

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

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

平成 12 年度研究報告書

平成 13(2001)年 3 月

主任研究者 天 谷 雅 行

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成 12 年度総括研究報告書	3
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 主任研究者 天谷 雅行	
III. 分担研究者報告書	
天疱瘡モデルマウスの病理学的、免疫学的解析	13
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 教授 西川 武二	
天疱瘡モデルマウスの電顕的解析	20
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 石河 晃	
尋常性天疱瘡病変部のデジタル解析	24
慶應義塾大学医学部皮膚科 助教授 田中 勝	
天疱瘡抗原三次元エピトープの解析	27
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
天疱瘡モデルマウスによる治療評価系の確立に関する研究	33
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
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	35
慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 西川 武二	
天疱瘡モデルマウスにおける自己抗体産生機序の解析	38
慶應義塾大学医学部微生物学 専任講師 鈴木 春巳	
抗 Dsg 3 抗体トランスジェニックマウスの作成	43
慶應義塾大学医学部微生物学 教授 小安 重夫	
シェーグレン症候群モデルマウスの作製	51
慶應義塾大学医学部微生物学 教授 小安 重夫	

黄色ブドウ球菌表皮剥脱性毒素による自己抗体産生モデルの開発.....	55
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	59
V. 平成12年度班会議プログラム.....	63

I. 平成 12 年度構成員名簿

班員構成

区分	氏名	所属	職名
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
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
	石河 晃	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師
	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

(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 62411
fax 03-3351-6880
e-mail: nagatomi@med.keio.ac.jp

Ⅱ. 平成 12 年度総括研究報告

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業
総括研究報告書

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
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

研究要旨 本研究班では、自己抗原ノックアウトマウスが欠失している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。本年度は、安定したモデルマウス供給系を確立しつつ、昨年度作成した天疱瘡モデルマウスを用いて、病変部の病理学的に光顕レベル、電顕レベルで解析を加え、ヒト疾患とモデルマウスの所見の近似性を確認するとともに、病的抗体産生にはT細胞、B細胞両方のレベルで免疫寛容が成立していないことが必要であることを明らかにした。天疱瘡モデルマウスより数種のモノクローナル抗体を作成し、その cDNA から抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウス作成を試み、末梢抗原 Dsg3 に対するB細胞免疫寛容獲得の機序を明らかにしようとしている。さらに、本作成法の応用として、アセチルコリン受容体 M3 ノックアウトマウスを利用し、シェーグレン症候群モデルの作成を試みている。また、本研究施行過程において、伝染性膿痂疹（いわゆる“とびひ”）、およびブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群において、原因菌である黄色ブドウ球菌の産生する外毒素（EFTa）の標的蛋白が、落葉状天疱瘡の自己抗原と同じデスモグレイン1（Dsg1）であることを明らかにし、感染症と自己免疫の新しい接点を見いだした。

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
石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科講師
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講師

A. 研究目的

本年度は、昨年度作成された天疱瘡モデルマウスを詳細に解析するとともに、本作成法を応用して他の自己免疫モデルマウスの作成を試みる。

天疱瘡モデルマウスを用いて、実際のヒト

疾患との類似性を病理学的に光顕レベル、電顕レベルで詳細に検討する。本作成法は、自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞をレシピエントマウスに移植し作成するが、移植する亜集団を検討することにより、病的抗体産生には、T細胞レベル、B細胞レベルのどのレベルで自己抗原に対する免疫寛容が成立しているか詳細に検討する。さらに、天疱瘡モデルマウスより、種々のモノクローナル抗体を作成し、水疱形成を誘導するモノクローナル抗体を分離する。また、ハイブリドーマ細胞より、H鎖、L鎖の cDNA を単離し、抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスを作成する。

ムスカリン型アセチルコリン受容体 M3 ノックアウトマウスが唾液腺分泌の低下が認めら

れる事実から、本作成法を応用しシェーグレン症候群モデルマウスの作成を試みる。

B. 研究方法

1) 天疱瘡モデルマウスの病理学的検討

天疱瘡モデルマウスを病理学的に詳細に検討し、Dsg3 ノックアウトマウスおよびヒト疾患との類似性を検討する。具体的には、モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスそれぞれ15個体につき全身の皮膚を剥離し1.5ミリ×20ミリの長方形の標本を全身の皮膚をほぼすべてカバーするように作製した。頭部、四肢、骨盤部、尾部については脱灰の後、約2ミリの幅にて連続切片を作成した。食道、胃、腸管、肺、肝臓、腎臓についても連続切片を作成した。さらに、モデルマウスにおける免疫グロブリンの表皮、粘膜における沈着の状態を明らかにするため、蛍光抗体法直接法により解析した。

2) 天疱瘡モデルマウスの電顕的検討

天疱瘡(PV)モデルマウスの皮膚、粘膜の超微細病理形態の透過型電子顕微鏡による観察した。さらに post-embedding 法を用いた免疫電顕により、PVモデルマウスのIgG自己抗体結合部位を検討した。

3) 天疱瘡抗原三次元エピトープの解析

ヒト疾患とマウスモデルにおける自己抗体のエピトープを比較検討するため、本年度はヒト自己抗体のエピトープ解析を行った。Dsg1とDsg3の細胞外領域を様々な領域で入れ換えた10種類のスワッピング分子を作成し、競合的ELISAを施行することにより、エピトープを解析した。

