

図とその説明

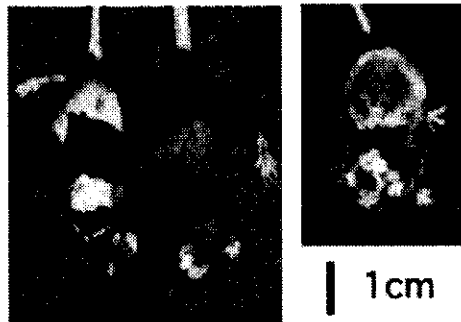


図1 PV モデルマウス(a)と Dsg3^{-/-}マウス(b)との一般的な肉眼的表現型の比較。両者とも局所的（休止期特異的）な脱毛と体重減少を認め、外見のみでの区別は困難である。

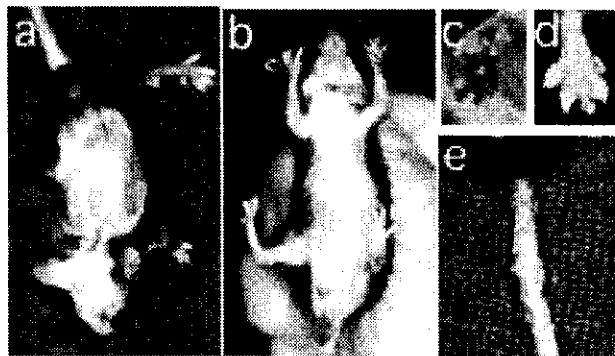


図2 激しい表現型を呈したモデルマウスの例。激しい脱毛(a,b)、四肢のびらん(c)四肢および尾部の痂皮(d,e)を認める。

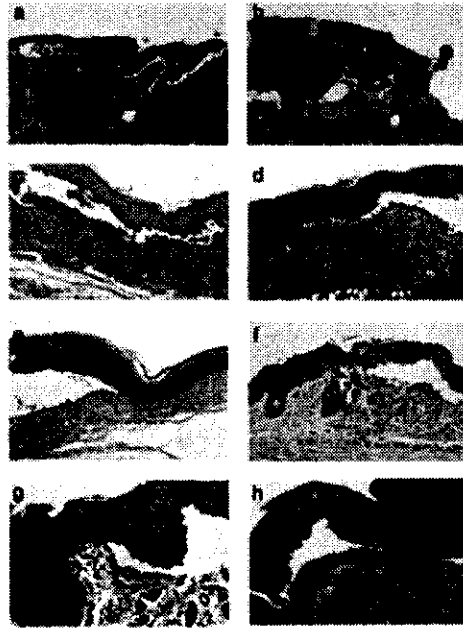


図 3 PV モデルマウス(a,c,e,g)、Dsg3^{-/-}マウス(b,d,f,h)ともに基本的な顕微鏡的病変の分布パターンに有意差は認められなかった。鼻部(a,b)、耳部(c,d)、四肢(e,f)、口蓋(g,h)に認められた棘融解の所見。

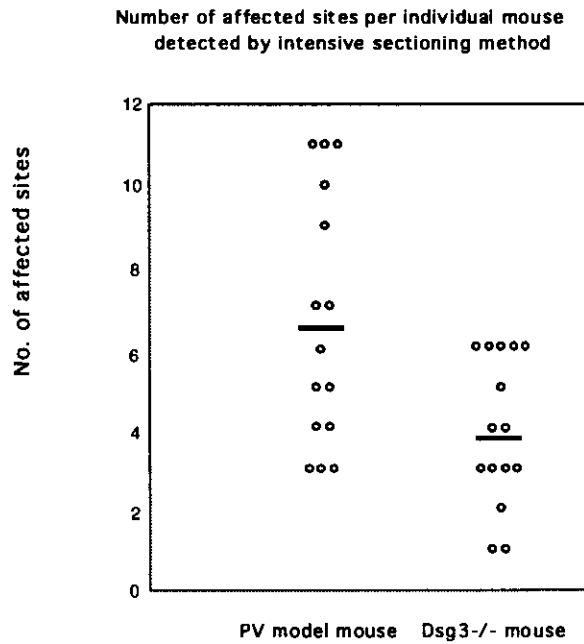


図 4 1 個体あたりの病変数の両マウス間での比較結果。モデルマウスのいくつかの個体は激しい表現型を呈している。またモデルマウスは病変数の幅が広く、表現型が Dsg3^{-/-}マウスに比べバラエティに富んでいることが判る。バーはそれぞれの平均を示す。

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電顕的解析

分担研究者 石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

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の結果, ヒト PV と同様の電顕病理所見を得た。また post-embedding 法を用いた免疫電顕から, PV モデルマウスの IgG 自己抗体が, 主にデスモゾームの細胞外領域に結合していることが明らかとなり, ヒト PV 血清より精製した抗ヒトデスモグレイン 3 (Dsg3)抗体の微細結合部位と一致した所見を得た。これらの結果は, PV モデルマウスの IgG 自己抗体が, 自己表皮細胞のデスモゾーム細胞外領域の Dsg3 に結合することで病変を形成することを示唆するもので, 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で確認され, PV 疾患モデルとしての高い有用性が示された。

研究協力者

清水 篤 慶應義塾大学大学院医学研究科専攻生 (皮膚科学)

A.研究目的

尋常生天疱瘡 (PV)モデルマウス皮膚, 粘膜の超微細病理形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察し, また, post-embedding 法を用いた免疫電顕直接法による IgG 自己抗体の局在を解析することで, PV モデルマウスの疾患モデルとしての有用性について, 形態学および免疫組織学的に電顕レベルで検討する。

B.研究方法

電顕用試料は, PV モデルマウスの鼻および背部脱毛巣の皮膚, 口蓋および舌の粘膜から採取した組織を, それぞれ <2 mm³ に細切, 2%グルタルアルデヒド, 1%OsO₄ にて二重固定し, エタノールによる置換をおこない, Epon 812 に包埋したものをを用いた。各部位の標本から 80 nm の超薄切片を作成し, 酢酸ウラニル, クエン酸鉛にて二重電子染色したものを TEM (JEOL1200EX II)により観察した。

免疫電顕用試料として, 同様の部位から採取した組織を, それぞれ 1mm³ 以下に細切し, 凍結固定装置 (KF80)を用い, -190℃に冷却した液体プロパンにて急速凍結固定し, 凍結

置換装置 (REICHERT AFS) にて, -80℃に冷却したメタノールにて 48 時間凍結置換し, Lowicryl K11M に-60℃下で 48 時間, 室温下で 48 時間の UV 重合包埋により免疫電顕用ブロックを作成した。作成した標本の口蓋粘膜部より 80 nm の超薄切片を作成し, 免疫染色の後, TEM にて観察した。免疫染色は, 一次抗体に rabbit anti-mouse IgG (H+L) (1:360, American Qualex Antibodies, California, USA) を, 4℃下で一晩, 二次抗体に 5nm gold-labelled rabbit anti-mouse IgG (1:40, Amersham, Olen, Belgium) を, 室温下で 2 時間反応させたものを, IntenSE™ M silver enhancement kit (Amersham) にて低倍率観察用に室温下で 10 分間, 高倍率観察用に 4℃下で 3 分間, 銀増感反応を施したものをを用いた。

