

17790589

厚生省 特定疾患対策事業

疾病モデルの開発研究班

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者：天 谷 雅 行

(慶應義塾大学医学部皮膚科)

厚生省 特定疾患対策事業

疾病モデルの開発研究班

平成 11 年度研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 天谷雅行

(慶應義塾大学医学部皮膚科)

班員構成

区分	氏名	所属	職名
班長	天谷雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師
班員	西川武二	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授
	田中 勝	慶應義塾大学医学部皮膚科	助教授
	小安重夫	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授
	鈴木春巳	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師

(事務局) 永富万里子
〒160-8582
東京都新宿区信濃町 35
慶應義塾大学医学部皮膚科
tel 03-3353-1211 ex 2411
fax 03-3351-6880
e-mail: nagatomi@med.keio.ac.jp

疾病モデルの開発に関する研究

主任研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

本研究は、新しい発想法から自己免疫モデルマウスを作成する。すなわち、自己抗原ノックアウトマウスが自己抗原に対し免疫寛容が成立していない事実を利用し、抗原で自己抗原ノックアウトマウスを免疫した後にそのリンパ球を野生型のマウスに移植することにより、抗原特異的に自己免疫反応を誘導し、自己免疫モデルを作成する。本法は、様々な新しい自己免疫モデルが作成されるだけでなく、分子機能の解析にも新しい方法論を与えるものと期待され、ノックアウトマウスの新しい解析法をも提示するものである。

分担研究者

西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科教授

田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科助教授

小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物学教授

鈴木春巳 慶應義塾大学医学部微生物学専任講師

A. 研究目的

本年度は、自己免疫性水疱性疾患である天疱瘡に焦点を絞り、標的抗原であるデスマグレイン3ノックアウトマウス (Dsg3^{-/-}) を用いて、天疱瘡モデルマウスを作成することにある。Dsg3^{-/-}マウスに、バキュロウイルス発原系で作成した組換え抗原蛋白 (rDsg3) を免疫し、Dsg3 の表皮細胞間接着能を阻害する病的活性を持った抗 Dsg3 抗体を誘導する。さらに、そのマウスの T・B 細胞を Dsg3^{+/+}または Dsg3^{+/-}マウスに移入することにより、天疱瘡様病変を有する動物実験モデルを作成する。

B. 研究方法

(1) マウス Dsg3 組換え蛋白の作成 マウスケラチノサイト cDNA ライブラリーより PCR クローニングする。得られた cDNA を、バキュロウイルストランスファーベクターにサブクローニングし、バキュロウイルス発原系にて分泌型の蛋白として産生させる。C末に挿入した His-tag により、Ni-NTA カラムにて細胞培養液中より精製する。

(2) Dsg3^{-/-}マウスのコロニー作成

Dsg3 ノックアウトマウスの雌雄ヘテロ接合体 (+/-) を mating させる事により、Dsg3 (-/-) マウスのコロニーを作成する。

(3) Dsg3^{-/-}マウスへの Dsg3 組換え蛋白による免疫

作成されたマウス Dsg3 組換え蛋白を抗原として、8週令の Dsg3^{-/-}マウスに免疫する。Dsg3^{-/-}

マウスでは Dsg3 に対する免疫寛容がないため、Dsg3 の各種エピトープに関する抗体が容易に得られると考えられる。

(4) 免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞の Rag-2^{-/-}マウスへの移植

Dsg3 の発現があり、移植脾細胞を拒絶することがない Rag-2^{-/-}マウスに、免疫 Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を移植する。移植後、レシピエントマウス内での血中抗体を ELISA 法にて検出するとともに、粘膜及び皮膚を病理組織学的、免疫組織学的に検討し、天疱瘡の表現型の有無を解析する。

C. 研究結果

(1) マウス Dsg3 組換え蛋白の作成

マウスケラチノサイト cDNA ライブラリーをテンプレートとして、マウス Dsg3 の塩基配列をもとにプライマーを設定し、PCR クローニングした。得られた cDNA を、バキュロウイルストランスファーベクターにサブクローニングし、バキュロウイルス発原系にて分泌型の蛋白として産生させた。C末に挿入した His-tag により、Ni-NTA カラムにて細胞培養液中より精製した。純度の高いマウス Dsg3 組換え蛋白が得られた。

(2) Dsg3^{-/-}マウスへの Dsg3 組換え蛋白による免疫

作成されたマウス Dsg3 組換え蛋白 (mrDsg3) を抗原として、8週令の Dsg3^{-/-}マウスに免疫した。免疫のプロトコールは、マウス 1匹当たり 10ug の組換え蛋白を初回 Freund 完全アジュバンドで皮下に免疫し、以後 1週毎に 10ug の組換え蛋白と Freund 不完全アジュバンドで 3回免疫する。4回目の免疫終了 1週後に、血中のマウス Dsg3 に対する抗体価を ELISA 法にて測定する。Dsg3^{-/-}マウスでは Dsg3 に対する免疫寛容がないため、in vivo の状態で Dsg3 に結合できる抗体が産生された。マウス培養ケラチノサイト PAM212 細胞の培養液中に、マウス血清を加えると、ケラチノサイト膜表面にある Dsg3 に結合していることが確認された。

