

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04238

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡抗原反応性T細胞株の樹立と応用

研究課題名(英文)Generation of bullous pemphigoid antigen specific T cell clones

研究代表者

氏家 英之(UJIE, Hideyuki)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60374435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡は、高齢者に好発する最も頻度の高い自己免疫性水疱症である。皮膚の表皮と真皮を結合する表皮基底膜部に存在する17型コラーゲン(COL17、BP180)に対する自己抗体により発症する。自己抗体産生には自己反応性T細胞の働きが重要と考えられるが、COL17反応性T細胞の病原性は未だ解析されていない。本研究では、ヒトCOL17ペプチドで免疫したマウスのリンパ球を刺激し培養することで、ヒトCOL17反応性T細胞株の樹立に成功した。そのT細胞株はIFN-gammaを産生するCD4陽性エフェクターT細胞であった。このT細胞株はマウスの体内で弱い病原性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立したヒトCOL17反応性T細胞株を解析することで、水疱性類天疱瘡(BP)における自己反応性T細胞の病態機序が明らかとなる。また、COL17は表皮と真皮の境界部に存在するため、扁平苔癬や移植片対宿主病(GVHD)といった疾患の病態解明の手掛かりとなる可能性が高い。さらにCOL17は毛包に発現し重要な役割を果たしていることから、毛包性疾患の病態解明に繋がる可能性もある。また、本研究で確立したT細胞株樹立の手法は他の様々な自己抗原に対するT細胞株の樹立にも応用可能であり、多くの自己免疫疾患の病態解明に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is a most common autoimmune blistering disorder, which preferentially affects elderly people. It is caused by autoantibodies to type XVII collagen (COL17, BP180) at the dermal-epidermal junction of the skin. Although autoreactive T cells is important to produce autoantibody, the pathogenicity of COL17-reactive T cells is still largely unclear. In this study, we have successfully established human COL17-reactive T cell lines by stimulating and culturing lymphocytes obtained from human COL17-immunized mice. Those T cell lines are CD4+ effector T cells which produce IFN-gamma and showed weak pathogenicity in a mouse model.

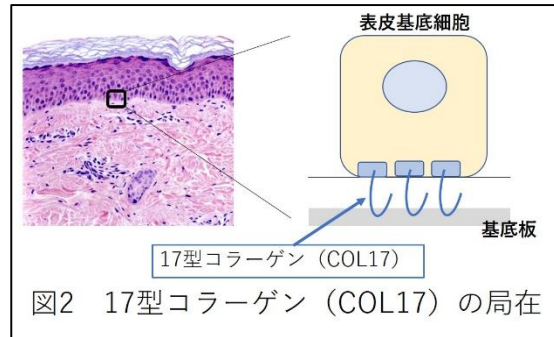
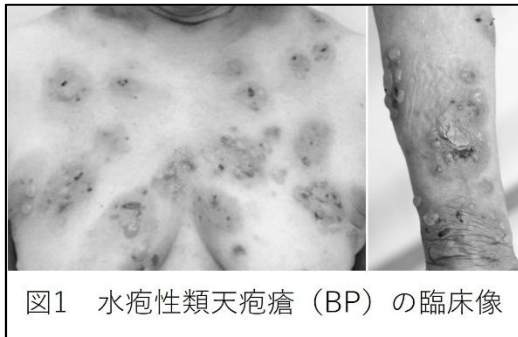
研究分野：皮膚科学

キーワード：T細胞株 水疱性類天疱瘡 17型コラーゲン BP180 アクティブマウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

