

図5：Passive transfer 実験結果

(A-C) Dsg1 の 1-161 残基にて吸収後。(D-E) Dsg1 の 164-496 残基にて吸収後。1-161 残基で吸収後の PF 血清を投与した新生仔マウスでは肉眼的 (A)、組織学的 (B) に水疱形成は認められず、164-496 残基にて吸収後の PF 血清では肉眼的 (D)、組織学的 (E) に著明な水疱形成を認めた。しかし、どちらの分子も DIF にて細胞間に IgG の沈着を認めた (C, F)。Bar は $50\mu\text{m}$ である。

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

腫瘍随伴性天疱瘡における 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 腫瘍随伴性天疱瘡（以下 PNP）血清にはプラキンファミリーに属する様々な抗原蛋白に対する自己抗体のみならず、デスモグレイン(Dsg) 3 に対する自己抗体も存在することが明らかにされ、PNP における水疱形成では、尋常性天疱瘡 (PV) と同様、抗 Dsg3 抗体が重要な役割を担っていることが考えられる。本研究では PNP における Dsg3 の三次元エピトープの解析と IgG サブクラスの分布を検討し、PV の結果と比較検討した。エピトープの解析は、Dsg3 と Dsg1 間でのスワッピング分子 (Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1、Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1) を competitor とし、Dsg3 細胞外全領域を抗原とした競合的 ELISA を施行した。50%以上の競合を優位とし検討を行ったところ、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ことが認められた。さらに PNP の Dsg3 に対する IgG サブクラスの分布を検討したところ、PV においては IgG4 優位であったが、PNP においては IgG1、IgG2 が優位であることが確認された。以上の結果より、PNP は PV と比較しエピトープおよびサブクラスが異なることから、自己抗体産生機序が PV と異なることが示唆された。

研究協力者

布袋祐子 慶應義塾大学医学部皮膚科助手

1) 研究目的

本研究において、我々は PNP および PV 両疾患において同じ Dsg3 に対する自己免疫反応の違いがあるかを検討するため、PNP における Dsg3 の三次元エピトープのマッピングと IgG subclass の分布の検討を行い、PV と比較した。

2) 研究方法

a) Swapping分子の作成

Dsg3 と Dsg1 を用いて、種々のスワッピング分子をバキュロウイルス発現系を用いて作成した。これらの分子は Dsg3 細胞外領域を N 末 2/3、1/3、C 末 2/3、1/3 に切断し、欠失領域に、対応する Dsg1 を融合させて作成した。これらは Dsg3 細胞外領域の N 末アミノ酸 1-403、N 末アミノ酸 1-161、C 末アミノ酸 163-566、C 末アミノ酸 405-566 の領域を含み、それぞれ Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis、Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis と命名された。

b) Competition ELISA 法

作成した分子を competitor として用いて、PNP16 例と PV 血清 25 例の competition ELISA 法を施行した。作成したそれぞれの分子を含む培養上清を PV 患者血清 1 μ l と反応させた後 (4 $^{\circ}$ C、O/N)、組換え Dsg3 固相化プレート (MBL) を用いた ELISA を行った。陰性コントロールとしてはいかなる Dsg3 も含まない昆虫細胞培養液、陽性コントロールとしては細胞外領域の全長を含む Dsg3-IgHis の培養液を用いた。陰性コントロールの OD 値を 0%、陽性コントロールの OD 値を 100% としたときの相対値をそれぞれの組換えタンパクの自己抗体吸収率とした。

$$\text{Competition rate}(\%) = \frac{1 - (\text{OD}_{\text{competitor}} - \text{OD}_{\text{positive}})}{(\text{OD}_{\text{negative}} - \text{OD}_{\text{positive}})} * 100$$

c) IgG subclass の ELISA

ELISA は組換え天疱瘡抗原 Dsg1 および Dsg3 が固相化されたプレート (MBL 社) を用いて検討を行った。200 倍に希釈した血清を ELISA プレート上で 1 時間反応させ、洗浄後、1000 倍希釈のマウス抗ヒトモノクローナル抗体 IgG1-IgG4 と室温で 30 分反応、さらに 5000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体にて室温 30 分で反応させた。洗浄後、tetramethylbenzidine と hydrogen peroxide が等量に混合された溶液にて発色を行った。発色は 4NH₂O にて反応を停止した。いずれにおいても同じ血清希釈液をネガティブ陰性コントロールとして用いた。吸収率は ELISA reader を用いて吸光度 450nm にて測定した。OD 値 0.16 を cut-off 値にして PNP 患者血清 15 例の検討を行い、PV 血清 16 例の分布と比較した。

3) 研究結果

a) 三次元エピトープ

まず代表例の結果を示す (図 1)。PV においては Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis で 96% とほとんどの抗体は吸収されており、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis でも 88% とかなりの抗体が吸収されていた。Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis および Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis においても 11% と 7% の吸収しか認められず、主要 epitope は Dsg3 N 末アミノ酸 1-161 に認められることが分かった。一方、PNP においては Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis では約 80% の抗体が吸収されている一方で Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis では 33% の抗体しか吸収されておらず、さらに Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis および Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis において 23% と 32% の吸収を認め、エピトープは細胞外領域全体の広い範囲に存在していることが確認された。

同様の epitope mapping を PNP16 例と PV 血清 25 例を用いて検討し、それぞれのスワッピング分子の自己抗体吸収率をグラフにまとめた (図 2)。50% 以上の吸収率を優位とした場合、Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis では 25 例中 24 例に、さらに Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis においても 18 例に優位な吸収を認め、平均吸収率は 87.3% と 64% と高い吸収率を示した。Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis では数例のみに、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis では 1 例のみに優位な吸収を認めただけであり、平均吸収率も低く、PV においては Dsg3 の主要エピトープは N 末 1-161 に多く存在する事が考えられた。

一方、PNP 16 例においては、Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis にて 16 例中 14 例に優位な吸収を認めるものの、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis にて 5 例のみ、また Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis にて 4 例、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis にて 5 例と、どの領域においてもほぼ同数の症例数であった。また、平均吸収率も Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis では 71.1% であったが、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis

では46.6%、Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHisでは39.8%、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHisでも33.3%とやはりどの領域においても同程度の吸収率を認めた。

従って、PNPにおいてはN末の1-403に多くのエピトープが認められるほか、N末のみならず、C末にもエピトープが存在することが判明し、PVと比較し、Dsg3細胞外領域の比較的広範囲に分布することが分かった。

b) IgG subclass の分布 (図3)

PVにおいてはIgG4は100%の15例中全症例にて陽性を認め、またIgG1は80%の15例中12例にて陽性を認めた。一方IgG2においては15例中7例が陽性で、IgG3においては全症例が陰性で、これらの結果よりPVにおいてはIgG4が主要subclassであることが確認された。一方PNP血清17例においては、IgG1は88.2%である15例が陽性、IgG2は64.7%にあたる11例で陽性であった。一方IgG3およびIgG4はそれぞれ23.5%の4例と41.1%の7例に陽性であった。すなわち、PNP血清中のIgG subclassはIgG1と、それについてIgG2が主要subclassであることが判明し、PVとは異なり、IgG4は比較的少ない頻度でしか認められず、またIgG3も若干ではあるも認められることが判明した。

D. 考察

腫瘍随伴性天疱瘡(以下PNP)は重篤な粘膜病変と多彩な皮膚病変を呈し、主として血液系悪性腫瘍を伴う自己免疫性水疱症で、尋常性天疱瘡(PV)とは確立された疾患である。PNP血清にはプラキンファミリーに属する様々な抗原蛋白に対する自己抗体が認められ、さらにPVの標的抗原であるデスモグレイン(Dsg)3に対する自己抗体も存在することが明らかにされた

ことから、PNPおよびPVとの間で認められる共通した症状が説明可能となった。PNPにおける水疱形成では、PVと同様、抗Dsg3抗体が重要な役割を担っていることが考えられるも、両疾患において明らかな違いも認められることから、両疾患のpathogenesisに何かしらの違いがあることが推測される。今回我々はPNPおよびPV両疾患において同じDsg3に対する自己免疫反応の違いがあるかを検討するため、PNPにおけるDsg3の三次元エピトープのマッピングとIgG subclassの分布の検討を行い、PVと比較した。

PNPにおけるDsg3のエピトープマッピングにあたって、Dsg3及びDsg1との間で作成したスワッピング分子は有用であったといえる。PVにおいては主要epitopeはDsg3 N末アミノ酸1-161に認められることが判明したが、PNPのエピトープはN末のみならずC末にも認められ、PVと比較し分子内の広範囲に分布することが判明した。これらのエピトープの違いの意義は未だ不明であるが、临床上PNPはPVに比較し重症であることから、これら臨床の違いがエピトープの違いから来ている可能性も考えられた。

また、IgG subclassの分布はPVにおいてはIgG4が主要subclassであったが、PNPにおいては、IgG1についてIgG2が頻回に認められ、とくにIgG4が多く認められることはなかった。以前Anhaltは間接蛍光抗体法を用い、PNPにおけるIgGサブクラスの分布の検討を行ったが、その結果、IgG1、IgG2、IgG4、IgG3の順に多く認められ、本研究における我々の結果と合致するものであった。天疱瘡におけるこれらIgGサブクラスの意義に関しては推測の域を出ないが、IgG1およびIgG3は補体活性に関与しており、一方、IgG4およびIgG2は補体活性にほとんどもしくは全く関与しないとされている。すなわち、

IgG1 優位である PNP の pathogenesis においては補体活性の関与が示唆され、そのため PV に比較し炎症が強く、重症である可能性が考えられた。

E. 結論

本年度の検討により、PNPは様々な分子に自己抗体を有するのみならず分子内においても分子全体にエпитープがあることが確認された。また、PVと比較し、Dsg3におけるエпитープおよびIgG subclassの分

布が異なることから、Dsg3に対する自己免疫反応が異なることが示唆された。

F. 研究発表

布袋祐子、藤井嘉子、天谷雅行、橋本隆、西川武二

腫瘍随伴性天疱瘡におけるデスモグレイン3三次元エピトープおよびIgGサブクラス
の解析

日本研究皮膚科学会第26回学術大会・総会
愛媛、2001年9月7-8日

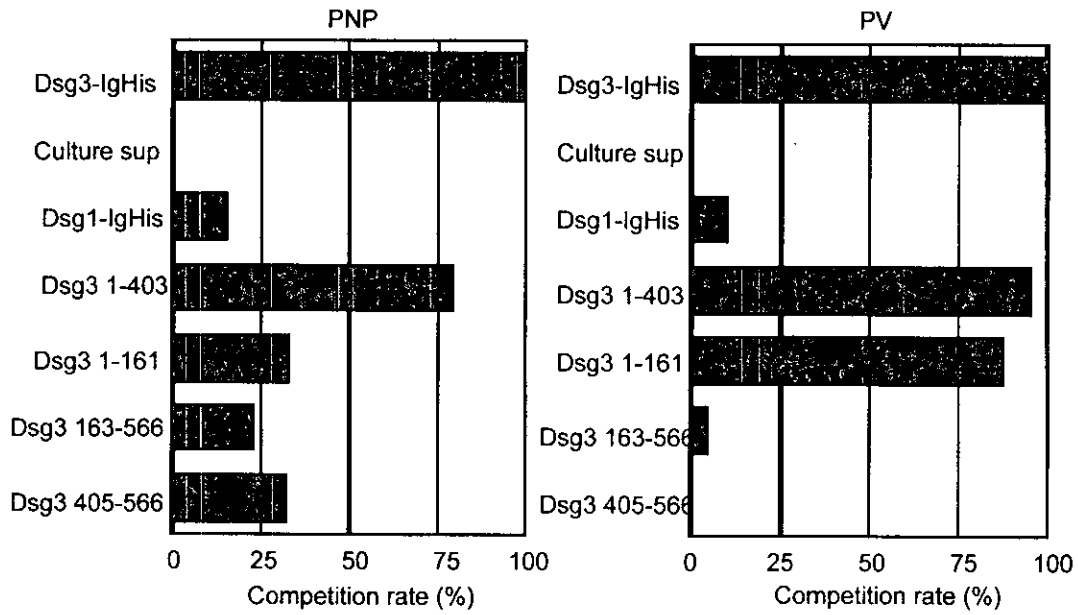


図1 PVおよびPNPにおける吸収率の代表例：PVにおいてはDsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHisおよびDsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHisでかなりの抗体が吸収されていたが、Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHisおよびDsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHisではいずれにおいてもごく僅かの吸収しか認められなかった。一方、PNPにおいてはDsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHisではかなりの抗体が吸収されている一方でDsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis、さらにDsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHisおよびDsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHisにおいて約20-30%の吸収を認めた。

