

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15539

研究課題名(和文) クラススイッチ導入モノクローナル抗体を用いた水疱性類天疱瘡の病態機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of bullous pemphigoid: a study using class-switched monoclonal antibodies.

研究代表者

西江 渉 (Nishie, Wataru)

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20443955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡(BP)は、皮膚の基底膜構成分子のひとつである17型コラーゲン(COL17)を自己抗体が標的とする自己免疫疾患である。本研究では、IgM型抗COL17モノクローナル抗体(mAb)産生ハイブリドーマを用い、同一の可変領域を持ち、IgMからIgG1、IgG2a、IgA、IgEへクラススイッチしたmAbをそれぞれ作製した。各mAbを新生仔マウスへ投与したところ、投与抗体は皮膚基底膜部へ沈着し、IgG2a投与マウスでは活性化した補体の沈着も認められた。しかし投与抗体のサブクラスによる表現型の違いは認めず、補体が活性化しても水疱形成には至らない可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering skin disease, in which autoantibodies target collagen XVII (COL17) in the skin. Here we produced recombinant monoclonal antibodies (mAb) directing COL17 with different isotypes including IgG1, IgG2a, IgA and IgE. These mAbs have identical variable regions. Passive transfer of these mAbs into mice induced activation of complements when IgG2a but not IgG1 mAbs were injected. However, there was no clinical differences were observed in complement-activating and complement-non-activating recipient mice. These results suggest that activation of complements is not enough to induce blistering skin disease in mice.

研究分野：自己免疫性水疱症

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 自己抗体の多くは、COL17 の細胞膜近傍の 77 アミノ酸で構成される“NC16A 領域”という細胞外領域の一部を標的とし、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によって解明されている(Nishie W, et al. Nat Med 13: 387, 2007)。BP 自己抗体が皮膚基底膜部の COL17 に結合すると、補体が活性化され炎症が惹起され水疱形成に至るとする考えのほか、補体活性とは依存せず表皮の脆弱化を来するという報告もあり、補体の関与については未だ不明な点が多い。加えて BP では、IgE クラス自己抗体の存在も報告されているほか、NC16A 領域以外の COL17 の様々な部位を標的とする自己抗体の存在も知られている。補体の活性化だけでなく、抗体の標的部位や IgG 以外のサブクラスの病原性など、不明な点は多い。

2. 研究の目的

抗体の補体活性化やサブクラスは、抗体の Fc 領域に依存する点に着目し、抗 COL17 モノクローナル抗体(mAb)の Fc 領域を改変し、補体活性化能の有無と異なるサブクラスの病原性の解明を試みた。その際、病原性を持たない抗 COL17 mAb をテンプレート抗体として用い、改変後に病原性を獲得するか確認するという斬新な方法を計画した。

3. 研究の方法

(1) 変異誘導物質によるクラススイッチの誘導

研究者らが過去に作製した、COL17 の細胞外領域を標的とし病原性を持たないマウス IgG1 クラス mAb 抗体(Wada M, et al. J Invest Dermatol 136: 938-46, 2016. および、

Toyanaga E, et al. J Invest Dermatol 137: 2552-9, 2017)を産生するハイブリドーマへ、変異誘導物質である ICR191 を投与し、クラススイッチを誘導する。薬剤投与 24 時間後に 50%の細胞が死滅する濃度で処理後、限界希釈を行いクローンが増殖した後、培地を採取し ELISA 法で IgG2, IgA, IgE ヘクラススイッチしたクローンを採取する。

(2) CRISPR/Cas-9 を用いたクラススイッチの誘導

過去の報告(Cheong TC, et al. Nat Commun 7: 10934, 2016)を参考として、ハイブリドーマへレンチウイルスベクターを用い Cas-9 と Fc 領域の DNA 配列を標的とする gRNA をコトランスフェクションする。(1)と同様の方法で他のサブクラスへスイッチしたクローンを採取する。

(3) リコンビナント抗体の作製

ハイブリドーマから mRNA を抽出後、RT-PCR で cDNA を作製し、抗体の重鎖と軽鎖の可変領域の DNA 配列をそれぞれ PCR 法で増幅後、ダイレクトシーケンス法で RNA 配列を確認する。N 末端へ IL-2 のシグナルシーケンスを付加した軽鎖の可変領域の DNA 配列を人工合成し、pcDNA3.1/Neo ベクターのクローニングサイトへ導入する。同様に N 末端へ IL-2 のシグナルシーケンスを付加した重鎖の可変領域に IgG2a, IgA, IgE の Fc 領域配列を付加した DNA 配列を人工合成し、pcDNA3.1/Hygro へ導入する。軽鎖と重鎖を発現するベクターを HEK293 細胞へ Lipofectamin2000 で遺伝子導入し、G-418 とヒグロマイシン両者でセレクション後に安定発現株をクローニングする。培養細胞の培地を無血清培地(HE200 培地)へ順化後、振盪器を用い浮遊細胞として 5 日間培養後に培地を回収する。

(4) マウスへの抗体投与

mAb を含有する培養上清を限界濾過フィルターで濃縮し PBS へバッファー交換する。正

常ヒトおよびマウス皮膚を基質として蛍光抗体間接法で抗体力価を確認後、新生仔マウス腹腔へ 50 ~ 100 μ l 投与する。投与 48 時間後に皮疹の有無を判定後、皮膚を採取し、蛍光抗体直接法で投与した抗体と補体活性化の有無を評価する。

