80. 自己抗原特異的 TCR を発現する水疱症モデル動物の樹立

氏家　英之

北海道大学 大学院医学研究院 皮膚科学教室

Key words：水疱性類天疱瘡，T 細胞受容体，17 型コラーゲン（COL17），T 細胞株，ノックインマウス

緒　言

水疱性類天疱瘡（BP）（図 1 左）は、表皮基底膜部の構成タンパクである 17 型コラーゲン（COL17、BP180）（図 1 右）に対する自己抗体により発症する最も頻度の高い自己免疫性水疱症で、厚生労働省の指定難病となっている。筆者が筆頭著者としてまとめた類天疱瘡診療ガイドライン [1] に治療アルゴリズムが記載されているように、中等症以上の BP の治療は長期間のステロイド内服が基本であり、多くの患者は様々な副作用に苦しんでいる。過去の研究により、BP の自己抗体産生には自己反応性 T 細胞の働きが重要と考えられているが、COL17 反応性 T 細胞の病原性は未だ明らかになっていない。

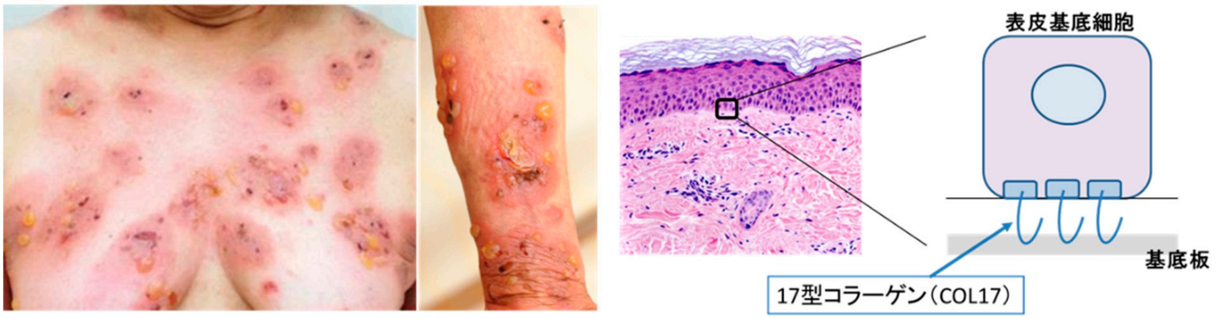

図 1．水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid：BP）

（左）臨床像。体幹四肢に浮腫性紅斑と緊満性水疱が多発している。

（右）自己抗体の標的抗原である 17 型コラーゲン（COL17）の局在。表皮基底細胞と真皮を結合している。

我々のグループは、皮膚でヒト COL17 を発現する遺伝子改変マウス（COL17 ヒト化マウス）を作製し、BP 患者 IgG 自己抗体を投与すると水疱が形成される BP モデルを確立した [2]。我々は、大人の COL17 ヒト化マウスを用いて持続的に抗 COL17 抗体を産生するアクティブ BP マウスモデルを作製し、その抗体産生は $CD4^{+}$T 細胞依存性であることを報告した [3]。また、そのマウスモデルを用いて、COL17NC16a 領域に反応する T 細胞に病原性があることを明らかにした [4]。更に、制御性 T 細胞（Treg）の機能異常によって Stat6 依存性に濾胞性ヘルパーT 細胞（follicular helper T：Tfh）が活性化し、その結果マウスやヒトに BP 自己抗体が誘導されることを示した [5]。以上より、マウスモデルにおいて BP 自己抗体の産生に COL17 反応性 T 細胞が重要な役割を果たしていることは明らかである。

BP 患者において、COL17 反応性 T 細胞の存在が報告されており [6]、マウスのみならずヒトにおいても抗 COL17 抗体産生において $CD4^{+}$T 細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、これまで COL17 反応性 T 細胞株は樹立されていないため病態機序については不明であった。我々は最近、マウスに COL17 タンパクで免疫し、そのマウスのリンパ球を *in vitro* で刺激することで（図 2）5 株の COL17 反応性 T 細胞株の樹立に成功した。T 細胞株の病原性を評価したところ（図 3）、3 つの株で病原性がみられ、2 つの株で病原性が見られなかった [7]。