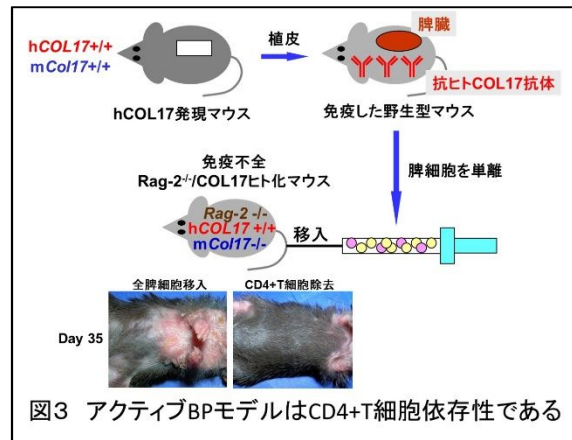
水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid: BP) は表皮基底膜部の構成タンパクである 17 型コラーゲン (COL17) を抗原とする自己抗体により発症する自己免疫性水疱症である (図 1, 2)。自己抗体産生には自己反応性 T 細胞の働きが重要と考えられているが、COL17 反応性 T 細胞の病原性はいまだ明らかにされていない。



我々はこれまでに、以下の(1), (2)に述べる 2 つの系により、CD4⁺T 細胞が抗 COL17 抗体産生に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

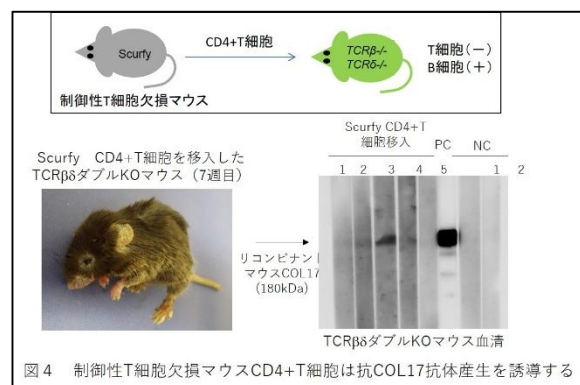
(1) アクティブ BP マウスモデルは CD4⁺T 細胞依存性に抗 COL17 抗体を産生する

我々のグループは、皮膚でヒト COL17 を発現する遺伝子改変マウス (COL17 ヒト化マウス) を作製し、BP 患者 IgG 自己抗体を投与すると皮膚に水疱を形成する BP モデルマウスを確立した (Nishie W et al., Nat Med 2007)。我々は、COL17 ヒト化マウスを用いて持続的に抗 COL17 抗体を産生するアクティブ BP モデルマウスを作製し、その抗体産生は CD4⁺T 細胞依存性であることを報告した (Ujiie H, et al., J Immunol 2010、図 3)。また、自己抗体産生には CD40-CD40 リガンドを介した T 細胞-B 細胞間の相互作用が必須であることを明らかにした (Ujiie H, et al., Clin Immunol 2012)。



(2) 制御性 T 細胞欠損マウスに生じる自己反応性 CD4⁺T 細胞は抗 COL17 抗体産生を誘導する

我々は、制御性 T 細胞のマスター転写因子の発現を司る Foxp3 遺伝子の変異により機能的制御性 T 細胞を欠損する Scurfy マウスは抗 COL17 抗体を自然産生することを報告した。また、Scurfy マウスの CD4⁺T 細胞を、T 細胞を欠損し B 細胞を有する TCRβ/TCRδ ダブルノックアウトマウスに移入する、抗 COL17 抗体産生が誘導されることを明らかにした (Muramatsu K, Ujiie H, et al. J Allergy Clin Immunol. 2018、図 4)。



BP 患者においても COL17 反応性 T 細胞の存在が報告されており (Thoma-Uszynski S, et al., J Immunol 2006) 抗 COL17 抗体産生における CD4⁺T 細胞の重要性は明らかである。しかしながら、これまでに COL17 抗体反応性 T 細胞株は樹立されていないため、病態機序についてはいまだ不明である。デスマグレイン 3 (Dsg3) 反応性 CD4⁺T 細胞を用いた研究により、マウスにおいて Dsg3 反応性 CD4⁺T 細胞が抗 Dsg3 抗体産生において重要な役割を果たしていることが明らかにされた (Takahashi H, et al., J Clin Invest 2011)。また、Dsg3 反応性 CD4⁺T 細胞が抗体産生を誘導すること、および細胞性免疫として interface dermatitis を誘導することが示された (Takahashi H, et al., J Clin Invest 2011)。これらの結果は、抗原特異的 T 細胞株の樹立が、自己免疫性疾患の病態解明において非常に有用であることを示している。

