

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21590

研究課題名（和文）画期的マウスモデルを用いた皮膚免疫寛容の破綻機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of breakdown of cutaneous immune tolerance using an innovative mouse model

研究代表者

氏家 英之（Ujiie, Hideyuki）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：60374435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：水疱性類天疱瘡抗原であるBP180が自己免疫の標的となりやすい機序を解明するため、中枢性免疫寛容に着目し解析を行った。胸腺髄質上皮細胞（mTEC）でのBP180のmRNA発現が他のタンパクに比べて低くなかったことから、BP180の免疫寛容破綻機序としてT細胞の中枢性免疫寛容の関与は少ないと考えられた。また、ヒトBP180をK14プロモーターで基底膜部とmTECに強制発現させ、かつFoxp3遺伝子を欠損させたTreg欠損/K14-BP180ヒト化マウスでは抗ヒトBP180抗体の産生が見られず、mTECでの自己抗原強制発現は末梢性免疫寛容の破綻をレスキューできる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスのmTECにおける皮膚構造タンパクのmRNA発現解析結果からは、ヒトでBP180が自己免疫のターゲットとなりやすい機序の解明には至らなかった。しかし、本研究ではmTECにおけるタンパクレベルの自己抗原発現解析は行っておらず、今後更なる検討が必要である。一方、mTECにおける自己抗原の強制発現によって自己抗体産生を抑制できている可能性が示されたため、今後、中枢性免疫寛容の強化が新規治療戦略となる可能性が示唆された。

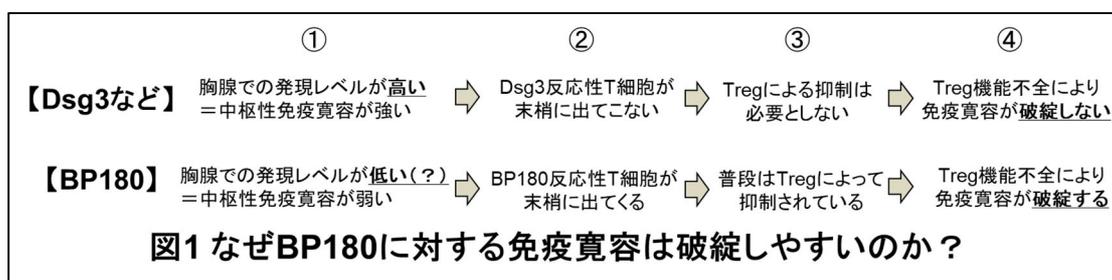
研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism by which BP180, a bullous pemphigoid antigen, is a likely target of autoimmunity, we focused our analysis on central immune tolerance. Since the mRNA expression of BP180 in thymic medullary epithelial cells (mTECs) was not lower than that of other proteins, a loss of central immune tolerance of T cells was considered less likely to be involved as a mechanism of BP180 immune tolerance failure. In addition, Treg-deficient/K14-BP180-humanized mice, in which human BP180 was forced to be expressed in the basement membrane and mTECs by the K14 promoter and the Foxp3 gene was deleted, did not produce anti-human BP180 antibodies, suggesting that forced self-antigen expression in mTECs may rescue the breakdown of peripheral immune tolerance. The results suggest that forced expression of autoantigen in mTECs may be able to rescue the disruption of peripheral immune tolerance.

研究分野：皮膚科学、自己免疫性水疱症

キーワード：免疫寛容 水疱性類天疱瘡 胸腺 mTEC 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

体内にはタンパクが無数に存在するが、多発性硬化症のミエリンタンパクや重症筋無力症のアセチルコリンレセプターなど、自己免疫の標的となるタンパクは極めて限られている。表皮には数十種類以上の構造タンパクが存在し、表皮細胞間や表皮真皮間の接合を担っているが、自己抗体の標的となりやすいタンパクはBP180やBP230、Dsg(デスモグレイン)3、Dsg1など数種類に留まる。そして、その中でもBP180が標的となる水疱性類天疱瘡(BP)が圧倒的に多い。我々は最近、高齢マウスの一部では抗BP180抗体が自然産生されていることを発見した。また、制御性T細胞(Treg)欠損マウスやヒトではStat6依存性にBP180に対する自己抗体が自然産生されるが、抗Dsg3抗体は誘導されないことを報告した(JACI 2018)。また興味深いことに、Tregの免疫抑制能を低下させるPD-1阻害薬投与によるBP発症の報告は多数みられるが、尋常性天疱瘡(PV)の報告はほとんどない。つまり、BP180はTreg機能不全の影響を受けて免疫寛容が破綻しやすく、Dsg3はTreg機能不全の影響を受けず免疫寛容が破綻しにくい。Dsg3は胸腺においてAire依存性にmTECに高発現していることが知られているが(Wada N, et al. J Invest Dermatol 2011)、BP180の発現は不明である。以上より、図1の仮説を立て、それを検証することで「特定のタンパクが自己免疫応答の標的となりやすい機序」の一端を解明できると考えた。



