

学位論文題名

A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen

(ヒト化した病原性抗原を標的とし、持続的な抗体産生と皮膚病変を生じる新規水疱性類天疱瘡マウスモデルの樹立)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid; BP) は最も頻度の高い自己免疫性水疱症で、表皮基底膜部 (BMZ) に存在し基底細胞と基底膜を結び付けている 17 型コラーゲン (COL17, BP180, BPAG2) に対する自己抗体によって引き起こされる。最も病原性の高いエピトープは、COL17 の Noncollagenous 16A domain (NC16A) に存在する。患者 IgG をマウスに投与してもマウスに水疱は生じないことが知られているが、それは NC16A のアミノ酸配列がヒトとマウスでは大きく異なるためと考えられている。そのため、BP 患者血清 IgG の病原性はこれまで証明されていなかった。我々は最近、マウス COL17 を欠損し代わりにヒト COL17 を発現する COL17 ヒト化マウス (*COL17^{m/h+}* mice; COL17-humanized mice) を作成した。この新生児マウスに BP 患者 IgG を投与すると表皮下水疱が誘発された。(Nishie et al. 2007) これによって初めて BP 患者 IgG の病原性が *in vivo* で証明された。しかし、この IgG passive-transfer BP モデルは一過性の病変しか再現することができない。

そこで本研究では、ヒト COL17 (hCOL17) を標的抗原として、持続的に抗体を産生し長期的な病気を再現することができる BP マウスモデルの樹立を試みた。

【材料と方法】

BP マウスモデルの樹立には、標的抗原で免疫したドナーマウスの脾細胞を免疫不全レシピエントマウスに移植する方法を用いた (Amagai et al. 2000)。

まず脾細胞移植レシピエントマウスを作製するために、免疫不全マウスである *Rag2^{-/-}* mice と COL17-humanized mice を繰り返し交配し、*Rag2^{-/-}/COL17-humanized* mice を作製した。次に脾細胞移植ドナーマウスを作製するために、hCOL17 タンパクを皮膚に発現する Transgenic mice の皮膚を野生型マウス (C57BL/6) に植皮した。間接蛍光抗体法 (IIF)、ELISA 法、Western blot 法を用いて、植皮マウス血清中の抗 hCOL17 抗体および抗 hNC16A 抗体を測定した。このドナーマウスの脾細胞を調整し、*Rag2^{-/-}/COL17-humanized* mice に移植した (n=10)。コントロールとして *Rag2^{-/-}* mice にドナーマウスの脾細胞を移植した (n=6)。レシピエントの血中抗体価および皮疹の程度を 10 週間観察した。また、皮膚を生検し組織学的に検討した。

レシピエント血清中の IgG の病原性を確認するために、移植後 8 日目の血清から IgG を精製し、新生児の COL17-humanized mice に皮下注射し変化を観察した (n=5)。

T 細胞あるいは B 細胞の役割を検討するために、ドナー脾細胞の CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および CD45R⁺ B 細胞をそれぞれ除去したのちに移植し、レシピエントの血清抗体価と皮疹を観察した (各 n=4)。また、移植後 2 日目からシクロスポリン A (CsA) を 35mg/kg/day で 14 日間投与し、レシピエントの血清抗体価や皮疹の変化を観察した (n=5)。

【結果】

植皮した野生型マウス血清中には、高力価の抗 hCOL17 抗体および抗 hNC16A 抗体が検出された。植皮マウスの脾細胞を移植したレシピエント (*Rag-2*^{-/-}/COL17-humanized recipients) の血清中には、移植後 7 日以内に抗 hCOL17 抗体(IIF 法)および抗 hNC16A 抗体(ELISA 法)が検出された。抗 hCOL17 抗体は移植後 9 日前後でピークとなり、その後徐々に低下したが、移植後 10 週でも 5120 倍以上の高値を示した。抗 hNC16A 抗体は移植後 9 日前後でピークとなり、その後急速に低下し、移植後 6 週でほぼ横ばいとなった。コントロールの *Rag-2*^{-/-} recipients では抗 hCOL17 抗体および抗 hNC16A 抗体は、いずれも検出されなかった。

