

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591635

研究課題名(和文) 補体をターゲットとした水疱性類天疱瘡の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment targeting complement for bullous pemphigoid

研究代表者

芝木 晃彦 (SHIBAKI, Akihiko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：40291231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡は17型コラーゲン(COL17)に対する自己抗体によって発症する自己免疫性水疱症で、補体活性化とそれに引き続く炎症細胞浸潤が発症に不可欠と考えられているが、補体非依存性の機序も提唱されている。我々は補体欠損COL17ヒト化マウスと抗COL17モノクローナル抗体を作製し、水疱形成には補体活性化ではなく抗体沈着そのものが重要であることを明らかにした。また、患者自己抗体が培養角化細胞のCOL17に結合すると、COL17はユビキチン化されプロテアソームで分解されることを示した。以上より、水疱形成には補体活性化は必須ではなく、抗体結合によるCOL17の減少が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Complement activation and subsequent recruitment of inflammatory cells at the dermal-epidermal junction are believed to be essential for blister formation in bullous pemphigoid (BP), an autoimmune blistering disease induced by autoantibodies against COL17; however, the involvement of complement-independent pathways has recently been proposed. To directly examine the necessity of the complement activation in blister formation, we generated C3-deficient COL17-humanized mice and monoclonal antibodies against COL17 with different ability of complement activation. By using them, we demonstrate that the deposition of antibodies, and not complements, is relevant to the induction of blister formation. BP autoantibodies reduced the amount of COL17 in cultured normal human keratinocytes, and the COL17-depletion was associated with a ubiquitin-proteasome pathway. In conclusion, the COL17-depletion induced by BP autoantibodies, and not complement activation, is essential for the blister formation.

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：自己免疫疾患 水疱性類天疱瘡 17型コラーゲン ヒト化マウス 疾患モデル動物 IgG1/IgG4 抗体サブクラス 補体活性化

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (BP) は、表皮真皮間結合に重要な表皮基底細胞へミデスモゾーム構成分子 1 つである XVII 型コラーゲン (COL17) に対する自己抗体により発症する。BP における表皮下水疱形成機序については、マウス COL17 リコンビナントタンパクを用いた抗マウス COL17 抗体による実験系で検証され、補体の活性化が BP における水疱形成に不可欠であると報告されている (Liu Z, et al. J Clin Invest 1995)。

当研究室では、マウス Col17 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、更にこのマウスにヒト COL17cDNA を導入することで、ヒト COL17 のみ表皮基底膜で発現する COL17 ヒト化マウスを作製した。この新生児マウスへ BP 患者 IgG (抗ヒト COL17 抗体) を投与すると BP に類似した反応が再現され、BP の病態解明に非常に有用なツールとなった (Nishie W, Shibaki A, et al. Nat Med 2007)。我々は、さらに持続的な BP 病変を再現するために、前述の COL17 ヒト化マウスと Rag-2KO マウスを交配して免疫不全 COL17 ヒト化マウスを作製し、抗ヒト COL17 抗体で免疫した野生型マウス脾細胞を移植することによって持続的に皮疹を発症する世界初のアクティブ BP マウスモデルを樹立した (Ujii H, Shibaki A, et al. J Immunol 2010)。これらの BP モデルはいずれも補体活性化を伴っていた。さらに、我々は補体活性能をもたない「抗ヒト COL17 Fab 抗体」(Wang G, Shibaki A, et al. Am J Pathol 2010)、あるいは Fc 領域に遺伝子変異を加えて補体活性能を消失させた「変異抗ヒト COL17IgG 抗体」(Li Q, Shibaki A, et al. J Immunol 2010) を COL17 ヒト化新生児マウスに投与したところ、いずれも水疱形成が見られないことを確認した。一方、BP 患者抗体を培養ケラチノサイトに投与すると、COL17 タンパクの発現量が低下し培養皿との接着が弱まることが報告され (Iwata H, et al. J Invest Dermatol 2009)、補体を介さない表皮下水疱形成メカニズムの存在を示唆する報告もみられる。

2. 研究の目的

本研究では BP の病態に深く関与していると考えられている補体について詳細に検討することで、ヒト COL17 に対する補体を介した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) 抗ヒト COL17-IgG1 抗体および IgG4 抗体の COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

まず、抗 COL17 抗体の補体活性化能と病原性との関連を評価するために、ヒト COL17NC16A ドメインを認識する抗ヒト COL17Fab とヒト Fc 1 および Fc 4 を用いて補体活性化能の高いリコンビナント抗ヒト

