



Title	制御性T細胞の機能不全はマウスとヒトにおいて類天疱瘡抗原への自己抗体産生を誘導する〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	村松, 憲
Description	配架番号 : 2485
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13471号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74754
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ken_Muramatsu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(医 学) 氏 名 村松 憲

学 位 論 文 題 名

制御性 T 細胞の機能不全はマウスとヒトにおいて類天疱瘡抗原への自己抗体産生を誘導する
(Regulatory T-cell dysfunction induces autoantibodies to bullous pemphigoid antigens in mice and humans)

【背景と目的】水疱性類天疱瘡は最も頻度の高い自己免疫性水疱症である。表皮基底膜部の類天疱瘡抗原である 17 型コラーゲン(type XVII collagen: COL17)と BP230 に対する自己抗体が産生され、表皮基底膜部が脆弱になることで水疱が形成される。この類天疱瘡抗原に対する自己抗体産生に関連する因子について、因果関係が直接的に証明されたものはなかった。制御性 T 細胞は Foxp3 をマスター転写因子とし、末梢性免疫寛容に重要な働きをしている。この制御性 T 細胞の機能不全では、肺、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、そして皮膚に対して自己免疫応答が生じる。これまで類天疱瘡抗原に対する免疫自己寛容の維持における制御性 T 細胞の役割は調べられていなかった。本研究では、制御性 T 細胞の機能不全が類天疱瘡抗原への自己抗体産生を誘導するかどうか、そしてその産生メカニズムを解明することを目的とした。

【材料と方法】Foxp3 に変異を持つ制御性 T 細胞の機能不全モデルである Scurfy (Sf)マウスと Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX)症候群の患者血清を使用した。蛍光抗体直接法で表皮基底膜部に対する自己抗体の沈着を、蛍光抗体間接法で血清中の表皮基底膜部に対する自己抗体を評価した。さらに 1M 食塩水剥離皮膚(Split skin)を用いた蛍光抗体間接法で、Sf マウス血清中の自己抗体が表皮基底膜部の表皮側もしくは真皮側のどちらに存在するタンパクに対するものであるかを評価した。またマウス COL17 と BP230 の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で、Sf マウス血清中の類天疱瘡抗原に対する自己抗体の有無を確認した。Sf マウスの血清から IgG を精製し新生仔マウスに Passive transfer することで、Sf マウスの血清中の自己抗体の水疱形成能を検証した。Sf マウスの CD4⁺T 細胞を T 細胞を欠損する T 細胞受容体欠損マウス(Tcrbd^{-/-}マウス)に Adoptive transfer することで、Sf マウスの CD4⁺T 細胞が類天疱瘡抗原に対する抗体の産生を誘導するかどうか確認した。II 型ヘルパー T 細胞に重要である STAT6 を欠損した Sf (Stat6^{-/-}-Sf)マウスを作成し、類天疱瘡抗原に対する抗体産生が STAT6 を介した経路で起こっているかどうかを確認した。また STAT6 は濾胞性ヘルパー T 細胞にも重要な転写因子であるため、Stat6^{-/-}-Sf マウスの脾臓と皮膚所属リンパ節の濾胞性ヘルパー T 細胞数をフローサイトメトリー法で測定し、Sf マウスの自己抗体産生に濾胞性ヘルパー T 細胞が関与しているかを調べた。IPEX 患者血清中のヒト COL17 と BP230 への自己抗体の有無を Split skin を用いた蛍光抗体間接法、Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)、ヒト COL17 と BP230 を用いたウエスタンブロット法で評価した。

【結果】Sf マウスの蛍光抗体直接法および間接法では、IgM と IgG が表皮基底膜部に線状に陽性であった。Split skin 法では表皮側に陽性であり、COL17 や BP230 に対する自己抗体の存在が示唆された。表皮基底膜部に対する IgM の沈着は生後 9 日目から生じており、生後 12 日では IgM に加えて IgG が沈着し始めていた。Sf マウスの血清はウエスタンブロット法でマウス COL17 と BP230 の特に Rod ドメインのリコンビナントタンパクに反応したが、水疱形成に重要な病原性ド

メインである COL17 の NC14A ドメインタンパクとは反応しなかった。Sf マウスの精製 IgG を Passive transfer した新生仔マウスでは、皮膚に IgG が沈着したが水疱形成は見られなかった。Sf マウスの CD4⁺T 細胞を Adoptive transfer した Tcrbd^{-/-}マウスは Sf マウス様の表現型を呈し、蛍光抗体直接法では表皮基底膜部に線状に陽性で、血清はマウス COL17 と BP230 に反応した。STAT6^{-/-}-Sf マウスでは Sf 様の表現型は減弱し、マウス COL17 と BP230 に対する自己抗体産生も低下していた。STAT6^{-/-}-Sf マウスの濾胞性ヘルパーT 細胞は、脾臓と皮膚所属リンパ節いずれにおいても Sf マウスより減少していた。IPEX 症候群患者の血清 IgG は Split skin を用いた蛍光抗体間接法で表皮側に陽性であり、ELISA でヒト COL17 全長タンパクに、ウェスタンブロット法でヒト BP230 Rod ドメインに反応した。このうちヒト COL17 全長タンパクの ELISA が強陽性の症例は湿疹病変を呈していた。

【考察】 Sf マウスは、類天疱瘡抗原である COL17 と BP230 に対する自己抗体を自然産生していた。この自己抗体は、病理組織学的に皮膚炎がほとんど生じていない生後 9 日目から生じていたため、表皮基底細胞の破壊による抗原露出ではなく、制御性 T 細胞の機能不全が引き起こしたものと考えた。また生後 12 日以内に IgM から IgG にクラススイッチしていることが示唆された。さらにこの自己抗体は、病原性ドメインである COL17NC14A ドメインには反応しないことや、Passive transfer で水疱形成を誘導しなかったことから、水疱形成能が低いと考えられた。また、Adoptive transfer の実験により、Sf マウスの CD4⁺T 細胞が類天疱瘡抗原に対する自己抗体産生の誘導能を持つことが示された。さらに、Sf マウスの自己抗体産生に STAT6 と濾胞性ヘルパーT 細胞が重要な役割を持つことが示唆された。IPEX 症候群患者血清においても Sf マウスと同様に類天疱瘡抗原に対する自己抗体を認め、ヒト COL17 に対する自己抗体と湿疹病変との関連が示唆された。以上から、マウスとヒトいずれにおいても制御性 T 細胞の機能不全が類天疱瘡抗原への自己抗体産生を引き起こすことが示された。

【結論】 制御性 T 細胞の機能不全は、Sf マウスと IPEX 症候群において類天疱瘡抗原への自己抗体産生を誘導する。