

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19667

研究課題名(和文)水疱性類天疱瘡における制御性T細胞の解析および細胞療法への応用

研究課題名(英文) Analysis of regulatory T cells and application for cell therapy in bullous pemphigoid

研究代表者

氏家 英之(Ujiie, Hideyuki)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60374435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)は免疫自己寛容に重要な役割を果たすTリンパ球で、マスター転写因子はFoxp3である。Foxp3遺伝子変異によってTregが欠損すると、マウスではScurfyマウス、ヒトではIPEX症候群という重篤な全身性自己免疫疾患が生じる。本研究では、Tregが欠損することで、表皮基底膜部に対する自己抗体が産生されることが明らかとなった。また、その自己抗体は、ScurfyマウスおよびIPEX症候群患者いずれにおいても、水疱性類天疱瘡抗原であるBP230と17型コラーゲンを標的としていた。以上より、Treg欠損は水疱性類天疱瘡の発症誘因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) are a T cell subset which play an important role on the self-tolerance. The master transcription factor of Treg is Foxp3, and its gene mutations induce severe systemic autoimmunity in mice (scurfy mice) and humans (IPEX syndrome). This study demonstrates that the absence of Tregs induce autoantibodies to epidermal basement membrane zone. We further revealed that the autoantibodies in scurfy mice and IPEX patients target bullous pemphigoid antigens, BP230 and type XVII collagen. These results suggest that a dysfunction of Tregs may trigger the development of bullous pemphigoid.

研究分野：皮膚科学

キーワード：水疱性類天疱瘡 自己免疫疾患 制御性T細胞 Scurfyマウス 疾患モデル動物 IPEX症候群 BP230 17型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid: BP, 図 1) は、表皮真皮間結合に重要な表皮基底細胞ヘミデスモゾーム構成分子の 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。



図 1 水疱性類天疱瘡患者の皮疹

BP において COL17 に対する自己免疫寛容が破綻するメカニズムは明らかになっていないが、一般的に制御性 T 細胞 (Regulatory T cells: Treg) が自己免疫寛容に重要な役割を果たしていることが知られている。Treg のマスター遺伝子である Foxp3 の遺伝子変異によって生じる IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群患者に BP が合併した報告 (McGinness JL, et al., J Am Acad Dermatol 2006) や、BP 患者末梢血の Treg が減少しているという研究結果 (Quaglino P, et al., Arch Dermatol Res 2012, 他) は、BP 発症における Treg の関与を示唆している。一方、BP 病変部皮膚の Treg を免疫組織化学染色で観察した研究では、Treg の増加 (Rensing-Ehl A, et al. Exp Dermatol 2007, 他) や減少 (Antiga E, et al., J Eur Acad Dermatol Venereol 2014) いずれの報告もあり、結果が一定していない。また BP における Treg の機能解析や詳細な経時的変化の解析、あるいは動物モデルを用いた研究はいまだなされていない。

申請者は、米国国立衛生研究所で Treg 欠損マウス (Scurfy マウス) を用いて Treg の基礎的研究を行い、最近、Scurfy マウスの一部が抗表皮基底膜部自己抗体を産生することを見出した (図 2)。

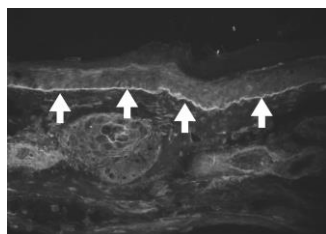


図 2 Scurfy マウス血清を用いたマウス

これは、Treg が表皮基底膜構成タンパクに対する自己免疫寛容の成立に重要な役割を果たしていることを示唆している。

申請者らは、自己の体内で持続的に病原性抗体を産生し皮疹を発症する新規 BP マウス

モデル(アクティブ BP マウスモデル)を開発し (図 3)、その自己抗体の産生は CD4+ T 細胞依存性であることを報告した (Ujiie H, et al., J Immunol 2010, Ujiie H, et al., Clin Immunol 2012)。

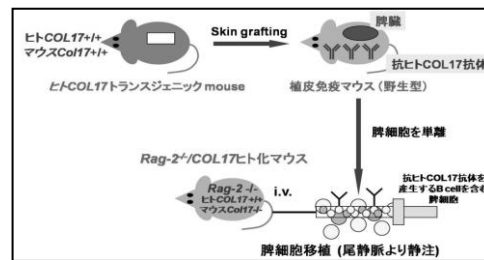


図 3 アクティブ BP マウスモデルの作製法

そのアクティブ BP マウスモデルでは、抗表皮基底膜部抗体 (=抗 COL17 抗体) 価は長期間高値を示すものの (図 4 上)、最も病原性の高い NC16A ドメインに対する抗体価は移植後早期に低下する現象がみられた (図 4 下)。