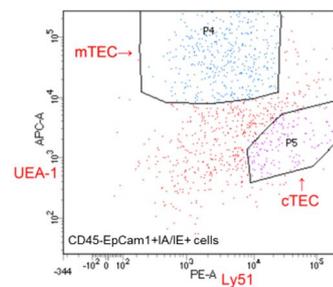
2. 研究の目的

自己免疫疾患は全身の様々な臓器に生じるが、生体内に存在する無数のタンパクのなかで一部のタンパクのみが自己免疫の標的になりやすい理由は明らかになっていない。本研究の目的は、皮膚の構造タンパクを対象として、特定のタンパクが自己免疫の標的となりやすい機序を解明し、それを回避する方法を創出することである。

3. 研究の方法

(1) マウス胸腺の皮膚構造タンパクの発現の網羅的解析

若年マウス(6~10週齢)3匹分の胸腺を1セットとして、mTEC(CD45-EpCam1+IA/IE+UEA1+Ly51-;図2)をセルソーターにて単離した(n=3)。また同様に加齢マウス(80~96週齢)3匹分の胸腺を1セットとしてmTECを単離した(n=6)。若年マウスと加齢マウスの胸腺のmTEC数を比較した。

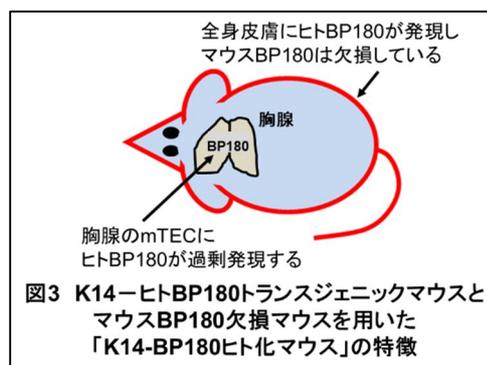


若年マウス(6~10週齢)3匹分の胸腺を1セットとしてmTECを採取してmRNAを抽出し、BP180(=Col17a1)やDsg3のほか、7型コラーゲン(=Col7a1)、BP230、Dsg1、その他各種ラミニンやインテグリンなどの表皮構造タンパクの発現レベルをRNA-sequenceで比較した(n=3)。

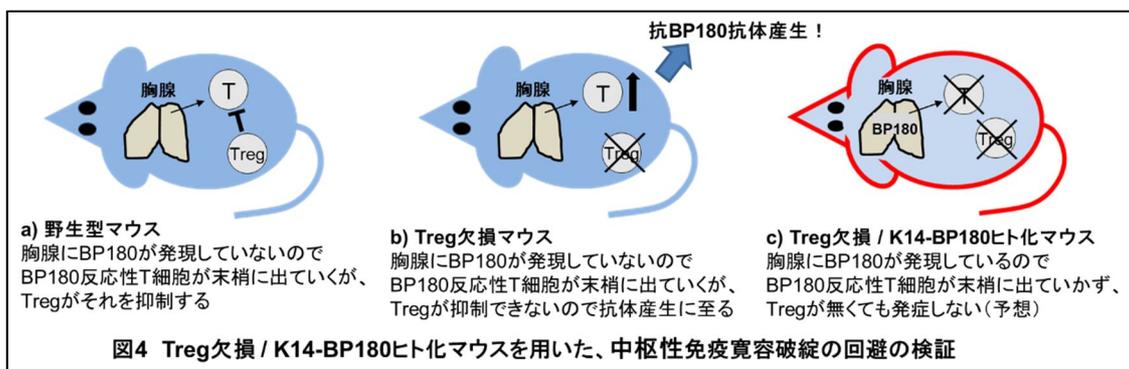
加齢マウス(80~96週齢)で抗表皮基底膜部IgM自己抗体を産生する個体と産生しない個体をtail皮膚の蛍光抗体直接法(DIF)で同定し、それぞれ3匹分の胸腺を1セットとしてmTECからmRNAを抽出し、BP180(=Col17a1)やDsg3、7型コラーゲン(=Col7a1)、BP230、Dsg1の発現をRNA-sequenceで比較した(n=2ずつ)。

