

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10141

研究課題名(和文)自己免疫性水疱症発症におけるTh17細胞の働きの解明

研究課題名(英文)The role of Th17 cells in the pathogenesis of autoimmune blistering disease

研究代表者

岩田 浩明(Iwata, Hiroaki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20397334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の一つ後天性表皮水疱症のモデルマウスを用いて、経皮免疫法で病気の発症を誘導することを試みた。従来の方法と比べ工夫した点は、免疫方法をアジュバントと呼ばれる強力な免疫賦活剤をもちいる皮下注射法の代わりに抗原を皮膚に塗布して免疫する手法で行った。この際、マウスの皮膚に直接抗原を塗布するのではなく、抗原提示を効率的に行えるようにするためTh17細胞あるいは抗原提示細胞が活性化した状態をイミキモドクリームを外用して誘導した。免疫効果は弱いアジュバントを用いずに抗体産生を誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患は皮膚疾患の一つ尋常性乾癬に高率に合併することが知られているが、その理由は明らかではない。我々の結果は、尋常性乾癬の病態(Th17細胞優位)が、自己免疫性水疱症をきたしやすい可能性を示唆する所見である。つまり、ある種の皮膚疾患をきちんと治療コントロールできないと、さらなる次の疾患が生じてくる可能性を示している。合併症を増やさないためにも、病気を適切に治療することの必要性を示す重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：We tried the establishment of the autoimmune blistering disease mouse model induced by epicutaneous immunization instead of subcutaneous injection. In this process, imiquimod cream was applied onto the mouse back skin, and then antigen protein was applied on the inflamed skin. Imiquimod cream is known to activate dendritic cell in the skin and induce Th17 cells. Compared to conventional subcutaneous immunization with adjuvant, epicutaneous immunization induced the autoantibodies less frequently and also less titier levels. However, epicutaneous immunization without adjuvant could induce autoantibodies in several mice.

研究分野：皮膚免疫疾患

キーワード：自己免疫性水疱症 尋常性乾癬 経皮免疫 Th17細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性水疱症は全身の皮膚および粘膜に水疱をきたし時に致死的となる疾患である。標的となる自己抗原によりいくつかの病型に分類される。皮膚基底膜部の7型コラーゲン (COL7) が標的となる場合、難治性の後天性表皮水疱症 (図1、epidermolysis bullosa acquisita: EBA) を発症する。EBAの病態解明は、当教室やドイツ リューベック大学などが中心となりモデルマウス (図2) を用いて研究が行われている。モデルマウスを用いた研究では、病気の発症に CD4T 細胞が必須であることが示されている (Iwata H et al. J Immunol 2013)。



図1 後天性表皮水疱症 (EBA)

CD4 を発現するヘルパーT細胞は、いくつかのサブセットに分類 (図3) されることが解明されている。制御性T細胞 (Treg) やTh17細胞が自己免疫疾患に大きく関与することが示されている。しかし、自己抗体が産生される“免疫寛容破綻”の機序は、未だ解明されていない。自己反応性の細胞は排除され免疫寛容が維持され免疫寛容は中枢性と末梢性に大別される。末梢性免疫寛容にかかわる細胞のひとつにTregが知られている。しかし、Th17細胞は免疫寛容に関与するかほとんど分かっていない。

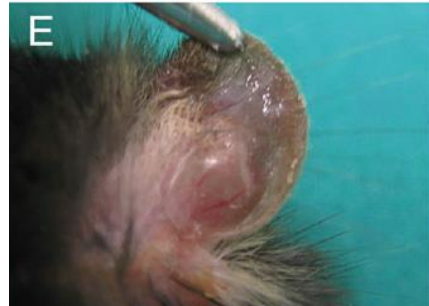


図2 EBAモデルマウス

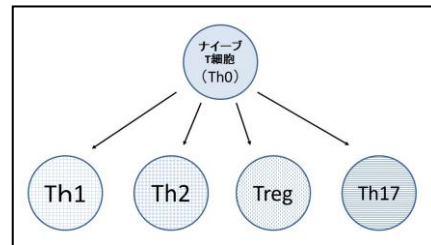


図3 ヘルパーT細胞の分化

2. 研究の目的

- 1) 自己免疫疾患のひとつ多発性硬化症では免疫寛容破綻の段階からTh17細胞の関与が示唆されている。
- 2) Th17 優位な皮膚疾患である尋常性乾癬において、正常人より非常に高い頻度でEBAを含め自己免疫水疱症が合併する。