4) 天疱瘡モデルマウス供給系の確立

PVモデルマウスをより安定にかつ再現性高く作成するためにデスマグレイン3ノックアウト(Dsg3^{-/-})マウスの遺伝的背景を均一にする必要がある。このためにC57BL/6と129/Svの2種類の系統の背景を持つDsg3^{-/-}マウスをC57BL/6の系統へ戻し交配を行う。

5) 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

天疱瘡モデルマウスでは、水疱形成能を有する抗体産生が行われていることから、病的活性を持つモノクローナル抗体の産生を試みた。常法に従い、PVモデルマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞株(P3)とをポリエチレングリコール(PEG)を用い細胞融合を行い、一次スクリーニングをELISAで、二次スクリーニングを培養マウス角化細胞を用いた living cell staining 法にて施行した。

6) 天疱瘡モデルマウスにおける自己抗体産生機序の解析

CD4陽性T細胞は免疫したDsg3^{-/-}もしくはDsg3^{+/-}マウス脾細胞から、AutoMACS、Cell Sorterを用い精製した。簡略に述べると脾細胞10⁸あたり100ulのCD4microbeadsを用いて20分間、インキュベーションし、AutoMACSにて陽性分画として精製した。さらにanti CD4-FITC、anti Ig-Kappa-PEにて染色しFACS-Vantage(Becton Dickinson)にてCD4陽性細胞のみ得た。B細胞は免疫していないDsg3^{-/-}もしくはC57BL/6-SJL(Dsg3^{+/+})マウス脾細胞から、CD4、CD8、陰性B220陽性細胞としてAutoMACSを用いて精製した。得られたT細胞もしくはB細胞はレシピエントマウスであるRag2^{-/-}マウスに、それぞれ1x10⁶、1x10⁷細胞ずつ静脈内に投与した。抗体産生及びPVの表現型の出現の有無により、病的抗体産生に必要な細胞亜集団の検討を行った。

7) 抗Dsg3抗体トランスジェニックマウスの作成

天疱瘡モデルマウスより作成した抗Dsg3 IgGモノクローナル抗体AK7のハイブリドーマ細胞より、H鎖、L鎖のcDNAを単離した。得られたcDNAをもとに、発現ベクターを構築した。

8) シェーグレン症候群モデルマウスの作成

本モデルマウスの作成法を応用する目的で、ムスカリン性アセチルコリン受容体M3ノックアウトマウスの表現型を検討した。

9) 黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素による自己抗体産生モデルの開発

黄色ブドウ球菌の産生する外毒素、表皮剥脱毒素 EFTa の作用機序を検討する。

C. 研究結果

1) 天疱瘡モデルマウスの病理学的検討

天疱瘡モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウス各々 15 個体の全身連続切片を詳細に観察したところ両マウスにおいて PV に特徴的な表皮基底層直上での棘融解像のみならず、天疱瘡モデルマウスにおいては、ヒト疾患の際に初期の組織所見として認められる海綿状態など、ヒト疾患の様々な発症段階の組織学的変化が観察された。また、水疱形成は、両マウスにおいて鼻部、耳部、眼周囲、四肢、尾部など外的刺激を受けやすい皮膚、口蓋、舌、咽頭など摂食による摩擦を受けやすい粘膜面に観察され、その分布のパターンはマウス間で大きな差はなかった。しかし、食道、前胃の病変は天疱瘡モデルマウスのみ認められた。

また、天疱瘡モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスにおいて、1 個体における病変の部位数を検討すると、天疱瘡モデルマウスの幾つかの個体では激しい病理組織学的表現型を有しており、Dsg3^{-/-}マウスに比べ表現型が激しいものと軽いものとの個体差が大きいことが明らかになった。

以上の結果は、天疱瘡モデルマウスは病理学的に実際のヒト疾患の特徴を正しく反映しているものであることが結論された。

2) 天疱瘡モデルマウスの電顕的検討

透過型電子顕微鏡による観察から、粘膜部および鼻の皮膚は、表皮基底細胞直上で棘融解をきたし、墓石状配列を呈している像を確認した。角化細胞は棘融解により開大した細胞間隙に糸状突起を伸展し、デスマゾームの離開により生じた多数のハーフデスマゾーム様構造にトノフィラメントが付着している像が認められた。免疫電顕では、低倍率において、マウス IgG に結合した金粒子は主にデスマゾーム上に局在していた。また、高倍率において、金粒子が主にデスマゾームの向かい合う接着板の間、すなわちデスマゾームの細胞外領域に局在しているのが、確認された。

以上より、PV モデルマウスは、形態学および免疫組織学的に、ヒト PV と同一の特徴を

示すことが電顕レベルにおいても確認され、本モデルマウスの PV 疾患モデルとしての高い有用性が示された。

3) 天疱瘡抗原三次元エピトープの解析

Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域を N 末側 1/3、2/3、C 末側 1/3、2/3 を有したスワッピング分子に対する反応を、PF 患者血清 43 例を用いて検討した結果、主なエピトープは N 末 1/3 のアミノ酸 1-161 の領域に存在していることが確認された。PV 患者血清 30 例を用いた同様の検討により、Dsg3 の主要エピトープもアミノ酸 1-161 に存在していた。さらに詳細なスワッピング分子の検討により、Dsg1 の主要な三次元エピトープは N 末アミノ酸 26-87 の領域に、Dsg3 の主要な三次元エピトープは N 末アミノ酸 25-88 の領域に局在していることが判明した。