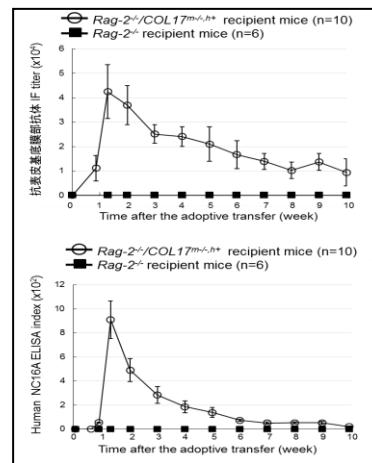


図 4 アクティブ BP マウスモデルにおける抗表皮基底膜部抗体 (上) と抗 NC16A 抗体 (下) の経時的変化

抗体産生を促進するものとして濾胞性ヘルパー T 細胞が知られており、BP においても末梢血でその増加が指摘されている (Li Q, et al., PLoS One 2013)。一方、濾胞性ヘルパー T 細胞の作用を抑制するものとして近年、濾胞性制御性 T 細胞 (Follicular regulatory T cells: TFR) が報告された (Linterman LA, et al., Nat Med 2011, 他)。申請者は、図 4 に示したモデルマウスの病原性抗体価の低下をもたらす要素として Treg、特に TFR に着目しており、それらを詳細に解析することで BP の病態解明を目指す。

Treg の臨床応用として、作成が簡単な Polyclonal Treg による細胞療法が注目されている。動物モデルを用いた自己抗体産生抑制作用がいくつか報告されているが (Nessi V, et al. J Immunol 2010, Yokoyama T, et al., Int Immunol 2011, 他)、その詳細な作用機

序は不明である。

本研究では、まず Scurfy マウスで産生される抗基底膜部抗体の標的抗原を同定する。次に、アクティブ BP マウスモデルにおける Treg および TFR の経時的変化を解析する。さらに、野生型マウスより CD4+CD25+ polyclonal Treg を採取し、in vitro で刺激し増殖させた後にアクティブ BP マウスモデルに投与し、治療効果および作用機序を解析する。また、BP 患者皮膚に浸潤する Treg を詳細に解析し、BP 病変部局所の病態生理を明らかにする。

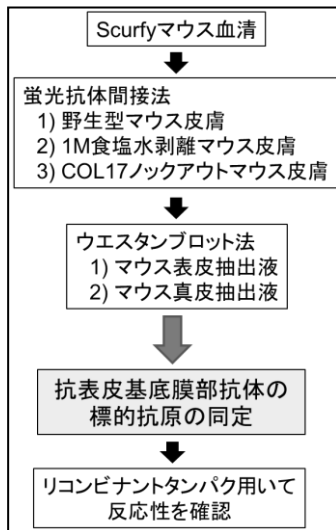
## 2. 研究の目的

- (1) Treg 欠損マウス (Scurfy マウス) が産生する抗表皮基底膜部抗体の標的抗原を同定する
- (2) アクティブ BP マウスモデルにおける Treg や TFR の経時的変化の解析
- (3) アクティブ BP マウスモデルを用いた Treg 細胞療法の治療効果の判定
- (4) BP 患者病変部皮膚の Treg の詳細な解析

## 3. 研究の方法

- (1) Treg 欠損マウス (Scurfy マウス) が産生する抗表皮基底膜部抗体の標的抗原の同定

抗表皮基底膜部抗体を産生する Scurfy マウスの皮膚を用いた蛍光抗体直接法、血清を用いた蛍光抗体間接法 (正常マウス皮膚、1M 食塩水剥離マウス皮膚、COL17 ノックアウトマウス皮膚) やウエスタンブロット法 (マウス表皮抽出液、マウス真皮抽出液) を行い、標的抗原を同定する。コントロールとして同腹仔の野生型マウス血清を用いる。



### (2) BP 患者末梢血 Treg の解析

BP 患者末梢血の Treg をフローサイトメトリ法を用いて Foxp3 と CD45RA の発現により、Non-Treg, naive Treg, effector Treg に分け、正常コントロール (年齢層一致) と比較する。

