

厚生省科学研究費補助金（疾患モデルに関する研究事業）
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 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

研究要旨：天疱瘡は自己免疫性の水疱形成疾患で、その発症に關与する自己抗体の解析は病因の解明や、治療法の開発に重要であると考えられる。最近われわれが開発された尋常性天疱瘡（PV）モデルマウスは病原性を有する自己抗体により天疱瘡病変を誘導している。この事実を利用して、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製し、その特異性、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モデルマウスを用いて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

a) Dsg3^{-/-}マウス

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。

b) Rag2^{-/-}

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。

c) PV model mouse

免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに移植し PV モデルマウスを作製した。Dsg3^{-/-}マウスの免疫は初回、組み換えマウス Dsg3-His (5ug/mouse) と完全フロイントアジュバントを皮下に注射した。初回免疫より 7 日後、14 日後に組み換えマウス Dsg3-His (5ug/mouse) と不完全フロイントアジュバントを腹腔内に注射した。さらに 21 日後、と細胞移植 4 日前に組み換えマウス Dsg3-His

(5ug/mouse) 単独を腹腔内に免疫した。免疫終了後、Dsg3^{-/-}マウス脾細胞 1×10^7 を PBS: Phosphate Buffered Saline、500ul 中に懸濁し、Rag2^{-/-}マウス尾静脈より静注した (figure 1)。脾細胞移植 30 日後に肉眼的な被毛の脱毛と血清学的にレシピエントマウス血清を採取し、マウス Dsg3-His を抗原とした ELISA 法と Living cell staining にて抗マウス Dsg3 抗体産生を確認した

1) ELISA

既報告と同様に作製したバキュロウイルスベクター、pEVmod-mouseDsg3-His、pEVmod-mouseDsg1-His を用いた。組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞 High Five に感染させ、組み換え Dsg 蛋白を培養液中より回収、精製後 ELISA プレートにコートした。ハイブリドーマ培養上清を各ウェルに 50ul 入れ、既報告通りに ELISA 法を施行した。

2) Living cell staining

培養マウス角化細胞 PAM212 を 8 ウェル、Chamber slide にて培養した。培養液を 30 倍希釈し、血清サンプルあるいはモノクローナル抗体培養上清と置換し、37℃、5%CO₂ インキュベーターにて 30 分間培養した。メタノール固定後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG にて反応後蛍光顕微鏡に

て検鏡した。

d) 細胞融合

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 (figure 2)。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。アイソタイプはマウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット (Iso Strip, Roche, Mannheim, Germany) を用いて決定した。

e) 間接蛍光抗体法

C57Bl/6J マウス口蓋粘膜、足底部皮膚、肝臓、腸を 5um 厚で薄切片し基質を作製した。各ハイブリドーマ培養上清を室温で 1 時間反応後、100 希釈 FITC 標識ヤギ抗マウス IgG を室温にて 60 分反応後、蛍光顕微鏡にて検鏡した。

g) モノクローナル抗体の精製

RPMI1640 培養液中でハイブリドーマを大量培養し、protein A カラムにて濃縮、精製した。

h) 落葉状天疱瘡 (PF: Pemphigus foliaceus) 患者血清

臨床的、病理組織学的に PF の特徴を有し、血清学的に間接蛍光抗体法および ELISA 法にて PF と診断された 1 患者血清を選択した。患者血清は 40%飽和硫酸アンモニウム沈殿させ、Centriprep にて約 10 倍に濃縮した。

i) 新生マウスによる病原性の確認

新生仔マウスへモノクローナル抗体を移入し、病原性の確認を行った。モノクローナル抗体と同時に移入する PF 患者血清を少量単独で移入し肉眼的、病理組織学的に水疱の形成が認められない量を決定した。同様に Dsg1 を特異的に消化する Exfoliative toxin A (ETA) を用いて、それ単独では病変を誘導しない程度の量を決定した。新生仔マウスへの移入は、モノク

ローナル抗体単独群、モノクローナル抗体と病変を誘導しない量の PF 患者血清の同時移入群、モノクローナル抗体とそれ単独では病変を誘導しない程度の ETA の同時移入群の 3 群で行った。生後 24 時間以内の新生仔マウスの肩胛骨間皮下にインスリン用シリンジポンプを用いて皮下注射した。注射後 18-24 時間で断頭し組織を採取し病理組織検査用に固定した。

j) 免疫不全マウスによる病原性の確認

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。

k) 直接蛍光抗体法

各種基質用組織を OCT コンパウンドにて包埋し、凍結後 5um 厚で薄切片を作製した。100 倍希釈、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG にて反応後、蛍光顕微鏡にて検鏡した。

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. 結果、考察

現在まで、マウス Dsg3 に反応する 9 クロー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、その他全てのクローンが 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、バキュロウイ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。AK15, 18, 19, 20, 23 はマウスとヒトの Dsg3 に交叉反応性を有するクローンであった。これらのクローンのなかで AK23 はヒト Dsg3 に対する反応性は非常に高かった。以上の結果より作製されたモノクローナル抗体の認識するエピトープは単一ではないことが示された。また、マウス各臓器および正常ヒト皮膚、口腔粘膜を基質として用いた間接蛍光抗体法では、全ての抗体でマウス硬口蓋粘膜における細胞間接着部に対する反応が認められた。しかし、心臓、腸、肝臓などの臓器では抗体の反応は認められなかった。これらの所見は組織中における Dsg の分布に一致した所見であった。また、正常ヒト皮膚、口腔粘膜を用いた間接蛍光抗体法では AK1, 15, 18, 19, 20, 23 で反応が認められ、ELISA の結果との解離は認めなかった。更に培養マウス角化細胞 PAM212 を用いた Living cell staining ではすべてのモノクローナル抗体が角化細胞表面への反応性を有していた。この結果より全てのモノクローナル抗体は *in vivo* において反応性を有する抗体であることが示された (表 1、図 1)。

