

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 13 年度研究報告書

平成 14(2002)年 3 月

主任研究者 天 谷 雅 行

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成13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 教授 西川 武二	
金コロイド免疫電顕法を用いた天疱瘡モデルマウスの解析	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	26
慶應義塾大学医学部皮膚科 助教授 田中 勝	
古典的天疱瘡における抗原3次元エピトープの解析	28
慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 西川 武二	
腫瘍随伴性天疱瘡における3次元エピトープの解析	37
慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 西川 武二	
ナイーブ細胞移植を用いた天疱瘡モデルマウスの作製	43
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おける抗原3次元エピトープの解析	47
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おける自己抗体産生機序の解析	51
慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授 小安 重夫	
モデルマウスを用いた病的活生を持つモノクローナル抗体の作成に関する研究	56
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	

抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成	63
慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 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	69
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み	73
慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授 小安 重夫	
自己抗原の胸腺発現と自己免疫：PO ノックアウトマウスによる解析	78
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 部長 山村 隆	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	87
V. 平成13年度班会議プログラム	91

I. 平成13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・免疫学	教授
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	部長

(事務局) 岡嶋万里子

〒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@sc.itc.keio.ac.jp

Ⅱ. 平成 13 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、自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞（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ことを目的としている。本年度は3年計画の最終年度であり、昨年度までの成果をもとに、天疱瘡モデルマウスの病理学的・免疫学的解析、水疱誘導活性を持つ病的モノクローナル抗体の単離、抗体エピトープの解析を行うとともに、ナイーブ脾細胞を用いるモデルマウス作成法の改良に成功した。さらに、モノクローナル抗体 cDNA より自己反応性B細胞トランスジェニックマウスを作成した。また、本研究で開発した方法の他疾患への応用として、末梢神経の構成蛋白 P0 のヘテロ・ノックアウトマウス (P0+/-) を用いた自己免疫性神経炎モデルマウスを作成し、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の開発を試みた。作成されたモデルマウスは、それぞれの疾患の病態解明、種々の免疫抑制治療法の評価、抗原特異的治療法の開発に重要なツールとなった。

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
山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部部長

A.研究目的

本年度は、一期3年の最終年度として、作成された天疱瘡モデルマウスの詳細な病理学的検討、免疫学的検討を完了させるとともに、天疱瘡の病態解明、天疱瘡抗原に対する自己免疫寛容の成立のメカニズムの解明を目指す。また、本作成法を応用して自己免疫性神経炎、シェーグレン症候群のモデルマウス作成を試みる。

B.研究方法

1) 天疱瘡モデルマウスの病理学的検討
PVに特徴的とされる表皮細胞間の棘融解 (acantholysis) 像以外の疾患特異的な病理組織所見として、好酸球浸潤を伴った海綿状態 (eosinophilic spongiosis) の有無につき PV モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスの両群を対象に検討するとともに、本モデルマウスを免疫学的にさらに詳細に解析した。

2) 天疱瘡モデルマウスの電顕的検討

尋常性天疱瘡 (PV) は自己抗体が標的抗原である Desmoglein 3 (Dsg3) と結合することにより棘融解を生じる自己免疫性水疱性疾患であるが、その病態発生機序として、患者表皮の Desmosome (DM) の狭い接着板 (AP) 間に存在す

る Dsg3 に対し、抗 Dsg3 自己抗体がどのように到達し結合しているか、については未だ議論の分かれるところである。そこで我々は、Post-embedding 金コロイド免疫電顕法を用い、PV モデルマウス (PV マウス) の口腔粘膜における自己抗体の微細局在と、レシピエントマウスである Rag2^{-/-}マウスの口腔粘膜に PV マウス血清を反応させた標的抗原の微細局在とを明らかにし、それらの微細局在部位の分布の統計学的解析を行った。

3) ヒト疾患における天疱瘡抗原三次元エピトープの解析

天疱瘡抗原デスマグレイン (Dsg) の 3 次元エピトープマッピングを行い、さらにその病原性について評価した。すなわち、互いに相同性の高い Dsg1 と Dsg3 の細胞外領域を様々な領域で入れ換え、Dsg 全体の立体構造を安定させることで一定領域の Dsg1 または Dsg3 の立体構造を保存したスワッピング分子を作製し、PF および PV 患者血清を用いて Competition ELISA を実施し 3 次元エピトープマッピングを行った。

さらに、新しい天疱瘡の疾患概念である腫瘍随伴性天疱瘡においても同様のエピトープの解析を行い、古典的天疱瘡と比較をする。

4) ナイーブ細胞移植を用いた天疱瘡モデルマウスの作製

これまでの天疱瘡モデルマウスの作成法は、rDsg3 で免疫した Dsg3^{+/+}マウス脾細胞を Dsg3 を発現するレシピエントマウス (Rag2^{-/-}マウス) へ移植するものであった。本研究では、rDsg3 で免疫せずに Dsg3^{+/+}マウスのナイーブな脾細胞がレシピエントマウス内において内在性の Dsg3 により刺激され、抗 Dsg3 IgG 抗体を産生し、天疱瘡の表現型を誘導するか

