

図1 ウェスタンブロット法に用いた
マウスDsg3蛋白 (シエーマ)

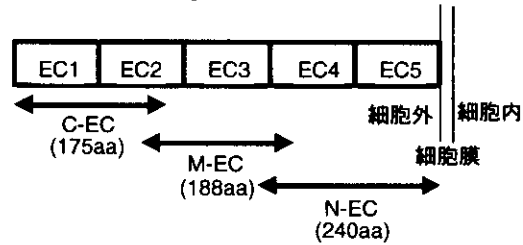


表1 モノクローナル抗体のアイソタイプとELISA
による抗原特異性

MoAb	isotype		mouse		human	
	light chain	heavy chain	Dsg1	Dsg3	Dsg1	Dsg3
AK 1	IgG1	κ	+	+	+	+
AK 7	IgG1	κ	-	+	-	-
AK 9	IgG1	κ	-	+	-	-
AK 15	IgG1	κ	-	+	-	+
AK 18	IgG1	κ	-	+	-	+

+ : 陽性

- : 陰性

表2 ウェスタンブロット法によるモノクローナル
抗体の抗原決定基の検討

MoAb	truncated molecule		
	N-EC	M-EC	C-EC
AK 1	-	-	-
AK 7	-	-	+
AK 9	-	-	+
AK 15	-	-	+
AK 18	-	-	+

+ : 陽性

- : 陰性

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

研究要旨 尋常性天疱瘡は水疱形成を主徴とする自己免疫疾患であり、細胞間接着因子の1つであるデスマグレイン3 (Dsg3) に対するIgG自己抗体を有する。しかしながら、患者においてはT細胞もしくはB細胞においてトレランスの状態、自己抗原を認識するT細胞の存在などは現在の所明らかではない。今回、天疱瘡モデルマウスを応用しトレランスの一端を明らかにすることを目的とする。T細胞およびB細胞をそれぞれDsg3^{-/-}もしくはDsg3^{+/-}、Dsg3^{+/+}のマウスから精製し、それぞれの組み合わせにおいてどのような抗体産生反応が起きるか、天疱瘡様の症状を呈するか検討したところ、Dsg3^{-/-}由来のT細胞、B細胞の組み合わせのみで、症状を呈した。すなわち、少なくともモデルマウスにおいてはT細胞、B細胞両方において、トレランスが成立していないことが条件であると考えられ、人においてはなんらかの機構によりトレランスが破綻している可能性が示された。

研究協力者

角田和之 慶應義塾大学医学部皮膚科
大田孝幸 慶應義塾大学医学部大学院生

A. 目的

尋常性天疱瘡は水疱形成を主徴とする自己免疫疾患であり、細胞間接着因子の1つであるデスマグレイン3 (Dsg3) に対するIgG自己抗体が、水疱形成を誘導する。患者において、自己抗体の形成機序に関しては現在のところ、不明である。

一般的に、抗体産生するB細胞の活性化にはヘルパーT細胞依存的である。T細胞に関しては様々な研究により胸腺において選択され、自己反応性のT細胞は除去されているかもしくはアナジーの状態にあると考えられている。H-2M遺伝子ノックアウトを用いた実験では普遍的な自己抗原に特異的なT細胞が胸腺で消失することを示されている。また末梢抗原に対してはT細胞はMHC上に提示されたペプチドを認識しても補助刺激シグナルを欠如するためアナジー

状態になると考えられている。B細胞におけるトレランスも徐々に明かとなり、大きくclonal deletionとアナジーの機構があると示されている。

では自己免疫疾患患者においては、免疫系はT細胞もしくはB細胞においてトレランスの状態、自己抗原を認識するT細胞の存在、自己抗原を産生するB細胞はT細胞に依存的なのかどうか、これらは現在の所明らかではない。

近年、我々は、天疱瘡モデルマウスを作成した。簡潔に述べると、Dsg3^{-/-}マウスではDsg3に関してトレランスが成立していなため、抗Dsg3抗体を作ることが可能である。Dsg3を免疫したDsg3^{-/-}マウス脾細胞をDsg3を有するRag2^{-/-}マウスに移入することにより、移入された細胞はnativeに存在するDsg3を認識し、抗Dsg3抗体を産生し、マウスは天疱瘡用の症状を呈した。

今回はこのモデルマウスをさらに応用しT細胞およびB細胞をそれぞれDsg3^{-/-}もし

くは Dsg3+/-、Dsg3+/+ のマウスから精製し、それぞれの組み合わせにおいてどのような抗体産生反応が起きるか明らかにし、Dsg3 に対する抗体産生的一端を解明することを目的とする。

B. 方法

1. mouse immunization

バキュロウイルスにて作成した mouse Dsg3 10ug を CAF 下で皮下に 2 回、IFA 下で腹腔内に 1 回、可溶性抗原として腹腔内に 1 回、計 4 回、週に 1 回の割合で Dsg3-/- マウスもしくは Dsg3+/- マウスに免疫した。

2. T and B cell purification

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、Auto MACS、Cell Sorter を用い精製した。簡略に述べると脾細胞 10^8 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 Auto MACS を用いて精製した。

3. transfer of splenocytes

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 1×10^6 、 1×10^7 細胞ずつ静脈内に投与した。

4. Flow cytometric analysis

脾細胞は ACK lysis buffer にて赤血球を除いた。細胞は phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19 (1D3)、FITC-conjugated anti-CD4 (GK1.5) で染色した。全ての抗体は PharMingen より購入した。染色した細胞は flow cytometer FACScan で解析し、データ解析には CellQuest software (Becton Dickinson) を用いた。

C. 結果

1. CD4+ T cell and B cell purification

rDsg3 を免疫した Dsg-/- もしくは Dsg3+/-

マウスより CD4+T 細胞は精製し、純度は 99% 以上であった。また B220+B 細胞は Dsg3-/- もしくは Dsg3+/+ マウスより精製し、純度は 95% 以上であった (Fig1A)。

2. recipient splenocytes analysis

脾細胞移入されたレシピエントマウスは最大 10 回 rDsg3 で免疫後、皮膚、口蓋における抗体の沈着、また脾臓内の T 細胞、B 細胞を解析した。Fig1B に示すごとく Rag2-/- コントロールマウスとは異なり、各々の細胞の生着が確認された。

3. analysis of PV phenotype in recipient mouse

レシピエントマウスは最大 10 回免疫後、皮膚、口蓋における、IgG の沈着を凍結切片を作成し、抗 mouse-FITC にて染色し確認した。また経過中、頬部の糜爛、脱毛などの天疱瘡様症状を示すかどうか観察した。Fig2 に示すごとく、症状に関しては 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 (Table 1)。凍結切片における抗体の沈着の評価に関しては、症状を示した 5 匹は明らかに認められたが、Dsg3+/- T、Dsg3-/- B の組み合わせで、2 例にのみ、極めて弱い陽性であった。血清をもちいた PAM 細胞を用いた染色結果も同様であった。

