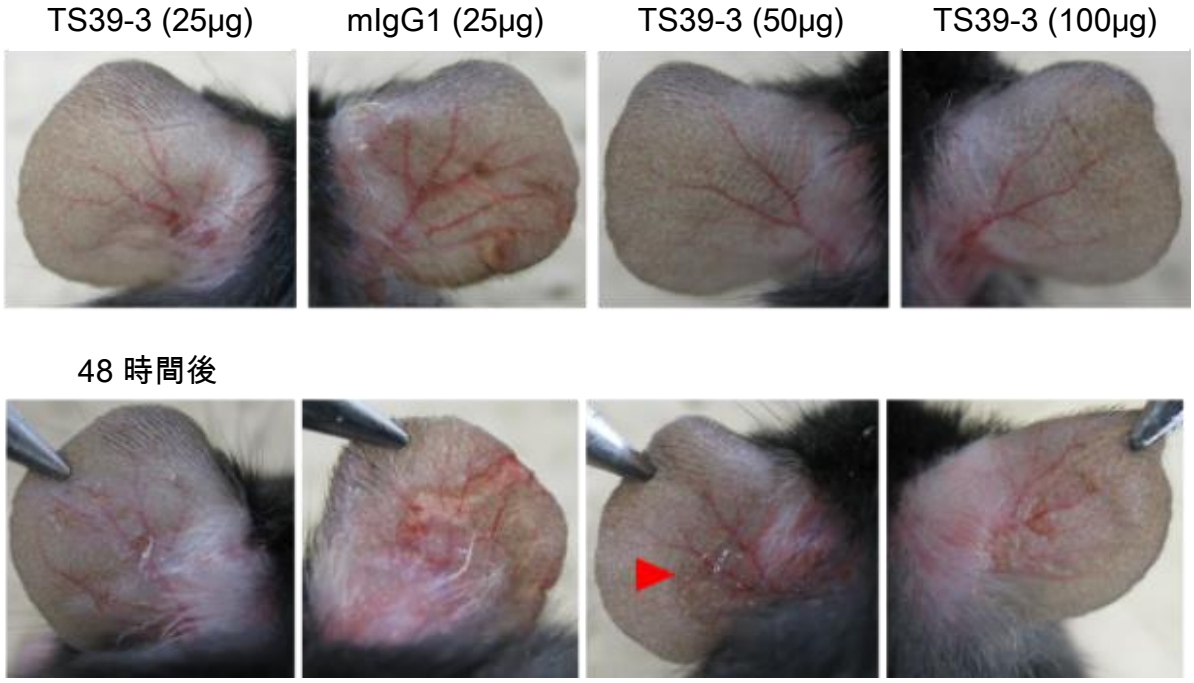

図 28　陽性コントロール mAb TS39-3 の至適投与量の評価

抗体投与後 48 時間において、50μg と 100μg 投与したマウスで明らかな皮膚の脆弱性を認めた。

11-2　mAb hC17-ect15 は皮膚脆弱性をきたさない

決定した至適投与量に基づき mAb hC17-ect15 （mAb TS39-3 の倍量の 100 μg / 箇所）、TS39-3 （50 μg/箇所）、mIgG1 抗体 （陰性コントロール、50 μg/箇所）を COL17 ヒト化マウスの耳介に皮下投与したところ、病原性を有する mAb TS39-3 のみ表皮の脆弱性を引き起こしたが [47]、mAb hC17-ect15 では脆弱性は観察できなかった（図 29、上）。マウスの耳介を採取して蛍光抗体直接法で抗体の沈着を確認したところ、TS39-3 および mAb hC17-ect15 いずれも表皮真皮結合への線状の集積が確認された（図 29、下）。マウスの IgG1 コントロール抗体でも陽性の反応が見られたのは、既報告の通り抗体を局所に高圧で注入したことによるものと考えられた [54]。このことから、mAb hC17-ect15 は組織に病原性を持たず、*in vitro* の結果と一致した。