これら二つの事実から、自己免疫性水疱症の発症初期 (免疫寛容破綻) からTh17細胞が関与しているのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、すでに樹立されたEBAモデルマウスを用いてTh17細胞の自己免疫水疱症の病態への関与を解明し、Th17細胞を抑制する抗IL-17製剤による治療の可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

- ① EBAモデルマウスを用いてTh17細胞の関与を明らかにする。

EBAモデルマウスはマウスCOL7を抗原としているため、本研究では当教室で保有するヒト化COL7マウス (Ito K et al. Am J Pathol. 2009) に技術応用する。HEK293細胞にヒトCOL7遺伝子を導入して作成した細胞からリコンビナントタンパクを作成する。EBAモデルマウス (Iwata H et al. J Immunol 2013) は、人と同様に特定の主要組織適合抗原 (MHC) クラスIIを持つマウスに発症しやすい。汎用されるC57BL/6 (B6) マウスはMHC-H2bを保有するが、MHC-H2sマウスの方が発症頻度が高いため、当教室の所有するヒト化COL7マウスのMHCを遺伝子組み換えする。ヒト化COL7マウス (B6) をB6マウスでMHC-H2sを保有するB6sマウス交配してヒト化

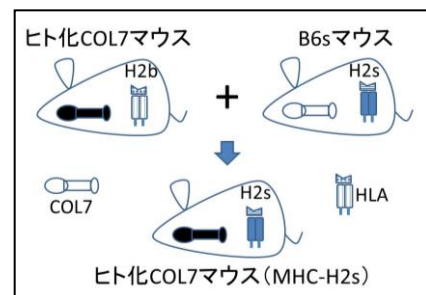


図4 ヒト化COL7マウス (B6s)

ヒト化COL7マウス (B6) をB6マウスでMHC-H2sを保有するB6sマウス交配してヒト化

COL7 マウス (B6s) を作成する (図 4)。続いてモデルマウスは、COL7 リコンビナントタンパクで免疫し再現性を確認する。その際、COL7 遺伝子にランダムに変異を加えることで抗原性の高い変異タンパクを作成 (Engelhorn ME et. al. Nat Med, 2006) し、より効率的に免疫寛容破綻を誘導できるように工夫する。

② Th17 優位な体内環境下からの自己免疫性水疱症の誘導 (新規自己免疫性水疱症モデルの作成)

アジュバントを用いないより自然な EBA 発症を誘導する工夫として、Th17 優位な体内環境をあらかじめ誘導する。そこでイミキモドを B6 マウスに塗布すると Th17 細胞が優位な尋常性乾癬に似た病態を再現できる。続いて作成した COL7 リコンビナントタンパク/変異タンパクを経皮的に免疫する。前処置を加えることで EBA が発症するようにならないか自己抗体の産生、サイトカイン産生、臨床症状などに着目し観察を行う。

③ 抗 IL-17 製剤による自己免疫性水疱症の治療の可能性 (最終年度)

現在、複数の抗 IL-17 製剤が尋常性乾癬に臨床適応があり使用されて良好な結果が得られている。そこで前述の①および②の結果に基づき Th17 細胞の関与が強く示唆されれば、尋常性乾癬に合併した自己免疫性水疱症の患者に対して抗 IL-17 製剤の使用を試みる (目標 3 症例)。尋常性乾癬に対する有効性は十分検証されているため、自己抗体抗体価、臨床的な水疱あるいは紅斑に着目し評価を行う。

4. 研究成果

① EBA モデルマウスを用いて Th17 細胞の関与を明らかにする。

ヒト COL7 を発現するマウスの作成を試みた。まず、B6 マウスの MHC-H2 b を MHC-H2 s に改変するために、当教室の所有するヒト化 COL7 マウスの MHC を遺伝子組み換えする。ヒト