(3) Dsg3^{-/-}免疫マウス脾細胞の Dsg3⁺マウスへの移植

Dsg3 を免疫した Dsg3^(-/-)マウス体内では Dsg3 に対する抗体が産生されることが証明された。そこで、表皮に Dsg3 の発現が見られる Rag-2 ノックアウトマウスに、免疫した Dsg3 ノックアウトマウスの脾細胞を移植した。

Rag-2 ノックアウトマウスは、B細胞、T細胞受容体の組換えができないため、成熟したT細胞、B細胞が認められず、免疫不全状態を呈する。従って移植された脾細胞を拒絶する事は無い。

移植後、4-7日後に、レシピエントマウス内に Dsg3 に対する抗体の産生が検出された。その後、抗体価は2日後にほぼピークに達し、6ヶ月以上に渡り抗体産生が持続的に認められた。マウスの、皮膚、口腔粘膜、食道などの重層扁平上皮の細胞膜には、移植された免疫担当細胞により産生された抗マウス Dsg3 抗体の沈着が確認された。さらに、それらの抗体により、表皮及び粘膜上皮の細胞間接着が障害され、天疱瘡に特徴的な病理学的所見である基底層直上での裂隙形成 (suprabasilar acantholysis) が認められた。また、抗体産生が明らかになる移植7日後以降には、レシピエントマウスの体重減少も認められた。これは、口腔内に広範囲に認められたびらんにより、摂食障害が生じたためと思われる。さらに、一部のレシピエントマウスでは、鼻周囲の通常ひっかく部位に一致して痂皮を伴うびらんを認めた。これは、天疱瘡患者で観察されるニコルスキー現象と考えられ、表皮細胞間の接着が通常より弱くなっているために、搔破によりびらんが生じるためと思われる。

D. 考察

従来の自己免疫疾患モデル動物では、自己抗原を強制的に多量投与する事により免疫応答を破綻させ、自己抗原に対する免疫応答を引き起こさせるタイプのものが主流であった。本研究では視点を変え、特異的な抗原蛋白を遺伝的に欠失した変異マウスがその抗原に対して免疫寛容にならない事実を利用している。本研究の特色は、自己寛容破綻による自己免疫発症メカニズムを、このように従来にない作製方法にて作成した自己免疫モデルマウスを使用して解明する点にある。また、この系は、免疫系全般には異常を認めないにもかかわらず、抗原特異的に免疫寛容が破綻しているため、臓器特異的自己免疫疾患のモデルとして優れている。本研究の成果は、自己免疫疾患の発症メカニズムの理解に大きく貢献するばかりでなく、今後期待される疾患特異的治療法の開発にも貢献する意義深

いものである。

E. 結論

本研究で作成されたマウスは、臨床的、病理学的、免疫学的にも、天疱瘡の特徴的な所見を有するマウスモデルである。同マウスモデルは、持続的抗体産生が認められる初めてのマウスモデルである。本研究で作成された天疱瘡モデルマウスは、自己抗体産生機序の解明に役立つばかりでなく、疾患特異的治療法の開発に重要な道具となる。

F. 研究発表 (平成 11 年 4 月から平成 12 年 3 月)

英語論文 29 編

1. Proby C, Fujii Y, Owaribe K, Nishikawa T, Amagai M. Human autoantibodies against HD1/plectin in paraneoplastic pemphigus. *J Invest Dermatol* 1999;112:153-156.
2. Lenz P, Amagai M, Volc-Platzer B, Stingl G, Kimbauer R. Desmoglein3 - ELISA: A pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool. *Arch Dermatol* 1999;135:143-148.
3. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999;140:351-357.
4. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:167-170.
5. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger KL, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanation for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:461-468.
6. Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS. The new pemphigus variants. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(5):649-671.
7. Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci*