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 (Figure 2、

a)。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 (図 2、d、g)、組織学的にも基底層直上の水疱形成を認めた (図 2、f、i)。免疫組織学的にはすべての組み合わせにおいて基底層直上の表皮角化細胞表面への抗体の沈着が認められた (図 2、b、e、h)。

新生マウス皮膚を用いた実験では、前述したように、マウス皮膚に Dsg1 が共発現しているために、その Dsg1 の接着機能を特異的に障害する目的で PF 患者血清や ETA を同時に移入して病原性を確認する必要性があった。しかし、この方法はマウスの個体差や抗体の活性のばらつきが生じる可能性があった。そこで、さらに Dsg3 を正常に発現する免疫不全マウスを用いた病原性確認を行った。ハイブリドーマを免疫不全マウスの腹腔内に接種し腹水化させ、もしモノクローナル抗体が病原性を有すれば、抗 Dsg3 抗体単独陽性のヒト PV で口腔粘膜に優位に水疱が形成されるのと同様に、レシピエントマウスの口腔粘膜にも水疱が形成されると考えた。その結果、AK23 産生性ハイブリドーマを接種した Rag2-/-マウスのみで、移植後約 7-10 日で被毛の脱毛が認められた (図 3、a 矢印)。直接蛍光抗体法では硬口蓋粘膜および足底部皮膚の基底層直上での角化細胞表面への IgG の沈着が認められた (図 3、b、c)。病理組織学的には硬口蓋粘膜で PV に特徴的な、基底層直上の水疱形成が認められた (図 3、d)。以上の肉眼的、病理組織学的な変化は

PV モデルマウスとはほぼ同様の所見であった。他のクローンを腹腔内に接種したマウスでは、免疫組織学的には足底部皮膚、硬口蓋粘膜に AK23 と同様の IgG の沈着が認められた。ところが、十分な腹水の貯留が認められたのにもかかわらず、肉眼的に被毛の脱毛、体重減少、病理組織学的に基底層直上の水疱形成は認められなかった。以上の結果より AK23 は単独で天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する抗体であることが確認された。

更にモノクローナル抗体の特異性を、バキュロウィルス発現系を用いて作製した組換えDsg3蛋白を用いた免疫沈降法と免疫ブロット法にて検討した。その結果、AK19 では分子量が異なるDsg3蛋白との反応性を認めた。しかしAK23では、AK19が認識した分子量が小さい蛋白分子と同じ分子量の単一なバンドのみを認めた。一般的に、バキュロウィルス発現系により得られた組み換えDsg3蛋白はその培養上清中に、プロ配列を有する不活性型のDsg3蛋白とプロ配列が除去された活性型のDsg3が存在する。つまり、AK19は分子量が大きいプロ配列を有する不活性型のDsg3蛋白分子をも同時に認識する抗体であることがわかる。これと比較してAK23は分子量が小さい、接着機能を有すると考えられる活性型のDsg3蛋白分子のみを認識する抗体であると考えられる (図4)。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。

今後の展開

今回、得られたAK23という抗Dsg3モノクローナル抗体は他のモノクローナル抗体とは異なる特異性を有し、また唯一、強力な病原性を有する抗体であった。今回、初めてモノクローナル抗体単独でPVを誘導できる事が確認され、Dsg3における細胞接

着機能ではこのAK23が認識するエピトープが非常に重要である事が考えられる。今後はAK23が認識するエピトープを詳細に検討することにより天疱瘡の発症機序の解明や細胞接着機能の解明が可能になるものと考えられる。またAK23が認識するペプチドを作製し、それにより抗原特異的な抗体除去療法の開発などが可能になると考えられる。

D、研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

角田和之、青木三代、大田孝幸、永井哲夫、山田健人、小安重夫、天谷雅行、西川武二
抗デスマグレイン 3 モノクローナル抗体による天疱瘡様病変の誘導 第 8 回分子皮膚科学フォーラム、2001. 07.

角田和之、永井哲夫、青木三代、大田孝幸、小安重夫、天谷雅行、西川武二
病原性を有する抗マウスデスマグレイン 3 モノクローナル抗体の作製 第 11 回、日本口腔粘膜学会総会、2001. 07.

角田和之、青木三代、大田孝幸、永井哲夫、山田健人、小安重夫、西川武二、天谷雅行
抗デスマグレイン 3 モノクローナル抗体による天疱瘡病変の誘導 日本研究皮膚科学会 第 26 回年次学術大会・総会、2001. 09.

角田和之、大田孝幸、永井哲夫、山田健人、小安重夫、西川武二、天谷雅行
天疱瘡モデルマウスを用いた抗デスマグレイン 3 病原性モノクローナル抗体の作製 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会、2001. 12.

Kazuyuki Tsunoda, Miyo Aoki, Takayuki Ota, Taketo Yamada, Tetsuo Nagai, Shigeo Koyasu, Takiji Nishikawa,

Masayuki Amagai Development of anti-Desmoglein 3 (Dsg3) pathogenic monoclonal antibody using active disease mouse model for vulgaris (PV).

The society for Investigative Dermatology, 62nd annual meeting, 2001, 05, Washington, DC

表1, 各モノクローナル抗体の特異性

MoAb	アイソタイプ	ELISA				間接蛍光抗体法						living cell staining (PAM 212)
		マウス		ヒト		mouse				human		
		Dsg3	Dsg1	Dsg3	Dsg1	硬口蓋	皮膚	肝臓	腸	皮膚	粘膜	
1	IgG1 κ	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
7	IgG1 κ	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
9	IgG1 κ	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
15	IgG1 κ	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
18	IgG1 κ	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
19	IgG1 κ	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
20	IgG1 κ	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
22	IgG1 λ	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
23	IgG1 κ	+	-	++	-	+	+	-	-	+	+	+