C.研究結果

電顕所見: 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 (Fig 1A)。ケラチノサイトは棘融解により開大した細胞間隙に糸状突起を伸展し, デスモゾームの離開により生じた多数のハーフデスモゾーム様構造にトノフィラメントが付着している像を認めた (Fig 1B)。背部脱毛巣表皮に, 棘融解は認めなかったが, 休止期毛嚢深部において外毛根鞘,

基底細胞直上で毛嚢をほぼ全周するように細胞間隙が開大し、一部に棘融解を生じている像を認めた (Fig 2A)。また、ケラチノサイトから伸展する糸状突起およびハーフデスモゾーム様構造も認めた (Fig 2B)。

免疫電顕所見:低倍率の観察では、マウス IgG に結合した金粒子は主にデスモゾーム上に局在していた (Fig 3A)。また、高倍率の観察では、金粒子が主にデスモゾームの向かい合う接着板の間、すなわちデスモゾームの細胞外領域に局在していた。(Fig 3B)。

D. 考察

透過電顕により、PV モデルマウスが、ヒト PV と同様の電顕形態学的特徴を有すること、すなわち基底細胞直上での棘融解、基底細胞の墓石状配列およびケラチノサイトにおけるハーフデスモゾーム様構造とそれに付着するトノフィラメントが認められた。また、PV モデルマウスは脾細胞移植後まもなくより、頭側から尾側にかけて広範囲に脱毛を生じるが、この現象は、休止期毛嚢深部での棘融解によって引き起こされると考えられた。

また、免疫電顕直接法による所見から、PV

モデルマウスの IgG 自己抗体は、デスモゾームの細胞外領域に特異的に結合することが明らかとなった。また、IgG がデスモゾーム接着板の中央部にまで到達可能であることが確認された。これまでに、ヒト PV 血清より精製した抗ヒト Dsg3 抗体が正常ヒト表皮のデスモゾームの細胞外領域に結合することが報告されている。PV モデルマウスにおいても同様の部位に IgG 自己抗体が結合していることから PV モデルマウスの産生する IgG 自己抗体は自己の表皮細胞デスモゾームに局在している Dsg3 と特異的に結合していることが強く示唆された。以上のことから、PV モデルマウス皮膚、粘膜病変は、抗 Dsg3 自己抗体が、デスモゾーム細胞外部分に結合することにより棘融解を生じ形成されることが電顕的に示された。

E. 結論

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で確認され、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。

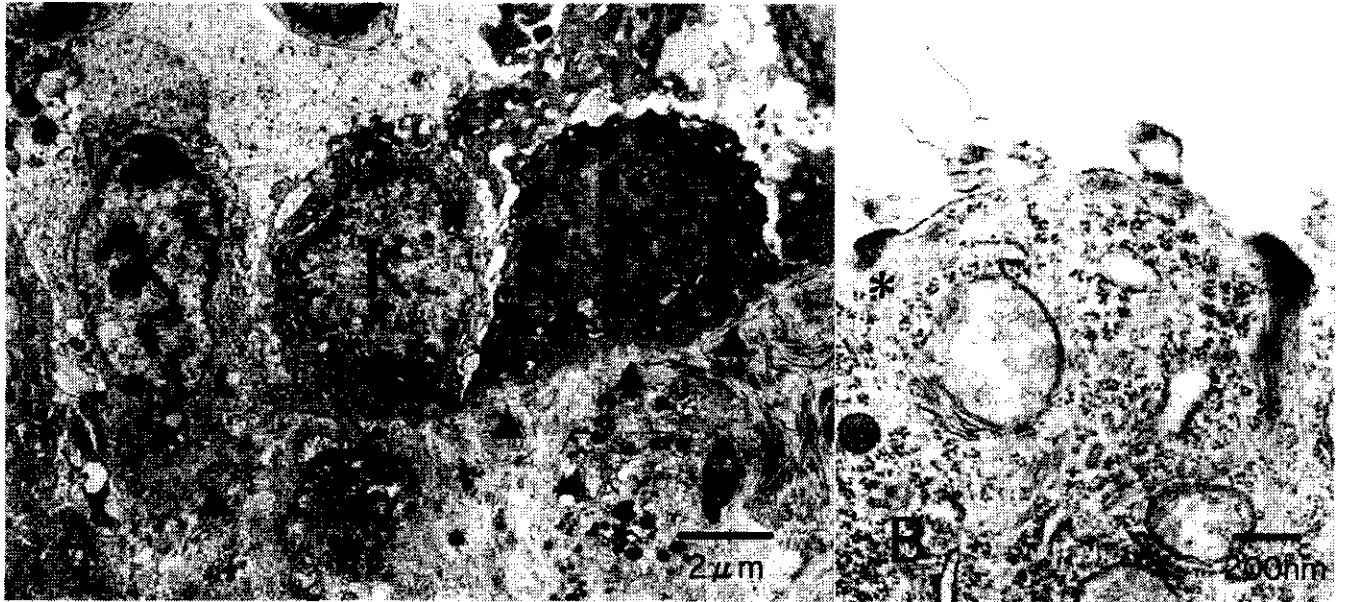


Fig.1 PVモデルマウス口蓋粘膜部の電顕所見
 (A) 基底細胞(K)直上での棘融解と基石状配列が認められる。(B) ハーフデスモゾーム様構造(矢印)とそれに付着するトノフラメント(*)。(矢尻は基底膜を示す)

