

学 位 論 文 題 名

Humanization of autoantigen

(自己抗原のヒト化)

学位論文内容の要旨

背景:病態解明および新規治療法を開発する上で、疾患モデル動物は非常に有用である。しかし自己免疫性疾患では、種の相違によりヒトの病気を実験動物で忠実に再現することは困難な場合が多い。例えば、自己免疫性水疱症の中で最も患者数の多く重症化した場合、死に至ることのある水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP)もその一例である。BPは、表皮基底細胞ヘミデスモゾームに存在し膜通過タンパクである 17 型コラーゲン (COL17) に対する自己抗体により発症すると考えられている。COL17 は表皮真皮間の接着に非常に重要であり、遺伝子異常により先天的に発現が欠損した場合、外的刺激により容易に水疱を形成し表皮水疱症の1型を呈する。この COL17 が自己抗原となる BP 患者 IgG をマウスへ投与しても病変は形成されない。この理由は、COL17 の抗原部位 (77 アミノ酸の細胞外領域) のアミノ酸配列がヒトとマウスで大きく異なるためと予想されている。従って、本当に患者の COL17 に対する自己抗体によって BP が発症するかについては未だ証明されていない。

研究の目的:患者 IgG を投与することで BP が発症する新たなモデルマウスを作製し、COL17 に対する IgG によって BP が発症することを直接的に証明する。さらにこの BP モデルマウスを利用し新規治療法を開発を行う。本研究では実験の過程で、表皮水疱症モデルマウスの作成、およびこのマウスへのヒト遺伝子の導入も行う。従って本研究により、表皮水疱症の遺伝子治療の可否についても明らかとなる。

実験の方法:まず COL17 ノックアウト (KO) マウスを作製し、更にヒト COL17 cDNA トランスジェニックマウスを作製し COL17 KO マウスと交配する。その結果、マウス自身の COL17 は欠損しヒトの COL17 のみが発現する COL17 ヒト化 (humanization of autoantigen) マウスを作る。同時にこの実験は、表皮水疱症のモデルである COL17 KO マウスへのヒト COL17 cDNA 遺伝子導入による治療実験でもある。

次に COL17 ヒト化マウスが完成した場合、BP 患者由来 IgG を投与することで BP が発症するかについて検討し、BP が発症できた場合、新しい治療法開発に応用する。今回、BP 患者 IgG の抗原エピートプである 77 アミノ酸のリコンビナントタンパクが、BP 患者 IgG を中和する疾患特異的な治療法としての有用性について検討する (epitope decoy 療法)。

結果:COL17 KO マウスでは, COL17 の発現が無く, 皮膚は脆弱で容易に水疱を形成しヒトの表皮水疱症患者に極めて類似していた. COL17 KO マウスの多くは成長障害と高い死亡率を呈し交配は不能だった. 一方, ヘテロの COL17 KO マウスでは異常所見は認めず, ヒト COL17 が皮膚で発現するヒト COL17 cDNAトランスジェニックマウスとの交配を進めた. 最終的に, マウス COL17 が欠損しヒト COL17 のみ発現する COL17 ヒト化マウスが得られた. このマウスでは KO マウスで見られた殆どの異常所見は認めずほぼ正常の表現形を呈し COL17 ヒト化マウス同士の交配も可能だった.

最後に, この COL17 ヒト化マウスへ BP 患者由来 IgG を投与したところ, ヒト IgG がマウス皮膚へ沈着し表皮下水疱が生じ BP の所見を再現することに成功した. 更に, COL17 の抗原エピトープをコードするタンパクをこの BP モデルマウスへ投与したところ, 優位に病勢を抑制し, 抗体中和療法として有用であることが解った (epitope decoy 療法).

考察:今回, 自己免疫疾患モデル動物作製に試みた手法である“humanization of autoantigen: 自己抗原のヒト化”はこれまでに無い新しい方法である. このマウスを用いて, ヒトの BP 患者の IgG が疾患の要因となることを初めて証明し, 更に BP 患者 IgG を直接ターゲットとする新たな疾患特異的治療の有用性を示すことが出来た. 今後, ヒトの疾患により類似した自己免疫疾患モデル動物作製手法の一つとして“humanization of autoantigen: 自己抗原のヒト化”は有用であると思われる.