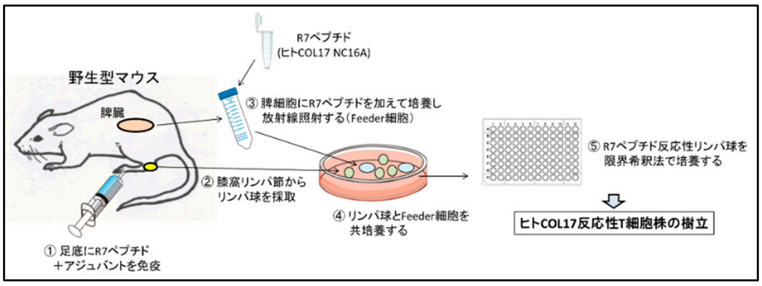

図 2. ヒト COL17NC16A 反応性 T 細胞株の樹立
マウスの足底に COL17 タンパク（R7 ペプチド）を免疫し、リンパ節から
リンパ球を採取して培養した。

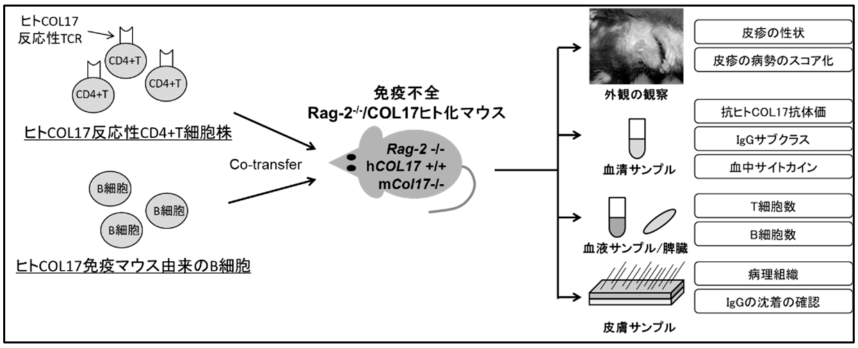

図 3. 樹立したヒト COL17NC16A 反応性 T 細胞株の病原性の評価
作製した T 細胞株と R7 ペプチドで免疫したマウスの B 細胞を共移入し、
皮疹や抗体価を評価した。

同じく自己免疫性水疱症である「天疱瘡」に関しては、マウスのデスモグレイン 3（Dsg3）反応性 CD4$^+$T 細胞株を用いた研究により、Dsg3 反応性 CD4$^+$T 細胞が抗 Dsg3 産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった［8］。また、Dsg3 反応性 CD4$^+$T 細胞が抗体産生を誘導すること、および細胞性免疫として interface dermatitis を誘導することが示された［9］。これらの結果は、抗原特異的 T 細胞株の樹立が、自己免疫の研究推進において非常に有用であることを明確に示している。

本研究の目的は、我々が樹立した COL17 反応性 T 細胞株の T 細胞受容体（TCR）の遺伝子配列を明らかにし、その配列を持つノックインマウスを作製することで新規 BP マウスモデルを樹立することである。本モデルは様々な実験に応用可能であり、BP 特異的な新規治療法の開発に資する研究ツールとなる。

方法および結果

移入後のレシピエントに皮膚症状が有る 3 株の T 細胞を「病原性 T 細胞」とし、皮膚症状がない 2 株の T 細胞を「非病原性 T 細胞」とする。これらの T 細胞から移入前に Total RNA を抽出し、Bulk の TCR レパトア解析を行った。その結果、病原性 T 細胞株のうち 2 株は全く同じ TCR の遺伝子再構成を起こしていた（表 1 のうち赤枠の#1-4-10 と#1-4-20）。また非病原性 T 細胞のうち 2 株も全く同じ TCR の遺伝子再構成を起こしていた（表 1 のうち青枠の#3-4-B2 と#3-4-E10）。病原性 T 細胞の TCR 2 種類、非病原性 T 細胞の TCR 1 種類の配列を人工遺伝子合成した。この人工遺伝子を pMXs ベクターに載せ換えを行った。この pMXs を感染させる T 細胞セルラインとして、TG40（TG40 は TCR 遺伝子を欠損している T 細胞株）と NFAT-GFP（TCR シグナルの下流にある NFAT に GFP が融合されており、TCR シグナルで活性化すると GFP 蛍光で同定することができる T 細胞株）を共同研究者より供与いただいた。レトロウイルスを感染させて、TCR の発現を確認した（図 4）。

