

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791242

研究課題名（和文）水疱性類天疱瘡における T 細胞サブセットの解析と治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of the role of T cell subsets and the development of novel treatment for bullous pemphigoid

研究代表者

氏家 英之（UJIIIE HIDEYUKI）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：60374435

研究成果の概要（和文）：水疱性類天疱瘡（BP）モデルマウスおよびサイトカインノックアウト（KO）マウスを用いて、BP における T 細胞サブセットの役割を解析した。IL-12KO マウスおよび IL-4KO マウスを用いてアクティブ BP マウスモデルを作成した。IL-12KO マウス脾細胞レシピエントでは IgG1 の沈着が強く見られ（Th2 型反応）、IL-4KO マウス脾細胞レシピエントでは IgG2 の沈着がより強く見られたが（Th1 型反応）、補体の沈着や皮疹の程度はほぼ同等であった。以上より、サイトカインのノックアウトは抗体サブクラスに差異をもたらすものの、抗体産生量や BP マウスモデルの表現型、補体活性化に明らかな差をもたらさないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the role of T cell subsets in bullous pemphigoid (BP) by using active BP mouse model and cytokine knockout (KO) mice. We generated active BP mouse model by using IL-12KO mice and IL-4KO mice. BP model mice that received IL-12KO splenocytes showed strong deposition of IgG1 (Th2-type reaction) and BP model mice that received IL-4KO splenocytes showed strong deposition of IgG2 (Th1-type reaction), while the deposition of complement and skin disease were almost same in both models. These results indicate that cytokine KO induce the difference in IgG subclass but fail to induce the difference in the amount of IgG-production, disease severity or complement activation in BP model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、ヒト化マウス、疾患モデル動物、Th1/Th2、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡（Bullous pemphigoid: BP）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。これまで BP における表皮下水疱形成機序については、マウス COL17 リコンビナントタンパクを用いた抗マウス COL17 抗体による実験系で検証されてきた

（Liu Z, et al. *J Clin Invest* 1993）。一方、BP 患者由来の抗ヒト COL17 抗体をマウスへ投与しても抗原エピトープのアミノ酸配列がマウスとヒトで異なるため、その病原性を *in vivo* で確認することはできなかった。そこで、当研究室では、マウス *Col17* 遺伝子 KO マウスを作製し、更にこのマウスにヒト *COL17* cDNA を導入することで、ヒト *COL17* のみ発現する COL17 ヒト化マウスを

作製した。この COL17 ヒト化マウスでは、ヒト COL17 のみが表皮真皮境界部に発現しているため、その新生児マウスへ BP 患者 IgG を投与すると BP に類似した所見が再現可能となり、BP の病態解明に非常に有用なツールとなった (Nishie W, et al. *Nat Med* 2007)。しかし、これらの IgG passive transfer による新生児 BP マウスモデルでは病態出現はごく短期間であり、慢性に経過する BP の病態解明には不十分であった。そこで我々は、ヒト COL17 で免疫した野生型マウスの脾細胞を免疫不全化した COL17 ヒト化マウスに移入することで新規のアクティブ BP マウスモデルを樹立し、報告した (Ujiie H, et al. *J Immunol* 2010)。移植された脾細胞は、マウス体内で抗ヒト COL17 抗体を長期間産生し、その抗体は皮膚に発現している COL17 と結合することにより長期間にわたって BP 類似の皮疹と組織学的変化を引き起こす。さらに我々は、CD4+ T 細胞を除去した脾細胞を移植した場合、抗ヒト COL17 抗体が産生されず皮疹が生じないことを明らかにした。これまで BP において、特定の HLA との相関が報告されており (Delgado JC, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996)、また BP 患者では COL17 反応性 CD4+T 細胞が検出されている (Budinger L, et al. *J Clin Invest* 1998; Lin MS, et al. *J Invest Dermatol* 2000)。以上より、BP において CD4+ T 細胞は病態に深く関与していると考えられ、CD4+T 細胞サブセットの解析および新規治療の開発を試みる本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、アクティブ BP マウスモデルの Th1、Th2 サブセットの役割を解析する。また、植皮レシピエントとしてサイトカイン KO マウスに免疫 (植皮) をすることにより、抗ヒト COL17 抗体産生における CD4+T 細胞サブセットの役割を明らかにする。これらは、T 細胞を標的とした新規治療法確立の基礎となる。そして、関与が高いと考えられるサイトカインに対する抗体を投与する新規治療を試みる。