検討した。

5) 天疱瘡モデルマウスにおける抗原 3 次元エピトープの解析

ヒト疾患におけるエピトープ解析と同様の手法を用いて、天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 における 3 次元エピトープ解析を行う。

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

PV モデルマウスを用いて、Dsg3 に対する自己抗体産生機序について解析を行った。すなわち、PV モデルマウス作製では、組み換え Dsg3 にて免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を、Dsg3 を発現する Rag2^{-/-}マウスに移植する方法で行っていた。そこで Dsg3^{-/-}マウス、Dsg3^{+/-}マウス、Dsg3^{+/+}マウスの T 細胞、B 細胞をさまざまな組合せで Rag2^{-/-}マウスに移植する事により、いかなる細胞レベルでの免疫寛容の破綻が PV の発症に関与しているかを検討した。

7) 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

モデルマウスの脾細胞数とマウス骨髄腫細胞株 P3 細胞数を 1:5 に調整しポリエチレングリコール 4000 を用いて常法に従って細胞融合を行った。抗 Dsg3 抗体産生を確認後、合計 3 回のクローニングを行いモノクローナル抗体を樹立した。新生仔マウスへモノクローナル抗体を注射し、病原性の確認を行った。また、免疫不全マウスへハイブリドーマを移入し、病原性を確認を行った。生後 4 週齢の Rag2^{-/-}マウス腹腔内に 500 μ l のプリスタンを注射し 1 週間後に 1×10^7 以上のハイブリドーマを接種した。接種後 7-10 日で十分な腹水の貯留を確認し、

PV の表現型の有無を確認した。

8) 抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成

自己抗原に対するトレランスの破綻機構はいまだ解明されておらず、さらに生理的でない抗原を用いた系における解析から現在のドグマが推論されている。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た。

9) 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

水疱性膿痂疹(BI)およびブドウ球菌性熱傷様症候群(SSSS)は、黄色ブドウ球菌の産生する表皮剥脱性毒素(ET)により、表皮内に裂隙を形成して落葉状天疱瘡(PF)に類似した臨床像、および病理組織像を呈する疾患である。昨年度の研究において、我々は ET の一つ ETA が、落葉状天疱瘡(PF)の自己抗原であるデスマグレイン(Dsg) 1 を標的蛋白とすることを明らかにした。本年度はさらに ETB の標的蛋白について検討を加える。

10) シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み

我々は尋常性天疱瘡モデルマウスの作製に用いた方法を他の自己免疫疾患に応用すべく、ムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプ 3 (M3) を標的としシェーグレン症候群モデルマウスの作製を試みた。

11) 自己抗原の胸腺発現と自己免疫：

P0 ノックアウトマウスによる解析

Myelin protein zero (P0) は末梢神経の主要構成蛋白であり、そのヘテロ欠損マウス (P0+/-) はリンパ球浸潤を伴う神経炎を自然発症する。我々は P0+/-マウスが P0 (180-199)ペプチド感作による実験的自己免疫性神経炎 (EAN) に対する感受性を検討し、その機序を解析した。

C. 研究結果および考察

1) 天疱瘡モデルマウスの病理学的検討

PV モデルマウスは IgG1 優位の抗 Dsg3 IgG 循環抗体を有し、eosinophilic spongiolysis はモデルマウス群においてのみ認められることが明らかとなった。

2) 天疱瘡モデルマウスの電顕的検討

天疱瘡モデルマウスにおいて、PV 自己抗体と標的抗原である Dsg3 の局在部位は、DM の AP 間に特異的に認められ、両者の分布パターンはほぼ同様の分布を示した。このことから、PV の水疱発生機序は DM の向かい合った AP 間に存在する Dsg3 の細胞外領域に対し、PV 自己抗体が直接到達し結合することで細胞接着が阻害され引き起こされていることが示唆された。

3) ヒト疾患における天疱瘡抗原三次元エピトープの解析

PF および PV 患者血清を用いた検討において、Dsg1 および Dsg3 の主要な 3 次元エピトープはそれぞれ N 末側アミノ酸 1-161 に局在すると考えられ、さらに詳細に検討したところ Dsg1 のアミノ酸 26-87、Dsg3 のアミノ酸 25-88 に主要な 3 次元エピトープが局在すると考えられた。さらにこれらの領域内で Dsg1 特異的配列を持った変異 Dsg3 分子を作製し、同様に解析したところ、Dsg1 のアミノ酸 25、28 および 29 に、

重要な 3 次元エピトープが少なくともひとつは存在していると考えられた。また、エピトープの病原性を新生仔マウスを用いた Passive transfer 実験により検討したところ、Dsg1 の N 末アミノ酸 1-161 の領域に PF 血清中の病原性抗体が認識する 3 次元エピトープの存在が示唆された。