## 4. 研究成果

- (1) Treg 欠損マウス (Scurfy マウス) が産生する抗表皮基底膜部抗体の標的抗原の同定

図 5 に示す通り、Treg を欠損する Scurfy マウスは著明な皮膚炎を生じ (図 5A 左)、組織学的には強い炎症細胞浸潤を認めた (図 5B 左)。蛍光抗体直接法 (DIF) では、Scurfy マウス皮膚の表皮基底膜部に線状に IgG の沈着を認めた (図 5C 左)。また、蛍光抗体間接法 (IIF) では、scurfy マウス血清に表皮基底膜部に対する IgG 自己抗体を認め (図 5D 左)、1M 食塩水剥離皮膚を用いた IIF では表皮側に IgG の線状沈着を認めた (図 5E 左)。以上より、Scurfy マウスは表皮基底膜部に対する自己抗体を産生し、標的抗原は表皮側タンパクである 17 型コラーゲン (COL17)、BP230、プレクチンあるいは  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンであることが示唆された。

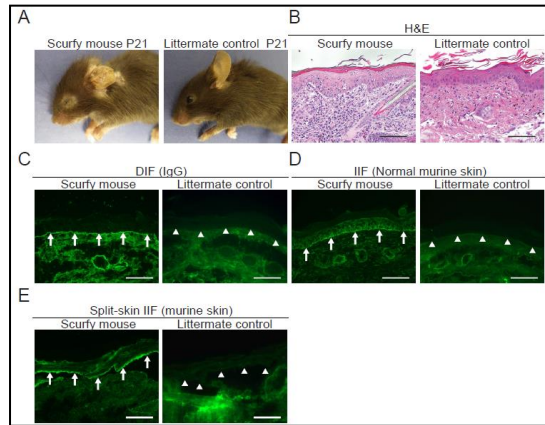


図 5 Scurfy マウスは抗表皮基底膜部自己抗体を産生する

図 6 に示す通り、Scurfy マウスは生後 9 日目ころより IgM 自己抗体を産生し始め、生後 12 日目には IgG 自己抗体も賛成していることが明らかとなった。

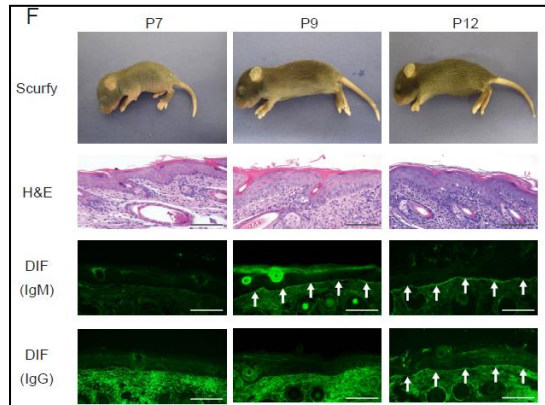


図 6 Scurfy マウスは IgM, IgG の順で抗表皮基底膜部自己抗体を産生する

次に、Scurfy マウス皮膚自己抗体の標的抗原の同定を試みた。Scurfy マウス血清はヒト

皮膚にも交差反応することが判明したため (図 7A, B)、ヒト表皮抽出液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、COL17 および BP230 と思われる部位にバンドが確認できた (図 7C)。そこでまず、マウス BP230 のリコンビナントタンパクを 3 つに分けて作製し (図 7D)、それぞれウエスタンブロットを行ったところ、半数の Scurfy マウス血清が N 末タンパク (BP230-1) に反応し (図 7E)、9 割の血清が rod ドメイン (BP230-2) に反応することが明らかとなった (図 7F)。一方、C 末には反応がみられなかった (図 7G)。以上より、Scurfy マウス自己抗体は BP230 に部位特異的に反応することが明らかとなった。