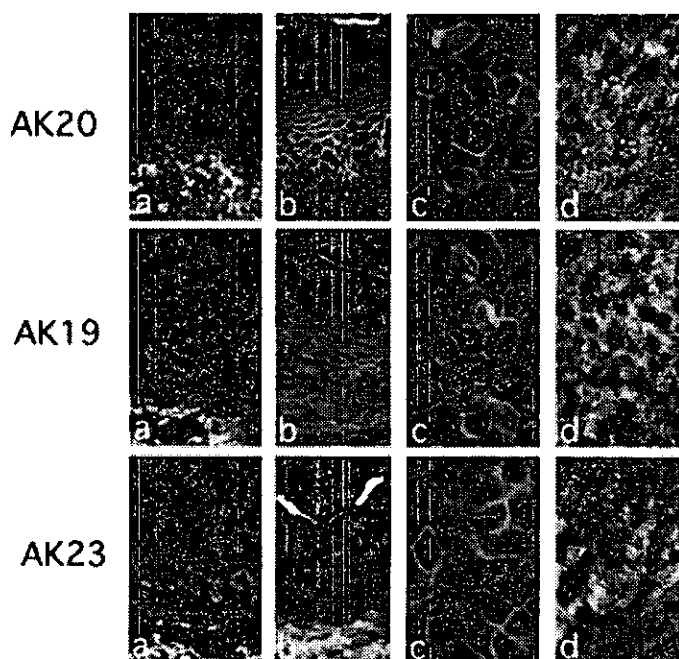


図1 モノクローナル抗体の間接蛍光抗体法(IIF)と Living cell staining

ヒト正常皮膚を基質とした IIF では AK20、AK19 では基底層直上に弱い抗体の反応を、AK23 では同部に強い反応を認める。(a) マウス硬口蓋粘膜の IIF ではすべての抗体で基底層から上皮中層にかけて反応が認められた(b)。マウス培養角化細胞 PAM212 を用いた Living cell staining において全ての抗体で角化細胞表面への IgG の反応を認める (c)。マウス心臓を基質とした IIF では全ての抗体において反応は認められなかった (d)。

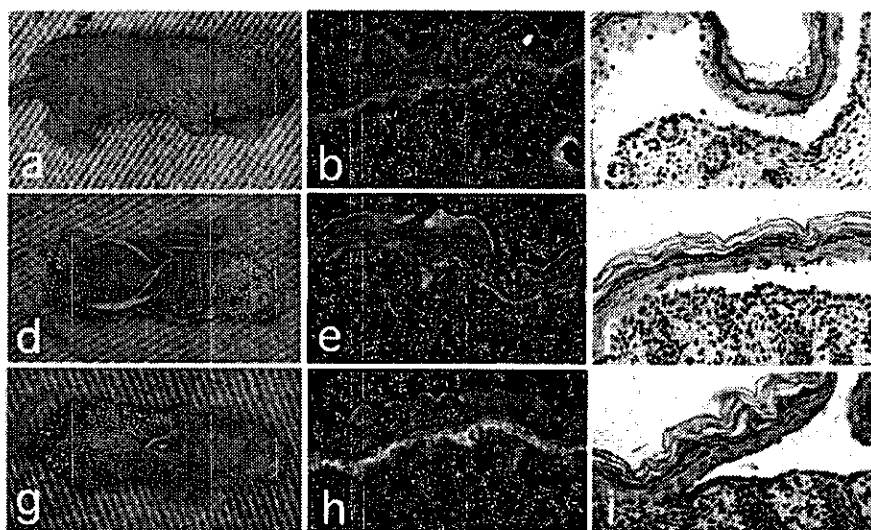


図2 新生仔マウスへの AK23 の移入

AK23 単独移入の新生マウスは肉眼的に水疱の形成を認めない (a)。AK23 と PF 血清 (d) または ETA を同時に移入したマウス (g) では広範囲な水疱形成を認める。直接蛍光抗体法ではマウス IgG の沈着を認めた (b, e, h)。病理組織学的に、全ての組み合わせで基底層直上の水疱形成を認めた (c, f, i)。

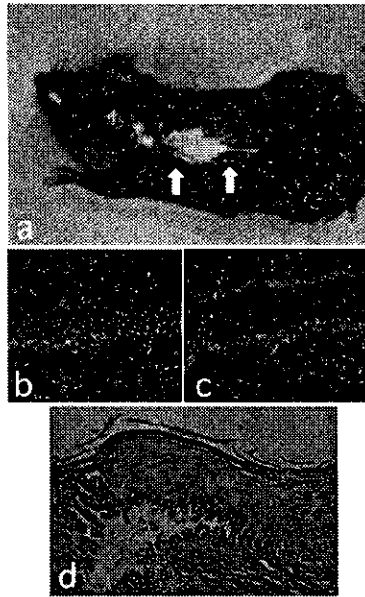


図3 AK23 産生性ハイブリドーマの免疫不全マウス腹腔内への接種

AK23 産生性ハイブリドーマを腹腔内に接種したマウスは、接種後、被毛の脱毛を認めた (a)。直接蛍光抗体法で、硬口蓋粘膜 (b)、足底部皮膚 (c) において抗体の沈着を認めた。病理組織学的に硬口蓋粘膜に基底層直上の水疱形成を認めた。

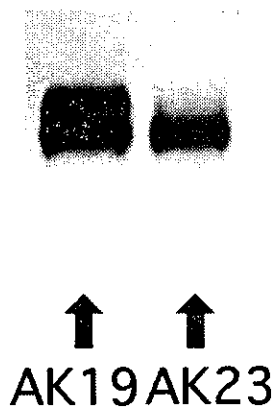


図4 モノクローナル抗体の免疫沈降法による特異性の検討

Dsg3 を抗原とした免疫沈降法。AK19 では分子量の異なるバンドが認められたが、AK23 では AK19 で認められた分子量の小さい蛋白と同じ分子量のバンドのみが認められた。

厚生省科学研究費補助金（疾患モデルに関する研究事業）

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・免疫学 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、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皮膚科

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-2Kb トランスジェニックマウスに H-2Kb を肝臓でのみ発現するようにコントロールされた抗 H-2Kb、H-2Kb ダブルトランスジ