COL17 IgG1 キメラ抗体 (rhIgG1)、および補体活性化能をほとんど持たないリコンビナント抗ヒト COL17 IgG4 キメラ抗体 (rhIgG4) を作製した。それらの抗体の補体活性化能を Complement fixation assay および C1q binding assay で評価した。これらの抗体を新生児 COL17 ヒト化新生児マウスに投与し (rhIgG1 4.5-30 μ g, rhIgG4 7.5-50 μ g)、48 時間後に皮膚脆弱性を評価した (n=4-8)。

(2) 抗ヒト COL17 抗体の C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

更に、抗体投与における補体活性化を完全に抑制するために C3KO マウスと COL17 ヒト化マウスを交配し、C3KO/COL17 ヒト化マウスを作製した。その C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスに rhIgG1 と rhIgG4 を投与した (rhIgG1 30 μ g, rhIgG4 50 μ g) (n=4-6)。

(3) BP 患者の IgG の COL17 ヒト化新生児マウスおよび C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

実際の BP 患者抗体における補体活性化と病原性との関連を評価するために、4 人の BP 患者 IgG を精製し、COL17 ヒト化新生児マウスおよび C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスに投与した (IgG-1 1000 μ g, IgG-2 1000 μ g, IgG-3 1500 μ g, IgG-4 1500 μ g) (n=5)。

(4) Fc レセプターブロッカー投与実験

抗体が炎症細胞活性化を惹起する機序として、補体活性化を介する系のほかに Fc-Fc レセプターの相互作用を介する系が挙げられる。この機序の関与を確認するために、COL17 ヒト化新生児マウスに Fc レセプターブロッカー (20 μ g) を投与したのちに rhIgG4 (50 μ g) を投与した (n=7)。

(5) マウス由来抗ヒト COL17 モノクローナル抗体の COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

使用動物と同種の抗体 (マウス抗体) による補体活性化能と病原性との関連を評価するために、補体活性化能および COL17 に対する親和性のそれぞれ異なる 4 種類のマウスハイブリドーマ由来抗ヒト COL17 抗体を COL17 ヒト化新生児マウスに投与した (TS4-2 (IgG2c) 50-500 μ g, TS39-3 (IgG1) 25-100 μ g, TS21-1 (IgG1) 25-100 μ g, T166-1 (IgG1) 25-100 μ g) (n=3-6)。

(6) マウス由来抗ヒト COL17 モノクローナル抗体ハイブリドーマの RAGKO/COL17 ヒト化成体マウスへの投与

ここまで全て新生児マウスを用いて病原性の判定をおこなってきたが、成体マウスにおける補体活性化能の役割を検討するために、上記 (5) で用いたマウス抗ヒト COL17 抗体ハイブリドーマを成体 RAGKO/COL17 ヒト化マウス臍部皮下に移植し (8x10⁶ 個/マウス) 5 週間観察した (n=5)。

(7)培養ヒト角化細胞における COL17 タンパク量の測定およびユビキチン化の検討

BP 患者抗体を培養ケラチノサイトに投与すると、COL17 タンパクの発現量が低下し培養皿との接着が弱まることが報告されている。そこで、培養ヒト角化細胞における COL17 タンパク量を rhIgG1/rhIgG4 抗体投与 (rhIgG1 40 µg/ml、rhIgG4 60 µg/ml) の有無で比較した。さらに、抗体投与における COL17 タンパクの減少機序を検討するために抗体投与後の COL17 のユビキチン化の有無を確認した。また、培養液中にプロテアソーム阻害薬 (MG-132 0-6.5 µM) を投与し、COL17 の減少が抑制されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 抗ヒト COL17-IgG1 抗体および IgG4 抗体の COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

抗ヒト COL17Fab とヒト Fc 1 および Fc 4 を用いて rhIgG1 および rhIgG4 を作製した (図 1) いずれの抗体も正常ヒト皮膚および COL17 ヒト化マウス皮膚に反応した。Complement fixation assay (図省略) および C1q binding assay (図 2) で両抗体の補体活性化能を評価したところ、予想通り IgG1 は高い補体活性化能を有し、IgG4 は極めて低い補体活性化能しか有さないことがわかった。新生児 COL17 ヒト化マウスに投与したところ、補体活性化能の高い rhIgG1 に加え、補体活性化能のきわめて低い rhIgG4 も皮膚脆弱性を誘発することが分かった (図 3)。以上より、リコンビナント抗ヒト COL17 抗体は COL17 ヒト化新生児マウスにおいて補体活性化を介さずに皮膚脆弱性を誘導することが示唆された。