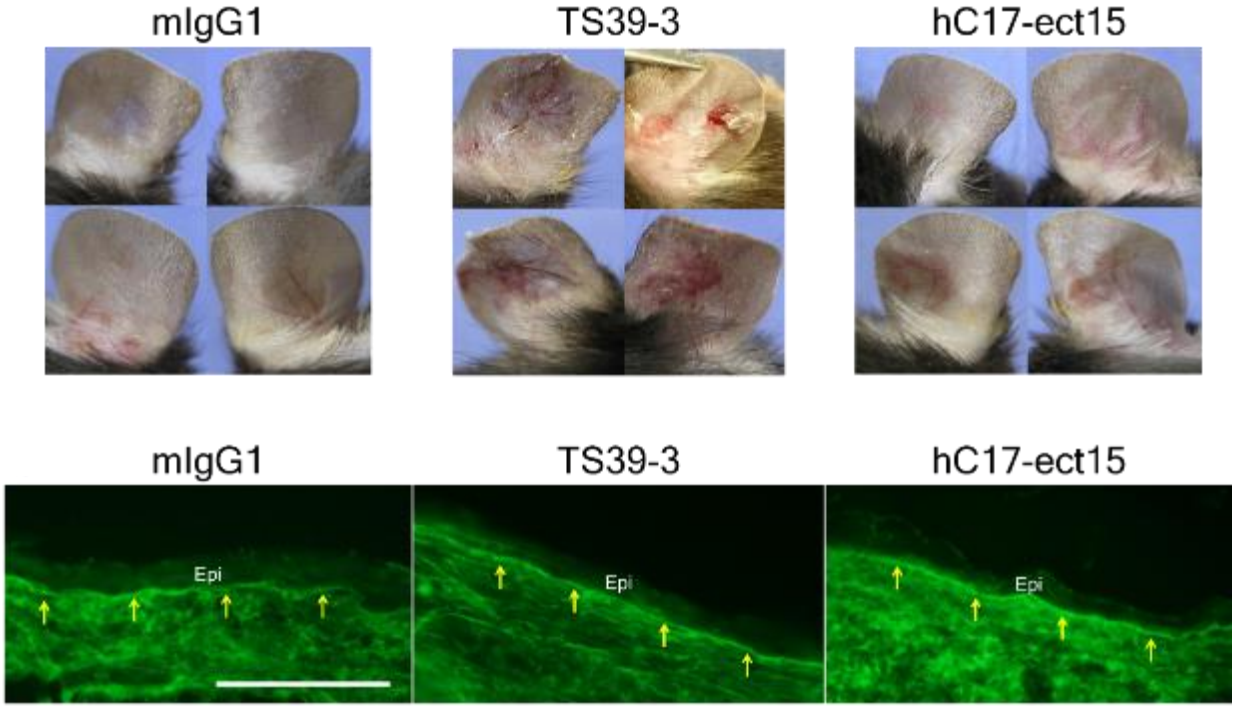

図 29　mAb hC17-ect15 の病原性を COL17 ヒト化マウスで検証

（上）mAb TS39-3 では皮膚の脆弱性が観察されたが、mAb hC17-ect15 では認めなかった。

（下）いずれも蛍光抗体直接法にて表皮真皮境界部に抗体の沈着を認めた（矢印）。スケールバー：100μm。Epi：表皮。

考察

本研究を通し、LAD 患者自己抗体が COL17 の C 末端部が切断され出現する neoepitopes を標的とすることを明らかにした。LAD 患者自己抗体はポリクローナル抗体であるため、過去の報告では COL17 の様々な領域を認識しうると報告されており、neoepitope の発生機序は殆ど解明されていなかった [18,41,42] 。今回、LAD 患者自己抗体によく似た特徴を持つ mAb hC17-ect15 を作製したことで、NC16A 内の切断だけではなく、C 末端切断でも 15 番コラーゲン領域に neoepitopes が出現しうることを初めて解明できた。特筆すべき点として、neoepitopes が生じた 15 番コラーゲン領域は、NC16A や C 末端から遠く離れた部位であることが挙げられる。この結果は、C 末端領域に生じた部分的な切断が、COL17 にダイナミックな構造変化を引き起こし、広範囲に渡り neoepitopes を生じ得ることを示唆している。今回の研究は、mAb hC17-ect15 と同じ 15 番コラーゲン領域の neoepitopes を標的とする LAD 患者自己抗体を特定するものではないが、LAD 患者自己抗体の主な抗体結合部分が 15 番コラーゲン領域に存在しているという過去の報告と相違ない [42]。