D. 考察

現在まで、T 細胞におけるトレランスの存在は、様々な手法を用いて明らかにされてきたが、B 細胞におけるトレランスの存在はいくつかしか示されていない。末梢抗原に関してはどのようなメカニズムで自己抗体を産生をコントロールしているのか。T 細胞におけるトレランスにより説明されてきたが、今回の実験の結果は、B 細胞においても T 細胞と同様、末梢抗原に対するトレランスの存在を示唆している。もし、存在しないのであれば、Dsg3-/- T + Dsg3+/+ B の組み合わせでも抗体産生がなされるはずである。しかしながら、今回の実験では否定された。Dsg3+/- T + Dsg3-/- B の組み合わせでは、微弱ではあるが抗体産生がみられた。一部の B 細胞は T

細胞非依存的に増殖するが、この組み合わせでは症状を呈する程の抗体産生は行われなかったことを考えると、T細胞依存的であると予測される。また非免疫状態でも脾細胞中に抗 Dsg3 抗体を産生するポテンシャルのある B 細胞がいると考えられる。以上を考えると、脾細胞中に抗 Dsg3 抗体を産生するポテンシャルのある B

細胞がいるという結論になる。本年度は、本モデルマウスをさらに発展させ、Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞中における抗 Dsg3 抗体を産生可能な B 細胞の頻度、また非免疫状態での T 細胞、B 細胞の様々な組み合わせなどを行い、検討する予定である。

Table 1: Summary of the combination experiments of T and B cells

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

The PV phenotype was demonstrated only in the recipient mice with Dsg3^{-/-} T cells and Dsg3^{-/-} B cells. No apparent phenotypic change was observed in any of these mice with various combinations of T and B cells.

Fig1A

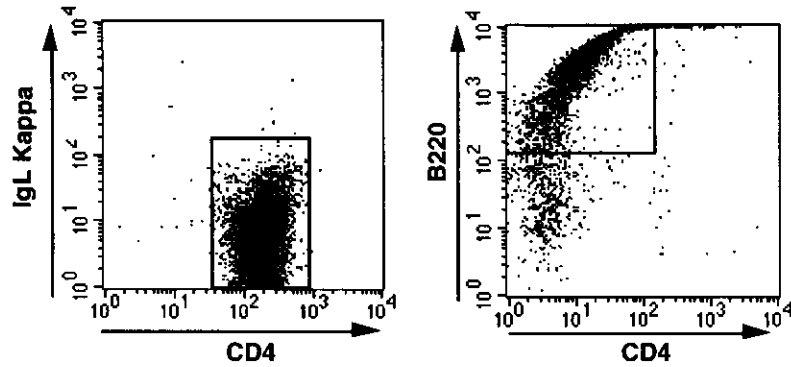


Fig1B

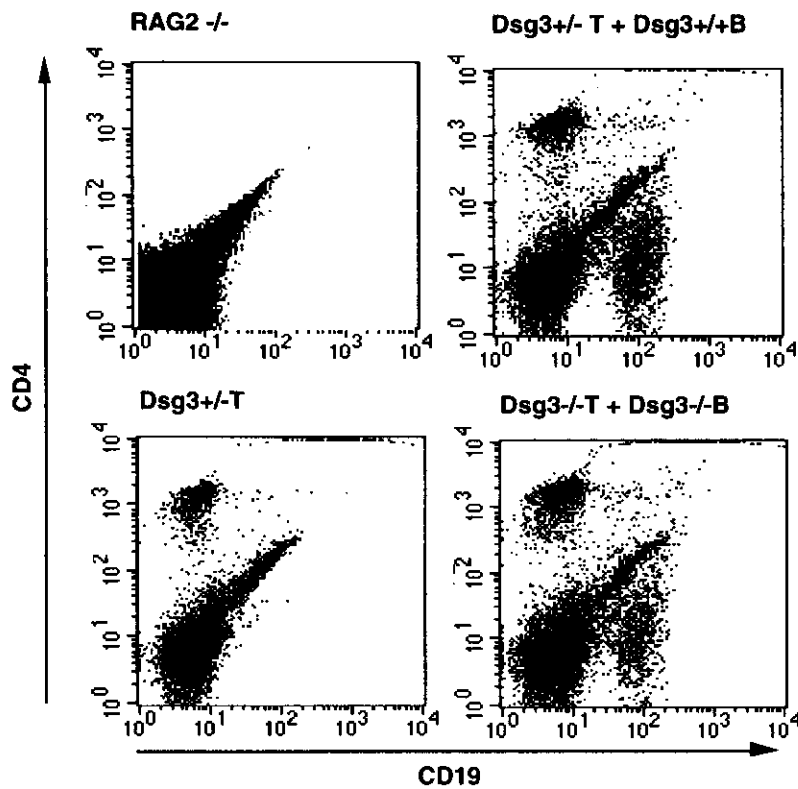


Fig1A and 1B: FACS analysis with transferred splenocytes

A. CD4⁺ T cells were purified using AutoMACS and FACS-Vantage. The purity of obtained T cells was over 99%. B220⁺ B cells were purified using AutoMACS only. The purity of B cells was over 95%.

B. In recipient mice, CD4⁺ and CD19⁺ cells were detected in spleen 10 weeks after the transfer. Splenocytes were stained with anti CD19-FITC and anti CD4-PE and analyzed with FACScan.

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

抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成

分担研究者 小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物学 教授

研究要旨 尋常性天疱瘡は水疱形成を主徴とする自己免疫疾患であり、表皮細胞間接着因子の1つであるデスモグレイン3（Dsg3）に対する自己抗体が水疱形成を誘導する病的役割をしている。一方、現在まで様々な系を用い、B細胞のトレランスとして、clonal deletion と anergy が提唱されてきた。しかしながら、自己抗原に対するトレランスの破綻理由までは解明されてなく、さらにほとんどの系において生理的でない抗原を用いている。Dsg3 は主に皮膚、粘膜に発現しており、骨髄には発現していない。したがって B 細胞における末梢抗原に対するトレランスを解析するのに適していると考えられる。今回我々は、独自に得られた抗 Dsg3 抗体を産生するクローンから、B 細胞表面に抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、生理的な環境下での自己抗原に対する B 細胞の運命を明らかにする。

研究協力者

大田孝幸 慶應義塾大学医学部大学院生

A 目的

尋常性天疱瘡は水疱形成を主徴とする自己免疫疾患であり、表皮細胞間接着因子の1つである Dsg3 に対する血中 IgG 自己抗体が水疱形成を誘導する。なぜ人において、自己抗体が産生されるようになるかは現在の所不明である。

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、抗原に応答できない。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。また今回用いる系では、Dsg3 を

過剰に発現させるのではなく、生理的に存在する、さらに実際に病気と関連していることが大きな特徴である。以上を踏まえ、抗 Dsg3 自己抗体トランスジェニックマウスを作成し、Dsg3 に対する B 細胞免疫寛容がどのような機序で過去得られるかを解析する。

