

表 1. AK mAb のまとめ

AK	Isotype	IIF		ELISA		Live keratinocyte dependency staining	Ca dependency	Pathogenic activity		Epitope
		mouse mucosa	human liver	mouse Dsg3	human Dsg1			Passive transfer	Ascites formation	
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ソードを認識した。

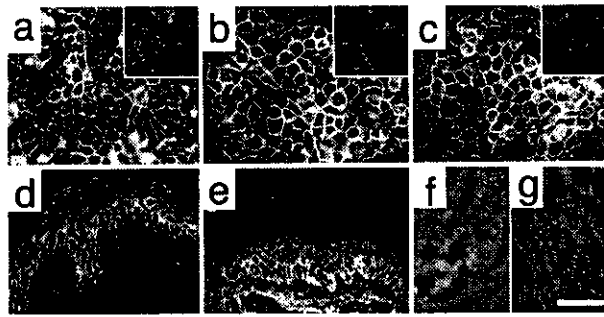


図1. マウス各組織を基質として用いた mAb の間接蛍光抗体法

培養マウス角化細胞 PAM212 での live keratinocyte staining. (a)AK23、(b)AK19、(c)PV モデルマウス血清とともに細胞表面への抗体の沈着が認められる(inset a、正常マウス血清)。マウス rDsg3 により吸収することにより反応性が消失した (inset b,c)。ヒト皮膚を基質とした間接蛍光抗体法では PV モデルマウス血清 (d)、AK23 (e)ともに Dsg3 の発現部位に一致した抗体の反応が認められる。AK23 は心臓(f)、肝臓(g)においては反応性を示さなかった。

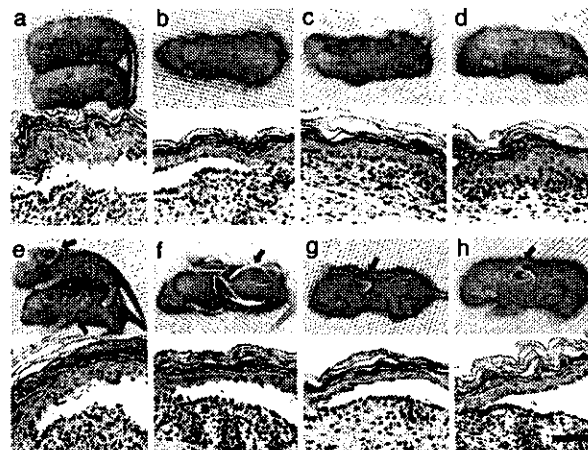


図2. 新生仔マウスを用いた病原性の確認

AK19 (a)および AK23 (b)を注射したマウスでは肉眼的な水疱形成は認めないものの、病理組織学的に微少水疱の形成を認めた。AK19 (e)および AK23 (f)と共に PFIgG (c、それ自身では肉眼的および病理組織学的に水疱形成をみとめない量)を注射したマウスでは、肉眼的 (矢印)、病理組織学的に水疱形成を認めた。AK19 (g)および AK23 (h)と共に ETA (d、それ自身では肉眼的および病理組織学的に水疱形成をみとめない量)を注射したマウスでは、肉眼的 (矢印)、病理組織学的に水疱形成を認めた。Bar=50 μ m