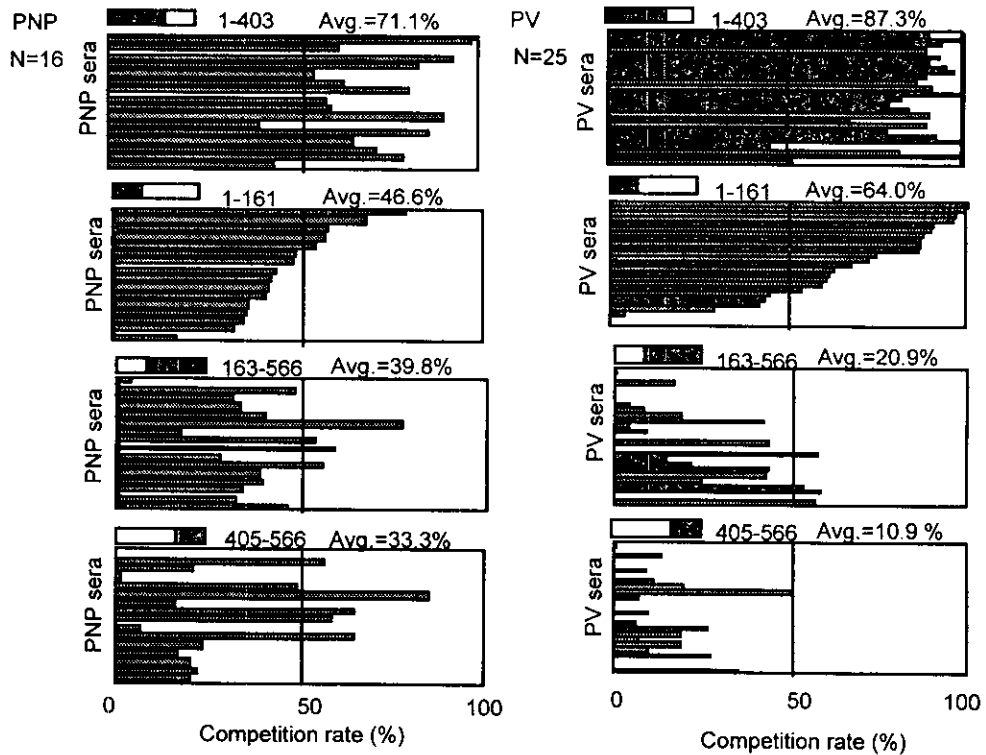


図2 PV25例およびPNP16例における三次元エピトープのまとめ：PVにおいては主要エピトープはN末1-161に多く存在する事が考えられた。一方、PNPにおいてはN末の1-403に多くのエピトープが認められるほか、N末のみならず、C末にもエピトープが存在することが判明した。

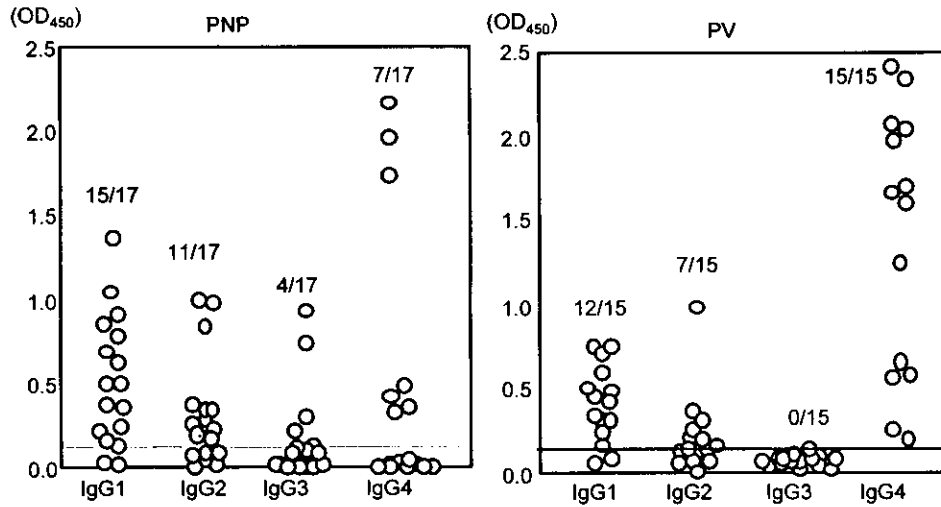


図3 IgG subclassの分布：PVにおいてはIgG4が主要subclassであることが確認されたが、一方PNPにおいてはIgG1と、それについてIgG2が主要subclassであることが判明した。

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

ナイーブ細胞移植を用いた天疱瘡モデルマウスの作製

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

研究要旨 以前我々は、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) へ移植することで、P Vモデルマウスの作製に成功した。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。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 P V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上でも応用が期待される。

共同研究者

青木三代 慶應義塾大学医学部皮膚科

A. 研究目的

組み換えマウス Dsg3 で免疫せずに、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞が Rag2^{-/-}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。

