

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21249063
 研究課題名（和文） ヒト化アクティブモデルマウスによる水疱性類天疱瘡の発症機序解明と新規治療法開発
 研究課題名（英文） Analysis of pathomechanisms of bullous pemphigoid and development of novel therapy by using humanized active mouse model
 研究代表者
 清水 宏（SHIMIZU HIROSHI）
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00146672

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、最も頻度の高い自己免疫性水疱症である。本研究ではBPの病態解明と新規治療法の開発を目的として、リンパ球・抗体・抗原の全てをヒト化した完全ヒト化アクティブマウスモデル樹立を試みた。まず、BPの自己抗原である17型コラーゲン（COL17）ヒト化マウスと免疫不全マウスであるNOD-Scidマウスを交配し、COL17ヒト化-NOD Scidマウスを作製した。次に、BP患者末梢血リンパ球を用いて抗ヒトCOL17-IgG4抗体を持続的に産生するCHO細胞を作製しCOL17ヒト化-NOD/scidマウスに移入したところ、CHO細胞は生体内に生着し、長期間にわたる抗ヒトCOL17-IgG4産生が確認された。

研究成果の概要（英文）：Bullous pemphigoid (BP) is the most common autoimmune blistering disorder that preferentially occurs in elderly people. To analyze the precise pathomechanisms of BP and to develop a novel therapeutic strategy for BP, we tried to develop a novel active disease model for BP of which lymphocytes, autoantibodies and autoantigens have been humanized. First, we generated COL17-humanized/Nod-Scid mice by crossing COL17-humanized mice with immunodeficient NOD-Scid mice. Next, we developed CHO cells which persistently produce anti-human COL17 IgG4 antibodies using circulating lymphocytes from a BP patient, and injected them into COL17-humanized/Nod-Scid mice. Injected CHO cells could survive in the recipient mice for a long period and continuously produce anti-human COL17 IgG4 in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	21,200,000	6,360,000	27,560,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：自己免疫疾患・水疱性類天疱瘡・17型コラーゲン・ヒト化マウス・疾患モデル動物・CHO細胞・NOD-Scid

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid; BP）

は高齢者に好発するもっとも頻度の高い自己免疫性水疱症である。BPは、表皮真皮間結

合に非常に重要な役割を担う表皮基底細胞へ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。副腎皮質ステロイドを代表とする非特異的免疫抑制の長期投与が現状の治療法の主体であるため、感染症併発、糖尿病誘発といった生命にかかわる重篤な副作用が大きな問題となっている。従って、副作用の少ない疾患特異的な治療法開発が急務であるが、BP患者自己抗体を応用した疾患モデル動物が存在しなかったため、BPの新規治療法開発はこれまで困難であった。これは、マウスとヒトのCOL17抗原エピトープにおけるアミノ酸配列が大きく異なるため、患者自己抗体をマウスへ投与しても自己抗体がマウス表皮基底膜に沈着しないためである。そこで研究代表者らは、分子生物学的アプローチによりCOL17ノックアウトマウスを作製し、更にこのマウスへヒトCOL17 cDNAを導入することで、ヒトCOL17のみを表皮基底膜で発現するCOL17完全ヒト化マウスを作製した。そしてCOL17ヒト化マウスへBP患者IgGを投与することにより発症するBPモデルマウス作製に世界に先駆けて初めて成功した(“Humanization of autoantigen.” Nishie W. et al, Nat Med 13: 378-383, 2007)。しかし、患者IgGを投与するモデルでは症状が一過性であり、免疫寛容が破綻することで慢性的に抗体を産生する実際のBP患者の臨床像とはかけ離れていることから、治療法開発には実際の患者に類似する新しい疾患モデルが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの血液細胞の移植を可能とすべく免疫不全マウスのCOL17をヒト化し、このCOL17ヒト化免疫不全マウスへBP患者末梢血単核球を移植することで自己抗原、免疫系いずれもヒト化され、実際のBP患者に

極めて類似するヒト化BPアクティブモデルを作成する。この実際の患者の病態に極めて類似した疾患モデルが作成された際には、BPの発症機序の詳細が初めて明らかとなることに加え、疾患特異的治療法開発が可能となる。さらに本アクティブモデルの手法は、他の自己免疫疾患の病態解明、疾患特異的治療法の開発にも応用することができる。