- 1999;20:92-102.
8. Ishii K, Amagai M, Komai A, Ebihara T, Chorzelski TP, Jablonska S, Ohya K, Nishikawa T, Hashimoto T. Desmoglein 1 and desmoglein 3 are the target autoantigens in herpetiform pemphigus. **Arch Dermatol** 1999;135:943-947.
 9. Morita E, Amagai M, Tanaka T, Horiuchi K, Yamamoto S. A case of herpetiform pemphigus coexistent with psoriasis vulgaris. **Br J Dermatol** 1999;141(4):754-755.
 10. Gomi H, Kawada A, Amagai M, Matsuo I. A case of classic pemphigus erythematosus : detection of anti-desmoglein 1 antibody by ELISA. **Dermatology** 1999;199(2):188-189.
 11. Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, Shirai T, Inoko H. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. **Tissue Antigens** 1999;54:333-340.
 12. Seitz CS, Staegemeir E, Amagai M, Rose C, Braker EB, Zillikens D. Herpetiform pemphigus with an autoimmune response to recombinant desmoglein 1. **Br J Dermatol** 1999;141(2):354-355.
 13. Chorzelski TP, Hashimoto T, Amagai M, Sysa-Jedrzejowska A, Choczaj A, Nousari HC, Anhalt GJ, Jablonska S. Paraneoplastic pemphigus with clinical and serological features of pemphigus foliaceus. **Br J Dermatol** 1999;141(2):357-359.
 14. Chorzelski T, Hashimoto T, Maciejewska B, Amagai M, Anhalt GJ, Jablonska S. Paraneoplastic pemphigus (PNP) associated with Castleman tumor, myasthenia gravis and bronchiolitis obliterans. **J Am Acad Dermatol** 1999;41(3):393-400.
 15. Gooptu C, Mendelsohn S, Amagai M, Hashimoto T, Nishikawa T, Wojnarowska F. Unique immunobullous disease in a child with a predominantly IgA response to three desmosomal proteins. **Br J Dermatol** 1999;141(5):882-886.
 16. Seishima M, Iwasaki-Bessho Y, Itoh Y, Nozawa Y, Amagai M, Kitajima Y. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. **Arch Dermatol Res** 1999;291(11):606-613.
 17. Suzuki H, Guinter TI, Koyasu S, and Singer A: Positive selection of CD4⁺ T cells by TCR-specific antibodies requires low valency crosslinking: Implications for repertoire selection in the thymus. **Eur J Immunol** 28. 3252-3268, 1998
 18. Suzuki H, Terauchi Y, Fujiwara M, Aizawa S, Yazaki Y, Kadowaki T and Koyasu S: Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. **Science** 1999, 283:390-392.
 19. Terauchi Y, --17 authors, -- Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y and Kadowaki T: Increased insulin sensitivity and hypoglycemia in mice lacking the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. **Nature Genet.** 1999, 21:230-235.
 20. Matsuda S, Minowa A, Suzuki S and Koyasu S: Differential activation of JNK and p38 pathways during FTY720 induced apoptosis of T lymphocytes that is suppressed by ERK pathway. **J Immunol** 1999, 162:3321-3326
 21. Ohteki T, Maki C, Koyasu S, Mak TW and Ohashi PS: Requirement of LFA-1 for liver NKT cell development: evidence for heterogenous origin of liver NKT cells. **J Immunol** 1999, 162:3753-3756.
 22. Ohteki T, Fukao T, Suzue K, Maki C, Ito M, Nakamura M and Koyasu S: Interleukin-12 dependent interferon- γ production by CD8⁺ lymphoid dendritic cells. **J Exp Med** 1999, 189:1981-1986.
 23. Proby CM, Ohta T, Suzuki H, Koyasu S, Gamou S, Shimizu N, Wheelock MJ, Nishikawa T, Amagai M. Development of chimeric molecules for recognition and targeting of antigen-specific B cells in pemphigus vulgaris. **Br J Dermatol** 2000(in press).

24. Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T. Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) Assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. **J Invest Dermatol** 2000;114(1):88-94.
25. Miyagawa S, Amagai M, Iida T, Muramatsu T, Yamamoto Y, Nishikawa T, Shirai T. Late development of anti-desmoglein 1 antibodies in pemphigus vulgaris: correlation with disease progression. **Br J Dermatol** 2000:in press.
26. Karpati S, Amagai M, Li LW, Dochmowski D, Hashimoto T, Horvath A. Identification of desmoglein 1 as autoantigen in a patient with intraepidermal neutrophilic type of IgA pemphigus. **Exp Dermatol** 2000:in press.
27. Nie Z, Ning W, Amagai M, Green KJ, Hashimoto T. C-terminus of desmoyokin/AHNAK protein is responsible for its translocation between the nucleus and cytoplasm. **J Invest Dermatol** 2000:in press.
28. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen knockout mice to develop an active autoimmune disease model of pemphigus. **J Clin Invest** 2000;105 : 625-631.
29. Ishii K, Amagai M, Ohata Y, Shimizu H, Hashimoto T, Ohya K, Nishikawa T. Development of pemphigus vulgaris in a patient with pemphigus foliaceus: Confirmation of anti-desmoglein antibody profile shift by ELISA. **J Am Acad Dermatol** 2000:in press.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 1 件
自己免疫疾患モデル動物
(特願平 11-91408)

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業
分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスの病理学的検討
分担研究者 田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科助教授

新たな手法で開発された天疱瘡モデルマウスの病理学的特徴を明らかにし、天疱瘡(PV)病変の形成機序をより詳細に検討するため、抗デスマグレイン 3 自己抗体により表現型が誘導される同モデルマウスと、遺伝子を欠損することにより同様の表現型を呈することが知られているデスマグレイン 3 ノックアウトマウスを病理学的に詳細に比較検討した。両者の間に有意な所見の差が見られなかったことより、PV の病変は自己抗体によるデスマグレイン 3 の直接的機能障害により生じることが示された。

研究協力者

大山 学 慶應義塾大学医学部皮膚科助手

A. 研究目的

本研究の目的は本研究により新たに作成された天疱瘡 (PV) モデルマウスとデスマグレイン(Dsg) 3 ノックアウト (KO) マウスを病理組織学的に比較検討する事により、モデルマウスの病理学的特徴を明らかにするとともに、抗 Dsg3 自己抗体が沈着してからの各種免疫応答の PV 病変の形成への関与の仕方を明らかにすることである。