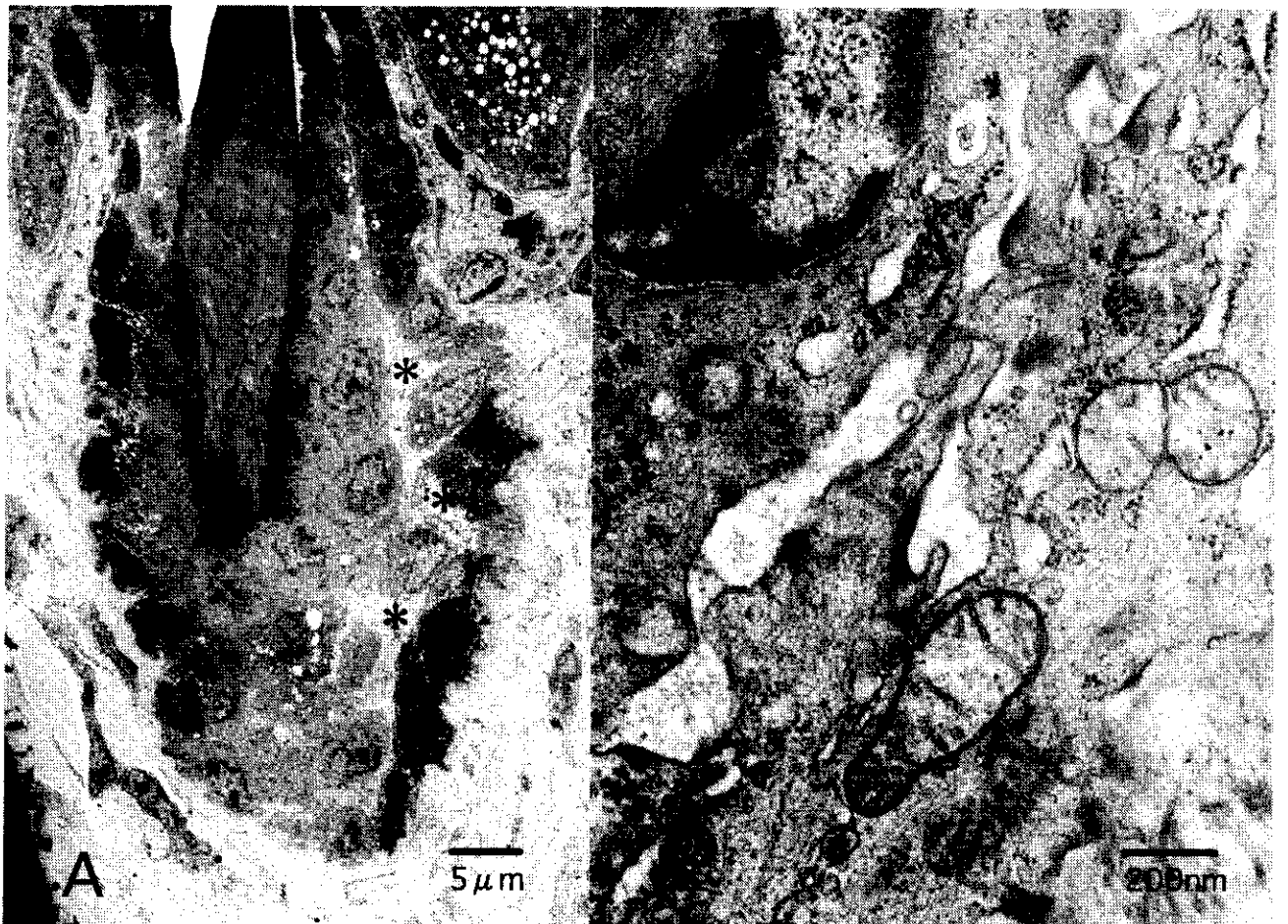


Fig.2 PVモデルマウス背部脱毛巣部、休止期毛嚢の電顕所見
 (A) 外毛根鞘の基底細胞直上から毛嚢を全周するように細胞間隙が開大し、一部に棘融解(*)が認められる。(B) 離開したケラチノサイトから糸状突起が伸展し、多数のハーフデスモゾーム様構造が認められる。

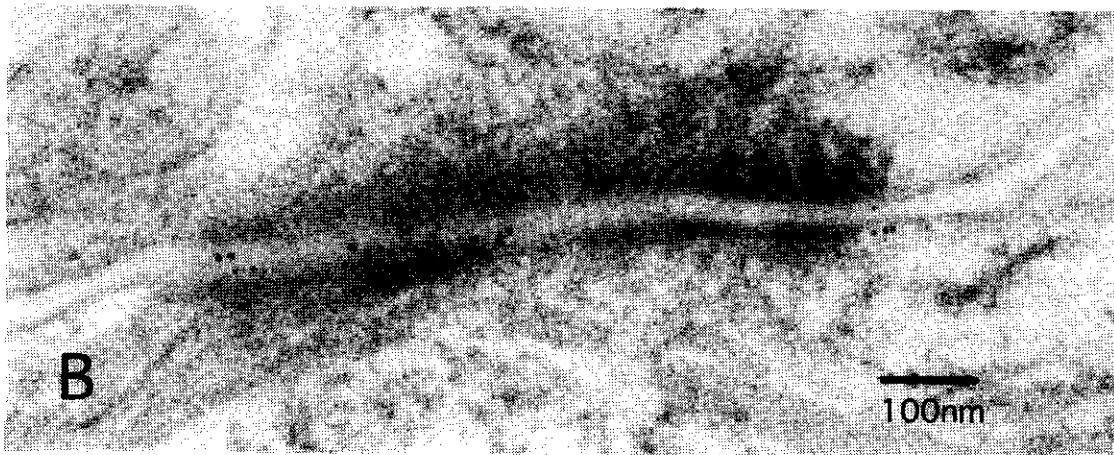
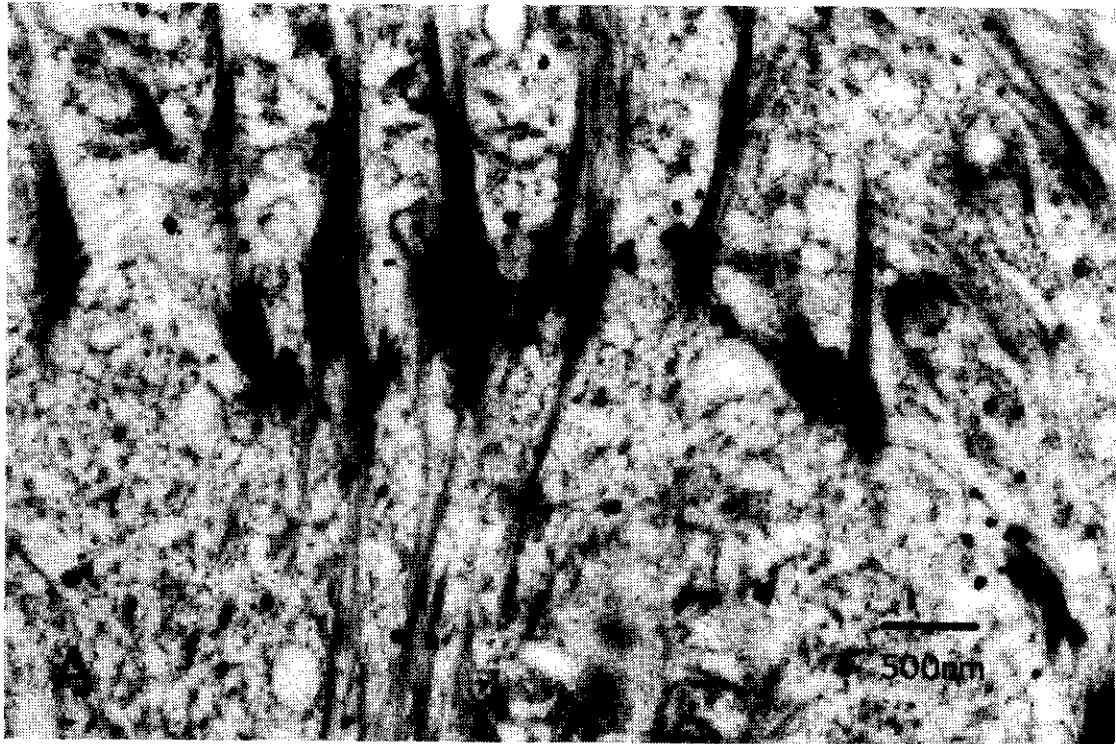