Dsg3 に対する IgG 自己抗体を認める腫瘍随伴性天疱瘡においても同様のエピトープの解析をしたところ、PV のエピトープは N 末の領域に多く認められたが、PNP においては分子全体にエピトープが分布している傾向が認められた。

4) ナイーブ細胞移植を用いた天疱瘡モデルマウスの作製

ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから脾細胞を分離し、 5×10^7 細胞を Rag2^{-/-}マウスへ移植した。移植 2 週間後にはレシピエントマウスの 80% で血中抗体価が上昇し、移植 3 週間後で 75% のマウスが明らかな表現型を示した。表現型を示したマウスの口蓋では直接蛍光抗体法で粘膜上皮細胞間にマウス IgG の沈着を認め、病理組織学的に基底膜直上での棘融解が確認された。免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞移植によるモデルマウスとの表現型の明らかな差は認めなかった。以上の結果から、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を移植するだけでも PV モデルマウスの作製は可能であることが示された。この方法は、免疫する蛋白の精製が不要であるため、作製が困難な抗原蛋白を標的とする他の自己免疫疾患モデル動物作製のうえでも応用が期待される。

5) 天疱瘡モデルマウスにおける抗原 3 次元エピトープの解析

mDsg3 の細胞外領域の N 末側 1/3、2/3、C 末側 1/3、2/3 を有した分子に対する反

応を、免疫脾細胞を用いた天疱瘡モデルマウス (Imm) 28 例、未免疫の脾細胞を用いた天疱瘡モデルマウス (Non-imm) 32 例の血清を用いて検討した。吸収率 50% 以上を有意な値とした場合、Imm モデルマウスでは、mDsg3 の C 末アミノ酸 163-614 が 27/28 例(96.4%)で有意な吸収率を示し、平均吸収率は 80.3%であった。Non-imm モデルマウスでも、mDsg3 の C 末アミノ酸 163-614 が 24/32 例(75.0%)で有意な吸収率を示し、平均吸収率は 69.6%であった。さらに Non-imm モデルマウスでは、N 末アミノ酸 1-162、1-404 が各々 4/32 例(12.5%)、19/32 例(59.4%)で有意な吸収率を示し、Imm モデルマウスと有意差を認めた(t 検定 各々 p=0.0004、0.0002)。

ヒト PV 患者血清を用いて同様の検討をした結果では前項で述べたごとく、カドヘリン型接着分子の細胞間接着に不可欠といわれる N 末 (1-161) アミノ酸の領域の吸収率が有意に高かった。一方、モデルマウスでは C 末 2/3 アミノ酸の吸収率が有意に高かったが、これは、デスマグレインのアイソタイプ (Dsg1, Dsg2, Dsg3) 間の相同性が N 末で最も高く、C 末にいくほど相同性が低くなることに関連していると考えられる。すなわち、移植された Dsg3^{-/-}リンパ球は、Dsg1 に対しては免疫寛容が成立していないため、宿主の Rag2^{-/-}マウス内在性 Dsg1 とより相同性の低い Dsg3 細胞外ドメインのより C 末側に対する抗体産生が起こると考えられる。ヒトにおいて、アイソタイプ間の相同性が高く、かつ主要エピトープと考えられる N 末 1/3 アミノ酸に高率に自己抗体が産生される機序は、今後解明されるべき課題である

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原性を有する抗 Dsg3IgG 抗体産生は、Dsg3-

/-T 細胞と Dsg3-/-B 細胞の組合せのみで認められ、Dsg3+/-T あるいは Dsg3+/+B のどちらかの細胞が移植された群では明かな抗 Dsg3 抗体の産生が認められず、天疱瘡の表現型を有したマウスは認められなかった。これらの結果は、PV モデルマウスにおいては T 細胞のみならず B 細胞における Dsg3 に対する免疫寛容の破綻が、病的自己抗体産生に必要であることを示唆する。

7) 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

現在まで、マウス Dsg3 に反応する 9 クロウンのモノクローナル抗体を作製した。アイソタイプは AK22 のみが IgG1 λ であったのに対して、その他全てのクロウンが IgG1 κ であった。モノクローナル抗体の抗原特異性の検討は、バキュロウィルス発現系により得られた組み換え Dsg 蛋白を抗原として用いた ELISA 法と、マウス各臓器を基質として用いた間接蛍光抗体法にて行った。各種 Dsg ELISA による検討では、AK1 はヒト、マウスの Dsg3, 1 のすべての Dsg に反応が認められた。また AK7, 9, 22 はマウス Dsg3 にのみ反応が認められた。