3. 研究の方法

(1) アクティブ BP マウスモデルの血清サイトカイン量の測定

アクティブ BP マウスモデルは脾細胞移植後 Day9 で抗体産生のピークを迎え、その後抗体価は徐々に低下していく (Ujiie H, et al. *J Immunol* 2010)。そこで、その前後の期間 (Day2-Day11) でモデルマウスの血清を連日採取し、Cytometric Bead Array (CBA) 法を用いて IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF、

IL-17A、IL-10 を継時的に測定した。

(2) IL-12KO マウスおよび IL-4KO マウスを用いた抗体産生誘導

まず、IL-12KO マウスおよび IL-4KO マウス (いずれも C57BL/6 バックグラウンド) およびコントロールの C57BL/6 マウスの脾細胞を精製し、 4×10^5 個の脾細胞を PMA (25ng/ml) と Ionomycin (1 μ g/ml) で 5 時間刺激し、ELISA 法で培養上清の IL-4、IL-5、IL-12、IFN- γ を測定した。

次に、IL-12KO マウスおよび IL-4KO マウスを実験に十分な数になるまで繁殖したのち、ヒト COL17 発現マウス皮膚を植皮した。植皮された KO マウスの血清抗体価を、蛍光抗体間接法を用いて経時的に測定し (0 週から 5 週まで毎週 1 回)、C57BL/6 マウスに植皮した場合と比較した。また、植皮後 5 週間の抗ヒト COL17 IgG 抗体サブクラスを蛍光抗体間接法で比較した。

(3) KO マウスの脾細胞を用いた BP マウスモデルの作成

ヒト COL17 発現マウス皮膚を植皮して免疫した IL-12KO マウスおよび IL-4KO マウスの脾細胞を抽出し、Rag-2^{-/-}/COL17 ヒト化マウスに移植し、移植後 4 週目の組織学的検索 (好酸球浸潤の有無や炎症細胞浸潤パターンの観察)、蛍光抗体直接法による皮膚への抗体沈着 (Total IgG、IgG サブクラス) および補体沈着を評価した。

(4) 抗サイトカイン抗体による治療実験
アクティブ BP マウスモデルの脾細胞移植 Day0、2、4、7 に抗マウス IL-4 抗体を投与し、皮疹の程度と抗体価を観察した。

4. 研究成果

(1) アクティブ BP マウスモデルの血清サイトカイン量の測定

アクティブ BP マウスモデルの血清を、脾細胞移植後 Day2-Day9 で連日採取し Cytometric Bead Array 法を用いて IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A を測定した (n=3)。図 1 に示す通り、脾細胞移植後 Day4-5 にかけて一過性の IFN- γ の上昇がみられた。一方、IL-4 の上昇は見られなかった。以上の結果より、アクティブ BP マウスモデルの抗体産生誘導過程においては Th1 優位の反応が生じている可能性が示唆された。

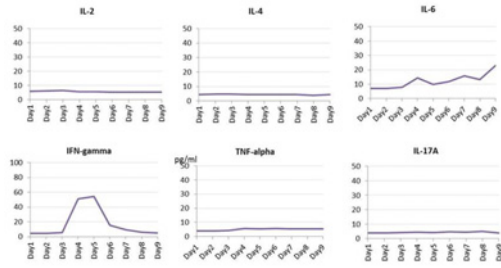


図 1 アクティブ BP マウスモデルの血清サイトカイン量 (pg/ml)