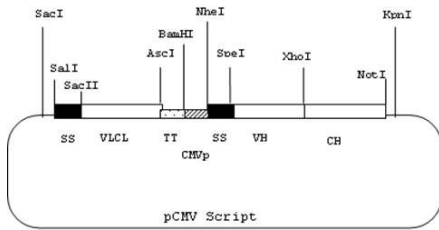


図1 rIgG1/4の発現ベクターの模式図

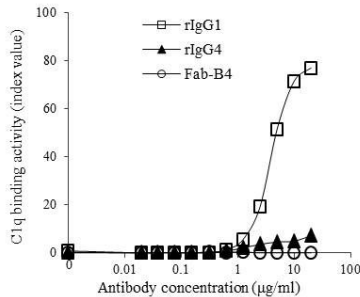


図2 C1q binding assay
rhIgG1/4およびFab-B4を96ウェルプレートにコーティングし、ヒトC1qを添加して結合能を測定した。

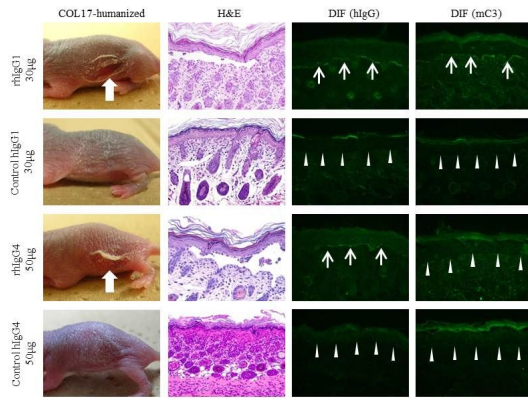


図3 rhIgG1/4を投与したCOL17ヒト化新生児マウスの表現型
rhIgG1およびrhIgG4を投与したマウスは48時間後に皮膚脆弱性を呈する (白大矢印)。H&E染色では表皮真皮境界部に嚢腫を認める。蛍光抗体直接法(DIF)では rhIgG1/4いずれの沈着も認めるが (rhlgG)、補体の沈着はrhIgG1投与マウスのみ認められる (mC3)。コントロール抗体投与マウスはいずれの所見も見られない。

(2) 抗ヒト COL17 抗体の C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

C3KO/COL17 ヒト化マウスを作製し、それらに rhIgG1 と rhIgG4 を投与したところ、いずれにおいても皮膚局所における補体活性化は見られなかったものの、皮膚脆弱性が誘発されることがわかった (図省略)。以上より、COL17 ヒト化新生児マウスにおける皮膚脆弱性は補体活性化を介さずに誘導されることがより直接的に示された。

(3) BP 患者の IgG の COL17 ヒト化新生児マウスおよび C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

BP 患者 IgG を COL17 ヒト化新生児マウスおよび C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスに投与したところ、COL17 ヒト化新生児マウスのみならず C3KO/COL17 ヒト化新生児マウスにおいても皮膚脆弱性が誘発された (図 4)。以上より、BP 患者 IgG は補体活性化を介さない経路で COL17 ヒト化新生児マウスにおける皮膚脆弱性を誘導できることを初めて直接的に証明した。

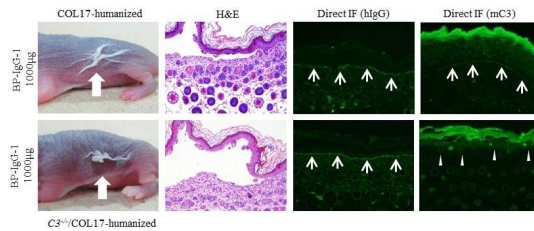


図4 BP患者精製IgGを投与したCOL17ヒト化新生児マウスおよびC3KO/COL17ヒト化新生児マウスの表現型
BP患者IgGはいずれのマウスにおいても皮膚脆弱性を誘導する (白大矢印)。H&E染色では表皮真皮境界部に嚢腫を認める。DIFでは患者IgGの沈着を認めるが (rhlgG)、補体の沈着はCOL17ヒト化マウスのみ認められる。

(4) Fc レセプターブロッカー投与実験

COL17ヒト化新生児マウスにFcレセプターブロッカーを投与したのちに rhIgG4 を投与したが、皮膚脆弱性の抑制は見られなかった (図省略)。以上より、rhIgG4 による皮膚脆弱性の誘導はFc-Fcレセプター相互作用非依存性であることが示された。

