



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15477
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90065
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIMOTO_Norihiro.pdf



学 位 論 文

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)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

葭 本 倫 大

学 位 論 文

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)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

葭 本 倫 大

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
諸言	6 頁
方法	7 頁
結果	12 頁
考察	36 頁
結論	39 頁
謝辞	40 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Yoshimoto N., Muramatsu K., Ito T., Zheng M., Izumi K., Natsuga K., Iwata H., Hasegawa Y., and Ujiie H.
Type XVII collagen-specific CD4⁺ T cell clones induce bullous pemphigoid in mice by producing Th2 cytokines
The Journal of Allergy and Clinical Immunology, submitted.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yoshimoto N., Muramatsu K., Ito T., Zheng M., Natsuga K., Iwata H., Nishie W., Shimizu H., and Ujiie H.
Generation of type XVII collagen-reactive T cell clones
The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec. 2020, Nagoya, Japan
2. Yoshimoto N., Muramatsu K., Ito T., Zheng M., Izumi K., Natsuga K., Iwata H., Hasegawa Y., and Ujiie H.
Type XVII collagen-specific CD4⁺ T cell clones induce the phenotype of bullous pemphigoid in mice by producing Th2 cytokines
The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec. 2022, Nagasaki, Japan

要 旨

【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、もっとも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、その主要なエピトープは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ピト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。

略 語 表

本文中及び図表で使用した略語は以下の通りである。

BSA:	bovine serum albumin
BP:	bullous pemphigoid
BPDAI:	bullous pemphigoid disease area index
CDR:	complementary determining region
COL17:	type XVII collagen
DEJ:	dermal-epidermal junction
DIF:	direct immunofluorescence
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS:	fetal bovine serum
HE:	hematoxylin & eosin
IIF:	indirect immunofluorescence
mAb:	monoclonal antibody
mRNA:	messenger RNA
RNA-seq:	RNA-sequencing
PBMC:	peripheral blood mononuclear cells
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PMA:	phorbol myristate acetate
qRT-PCR:	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
TCR:	T cell receptor
Treg:	regulatory T cell

諸 言

水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid: BP) は、最も頻度の高い自己免疫性水疱症であり、緊満性水疱および浮腫性紅斑を特徴とする (Schmidt et al. 2013, Daniel et al. 2019)。BP の皮膚病変は、組織学的に表皮下水疱と好酸球を含む炎症細胞浸潤を示す。BP の主な自己抗原は 17 型コラーゲン (Type XVII collagen: COL17) であり、基底膜と表皮基底細胞を固定する膜貫通型タンパクである (Diaz et al. 1990)。BP 患者の自己抗体は、COL17 のうち NC16A ドメインと呼ばれる領域を主要なエピトープとして認識していることが知られている (Giudice et al. 1993)。Büdinger らは、ヒト BP 患者が COL17 特異的 CD4 陽性 T 細胞を有しており、その T 細胞が IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカインを産生することを示した (Büdinger et al. 1998)。我々の研究室では、BP アクティブモデルマウスにおいて CD4 陽性 T 細胞を枯渇させると自己抗体の産生が抑制されることを示し、BP の自己抗体産生に CD4 陽性 T 細胞が必須であることを過去に報告した (Ujiie et al. 2010)。さらに我々は、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) のマスター転写因子である Foxp3 の遺伝子変異を有し、機能的 Treg を欠損しているマウスである Scurfy マウス (Hori et al. 2003) が、CD4 陽性 T 細胞依存性に抗 COL17 抗体を自発的に産生していることを証明した (Muramatsu et al. 2018)。以上より、CD4 陽性 T 細胞は抗 COL17 自己抗体産生に不可欠であることが示されている。しかしながら、ヒト COL17 特異的 T 細胞の病原性については未だ解明されていない。

そこで本研究は、ヒト COL17 特異的 T 細胞の特性を解析するために、ヒト COL17 特異的 T 細胞クローンを樹立することを目指す。樹立したクローンを *RAG-2*^{-/-}COL17 ヒト化マウスに移入することにより、病原性を評価し、BP における自己反応性 T 細胞の病態機序を明らかにすることを目標とする。また、COL17 は基底膜部に存在するため、COL17 に対する免疫学的機序の解明は、組織学的な interface change (真皮表皮境界部皮膚炎において生じる、表皮真皮境界部の炎症所見) の病態解明にもつながりうる。さらに、COL17 は毛包にも発現し、恒常性の維持などに重要な役割を担っているため、毛包性疾患の病態究明にも寄与する可能性がある。以上に挙げたように、BP のみならず COL17 が関与する多彩な疾患や病態の解明の足掛かりとすることを目的とする。

方 法

【実験動物】

本研究の動物実験は北海道大学大学院医学研究院の機関審査委員会の承認を得て、北海道大学動物実験に関する規定に従って行った(#14-0152, #19-0029)。野生型マウスはすべて日本 SLC (浜松、日本) から購入した。COL17 ヒト化マウスは過去の報告に従い、下記のように作製した。扁平上皮特異的 K14 プロモーターおよびヒト COL17A1 cDNA (*COL17^{h+/+}*) を発現するヒト COL17 トランスジェニック C57BL/6J マウス (Olasz et al. 2007) を、ヘテロ接合性 *Col17^{-/-}* マウスと交配して COL17 ヒト化マウス (*COL17^{h-/-}*, h⁺) を作製した。*Rag-2^{-/-}*/COL17 ヒト化マウスは、COL17 ヒト化マウスと C57BL/6J *Rag-2^{-/-}* マウス (実験動物中央研究所、川崎、日本) を当研究室の既報告と同様に交配して作成した (Ujiie et al. 2010)。

【抗原】

GST タグと His タグを有する NC16A リコンビナントタンパク (Glu⁴⁹⁰~Arg⁵⁶⁶) を、過去の報告 (Natsuga et al. 2012, Ujiie et al. 2019) に基づき、発現ベクター pGEX6P-1 (GE Healthcare) と BL21 大腸菌株 (GE Healthcare) を用いて作製した。タンパク質は、Talon affinity metal resin (Clontech Laboratories) を用いて His タグ精製を行った。ヒト COL17NC16A の病原性エピトープを含むことが示されている R7 ペプチド (Asp⁵²²~Gln⁵⁴⁵) (Natsuga et al. 2012) は化学的に合成した (GL Biodhem)。

【培養細胞】

C57BL/6J 野生型マウスの足底に、GST タグと His タグを有する NC16A リコンビナントタンパクを、免疫アジュバントである Titermax Gold (Sigma) と乳化させてから 1 匹あたり 50µg 免疫した。7 日後、同量の混合物をマウス尾基部に免疫した。さらに 7 日後、免疫したマウスの脾臓とリンパ節よりリンパ球懸濁液 (3×10⁶ 個/well) を調製し、BSA タグを有する R7 ペプチド (5µg/mL) を完全培地 (RPMI-1640 中に 10% fetal bovine serum (FBS)、2mM L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES buffer、1x 非必須アミノ酸 (Thermo Fisher Scientific)、100U/mL ペニシリン、100µg/mL ストレプトマイシンを含む) の中で 24well 平底プレートを用いて培養した。1×10⁶ 個の同種脾細胞を完全培地中で R7 ペプチド (5µg/mL) と共培養し、40Gy の X 線照射で処理した後に培養細胞に加えることにより、10 日おきに 2 回抗原刺激を行った。成長因子として、T-STIM with Con A (BD Biosciences) を最終濃度 1% に

なるように週2回添加した。その後、これらの培養T細胞に対し、丸底96wellプレートを用いて、X線照射した同種脾細胞 (4×10^4 個/well)、R7 ペプチドおよび1% T-STIM with Con A の存在下で限界希釈を行った。その後、上記と同内容の抗原刺激を1~2週間おきに行った。すべての培養は37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

【細胞増殖能検定】

T細胞のCOL17 (R7) 特異性は、過去の報告と同様に³H-thymidineの取り込みによって測定した (Kuwana et al. 1995)。 1×10^4 個の培養T細胞を、10µg/mLのBSAタグ付きR7ペプチドと共培養した 1×10^5 個の40Gy照射同種脾細胞、または同量のmock feederを加え56時間培養した。その後、³H-thymidineを双方のwellに添加し、さらに16時間培養した。³H-thymidineの取り込み量を測定することで、R7特異的T細胞の増殖能を判定した。

【免疫細胞の養子移入】

R7特異的T細胞株 (1.0×10^7 個) とR7反応性B細胞 (5.0×10^6 個) を100µLのphosphate-buffered saline (PBS)に懸濁し、内眼角から注入を行うことにより、*Rag-2*^{-/-}COL17ヒト化マウスに養子移入した。R7反応性B細胞は、野生型C57BL/6Jマウスの足底に50µgのKLHタグ付きR7ペプチドをTitermax Goldアジュバントと乳化して免疫したのち、免疫したマウスの脾細胞に対して、B cell isolation kit (Miltenyi Biotec) と autoMACS Separator (Miltenyi Biotec) を用いた処理を行い、B細胞を分離することによって得た。B細胞の分離は、FACS CantoII (BD Pharmingen) を用いたフローサイトメトリー解析により確認した。コントロール群として、T細胞株単独、またはB細胞単独で*Rag-2*^{-/-}COL17ヒト化マウスに移入する実験も同時に行った。

【免疫抗体法】

ヒト正常皮膚およびマウスの皮膚検体は、クリオマウント (Muto Pure Chemicals、東京、日本) を用いて凍結標本として包埋した。包埋した凍結標本はクリオスタット (Leica CM1950, Leica Biosystems, Wetzlar Germany) を用いて5µmに薄切し、プレパラート上で15分以上風乾した。その後、PBSで10分以上洗浄した後に、10% bovine serum albumin (BSA) で37°C、1時間ブロッキングを行った。

マウス皮膚を用いた蛍光抗体直接法 (Direct immunofluorescence: DIF) を行った際の抗体として、FITC標識抗マウスIgG抗体 (dilution 1:100) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) またはFITC標識抗マウスIgG抗体

(dilution 1:100) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用し、37°C で1時間反応させた。蛍光抗体間接法 (Indirect immunofluorescence: IIF) には、基質としてヒト正常皮膚を用い、一次抗体としてマウス血清 (dilution 1:20) を37°Cで1時間反応させ、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体 (dilution 1:100) を37°Cで30分反応させた。異なる抗体で染色する前後には、PBSで5分×3回の洗浄を行った。

CD4陽性細胞の染色を行う際には、薄切したマウス検体に対し、FITC標識抗CD4モノクローナル抗体 (monoclonal antibody: mAb) (H129.19, dilution 1:100) を4°Cで一晩反応させた後、PBSで5分×3回洗浄した後に観察した。

【酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)】

マウス血清中のNC16Aに対するIgG抗体価は、GSTタグおよびHisタグを有するNC16Aリコンビナントタンパクと、Nunc Immunoplate II-Maxisorp 96wellマイクロプレート (Thermo Fisher scientific) およびBD OptEIA (BD Biosciences) を用いてELISA法で検出した。BD OptEIAキットのプロトコールに従い、Coating bufferで5 µg/mLに希釈したリコンビナントタンパク抗原をMaxisorp96wellマイクロプレートに加え、37°Cで2時間反応させて固定し、Wash bufferで洗浄した後、Assay diluentを加えて37°Cで2時間反応させてブロッキングした。洗浄後、養子移入5~6週間後に採取した血清をAssay diluentで希釈し (dilution 1:25)、抗原を固定したマイクロプレート上で37°C、1時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体をAssay diluentで希釈して加え (dilution 1:10000)、37°C、30分反応させた。洗浄後、Substrate Reagent AとSubstrate Reagent Bを同量添加し、常温で10分反応させた後、Stop bufferを添加し反応を終了させ、450nmの吸光度を測定した。陰性対照として、レシピエントマウスと同週齢の*Rag-2^{-/-}*COL17ヒト化マウスの血清を用いた。陽性対照として、COL17ヒト化マウスの皮膚を移植され5週経過した、レシピエントマウスと同週齢のC57BL/6J野生型マウスの血清を使用した。

T細胞クローンの上清のIL-5濃度は、Mouse IL-5 Platinum ELISA kit (eBioscience) を用い、製品のプロトコールにしたがって測定した。

【フローサイトメトリー】

COL17特異的T細胞クローンの表面マーカーを染色する抗体として、PerCP/Cy5.5標識抗マウスCD4mAb (GK1.5, dilution 1:100)、PE標識抗マウスCD8 mAb (53-6.7, dilution 1:100)、FITC標識抗マウスCD3 mAb (145-2C11, dilution 1:100)、Brilliant Violet 421標識抗マウスCD44 mAb

(IM7, dilution 1: 100)、および PE-Cy7 標識抗マウス CD62L mAb (MEL-14, dilution 1: 100) を用いた。

【定量的逆転写 PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; qRT-PCR)】

T 細胞株については、1x 細胞刺激カクテルを含む phorbol myristate acetate (PMA) (eBioscience) および ionomycin (eBioscience) で T 細胞株を 3 日間刺激した。その後、RNeasy plus mini kit (Qiagen) を用いて、それぞれの T 細胞株からトータル RNA を抽出した。マウス皮膚組織については、セラミックビーズ (Thermo Fisher scientific) を加え、Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies) を用いてホモジナイズし、RNeasy plus mini kit を使用して RNA を抽出した。その後、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen) を用いて相補的 DNA の合成を行った。SetpOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) と TaqMan プローブ (TaqMan® Gene Expression Assays) を用いてリアルタイム PCR を行った。

【RNA シークエンシング (RNA-sequencing: RNA-seq)】

RNA の濃度と品質は、それぞれ Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific) と Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent) で確認した。精製したトータル RNA (50 ng) を、Illumina (Lexogen) の Quant Seq 3' mRNA-seq library preparation kit FWD のプロトコールに従って、RNA ライブラリー調製に使用した。Illumina NextSeq 500 システムを用いて、75nt のリードで RNA ライブラリーのシークエンシングを行った。T 細胞受容体レパートリー解析についても上記ライブラリーを用いて行った。

すべてのデータ解析は、Strand NGS ver4.0 (Strand Life Sciences Pvt Ltd,) を用いて行った。

【IL-5 中和実験】

R7 特異的病原性 T 細胞クローン (1.0×10^7 個) および R7 反応性 B 細胞 (5.0×10^6 個) を 100 μ L の PBS に懸濁し、内眼角から注入して *Rag-2*^{-/-}COL17 ヒト化マウスに養子移入した。その後、過去の報告 (Moynihan et al. 2016) に従い、レシピエントマウスに抗 IL-5mAb 1mg/匹 (TRFK5、BioXCell) またはア イソタイプ IgG コントロール抗体 1mg/匹を、養子移入日から 5 週間にわたり週 1 回腹腔内注射した。

【統計解析】

2 群間比較は Mann-Whitney の U 検定を用いて比較し、p 値 <0.05 を統計的に有意と判定した。すべての統計解析は、GraphPad Prism 6 ソフトウェア (GraphPad Software) を用いて行った。

結 果

1. ヒト COL17 特異的 T 細胞クローンを 5 種類樹立することに成功した

ヒト COL17NC16A リコンビナントタンパクを免疫した C57BL/6J 野生型マウスの脾臓・リンパ節を採取し、リンパ球を培養した。別の野生型マウスの脾細胞と R7 ペプチドを共培養し、40Gy の X 線を照射したものを feeder 細胞とし、抗原提示細胞として培養リンパ球に加え、抗原刺激を行った。その後、培養細胞を限界希釈し、クローンとして単離を試みた。限界希釈後の培養細胞に対し、1~2 週間おきに R7 による抗原刺激を反復することで、培養細胞は増殖し続けた(図 1)。

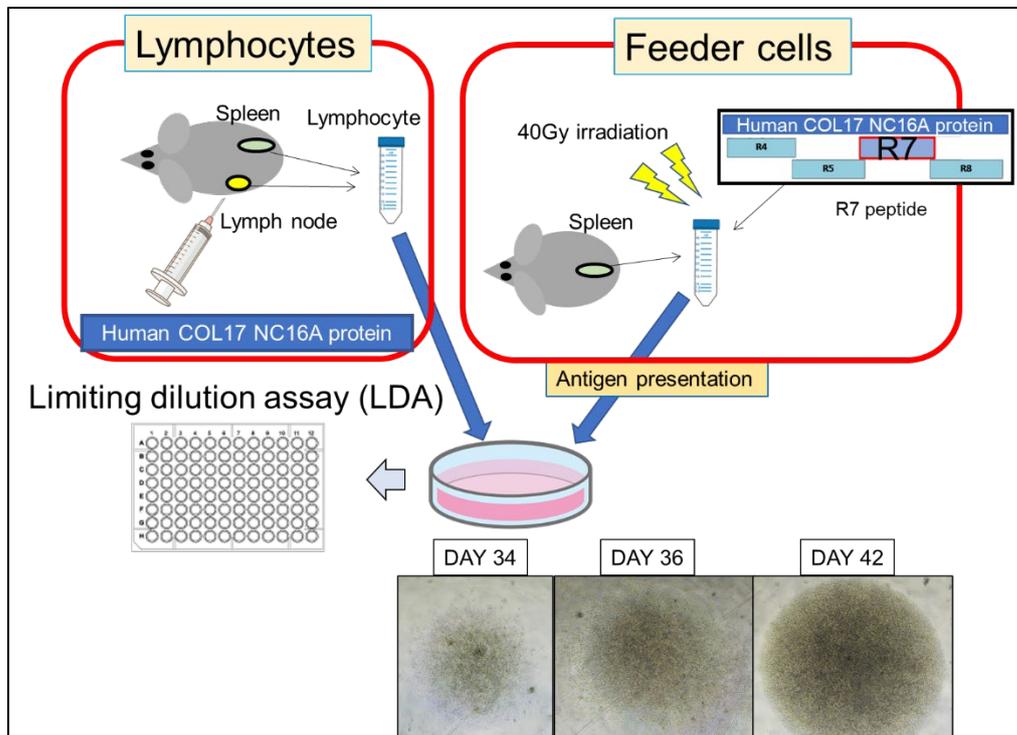


図 1 T 細胞クローン樹立方法の模式図

増殖した培養細胞が COL17 特異的 CD4 陽性 T 細胞であるか否かについて評価した。まず、培養リンパ球の表面抗原を染色し、フローサイトメトリーにより解析した。ほぼ全ての増殖リンパ球が表面に CD4 を発現し、CD44 陽性 CD62L 陰性細胞で構成されていることが明らかになり、培養リンパ球が CD4 陽性エフェクター T 細胞であることが示された (図 2)。

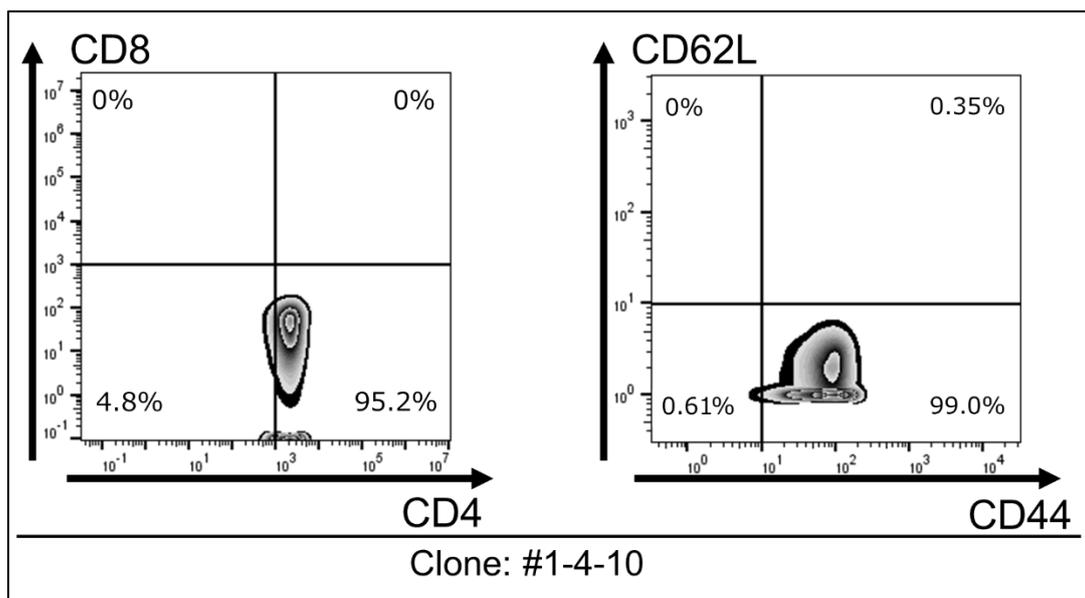


図 2 培養 T 細胞株のフローサイトメトリー分析

次に、これらの T 細胞株が R7 ペプチド特異的であるかを検討するために、あらかじめ R7 ペプチドと共培養した feeder 細胞 (R7 feeder) または mock feeder 細胞と共培養した。³H-thymidine uptake 検定により、R7 feeder と共培養した T 細胞株では、有意に ³H-thymidine の取り込みが上昇しており、T 細胞株が R7 特異的であることが示された (図 3)。

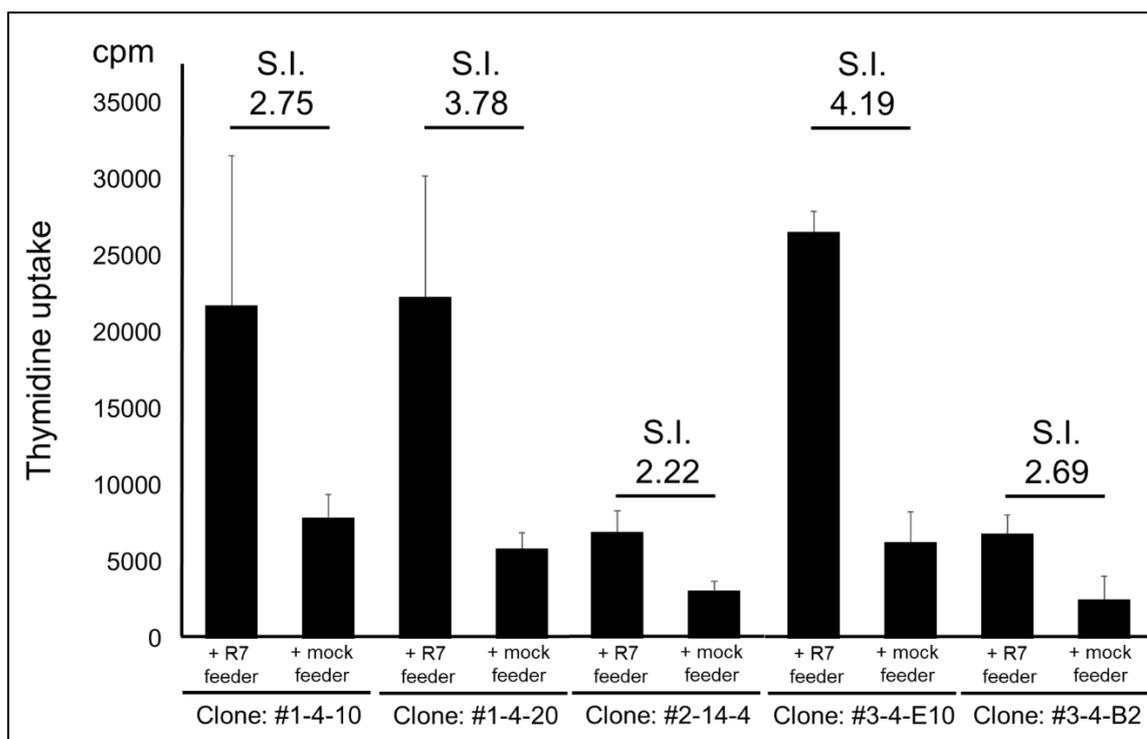
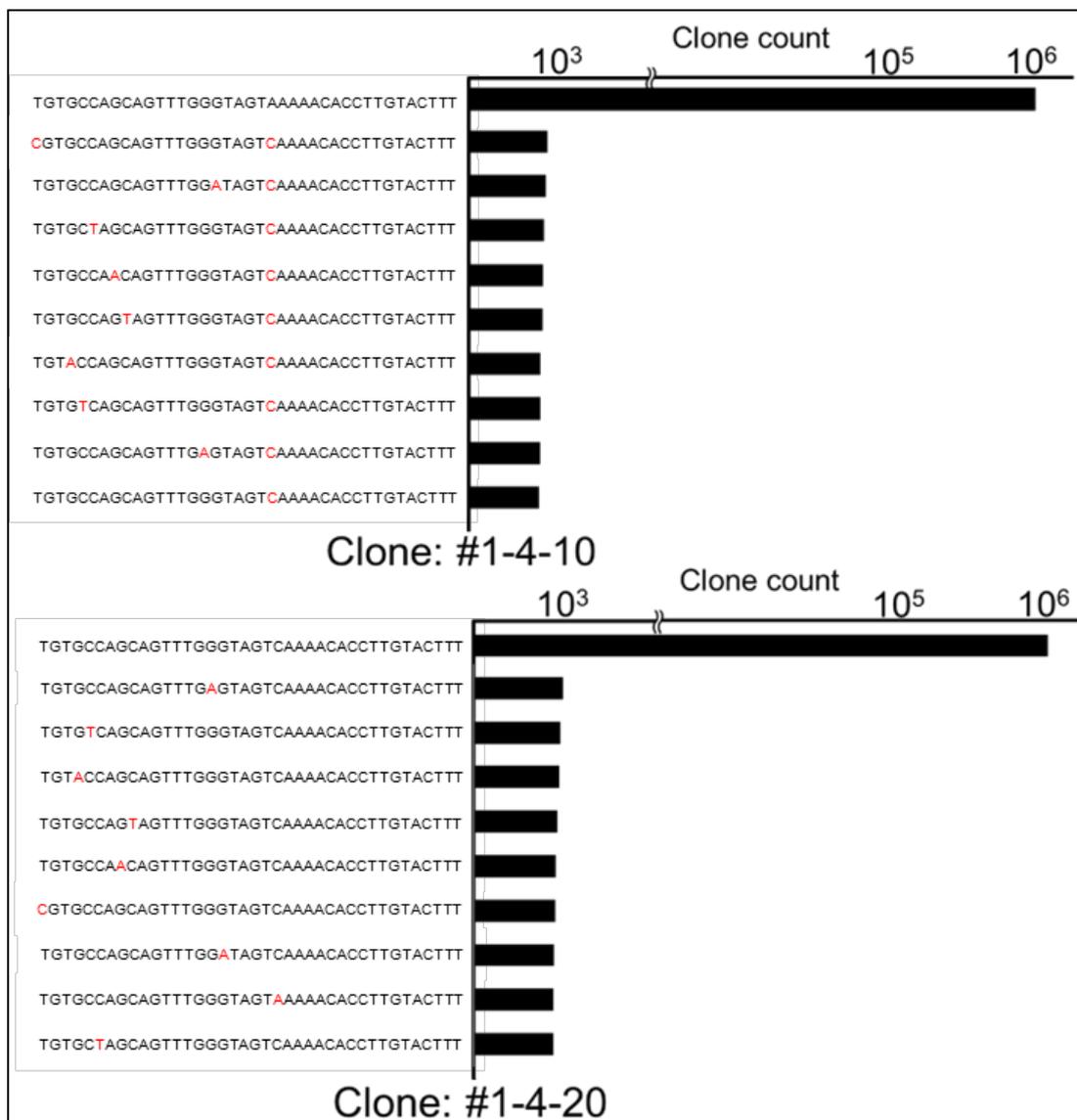


図 3 培養 T 細胞株の ³H-thymidine uptake 検定

Stimulation Index (S. I.) は、mock feeder 細胞と共培養した T 細胞株の thymidine 取り込み量に対する、R7 feeder 細胞と共培養した T 細胞株の取り込み量の比である。

T細胞株のクローナリティを観察するため、樹立したT細胞株のそれぞれに対し、T細胞受容体（T cell receptor: TCR）レパートリー解析を行った。各T細胞株において、99%以上のT細胞が同一の相補性決定領域（Complementary determining region: CDR）3をTCRに持つことが示された（図4）。



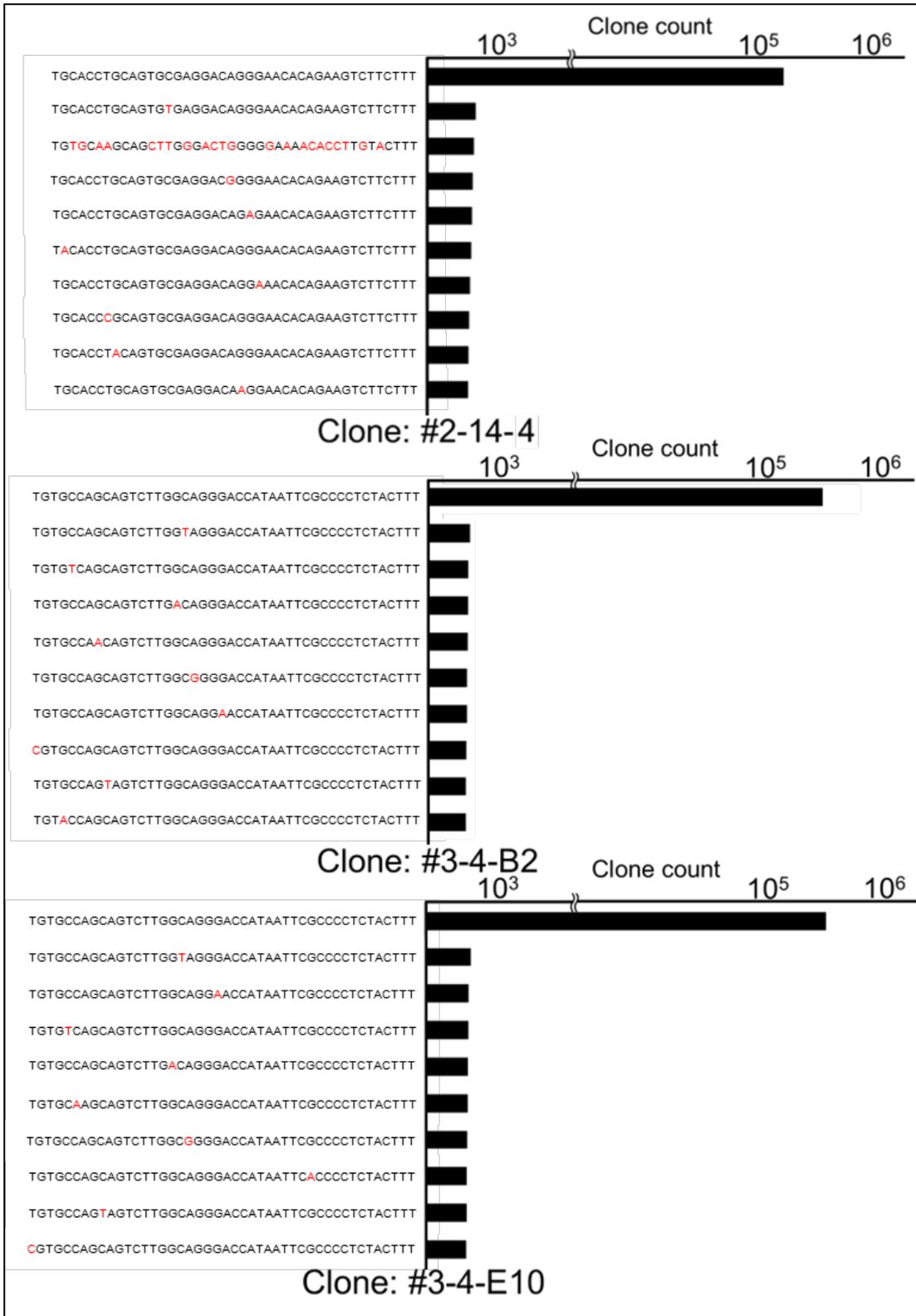


図4 培養T細胞株のTCRレパートリー解析

同一のCDR3配列を持つT細胞の数を図示した。それぞれのT細胞株のほとんどのTCRは同一であった。最多のTCR配列と異なる塩基を赤色で記した。

以上より、5種類のR7特異的T細胞クローン（#1-4-10, #1-4-20, #2-14-4, #3-4-B2, #3-4-E10）の樹立に成功したことが示された。

2. COL17 特異的 T 細胞クローンは、病原性クローンと非病原性クローンに分類された

これらの T 細胞クローンの病原性を *in vivo* で評価するために、養子移入実験を行った (図 5)。R7 で免疫した野生型マウスの脾臓から分離した R7 反応性 B 細胞とともに、各 T 細胞クローンをレシピエントの *Rag-2^{-/-}*COL17 ヒト化マウスに移入した。

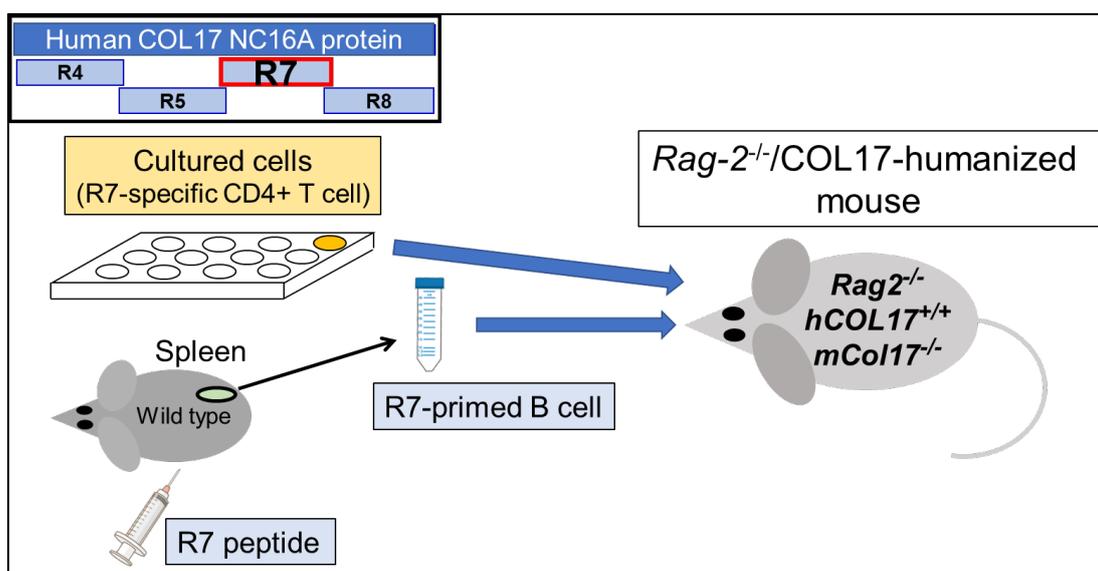


図 5 養子移入実験の模式図

R7 特異的 T 細胞クローン (1.0×10^7 個/匹) および R7 反応性 B 細胞 (5.0×10^6 個/匹) を 100 μ L の PBS に懸濁し、*Rag-2^{-/-}*COL17 ヒト化マウスに移入した。

移入後 21 日経過したレシピエントマウスの血液をフローサイトメトリーで解析したところ、T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞の両方を移入されたレシピエントマウスの末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) には、生存 T 細胞と B 細胞が観察された (図 6a)。一方、R7 反応性 B 細胞を伴わず、T 細胞クローンを単独で移入した場合、移入した T 細胞クローンはフローサイトメトリーで検出されなかった (図 6b)。

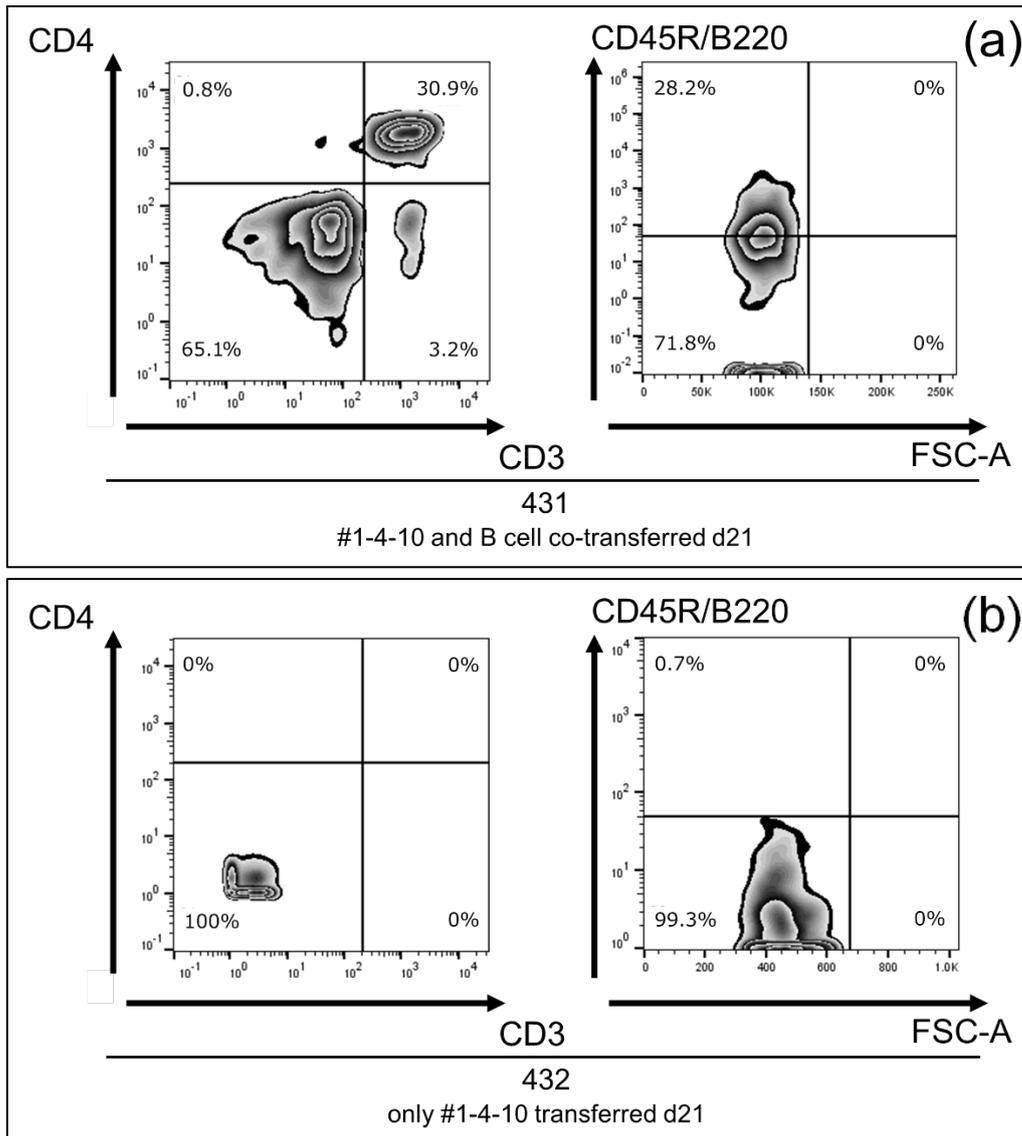


図 6 レシピエントマウスの PBMC のフローサイトメトリー解析

- (a) T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移植したレシピエントマウス中の PBMC。
 (b) T 細胞クローンのみを移植したマウスの PBMC。

樹立した5細胞株のうち3種類のクローン（#1-4-10, #1-4-20, #2-14-4）のいずれかと R7 反応性 B 細胞とを共移入したレシピエントマウスは、移入5～6週間後に首の皮膚、鼻、尾、耳にびらんや紅斑を呈した（図7）。

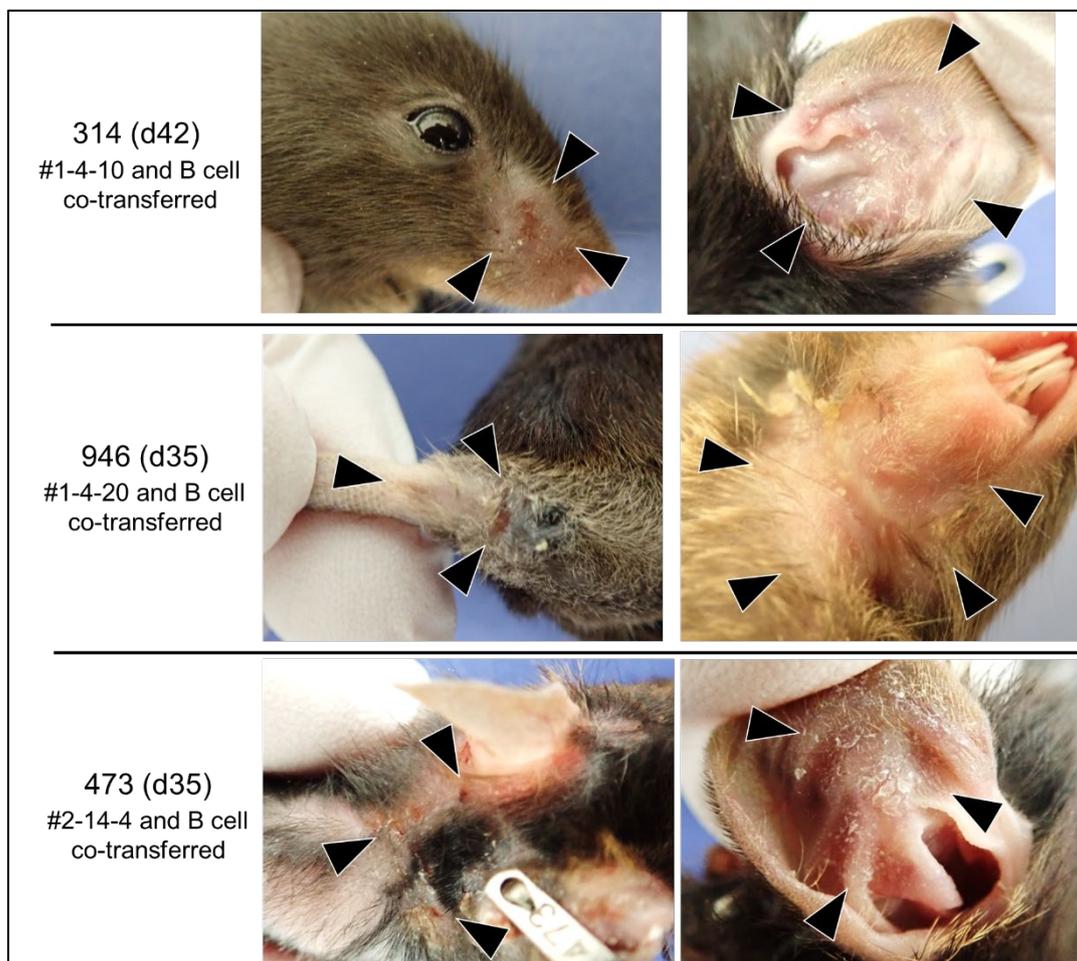


図7 病原性 T 細胞クローン（#1-4-10, #1-4-20, #2-14-4）と R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの臨床所見

一方、他の2つのクローン（#3-4-B2、#3-4-E10）のいずれかと R7 反応性 B 細胞との共移入では皮膚にびらんや紅斑などは誘導されなかった（図 8）。

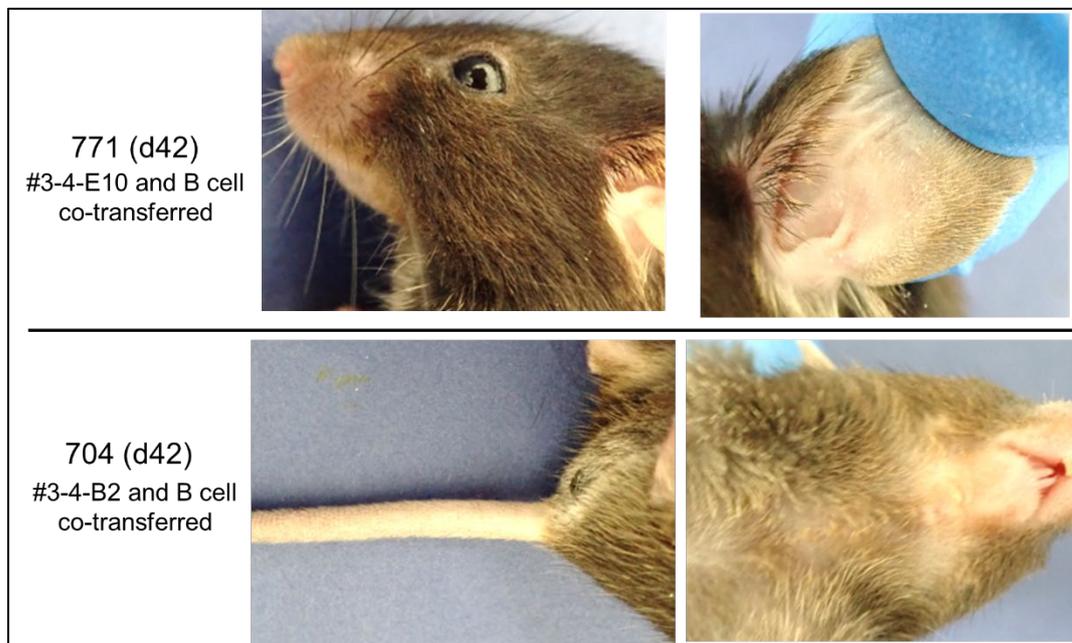


図 8 非病原性 T 細胞クローン（#3-4-B2、#3-4-E10）と R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの臨床所見

樹立した 5 種類の R7 特異的 T 細胞クローンのうち、3 種類（#1-4-10, #1-4-20, #2-14-4）は *in vivo* で BP 表現型を誘導したため、病原性クローンであると判断した。残りの 2 つの R7 特異的 T 細胞クローン（#3-4-B2 および #3-4-E10）は BP 表現型を誘導せず、非病原性クローンとみなした。

病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚病変に対して FITC 標識抗 CD4mAb を用いて免疫組織学的染色を施行したところ、真皮中層への CD4 陽性 T 細胞浸潤が観察された。これに対し、非病原性 T 細胞クローンのレシピエントマウスの同部位の皮膚に対して同様の染色を行ったが、CD4 陽性 T 細胞はみられなかった。また、養子移入を行わない *Rag-2*^{-/-}COL17 ヒト化マウスの皮膚においても CD4 陽性 T 細胞は観察されなかった (図 9)。以上より、皮膚に浸潤する CD4 陽性細胞が病原性の発現に関連していることが示唆された。

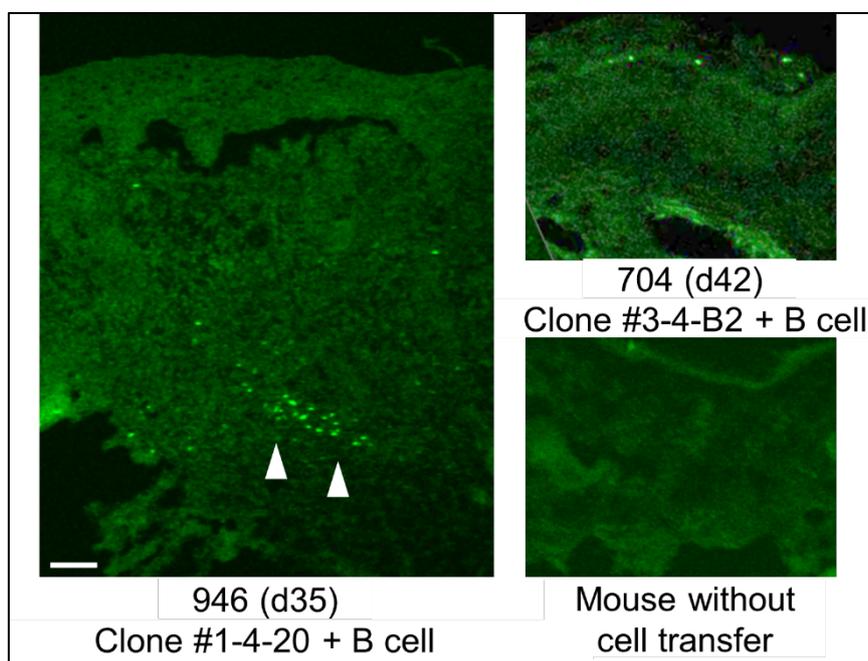


図 9 レシピエントマウスの皮膚における CD4 陽性 T 細胞の免疫組織学的染色所見

レシピエントマウスないし細胞移入を行っていない *Rag-2*^{-/-}COL17 ヒト化マウスの皮膚を FITC 標識抗 CD4mAb で染色した。#1-4-20：病原性 T 細胞クローン、#3-2-B4：非病原性 T 細胞クローン。矢頭：CD4 陽性 T 細胞。Bar=200µm。

3. 病原性 T 細胞クローンを移入したマウスの病変部は組織学的に BP 様の変化を示した

病変部の組織学的評価を行うために、病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚病変を検体とし、Hematoxylin & eosin (HE) 染色を施行した。真皮表皮境界部 (Dermal-epidermal junction: DEJ) における interface change および表皮下水疱、水疱内および真皮浅層へのリンパ球・好酸球浸潤を示した (図 10)。

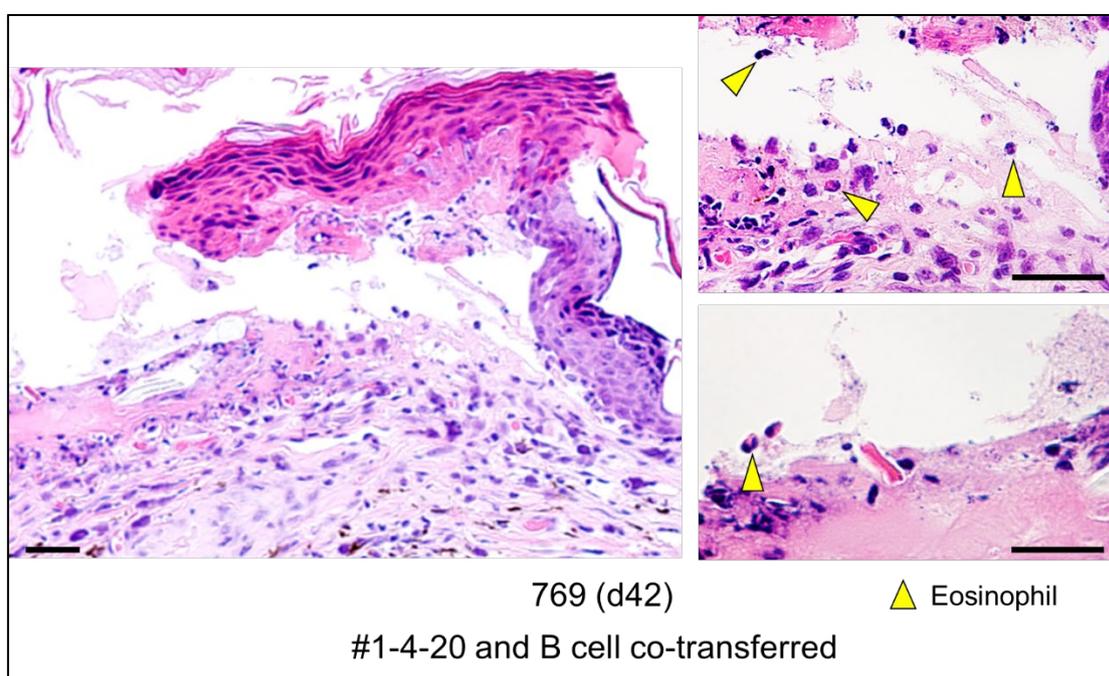


図 10 病原性 T 細胞クローン (#1-4-20) と R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚病変の組織学的所見
HE 染色、Bar=100 μ m。

一方で、非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚は、組織学的に DEJ での変化や好酸球の浸潤は認められなかった (図 11)。

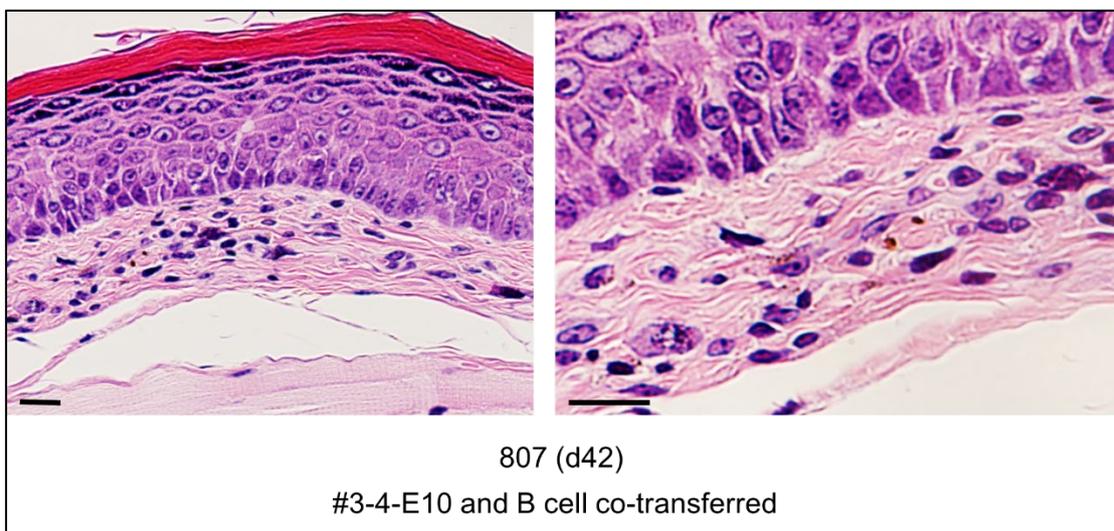


図 11 非病原性クローン (#3-4-E10) と R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚病変の組織学的所見
HE 染色、Bar=100 μ m。

4. 病原性 T 細胞クローンのみならず、非病原性 T 細胞クローンも抗 COL17 抗体の産生を誘導した

病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの血清と皮膚を用いた DIF および IIF を施行したところ、DEJ に線状の IgG および IgM が沈着していることが確認された。非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスにおいても、一部のマウスで病原性 T 細胞クローンと同様に IgG と IgM の線状沈着が誘導された。T 細胞クローン単独、R7 反応性 B 細胞単独で移入されたレシピエントマウスでは、DIF や IIF のいずれでも抗体産生は証明されなかった。IIF の陰性対照として、血清の代わりに PBS を用いた結果、非特異的な抗体沈着は検出されなかった (図 12)。

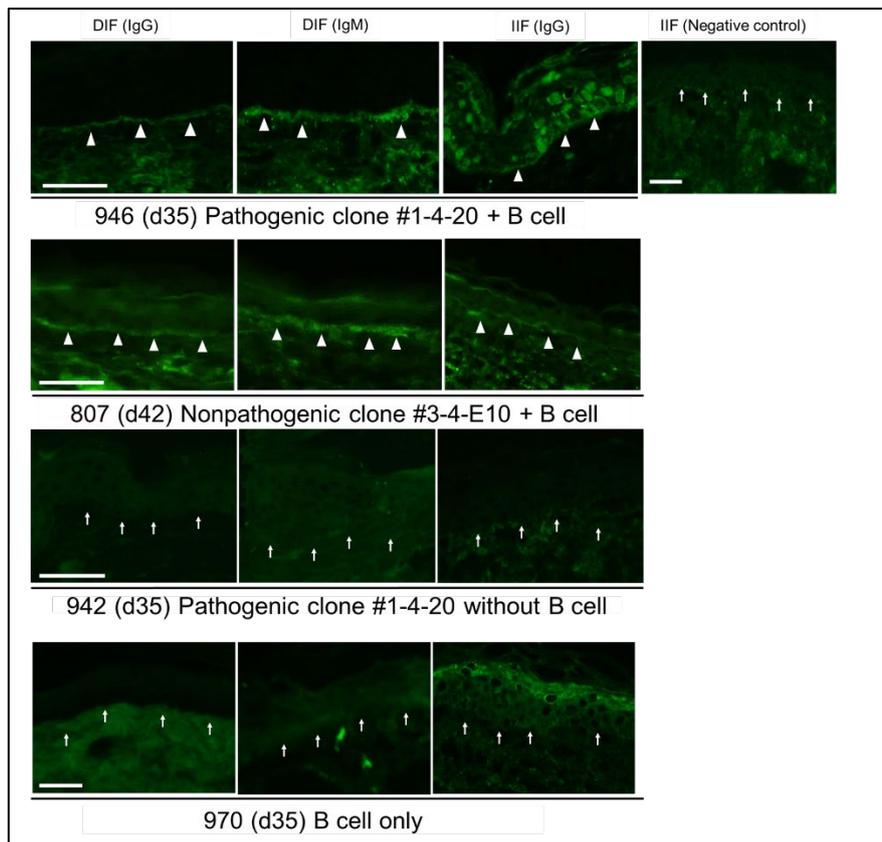


図 12 レシピエントマウスの皮膚と血清を用いた免疫蛍光所見

病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞、非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したいずれのレシピエントマウスでも、DIF では DEJ に IgG と IgM が沈着し (矢頭)、正常ヒト皮膚とマウス血清を用いた IIF では DEJ

に IgG が沈着した (矢頭)。T 細胞クローン単独・R7 反応性 B 細胞単独で移入したレシピエントマウスは DIF および IIF のいずれでも抗体沈着を認めなかった (矢印)。Bar=100 μ m。

病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したすべてのマウスに表現型が発現したのではなく、皮疹を呈したのは一部のマウスのみであり、皮疹が出現したマウスすべてにおいて、DIF および IIF で IgG 沈着がみられた。

皮膚組織への好酸球浸潤は、組織学的に interface change や表皮下水疱を有するマウスにのみ認められた (表 1)。

表 1 T 細胞クローン移植マウスの臨床的所見、組織学的所見および自己抗体産生プロファイルの要約

Clone #	B cell co-transfer	n	Skin change	Subepidermal separation and/or interface change in H&E staining	Eosinophil infiltration in H&E staining	DIF IgG	DIF IgM	IIF IgG	IIF IgM
#1-4-10	(+)	7	5/7	5/7	5/7	5/7	2/7	5/7	2/7
	(-)	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
#1-4-20	(+)	14	8/14	8/14	8/14	8/14	5/14	12/14	6/14
	(-)	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
#2-14-4	(+)	3	2/3	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	1/3
	(-)	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
#3-4-B2	(+)	5	0/5	0/5	0/5	4/5	2/5	5/5	0/5
	(-)	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
#3-4-E10	(+)	5	0/5	0/5	0/5	5/5	2/5	4/5	3/5
	(-)	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
B cell only	N/A	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

ELISAにより、レシピエントマウスの血中抗 NC16A 抗体を検出した。興味深いことに、非病原性 T 細胞クローンは病原性 T 細胞クローンよりも高い抗体価を誘導した（表 2）。以上より、病原性 T 細胞クローンと非病原性 T 細胞クローンのいずれも抗 COL17 自己抗体産生を誘導するにもかかわらず、抗体産生のみでは表現型（皮疹、組織学的変化）の発現には至らないことが示された。

表 2 レシピエントマウスの血中抗 COL17NC16A 抗体価

Clone #	Skin change	ELISA absorbance (450nm) (mean±SD)
#1-4-10	5/7	0.175±0.096
#1-4-20	8/14	0.177±0.130
#2-14-4	2/3	0.087±0.037
#3-4-B2	0/5	0.235±0.118
#3-4-E10	0/5	0.613±0.344
Negative control	N/A	0.030
Positive control	N/A	0.812

5. 病原性 T 細胞クローンは IL-5 をはじめとする Th2 サイトカインの高発現を示した

T 細胞クローンの病原性を規定する因子を検索するために、RNA 配列解析を行った。各 T 細胞クローンから抽出した mRNA は、2100 bioanalyzer system (Agilent) を用いた解析の結果、RIN 値が 8 以上であり、RNA-seq に十分な品質を有していた。クラスター解析の結果、病原性 T 細胞クローンと非病原性 T 細胞クローンは異なるクラスターに分類された (図 3A)。

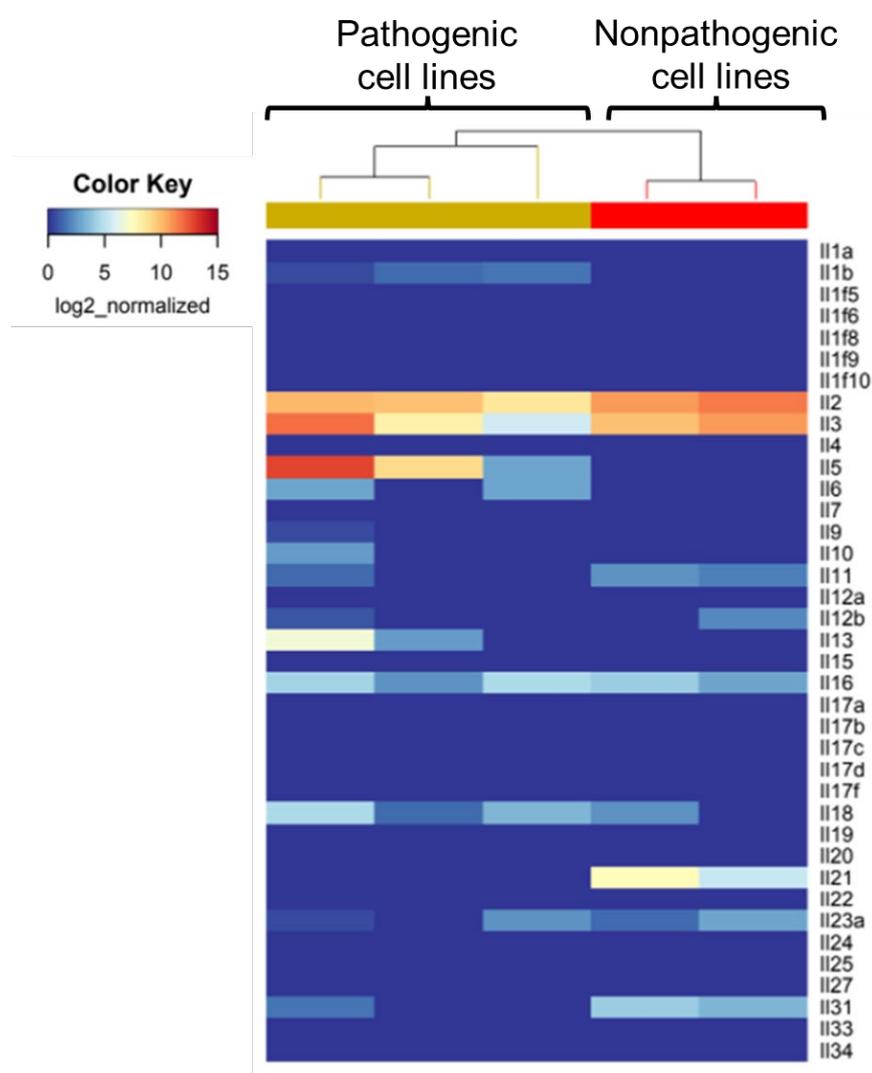


図 13 T 細胞クローンから抽出した mRNA を用いた RNA-seq 解析によるクラスター解析およびサイトカイン発現量の比較

病原性 T 細胞クローンと非病原性 T 細胞クローン間の遺伝子発現量を、サイトカインに着目して比較したところ、IL-5をはじめとする Th2 サイトカインが病原性細胞株において高発現していた（図 13, 14）。

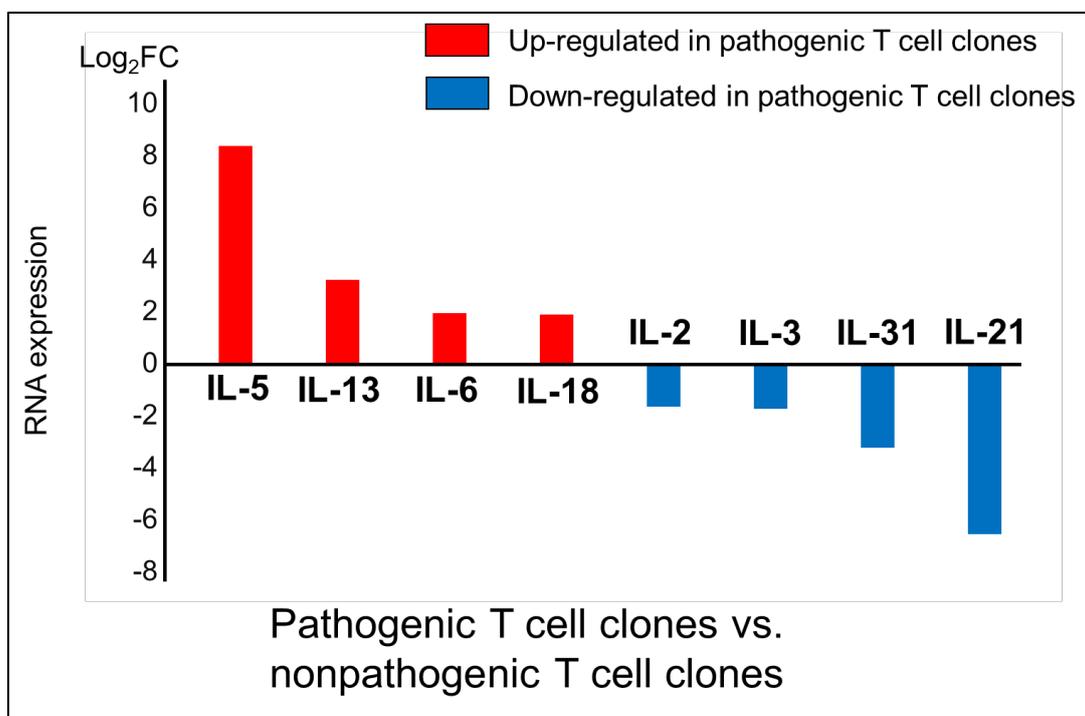


図 14 病原性 T 細胞クローンと非病原性 T 細胞クローン間のサイトカイン発現量の比較

発現量の比について、2 を底とする対数グラフを縦軸にとり示した。

赤いグラフは病原性 T 細胞クローンで高発現、青いグラフは非病原性 T 細胞クローンで高発現していたサイトカインを表す。

病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚病変部から抽出した mRNA と、非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの同部位の皮膚から抽出した mRNA を用いて qRT-PCR を行い、各遺伝子発現量を比較した。その結果、IL-6、IL-13、好酸球関連リボヌクレアーゼ-1 (Eosinophil associated ribonuclease-1: Ear1)、CCL11 (Eotaxin-1)、CCL24 (Eotaxin-2) の発現量が病原性 T 細胞クローンのレシピエントマウスの皮膚で有意に高かった。IL-4、IL-5、CCL26 (Eotaxin-3) の皮膚における発現は、病原性 T 細胞クローン+R7 反応性 B 細胞移入群、非病原性 T 細胞クローン+R7 反応性 B 細胞移入群ともに非常に低く、ほぼ検出されなかった (図 15)。

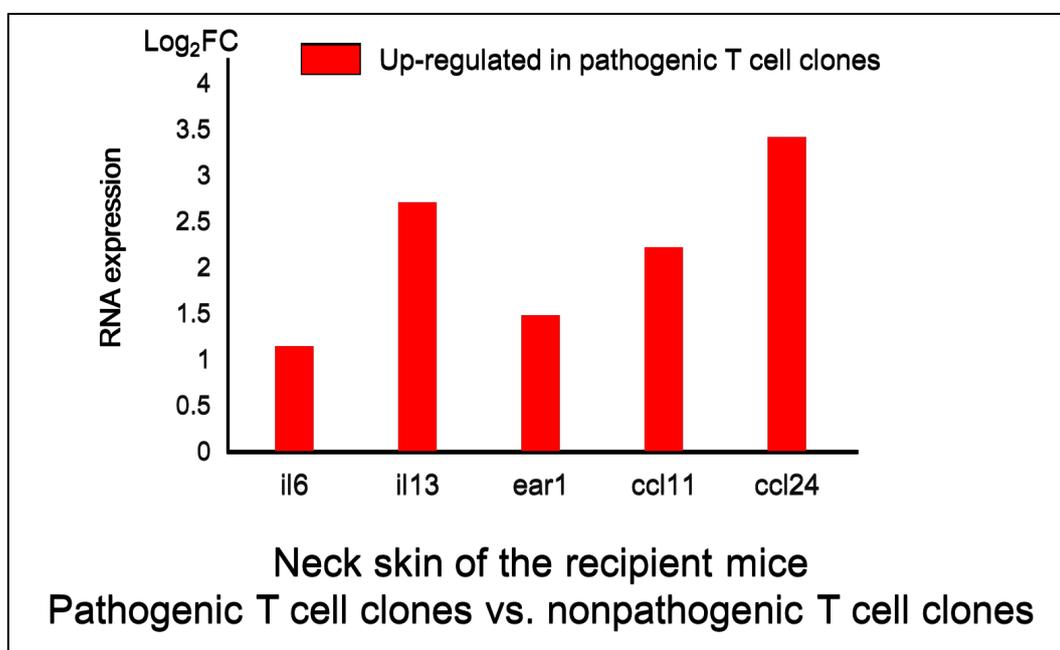


図 15 病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスと非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの皮膚におけるサイトカインおよびケモカインの発現量の比較

病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したマウスの皮膚では、好酸球関連のケモカインが高発現している。

1.0×10⁵個/well の T 細胞クローンを feeder 細胞とともに 4 週間培養し、その上清を用いて IL-5 ELISA を施行した。その結果、3 種の病原性 T 細胞クローンのうち 2 種（#1-4-10、#1-4-20）の上清の IL-5 濃度が非病原性 T 細胞クローンの上清よりも著明に高いことが示された（図 16）。

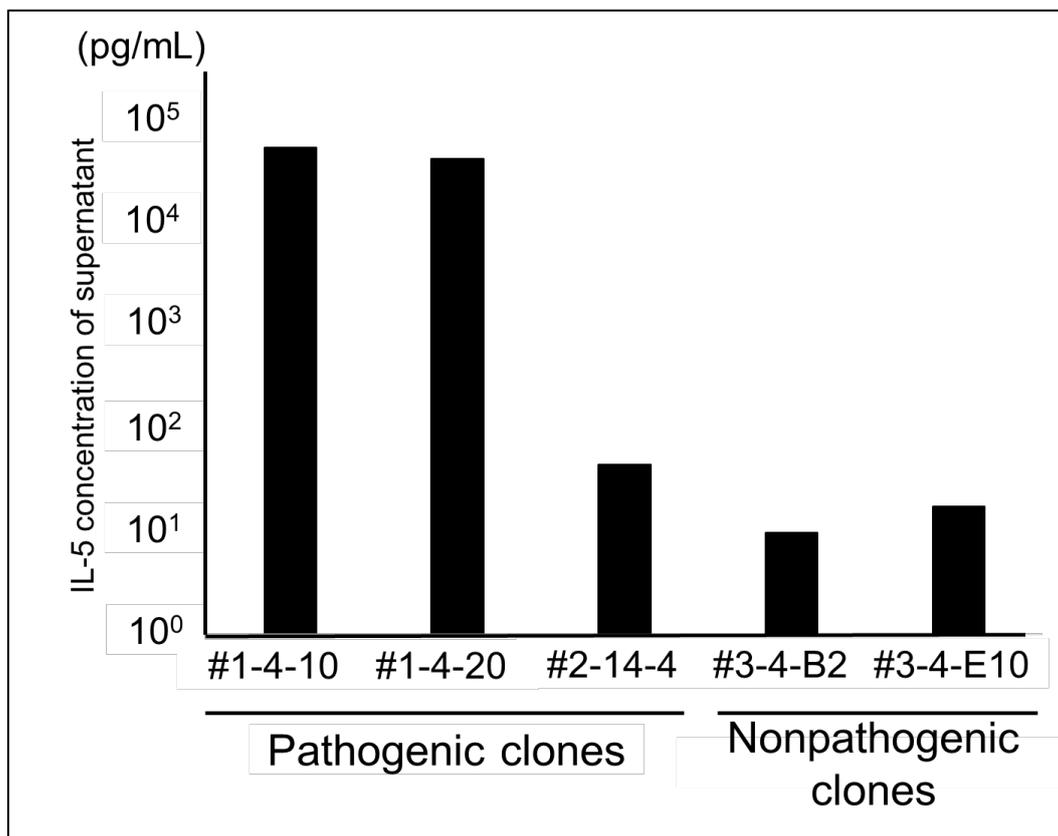


図 16 培養 T 細胞クローンの上清を用いた IL-5 ELISA の結果

以上の結果、病原性 T 細胞クローンは、高濃度の IL-5 を産生し、それが皮膚への好酸球浸潤を誘導していると考えた。

6. 病原性 T 細胞クローンのレシピエントマウスに対する抗 IL-5 モノクローナル抗体の投与は、皮疹形成と皮膚への好酸球浸潤を抑制した

以上の結果を踏まえ、in vivo における IL-5 中和実験を行った。病原性 T 細胞クローン (#1-4-20) を、R7 反応性 B 細胞とともに 8 匹の *Rag-2*^{-/-}COL17 ヒト化マウスに前述の通り養子移入した。そのうち 4 匹のマウスには毎週 1mg の抗 IL-5mAb を腹腔内投与し、残りの 4 匹のマウスには毎週同量のアイソタイプ IgG 抗体を投与した。移入 35 日後、抗 IL-5mAb を投与した 4 匹のマウスのうち 1 匹は、耳と体幹に紅斑やびらんなどの BP の表現型が発生した。一方、アイソタイプ IgG 抗体を投与したマウス 4 匹中 3 匹は耳と体幹に皮疹を呈した (図 17)。

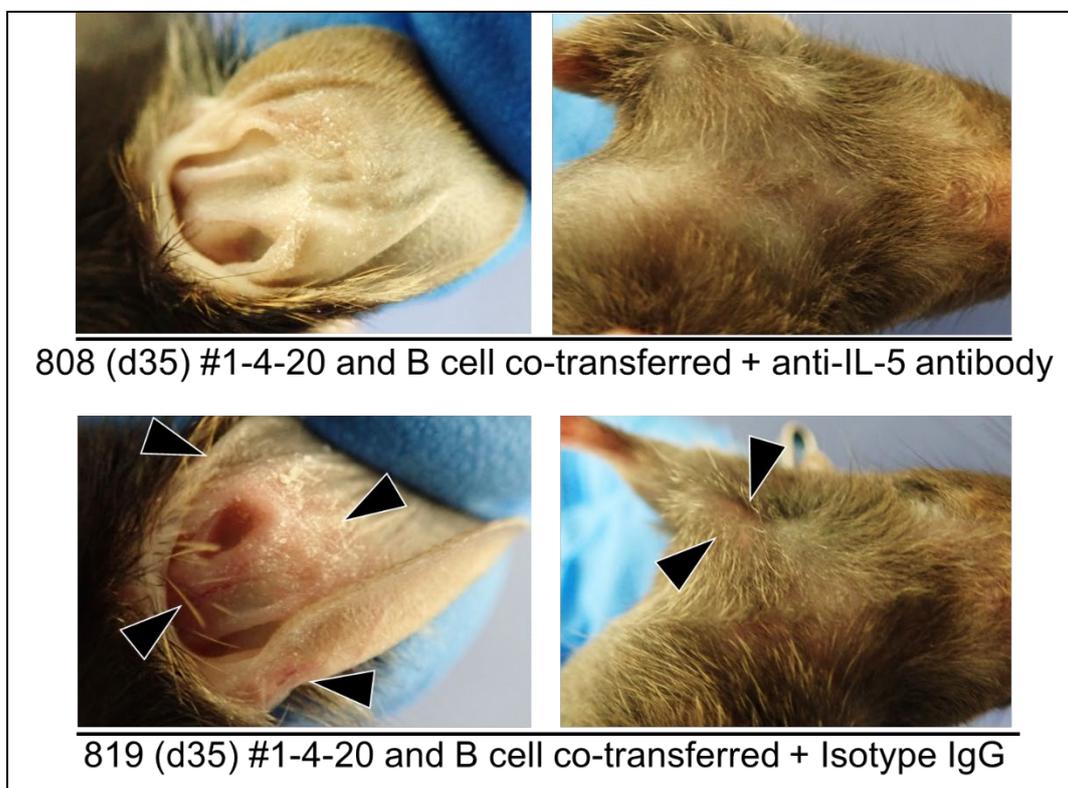


図 17 抗 IL-5mAb (上段) またはアイソタイプ IgG 抗体 (下段) を投与したレシピエントマウスの臨床所見

皮疹を呈した皮膚表面の割合で評価すると、両群間に有意差はなかったが、抗 IL-5 抗体投与マウスでは皮疹が少ない傾向が見られた(図 18)。

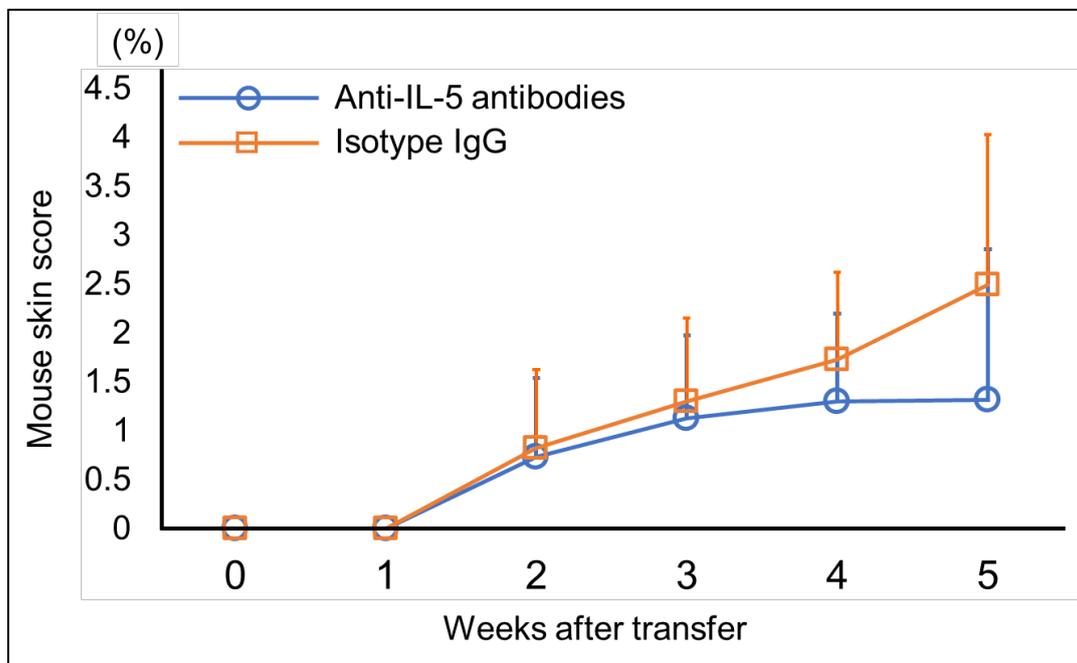


図 18 レシピエントマウスのスキンスコアの推移

マウスの skin score は、BP 表現型を呈した皮膚の体表面積に占める割合によって算出した。

続いて、上記レシピエントマウスの組織学的評価を行った。アイソタイプ IgG 抗体を投与したマウスでは、表皮下水疱、DEJ の interface change、真皮表層への好酸球浸潤がみられた。一方で、抗 IL-5mAb を投与したマウスでは、4 匹のうち皮疹を生じた 1 匹のみ DEJ の interface change を認めた (図 19)。また、抗 IL-5mAb を投与したマウスでは、真皮への好酸球浸潤はごくわずかであり (1.5 ± 1.7 個/ 5 強拡大視野)、アイソタイプ IgG 投与群 (13.5 ± 5.3 個/ 5 強拡大視野) よりも有意に少なかった (図 19、20、表 3)。

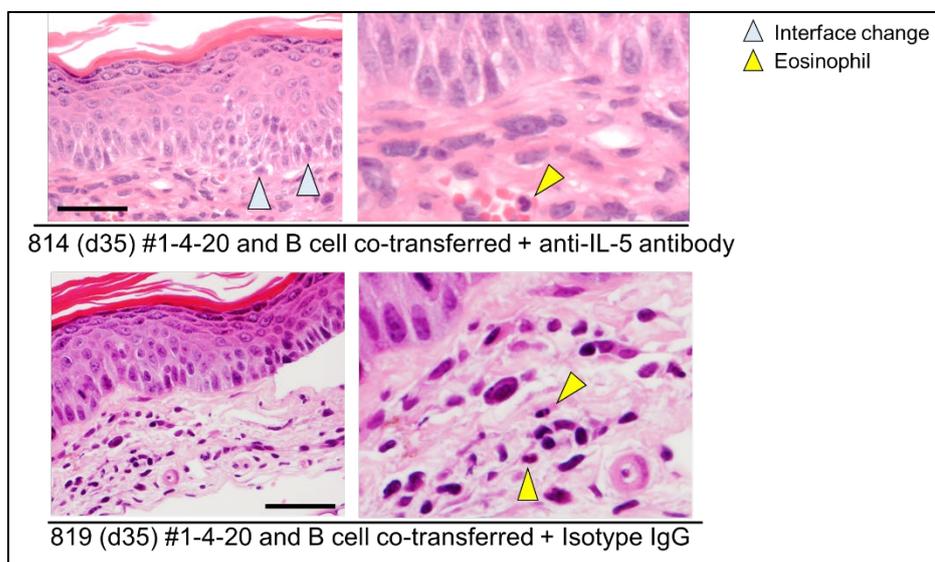


図 19 抗 IL-5mAb またはアイソタイプ IgG 抗体を投与したレシピエントマウスの皮膚病変の組織学的所見

HE 染色、Bar=100 μ m。

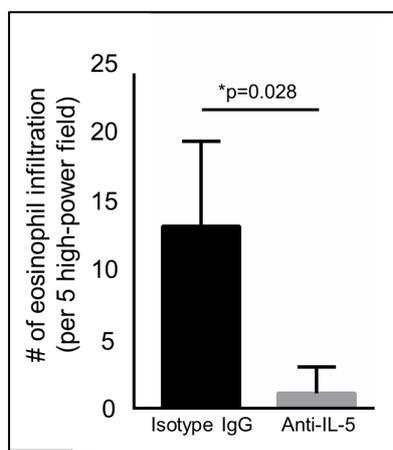


図 20 抗 IL-5mAb またはアイソタイプ IgG 抗体を投与したレシピエントマウスにおける皮膚浸潤好酸球数の比較

また、DIF および IIF により、皮疹を呈したマウスのみにおいて、DEJ に IgG が線状に沈着していることが確認された (表 3)。さらに、抗ヒト COL17NC16A 抗体の抗体価を ELISA で評価した。アイソタイプ IgG 投与群の吸光度は 0.145 ± 0.03 であったが、抗 IL-5 抗体投与群は 0.109 ± 0.01 であり、COL17NC16A に対する抗体産生がわずかに低下していることが示された (表 3)。

表 3 抗 IL-5mAb 投与の有無によるマウスの表現型、免疫組織学的所見および抗 COL17NC16A 抗体価の要約

Clone #	Anti-IL-5 antibody administration	n	Skin change	Subepidermal separation or interface change in H&E staining	# of eosinophil infiltration (per 5 high-power field) (mean \pm SD)	DIF IgG	DIF IgM	IIF IgG	IIF IgM	ELISA absorbance against hCOL17NC16A (450nm) (mean \pm SD)
#1-4-20	(+)	4	1/4	1/4	1.5 ± 1.7	1/4	1/4	3/4	1/4	0.109 ± 0.01
	(-)	4	3/4	3/4	13.5 ± 5.3	2/4	0/4	3/4	3/4	0.145 ± 0.03

以上の結果から、in vivo での IL-5 中和は、病原性 T 細胞クローンによる表現型の発現、好酸球浸潤、および組織学的な変化を抑制することが明らかとなった。

考 察

本研究では、COL17 (R7) 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンを樹立することに成功した。当初の実験系では、最初に野生型マウスに免疫するタンパクを R7 ペプチドとしていたが、R7 特異的 T 細胞の増殖がみられなかった。合成ペプチドでは免疫応答が不十分であった可能性を考え、免疫抗原をヒト COL17NC16A リコンビナントタンパクへ変更した結果、培養 T 細胞の増殖が認められた。

樹立した 5 種の T 細胞クローンのうち 3 種は、レシピエントマウスに R7 反応性 B 細胞と共移入することによって BP の臨床型を誘導し、組織学的・免疫学的にも BP 様所見を示した。これに対して、非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入し、BP の皮疹を呈さないマウスにおいても、COL17 に対する抗体が検出された。以上から、病原性 T 細胞クローンと非病原性 T 細胞クローンの双方が抗 COL17 抗体産生を誘導することができ、抗 COL17 抗体の存在単独では *in vivo* での病原性に関連しないことが示された。

本研究で樹立した病原性 T 細胞クローンは多量の IL-5 を産生しており、この結果はヒトにおける BP の病態と一致している。これまでの研究で、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いる (Büdinge et al. 1998)。さらに、BP 患者の血清中のサイトカインを解析した報告において、IL-5, IL-6, IL-8, IL-17, CCL17, CCL26 の血中濃度が健常人コントロール群に比べて有意に高いことが示されている (Kowalski et al. 2019)。同様に、水疱内容液においても、IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-8, CCL11, TNF- α の有意な上昇が確認されている (Kowalski et al. 2019)。BP では Th2 サイトカインの発現が上昇することが指摘されているが、この中で IL-4 の有意な上昇は確認されていないことが重要であり、本研究においても、IL-4 ではなく IL-5 や IL-6 の発現上昇が病原性クローンで確認されており、先行研究の結果と合致しているものと考えられる。

IL-5 は、好酸球の分化、活性化、脱顆粒など様々な機能を制御するサイトカインである (Feliciani et al. 1999, Shrikhande et al. 2000, Engineer et al. 2001)。好酸球浸潤は BP に特徴的であり、BP の水疱形成の初期から存在することが知られている (Borrego et al. 1996, Amber et al. 2018)。de Graauw らの報告によれば、BP 自己抗体の存在下で、IL-5 により活性化された好酸球が BP の水疱形成に直接寄与することが証明されている。対して、BP 抗体のみ存在し IL-5 が存在しない状況では、好酸球は表皮下水疱を誘発できないことも示されている (de Graauw et al. 2017)。本研究において、非病原性 T 細胞クローンと R7 反応性 B 細胞を共移入したレシピエントマウスの一部は、抗 COL17 抗体が産生されているにもかかわらず BP が誘発されないことが確認さ

れた。この結果は、非病原性 T 細胞クローンは IL-5 の産生が低レベルであるため、抗 COL17 抗体の存在のみでは水疱形成を誘導できず、その結果皮疹が生じなかったことを示唆している。また、本研究では、病原性 T 細胞クローンのレシピエントマウスの皮膚病変部において、qRT-PCR を用いた解析では IL-5 がほぼ検出されなかったが、過去の報告では、BP 患者の皮膚病変部の DEJ や浸潤細胞に IL-5 が発現していることが明らかにされている (Rico et al. 1999, Giomi et al. 2002)。我々の実験系では、図 9 に示すように、皮膚病変部への CD4 陽性 T 細胞の浸潤が微弱であるために、皮膚病変部の IL-5 を検出することは困難であると考えられた。

好酸球は、CCL5 (RANTES) と IL-16 を介して T 細胞を活性化し、T 細胞の遊走を誘導することによって免疫応答に関与している (Schall et al. 1990, Rot et al. 1992, Lim et al. 1996)。好酸球の他の走化性因子にはエオタキシン-1 (CCL11)、エオタキシン-2 (CCL24)、エオタキシン-3 (CCL26) などが存在し、これらのエオタキシンは末梢好酸球に発現する CCR3 との相互作用によって、好酸球の遊走と脱顆粒を媒介することが知られている (Ying et al. 1999, Davoine et al. 2014, Liu et al. 2003)。BP の皮膚病変における好酸球浸潤の増多は、これらのエオタキシンの増加によるものと考えられている。本研究における CCL11、CCL24 の上昇と皮膚病変部における好酸球浸潤の増多は、BP における先述の疾患特異的な特徴を反映していると考えた。

本研究では、非病原性 T 細胞クローンにおいて IL-21 が高発現していた。IL-21 は、活性化 T 細胞によって分泌されるサイトカインであり (Parrish-Novak et al. 2000)、NK 細胞、Th1、Th2、Th17、細胞傷害性 T 細胞、樹状細胞やマクロファージの増殖や分化・活性化を調節する (Kishida et al. 2007)。Li らは、BP 患者の血中 IL-21 濃度が上昇しており、BP の治療により IL-21 濃度が低下することを報告している (Li et al. 2013)。さらに、IL-21 の阻害により、*in vitro* での CD4 陽性 T 細胞/B 細胞共培養系における抗 COL17NC16A 自己抗体の分泌が阻害されることを報告している (Li et al. 2013)。一方で、IL-21 は、IgE へのクラススイッチを起こした B 細胞などの様々な免疫担当細胞に対して調節活性を有しており、ピーナッツアレルギーモデルマウスに対する IL-21 の全身投与がアナフィラキシー反応を改善させることが報告されている (Kishida et al. 2007)。BP における IgE 自己抗体の役割は十分には解明されていないが、BP 患者の皮膚における好酸球浸潤は抗 COL17 IgE 自己抗体に起因することが示唆されている (Ujiie et al. 2015)。本研究では、IL-21 を高発現する非病原性 T 細胞クローンを移入したレシピエントマウスは、組織学的に好酸球浸潤を示さなかった。したがって、IL-21 の高発現は BP の病原性の抑制に関連している可能性があると考えられる。