B. 研究方法

PV モデルマウス、KO マウス、ともに全身の表皮を剥離し短冊状に約 1.5mm 幅に裁断し連続 HE 切片を作製した。主要臓器も摘出し同様に標本を作製。頭部、陰部、四肢については脱灰の後、薄切切片を作製し詳細に観察した。また、両マウスの表現型の特徴である脱毛現象の解明のため、脱毛部については、特に PV モデルマウスにおいては HE 標本のみならず局所への免疫グロブリンの沈着を免疫蛍光抗体法を用いて毛周期ごとに検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って遂行され本研究の申請内容は、慶應義塾大学医学部動物実験委員会により、動物福祉の精神に則った適正な計画であることが承認されている。(承認番号 990014)

C. 研究結果

KO マウス、PV マウスとも鼻部、耳部、四肢末端などの皮膚、口腔粘膜などに PV と同様の棘融解の所見を認めた。これらの所見に両マウス間での大きな差はなかった。また、両マウスにおいて毛周期のうち休止期の毛嚢に棘融解による脱毛の所見が得られ、PV マウスにおいては同部に免疫グロブリンの沈着を認めた。沈着する免疫グロブリンの量には、毛嚢間で差が認められた。

D. 考察

KO マウスと PV マウスの違いは、前者ではデスマグレイン 3 を欠く一方で、後者は特異的な自己抗体によりデスマグレイン 3 の機能を障害している点である。両者の間で、皮膚、粘膜、毛嚢の棘融解所見の分布、程度に病理組織学的有意差がなかったことは、PV 病変の形成には補体の活性化、細胞浸潤などの、自己抗体が沈着した後に生じる免疫学的応答の関与が重要でないことを示唆していると考えられる。

また、毛周期特異的に棘融解による脱毛現象を認めたことからデスマグレイン 3 の毛髪のアンカリングに果たす役割が各毛周期ごとに異なる可能性があると考えられる。

E. 結論

両マウスの病理学的検討より PV の病変は自己抗体によるデスマグレイン 3 の直接的機能障害により生じることが示された。

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業
分担研究報告書

モデルマウスを用いた病的活性を持つモノクローナル抗体の作成に関する研究
分担研究者 西川 武二 慶應義塾大学医学部皮膚科教授

天疱瘡は自己免疫性の水疱形成疾患で、自己抗体の解析は重要である。そのためには病原性を有し、実際に天疱瘡を発症するモノクローナルな抗体が必要である。そこで、本研究では尋常性天疱瘡モデルマウスの脾細胞から細胞融合により、モノクローナル抗体を作成する。得られたモノクローナル抗体の反応特異性、エピトープ、病的活性の有無の検討を行った。

研究協力者

角田和之 慶應義塾大学医学部皮膚科助手

A、研究目的

天疱瘡 (PV) モデルマウスの脾細胞の細胞融合による病原性を有するモノクローナル抗体の作成する。

B、研究方法

PVモデルマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞をポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。得られたハイブリドーマを、マウスDsg3を抗原として用いたELISA法にて1次スクリーニングし、陽性クローンを培養マウス角化細胞、PAM212を用いたliving cell stainingで2次スクリーニングを行った。得られた抗体の抗原特異性を調べるために、マウス口蓋粘膜およびヒト皮膚を基質とした間接蛍光抗体法を行った。さらに病原性を確認するために新生マウスへの移入及びハイブリドーマの免疫不全マウスへの移植を行った。

本研究で用いられるマウスはすべてSPF環境において飼育され、オートクレーブしたケージ、床敷、水、さらにγ線照射した飼料を用い、アレタウン社製のマイクロベントシステムによる管理下で飼育される。全ての動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って遂行され、本研究の申請内容は、慶應義塾大学医学部動物実験委員会により、動物福祉の精神に則った適正な計画であることが、承認されている。

C、研究結果

現段階で3クローン(1AK,7AK,9AK)のモノクローナル抗体を作成した。すべて重鎖はIgG 1、軽鎖はカッパであった。間接蛍光抗体法では7AK,9AKがマウスに特異的であった。マウスDsg1、ヒトDsg3、Dsg1を抗原に用いたELISAでは7AK,9AKがマウスDsg3に特異的であった。新生マウスへの移入および免疫不全マウスへのハイブリドーマ細胞の移植では、明らかな病変の形成はみられなかった。

D、考察

天疱瘡は自己免疫性の水疱形成疾患で、その発症には自己抗体が関与している。最近我々が開発したPVモデルマウス中にはDsg3に対する特異的な自己抗体が存在する。そのモデルマウスの脾細胞を細胞融合する事により病原性を有するモノクローナル抗体を効率よく作成出来ると考える。現段階では明らかな病原性の誘導は証明されていないが、天疱瘡の発症にはポリクローナルな抗体が関与しているという説もあり、新生マウスの実験ではさらにクローンの数を増やし、それらを組み合わせた移入実験などが必要と考えられる。

E、結論

現段階で1AK,7AK,9AKのモノクローナル抗体を作成した。7AK,9AKはin vivoの状態では反応する抗体であった。今後さらにクローンの数を増やす必要があると考えられた。

