

加齢に伴う皮膚17型コラーゲン切断動態の解析

北海道大学病院皮膚科

西 江 渉

Bullous pemphigoid (BP) is the most common autoimmune blistering disorder, which affects elderly. IgG autoantibodies from BP patients target the transmembrane collagen XVII (COL17), a major component of hemidesmosomes in basal keratinocytes. Hemidesmosomes plays a vital role for keeping stable adhesion between the dermis and the epidermis, thus, autoimmunity to COL17 results in blistering phenotype. However, the pathogenesis for breaking the tolerance to COL17 is still uncertain. The major epitopes for IgG autoantibodies from BP patients are clustering within the juxtamembranous non-collagenous (NC) 16A domain, and interestingly, extracellular domain of COL17 is physiologically cleaved within the NC16A domain. In addition, certain autoantibodies from BP patients preferentially react with the shed ectodomain but not with the full-length form. Furthermore, cleavage of COL17 can induce neoepitopes around the cleavage-sites on the NC16A domain. These findings suggest the ectodomain shedding of COL17 is closely related with the development of autoimmunity to COL17, and non-physiological ectopic cleavage of the molecule due to aging may be related with the autoimmunity development. To address these issues, we tried to identify non-physiological cleavage sites within the NC16A domain and to produce a novel cleavage site-specific antibody which can detect the non-pathological cleavage site. We first identified Ser⁵⁰⁸ to be N-terminal cleavage site of COL17 ectodomain which is cleaved by plasmin, a potential serine protease expressing in lesional skin as well as blister fluid of BP. Second, we generated rabbit antibodies which specifically target pathological N-terminal cleavage site of cleaved COL17 ectodomain by immunizing short peptides corresponding to the identified cleavage site. The antibody demonstrated that COL17 is cleaved at Ser⁵⁰⁸ in lesional skin of some BP patients, however, the cleavage was not observed physiological setting even aged skin.

1. 緒 言

水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP) は、高齢者に好発し、自己免疫性水疱症のなかで最も頻度の高い疾患である。BP患者IgGの多くは、表皮真皮境界部に存在する17型コラーゲン (COL17) の細胞膜近傍のNC16A領域に強く反応する。近年、申請者らはCOL17のNC16A領域内でCOL17の細胞外領域が生理的に切断され、切断後に新しい抗原エピトープが生じることを明らかにした¹⁾。従って、COL17の切断は、BPにおける自己抗体の発症に大きく関与することが予想されるが、その病態生理は未だ十分に解明されていない。生理的な条件下では、COL17はADAM9、10、17によってNC16Aドメイン内の複数個所で切断されるが^{2,3)}、申請者らは、BPの水疱内容液中に含まれるセリンプロテアーゼによって生理的切断部とは異なる部位で切断を受ける可能性を示した¹⁾。しかし、実際のBP病変部で、生理学的切断部位と異なる部位でCOL17が切断されているかは不明である。一方、BPの病変部では、プラスミンの発現が亢進していることが知られており⁴⁾、実際に、プラスミンがCOL17の細胞外領域をNC16Aド

メイン内で切断することも報告されている⁵⁾。従ってプラスミンによるCOL17の切断部位が判明され、同部位に対する切断部特異抗体の作成が出来ると、BPの病変部に於けるCOL17の非生理学的切断の有無が明らかになる可能性が高い。更に、切断部が判明すると切断部を特異的に認識する抗体を作成することが可能となるため¹⁾、加齢に伴いCOL17が非生理学的部位で切断されるかどうかについても解明可能となる。BPは高齢者に好発する疾患であるため、BPの発症機序解明に迫る可能性がある。

本研究の目的は、COL17の切断部特異抗体を用い、COL17の切断によって生じる抗原エピトープの出現とBPとの関連について解明することである。本研究の特徴は、各種年齢の皮膚におけるCOL17の切断動態を解明し、高齢者皮膚の一部において、BP病変部と同様にCOL17が切断され、切断部に新規エピトープが生じているかを明らかにする点である。