4) 天疱瘡モデルマウス供給系の確立

今年度は、C57BL/6 への戻し交配が 6 代目まで終了し、現在 7 代目に入っている。

5) 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

現時点で 5 クローンの抗マウス Dsg3 抗体産生性のハイブリドーマを作成した。アイソタイプは全て、H 鎖は IgG 1、L 鎖は κ であった。

間接蛍光抗体法および ELISA による抗原特異性の解析では、全ての抗原に反応したクローン(AK1) , マウス・ヒト Dsg3 に反応したクローン(AK15,18) , マウス Dsg3 のみに反応したクローン(AK7,9)が認められた。ウェスタンブロット法による抗原決定基の解析では AK1 以外のすべてのクローンが、マウス Dsg3 細胞外領域の C 末端側をコードするアミノ酸残基 340-614 に反応性を有した。現段階ではモノクローナル抗体単独では明らかな水疱の形成は認められていない。

6) 天疱瘡モデルマウスにおける自己抗体産生機序の解析

天疱瘡モデルマウスにおける病的抗体産生に必要な細胞亜集団を検討した。レシピエントマウスにおいて PV の表現型を明らかに認め

たものは、Dsg3^{-/-}由来の T 細胞と Dsg3^{-/-}由来の B 細胞の組み合わせでのみ 8 匹中、5 匹に確認された。In vivo における IgG の沈着は、前述の症状を示した 5 匹は明らかに認められたのみで、Dsg3^{+/-}T、Dsg3^{-/-}B の組み合わせを移植したレシピエントマウス 2 例にのみ、極めて弱いが陽性であった。

以上の結果より、病的抗体産生には、T 細胞、B 細胞ともに Dsg3^{-/-}マウス由来であることが推論された。

7) 抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成

Krebber A らにより提案された、primer mix を用い、H 鎖、L 鎖を増幅し、さらに PCR にて両鎖を結合し、発現ベクター pCANTAB5SH にクローニングした。M13KO7 helper phage を用い、ファージ上に抗体を発現させる手法を用い、マウス Dsg3 に反応する 12 クローンを得た。抗 Dsg3 抗体をコードするリコンビナント遺伝子、H 鎖、L 鎖のベクターを作成した。C57BL/6 由来の受精卵に H 鎖のみ、もしくは H 鎖、L 鎖、両方注入した。用いた遺伝子は Ig 遺伝子由来のプロモータとエンハンサーにより活性を有する。H 鎖のコンストラクトには、膜型と分泌型の両方のエキソンを含む。従って、H 鎖は B 細胞表面と血液内に分泌することが可能である。一方 L 鎖は、イントロン由来のエンハンサーだけではなく 3'エンハンサーも含む。3'エンハンサーは L 鎖遺伝子のリコンビネーションと転写活性も有することが示されている。

現在、H 鎖のみのトランスジェニックに関しては、5 系統、PCR にて発現を確認している。H 鎖、L 鎖両方のトランスジェニックは 1 系統のみ PCR にて発現を確認した。

8) シェーグレン症候群モデルマウスの作成

本モデルマウスの作成法を応用する目的で、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 ノックアウトマウスの表現型を検討した。このノックアウトマウスにおいては、唾液の分泌に異常があり、ピロカルピンで刺激をしても全く唾液が分泌されないことが明らかになった。ただしアドレナリン性の刺激に対しては反応して唾液の分泌が見られた。それ以外にも、

膀胱の膨満や軽度の水腎症がみられ、カルバコールに対する収縮が約 4 分に 1 に減少していることなどが明らかになっている。

今後、ノックアウトマウスにこの細胞を投与したり、あるいはノックアウトマウスの免疫担当細胞を C57BL/6 バックグラウンドの Rag2 ノックアウトマウスに移植することによってムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 を標的とした自己免疫反応を誘導し、これがシェーグレン症候群患者に見られる症状と類似するかいなかを検討する予定である。

9) 黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素による自己抗体産生モデルの開発

EFT には、A 型と B 型の 2 種があるが、以下 A 型 (EFTa) を用いて行った。EFTa および生食を新生仔マウスに打った後に、皮膚の Dsg1 と Dsg3 の発現を免疫染色で検討してみると、Dsg3 の発現は EFTa 投与により全く影響を受けないが、Dsg1 の発現は EFTa 投与により消失しているのが認められた。さらに、EFTa および生食をうった新生仔マウスの皮膚から蛋白を抽出し、免疫プロット法により Dsg1, Dsg3, および E-cadherin の分子量を検討してみた。すると、Dsg3 ならびに E-cadherin は、EFTa 投与後も分子量が全く変化していないのに対して、Dsg1 では、生食を投与した群ではもとの 160kD であるのに対し、EFTa を投与した群では、113kD に分解されていることが観察された。また、Dsg1 および Dsg3 を培養角化細胞に遺伝子導入し、培養上清中に EFTa を添加すると、培養細胞膜表面に発現される Dsg3 は分解されないが、Dsg1 は分解されることが観察された。さらに、Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域のみを組換え蛋白としてバキュロウイルスの発現系を用いて作成し、in vitro において EFTa が Dsg1 を分解できるか検討した。すると、濃度依存性に、EFTa は組換えマウス Dsg1 を分解するのに対して、組換えマウス Dsg3 には全く影響を受けないことが示された。組換えヒト Dsg1 およびヒト Dsg3 を用いた実験も同様に、EFTa は Dsg1 のみを分解することが確認された。以上の結果より、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素 (EFTa) の標的蛋白は Dsg1 であることが結論された。

