

マウスの病理学的、免疫学的検討で、1) このモデルマウスが表皮細胞間に沈着する抗原特異的な抗 Dsg3 抗体を産生すること、2) PV に特異的な病理組織所見である棘融解像を呈すること、3) Dsg3<sup>-/-</sup>マウスと比較すると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、が示されこのモデルマウスの疾患モデルとしての有用性が明らかとなってきた。そこで本年度は、棘融解以外の PV に特徴的な所見として ES 所見の有無を検討するとともに、IgG 以外の抗 Dsg3 免疫グロブリン、抗 Dsg3 IgG サブクラスを解析した。

ES は Emmerson と Wilson Jones により初めて報告された天疱瘡の初期病変に特徴的な組織学的所見である。当初、この所見は天疱瘡に特異的なものとされたが、その後の検討により、天疱瘡のみならず、類天疱瘡など自己免疫性水疱症でも広く観察されることが明らかとなった。ES はよく知られた所見であるにもかかわらず、その疾患の病態生理における意義はいまだ明らかにされていないが、本年度の検討で、ES が遺伝子欠損により Dsg3 の機能を欠く Dsg3<sup>-/-</sup>マウスには見られず、産生抗体による Dsg3 分子の阻害により表現型を呈する PV モデルマウスのみ認められたことより、モデルマウスでは免疫応答に続発するかたちで、PV 患者で実際に生じている炎症反応の一部が再現されている可能性が示唆された。

昨年度の蛍光抗体直接法を用いた検討で、表皮細胞間に IgG 以外の免疫グロブリンが沈着していたことから、本年度組み替え Dsg3 を用いた IgA、IgM の ELISA 法を新たに確立しモデルマウス血清の解析を試みた。ELISA 法では IgM はほぼ検出されず、IgA は 3 検体で cut-off 値をわずかに超える値を示したことから、モデルマウス

で病原性を有する抗 Dsg3 抗体は IgG に属することが明らかとなった。

また、モデルマウスの血清中の抗 Dsg3 IgG のサブクラスを ELSIA 法で検討したところ、IgG1 が優位であった。マウスとヒトの IgG サブクラス間では、明確な対応はないが、マウス IgG1、ヒト IgG4 とともに補体結合能に乏しいという共通点をもつ。PV モデルマウスは、rDsg3 で免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>マウスから Dsg3<sup>+/+</sup>である Rag-2<sup>-/-</sup>マウスに脾細胞を移植することで抗 Dsg3 抗体の産生能を獲得するため、発症機序という点では自然経過で抗体産生を生じる PV 患者とは異なる。しかし、同様の免疫学的特徴をもつ IgG サブクラスの抗体が主たる病原性を有することから、PV モデルマウスにおける自己抗体の標的抗原への結合に引き続いて生じる二次的な反応は、PV 患者のそれに類似していることが示唆された。

## E. 結論

本年度の検討により、新たな手法で作成された PV モデルマウスには、いくつかの PV 患者にみられる、臨床像、病理組織学的、免疫学的特徴が再現されていることがさらに明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J, Nishikawa T. Immunological histopathological characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol, in press.
- 2) 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 (4):

593-598, 2001.

3) Kimoto M, Ohyama M, Amagai M, Hata Y, Nishikawa T. A case of pemphigus foliaceus which occurred after five years of remission from pemphigus vulgaris. *Dermatology*, 203: 174-176, 2001.

2. 学会発表

1) Ohyama 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 62<sup>nd</sup> annual meeting of the Society for Investigative Dermatology, Washington DC, 2001.

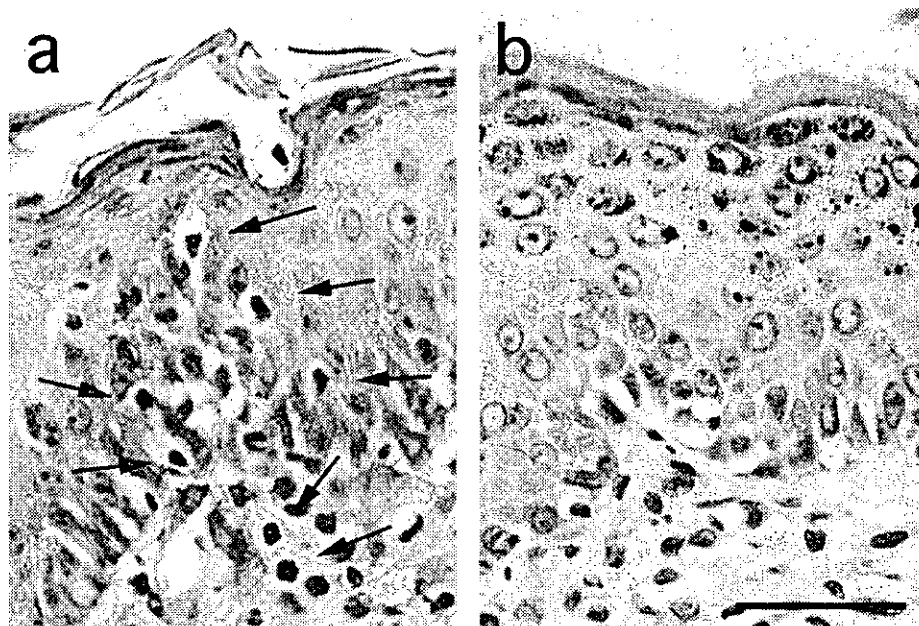


図1 PV モデルマウスにおいては表皮細胞の海綿状態に好酸球が浸潤する eosinophilic spongiosis (ES) の像が観察された (a)。こうした所見は Dsg3<sup>-/-</sup>マウスにはみられなかった (b)。Bar: 50 $\mu$ m。(Chromotrope 2R, hematoxylin 染色)

Eosinophilic spongiosis was observed  
in PV model mice

	PV model mouse	Dsg3 <sup>-/-</sup> mouse
Mice studied	9	7
Sections examined	19	16
Sites with spongiosis	52	40
Eosinophilic spongiosis	12	0