Fig. 3 免疫電顕所見

(A) 低倍率所見：銀増感をさせた大きな金粒子（マウス IgG）は，主にデスモソーム上に局在している。

(B) 高倍率所見：金粒子（マウス IgG）の微細局在部位は，主にデスモソームの細胞外領域に認められた。

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

尋常性天疱瘡病変部のデジタル解析

分担研究者 田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科助教授

現在、天疱瘡の病変から病勢、治療効果判定の客観的評価は、なされていない
画像データにおいて、病変部の面積の算出を行えば、客観化は可能である。そこで、
画像のデジタル解析を行い客観的評価を目指す

研究協力者

小林誠一郎 慶應義塾大学医学部皮膚科助手

A. 研究目的

尋常性天疱瘡の皮疹を画像のデジタル解析を行い客観的評価するのが最終目標である。デジタル解析により、病勢の判定や治療効果判定を客観的に検討することができる。病変面積を算出できると動物実験モデルにおいても、応用できる。現在、面積の算出は病変抽出ができれば机上で可能であるため、病変部の抽出が課題である。今回、赤色系の病変部の抽出について報告する。

て報告する。

B. 研究方法

抽出にあたり、以下の問題点があげられる。

①画像中の陰影:影により、皮疹の境界部が抽出できなくなる。②多彩な病変:尋常性天疱瘡の皮疹は水疱、びらん、紅斑、痂皮、色素沈着と多彩であるため、病変抽出は一つの条件では不可能である。③基準色が存在しない:撮影条件(温度・体温・撮影機材・光源・現像条件など)の違いにより同一人物でも写真では色が違う④病変部以外のオブジェクトの存在:顔における目、鼻、口などの

境界線を有するオブジェクトがあると抽出はより困難である。これら問題に対し次ぎのように対処した。①

①

L*a*b*表色系を利用②病勢の激しいとき最も認められる赤色系の皮疹を

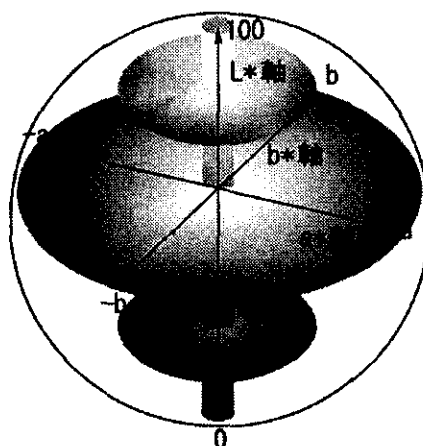


Fig1 L*a*b*表色系モデル

抽出する。③皮疹と周

囲の皮膚色の相対的な差を利用して抽出する。

④背部の写真のみ抽出対象とする。

L*a*b*表色系では、色を明度:L と色度:a(色度:赤-緑),b(色度:黄-青)において表す (Fig1)。色と色の差は、この表色系の2点間の距離として計算される。このように画像を表色系の各成分に分ければ、陰影の情報は、主にL成分に含まれ、また赤色系の情報はa成分に含まれるため、

陰影と赤色系病変抽出の点で問題解決できる。また、色と色の差は数値化され、病変と周囲の色の相対的な色差が算出できる。

具体的な方法は以下の通りである。

尋常性天疱瘡患者の背部写真を、コン

POLASCANにて320dpiで取り込みする。

Adobe Photoshop5.0にてLab表色系に変換、L(明度)、a(色度:赤-緑)、b(色度:黄-青)各成分を256階調のグレースケール画像に変換する。

以後は、赤色系のデータの最も有しているa成分の画像のみを対象とする。病変部は、a成分の画像では、輝度の高い部位であるため、輝度差の激しい部位が境界を表す。輝度の高い部位のみ抽出するため、周囲のレベルぎりぎりの平面をガウシアンを使い作製する。

原画像a成分Iのみがガウシアンをかけ、ぼけ画像IIを作製する。Iの反転画像IIIを作製。IIIをガウシアンをかけ、反転画像のぼけ画像IVを作製する。

IVをさらに反転しVとする。ガウシアンにより、

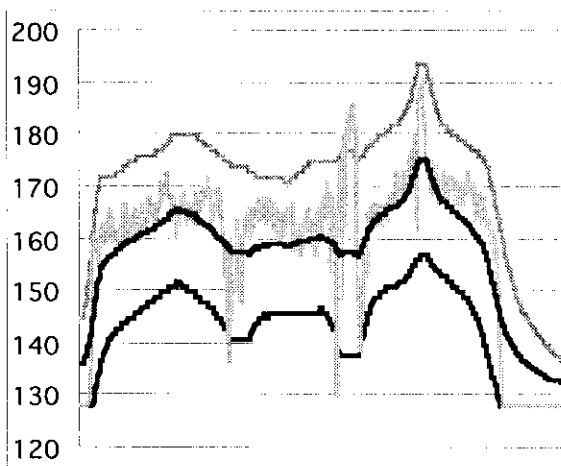


Fig2 輝度グラフ

Iの下のレベルにその凹凸の特性を有したなめらかな面ができる。反転により、VはIの上のレベルのなめらかな面となる。IIとVを平均化することにより、Iとほぼぎりぎりのなめらかな面IVが作製される(Fig2)。このIVとIの差が、病変部の色差となる。

色差は ΔE と表し、国際標準化機構により、以下のごとく肉眼的認識度が判明している(下表)。色差6.5以下は、肉眼的に同一の色のため、7以上の色差において病変の境界と認識される。色

ΔE	肉眼的認識度
0~1以下	見分けられない
1.6~3.2	同じ色
3.3~6.5	感覚的に同じ色
6.5~13	同系統の色
13~25	別系列の色

差7のレベルにおいて画像を白と黒に2値化すると目的の病変部の抽出画像となる。

C. 研究結果

色差7と10,13で2値化した画像を原画像に重ね合わせ病変部の抽出がなされているか確認した。色差7以上の場合、淡い紅斑から強い紅斑、びらんを抽出する。13以上では強い紅斑とびらん抽出された(Fig3)。色差10では7と13の中間の病変抽出が確認できた。いずれも赤色系でない色素沈着部は、抽出されなかった。陰影部の病変の抽出もなされていた。躯幹の辺縁において境界線の抽出があり、病変部の抽出が不正確になる傾向が認められた。

D. 考察・結論

L*a*b*表色系を用い、陰影の成分を分離し、赤

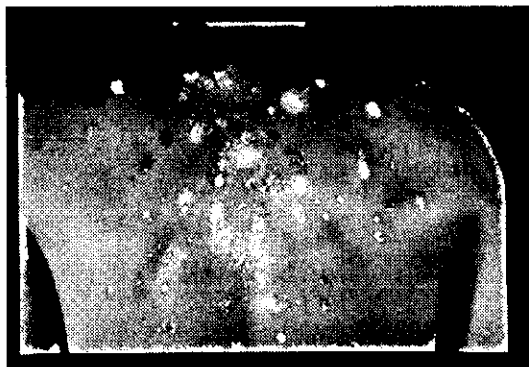


Fig3 画像処理により抽出されたびらん

色系の成分のみに考えた場合、色差で病変部の抽出は可能である。しかし、より原画像ぎりぎりのなめらかな面を他のフィルタで作ることができればより正確な抽出が可能である。赤色系の病変でも、紅斑、びらん、水疱などそれぞれ違いがあるが、現段階では淡い色と濃い色の違いは識別可能であるが、正確な識別は困難である。今後、面積の算出にあたり、測定範囲の決定、赤色系以外の病変の抽出、背部以外の病変部抽出が課題である。

