

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15409

研究課題名(和文) 経口免疫寛容を応用した水疱性類天疱瘡自己抗体の産生制御

研究課題名(英文) Induction of tolerance to bullous pemphigoid autoantigen by oral administration of antigenic peptides.

研究代表者

西江 渉(Nishie, Wataru)

北海道大学・医学(系)研究科(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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡(BP)は高齢者に好発する自己免疫性水疱症で、主な標的抗原は表皮真皮境界部に存在する17型コラーゲン(COL17)である。BPでは免疫抑制剤の全身投与が一般的だが、重症化すると死に至る症例も稀でない。従って副作用の少ない疾患特異的な治療法開発が必須である。本研究では、BPの患者自己抗体の多くがCOL17のNC16A領域(77アミノ酸)を標的とする点に着目し、NC16A領域ペプチドをマウスへ経口投与した。その結果、抗原ペプチドの経口投与によって抗COL17の自己抗体産生が抑制される傾向が確認された。本研究結果は、将来、BPに対する新規治療法開発へ応用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is the major autoimmune blistering disease in which autoantibodies mainly target NC16A domain of collagen XVII (COL17). BP may be fatal because majority of patients are treated with systemic immune suppressive drugs; thus, disease-specific therapies are required. In this study, we aimed at the fact that BP autoantibodies mainly target NC16A domain, and hypothesized that oral treatment with NC16A peptides may induce tolerance to COL17. We showed that oral treatment of NC16A peptides can suppress development of autoantibodies directing COL17 in mice, although statistical significance was not achieved. However, this finding must be very helpful to establish novel disease-specific therapies for BP in the near future.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚病態学

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (BP) は高齢者に好発する自己免疫性水疱症であり、主な標的抗原は表皮真皮境界部に存在する 17 型コラーゲン (COL17) である。BP の患者自己抗体の多くは、COL17 の細胞膜近傍の NC16A 領域という細胞外領域を標的とする。77 アミノ酸で構成される NC16A 領域は、180kDa である COL17 分子のなかで非常に限られた領域であり、同部位に対する IgG クラス自己抗体クラス自己抗体が病原性を有することは研究者らが過去に報告している (Nishie W, et al. Nat Med 13: 387, 2007)。BP の水疱形成機序の解明は比較的進んでいる一方、治療は副腎皮質ステロイド等の免疫抑制剤の全身投与が一般的であり、重症化すると死に至る症例も稀でない。従って、副作用の少ない疾患特異的な治療法開発が必須だが未だ確立していない。

2. 研究の目的

本研究では、“経口免疫寛容”という普遍的な免疫制御現象に着目した。“経口免疫寛容”は、抗原タンパクを事前に経口投与すると、後日、同一抗原に対する免疫応答が臓器を問わず、消失あるいは低下する現象である。BP の患者自己抗体が COL17 の NC16A 領域という限られた部位を標的とする点に着目し、NC16A 領域のペプチドを経口摂取した際の免疫応答を明らかにする計画を立てた。本研究の目的は、“経口免疫寛容”を用い BP の発症を予防可能な疾患特異的治療 (予防) 法の開発することである。

3. 研究の方法

(1) NC16A 領域ペプチドの合成

図 1 に示すように、77 アミノ酸で構成されるヒト COL17 NC16A 領域に相当する、4 種の 20~25 アミノ酸ペプチド (R4, R5, R7, R8) を人工合成する。それぞれ 10mg/ml 濃度になるよう PBS で溶解する (R8 のみ 1% アンモニア水を溶解するまで追加した)。

(2) NC16A 領域ペプチドの経口投与

過去に報告されている多発性硬化症モデルを参考に (Peron JPS, et al. J Neuroimmunol 227: 10, 2010) 4 匹ずつ 6~8 週令のヒト COL17 発現遺伝子改変マウス (Nishie W, et al. Nat Med 2007) へ、同量ずつ混合した R4, R5, R7, R8 ペプチドを 40 μ l ずつ、ディスポーザブルフィーディングニードルを用い、1 日おきに合計 5 回、経口投与する。従って各ペプチドの総投与量は、それぞれ 0.5mg となる (NC16A 領域全体では 2.0mg に相当)。

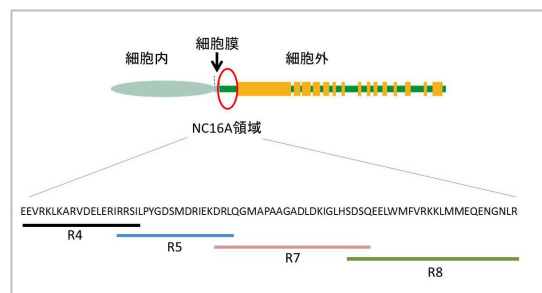


図 1 NC16A 領域のペプチド

(3) ヒト COL17 タンパクによる免疫ペプチド投与最終回 (5 回目投与日) に、500 μ g/ml 濃度の精製リコンビナント全長 COL17 タンパク (Wada M, Nishie W, et al. J Invest Dermatol 136: 938, 2016) を足底へ皮下投与し免疫する。その際、アジュバントを用いずネイティブなリコンビナント COL17 は 50 μ g/匹使用し、TiterMax を用い免疫する個体では COL17 量として 10 μ g/匹使用した。初回投与から 2 週後に同量を追加投与し、その 4 週後 (初回投与から 6 週後) に採血を施行した。コントロールマウスへの免疫には、アジュバント用いない群では PBS を投与し、TiterMax を用いた群では PBS と TiterMax との混和物を用いた。