また、COL17 は表皮真皮結合を担うのみならず、毛包の恒常性維持や色素幹細胞の維持にも

重要な役割を果たしていることが示されている (Tanimura S et al., Cell Stem Cell 2011, Matsumura H, et al., Science 2016)。よって、COL17 反応性 T 細胞株の樹立により、円形脱毛症をはじめとした、毛包に対する自己免疫反応による疾患の病態解明の一助となる可能性がある。

以上より、COL17 反応性 CD4+T 細胞株、および COL17 反応性 TCR 遺伝子導入マウスを樹立する本研究を着想した。

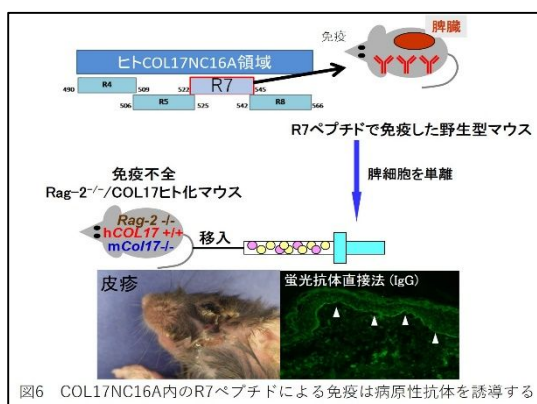
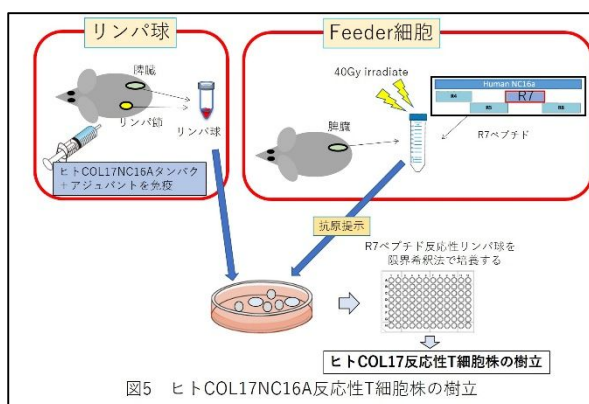
2. 研究の目的

COL17 反応性 CD4+T 細胞株による BP 誘導能および皮膚炎誘発能を解析し、標的エピートプや産生サイトカインの差異による病原性への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

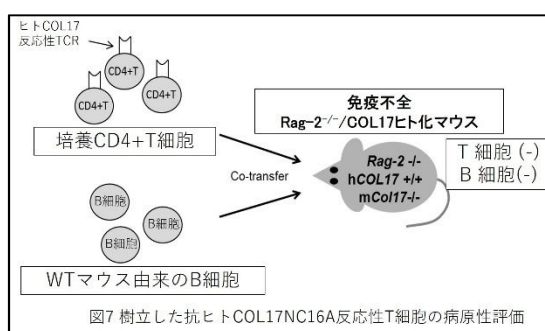
(1) ヒト COL17 反応性 CD4+T 細胞株の樹立

図 5 に概略図を示す。ヒト COL17NC16A タンパクとアジュバントを混合し、野生型マウスに免疫した。免疫から 2 週間経過後に免疫マウスのリンパ節および脾臓を採取して得たヒト COL17NC16A 反応性 T 細胞を培養した。他の野生型マウスより脾細胞を採取し、ヒト COL17NC16A の病原性エピートプをカバーする合成ペプチドである R7 ペプチド (Natsuga K, et al. J Immunol. 2012、図 6) と共培養したのちに X 線を照射し、これを feeder 細胞として培養 T 細胞に加えた。これにより R7 反応性 T 細胞のみが抗原刺激を受け、抗原特異的でない T 細胞は培養の過程で死滅する。培養開始 3 週間後に R7 ペプチドに対する T 細胞の反応性を ³H の取り込みで判定した。抗原特異的 T 細胞を含む細胞液に対し限界希釈を施行し、96well plate で培養を継続した。2 週間おきに前述の feeder 細胞を加え抗原刺激を行い、クラスター形成を確認した。樹立した T 細胞株の表面マーカーをフローサイトメトリー法を用いて検査し、得られた細胞株が CD4+T 細胞であるかを確認した。