4. 研究成果

変異誘導物質 ICR191 を培養ハイブリドーマへ投与し、数百以上のクローンを ELISA 法で解析したが、IgG1 から他のアイソタイプへクラススイッチしたクローンを得ることは出来なかった。上手く行かなかった要因として、化学物質による変異誘導は効率が低いと予想された。そこで最近報告のある、CRISPR/Cas-9 システムを用いたゲノム編集を用いることにした。Cas-9 タンパクは比較的大きな分子であり遺伝子導入が困難であることが予想されたため、最初にレンチウイルスベクターを用いたが予想に反し、遺伝子導入が困難であった（コントロールに用いた表皮細胞へは高率に導入された）。これは血球細胞由来であるハイブリドーマ細胞の特徴に由来すると考えられた。

そこで、最近新たに作製した COL17 の細胞外領域を標的とする IgM mAb を産生するハイブリドーマ（名称：1D-3、未発表データ）から可変領域をコードする RNA 配列を解読し、リコンビナント mAb を作製した。作製した抗体は、いずれもヒトとマウスの表皮真皮境界部に線状に沈着し、各サブクラス特異抗体が反応を示した（IgA は二次抗体が綺麗にワークせず評価困難であった。図 1）。IgG1, IgG2a, IgE クラス mAb を含む培養上清をそれぞれ濃縮し、蛍光抗体間接法で正常ヒト皮膚への反応性を確認したところ、1:1,000 倍以上の希釈でも基底膜部に反応することを確認した。この抗体を野生型新生仔マウスへ投与したが、いずれの投与マウスにも明らかな表現型は認めなかった（図 2 A）。投与マウス皮膚に

は IgG1 と IgG2a が線状に沈着しており、IgG2a 投与マウスでは活性化した補体の沈着も認めた（図 2 B）。

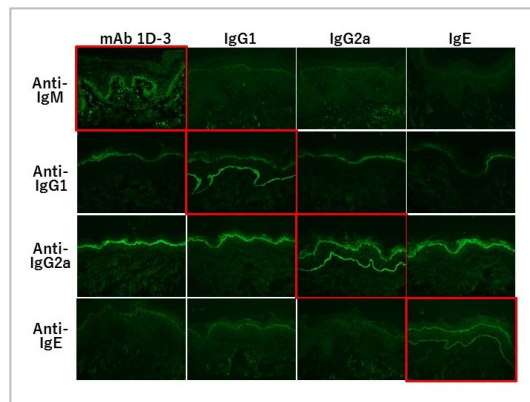


図 1 作製した mAb の皮膚への反応性

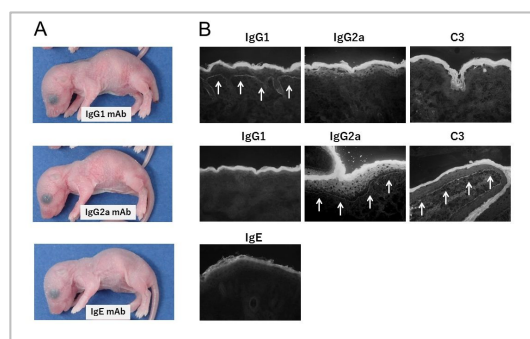


図 2 mAb を投与したマウス (A) と蛍光抗体直接法 (B)

以上の結果は、補体の活性化は水疱形成に深く関与していない可能性を示唆するが、投与した抗体量が病変形成には不十分であった可能性も考えられる。今後、より多くの抗体量を投与した際の反応も検討する予定である。また、IgE クラスリコンビナント mAb を投与したマウスでは、表皮真皮境界部に抗体の沈着は認めなかった。この結果に至った機序は不明だが、IgE は Fc レセプターを介し好塩基球や肥満細胞上に結合することから、投与した IgE がこれらの細胞上に結合し表皮真皮境界部への沈着に至らなかった可能性を考えた。詳細は今後の研究で解明していきたい。

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. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Ujiie H, Iwata H, Natsuga K, Hiroshi Shimizu.
Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay.
J Dermatol Sci 88; 247-8, 2017 査読あり、
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.005
2. Toyonaga E, Nishie W, Mayumi W, Ujiie H, Natsuga K, Iwata H, Izumi K, Nakamura H, Shimizu H.
C-terminal cleavage of collagen XVII induces neoepitopes for linear IgA bullous dermatosis autoantibodies.
J Invest Dermatol 137; 2552-9, 2017 査読あり、
DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.831
3. Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S, Fujimura Y, Tsukiyama T, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt F, Shimizu H.
Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis.
eLife 6; e26635, 2017 査読あり、
DOI: 10.7554/eLife.26635
4. Natsuga K, Nishie W, Nishimura M, Shinkuma S, Watanabe M, Izumi K, Nakamura H, Hirako Y, Shimizu H.
Loss of interaction between plectin and type XVII collagen results in epidermolysis bullosa simplex.
Hum Mutat 38; 1666-70, 2017 査読あり、
DOI: 10.1002/humu.23344

[学会発表](計 2 件)

1. Nishie W.
Fc-independent mechanisms.
Scientific conference of the International Pemphigus and Pemphigoid Foundation (IPPF).
2017年6月23日、Media Docks (Lübeck, Germany)
2. Nishie W.
DPP4 inhibitors-associated bullous pemphigoid.
Italian association of pemphigus and pemphigoid patients.
2017年10月7日、IDI Istituto Dermatologico dell'Immacolata (Rome, Italy)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西江 渉 (NISHIE, Wataru)
北海道大学・大学院医学研究院・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・講師
研究者番号: 70645457