B 研究方法

H 鎖、L 鎖 cDNA のクローニング

1. Construction of transgenes

H鎖およびL鎖の可変領域のcDNA断片 (VH、VL) は anti-mDsg3 IgG1 producing hybridoma AK7 よりRT-PCRにて増幅した。簡潔に述べるとtotal RNA はAK7細胞から調整、oligo-dT15 primer と Superscript II RNaseH reverse transcriptase (Gibco/BRL, Rockville, MD) に42° C 50分間、反応させた。続いて、H鎖およびL鎖特異的なプライマ Mixを用いPCR を35cycle行った。(0.5 min at 96° C, 1 min at 55° C, 1 min at 72° C) これらのプライマーはほとんどのH鎖およびL鎖を増幅できるようにデザインされている。得られた、H鎖およびL鎖をアガロースゲルにて生成し、リンカーを含むプライマー-scFor、scBackにて全長を増幅した。得られた断片を SfiI にて O/N 反応後、pCANTAB5SH(pCANAB5Eを改変)にクローニングした。コンピテントセル XL1-Blue(MRF-)にエレクトロポレーションにてトランスフォームし、1%Glucose-LB Ampr プレートに播いた。24クローンを選択し、M13KO7 helper phageを感染させ、一本鎖抗体をファージ上に発現させた。mDsg3 20ng/mlを MaxiSorp Plate(Nunc biotech)に固相化し、得られたファージを用い、ELISA を施行し、mDsg3を認識するクローンを同定した。なお2次抗体として anti-M13 HRP(amersham pharmacia)を用い、TMBを基質として発色させた。得られた5クローンを ABI 310sequencerを用い、塩基配列を同定した。それぞれの可変領域の塩基配列は全て同一であった。7AK-c12を用いtransgenic の vectorを作成した。この領域にはシグナルペプチドを含まないため、松岡らにより同定された抗TNP抗体を産生するハイブリドーマ IGEL b4 (ATCC, Rockville, MD; TIB141) よ

り得られた、genomic塩基配列を用いた。L鎖 2KbPvuII-PstI断片はanti TNP-L HindIII-HindIII、7AK-c12をテンプレートとし、PCRにて合成し、pet32bf(pet32b-pvuII deficient vector; Novagen)にクローニングし塩基配列を確認した。pMM222よりL鎖のプロモータ領域PvuII-PvuII4kb断片、定常領域、エンハンサーを含むPstI-PstI 10kb断片をそれぞれ精製し、PvuII-PstI 2kb断片と共にpet32bfにクローニングした。(7AK-L) L鎖同様、可変領域を含むXbaI-XbaI2.5Kbp断片はanti TNP-H EcoRI-EcoRI、7AK-c12をテンプレートとし、PCRにて合成し、pet32bfにクローニングし塩基配列を確認した。anti TNP-H EcoRI-EcoRIは3をmutagenesisにてSal-EcoRIと改変し、pet32bfにクローニングし、Xba-XbaI断片を7AK由来のものに置き換えた。エンハンサー領域、ならびに定常領域をVH167よりEcoRI断片として精製し、EcoRIサイトにクローニングした。(7AK-H)えられた、7AH-L、7AK-Hはミエローマ細胞にエレクトロポレーションにてトランスフェクトし、培養上清をmDsg3に対し、ELISAを施行し、抗体の発現を確認した。

2. Generation of transgenic mice

anti-mDsg3 IgM H鎖とL鎖のベクター7AK-H、7AK-LはH鎖のみ、もしくはH鎖、L鎖、当量混合し、C57BL/6 マウス (Taconic) 受精卵にマイクロインジェクトし、トランスジェニックを作成した。H鎖のみのトランスジェニックでは24匹中5匹にPCRにて遺伝子の存在を確認した。

3. ELISA

培養上清中の抗Dsg3 IgMはELISAにて確認した。簡潔に述べると、バキュロウイルスにて作成したrecombinant mDsg3をTALONカラムにて精製した。

精製した蛋白を10ng/mlにPBS-1mM Caに希釈し、MaxiSorp Plateに固相化した。2次抗体として、Rabbit anti mouse IgM-mu specific抗体(Zymed)、3次抗体としてanti Rabbit-HRP(PharMingen, San Diego, CA)を用い測定した。

4. Flow cytometric analysis

末梢血は ACK lysis buffer にて赤血球を除いた。細胞は phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19 (1D3)、 FITC-conjugated anti-IgM^a (DS-1), anti-IgM(R6-60.2)で染色した。全ての抗体は PharMingen より購入した。染色した細胞は flow cytometer FACScan で解析し、データ解析には CellQuest software (Becton Dickinson)を用いた。

C 結果

1. 抗 mDsg3 抗体を産生する 7AK 由来、一本鎖抗体の作成

Kreber Aらにより提案された、primer mix を用い、H鎖、L鎖を増幅し(Fig1)、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(Fig2)。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、12クローン、mDsg3 に対しスクリーニングを行った(Fig3)。

2. mDsg3 特異的な IgM トランスジェニックマウスの作成

抗 mDsg3 抗体をコードするリコンビナント遺伝子、H鎖、L鎖は Fig4 のように作成した。C57BL/6 由来、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細胞表面と血液ない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。

D 考察

現在の所、H鎖のみのトランスジェニックマウスは末梢血で、トランスジーンが発現が確認されている。詳細な解析は両鎖のトランスジェニックマウスが数系統できてからになるが、おそらく骨髄においては Goodnowらに示されたように、トランスジーンは正常に発現するが、抗原が異なるという点で HEL-Igを用いた時のように、B細胞が、脾臓や、末梢血に見られるかどうかは不明である。しかし今回用いている遺伝子は IgD の領域は用いていないので、全てを単純に比較することはできない。今後、まず脾臓、末梢血で B細胞が deletion しているかどうか、Dsg3^{-/-}とかけると、B細胞は正常に分化できるかどうか、mouse Dsg3 を強制免疫をするとトレランスがはずれかどうかなどを検討する予定である。

謝辞 pMM222 を提供していただいた Dr H. Sakano, pVH167 μ に提供していただいた Dr. U. Storb、TNP-IgE-H と L を提供していただいた Dr. H. Karasuyama、Dr. K.Matusoka に感謝します。

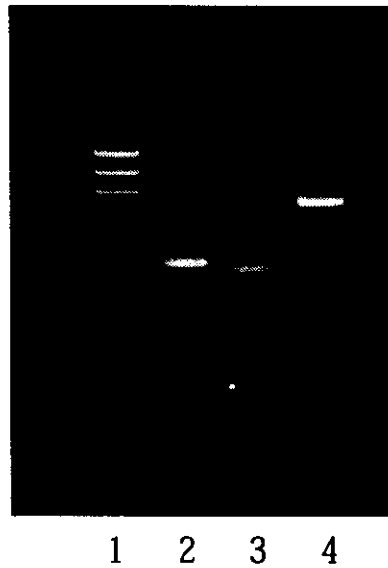


Fig1: PCR amplification of 7AK Heavy and Light chain
 1: ϕ x-HaeIII marker, 2: Heavy chain, 3: Light chain, 4: H and L chain

