

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08786

研究課題名(和文) 自己免疫疾患における補体の新たな働きの解明

研究課題名(英文) The impact of complement in blistering formation of pemphigoid

研究代表者

岩田 浩明 (Iwata, Hiroaki)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20397334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡の水疱形成には補体を介した炎症が必須とされたが、必ずしも必要な条件ではないことをこれまでに示した。しかし、補体が自己抗体の定常領域に結合することで自己抗原BP180の細胞内への取り込みが促進されることを証明した。この際、最初に結合する補体C1qは、自己抗体刺激によりケラチノサイトも産生することが示された。つまり、自己抗体により自己抗原の減少と同時に補体C1qの産生が生じてそれがさらにBP180の細胞内への取り込みを促進するということが水疱形成に重要であることが示唆された。補体を介した炎症は、病気の重症化に関与するが水疱形成には必須ではないと考えられる結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水疱性類天疱瘡の治療は、根本原因となる自己抗体を減らすことを目的とした治療戦略が主体である。今回の研究成果は、単なる免疫抑制による自己抗体の抑制のみでなく補体を治療ターゲットとした新たな治療選択肢の可能性が広がる。免疫抑制治療は、しっかり使うことで有効性は期待できるが副作用も比較的多い治療である。補体などFc結合タンパクによる抗体の性質変化を抑制する治療法は新しい治療ターゲットとなりうる可能性があり、副作用も軽減できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The inflammation caused by complement is thought to be essential for the blistering mechanism of bullous pemphigoid. However, we have previously shown the complement independent blistering mechanism. At this study, we found that C1q which is a component of complement systems enhances the endocytosis of BP180 after binding BP-IgG to BP180 using cell culture system. In addition, keratinocytes stimulated with BP-IgG produced C1q from from keratinocytes and enhanced the endocytosis of BP180. Based on these results, we think that the complement may directly modulate the pathogenicity of BP-IgG autoantibody. In addition, complement enhance the severity of buloous pemphigid though the inflammation.

研究分野：皮膚科

キーワード：水疱性類天疱瘡 17型コラーゲン 補体 自己抗体 Fc結合タンパク

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 (以下、BP) の水疱形成の機序は、補体を介した炎症が中心であると長らく考えられてきた。しかし、代表者らは自己抗原の枯渇こそが水疱形成の根幹であると報告した。その際、自己抗体の病原性を評価する手法として、自己抗体刺激による培養細胞における自己抗原 (COL17) が減少・枯渇する Depletion Assay を報告した (図 1、[Iwata H, et al. J Invest Dermatol, 2009](#))。さらに、本手法を用いて、治療法の一つである大量ガンマグロブリン療法の作用機序の一つが中和抗体 (イディオタイプ抗体: 抗体の可変領域に対する抗体) であることを明らかにした ([Kamaguchi M, Iwata H, et al. Front Immunol, 2018](#))。

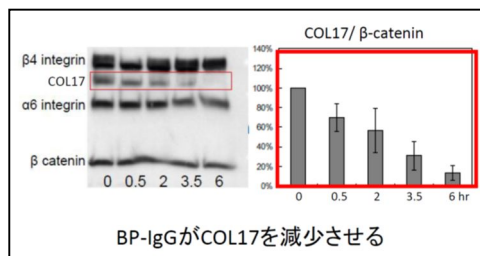


図 1 自己抗原の枯渇

中和抗体による治療的作用を発見した際に、抗体の定常領域 (Fc 領域) に対する抗体も同様の作用があるのではないかと推察した。しかし、われわれの予想に反して Depletion assay を行う際に Fc 領域に対する抗体を添加したところ、著しく自己抗原の枯渇が促進される事実を発見した (図 2)。補体は、いくつかの分子がカスケードを経て活性化して機能を発揮する。中でも古典経路の活性化は、C1q が抗体の Fc 領域に結合してカスケードが開始される。つまり、補体は Fc 領域に結合して自己抗原の枯渇にも大きく関与して水疱形成に関与するのではないかと仮説を立てた。本研究は、この新たな水疱形成の機序を証明するために発案した。

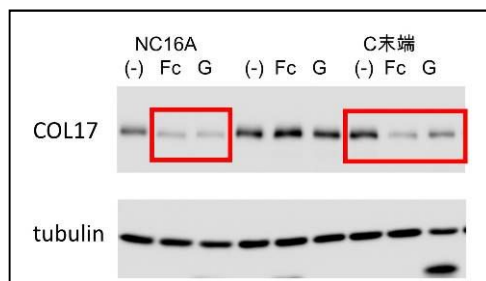


図 2 抗原枯渇の促進効果

2. 研究の目的

本研究の目的は、補体が炎症以外の働きにより自己免疫疾患の病態に関与している可能性を検証する。補体は、炎症に関与する免疫分子であると認識されてきた。本研究は、これまでに報告のない補体の新たな働きの可能性について解明する独創的な研究である。本研究成果は、リウマチなど自己免疫疾患全般における「補体 = 炎症」という病態の理解を大きく変える可能性がある。新たな病態・機能の解明により、分子標的治療による補体をターゲットとする治療法の開発を目指す研究である。