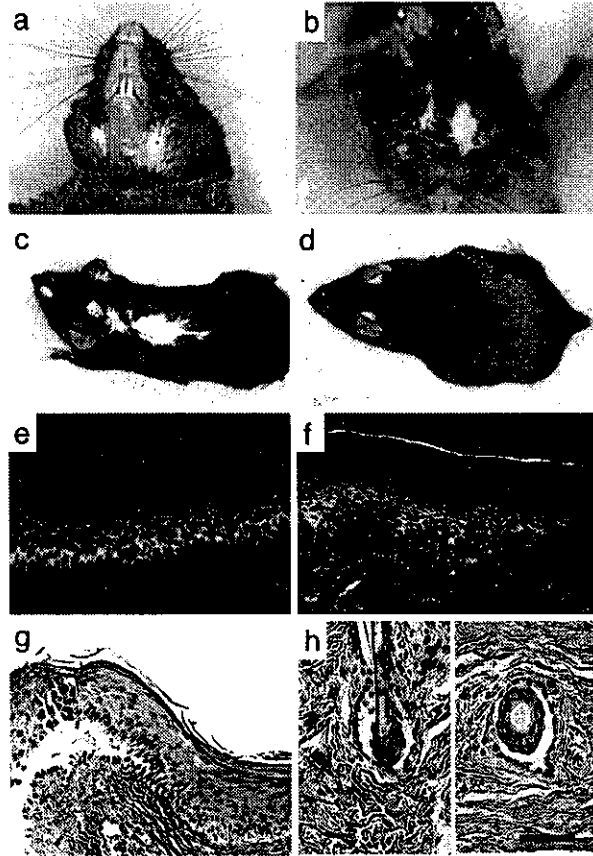


図3.成体マウスを用いたハイブリドーマの腹腔内接種による病原性の確認。

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 μ m

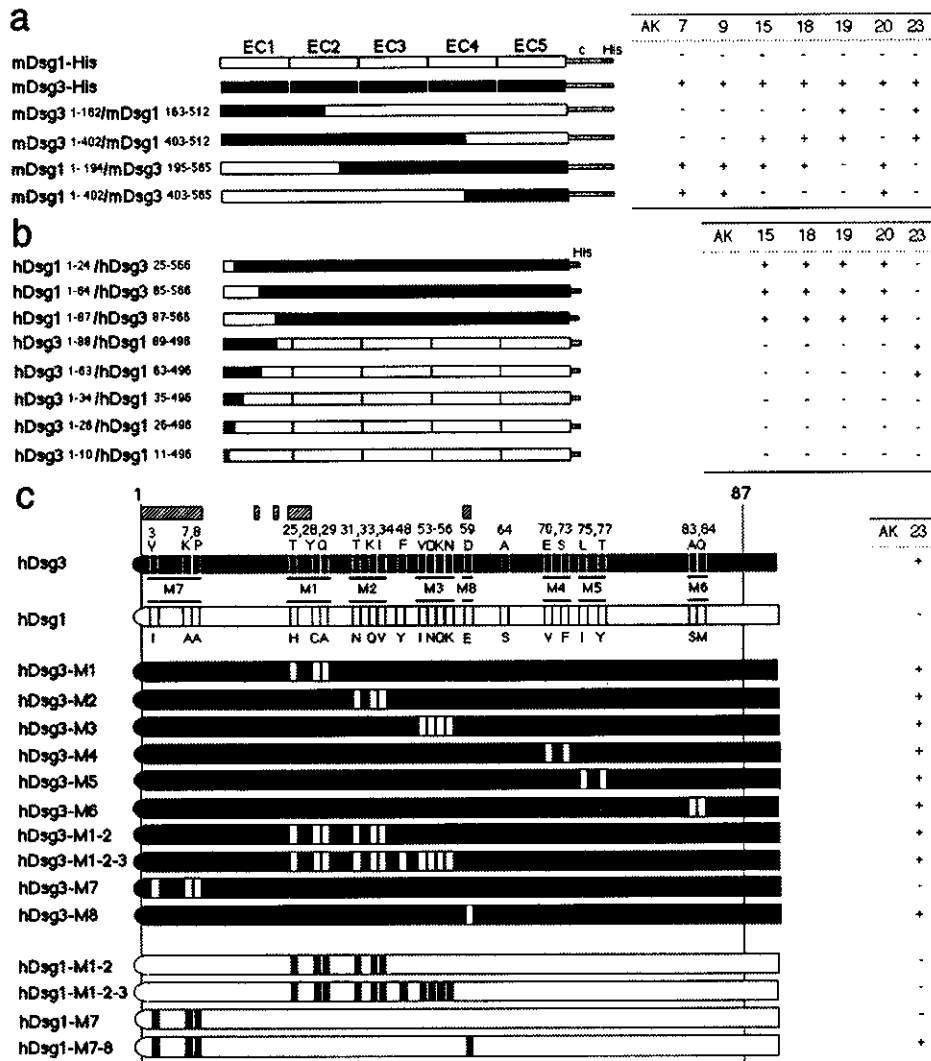


図4. エピトープ解析に用いたキメラ分子の構造模式図と mAb の反応性

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)。

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室 教授

研究要旨 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、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。尋常性天疱瘡抗原である 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。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 細胞の運命を解明することを試みる。天疱瘡モデルマウスより作成した AK7 抗 Dsg3 IgG モノクローナル抗体の H 鎖及び L 鎖の可変領域の cDNA から、IgM 膜結合型の B 細胞トランスジェニックマウスを作成した。トランスジーンを持った Dsg3 特異的 B 細胞は、Dsg3 の発現の認められない骨髄のみならず、末梢リンパ組織である脾臓及びリンパ節においても検出された。従って、Dsg3 特異的な B 細胞はトレランスによる除去を逃れていることが考えられた。Dsg3 存在下、非存在下での B 細胞の運命をさらに詳細に検討する予定である。

共同研究者

大田孝幸 慶應義塾大学医学部大学院生
天谷雅行 慶應義塾大学医学部専任講師

A. 研究目的

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、抗原に応答できない。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障害があり、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人工的な系であり、過剰発現されているために、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去得られるかを解析する。

B. 研究方法

1. トランスジェニックマウスの作成
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- μ 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

トランスジェニックマウスの脾臓、リンパ節、骨髄より単核球を分離し、phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19 (1D3)、FITC-conjugated anti-IgMa (DS-1)、anti μ IgM(R6-60.2)で染色した。末梢血は ACK lysis buffer にて赤血球を除いた。全ての抗体は 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. 研究結果

1. 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を 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。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。

2. 脾臓 B 細胞の解析

両鎖のトランスジェニックマウスでは、B 細胞の割合の若干の減少を認めたものの Dsg3 にて idiotyoe を染色したところ、IgM^a 陽性のほぼ全ての細胞にて idiotype 陽性、つまり Dsg3 と反応することができると考えられた。また内在性の L 鎖の発現がある可能性があるため、Rag2-/-マウスと掛け合わせたか、idiotype 陽性の細胞が脾臓に見られた。(図 1)

3. 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 IgM^a の沈着があるかどうか確認した。従って、本マウスにおいて、血液中にも Dsg3 に特異的な抗体を分泌している可能性が考えられた。(図 2)

4. 血中抗体価の測定

両鎖のトランスジェニック並びに AK7-LH1 マウス、Ak7-LH1 Rag2-/- マウスにおける全 IgM ならびに Dsg3 に対する抗体価の測定を行った。血中全 IgM の値においては AK7-LH1 マウスは相当量のかかなり多くの自己抗体を分泌していると考えられた。(図 3)

D. 考察

末梢抗原に対する B 細胞のトレランスは未だ議論の多いところである。今回 Dsg3 に対するトランスジェニックマウスを作成したが、今までの議論によるとおそらく clonal deletion を受けるか anergy が誘導され自己反応性の B 細胞は脾細胞中に認められないと考えられたが、両鎖のトランスジェニックマウスにおいては脾細胞中に Dsg3 と反応する B 細胞が認められ、血中抗体価も陽性であり、口蓋にも抗体の沈着が見られた。PV の発症機序を考える上で、B 細胞にトレランスが働くかどうかは治療面においても詳細に検討する必要がある、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