Rag-2^{-/-}/COL17-humanized recipients には移植後 10 日前後から顔面に搔痒を伴う紅斑が出現し、脱毛斑となって次第に体幹に拡大した。小水疱やびらんも観察され、病変部皮膚では軽度の擦過で表皮剥離が生じた。皮疹は移植後 10 週でも広範囲に観察された。皮膚生検では、HE 染色で真皮表皮境界部に裂隙が見られた。トルイジンブルー染色では肥満細胞の脱顆粒が観察された。直接蛍光抗体法では、真皮表皮境界部に線状の IgG および補体 C3 の沈着が見られた。一方、*Rag-2*^{-/-} recipients には皮疹は全く生じず、皮膚の組織学的変化も見られなかった。

移植後 8 日目の *Rag-2*^{-/-}/COL17-humanized recipients の血清から IgG を抽出し、新生児 COL17-humanized mice に皮下注したところ、皮膚の脆弱性が生じ、組織学的にも上記と同様の変化が見られた。以上より、*Rag-2*^{-/-}/COL17-humanized recipients は病原性のある抗 hCOL17 抗体を体内で持続的に産生し、それが自己の hCOL17 分子に結合して BP phenotype を発現することが示された(BP マウスモデル)。

CD8⁺ T 細胞を除去したのちに脾細胞を移植した群では全脾細胞を移植した場合と同様の変化が見られたが、CD4⁺ T 細胞、あるいは CD45R⁺ B 細胞を除去して移植した群では抗体産生は見られず、皮疹も生じなかった。以上より、BP マウスモデルにおいて CD4⁺ T 細胞と CD45R⁺ B 細胞が BP phenotype の誘導に不可欠であることが明らかになった。また、CsA を投与した BP モデルマウスでは、抗体産生や皮疹の出現が有意に抑制された。

【考察】

脾細胞移植の手技を用いて、hCOL17 を標的とし持続的な抗体産生と皮膚病変を生じる新規 BP マウスモデルの樹立に成功した。今回観察された抗 hCOL17 抗体が標的抗原に結合し補体が活性化され、肥満細胞の脱顆粒が生じ、最終的に真皮表皮境界部の裂隙形成に至るプロセスは過去の IgG passive-transfer BP 新生児マウスモデルでも示されており、今回作製した BP マウスモデルは BP の病態を忠実に再現していると考えられた。

この BP マウスモデルでは、CD4⁺ T 細胞が抗体産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。実際の BP 患者においても、hCOL17 反応性の CD4⁺ T 細胞の存在が報告されている。また、ある特定の MHC class II allele が高頻度で見られることも報告されている。今後 BP モデルを用いてより詳細に CD4⁺ T 細胞の機能を解析することで、T 細胞を標的とした新規治療法の開発につながると考えられた。

【結論】

免疫不全の標的抗原ヒト化マウスを用いて、ヒト化 COL17 を標的とし持続的な抗体産生と皮膚病変を生じる新規 BP マウスモデルの樹立に成功した。この新規 BP モデルは BP の病態解明および新規治療法の開発に有用である。

学位論文審査の要旨

主査 教授 畠山 鎮次
副査 教授 清水 宏
副査 准教授 岩瀬 和也

学位論文題名

A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen

(ヒト化した病原性抗原を標的とし、持続的な抗体産生と皮膚病変を生じる新規水疱性類天疱瘡マウスモデルの樹立)