D. 考察

疾患モデル動物は、疾患の病態機序の解明のみならず、治療法の評価、新しい治療法の開発に必要不可欠のものである、しかし、作成されたモデルマウスが、どれだけ本来のヒト疾患に近いものであるかが、そのモデルマウスの価値につながる。本研究で作成したモデルマウスは、自己抗原ノックアウトマウスを使用することにより欠損している自己抗原に対する免疫寛容をはずしているため、本モデルは、自己免疫発症の部分は反映していない。しかし、自己抗体が作成された後の皮膚症状は本来のヒト疾患で認められる病理学的所見を忠実に反映していることが、光顕レベルのみならず電顕レベルにおいても確認された。

天疱瘡抗原三次元エピトープの解析からは、ヒト疾患において、PFの標的抗原である Dsg1 では N 末アミノ酸 26-87、PV の標的抗原である Dsg3 では 25-88 に主要な三次元エピトープが存在すると考えられた。Dsg1 と Dsg3 のアミノ酸配列を比較すると、C 末側に比べ N 末側でより相同性が高い。興味深いことに、主要な三次元エピトープは、Dsg3 及び Dsg1 の分子間で非常に高い相同性を持っている領域に認められることが判明した。天疱瘡において自己免疫産生がなぜ、この領域に起こるのか現在のところは不明である。しかし、Dsg1 あるいは Dsg3 分子のみを特異的に排除したいと免疫系が考えた場合に、C 末の相同性の低い部位に抗体を産生するはずである。わざわざ N 末の相同性が高い領域に自己抗体が産生される理由があり、そこに、天疱瘡発症機序を解く鍵が隠されていることが想像される。さらに、天疱瘡モデルマウスにおけるエピトープと比較検討することにより、興味深い知見が得られることが期待される。

自己反応性の B 細胞はどのようなメカニズムにより除去されているのか。一般的には clonal deletion と anergy がいわれている。細胞表面に多数発現しているような多価抗原に対しては、ほとんどの未熟 B 細胞はアポトーシスにより死滅し、B 細胞集団から除かれる (clonal deletion)。clonal deletion は自己反応性 B 細胞が末梢で多価抗原に始めてさらされる時にも起る。例えば抗 H-2K^b トランス

ジェニックマウスに H-2K^b を肝臓でのみ発現するようにコントロールされた抗 H-2K^b、H-2K^b ダブルトランスジェニックマウスでは H-2K^b 応答性未熟 B 細胞が骨髄に発現するが末梢には存在しない。一方、可溶性抗原が未熟 B 細胞に結合すると細胞は不活化される。高親和性抗 HEL 抗体のトランスジェニックマウスに分泌型蛋白である HEL を遺伝子導入により発現させると、HEL 特異的な B 細胞は成熟できるが、抗原に应答できない。B 細胞は細胞内に IgM を持っているが細胞膜にはほとんど発現していない。さらに正常レベルの HEL と結合できる IgD を細胞膜表面に発現しているのに、細胞はシグナル伝達に部分的な障害があり、レセプターの架橋により刺激されない。この状態は anergy と呼ばれている。

Dsg3 は生体内で皮膚、粘膜、いわゆる外胚葉系に分布している。RT-PCR で見る限りは胸腺に発現しているが、骨髄にはない。従って、Dsg3 を認識する T 細胞は胸腺内選択により除去されている可能性がある。一方抗 Dsg3 抗体を産生する B 細胞はこれまでの理論からすると、末梢にて clonal deletion されている可能性がある。しかし、H-2K^b を用いたトランスジェニックの系は非常に人工的な系であり、過剰発現されているために、効率良く B 細胞が除去されている可能性がある。Dsg3 は生理的に発現されている蛋白であるとともに、実際の自己免疫疾患の標的抗原となっている分子である。その Dsg3 に対して B 細胞がどのような機序で免疫寛容を獲得するのだろうか。従って、我々が現在作成中の抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスにおいて、B 細胞がどのような運命をたどるのか非常に興味深いと思われる。

30 年という長い間不明とされていた EFT の標的蛋白がふたつの異なる疾患、落葉状天疱瘡とブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、の類似性から推測され、表皮細胞において細胞間接着に重要な役割をしており、また PF の抗原である Dsg1 であることが同定された。細菌の産生する毒素の標的が、自己免疫性疾患の自己抗原であったという事実から、感染症と自己免疫の新たな展開が生まれることが期待される。さらに、毒素投与により自己抗原が修飾され、Dsg1 に対する免疫応答が起こるとす

ると、感染と自己免疫発症をつなぐモデルマウスの作成も可能となることが期待される。

E. 結論

本年度は、天疱瘡モデルマウスを解析することにより、様々な知見が得られた。光顕レベル、電顕レベルでの病理学的解析により、天疱瘡モデルマウスは実際のヒト疾患である尋常性天疱瘡の特徴的な所見を有しており、モデルマウスとしての有用性が確認された。さらに、モデルマウスにおける病疫抗体産生には、T細胞のみならず、B細胞においても、Dsg3 に対する免疫寛容が不成立であることが必要であることが示された。また、天疱瘡モデルマウスより、数種のモノクローナル抗体が作成された。次年度は、本年度の成果をもとに、水疱形成誘導能を持つ病的モノクローナル抗体の分離され、水疱形成機序の解明がさらに進むこと、抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成により、自己抗原に対するB細胞免疫寛容獲得機序の一端があきらかにされること、アセチルコリン受容体 M3 ノックアウトマウスを用いたシェーグレン症候群モデルマウスが作成されること、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素の作用機序がされに解明され、感染症と自己免疫の新たな展開が生まれることが期待される。