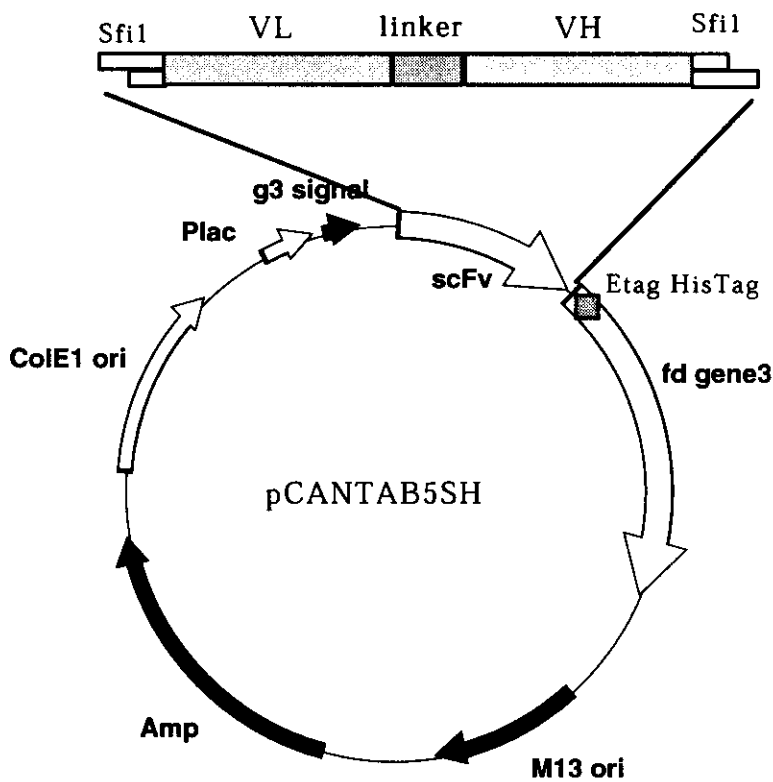


Fig2: scFv expression vector

ScFv gene was cloned into the *Sfi* I-digested pCANTAB 5SH vector. Phage rescue of the transformed cells with M13KO7 helper phage resulted in production of recombinant phage containing a copy of the DNA encoding a specific antibody scFv

gene. The recombinant phage displays one or more copies of the corresponding recombinant antibody as fusion proteins on their tips.

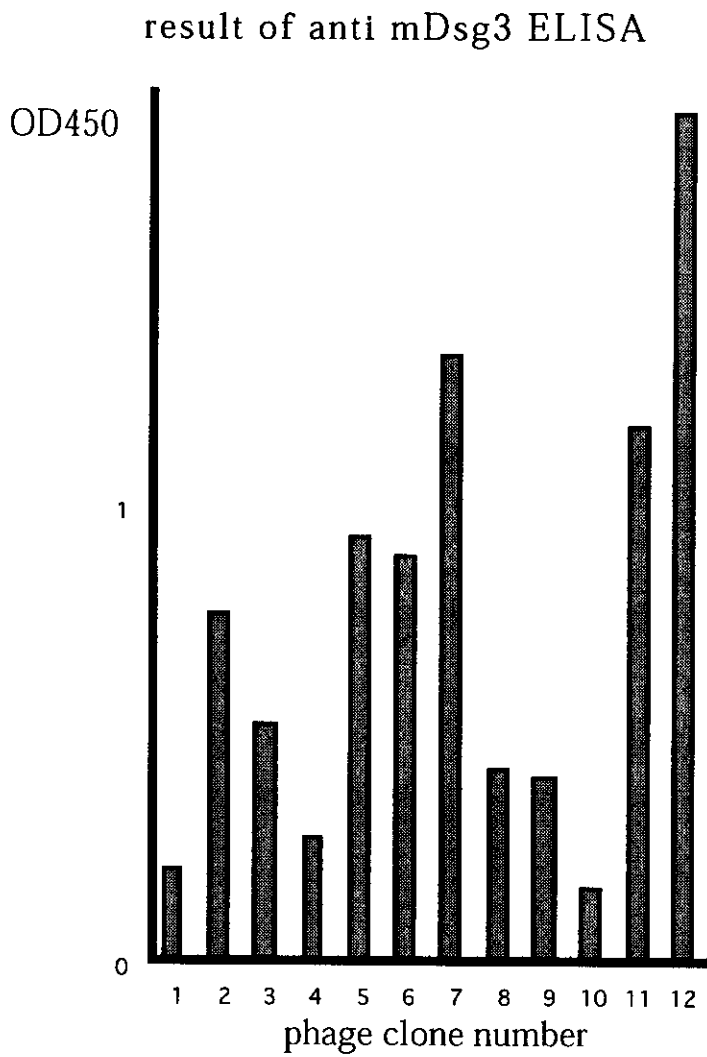


Fig3: ELISA assay of recombinant phages. Each obtained phage was selected by anti mouse Dsg3 ELISA. 6/12 clones were positive