B. 研究方法

a) Dsg3^{-/-}マウス

米国 Jackson laboratory より得られたマウスを使用した。

b) Rag2^{-/-}マウス

米国 Taconic 社より購入したマウスを使用した。

c) ナイーブ脾細胞の移植

以前の方法では、免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を 1 匹あたり 1×10^7 個ずつ移植していた。今回は、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから脾細胞を分離し、マウス一匹あたり 5×10^7 細胞 / 500ul PBS になるように調整し、Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与した (n=20)。また、コントロールとして、ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスから分離した脾細胞をマウス一匹あたり 5×10^7 細胞 / 500ul PBS に調整し、Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与した (n=10)。各群の抗体価の推移を観察するために、移植後 14、28、42 日目の血清を採取した。

e) ELISA

血中の抗 Dsg3 抗体価は、組み換えマウス Dsg3 を抗原として用いた ELISA 法にて測定した。同様に抗 Dsg1 抗体価は、組み換えマウス Dsg1 を抗原として用いた ELISA

法にて測定した。

f) 直接蛍光抗体法 (DIF)

抗 Dsg3 抗体の粘膜上皮細胞間への沈着は、42 日目に採取したマウス口蓋を基質とした直接蛍光抗体法により検討した。

g) 肉眼的表現型の検討

ナイーブな Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を移植したレシピエントマウスの肉眼的表現型について rDsg3 で免疫した Dsg3^{+/-}マウスの脾細胞を移植した P V モデルマウスと比較検討した。

C. 研究結果

ナイーブな脾細胞を 5×10^7 細胞ずつ移植したマウスでは、移植後 2 週間で 20 匹中 16 匹の血中抗体価が上昇し、移植 3 週間で 15 匹に明らかな表現型を認めた。産生された抗体は、観察期間を通して Dsg1 に反応性を示すことはなく、Dsg3 特異的なものであった。また、Dsg3^{+/-}マウスの脾細胞を移植したマウスにおいては、Dsg3 に反応性を示す抗体は全く産生されなかった。(図 1)

抗体産生を示したマウスの口蓋では、粘膜上皮細胞間に IgG の沈着を認め、病理組織学的に、尋常生天疱瘡に特徴的な所見である基底層直上での裂隙形成が確認された(図 2)。一部のマウスでは、口腔内に広範囲に認められたびらんにより、摂食障害が生じたためと考えられる前歯の過長が認められた。また、鼻および眼周囲などの通常搔爬する部位や、足底などの物理的刺激を受けやすい部位に一致して痂皮を伴うびららを認めた(図 3a-3d)。これらの所見において、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間に明らかな差は認めなかった。以上のことから、Dsg3^{+/-}マウス内の免疫寛容による除去あるいは不活化を逃れた Dsg3 特異的リンパ球(T 細胞、

B 細胞)は、レシピエントマウスへ移植後、in vivo の状態で内在性の Dsg3 に出会い、活性化され、抗 Dsg3 抗体を産生することが示された。

D. 考察

以前我々が報告した P V モデルマウスの作製法では、Dsg3^{-/-}マウスを rDsg3 で繰り返し刺激することで Dsg3^{+/-}マウス内の Dsg3 特異的な T 細胞と B 細胞の頻度を増加させ、効率よく P V モデルマウスの作製を行っていた。しかし、今回の結果から、未免疫の Dsg3^{+/-}マウス脾細胞を移植するだけでも P V モデルマウスの作製は可能であることが示された。この方法においては、組み換え蛋白の作製および調整が不要であり、自己抗原ノックアウトマウスを免疫するステップも省略できることから、疾患モデル作製を簡便に短期間でできる点で非常に有用であると考えられた。すなわち、組み換え蛋白の作製が困難な自己抗原に対する自己免疫疾患においても、ノックアウトマウスの脾細胞を移植することにより臓器特異的自己免疫性疾患モデルマウスを作製できる可能性を示唆している。

また、今回用いた Dsg3^{+/-}マウスの脾細胞は、外来抗原である rDsg3 で免疫していないため、レシピエントマウス内の内在性の Dsg3 によって、初めて抗原刺激を受けるという点で以前のモデルマウスとは異なっていると考えられる。すなわち、生着したナイーブな Dsg3^{+/-}マウス由来の脾細胞はリンパ器官において、抗原提示細胞によって末梢抗原として Dsg3 を提示されることで分化すると考えられる。この、内在性の Dsg3 を認識して初めて抗体産生するという点で、よりヒト PV における抗 Dsg3 抗体産生機序に近いと考えられ、今後 PV における水疱形成機序の解明に非常に有用であると考えられた。

E. 結論

ナイーブな Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞をそのまま移植することで作製されたモデルマウスは、疾患モデル動物作製の点で非常に応用範囲が広く有用であると考えられた。

F. 学会発表

1) 青木三代、角田和之、大田孝幸、岩崎利郎、

小安重夫、天谷雅行、西川武二 ナイーブ Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を用いた尋常性天疱瘡の表現型の誘導 第8回分子皮膚科学フォーラム 東京 2001年7月

2) 青木三代、角田和之、大田孝幸、岩崎利郎、小安重夫、天谷雅行、西川武二 ナイーブ Dsg3^{-/-}マウス脾細胞移植による尋常性天疱瘡モデルマウスの作製 日本研究皮膚科学会第26回学術大会 愛媛 2001年9月

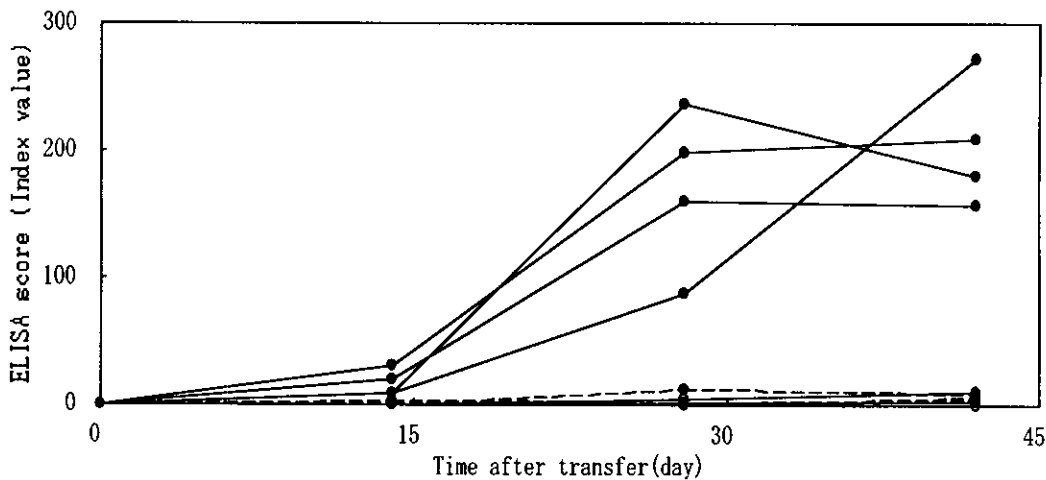


図1. ナイーブな Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を移植したマウスでは、移植一ヶ月後には抗 Dsg3 抗体の産生が認められた (実線、黒丸) のに対し、Dsg3^{+/-}マウス脾細胞を移植したマウスでは抗 Dsg3 抗体の産生は認められなかった (実線、白丸)。また、産生された抗体は Dsg1 とは反応しない、Dsg3 に特異的なものであった (点線、黒丸)。