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業
分担研究報告書

天疱瘡抗原 3 次元エピトープの解析に関する研究
主任研究者 天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

天疱瘡抗原デスマグレイン 1 (Dsg1) の 3 次元エピトープの分子上局在を検討するため、Dsg1 の細胞外領域を C 末側または N 末側から欠失させ、全体の立体構造を保つために欠失領域に相当する Dsg3 の領域を融合させた種々のスワッピング分子を作成した。PF 血清を用いて、スワッピング分子を competitor とした Competition ELISA を行なったところ、主要な三次元エピトープは N 末アミノ酸 1-161 に存在し、特にアミノ酸 25-87 の古典的カドヘリンにおいてカドヘリン分子同士の結合に直接関与する部分に重要なエピトープが存在すると考えられた。

研究協力者

関口麻衣子 慶應義塾大学医学部皮膚科

行なったところ、N 末アミノ酸 25-87 の領域にクリティカルな三次元エピトープがあると考えられた。

A. 研究目的

天疱瘡抗原デスマグレイン (Dsg1) の 3 次元エピトープの分子上局在を検討する。

D. 考察

Dsg1 のクリティカルな 3 次元エピトープは N 末アミノ酸 25-87 の領域に存在すると考えられた。Dsg1 と Dsg3 は、N 末側でより高い homology を示すことが分かっていることから、この領域において、Dsg1 と Dsg3 の間で homology を持たないわずかなアミノ酸を置換する Site-directed mutagenesis を施行し、その抗原性の変化を検討することで、さらにクリティカルなアミノ酸領域を同定することが今後必要である。

B. 研究方法

既に我々は、昆虫細胞を用いるバキュロウイルス発現系により三次元構造を持った Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域を作成しており、この Dsg1 の細胞外領域をさらに N 末 1/3、2/3、C 末 1/3、2/3 の長さに切断し、全体としての立体構造を保つために欠失領域に類似分子の Dsg3 を融合させた 4 つのスワッピング分子を作成した。これらの分子と PF 患者血清中の自己抗体とを反応後、組換え Dsg1 固相化プレートにより残存抗体を検出する Competition ELISA を施行した。さらに Dsg1 を N 末アミノ酸 1-24、1-64、1-87、26-496 (細胞外領域終末)、63-496、89-496 で切断した新たな 6 つのスワッピング分子を作成し、アミノ酸 1-161 における詳細なエピトープマッピングを行なった。

E. 結論

正しい立体構造を持ったスワッピング分子を用いることにより、PF の自己抗原である Dsg1 の主要な 3 次元エピトープは、N 末アミノ酸 1-161 に存在することが推察され、さらに詳細なエピトープマッピングを行なうことで、アミノ酸 25-87 の古典的カドヘリンにおいてカドヘリン分子同士の結合に直接関与する部分に重要なエピトープが存在すると考えられた。

C. 研究結果

Dsg1 の N 末 2/3 (アミノ酸 1-401) で 31 例中 31 例 (100%)、Dsg1 の N 末 1/3 (アミノ酸 1-161) で 31 例中 20 例 (65%) が有意に吸収された。N 末アミノ酸 1-161 のさらに詳細なエピトープマッピングを

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業
分担研究報告書

モデルマウスにおける自己抗体産生機序の解析
分担研究者 鈴木春巳 慶應義塾大学医学部微生物学専任講師

デスマグレイン 3 (Dsg3) ノックアウトマウスでは Dsg3 に対し、免疫寛容が破綻しているため Dsg3 に対して機能阻害活性を持つ抗体が産生される。しかしながら、野生型のマウスではそのような抗体産生はされない。本研究では、抗体産生にいたるには、T 細胞、B 細胞のどのレベルで免疫寛容が破綻している必要があるのかを検討する。天疱瘡モデルマウスの作成の過程において、Rag2 -/- マウスに移植するリンパ球を Dsg3 -/- T、Dsg3 +/- T および Dsg3 -/- B、Dsg3 ++ B の計 4 通りを組み合わせ、Dsg3 に対する抗体産生を検討した。機能阻害抗体産生は、Dsg3 -/- T および Dsg3 -/- B の組み合わせのみ観察された。以上より、T 細胞、B 細胞両方のレベルで免疫寛容が破綻している必要があると考えられた。

研究協力者

大田孝幸 慶應義塾大学医学部皮膚科

A. 研究目的

Dsg3 -/- マウスでは Dsg3 が存在しないため、Dsg3 を免疫することにより、Dsg3 に対する病原性を有する抗体産生が可能である。しかし野生型のマウスでは同様に免疫しても Dsg3 に対する免疫寛容のため病原性を有する抗体は産生されない。病的抗体産生に必要な免疫寛容の破綻が、T 細胞、B 細胞のどちらのレベルで起きていること重要であるか検討する。

