

平成 31 年 5 月 5 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05365

研究課題名(和文) 免疫寛容が破綻し発症する画期的水疱性類天疱瘡モデルの作成と応用

研究課題名(英文) Novel bullous pemphigoid models induced by breaking tolerance to autoantigens.

研究代表者

西江 渉 (Nishie, Wataru)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20443955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、免疫寛容の破綻によって発症する水疱性類天疱瘡モデルを作製し、病態解明と新規治療法開発へ応用することを目的としている。水疱性類天疱瘡の患者自己抗体が標的とする自己抗原である17型コラーゲン(COL17)のリコンビナントタンパクを作製し各種マウスへ免疫し、水疱性類天疱瘡のモデルを作製した。免疫したマウスからモノクローナル自己抗体を作製し解析したところ、抗体がCOL17上の標的とする部位および抗体のクラスは、皮膚症状と相関することを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、自己免疫性水疱症のなかで最も頻度の高い水疱性類天疱瘡の自己抗体の発症機序と病態の一部が解明されました。特に、自己抗体の全てが発症に関与する訳ではなく、抗体が標的タンパクである17型コラーゲンのどこに結合するかが重要であることが明らかになりました。また、抗体にはIgGやIgA、IgE、IgMなど様々な種類がありますが、17型コラーゲンの細胞外領域を標的とするIgMクラス自己抗体は、もともと健常のマウスでも有していることを見出しました。本研究は水疱性類天疱瘡がなぜ発症するのかという疑問の一部を解明するものです。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop bullous pemphigoid models for elucidating the pathomechanisms and producing novel therapies. We have established several novel bullous pemphigoid models by immunizing recombinant collagen XVII (COL17) proteins. Notably, monoclonal antibodies derived from the immunized mice disclosed that epitopes and subclasses of the monoclonal antibodies were associated with phenotypes of skin disease.

研究分野：皮膚科学

キーワード：自己免疫性水疱症 コラーゲン 自己抗体 免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者に好発する水疱性類天疱瘡(BP、図1)は、表皮真皮間接合を担う17型コラーゲン(COL17、図2)を標的とする自己抗体によって発症する自己免疫性水疱症の代表疾患である。これまで申請者らは、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水疱が形成されるBPモデルを確立している(Nishie W, et al. Nat Med 13:378, 2007、図3)。このモデルはBPにおける水疱形成機序の解明に非常に有用であり、補体を介さない水疱形成機序の存在や(Natsuga K, Nishie W, et al. J Immunol 2011)、非病原性抗体の証明(Nishie W, et al. Am J Pathol 2015)、抗体の標的部位による病原性の相違(Wada M, Nishie W, et al. J Invest Dermatol 2016)等の解明へ応用されてきた。しかし、高齢者でCOL17に対する免疫寛容が破綻しBP発症に至る機序は不明であった。



図1 水疱性類天疱瘡 (BP)

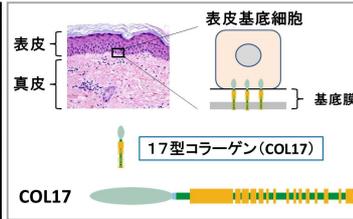


図2 17型コラーゲン



図3 新生仔BPモデル

(2) COL17に対する免疫寛容破綻機序の解明には、マウス自体のCOL17に対し免疫寛容が破綻するモデルが有用である。大腸菌由来のマウスCOL17 NC14A領域タンパク(ヒトCOL17のNC16A領域に相当)をアジュバンドと共に野生型マウスへ免疫し発症するBPモデルが報告されたが(Hirose M, et al. J Immunol 2011)、患者と異なり水疱形成は見られず病理組織学的に表皮下水疱を認めるのみである。また有病率も56%と高くなく、その後は同モデルを用いた研究は報告されていない。従って、より有病率の高いマウス自身のCOL17に対し免疫寛容が破綻し発症するモデルが望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大人マウスで自己抗体を生じ自然発症する新規BPモデルを樹立し、COL17に対する免疫寛容の破綻機序の解明と新規治療法開発を行うことである。全長のヒトCOL17タンパクを、ヒトCOL17を皮膚で発現する遺伝子改変マウスへ免疫し発症するヒトBPモデルと、全長のマウスCOL17タンパクを野生型マウスへ免疫し発症するマウスBPモデルの2系統を作成する。これらは、実際のBP患者の病態に類似した新しいBPモデルであり、BPの病態解明と新規治療法開発など、様々な研究へ応用されることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 全長マウスCOL17タンパクを用いたBPモデルの作製