表1 好酸球性海綿体状態の認められた部位の数

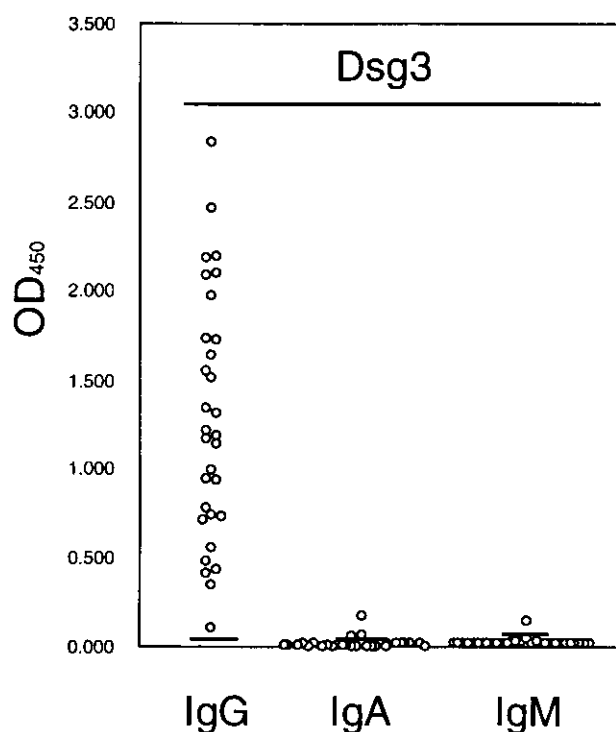


図2 PVモデルマウス血清のIgA、IgM ELISA法による解析結果。抗Dsg3 IgG抗体陽性PVモデルマウス血清を解析したところ抗Dsg3 IgA抗体、抗Dsg3 IgM抗体は、それぞれ3検体、1検体のみ陽性を示した。

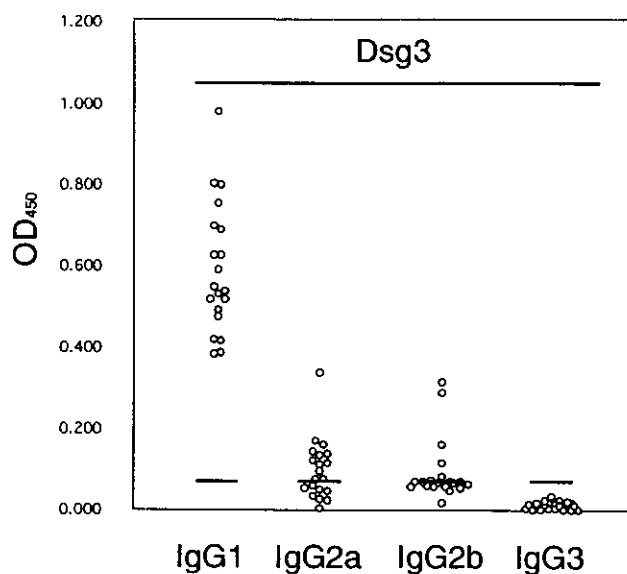


図3 PVモデルマウス血清のIgGサブクラスELISA法による解析結果。(a) PVモデルマウス血清20検体すべてがIgG1抗体陽性、IgG2a、IgG2bはそれぞれ12検体が陽性を示した。IgG3抗体は検出されなかった。

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

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

分担研究者 石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

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<sup>-/-</sup>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。その結果、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。

研究協力者

清水 篤 慶應義塾大学医学部皮膚科大学  
院医学研究科専攻生

A.研究目的

尋常性天疱瘡（PV）は、PV 自己抗体が表皮細胞の Desmosome（DM）上に存在する Desmoglein 3（Dsg3）と結合することで表皮基底層直上にて棘融解を生じる自己免疫性水疱性疾患の一つである。しかしながら PV 自己抗体の水疱発生機序における役割として、細胞膜上にプールされている Dsg3 と結合し、DM から Dsg3 が枯渇し DM の結合が傷害されるという説、また DM の向かい合う狭い接着板（AP）間に存在する Dsg3 へ PV 自己抗体が到達し直接結合することで隣り合った細胞の Dsg3 分子間のホモフィリック結合が傷害されるという説、さらに PV 自己抗体が Dsg3 と結合することで何らかのシグナル伝達が起こり結合障害を

引き起こし水疱発生を引き起こす説などが議論されているが、それらについては未だ結論は出ていない。そこで我々は、PV モデルマウスおよびレシピエントマウスである Rag2<sup>-/-</sup>マウスを非天疱瘡コントロールマウスとし、それぞれの口腔粘膜を用いて、post-embedding 免疫電顕法により PV 自己抗体の微細局在と PV 自己抗体が認識する標的抗原の微細局在とを統計学的に比較解析することで、PV 自己抗体の標的抗原への到達度を解析し、PV における水疱発症の機序を解明する。

B.研究方法

免疫電顕：免疫電顕用試料は、PV マウスおよび、PV マウスと同型の Rag2<sup>-/-</sup>マウスを非天疱瘡コントロールとして、それぞれの口腔粘膜より採取した。採取した組織は、それぞれ 1mm<sup>3</sup>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、 $-80^{\circ}\text{C}$  に冷却したメタノールにて 48 時間凍結置換し、Lowicryl K11M に $-60^{\circ}\text{C}$  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。型のごとく超薄切片を作成し、免疫染色の後、透過型電子顕微鏡下にて観察した。PV 自己抗体の免疫染色 (in vivo) には、一次抗体として rabbit anti-mouse IgG (H+L) (1:360, American Qualex Antibodies, California, USA) を、 $4^{\circ}\text{C}$  下で一晩、二次抗体として、5nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG (1:40, Amersham, Olen, Belgium) を、室温下で 2 時間反応させたものを、また、標的抗原の免疫染色 (in vitro) は、PV マウス血清を Rag2<sup>-/-</sup> マウスより採取した超薄切片上にて  $4^{\circ}\text{C}$  下で一晩反応させた後、5nm gold-labelled goat anti-mouse IgG (1:40, Amersham) を、室温下で 2 時間反応させたものを、それぞれ IntenSE<sup>TM</sup> M silver enhancement kit (Amersham) により銀増感反応を施した。

統計解析：DM へ局在している金粒子の分布をより精密に解析するため、二方向の金粒子の統計学的解析をおこなった。

1. 垂直方向へ分布する金粒子の微細局在の解析：DM は隣接する二つの細胞間に形成されることから、基準線を DM の中心にとり、基準線から金粒子の中心までの距離 (a) として測定、さらに向かい合う細胞膜間の距離 (b) を別に測定し、a を b に対する相対距離 ( $a/b \times 100$ ) として表現したものを、in vivo で 401 個、in vitro で 338 個計測しヒストグラム化した (図 1. A)。2. 水平方向へ分布する金粒子の微細局在の解析：DM の横軸方向 (b) の中心から金粒子の中心までの距離 (a) を測定し、a を b に対する相対距離 ( $a/b \times 100$ ) として表現したものを in vivo で 296 個、in vitro で 256 個計測し、ヒストグラム化した (図 1. B)。