(2) ヒト COL17 反応性 CD4+T 細胞株の in vivo での病原性の評価

樹立した T 細胞株の活性化プロファイルおよびサイトカイン産生プロファイルをフローサイトメトリー法で確認した。T 細胞株の in vivo での病原性の評価を行うため、ヒト COL17NC16A タンパクで免疫した野生型マウスの B 細胞とともに T 細胞株を Rag ノックアウト COL17 ヒト化マウスに移入した (図 7)。レシピエントマウスにおける皮疹の臨床経過および病理学的所見、脱毛や白毛化の有無、血中抗ヒト COL17 抗体価やサブクラス・エピートプを評価し、T 細胞株の差異による病原性の有無について検討する。



4. 研究成果

(1) ヒト COL17 反応性 CD4+T 細胞株の樹立

ヒト COL17NC16A タンパクで免疫したマウスより得られた T 細胞を、R7 ペプチドによる抗

原刺激を加えながら培養した。培養開始 DAY21 の時点で培養細胞の一部を分離し、R7 ペプチドによる抗原刺激の有無で ^3H の取り込みを比較したところ (Thymidine-uptake 法) 一部の well において R7 ペプチドの刺激により ^3H の取り込みが亢進していた。この well の細胞液を限界希釈し、R7 ペプチドによる抗原刺激を反復しながら 96well plate で培養したところ、DAY34以降から一部の well で明らかなクラスター形成が見られた (図 8)。得られた培養細胞を、R7 ペプチドの有無で ^3H の取り込みを比較

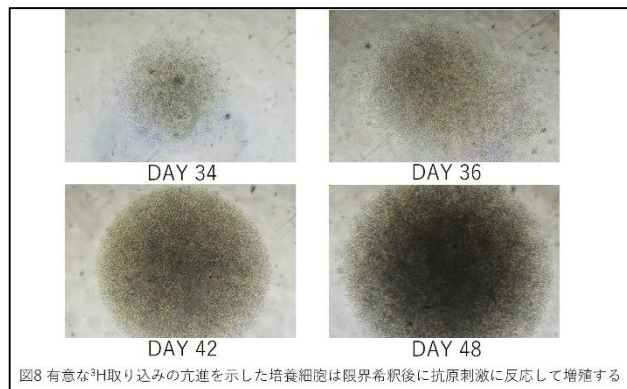


図8 有意な ^3H 取り込みの亢進を示した培養細胞は限界希釈後に抗原刺激に反応して増殖する

したところ、抗原刺激群で著明な ^3H の取り込みの亢進を示した (図 9 の R7 feeder 参照)。また増殖している細胞の表面マーカーをフローサイトメトリー法で確認したところ、live cell のほぼすべてが $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ であり、 CD8^+ 細胞は存在しなかった (図 10)。以上より、得られた細胞株は R7 反応性 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞であることが示された。

Name of cells	Thymidine uptake		Stimulation Index
	R7 feeder	Mock feeder	
#100C3	32190	1952	16.5
#100F5	10573	2377	4.4
#100C6	3880	1870	2.1
#100C7	55653	997	55.8
#100D7	31726	42	761.4
#100F7	19475	83	235.6
#100G7	1901	42	44.9
#100B8	7251	78	92.6

