

# XVII型コラーゲンノックアウトマウスを用いた 水疱性類天疱瘡モデルマウスの作成

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

自己免疫性水疱症は、表皮抗原に対する多彩な自己抗体によって皮膚が障害を受け、表皮内あるいは表皮下に水疱を形成する一連の疾患群である。自己免疫性水疱症は抗表皮細胞間物質抗体により表皮細胞間接着が障害されることで表皮内水疱を生じる天疱瘡群と、抗表皮基底膜部抗体により表皮-真皮間接着が障害される類天疱瘡群に大別される。

表皮-真皮間接着はヘミデスモゾームを中心とする様々な接着分子によって形成され、XVII型コラーゲン (COL17) は、このヘミデスモゾームを構成する主要な構造タンパクである。COL17分子に対して自己抗体が生じると、自己免疫性水疱症である水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid: BP) が発症するが、再現性のあるモデルマウスが存在しないため、自己抗体産生に至る発症メカニズムは明らかにされていない。

最近、筆者が所属する研究グループは COL17 のノックアウトマウス (COL17<sup>-/-</sup>マウス) の作成に成功した。COL17<sup>-/-</sup>マウスでは COL17 の発現が完全欠損しており、リンパ球は COL17 を自己蛋白として認識しないことから、COL17<sup>-/-</sup>マウスを COL17 で免疫すると、COL17 に対する免疫応答が得られる。免疫した COL17<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞 (T 細胞、B 細胞) を、COL17 を正常に発現する免疫不全マウス (RAG2<sup>-/-</sup>マウス) に移植することで、移植された COL17<sup>-/-</sup>マウス由来の T 細胞、B 細胞はレシピエントマウスの中で自己抗原と出会い、持続的な自己免疫反応が起こるとの仮説をたてた。本研究では、以上の仮説に基づき COL17<sup>-/-</sup>マウスを用いて BP モデルマウスの作成を試みた。

### 【材料と方法】

1. 実験動物 COL17<sup>-/-</sup>マウスは雄と雌のヘテロマウス (COL17<sup>+/-</sup>マウス) 同士を交配させることにより作成した。COL17<sup>-/-</sup>マウスは 10 倍希釈の mNC16A モノクローナル抗体による免疫組織染と PCR 法を用いてスクリーニングを行った。

2. リコンビナントマウス NC16a (r-NC16a) およびマウス COL17 蛋白の作成

マウス COL17 の NC16a 領域全長を含む cDNA を Liu らの方法に基づき PCR 法にてクローニングした。得られた cDNA クローンを GST 融合ベクターにサブクローニングし、大腸菌 XL-1-Blue 株を宿主として組み替え、マウス NC16a タンパクを作成した。リコンビナントマウス COL17 タンパクは、COL17 cDNA を挿入した Flip-in 用発現ベクターと Flip リコンビナーゼ発現ベクターである pOG44 を Flip-in 293 細胞にコトランスフェクションし作成した。

3. COL17<sup>-/-</sup>マウスの免疫と脾細胞の移植

COL17<sup>-/-</sup>マウスの免疫は、C57BL/6Cr の皮膚を植皮することで行った。COL17<sup>-/-</sup>マウスの背部に 1cm 四方の C57BL/6Cr の皮膚 (背部または耳介) を全層植皮した。植皮により免疫した COL17<sup>-/-</sup>マウスおよびコントロールの COL17<sup>+/-</sup>マウスから、植皮後 day35 に脾臓を摘出した。最終的に  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  個の脾細胞を 6~8 週齢の RAG2<sup>-/-</sup>マウス尾静脈に静脈注射して移植した。

### 【結果】

## 1. C57BL/6Cr マウス皮膚移植による COL17<sup>+/+</sup>マウスの免疫

COL17<sup>+/+</sup>マウスに対して C57BL/6Cr の皮膚移植による免疫を行ったところ、植皮の3週後から IIF にて抗基底膜抗体の産生が確認され、抗体価の上昇は植皮5週後にほぼプラトーとなり、植皮20週後まで抗体価は低下することなく陽性であった。植皮5週後の COL17<sup>+/+</sup>マウス血清の希釈系列による IIF の結果では、1280倍希釈までで陽性所見を示し、高力価の抗基底膜抗体の産生が確認された。また、1N塩化ナトリウム処理皮膚を用いた IIF では、表皮側に抗体の沈着が確認された。次に IIF にて確認された抗基底膜抗体の抗原特異性を確認するため、マウス COL17 cDNA から作成したリコンビナントタンパク質を用いたウェスタンブロット法を施行した。植皮5週後の血清を用いたウェスタンブロットでは、免疫した COL17<sup>+/+</sup>マウス血清にて 180kd にバンドを認めた。