B. 研究方法

Dsg3 -/- T、Dsg3 +/- T それぞれに対し、Dsg3 -/- B、Dsg3 ++ B の計 4 通りを組み合わせ、Rag2 -/- マウスに移入する実験を行った。T 細胞は cell sorter で 99%以上の純度で精製し、1 個体当たり 1×10^6 細胞を Rag2 -/- マウスに移植した。B 細胞は CD4/8 陰性画分より B220 陽性細胞を MACS を用い精製し、1 個体当たり 1×10^7 細胞を Rag2 -/- マウスに移植した。移植後、最大 10 回まで Dsg3 を免疫し、抗体価の推移を ELISA および PAM 細胞を用いた living cell stain により評価し、さらに天疱瘡の表現型が誘導されるか否かを検討した。

C. 研究結果

天疱瘡の表現型は Dsg3 -/- T と Dsg3 -/- B の組み合わせのみで認められ、それ以外の組み合わせでは全く誘導されなかった。また living cell stain は Dsg3 +/- T と Dsg3 -/- B の組み合わせにて、弱いながらも 2 例、陽性が認められた。

activated T Cell	B Cell	living cell stain (PAM)	phenotype
-/-	-/-	5/8	5/8
+/-	+/+	0/7	0/7
+/+	-/-	2(weak)/8	0/8
+/-	+/+	0/8	0/8

D. 考察

今回行った実験では、頻度の問題から T Cell をあらかじめ、Dsg3 を免疫している。一般的に、病的抗体産生の誘導に T 細胞の重要性が言われているが、今回の実験の結論より、T 細胞のみならず、B 細胞のレベルにおいても免疫寛容が破綻している必要があることが示唆された。

E. 結論

Dsg3 に対する抗体産生には、T 細胞、B 細胞両方において免疫寛容が破綻している必要があることが示唆された。

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業
分担研究報告書

自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫モデルの開発に関する研究
分担研究者 小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物学教室教授

天疱瘡モデルマウスをより安定に、かつより再現性高く作製するためには、Dsg3 ノックアウトマウスの遺伝的背景を均一にする戻し交配を開始した。C57BL/6 と 129/Sv の 2 種類の系統に 3 年間で 1 2 代の戻し交配を目指す。

A 研究目的

現在の天疱瘡モデルマウスの作製には、デスマグレイン 3 (Dsg3) ノックアウトマウスと rag-2 ノックアウトマウスを用いているが、本来は、rag-2 ノックアウトマウスを用いなくても同系のマウスに免疫した Dsg3 ノックアウトマウスの免疫担当細胞を移植することによってモデルマウスが出来るはずである。この理由は、Dsg3 ノックアウトマウスの遺伝的背景が均一でないために、MHC を合致させたとしてもなお、移植後の適合性に問題が残るためである。天疱瘡モデルマウスをより安定に、かつより再現性高く作製するためには、Dsg3 ノックアウトマウスの遺伝的背景を均一にすることが求められる。そこで本研究では、Dsg3 ノックアウトマウスを種々の純系マウスに戻し交配を行うことによって系統化を計り、安定したモデルマウスの作製法を検討することにある。併せて、異なる遺伝的背景を持つマウスを用いた場合の天疱瘡モデルマウスの病的解析を行うことにより、天疱瘡発症における遺伝的背景の寄与に関する情報を得ることも目的とする。

B 研究方法

C57BL/6 と 129/Sv の 2 種類の系統の背景を持つ Dsg3 ノックアウトマウスを C57BL/6 と BALB/c の 2 系統に戻し交配を行う。年間に 5 代を目標とし、3 年間で 1 2 代の戻し交配を目指す。

C 研究結果

今年度は C57BL/6 へ 2 代の戻し交配をし、現在 3 代目にはいつている。BALB/c へは 2 代目の戻し交配をしている段階である。

D 考察

C57BL/6 と BALB/c の 2 系統を選択した理由は、前者が Th1 優位の免疫反応、すなわち細胞性免疫を主とした免疫反応を有為息するのに対し、後者は Th2 反応優位に抗体生産を主とする反応を誘起するという差が明らかにされているためである。将来的に、戻し交配を終えたマウスを用いることによって Th1 反応優位な遺伝的背景をもつ場合と Th2 優位な遺伝的背景を持つ場合の発症率の差などを検討することができる。戻し交配を行っている間も 6 代目のマウスを用いてホモザイゴットを作製し、予備的な検討に入る予定である。これにはレシピエントマウスとして rag-2 ノックアウトマウスを用いる必要がなくなるか否か、遺伝的背景の差が発症率に影響を与えるかなどが含まれる。

E 結論

これまでの研究からは遺伝的背景を均一にして系統化することはモデル動物として広汎に利用されるためには必須である。我々が開発した本法は基本的にはノックアウトマウスが致死になつたり免疫系に重篤な影響が出ないかぎり、どのような場合にも応用できるため、系統化によってどのようなメリットがあるかを見極めることは極めて重要である。