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid: BP) は最も頻度の高い自己免疫性水疱症であり、表皮基底膜部 (BMZ) に存在する 17 型コラーゲン (COL17) の特に Noncollagenous 16A domain (NC16A) に対する自己抗体によって引き起こされる。最近、マウス COL17 の発現を欠損させ、代わりにヒト COL17 (hCOL17) を発現する遺伝子改変マウス (COL17 ヒト化マウス) が作製された。この遺伝子改変マウスの新生児に BP 患者 IgG を投与すると、表皮下水疱が誘発された。しかし、この IgG passive-transfer BP モデルは一過性の病変しか再現することができない。そこで本研究では、hCOL17 を標的抗原として、持続的に抗体を産生させることで、長期的な病態を再現することができる BP マウスモデルの樹立が試みられた。

BP マウスモデルの樹立には、標的抗原で免疫したドナーマウスの脾細胞を免疫不全レシピエントマウスに移植する方法が用いられた。まず、脾細胞移植レシピエントマウスを作製するために、*Rag2*^{-/-}マウスと COL17 ヒト化マウスを繰り返し交配し、*Rag2*^{+/-}/COL17 ヒト化マウスが作製された。次に脾細胞移植ドナーマウスを作製するために、hCOL17 タンパク質を皮膚に発現するトランスジェニックマウスの皮膚を野生型マウスに植皮し、抗 hCOL17 抗体の産生を誘導した。このドナーマウスの脾細胞を、*Rag2*^{+/-}/COL17 ヒト化マウスに移植した。レシピエントの血清中の抗 hCOL17 抗体は移植後 9 日前後でピークとなり、その後徐々に低下したが移植後 10 週でも高値を示した。抗 hCOL17 抗体は移植後 9 日前後でピークとなり、その後低下した。移植後 10 日前後から搔破跡を伴う紅斑が出現し、次第に体幹に拡大した。さらには、小水疱やびらんも観察された。皮膚生検では、真皮表皮境界部に裂隙が見られ、トルイジンブルー染色では肥満細胞の脱顆粒が観察された。直接蛍光抗体法では、真皮表皮境界部に線状の IgG および補体 C3 の沈着が見られた。以上より、*Rag2*^{+/-}/COL17 ヒト化マウスのレシピエントは抗 hCOL17 抗体を体内で持続的に産生し、

それが自己の hCOL17 分子に結合して BP 表現型を示すことが判明した (BP マウスモデル)。

CD8⁺ T 細胞を除去したのちに脾細胞を移植した群では全脾細胞を移植した場合と同様の変化が見られたが、CD4⁺ T 細胞あるいは CD45R⁺ B 細胞を除去して移植した群では抗体産生は見られず、皮疹も生じなかった。以上より、BP マウスモデルにおいて CD4⁺ T 細胞と CD45R⁺ B 細胞が BP の表現型の誘導に不可欠であることが明らかになった。また、CsA を投与した BP モデルマウスは、抗体産生や皮疹の出現が有意に抑制された。

岩淵准教授から、BP の表現型が self limiting かどうか、制御性 T 細胞の経時変化はどうか、CD4⁺T 細胞依存性に抗体産生が起こるのか、などについての質問があった。次いで畠山教授から、COL17 が欠損すると表現型は BP と同様になるのか、BP の病態に炎症は関与しているのか、COL17 反応性の T 細胞が存在するのかどうか、移植した脾細胞は減少していくのかどうか、持続的に抗 COL17 抗体を産生するモデルの作製は可能かどうか、などについての質問があった。最後に清水教授から、モデルマウスを作製して得られた経験を踏まえた今後の展望についての質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、COL17 を欠損する表皮水疱症患者についての知見、BP の病態発症機序の知見、T 細胞依存性の他の自己免疫疾患マウスモデルに関する知見、制御性 T 細胞と自己免疫性疾患モデルに関する過去の報告や BP における T 細胞の働きについてのこれまでの研究結果、及び論文等を引用し、おおむね適切に回答した。

この論文は、遺伝学的及び免疫学的手法による新規の BP モデルを樹立し、そのモデルにおける CD4⁺ T 細胞の重要な役割を明らかにした点で高く評価され、今後さらなる BP の病態解明や新規治療法の開発につながっていくことが期待される。

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。