(2) IL-12KO マウスおよび IL-4KO マウスを用いた抗体産生誘導

各 KO マウスおよび C57BL/6 マウスの脾細胞を精製し、PMA+Ionomycin で刺激した培養上清のサイトカイン値を ELISA 法で測定した(n=4)。図 2 に示す通り、IL-4KO マウスでは IL-4 の産生は見られず IL-12KO マウスでは IL-12 の産生は見られなかった。一方、IL-4KO マウスにおいて Th2 サイトカインである IL-5 の産生は低いながらも見られ、IL-12KO マウスにおいて Th1 サイトカインである IFN- γ の産生が十分に見られた。以上より、IL-4 のノックアウトは Th2 サイトカイン全般の抑制には至らず、同様に IL-12 のノックアウトは Th1 サイトカイン全般の抑制には至らないことが示された。

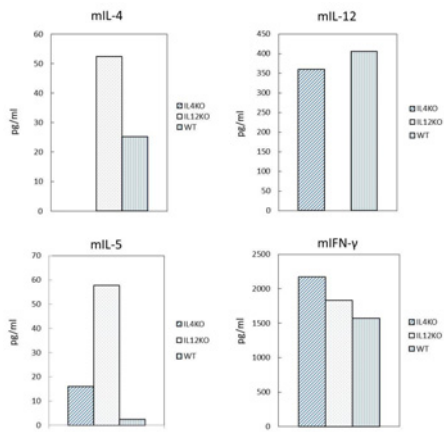


図 2 刺激した脾細胞の培養上清中サイトカイン値

次に、ヒト COL17 発現マウス皮膚を各ノックアウトマウスに植皮し、血清の抗ヒト COL17 IgG 抗体価を正常ヒト皮膚を用いた蛍光抗体間接法を用いて経時的に 5 週間に測定し、C57BL/6 マウスに植皮した場合と比較した (IL-4KO;n=8, IL-12KO;n=10, C57BL/6;n=9)。図 3 に示す通り、各群間で抗体価に有意差は見られなかった。

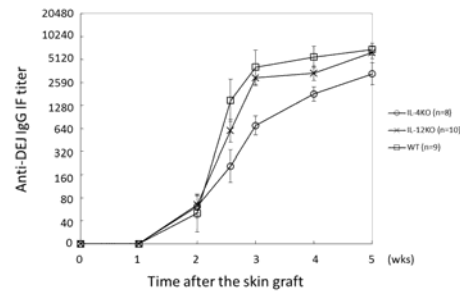


図 3 植皮マウスの抗ヒト COL17 抗体価の推移

また、植皮後 5 週間の抗ヒト COL17IgG 抗体サブクラスを、正常ヒト皮膚を用いた蛍光抗体間接法を用いて比較した (IL-4KO;n=8, IL-12KO;n=10, C57BL/6;n=9)。図 4 に示す通り、IL-4KO マウスは IgG1 低値 IgG2 高値の Th1 型の反応を示した。一方、IL-12KO マウスは IgG1 高値 IgG2 低値の Th2 型の反応を呈した。

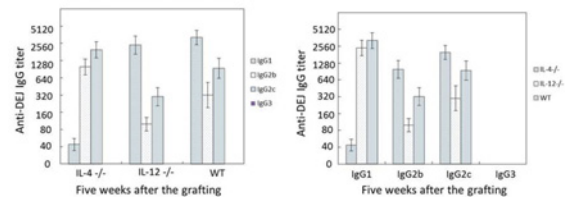


図 4 植皮マウスの植皮後 5 週目の抗ヒト COL17 IgG サブクラス値

(3) KO マウスの脾細胞を用いた BP マウスモデルの作成

ここまでの結果から、IL-4KO マウスは Th1 優位、IL-12KO マウスは Th2 やや優位の反応を示すと考えられた。これらの KO マウスの脾細胞を用いてアクティブ BP マウスモデルを作製し免疫応答を確認するために、植皮した IL-4KO マウス、IL-12KO マウスの脾細胞を 2×10^8 個ずつ Rag-2KO/COL17 ヒト化マウスに移植した(各 n=3)。レシピエントマウスの皮膚組織の蛍光抗体直接法の結果を図 5 に示す。いずれの系においてもほぼ同程度の抗体産生と皮膚の発疹が観察された。蛍光抗体直接法を用いて抗体および補体の皮膚への沈着を観察したところ、IL-12KO マウス脾細胞レシピエントでは IgG1 の沈着が、IL-4KO マウス脾細胞レシピエントでは IgG2b の沈着がより強く見られたが、補体の沈着には明らかな差は見られなかった。IL-12KO マウス脾細胞レシピエントでは Th2 型反応による好酸球浸潤が予想されたが、明らかな浸潤は観察されなかった。