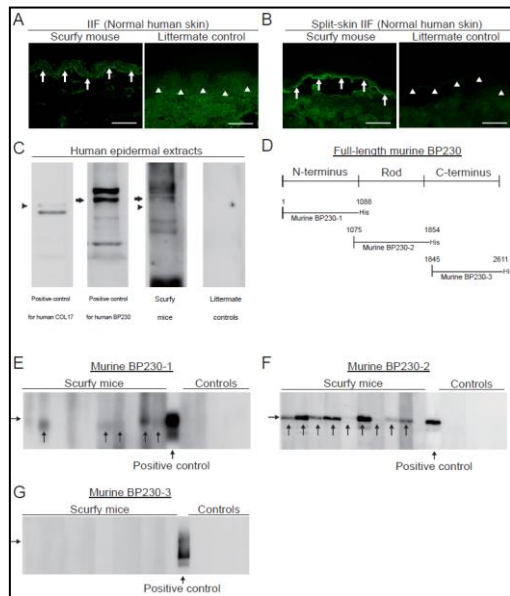


図 7 Scurfy マウスは BP230 に対する自己抗体を産生する

次に、マウスリコンビナント COL17 (図 8A) を用いてウエスタンブロットを行ったところ、約半数の Scurfy マウス血清が反応した (図 8B)。一方、病原性エピトープを含むと考えられている COL17 の NC14A 領域のリコンビナントタンパクには反応しなかった (図 8C)。以上より、Scurfy マウスは COL17 に対する自己抗体も産生していることが明らかとなった。

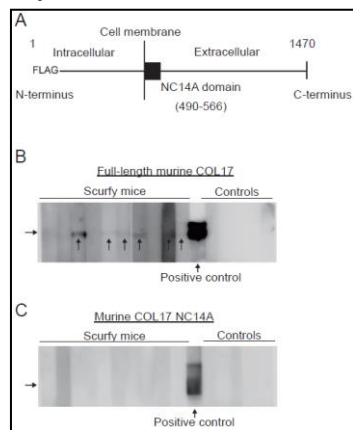


図 8 Scurfy マウスは COL17 に対する自己抗体を産生する

次に、Scurfy マウスより CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、T リンパ球を欠損し、B リンパ球を持つ TCRβδ ダブルノックアウトマウスに移入したところ、レシピエントマウスは皮疹を生じ、COL17 や BP230 に対する自己抗体を産生した (図 9)。以上より、Scurfy マウスにおける抗表皮基底膜部自己抗体産生は CD4<sup>+</sup>T 細胞依存性であることが明らかとなった。

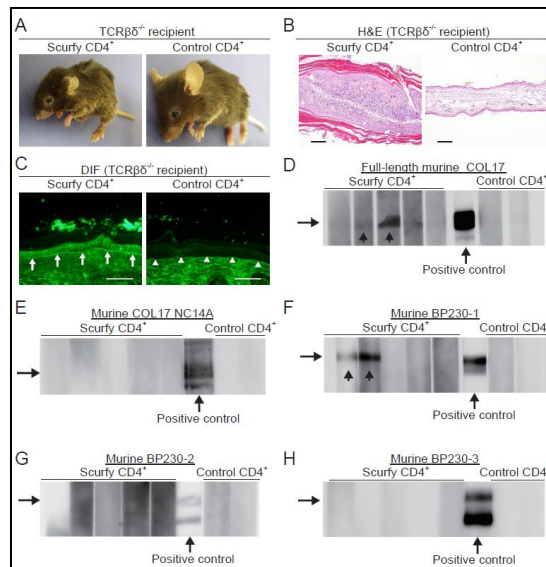


図 9 Scurfy マウスにおける抗基底膜部自己抗体産生は CD4<sup>+</sup>T 細胞依存性である

## (2) BP 患者末梢血 Treg の解析

BP 患者末梢血から単核球を単離し、FACSにて TCRβ+CD4<sup>+</sup> 分画の Foxp3/CD45RA の発現を測定し、Treg を Non-Treg (CD45RA low/Foxp3 low), naive Treg (CD45RA high/Foxp3 low), effector Treg (CD45RA low/Foxp3 high) に分けて頻度を計測したところ、図 10 に示す通り、BP 患者では Effector Treg の割合が有意に高かった (図 10 右下)。