F. 研究発表（平成 12 年度）

英語論文 33 編

1. 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* 114: 88-94, 2000
2. O'Toole EA, Mak LL, Guitart J, Woodley DT, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS: Induction of keratinocyte interleukin-8 expression and secretion by IgG autoantibodies as a novel mechanism of epidermal neutrophil recruitment in a pemphigus variant. *Clin Exp Immunol* 119: 217-224, 2000
3. 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* 9: 224-228, 2000
4. Hakuno M, Shimizu H, Akiyama M, Amagai M, Wahl JK, Wheelock MJ, Nishikawa T: Dissociation of intra- and extracellular domains of desmosomal cadherins and E-cadherin in Hailey-Hailey disease and Darier's disease. *Br J Dermatol* : 702-711, 2000
5. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Kovasu S, Nishikawa T: Use of autoantigen knockout mice to develop an active autoimmune disease model of pemphigus. *J Clin Invest* 105: 625-631, 2000
6. 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* 114: 1044-1049, 2000
7. 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* 42: 859-861, 2000
8. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci* 113: 1803-1811, 2000
9. Fujisawa H, Ishii Y, Tateishi T, Kawachi Y, Otsuka F, Amagai M, Komai A, Hashimoto T: Pemphigoid nodularis with IgA autoantibodies against the intracellular domain of desmoglein 1. *Br J Dermatol* 142: 143-147, 2000
10. Amagai M: Towards a better understanding of pemphigus autoimmunity. *Br J Dermatol* 143: 237-238, 2000

11. Wu H, Wang ZH, Yan A, Lyle S, Fakharzadeh S, Wahl JK, Wheelock MJ, Ishikawa H, Uitto J, Amagai M, Stanley JR: Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. **N Eng J Med** 343: 31–35, 2000
12. Takagi Y, Sawada S, Yamauchi M, Amagai M, Niimura M: Coexistence of psoriasis and linear IgA bullous dermatosis. **Br J Dermatol** 142: 513–516, 2000
13. Futei Y, Amagai M, Sekiguchi M, Nishifuji K, Fujii Y, Nishikawa T: Conformational epitope mapping of desmoglein 3 using domain-swapped molecules in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 115: 829–834, 2000
14. Arnold J, Rose C, Amagai M, Brocker E, Zillikens D: Pemphigus vegetans mit autoantikörpern gegen rekombinantes desmoglein 3. **Akt Dermatol** 26: 241–244, 2000
15. Gruss C, Zillikens D, Hashimoto T, Amagai M, Kroiss M, Vogt T, Landthaler M, Stolz W: Rapid response of IgA pemphigus of subcorneal pustular dermatosis type to treatment with isotretinoin. **J Am Acad Dermatol** 43: 923–926, 2000
16. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR: Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome targets desmoglein 1. **Nature Medicine** 6: 1275–1277, 2000
17. Takeshita K, Amano M, Shimizu T, Oyamada Y, Abiko T, Kobayashi K, Futei Y, Amagai M, Kuramochi S, Asano K, Yamaguchi K: Thymoma with pemphigus foliaceus. **Internal Medicine** 39: 742–747, 2000
18. Hata Y, Fujii Y, Tsunoda K, Amagai M: Production of the entire extracellular domain of BP180 (type XVII collagen) by baculovirus expression. **J Dermatol Sci** 23: 183–190, 2000
19. Hahn K, Kippes W, Amagai M, Rzany B, Brocker E-B, Zillikens D: Clinical and immunopathological findings in 48 patients with pemphigus. **Hautarzt** 51: 670–677, 2000
20. Tsuchihashi, N. Matsuda, S., Reinherz, E. L. and Koyasu S.: Two YxxL segments of a single immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the CD3_ε molecule differentially activate calcium mobilization and mitogen-activated protein kinase family pathways. **Eur. J. Immunol.** 30:1785–1793, 2000
21. Fukao, T. and Koyasu S.: Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. **Eur. J. Immunol.** 30: 1453–1457, 2000
22. Fukao, T., Matsuda, M. and Koyasu S.: Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12 dependent interferon-γ production by dendritic cells. **J. Immunol.** 164: 64–71, 2000
23. Ueno, H., Matsuda, S., Katamura, K., Mayumi, M. and Koyasu S.: ZAP70 is required for calcium mobilization but is dispensable for MAPK superfamily activation in human T cells stimulated via CD2. **Eur. J. Immunol.** 38:71–76, 2000
24. Toyama-Sorimachi, N., Taguchi, Y., Yagita, H., Kitamura, F., Kawasaki, A., Koyasu S. and Karasuyama, H. Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49. **J. Immunol.** in press.
25. Matsuda, S., Shibasaki, F., Takehana, K., Mori, H, Nishida, E. and Koyasu S.: Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T cell activation. **EMBO Reports** in press.
26. Fukao, T., Frucht, D. M., Yap, G., Gadina, M., O’Shea, J. J. and Koyasu S. (2001) Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. **J. Immunol.** in press
27. Ohyama M, Amagai M, Hashimoto T, Nousari HC, Anhalt GJ, Nishikawa T:

- Clinical phenotype and anti-desmoglein autoantibody profile in paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* : in press, 2001
28. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T: Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Dermatol Sci* : in press, 2001
 29. Ogata K, Nakajima H, Yamamoto Y, Amagai M, Hashimoto T, Kataoka K, Hosokawa T, Nishiya K, Hashimoto K, Kodama H: Drug-induced pemphigus foliaceus with the features of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* : in press, 2001
 30. Tanaka M, Fujimoto A, Kobayashi S, Hata Y, Amagai M: Keyboard wrist pad. *Contact Dermatitis* : in press, 2001
 31. Ohata Y, Amagai M, Ishii K, Hashimoto T: Immunoreactivity against intracellular domains of desmogleins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 25: 64-71, 2001
 32. Komai A, Amagai M, Ishii K, Nishikawa T, Chorzelski T, Matsuo I, Hashimoto T: The clinical transition between pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris correlates well to the change in autoantibody profile assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Dermatol* : in press, 2001
 33. Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, Amagai M: Desmogleins are targeted by IgA autoantibodies of a few IgA pemphigus patients. *Arch Dermatol* : in press, 2001
- 日本語総説 (18 編)
1. 天谷雅行: デスモソームと疾患. 病理と臨床 18: 691-696, 2000
 2. 天谷雅行, 西川武二: 天疱瘡の皮膚・粘膜病変と自己抗体. 臨床免疫 34: 20-25, 2000
 3. 天谷雅行: 水疱症に関する検査. Monthly Book Derma: 外来診療に必要な皮膚科検査マニュアル 41: 105-110, 2000
 4. 天谷雅行 2000. ELISA 法による天疱瘡抗体の同定. 橋本公二, 宮地良樹, & 瀧川雅浩 編集, 皮膚科診療プラクティス: 治療にてこずる皮膚疾患 (pp. 170-171). 東京: 文光堂.
 5. 天谷雅行: 天疱瘡の分子免疫学-抗原解析からマウスモデルへ-. 西日本皮膚科 62: 577-580, 2000
 6. 天谷雅行: 天疱瘡の発症機序. 日本皮膚科学会雑誌 110: 1836-1837, 2000
 7. 天谷雅行: 尋常性天疱瘡. 皮膚科の臨床”手の平・足の裏の皮膚病” 42: 1486-1487, 2000
 8. 天谷雅行 2000. 天疱瘡. 新村真人 & 瀧川雅浩 編集, 皮膚疾患最新の治療 2001-2002 東京: 南江堂.
 9. 天谷雅行 2000. 自己免疫モデルマウスの新作製法: 自己抗原ノックアウトマウスを用いた天疱瘡モデルマウス. 小安重夫編集, 免疫学がわかる (pp. 115-119). 東京: 羊土社.
 10. 天谷雅行: 天疱瘡で水疱ができる理由. マルホ皮膚科セミナー 149: 28-31, 2000
 11. 天谷雅行: 自己免疫性皮膚疾患における自己抗原. 臨床化学 29: 175-183, 2000
 12. 天谷雅行 2001. 天疱瘡. 齋田俊明, 塩原哲夫, 宮地良樹, & 渡辺晋一 編集, 今日の皮膚疾患治療指針 東京: 医学書院: 印刷中, 2001.
 13. 天谷雅行 2001. 水疱症. 皮膚科専門医テキスト 東京: 南江堂: 印刷中, 2001.
 14. 天谷雅行: 皮膚の自己免疫疾患-天疱瘡. 実験医学: 印刷中, 2001
 15. 天谷雅行 2001. 天疱瘡. In 宮地良樹 & 古川福実 編集, 皮膚科診療実践ガイド 東京: 文光堂: 印刷中, 2001.
 16. 天谷雅行 水疱症はなぜ起こるか. 関口清俊

& 鈴木信太郎 編集, 多細胞体の構築と細胞接着システム. 東京: 共立出版: 印刷中, 2001.

17. 天谷雅行: 黄色ブドウ球菌毒素と皮膚疾患の最前線. 実験医学 : 印刷中, 2001
18. 天谷雅行: 自己免疫疾患治療評価モデル. 組織培養工学 : 印刷中, 2001

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の作成
国際特許出願番号 PCT/JP00/02023

Ⅲ. 分担研究報告

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、免疫学的解析

分担研究者 西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室教授

研究要旨 本研究では新たな手法により作成された尋常性天疱瘡（PV）モデルマウスを病理学的に詳細に検討し、その特徴を明らかにするとともに、デスマグレイン3 ノックアウト(Dsg3^{-/-})マウスとの比較検討を試みてきた。昨年までの検討でモデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスとも体重減少、脱毛がみられ、組織学的に PV の特徴である棘融解が粘膜、皮膚の外的刺激を受け易い部位に認められることは確認されていたが、今回検討対象個体数を増やした結果、新たな知見として、モデルマウスでは、激しい表現型を示す個体が存在し、食道、前胃の病変が認められ、一個体中の病変の部位数もバラエティに富むことが明らかとなった。さらにモデルマウスについて、免疫学的検討も加えた結果、蛍光抗体直接法にて、表皮細胞間に IgG1 のサブクラスに属する IgG の沈着がみられ、モデルマウスの血清中の IgG 抗体は組み換え蛋白を用いた ELISA による検討で、Dsg1 とは反応せず Dsg3 を特異的に認識していた。以上より本モデルマウスが天疱瘡の病態と近似するものであることが明らかとなった。