## C. 研究結果

免疫電顕所見：in vivo、in vitro 共に、弱拡大像 (図 2, 3. A) から金粒子の分布は DM 上に特異的に局在しており、DM 以外の細胞膜および、細胞質内に特異的と思える金粒子の分布は認められなかった。さらに強拡大像から、ほとんどの金粒子は DM の AP の間の細胞外領域に特異的に局在 (図 2, 3. B) しており、それ以外の細胞膜および細胞質内に特異的な金粒子の局在を認められなかった (図 2, 3. C)。

統計解析：水平方向の金粒子の分布はヒストグラム (図 4) から、in vivo、in vitro 共に、そのほとんどが DM の細胞外領域に局在しており、細胞質内に金粒子はほとんど認められなかった。また、分布パターンは in vivo、in vitro 共に細胞膜よりにピークを認める類似した分布パターンを示した。また、水平方向の金粒子の微細局在は、in vivo、in vitro 共に DM の大きさに関係なく DM 内にほぼ均一にその局在が認められ (図 5)、さらにヒストグラム (図 6) から、その分布パターンは DM の中心まで、ほぼ均一に分布していた。

## D. 考察

免疫電顕所見から PV 自己抗体は、DM の向かい合う AP 間の狭い細胞外領域に特異的に沈着し、その局在部位は標的抗原の微細局在と一致していた。また、DM 以外の細胞膜上や細胞質内に特異的と思える局在を示さなかったことなどから、PV 自己抗体の沈着部位は標的抗原の局在部位と一致していると考えられた。さらに、統計学的解析の結果、垂直方向の金粒子の微細局在の解析から、PV 自己抗体の沈着は DM の AP 間の細胞外領域に特異的に局在していることが認められ、その分布パターンは標的抗原の分布パターンと非常に類似していること。また、水平方向の金粒子の微細局在の解析から、標的抗原は DM の大きさ

に関係なく DM 内にほぼ均一に局在しており、これに対し PV 自己抗体も同様の分布パターンを示すことが明らかとなった。以上のことから、1. PV 自己抗体は DM の細胞外領域に存在する標的抗原に対し直接到達し結合することが出来る。2. 細胞膜上に浮遊して存在する遊離 Dsg3 に自己抗体が結合しながらも、PV 自己抗体が結合した遊離 Dsg3 が集合し、正常な Dsg3 の分布をともなった DM を形成することが出来る。とする二つの可能性が示唆された。しかし、免疫電顕所見から、DM 以外の細胞膜上に特異的と思える PV 自己抗体および、標的抗原の局在を認めなかったことから、細胞膜上に浮遊して存在する遊離 Dsg3 に対し PV 自己抗体が結合して存在することは否定的と考えられた。すなわち、PV 自己抗体は DM の細胞外領域に存在する標的抗原である Dsg3 に対し、直接到達し結合していることが示唆された。

#### E. 結論

これまで議論の分かれていた PV の水疱

発症機序は、DM の向かい合う狭い 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によって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。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) A Shimizu, A Ishiko, T Ota, K Tsunoda, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa. Characterization of mouse pemphigus vulgaris model using immunoelectron microscopy. The 62nd annual meeting of the society for Investigative Dermatology, Washington DC, 2001.

2) 清水 篤, 石河 晃, 太田孝幸, 角田和之, 天谷雅行, 西川武二, 小安重夫 尋常性天疱瘡 (PV) 自己抗体は PV モデルマウスにおいてデスモゾーム上のデスモグレイン 3 に結合している  
日本研究皮膚科学会第 26 回年次学術大会、総会、愛媛、2001、9

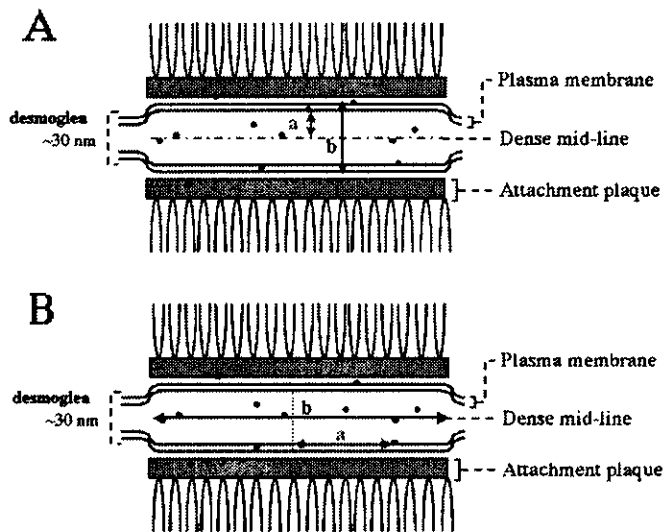


図1. Desmosomeにおける金粒子の測定例。(A)垂直方向へ分布している金粒子の測定法。(B)水平方向へ分布している金粒子の測定法。

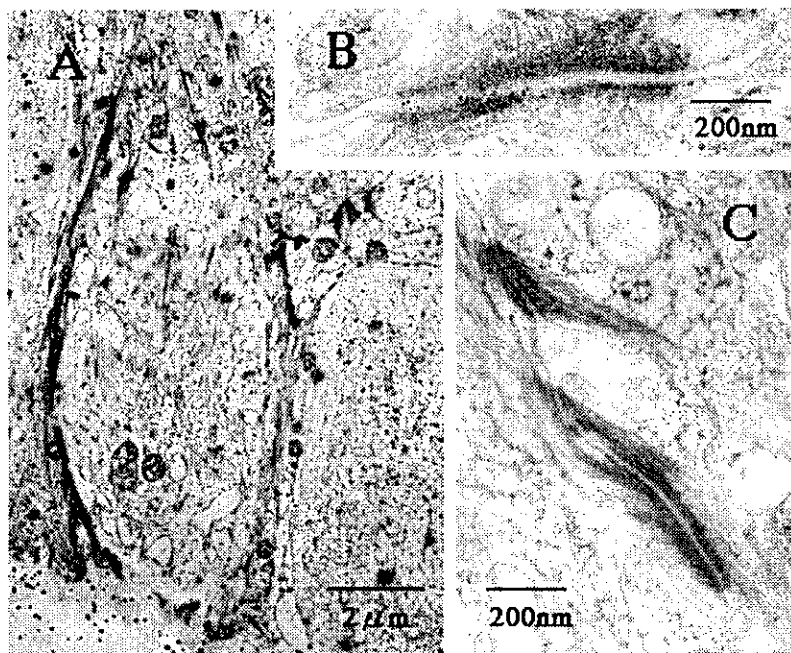


図2. PV モデルマウス表皮細胞に沈着する PV 自己抗体を認識する金粒子。(A)金粒子は Desmosome 上に特異的に沈着している。(B)ほとんどの金粒子の微細局在部位は Desmosome の向かい合う Attachment Plaque の間に認められる。(C)Desmosome 以外の細胞膜および細胞質内に特異的な金粒子の沈着は認めない。