新生マウスを用いた病原性の確認では、モノクローナル抗体の移入により行った。まず精製した各モノクローナル抗体を単独で移入し、マウス皮膚での肉眼的な水疱形成と顕微鏡的な微小水疱形成を観察した。その結果すべてのモノクローナル抗体において肉眼的な水疱形成は認められなかった。顕微鏡的な微小水疱の形成を観察したところ、AK19 と AK23 を移入したマウスのみで微小水疱の形成が認められた。肉眼的な水疱形成が認められない理由として、皮膚においては Dsg1 が共発現しているために AK23 による Dsg3 の接着機能障害を Dsg1 の接着機能が代償してしまうためと考えた。この問題を解決するために、それ自身では

明かな水疱形成を誘導しない微量の抗 Dsg1 抗体（落葉状天疱瘡血清）と最近になり Dsg1 を特異的に消化することが判明した黄色ブドウ球菌毒素の ETA を同時に移入した。その結果、AK19 と AK23 を移入したマウス皮膚で、肉眼的に広範囲な水疱を形成し、組織学的にも基底層直上の水疱形成を認めた。以上の所見より、AK23 は活性型の Dsg3 を特異的に認識し、他のクローンとは異なる Dsg3 の細胞外領域上のエピトープを認識することにより強い病原性を有することが確認された。

8) 抗 Dsg3 抗体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 Fig1 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 2 系統、確認した。

9) 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

ETB を新生仔マウスに投与し、水疱部周囲の皮膚を採取して抗 Dsg1 ならびに Dsg3 抗体を用いた蛍光抗体法を行ったところ、Dsg3 に対する染色性は ETB、PBS 投与群とも変化がないのに対し、Dsg1 に

対する染色性は ETB 投与群において PBS 投与群よりも著減していた。マウス表皮抽出物の免疫プロット法により、Dsg3 の分子量は ETB 投与により影響しないのに対し、Dsg1 の分子量は PBS 投与群と比較して低下していた。

さらに ETB を、*in vitro* で rDsg1 または rDsg3 と反応させたところ、ETB がマウスおよびヒトの rDsg1 を特異的に切断することが確認された。

以上より、ETB の標的蛋白は ETA と同様 Dsg1 であることが証明された。

今後、マウスに ET を投与した後の、Dsg1 に対する免疫応答を検討することで、Dsg1 に対する自己抗体産生モデルを開発できるとともに、感染症と自己免疫の発症との関係を明らかにできる可能性が期待された。

1 0) シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み

(M3 ノックアウトマウス由来ナイーブ細胞の移植による試み)

まず、強制免疫をせずに尋常性天疱瘡モデルマウスが作製し得るという最近の結果(青木ら、投稿準備中)を基に、M3 ノックアウトマウスの脾臓細胞を調製し、rag-2 ノックアウトマウス 1 頭あたり 5×10^7 の脾臓細胞を尾静脈より移植し、その後 6 週間にわたってマウスを観察した。コントロールとして M3 を発現する野生型のマウスの脾臓細胞を移植した rag-2 ノックアウトマウスを用いた。観察期間中特に体重減少などの変化は見られなかった。また 6 週後に唾液腺の組織像を観察したがコントロールと比較して変化は観察されず、炎症細胞の浸潤なども見られなかった。

(M3-EL4 を用いた免疫)

次に M3 ノックアウトマウスの腹腔に 1 頭あたり 10^7 のガンマ線照射した M3-EL4 を投与し、3 週後に再び同じ処置を行なった。その 3 週後に免疫した M3 ノックアウトマウスの脾臓細胞を調製し、rag-2 ノックアウトマウス 1 頭あたり 5×10^7 の脾臓

細胞を尾静脈より移植し、その後マウスを観察を行なっている。この方法によっても 10 週後の現在に至るまで体重減少などの変化は見られていない。組織像の観察は行っていない。

今後、リコンビナントタンパク質の投与ならびに DNA ワクチンによる免疫誘導を試みる予定である。

1 1) 自己抗原の胸腺発現と自己免疫:

P0 ノックアウトマウスによる解析

P0+/-マウスでは、P2 感作 EAN、MOG 感作 EAE に対する感受性は亢進していないが、P0 感作 EAN の重症度、P0 に対する recall response (P0 特異的増殖反応、IFN γ 産生能)は亢進しており、P0 特異的免疫寛容の破綻が推測された。P0+/-では P0mRNA の発現が減少(-50%)しており、胸腺内 negative selection の欠陥を推定した。この推定に一致し、P0 欠損マウスの胸腺を移植した野生型マウスでは P0 に対する反応性が亢進し、野生型マウスの胸腺を移植した P0 欠損マウスでは、反応が低下した。以上より P0+/-における EAN 重症化は胸腺における P0 発現低下とそれに伴う P0 反応性 T 細胞の残存に起因するものと考えた。胸腺での自己抗原の発現低下は自己免疫病の発症リスクとなり得ることを考慮する必要があることが示唆された。