表 1. 樹立したヒト COL17NC16A 反応性 T 細胞株の TCR の RNA シークエンス結果

clone	#1-4-10		#1-4-20		#2-14-4		#3-4-B2		#3-4-E10	
TCR	alpha	beta	alpha	beta	alpha	beta	alpha	beta	alpha	beta
V-region	TRAV7-2	TRBV14	TRAV7-2	TRBV14	TRAV13-1	TRBV1	TRAV3-3	TRBV26	TRAV3-3	TRBV26
D-region						TRBD1		TRBD1, TRBD2		TRBD1, TRBD2
J-region	TRAJ21	TRBJ2-4	TRAJ21	TRBJ2-4	TRAJ40	TRBJ1-1	TRAJ23	TRBJ1-6	TRAJ23	TRBJ1-6
CDR3 aa sequence	CAARSN YNVLYF	CASSLG SQNTLY F	CAARSN YNVLYF	CASSLG SQNTLY F	CAPNT GNYKY VF	CTCSA RTGNT EVFF	CAVSPY NQGKLI F	CASSLG RDHNSP LYF	CAVSPY NQGKLI F	CASSLG RDHNSP LYF

赤枠は病原性 T 細胞株の TCR 配列を、青枠は非病原性 T 細胞株の TCR 配列を示している。

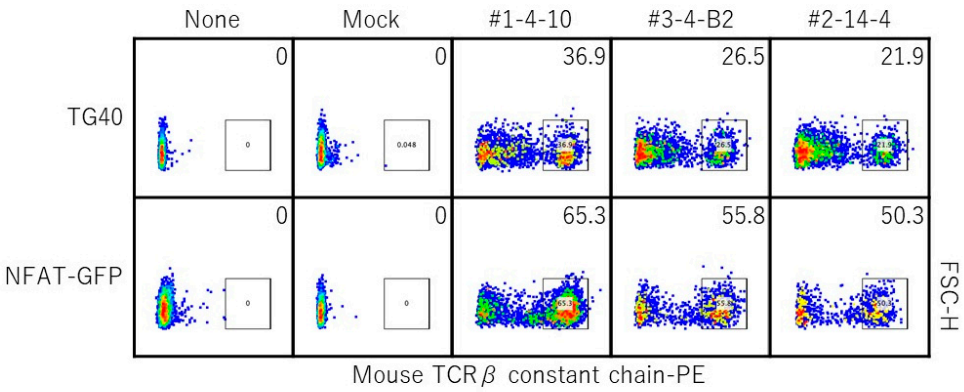

図 4. フローサイトメトリーによる T 細胞セルラインへの TCR 導入の確認
図内の四角は TCR 導入に成功した T 細胞の割合を示している。

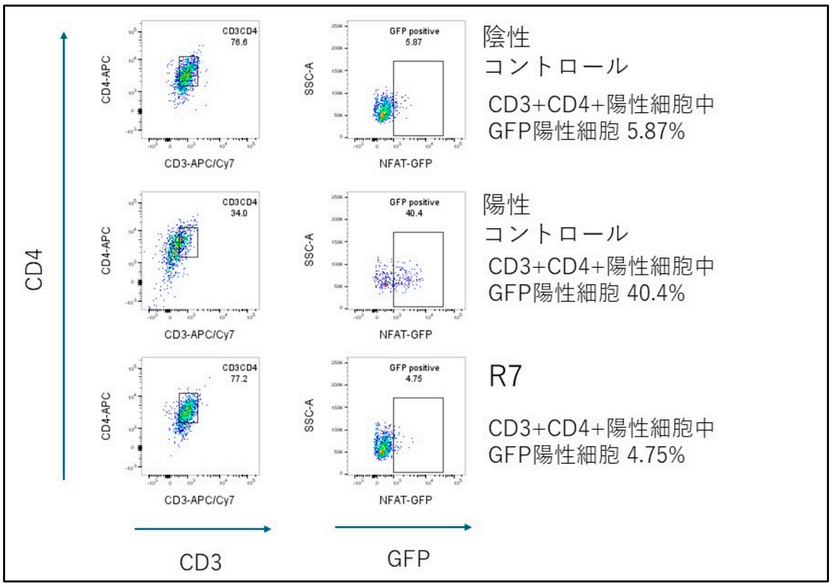

図 5. フローサイトメトリーによる R7 ペプチド刺激による NFAT-GFP の活性化確認
GFP 陽性細胞の割合は、R7 刺激群と陰性コントロールで差がみられていない。