LAD 患者自己抗体が、全長の COL17 より切断されたタンパクである LAD-1 や LABD97 に対して高い親和性を示すことは、過去の Western blotting 法を用いた検討で報告されている [8–11,17,41]。免疫沈降法においては結合反応の段階では、ドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulfate ; SDS）を含まないため立体構造が保持されていることは解釈可能だが、一般的な SDS-PAGE ではタンパク立体構造は消失し、一本鎖のタンパクとして泳動されると理解されている。そのため当初、なぜ LAD 患者自己抗体が Western blotting 法でも COL17 が切断され生じた LAD-1 と LABD-97 により高い親和性を示すのか疑問に感じた。今回の研究では、免疫沈降法だけでなく Western blotting 法でも mAb hC17-ect15 が C 末端切断を受けた COL17（COL17（Δ1-6）、COL17（Δ1-10）、COL17（Δ1-14））に親和性を示すことを発見した。同様に LAD 患者自己抗体も Western blotting 法で C 末端切断を受けた COL17（COL17（Δ1-2）、COL17（Δ1-16）、COL17（Δ1-10））に親和性を示していた。mAb hC17-ect15 は COL17 の 15 番コラーゲン領域にエピトープを持つことから、少なくとも 15 番コラーゲン領域では構造依存性の neoepitopes が出現すると予想される。SDS-PAGE でも neoepitope を同定することが可能であった機序の一つとして、ポリプロリン II ヘリックスのようなタンパク二次構造は、ジチオトレイトール（dithiothreitol ; DDT）や尿素、SDS といった強い還元条件下でも保存されていることが挙げられる [55,56]。ポリプロリン II ヘリックス様二次構造は、コラーゲンで特徴的とされており [57]、Western blotting においても一部タンパクにお

いては、特にコラーゲンでは二次構造が保持されいる可能性が高い。従って、COL17 の 15 番コラーゲン領域に生じた構造依存性の neoepitopes も還元条件下で保持され、Western blotting で検出できたと考えられた。一方、mAb hC17-ect15 は、免疫沈降法や ELISA 法といった還元剤は使用しない実験において、全長の COL17 に弱い反応性を示した。Western blotting では明らかな結合性は認めなかったことから、mAb hC17-ect15 が標的とするエピトープは、SDS を含む強い還元状態と自然な環境では若干異なることも予想された。

mAb hC17-ect15 を用いた免疫沈降法および Western blotting 法の結果から、C 末端が切断された COL17 の neoepitopes が SDS-PAGE 下でも保存されているという事実をつきとめた。この現象をもとに、LAD 患者自己抗体も同様に C 末端が切断された COL17 に生じた neoepitopes を標的にすることを明らかにした。興味深いことに、LAD 患者自己抗体は mAb hC17-ect15 とは強い親和性を示さなかった COL17（Δ1-2）とも強く結合していた。この結果は、mAb hC17-ect15 が認識する部位とは異なる neoepitopes が C 末端切断によって生じていることを示唆している。COL17 の 15 番コラーゲン領域は細胞外ドメインであることから [20]、LAD 患者自己抗体の標的となる他の neoepitopses も COL17 の色々な部分に生じている可能性がある。Neoepitopses に対する自己抗体産生機序の解明は、自己免疫疾患発症における免疫寛容の破綻がおきる機序の解明につながることが予想されるため、今後、詳細に検討していきたい。

本研究での画期的な臨床応用として、C 末端切断 COL17（Δ1-6）（Met^{1} から Arg^{1174}）を用いた ELISA 法により、効率よく LAD 患者自己抗体を検出できたことが挙げられる。これまで LAD 患者自己抗体の検出を目的として、HEK293 細胞で産生した 120kDa の COL17 細胞外ドメイン（LAD-1 タンパク）を基質として用いた ELISA 法の検討で、83.3%の LAD 患者自己抗体を同定可能であったと報告されている [58]。しかし、本手法は未だ実用化には至っていない。一方、BP の診断ツールとして市販化され、広く臨床応用されている COL17 の ELISA キットは、NC16A 領域を標的とする自己抗体を同定するものである。LAD 患者自己抗体のなかで NC16A 領域を標的とする割合は、約 20%程度と報告されており、大部分の患者自己抗体の同定は困難である [18]。さらに通常のキットは IgG 抗体を検出するものであるため、二次抗体を抗ヒト IgA 抗体に変更し条件検討を行う必要も伴う。Western blotting での自己抗体検出も可能であるが、基質タンパクである LAD-1 および LABD97 が必要となる上、特定の研究室でしか行えない検査法である。今回、本研究で確立した C 末端欠損 COL17 タンパクを用いた ELISA 法は、これら多くの問題点を解決するものであり、今後さらなる臨床応用と商品化も期待している。