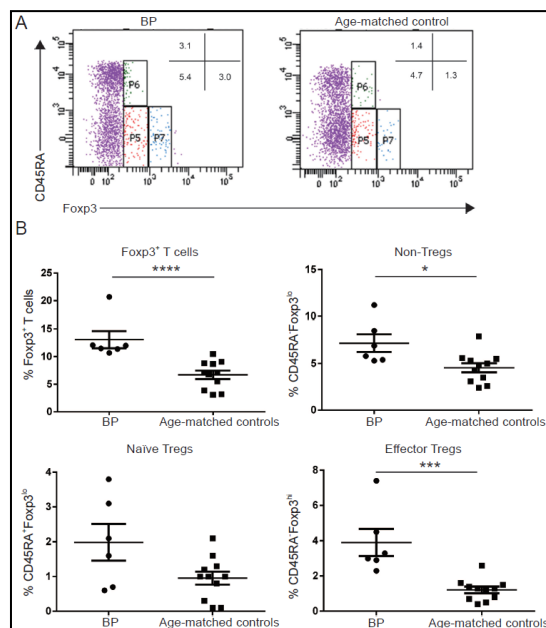


図 10 BP 患者の Treg サブセットの解析

## 【考察】

以上の結果から、Treg の欠損により、マウス体内に BP 抗原である COL17 と BP230 に対する自己抗体が産生されることが初めて明らかとなった。また、この抗体産生は生後早期に IgM から開始されクラススイッチにより IgG に拡大することが示された。また、この自己抗体産生は CD4+T 細胞依存性であることが明らかとなった。つまり、Treg の欠損により Scurfy マウス体内で COL17 や BP230 に対する反応性をもつ CD4+T 細胞が活性化し、抗体産生をもたらすと考えられる。この結果から、BP においてもその発症機序に Treg 機能不全が関与していることが示唆された。そこで BP 患者末梢血の Treg サブセットを測定した (Miyara et al. Immunity 2009)。予想に反して BP 患者では Effector Treg が正常コントロールに比較して増加していることが明らかとなった。BP 患者では免疫応答により T リンパ球が活性化していると考えられ、IL-2 などの Treg 増殖に必須のサイトカイン産生も亢進していると考えられる。その結果、Effector Treg が増加しているという結果となったと推測している。増加している Treg が BP の病態において抑制性の役割を果たしているかどうかを確認するためには、それらの Treg が COL17 や BP230 反応性かどうかを確認したいが、技術的には難しいため今後の課題として検討を続けたい。

今回、マウスモデルを用いて Treg 機能低下における抗皮膚自己抗体産生を評価したが、今後、機能性 Treg を欠損する IPEX 症候群の患者血清も解析し、ヒトでも同様の現象がみられるか確認する予定ある。既に倫理委員会の承認を得て検体を収集している。

本研究課題で当初予定していた、アクティブ BP マウスモデルにおける Treg の解析は、使用するマウスの繁殖に時間を有したため十分な解析を行えなかった。今後十分数のマウスが得られたら解析を行っていく予定である。また、当初は BP 患者皮膚の Treg 解析を計画していたが、十分量の細胞を回収することが困難であり、末梢血の解析を行った。

一方、Scurfy マウスの解析は計画どおり順調に進み、標的抗原の同定まで実施することができた。本研究で得られた結果は世界初の知見であり、皮膚自己免疫研究の前進に大きく寄与するものと考えられる。現在論文を作成中で、間もなく投稿予定である。今後、BP 抗原に対する免疫寛容の破綻機序について、胸腺における中枢性免疫寛容の解析を中心に更に研究を進めていく予定である。

## 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 4 件)

① Matsuura K, Ujiie H, Hayashi M,

Muramatsu K, Yoshizawa J, Ito T, Iwata H, Suzuki T, Shimizu H: Linear IgA disease in a pregnant woman with autoantibodies to non-collagenous 16A domain of type XVII collagen. Acta Derm Venereol 97: 404-405, 2017. 査読有

② Yamaguchi Y, Ujiie H, Ohigashi H, Iwata H, Nishie W, Shimizu H: Linear IgA dermatosis associated with IgA type AL amyloidosis. Acta Derm Venereol 97: 528-529, 2017. 査読有

③ Iwata H, Kamaguchi M, Ujiie H, Nishimura M, Izumi K, Natsuga K, Shinkuma S, Nishie W, Shimizu H: Macropinocytosis of type XVII collagen induced by bullous pemphigoid IgG is regulated via protein kinase C. Lab Invest 96: 1301-1310, 2016. 査読有

④ Yoshimoto N, Ujiie H, Hirata Y, Izumi K, Nishie W, Shimizu H: Bullous pemphigoid developed in a patient with prurigo nodularis. J Eur Acad Dermatol Venereol 31: e187-e189, 2017. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
北海道大学大学院医学研究院・医学部  
皮膚科ホームページ  
[http://www.derm-hokudai.jp/jp/kenkyu/ujiie\\_team/index.html](http://www.derm-hokudai.jp/jp/kenkyu/ujiie_team/index.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏家 英之 (UJIIE HIDEYUKI)

北海道大学・大学病院・講師  
研究者番号：60374435

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
村松 憲 (MURAMATSU KEN)  
北海道大学・大学院医学研究科・大学院生