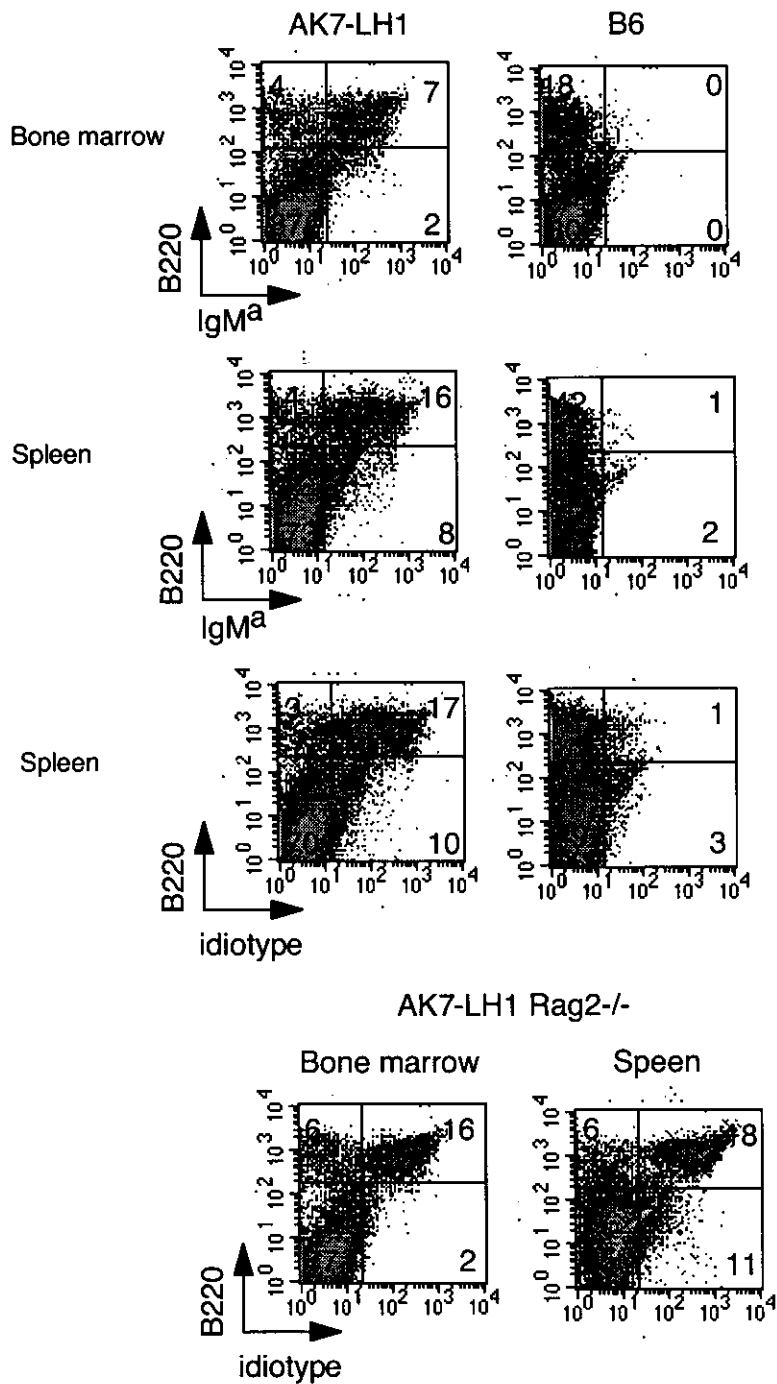


図 1: AK7-LH1 および AK7-LH1 Rag2^{-/-} マウスの骨髄および脾臓における B 細胞の解析。AK7-LH1 マウスにおいて、骨髄並びに脾臓中にも Dsg3 と反応することができる B 細胞を認め、AK7-LH1 Rag2^{-/-} にてもその傾向に変化はみとめられなかった。