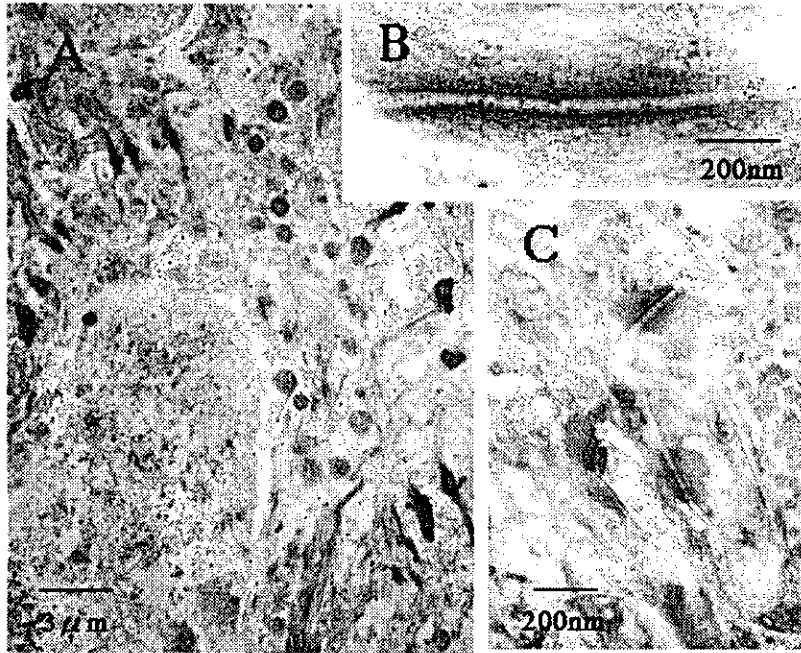


図3.コントロールマウス表皮細胞において標的抗原を標識した金粒子の微細局在。(A)表皮基底細胞の弱拡大像。金粒子はDesmosomeに特異的に沈着している。(B)ほとんどの金粒子はDesmosomeの向かい合う Attachment Plaquesの間に局在している。(C)Desmosome以外の細胞膜および細胞質内に特異的な金粒子の局在は認められない。

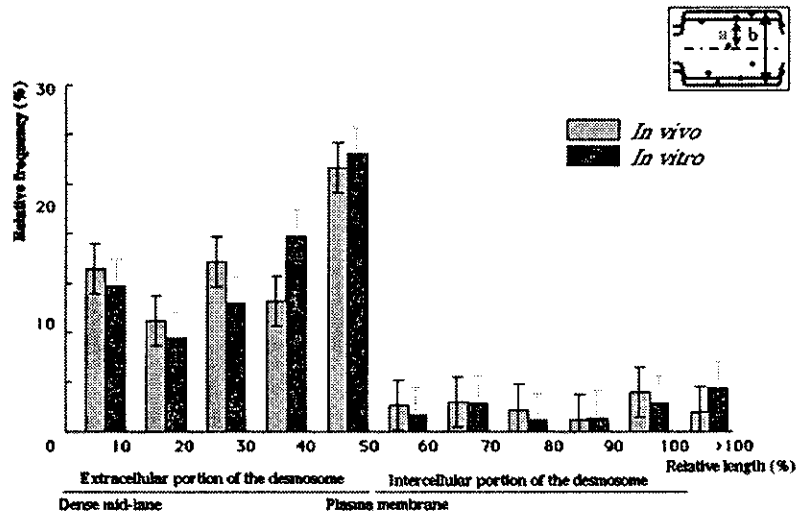


図4.PVモデルマウス (in vivo) およびコントロールマウス (in vitro) の Desmosome における金粒子の垂直方向への分布を解析することにより得たヒストグラム。横軸は Dense mid-line から細胞膜方向への相対距離を、縦軸は金粒子の相対的出現頻度を示す。in vivo、in vitro 共にほとんどの金粒子は細胞質内に認められ、金粒子の分布パターンは細胞膜よりにピークを持つよく似た分布パターンを示した。

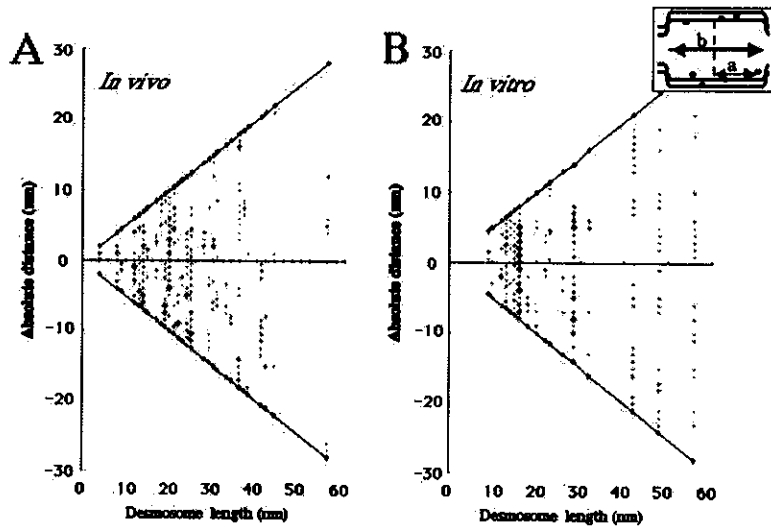


図 5. PV モデルマウス (*in vivo*) およびコントロールマウス (*in vitro*) の Desmosome における金粒子の水平方向へ分布。横軸は Desmosome の大きさ、縦軸は Desmosome の中心から金粒子までの距離を示す。 *in vivo*、*in vitro* 共に金粒子は Desmosome の大きさに関係なく、Desmosome 内にはほぼ均一に分布している。

