HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水疱性類天疱瘡自己抗原である17型コラーゲンの異なるエピトープに対する抗体の病原性解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	和田, 麻友美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11733号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59268
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mayumi_Wada_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　和　田　麻　友　美

学　位　論　文　題　名

水疱性類天疱瘡自己抗原である 17 型コラーゲンの
異なるエピトープに対する抗体の病原性解析

【緒言】水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid; BP）は、浮腫性紅斑と緊満性水疱を特徴とする自己免疫水疱症で、主に高齢者に好発する。免疫学的には、表皮基底細胞のヘミデスモゾーム構成分子である 17 型コラーゲン（COL17）/ BP180 と BP230 に対する自己抗体を認め、主に COL17 に対する自己免疫反応が水疱形成の要因とされている。COL17 の細胞外の細胞膜近傍には、noncollagenous 16A domain（NC16A）と呼ばれる領域が存在し、90%以上の BP 患者自己抗体（BP-IgG）がこの領域に反応する。一方、NC16A 以外の領域にも反応する BP-IgG も存在し、特に C 末端領域に対する自己抗体は、BP の類縁疾患である粘膜類天疱瘡（mucous membrane pemphigoid; MMP）で認めることが多い。NC16A に対する BP-IgG の病原性は、ヒト COL17 発現遺伝子改変（COL17 ヒト化）マウスに抗体を投与する実験で明らかになっているが、C 末端を含む NC16A 以外の領域に対する自己抗体の病原性は未だ十分に解明されていない。COL17 の NC16A 以外に対する抗原エピトープを持つ BP-IgG の病原性を確認する際、患者血清から精製した自己抗体では収量が少ないため困難である。そこで我々は NC16A 以外の領域、特に C 末端部を認識するモノクローナル抗体（monoclonal antibodies; mAb）を作製することとした。本研究は、エピトープの異なる抗ヒト COL17 マウスモノクローナル抗体を用い、抗原エピトープの違いによる抗 COL17 抗体の病原性について検討した。

【方法】C 末端領域に対するモノクローナルマウス IgG（mAb C17-C1）を作製し、NC16A に対する抗体（mAb TS39-3）と比較検討した。mAb C17-C1、mAb TS39-3、コントロールとして正常マウス IgG1（mIgG1）をそれぞれ新生仔 COL17 ヒト化マウスに投与し、48 時間後、皮膚脆弱性と基底膜への抗体沈着の有無を観察した。さらに、正常ヒト表皮角化細胞 （NHEK）に各抗体を反応させ、COL17 の発現量を解析した。

【結果】

1. 各 mAb の抗原マッピングとサブクラス解析

COL17 の様々な部位を発現するリコンビナントタンパクを用いたウエスタンブロット法にて抗原マッピングを行ったところ、mAb C17-C1 の抗原エピトープは Gly^{1316}～Gly^{1342} と判明した。mAb TS39-3 の抗原エピトープは過去の報告から NC16A の Gln^{522} ～Ala^{545} に同定されている。また、正常ヒト皮膚（NHS）を基質とした間接蛍光抗体法（IIF）では、1 mg/ml の mAb C17-C1、mAb TS39-3 は基底膜に対し、いずれも 204,800 倍希釈まで陽性であり、同等の高い抗原結合能を示した。各抗体のサブクラスは、サブクラス特異抗体を用いた IIF にて検討した結果、いずれも IgG1 であった。

2. 新生仔 COL17 ヒト化マウスにおける mAb C17-C1 の病原性の検討

mAb の病原性を解析するため、mAb C17-C1、mAb TS39-3、mIgG1 を新生仔 COL17 ヒト化マウスにそれぞれ腹腔内投与した。48 時間後、NC16A を認識する mAb TS39-3 を投与したマウスでは皮膚の脆弱性を認めたのに対し、C 末端を認識する mAb C17-C1 を投与したマウスでは皮膚の脆弱性は認められなかった。直接蛍光抗体法（DIF）では、mAb C17-C1、mAb TS39-3 投与マウスの両者とも基底膜に著明な IgG 沈着を認めたが、C3 の沈着は認めなかった。

3. NHEK における mAb C17-C1 の COL17 発現抑制効果の検討

新生仔 COL17 ヒト化マウスへ mAb C17-C1 を投与すると、基底膜への IgG 沈着を認めたにも関わらず、皮膚脆弱性は認めなかった。その要因を解析するため、培養 NHEK に抗体を反応させた際の COL17 発現量を比較した。mAb TS39-3 では NHEK 細胞抽出液中の COL17 量が低下したのに対し、mAb C17-C1 を反応させた NHEK 細胞抽出液では反応前後で COL17 発現量に差を認めなかった。

【考察】本研究により、COL17 上の標的抗原エピトープの違いにより、抗体の病原性（皮膚脆弱性誘導能）が異なることが明らかになった。NC16A に対する mAb TS39-3 では COL17 ヒト化マウスの皮膚の脆弱性を引き起こしたが、C 末端に対する mAb C17-C1 では皮膚の剥離を誘発できなかった。投与した C 末端に対する抗体は、mAb TS39-3 と同様かそれ以上に投与マウス皮膚の基底膜に沈着していたことから、COL17 に対する抗体の結合のみでは病変形成に至らないことが解る。COL17 の C 末端に対する mAb C17-C1 がマウスの基底膜に反応したにも関わらず、皮膚の脆弱性を誘発しなかった原因を解明するため、NHEK に各種 mAb を反応させ COL17 の発現量を検討したところ、NC16A に対する mAb TS39-3 で COL17 発現量の低下を認めたのに対し、C 末端に対する mAb C17-C1 では発現量の低下を認めなかった。

BP 病変の基底膜部には活性化した補体の沈着を認め、従来、補体の活性化が不可欠と考えられていた。しかし、本研究で用いた mAb TS39-3 はマウス由来の IgG1 であり補体活性化能を持たないため、補体非依存性にマウスの皮膚脆弱性や COL17 発現量の低下を引き起こしたと考えられる。また mAb C17-C1 も IgG1 であり、基底膜への C3 沈着を認めなかった。従って BP は、補体活性化を起因とした炎症反応による COL17 の分解だけでなく、抗原抗体反応の結果起こる COL17 の枯渇化により生じると考えられる。以上の結果より、COL17 上の標的抗原エピトープの違いによって抗体の病原性が異なることが明らかとなり、その際、補体活性化とは異なる機序で生じることが示された。
C 末端に対する抗体は、MMP 患者のみならず一部の BP 患者からも検出されており、粘膜病変などに関与すると言われている。従って、C 末端を認識する抗体にも病原性があると推測され、その病態発症には本実験系では再現されていない補体の活性化など、何らかの炎症反応が関わっている可能性も考えられる。また、NC16A 領域の中でも病原性の高いエピトープと低いエピトープがあることがわかっており、本研究で用いた mAb C17-C1 は C 末端内の病原性の高いエピトープを認識していなかった可能性も否定できない。今後、他の C 末端領域を認識する抗体を用いた検討などが必要と思われる。

【結論】COL17 に対する自己抗体の病原性は、標的となるエピトープの部位によって異なることが明らかとなった。病原性の違いは補体活性化とは無関係であり、細胞膜上の COL17 に抗体が結合後、COL17 の発現量が低下する事象と関連する可能性が示唆された。本研究は BP や MMP における粘膜病変の発症機序を解明する一助となると思われる。