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

天疱瘡抗原三次元エピトープの解析

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

研究要旨：天疱瘡抗原であるデスモグレイン（Dsg）はカドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子であり、落葉状天疱瘡（PF）抗原である Dsg1 と尋常性天疱瘡（PV）抗原である Dsg3 があるが、自己抗体はそれぞれの抗原を特異的に認識する。自己抗体がそれぞれの抗原を認識し水疱形成に至るためには、抗原の三次元エピトープが重要である。本研究では、Dsg1 および Dsg3 の三次元エピトープの分子上局在を検討する目的で、Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域を様々なフラグメントとし、欠失領域に類似分子である Dsg3 または Dsg1 を融合させた 10 種類のスワッピング分子を作成し、これらに対する PF および PV 抗体の反応を Competition ELISA により検討した。Dsg1 は N 末アミノ酸 26-87、Dsg3 は N 末アミノ酸 25-88 に主要な三次元エピトープが存在することが判明した。天疱瘡において、カドヘリン分子の分子間結合に重要な接着面に対して抗体が産生されていることが明らかにされた。

研究協力者

関口麻衣子 慶応大学医学部皮膚科

A. 研究目的

本研究の目的は、天疱瘡抗原 Dsg1 および Dsg3 の三次元エピトープの分子上局在を尋常性天疱瘡血清、落葉状天疱瘡血清を用いて検討する。

B. 研究方法

Dsg はカドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子であり、膜貫通型タンパクとして存在している。その細胞外領域は N 末側よりカドヘリンリピートと呼ばれる細胞外ドメインが 5 つタンデムに並んだ構造をとっている（図 1）。天疱瘡では、自己抗体がこれら標的抗原の細胞外領域をエピトープとして認識し、水疱形成が誘導されると考えられており、自己抗体がエピトープを認識するためには、その三次元構造が保存されていることが重要である。

すでに我々は、昆虫細胞を利用するバキュロウイルス発現系を用いて、三次元構造を持った Dsg1 および Dsg3 を作成している。両者の間ではアミノ酸配列の保存性が高く、非常に類似した分子構造をとっているにも関わらず、PF および PV の自己抗体は Dsg1、Dsg3 それぞれに特異的な反応を示す。そこで 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た（図 2 A, B）。こうして、全体としての立体構造を保つことで、Dsg1 または Dsg3 の一定領域における抗原特異性も保存されることが期待される。

C. 研究結果

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 を有した分子（図 2 A）に対する反応を、PF 患者血清 43 例を用いて検討した結果（図 3）、吸収率 50% 異常を有意な値とした場合、Dsg1 の N 末アミノ酸 1-401 の分子では 43/43（100%）が有意な吸収率を示し、全体の平均吸収率は 98.2% であ

った。さらに N 末アミノ酸 1-161 の分子でも 30/43 (69.8%) が有意な吸収率を示し、平均吸収率は 62.5%であった。一方、C 末アミノ酸 164-496 および 404-496 の分子では、それぞれ 2/43 (4.7%) および 0/43 (0%) でほとんど有意な反応は示されなかった。また PV 患者血清 40 例を用いて検討した結果、Dsg3 の N 末アミノ酸 1-403 および 1-161 の分子では 38/40 (95%) および 31/40 (77.5%) が有意な吸収率を示し、平均吸収率はそれぞれ 85.8% および 67.4% であった。一方、C 末アミノ酸 163-566 および 405-566 の分子では、それぞれ 4/40 (10%) および 0/40 (0%) でほとんど有意な反応は示されなかった。よって、主要な三次元エpitope は PF および PV のどちらにおいても Dsg1 および Dsg3 の N 末アミノ酸 1-161 の領域に局在すると考えられた。

そこで次に、N 末アミノ酸 1-161 で 50% 以上の有意な吸収率を示した PF および PV 血清について、Dsg1 および Dsg3 の N 末アミノ酸 1-161 の領域をさらに細かい領域に限定したスワッピング分子を用いて、さらに competition ELISA を施行した。自己抗体吸収率は、N 末アミノ酸 161 までの分子と反応させた時の OD 値を吸収率 100% として求めた。

そこで次に、N 末アミノ酸 1-161 で 50% 以上の有意な吸収率を示した PF および PV 血清について、Dsg1 および Dsg3 の N 末アミノ酸 1-161 の領域をさらに細かい領域に限定したスワッピング分子 (図 2 B) を用いて、さらに competition ELISA を施行した。自己抗体吸収率は、N 末アミノ酸 161 までの分子と反応させた時の OD 値を吸収率 100% として求めた。

PF 血清 26 例を用いて検討したところ (図 4)、Dsg1 の 1-24、1-64、1-87、26-161、63-161、89-161 の分子でそれぞれ平均吸収率が 14.9%、38.5%、41.0%、55.1%、39.3%、18.4% となり、1-24 および 89-161 の分子で有意な吸収率を示した症例はそれぞれ 0/26 (0%) および 1/26 (3.8%) とほとんど示されなかったのに比べ、1-64、1-87、26-161、63-161 の分子ではそれぞれ 6/26 (23.1%)、10/26 (38.5%)、13/26 (50%)、9/26 (34.6%) で有意な値が示された。このことから Dsg1 の主要な三次元エpitope は N 末アミノ酸

26-87 の領域に局在していると考えられた。同様に PV 血清 30 例を用いて検討したところ、やはり PF における Dsg1 の結果とほぼ同様の成績が示され、PV における Dsg3 の主要な三次元エpitope は N 末アミノ酸 25-88 の領域に局在すると考えられた。同様に PV 血清 30 例を用いて検討したところ、やはり PF における Dsg1 の結果とほぼ同様の成績が示され、PV における Dsg3 の主要な三次元エpitope は N 末アミノ酸 25-88 の領域に局在すると考えられた。

考察

本研究結果から、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pitope 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pitope 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。

今後、この領域において Dsg3 のアイソタイプ特異的アミノ酸配列に Dsg1 特異的アミノ酸を導入した変異 Dsg3 タンパクを作成し、PF 血清の反応性を検討し、さらにエpitope を細かく同定する予定である。

D. 結論

本研究では、今回我々の作成したスワッピング分子が三次元エpitope マッピングに有効であることが示され、これにより、Dsg1 および Dsg3 それぞれの主要な三次元エpitope の局在が明らかになった。天疱瘡抗原 Dsg の三次元エpitope の局在を特定することは、抗原特異的血漿交換療法などの新しい治療法の開発、自己免疫反応により誘導される天疱

瘡の病態発現機序を解明する上においても重要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Futei Y, Amagai M, Sekiguchi M, Nishifuji K, Fujii Y and Nishikawa T. Use of Domain-Swapped Molecules for Conformational Epitope Mapping of Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol* 115:829-834, 2000.

2. 学会発表

1) 落葉状天疱瘡 (PF) 抗原 Dsg1 の三次元エピトープの解析、第 743 回日本皮膚化学会東京地方会、東京、1998.12.