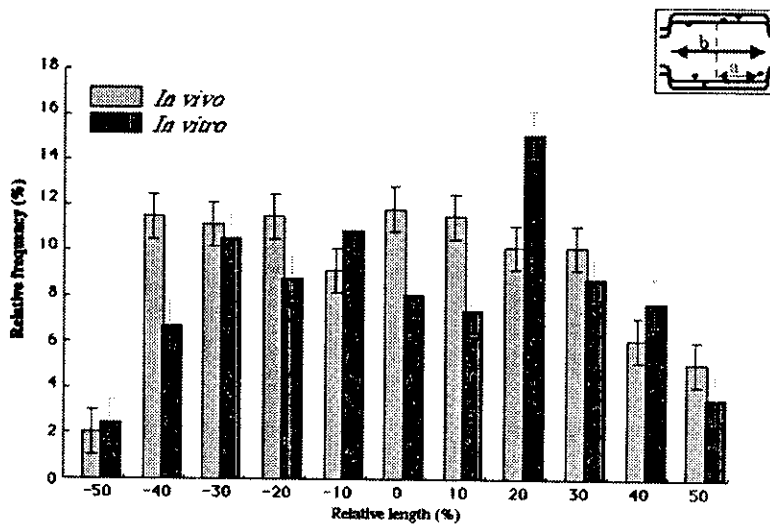


図 6. PV モデルマウス (*in vivo*) およびコントロールマウス (*in vitro*) の Desmosome における金粒子の水平方向への分布を解析することにより得たヒストグラム。横軸 0 は Desmosome の中心を示し、-50 および 50 は Desmosome の端までの相対距離を示す。また、縦軸は金粒子の相対的な出現頻度を示す。 *in vivo*、*in vitro* 共に金粒子は Desmosome の中心まではほぼ均一に分布している。

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

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。昨年度までの赤色系の病変部抽出法を用い実際に時系列で比較検討を行った。

研究協力者

小林誠一郎 慶應義塾大学医学部皮膚科助手

するなど検討したが、手技の多くなるほど誤差要因が増えるため、以下のように簡素に決定することにした。

A. 研究目的

本年度は、実際に時系列で撮影した写真から病変面積を算出し、比較検討することを目的とした。

B. 研究方法

赤色系の病変部の算出法については昨年度の報告のとおりである。実際に面積を比較するにあたり、次の問題点があげられる。  
①算出の対象範囲の決定②条件の異なる写真から時系列で比較するため方法の検討③抽出時の境界領域の雑音。算出の対象範囲は両腋窩幅では、同一人物では、あまり変化がないと仮定し、正方形や背部のみの多

腋窩の幅を一辺とし腋窩から垂直方向にのばした直線と肩の交点を一頂点とした正方形の内側を対象領域とした。また、どの写真も尺度となる情報が含まれていないため、領域内の背部全面積に対する病変面積の和の率を占有率としそれぞれ算出した。比較的よく撮影されている5症例を選んだ。また、境界部に病変以外の範囲を抽出してしまうため、色差1.3以上で雑音の少なくなるぎりぎりの値とし色差1.5以上とした。

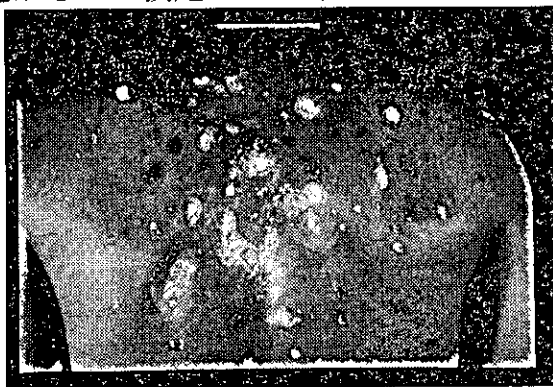
C. 研究結果

同日に撮影され、異なった写真から、占有率を計算したところ0.31~0.34の差があった。

症例1~5のうち、ELISAは症例2~4が撮影日とは完全に一致してはでないが測定されていた。

D. 考察・結論

同一日に撮影した写真から算出した病変面積では0.3の差があり、これが誤差範囲と考えられる。占有率は、大きくても3.6%、下は0.9%と変動のはばが小さい。ELISA



角形、多角形を面積をかえないように変形

をほぼ同時期に測定したものについてみると、症例3においてDSG1は、病勢の上昇傾向のとき占有率と平行していると思われた。症例5では、病勢の下降傾向時は、ELISAは下降傾向となるが、占有率はあまり変化なかった。ELISAとの比較は観察点が少ないためまだ不明な点が多い。今後は、一定の長期、短期それぞれで軽快時も

含め写真撮影と同時にELISAを測定する必要がある。また、他の病変や背部以外の部位についての課題が残された。

F.研究発表  
なし

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

## 古典的天疱瘡における抗原 3 次元エピトープの解析

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** 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 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。この結果、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。

研究協力者

関口 麻衣子 慶應義塾大学医学部皮膚科

### A. 研究目的

本研究の目的は、古典的天疱瘡抗原である Dsg1 および Dsg3 の 3 次元エピトープの分子上局在を検討することである。前年度まで成果として、Dsg1 および Dsg3 における 3 次元エピトープの主な局在領域が N 末 1-161 の領域に存在することが確認された。本年度はさらに詳細に領域を検討するとともに、このエピトープの違いによる病原性の差について検討を加えた。

### B. 研究方法

天疱瘡抗原の 3 次元エピトープマッピングを行うために、Dsg1 と Dsg3 の様々な領域を入れ換えたスワッピング分子を作製し、PF または PV 血清を用いて Competition ELISA を施行した。すでに

我々は昆虫細胞を用いるバキュロウイルス発現系を用いて 3 次元構造を持った Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域を作製している。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と考えられ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ことが分かっている。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 1A, 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ようにした。

方法として Competition ELISA を行った。作製されたスワッピング分子と PF 血清 43 例および PV 血清 40 例と競合反応させ、Dsg1 または Dsg3 の細胞外領域全体を抗原とした ELISA を行い抗体吸収率を算出した。

さらにスワッピング分子による 3 次元エピトープマッピングでの結果から、主要な 3 次元エピトープが局在すると考えられた領域内で、Dsg3 分子上のアイソタイプ特異的アミノ酸配列に Dsg1 特異的アミノ酸配列を Site-directed mutagenesis 法により導入した、変異 Dsg3 分子 (M1-M6) を作成した (図 1C)。

また、3 次元エピトープに反応する病原性抗体を検討するために ICR の新生仔マウス (生後 24-48 時間) を用いて、PF 血清 2 例と Dsg1 の N 末側 1/3 (アミノ酸 1-161) および C 末側 2/3 (アミノ酸 164-496) を含むスワッピング分子とを反応後、精製した検体を皮下投与して、18 時間以後に生検し、肉眼的、病理組織学的に水疱形成を調べ、DIF にて表皮細胞間の自己抗体の沈着を評価した (図 5)。

### 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 に制限した分子 (図 1A) と PF 血清 43 例とを競合反応させた結果 (図 2)、吸収率 50%以上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 3 次元エピトープは PF および PV のどちらも Dsg1 および Dsg3 それぞれの N 末アミノ酸 1-161 の領域に局在すると考えられた。

さらに、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 の領域をより細かい領域に限定したスワッピング分子 (図 1B) 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 3)、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 3 次元エピトープは N 末アミノ酸 26-87 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 3 次元エピトープは N 末アミノ酸 25-88 の領域に局在すると考えられた。