図9 抗原刺激を反復して増殖した細胞はR7ペプチド反応性である

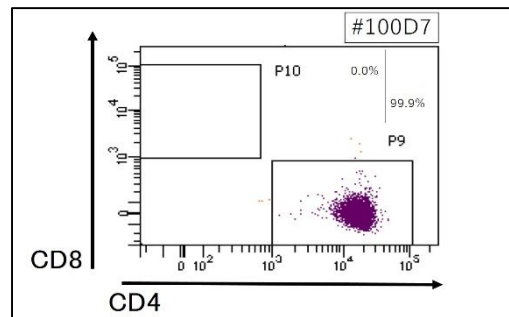


図10 抗原刺激に反応して増殖した細胞は $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞である

1 回目の Thymidine-uptake 法で、 ^3H 取り込みの亢進を示し限界希釈後も継続して細胞増殖を示した細胞液を含む well は現時点で 6well 存在し、いずれの well からも限界希釈後に複数の細胞株が得られており、現在 21 ラインの細胞株が存在する。これらの細胞株から mRNA を採取し、cDNA へ変換したのちに PCR 法で T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を増幅させたところ、いずれの細胞株においても 2~4 種類のバンドが見られた (図 11)。したがって、得られた細胞株はオリゴクローナルであると考えた。また、限界希釈前の培養細胞の由来が同じ細胞株では同じバンドがみられたのに対し、限界希釈前の培養細胞の由来が異なる細胞株ではそれぞれ異なる TCR 遺伝子の増幅を示した (図 11)。発現したバンドのうち、TCR V β 2 レーンの PCR 増幅産物を gel extraction で回収し DNA sequencing を行ったところ、V β 2 鎖の遺伝子配列が含まれていることが確認された。

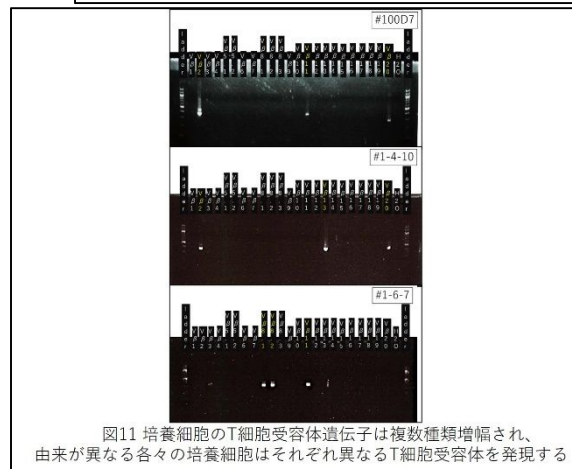


図11 培養細胞のT細胞受容体遺伝子は複数種類増幅され、由来が異なる各々の培養細胞はそれぞれ異なるT細胞受容体を発現する

(2) ヒト COL17 反応性 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞株の in vivo での病原性の評価

上記により得られた細胞株のうち 7 ラインの細胞株について、活性化マーカーをフローサイトメトリー法を用いて確認したところ、いずれの細胞株でも live cell はほぼ全て $\text{CD4}^+\text{CD44}^+\text{CD62L}^-$ であり、増殖細胞はほとんど全て effector T 細胞であると考えた (図 12)。また、フローサイトメトリー法でサイトカイン産生を分析したところ、40-50%の細胞が $\text{IFN-}\gamma$ を産生していたが、IL-4 および IL-17 を産生する細胞は見られず、Th1 dominant のサイトカイン産生パターンを示していた (図 13)。

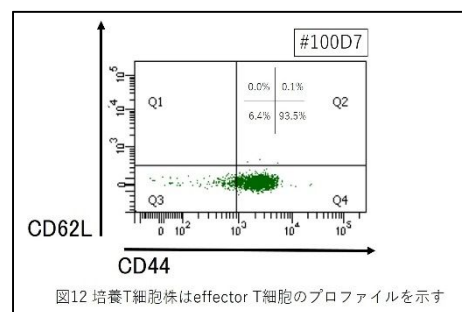


図12 培養T細胞株はeffector T細胞のプロファイルを示す

得られた細胞株のうち 4 ラインを野生型マウスの B 細胞とともに Rag ノックアウト COL17 ヒト化マウスにそれぞれ移入した。移入後 DAY10 の血清を用いて、正常ヒト表皮を基質とした蛍