2. 実 験

2.1 プラスミンによるCOL17の切断部位の同定

FLAGタグを組み込んだCOL17A1 cDNAをpcDNA5/FRTベクター (Invitrogen)へ導入し、pOG44ベクターと共にFlp-In293細胞へコトランスフェクション後、ヒグロマイシンによって安定発現株をクローニングする。安定発現株細胞にCOL17が正しく発現していることを、ウェスタンブロット等にて確認後、ライセートタンパクから、FLAGに対するマウスモノクローナル抗体 (M2, Sigma)を用い、アフィニティー精製する。精製された全長のリコ



Non-physiological cleavage of collagen XVII in aged skin

Wataru Nishie

Department of Dermatology, Hokkaido University Hospital

ンビナントCOL17タンパクをリコンビナントプラスミンで消化し、SDS-PAGEを行い、COL17の細胞外領域に該当する120kDのバンドをクマシー染色後に切り出し、トリプシンで処理後、マスペクトロメトリー (nano-LC/LC-MS) にて切断部を同定する。その際、トリプシン処理によって生じるアミノ末端断片とプラスミンによって生じた断片を鑑別する目的で、SDS-PAGE施行直前にサンプル中の全タンパクのアミノ末端をアセチル化し (Sulfo NHS-Acetate、Pierce)、nano-LC/LC-MS結果をMascotで解析する際、アセチル化条件でペプチド配列を算出する¹⁾。

2.2 プラスミン切断部位に対する切断部特異抗体の作成

同定された切断部から8アミノ酸程度のペプチド (システインをC末端に結合) を合成し、MBSを用いKLHに共有結合後、抗原として2匹の兎へ免疫する。抗原ペプチドカップリングアガロースを作成し (SulfoLink Coupling Resin and immobilization kit、Pierce)、得られた抗血清から切断部特異抗体をアフィニティー精製する。得られた切断部特異抗体の特異性は、プラスミン消化したCOL17タンパクおよび正常ヒト皮膚を基質として用い、それぞれウェスタンブロットと蛍光抗体法で確認する。最後に、得られた切断部特異抗体を用い、各種年齢の正常ヒト皮膚を染色し、BPの病変部と同様の病的な切断がCOL17に生じているかについて検討する。

2.3 各種切断部特異抗体を用いたCOL17の切断動態の解明

プラスミンによって切断された切断部特異抗体に加え、

これまで申請者が作成した生理的なCOL17の切断部位を特異的に認識する抗体を用い¹⁾、各種年齢の正常ヒト皮膚を染色し、BPの病変部と同様の病的な切断が年齢や部位特異的に生じているか検討する。

3. 結果

3.1 プラスミンによるCOL17の切断部位の同定

リコンビナントCOL17は、抗FLAG抗体によって極めて高純度に精製できた。コラーゲンは3本鎖を形成するが、精製COL17は非還元状態では540kD (180kD×3本)、還元状態では180kD付近に一本鎖として確認出来た (図1)。さらに精製リコンビナントCOL17をプラスミンで処理すると、COL17の細胞外領域に相当する120kDと97kDの断片を生じることを確認した (図1)。120kDの切断断片を切り出し、マスペクトロメトリーで解析したところ、生理的切断部位とは異なる、NC16A領域内の508番目セリン (Ser⁵⁰⁸) のアミノ末端で切断されることが判明した。

3.2 プラスミンによって生じる切断部に対する特異抗体の作製

Ser⁵⁰⁸から8アミノ酸のペプチドを合成し、2匹の野兎へ免疫した。抗原ペプチドカップリングカラムによってアフィニティー精製した切断部特異抗体は、プラスミンによって消化されたCOL17断片に反応することをウェスタンブロットで確認した。次に、凍結正常ヒト皮膚切片を薄切切片上でプラスミンと反応させ、作成した切断部特異抗体で染色したところ、表皮真皮間境界部に線状に沈着することを確認した (図2)。