共同研究者

大山 学

慶應義塾大学医学部皮膚科助手

米国 Jackson laboratory より得られたマウスを使用した。

A. 研究目的

昨年度は、PV モデルマウスと Dsg3^{-/-}マウスを病理組織学的に比較検討し、1) 毛嚢部への IgG の沈着により休止期特異的に毛嚢部での棘融解が生じることによりモデルマウスにおいても Dsg3^{-/-}同様の休止期特異的な脱毛が生じること 2) 両マウスにおいて病変の生じる皮膚、粘膜の部位は有意な差がないことを報告し、PV における棘融解は基本的に抗体が Dsg3 を直接的に障害することにより生じることを支持する結果を得た。

しかし、本モデルマウスの詳細な特徴付けは未だ十分にはなされていない。そこで、本年度は、モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスとも対象個体数を増やして病理学的検討を加えるとともに、モデルマウスについては免疫学的にも検討を加え、疾患モデルとしての本マウスの特質を解明することを目的とした。

B. 研究方法

a) Dsg3^{-/-}マウス

b) Rag2^{-/-}マウス

米国 Taconic 社より購入したマウスを使用した。

c) モデルマウス

昨年報告したように Dsg3^{-/-}マウスに、バキュロウイルスの発現系を用いて作成した組み換え Dsg3 蛋白を免疫し、抗 Dsg3 抗体価の上昇を確認したのち、その脾細胞を免疫不全マウスである Rag2^{-/-}マウスに移植した。

d) 肉眼的表現型の検討

病理組織学的検討の対象となるモデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスについて、肉眼的表現型を比較検討した。

e) 病理組織学的検討

モデルマウスの病理組織学的特徴を詳細に検討するため、全身標本の作製を試みた。

本年度は昨年度の検討方法に改善を加え、より定量的に、かつ客観的に検討を加えることが可能になるよう下記の方法を採用した。

モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスそれぞれ15個体につき全身の皮膚を剥離し1.5ミリ×20ミリの長方形の標本を全身の皮膚をほぼすべてカバーするように作製した。これらの標本を個体内におけるオリエンテーションがつくように包埋用ブロックに配置し連続切片を作成した。頭部、四肢、骨盤部、尾部については脱灰の後、約2ミリの幅にて連続切片を作成した。食道、胃、腸管、肺、肝臓、腎臓についても連続切片を作成した。これらの切片をHE染色し、光学顕微鏡で詳細に観察し、一個体中における天疱瘡様病変（海綿状態、棘融解）の分布、病変の総数などを記録した。

f) 蛍光抗体直接法

モデルマウスにおける免疫グロブリンの表皮、粘膜における沈着の状態を明らかにするため、蛍光抗体法直接法による解析を試みた。モデルマウス5個体につき検討した。マウス皮膚（鼻周囲）、および口蓋粘膜を薄切しOCTコンパウンドに包埋の後、FITCラベルした抗マウスIgG、IgM、IgAポリクローナル抗体と反応の後、蛍光顕微鏡にて観察した。また、沈着するIgGのサブクラスを明らかにするため、抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3モノクローナル抗体をモデルマウス口蓋粘膜を基質として反応させた後、FITCラベルした二次抗体と反応させ、同じく蛍光顕微鏡下にて観察した。

g) マウスDsg1およびDsg3のELISA

モデルマウスの産生する抗Dsg3 IgG抗体価を正確に測定し、この抗体がDsg3特異的に反応することを示すため、血清中のマウスDsg3に対するIgG抗体価のみならず、Dsg3とホモロジーを有する落葉状天疱瘡抗原であるマウスDsg1に対するIgG抗体価をELISAを用いて測定した。組み換えマウスDsg1、Dsg3を固相化したELISAプレートにモデルマウス血清を反応させた後、HRP標識した抗マウスIgGポリクローナル抗体と反応させ発色した後、吸光度を測定した。モデルマウス31個体、陰性コントロール10個体につき検討を加えた。ELISAにおいて理論的なcut off値は陰性コントロール10個体のOD値の平均値にその標準偏差の3倍を加えたものとした。

C. 研究結果

a) PVモデルマウスとDsg3^{-/-}マウスの肉眼的表現型の比較検討

PVモデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスとも休止期の毛嚢に特異的な局所的脱毛、口腔内に生じたびらん起因する接食障害による体重減少、眼、鼻周囲のびらん、痂皮といった共通する肉眼的表現型を有し、多くの個体はどちらのマウスであるか見分けることは困難であった(図1a,b)。

しかし、モデルマウスのうち幾つかの個体は、全身にわたる激しい脱毛、四肢、尾部の厚い痂皮、四肢末端からの出血などの激しい表現型を呈していた(図2a-e)。

b) 病理組織学的検討

モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウス各々15個体の全身連続切片を詳細に観察したところ両マウスにおいてPVに特徴的な棘融解像のみならず、天疱瘡モデルマウスにおいては、ヒト疾患の際に初期の組織所見として認められる海綿状態など、PVの様々な発症段階の組織学的変化が観察された。また、こうした病変は、両マウスにおいて鼻部、耳部、眼周囲、四肢、尾部など外的刺激を受けやすい皮膚、口蓋、舌、咽頭など摂食による摩擦を受けやすい粘膜面に観察され、その分布のパターンはマウス間で大きな差はなかった(図3)。しかし、食道、前胃の病変はモデルマウスのみ認められた。

