



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	17型コラーゲン特異的CD4陽性T細胞クローンはTh2サイトカインの産生を介して水疱性類天疱瘡を誘発する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	葭本, 倫大
Description	配架番号 : 2795
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15477号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90024
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIMOTO_Norihiro_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 葭本 倫大

学 位 論 文 題 名

17 型コラーゲン特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンは Th2 サイトカインの産生を介して水疱性類天疱瘡を誘発する

(Type XVII collagen-specific CD4⁺ T cell clones induce bullous pemphigoid in mice by producing Th2 cytokines)

【背景と目的】水疱性類天疱瘡(Bullous pemphigoid: BP)は緊満性水疱と浮腫性紅斑を主徴とする、もともと頻度の高い自己免疫性水疱症である。BP の主要な病原性自己抗原は、基底膜と表皮基底細胞を接着している 17 型コラーゲン(Type XVII collagen: COL17)であり、その主要なエпитープは NC16A 領域と呼ばれている。過去の研究では、抗 COL17 自己抗体の産生には CD4 陽性 T 細胞が重要な役割を果たしていることが示されている。しかしながら、これまでにヒト COL17 特異的 T 細胞クローンは確立されていないために、その特性については未だ判明していない。本研究では、ヒト COL17 特異的 T 細胞クローンを確立し、その病原性を解析することを目的とした。

【材料と方法】過去の研究において、ヒト COL17NC16A 領域を 4 分割したうちの 3 番目の領域である R7 と呼ばれる領域が病原性エпитープであることが示されているため、本研究でも R7 特異的 T 細胞クローンを作成することを試みた。野生型マウスに R7 ペプチドを免疫した後、そのリンパ球を採取し、抗原刺激を行いながら培養を行った。培養細胞を限界希釈し、さらに抗原刺激を反復することにより、R7 特異的 T 細胞株を 5 種類得た。これらの T 細胞株についてフローサイトメトリー解析を行い、細胞株はすべて活性化 CD4 陽性 T 細胞であることが判明した。この細胞株に対して R7 抗原刺激の有無で 3H-thymidine の取り込み量を比較したところ、R7 抗原刺激により有意に増殖能が上昇することを示した。これらの細胞株の T 細胞受容体(TCR)の配列は、それぞれの細胞株で 99%以上が同一の配列を示していた。以上より、R7 特異的 T 細胞クローンを 5 種類(#1-4-10, #1-4-20, #2-14-4, #3-4-B2, #3-4-E10)得たことが示された。これらの細胞株を用いて病原性解析を行った。

【結果】R7 ペプチドで免疫した野生型マウスから B 細胞を抽出し、それぞれの R7 特異的 T 細胞クローンと共に Rag-2^{-/-}COL17 ヒト化マウスに移入した。5 種類のクローンのうち、3 種類(#1-4-10, #1-4-20, #2-14-4)のクローンはレシピエントマウスにびらんや紅斑といった BP 様皮疹を誘発し、病原性クローンとみなした。皮疹部は病理組織学的に表皮真皮境界部(Dermal-epidermal junction: DEJ)の interface change と真皮浅層の好酸球を含むリンパ球浸潤を示し、BP に矛盾しない組織学的所見であった。他の 2 種類(#3-4-B2, #3-4-E10)のクローンはレシピエントマウスに皮疹を誘発せず、非病原性クローンであることが示された。蛍光抗体直接法と蛍光抗体間接法では、皮疹を呈したマウスにおいて IgG と IgM の DEJ への線状沈着が示された。非病原性クローンを移入されたマウスの一部でも、皮疹を呈さなかったにもかかわらず、DEJ に IgG および IgM の沈着が認められた。皮疹の誘発能に反して、非病原性クローン移入群では病原性クローン移入群よりも血中抗 COL17 自己抗体の抗体価が高かった。免疫組織学的染色では、真皮中層への CD4 陽性 T 細胞の浸潤が示された。

樹立した各 T 細胞クローンより mRNA を提出し RNA シークエンシングを行い、病原性クローンと非病原性の遺伝子発現量を比較した。クラスター解析の結果、病原性クローンと非病原性クロー

ンは異なるクラスターに分類された。遺伝子発現量の比較では、病原性クローンでは Th2 サイトカイン、特に IL-5 が高発現していることが証明された。病原性クローンの培養上清の IL-5 濃度は非病原性クローンよりも有意に上昇していた。

病原性クローンと R7 免疫野生型マウス由来の B 細胞を RAG-2^{-/-}COL17 ヒト化マウス 8 匹に共移入し、4 匹には抗 IL-5 モノクローナル抗体 (monoclonal antibody: mAb) を、他の 4 匹には isotype IgG 抗体を週 1 回投与した。移入 5 週後、抗 IL-5mAb を投与した 4 匹中 1 匹は、耳と体幹に皮疹を呈した。一方で、isotype 抗体を投与したマウスでは 4 匹中 3 匹に耳と他患に皮疹が出現した。皮疹の程度は両群間で有意差はなかった。組織学的に、isotype 抗体投与群では、DEJ の裂隙や interface change、真皮表層への好酸球浸潤が認められた。他方、抗 IL-5mAb 投与群では皮疹を生じた 1 匹にのみ DEJ の interface change がみられた。抗 IL-5mAb 投与群の好酸球浸潤の程度は isotype 抗体投与群より少なかった。COL17NC16A 抗原に対する自己抗体の抗体価は、抗 IL-5mAb 投与群でわずかに低下していた。

【考察】樹立した R7 特異的 T 細胞クローンの一部は、抗 R7 抗体産生を誘導し、BP の表現型および組織学的変化を誘発するとともに、R7 反応性 B 細胞と共同して皮膚への好酸球浸潤を引き起こした。過去の研究でヒト BP 患者由来の T 細胞クローンでは IL-5 と IL-13 の産生が増加していることが示されており、本研究の結果はヒトにおける BP の病態と一致していた。樹立したクローンには病原性クローンと非病原性クローンが存在しており、病原性クローンは高レベルの IL-5 を産生した。in vivo での IL-5 中和は、病原性クローンによる好酸球浸潤や表現型・組織学的変化を抑制した。過去の報告により、BP 自己抗体の存在下で、IL-5 により活性化した好酸球が BP の水疱形成に寄与することが示されている。また、IL-5 が存在しない条件下において BP 自己抗体のみにより活性化された好酸球は DEJ の裂隙形成を誘導できないことも証明されている。以上より、本研究における非病原性クローンは IL-5 の産生がごく少量にとどまるため、抗 COL17 抗体のみでは DEJ の裂隙形成を誘導できず、その結果 BP の表現型が出現しなかったと考えられる。

【結論】ヒト COL17 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンの樹立に成功した。樹立した T 細胞クローンには病原性クローンと非病原性クローンの両方が存在し、病原性クローンでは IL-5 の高発現がみられた。IL-5 が皮膚への好酸球浸潤の誘導に関連しており、BP の病原性の発現に関連していると考えられた。