Dsg1 と Dsg3 のアミノ酸配列は C 末側に比べ N 末側でより相同性が高いことが解っており、興味深いことに、主要な 3 次元エピトープが局在すると考えられたこれらの領域は非常に高い相同性を持っており、保存されていない配列はごくわずかである。そこで Dsg3 分子上のアイソタイプ特異的

アミノ酸配列に、Dsg1 特異的配列を導入した変異 Dsg3 分子 (M1-M6) (図 1C) を用いて、先程 Dsg1 のアミノ酸配列 1-161 の分子で 50%以上の吸収率を示した PF 血清 26 例についてさらに Competition ELISA を施行した。この結果 (図 4)、最も N 末に近いアミノ酸 25、28、29 を Dsg1 で置換した変異 Dsg3 分子 (M1) において有意な抗体吸収率が示された。このことから、Dsg1 の抗原特異性を決定づける重要なエピトープが少なくともひとつ、ここに存在していると考えられた。

また、3 次元エピトープの病原性を評価するため、新生仔マウスを用いた Passive transfer 実験を行った (図 5)。Dsg1 の N 末アミノ酸 164-496 を含む分子と反応させた検体では肉眼的、病理組織学的に水疱形成を認め (図 5D, E)、DIF にて表皮細胞間にヒト IgG の沈着を認めた (図 5F)。一方、N 末アミノ酸 1-161 を含む分子と反応させた検体では、肉眼的、病理組織学的に水疱形成は認められなかったものの (図 5A, B)、DIF では表皮細胞間にヒト IgG の沈着を認めた (図 5C)。このことから、Dsg1 の N 末アミノ酸 1-161 に局在する 3 次元エピトープを PF 血清中の病原性抗体が認識したと考えられた。

#### D. 考察

本年度は 3 次元エピトープの病原性に関する検討を加え研究を行った。

3 次元エピトープマッピングとしては Dsg1 と Dsg3 の細胞外領域の様々な領域を入れ換えたスワッピング分子を作製し、PF および PV 血清を用いて Competition ELISA を行い、抗体吸収率を求めることで 3 次元エピトープの局在を解析した。その結果、Dsg1 および Dsg3 とともに N 末アミノ酸 1-161 の領域に主要な 3 次元エピトープが局在すると考えられた。さらにこの領域を限定したスワッピング分子によって詳細な 3 次元

エピトープマッピングを行ったところ Dsg1 の N 末アミノ酸 26-87、Dsg3 の 25-88 にそれぞれの主要な 3 次元エピトープが局在すると考えられた。さらに PF に関してはさらにアミノ酸 25、28 および 29 に重要なエピトープのひとつが存在すると考えられた。このアミノ酸 25-29 の領域はカドヘリンファミリーである E-カドヘリンの立体構造において、隣り合う 2 つの分子がダイマーを形成したときに、最も N 末側のドメインである EC1 が向かい合ってポケット構造を形成している領域に相当することが分かった。天疱瘡抗体がこの部位に結合しダイマー形成が破綻することで、細胞間接着機能が障害され、水疱形成が誘導される可能性が考えられた。

さらに、解析された 3 次元エピトープの病原性について検討するために、新生仔マウスを用いた Passive transfer 実験を行ったところ、Dsg1 の N 末アミノ酸 1-161 に局在する 3 次元エピトープは PF 血清中の病原性抗体によって認識されることが示唆された。

今後、さらに病原性抗体の認識部位を詳細に検討する必要があると考えられた。

#### E. 結論

本研究により、天疱瘡抗原デスモグレインの主要な 3 次元エピトープの局在を解明することができ、エピトープと病原性の関連について明らかにすることができた。これらの成果によって、天疱瘡における水疱形成の分子レベルでの機序が明らかになるとともに、抗原特異的血漿交換療法などの新たな治療法の開発につながることを期待できる。

#### F. 研究発表

英語論文

1) 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) Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T and Amagai M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol.* 167:5439-5448, 2001

学会発表

1) 落葉状天疱瘡 (PF) 抗原 Dsg1 の 3 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) 抗原デスモグレイン (Dsg) 1 の 3 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, U.S.A., 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モグレイン (Dsg) の 3 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



