

アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの作成及びその解析

分担研究者 松井 稔

東京大学医科学研究所 基礎医科学大部門 神経ネットワーク分野 助手

研究要旨 ムスカリン性アセチルコリン受容体は5つのサブタイプよりなる。本受容体は、末梢神経系、中枢神経系で多岐に渡る機能を有しており、多くの疾患の病態生理に深く関わっている。今年度は、M2 および M3 受容体を欠損したマウスを作成し、コリン性の平滑筋収縮の生理的意義に関して新たな知見を得た。

共同研究者

藤川 徹 他 万有製薬つくば研究所

A. 研究目的

ムスカリン性受容体の機能はこれまで薬理的に解析されて来たが、サブタイプ特異的な薬物がないために、不十分な結果しか得られなかった。我々は、全てのサブタイプのノックアウトマウスを作成して、これらを比較検討することにより、各サブタイプの機能を知ることを試みた。今年度は平滑筋におけるムスカリン性受容体の意義を知ることを目的とした。

B. 研究方法

平滑筋には M2 と M3 が存在することが知られている。我々が確立した M2 ノックアウトマウスと M3 ノックアウトマウスを交配することにより、M2 と M3 の両者が欠失した、いわゆる「M2M3 ダブルノックアウトマウス」を作出した。このマウスの全身状態を観察し、摘出標本のコリン性アゴニストに対する収縮応答、瞳孔径の観察等を行った。

C. 研究結果

M2M3 ダブルノックアウトマウスの作出：すでに報告済みの M3 ノックアウトマウスに加え、新たに M2 ノックアウトマウスを作出した。M2 ノックアウトマウスは、外観上著変を認めず健康であった。これは、Gomezら の M2 ノックアウト

マウスに関する報告と矛盾しない。次に、M2 ノックアウトマウスと M3 ノックアウトマウスをかけあわせ、M2+/-M3+/- のマウスを作出した。さらにこのダブルヘテロマウスどうしを交配したところ、M2M3 ダブルノックアウトマウスがメンデル律に従って生まれて来た。これは M2M3 ダブルノックアウトマウスが胎生致死ではないことを意味する。ムスカリン性受容体を介するシグナル伝達は消化管や泌尿器などの生命維持に関わる臓器の制御に関わっているが、M2M3 ノックアウトマウスは、離乳直後の一過性の成長遅延の後、死に致ることなくアダルトにまで生育した。一過性の成長遅延は、ペースト状の餌を与えることにより軽減するがこれは、M3 を介する唾液腺への刺激が欠失していることに由来する。ムスカリン性受容体は生殖器においても何らかの役割を果たすことが考えられているが、M2M3 ダブルノックアウトマウスはオス、メスとも生殖可能であった。

泌尿器の表現型における性差：膀胱においては、ムスカリン性の排尿筋の収縮が排尿力の主たる源とされており、ムスカリン性拮抗薬は過活動性膀胱の治療薬としても使われている。我々はすでに、M3 ノックアウトマウスの排尿筋の収縮は野生型の約5%に減弱していることを報告した。このような *in vitro* での機能障害には性差はなかったにも関わらず、排尿障害はオスに顕著でメスでは軽度であり、M2 の機能的

意義はメスでより大きいことを示唆するものであった。しかしながら、M2 ノックアウトマウスの膀胱の外観は、オスにおいてもメスにおいても正常であった。さらに、メスにおいて、M2M3 ダブルノックアウトの膀胱は M3 ノックアウトマウスの膀胱より特に大きくはなかった。このような軽度の排尿障害に合致して、腎臓の組織学的所見は正常であった。オスにおいても、M2M3 ダブルノックアウトマウスの膀胱が M3 ノックアウトマウスの膀胱より特に大きいということはなかった。尿検査や血清学的な腎機能検査でも、オスメスとも特に異常は見いだされなかった。以上のように、オスにおいては M3 が排尿するために重要であるが、メスにおいては M2 も M3 もさほど重要ではなさそうである。

外見上正常な消化管：消化管においては、M2 と M3 の両者が腸管平滑筋の収縮を担う。腸管平滑筋の収縮は、蠕動運動を含む機能的な腸運動の基礎と考えられている。コリン性刺激の機能不全に関わる acute colonic pseudo-obstruction と言った病態に例示されるように、蠕動運動の消失は致死的でありうる。従って、我々は M2M3 ダブルノックアウトの腸管では、重篤な機能不全が存在するものと予想した。しかしながら、腹部膨満や便秘を示唆する所見は見いだされなかった。解剖してみても、消化管の全長に渡って、外見上は正常であった。組織学的検索によっても、胃や小腸に異常は見いだされなかった。その他の主要な腹腔内臓器、すなわち心臓、肺、脾臓も形態学的に正常であった。ムスカリン性受容体は胆嚢の収縮や膵臓の外分泌、内分泌に関わるとされている。しかしながら、血液検査によっても、肝機能や膵臓機能に異常は見いだされなかった。

カルバコールに対する平滑筋の収縮力

(図1)：以上に述べたように、M2 と M3 はコリン性収縮に関わっているとされているものの、これら双方の受容体を欠失したマウスにおいて、オスの排尿障害を除いては顕著な異常は見いだされなかった。これまでの薬理的解析では、確実な結果には至っていないため、M2 や M3 以外のムスカリン性受容体により、コリン性シグナル伝達が保たれているということも否定は

出来ない。そこで、我々は排尿筋と回腸の縦走筋について、試験内での収縮力を調べた。50 mM の KCl に対する反応は、野生型、M2 ノックアウト、M3 ノックアウト、M2M3 ダブルノックアウトの間で特に差はなかった。しかしながら、カルバコールに対する反応は、M2M3 ダブルノックアウトでは完全に欠失していた。非生理的に高い濃度域では弱い収縮が検出されたが、これはヘキサメトニウムで阻害されたことから、ニコチン性受容体の弱い関与を示唆するものであった。M3 ノックアウトマウスで失われた収縮力は、M2 ノックアウトマウスにおいて残存しているものとほぼ同じであった。したがって、平滑筋の収縮においては、M2 と M3 のみが機能していると結論づけた。

M2 の欠失による縮瞳効果 (図2)：ムスカリン性刺激は強い瞳孔の収縮をもたらすことが知られている。すでに報告したように、M3 ノックアウトマウスでは、中等度の散瞳が見られた。M2 ノックアウトマウスでは、瞳孔の大きさは正常であり、正常の瞳孔機能には M2 は重要ではないことが示唆された。しかしながら、M2M3 ダブルノックアウトマウスの瞳孔は、M3 ノックアウトマウスよりも常に小さかった。この結果は、M2 が瞳孔の収縮ではなく拡大を起こすことを示唆する。1%のアトロピンを点眼すると完全な散瞳が得られたことから、M1, M4, M5 のいずれかが、M2M3 ダブルノックアウトマウスの瞳孔収縮に寄与している可能性が考えられた。

D. 考察

コリン性収縮におけるムスカリン性受容体各サブタイプの役割：M3 が平滑筋収縮に主要な役割を果たしていることは知られていたが、共存するその他のサブタイプの重要性についてはあまり理解されていなかった。これまでのところ、M2 について以下の様な間接的な働きがあることが示唆されている。1) イソプロテレノールによる平滑筋の弛緩を M2 を刺激しアデニル酸シクラーゼを抑制することで解除できる。2) M2 の刺激は M3 の細胞内シグナル伝達を制御する働きを担っているかも知れない。ここで、私たちは M2 が平滑筋を直

接的に、すなわち M3 受容体の共存や cAMP を増加させる刺激の共存なしで、収縮させることができることを見いだした。5つのサブタイプの平滑筋収縮に対する寄与は以下のように結論した。膀胱排尿筋においては、M1, M2, M3, M4, M5 がそれぞれ 0, 5, 95, 0, 0%、回腸縦走筋においては、0, 25, 75, 0, 0%。M2 が直接平滑筋を収縮させるメカニズムは明らかでないが、非選択的な陽イオンチャネルの開口を介しているのかもしれない。

腹腔内臓器における In vivo でのコリン性収縮の意義：アトロピンの全身投与は、胃内容物の排出を遅延させ、大腸の動きを抑制する。従って、ムスカリン性拮抗薬は、胃腸の動きを抑制するための前投薬として広く使われている。しかしながら、大腸内視鏡の術前にそのような処置をすることの有効性を疑問視する向きもあり、生体内での平滑筋収縮におけるコリン性シグナル伝達の役割については疑問もある。nNOS を欠失したマウスの拡張した胃に例示されるように、消化管の動きに重要な役割を果たす分子の欠失は、明らかな腸管の閉塞所見となって現れる。しかしながら、我々はコリン性収縮が完全に欠失しているにも関わらず、消化管やメスの尿路での閉塞所見を見いだすことができなかった。このように、コリン性の収縮はこれらの臓器の基礎的な機能において前提条件になっているとは言えない。我々のノックアウトのマウスに見られた結果と、薬物によりムスカリン性受容体を拮抗した時の効果とは、矛盾しないものであることに注目されたい。すなわち、低容量のアトロピンは口内乾燥を引き起こし、中容量のアトロピンは散瞳を引き起こす。我々は、M3 ノックアウトマウスで同様の表現型を報告した。排尿障害や蠕動運動の抑制はより高濃度のアトロピンを必要とする。M2M3 ダブルノックアウトマウスの腸管が一見正常であることに一致して、高濃度のアトロピンを投与しても、腸の動きを完全には抑えることができなかったという報告もある。腸管やメスの膀胱では、アセチルコリン以外の神経伝達物質が、平滑筋収縮に関与し、コリン性収縮の欠如を十分に補っていると考えられる。実際、腸管神経系の神経伝達の特徴は複数の平行す

る経路による相互補完的なシステムである。コリン性収縮の欠如を補っているものは、腸管においてはタキキニンであるかも知れない。メスの排尿に関しては、プリンのような他の副交感神経性神経伝達物質がより重要なものかもしれない。

散瞳機能を持つ M2：我々は M2M3 ダブルノックアウトマウスの瞳孔が M3 ノックアウトマウスよりも大きいことを見いだした。アセチルコリンの放出を抑制するムスカリン性の autoreceptor が虹彩の副交感神経終末に見いだされ、そのサブタイプが M2 ではないかと推測されていることは注目に値する。そのような受容体の欠失はアセチルコリンの過剰放出を招くであろう。アトロピンの点眼が M3 ノックアウトマウスや M2M3 ダブルノックアウトマウスで完全な散瞳を引き起こしたことから、過剰放出されたアセチルコリンが残存するサブタイプ (M1, M4, M5) を刺激して、縮瞳をおこしたというのはいささかそうである。また、中枢神経系、例えば Edinger-Westphal 核における M2 受容体の欠失が今回の表現型の原因であるという可能性も否定できない。最後に、M1 や M5 といった他のサブタイプの発現が代償的に亢進し、M2M3 ノックアウトマウスの相対的縮瞳に寄与したという可能性も考えられるかも知れない。しかしながら、これまでのムスカリン性受容体ノックアウトマウスの報告ではいずれもそのような代償的な変化を検出したものはない。

E. 結論

我々はコリン性の平滑筋収縮が、消化管機能やメスの排尿に必須ではないことを示した。これらの情報はアセチルコリン以外の神経伝達物質の重要性に光をあて、自律神経機能異常に関わる疾患に対するよりよい治療指針を与えるかも知れない。そのような疾患としては、尿失禁、過敏性腸症候群、PTSD などが含まれる。これまで、M2 は平滑筋に豊富に存在するもののその機能は比較的小さいものと考えられて来た。私たちのノックアウトマウスは M2 の機能を明らかにするのに大いに役立つであろう。事実、我々は M2 が散瞳作用を持つこと

を発見し、新たな眼疾患治療薬の開発につながる可能性を示した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

英語論文

Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM: Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* 22: 10627-10632, 2002

日本語論文

松井稔, 船田正彦. ムスカリン性受容体サブタイプと疾患 -最近の展開-. *精神保健研究*. 48: 43-51, 2002

2. 学会発表

マウス顎下腺では M3 アセチルコリン受容体が副交感神経伝達において中心的な役割を果たす：第16回 唾液腺懇話会

ノックアウトマウスを駆使したムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析：第一回脳神経医学専攻フォーラム
マウス顎下腺では M3 アセチルコリン受容体が副交感神経伝達において中心的な役割を果たす：第25回日本神経科学大会

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

特記すべきことなし。

図とその説明

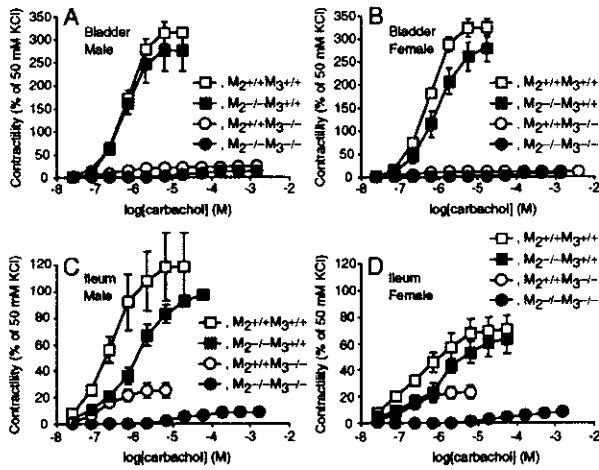


図1 野生型、M2 ノックアウトマウス、M3 ノックアウトマウス、M2M3 ダブルノックアウトマウスにおける、摘出標本（膀胱排尿筋、または、回腸縦走筋）の種々の濃度のカルバコールに対する反応曲線。

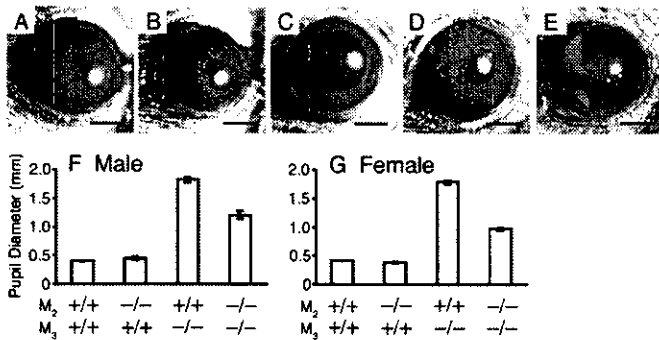


図2 野生型 (A)、M2 ノックアウトマウス (B)、M3 ノックアウトマウス (C)、M2M3 ダブルノックアウトマウス (D, E) における瞳孔の大きさ。E はアトロピン点眼後の完全な散瞳を示す。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

平成14年度分担研究報告書

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室 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の細胞外ドメインからなるリコンビナントタンパク質の投与によってM3 KOマウスにおいて抗M3抗体の誘導を確認した。その後免疫したM3 KOマウスの脾臓細胞を調製し、rag-2 KOマウスに尾静脈経路で移植し、その後マウスの観察を行なっている。顕著な体重減少などの変化は見られていないが、一部のマウスにおいて唾液腺へのリンパ球浸潤を認めている。

共同研究者

大田孝幸、天谷雅行、西川武二
（慶應義塾大学医学部 皮膚科）

松井稔

（東京大学医科学研究所）

永井重徳、松田達志

（慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学）

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 機能の障害、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 12 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。免疫源として、N 端にグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) タグを付加したマウス M3 の N 端部分の細胞外ドメインをリコンビナント分子として発現精製したものをを用いた。

C. 研究結果

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、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。M3 ノックアウトマウスにリコンビナント抗原 10 μ g/head を完全フロイントアジュバントを用いて免疫し、2 週間後に 2 μ g を Immune Eazy (QLAGEN)

を用いて 2 回ブーストした。その後、全血を採血して ELISA 法によって血清中の抗体価を検討したところ、4000 倍希釈によっても十分な抗体価が検出された。この抗体の反応性は、ELISA を行うにあたって十分な GST にて吸収してもなお反応が見られ、細胞外部位に対する抗体が生産されていると考えられた。そこで免疫した脾臓細胞を調製し、rag-2 ノックアウトマウス 1 頭あたり 5 x 10⁷ 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。観察期間中特に体重減少などの変化は見られなかった。しかし、6 週後に唾液腺の組織像を観察したところ、一部にリンパ球の浸潤が観察された。

D. 考察

尋常性天疱瘡モデルマウスにおいて用いた方法 (1) を踏襲することにより、M3 に対する抗体を誘導できたことは、この方法論が一般性を持つことを示唆する。しかしその一方で、体重減少などの変化が観察されないことは抗体の生産のみで表現系が現れない可能性も示唆する。事実、一部ながら唾液腺へのリンパ球浸潤が観察された事実は、細胞性免疫反応の関与を示唆する。事実、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も報告されており、M3 が MHC クラス I によって提示される可能性が強く示唆される (9)。そこで今後は自己抗体の誘導と細胞性免疫の誘導を検討する。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、昨年度までに作製した、M3を強制発現させたEL4 (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、液性免疫、細胞性免疫の両方から目指したい。

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., Hubscher, 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., Komiyama, 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., Konttinen, 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, J., Yokoyama, M., Widera, G., Fuller, J. T., Kincaid, C., Campbell, I. L. and Whitton, J. L. (1998) DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J. Virol.* 72:5174-5181.
- 11) Tobery, T. and Siliciano, R. F. (1999) Cutting edge: induction of enhanced CTL-dependent protective immunity in vivo by N-end rule targeting of a model tumor antigen. *J. Immunol.* 162:639-642.
- 12) Velders, M. P., Weijzen, S., Eiben, G. L., Elmishad, A. G., Kloetzel P. M., Higgins, T., Ciccarelli, R. B., Evans, M., Man, S., Smith, L. and Kast, W. M. (2001) Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J. Immunol.* 166:5366-5373.

F. 研究発表 (平成 14 年度)

原著論文

- 1) Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nihsikawa, T. (2002) Immunological and histopathological characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 118:199-204.
- 2) Tsunoda, K., Ota, T., Suzuki, H., Ohyama,

M., Nagai, T., Nishikawa, T., Amagai, M. and Koyasu, S. (2002) 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.

3) 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.** 3:295-304.

4) Agematsu, K., Futatani, T., Hokibara, S., Kobayashi, N., Takamoto, M., Tsukada, S., Suzuki, H., Koyasu, S., Miyawaki, T., Sugane, K., Komiyama, A. and Ochs, H. D. (2002) Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. **Clin. Immunol.** 103:34-42.

5) Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in dendritic cells. **Nat. Immunol.** 3:875-881.

6) Murata, Y., Ohteki, T., Koyasu, S. and Hamuro, J. (2002) IFN- γ production by macrophages and dendritic cells dictated by intracellular thiol redox status. **Eur. J. Immunol.** 32:2866-2873.

7) Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Tsunoda, K., Koyasu, S., Amagai, M. and Nishikawa, T. (2002) The ultrastructural changes of mice actively producing antibodies to desmoglein 3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch. Dermatol. Res.** 294:318-323.

8) Shinoda, M., Shimazu, M., Matsuda, S., Wakabayashi, G., Tanabe, M., Hoshino, K., Kamei, S., Koyasu, S. and Kitajima, M. (2002) c-Jun N-terminal kinase activation during warm hepatic ischemia/reperfusion injuries in a rat model. **Wound Repair Regen.** 10:314-319.

9) 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.

10) 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.** in press.

総説

1) Matsuda, S. and Koyasu, S. (2002) Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. **Curr. Top. Medicin. Chem.** in press.

G. 知的所有権の取得状況

特許出願 5 件

- 1) 出願番号：特願平 11-218008 号
発明者：小安重夫、松田達志
発明の名称：「単一シグナル伝達系を標的としたスクリーニング系」
出願人：小安重夫
出願日：1999/07/30
公開日：2001/2/13 (特開 2001-37497 号)
- 2) 出願番号：特願 2000-113938 号
発明者：小安重夫、松田達志、竹鼻健司、小林幹
発明の名称：「Th2 反応に特異的な免疫寛容誘導剤」
出願人：慶應義塾、味の素 (株)
出願日：2000/04/14
公開日：2001/10/23 (特開 2001-294527)
- 3) 出願番号：特願 2000-607462
発明者：天谷雅行、西川武二、鈴木春巳、小安重夫
発明の名称：「自己免疫疾患モデル動物」
出願人：慶應義塾
出願日：2000/03/30
公開日：2000/10/05 (特開 WO00/57695 号)

査定日：2002/6/16、特許第 3326770 号
4) 出願番号：特願 2001-156126 号
発明者：天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：「自己免疫疾患モデル動物の作
製方法」
出願人：慶應義塾
出願日：2001/05/24
査定日：2002/4/11、特許第 3306625 号

5) 出願番号：特願 2001-267653 号
発明者：角田和之、天谷雅行、西川武二、
小安重夫
発明の名称：「天疱瘡モノクローナル抗体」
出願人：慶應義塾
出願日：2001/09/04

P0+/-マウス自己免疫性神経炎の発症機構とヒトにおける類似疾患の検討

分担研究者 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

研究要旨 ミエリン P0 蛋白(P0)は末梢神経ミエリンの主要構成蛋白で、その遺伝子変異はヒト Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) の原因となる。P0-/-マウスは早期発症ニューロパチーを発症するのに対し、P0+/-マウスは生後 6-9 ヶ月でヒト慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) に類似した炎症性神経炎を自然発症する。我々は本研究において、P0+/-マウスでは P0 に対する免疫寛容が破綻していることを明らかにし、その原因は胸腺 P0 発現低下に伴う P0 反応性 T 細胞の negative selection の欠陥にあることを示した。また、臨床的に CIDP と診断される患者の中に、P0 の遺伝子変異を伴う症例を見いだした。これらの研究結果は、自己免疫疾患の発症と自己抗原遺伝子変異の新たな関係を示すものである。

共同研究者

林 幼偉 国立精神・神経センター神経研究所

三宅幸子 国立精神・神経センター神経研究所

A. 研究目的

末梢ミエリンの 50%程度を占める主要構成要素である P0 タンパクは、その形成維持に重要な役割を担っており、その遺伝子異常と遺伝性ニューロパチー(CMT1B, DSS, CH, CMT2)との関係が指摘されている。P0 の機能的意義を解析する目的で、P0 のノックアウト・マウスが作製され、有用な情報を提供している。P0 -/-マウスは早期に遺伝性の脱髄性ニューロパチーを発症するが、P0 +/-マウスでは初期のミエリン形成にはさほど異常を認めないものの、遅発性に脱髄し生後約 6-9 ヶ月で神経炎を自然発症する(J Neuropathol Exp Neurol 56: 811, 1997)。この遅発性神経炎は、リンパ球浸潤を伴い、ヒトにおける慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP) に類似した病理像を呈する。その発症機序に関連して、これまでに我々は P0 が胸腺で発現していること、P0 +/-マウスでは胸腺における P0 発現低下とそれ

に伴う P0 反応性 T 細胞の残存に起因して実験的自己免疫性神経炎 (EAN) が重症化することを示してきた。また、Martini らは T 細胞や B 細胞を欠損する P0 +/-マウスでは神経炎の発症が抑制されることを示した (J Neurosci 20: 729, 2000)。これらの結果は、P0 +/-マウスでは P0 ペプチドに対する自己応答性が亢進し、それが遅発性神経炎の発症に関与するという我々の仮説を支持する。

一方ヒトの遺伝性ニューロパチーにおいても、ステロイド反応性の症例や活性化 T 細胞を認める症例もあり、免疫学的機序の関与が指摘されてきた。

B. 研究方法

(マウス胸腺移植)

生後三日目のマウスペアより胸腺を摘出し、摘出した胸腺をそれぞれ置換した。8 週後にマウスの性をチェックし、ドナーとホストの性が一致した場合に限り、以下の実験に利用した。残ったマウスは P0 ペプチドで免疫し、11 日目に所属リンパ節細胞を調製し P0 ペプチドで刺激。培養上清中の IFN- γ の濃度を ELISA で測定した。実験の終了時には必ず胸腺移植が成功したことを確認した。

(症例検討)

臨床的に CIDP とされながら後に P0 遺伝子異常の確認された症例を提示し、ヒト炎症性疾患の中に P0 +/- マウス神経炎と類似した機序で発症する疾患が存在する可能性を検証する。

C. 研究結果

(マウス実験)

野生型 B6 マウスをホストにした場合、P0+/-、P0-/-マウスの胸腺を移植したマウスでは、野生型 B6 の胸腺を移植したマウスに比較して、有意に強い P0 反応性 (IFN- γ 産生) が確認された (P0-/- > P0+/-)。一方、野生型 B6 の胸腺を、P0 遺伝子マウスに移植した場合には、P0 に対する反応性は強く抑制された。以上の結果は、P0 欠損マウスにおける免疫寛容の破綻が、胸腺内 P0 発現低下に起因することを証明するものである。

(症例呈示：天理よろづ相談所病院橋本部長のご厚意による。)

症例は 63 歳の女性で、四肢遠位の筋力低下としびれ、歩行困難を主訴として来院された。50 歳頃から耳が聞こえにくくなり、右足底のこわばりを自覚。まもなく下腿の絞扼感、重だるさと筋力低下を呈しはじめ、下腿の冷感を生じ、やがて杖歩行となった。さらに右手の筋力低下としびれを呈するようになり、精査加療目的で入院。神経学的には sensory-motor neuropathy で、髄液検査にて髄液タンパクの高値と Q-alb 値の上昇を認めた。

末梢神経伝導速度検査では、Rt median nerve の motor component で顕著な temporal dispersion と conduction block を伴い、不均一な伝導速度の低下を呈していた。また画像検査は腰髄 MRI で多発性に cord の Gd enhancement を認めた。

CIDP-variant としてステロイドパルスを実施、輪状暗点と発汗障害は速やかに改善、感覚障害や筋力低下は部分的に軽快した。ただ tapering にて再発し 2 回目のパルスでも悪化したため IVIG に切り替え、特に感覚障

害と歩行障害が軽快した。

以後約半年毎に再発傾向にあるため、その都度 IVIG を施行し、軽快している。

神経症候学的には CIDP に矛盾しないが、非典型的な所見として、遺伝性の難聴音性難聴、両側性の Adie 瞳孔や局所性発汗障害、アカラジア、膀胱直腸障害などの自律神経障害、左眼の輪状暗点などを呈していたことから遺伝子検索を行い、山形大学小児科早坂清先生らによる DGGE 法にて P0 遺伝子の Thr124Met ヘテロの異常を確認した。

D. 考察

ヒトの遺伝性ニューロパチーは point mutation によるものが多く、マウスのように完全なヘテロにはならない。ただある mutation においては異常タンパクの種類や発現場所、MHC との avidity などによっては、マウスと類似の発症機序が働くのではないかと考えられる。つまりヒトにおいても自己抗原の発現異常が自己免疫応答を促進する可能性があるのではないかとと思われる。

ただこの仮説を検証するには、実際に胸腺内、あるいは免疫細胞における蛋白発現レベルを検討する必要がある。P0 以外の自己抗原については、ヘテロ遺伝子異常の結果、胸腺内自己抗原レベルが完全なネガティブセレクションを不可能にするようなレベルでないと、P0+/-マウスのような自己反応性亢進は起こらないと思われる。今後、どのミエリンタンパクが胸腺でどの程度発現し、ヘテロミュータントではどの程度減少するのかを確認して比較していく必要がある。

E. 結論

P0+/-マウスでは、胸腺内 P0 発現低下に伴う negative selection の欠陥がある。このような免疫寛容の破綻が、P0+/-マウス自然発症神経炎の原因となっている可能性が高いと考えられる。また、今回検討した症例は臨床経過、電気生理学的検査結果や治療反応性など、いずれも CIDP に合致し、遺伝子検索によらなければ CIDP-variant とされていたものである。このように CIDP 症例の中に背景に遺伝子異常を持つ症例が潜在的に存在するものと思われる。自己免疫疾患の発

症リスクを高める因子としての自己抗原胸腺内発現低下は、多くの病態で検討されるべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

英語論文

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* 25 : 280-282, 2002

Gumperz, J.E., S. Miyake, T. Yamamura, and M.B. Brenner: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195: 625-636, 2002

Kondo, T., K. Takahashi, N. Kohara, Y. Takahashi, S. Hayashi, H. Takahashi, H. Matsuo, M. Yamazaki, K. Inoue, K. Miyamoto, and T. Yamamura: Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease): Three genetic forms. *Neurology* 59: 1105-1107, 2002

Araki, M., T. Kondo, J.E. Gumperz, M.B. Brenner, S. Miyake and T. Yamamura: Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* 15: 279-288, 2003

Sakami, S., A. Nakata, T. Yamamura, and N. Kawamura: Stressors increase in vitro T cell apoptosis in humans. *Neuroimmunomodul.* 10:224-231 (2002-2003)

Miyamoto, K., S. Miyake, M. Schachner, and T. Yamamura: Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances

susceptibility to autoimmune neuritis Targeting P0 Peptide. *Eur. J. Immunol.*33: 656-665, 2003

日本語論文

三宅幸子、山村 隆: NKT 細胞と実験的自己免疫性脳脊髄炎. 免疫病研究の最先端. 分子制御というアプローチ. *Mebio* 19:61-67, 2002

荒木 学、高橋 和也、山村 隆: 多発性硬化症におけるNK細胞、NKT細胞の関与. *神経内科* 56:312-318, 2002

山村 隆: NKT 細胞と新しい自己免疫病治療薬. *Medical Science Digest* 28:306-307, 2002

宮本勝一、三宅幸子、山村 隆: 糖脂質による自己免疫病の制御. *感染・炎症・免疫* 32 : 200-201, 2002

山村 隆、宮本勝一、長山成美、三宅幸子: NK・NKT 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症制御. 蛋白質核酸酵素増刊号「免疫研究の最前線: 高次複雑系免疫システムの包括的理解をめざして」47: 1115-1120, 2002

宮本 勝一、三宅 幸子、山村 隆: 自己免疫性脳脊髄炎に対する NKT 細胞糖脂質リガンド療法. *神経免疫学* 10:209-211, 2002

2. 学会発表

海外

Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura: Prevention of autoimmune ecephalomyelitis by a novel glycolipid ligand for natural killer T cells. *Experimental Biology 2002*, New Orleans, Louisiana, April 23, 2002

Koike, F., T. Kondo, T. Fukazawa, and T. Yamamura: Immunomodulatory effects of interferon (IFN)- β 1b. cDNA microarray analysis of peripheral blood T

and non-T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002

Chiba, A., T. Yamamura, K. Miyamoto, and S. Miyake: A new synthetic glycolipid OCH prevents collagen-induced arthritis by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002

Araki, M., T. Kondo, and T. Yamamura: Th2 bias of CD4+ NKT cells in multiple sclerosis. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002

Miyake, S., A. Chiba, M. Mizuno, and T. Yamamura: A synthetic glycolipid OCH prevents collagen induced arthritis and diabetes in NOD mouse by inducing Th2 bias of NKT cells. CD1 & NK T cell Workshop. 2nd International Workshop on CD1 antigen presentation and NK T cells. Woods Hole, MA, USA, Nov 6, 2002

Pyz, E., O. Naidenko, S. Miyake, T. Yamamura, S. Cardell, M. Kronenberg, and T. Herrmann: Investigation on CD1d restricted rat T cells. CD1 & NK T cell Workshop. 2nd International Workshop on CD1 antigen presentation and NK T cells. Woods Hole, MA, USA, Nov 7, 2002

天疱瘡モデルマウスより分離された疾患誘導性モノクローナル抗体のエピトープ解析

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、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

A. 研究目的

PV モデルマウスより病原性を有する抗 Dsg3 mAb を単離し、そのエピトープを解析する。

B. 研究方法

a)マウス

生後6～10週齢の Dsg3^{-/-}マウスを5ug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^{-/-}マウスの脾細胞を C57BL/6 Rag2^{-/-}の尾静脈より移植し、抗 Dsg3 抗体産生をマウス Dsg3ELISA 及び live keratinocyte staining にて確認した。

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、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。

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。単離されたすべてのクローンは限界希釈法にて3回のクローニングを行った。モノクローナル抗体のアイソタイプは Isotyping

Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて行った。MAb は、HiTrap rProtein A FF column (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)を用いて培養上清より精製した。

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、さらに、ヒト Dsg1 と Dsg3 の点変異蛋白 14 種類を作製した。ヒト Dsg スワッピング分子におけるヒト Dsg3 とヒト Dsg1 の様々な領域に相当するフラグメントは適したプライマーを用い PCR にて増幅後、pQE-Tri-System vector (Qiagen, Hilden, Germany)に組み込まれた。点変異蛋白は適したプライマーをい two step-PCR 法を用いて増幅後、pQE vector に組み込まれた。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)ELISA および live keratinocyte staining

さまざまな Dsg を抗原として用いた ELISA 法は既報告に従い行った。また Live keratinocyte staining は既報告に従い行った。すなわち、培養マウス角化細胞 PAM212 を8ウェル、Chamber slide にて培養後、培養液をモノクローナル抗体培養上清に置換し、37℃、5%CO₂ インキュベーターにて 30 分間培養した。-20℃メタノールにて 20 分間固定後、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。

e)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 µg/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。

(PFIgG1 は 1 mg/mouse ETA は 1 µg/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、PFIgG、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。

f)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-tetramethylpentadecane (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)にてプライミングした C57BL/6 Rag2^{-/-}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。

g)免疫沈降法によるエピトープ解析

mAb のエピトープを解析するために Dsg1 と Dsg3 のスワッピング分子あるいは点変異蛋白を用いた免疫沈降法を行った。5µg の精製した mAb と 300ul の組み換え蛋白を含む培養上清を混合し 30 分間、室温で反応させた。陽性コントロールとしては抗 E-tag mAb (Amersham Bioscience)を用いた。蛋白は Protein G Sepharose (Amersham Bioscience)にて 4℃で1晩、反応させ免疫沈降した。免疫沈降反応物は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて泳動し、PVDF 膜 (Millipore Corp., Bedford, MA)上に転写した。組み換え蛋白は抗 6X ヒスチジン抗

体(R&D Systems, Minneapolis, MN)にて可視化した。EDTA 処理は、組み換え蛋白を含む培養上清に 5 mM EDTA を加えて、室温で 30 分反応させた。反応後、組み換え蛋白は上述のごとく免疫沈降法に使用された。

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 クローンの抗 Dsg3 mAb が単離され AK (acantholytic keratinocyte) と名付けられた。

すべてのクローンのアイソタイプは重鎖が IgG1 で軽鎖が κ 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、数クローン (AK 1、AK 15、AK 18、AK 19、AK 20、AK 23) 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 AK 1 を除いて、全て Dsg3 にのみ反応性を有していた。(表 1, 図 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小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 (図 2)。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^{-/-}マウス) を用いた病原性の確認を行った。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^{-/-}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 (図 3)。

d) 病原性を有する AK23 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。

mAb のエピトープを解析するために、まず mAb のカルシウム依存性の有無を確認した。EDTA で処理、未処理のマウス rDsg3 と mAb の免疫沈降では、EDTA 処理後 AK23 と AK19 のみで rDsg3 に対する反応性を認めなかった。これらの所見より AK19 と AK23 はカルシウム依存性のエピトープを認識する事が確認された。

バキュロウィルスにより得られた組み換え Dsg3 は免疫沈降法において、それぞれ、小さい分子量はプロ配列が切断された成熟型、大きい蛋白はプロ配列 Bar=50 μm を有する未成熟型である、2 本のバンドの蛋白として産生される。

各 mAb で免疫沈降したところ、AK23 のみで、小さい分子量のバンドのみが検出された。この所見より AK23 はプロ配列が切断された後に暴露される成熟型の Dsg 上のエピトープを優位に認識する事を示唆する。

次にわれわれは 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。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 (図 5)。

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 κ 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^{-/-}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) とデスマゾームカドヘリン (デスマグレインとデスマコリン) 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 から 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、おそらくデスマ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、そして 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。。

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マゾームの役割や、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 12 年度）

1. 論文発表

英語論文

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 interfarface of desmoglein 3. J Immunol. 2003. 170: 2170-2178

2. 学会発表

1. Tsunoda T, Aoki M, Ota T, Nagai T, Yamada T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. A pathogenic anti-desmoglein3 monoclonal antibody recognizes N-terminal adhesive region of desmoglein3. The 63rd of annual meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, 2002.

2. 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. 水疱形成誘導能を持つ抗デスモグレイン3モノクローナル抗体 AK23 はN末のカドヘリン接着面を認識する。日本研究皮膚科学会 第 27 回年次学術大会・総会、2002、京都

3. 角田和之、大田孝幸、中川種昭、永井哲夫、小安重夫、西川武二、天谷雅行 天疱瘡モデルマウスより作製した抗デスモグレイン3病原性モノクローナル抗体のエピトープ解析。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会、2002、東京

G. 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)