2) 落葉状天疱瘡 (PF) 抗原デスマogleイン (Dsg) 1 の三次元エピトープの解析、日本研

究皮膚科学会第 24 回年次学術大会・総会、神戸、1999.7.

3) Mapping of The Major Conformational Epitopes of Desmoglein 1 (Dsg1) , Pemphigus Foliaceus (PF) Antigen, to Residues 25-87 in EC1 domain. The 61th Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Chicago, 2000.

4) Dsg1/Dsg3 スワッピング分子および Site-directed mutagenesis による天疱瘡抗原デスマogleイン (Dsg) の三次元エピトープ解析、日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会・総会、岐阜、2000.7.

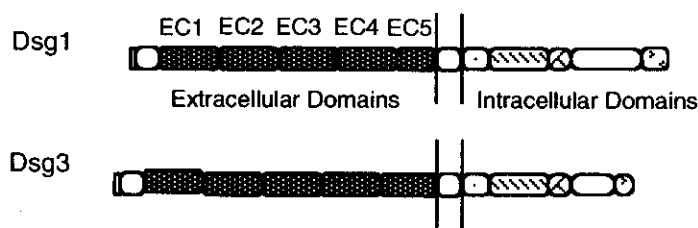


図 1 : 天疱瘡抗原デスマogleイン

カドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子で、膜貫通型タンパクとして存在し、その細胞外領域はN末側よりカドヘリンリピートと呼ばれる細胞外ドメインが5つタンデムに並んだ構造をとる。

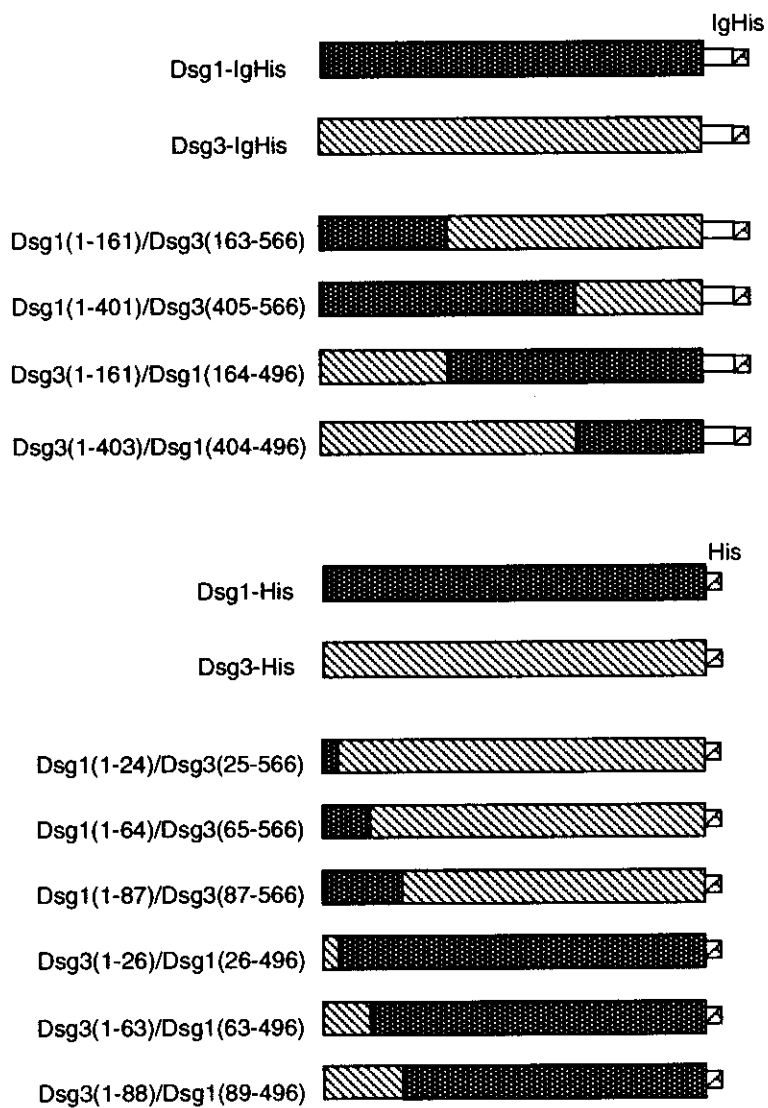


図2 : Dsg1/Dsg3スワッピング分子の作成
 全体としての立体構造を保つことでDsg1またはDsg3の一定領域における抗原特異性も保存されるように、Dsg1とDsg3の細胞外領域を様々な領域で入れ換えた10種類のスワッピング分子を作成し、バキュロウイルス発現系を用いて組換え蛋白を作成した。