(2) 胸腺にBP180を過剰発現させ中枢性免疫寛容の破綻を回避する

マウス胸腺のmTECにBP180を過剰発現させ、BP180に対する中枢性免疫寛容が回復するかどうかを検証した。ケラチン14(K14)プロモーター下にヒトBP180タンパクを発現しているトランスジェニックマウスとマウスBP180欠損マウスを掛け合わせた「K14-BP180ヒト化マウス」(Nishie W, et al Nat Med 2007)を用いた。mTECにはK14が強発現しているため(Lomada D, et al. J Immunol 2007)、このマウス



の mTEC にはヒト BP180 が発現し、中枢性免疫寛容が強くなるはずである (図 3)。この K14-BP180 ヒト化マウスを用いて「Treg 欠損 / K14-BP180 ヒト化マウス」を作製した。通常の Treg 欠損マウスは抗 BP180 抗体を自然産生するが (Muramatsu K, Ujiie H, et al. J Allergy Clin Immunol 2018) (図 4b)、このマウスで抗ヒト BP180 抗体の産生が抑制されるかを検証した (図 4c)

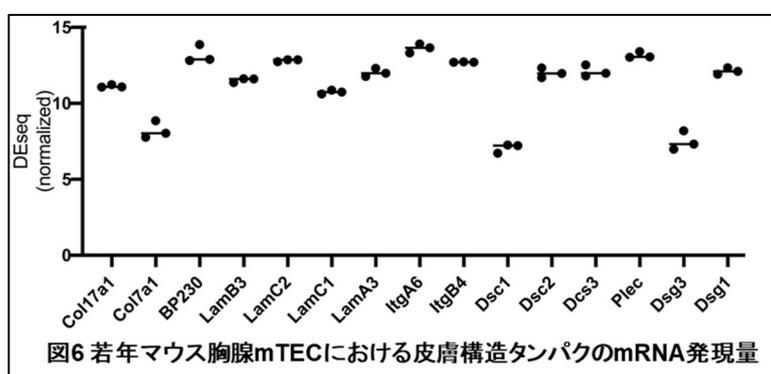
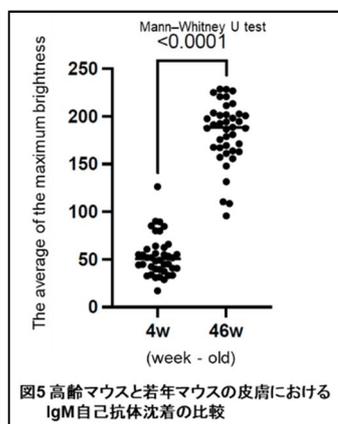


4. 研究成果

(1) マウス胸腺の皮膚構造タンパクの発現の網羅的解析

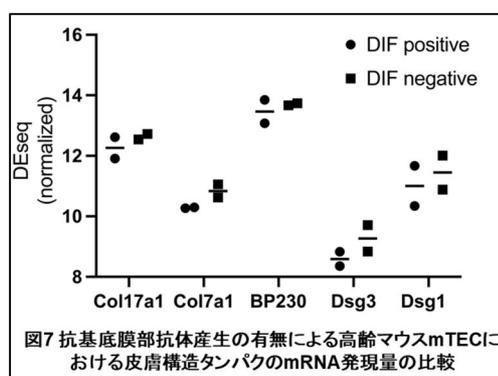
若年マウスでは加齢マウスより有意に mTEC が多かった (図 5)。

図 1 の予想に反して、若年マウス胸腺の mTEC では BP180 (Col17a1) の mRNA が十分に発現していることが明らかとなった (図 6)。



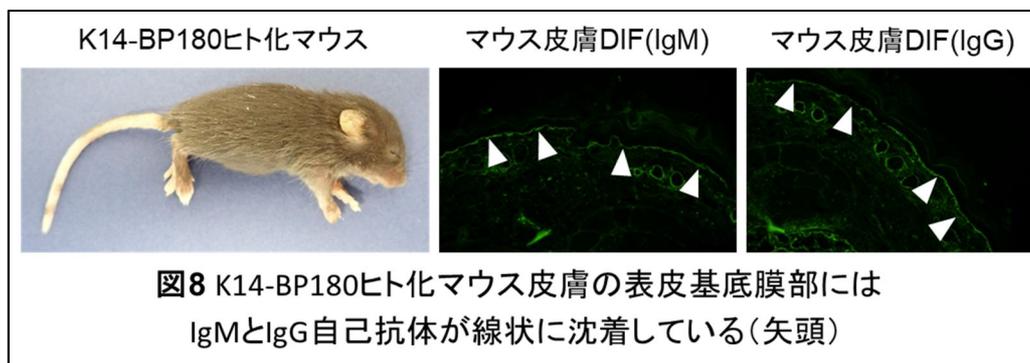
加齢マウス胸腺の mTEC でも各種構造タンパクの mRNA は発現しており、抗表皮基底膜部 IgM 自己抗体の有無では mRNA 発現に差が無かった (図 7)。