表皮水疱症のモデルマウス(KO マウス)はこれまでいくつか作製された報告があるが, その多くは致死性であるか生後まもなく死亡する. 一方, 今回作製した COL17 KO マウスの一部では長期生存可能であり, 新たな表皮水疱症の疾患モデルとして非常に有用である. また, これまで他の表皮水疱症モデルマウスにおいて遺伝子導入治療実験に成功した報告は無い. ヒト COL17 cDNA を導入された COL17 KO マウスでは, 多くの異常所見は消失し, 異なる種の cDNA であっても効率良く導入された場合, 治療に有効であることが解った. 今後, 表皮水疱症患者の治療法を開発する上で非常に参考になる結果と思われる.

結論:“humanization of autoantigen: 自己抗原のヒト化”は自己免疫疾患モデルマウス作成において, マウスとヒトという異なる種の壁を克服する手法の一つとして有用である. また本研究を進める過程で作製した, COL17 が関連する BP と表皮水疱症の 2 つの水疱性疾患モデルマウスは忠実にヒトの疾患を再現していた. これらのモデルマウスを利用し, BP では抗原タンパクによる抗体中和療法 (epitope decoy 療法) が, 表皮水疱症では欠損遺伝子に相当する cDNA 導入による治療が有効であることを示した.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Humanization of autoantigen

(自己抗原のヒト化)

病態解明および新規治療法を開発する上で、疾患モデル動物は非常に有用である。しかし、種の相違によりヒトの病気を実験動物で忠実に再現することは困難な場合が多い。水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP) は、自己免疫性水疱症の中で最も患者数の多い疾患であるが、BP 患者抗体をマウスへ投与しても病変は形成されず疾患モデルそのような疾患モデル動物も作製されていない。BP 抗原は、表皮基底細胞ヘミデスモゾームに存在する XVII 型コラーゲン (COL17) と考えられているが、抗原部位のアミノ酸配列はヒトとマウス間で大きく異なっている。一方、COL17 は表皮真皮間の接着に非常に重要な分子であるが、遺伝子異常により先天的に発現が欠損した場合、容易に水疱を形成する表皮水疱症の1型を発症する。同様に、COL17 遺伝子ノックアウトマウスも未だ作製されていない。

本研究では、まず表皮水疱症モデルマウスである COL17 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。このノックアウトマウスはヒトの患者に非常に類似した所見を多く呈していた。次に、このノックアウトマウスへヒト COL17 cDNA を遺伝子導入する治療実験を行った。更に、ヒト COL17 のみ発現する COL17 ヒト化マウスへ BP 患者 IgG を投与することで、BP に類似した皮膚病変を再現することに成功した。最後にこの BP モデルマウスを利用し、COL17 の抗原ペプチドが自己抗体を中和し病変を抑制する効果があることを示した。

今回作製した表皮水疱症のモデルマウス (COL17 ノックアウトマウス) の一部は長期生存可能であり、表皮水疱症の疾患モデルとして非常に有用である。また、ノックアウトマウスへヒト COL17 cDNA 遺伝子を導入することによって、多くの異常所見が消失したことは、今後の表皮水疱症患者の治療法を開発する上で非常に参考になると思われた。また、自己免疫疾患モデル動物作製に試みた“humanization of autoantigen: 自己抗原のヒト化”はこれまでに無い新しい方法である。このマウスを用いて、ヒトの BP 患者の IgG が疾患を引き起こすことを初めて証明し、更に BP 患者 IgG を直接ターゲットとする新たな疾患特異的治療の有用性を示した。今後、ヒトの疾患により類似した自己免疫疾患モデル動物作製手法の一つとして“humanization of autoantigen: 自己抗原のヒト化”は有用であると思われる。

副査の小池隆夫教授からは、COL17 の多臓器での分布と他の動物種におけるエピトープ部位の相違について、および実際の自己免疫疾患と本研究で行ったモデル動物との相違についての

助言と質問, 副査の清水 宏教授からは本研究の他疾患への応用と発展性についての質問, 主査の小野江和則教授からは, デコイペプチドの抗原性に関する質問などがあったが, 申請者は大概適切な回答をした。

この論文は, 2つの水疱性疾患モデルマウスを作製し新規治療法開発へ応用した点が高く評価され, 今後の臨床応用以外に他の自己免疫疾患研究への発展が期待される。

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。