ェニックマウスでは H-2Kb 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、抗原に应答できない。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阻害があり、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-2Kb 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剰されるかを解析する。

B 研究方法

1. 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。また両鎖を含むマウスは 24 匹中 2 匹に確認した。

2. 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'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。

3. 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-IgMa (DS-1), anti λ IgM(R6-60.2)で染色した。全ての抗体 h 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

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 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。

骨髄 B 細胞の解析

H 鎖のみのトランスジェニックマウスでは IgM-FITC、CD19-PE で染めると、IgM-high の割合が増加していた。両鎖のトランスジェニックマウスでは WT と比較すると、43%から 35%へと割合の減少を認めるものの、その大部分は IgM⁺、Kappa 鎖を発現しており、トランスジーンを発現していると考えられた。(Fig2、4)

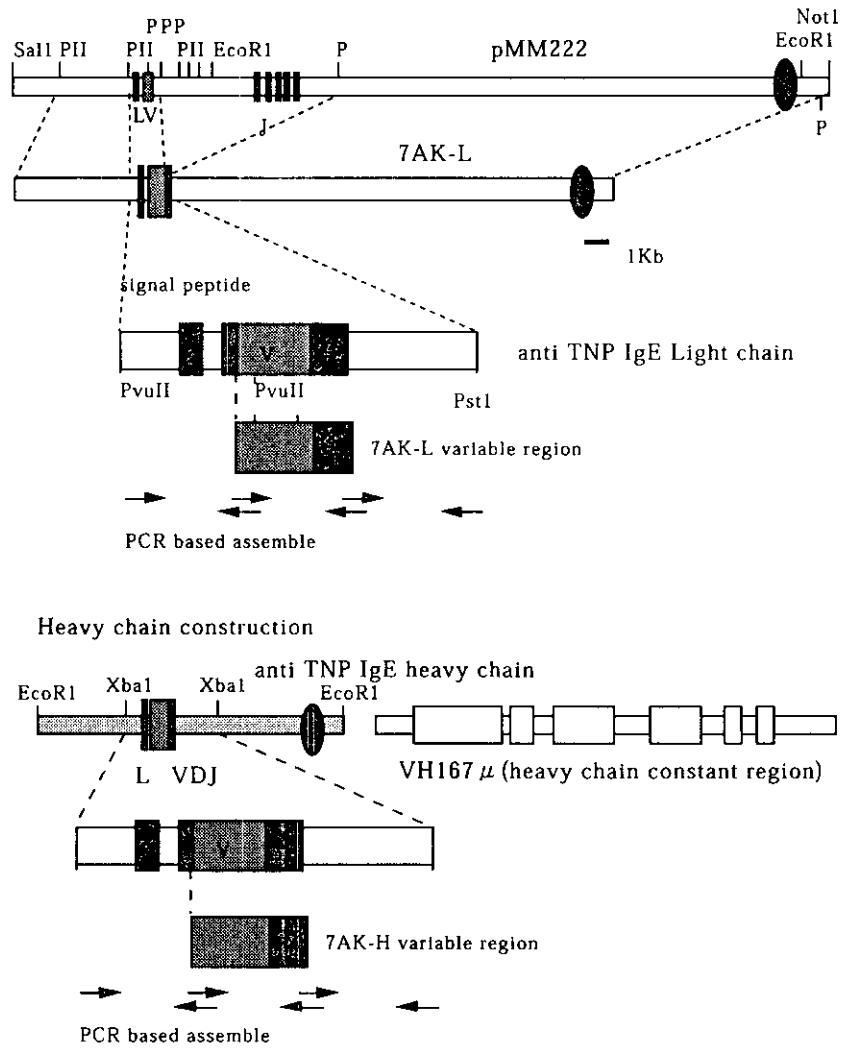


Fig1: Heavy and light chain construction

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

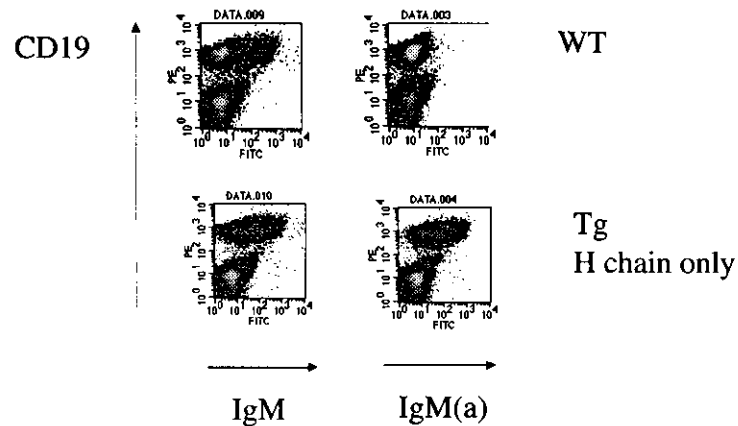


Fig2: WT and heavy chain transgenic mouse bone marrow cells were stained with IFITC-IgM and PE-CD19. In Tg mouse, IgM-high B cells were detected.

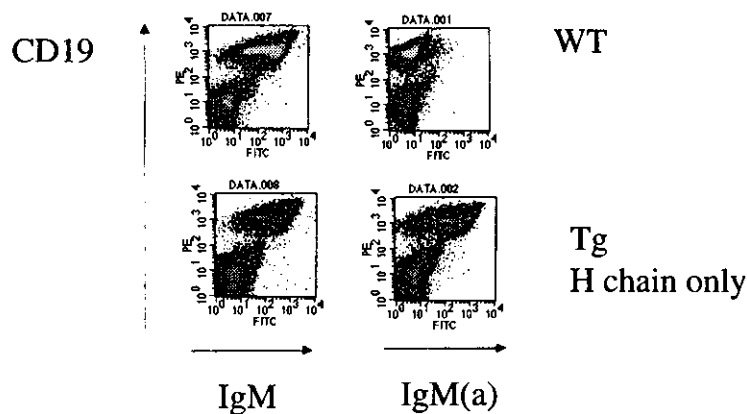


Fig 3: WT and heavy chain transgenic mouse spleen cells were stained with IFITC-IgM and PE-CD19. There is no difference between WT and Tg except for the expression of IgM-a.