E. 結論

本年度は、3 年計画の最終年度として、作成された天疱瘡モデルマウスの病理学的、免疫学的解析を行い、ヒト疾患と近似する物であることを明らかにした。さらに、病態解明として、抹消抗原であるデスマグレイン 3 に対する病的抗体産生には、T 細胞レベルのみならず、B 細胞レベルにおいても免疫寛容が成立していないことが必要であり、自己免疫発症における B 細胞レベルの免疫寛容破綻の重要性を示した。また、

天疱瘡モデルマウスより、複数の抗 Dsg3 モノクローナル抗体を単離し、病的活性を持つ抗体を単離した。これらの抗体のエピトープ解析により水疱形成機序、表皮細胞間接着機序の解明に大きく寄与する。ヒト疾患における抗原上のエピトープの局在とマウスモデルにおけるエピトープの局在が異なることから、ヒト疾患発症における自己抗体産生機序の解明への手がかりを得ることが出来た。病的活性を持つモノクローナル抗体とヒト血清で確認出来たエピトープが Dsg のアミノ末の領域であることが一致し、モデルマウスを用いた解析の有用性が再確認された。また、抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成により、B細胞免疫寛容の獲得機序が明らかにされることが期待される。自己抗原ノックアウトマウスを用いるアプローチ法を応用し、末梢神経の構成蛋白 P0 のヘテロ・ノックアウトマウス (P0+/-) を用いた自己免疫性神経炎モデルマウスを作成し、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の開発が試みられている。このような方法は国内外においても過去に見あらず、全く新しい独創的な自己免疫モデルの作成法である。さらにモデルマウスの解析を通して、多くの国際的に評価される知見を得ることができた。

今後の方針としては、純系化したノックアウトマウスを用いてモデルマウスを作成することにより個体間の格差を均一にした安定したモデルマウスの供給を確立する。また、疾患を誘導する病的自己抗体のエピトープを詳細に解析し、病的自己抗体産生に関与する T細胞クローンの分離及び T細胞エピトープの同定を行い、自己免疫疾患における自己抗体産生メカニズムを分子レベルで解明する。さらに、その知見をもとに、病的な T細胞、B細胞のみを抗原特異的に抑制する抗原特異的、疾患特異的な免疫抑制療法を開発する。また、種々の治

療プロトコールを比較検討し、より効率のよい治療法を提言する。これらの目標は、過去3年間の本研究班の成果を結実させるために必要である。

F. 研究発表 (平成 13 年度)

英語論文 24 編

1. 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** 44: 593-598, 2001
2. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T: Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. **J Dermatol Sci** 26: 55-61, 2001
3. Ohata Y, Amagai M, Ishii K, Hashimoto T: Immunoreactivity against intracellular domains of desmogleins in pemphigus. **J Dermatol Sci** 25: 64-71, 2001
4. 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** 144: 1177-1182, 2001
5. Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, Amagai M: Desmogleins are targeted by IgA autoantibodies of a few IgA pemphigus patients. **Arch Dermatol** 137: 735-738, 2001
6. Stanley JR, Nishikawa T, Diaz LA, Amagai M: Pemphigus: Is there another half of the story? **J Invest Dermatol** 116: 489-490, 2001
7. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M: Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-

- terminal adhesive region of desmogleins. **J Immunol** 167: 5439-5448, 2001
8. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, Nishikawa T: Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. **Br J Dermatol** : in press, 2002
 9. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S: Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol** 32: 627-633, 2002
 10. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, Stanley JR: Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. **J Invest Dermatol** : in press, 2002
 11. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Umezawa A, Hata J, Nishikawa T: Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 118: 199-204, 2002
 12. Toyama-Sorimachi, N., Taguchi, Y., Yagita, H., Kitamura, F., Kawasaki, A., Koyasu, S. and Karasuyama, H. (2001) Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49. **J. Immunol.** 166:3771-3779.
 13. 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.** 166:4446-4455.
 14. Suzuki, A., Tsukio-Yamaguchi, M., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., Tsubata, T., Ohashi, P., Koyasu, S., Penninger, J. M., Nakano, T. and Mak, T. W. (2001) T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. **Immunity** 14:523-534.
 15. Ohteki, T., Maki, C. and Koyasu, S. (2001) Overexpression of bcl-2 differentially restores development of thymus-derived CD4⁺ T cells and intestinal intraepithelial T cells in IRF-1 deficient mice. **J. Immunol.** 166:6509-6513.
 16. Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Harada, M., Saito, Y. and Ogawa, S. (2001) ERK and p38 MAPK, but not NF- κ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. **Circ. Res.** 89:661-669.
 17. Suzue, K., Reinherz, E. L. and Koyasu, S. (2001) Critical role of NK but not NKT cells in acute rejection of parental bone marrow cells in F1 hybrid mice. **Eur. J. Immunol.** 31:3147-3152.
 18. Ohteki, T., Suzue, K., Maki, C., Ota, T., and Koyasu, S. (2001) Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions of in the innate immune response. **Nat. Immunol.** 2:1138-1143.
 19. Fukao, T., Yamada, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Takayama, T., Asano, T., Takeuchi, T., Kadowaki, T., Hata, J. and Koyasu, S. (2002) Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. **Nat. Immunol.** in press.
 20. Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, K. Terao, M. Hatakenaka, S. Hashimoto and T. Yamamura : Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** 107:R23- R29, 2001

21. Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413:531-534, 2001
22. Maeda, M., S. Lohwasser, T. Yamamura, and F. Takei: Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J. Immunol.* 167: 4180-4186, 2001
23. Miyamoto, K., N. Oka, T. Kawasaki, S. Miyake, T. Yamamura, and I. Akiguchi: new cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. *Muscle and Nerve* (in press), 2001.
24. Gumperz, J.E., S. Miyake, T. Yamamura, and M.B. Brenner: CD1d tetramer staining reveals functionally distinct subsets of human CD1d-restricted NKT cells. *J. Exp. Med.* (in press), 2001

日本語論文 11 編

1. 天谷雅行: 皮膚の自己免疫疾患-天疱瘡. 実験医学 19: 180-184, 2001
2. 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 19: 1004-1007, 2001
3. 天谷雅行: 自己免疫疾患治療評価モデル. 組織培養工学 27: 14-17, 2001
4. 天谷雅行: 天疱瘡モデルマウス. 病理と臨床 19: 655-659, 2001
5. 天谷雅行: デスマグレイン KO マウスを用いた天疱瘡モデルマウスの作製. 臨床免疫 35: 758-762, 2001
6. 角田和之, 天谷雅行: 粘膜と皮膚に生じる免疫疾患. 医学のあゆみ 199: 103-106, 2001
7. 天谷雅行: 自己免疫のモデル疾患としての天疱瘡. 日本皮膚科学会雑誌 111: 1769-1771, 2001
8. 天谷雅行: 自己抗原ノックアウトマウスを用いた新たな自己免疫疾患モデル動物. 免疫 2002 190-196, 2001.
9. 宮本勝一、三宅幸子、河野直子、山村 隆: P0+/- マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的自己免疫性神経炎 (EAN) 感受性

- の亢進. 神経免疫学 9:225-228, 2001
10. 宮本勝一、三宅幸子、山村 隆: P0+/- マウスにおける実験的自己免疫性神経炎 (EAN) の増悪: 胸腺移植の効果と意義. 末梢神経 (印刷中).
 11. 山村 隆: 多発性硬化症に対する新しい免疫療法. NK/NKT 細胞をめぐる. 臨床神経学 (印刷中), 2001

学会発表 (代表的なもの)
国際学会

1. Amagai M: Pathophysiology of anti-cadherin autoimmune disease, pemphigus. The 6th Keio Medical Science Prize Symposium, Tokyo, 2001. 11. 30.
2. Amagai M: Experimental murine pemphigus using autoantigen knockout mouse. 国際シンポジウム”NK/NKT細胞と自己免疫”, 東京, 2001. 12. 14.
3. Amagai M: The pathogenic autoantibody response of animal models in pemphigus. Pemphigus as a model of organ-specific humoral autoimmune diseases, Bethesda, Maryland, 2001. 4. 20-21.
4. Ohshima M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J, Umezawa A, Nishikawa T: Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. The 62nd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Washington D. C., 2001. 5. 9-12.
5. Nagata Y, Amagai M, Hashimoto T, Garrod D: Detection of IgG and IgA autoantibodies reactive with human desmogleins 1, 2, and 3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed recombinant desmogleins. The 62nd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Washington D. C., 2001. 5. 9-12.
6. Tsunoda K, Aoki M, Ota T, Yamada T, Nagai T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M: Development of anti-desmoglein 3 pathogenic monoclonal antibody using active disease mouse model for pemphigus vulgaris.

- The 62nd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Washington D. C., 2001. 5. 9-12.
7. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, Nishikawa T: Characterization of a mouse pemphigus vulgaris model using immunoelectron microscopy. The 62nd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Washington D. C., 2001. 5. 9-12.
 8. Nagata Y, Amagai M, Garrod DR, Hashimoto T: Detection of IgG and IgA autoantibodies reactive with human desmocollins 1, 2 and 3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed recombinant desmocollins. The 62nd Annual Meeting for The Society for Investigative Dermatology, Washington, D.C., 2001. 5. 9-12.
 9. Miyamoto, K., Miyake, S., Schachner, M. and Yamamura, T. Higher susceptibility of heterozygous P0 knockout mice to P0-induced experimental autoimmune neuritis (EAN). 13th Naito Conference. Hayama, November 8-11, 2000
 10. Miyamoto, K., Miyake, S., Schachner, M. and Yamamura, T. Higher susceptibility of heterozygous P0 knockout mice to P0-induced experimental autoimmune neuritis (EAN): lower P0 expression in the thymus may be a cause. Experimental Biology AAI '01. Orlando, April 1-4, 2001
 11. Yamamura, T. : Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. Major Symposia. Immunomodulation/ Innate Immunity. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 1st Annual Meeting, Boston, USA, May 7, 2001