以後の評価系としてフローサイトメトリーでの T 細胞活性化の評価ができる点から NFAT-GFP の細胞を使用することとした。R7 ペプチドで NFAT-GFP を刺激したが、陰性コントロールと差がなかった（図 5）。また同様にサイミジン取り込み試験を施行したが、陰性コントロールも値が高く十分な差を認めなかった。以上より、#1-4-10 の TCR をトランスフェクションした NFAT-GFP は、R7 ペプチド刺激に反応しないことが示された。

原因究明のため、トランスフェクションに使用した pMXs プラスミド内の TCR の配列を制限酵素部位を含むようにシークエンスしたところ、TCR に変異が入っていることが確認された（図 6)。現在このプラスミドの全長をシークエンスし、変異の有無について再確認している。

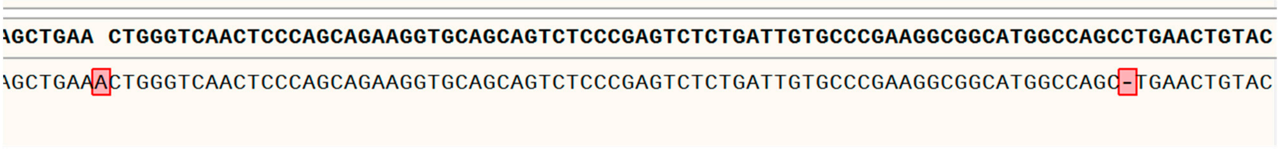

図 6. NFAT-GFP に導入した TCR のサンガーシークエンス結果

赤枠は変異の見られた遺伝子を示している。

細胞株作製と同時に、#1-4-10 と#3-4-B2 の TCR をノックインしたマウスを作製することとした［10]。TCR は TCR β 鎖と α 鎖を P2A でつなぎ、ホストのマウスの内在性の TCR α 鎖の C 領域に組み込むようにデザインした（図 7)。これにより TCR α 鎖はノックアウトされる。デザインした TCR を人工遺伝子合成で作製し、ゲノム編集をマウス受精卵に施行し F0 を得た。

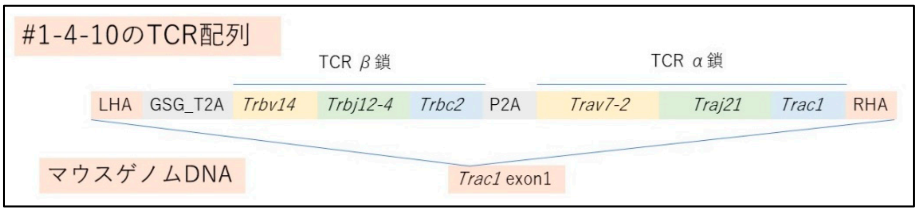

図 7. ノックインマウス作製のための TCR 設計のストラテジー

TCR β 鎖と α 鎖を P2A でつなぎ、ホストのマウスの内在性の TCR α 鎖の C 領域に組み込むようにデザインした。

これらのマウスを図 8 に示したようにプライマー設計して、TCR が導入されたマウスかどうかを確かめた。

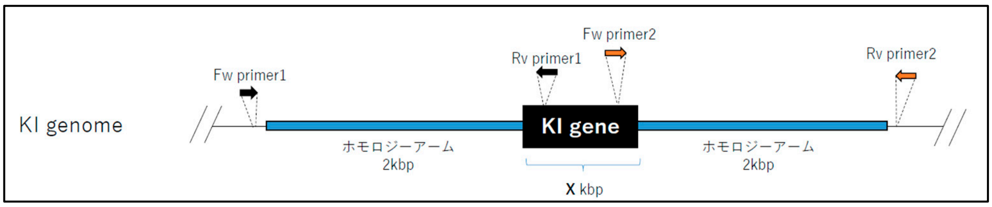

図 8. ノックインの成功を確認するためのプライマー設計

KI gene の 5'末端と 3'末端を読むプライマー（計 2 セット）を設計した。

例えば 1、2 のマウスには TCR がノックインされており、3 のマウスにはノックインされていなかった(図 9)。はっきりと PCR でバンドを認めたマウスのみを現在当施設の動物施設で検疫中である。TCR β 鎖は内在性のものが発現するので、TCR β ノックアウトマウスと交配させることで、目的の TCR のみを発現するマウスを作製する予定である。

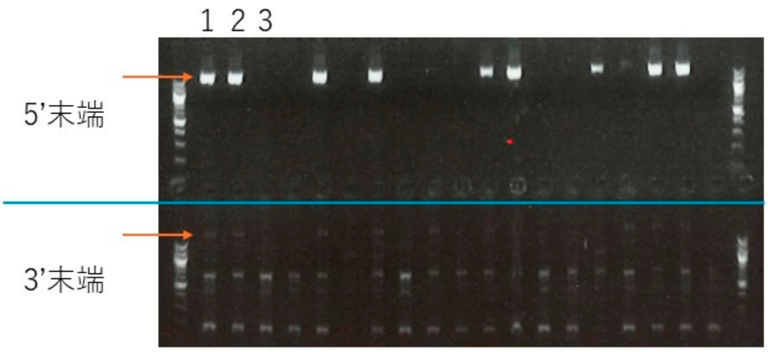

図 9. ノックインを確認するための Genotyping 目的の PCR の電気泳動結果
赤矢印は目的のバンドを示している。

考　察

本研究では、我々が樹立したCOL17反応性T細胞株のTCRの遺伝子配列を明らかにし、その配列を持つT細胞ハイブリドーマとノックインマウスを作製することを試みた。COL17反応性T細胞株のTCRの遺伝子配列を確認した際に、2回の実験で得られた細胞株のTCRの遺伝子再構成のパターンが全く同じであり、本研究で得られたTCR配列のCOL17NC16aのR7への反応性は確かなものであると考える。T細胞ハイブリドーマは組換え時に変異が導入された可能性が高く、変異を修正することで目的の配列を持ったT細胞ハイブリドーマを得ることが可能と考える。今後、改めてR7ペプチドでの刺激実験を再開する予定である。またTCRのノックインマウスは最新のゲノム編集により作製した。PCRでは問題なくノックインを確認できており、今後の新規BPマウスモデルの樹立に使用する予定である。以上より、本研究では、当初の目的の大部分を達成できたと考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の水上拓哉、片山奨、椎谷千尋、葭本倫大、村松憲である。また、本研究の実施にあたり T 細胞株を供与頂いた熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター感染予防部門感染免疫学分野の本園千尋准教授、ならびに大阪大学免疫学フロンティア研究センター微生物病研究所免疫化学分野の荒瀬尚教授に深謝いたします。

文　献

1） 氏家英之ほか, 類天疱瘡（後天性表皮水疱症を含む）診療ガイドライン. 日本皮膚科学会雑誌 2017 127:1483-1521.
2） Nishie W, et al. Humanization of Autoantigen. Nat Med 2007 Mar;13(3):378-83. PMID: 17322897 DOI: 10.1038/nm1496
3） Ujiie H, et al. A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. J Immunol 2010 Feb 15;184(4):2166-74. PMID: 20089696 DOI: 10.4049/jimmunol.0903101
4） Ujiie H, et al. Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. Clin Immunol 2012 Feb;142(2):167-75. PMID: 22044750 DOI: 10.1016/j.clim.2011.10.002

5) Muramatsu K, et al. Regulatory T-cell dysfunction induces autoantibodies to bullous pemphigoid antigens in mice and human subjects. J Allergy Clin Immunol 2018 Dec;142(6):1818-1830.e6. PMID: 29704593 DOI: 10.1016/j.jaci.2018.03.014
6) Thoma-Uszynski S, et al. Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230. J Immunol 2006 Feb 1;176(3):2015-23. PMID: 16424234 DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.2015
7) Yoshimoto N, et al. Type XVII collagen-specific CD4+ T cells induce bullous pemphigoid by producing IL-5. J Invest Dermatol, in press. PMID: 39326663 DOI: 10.1016/j.jid.2024.08.026
8) Takahashi H, et al. Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. J Immunol 2008 Jul 15;181(2):1526-35. PMID: 18606708 DOI: 10.4049/jimmunol.181.2.1526
9) Takahashi H, et al. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. J Clin Invest 2011 Sep;121(9):3677-88. PMID: 21821914 DOI: 10.1172/JCI57379
10) Moosmann C et al. Orthotopic T-cell receptor replacement in primary human T cells using CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair. STAR Protoc. 2021 Dec 14;3(1):101031. PMID: 34977677 DOI: 10.1016/j.xpro.2021.101031