## 2. 植皮免疫した COL17<sup>+/+</sup>マウス脾細胞移植による BP モデルマウス作成

C57BL/6Cr マウス皮膚移植により免疫した COL17<sup>+/+</sup>マウスから脾細胞を調整し、 $1 \times 10^7$  ~  $1 \times 10^8$  の脾細胞を20匹以上の免疫不全マウスである Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植し、フェノタイプの変化を観察した。 $1 \times 10^7$  および  $5 \times 10^7$  の脾細胞を移植したマウスでは明らかなフェノタイプの変化が見られなかった。一方、 $1 \times 10^8$  の脾細胞を移植したマウスのうち1匹のマウスで、移植後40日の時点で紅斑および糜爛の形成が認められ、移植後70日にマウスの尾部の全体的な腫脹と表面に膜様の鱗屑を伴った紅斑が認められた。フェノタイプの変化がみられたマウスの皮膚を採取し、DIFによる検討を行ったところ、基底膜部に IgG の線状沈着が認められ、マウスの血清を用いた IIF では、20倍希釈で基底膜への IgG 沈着を認めた。

### 【考察】

マウス COL17 を発現する C57BL/6J の皮膚移植による免疫を行い、免疫後3週で蛍光抗体法により高力価の抗 COL17 IgG 抗体産生が認められた。植皮による免疫法はこれまでに B 細胞による抗体産生と T 細胞による細胞障害性 T 細胞誘導の両実験系でその有効性が示されており、本研究においてもこれまでの報告同様植皮後約3週後より効果的に高力価の抗体産生が誘導された。リコンビナントタンパクによる免疫に対し植皮による免疫の利点としては、より強い抗原性が得られる点があげられる。皮膚は生体の最外層の大部分を覆うという特性上、免疫学的バリア機能に代表されるさまざまなバリア機能を有すると考えられている。特に植皮による免疫では、表皮に存在する樹状細胞であるランゲルハンス細胞と真皮に存在する樹状細胞の両者によるリンパ球の活性化が生じることでより強力なリンパ球活性化が生じるものと考えられる。

植皮により免疫した COL17<sup>+/+</sup>マウスの脾細胞 ( $1 \times 10^8$  個) を RAG2<sup>-/-</sup>マウスに移植したところ、一匹のマウスで移植後40日に紅斑、糜爛の形成がみられ、70日にはびまん性の浮腫が認められた。 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$  個の脾細胞を移植したマウスではフェノタイプの発現は見られなかった。標的抗原が発現しているにもかかわらず、大部分のマウスでフェノタイプの発現が見られなかった理由は不明だが、免疫した生体における抗原特異的 B 細胞の数は  $10^5$  個あたり1個の割合とされていることから、フェノタイプ出現に必要な抗原特異的 B 細胞の数が不足していたためと考えられる。

### 【結論】

COL17<sup>+/+</sup>マウスに植皮による免疫を行い、抗体の産生を確認したマウスの脾細胞を抽出し、COL17 を発現する免疫不全マウス (RAG2KO<sup>-/-</sup>マウス) に移植したところ、一部のレシピエントマウスで抗 COL17 抗体の産生を確認した。本研究により作成された BP モデルマウスを用いることで、今後、さらなる病態の解明に寄与できるものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 田 中 伸 哉