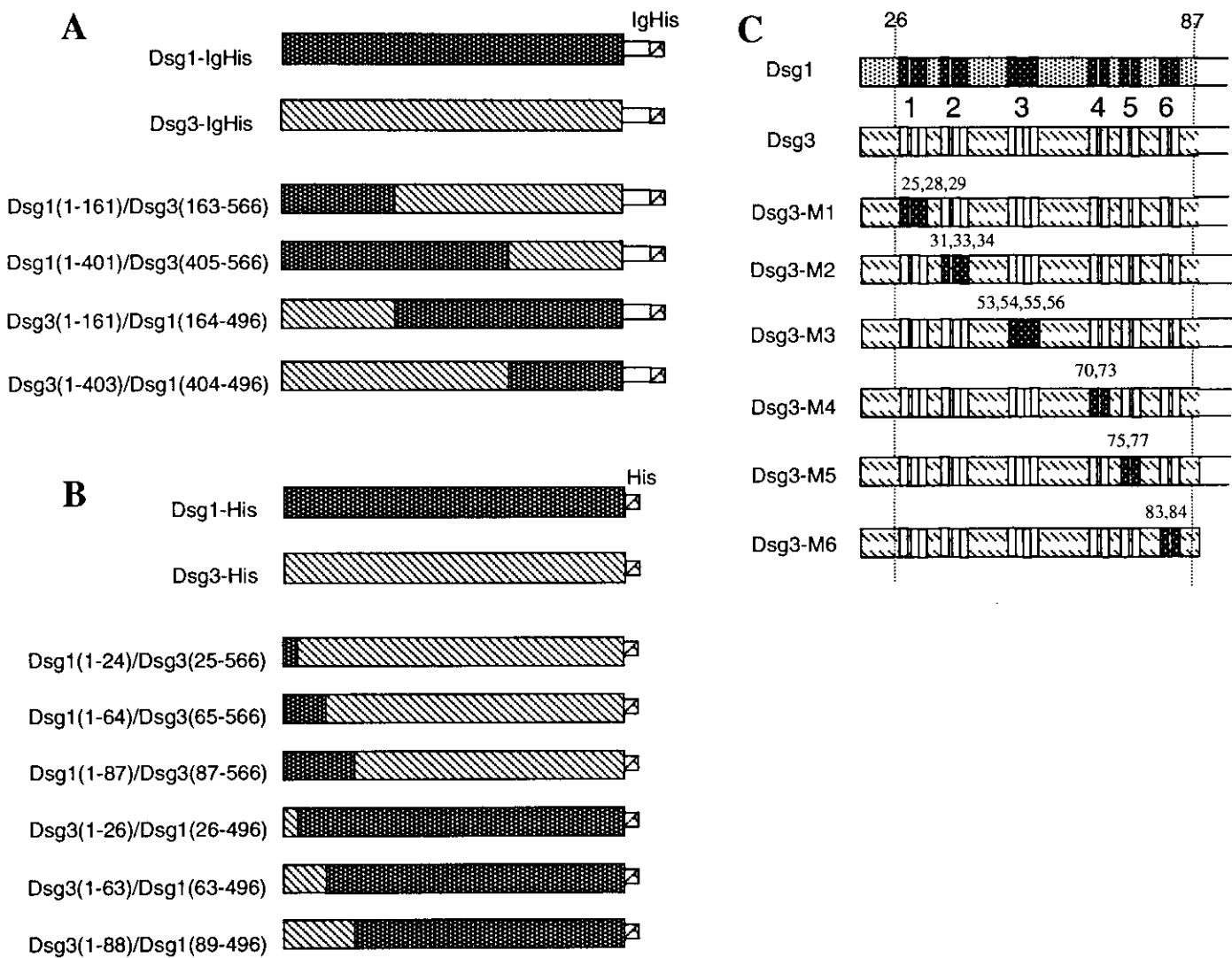


図1：スワッピング分子と変異Dsg3

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た (図1A, B)。さらにこの結果から、主要な3次元エピトープが局在すると考えられた領域内で、Dsg3分子上のアイソタイプ特異的アミノ酸配列にDsg1特異的アミノ酸配列をSite-directed mutagenesis法により導入した、変異Dsg3分子 (M1-M6) を作成した (図1C)。

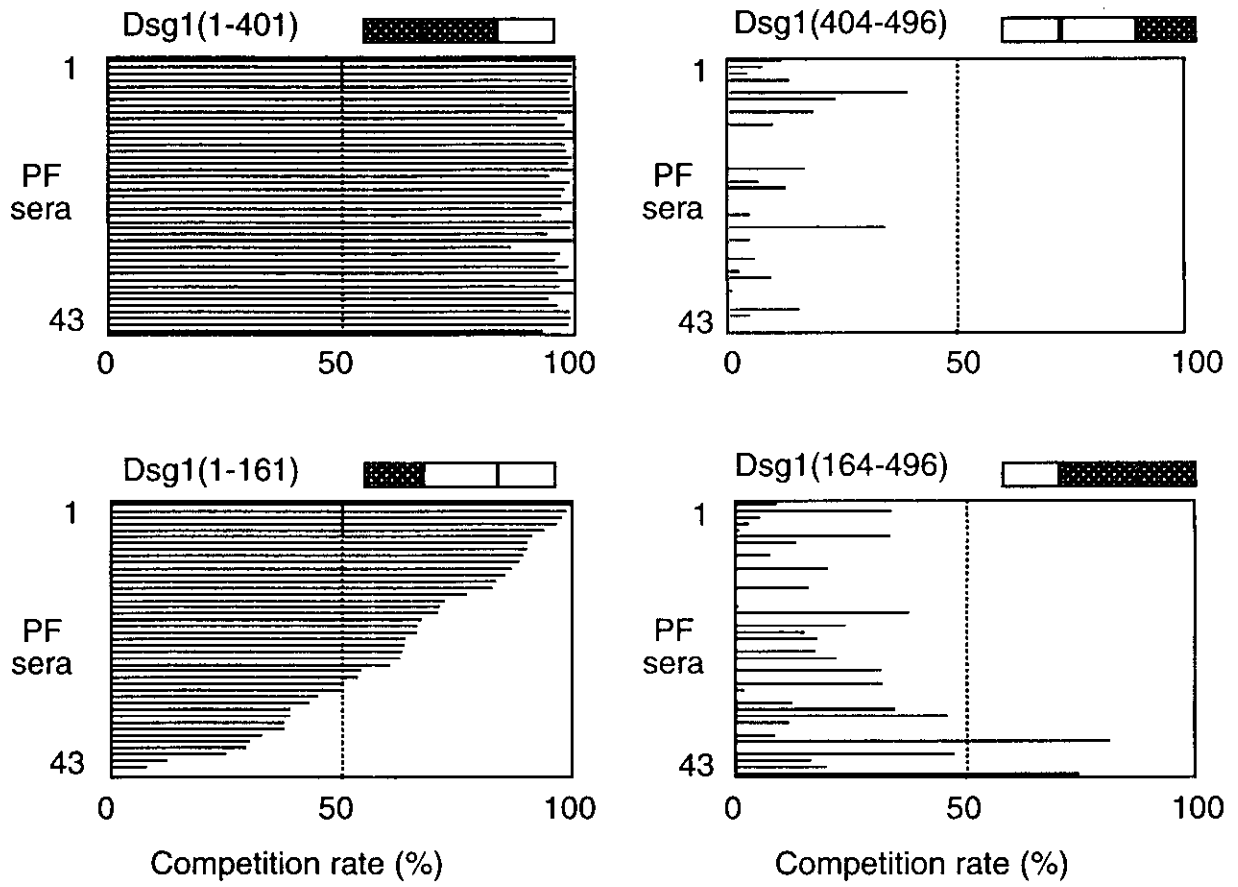


図2：PF血清の3次元エピトープ解析(1)