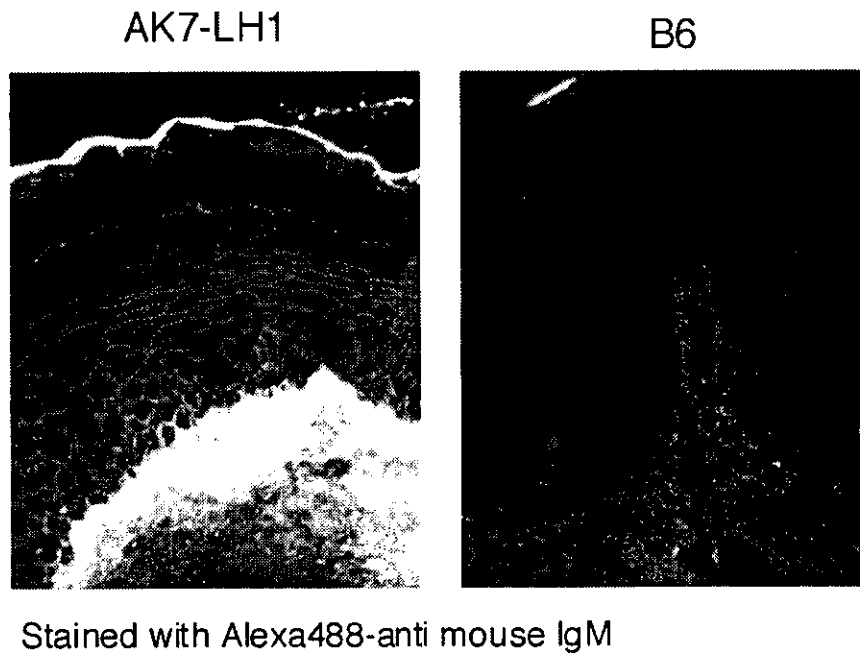


図 2 AK7-LH1 マウスの口蓋ケラチノサイト細胞間には IgM の沈着を認める。

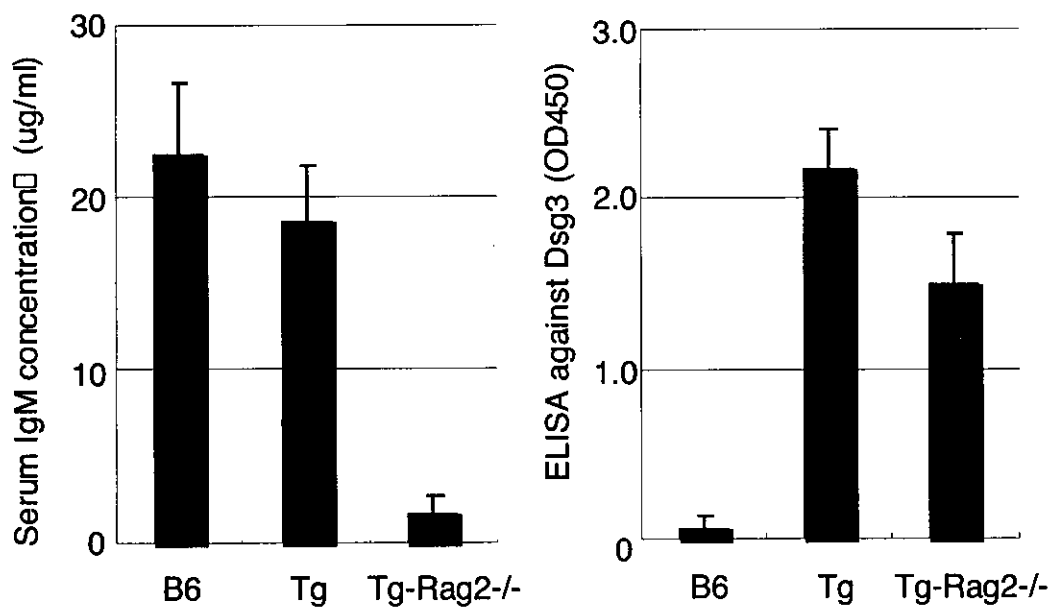


図 3 Total IgM and anti Dsg3 IgM ELISA in AK7-LH1(Tg) and AK7-LH1 Rag2^{-/-} (Tg-Rag2^{-/-}) マウスにおける IgM 総量及び抗 Dsg3 IgM 抗体

天疱瘡抗原ノックアウトマウスを用いた病原性を有する

自己反応性 T 細胞の同定および解析

分担研究者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 専任講師

研究要旨 尋常性天疱瘡 (PV) において病態と関連する抗デスマグレイン 3

(Dsg3) 抗体の産生には Dsg3 を認識する自己反応性 T 細胞の関与が推測されている。そこで、我々は Dsg3^{-/-}マウスを用いた PV モデルを利用することで、PV の病態を誘導する病原性 Dsg3 反応性 T 細胞の特性を明らかにすることをめざしている。そのため、本年度は Dsg3^{-/-}マウスから Dsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立するためのマウス Dsg3 (mDsg3) の免疫培養条件の最適化を目的とした。まず、T 細胞刺激用の抗原としてリコンビナントの mDsg3 をバキュロウイルスと大腸菌の系で発現、精製した。5 つの異なる条件でリコンビナント mDsg3 で Dsg3^{-/-}マウスを免疫し、採取した脾臓、膝窩リンパ節、単径リンパ節から *in vitro* での抗原刺激により mDsg3 に対する T 細胞の特異的反応を検出した。その結果、mDsg3 反応性 T 細胞を誘導し得る免疫培養条件を確立することができた。今後、今回確立した条件を用いて Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の樹立および解析を行う予定である。

共同研究者

高橋勇人 慶應義塾大学医学部大学院生
天谷雅行 慶應義塾大学医学部専任講師
西川武二 慶應義塾大学医学部教授

A. 研究目的

尋常性天疱瘡 (PV) は皮膚表皮細胞に対する自己免疫疾患で、デスマグレイン 3 (Dsg3) に対する自己抗体によりその病態が誘導される。抗 Dsg3 抗体のアイソタイプは主に IgG4 で、Dsg3 分子の接着を阻害する高い親和性を有する。また、抗 Dsg3 抗体産生と特定の HLA クラス II アレルとの強い相関も報告されている。これらの知見から、抗 Dsg3 抗体産生には抗原特異的な CD4⁺T 細胞による B 細胞の活性化が不可欠と考えられる。これまで、PV 患者を対象とした Dsg3 反応性 T 細胞の検出、解析が複数の研究グループにより行われてきた。しかし、Dsg3 反応性 T 細胞により認識されるエピトープやサイトカイン産生能などは報告ごとに異なり、一定した見解は得られていない。その原因として特異的 T 細胞の検出方法が異なること、ヒト検体は遺伝、環境背景が多様なことが挙げられる。また、こ

れまでに解析された Dsg3 反応性 T 細胞が本当に PV の病態に関与する‘病原性’を有する T 細胞であるかについても明らかでない。

最近、Amagai らは Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を免疫不全マウスに移入することで抗 Dsg3 抗体産生と PV phenotype を誘導できることを報告した。そこで、我々は病原性を有する Dsg3 反応性 T 細胞の解析にこの PV モデルマウスの系を用いることを着想した。この系を用いる長所として、1)対象がマウスのため遺伝、環境背景が均一、2)Dsg3 反応性 T 細胞の病原性を免疫不全マウスへの移入によりスクリーニングできること、が挙げられる。本研究は、1) Dsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスからの Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の樹立、2)T 細胞クローン株の特性 (抗原認識機構、サイトカイン産生能など) の解析、3)T 細胞クローン株を Dsg3^{-/-}マウス B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスへ移入し、抗 Dsg3 抗体産生や PV phenotype の発現による Dsg3 反応性 T 細胞株の病原性の確認、の 3 段階から構成される。さらに、個々の Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の特性と病原性の有無を比較する

ことで、病原性に関連する T 細胞クローン株の特性（例えば特定の T 細胞エトープやサイトカイン産生能）が抽出可能と考えられる。その結果、これらを標的とした PV に対する新しい治療法の開発につながる可能性がある。

本年度は、まずマウスの免疫と T 細胞の刺激に用いるマウス Dsg3 (mDsg3) のリコンビナント蛋白の作成と Dsg3^{-/-}マウスから mDsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立するための免疫培養条件の最適化を目的とした。

B. 研究方法

a) リコンビナント mDsg3 の作成

リコンビナント mDsg3 は 2 つの異なる発現系で作成した。まず、mDsg3 の細胞外ドメイン (rmDsg3) をバキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞の培養系で発現、精製した。さらに、mDsg3 を図 1 に示すように 10 以上のアミノ酸を重複するように 9 分割し、それぞれ maltose binding protein (MBP) との融合タンパクとして大腸菌で発現させ、アフィニティーを用いて精製した (mDsg3-1~mDsg3-9)。個々の精製リコンビナント蛋白は SDS ポリアクリルアミド電気泳動により分画し、クマシーブルー染色により純度を評価した。

b) Dsg3^{-/-}マウスに対する mDsg3 の免疫
Dsg3^{-/-}マウスを図 2 に示す 5 つの異なるスケジュール (①~⑤) で免疫した。Day 0 に、完全 Freund アジュバント (CFA) とともに 10 µg の rmDsg3 をマウスの両足底に免疫した。その後の免疫には rmDsg3 単独あるいは不完全 Freund アジュバント (IFA) との組み合わせを用いた。プロトコール終了後、脾臓、膝窩リンパ節、単径リンパ節をそれぞれ採取した。ひとつの免疫条件で少なくとも 3 匹のマウスを検討した。

c) In vitro での mDsg3 に対する特異的 T 細胞応答の検出

未免疫あるいは rmDsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスより採取した脾臓、膝窩リンパ節、単径リンパ節を RPMI1640 内ですりつぶし、単核球を分離した。脾細胞では、混入赤血球を除去するため ACK lysing buffer (BioWhittaker,