以上の結果より、サイトカインのノックアウトは抗体サブクラスに差異をもたらすものの、抗体産生量やBPモデルマウスの表現型、補体活性化に明らかな差をもたらさないことが示唆された。

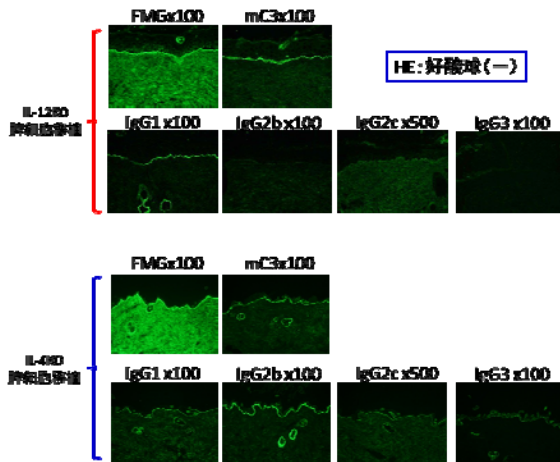


図5 サイトカイン KO マウス脾細胞を用いたBPモデルマウスの抗体沈着

(4) 抗サイトカイン抗体による治療実験

当初の予想と異なり、アクティブBPモデルマウスのIL-4産生およびTh2依存性は確認できなかったが、同じく自己免疫性水疱症である尋常性天疱瘡のモデルマウスではIL-4が病態メカニズムに大きく関与していると報告されているため、アクティブBPモデルマウスを用いて抗マウスIL-4抗体投与実験を行った(n=3)。図6に示すように、移植後9日目の抗体価に差は見られなかった。また、治療による皮疹の改善や抗体沈着の軽減も観察されなかった。

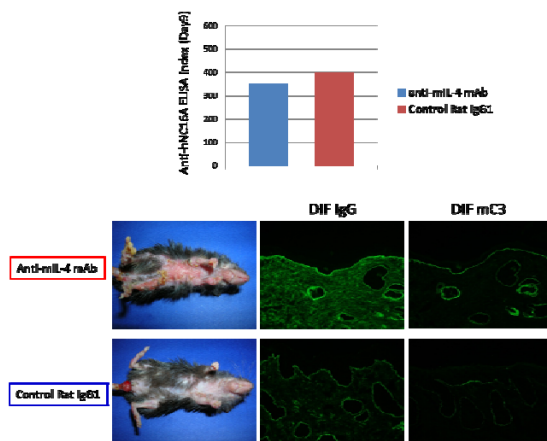


図6 抗マウスIL-4抗体投与アクティブBPモデルマウスの抗体産生および表現型

(6) 考察

過去の報告で、BPの水疱内容液中でIL-4が高値であることから、BPではTh2優位の免疫応答が生じていると推測された

(Schmidt E, et al. *Arch Dermatol Res* 1996)。同じく自己免疫性水疱症である尋常性天疱瘡モデルマウスにおいて、Th2サイトカインであるIL-4が病原性に重要な役割を果たしていることが報告された(Takahashi H, et al. *J Immunol* 2008)。以上より、アクティブBPモデルマウスにおいてもTh2が重要であろうと予想した。ただし、マウスにおいて主にTh1がIgG2の産生を誘導すると考えられている。よって、補体活性化が重要と考えられているBPにおいては補体活性化能のあるIgG2の産生を誘導するTh1による免疫応答も必要であろうと推測した。実際、アクティブBPモデルマウスの血清サイトカインを測定したところ、Th1サイトカインであるIFN- γ の上昇がみられた(図1)。一方、IL-4の上昇はみられなかった(図1)。このアクティブBPモデルマウスの作製に使用した野生型マウスC57BL/6はTh1優位となる傾向を有していることや、血清中のIL-4やIL-5はIFN- γ より低値であることが多いため検出能の問題が結果に影響を及ぼしている可能性があると考えた。今後、モデルマウス脾細胞のサイトカインmRNA量を測定するなど、高感度の検定を行う必要があると考えた。