G. 知的所有権の取得状況
特許取得 2 件 (平成 13 年度)

1. 自己免疫疾患モデル動物の作成方法 (特願 2001-156126)
2. 天疱瘡モノクローナル抗体 (特願 2001-267653)

Ⅲ. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（特定対策研究事業）

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）モデルマウスとデスマグレイン 3 ノックアウト（Dsg3^{-/-}）マウスを病理組織学的に比較検討し、かつ PV モデルマウスを免疫学的に詳細に解析することにより、このモデルマウスの疾患モデルとしての特徴を明らかにすることを目的としてきた。昨年度までの検討により、1) PV モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスとも体重減少、休止期に特徴的な脱毛、外的刺激を受けやすい部位の痂皮、びらん形成といった類似した肉眼的表現型を呈するが、モデルマウスには激しい表現型を示す個体が存在すること、3) 病理組織学的に詳細に両マウス群を比較検討すると、基本的な病変の分布パターンは両マウス群間で差異はないが、モデルマウス群においてのみ食道、前胃の病変が認められ、かつ一個体中の病変数も Dsg3^{-/-}マウスと比較してモデルマウス群の方がバラエティに富むこと、3) PV モデルマウスの表皮細胞間には IgG1 優位の IgG の沈着がみられ、かつ産生する循環 IgG 抗体が Dsg3 を特異的に認識していること、が解明され本モデルマウスの疾患モデルとしての有用性の一端が明らかとなってきた。今年度は、PV に特徴的とされる表皮細胞間の棘融解（acantholysis）像以外の疾患特異的な病理組織所見として、好酸球浸潤を伴った海綿状態（eosinophilic spongiosis）の有無につき PV モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスの両群を対象に検討するとともに、本モデルマウスを免疫学的にさらに詳細に解析した。その結果、PV モデルマウスは IgG1 優位の抗 Dsg3 IgG 循環抗体を有し、eosinophilic spongiosis はモデルマウス群においてのみ認められることが明らかとなった。以上より本モデルマウスが、棘融解以外の PV 患者の病態も反映していることが示された。

研究協力者

大山 学 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室助手

A. 研究目的

昨年度までの研究では、PV モデルマウスと Dsg3^{-/-}マウスの肉眼的、あるいは顕微鏡的表現型を比較検討し、両群間において表現型は基本的には大きな差異はないが、PV モデルマウスのいくつかの個体では激しい症状を呈する個体が存在し、かつ

一個体あたりの PV に特徴的な棘融解を示す病変数もモデルマウス群では Dsg3^{-/-}マウス群と比較してバラエティに富むことが示された。また、モデルマウスの免疫学的検討では、産生される IgG は Dsg3 に特異的であり、かつ表皮細胞間に沈着する IgG は IgG1 優位であることが示された。本年度は、モデルマウスの病理学的、組織学的検討を進め、PV モデルマウス、比較検討の対象として Dsg3^{-/-}マウスの両マウス群において棘融解以外に PV を反映す

る組織学的所見として eosinophilic spongiosis が再現されているかどうかについての解析、モデルマウスにおいて産生される IgG 以外の免疫グロブリン、あるいは、実際にモデルマウスの血清中に循環している抗 Dsg3 IgG 抗体の IgG サブクラスについての検討を行うことにより、PV モデルマウスの疾患モデルとしての有用性をさらに明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

a) マウス

モデルマウス作製のもととなる Dsg3^{-/-}マウス、Rag2^{-/-}マウスについては昨年度と同様の供給元より購入したものを使用した。また、モデルマウスの作製方法も同様であり、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。

b) 好酸球染色

初期の PV 患者にみられる特徴的な病理組織所見として、好酸球浸潤を伴う表皮細胞の海綿状態 (eosinophilic spongiosis; ES) が知られている。ES の所見の有無を評価するため、通常の HE 染色で表皮の海綿状態が明らかな、PV マウス 9 匹由来の 19 切片のうち 52 部位、Dsg3^{-/-}マウス 7 匹由来の 16 切片のうち 40 部位を選び、Lendrum の方法に従い Chromotrope2R と hematoxylin による染色を試みた。作製した切片は、光学顕微鏡下に観察し、表皮細胞間に 400 倍の視野で少なくとも 3 個の好酸球の浸潤が得られた場合に ES と診断した。

c) IgA、IgM ELISA 法

昨年度までの研究と同様に、バキュロウイ

ルスを用いて発現させたマウス組換え Dsg3 を抗原とした ELISA 法により、PV モデルマウス血清中の抗 Dsg3 抗体について、さらなる解析を試みた。まず、IgG クラス以外の抗 Dsg3 抗体が PV モデルマウスで産生されているかどうかにつき検討した。全細胞外ドメインを発現させたマウス rDsg3 を固相化した ELISA プレートに、5000 倍に希釈した PV モデルマウス血清を 1 時間反応後、5000 倍希釈したペルオキシターゼ標識ヤギ抗マウス IgA、IgM ポリクローナル抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) を 1 時間反応させた後、等量の tetramethylbenzidine と hydrogen peroxide からなる基質液 (MBL, Nagano) と 30 分間反応させ発色し、4N H₂SO₄ 溶液添加により反応を停止させた。得られたサンプルの 450nm における optical density (OD) 値をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定した。昨年度の報告で抗 Dsg3 IgG 抗体の cut-off 値を決定した方法と同様に、PV モデルマウス血清 31 検体と正常マウス血清 10 検体を、IgA、IgM 抗体の各 ELISA 法で解析して得られた OD 値をもとに、平均値 ± 3 標準偏差にあてはめ抗 Dsg3 IgA、IgM ELISA 法ともに cut-off 値を、0.027 とした。

d) IgG サブクラス ELISA 法

PV モデルマウスで産生される抗 Dsg3 IgG 抗体について IgG サブクラスを検討した。マウス rDsg3 固相化 ELISA プレートと 1000 倍希釈した PV モデルマウス血清を 45 分間反応させた後、1000 倍希釈のラット抗マウス IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 モノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA, USA) と 45 分間反応、続いて 2500 倍に希釈したペルオキシターゼ標識ヤギ抗ラット IgG ポリクローナル抗体

と 45 分間反応させた。発色と測定は上記と同様に行った。各 IgG サブクラスの ELISA 法につき PV モデルマウス血清 20 検体、正常マウス血清 10 検体を解析し、前述の計算式に従い 0.062 をそれぞれの cut-off 値とした。

C. 研究結果

a) eosinophilic spongiosis の有無についての検討

PV 患者の早期の紅斑性病変にみられる病理組織学的所見として、好酸球浸潤を伴う表皮細胞の海綿状態 (ES) が知られている。棘融解以外の PV に特徴的な所見として、ES がはたして PV モデルマウス、Dsg3^{-/-}マウスでも再現されているかについて Chromotrope2R を用いた好酸球染色で検討した。マウスでは、ヒトに比べ表皮がきわめて薄いことを考慮し、本研究では、海綿状態を呈する表皮細胞間に 400 倍の視野で少なくとも 3 個の好酸球の浸潤が得られた場合に ES と定義した。この定義に従うと、PV モデルマウス (n=9) から得られた 19 切片のうち海綿状態が明らかかな 52 部位のうちの 12 部位で ES が確認された (表 1、図 1a)。一方、Dsg3^{-/-}マウス (n=7) の 16 切片の海綿状態を伴う 40 部位について同様の検討を加えたところ、いくつかの切片で真皮の好酸球浸潤は観察されたものの、明らかかな ES はみられなかった (表 1、図 1b)。

b) IgA、IgM ELISA 法

昨年までの ELISA 法を用いた検討で、対象としたすべての PV モデルマウスが Dsg3 に特異的に反応する IgG 抗体を産生していることが明らかとなった。しかし、昨年度のモデルマウス口蓋粘膜を基質とした蛍光抗体直接法による検討では、表皮細胞間に IgG 以外に IgA の沈着もわずかながら認められていたことから、モデルマウ

スが IgG 以外の免疫グロブリンを産生しているかどうかについて検討することが必要であった。そこで、新たに抗 Dsg3 IgA、IgM 抗体を検出するための ELISA 法を確立し、抗 Dsg3IgG 抗体陽性であった PV モデルマウス血清 31 検体をもちいて解析を行った。その結果、抗 Dsg3 IgA 抗体、抗 Dsg3 IgM 抗体に関しては、ほとんどの検体が陰性を示したが、IgA については 3 検体、IgM については 1 検体がわずかに cut-off 値を超える値を示した (図 2)。

c) IgG サブクラス ELISA 法

マウス IgG のサブクラスは IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 の 4 種類よりなり、それぞれ免疫応答において異なる役割をもつ。故にモデルマウスにおいて産生される IgG がどのような IgG サブクラスにより構成されているかを知ることは、モデルマウスにおいて生じている免疫応答の特徴を知る上で大きな意味をもつ。抗 Dsg3IgG 抗体のサブクラスを検討するために施行した ELISA 法では、抗 Dsg3 IgG 抗体が陽性であった 20 検体すべてが抗 Dsg3IgG1 抗体陽性であり平均 OD 値は 0.59 であった。IgG2a 抗体、IgG2b 抗体については、それぞれ 12 検体が陽性を示したが、その平均 OD 値は低く、IgG2a 抗体が 0.097、IgG2b 抗体が 0.090 であった。IgG3 抗体はすべての検体が陰性であり平均値は 0.009 であった (図 3)。

D. 考察

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自己免疫性疾患のうちでも、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の解明、治療法の評価などの点で重要と考えられる。昨年度までの PV モデル