主要な3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

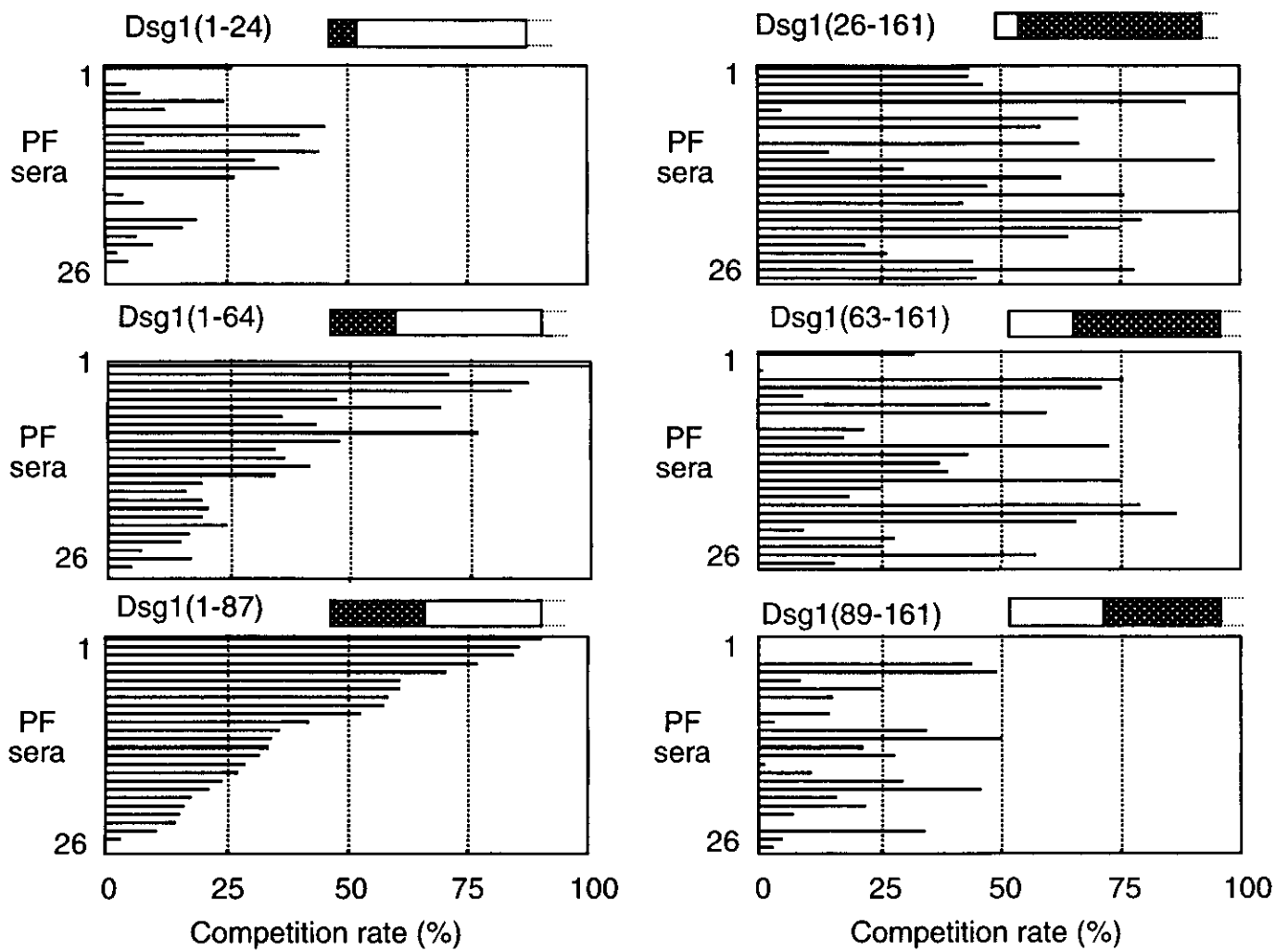


図 3 : PF 血清の 3 次元エピトープ解析 (2)

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 3 次元エピトープが存在すると考えられた。

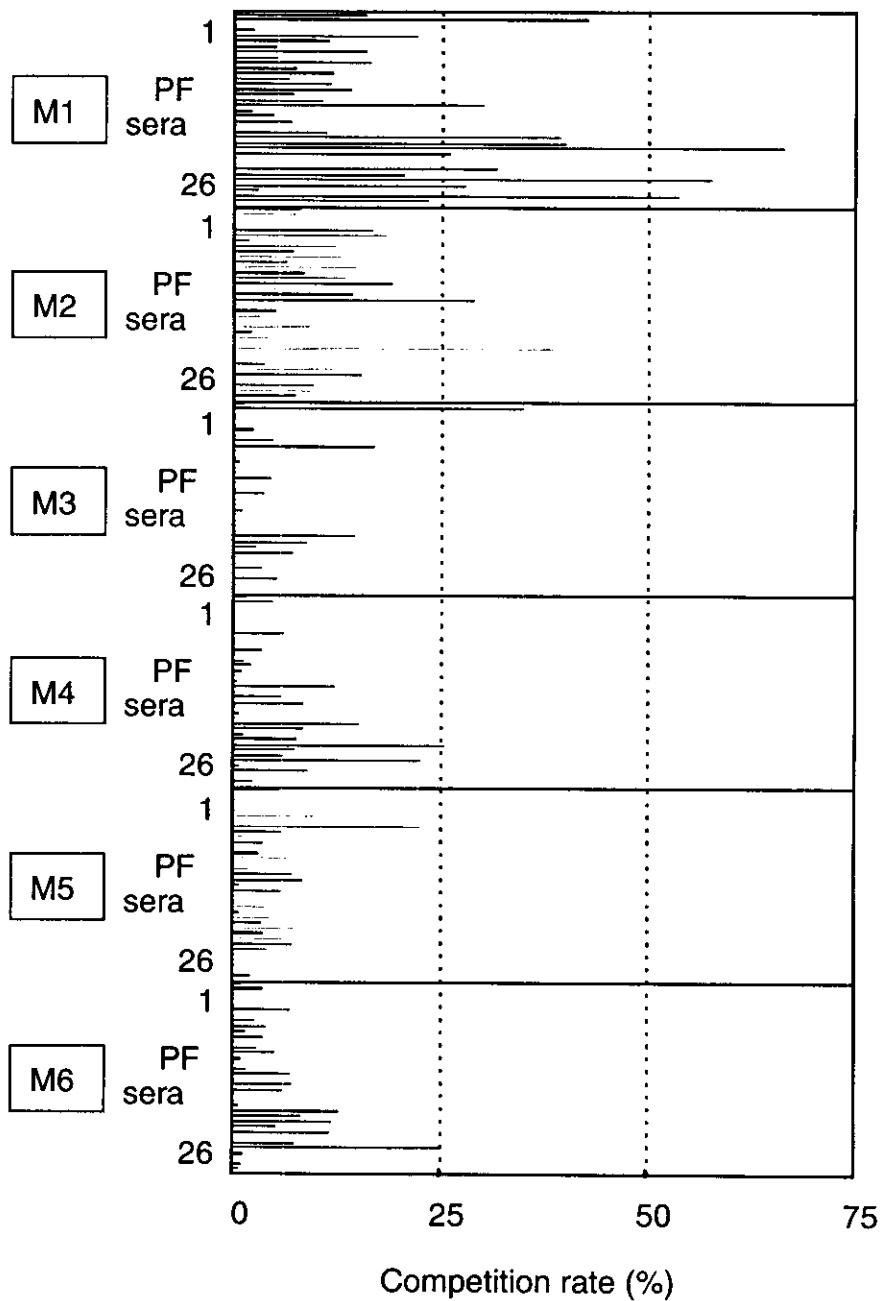


図4：変異 Dsg3 による 3 次元エピトープ解析

PF 血清において、最も N 末に近いアミノ酸 25、28、29 を Dsg1 で置換した変異 Dsg3 分子 (M1) で有意な抗体吸収率が示された。