

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591312

研究課題名（和文）自己抗原ヒト化マウスを用いた後天性表皮水疱症モデルの作成と
新規治療法開発への応用研究課題名（英文）Generation of a disease model for epidermolysis bullosa acquisita using
autoantigen-humanized mice and application for the development of novel treatment

研究代表者

芝木 晃彦 (SHIBAKI AKIHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：40291231

研究成果の概要（和文）：ヒト VII 型コラーゲン(COL7)に対する IgG 抗体を産生する後天性表皮水疱症モデルマウスの作製を試みた。野生型マウスにリコンビナントヒト COL7 を免疫したところ、高力価の抗ヒト COL7 IgG 抗体の産生がみられた。COL7 ヒト化新生児マウスに免疫したマウスの IgG 抗体を腹腔内投与したところ、皮膚基底膜に IgG 抗体の線状沈着が認められた。COL7 ヒト化免疫不全マウスを作成し、抗ヒト COL7 抗体産生を誘発したマウスより脾細胞移植を行ったが、抗ヒト COL7 抗体産生や皮疹は観察できなかった。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop an active disease model for epidermolysis bullosa acquisita which produce IgG against human type VII collagen (COL7). Immunized wild type mice with recombinant human COL7 protein with adjuvant produced high titer of anti-human COL7 IgG antibody *in vivo*. We injected those IgG in neonatal COL7-humanized mice intraperitoneally. We observed the linear deposition of IgG at the basement membrane zone. To develop an active model for EBA, we generated immunodeficient COL7-humanized mice. Splenocytes isolated from immunized wild type mice were transferred into immunodeficient COL7-humanized mice. However, the recipient mice produced no anti-human COL7 IgG or developed no skin changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学、免疫、治療、臨床、自己免疫性疾患、動物モデル、リンパ球

1. 研究開始当初の背景

VII 型コラーゲン (COL7) はアンカーリングフィブリルの構成分子であり、基底膜を介して表皮と真皮との接着をつかさどる重要な基底膜構成蛋白である。COL7 に対して異常な免疫反応が生じると、自己免疫性疾患である後天性表皮水疱症 (epidermolysis bullosa acquisita: EBA) が発症する。EBA 患者では流血中に COL7 に対する自己

抗体が認められ、この自己抗体がアンカーリングフィブリルに沈着することで水疱形成が生じると考えられている。これまでに COL7 で免疫したラビット抗血清 (Sitaru *C et al. J Clin Invest*, 2005)、あるいはマウスを COL7 で直接免疫する実験系で、表皮下水疱を誘発する EBA モデルが報告されている (Sitaru *et al. J Immunol*, 2006)。研究代表者らのグループも、平成 17

年、平成 18 年の基盤研究 C において、マウス COL7 を欠損したマウスを COL7 で免疫し、抗マウス COL7 抗体を産生させたマウスの脾細胞を、免疫不全マウス (RAG2 KO マウス) に移植することで、EBA を発症する新たなモデルマウスを作成した (Moriuchi *et al.* manuscript in preparation)。このモデルでは、持続的に抗ヒト COL7 抗体が産生、表皮基底膜に沈着することで表皮下水疱が形成されることが確認されている。しかし、これらモデルでみられる免疫反応は、マウスの COL7 分子を標的とした反応で、かならずしも EBA 患者における反応を忠実に再現したモデルではないという問題点があった。最近、研究代表者らのグループは、自己免疫性疾患の標的抗原をヒト化したマウスを作成した (“Humanization of autoantigen.” Nishie *et al.* *Nature Med.* 2007)。この自己抗原ヒト化技術は、様々な自己免疫性疾患に応用可能であり、平成 18 年、19 年度におけるその後の研究により、あらたに EBA の標的抗原である COL7 をヒト化した COL7 ヒト化マウスの作成に成功した (Ito *et al.* *Am J Immunol.* 2009)。以上の研究成果を踏まえ、本研究では COL7 ヒト化マウスを用いて、ヒト COL7 に対する自己免疫反応を生じる新たな EBA モデルを作成し、自己抗体産生、水疱形成メカニズムについてより詳細に解析するとともに、最近報告されているリンパ球をターゲットとした分子標的療法による新規治療法の検証とメカニズムの解析を行う研究の着想に至った。

2. 研究の目的

最近の研究により、自己免疫疾患の発症メカニズムが解明されつつあるが、臨床の現場で選択可能な疾患特異的治療法の開発は進んでいない。本研究では“Humanization of autoantigen”という新しい発想に基づいて作成したヒト化モデルマウスをアッセイ系に用いることで、ヒト COL7 をターゲットとした抗体産生から水疱形成にいたる EBA の発症メカニズムについて詳細に検討することが可能であり、このシステムを利用することでヒト COL7 に対する自己免疫反応を抑制する、より副作用の少ない疾患特異的治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リコンビナントヒト COL7 により抗ヒト COL7 抗体産生を誘発する。ワイルドタイプマウスの腹腔内にリコンビナントヒト COL7 をアジュヴァント (CFA) とともに免疫する。経時的に採血した血清中の抗ヒト COL7 抗体の産生を蛍光抗体間接法、ELISA 法、ウェスタンブロット法で検討する。

(2) COL7 ヒト化新生児マウスにリコンビナント COL7 で免疫したマウスの IgG 抗体を

腹腔内投与する。

(3) リコンビナント COL7 で免疫したマウスの脾臓を免疫 3 週間後に摘出し、細胞数を調整 ($1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$ /mouse) する。調整したリンパ球を COL7 ヒト化マウスの尾静脈から静注、移植する。そのマウスの血清中抗体を蛍光抗体間接法と ELISA 法を用いて測定する。

(4) COL7 ヒト化マウスと Rag-2 ノックアウトマウスを繰り返し交配することにより、Rag-2KO/COL7 ヒト化マウスを作製する。

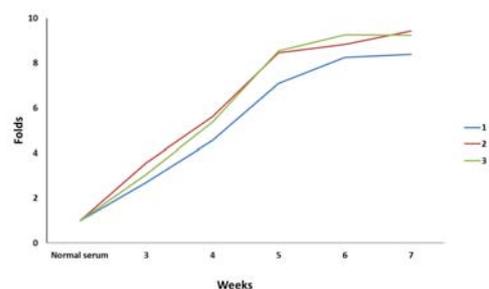
(5) リコンビナントヒト COL7 で免疫したマウスの脾臓を免疫 3 週間後に摘出し、細胞数を調整 ($2.0 \times 10^7 \sim 4.0 \times 10^8$ /ml) する。調整したリンパ球を COL7 ヒト化免疫不全マウスの尾静脈から静注、移植する。そのマウスの血清中抗体を蛍光抗体間接法と ELISA 法を用いて測定する。

4. 研究成果

(1) 生後 8-12 週齢の Wild type (C57BL/6) マウスにリコンビナントヒト COL7 10 μ g をアジュヴァント (CFA) とともに免疫したところ、免疫したマウスは約 3 週間後から蛍光抗体間接法で表皮基底膜部に沈着する IgG 抗体の産生が見られた。

正常ヒト皮膚を用いた蛍光抗体間接法 (x40)

免疫後 3 週間 免疫後 4 週間 免疫後 5 週間

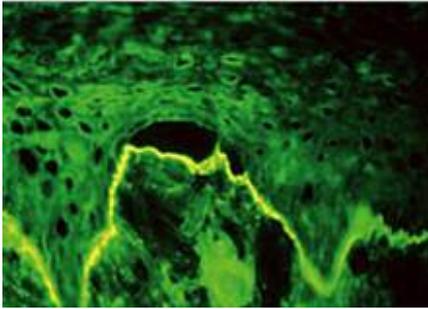


リコンビナントヒト COL7 タンパクを基質とした ELISA 法

抗体価の動きを見たところ、抗体価は継時的に上昇し、蛍光抗体間接法では 5120 倍まで陽性であった。抗体のサブクラスは IgG1 と IgG2c が主であった (IgG1 > IgG2c)。

1M 食塩水で処理したヒト皮膚を用いた蛍光抗体間接法では真皮側に線状の抗体沈着が見られた。

1M 食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法



リコンビナントタンパクを用いたウエスタンブロット法では290kDaのCOL7を認識する抗体であることが確認された。

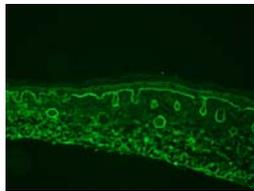
以上より、リコンビナントヒトCOL7で免疫することにより、Wild type マウスに抗ヒトCOL7抗体産生を誘導することができることが示された。

(2) 抗ヒトCOL7抗体産生を誘導したWild type マウスの抗ヒトCOL7抗体の病原性の有無を確認するために、免疫マウスの血清からIgGを抽出し、COL7ヒト化マウス新生児に腹腔内投与した。皮膚基底膜にIgG抗体の線状沈着が見られたが、明らかな水疱形成や皮膚の脆弱性の出現は見られなかった。

抗体投与マウス外観



蛍光抗体直接法

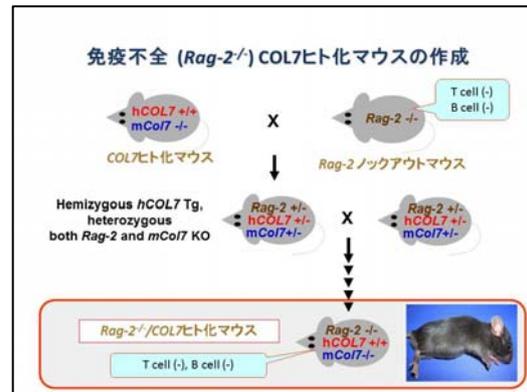


この結果は、EBA患者血清を新生児マウスに投与しても皮疹が誘導されないという過去の報告と合致しており (Sitaru *et al. J Clin Invest*, 2005)、新生児マウスにおいては炎症細胞浸潤を誘導する免疫応答が未成熟なため、抗体沈着のみでは皮疹形成に至らないものと考えられた。

(3) リコンビナントヒトCOL7で免疫したマウスの脾細胞を抽出し、 $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$ の範囲でCOL7ヒト化マウスに移植したが、いずれのマウスにおいても抗ヒトCOL7抗体産生は確認されず、皮疹の変化も見られなかった。これは、移植された脾細胞がレシピエントマウス体内で生着できなかったためと考えた。

(4) COL7ヒト化マウスとRag-2ノックアウトマウス交配し、Rag-2^{+/-}/COL7^{h+,m+/-}マウス

を作製し、さらにそれらを繰り返し交配することにより、Rag-2KO/COL7ヒト化 (Rag-2^{-/-}/COL7^{h+,m+/-}) マウスを作製した。系が複雑なため、作製に1年以上かかった。



(5) リコンビナントヒトCOL7で免疫したマウスの脾細胞を抽出し、 $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$ の範囲でCOL7ヒト化免疫不全マウスに移植したが、いずれのマウスにおいても抗ヒトCOL7抗体産生は確認されず、皮疹の変化も見られなかった。これは、移植された脾細胞がレシピエントマウス体内で生着できなかったか、あるいは生着したが何らかの機序により抗体産生が抑制されたためと考えた。

(6) 結語

リコンビナントヒトCOL7で免疫することにより、Wild type マウスに抗ヒトCOL7抗体の産生を誘導することができた。しかし、誘導した抗ヒトCOL7抗体あるいは抗体産生脾細胞を用いたヒトEBAモデルマウスを作製するには至らなかった。Wild type マウスに抗ヒトCOL7抗体産生を誘導できることがわかったので、今後は *in vivo* および *in vitro* のアッセイ系を確立し、抗ヒトCOL7抗体の病原性を評価したいと考えている。また、より高力価の抗ヒトCOL7抗体を得るために、免疫方法の変更 (ヒトCOL7を発現するトランスジェニックマウスの皮膚を植皮することによる免疫や、アジュバントの変更など) を検討していく。さらに、ヒトEBAモデルマウスの作成のために、レシピエントマウスのさらなる免疫不全化 (NOD-scid マウスとの交配など) も検討していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Wang G, Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Kikuchi K, Li Q, McMillan JR, Morioka H, Sawamura D, Nakamura H, Shimizu H. Blockade of

- autoantibody-initiated tissue damage by using recombinant Fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. *American Journal of Pathology*, 査読有, 176, 2010, 914-25
2. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Moriuchi R, Qiao H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H. A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *Journal of Immunology*, 査読有, 184, 2010, 2166-74
 3. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao HJ, Morioka H, Shinkuma S, Natsuga K, Long HA, Nishie W, Shimizu H. Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model. *Journal of Immunology*, 査読有, 185, 2010, 7746-55
 4. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shimizu H. What's new in bullous pemphigoid. *Journal of Dermatology*, 査読無, 37, 2010, 194-204
 5. Qiao H, Shibaki A, Long HA, Wang G, Li Q, Nishie W, Abe R, Akiyama M, Shimizu H, McMillan JR. Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38-MAPK-dependent migration and cell signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読有, 129, 2009, 2288-95
 6. Nomura Y, Nishie W, Shibaki A, Ibata M, Shimizu H. Disseminated cutaneous Mycobacterium kansasii infection in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical and Experimental Dermatology*, 査読有, 34, 2009, 625-6
 7. Ito K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Nishie W, Sakai K, Natsuga K, Shinkuma S, Shibaki A, Uitto J, Denton CP, Nakajima O, Akiyama M, Shimizu H. Keratinocyte/fibroblast-targeted rescue of Col7a1-disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using human COL7A1 mutation. *American Journal of Pathology*, 査読有, 175, 2009, 2508-17
 8. Shinkuma S, Nishie W, Shibaki A, Sawamura D, Ito K, Tsuji-Abe Y, Natsuga K, Chan PT, Amagai M, Shimizu H. Cutaneous pemphigus vulgaris with skin features similar to the classic mucocutaneous type: a case report and review of the literature. *Clinical and Experimental Dermatology*, 査読有, 33, 2008, 724-8
- [学会発表] (計 3 件)
1. Shibaki A. Human IgG1 mAb against human COL17 NC16A developed from BP patients induces blisters in experimental bullous pemphigoid model. Society for Investigative Dermatology Annual Meeting, 2010年5月8日, Hilton Atlanta, Atlanta, Georgia. (USA)
 2. Shibaki A. Pathomechanism in bullous pemphigoid- evidence from the model animal-. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, 2009年7月10日, 札幌市
 3. Ujiie H, Shibaki A, et al. Development of an active disease model for bullous pemphigoid. International Investigative Dermatology 2008, 2008年5月17日, 京都市
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 芝木 晃彦 (SHIBAKI AKIHIKO)
 北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
 研究者番号：40291231
- (2)研究分担者
 秋山 真志 (AKIYAMA MASASHI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：60222551
- (3)連携研究者
 伊藤 圭 (ITO KEI)
 北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
 研究者番号：20421977