3. 研究の方法

(1) COL17ヒト化免疫不全マウスの作製

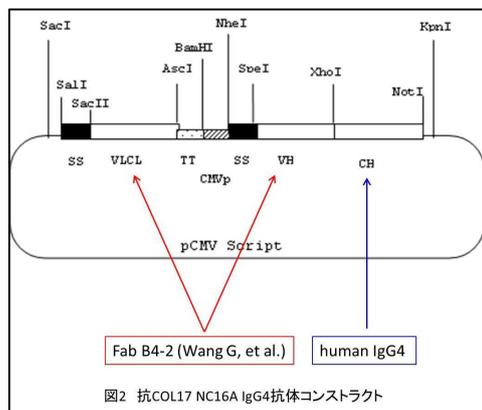
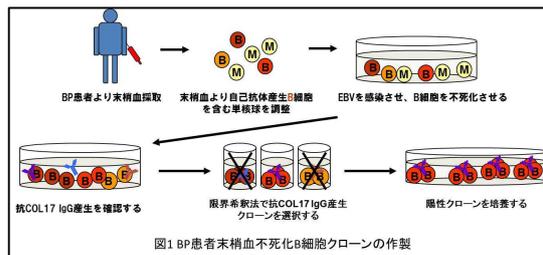
我々がすでに作成したCOL17ヒト化マウス(Nishie W. et al, Nat Med 13, 378-383, 2007)を用いて免疫不全マウスのCOL17をヒト化した。具体的にはCOL17ヒト化マウスと免疫不全マウスを交配し、それによって得られたマウス同士の交配を進めていくことで、最終的にCOL17ヒト化免疫不全マウスを得る。今回、ベースとなる免疫不全マウスとしてヒトリンパ球生着に優れたNOD-Scidマウスを用いた。COL17ヒト化マウスはバックグラウンドがC57BL/6であるため、スピードコンジュニク法を用いてバックグラウンドをNod-ScidにしたCOL17ヒト化-Nod-Scidマウスを作製した。

(2) BP患者末梢血リンパ球の採取と応用

実際のBP患者末梢血移植に先行し、BP患者末梢血の不死化を試みた。EBウイルスにより、抗COL17 IgG抗体を持続産生するBP患者末梢血不死化B細胞クローンを樹立した。具体的にはBP患者末梢血リンパ球を採取し、B細胞をセルソーターで分離精製しEBVを感染させ、不死化細胞株を作製した。その細胞株を限界記希し、培養上清の抗体価をCOL17 NC16A ELISAで測定し、陽性クローンを選定した(Li Q, et al. J Immunol 185: 7746-7755, 2010)(図1)。このB細胞クローンをCOL17ヒト化-NOD/scidマウスへ移植し、血中抗体価の

推移を観察した。

次に、抗ヒトCOL17-IgG4抗体を持続的に産生するCHO細胞を作製した。我々は以前に、BP患者末梢血リンパ球からファージディスプレイ法を用いて、ヒトCOL17 NC16Aを認識するIgG Fabフラグメントを作製した (Wang G, et al. Am J Pathol 176: 914-925, 2010)。そのFab領域の遺伝子を、IgG4のFc領域を組み込んだベクターに組み込むことで、抗COL17 NC16A IgG4抗体コンストラクトを作製した (図2)。ベクターをCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞にトランスフェクションし、培養上清中の抗COL17-NC16A IgG4抗体産生を確認した。そのCHO細胞を、COL17ヒト化-NOD/scidマウスへ移植し、血中抗体価の推移を観察した。



4. 研究成果

(1) COL17ヒト化免疫不全マウスの作製

短期間でCOL17ヒト化マウスのバックグラウンドをNod-Scid化するために、スピードコンジェニック法を用いてバッククロスを行った。N2以降の毎世代でマイクロサテライト

マーカー (SSLPマーカー) を用いてゲノムスクリーニングを行い、Recipient系統遺伝子が多く伝達された固体を選抜し、次世代の作出を行った。N5において、98.5-100%のNOD-Scid化が進んだ個体を得られ、目標のレベルに到達したと考えた。抗ヒトCOL17抗体を用いて、皮膚におけるヒトCOL17タンパク発現