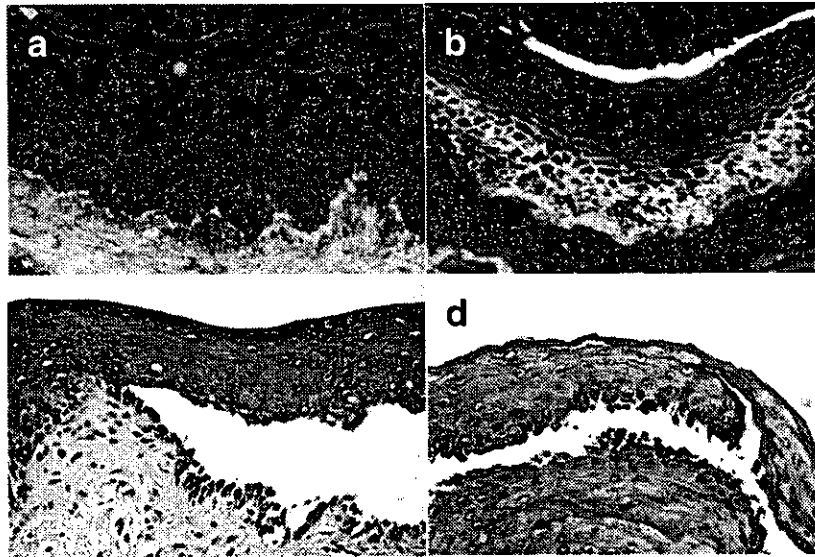


図2. ナイーブな *Dsg3*^{-/-}マウス脾細胞を移植したマウス (a, c) で、抗体産生が認められた個体では、免疫した脾細胞移植によるモデルマウス (b, d) と同様に口蓋の粘膜上皮細胞間に IgG の沈着が認められた (a, b)。これらのマウスでは産生された抗体により、口蓋の粘膜上皮細胞において P V に特徴的な基底層直上での棘融解が免疫した脾細胞を移植したモデルマウスと同様に認められた (c, d)。

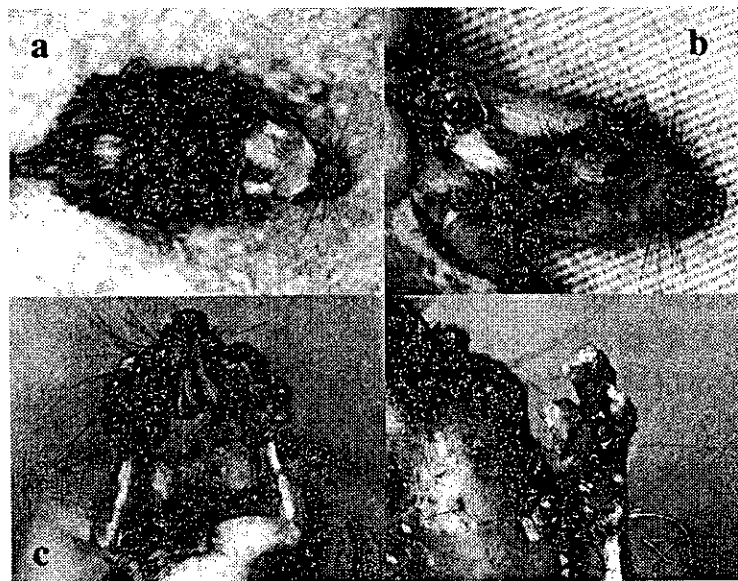


図3. ナイーブな脾細胞を移植したマウスの頭部および背側に認められたパッチーな脱毛 (a)。中には、鼻周囲および眼周囲など通常搔爬する部位に一致して痂皮を伴うびらんを呈するものが認められた (b)。前歯の過長は、口腔内のびらんによる摂食困難のためと思われる (c)。足底に重度の痂皮形成を呈するマウスでは、足底の痂皮を取り除くとびらんを認めた (c, d)。

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における抗原 3 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 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）モデルマウスにおける、マウスデスマグレイン 3 (mDsg3) の三次元エピトープの分子上局在を検討する目的で、mDsg3 の細胞外領域を三つのフラグメントとし、欠失領域を類似分子である mDsg1 で置換した 4 種類のスワッピング分子を作成し、これらに対する PV モデルマウス血清の反応を Competition ELISA により検討した。PV モデルマウスの主要抗体産生は、C 末 2/3 アミノ酸に対して認められた。Dsg のアイソタイプ間でより相同性の低い C 末に対して自己抗体が産生されていた。