光抗体間接法(IIF)を行ったところ、4匹中1匹で表皮基底膜(BMZ)への沈着がみられた(図14)。DAY12のtail skinを用いて蛍光抗体直接法(DIF)を行ったところ、4匹中2匹のマウスでBMZへの抗体沈着がみられた(図14)。また、移入後数週間の時点では移入マウスに明らかな皮疹はみられていなかったが、移入後16週経過時点で、移入マウスの4匹中2匹において、背部に明らかなびらんが認められた(図15)。PBMCを採取しフローサイトメトリーを施行したところ、移入後6wまでの時点ではT細胞がほぼ存在しなかったのに対し、移入後16wのPBMCでは血球全体の1.2~2.5%がCD4陽性T細胞であった。いずれもCD8陽性細胞は存在しなかった。また、びらんがみられないマウスでは血中CD4陽性細胞は0.3%程度とびらんのみられたマウスよりも割合が低下していた(図16)。いずれもB細胞の割合は3.0%前後で同等であった。

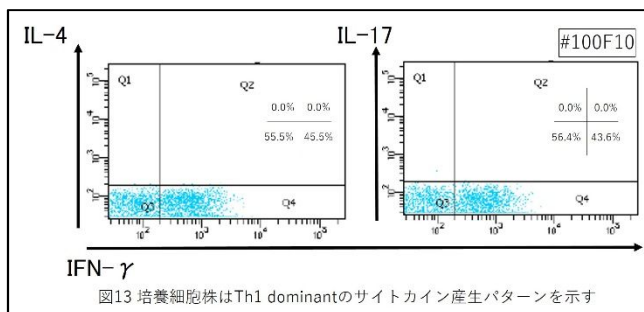


図13 培養細胞株はTh1 dominantのサイトカイン産生パターンを示す

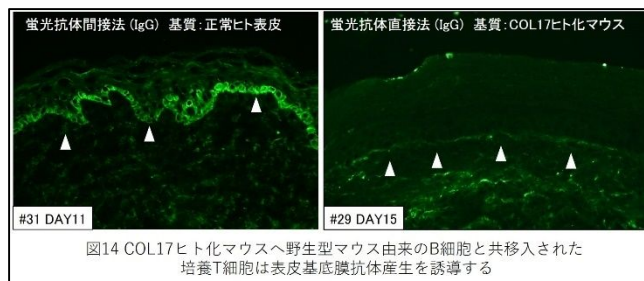


図14 COL17ヒト化マウスへ野生型マウス由来のB細胞と共移入された培養T細胞は表皮基底膜抗体産生を誘導する



図15 培養T細胞と野生型マウス由来B細胞を共移入されたCOL17ヒト化RAGノックアウトマウスは皮疹を生じる

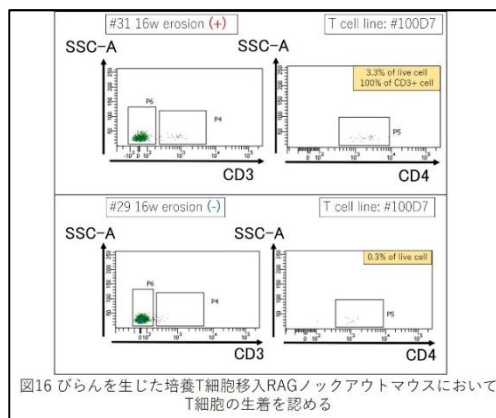


図16 びらんを生じた培養T細胞移入RAGノックアウトマウスにおいてT細胞の生着を認める

【考察】

現時点でヒト COL17 反応性 T 細胞株を複数得られているが、モノクローナルの細胞株はいまだ得られていない。一般的な限界希釈では細胞数を 0.5 ~ 1 cell/well とごく薄い濃度に設定して希釈を行うが、本研究においては、T 細胞自身が産生する IL-2 などの増殖因子が T 細胞の増殖のために重要であると考えられ、細胞株を得るためには比較的高い細胞濃度 (100 ~ 250 cell/well) が必要であった。そのため、1 つの well に複数個の R7 反応性 T 細胞が含まれており、1 細胞株に複数の TCR をもつ T 細胞が存在すると考えた。これを解決するために、現在得られた細胞をさらに限界希釈することを検討している。現時点で得られた細胞株は抗原刺激に反応して良好な増殖を示しているため、培養当初よりも増殖に必要な細胞濃度が少ないと推測しており、モノクローナルなヒト COL17 反応性 T 細胞を得られる可能性がある。