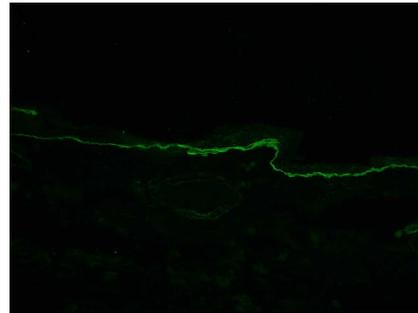


図3 COL17ヒト化-NOD-Scidマウス皮膚におけるヒトCOL17の発現

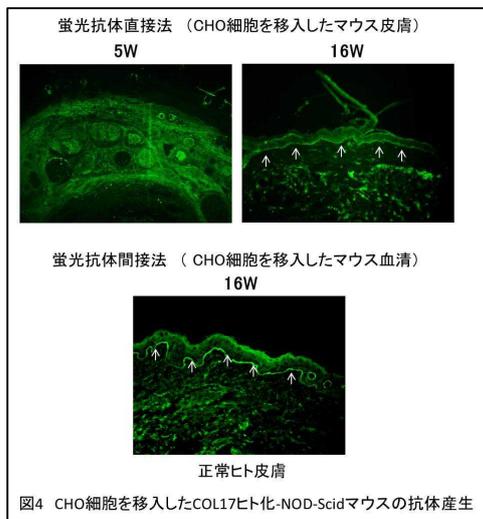
を確認した (図3)。

(2) BP患者末梢血リンパ球の採取と応用

BP患者末梢血リンパ球から作製した抗COL17 NC16A抗体を産生する不活化B細胞クローンを、COL17ヒト化-NOD/scidマウスへ 1×10^6 、 1×10^7 cells/ mouseの細胞数で移入したが、移入後1、2、3週後の血清中に抗COL17 NC16A抗体は確認できなかった。

次に、抗ヒトCOL17-IgG4抗体を持続的に産生するCHO細胞をCOL17ヒト化-NOD/scidマウスに 5×10^6 cells / mouseの細胞数で移入したところ、移入後5週のマウス血清を3倍希釈して測定したCOL17 NC16A ELISA値は0.33 (陽性コントロール:1.19, 陰性コントロール:0.03)と陽性で、血清中に抗ヒトCOL17-IgG4の産生が確認された。蛍光抗体直接法において、移入後5週と16週のマウス皮膚におけるIgG4の沈着がみられた (図4上)。また、蛍光抗体間接法において、移入後16週後のマウス血清IgG4は陽性であった (図4下)。しかし、マウスに明らかな皮疹の出現は見られなかった (図5)。現在、補体活性化の程度

や炎症細胞浸潤などを解析中である。本研究はヒトIgG4抗体を用いたため、局所における補体活性化が不十分である可能性が考えられた。また、NOD-Scid化したマウスを用いたことで補体活性化能が低く、病態に影響を与えている可能性も考えられた。今後は、移入する細胞数や投与経路などを再検討し、最適化した条件のもとでnを増やしていく予定である。また、補体活性化を十分に解析したうえで、補体の補充なども含め検討していく。



(3) 結語

本研究で、COL17ヒト化マウスの免疫不全化に成功し、抗体産生CHO細胞が長期間生着可能であることを確認できた。今後は実際のBP患者末梢血をCOL17ヒト化NOD-Scidマウスに移植することで、リンパ球・抗体・抗原の全てをヒト化した完全ヒト化アクティブBPマウスモデルを作製し、病態メカニズム解明や新規治療法の開発に応用していく予定で

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16件)

1. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H: Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner. *J Immunol* 188: 5792-5799, 2012. 査読有

2. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, Shimizu H: Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clin Immunol* 142: 167-175, 2012. 査読有

3. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H: Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Br J Dermatol* 166: 903-905, 2012. 査読有

4. Umemoto H, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Aoyama Y, Oizumi A, Suga Y, Kitagawa Y, Shimizu H: New insight into genotype/phenotype correlations in ABCA12 mutations in harlequin ichthyosis. *J Dermatol Sci* 61: 136-138, 2011. 査読有

5. Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK: Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell* 8: 177-187, 2011. 査読有
6. Osawa R, Akiyama M, Izumi K, Ujiie H, Sakai K, Nemoto-Hasebe I, Yanagi T, Koizumi H, Shimizu H: Extremely severe palmoplantar hyperkeratosis in a generalized epidermolytic hyperkeratosis patient with a keratin 1 gene mutation. *J Am Acad Dermatol* 64: 991-993, 2011. 査読有
7. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Matsushima Y, Tatsuta A, Komine M, Shimizu H: Expression of exon-8-skipped kindlin-1 does not compensate for defects of Kindler syndrome. *J Dermatol Sci* 61: 38-44, 2011. 査読有
8. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H: A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol* 20: 74-76, 2011. 査読有
9. Natsuga K, Akiyama M, Shimizu H: Malignant skin tumours in patients with inherited ichthyosis. *Br J Dermatol* 165: 263-268, 2011. 査読有
10. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, Caux F, Marinovic B, Sinha AA, Hertl M, Bernard P, Sirois D, Cianchini G, Fairley JA, Jonkman MF, Pandya AG, Rubenstein D, Zillikens D, Payne AS, Woodley D, Zambruno G, Aoki V, Pincelli C, Diaz L, Hall RP, Meurer M, Mascaro JM, Jr., Schmidt E, Shimizu H, Zone J, Swerlick R, Mimouni D, Culton D, Lipozencic J, Bince B, Bystryn JC, Werth VP: Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: Recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol*, 2011. 査読有
11. Lin HY, Yanagi T, Akiyama M, Iitani MM, Moriuchi R, Natsuga K, Shinkuma S, Yamane N, Inokuma D, Arita K, Shimizu H: Childhood subepidermal blistering disease with autoantibodies to type VII collagen and laminin-332. *Br J Dermatol* 164: 452-454, 2011. 査読有
12. Kusajima E, Akiyama M, Sato M, Natsuga K, Shimizu H: Type XVII collagen ELISA indices significantly decreased after bullous pemphigoid remission. *Int J Dermatol* 50: 238-240, 2011. 査読有
13. Kikuchi K, Natsuga K, Shinkuma S, Nishie W, Kajita S, Sato H, Shimizu H: Subepidermal blistering disease with 3

distinct autoantibodies: Anti-BP230, anti-laminin gamma-1, and anti-laminin-332. J Am Acad Dermatol 65: 878-880, 2011. 査読有

14. Fujita Y, Yoshioka N, Abe R, Murata J, Hoshina D, Mae H, Shimizu H: Rapid immunochromatographic test for serum granulysin is useful for the prediction of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. J Am Acad Dermatol 65: 65-68, 2011 査読有

15. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao HJ, Morioka H, Shinkuma S, Natsuga K, Long HA, Nishie W, Shimizu H: Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model. J Immunol 185: 7746-7755, 2010 査読有

16. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Moriuchi R, Qiao H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H: A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. J Immunol 184: 2166-6174, 2010 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Ujiie H, Shibaki A, Moriuchi R, Shimizu H: Therapeutic Strategies For Targeting Autoreactive T Cells In Autoimmune

Bullous Diseases. 22nd World Congress of Dermatology. Soul, Korea, 2011/5/24-29

2. Ujiie H, Nishie W, Fujita Y, Shibaki A, Shimizu H: Novel Mouse Models of Human Skin Diseases. 22nd World Congress of Dermatology. Soul, Korea, 2011/5/24-29

3. Shimizu H: Active Mouse Model for Bullous Pemphigoid. The 7th Annual Scientific Meeting Australasian Society for Dermatology Research. Australia, 2010/6/19-20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 00146672

(2) 研究分担者

芝木 晃彦 (SHIBAKI AKIHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 40291231
(H 2 1 ~ H 2 2)

秋山 真志 (AKIYAMA MASASHI)
名古屋大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 60222551

阿部 理一郎 (ABE RIICHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60344511

西村 栄美 (NISHIMURA EMI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 70396331
(H 2 1 ~ H 2 2)

西江 涉 (NISHIE WATARU)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 20443955
(H 2 3)

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: