

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	感覚統合領域 皮膚科学教育研究分野 氏名 牧田瑛子
(論文題目) Autoantibodies to BPAG1e trigger experimental bullous pemphigoid in mice (BPAG1e に対する自己抗体は、マウスで実験的な水疱性類天疱瘡を引き起こす)	
(内容の要旨) 【背景と目的】 水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid: BP) は高齢者に好発する最も頻度の高い自己免疫性水疱症である。真皮表皮接合部 (dermal-epidermal junction: DEJ) のヘミデスマソームタンパクである BP180 および bullous pemphigoid antigen 1e (BPAG1e) に対する自己抗体が産生され、DEJ が脆弱になることで裂隙が生じ、表皮下水疱が形成される。抗 BP180 抗体の多くは、膜貫通型タンパクである BP180 の細胞外領域を標的とする。一方、BPAG1e は細胞内タンパクであり、抗 BPAG1e 抗体の病原性については未だに不明な点が多い。この研究では、BPAG1e を標的とする実験的 BP モデルマウスを作成し、抗 BPAG1e 抗体の病原性を解明することを目的とした。	
【材料と方法】 ① BPAG1 の発現が全身でノックアウト (KO) される <i>Bpag1</i> -KO マウスは、生後 1-2 週間でジストニア症状により死亡する。そこで、Cre-loxP 条件付き遺伝子削除システムを使用して、 <i>Bpag1</i> 遺伝子の KO がケラチン 5 を発現する表皮細胞でのみ生じる <i>Bpag1</i> コンディショナル KO (<i>Bpag1</i> -cKO) マウスを作成した。 <i>Bpag1</i> -cKO マウスの表皮細胞で BPAG1e の発現が KO されていることを確認する為に、イムノブロットおよび免疫蛍光分析を行った。 ② <i>Bpag1</i> -cKO マウスを、BPAG1e の C 側部分 (BPAG1e-C) タンパクで 3 回免疫した。抗体価を確認する為に、マウス血清および BPAG1e-C タンパクを用いて ELISA を行った。抗体価が高かったマウスの脾細胞を免疫不全マウスである <i>Rag2</i> ^{-/-} マウスに静注 (adoptive transfer)、経時的に経過観察した。また、BP 様症状が出現したマウスから皮膚を採取し、組織学的に検討した。 ③ BPAG1e タンパクおよび BPAG1e-C タンパクに対する結合活性を確認する為に、マウス血清を用いてイムノブロットを行った。 ④ 抗 BPAG1e 抗体による液性免疫がマウスに BP 様症状を誘発したことを確認する為に、BPAG1e-C タンパクで免疫させた <i>Bpag1</i> -cKO マウスの脾細胞から B 細胞を除去、残りの脾細胞を <i>Rag2</i> ^{-/-} マウスに静注、経時的に経過観察した。 ⑤ BPAG1e に対する抗体が、 <i>in vivo</i> で表皮下水疱を発症するかを解明する為に、BP 様症状を呈する <i>Rag2</i> ^{-/-} マウスの血清を、C57BL/6 新生児マウスの背部に皮下注射し (passive transfer)、経過観察した。48 時間後に皮膚を採取し組織学的にも検討した。 ⑥ BP 様症状発症の誘因を調べる為に、adoptive transfer 後に、 <i>Rag2</i> ^{-/-} レシピエントマウスの背部皮膚に傷をつけて観察、発症率の変化を検討した。	

【結果】

- ① *Bpag1-cKO* マウスは、ジストニア症状を示さず長期間生存が可能であった。イムノブロット、免疫蛍光分析により、表皮細胞における BPAG1e 発現の消失を確認した。
- ② 抗体産生を確認する為に行った ELISA では、免疫後のマウスの抗体価は、免疫前および野生型マウスよりも有意に高値だった。Adoptive transfer では約 3 割のマウスが耳、背中、尾に鱗屑やびらんを呈した。顕微鏡的には表皮下水疱がみられ、DEJ に IgG の沈着を認めた。これらの所見は BP の組織所見と一致し、BPAG1e が BP 発症に関わる抗原であり、BPAG1e に対する抗体が病原性機能を持っていることを示唆した。
- ③ イムノブロットにおいて、BP 様症状が見られた *Rag2*^{-/-}マウスの血清は、BPAG1e タンパクに対してドナーマウスよりも強く反応した。また、BPAG1e-C タンパクへの結合活性も、レシピエントマウスで増強されていた。このことより、*Rag2*^{-/-}レシピエントマウスの表皮細胞に存在する BPAG1e タンパクが adoptive transfer された脾細胞の活性化を引き起こし、BPAG1e に対する抗体が持続的に産生されるようになったことが示された。
- ④ B 細胞を除去した脾細胞を移植された *Rag2*^{-/-}マウスは BP 様症状を呈さなかった。抗 BPAG1e 抗体は、マウスにおいて実験的 BP を誘発する必須因子であることが示された。
- ⑤ Passive transfer では、顕微鏡的に表皮下水疱が見られ、DEJ に IgG の沈着を認めた。BPAG1e に対する抗体が、*in vivo* で表皮下水疱を引き起こすことが示された。
- ⑥ 負傷マウス群では重症度と罹患率が非負傷マウス群に比べて有意に高かった。創傷が BP 発症の誘因となることが示された。

【考察】

本研究では、BPAG1e-C タンパクで免疫された脾細胞を *Rag2*^{-/-}マウスに移植することで実験的 BP モデルマウスを作成、抗 BPAG1e 抗体が BP 発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。抗 BPAG1e 抗体は、自己免疫性水疱症発症後のエピトープ拡散に起因すると考えられ、病原性については懐疑的であったが、本研究の結果から、抗 BP180 抗体による BP とは異なる機序で生じる、抗 BPAG1e 抗体による BP が存在することを証明した。

細胞内タンパクである BPAG1e はリンパ球や抗体によって認識されにくいと考え、BPAG1e を抗原として細胞外に曝露することを目的に、マウス背部皮膚に外傷を加えたところ、BP 発症率、重症度が有意に上昇することを確認した。この結果より、BPAG1e の細胞外曝露が脾細胞や抗体による認識を誘導し、最終的に BP 様症状が誘発・悪化したと思われる。外傷を含む物理的要因が組織破壊を引き起こし、自己免疫反応を促進、誘導する可能性が示唆された。

【結論】

BPAG1e の C 側部分に対する抗体が DEJ に結合し表皮下水疱を引き起こすこと、および外傷を含む外的要因が BP 発症の誘因となることを確認した。今後の BP の研究に大きく寄与する発見であると考ええる。