N末端にFLAGタグ配列を有するマウスCOL17 cDNAを作成し、Flp-Inシステムの発現ベクターであるpcDNA5/FRTのクローニングサイトへ組み込み、pOG44と共にFlp-In 293細胞へトランスフェクションする。ヒグロマイシン下で安定発現株をセレクションし、細胞ライセートから抗FLAG抗体結合マグネットビーズを用い、全長のマウスCOL17タンパクを精製する。精製タンパク(5µg/head)をTiterMaxアジュバンドで、6週齢のSJL/Jメスマウス足底へ免疫する(n=10)。4週後に再度免疫し、最終免疫から12週まで4週毎の採血と表現型評価を行い、最終回到皮膚組織をサンプリングする。

(2) 全長ヒトCOL17タンパクを用いたBPモデルの作製

全長のリコンビナントヒトCOL17タンパクを過去に研究者らが報告した方法で作製する。マウス皮膚でヒトCOL17タンパクを発現するCOL17ヒト化マウス(Nishie W, et al. Nat Med 13:378, 2007)では、抗ヒトCOL17自己抗体が自然に生じる個体が存在するため(未発表データ)、精製タンパク(5µg/head)はアジュバンドを使用せずCOL17ヒト化マウスの足底へ投与する(n=5)。(1)のマウスCOL17を用いたBPモデル作製と同様、4週後に再度免疫し、最終免疫から12週まで4週毎の採血と表現型評価を行い、最終回到皮膚組織をサンプリングする。

(3) プラスミンで切断後の全長ヒトCOL17タンパクを用いたBPモデルの作製

BPの類縁疾患である線状IgA皮膚症(LAD)の患者自己抗体は、全長ではなく切断されたCOL17の細胞外領域(120kDaのLAD1、97kDaのLABD97)を標的とする。研究者らは、全長のヒトCOL17タンパクをプラスミンで消化するとLAD1とLABD97タンパクを生じ、LAD1患者自己抗体が反応することを報告している(Toyonaga E, Nishie W, et al. 未発表データ)。そこで(2)でヒトCOL17を用いBPモデルを作製する際、COL17タンパクをプラスミンで切断したLAD1とLABD97タンパクを使用し、LADに類似するモデルが得られるか検討する。その際、臨床症状に加え、ヒトCOL17タンパクを基質に使用したELISA法で自己抗体値の推移を評価する。

(4) 抗 COL17 モノクローナル抗体 (mAb) の作製と抗体可変領域コード DNA 配列の同定
 上記(1)で作製した BP モデルマウスから脾細胞を採取し、マウスミエローマ SP2/0-Ag14 細胞と PEG を用い細胞融合させ、HAT 培地でセレクションし限界希釈にてクローニングする。得られたハイブリドーマの上清を、リコンビナントマウス COL17 を基質に用いた ELISA 法と正常マウス皮膚を用いた蛍光抗体間接法でスクリーニングし、抗マウス COL17 mAb 産生クローンを同定する。可変領域コード DNA の配列は、mRNA から該当領域を PCR 法で増幅しダイレクトシーケンシング法で解読する。

4. 研究成果

(1) 全長マウス COL17 タンパクを用いた BP モデル

全長のリコンビナントマウス COL17 は、予想通り 180kD の分子量タンパクとして精製することに成功した(図 4A)。本タンパクを SJL/J マウスへ免疫したところ、免疫 2~3 週間後から基底膜部を標的とする IgM, IgG1, IgG2 クラスの自己抗体産生が誘導され(蛍光抗体間接法、図 4B)、2 回目免疫から 8~10 週経過すると耳介や口囲に痂皮を伴う紅斑が出現した(図 4C)。本マウス皮膚基底膜部には IgG とマウス C3 の線状沈着を認め、病理組織学的に多数の炎症細胞浸潤を伴う表皮下水疱が生じていた(HE 染色、図 4D)。好酸球と脱顆粒した肥満細胞も確認できた(Astra Blue 染色、図 4E)。しかし臨床的な水疱形成は確認できず、最終評価時での発症率も 56%と、既存モデルと同様であった。従って、本マウスで生じた自己抗体の多くは非病原性であることが予想された。