化 COL7 マウス (B6) を B6 マウスで MHC-H2 s を保有する B6s マウス交配してヒト化 COL7 マウス (B6s) を作成する。ヒト COL7 マウス (B6s) が、交配中に生育不良が続き絶滅してしまっただけのため、樹立が困難となった。そのため、以降の研究は野生型マウスを用いて、マウス COL7 タンパクでの実験に変更した。変異タンパク作成は、いくつかの変異を導入した COL7 遺伝子を作成したが、これらを発現させてマウスに投与するだけの量の精製に至っていない。

② 新規モデルマウスの作成

マウスの背部にイミキモドを塗布したマウスに COL7 およびアルブミンにて経皮免疫を実施した。イミキモド塗布による IL-17A サイトカインの有意な上昇が qPCR で認めた (図 5、中)。しかし、足底に免疫したマウスにおいても同様に皮膚における IL-17A の上昇を認めこの理由は不明である (図 5、右)。アルブミンによる免疫で、血中の抗アルブミン抗体の上昇を

ELISA 法にて確認できた (図 6)。続いて、イミキモド塗布後の皮膚に、マウス COL7 を塗布して自己抗体の産生・表現型を評価した。自己抗体の産生は一部のマウスで認めた (図 7) もの皮膚炎を生じたマウスはいなかった。

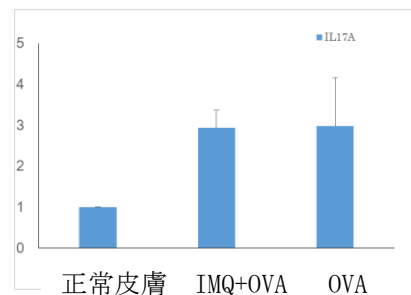


図 5 背部皮膚の IL17A 発現

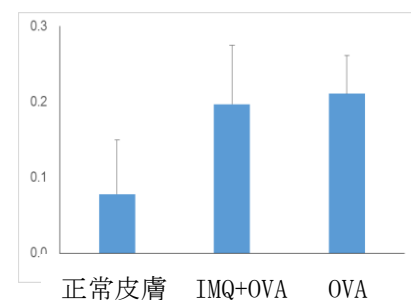


図 6 血中抗体価 (ELISA 法)

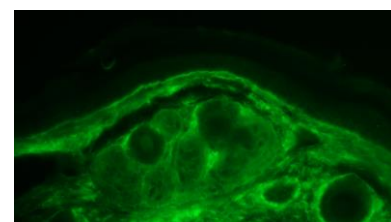


図 7 蛍光抗体直接法

④ 抗 IL-17 製剤による自己免疫性水疱症の治療の可能性

当科における患者の解析から、自己免疫性水疱症患者において 2.5%に尋常性乾癬の合併を認めこれは過去の報告ともおおむね同様の結果であった。一方、尋常性乾癬患者の 0.6%に自己免疫性水疱症を合併していた。今までに具体的な解析結果はないため、比較のためには今後他施設における解析も必要である。研究機関内には、抗 IL-17A 抗体治療を行うような尋常性乾癬に合併する類天疱瘡患者は該当なかった、そのためこちらは引き続き今後の課題として検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kamaguchi M, Iwata H, Ujiie H, Izumi K, Natsuga K, Nishie W, Asaka T, Kitagawa Y, Shimizu H:
Oral mucosa is a useful substrate for detecting autoantibodies of mucous membrane pemphigoid
Br J Dermatol, 178: e119-e121, 2018, doi: 10.1111/bjd.15925
2. Kamaguchi M, Iwata H, Ujiie H, Natsuga K, Nishie W, Kitagawa Y, Shimizu H:
High Expression of Collagen XVII Compensates for Its Depletion Induced by Pemphigoid IgG in the Oral Mucosa
J Invest Dermatol, 138: 1707-1715, 2018, doi: 10.1016/j.jid.2018.03.002
3. Iwata H, Kamaguchi M, Ujiie H, Ujiie I, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H:
Fc-binding proteins enhance autoantibody-induced BP180 depletion in pemphigoid
J Pathol. 247: 371-380, 2019, doi: 10.1002/path.5196

[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:

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：西江 渉
ローマ字氏名：(NISHIE, wataru)
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学院医学研究院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：20443954

研究分担者氏名：氏家 英之
ローマ字氏名：(UJIIE, 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

(2) 研究協力者

※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。