また、モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウス各々15匹の全身連続切片を詳細に検討することにより、1個体における病変の部位数を検討した。Dsg3^{-/-}マウスでは、15個体のうちの5個体において6箇所(部位)の病変が認められたが、2個体では1箇所(部位)に病変を認めるのみであった。15個体の平均病変数は3.93であり標準偏差は1.83であった。一方15個体のモデルマウスのうち3個体においては11箇所(部位)の病変を認めたが、1個体あたりの病変数が2箇所(部位)であるものも1個体存在した。平均病変数は6.5であり標準偏差は3.18であった。これより、モデルマウスの幾つかの個体では激しい病理組織学的表現型を有しており、Dsg3^{-/-}マウスに比べ表現型が激しいものと軽いものとの差が大

きい、つまり表現型がバラエティに富むことが示された。(図4)

c)直接蛍光抗体法

モデルマウスの口蓋粘膜を基質として用いた蛍光抗体直接法では、表皮細胞間に強いIgGと弱いIgAの沈着が認められた(図5a)。また沈着するIgGのサブクラスの検討では、IgG1が強くIgG2a、IgG2bが弱く沈着していた(図5b)。

d) ELISA

落葉状天疱瘡抗原でありDsg3とホモロジーを有するマウスDsg1の組み換えタンパクとマウスDsg3タンパクを用いたELISAでは31個体すべての血清が抗Dsg1IgG抗体陰性、抗Dsg3IgG抗体陽性を示し、モデルマウスにて産生されるIgGはDsg3を特異的に認識することが示された(図6)。

D. 考察

疾患モデル動物は、疾患の病態機序の解明、治療法の評価などに有用である。多々存在する自己免疫性疾患のうち、PVは、基本的には、自己抗体が標的抗原の機能を阻害し病変を形成するという理解しやすい発症機序を持つため、その疾患モデルを作成することは、難治である本症の解析に有用であるばかりか、各種自己免疫性疾患の病態生理を解明する上でも重要と考えられる。

我々の作成したモデルマウスの肉眼的表現型の特徴は、休止期の毛嚢に特異的な脱毛と、口腔内のびらんによる疼痛に起因する摂食障害から生じた体重減少である。これは、本報告にあるようにDsg3が発現していないDsg3^{-/-}マウスにも共通してみられる表現型である。昨年までの個体数の少ない段階では、両者間の病理学的検討においても有意差を見いだすことはできなかった。そこで本年度は切片作製方法などに改善を加えより定量的に病理組織所見が評価できるよう工夫し、検討対象個体数を増やして詳細に検討を試みた。その結果、やはり両マウスにおいて、顕微鏡的病変は、皮膚、粘膜の外的な刺激を受けやすい部位に認められ、その分布のパターンは基本的には両者間で大きな違いはなかった。

しかし、モデルマウスのうち幾つかの個体においては激しい肉眼的表現型がみられたことが組織学的検討にも反映されていた。つまり、1個体あたりの病変数は、Dsg3^{-/-}マウスでは比較的均一であったのに比して、モデルマウスではDsg3^{-/-}マウスの解析対象集団に比べ、病変数の多い個体から少ない個体まで幅広い分布を示し、その表現型は、実際のPV患者の臨床像のように、激しいものから、軽いものまでバラエティに富むことが明らかとなった。

加えて、今回の検討では、モデルマウスを免疫学的に解析し、1) *in vivo* において、沈着する抗Dsg3抗体はIgG1のサブクラスに属するIgG抗体であり 2) ELISAによる検討で、血清中のIgGは、Dsg3とホモロジーを持つ落葉状天疱瘡抗原であるDsg1は認識せず、Dsg3に特異的であることも確認された。PV患者では産生される抗Dsg3抗体がIgG4主体であり、その表皮細胞間への沈着することにより棘融解が生じるとされるが、これらの結果は、モデルマウスにおける抗体産生、抗体の抗原への沈着の様式がPV患者に類似していることを示唆するものであると考えられる。

今後は、1) IgG以外の抗Dsg3抗体産生の血清学的検討 2) 血清中のIgG抗体のサブクラスの確認に加えて 3) 抗原抗体反応に引き続き生じると考えられる炎症反応がどの程度再現されているのかを検討し、疾患モデルとしての本モデルマウスの特徴を解明していく予定である。

E. 結論

本年度の検討により、我々の作成したPVモデルマウスには、実際のPV患者にみられる、臨床像、病理組織学的、免疫学的特徴がいくつかの点で反映されていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohyama M, Amagai M, Hashimoto T, Nousari HC, Anhalt GJ and Nishikawa T Clinical phenotype and anti-desmoglein autoantibody profile in paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol, in press

2) 大山 学、天谷雅行

水疱性類天疱瘡

免疫症候群、日本臨床別冊、274-276、
日本臨床社、2000.

3) 大山 学、天谷雅行

妊娠性疱疹

免疫症候群、日本臨床別冊、277-278、
日本臨床社、2000.

2. 学会発表

1) Manabu Ohyama

Association between clinical phenotype
and anti-desmoglein autoantibody
profile

in paraneoplastic pemphigus.
Pemphigus 2000, Bangkok, Thailand,
2000, 8.

2) 大山 学、天谷雅行、角田和之、

大田孝幸、小安重夫、梅澤明弘、

西川武二

天疱瘡モデルマウスにおける水疱形
成機序の検討

日本研究皮膚科学会第25回年次学術
大会、総会、岐阜、2000、9.