LABD97 に対する IgA mAb を SCID マウスに移植したヒト皮膚の表皮基底層に投与した過去の検討では、移植皮膚片の基底膜領域に IgA の沈着と炎症反応が確認されているが [59]、LAD 患者自己抗体の病原性については未だ不明である。LAD は患者数が少ないため、実際に自己抗体を動物へ投与する実験は困難である。今回、LAD 患者自己抗体と類似した特徴を有する mAb hC17-ect15 を得たため、本抗体の病原性を *in vitro* と *in vivo* で評価した。*In vitro* の評価法として、病原性を持つ BP 患者自己抗体を培養 NHEKs に加えると、細胞膜表面の COL17 と結合後に免疫複合体として細胞内へ Macropinocytosis を介し取り込まれ、結果として COL17 発現量の減少を引き起こすことが報告されており [51]、この現象が表皮真皮境界部での裂隙形成に関与すると考えられている [60]。そこで mAb hC17-ect15 を培養 NHEKs へ投与し COL17 の量的変化を経時的に観察したところ、COL17 の発現量には特に有意な変化は認めなかった。COL17 の NC16A 領域を認識し病原性を有する mAb TS39-3 で刺激をした場合、COL17 の減少は観察されたため、*in vitro* での実験系では mAb hC17-ect15 の病原性は否定的と予想された。続いて *in vivo* の病原性を確認するために、mAb hC17-ect15 のマウスへの投与を検討したが、mAb hC17-ect15 はヒト COL17 を特異的に認識する抗体であり、マウス COL17 には反応しない。ヒトとマウス COL17 間の相同性の問題を解決するために COL17 ヒト化マウスを用いた [31]。COL17 ヒト化マウスでは、皮膚基底細胞にマウス COL17 は発現せず、ヒト COL17 を発現している。COL17 ヒト化マウスの皮下に mAb hC17-ect15 あるいは mAb TS39-3 を投与したところ、mAb TS39-3 では表皮の脆弱性が観察された一方、mAb hC17-ect15 は脆弱性や水疱形成といった病原性を示唆する所見は確認されなかった。以上の結果から、mAb hC17-ect15 の病原性は否定的と考えられた。しかし mAb hC17-ect15 は補体活性化能に乏しいマウス IgG1 mAb であるため、LAD 患者自己抗体と同様、異なるエフェクター機能を有するサブクラス（例：IgA mAb）では病原性が異なる可能性も予想される。そこで現在、マウス IgG1 である mAb hC17-ect15 を分泌するハイブリドーマを IgA へクラススイッチする目的で、変異誘導物質である ICR191[61] や CRISPR/CAS-9[62] を用い実験を進めている。今後、IgA へクラススイッチさせた mAb hC17-ect15 の病原性の解明を目指していきたい。

総括および結論

本研究では以下の新知見を得た。

1）LAD 患者自己抗体に類似した性質を持つ mAb hC17-ect15 の作製に成功し、この抗体はヒト COL17 の 15 番目のコラーゲン領域にエピトープを有する。

2）COL17 は C 末端部の切断に伴い、構造変化をきたし新たな抗原エピトープを生じる。

3）LAD 患者自己抗体は C 末端の切断をうけた COL17 に対して反応性を示し、切断により生じた立体構造に伴うエピトープを標的とする。

4）COL17 の C 末端を短縮したタンパクを用いた ELISA 法は、LAD 患者自己抗体の検出に有用である。

本研究では、COL17 の切断に伴い生じる新規エピトープが自己免疫疾患の発症に関与することを証明した。COL17 は切断に伴い立体構造の変化をもたらし、切断部位から離れた部位にも neoepitopes を生じうることを明らかとした。このことは、自己免疫疾患発症における免疫寛容の破綻がおきる機序の解明につながることが予想される。