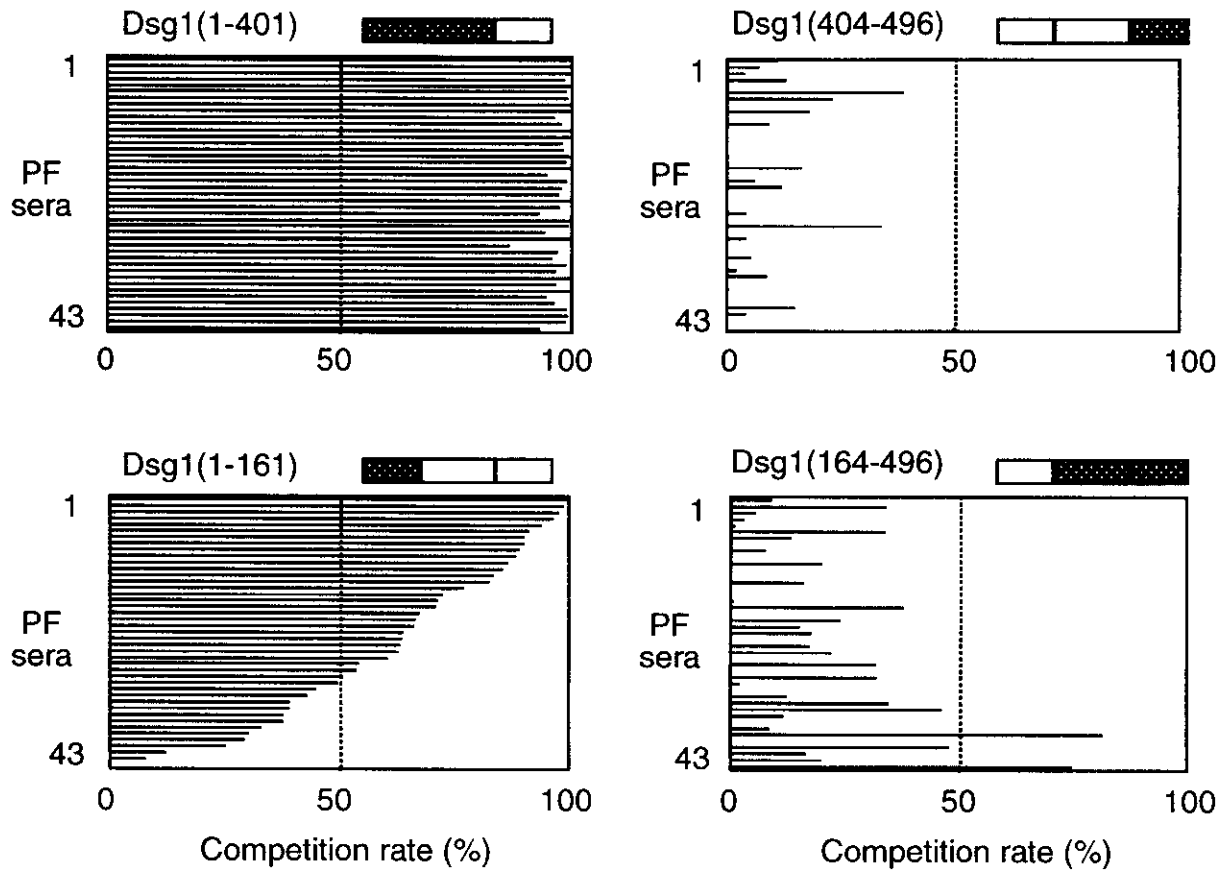


図3 : PF 血清の三次元エピトープ解析 (1)
 主要な三次元エピトープは PF および PV のどちらにおいても Dsg1 および Dsg3 の N 末アミノ酸 1-161 の領域に局在すると考えられた。

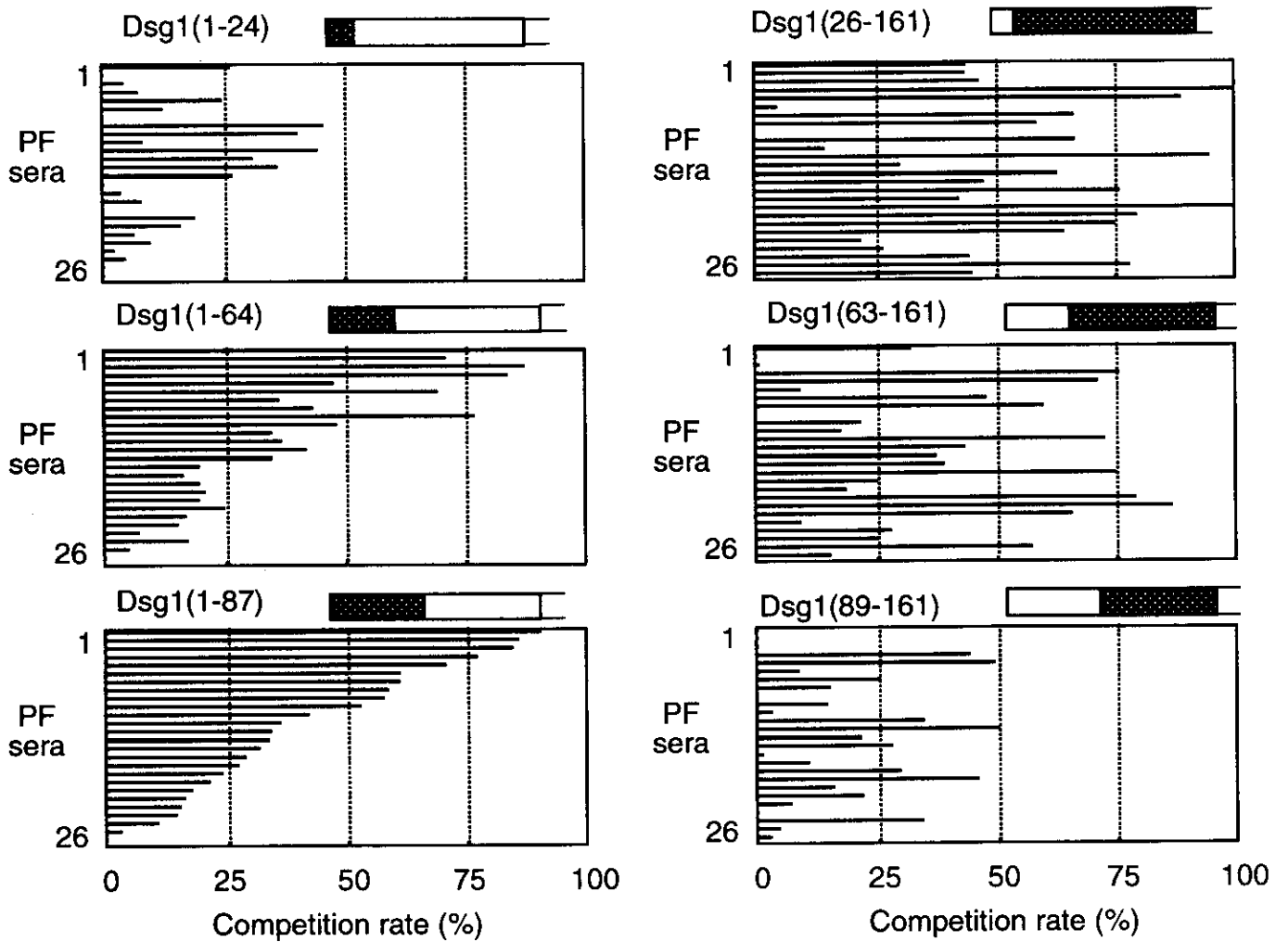


図4：PF血清の三次元エピトープ解析 (2)

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

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業

分担研究費報告書

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

主任研究者 天谷雅行 應義塾大学医学部皮膚科専任講師

自己免疫疾患の治療に用いられているステロイド剤あるいは各種免疫抑制剤の投与法は客観的評価がなされていない。本研究では、尋常性天疱瘡(PV)モデルマウスを用いて、免疫抑制剤あるいは免疫抑制療法の評価系の開発を目指す。

研究協力者

青木三代 慶應義塾大学医学部皮膚科

A.研究目的

本研究では、PVモデルマウスを用いて免疫抑制剤あるいは免疫抑制療法の評価系を開発することを目的とする。

B.研究方法

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。

今後はさらに12代まで戻し交配し、純系化したDsg3^{-/-}マウスを用いてPVモデルマウスを作製する。このPVモデルマウスに対して、種々の薬剤を投与する。PVモデルマウスの場合、症状として体重減少および脱毛が認められるので、体重減少および脱毛の全表面積に対する範囲を経時的に記録する。循環血中のデスマグレイン3(Dsg3)に対する自己抗体を組換えDsg3を抗原としたELISA法にて経時的に測定する。また、脾臓、リンパ節、骨髄および末梢血中の単核球を分離し、組換え

Dsg3をコートした96穴ディッシュを用いたELISPOT法にて抗Dsg3抗体産生B細胞の数を計測する。これらの結果をもとに治療評価系の確立を目指す。

本研究で用いるマウスは、SPF環境において飼育され、オートクレーブされたケージ、床敷および水ならびにγ線照射飼料を用いて飼育される。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る。

C.研究結果

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。さらに、効果判定に用いる組換えマウスDsg3、Dsg1蛋白を用いたELISA法、ならびにELISPOT法を確立した。ELISA法では、重症度とほぼ一致して血清抗体価が変動することを確認した。ELISPOT法では、リンパ節、脾臓、骨髄に存在する抗Dsg3抗体産生B細胞を検出し、その時点での抗体産生能を評価する有用な評価法であることが確認された。