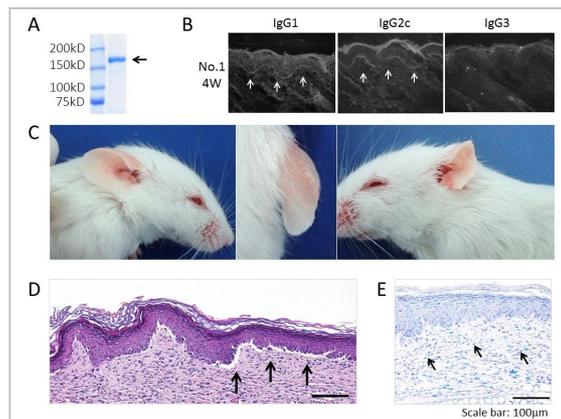


図 4 マウス COL17 免疫モデル

(2) 全長ヒト COL17 タンパクと LAD1, LABD97 を用いた BP モデル

全長のリコンビナントヒト COL17 を COL17 ヒト化マウスへアジュバントを使用せずに投与したところ、耳介に鱗屑を伴う紅斑が出現した(図 5A)。一方、LAD1 と LABD97 を投与したマウスでは皮疹は認めなかった。抗ヒト COL17 IgG クラス自己抗体の有無を経時的に ELISA 法で確認したところ、LAD1 と LABD97 投与群より全長 COL17 投与群の方が抗体価は高かった。一方、正常ヒト皮膚を基質に用いた傾向抗体間接法では LAD1 と LABD97 投与群の方が抗基底膜部自己抗体は明瞭であった(図 5B)。以上より、本マウスで生じる切断された COL17 を標的とする自己抗体の多くは非病原性で、過去の報告と同様、正常ヒト皮膚には切断された COL17 が基底膜部に存在することが予想された。

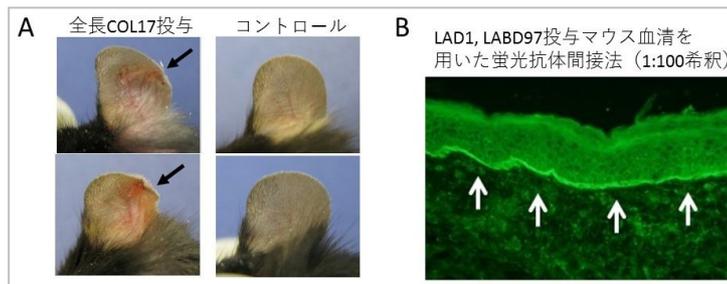


図 5 ヒト COL17 投与モデル

(3) BP モデルマウス由来 mAb の作製と解析

上記(1)で作製した、リコンビナント全長 COL17 タンパク免疫マウスから脾細胞を採取し、モノクローナル抗体を 6 クローン作製した。そのうち 4 クローンは補体活性可能を持つ IgG2c あるいは 2b で細胞内領域を標的とし(図 6A)、IgM であった残りの 2 クローンは、NC14A 以外の COL17 の細胞外領域を標的としていた(図 6B)。このうち 1 クローンは全長の COL17 への反応性が乏しく、断片化された 120kD と 97kD の細胞外領域へ強い反応性を認めた(図 6C)。本クローンの可変領域を解析したところ、somatic hypermutation を認めず自然自己抗体に類似したクローンが増殖したものと予想した。この様な自己抗体が BP 発症の初期段階として生じる可能性が予想され、本研究が BP 発症の一助を解明する大きな成果となると予想した。

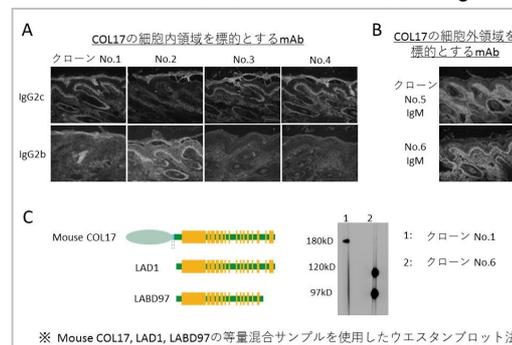


図 6 BP モデルマウス由来 mAb

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Mai Y, Nishie W, Izumi K, Yoshimoto N, Morita Y, Watanabe M, Toyonaga E, Ujiie H, Iwata H, Fujita Y, Nomura T, Sato-Matsumura KC, Shimizu S, Shimizu H. Detection of anti-BP180 NC16A autoantibodies after the onset of dipeptidyl peptidase-IV

inhibitor-associated bullous pemphigoid: a report of three cases.

Br J Dermatol 179: 790-1, 2018. 査読有、DOI: 10.1111/bjd.16656

Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Hirako Y, Sawamura D, Fujimoto W, Shimizu H. C-terminal processing of collagen XVII induces neoepitopes for linear IgA bullous dermatosis autoantibodies. J Invest Dermatol 137: 2552-9, 2017. 査読有、DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.831

Izumi K, Nishie W, Mai Y, Ujiie H, Iwata H, Natsuga K, Shimizu H. Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay. J Dermatol Sci 88: 247-8, 2017. 査読有、DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.005

Wada M, Nishie W, Ujiie H, Izumi K, Iwata H, Natsuga K, Nakamura H, Kitagawa Y, Shimizu H. Epitope-dependent pathogenicity of antibodies targeting a major bullous pemphigoid autoantigen collagen XVII/BP180. J Invest Dermatol 136: 938-46, 2016. 査読有、DOI: 10.1016/j.jid.2015.11.030

Nishimura M, Nishie W, Shirafuji Y, Kamiya K, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Sawamura D, Iwatsuki K, Shimizu H. Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for cutaneous basement membrane formation. Hum Mol Genet 25: 328-39, 2016. 査読有、DOI: 10.1093/hmg/ddv478

Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Shimizu H. Autoantibody profile differentiates between inflammatory and non-inflammatory bullous pemphigoid.

J Invest Dermatol 136: 2201-10, 2016. 査読有、DOI: 10.1016/j.jid.2016.06.622

〔学会発表〕(計 5 件)

Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Ujiie H, Shimizu H. C-terminal cleavage of collagen XVII induces neoepitopes which can be recognized by autoantibodies of linear IgA bullous dermatosis. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, Sendai, December 09-11, 2016.

Izumi K, Nishie W, Nishimura M, Ujiie H, Iwata H, Shimizu H. Collagen XVII is the major autoantigen in mucous membrane pemphigoid. The 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Munich, Germany, Sept7 to 10, 2016.

Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Ujiie H, Shimizu H. Not only ectodomain shedding but also C-terminal cleavage induces neoepitopes on proteolyzed collagen XV. The 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Munich, Germany, Sept7 to 10, 2016.

Mai Y, Izumi K, Nishie W, Shimizu H. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid autoantibodies preferentially target the non-NC16A extracellular domain of collagen XVII. Pathogenesis of Pemphigus and Pemphigoid 2016: the open blister/mind meeting, Satellite Symposium to the 46th ESDR meeting. Institute of Anatomy and Cell Biology, Munich, Germany, Sept5 to 7, 2016.

Nishie W. Immunopathological variants of bullous pemphigoid. Pathogenesis of

Pemphigus and Pemphigoid 2016: the open blister/mind meeting, Satellite Symposium to the 46th ESDR meeting. Institute of Anatomy and Cell Biology, Sept5 to 7, Munich, Germany, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩田 浩明

ローマ字氏名：(IWATA, hiroaki)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：20397334

研究分担者氏名：氏家 英之

ローマ字氏名：(UJIE, hideyuki)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：60374435

研究分担者氏名：夏賀 健

ローマ字氏名：(NATSUGA, ken)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：70645457

(2)研究協力者

研究協力者氏名：泉 健太郎

ローマ字氏名：(IZUMI, kentaro)

研究協力者氏名：豊永 愛恋

ローマ字氏名：(TOYONAGA, ellen)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。