また、今回作成した C 末端を短くした COL17 を用いた ELISA 法は、現在簡便な検出法のない LAD 患者自己抗体の検出システムとしての臨床応用が期待できる。

今後の課題として LAD 患者自己抗体の病原性の解明が残されている。今回作成した mAb hC17-ect15 抗体を更に応用し LAD の病態解明を進めていきたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室　清水　宏教授に、そして直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室　西江　渉准教授に心より感謝いたします。また、本研究にご協力いただきました当科の先生方、川崎医科大学皮膚科学　教授の藤本　亘先生、弘前大学大学院医学部研究科皮膚科学分野　教授の澤村　大輔先生、名古屋大学大学院理学研究科　講師の平子　善章先生、慶応義塾大学医学部皮膚科学教室　専任講師の山上　淳先生、JA 北海道厚生連札幌厚生病院 副院長の高橋　博之先生、そして、水疱性類天疱瘡、自己免疫性水疱症、その他の炎症性・良性腫瘍患者さん、健常人ボランティアの方々に深く御礼申し上げます。北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。とくに技術員の戸澤麻衣子さんと東寛子さんからは、多大なサポートをいただきました。最後に大学院生活の間に、心の支えとなった家族、主人の豊永拓哉と娘の絵莉彩にも感謝を申し上げます。

引用文献

1. Langan, S. M. *et al.* Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* **337,** a180 (2008).
2. Amber, K. T., Murrell, D. F., Schmidt, E., Joly, P. & Borradori, L. Autoimmune Subepidermal Bullous Diseases of the Skin and Mucosae: Clinical Features, Diagnosis, and Management. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* (2017). in press
3. Kershenovich, R., Hodak, E. & Mimouni, D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun. Rev.* **13,** 477–481 (2014).
4. Schmidt, E. & Zillikens, D. Pemphigoid diseases. *Lancet* **381,** 320–332 (2013).
5. Nie, Z. & Hashimoto, T. IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with C-terminus of BP180. *J. Invest. Dermatol.* **112,** 254–5 (1999).
6. Yasukochi, A., Teye, K., Ishii, N. & Hashimoto, T. Clinical and Immunological Studies of 332 Japanese Patients Tentatively Diagnosed as Anti-BP180-type Mucous Membrane Pemphigoid: A Novel BP180 C-terminal Domain Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Acta Derm. Venereol.* **96,** 762–7 (2016).
7. Calabresi, V. *et al.* Oral pemphigoid autoantibodies preferentially target BP180 ectodomain. *Clin. Immunol.* **122,** 207–13 (2007).
8. Marinkovich, M. P., Taylor, T. B., Keene, D. R., Burgeson, R. E. & Zone, J. J. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **106,** 734–738 (1996).
9. Zone, J. J., Taylor, T. B., Meyer, L. J. & Petersen, M. J. The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J. Invest. Dermatol.* **110,** 207–210 (1998).
10. Hirako, Y. *et al.* The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini. *J. Invest. Dermatol.* **121,** 1554–6 (2003).
11. Hofmann, S. C. *et al.* Plasmin Plays a Role in the In Vitro Generation

of the Linear IgA Dermatosis Antigen LADB97. *J. Invest. Dermatol.* **129,** 1730–1739 (2009).