D.考察

Dsg3^{-/-}マウスの純系化は順調に進んでおり、安定したモデルマウスの供給系は確立し

つつある。

純系化 Dsg3^{-/-}マウスから PV モデルマウスを作製することは、背景遺伝子の違いによる免疫反応の個体間格差を是正し、広汎に利用できる自己免疫疾患モデルの供給系を確立する上で重要である。また、この PV モデルマウスを用いてステロイドおよび各種免疫抑制剤の効果を検討することは、臨床的観点からも意義深く、さらに作用機序を細胞レベル、分子レベルで検討することにより、新しい免疫抑制療法の開発の鍵となる知見が得られることが期待される。

E. 結論

天疱瘡モデルマウスを用いて、自己免疫疾患に対する各種治療法の効果を検討することが、現実的に可能であり、基礎研究から臨床の場への還元が期待される。

厚生省科学研究費補助金（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

研究要旨：天疱瘡は自己免疫性の水疱形成疾患で、その自己抗体の解析は病因の解明や、治療法の開発に重要なステップであると考えられる。そこで最近開発された尋常性天疱瘡（PV）モデルマウスの脾細胞を用いて病原性を有するモノクローナル抗体を作成し、特異性、病原性について解析を行った。

研究協力者
角田 和之 慶應義塾大学医学部皮膚科

A. 研究目的

PVモデルマウスの脾細胞とマウス骨髄腫細胞を細胞融合し、病原性を有する抗マウス Dsg3モノクローナル抗体を作成し、その抗原特異性や病原性について解析を行う。

B. 研究方法

PVモデルマウスの作成として、まず天疱瘡の自己抗原蛋白であるデスマグレイン(Dsg)3を遺伝的に欠如した Dsg3 ノックアウト(-/-)マウスをバキュロウイルス発現系により得られた、組み換えマウス Dsg3 蛋白とフロイントアジュバントにて免疫し、マウス血清中の *in vivo* で反応する抗マウス Dsg3 抗体産生を確認した。次に免疫した Dsg3-/-の脾細胞を、Dsg3 を発現する免疫不全マウス(Rag2-/-)に移植した。レシピエントマウスは移植後、病理組織学的に基底層直上の水疱形成、免疫組織学的には表皮・粘膜上皮細胞間への IgG の沈着等の PV に類似した所見を呈していた。次に、モノクローナル抗体の作成として 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った。得られたハイブリドーマを、組み換えマウス Dsg3 を抗原として用いた ELISA 法にて1次スクリーニングし、次にその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。スクリーニング終了後、得られた各クローンに対して、計3回のクローニングを行った。

つぎに得られたモノクローナル抗体の抗原特異性を確認するために、マウス口蓋粘膜、皮膚およびヒト口腔粘膜、皮膚を基質とした間接蛍光抗体法、およびマウス Dsg3、マウス Dsg1、ヒト Dsg3、ヒト Dsg1 の組み換え蛋白を抗原とした ELISA にて確認した。

続いてモノクローナル抗体の抗原決定基を検討するためにウェスタンブロットを施行した。抗原としてはマウス Dsg3 の細胞外領域 (EC1-EC5) を C 末端側約 1/3(C-EC)、中央約 1/3(M-EC)、N 末端側約 1/3(N-EC)に分割し大腸菌発現系にて蛋白を作成し、モノクローナル抗体との反応性を確認した (図1)。さらにモノクローナル抗体単独と、モノクローナル抗体と PF 患者血清 (抗 Dsg1 抗体のみを有し、単独では皮膚に水疱を形成しない量) と、PF 患者血清単独の3通りの組み合わせの抗体を新生マウスに移入し、24時間後にマウス皮膚における水疱形成を臨床的、病理組織学的に観察し、モノクローナル抗体の病原性を検討した。

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、アレントア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のクローンが、重鎖は IgG 1、軽鎖は 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(表1)。ウェスタンブロット法による抗原決定基の解析では1クローン(AK1)が全ての蛋白に反応を有さなかったが、残りの全てのクローンが、マウス Dsg3 細胞外領域の C 末端側をコードする C-EC 蛋白(340-614 アミノ酸残基)に反応性を有するクローンであった。(表2)

新生マウスへのモノクローナル抗体の移入実験は、免疫組織学的には移入後 24 時間後に皮膚、粘膜の角化細胞表面への抗体の沈着が全てのクローンにおいて認められた。また皮膚における水疱形成は、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。またモノクローナル抗体と PF 患者血清を同時に移入した場合においても PF 患者血清を単独で移入した場合と明らかな違いは認められていない。

D 考察、結論

最近我々が開発した PV モデルマウスには PV 抗原である Dsg3 に対して特異的な自己抗体産生細胞が存在する。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産生性のハイブリドーマが効率よく作成できるものと考えられる。現段階で得られた抗体はヒトとマウスの Dsg3 と Dsg1 に交叉反応するクローン、マウス Dsg3 のみに反応するクローン、ヒトとマウスの Dsg3 のみに反応するクローンと様々な反応性を有し、各デスマグレイン間における相同性が関与していると思われる。

ウェスタンブロット法による抗原決定基の解析では全てのクローンがマウス Dsg3 の細胞外領域の C 末端側に反応性を有することが

確認された。現在、天疱瘡における病原性を有する自己抗体はその多くが Dsg の N 末端領域に反応性を有することが確認されている。これらの反応性の違いが生じた理由としては、PV モデルマウスにおける自己抗体産生機序はヒト天疱瘡のそれと免疫学的に何らかの相違があると考えられる。今後さらにそれらの解析をすすめることにより自己免疫疾患における自己抗体産生機序を解明する一助になるかもしれない。

病原性に関しては、ヒトにおける天疱瘡では水疱形成にポリクローナルな抗体が関与していると考えられている。これらの事実を考えると今後さらにクローン数を増やし、1つのモノクローナル抗体単独ではなく、いくつかの抗体を組み合わせポリクローナルな状態にし、病原性を確認する必要があると考えられる。病原性を有するモノクローナル抗体が得られた場合、その抗体の詳細なエピトープの解析を行う事により、抗原特異的な抗体除去治療などの開発に有用であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Kazuyuki Tsunoda, Takayuki Ota, Tetsuo Nagai, Shigeo Koyasu, Takeji Nishikawa and Masayuki Amagai. Production of Anti-desmoglein3 Mouse Monoclonal Antibodies Using Active Disease Mouse Model for Pemphigus. The society for Investigative Dermatology, 61st annual meeting, 2000, 05, Chicago

2) 角田和之、天谷雅行、大田孝幸、永井哲夫、小安重夫、西川武二 天疱瘡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 第7回分子皮膚科フォーラム 弘前 2000年4月22日

3) 角田和之、天谷雅行、大田孝幸、永井哲夫、小安重夫、西川武二 天疱瘡モデルマウスを用いた抗マウスデスマグレイン 3 モノクローナル抗体の作成 日本研究皮膚科学会第25回学術大会 岐阜 2000年9月1-3日