複数の細胞株を RAG ノックアウト COL17 ヒト化マウスに移入したが、現時点で確認できた病原性(皮疹)は軽度であり、先行研究で確立したアクティブ BP モデルマウスなどに比べて病勢が弱く、また皮疹発現に要する期間も長い。これについて、移入する時点で T 細胞の viability が低下している可能性や、R7 ペプチド反応性の T 細胞株が生体内に移入された際に抗原提示細胞によって提示されているヒト COL17 を認識できていない可能性を考慮した。今後、ヒト COL17 反応性 T 細胞株を介した抗体産生の評価をより簡便に行うために、現在、COL17NC16A タンパク免疫野生型マウス由来の B 細胞と T 細胞株を共培養し in vitro で評価する方法の条件検討を行っている。

本研究の開始当初はプロトコールの最適化に難航したため、複数の良好なヒト COL17 反応性 T 細胞株が得られるようになるまでに時間を要した。したがって、細胞株のサイトカイン産生プロファイルの差異については現在も解析中であり、得られた細胞株ごとの特性は今後、in vivo での解析を中心に進めて行く。

以上、本研究ではヒト COL17 反応性 T 細胞株の樹立に成功した。今後、得られた細胞株の詳細な解析を継続し、水疱性類天疱瘡のみならず、扁平苔癬といった炎症性皮膚疾患や、円形脱毛症といった毛包性疾患の病態解明へと展開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zheng M., Ujiie H., Iwata H., Muramatsu K., Yoshimoto N., Ito T., Ujiie I., Shimizu S., Sato-Matsumura K.C., Shimizu H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Characteristics of IgG subclasses and complement deposition in BP230-type bullous pemphigoid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 595 ~ 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.15325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimoto N., Ujiie H., Zheng M., Iwata H., Kosumi H., Hata H., Shimizu H.	4. 巻 32
2. 論文標題 Bullous pemphigoid with the deposition of IgG2 but not IgG1, IgG3 nor IgG4 autoantibodies at the basement membrane zone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e344 ~ e346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.14920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugai T., Ujiie H., Nakamura H., Kikuchi K., Iwata H., Shimizu H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Case of autoimmune intraepidermal and subepidermal blistering disease in which autoantibodies to desmoglein 1 and BP230 coexist	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e215 ~ e216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ujiie I., Ujiie H., Iwata H., Shimizu H.	4. 巻 180
2. 論文標題 Clinical and immunological features of pemphigus relapse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1498 ~ 1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.17591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ujiie H., Yoshimoto N., Natsuga K., Muramatsu K., Iwata H., Nishie W., Shimizu H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Immune Reaction to Type XVII Collagen Induces Intramolecular and Intermolecular Epitope Spreading in Experimental Bullous Pemphigoid Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ujiie I., Ujiie H., Yoshimoto N., Iwata H., Shimizu H.	4. 巻 47
2. 論文標題 Prevalence of infectious diseases in patients with autoimmune blistering diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 378~384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seo T., Ujiie H., Ujiie I., Iwata H., Shimizu H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Epitope spreading possibly from BP230 to the NC16A domain of BP180 preceding disease progression in bullous pemphigoid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ujiie H
2. 発表標題 New insights into bullous pemphigoid.
3. 学会等名 The 24th World Congress of Dermatology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ujiie H
2. 発表標題 Mechanism of autoantibody production in bullous pemphigoid
3. 学会等名 Japan-Singapore International Skin Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ujiie H
2. 発表標題 Clarification of the mechanism of the breakdown of self-tolerance in bullous pemphigoid
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩田 浩明 (IWATA Hiroaki) (20397334)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	西江 渉 (NISHIE Wataru) (20443955)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	