脾臓 B 細胞の解析

H 鎖のみのトランスジェニックでは WT と比較し、明かな差は認められなかった。両鎖のトランスジェニックマウスでは、B 細胞の割合が 44%から 16%へと明らかに

減少していた。また、8 割の細胞はトランスジェニック由来の IgM^a を発現していた。L 鎖に関しては、ほとんどの細胞が Kappa 鎖を発現しており、内在性の Kappa 鎖が発現しているものと考えられた。(Fig3、5)

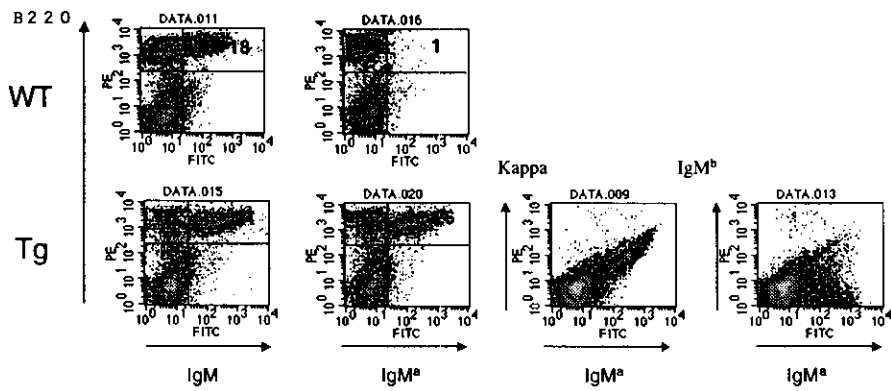


Fig 4: WT and heavy and light chain transgenic mouse bone marrow cells were stained with IFITC-IgM , PE-B220, PE-Kappa, PE-IgM(a). In Tg mouse, 35% cells were B cells and most of them expressed IgM-a and Kappa.

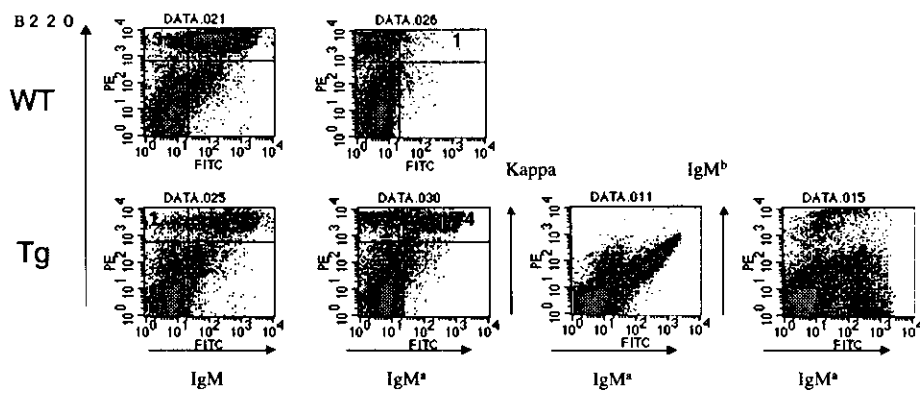
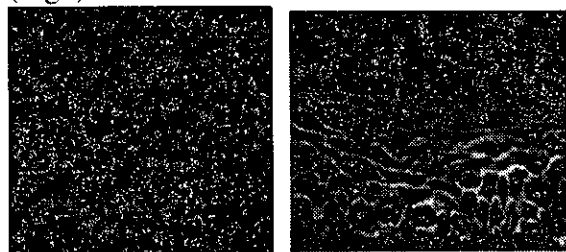


Fig 5: WT and heavy and light chain transgenic mouse spleen cells were stained with IFITC-IgM , PE-B220, PE-Kappa, PE-IgM(a). In Tg mouse, decreased amount B cells were detected and most of them were IgM-a Kappa. Some IgM-b expressed cells also detected.

硬口蓋における抗体の沈着

両鎖のトランスジェニックマウスにおいて IgMa の沈着があるかどうか確認したが、抗体は全く見られなかった。従って、血中に AK7 由来 IgM はないものと考えられた。

(Fig6)



Tg hard palate

positive control

Fig6: Heavy and light chain transgenic mouse hard plate was stained with anti IgM(a)-FITC. No IgM(a) deposition was detected.

両鎖のトランスジェニックマウスでの自己抗体の誘導

両鎖のトランスジェニックマウスにバキュロウィルスを用いて作成した r-mDsg3 を 10ug ずつ、CFA、IFA を用い、2 回免疫し、硬口蓋への抗体の沈着を評価したところ、わずかに、細胞間に IgM^a の沈着が見られた。(Fig7)

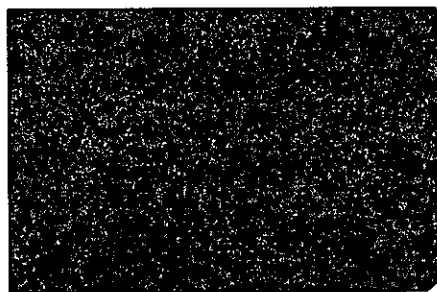


Fig7: Heavy and light chain transgenic mouse was immunized with recombinant mouse Dsg. And the hard plate was stained with anti IgM(a)-FITC. A little bit amount of IgM(a) was detected.