Walkersville, MD) により溶血処理を行った。培地として、1%の C56BL/6 血清を添加した RPMI1640 を初期培養に用い、以後は 10%仔牛胎児血清 (FBS) 添加 RPMI1640 を用いた。Day 0 に 24 穴プレートに単核球 (3×10^6 cell/ウェル) をまき、5 µg/ml の rmDsg3 を加えた。Day 10 に、凍結保存しておいた自己の脾細胞 (1×10^6 cell/ウェル) に X 線照射 (40Gy) し、rmDsg3 (5 µg/ml) とともに培養に加えた。サイトカインとして Day 3, 7, 10, 14, 17 に 1, 2, 5% T-STIM™ (Becton-Dickinson, Bedford, MA) を加えた。Day 21 に上記と同様に調整した rmDsg3 添加および非添加自己脾細胞 (10^5 cell/ウェル) を培養細胞 (10^4 cell/ウェル) とともに 96 穴丸底プレートにまき、72 時間培養した。細胞回収の 16 時間前に 0.5 µCi/ウェルの ³H-thymidine を加え、その取り込みを測定した。rmDsg3 特異的 T 細胞の反応は、rmDsg3 を添加しない培養に対する rmDsg3 を添加した培養の ³H-thymidine の取り込みの比

(Stimulation Index ; SI) として算出した。安定した rmDsg3 に対する特異的 T 細胞応答は SI が 3 を越え、かつ SE が 15% 未満とした。

C. 研究結果

a) リコンビナント rmDsg3 の作成

バキュロウイルスを用いて発現させた rmDsg3 および大腸菌で発現させた rmDsg3-1~9 はいずれも 1 mg 以上を精製することができた。SDS ポリアクリルアミド電気泳動後のクマシーブルー染色では、すべての精製蛋白の純度は 95% 以上と高く、昆虫細胞あるいは大腸菌由来成分の混入は明らかでなかった。ただし、図 1 に示す通り大腸菌で発現させた mDsg3 の細胞内領域を発現するリコンビナント mDsg3 断片 (rmDsg3-6~9) で degradation が強い傾向を認めた。Intact なリコンビナント断片がある程度残存していることから、T 細胞エトープ解析には使用可能と考えられた。

b) mDsg3 に対する特異的 T 細胞応答を誘導する免疫培養条件の検討

Dsg3^{-/-}マウスをアジュバントを用いて複数回免疫するスケジュール④と⑤はそれぞれ 3 匹中 1 匹、3 匹中 0 匹しか生存

せず、スケジュールを完全に達成できなかった。また、未免疫のナイーブ Dsg3^{-/-}マウスでは、in vitro で rmDsg3 に対する T 細胞の特異的応答を誘導できなかった。

Schedule①で免疫した Dsg3^{-/-}マウスでは、脾臓を用いた場合いずれの T-STIM™濃度でも安定して rmDsg3 に対する T 細胞の反応が得られた (図 3)。これらの反応はマウス MHC クラス II に対するモノクローナル抗体の添加により抑制された。ただし、膝窩リンパ節、単径リンパ節では rmDsg3 に対する T 細胞の反応は検出できなかった。

Schedule②で免疫した Dsg3^{-/-}マウスでは、脾臓の T-STIM™濃度 1%と膝窩リンパ節の T-STIM™濃度 1, 2%で特異的な T 細胞の反応が得られたが、単径リンパ節での反応は低値であった。

Schedule③で免疫した Dsg3^{-/-}マウスでは、rmDsg3 に対して反応性を示した個体があったが、データ間のばらつきが大きく安定した結果は得られなかった。

D. 考察

今回、Dsg3^{-/-}マウスを rmDsg3 で免疫し、さらに in vitro で繰り返し刺激することで mDsg3 に対する T 細胞応答を検出することができた。Dsg3^{-/-}マウスにとって mDsg3 は非自己であるため、当初は rmDsg3 に対する T 細胞の反応は容易に得られると想定していた。ただし、未免疫のナイーブ Dsg3^{-/-}マウスでは in vitro での 3 回の抗原刺激にも関わらず mDsg3 に対する T 細胞の反応は得られなかった。また、rmDsg3 で免疫後にさらに in vitro で刺激したにもかかわらず、Dsg3^{-/-}マウス由来 T 細胞では高い rmDsg3 特異的応答を誘導できなかった。その原因としては技術的な問題もあるが、Dsg3^{-/-}マウスにおける mDsg3 に対する低反応性が存在する可能性が考えられた。その理由として、Dsg3^{-/-}マウスにも Dsg3 とアミノ酸配列の相同性の高い Dsg1 が発現していること、表皮における免疫寛容は強く維持されていること、などが考えられた。今回いくつかの免疫培養条件で低いながらも mDsg3 に対する特異的な T 細胞の反応が得られた。今後これらスケジュールを用いて限界希釈法により mDsg3 特異的な T 細胞クローン株の樹立および解析

をめざす予定である。

E. 結論

Dsg3^{-/-}マウスから mDsg3 特異的な T 細胞の反応を誘導する免疫培養条件を確立することができた。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

G. 研究発表 (平成 12 年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M: Restricted T cell receptor β -chain usage by T cells autoreactive to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood* 99: 2499-2504, 2002.

2. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 63: 1156-1163, 2002

3. Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 101: 621-623, 2003

日本語論文

1) 桑名正隆: 膠原病の病態と自己抗原反応性 T 細胞. *アレルギー・免疫* 9: 40-46, 2002

2. 学会発表

1. 桑名正隆: リウマチ性疾患における病因的自己反応性 CD4⁺T 細胞と樹状細胞を用いたその人為的制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会(神戸). 2002. 4

2. 桑名正隆: 自己免疫疾患の発症機序と自己反応性 T 細胞を標的とした免疫療法. 第 32 回日本免疫学会総会(東京). 2002.12

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

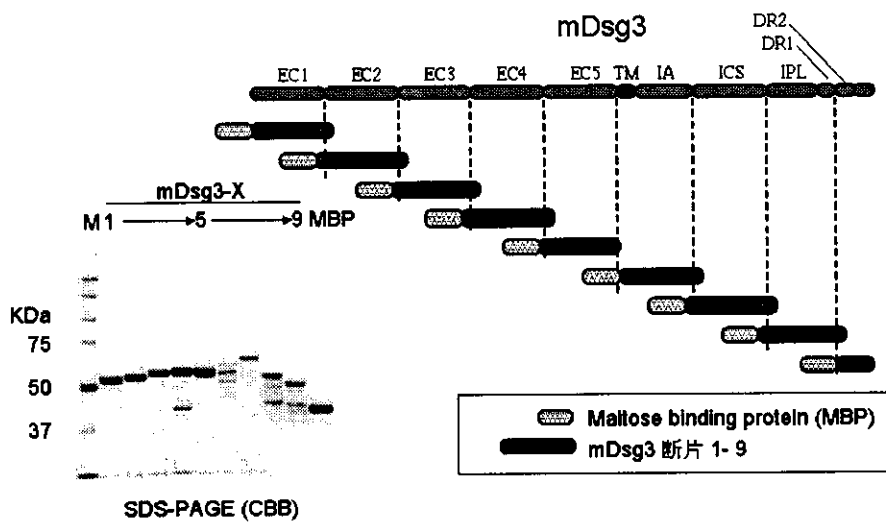


図 1. 大腸菌で作成したリコンビナント mDsg3 断片 (rmDsg3-1~9)

Schedule	Day 0	3	6	7	14	21	28
Naive	免疫せず						
①	↓ +CFA	↓	↓	✓			
②	↓ +CFA			✓			
③	↓ +CFA				✓		
④	↓ +CFA					↓ +IFA	✓
⑤	↓ +CFA		↓ +IFA		↓ +IFA	↓ +IFA	✓

↓ : 抗原刺激 (両足底に10 μgずつ注入)
 ✓ : 検体採取

図 2. Dsg3^{-/-}マウスに対する rmDsg3 の免疫スケジュール

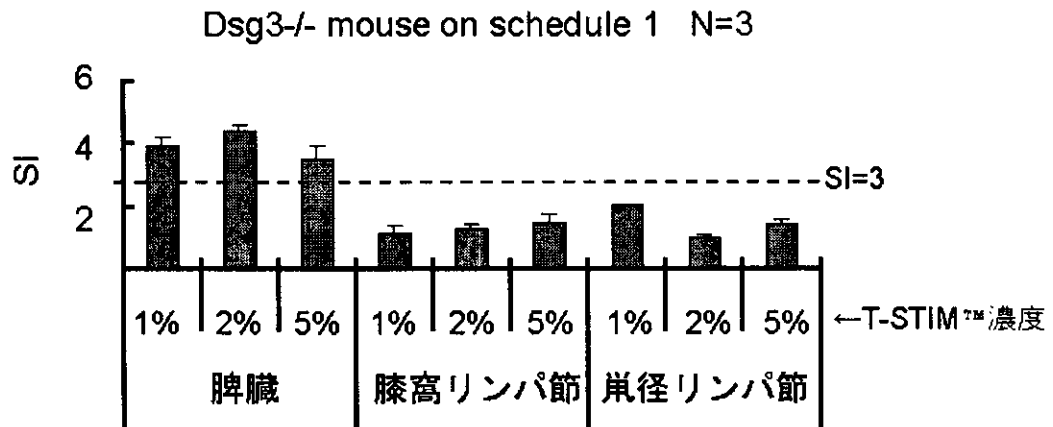


図3. スケジュール①で免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾臓、膝窩リンパ節、鼠径リンパ節由来 T 細胞における in vitro での rmDsg3 特異的増殖反応

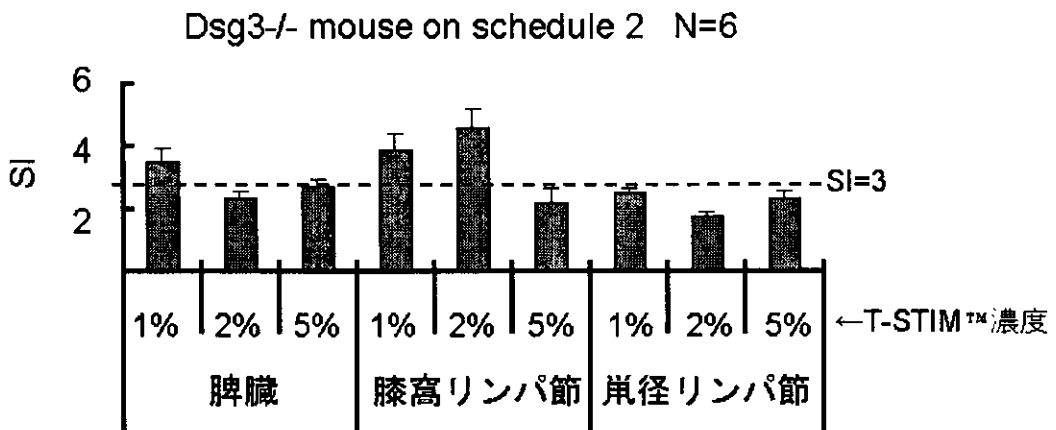


図4. スケジュール②で免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾臓、膝窩リンパ節、鼠径リンパ節由来 T 細胞における in vitro での rmDsg3 特異的増殖反応