(5) マウス由来抗ヒト COL17 モノクローナル抗体の COL17 ヒト化新生児マウスへの投与

補体活性化能および COL17 に対する親和性のそれぞれ異なる 4 種類のマウス由来抗ヒト COL17 抗体を COL17 ヒト化新生児マウスに投与したところ、補体活性化があるものの抗原親和性の低い TS4-2(マウス IgG2c)は皮膚脆弱性を誘導せず、補体活性化が低く抗原親和性の高い TS39-3、TS21-1、T166-1(いずれもマウス IgG1)は皮膚脆弱性を誘導した(図 5)。以上より、病原性は補体沈着量ではなく抗体沈着量に依存することが示された。

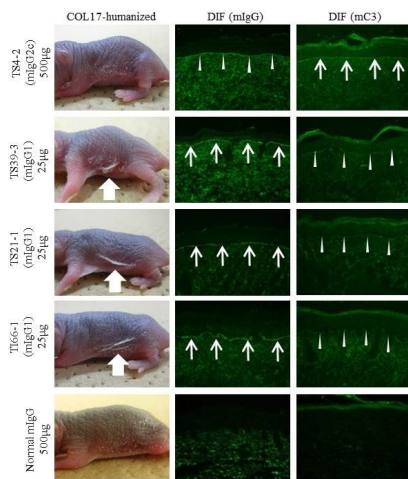


図5 マウスハイブリドーマ由来抗ヒトCOL17抗体を投与したCOL17ヒト化新生児マウスの表現型
TS4-2投与群(最上段)は補体沈着がみられるものの抗体沈着が弱く、皮膚脆弱性は誘導されない。TS39-3、TS21-1、T166-1投与群は補体沈着が見られないが抗体沈着が強く見られ皮膚脆弱性が誘導される。

(6) マウス由来抗ヒト COL17 モノクローナル抗体ハイブリドーマの RAGKO/COL17 ヒト化成体マウスへの投与

上記(3)で用いたマウス抗ヒト COL17 抗体のハイブリドーマを成体 RAGKO/COL17 ヒト化マウスに移植したところ、補体沈着が見られない成体マウスにおいても抗体沈着によって皮膚脆弱性が誘導されることがあきらかとなった(図 6)。

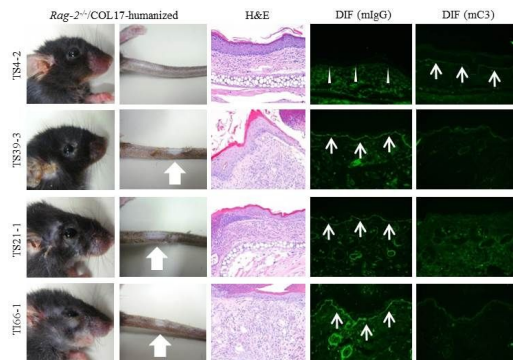


図6 抗ヒトCOL17抗体産生マウスハイブリドーマを皮下移植した成体RAGKO/COL17ヒト化マウスの表現型
TS4-2移植群(最上段)は補体沈着がみられるものの抗体沈着が弱く、皮膚脆弱性は誘導されない。TS39-3、TS21-1、T166-1移植群は補体沈着が見られないが抗体沈着が強く見られ、Tailに皮膚脆弱性が誘導される(白太矢印)。

(7) 培養ヒト角化細胞における COL17 タンパク量の測定およびユビキチン化の検討

培養ヒト角化細胞に rhIgG1/rhIgG4 抗体を投与 (rhIgG1 40 µg/ml、rhIgG4 60 µg/ml) すると、COL17 タンパク量が有意に減少した(図 7)。次に、抗ヒト COL17 抗体(rhIgG4)投与後に COL17 がユビキチン化されていることを確認した(図 8)。培養液中にプロテアソーム阻害薬 (MG-132 0-6.5 µM) を投与したところ、COL17 の減少が抑制された(図 9)。以上より、抗ヒト COL17 抗体がヒト角化細胞の COL17 に結合すると COL17 は細胞内でユビキチン化されプロテアソームで分解され、その結果 COL17 タンパク量が減少することが明らかとなった。

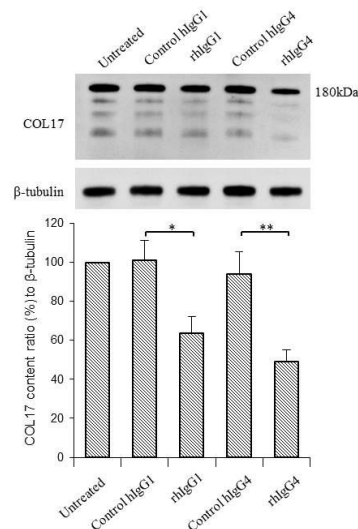


図7 rhIgG1およびrhIgG4を投与した培養角化細胞のCOL17発現量
培養角化細胞にrhIgG1/4を添加し6時間培養後、cell lysateのCOL17量をウエスタンブロット法で測定した。rhIgG1/4はいずれも有意にCOL17量を減少させる。* $P < 0.05$ versus control rhIgG1, ** $P < 0.01$ versus control rhIgG4。