上記 に示すように、加齢マウスでは胸腺が退縮しているため、採取される mTEC 数が有意に少なかった。上記 に示すように、我々の予想に反して mTEC では BP180 (Col17a1) は Dsg3 や COL7a1 などの他のタンパクと比較しても十分量発現していた。つまり、「BP180 の胸腺での発現レベルが低いために中枢性免疫寛容 (負の選択) が弱く、その代わり末梢で Treg が BP180 反応性 T 細胞の抑制に重要な役割を果たしている」という図 1 に示した仮説は否定的であった。上記 に示すように、抗表皮基底膜部 IgM 自己抗体産生加齢マウス (DIF positive 群) と自己抗体非産生マウス (DIF negative 群) では代表的な自己抗原である Col17a1 や Col7a1、BP230、Dsg3、Dsg1 の発現に差はなく、mTEC におけるこれらの mRNA 発現と自己抗体産生は直接関連していないことが明らかとなった。今後、本研究結果の確認のため、胸腺 mTEC における BP180 や BP230 の発現を蛍光抗体法によってタンパクレベルで確認する必要がある。BP180 が自己免疫のターゲットになりやすい別の理由として、BP180 タンパクそのものの免疫原性が高い可能性や、加齢や紫外線・外傷・熱傷などの外的刺激等によって抗原性が変化しやすい可能性、BP180 特異的 Treg が加齢によって機能不全になりやすい可能性、Age-associated B cells (ABCs) の関与の可能性などを考慮し、研究を進めていく。

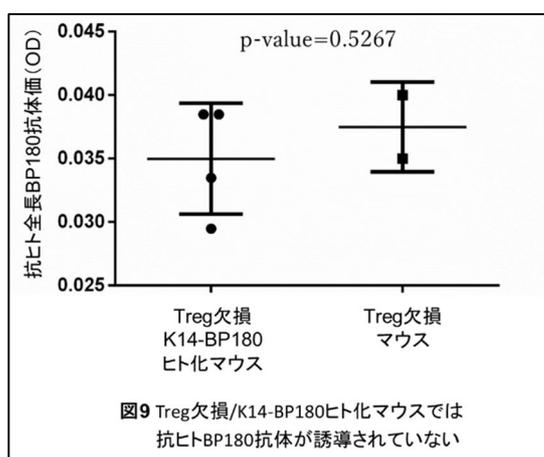


(2) 胸腺にBP180を過剰発現させ中枢性免疫寛容の破綻を回避する

Treg 欠損 / K14-BP180 ヒト化マウスの作製に難渋したが、これまで4匹のマウスが得られた。まず、皮膚に沈着する自己抗体の有無を、DIF で確認した。全ての Treg 欠損 / K14-BP180 ヒト化マウスで、IgM と IgG が表皮基底膜部に線状に沈着していた (図8)。



次に、マウス血清中の抗ヒトBP180抗体の有無を確認するために、ヒトBP180 NC16A リコンビナントタンパクを用いたELISA (MBL) と全長ヒトBP180 リコンビナントタンパクを用いたELISA (Izumi K, et al. J Invest Dermatol 2016) を行った。BP180 NC16A ELISA、全長BP180 ELISA のいずれにおいても Treg 欠損 / K14-BP180 ヒト化マウスの血清中に抗ヒトBP180抗体は検出されなかった (図9)。



以上の結果から、mTECでの自己抗原強制発現は中枢性免疫寛容を強化し、末梢性免疫寛容の破綻をレスキューできる可能性が示唆された。今後は、表皮構成タンパクの各種リコンビナントタンパクを用いたウエスタンブロットを行い、Treg 欠損 / K14-BP180 ヒト化マウスで産生されている抗表皮基底膜部自己抗体の標的抗原の同定を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ujiie Hideyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 What's new in the pathogenesis and triggering factors of bullous pemphigoid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 140 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16654	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 氏家英之
2. 発表標題 中枢性免疫寛容に着目した 自己免疫性水疱症の発症機序の解明
3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2022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	鄭 ビョウ (Zheng Miao) (50833802)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (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
---------	---------