天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価

分担研究者 西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 Pemphigus vulgaris(PV)の治療は、現在、副腎皮質ステロイドホルモンを中心として様々な免疫抑制薬を組み合わせで行われているが、経験に依存しているところが大きい。客観的に評価のできる、治療評価系の確立は囑望されている。先に我々が作成に成功した PV モデルマウスは、マウスの中で自己抗原であるデスマグレイン 3(Dsg3)に対する自己抗体の産生が6カ月以上に渡って持続的に認められ、PV に特徴的な病理所見を有する水疱、びらんの形成を有するマウスである。このマウスの画期的な点は、同一個体の臨床症状の観察と抗体価の測定で、様々な治療の効果を経時的にみることが出来ることにあり、治療評価系として有用であると予測される。今回我々はこの PV モデルマウスを用いて、現在ヒトの PV の治療に用いられている薬剤の治療効果の評価を開始した。Predonisolone (PSL)、Dexamethasone (DEX)、Cyclophosphamide (CPA) を使用した。DEX および CPA は効果がると考えられ、さらに効果を長期検討していく予定である。

共同研究者

高江雄二郎 慶應義塾大学医学部助手
天谷雅行 慶應義塾大学医学部専任講師

A. 研究目的

本研究の目的は、われわれの作成した PV モデルマウスを用いてヒトの PV の治療に用いられている薬剤の治療効果を評価することにある。

B. 研究方法

a) Dsg3^{-/-} マウス
日本 Central Institute for Experimental Animals 社より得られたマウスを使用した。

b) Rag2^{-/-} マウス
日本 Central Institute for Experimental Animals 社より得られたマウスを使用した。

c) PV モデルマウスの作成
Dsg3^{-/-}マウスを、10 μ g の精製したマウス rDsg3 蛋白を含む complete Freund's adjuvant にて免疫した。その 1 週後、同量の抗原蛋白をふくむ incomplete Freund's adjuvant にて免疫し、これを 2 回行い、その後、抗原蛋白の

みにて 5 回免疫を行った。抗 mDsg3 抗体産生の確認は、マウスケラチノサイトである PAM212cell を用いた Living keratinocyte staining で行った。抗原産生の確認後、Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を 1 匹あたり 2x10⁷ 個、Rag2^{-/-}マウスに経静脈的に移植した。

モデルマウスの発症の確認は、臨床症状すなわちびらん・脱毛の出現と体重減少、および rDsg3 蛋白を抗原として用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による抗 mDsg3 に対する抗体価にて行った。

d) 投薬
使用薬剤は、Predonisolone (PSL)、Dexamethasone (DEX)、Cyclophosphamide (CPA) の 3 種を用いた。投与経路は腹腔内投与で、投与量は以下の通りに行った。

- i) 実験 1
- PSL : 40 mg/kg/日
 - DEX : 4 mg/kg/日
 - CPA : 100 mg/kg/週, 20 mg/kg/週, 20 mg/kg/日

ii) 実験 2

- ・ DEX : 4 mg/kg/日
- ・ CPA : 100 mg/kg/週
- ・ DEX+CPA 併用 (DEX : 4 mg/kg/日 CPA : 100 mg/kg/日の併用)

尚、コントロール群への投薬は PBS を等量とした。

e) 治療評価

投薬開始より、週 1 回の採血と週 2 回の臨床症状の観察、即ち、びらんおよび脱毛の局在のスケッチと体重測定、デジタルカメラでの顔面側方 2 方向と下顎 1 方向の写真の記録を行った。

C. 研究結果

a) 実験 1

PSL、DEX および CPA の単独投与を行った。ELISA の結果を図 1 に示す。

1) PSL

PSL 投与マウスには臨床症状の改善を認めなかった (図 2)。ELISA 値は若干の低下を示したが、コントロールマウスも若干の低下を示しており、差は認められなかった。体重の増加は見られなかった。

2) DEX

DEX 投与マウスは臨床症状の改善をみた (図 2) が、ELISA 値は不変のマウスも存在した。体重の増加は認められなかった。

3) CPA

CPA 投与マウスは、臨床症状の改善はなかった (図 3) が、ELISA 値は投与量 100 mg/kg/w と 20 mg/kg/d で低下を認めた。体重の増加は認められなかった。

b) 実験 2

DEX、CPA 単独投与と DEX+CPA へいよう投与を行った。ELISA の結果を図 4 に示す。尚、死亡したマウスはその時点での抗体価が持続したと仮定した。

1) DEX および DEX+CPA

DEX 投与群と DEX+CPA 投与群は、投与開始後 22 日目時点でともに抗体価の減少を認めた。臨床症状ともにびらんの改善を認め、生存率も CPA 投与群と Control 群に比して高かった (図 5)。

2) CPA

CPA 投与群は抗体価の減少を認めず、臨床的にも改善は見られなかった。

D. 考察

今回、われわれは PV の治療評価系の確立を目指し、薬剤の治療反応性を評価した。治療評価に先立ち、次のような予測を立てた。即ち、ステロイドは抗炎症作用と免疫抑制作用をもつ薬剤であり、CPA は免疫抑制作用を持つ薬剤であることから、ステロイド投与群は臨床症状の改善は早くみられ、CPA は抗体価は下げるも臨床症状は遅れて改善してくると予測した。

結果、DEX 投与群は臨床症状の改善、即ちびらんの上皮化を認める個体が多く認められたが、CPA 投与群は抗体価を下げるも臨床症状の改善を認めなかった。実験 2 では CPA 投与群は抗体価が下がっていないが、これは生存率が低かったことから、抗体価は下がったことが評価できなかったからかもしれない。また、実験 2 での DEX と CPA の併用投与群では、抗体価の低下と臨床症状の改善を認めた。

以上まとめると、

- ・ DEX は臨床症状を改善させ抗体価を下げ、生存率を上げる。
- ・ CPA は抗体価を下げるが、臨床症状を改善させず、生存率には関与しない。
- ・ DEX と CPA を併用にても CPA の治療相乗効果は認めない。

これは、PV の治療において、ステロイドが中心になって行われていることを裏付けるものであり、PV モデルマウスは治療評価系として有用であると考えられる。

今回の実験では、1 ヶ月という比較的短期間での評価であったが、今後は長期にわたった臨床症状・抗体価の評価と、他の免疫抑制剤の効果の評価をしていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