3. 研究の方法

培養細胞に BP-IgG 刺激を加えると自己抗原が細胞内に取り込まれて分解減少する Depletion assay は、申請者が確立した手技でありこれを応用して行う。以前当教室で報告した病原抗体産生 B 細胞クローンの抗体の可変領域の遺伝子配列 ([Li Q, et al. J Immunol, 2010](#)) をもとに、遺伝子改変技術を用いてヒト IgG1/IgG4 とマウス IgG1/IgG2a の mAb を HEK293 細胞で一過性発現にて作成する (図 3)

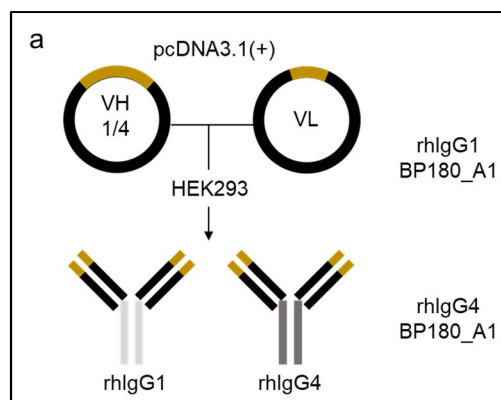


図 3 mAb 作成手順

我々が保有する非病原抗体とされる BP180-C 末端を認識する mAb (C17-C1) の可変領域の遺伝子配列を決定し、同様にヒト化した mAb を作成する。遺伝子改変技術が必要な理由は、抗体はアイソタイプやサブクラスにより補体活性化能が異なるためである。樹立した mAb を用いて、BP-IgG と共に C1q 刺激をした場合に抗原の枯渇が促進するか検証する。

培養細胞に対して BP-IgG 刺激を行い、補体 C1q の発現の変化をウエスタンブロットおよび定量的 PCR 法にて検証する。

Depletion assay で BP180 の減少が認められるのは NC16A 抗体のみであるため、NC16A 領域の重要性を検証するため、抗体結合部位 (エピトープ) の Swapping タンパクを発現する細胞を CRISPR-Cas9 遺伝子改変技術を用いて作成して上記同様に検証する (図 4)。

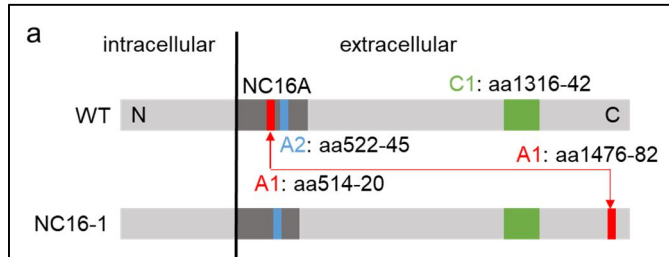


図 4 Swapping BP180 発現細胞の樹立

4. 研究成果

(1) BP180-NC16A mAb 作成

過去の患者抗体から作成された不死化 B 細胞クローンの可変領域シーケンスをもとに重鎖および軽鎖のベクターを作成して HEK293 細胞にて一過性発現させた。この際、重鎖は IgG1 と IgG4 を作成した。いずれも皮膚基底膜を認識する抗体であり、

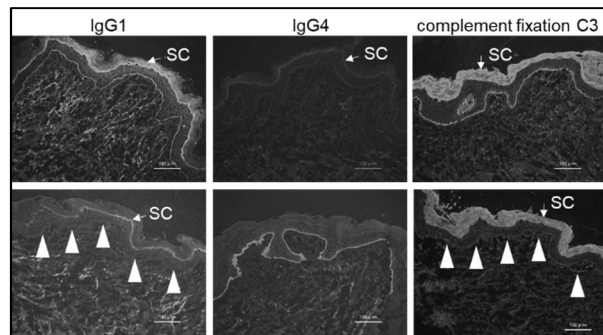


図 5 BP180-NC16A mAb

らに、補体結合能は IgG1 のみに認めた (図 5)。これらは、大量精製を行い ProteinG カラムによる精製を試みたが、今のところ濃縮はできていない。

(2) BP180-C 末 mAb 作成

上記同様に、我々の保有する BP180-C 末ハイブリドーマから可変領域のシーケンスを行った。興味深いことに重鎖、軽鎖ともに複数の配列が検出された。それぞれの配列に対して同様にベクターを作成して発現を誘導したところ、重鎖および軽鎖の単独では発現が見られるものの共発現させると軽鎖が発現しなかった。こちらは、定常領域の配列を入れ替えてベクターの作成を行って解決を図っている。