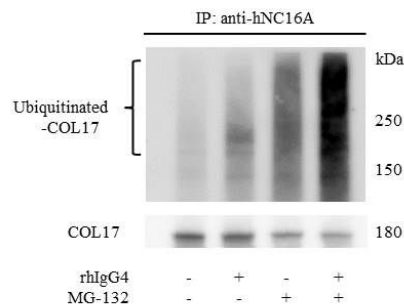


図8 培養角化細胞のユビキチン化の測定

培養角化細胞にrhIgG4およびプロテアソーム阻害薬(MG-132)を添加し、cell lysateを抗COL17抗体で免疫沈降した後にユビキチン化をウエスタンブロットで測定した。rhIgG4投与によりユビキチン化が生じている。

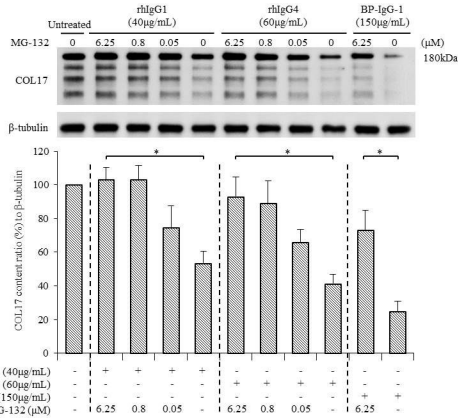


図9 培養角化細胞にプロテアソーム阻害剤(MG-132)を添加した際のCOL17量の測定。培養角化細胞にMG-132を異なる濃度で添加し、rhIgG1/4およびBP患者IgGを投与した。MG-132は抗体投与によるCOL17減少を濃度依存性に抑制している。*P<0.05。

(8)考察

本研究では、抗ヒトCOL17抗体は補体非依存性にCOL17ヒト化マウスの皮膚脆弱性(=病原性)を誘導することを明らかにした。これはBP患者精製IgG(結果(3))、同じエピトープを認識し補体活性化能の異なるヒトモノクローナル抗体(結果(1)(2))、結合力および補体活性化能の異なるマウスモノクローナル抗体(結果(5))の3つの系を用いて示された。これは新生児マウスのみならず成体マウスでも同様であった(結果(6))。さらに、補体非依存性の病原性は、Fcレセプター非依存性であることも確認された(結果(4))。補体およびFcレセプター非依存性の病原性誘導メカニズムとして、抗COL17抗体結合によるCOL17タンパクのコヒキチン化およびプロテアソームによる分解によるCOL17量の減少が示唆された(結果(7))。

研究開始当初は、抗COL17抗体による病原性は補体依存性であり補体活性化の障害がBPの治療となると予想していたが、上記の結果が得られたため今後は抗COL17抗体の産生抑制および抗COL17抗体のCOL17への結合障害がBPの主要な治療戦略となると考えられる。

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 3 件)

1. Ujiie H, Shimizu H. Evidence for pathogenicity of autoreactive T cells in autoimmune bullous diseases shown by animal disease models. *Experimental Dermatology*, 査読有, 21, 2012, 901-5. doi: 10.1111/exd.12011.

2. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H. Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent

manner. *Journal of Immunology*, 査読有 188, 2012, 5792-5799.

doi: 10.4049/jimmunol.1003402.

3. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, Shimizu H. Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clinical Immunology*, 査読有, 142, 2012, 167-175.

doi: 10.1016/j.clim.2011.10.002.

[学会発表](計 2 件)

1. Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Shibaki A, Nakamura H, Shimizu H: Bullous pemphigoid autoantibodies induce skin fragility in neonatal mice in a complement-independent manner. The 6th International Investigative Dermatology 2013. 2013年5月9日(イギリス)

2. Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Shibaki A, Shinkuma S, Tanabe M, Nakamura H, Shimizu H: Monoclonal human IgG1 and IgG4 against COL17 induce skin fragility in neonatal COL17-humanized mice in a complement-independent manner. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012年12月7日(沖縄県)

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・客員研究員

研究者番号: 40291231

(2)研究分担者

清水 宏 (SHIMIZU, Hiroshi)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00146672

氏家 英之 (UJIIE, Hideyuki)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 60374435

(3)連携研究者

なし