(4) 抗 COL17 NC16A 自己抗体の測定
抗 BP180 NC16A ELISA キット (MBL) を用い 101 倍希釈した血清を室温 1 時間反応させ洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (1:20,000 希釈) を室温 1 時間反

応させキット付属の酵素基質液で発色後、450nm で吸光度を測定する。得られた吸光度は、Mann-Whitney の U 検定を用い統計学的な有意差を検定する。

4 . 研究成果

アジュバントを用いずネイティブなりコンピナント COL17 を免疫した場合、NC16A ペプチドを経口投与した群では抗ヒト COL17 NC16A 自己抗体が低下する傾向を認めたが、免疫 6 週の時点で統計学的な有意差は確認出来なかった ($p=0.280$) (図 2 A)。同様にアジュバントを使用した場合も NC16A ペプチドを経口投与した群で抗ヒト COL17 NC16A 自己抗体の産生が抑制される傾向がみられたが、免疫 6 週の時点で統計学的有意差は認めなかった ($p=0.105$) (図 2 B)。マウスの臨床的表現型に関しては、NC16A ペプチドの経口投与群と非投与群間で相違は見られなかった。

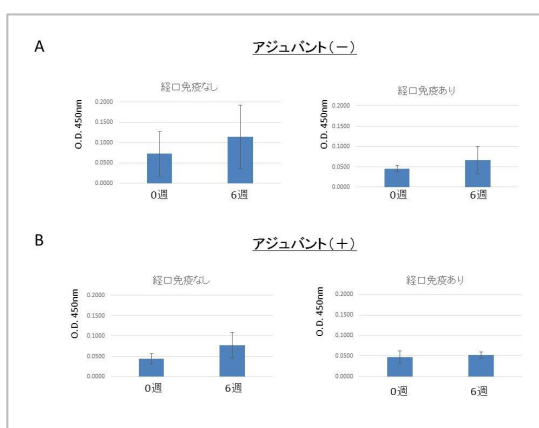


図 2 経口免疫の有無による抗 COL17 NC16A 自己抗体の推移

本研究で統計学的な有意差は認めることは出来なかったが、BP 患者自己抗体の主要な標的部位である COL17 の NC16A 領域ペプチドの経口投与によって抗ヒト COL17 NC16A 自己抗体の産生を抑制できる傾向を認めた。BP は未だ疾患特異的治療法がない指定難病であり、本研究成果は今後の治療法開発に参考となると思われる。今後、NC16A 領域ペプチドを経口投与した際の効果の持

続期間やペプチド投与量の最適化などを、多数例で検討し、本手法が、将来の BP に対する疾患特異的な画期的治療法となる可能性について検討を続けていきたい。

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 4 件)

1. 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 査読あり,
DOI: 10.1093/hmg/ddv478.
2. 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 autoAg collagen XVII/BP180.
J Invest Dermatol 136; 938-46, 2016 査読あり,
DOI: 10.1016/j.jid.2015.11.030.
3. Dainichi T, Nishie W, Yamagami Y, Sonobe H, Ujiie H, Kaku Y, Kabashima K.
Bullous pemphigoid suggestive of complement-independent blister formation with anti-BP180 IgG4 autoantibodies.
Br J Dermatol, in press. 査読あり,
DOI: 10.1111/bjd.14411.
4. Honda Y, Dainichi T, Nishie W, Ujiie H, Hattori Y, Miyachi Y, Kabashima K.
Subepidermal autoimmune bullous disease affecting predominantly mucocutaneous junctions and palms with autoantibodies

to BP230 and laminin 1.
Br J Dermatol, in press. 査読あり,
DOI: 10.1111/bjd.14542.

[学会発表](計 4 件)

1. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S,
Nakamura H, Watanabe M, Kambe M,
Hatamochi A, Kimura U, Suga Y, Shimizu
H:
A single laminin subunit deficiency
alters other laminin expression
depending on the mutated genes .
第 40 回日本研究皮膚科学会総会、2015 年
12 月 11 日 - 2015 年 12 月 13 日、岡山コ
ンベンションセンター (岡山県・岡山市)
2. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga
K, Ujiie H, Iwata H, Shimizu H:
Autoantibody profile differentiates
between inflammatory and
non-inflammatory bullous pemphigoid .
第 40 回日本研究皮膚科学会総会、2015 年
12 月 11 日 - 2015 年 12 月 13 日、岡山コ
ンベンションセンター (岡山県・岡山市)
3. 守内玲寧、西江 渉、氏家英之、夏賀 健、
清水 宏:
水疱性類天疱瘡における IgE 自己抗体の
解析.
日本皮膚科学会第 403 回北海道地方会、
2015 年 10 月 3 日、北海道大学、(北海道・
札幌市)
4. 泉 健太郎、西江 渉、夏賀 健、岩田
浩明、氏家英之、清水 宏:
全長 XVII 型コラーゲンを抗原とした
ELISA による粘膜類天疱瘡患者自己抗体
の検出.
第 37 回水疱症研究会、2015 年 9 月 26 日、
クラッセ福島、(福島県・福島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号: 20443955

(2)研究分担者

夏賀 健 (NATSUGA KEN)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 70645457