副 査 教 授 島 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

## XVII型コラーゲンノックアウトマウスを用いた 水疱性類天疱瘡モデルマウスの作成

今回の研究では XVII 型コラーゲン (COL17) ノックアウトマウス (COL17<sup>-/-</sup>マウス) を用いて水疱性類天疱瘡モデルマウスの作成を試みた。COL17 を発現するワイルドタイプマウスの皮膚移植による COL17<sup>-/-</sup>マウスの免疫では、植皮の 3 週後から蛍光抗体法で IgG 抗基底膜抗体がみられ、植皮 5 週後には高力価の抗体上昇を確認した。また、免疫プロット法で標的抗原が COL17 であること確認した。免疫した COL17<sup>-/-</sup>マウスから脾細胞を調整し、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  の脾細胞を Rag2<sup>-/-</sup>に移植した。 $1 \times 10^8$  の脾細胞を移植したマウスのうち 1 匹のマウスで、移植後 40 日の時点で紅斑および糜爛の形成がみられ、蛍光抗体法によりレシピエントマウスでの IgG 抗基底膜抗体の病変部への沈着が確認された。標的抗原が発現しているにもかかわらず、大部分のレシピエントマウスでフェノタイプの発現が見られなかった理由については、これまでの報告で免疫した個体における抗原特異的 B 細胞の数は  $10^5$  個あたり 1 個の割合とされていることから、フェノタイプ出現に必要な抗原特異的 B 細胞の数が不足していたことが原因として考えられた。

質疑応答では、まず副査の田中伸哉教授から水疱性類天疱瘡の病態における IgE 自己抗体の関与について質問があった。この質問に対して申請者は、実際の症例で患者血清中の IgE 抗体が上昇していることから病態形成に関与している可能性があること、マウスを用いた実験系で病態形成に IgE 抗体が関与していると報告されていることを回答した。つぎの質問として抗 BP230 抗体と病態形成との関連についての質問があり、申請者は、ほとんどの患者で BP180 に対する抗体が確認でき、BP230 に対する抗体は一部の患者で確認されていること、また BP230 抗原が細胞膜の内側に局在することから、まず BP180 が障害された後に BP230 に対する反応が起こると考えられると回答した。最後の質問としてレシピエントマウスとして RAG2<sup>-/-</sup>を用い、SKID マウスを用いなかった理由について質問があり、当初ノックアウトマウスのバッククロスが十分でなかったことから免疫不全マウスである RAG2<sup>-/-</sup>マウスを用いたこと、また今回の実験系では B6 バックグラウンドのマウスを使用したため SKID マウスを用いなかったことをその理由として回答した。

次に副査の島山鎮次教授から次のような質問があった。第 1 の質問として水疱性類天疱瘡でみられる免疫反応は T 細胞依存性なのかについての質問があり、申請者から尋常性天疱瘡モデルマウスで、B 細胞のみ移植した場合は病気が起こらず、B 細胞の他に T 細胞を

移植した場合に病気が生じていることから、病態にはT細胞の関与も必要であるとの回答があった。第2の質問として、COL17全長のリコンビナントタンパクを用いた免疫が望ましいのではないかとの指摘があり、それに対し申請者はCOL17全長のリコンビナントタンパクによる免疫も計画したが、分泌型タンパクとして発現されなかったため、全長のCOL17タンパクによる免疫はまだ施行していないと回答した。第3の質問として患者でMHCとの相関性がみられるかとの質問があり、それに対し申請者は水疱性類天疱瘡においてヒトではHLA-DQB1\*0301と相関することが知られていると回答した。第4の質問としてCOL17とマウスMHCとの染色体上の位置についての質問があり、COL17は第19番染色体上に、マウスMHCは第17番染色体上にあることから、MHCには影響がないものと考えられるとの回答があった。第5の質問としてレシピエントマウスにワイルドタイプのC57BL/6を用いた場合はどうかとの質問があり、それに対し申請者はレシピエントマウスとしてワイルドタイプマウスを用いた場合、より強い免疫反応を起こすことが期待できるため、充分バッククロスがすすんでいるのであれば、B6マウスも用いたいと考えていると回答した。

最後に主査の清水宏教授から水疱性類天疱瘡におけるIgE抗体の役割についての質問があった。これに対し申請者は病態としてIgE抗体が肥満細胞に結合することにより、肥満細胞の脱顆粒が起こることで、炎症反応が引き起こされている可能性があるかと回答した。

本論文は水疱性類天疱瘡モデルマウスを作成するという内容の論文であり、今後はこの実験で作成したモデルマウスを用いることで新しい治療法の開発に役立つことが期待される。

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。