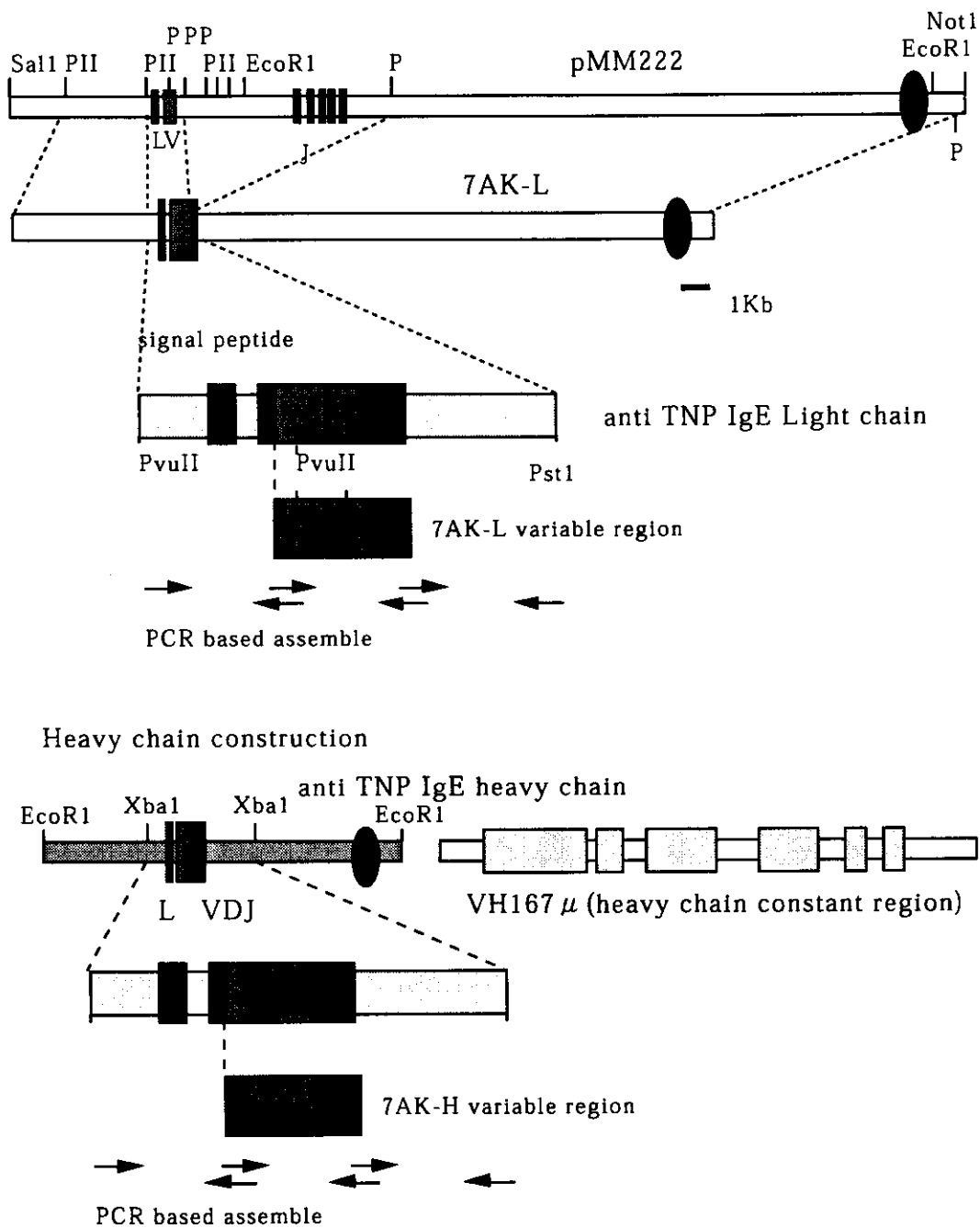
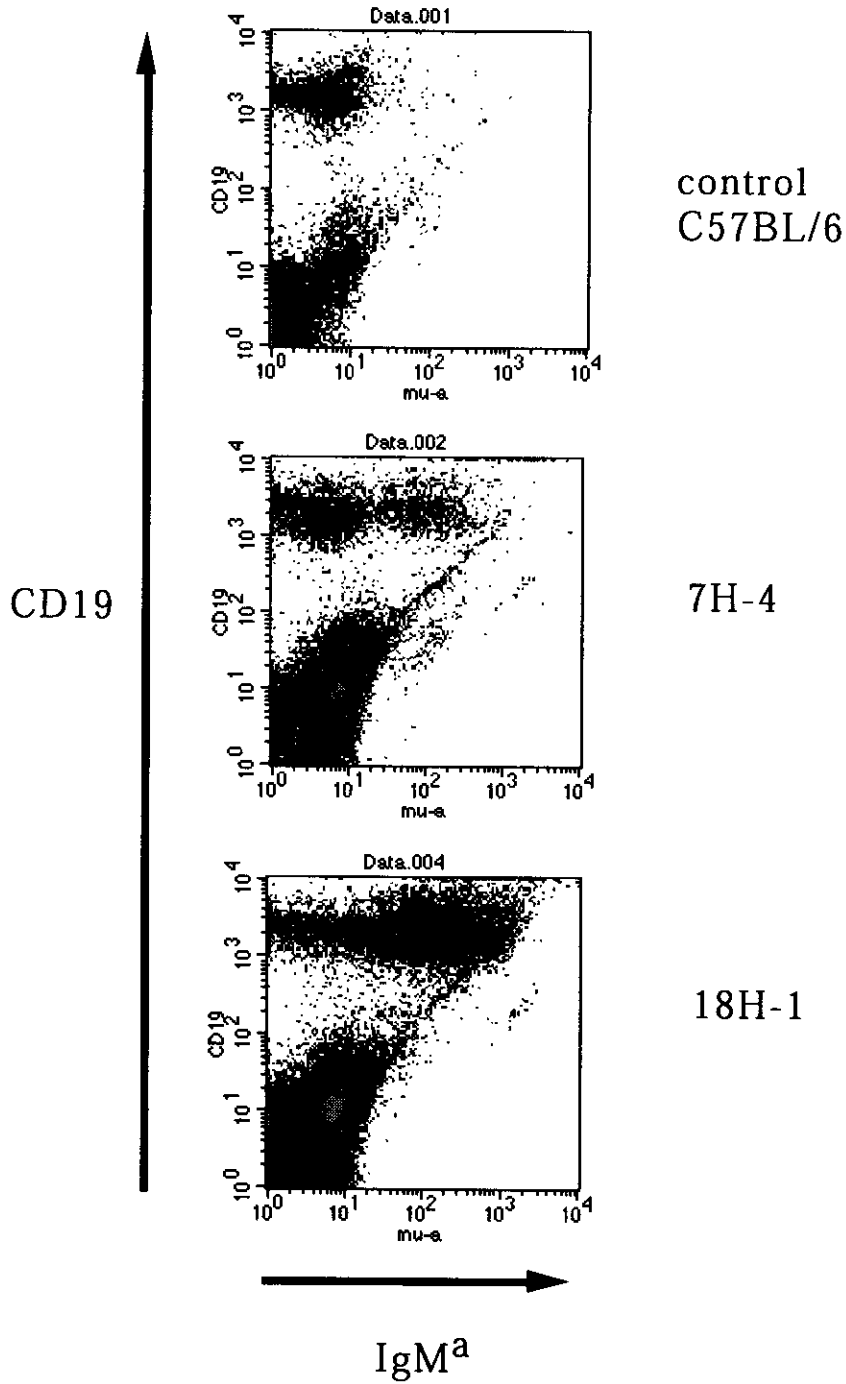


Fig4: Heavy and light chain construction

PCR assembled Heavy chain PvuII-PstI fragment and XbaI-XbaI fragment were cloned into each expression vector containing promoter region and constant region.