共同研究者
安西秀美
慶應義塾大学医学部皮膚科助手

A. 研究目的

本研究では PV モデルマウスにおける mDsg3 の三次元エピトープの分子上局在を検討する。

B. 研究方法

a) モデルマウス

下記の如く免疫した脾細胞を用いたもの (Imm) に加え、新たに、別項で報告する如く免疫しない脾細胞を用いたもの (Non-imm) の二種のモデルマウスを使用した。imm は、すでに報告したように 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。Non-imm は組み換え Dsg3 蛋白による免疫を行わずに、Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに移植した。マウス血清中の抗 mDsg3 抗体産生を ELISA にて確認した。

b) スワッピング分子の作成

バキュロウイルスの発現系を用いた組み換え Dsg3 蛋白の細胞外領域を N 末端 3 分の 1、N 末端 3 分の 2、C 末端 3 分の 1、C 末端 3 分の 2 の長さに切断し、欠失領域に、類似の分子である Dsg1 を融合させることで、三次元構造を保つ 4 種類のスワッピング分子を作成した。

c) Competition ELISA

自己抗体が反応する抗原エピトープが同時に存在しない場合、自己抗体は吸収されぬまま、固相化された全長をもった mDsg3 抗原と結合して ELISA 反応は陽性となり、competition が起きてないことになる。しかし、抗原として主要な三次元エピトープが共存した場合、これに大部分の抗体が吸収除去されるため ELISA 反応は陰性となり、competition が起きたことになる。陽性コントロールの OD 値を 100%、陰性コントロールの OD 値を 0% としたときの相対値をそれぞれの組換え蛋白の自己抗体吸収率とした。

C. 研究結果

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、Imm モデルマウス 28 例、Non-imm モ

デルマウス 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)。

D. 考察

すでにわれわれがヒト PV 患者血清を用いて同様の検討をした結果では、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 1/3 アミノ酸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 末側に抗体産生が起こり得る。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と考えられた。

E. 結論

本年度の検討により、我々の作成した PV モデルマウスでは、ヒト PV 患者と異なり、Dsg アイソタイプ間で相同性の低い C 末のエピトープに対する抗体産生を認める傾向にあった。今後、水疱誘導活性はエピトープにより異なるのか検討するとともに、ヒト疾患に於いて Dsg3 の N 末に自己抗体が産生されるメカニズムを解明する必要がある。

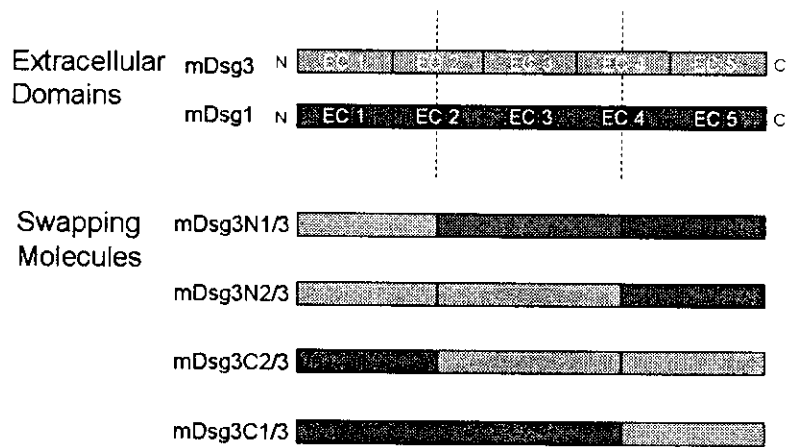


図1.マウスデスモグレイン3スワッピング分子

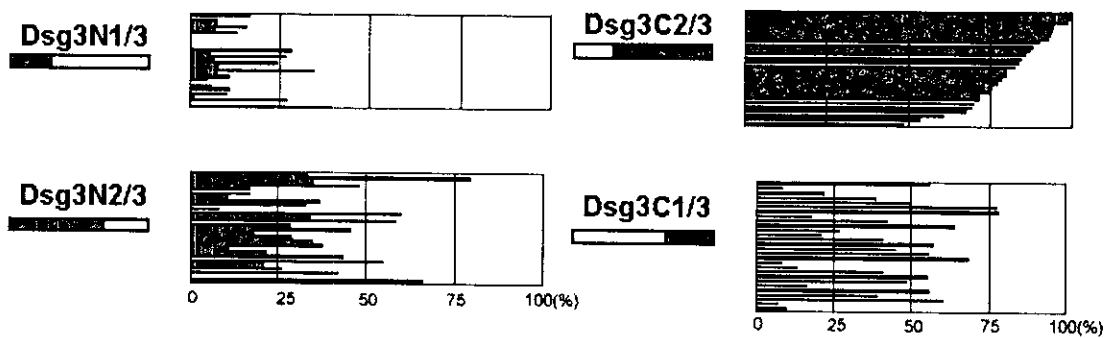


図2.rDsg3で免疫したDsg3^{-/-}脾細胞を移植したモデルマウス28例のCompetition ELISA

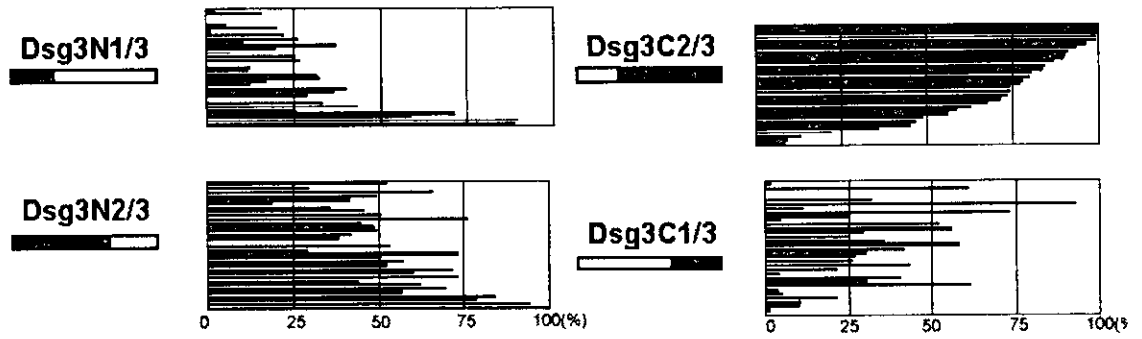


図 3.rDsg3 で免疫しない Dsg3^{-/-}脾細胞を移植したモデルマウス 32 例
 の Competition ELISA

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 小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授

研究要旨：尋常性天疱瘡（PV）は自己免疫性の水疱形成疾患で、その自己抗原はカドヘリンタイプの細胞接着因子であるデスモグレイン3（Dsg3）である。現在まで、Dsg3 に対する自己抗体の産生機序については殆ど明らかにされていない。本研究では、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。その結果、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ることが判明した。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。