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 IgM^a を有した B 細胞では、その発達においてほとんど影響はないと考えることができる。しかしながら、両鎖のトランスジェニックマウスにおいては骨髄においても若干の B 細胞の減少が見られ、脾臓においては、さらに顕著に見られた。脾臓における多くの B 細胞は IgM^a-Kappa を発現しているものの、口蓋の染色では抗体の沈着が見られなかったことより、内在性の Kappa 鎖が発現していることが考えられる。今後の方針として、B 細胞の idiotype、すなわち抗 dsG3 抗体が発現しているかどうか、また Dsg3^{-/-}Tg^{+/-}においては、B 細胞の発現に影響があるかなどを観察する予定である。

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。

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 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室専任講師

研究要旨 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行い、その結果ETBもETAと同様Dsg1を特異的に切断することを明らかにした。以上の結果より、黄色ブドウ球菌の産生する2種類のETがDsg1を標的蛋白とすることが証明され、感染症により自己免疫性疾患の標的抗原が修飾を受けることが明らかになった。また本研究の成果により、ETにより切断されたDsg1に対する免疫応答を検討することで、Dsg1特異的な自己抗体産生モデルが開発できる可能性が示唆された。

研究協力者

西藤公司 慶應義塾大学医学部皮膚科

A. 研究目的

水疱性膿痂疹(BI)は小児に発症する代表的な皮膚細菌感染症であり、黄色ブドウ球菌の感染により皮膚に水疱、びらん、痂皮を形成する疾患である。乳幼児においては、黄色ブドウ球菌の感染によりほぼ全身の皮膚に潮紅と水疱を形成して熱傷様外観を呈し、ブドウ球菌性熱傷様症候群(SSSS)とよばれる皮膚症状を示す。これらの水疱形成は、黄色ブドウ球菌の産生する表皮剥脱性毒素(ET)により、表皮顆粒層のレベルで細胞間接着が障害されておこることが知られている。ETは血清型により分類され、そのうちヒトから分離されるものは主に2種類(ETA、ETB)である。

このETの標的蛋白は、毒素の存在が明らかにされてから約30年もの間不明のままであった。しかし我々はBIとSSSSの臨床像、および病理組織学的所見が、表皮細胞接着に対する自己免疫性疾患である落

葉状天疱瘡(PF)に酷似していることに着目した。そして昨年度の研究において、ETAの標的蛋白がPFの自己抗原と同じDsg1であることを証明した。本年度はさらにETBの標的蛋白について、ETAと同様Dsg1を切断することで皮膚に水疱を形成するか検討した。

B. 研究方法

a) ETB

広島大学歯学部微生物学教室より譲渡されたものを用いた。

b) 新生仔マウスへのET投与

生後24時間未満の新生仔マウス(Balb/c、ICR)に2-20 μ gのETBまたは生食を皮下投与し、その1-2時間後に注射部位の皮膚の変化を肉眼的および免疫組織学的に検討するとともに、Dsg1ならびにDsg3の分子量の変化を免疫プロット法により確認した。

c) 培養角化細胞へのDsgの導入ならびに発現したDsgとETBとの反応性の検討

マウスDsg1ならびにDsg3の全長およ

びその C 末端に FLAG octapeptide epitope を融合した蛋白の cDNA を、それぞれ pcDNA3.1 プラスミドベクターにサブクローニングし、それぞれ FuGENE6 を用いて HaCaT 細胞に遺伝子導入した。導入後細胞を 37°C、48 時間培養した後、培養上清を 1µg/ml の ETB を含む培養液に交換してさらに 37°C、1 時間培養した。細胞表面に発現した Dsg1 ならびに Dsg3 の分子量の変化を、細胞抽出液を用いた免疫プロット法により確認した。

d) *in vitro* における ETB と組換え Dsg (rDsg) との反応

バキュロウイルス発現系で作成したヒトおよびマウスの rDsg1 ならびに rDsg3 と ETB とを混合し、37°C、1-2 時間反応した後、それらの組換え蛋白の分子量の変化を免疫プロット法により確認した。

C. 研究結果

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 (図 1)。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 (図 2)。

Dsg1 および Dsg3 を遺伝子導入した HaCaT 細胞を ETB と反応させたところ、培養細胞表面に発現する Dsg1 だけが特異的に分解された (図 3)。

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 (図 4A) およびヒト (図 4B) 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。

D. 考察

BI および SSSS は、黄色ブドウ球菌の産生する ET により、表皮内に裂隙を形成して 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。この ET の標的蛋白は、1970 年代に毒素の存在が示唆されてからこれまで明らかにされていなかった。今回の研究により我々は、ETA と同様 ETB が PF の自己抗原と同じ Dsg1 を特異的に分解することを証明した。過去の研究において、蛋白配列の相同性から ET はセリンプロテアーゼの仲間であることが想像されていたが、本研究の成果により、ET が Dsg1 に対する蛋白分解酵素としての機能を有することが直接証明された。また本研究の成果は、本症と PF との病態発症機序の類似点を明らかにするものであるとともに、感染症により自己免疫性疾患の標的抗原が修飾を受けることを明らかにするものとなった。今後の方針として、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。

F. 研究発表

英語論文

1. 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.*

日本語総説

1. 天谷雅行: 遺伝子と疾病研究の最前線をゆく 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

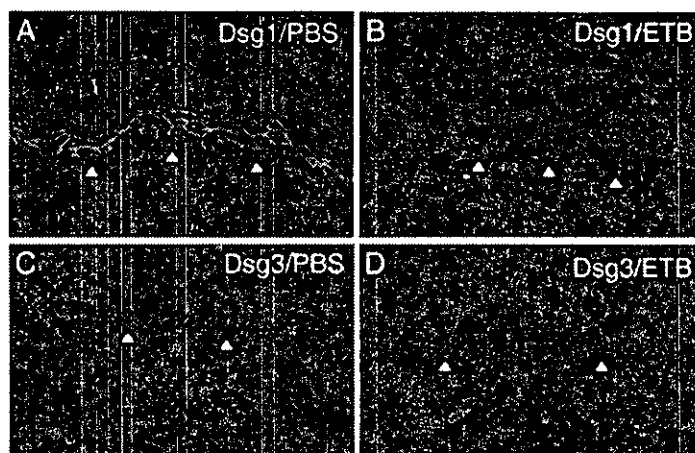


図1 ETB ならびに PBS を投与した新生仔マウス表皮の蛍光抗体法所見。Dsg1 の染色性は ETA、ETB で PBS 投与群と比べ著減しているのに対し、Dsg3 に対する染色性は全ての群で差は認められなかった。

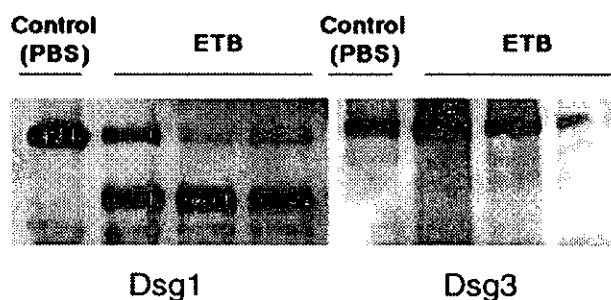


図2 ETB を投与した新生仔マウスの表皮抽出物の免疫プロット法所見。ETB 投与群では Dsg1 の分子量が PBS 投与群と比較して低下していたのに対し、Dsg3 の分子量には差は認められない。

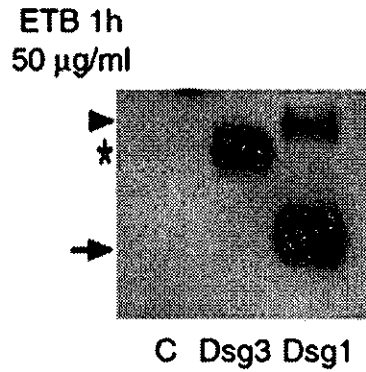


図3 遺伝子導入により Dsg1 あるいは Dsg3 を発現した後、ETB を含む培養液と反応させた HaCaT 細胞抽出液の免疫ブロット法所見。培養細胞表面に発現する Dsg1 だけが特異的に分解された。

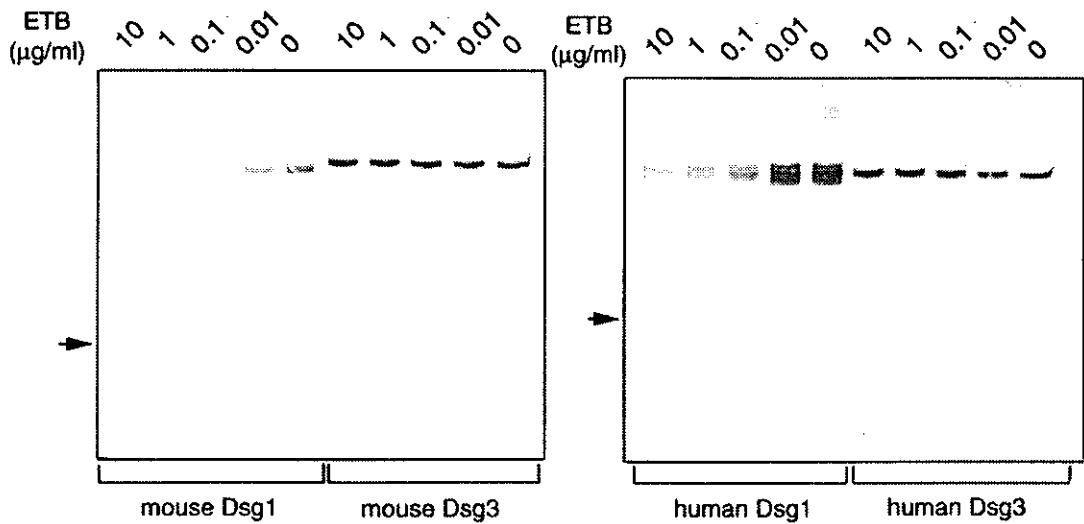


図4 *in vitro* で ET ならびに PBS と反応させた組換え Dsg の免疫ブロット法所見。ETB はマウスおよびヒト Dsg1 の組換え蛋白を特異的に、かつ用量依存性に切断した。

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

シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み

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 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ている。これはシェーグレン症候群患者の中にM3に対する自己抗体が見られるという報告や、M3ノックアウト（KO）マウスにおいて唾液の分泌不全によって離乳後の体重減少が観察されるという事実に基づく。マウスM3を発現する EL4 細胞株を γ 線照射した後 M3 KO マウスの腹腔に投与して免疫した。その後免疫した M3 KO マウスの脾臓細胞を調製し、rag-2 KO マウスに尾静脈経由で移植し、その後マウスの観察を行なっている。10 週後の現在まで、体重減少などの変化は見られていない。現在、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準備している。

共同研究者

大田孝幸

慶應義塾大学医学部皮膚科

微生物学免疫学教室

松井稔

東京大学医科学研究所

の松井らによりムスカリン性アセチルコリン受容体系は5つのサブタイプにおいてノックアウトマウスが作製されており、また全て正常に出生することは利点である。

また、これまで解析した M2, M3, M4 のノックアウトマウスにおいては免疫系に大きな異常は見られていない。さらに、ニコチン性アセチルコリン受容体と異なり7回膜貫通型のつのサブユニットからなる点も標的が明らかになるという点から利点となる。

M3 を標的としてシェーグレン症候群モデルマウスを作製するという考えはさらに以下の報告ならびに観察に基づいている。まず、シェーグレン症候群患者の中にM3に対する自己抗体が見られるという報告が2つのグループから報告されていること

(3-5)。この報告はムスカリン性アセチルコリン受容体の中でも M3 が腺組織に多く発現するという事実と矛盾しない。さらに、松井らによって作製された M3 ノックアウトマウスでは唾液の分泌不全によって離乳後の体重減少が観察されている (6)。さらにムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストがシェーグレン症候群の治療薬として認可されたこと (7) も M3 が標的の