抗 IL-5mAb を投与したマウスでは、組織学的に好酸球浸潤が減少したが、好酸球の完全な枯渇はみられなかった。そのため、抗 IL-5mAb を投与したマウスでは、軽度の皮疹が発生した。好酸球を標的とした BP の治療法としては、IL-5 に対するモノクローナル抗体である mepolizumab や、CCL11 に対するモノクローナル抗体である bertilimumab がある (Jones et al. 2021, Simon et al. 2020, Fiorino et al. 2019)。Simon らによれば、mepolizumab による治療は血中好酸球数を減少させるが、組織に浸潤する好酸球数および臨床経過にはプラセボと比較して有意な改善効果がないとされている (Simon et al. 2020)。この点について、試験期間が 12 週間と短かったために、BP の長期的な臨床的改善を達成するには不十分であり、BP に対する抗 IL-5 抗体療法の有効性が否定されたわけではなく、引き続き検討する余地があると考えられている。反対に、Rhyou らは BP 患者に対して抗 IL-5 抗体 (reslizumab) を用いて治療に成功した例を報告している (Rhyou et al. 2021)。この論文においては、前述の mepolizumab の試験のエンドポイントがステロイド減量効果ではなく、mepolizumab 投与後の無再発累積率だったために mepolizumab の治療が有効とされなかった可能性が考慮されている。また、CCL11 を低下させることが知られている bertilimumab に関する研究では、BP 患者における Bullous pemphigoid disease area index (BPDAI)、痒痒、QOL の改善を示す結果が報告されている (Fiorino et al. 2019)。以上から、好酸球を標的とする治療は、BP 患者に対する治療オプションとして妥当であるといえるだろう。

本研究では、ヒト COL17 特異的 T 細胞が BP の発症を誘導し、T 細胞が産生する IL-5 などの Th2 サイトカインが BP の病態に寄与していることを明らかにした。さらに、IL-5 の阻害が BP の病原性を減弱させることが示唆され、BP の病態とその治療可能性について新たな知見を提供することができたと考える。

結 論

- ① ヒト COL17 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンの樹立に成功した。
- ② *Rag2*^{-/-}COL17 ヒト化マウスへの移入実験により、T 細胞クローンごとの in vivo での病原性の差が観察された
- ③ 病原性 T 細胞クローンでは IL-5 をはじめとする Th2 サイトカインが高発現していた
- ④ IL-5 中和実験により、移入した T 細胞クローンにおける in vivo での病原性の緩和が観察された。

本研究ではヒト COL17 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンを樹立することにより、BP の発症に IL-5 および好酸球浸潤が関与していることを新規の実験系を用いて示すことができた。今後、樹立したクローンを用いて、ヒト COL17 特異的 TCR 発現トランスジェニックマウスを確立し、同マウス由来の COL17 特異的制御性 T 細胞を単離することによって細胞療法実験を行う予定である。

BP は難治性疾患であり、既存の内服ステロイドを用いた治療では内服期間が長期にわたり、種々の副作用を生じることが問題となっている。今回の研究により、BP の病態解明や治療実験に新たな知見が加わり、新規治療法の確立の一助となることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会および多くのご指導とご助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水宏名誉教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導いただきました氏家英之教授に深謝申し上げます。そして、本研究に対し多大なるご助言を賜りました西江渉先生、ならびに慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 高橋勇人准教授に心より感謝申し上げます。ヒト COL17cDNA トランスジェニックマウスをご提供いただきました、University of Texas Southwestern Medical Center ご所属の Kim B. Yancey 先生に深甚なる謝意を表します。最後に、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の全ての教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Amber K.T., Chernyavsky A., Agnoletti A.F., Cozzani E., and Grando S.A. Mechanisms of pathogenic effects of eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin on human keratinocytes.

Exp. Dermatol. 2018; 27: 1322-1327.

Bernard P., Venot J., Constant F., and Bonnetblanc J.M. Blood eosinophilia as a severity marker for bullous pemphigoid.

J. Am. Acad. Dermatol. 1987; 16: 879-81.

Borrego L., Maynard B., Peterson E.A., George T., Iglesias L., Peters M.S., Newman W., Ggleich G.J., and Leiferman K.M. Deposition of eosinophil granule proteins precedes blister formation in bullous pemphigoid. Comparison with neutrophil and mast cell granule proteins.

Am. J. Pathol. 1996; 148: 897-909.

Bowszyc-Dmochowska M., and Dmochowski M. Immediate hypersensitivity phenomena in bullous pemphigoid: critical concepts. *J. Med.* 2002; 33: 189-198.

Büdinger L., Borradori L., Yee C., Eming R., Ferencik S., Grosse-Wilde H., Merk H.F., Yancey K., and Hertl M. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 2082-2089.

Daniel B.S., and Murrell D.F. Review of autoimmune blistering diseases: the Pemphigoid diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2019; 33: 1685-1694.

Davoine F., and Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front. Immunol.* 2014; 5: 570.

de Graauw E., Sitaru C., Horn M., Borradori L., Yousefi S., Simon H.U., and Simon D. Evidence for a role of eosinophils in blister

formation in bullous pemphigoid. *Allergy*. 2017; 72: 1105-1113.

Diaz L.A., Ratrie H.3rd, Saunders W.S., Futamura S., Squiquera H.L., Anhalt G.J., and Giudice G.J. Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 1088-1094.

Engineer L., Bhol K., Kumari S., and Razzaque Ahmed A. Bullous pemphigoid: interaction of interleukin 5, anti-basement membrane zone antibodies and eosinophils. A preliminary observation. *Cytokine*. 2001; 13: 32-38.

Felicani C., Toto P., Mohammad Pour S., Coscione G., Amerio P., and Amerio P. A Th2-like cytokine response is involved in bullous pemphigoid. the role of IL-4 and IL-5 in the pathogenesis of the disease. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 1999; 12: 55-61.

Fiorino A., Baum S., and Czernik A. Safety and efficacy of bertilimumab, a human anti-eotaxin-1 monoclonal antibody in bullous pemphigoid in a phase 2a study. *J. Invest. Dermatol.* 2019; 139: S98.

Frezzolini A., Teofoli P., Cianchini G., Barduagni S., Rufferlli M., Ferranti G., Puddu P., and De Pita O. Increased expression of eotaxin and its specific receptor CCR3 in bullous pemphigoid. *Eur. J. Dermatol.* 2002; 12: 27-31.

Giomi B., Caproni M., Calzolari A., Bianchi B., and Fabbri P. Th1, Th2 and Th3 cytokines in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *J. Dermatol. Sci.* 2002; 30: 116-128.

Giudice G.J., Emery D.J., Zelickson B.D., Anhalt G.J., Liu Z, and Diaz L.A. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J. Immunol.* 1993; 151: 5742-5750.

Hori S., Nomura T., and Sakaguchi S.. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; *299*: 1057-1061.

Jones V.A., Patel P.M., and Amber K.T. Eosinophils in bullous pemphigoid. *Panminerva Med*. 2021; *63*: 368-378.

Kishida T., Hiromura Y., Shin-ya M., Asada H., Kuriyama H., Sugai M., Shimizu A., Yokota Y., Hama T., Imanishi J., Hisa Y., and Mazda O. IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice. *J. Immunol*. 2007; *179*: 8554-8561.

Kowalski E.H., Kneibner D., Kridin K., and Amber K.T. Serum and blister fluid levels of cytokines and chemokines in pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun. Rev*. 2019; *18*: 526-534.

Kridin K. Peripheral eosinophilia in bullous pemphigoid: prevalence and influence on the clinical manifestation. *Br. J. Dermatol*. 2018; *179*: 1141-1147.

Kuwana M., Medsger T.A. Jr., and Wright T.M. T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J. Clin. Invest*. 1995; *96*: 586-596.

Lim K.G., Wan H.C., Bozza P.T., Resnick M.B., Wong D.T., Cruikshank W.W., Kornfeld H., Center D.M. and Weller P.F. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J. Immunol*. 1996; *156*: 2566-2570.

Li Q, Liu Z, Dang E, Jin L, He Z, Yang L, Shi X, Wang G. Follicular helper T Cells (Tfh) and IL-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *PLoS. One*. 2013; *8*: e68145. doi: 10.1371/journal.pone.0068145. Print 2013.

Liu L.Y., Jarjour N.N., Busse W.W., and Kelly E.A. Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and

bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge.

J. Allergy. Clin. Immunol. 2003; 112: 556-562

Messingham K.N., Wang J.W., Holahan H.M., Srikantha R., Aust S.C., and Fairley J.A. Eosinophil localization to the basement membrane zone is autoantibody- and complement-dependent in a human cryosection model of bullous pemphigoid. *Exp. Dermatol.* 2016; 25: 50-55.

Moynihan K.D., Opel C.F., Szeto G.L., Tzeng A., Zhu E.F., Engreitz J.M., Williams R.T., Rakhra K., Zhang M.H., Rothschilds A.M., Kumari S., Kelly R.L., Kwan B.H., Abraham W., Hu K., Mehta N.K., Kauke M.J., Suh H., Cochran J.R., Lauffenburger D.A., Wittrup K.D., and Irvine D.J. Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nat Med.* 2016; 22: 1402-1410.

Muramatsu K., Ujiie H., Kobayashi I., Nishie W., Izumi K., Ito T., Yoshimoto N., Natsuga K., Iwata H., and Shimizu H. Regulatory T-cell dysfunction induces autoantibodies to bullous pemphigoid antigens in mice and human subjects. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2018; 142: 1818-1830.

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

Nishie W., Sawamura D., Goto M., Ito K., Shibaki A., McMillan J.R., Sakai K., Nakamura H., Olasz E., Yancey K.B., Akiyama M., and Shimizu H. Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* 2007; 13: 378-383.

Olasz E.B., Roh J., Yee C.L., Arita K., Akiyama M., Shimizu H., Vogel J.C., and Yancey K.B. Human bullous pemphigoid antigen 2 transgenic skin elicits specific IgG in wild-type mice. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127: 2807-2817.

Parrish-Novak J., Dillon S.R., Nelson A., Hammond A., Sprecher C.,

Gross J.A., Johnston J., Madden K., Xu W., West J., Schrader S., Burkhead S., Heipel M., Brandt C., Kuijper J.L., Kramer J., Conklin D., Presnell S.R., Berry J., Shiota F., Bort S., Hambly K., Mudri S., Clegg C., Moore M., Grant F.J., Lofton-Day C., Gilbert T., Rayond F., Ching A., Yao L., Smith D., Webster P., Whitmore T., Maurer M., Kaushansky K., Holly R.D., and Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 200; 408: 57-63.

Rhyou H. I., Han S.H., and Nam Y.H. Successful induction treatment of bullous pemphigoid using reslizumab: a case report. *Allergy. Asthma. Clin. Immunol.* 2021; 17: 117.

Rico M.J., Benning C., Weingart E.S., Streilein R.D., and Hall R.P. 3rd. Characterization of skin cytokines in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 1999; 140: 1079-1086.

Rot A., Krieger M., Brunner T., Bischoff S.C., Schall T.J. and Dahinden C.A. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1489-1495.

Schall T.J., Bacon K., Toy K.J., and Goeddel D.V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990; 347: 669-671.

Schmidt E., and Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 2013; 381: 320-332.

Shrikhande M., Hunziker T., Braathen L.R., Pichler W.J., Dahinden C.A., and Yawalkar N. Increased coexpression of eotaxin and interleukin 5 in bullous pemphigoid. *Acta. Derm. Venereol.* 2000; 80: 277-280.

Simon D., Yousefi S., Cazzaniga S., Bürgler C., Radonjic S., Houriet C., Heidemeyer K., Klötgen H.W., Kozłowski E., Borradori L., and Simon H.U. Mepolizumab failed to affect bullous pemphigoid: A randomized,

placebo-controlled, double-blind phase 2 pilot study. *Allergy*. 2020; 75: 669-72.

Takahashi H., Amagai M., Nishikawa T., Fujiie Y., Kawakami Y., and Kuwana M. Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. *J. Immunol.* 2008; 181: 1526-1535.

Ujiie H. IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: supporting role, or leading player? *J. Dermatol. Sci.* 2015; 78: 5-10.

Ujiie H., Shibaki A., Nishie W., Sawamura D., Wang G., Tateishi Y., Moriuchi R., Qiao H., Nakamura H., Akiyama M., and Shimizu H. et al. A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *J. Immunol.* 2010; 184: 2166-2174.

Ujiie H., Yoshimoto N., Natsuga K., Muramatsu K., Iwata H., Nishie W., and Shimizu H. Immune reaction to type XVII collagen induces intramolecular and intermolecular epitope spreading in experimental bullous pemphigoid models. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1410. doi: 10.3389/fimmu.2019.01410. eCollection 2019.

Ying S., Meng Q., Zeibecoglou K., Robinson D.S., Macfarlane A., Humbert M., and Kay A.B. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 1999; 163: 6321-6329.