平成 11 年度事業報告

平成 11 年度疾病モデルの開発に関する研究班班会議

日時：平成 12 年 2 月 16 日（水）10:00～12:30

場所：慶應義塾大学医学部新棟中会議室（新棟 11 階）

プログラム

- | | | |
|-------------|-----------------------------------|------------------------|
| 10:00 | 開会の辞 | 慶應大皮膚科 天谷雅行 |
| | 座長：西川武二 | |
| 10:05-10:20 | 自己抗原ノックアウトマウスを用いた新たなモデル動物の作成 | 慶應大微生物 鈴木春巳 |
| 10:20-10:35 | 天疱瘡モデルマウスの作成 | 慶應大皮膚科 天谷雅行 |
| 10:35-10:50 | 天疱瘡モデルマウスの病理学的検討 | 慶應大皮膚科 大山 学 |
| | 座長：小安重夫 | |
| 10:50-11:05 | モデルマウスを用いた病的活性を持つモノクローナル抗体の作成 | 慶應大皮膚科 角田和之 |
| 11:05-11:20 | 天疱瘡抗原 3 次元エピトープの解析 | 慶應大皮膚科 関口麻衣子 |
| 11:20-11:35 | モデルマウスにおける自己抗体産生機序の解析：
T細胞対B細胞 | 慶應大微生物 大田孝幸 |
| 11:35-11:50 | 班会議評価体性と来年度研究事業について | 厚生省保健医療局エイズ疾病対策課 金谷 泰宏 |
| 11:50-12:30 | 総合討論 | |
| 12:30 | 閉会の辞 | 天谷雅行 |

**Use of Autoantigen Knockout Mice to Develop an Active
Autoimmune Disease Model for Pemphigus**

Masayuki Amagai¹, Kazuyuki Tsunoda¹, Harumi Suzuki²,
Koji Nishifuji¹, Shigeo Koyasu², and Takeji Nishikawa¹

Departments of ¹Dermatology and ²Immunology
Keio University School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku
Tokyo 160-8582, Japan

Running title: Experimental pemphigus

Correspondence should be addressed to :

Masayuki Amagai, MD, PhD

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Tel:81-3-3353-1211 ex 62414, Fax:81-3-3351-6880,

E-mail: amagai@mc.med.keio.ac.jp

or

Shigeo Koyasu, PhD

Department of Immunology, Keio University School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Tel: 81-3-5363-3768, Fax:81-3-5361-7658,

E-mail: koyasu@sun.microb.med.keio.ac.jp

Abstract

The development of experimental models of active autoimmune diseases can be difficult due to tolerance of autoantigens. Knockout mice do not acquire tolerance of the defective gene product. Using knockout mice lacking desmoglein 3 (Dsg3), the target antigen of pemphigus vulgaris (PV), we established a method to generate an active disease model for this autoantibody-mediated disease. Dsg3^{-/-} mice, but not Dsg3^{+/-} littermates, produced anti-Dsg3 IgG that was able to bind the native Dsg3 when immunized with recombinant mouse Dsg3. Splenocytes from the immunized Dsg3^{-/-} mice were then adoptively transferred into Rag-2^{-/-} immunodeficient mice expressing Dsg3. Anti-Dsg3 IgG was stably produced in the recipient mice for over 6 months without further boosting. This IgG bound to Dsg3 *in vivo* and disrupted the cell-cell adhesion of keratinocytes. Consequently, the recipient mice developed erosions in their oral mucous membranes with typical histologic findings of PV. In addition, the recipient mice showed telogen hair loss, as found in Dsg3^{-/-} mice. Collectively, the recipient mice developed the phenotype of PV due to the pathogenic anti-Dsg3 IgG. This model will be valuable for developing novel therapeutic strategies. Furthermore, our approach can be applied broadly for the development of various autoimmune disease models.

Key Words: autoimmunity, tolerance, desmoglein, experimental model, Rag-2

Introduction

Self-tolerance is acquired as a result of clonal deletion or the inactivation of developing lymphocytes that are potentially harmful to the body (1-3). This prevents the immune system from reacting destructively against self components, which can lead to devastating autoimmune diseases. On the other side of the same coin, however, it is very difficult to develop experimental models for autoimmune diseases, which are pivotal for dissecting the mechanisms of tolerance and autoimmunity, as well as for developing novel therapeutic strategies. In this study, we attempted to overcome this difficulty by using autoantigen knockout mice. In these mice, self-tolerance of the defective gene product is not acquired because lymphocytes are never exposed to the target antigen during development. Adoptive transfer of lymphocytes from autoantigen knockout mice after immunization with the antigen into mice expressing the antigen should generate an autoimmune reaction in the recipient mice, thus providing an active disease model for autoimmune disease. To test this hypothesis, we employed a well-defined autoimmune disease against skin and mucous membranes, pemphigus vulgaris (PV).

PV is a life-threatening autoimmune disease of the skin and mucous membranes that is characterized histologically by blister formation due to the loss of cell-cell adhesion of keratinocytes, and immunopathologically by the presence of bound and circulating IgG directed against the cell surface of keratinocytes *in vivo* (4). Clinically, patients with PV develop widespread flaccid blisters and painful erosions, which can occur in any stratified squamous epithelium. The target antigen of PV, desmoglein 3 (Dsg3), is a transmembrane desmosomal protein that belongs to the cadherin supergene family of cell-cell adhesion molecules (5-7). Compelling evidence has

accumulated for the pathogenicity of IgG autoantibodies against Dsg3 in PV (8-12).