IL-4KOマウスやIL-12KOマウスの脾細胞を刺激してサイトカインを測定したところ、IL-4KOマウスでIL-5の産生がみられ、IL-12KOマウスでIFN- γ の産生がみられた(図2)。IFN- γ はTh1細胞以外の細胞が産生している可能性があるため、今後、脾細胞からT細胞を精製したものをを用いて同実験を行う必要があると考えた。また、Th1/Th2バランスの制御をより明確にするために、転写因子KOマウス(T-betKOマウス, Stat6KOマウス)の使用を計画している。

IL-4KOマウスではB細胞の形質細胞への分化が低下すると予想されたが、植皮後の抗ヒトCOL17抗体価はIL-12KOマウスや野生型マウスと差がなかった(図3)。IgGサブクラスの結果を見ると(図4)、IL-4KOマウスではIgG2優位でありTh1優位の状態が示唆され、IL-12KOマウスではIgG1優位でありTh2優位の状態が示唆された。

植皮したIL-12KOマウスの脾細胞を移植したアクティブBPモデルマウスはTh2優位でありIgG1を主体とした抗体産生が著明であると予想されたが、その通り著明なIgG1の産生がみられた。しかし低値ながら、IgG2の産生も見られ、それに伴いC3の沈着もみられた。また、皮疹の出現も観察された。以上より、植皮したIL-12KOマウスの脾細胞には病原性抗体の産生能があることが示さ

れた(図5)。IL-12KO マウス脾細胞移植 BP モデルでは IL-5 の産生が亢進すると考えられるが(図5)、組織学的には好酸球浸潤は明らかではなかった。植皮 IL-4KO マウスを用いたアクティブ BP マウスモデルは予想通り IgG2 の産生が優位にみられたが、補体活性化の程度や皮疹の程度は IL-12KO マウス脾細胞移植 BP モデルと同程度であった。以上より、サイトカインのノックアウトは抗体サブクラスに差異をもたらすものの、抗体産生量や BP モデルマウスの表現型、補体活性化に明らかな差をもたらさないことが示唆された。ただし、現時点で移植実験は各 n=3 と少数であり、今後も引き続き実験を継続し解析を進めていきたい。

抗マウス IL-4 抗体投与はアクティブ BP マウスモデルの治療効果を示さなかった。これは、図1および図5の結果に矛盾しないと考えられる。今後は、サイトカイン KO マウスから精製した T 細胞を用いた移植実験や、前述した転写因子 KO マウスを用いた移植実験を行うことで、BP の皮疹発症における T 細胞の役割をより詳細に解析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4件)

1. 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. *Clinical Immunology*, 査読有, 142, 2012, 167-175. doi: 10.1016/j.clim.2011.10.002.

2. Ujiie H, Shimizu H. Evidence for pathogenicity of autoreactive T cells in autoimmune bullous diseases shown by animal disease models. *Experimental Dermatology*, 査読有, 21, 2012, 901-5. doi: 10.1111/exd.12011.

3. 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. *Journal of Immunology*, 査読有 188, 2012, 5792-5799. doi: 10.4049/jimmunol.1003402.

4. Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S,

Natsuga K, Ujiie H, Yasui C, Tsuchiya K, Nishie W, Shimizu H. Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters: IgA and IgG autoantibodies target both laminin-332 and type XVII collagen. *British Journal of Dermatology*, 査読有 166, 2012, 1116-1120. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10776.x.

[学会発表] (計1件)

1. 氏家英之, 西江 涉, 新熊 悟, 清水宏: 新規水疱性類天疱瘡アクティブマウスモデルにおける CD4 陽性 T 細胞サブセットの役割の解析. 第111回日本皮膚科学会総会. 2012年6月1日, 国立京都国際会館(京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏家 英之 (UJIIE HIDEYUKI)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 60374435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし