

Naive Dsg3<sup>-/-</sup> splenocytes      Immunized Dsg3<sup>-/-</sup> splenocytes

図1. ナイーブなDsg3<sup>-/-</sup>マウス脾細胞を移植したマウスで、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 PV 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)。

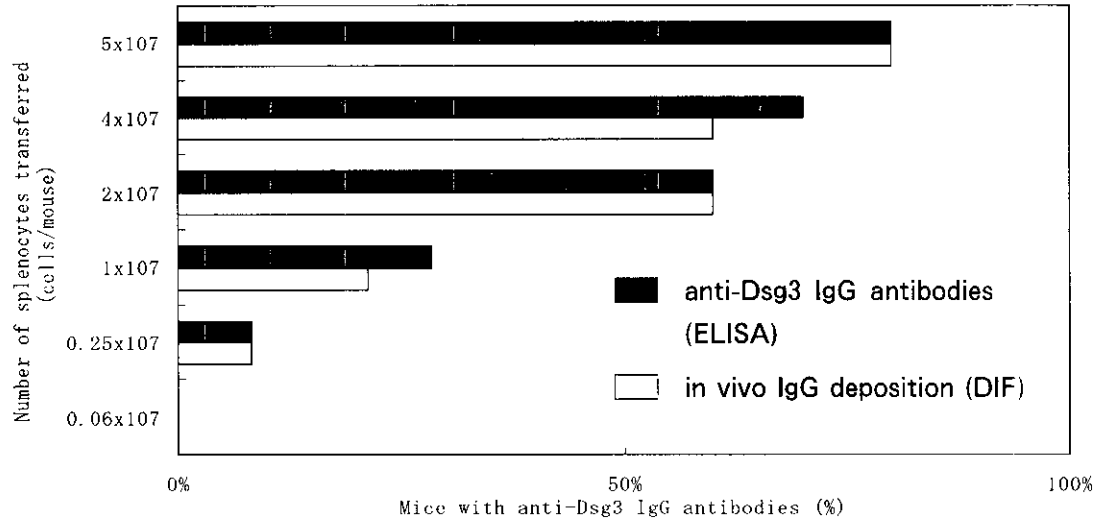


図 2.  $5 \times 10^7$  脾細胞を移植したマウスでは、約 80% で抗 Dsg3 抗体の産生が認められ、その割合は移植した脾細胞の数に依存して減少した。また、 $0.25 \times 10^7$  脾細胞を移植した群では、12 匹中 1 個体のみで抗 Dsg3 抗体が認められたのに対し、 $0.06 \times 10^7$  脾細胞を移植した群においては抗体産生を示す個体を認めなかった。(縦軸：マウス 1 匹に移植した脾細胞数、横軸：抗 Dsg3 抗体の産生を示したマウスの割合、黒：ELISA 陽性個体の割合、白：DIF で IgG 沈着陽性個体の割合)

厚生労働科学研究費補助金（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より作成した疾患誘導性モノクローナル抗体の解析

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** 我々は、自己抗原ノックアウトマウスを用いた新しい方法により尋常性天疱瘡モデルマウスの作成に成功している。本研究では、天疱瘡モデルマウスを用いて、天疱瘡における水疱形成機序および病的抗体産生の免疫学的機序を解明することを目的とする。天疱瘡モデルマウスより水疱形成を誘導できるモノクローナル抗体の単離を行い、エピトープと水疱誘導能の関係を詳細に検討する。本年度は、天疱瘡モデルマウスより9種のモノクローナル抗体（AK mAb シリーズ）を作成し、そのうちの1種 AK23は、ハイブリドーマ細胞をマウスに接種した際に天疱瘡の表現型を誘導した病的活性を持つものであった。さらに、詳細な3次元エピトープの解析により、AK23は天疱瘡抗原である Dsg3 分子の接着面を認識していることが明らかとなった。他の明らかな病原性を示さない mAb は、接着面以外の部位を認識していた。以上の結果より、抗体による直接的な接着障害の誘導が、水疱形成を誘導する機序として少なくとも存在することが示唆された。

共同研究者

西川武二 慶應義塾大学医学部教授  
角田和之 慶應義塾大学医学部助手  
大田孝幸 慶應義塾大学医学部大学院生

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 $\gamma$ 線照射した飼料を用い、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。

**A. 研究目的**

天疱瘡モデルマウスを用いて、天疱瘡における水疱形成機序および病的抗体産生の免疫学的機序を解明することを目的とする。

**B. 研究方法**

**a) マウス**

生後6～10週齢の Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを5 $\mu$ gの組み換えマウス Dsg3 蛋白 (rDsg3) と完全フロイントアジュバントにて皮下に免疫した。次に rDsg3 と不完全フロイントアジュバントにて腹腔内に2回免疫し、さらに rDsg3 単独で2回追加免疫した。免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を C57BL/6 Rag2<sup>-/-</sup>の尾静脈より移植し、抗 Dsg3 抗体産生をマウス Dsg3 ELISA 及び live keratinocyte staining にて確認した。

**b) モノクローナル抗体の作製**

PV の表現型を有する PV モデルマウス脾細胞と、マウス骨髄腫細胞種 (P3) を5:1で PEG 4000 (MERCK, Darmstadt, Germany) を用いて細胞融合し、10% hybridoma cloning factor (IGEN, Gaithersburg, MD) を含む HAT および HT 培地にて選択培養した。ハイブリドーマはまずマウス rDsg3 を抗原として用いた ELISA にて1次スクリーニングを行った。陽性クローンをマウス培養角化細胞 PAM212 を用いた live keratinocyte

staining にて 2 次スクリーニングを行った。

### C) 組み換え蛋白の作製

Dsg3 の細胞外領域を異なる長さに切断し、その欠失領域に対応する Dsg1 の領域を融合させた 4 種類のマウス Dsg スワッピング分子と 8 種類のヒト Dsg スワッピング分子（うち 6 種類は既報告のものを使用）、さらに、ヒト Dsg1 と Dsg3 の点変異蛋白 14 種類（うち 6 種類は既報告のものを使用）を作製した。組み換え蛋白は既報告に従いバキュロウィルス発現系を用いて作製した。すなわち、組み換えバキュロウィルスを昆虫細胞 High Five に感染させ、組み換え Dsg 蛋白を培養液中より回収し、その精製は TALON affinity metal resin (Clontech, Palo Alto, CA) にて行った。

#### d) 新生マウスへの受動免疫

mAb の病原性を評価するために新生仔マウスへの受動免疫を行った。mAb 単独 (75-200  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) か、あるいは硫酸アンモニウム沈殿にて得られた、それ自身では水疱形成を誘導しない程度の、少量の PF 患者血清か、または Dsg1 を特異的に消化する、それ自身では水疱形成を誘導しない程度の、少量の ETA と同時に移入した。(PF IgG1 は  $1\text{mg}/\text{mouse}$  ETA は  $1\mu\text{g}/\text{mouse}$ )。生後 12-24 時間の新生仔マウス・ICR マウス (体重 1.5-2.0 g) に AK mAb、PF IgG、ETA を様々な組み合わせで注射後 18-24 時間で肉眼的、さらに顕微鏡的に微少水疱形成を観察した。微少水疱の形成の基準は、全身皮膚を 3 mm 幅で 6 部位に分割し、すべての切片中で基底層直上の水疱形成が 2 カ所以上ある場合を陽性とした。

#### e) 成体マウスにおける腹水形成法

成体マウスにおける AK mAb の病原性を評価するためにハイブリドーマを用いた

方法を考案した。mAb を産生するハイブリドーマを 6,10,14-tetramethyl-pentadecane (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) にてプライミングした C57BL/6 Rag2<sup>-/-</sup> マウスの腹腔内へ接種した。接種後マウスにおける被毛の脱毛と体重減少を観察した。マウスが表現型を呈した時点、あるいは接種後 14 日経過し腹水の形成が認められた時点で、口腔粘膜および皮膚より生検を施行した。

### C. 研究結果

#### a) PV モデルマウスを用いた抗 Dsg3 mAb の作製

本研究では 8 クロンの抗 Dsg3 mAb が単離され AK (acantholytic keratinocyte) と名付けられた。

すべてのクロンのアイソタイプは重鎖が IgG1 で軽鎖が  $\kappa$  であった。様々なマウスの組織を基質として用いた間接蛍光抗体法 (IIF) では、すべての mAb が硬口蓋や皮膚の重曹扁平上皮細胞表面には反応性を有していたが、肝臓、心臓あるいは腸のような単層上皮には反応性を有さなかった。ELISA 法による解析では、数クロン (AK1、AK15、AK18、AK19、AK20、AK23) はマウスの他にヒトの基質に交差反応した。さらにマウス Dsg1 と反応した AK1 を除いて、全て Dsg3 にのみ反応性を有していた。(表 1)。

#### b) 新生マウスへの受動免疫による mAb の病原性の確認

mAb の病原性の有無を確認するために、新生仔マウスへの受動免疫を行った。まず、精製した mAb を単独でマウス皮下に注射し、皮膚における肉眼的な水疱形成と顕微鏡的な微少水疱形成を観察した。その結果すべての mAb において肉眼的な水疱形成は認められなかった。しかし、AK19 と AK23 を移入したマウスの皮膚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は、マウス皮膚においては Dsg3 に加えて Dsg1 が共に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）、あるいは Dsg1 を特異的に消化することが知られている、黄色ブドウ球菌毒素の Exfoliative toxin A (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（表 1）。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。

#### c) 成体マウスの腹水形成による病原性の確認

新生マウスへの受動免疫の系では、上述のごとく Dsg1 の接着機能を特異的に障害する必要性があった。しかし、この方法はマウスの個体間差や抗体の活性のばらつき等が生じる可能性があった。そこで、Dsg3 を正常に発現する免疫不全マウス (Rag2<sup>-/-</sup>マウス) を用いた病原性の確認を行った（図 1）。この方法は、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るものである。仮に、その mAb が病原性を有すれば、抗 Dsg3 抗体単独陽性のヒト PV において粘膜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られた。その結果、AK23 ハイブリドーマを接種した Rag2<sup>-/-</sup>マウスのみで、接種後約 7-10 日で被毛の脱毛が認められた。直接蛍光抗体法では硬口蓋粘膜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。また、脱毛が認められた周囲皮膚よりの生検では休止期毛根周囲角化細胞への IgG の沈着が認められ、休止期毛周囲

と外毛根鞘上皮基底層の間に裂隙の形成が認められた。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。他のクローンを腹腔内に接種したマウスでも同様に、硬口蓋粘膜に AK23 と同様の IgG の沈着が認められた。しかし、他の mAb では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。

#### d) 病原性を有する AK23 モノクローナル抗体は、Dsg3 の N 末端側のアミノ酸 V3, K7, P8, D59 から構成される、カルシウム依存性の立体構造によるエピトープを認識する。

我々は Dsg3 と Dsg1 のスワッピング組み換え分子を用いた免疫沈降を用いてエピトープを解析することを試みた（図 2）。最初に、Dsg3 のアミノ酸 1-162、1-402、195-565、403-565 をそれぞれ有するスワッピング分子を用いたところ、AK7、AK9、AK20 はマウス Dsg3 の細胞外領域のカルボキシ末端部分のアミノ酸残基 403-565 に存在することが明らかになった。AK15 と AK18 はマウス Dsg3 の細胞外領域の中央部分のアミノ酸残基 195-402 に存在することが明らかになった。AK19 と AK23 はマウス Dsg3 の細胞外領域のアミノ末端のアミノ酸残基 195-402 領域に存在することが明らかになった。次に病原性を有する AK23 と AK19 の詳細なエピトープ解析を行った。両 mAb とともにヒト Dsg3 に交叉反応し Dsg1 には反応せず、さらにそれらのエピトープがアミノ末端に存在することから、ヒト Dsg3 アミノ酸残基の 25-566、65-566、87-566、1-88、1-63、1-34、1-26、1-10 領域を有する 8 種類のヒト Dsg1/Dsg3 のスワッピング分子をエピトープ解析に用い

た。その結果、AK19のエピトープはヒト Dsg3のアミノ酸残基87-161領域に存在することが明らかになった。また AK23はアミノ酸残基1-88と1-63領域に反応した。これは AK23のエピトープがアミノ酸残基1-63領域に存在することを示す。しかし、Dsg3のアミノ酸残基25-566, 1-34, 1-26, 1-10領域には反応せず、この段階で AK23の詳細なエピトープの特定は不可能であった。

ヒト Dsg3と Dsg1のアミノ末端領域は相同性が高く、特にアミノ酸残基1-87領域では22個のアミノ酸のみが保存されていないにすぎない。そこで、Dsg3特異的なアミノ酸を、それに相当する Dsg1特異的なアミノ酸に置換した点変異蛋白を作製し免疫沈降を行った。その結果、AK23のエピトープは Dsg3のアミノ酸 V3、K7、P8、D59であることが判明した。これら4個のアミノ酸全てがマウスとヒトの間では保存されている。

#### D. 考察

天疱瘡患者の皮膚・粘膜での水疱形成において IgG 自己抗体が主たる役割を演じていることはよく受け入れられている事実である。本研究では抗 Dsg3IgG 抗体が異なる病原性を有するかどうかを明らかにし、さらに、病原性に影響する因子を明らかにすることを試みた。

本研究では8クローンの AK シリーズモノクローナル抗体を、PV モデルマウスより作製した。アイソタイプは全て IgG1 $\kappa$  で *in vivo* の状態で角化細胞表面に結合できる抗体であった。その中で AK7 と AK9 はマウス Dsg3 のみに反応したが、その他の mAb はヒト Dsg3 に交叉反応した。また AK19 と AK23 の結合性はカルシウム依存性であったが、他の mAb はカルシウム非依存性であった。

これらの mAb の病原性を確認するために2通りの方法を用いた。まず、第一の方

法は新生マウスへの mAb の受動免疫である。受動免疫法はおそらく腹水形成法よりも、病原性を確認する上では、より鋭敏な方法であると考えられる。それは新生仔マウスの系では高濃度の IgG が受動的に移入されるが、腹水形成法ではそのハイブリドーマの増殖力や抗体の産生度に、mAb の量が依存するからである。AK19 と AK23 は受動免疫後に水疱を形成したが、他の mAb は病的活性を有さなかった。

腹水形成法では AK23 のみが水疱を形成し AK23 を接種されたマウスの表現型は Dsg3<sup>-/-</sup> と PV モデルマウスとほぼ同様の所見を有していた。AK19 の抗体価は AK23 産生ハイブリドーマが接種されたマウスの抗体価よりも5倍近く高いにもかかわらず、認められなかった。これらの所見は AK23 と AK19 は異なる強さの、角化細胞の接着を障害する能力を有することを示す。これは、*in vivo* で Dsg3 に対して結合する抗 Dsg3IgG 抗体の不均一性を初めて示したものである。

mAb のエピトープはバキュロウィルス発現系により得られた Dsg1/Dsg3 の点変異蛋白と同じくスワッピング分子を用いた免疫沈降法によって行われた。スワッピング分子による免疫沈降法にて、病原性を欠く AK7,9,15,18,20 のエピトープは Dsg3 の細胞外領域の中央からカルボキシ末端側に存在することが確認された。しかし、病的活性を有する AK23 と AK19 のエピトープはカルシウム依存性でそれぞれ、アミノ酸残基89-161領域と 1-63領域に存在することが確認された。これに続いてより詳細な Dsg3/Dsg1 の点変異蛋白を用いた解析では、AK23 は Dsg3 のアミノ酸 V3、K7、P8、D59によって構成される3次元エピトープを認識する抗体であることが確認された。

カドヘリンは複合組織の維持と形成において重要な役割を果たすカルシウム依存性の細胞接着分子である。その配列の相同性から大きく、クラシックカドヘリン(E-

P-, N-カドヘリン) とデスモゾームカドヘリン (デスモグレインとデスモコリン) 二つのグループに分類されている。これらのカドヘリンは、高度に保存された細胞質領域と、5つのタンデム状のカドヘリンリピート (EC1-EC5) によって構成される共通の組織構成を有している。最近ではクラシックカドヘリンの一つであるCカドヘリンの全細胞外領域の結晶構造解析がなされた。

Dsg3 のアミノ酸配列をその C-カドヘリンの構造と重ね合わせると、トリプトファン の接着面のドナーであると予測されるアミノ酸は、E1 to P8、P20、K23、T25、S26、D27、D59である事が判明した。これらのアミノ酸の中で Dsg3 と Dsg1 の間で保存されていないものは、おそらくデスモグレインの接着特異性を決定するもので、それはV3、K7、P8、T25、and D59である。驚くことに最も病原性を有したAK23のエピトープはV3、K7、P8、D59で接着面のDsg3 特異的アミノ酸上に正確に位置していた。この AK23 のエピトープの構造はAK23 が優位に成熟型の Dsg3 を認識するという事実が支持している。

Dsg3 のプロ配列は、その発現中に蛋白同士が自己集束することを防ぐために、カドヘリンのアミノ末端の接着領域をブロックしていると考えられている。強い病原性を有する AK23 は成熟型の Dsg3 にのみ認められる機能的に重要なアミノ末端を認識するが、他の mAb は機能的に重要ではないと思われる中央からカルボキシ末端側に結合する。これは、AK23 が直接的に Dsg3 の接着機能を障害している可能性を示唆するものである。

分子上の病原性ホットスポットを直接的に障害することは、細胞接着におけるデスモゾームの役割や、天疱瘡における水疱形成の分子機構の解明への重要な手がかりとなる。さらに、病原性あるいは非病原性の抗 Dsg3 mAb は角化細胞の増殖や分化を

研究する上で重要なツールになるものと考えられる。また診断的には、病勢の明確な基準となりうる、単一エピトープに対する ELISA 法の開発も可能であると考えられる。治療においては、Dsg3 上の病原性ホットスポットの解明は天疱瘡の抗原特異的血漿交換療法や抗原特異的 B 細胞除去などのターゲット療法の開発に有用であると考えられる。

## E. 結論

本研究で得られた病原性を有する抗 Dsg3 mAb である AK23 は、マウスにおいて単独で PV の表現型を誘導する事が可能な強い病原性を有する mAb である事が確認された。その認識するエピトープは Dsg3 細胞外領域のアミノ末端側のアミノ酸残基 V3、K7、P8、D59で今後、PV における発症機序の解明や治療法の開発のみならず、細胞接着機構の解明などにも有用なツールであると考えられた

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表 (平成14年度)

英語論文

1. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, and Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. *Br J Dermatol* 147:261-265, 2002.
2. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, and 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.
3. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, and Stanley JR. Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. **J Invest Dermatol** 118:845-850, 2002.
  4. Campo-Voegli A, Muniz F, Casals M, Mascaro JM, Garcia F, Arimany JL, Amagai M, and Camps A. Neonatal pemphigus vulgaris with extensive mucocutaneous lesions from a mother with oral pemphigus vulgaris. **Br J Dermatol** 147:801-805, 2002.
  5. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Umezawa A, Hata J, and Nishikawa T. Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 118:199-204, 2002.
  6. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker E, and D. Z. Increased incidence of pemphigus vulgaris in Southern Europeans living in Germany compared to native Germans. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 16:68-71, 2002.
  7. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fubada Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, and Stanley JR. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impegito and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 110:53-60, 2002.
  8. Amagai M. Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. **Keio J Med** 51:133-139, 2002.
  9. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, and Sugai M. Identification of Staphylococcus aureus etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect Immun** 70:5835-5845, 2002.
  10. Oiso N, Yamashita C, Yoshioka K, Amagai M, Komai A, Nagata Y, Hashimoto T, and Ishii M. IgG/IgA Pemphigus with IgG and IgA anti-desmoglein 1 antibodies detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Br J Dermatol** 147:1012-1017, 2002.
  11. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, and Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-232, 2002.
  12. Fujimoto W, Kanehiro A, Kuwamoto-Hara K, Saitoh M, Nakakita T, Amagai M, Arata J, and Iwatsuki K. Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman's disease and asymptomatic bronchiolitis obliterans. **Eur J Dermatol** 12:355-359, 2002.
  13. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. The ultrastructural changes of mice actively producing antibodies to desmoglein3 parallel those in patients



- with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol Res* 294:318-323, 2002.
14. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, and Hashimoto K. Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. *J Invest Dermatol* 119:1224-1230, 2002.
  15. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol* 170:2170-2178, 2003.
  16. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol* 48:244-252, 2003.
  17. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska, Amagai M, Nagata Y, Strasz Z, and Jabłonska S. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *J Am Acad Dermatol* 48:117-122, 2003.
  18. Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: An implication for gene therapy. *J Invest Dermatol*:in press, 2003.
  19. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, F\_dinger D, Kirnbauer R, and Stingl G. 230 kDa and 190 kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell surface and basement membrane zone immune staining pattern. *Exp Dermatol*:in press, 2003.
  20. Amagai M. Active disease mouse model for pemphigus. *Ann Dermatol Venereol*:in press, 2003.
  21. Nagata Y, Velez AMA, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, and Hashimoto T. Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. *J Dermatol Sci*:in press, 2003.

#### 英語著書

1. Amagai M. Pemphigus. In *Dermatology*. Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, Siegfried E, Salasche S, Stingl G, Horn T, Mascaro J, and Saurat JHeditors. London: Harcourt Health Sciences. in press. 2003.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特許出願 2 件

天疱瘡モノクローナル抗体  
（特願2001-267653）

Pemphigus Monoclonal Antibody  
(PCT/JP02/08987)

表1. AK mAb の特異性

AK	Isotype	IIF			ELISA			Live keratinocyte staining	Ca dependency	Pathogenic activity		Epitope
		mouse mucosa	human liver	human skin	mouse Dsg1	mouse Dsg3	human Dsg1			human Dsg3	Passive transfer	
1	IgG1 κ	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	ND
7	IgG1 κ	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	403-565
9	IgG1 κ+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	403-565
15	IgG1 κ	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	195-402
18	IgG1 κ	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	195-402
19	IgG1 κ	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	87-161
20	IgG1 κ	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	403-565
23	IgG1 κ	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	V3,K7,P8,D59

全ての mAb は ELISA 法にてマウス Dsg3 に反応性し、間接蛍光抗体法では Dsg3 の発現部位に一致して反応性が認められた。AK19 と AK23 のみが病原性を有しカルシウム依存性のエピトープを認識した。

(Tsunoda et al, J Immunol 170:2170-2178, 2003 より転載)

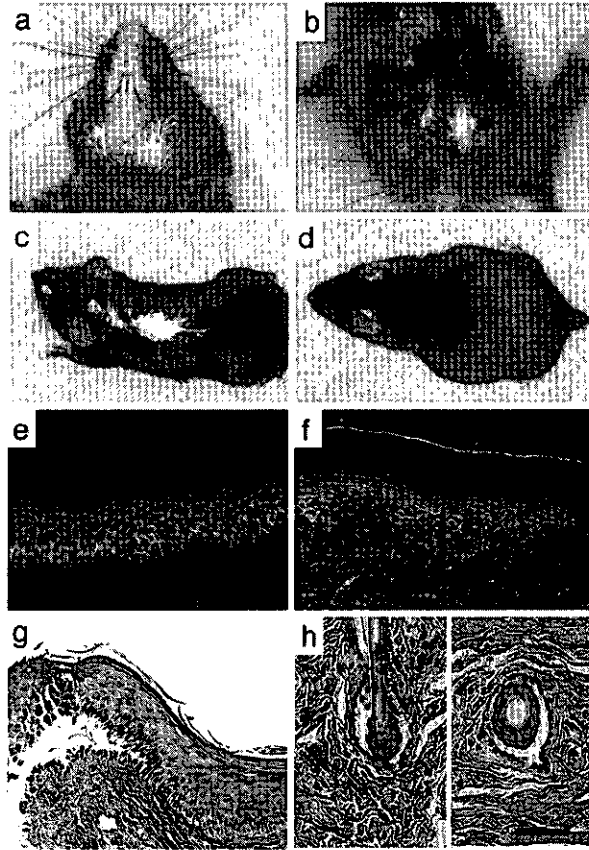


図1. 成体マウスを用いたハイブリドーマの腹腔内接種による病原性の確認。

AK23ハイブリドーマを接種したマウスにおいて、口周囲(a)、眼周囲(b)、背部(c)の被毛の脱毛が認められた。AK19を接種したマウス(d)では明らかな表現型は認められなかった。これらのマウスの口蓋における直接蛍光抗体法ではAK23(e)、AK19(f)ともに細胞表面への抗体の沈着が認められた。AK23を接種したマウスの口蓋(g)では基底層直上の水疱形成が認められ、毛根周囲の角化細胞における裂隙の形成が認められた(h)。Bar=50  $\mu$ m. (Tsunoda et al, J Immunol 170:2170-2178, 2003 より転載)

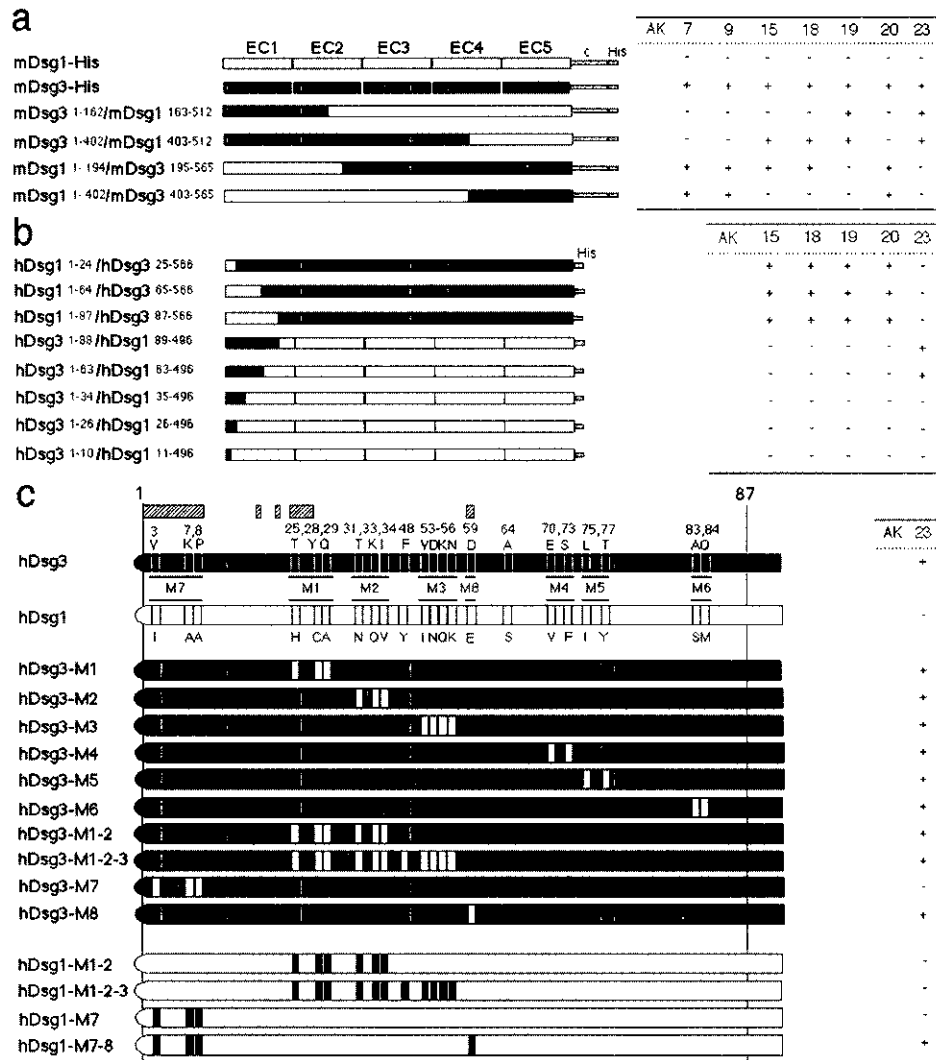


図2. エピトープ解析に用いたキメラ分子の構造模式図と mAb の反応性

右側パネルに各 mAb のキメラ分子にたいする反応性を示す。

病原性を有するAK23はDsg3の細胞外領域のアミノ末端側を認識し(b,c)、点変異蛋白を用いた解析ではAK23のエピトープはDsg3特異的なアミノ酸V3、K7、P8、D59であり、そのアミノ酸はCカドヘリンのトリプトファンドナーである接着面を構成するアミノ酸、E1-P8、P20、K23、T25、S26、D27、D59と一致する所見であった(c)。(Tsunoda et al, J Immunol 170:2170-2178, 2003 より転載)

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

デスモゾーム関連タンパクであるデスモヨーキンに関する研究

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科 教授

**研究要旨** デスモゾームは表皮における重要な細胞間接着機構の一つであり、天疱瘡ではデスモゾームの破壊が認められる。これまで、デスモグレイン、デスモプラキンなどを含む多くのデスモゾーム構成タンパクが発見され、その機能解析は天疱瘡の研究に貢献してきた。デスモヨーキンはウシ表皮デスモゾームより同定され、現在まで報告されているいくつかの *in vitro* での解析結果から、中央に特徴的なリピート構造を持つ分子量 680KD の巨大なタンパクで、デスモゾーム関連タンパク質として表皮細胞間接着機構に関与していると考えられていた。そこで我々は、デスモヨーキンの生体内での機能を解明する目的でノックアウトマウスを作製した。マウス表皮細胞を用いた免疫沈降解析の結果、遺伝子変異マウスでのタンパクの発現は認められなかった。遺伝子変異マウスの皮膚組織像では表皮、真皮、付属器に異常なく、電子顕微鏡による微細構造の解析を行ったところ、デスモゾームを含む表皮細胞間接着構造の異常も認められなかった。以上のことからデスモヨーキン単独欠損では表皮細胞間接着に影響しないことが分かった。

共同研究者  
竹田潤二  
大阪大学医学部修士社会環境医学  
河野通良  
久留米大学医学部皮膚科

**A. 研究目的**

これまでに多くのデスモゾーム構成タンパクが同定され、その機能解析は天疱瘡の研究に役立ってきた。デスモヨーキンはウシ表皮デスモゾームよりデスモゾーム関連タンパクとして同定され、現在までにいくつかの *in vitro* での研究によりその機能解析が行われている。本研究ではノックアウトマウスを作製し、デスモヨーキンの *in vivo* での機能解析を行うことにより、生体内での皮膚におけるデスモヨーキンの役割を解明すること、さらには表皮細胞間接着に異常をきたす天疱瘡の発生機序を解明することを目的とする。

**B. 研究方法**

まずマウス cDNA の一部分をプローブ

として、プラークハイブリダイゼーションによりマウスゲノムライブラリーからゲノムの全長をクローニングした。それを用いて全長 18kb のうち、プロモーター領域、転写開始点を含む 3.2kb の領域を破壊するターゲティングベクターを作製した。エレクトロポレーション法によりベクターを ES 細胞に導入し、PCR、サザンブロット解析により 4 つの相同組み換え ES クロノンを同定した。それらをマウス胚盤胞にマイクロインジェクション法により導入し、仮親マウスの子宮に移植した。生まれたキメラマウスを用いた交配により、両アレルに遺伝子変異が導入されたノックアウトマウスを作製した。次にタンパクの欠損を確認するため培養表皮細胞を用いた免疫沈降解析を行った。生後 3、4 日のマウスより表皮細胞を採取して 2 日間培養した後 <sup>35</sup>S で metabolic labeling した。その cell lysate を SDS-PAGE に展開し、ゲルを乾燥させた後 imaging plate にあてて検出した。皮膚組織の解析では生後 8 週齢のマウスの皮膚を用いた。

マウスを用いた一連の実験操作は、安楽死、適切な麻酔使用などにより愛護的に行った。

### C. 研究結果

野生型マウス、遺伝子変異マウスの表皮細胞を用いた免疫沈降解析を行ったところ、遺伝子変異マウスではデスモヨーキンの発現は認められなかった(図1)。遺伝子変異マウスの出生、発育は正常で、皮膚を含む各臓器に肉眼解剖学的異常は認められなかった。デスモゾームはデスモゾーム関連タンパクと考えられてきたが、遺伝子変異マウスの皮膚組織 H.E 染色像では表皮に異常はなく(図2)、電子顕微鏡による微細構造の解析においてもデスモゾームを含む細胞間接着構造に異常は認められなかった(図3)。

### D. 考察

本研究で作製したノックアウトマウスではデスモヨーキンタンパクは欠失していたが、デスモゾームを含む表皮の構造に異常は認められず、デスモヨーキン単独の欠損では表皮細胞間接着機構に影響しないことが分かった。一昨年、デスモヨーキンと分子量 3700KD の巨大構造タンパクである titin に対する抗体との cross reactivity が報告された。両者は巨大な分子であること、長いリピート配列を持つことなど、構造の類似点があり、両者の抗体の cross reactivity を合わせて考えると、titin がデスモヨーキンに類似した機能を持ち、デスモヨーキン欠損に対する代償機構が働いている可能性も考えられる。

### E. 結論

デスモヨーキンは、単独では表皮細胞間接着に関与していないことが分かった。また、デスモヨーキン欠損に対する代償機構を持つタンパクが存在している可能性が考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表(平成14年度)

#### 1. 論文発表

英語論文

1. Chan LS, Ahmed R, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine J-D, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtshchig G, Korman NJ, Lightman S, Lozadanner F, Marikovitch MP, Mondino BJ, Porst C, Rogers RS III, Setterfield JF, West D, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zone JJ: Mucous membrane pemphigoid: Definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment and prognostic factors, Arch Dermatol 138:370-379, 2002
2. Hamada T, McLean WHI, Ramsay M, Ashton GHS, Nanda A, Jenkins T, Edelstein I, South AP, Bleck O, Wessagowit V, Mallipeddi R, Orchard GE, Wan H, Dopping-Hepenstal PJC, Mellerio JE, Whittock NV, Munro CS, van Steensel MAM, Steijlen PM, Ni J, Zhang L, Hashimoto T, Eady RAJ, McGrath JA: Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). Hum Mol Genet 11:833-840, 2002
3. Miyake H, Morishima Y, Komai A, Hashimoto T, Kishimoto S: Epidermolysis bullosa acquisita: Correlation of IgE levels with disease activity under successful betem-

- ethasone/dapsone combination therapy. *Acta Derm-Venereol* 81: 429-451, 2001
4. Leverkus M, Georgi M, Nie Z, Hashimoto T, Brocker E-B, Zillikens D: Cicatricial pemphigoid with circulating IgA and IgG antibodies to the central portion of the BP180 ecto-domain. Beneficial effect of adjuvant therapy with high dose intravenous immunoglobulin. *J Am Acad Dermatol* 46:116-122, 2002
  5. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zillikens D: Autoanti-bodies to type VII collagen mediate Fcg-dependent neutrophilic activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol* 161:301-311, 2002
  6. Sakamoto T, Hashimoto T, Furukawa F: Pyoderma gangrenosum in a patient with bullous systemic lupus erythematosus. *Eur J Dermatol* 12:485-487, 2002
  7. South AP, Ashton GHS, Willoughby C, Ellis IH, Bleck O, Hamada T, Mannion G, Wessagowit V, Hashimoto T, Eady RAJ, McGrath JA: EEC (ectodactyly, ectodermal dysplasia) syndrome: heterozygous mutation in the p63 gene (R279H) and DNA-based antenatal diagnosis. *Br J Dermatol* 146:216-220, 2002
  8. Hamada T, South AP, Mitsuhashi Y, Kinebuchi T, Bleck O, Ashton GHS, Hozumi Y, Suzuki T, Hashimoto T, Eady RAJ, McGrath JA: Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. *Exp Dermatol* 11:107-114, 2002
  9. Oiso N, Yamashita C, Fukai K, Yoshioka K, Murakami T, Kato A, Amagai M, Komai A, Nagata Y, Hashimoto T, Ishii M: IgG/IgA pemphigus with IgA and IgG anti-Dsg1 autoantibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Dermatol* 147:1012-1017, 2002
  10. Shimanovich I, Skrobek C, Rose C, Nie Z, Hashimoto T, Brocker E-B, Zillikens D: Pemphigoid gestationis with predominant involvement of oral mucous membranes and IgA autoanti-bodies targeting the C-terminus of BP180. *J Am Acad Dermatol* 47:780-784, 2002
  11. Nitta Y, Kawamura C, Hashimoto T: Vesiculobullous systemic lupus erythematosus: A case with circulating IgG and IgA autoantibodies to type VII collagen. *J Am Acad Dermatol*. 47(5 Suppl):S283-6, 2002
  12. HashKS, Rencic A, Hernandez MI, Hashimoto T, HC Nousari: Aggressive immunosuppressive therapy for a refractory case of IgA pemphigus. *Arch Dermatol* 138: 744-746, 2002
  13. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T: BP180 ELISA as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* ;30(3):224-32, 2002
  14. Beutner EH, Pelton S, Hashimoto T, Yuelin Xu, Plukett RW, Korman NJ, Helm TN, Jablonska

S: A non-fatal and two fatal paraneoplastic pemphigus cases: can a complement indirect immunofluorescence test help to identify fatal "group A" PNP cases? J Am Acad Dermatol 47:841-851, 2002

日本語論文  
特になし

## 2. 学会発表

河野通良、外野善弘、堀江恭二、近藤玄、竹田潤二、橋本隆：表皮デスモゾーム関連タンパク質デスモヨーキンのジーンターゲティングによる解析、第25回日本分子生物学会、横浜、2002年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）  
特になし



図とその説明

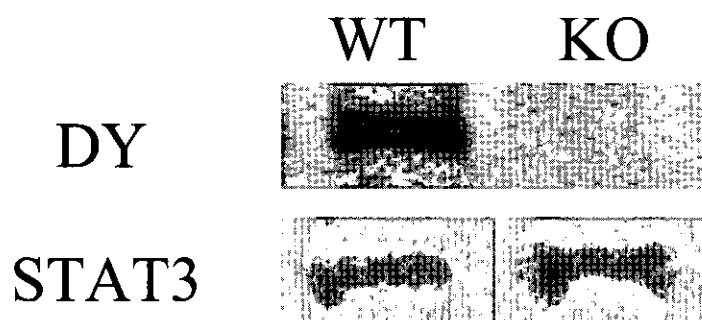


図1 野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の表皮細胞を用いた免疫沈降解析。  
DY:デスモヨーキン、STAT3:陽性コントロール

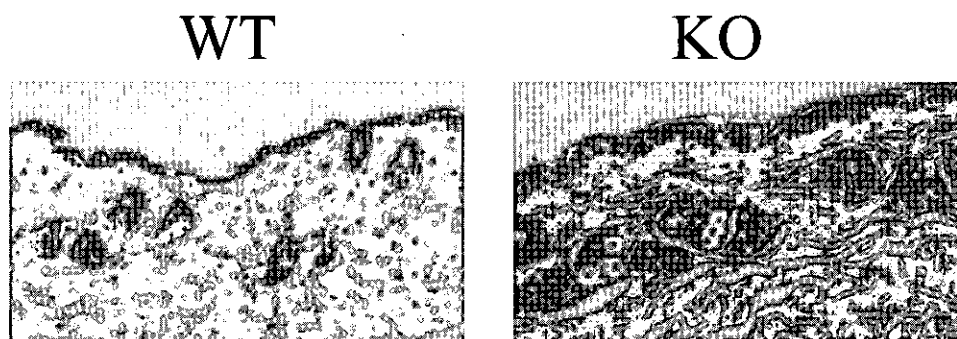


図2 野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の皮膚組織 H.E 染色像。



図3 野生型マウス(WT)、遺伝子変異マウス(KO)の皮膚電顕像。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

IgA 天疱瘡（SPD型, IEN型）自己抗体結合部位の免疫電顕的検討

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学 教授

**研究要旨** IgA 天疱瘡は IgA 抗表皮細胞間抗体を認める疾患であり、現在臨床的・病理組織学的に subcorneal pustular dermatosis (SPD) 型と intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型の 2 種の亜型に大別することができる。我々は cDNA トランスフェクション法で、SPD 型の IgA 天疱瘡抗原が desmocollin 1 (Dsc 1) であることを示した。しかし、IEN 型の抗原はいまだ不明である。今回、我々は免疫電顕法を用いて 6 例の IgA 天疱瘡（SPD 型 3 例、IEN 型 3 例）患者血清を使い、そのエピトープの局在を検討した。3 例すべての SPD 型では主にデスモゾーム領域に金粒子の沈着を認め、対照的に IEN 型では主にデスモゾーム領域以外の細胞間に沈着を認めた。

共同研究者  
石井 文人  
久留米大学医学部皮膚科助手  
山本 明美  
旭川医科大学皮膚科講師

#### A. 研究目的

IgA 天疱瘡は IgA クラスの自己抗体が表皮細胞表面に対して認められる疾患であり、角層下膿疱症様の皮疹を示す SPD 型と異質な膿疱性皮疹を示す IEN 型の 2 種に大別することができる。我々は最近 Dsc 1 を発現させた Cos 7 細胞を基質に用いて、SPD 型血清中にヒト Dsc 1 に対する抗体が存在することを明らかにし、SPD 型 IgA 天疱瘡のエピトープは Dsc 1 であることを示した。IEN 型の抗原は現在まだ不明である。今回、我々は post-embedding 免疫電顕法を用いて 6 例の IgA 天疱瘡（SPD 型 3 例、IEN 型 3 例）におけるエピトープの微細局在部位を検討した。

#### B. 研究方法

1) 血清：SPD 型 IgA 天疱瘡 3 例、IEN 型 IgA 天疱瘡 3 例。

2) post-embedding 免疫電顕法：  
固定と包埋：正常ヒト皮膚を細切り、15% グリセロール PBS で固定。液体プロパンで凍結固定、メタノールで凍結置換を行い、Lowicryl K11M に包埋し、紫外線重合させ皮膚ブロックを作成した。これらのブロックから超薄切片を作成し、ニッケルグリッド上で、以下に示す免疫染色法を行った。  
免疫染色：

40倍に希釈した患者血清を常温で1時間反応させ、i) 500倍希釈した抗ヒト免疫グロブリン IgA を1時間反応させ、10倍希釈した10nmまたは5nmの gold labelled goat anti-rabbit と反応させた。ii) 10倍希釈した5nmの gold conjugated goat anti-human IgA と反応させた。ウラニール染色後に、電子顕微鏡で観察した。

#### C. 研究結果

SPD 型では 3 例いずれにおいても主に金粒子はデスモゾームの細胞間に沈着を認め (図1)、IEN 型でも 3 例ともデスモゾームの接合板がない細胞間に沈着を認めた (図2)。

#### D. 考察

SPD型では従来から言われている標的抗原であるデスモコリン1が存在するところに相当する部位に金粒子の沈着を認めた。また、IEN型ではデスモゾームの存在しない細胞間に金粒子の沈着を認め、標的抗原はデスモゾームの構成蛋白ではないことを示唆している。

## E. 結論

天疱瘡群のエピトープは一般的にいずれかのデスモゾームの構成蛋白であるが、今回の免疫電顕の結果からIEN型天疱瘡のエピトープは、デスモゾーム部以外の細胞間接着装置を構成する蛋白であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表 (平成14年度)

### 1. 論文発表 英語論文

1. Chan LS, Ahmed R, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine J-D, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtshchig G, Korman NJ, Lightman S, Lozadanur F, Marikovitch MP, Mondino BJ, Porst C, Rogers RS III, Setterfield JF, West D, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zone JJ: Mucous membrane pemphigoid: Definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment and prognostic factors, **Arch Dermatol** 138:370-379, 2002
2. Hamada T, McLean WHI, Ramsay M, Ashton GHS, Nanda A, Jenkins T, Edelstein I, South AP,

Bleck O, Wessagowit V, Mallipeddi R, Orchard GE, Wan H, Dopping-Hepenstal PJC, Mellerio JE, Whittock NV, Munro CS, van Steensel MAM, Steijlen PM, Ni J, Zhang L, Hashimoto T, Eady RAJ, McGrath JA: Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). **Hum Mol Genet** 11:833-840, 2002

3. Leverkus M, Georgi M, Nie Z, Hashimoto T, Brocker E-B, Zillikens D: Cicatricial pemphigoid with circulating IgA and IgG antibodies to the central portion of the BP180 ectodomain. Beneficial effect of adjuvant therapy with high dose intravenous immunoglobulin. **J Am Acad Dermatol** 46:116-122, 2002
4. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zillikens D: Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophilic activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. **Am J Pathol** 161:301-311, 2002
5. Sakamoto T, Hashimoto T, Furukawa F: Pyoderma gangrenosum in a patient with bullous systemic lupus erythematosus. **Eur J Dermatol** 12:485-487, 2002
6. South AP, Ashton GHS, Willoughby C, Ellis IH, Bleck O, Hamada T, Mannion G, Wessagowit V, Hashimoto T, Eady RAJ, McGrath JA: EEC (ectodactyly, ectodermal dysplasia) syndrome: heterozygous mutation in the p63 gene (R279H) and DNA-based antenatal diagno-

- sis. **Br J Dermatol** 146:216-220, 2002
7. Hamada T, South AP, Mitsuhashi Y, Kinebuchi T, Bleck O, Aschton GHS, Hozumi Y, Suzuki T, Hashimoto T, Eady RAJ, McGrath JA: Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. **Exp Dermatol** 11:107-114, 2002
  8. Oiso N, Yamashita C, Fukai K, Yoshioka K, Murakami T, Kato A, Amagai M, Komai A, Nagata Y, Hashimoto T, Ishii M: IgG/IgA pemphigus with IgA and IgG anti-Dsg1 autoantibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Br J Dermatol** 147:1012-1017, 2002
  9. Shimanovich I, Skrobek C, Rose C, Nie Z, Hashimoto T, Brocker E-B, Zillikens D: Pemphigoid gestationis with predominant involvement of oral mucous membranes and IgA autoantibodies targeting the C-terminus of BP180. **J Am Acad Dermatol** 47:780-784, 2002
  10. Nitta Y, Kawamura C, Hashimoto T: Vesiculobullous systemic lupus erythematosus: A case with circulating IgG and IgA autoantibodies to type VII collagen. **J Am Acad Dermatol**. 47(5 Suppl):S283-6, 2002
  11. HashKS, Rencic A, Hernandez MI, Hashimoto T, HC Nousari: Aggressive immunosuppressive therapy for a refractory case of IgA pemphigus. **Arch Dermatol** 138:744-746, 2002
  12. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T: BP180 ELISA as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-32, 2002
  13. Beutner EH, Pelton S, Hashimoto T, Yuelin Xu, Plukett RW, Korman NJ, Helm TN, Jablonska S: A non-fatal and two fatal paraneoplastic pemphigus cases: can a complement indirect immunofluorescence test help to identify fatal "group A" PNP cases? **J Am Acad Dermatol** 47:841-851, 2002
- 日本語論文  
特になし
2. 学会発表  
特になし
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）  
特になし