In this study, we developed an active autoimmune disease model of PV using mice genetically deficient in the target antigen for PV. We immunized Dsg3^{-/-} mice (13) with mouse rDsg3 and then adoptively transferred their splenocytes into Rag-2^{-/-} immunodeficient mice that express Dsg3. The recipient mice stably produced the pathogenic anti-Dsg3 IgG and exhibited the phenotype of PV. Our approach can be widely applied to develop experimental models of various autoimmune diseases.

Methods

Construction of Recombinant Mouse Dsg3 and Dsg1 Protein

A cDNA encoding the entire extracellular domain of mouse Dsg3 (GenBank U86016) was PCR amplified on a phage clone containing mouse Dsg3 cDNA as a template (a kind gift from Dr. Jouni Uitto) with the appropriate primers (5'-CCGAGATCTCCTATAAATATGACCTGCCTCTTCCCTAGA-3' and 5'-CGGGTCGACCCTCCAGGATGACTCCCCATA-3'). In the same way, a cDNA encoding the entire extracellular domain of mouse Dsg1, the autoantigen of pemphigus foliaceus, was PCR amplified on a plasmid clone containing mouse Dsg1 cDNA (a kind gift from Drs. Norihisa Matsuyoshi, John Stanley, Leena Pulkinen, and Jouni Uitto) with another pair of primers (5'-CCGAGATCTCCTATAAATATGGACTGGCACTCCTTCAGG-3' and 5'-CGGCTCGAGGTGAACGTTGTCTCCATAGAG-3'). These cDNAs were subcloned into pEVmod-Dsg3-His vector (14) in place of cDNA for human Dsg3 (pEVmod-mDsg3-His, pEVmod-mDsg1-His). Recombinant baculoproteins, mouse rDsg3 and rDsg1, were prepared as previously described (15, 16).

Mice

Dsg3^{-/-} mice were obtained from mating male Dsg3^{-/-} mice and female Dsg3^{+/-} mice (13) (Jackson Lab., Bar Harbor, ME). Dsg3^{-/-} mice have a mixed genetic background of 129/SV (H-2^b) and C57BL/6J (H-2^b) (13). Rag-2^{-/-} mice that had been backcrossed to B6.SJL-*ptpr*^c for 10 generations were obtained from Taconic (German Town, NY) (17).

ELISA

Circulating anti-Dsg3 IgG was measured with ELISA using mouse rDsg3 as a coated-antigen as previously described (14, 18). Each sample was diluted 50 fold and run in duplicate. A single serum sample obtained from a Dsg3^{-/-} mouse immunized with mouse rDsg3 was used as a positive control and serum from a non-immunized mouse was used as a negative control. ELISA scores were obtained as index value with the following formula (18):
index value = (OD₄₅₀ of sample - OD₄₅₀ of negative control) / (OD₄₅₀ of positive control - OD₄₅₀ of negative control) × 100. When the OD exceeded 2.0, the serum sample was further diluted and the index value was multiplied by the dilution factor. The ELISA scores against mouse rDsg1 were measured in the same way using rDsg1-coated ELISA plates.

Living Keratinocyte Staining

A mouse keratinocyte cell line, PAM212 (19), was incubated with mouse serum samples diluted 20-fold with DMEM containing 10% fetal calf serum at 37°C in a CO₂ incubator for 30 min. After washing with PBS, the cells were fixed with 100% methanol at -20°C for 20 min, and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse antibodies (Dako, Copenhagen, Denmark) at room temperature for 30 min. Specimens were examined under a fluorescent microscope (Nikon, Eclipse E800).

Immunization of Mice

Mice were primed by intraperitoneal injection of 5 µg of purified mouse rDsg3 in complete Freund's adjuvant on day 0, then boosted with mouse rDsg3 in incomplete Freund's adjuvant twice, and then without adjuvant twice each week. The antibody production was examined by ELISA at the indicated time.

For the adoptive transfer experiments, mice were sacrificed to prepare splenocytes 4 days after boosting with mouse rDsg3 without adjuvant at day 21.

Adoptive Transfer of Splenocytes

Splenocytes were isolated from Dsg3^{-/-} or Dsg3^{+/-} mice 4 days after boosting with mouse rDsg3 without adjuvant at day 28. Typically, the splenocytes were pooled from two immunized Dsg3^{-/-} or Dsg3^{+/-} mice and then administered to 10 Rag-2^{-/-} mice. 1×10^7 splenocytes in 500 μ l PBS per mouse were transferred to Rag-2^{-/-} mice by intravenous injection into the tail vein.

ELISPOT Assay

PVDF-bottomed 96-well multiter plates (Millipore-Amicon, Beverly, MA) were coated with 30 μ g/ml of mouse rDsg3. Mononuclear cells prepared from the peripheral blood, spleen, bone marrow, and lymph nodes of reconstructed Rag-2^{-/-} mice were incubated on the plates at 37°C in a CO₂ incubator for 4 hours. IgG bound to the membrane was visualized as spots with alkaline-phosphatase conjugated anti-mouse IgG antibodies (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA). The number of spots was counted under a dissecting microscope, and the frequency of anti-Dsg3 IgG-producing B cells was defined as the number of spots in 10^5 mononuclear cells. All experiments were carried out in triplicate.