A.研究目的

我々は尋常性天疱瘡モデルマウスの作製に用いた方法、すなわち「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の作製法」(1,2)を他の自己免疫疾患に応用するための第一歩として、神経系に発現する分子を標的とした自己免疫モデルマウスの作製を目指している。具体的にはムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプ3（M3）を標的とした自己免疫モデルマウスの作製を目標としてこの研究を開始した。ムスカリン性アセチルコリン受容体に注目した理由は以下の通りである。「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もでる動物の作製法」はノックアウトマウスが致死でないこと、また免疫系に大きな異常が見られないことが前提となる。この点で、共同研究者

一つである可能性を支持する。したがって、M3 に対する自己免疫反応の誘導によって、自己抗体による M3 機能の阻害、あるいは細胞傷害性 T 細胞による炎症誘導などによって腺組織への障害が起きればシェーグレン様の症状が引き起こされることが予想される。シェーグレン症候群の振の標的が不明である現在、M3 に対する自己免疫反応の誘導によってシェーグレン様の表現型を持つマウスが作製できるのであればその意味は大きいと考えられる。このような理由から、M3 を標的とした自己免疫モデルマウスの作製を計画した。

B. 研究方法

松井らによって作製された M3 ノックアウトマウス (6) を C57BL/6 マウスに 8 代戻し交配をした後にヘテロザイゴート同士の交配によって得られたノックアウトマウスを用いた。「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の作製法」(1,2) において用いる rag-2 ノックアウトマウスは真貝らによって作製された rag-2 ノックアウトマウス (8) を C57BL/6 マウスに 10 代戻し交配をした後にヘテロザイゴート同士の交配によって得られたノックアウトマウスを用いた。C57BL/6 マウスの胸腺腫由来の EL4 細胞は RPMI1640 培地に 10% の牛胎児血清、50 μ M β -mercaptoethanol ならびに抗生物質を添加した培地を用い、CO₂ インキュベーター内で培養した。マウス M3 を発現する EL4 細胞株は N 端に Myc タグを付加したマウス M3 cDNA コンストラクトを作製し、EL4 細胞に導入した後 G418 存在下で選択し安定発現株 (M3-EL4) を得た。

C. 研究結果

(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 頭当たり 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。組織像の観察は行なっていない。

D. 考察

現在までに M3 に対する自己免疫の誘導には成功していないが、これは必ずしもノックアウトマウスにおいても M3 に対する自己寛容が成立していることは意味しない。自己免疫の誘導法に問題があると考えられる。尋常性天疱瘡モデルマウスにおいてはリコンビナント DSG3 を抗原として完全フロイントアジュバント (CFA) とともに強制免疫をすることから最初のモデルが作製され (1)、その後に移植時期やその細胞数の検討など、条件の至適化の中でナイーブ細胞の移植という方法が可能であることが明らかになった (青木ら、投稿準備中)。尋常性天疱瘡は自己抗体が病因であることは確定しているが、シェーグレン症候群が自己抗体によるか細胞性免疫反応に夜かは不明である。後者が主因の場合にも抗体が現れることは珍しくない。またごく最近の研究から、M3 が細胞傷害性 T 細胞が持つタンパク質分解酵素の一つであるグランザイム B によって消化されるという結果は M3 が MHC クラス I によって提示される可能性を示唆する (9)。そこで今後は自己抗体の誘導と細胞性免疫の誘導の両面から

進める予定である。まず、自己抗体によるアプローチであるが、M3 は7回膜貫通型タンパク質であることから、リコンビナントタンパク質を作製することは難しいと思われる。そこでまず、最も長い細胞外ドメインである N 端部位を標的とし、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) のc 端に M3 の N 端の細胞外ドメインを結合させた融合タンパク質を作製した。これを CFA とともに尋常性天疱瘡モデルの場合と同様なプロトコールで M3 ノックアウトマウスに免疫し、まず自己抗体の誘導を免疫原である GST 融合タンパク質を用いた ELISA 法で検討し、誘導が確認できた段階で脾臓細胞の rag-2 ノックアウトマウスへの移植を行う。次に細胞性免疫反応の誘導には DNA ワクチン法を応用する。最近の研究から cDNA のN端にユビキチンを融合させたコンストラクトを用いた DNA ワクチン法で効率よく細胞傷害性 T 細胞を誘導できることがいくつかの系において報告されている (10-12)。この場合に、ユビキチン部分と目的のタンパク質の境界をタンパク質分解酵素に対して感受性にしたほうが効率が良いという結果 (10) と抵抗性にしたほうが良いという結果 (11) の両方が報告されている。また、間にいれるスペーサーが重要であるという報告もある (12)。そこでとりあえずいくつかの方法を試みることにし、現在コンストラクトを作製中である。この場合、細胞傷害性 T 細胞の誘導は、EL4 をコントロールとし、M3-EL4 を特異的な標的とした細胞傷害性試験を用いる予定である。これらの一連の実験を行なうことによって M3 に対する自己免疫反応の誘導を目指したい。

E. 引用文献

- 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) Amagai, M., Nihsimawa, T., Suzuki, H. and Koyasu, S. (2000) Autoimmune disease model animal. PCT/JP00/02023.
- 3) Bacman, S., Perez- Leiros, C., Sterin-Borda, L., Hubsche, r O., Arana, R. and Borda, E. (1998) Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:151-156.
- 4) Bacman, S., Berra, A., Sterin-Borda, L. and Borda, E. (2001) Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjögren syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:321-327.
- 5) Waterman, S. A., Gordon, T. P. and Rischmueller, M. (2000) Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 43:1647-1654.
- 6) 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.
- 7) Fox, R. I., Kontinen, Y. and Fisher, A. (2001) Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol.* 101:249-263.
- 8) Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. and Alt, F. W. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
- 9) Nagaraju, K., Cox, A., Casciola-Rosen, L. and Rosen, A. (2001) Novel fragments of the Sjögren's syndrome autoantigens a-fodrin and type 3 muscarinic acetylcholine receptor generated during cytotoxic lymphocyte granule-induced cell death. *Arthritis Rheum* 44:2376-2386.
- 10) Rodriguez, F., An, L. L., Harkins, S., Zhang,