H chain transgenic mouse



H chain transgenic mouse

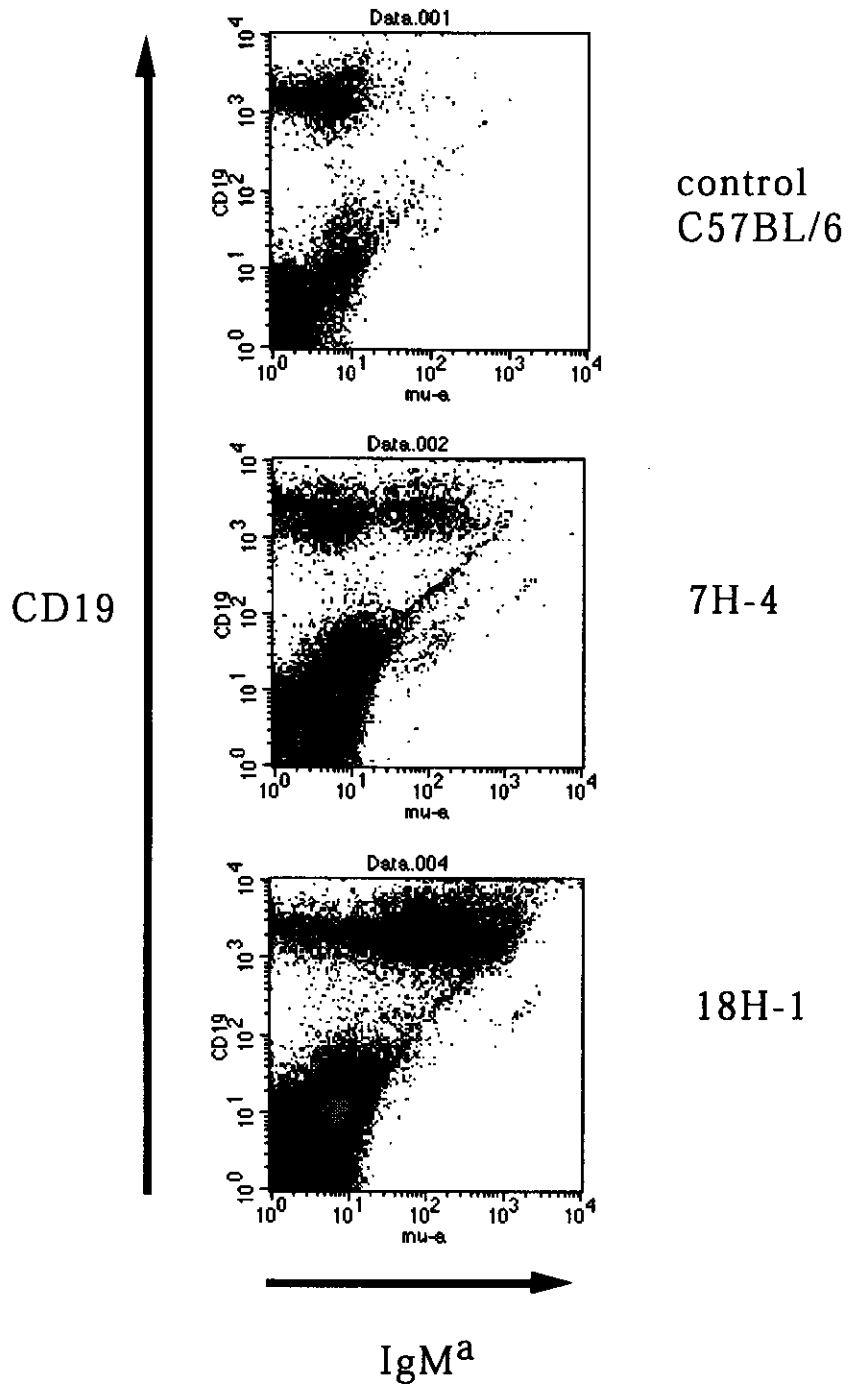


Fig6: peripheral mononuclear cells were stained with FITC-IgM^a and PE-CD19. In both line(7H and 18H), transgene(Ig-H) expression was confirmed.

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

シェーグレン症候群モデルマウスの作製

分担研究者 小安重夫 慶応義塾大学医学部微生物学 教授

研究要旨：ムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 のノックアウトマウスは唾液の分泌が低いために固形餌の摂取が悪いことが明らかになった。これはシェーグレン症候群患者の病状に類似する。そこでシェーグレン症候群の標的抗原がムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 である可能性を考え、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を用いてシェーグレン症候群のモデルマウスを作製することを目指した。現在までにノックアウトマウスを2系統のマウスに戻し交配し、遺伝的背景が比較的均一なマウスを樹立した。このマウスを用いて、本研究班が開発した方法を応用した自己免疫疾患モデル動物の作製を開始した。

本研究班のアプローチの基盤をなすものは自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫反応の誘導法である。すなわち、これまでに報告されてきたように、ノックアウトマウスにおいては、欠損する遺伝子産物に対する自己寛容が成立しておらず、その抗原を非自己をみなす。そこで、ノックアウトマウスにその遺伝子産物を投与することによって免疫反応を誘導することが出来る。さらにそのノックアウトマウスの免疫担当細胞を正常マウスに移植することにより、誘導された免疫反応を正常動物に誘起することが可能になる。この方法を用いて尋常性天疱瘡のモデルマウスの作製に成功したのはこれまでに報告された通りである（1）。本方法は、ノックアウトマウスが致死であったり、免疫不全に陥らないかぎり様々な抗原に応用が可能である。また、本法を用いて作製した自己免疫反応によって引き起こされる症状が既知のヒト疾患に類似していた場合には、逆の方向から自己抗原が明らかになる可能性がある。多くの自己免疫疾患、特にT細胞が主役の細胞性免疫反応によって誘導される疾患の場合には、その自己抗原を同定することは容易ではない。しかし、本法によって自己抗原が明らかになり、さらにモデル動物が作製できるのであれば治療法の開発にも応用が可能となり一石二鳥である。また、ある遺伝子産物の機能を解析するためにノックアウトマウスを作製するわけであるが、しばしば同じファミリーに属する類似の遺伝子産物の発現量が増大し、それによって機能が代替されるために表現形が

現れないことことがある。本法によって自己免疫反応を誘導して組織への攻撃が起こる場合には、そのような代替反応が起こる可能性は低いと思われる。したがって、場合によっては目的の遺伝子産物の機能を検討する方法としてよりすぐれた方法になりうる。

以上のことから、尋常性天疱瘡以外の自己免疫疾患のモデル動物の作製に本法を応用するべく本分担研究を計画した。本研究を計画するに至った発端は現東京大学薬学部の松井稔博士との討論である。シェーグレン症候群は、腺組織の機能不全によって唾液や涙液の分泌の低下などが見られる。腺組織が標的である可能性が高いがその標的抗原は不明である。松井博士は神経系の機能の研究を進めるために一連のムスカリン性アセチルコリン受容体のノックアウトマウスの樹立と解析を行ってきた。5種類の遺伝子の中で M3 と名付けられた遺伝子産物はもともと脳、平滑筋や腺組織に多く発現が見られることが知られていたが、そのノックアウトマウスを作製したところ、唾液の分泌が悪く、ホモのノックアウトマウスは固形餌の摂取が悪いことに気がついた。そこでシェーグレン症候群とムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 の関係が浮かび上がった。同じころに、シェーグレン症候群の患者において血中にムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 に対する自己抗体が見られるという報告があった。そこで、上記の方法を応用することによってシェーグレン症候群のモデルマウスが作製できるのではないかと考えた。ムスカリン性アセチルコリン受

容体 M3 の表現形を詳しく調べた結果、このノックアウトマウスにおいては、確かに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(図1A)。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(図1B)。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(2)。

そこで上記の方法を利用し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する実験を開始した。まずこの場合に抗体が主要なエフェクターであるかT細胞が主要なエフェクターであるかが不明なため、なるべくバックグラウンドが低い条件で解析を進めるため、まず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遺伝的背景を均一にするための戻し交配を行った。C57BL/6 と DBA/2 の2系統へ戻し交配を開始し、現在までのところ7代が完了している。またノックアウトマウスに免疫反応を誘導するために、尋常性天疱瘡の場合には昆虫細胞で発現させたりコンピナントタンパク質を用いたが、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 は膜7回貫通タンパク質であるがゆえに可能性のリコンピナントタンパク質を作製することは困難である。また、誘導される自己免疫反応が抗体を主とするものではなくT細胞の反応を主とするものである可能性もある。そこで、マウスのムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 を C57BL/6 の胸腺腫由来の細胞株である EL-4 に導入し安定発

現株を作製した(図2)。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。また、ヒトのシェーグレン症候群においてムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 に対する自己抗体がどのような頻度で検出されるかを調査するために、ヒトのムスカリン性アセチルコリン受容体 M3 を発現する細胞株を作製中である。シェーグレン症候群の患者の血清中の M3 特異的な抗体価の検討は血液内科の協力を得て行う予定である。

文献

- (1) Amagai, M., Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S. and Nishikawa, T. (2000) Use of autoantigen knockout mice to develop an active autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* 105:625-631
- (2) Matsui, M., Motomura, D., Karasawa, H., Fujikawa, T., Jiang, J., Komiya, Y., Takahashi, S. and Taketo, M. M. (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9579-9584

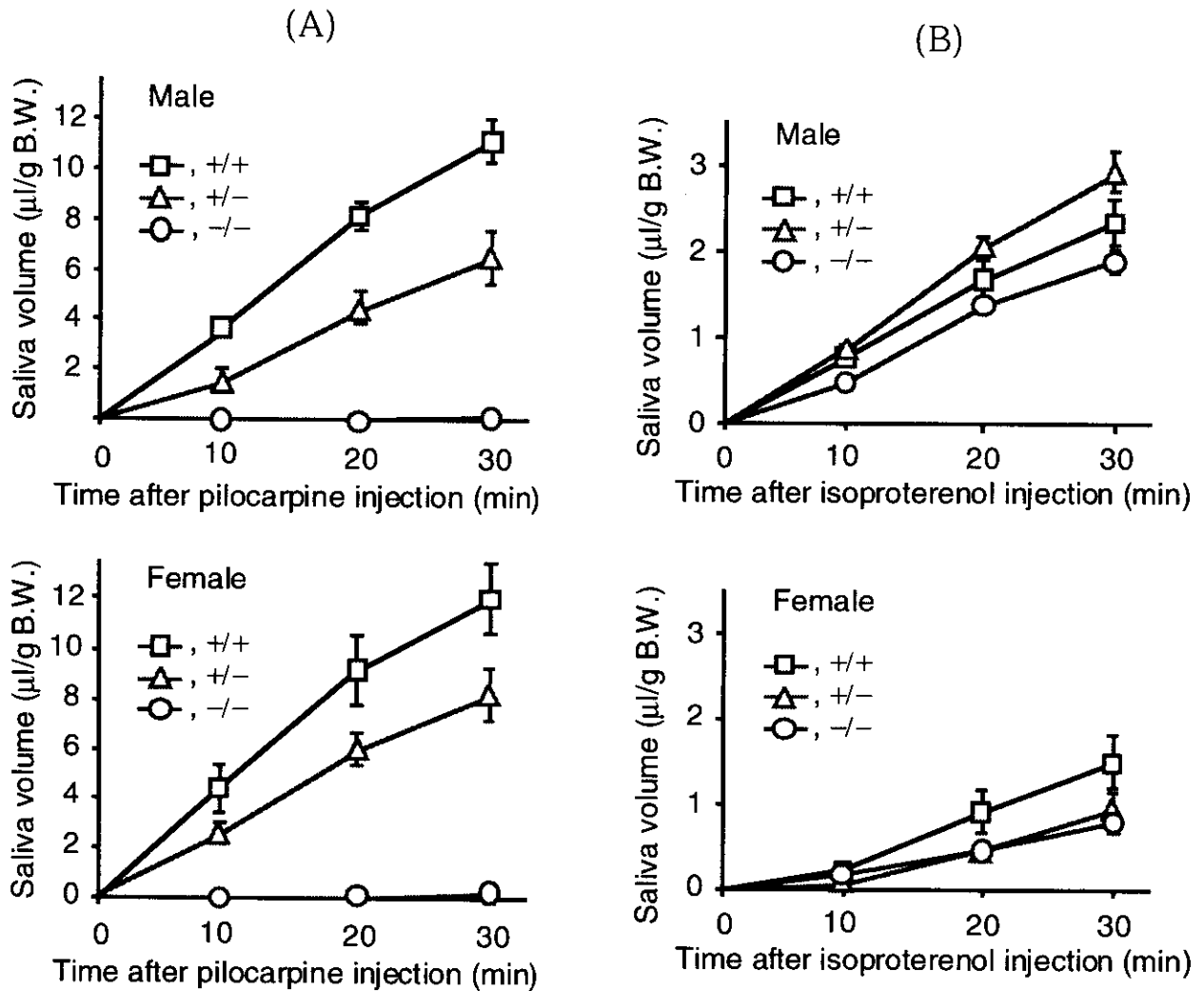


図1 M3 ノックアウトマウスはピロカルピンに対する唾液の分泌誘導不全を呈する。6-8ヶ月令の野生型 (+/+), ヘテロザイゴート (+/-), ヒモザイゴート (-/-) のマウスを数時間絶食させ、麻酔下に (A) pilocarpine (1 mg/Kg) あるいは (B) isoproterenol (0.3 mg/Kg) を皮下に投与した。その後30分間の唾液の分泌を測定した。(松井ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:9579-9584, 2000 より引用)