12. Overall, C. M. & Blobel, C. P. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 245–257 (2007).
13. Canter, R. G., Penney, J. & Tsai, L.-H. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature* **539,** 187–196 (2016).
14. Puts, N. A. J., Wodka, E. L., Tommerdahl, M., Mostofsky, S. H. & Edden, R. A. E. Impaired tactile processing in children with autism spectrum disorder. *J. Neurophysiol.* **111,** 1803–1811 (2014).
15. Mort, J. S. & Buttle, D. J. The use of cleavage site specific antibodies to delineate protein processing and breakdown pathways. *Mol. Pathol.* **52,** 11–18 (1999).
16. Bigler, C., Schaller, M., Perahud, I., Osthoff, M. & Trendelenburg, M. Autoantibodies against complement C1q specifically target C1q bound on early apoptotic cells. *J. Immunol.* **183,** 3512–3521 (2009).
17. Zone, J. J., Taylor, T. B., Kadunce, D. P. & Meyer, L. J. Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J. Clin. Invest.* **85,** 812–820 (1990).
18. Zillikens, D. *et al.* Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP1801. *J. Invest. Dermatol.* **113,** 947–953 (1999).
19. Diaz, L. A. *et al.* Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J. Clin. Invest.* **86,** 1088–1094 (1990).
20. Giudice, G. J., Emery, D. J. & Diaz, L. A. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J. Invest. Dermatol.* **99,** 243–50 (1992).
21. Green, K. J. & Jones, J. C. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* **10,** 871–81 (1996).
22. Jones, J. C. R., Hopkinson, S. B. & Goldfinger, L. E. Structure and

assembly of hemidesmosomes. *BioEssays* **20,** 488–494 (1998).
23. McGrath, J. A. *et al.* Mutations in the 180–kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat. Genet.* **11,** 83–86 (1995).
24. Gatalica, B. *et al.* Cloning of the human type XVII collagen gene (COL17A1), and detection of novel mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet.* **60,** 352–365 (1997).
25. Franzke, C.-W., Tasanen, K., Schumann, H. & Bruckner-Tuderman, L. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol.* **22,** 299–309 (2003).
26. Fine, J.-D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70,** 1103–1126 (2014).
27. Schumann, H. *et al.* The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am. J. Pathol.* **156,** 685–95 (2000).
28. Giudice, G. J. *et al.* Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J. Immunol.* **151,** 5742–50 (1993).
29. Zillikens, D. *et al.* Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J. Invest. Dermatol.* **109,** 573–579 (1997).
30. Liu, Z. *et al.* Subepidermal blistering induced by human autoantibodies to BP180 requires innate immune players in a humanized bullous pemphigoid mouse model. *J. Autoimmun.* **31,** 331–8 (2008).
31. Nishie, W. *et al.* Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* **13,** 378–383 (2007).
32. Nishie, W. & Shimizu, H. [Novel animal models for bullous pemphigoid utilized by "humanization of autoantigen"]. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* **32,** 472–7 (2009).
33. Hirako, Y. *et al.* Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J. Biol. Chem.* **273,** 9711–9717 (1998).

34. Franzke, C.-W. *et al.* Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* **21,** 5026–5035 (2002).
35. Franzke, C.-W., Tasanen, K., Borradori, L., Huotari, V. & Bruckner-Tuderman, L. Shedding of Collagen XVII/BP180: STRUCTURAL MOTIFS INFLUENCE CLEAVAGE FROM CELL SURFACE. *J. Biol. Chem.* **279,** 24521–24529 (2004).
36. Franzke, C.-W., Bruckner-Tuderman, L. & Blobel, C. P. Shedding of Collagen XVII/BP180 in Skin Depends on Both ADAM10 and ADAM9. *J. Biol. Chem.* **284,** 23386–23396 (2009).
37. Nishie, W. *et al.* Ectodomain Shedding Generates Neoepitopes on Collagen XVII, the Major Autoantigen for Bullous Pemphigoid. *J. Immunol.* **185,** 4938–4947 (2010).
38. Nishie, W., Jackow, J., Hofmann, S. C., Franzke, C.-W. & Bruckner-Tuderman, L. Coiled Coils Ensure the Physiological Ectodomain Shedding of Collagen XVII. *J. Biol. Chem.* **287,** 29940–29948 (2012).
39. Franzke, C.-W., Bruckner, P. & Bruckner-Tuderman, L. Collagenous Transmembrane Proteins: Recent Insights into Biology and Pathology. *J. Biol. Chem.* **280,** 4005–4008 (2005).
40. Nishimura, M. *et al.* Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation. *Hum. Mol. Genet.* **25,** 328–339 (2016).
41. Yamauchi, T., Matsushita, S., Hashimoto, T. & Hirako, Y. Major cleavage-dependent epitopes for linear IgA bullous dermatosis are formed at the boundary between the non-collagenous 16A and collagenous 15 domains of BP180. *J. Dermatol. Sci.* **76,** 25–33 (2014).
42. Nie, Z. *et al.* IgA Antibodies of Linear IgA Bullous Dermatosis Recognize the 15th Collagenous Domain of BP180. *J. Invest. Dermatol.* **115,** 1164–1166 (2000).
43. Wojnarowska, F., Marsden, R. A., Bhogal, B. & Black, M. M. Chronic bullous disease of childhood, childhood cicatricial pemphigoid, and linear IgA disease of adults. A comparative study demonstrating clinical and immunopathologic overlap. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19,** 792–805 (1988).
44. Fortuna, G. & Marinkovich, M. P. Linear immunoglobulin A bullous