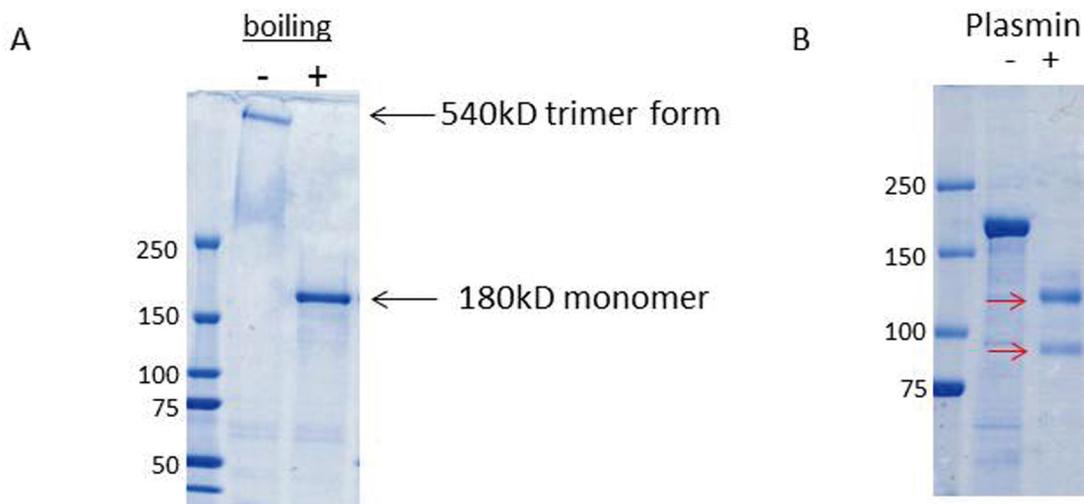


図1 精製COL17は非還元状態では540kD (180kD×3本)、還元状態では180kD付近に一本鎖として確認出来た (A、矢印)。さらに精製リコンビナントCOL17をプラスミンで処理すると、COL17の細胞外領域に相当する120kDと97kDの断片を生じた (B、赤矢印)。