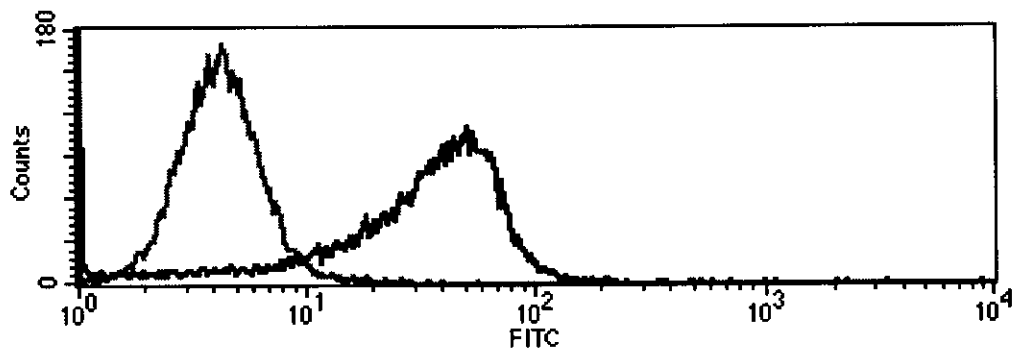


図2 遺伝子導入 EL4 株におけるマウス M3 の発現

マウス M3 のN端に Myc タグを添加した cDNA をマウス胸腺細胞腫株 EL-4 に導入し、安定発現株を得た。Alexa488 を結合した、Myc に対する単クローン抗体 9E10 を用いてその発現を検討した。親株を同一の抗体で染色したものをコントロールとした。

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

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

分担研究者 天谷雅行 慶応義塾大学医学部皮膚科専任講師

研究要旨：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（SSSS）において、原因菌である黄色ブドウ球菌の産生する表皮剥脱性毒素（EFTa）の標的蛋白が、落葉状天疱瘡の自己抗原と同じ Dsg1 であることを我々は本研究班の研究施行過程において明らかにした（Amagai et al, Nature Medicine 6:1275-1277, 2000）。このことにより、皮膚感染症により天疱瘡の自己抗原である Dsg1 が修飾を受けるという事実が明らかとなったわけである。本研究では、EFT 産生黄色ブドウ球菌感染後の Dsg1 に対する免疫応答を検討し、感染症と自己免疫発症の関係を明らかにするとともに、EFT 投与による Dsg1 に対する自己抗体産生モデルを開発することを目的とする。本年度は、EFT の標的蛋白を明らかにした過程について報告する。

はじめに

感染症は 21 世紀を迎える今日においても重要な社会問題であり、解明されていない点も未だ多い。伝染性膿痂疹（impetigo contagiosa, IC）は、小児に発症する代表的な皮膚細菌感染症であり、強い伝染性を有し、家族内あるいは集団発症が多く認められる。いわゆる“とびひ”とも呼ばれ、夏季に、主として乳幼児の顔面、体幹、四肢に、水疱が次々に発生し、容易に破れてびらん面と化し、白色から黄色の痂皮を被る（水疱性膿痂疹：bullous impetigo, BI）。これらは、黄色ブドウ球菌の感染により生じ、黄色ブドウ球菌により産生される表皮剥脱性毒素（exfoliative toxin, EFT）により、表皮上層に裂隙を生じるとされている。

BI を局所型とすると、全身型がブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群（Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS）である。乳幼児にかかりやすく、特に新生児では重症化しやすく、リッター新生児剥脱性皮膚炎（Dermatitis exfoliativa neonatorum Ritter）、新生児天疱瘡（pemphigus neonatorum）とも呼ばれる。免疫不全を伴う成人にも認められることがある。咽頭、鼻孔、眼脂などに黄色ブドウ

球菌が検出され、ブドウ球菌の産生した EFT が血流を介し全身皮膚に至り、表皮上層の顆粒層のレベルで裂隙を生じると考えられている。全身管理および抗生物質の投与の治療により一般的に予後は良好であるが、近年では薬剤耐性黄色ブドウ球菌による症例も報告されており、社会的問題となっている。

BI および SSSS における EFT の水疱形成における役割は、1970 年に Melish と Glasgow の実験により明らかにされている。患者より分離された黄色ブドウ球菌の産生する EFT を新生仔マウスに打つと、数時間後にマウスに皮膚剥脱が認められる。しかし以来約 30 年間、EFT の表皮剥脱における作用機序は不明のままであった。EFT の遺伝子が単離され、アミノ酸一次配列からタンパク分解酵素の活性をもつことが予想されるも標的蛋白が不明であった。また、EFT がスーパー抗原の活性を持つことが唱えられた際は、EFT に対する生体の過剰な免疫反応により水疱形成が起こる可能性も議論された

落葉状天疱瘡とブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群

天疱瘡は、落葉状天疱瘡（pemphigus

foliaceus、PF)と尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris)に大別される。尋常性天疱瘡がほぼ全例において口腔粘膜に病変を認めるのに対し、PF では、皮膚のみに鱗屑、痂皮を伴った紅斑と小水疱、びらんが認められる。水疱の病理組織像は、表皮細胞間の接着が失われ、表皮内に裂隙形成を認める。PF では表皮上層の顆粒層のレベルで、尋常性天疱瘡では表皮下層の基底層直上に裂隙形成が認められる。

これらの細胞間接着障害は、患者血清中に存在する IgG 型の自己抗体により誘導される。自己抗体の標的とする天疱瘡抗原は、デスモゾームという細胞接着装置の構成膜蛋白であるデスモグレイン (Dsg) であることが明らかにされている。PF 抗原は、デスモグレイン 1 (Dsg1) であり、尋常性天疱瘡抗原はデスモグレイン 3 (Dsg3) である。天疱瘡における基本的病態生理は、自己抗体が抗原蛋白 Dsg の接着機能を阻害することにより、表皮細胞間接着障害が誘導され水疱が生じると理解されている。Dsg1 は、表皮において全層に発現が認められるが、上層により強く発現が認められ、表皮上層において Dsg3 の発現は認められない。従って、抗 Dsg1 抗体を有する PF においては、表皮上層における水疱が形成されることになる。

PF と SSSS の臨床所見、病理所見を比較してみるとこれが実によく似ている。PF も SSSS も皮膚以外の他の臓器は侵されず、粘膜に病変を見ず、皮膚にのみ病変が限られている疾患であること。病理組織学的には、ともに表皮上層のレベルで表皮細胞間の接着が障害され、水疱が形成されていること。PF の患者血清から IgG を精製して新生仔マウスに打つと水疱形成が誘導されるが、EFT を新生仔マウスに打つと、やはり水疱が誘導されること。さらに、新生仔マウスに誘導された水疱の病理組織学的所見は全く見分けがつかない程、近似していること。これらのことから、EFT の標的蛋白が、Dsg1 であるという仮説のもとに以下の実験を行った。

黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素 (EFTa) の標的蛋白は Dsg1 である

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。

今後の展開

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。EFT は、蛋白配列の相同性からセリン蛋白分解酵素の仲間であることが予想されていたが、標的蛋白が同定され、特異的な酵素活性が確認されたことにより、EFT のタンパク分解酵素としての機能も確認されたことになる。

SSSS は、以前一時期新生児天疱瘡 (pemphigus neonatorum) とも呼ばれていた。機序も何も不明なその時期に、臨床像から天疱瘡という命名をしていた先人たち皮膚