また、DPP4 阻害薬関連類天疱瘡患者から Phage display 法で non-NC16A 抗体の作成を試みている。

(3) C1q 結合阻害実験

上記で作成した mAb に対して C1q の結合を阻害するペプチドを作成した。

C1q-b1: CEGPFGPRHDLTFCW

C1q-b2: FPLRAPTFVVRTIG

C1q-b1 は結合阻害能を有するが、C1q-b2 は阻害能を有さない (図 6)。

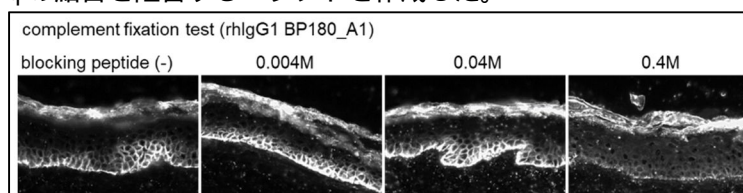


図 6 ブロッキングペプチドによる阻害実験

(4) ケラチノサイトからの C1q 産生

ケラチノサイトに対して BP180 抗体刺激を加えて C1q の産生を定量的 PCR およびウエスタンブロット法にて検出した。コントロールの正常 IgG 刺激と比べて NC16A の抗体で mRNA 発現の上昇 (図7 左) とともに、タンパク量の増加を検出した (図7 右)。

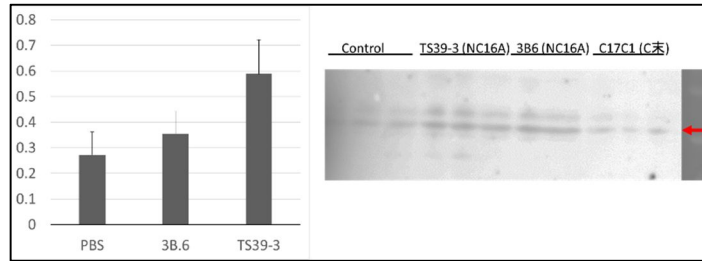


図7 C1q qPCR (左) ウエスタンブロット (右)

(5) NC16A ドメインの入れ替えタンパク発現細胞の樹立

BP180 の Depletion は NC16A 抗体依存性に生じるため、アミノ酸配列の重要性あるいは部位の重要性を検証するために 3B6 のエピトープを C 末端に移動した BP180 のベクターを作成した。Ker-CT (不死化ケラチノサイト) を CRISPR-Cas9 で BP180 をノックアウトしたのち、作成したベクターをレンチウイルスベクターにて移入して変異細胞を作成した。

これらは、野生型細胞と同様に BP180 は 3 本鎖を形成して、NC16A 抗体 (TS39-3) により Depletion も生じることが証明された。

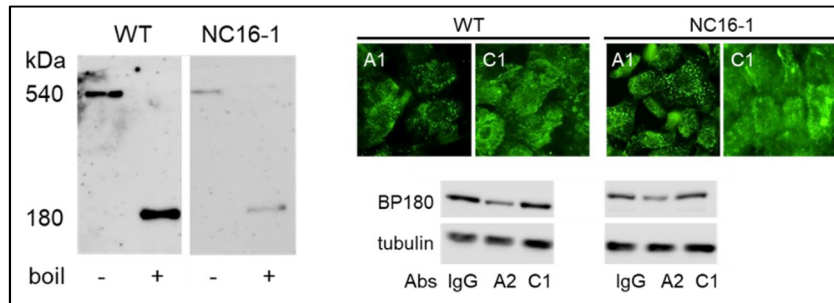


図8 Swapping BP180 3本差 (左) Depletion (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirano Yoko, Iwata Hiroaki, Tsujuwaki Masumi, Mai Shoko, Mai Yosuke, Imafuku Keisuke, Izumi Kentaro, Koga Hiroshi, Ujiie Hideyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 Super resolution imaging detects BP180 autoantigen in immunoglobulin M pemphigoid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 374 ~ 378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16260	査読の有無 無
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 Imafuku Keisuke, Kamaguchi Mayumi, Natsuga Ken, Nakamura Hideki, Shimizu Hiroshi, Iwata Hiroaki	4. 巻 384
2. 論文標題 Zonula occludens-1 demonstrates a unique appearance in buccal mucosa over several layers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 691 ~ 702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03425-8	査読の有無 無
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0件

〔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	西江 渉 (Nishie Wataru) (20443955)	北海道大学・医学研究院・客員教授 (10101)	
研究分担者	氏家 英之 (Ujiie Hideyuki) (60374435)	北海道大学・大学病院・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------