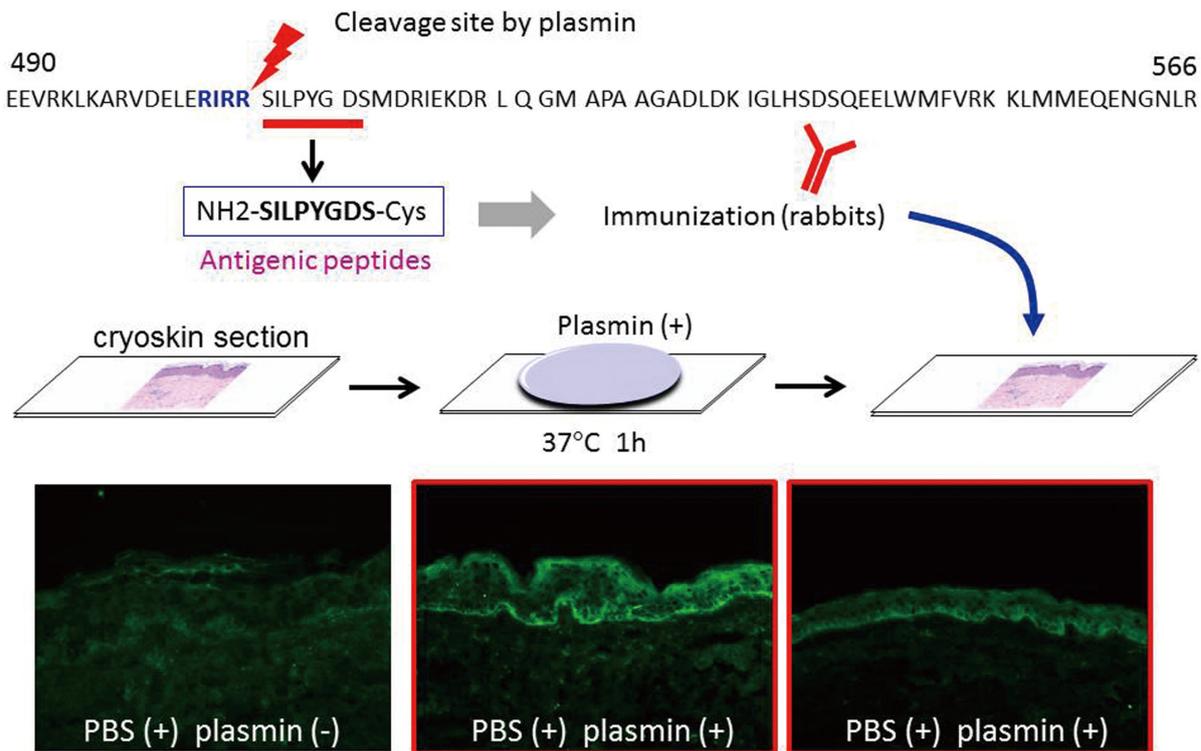


図2 凍結正常ヒト皮膚切片を薄切片上でプラスミンと反応させ、作成した切断部位特異抗体で染色したところ、表皮真皮間境界部に線状に沈着することを確認した。上方の配列は、プラスミンによる切断部位を明示した COL17 cDNA 中の NC16A 領域のアミノ酸配列。下線：抗原ペプチド。

3.3 各種切断部特異抗体を用いた COL17 の切断動態の解明

新たに作成した抗体は、COL17 の非生理学的な切断部を正しく認識することが判明した。この抗体を用い BP の病変部皮膚を観察した結果、15 例中 4 例の病変部において非生理学的な切断が生じていたことが判明した。一方、10 例の 80 歳以上の高齢者（正常部）皮膚において同様に検討した結果、いずれの検体でも非生理学的な切断は認めなかった。

4. 考察

BP は、IgG クラス自己抗体が自己抗原である COL17 に結合し、補体活性化に伴う炎症反応の惹起により発症すると考えられているが、自己抗体が生じるメカニズムは未だ不明である。本研究により、COL17 はプラスミンによって NC16A ドメイン内の生理学的部位とは異なる箇所での切断を受けることが明らかになった。同定された切断部に対する抗体（切断部特異抗体）の作成にも成功し、実際の BP 患者皮膚においても病変部特異的な切断が COL17 で生じていることが本研究によって解明された。BP の病変部特異的な COL17 の切断は生理的条件下では生じないため、健康人で生じると、同切断部への自己免疫反応が惹起され

ることが予想される。BP は高齢者に好発するため、高齢者皮膚において非生理学的な切断が生じている可能性を検討したが今回の研究では確認出来なかった。しかし BP は一部に高齢者に生じる疾患であり、一部の皮膚で COL17 の非生理学的切断が生じるだけで COL17 に対する自己免疫反応が誘発される可能性も想定される。今後、更なる研究によって BP が高齢者に好発する機序が解明されることが期待される。

(引用文献)

- 1) Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke C W, Hofmann S C, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L: Ectodomain shedding generates Neopeptides on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid, *J Immunol.* 185., 4938-4947, 2010.
- 2) Franzke C W, Tasanen K, Schacke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C, Zigrino P, Sunnarborg S, Lee D C, Fahrenholz F, Bruckner-Tuderman L: Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs, *EMBO J.*, 21, 5026-5035, 2002.

- 3) 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.
- 4) Kramer M D, Reinartz J: The autoimmune blistering skin disease bullous pemphigoid. The presence of plasmin/alpha 2-antiplasmin complexes in skin blister fluid indicates plasmin generation in lesional skin, *J Clin Invest.*, 92, 978-983, 1993.
- 5) Hofmann S C, Voith U, Schonau V, Sorokin L, Bruckner-Tuderman L, Franzke C W: Plasmin plays a role in the in vitro generation of the linear IgA dermatosis antigen LADB97, *J Invest Dermatol.*, 129, 1730-1739, 2009.