dermatosis. *Clin. Dermatol.* **30,** 38–50 (2012).
45. Izumi, K. *et al.* Autoantibody Profile Differentiates between Inflammatory and Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* **136,** 2201–2210 (2016).
46. Nishie, W., Kiritsi, D., Nyström, A., Hofmann, S. C. & Bruckner-Tuderman, L. Dynamic Interactions of Epidermal Collagen XVII with the Extracellular Matrix. *Am. J. Pathol.* **179,** 829–837 (2011).
47. Ujiie, H. *et al.* Bullous Pemphigoid Autoantibodies Directly Induce Blister Formation without Complement Activation. *J. Immunol.* **193,** 4415–4428 (2014).
48. Nishie, W. *et al.* Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *Am. J. Pathol.* **185,** 1361–1371 (2015).
49. Nakamura, H. *et al.* Analysis of the COL17A1 in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa and amelogenesis imperfecta. *Int. J. Mol. Med.* **18,** 333–7 (2006).
50. Wada, M. *et al.* Epitope-Dependent Pathogenicity of Antibodies Targeting a Major Bullous Pemphigoid Autoantigen Collagen XVII/BP180. *J. Invest. Dermatol.* **136,** 938–946 (2016).
51. Iwata, H. *et al.* IgG from Patients with Bullous Pemphigoid Depletes Cultured Keratinocytes of the 180-kDa Bullous Pemphigoid Antigen (Type XVII Collagen) and Weakens Cell Attachment. *J. Invest. Dermatol.* **129,** 919–926 (2009).
52. Hiroyasu, S. *et al.* Bullous Pemphigoid IgG Induces BP180 Internalization via a Macropinocytic Pathway. *Am. J. Pathol.* **182,** 828–840 (2013).
53. Liu, Z. *et al.* A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J. Clin. Invest.* **92,** 2480–8 (1993).
54. Tonra, J. R. & Mendell, L. M. Rabbit IgG distribution in skin, spinal cord and DRG following systemic injection in rat. *J. Neuroimmunol.* **80,** 97–105 (1997).
55. Rath, A., Davidson, A. R. & Deber, C. M. The structure of ?unstructured? regions in peptides and proteins: Role of the polyproline II helix in protein folding and recognition. *Biopolymers*

80, 179–185 (2005).

56. Lopes, J. L. S., Miles, A. J., Whitmore, L. & Wallace, B. A. Distinct circular dichroism spectroscopic signatures of polyproline II and unordered secondary structures: Applications in secondary structure analyses. *Protein Sci.* **23,** 1765–1772 (2014).
57. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* **78,** 929–958 (2009).
58. Csorba, K. *et al.* Development of an ELISA for sensitive and specific detection of IgA autoantibodies against BP180 in pemphigoid diseases. *Orphanet J. Rare Dis.* **6,** 31 (2011).
59. Zone, J. J., Egan, C. A., Taylor, T. B. & Meyer, L. J. IgA autoimmune disorders: development of a passive transfer mouse model. *J. Investig. dermatology. Symp. Proc.* **9,** 47–51 (2004).
60. Iwata, H. & Kitajima, Y. Bullous pemphigoid: role of complement and mechanisms for blister formation within the lamina lucida. *Exp. Dermatol.* **22,** 381–385 (2013).
61. Paizi, M., Zivion, D. & Spira, G. Use of mutagens to increase rate of immunoglobulin isotype switching of hybridoma cells. *Hybridoma* **14,** 85–90 (1995).
62. Cheong, T.-C., Compagno, M. & Chiarle, R. Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system. *Nat. Commun.* **7,** 10934 (2016).