研究協力者

角田和之、大田孝幸

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

A、研究目的

本研究は PV モデルマウスを用いて、PV における自己抗体産生機序を明らかにすることを目的とする。

B、研究方法

マウスは以下のものを使用した。Dsg3^{-/-}マウスは実験中央動物研究所にて繁殖させたマウスを使用した。Rag2^{-/-}マウスは実験中央動物研究所より得られたマウスを使用した。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、アレンタ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。

フローサイトメトリーによる解析は以下の方法で行った。GK1.5-FITC (anti-CD4), GK1.5-PE, 1D3-PE (anti-CD19), RA3-6B2-PE (anti-CD45R), R8-140-PE (anti-Ig κ light chain), 5H10-1-biotin (anti-CD8 α), A20-FITC (anti-CD45.1), A20-biotin, 104-biotin (anti-CD45.2).は PharMingen (San Diego, CA) をフローサイトメトリーに用いた。ビオチン化抗体の検出には Gibco BRL, Grand Island, NY より得られた streptavidin-Red670 を用いた。染色後の細胞は 2% FCS 中に浮遊させ CELL-Quest program (Becton Dickinson, San Jose, CA) にて FACScan を行った。

移植前の Dsg3^{-/-}マウスと Dsg^{+/+}マウスの免疫とリンパ球の処理は以下の方法で

行った。Dsg3^{-/-}マウスを complete Freund Adjuvant と組み換えマウス Dsg3 (第1回目) にて、さらに Incomplete Freund Adjuvant と組み換えマウス Dsg3 (第2,3回目) にてし、最後に組み換えマウス Dsg3 のみで2回免疫を行った。次に、免疫が終了したマウスの脾細胞を摘出し70umのナイロンにて分離し、hypotonic buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1mMNDTA) にて血球の処理を行った。CD4(+)T細胞の分離は、まず抗CD4抗体標識magnetic beadsにて分離しさらに GK1.5-FITC (anti-CD4) と R8-140-PE (anti-Ig) にて染色を行った。最終的にCD4(+)細胞の分離はFACS Vantage (Becton Dickin-son, San Jose, CA) を用いて行った 分離された細胞の純度は99%以上であった。

リンパ球の移植とマウスの免疫は以下の通り行った。0.8x10⁶ ~1.2x10⁷ のT細胞と 0.6x10⁶ ~1.5x10⁶ のB細胞を500ulのPBS中に浮遊させRag2^{-/-}マウスの尾静脈より移植した。移植翌日よりレシピエントマウスを最高で計10回、組み換えマウスDsg3にて免疫を行った。

培養マウス角化細胞を用いた living cell staining は以下の方法で行った。20倍に希釈したレシピエントマウス血清を培養マウス角化細胞 PAM212 の培養液に加え37℃、CO₂ 培養器中で30分間培養し、100%メタノールにて-20℃中で20分間固定した。さらにFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体を室温で30分間反応させ蛍光顕微鏡で抗体の沈着の有無を確認した。

C、研究結果、考察

昨年度までの本研究では、さまざまな組合せで移入したレシピエントマウス中のリンパ球の生着をフローサイトメトリーで観察し、さらにレシピエントマウス血清中の抗体の生細胞染色性について報告した。今年

度は昨年度に加えて、レシピエントマウスの肉眼的表現型の変化、体重変化、病理組織学的、免疫組織学的所見を加えて検討した。

精製されたT細胞とB細胞をさまざまな組合せでRag2^{-/-}マウスに移植し、表現型の変化を観察した (Table1)

この実験系ではDsg3^{-/-}マウスのT細胞とDsg3^{-/-}マウスのB細胞の組合せを陽性コントロールに、Dsg^{+/-}マウスのT細胞とDsg3^{+/+}マウスのB細胞の組合せを陰性コントロールとしてそれぞれ設定した。移植後10週でCD4(+)T細胞とCD19(+)B細胞が、レシピエントマウス中より検出された。(fig.1B) また、T細胞のみを移植したマウスではCD4(+)T細胞は検出されたがCD19(+)B細胞は検出されなかった。

レシピエントマウスにおける天疱瘡病変の有無は、直接蛍光抗体法による角化細胞表面への抗体の沈着の有無、病理組織学的な水疱形成の有無、体重の変化にて検討した。(Table1)。すなわち。また休止期毛根周囲の角化細胞間のDsg3の機能を障害するために、毛根を繫留する事が困難となり脱毛を生じると考えられ、脱毛の有無についても検討した。その結果、Dsg3^{-/-}T細胞とDsg3^{-/-}B細胞の組合せのマウスにのみ体重の減少が認められた (Table 1, fig 2)。8匹中5匹のDsg3^{-/-}T細胞とDsg3^{-/-}B細胞の組合せのマウスにパッチ状の脱毛と体重減少を認めたが、他のいかなる組合せのT細胞とB細胞の組合せのマウスにも脱毛や体重減少などの表現型の変化は認められなかった。さらにPVの表現型を有するレシピエントマウスの血清をマウス角化細胞であるPAM212細胞の培養液に加えたところ細胞間接着部に一致してマウスIgG抗体の沈着が認められた (fig 3)。加えて、これらの5匹のマウスではin vivoで角化細胞表面へのIgGの沈着が認められ、病理組織学的には基底層直上の水

疱形成が認められた。そのほかのいかなる組合せのマウスにおいても抗 Dsg3 抗体の産生は認められなかった。これらの所見は、病原性を有する抗 Dsg3 抗体産生と PV の表現型の誘導には T 細胞と B 細胞の両方の免疫寛容の破綻が必要である事を示すと考えられる。我々の PV モデルマウスはヒトの PV に類似した特徴を有することから、Dsg3 に対する免疫寛容は T 細胞と B 細胞で成立し、これら両細胞の免疫寛容の破綻が PV の発症に関わっていると考えられる。

E、研究発表

1、論文発表

Kazuyuki Tsunoda, Takayuki Ota , Harumi Suzuki, Manabu Ohya, Tetsuo Nagai, Takeji Nishikawa, Masayuki Amagai and Shigeo Koyasu Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris European Journal of Immunology. 2002. 32: (in press)

2、学会発表
なし

Table I Summary of combination transfer of T and B cells

Source of		マウス	living cell	in vivo I での	病理組織学的	肉眼的表現型	
T cells	B cells					Staining	IgG の沈着
Dsg3-/-	Dsg3-/-	8	5	5	5	5	5
Dsg3-/-	Dsg3+/+	7	0	0	0	0	0
Dsg3+/-	Dsg3-/-	8	2	2	0	0	0
Dsg3+/-	Dsg3+/+	8	0	0	0	0	0
Dsg3-/-	none	4	0	0	0	0	0

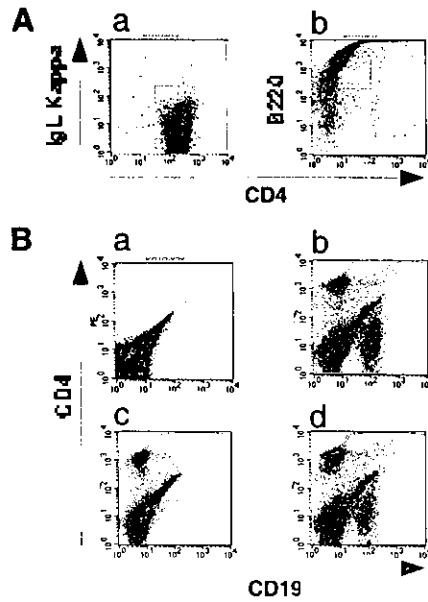


fig. 1 フローサイトメトリーによる移植されたリンパ球の解析

移植の際に精製された精製度は CD4(+)細胞では 99%以上、B 細胞では 95%以上であった (A. panel a and b)。移植 3 ヶ月後のレシピエントマウス中のリンパ球の頻度を示す。移植を行っていない Rag2^{-/-}マウス (B. panel a)。Dsg^{+/-}T 細胞と Dsg3^{+/+}B 細胞を移植したレシピエントマウス (B. panel b)。Dsg^{+/-}T 細胞のみを移植したレシピエントマウス (B. panel c)。Dsg3^{-/-}T 細胞と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植したレシピエントマウス (B. panel d)。

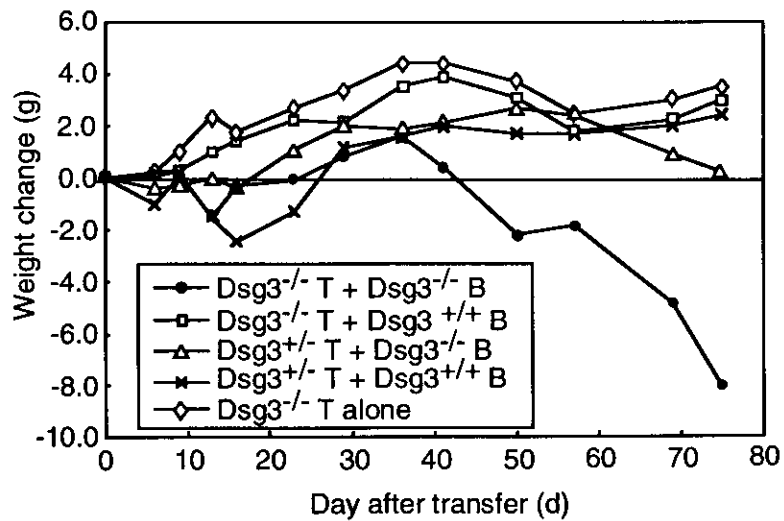


fig. 2 レシピエントマウスの体重の変化

Dsg3^{-/-}T 細胞と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植したレシピエントマウスのみで体重の減少を認めた。

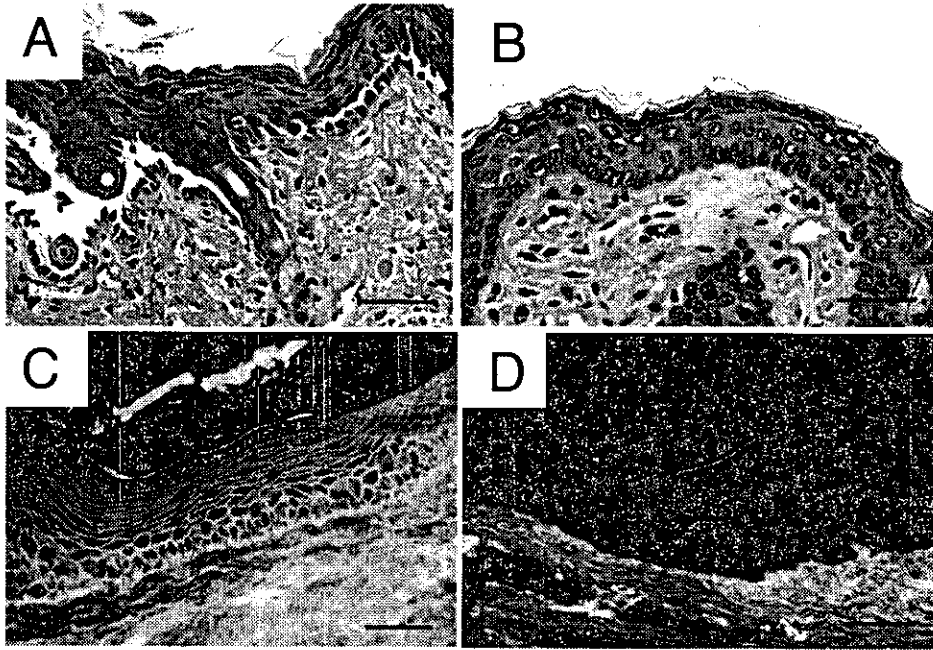


fig.3 レシピエントマウスの病理、免疫組織学的所見

Dsg3^{-/-}T 細胞と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植したマウスでは基底層直上の水疱形成および、マウス IgG の沈着を認めた (A,B)。しかし、Dsg3^{-/-}T 細胞と Dsg3^{+/+}B 細胞を移植したマウスでは水疱形成、抗体の沈着を認めなかった。