治療前後のELISA Scoreの推移

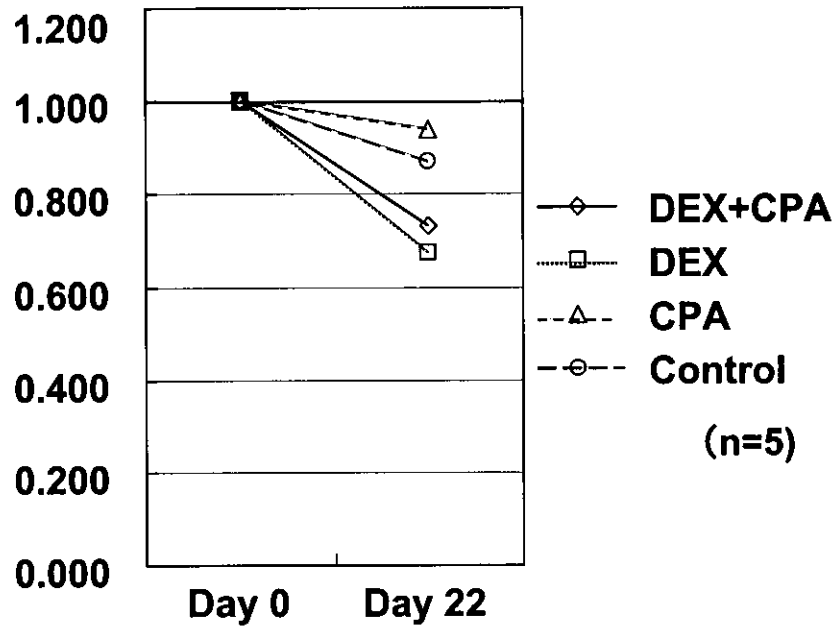


図1 PSL、DEX、CPA 投与群の ELISA score(Day 0 を 1.0 としたときの比) CPA は投与量が 100 mg/kg/週、20 mg/kg/日ともに抗体価が減少している。

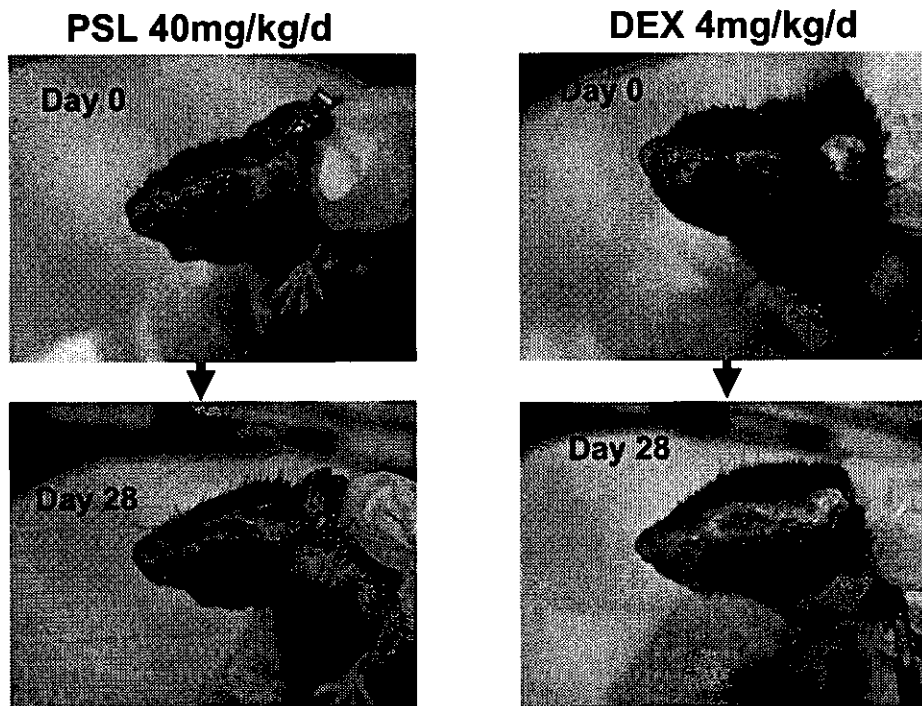


図2 PSL 40 mg/kg/日と DEX 4 mg/kg/日投与したマウスの臨床症状 PSL 投与したマウスは悪化しているが、DEX 投与したマウスはびらんの上皮化が見られる。

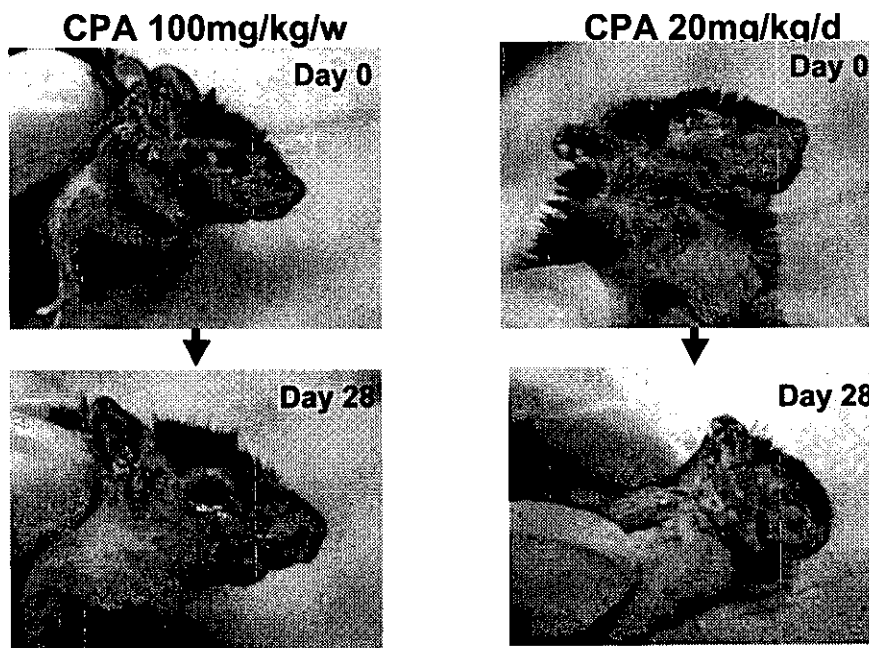


図3 CPA 100mg/kg/日と CPA 20mg/kg/日投与したマウスの臨床症状ともにびらんの改善は認めない。

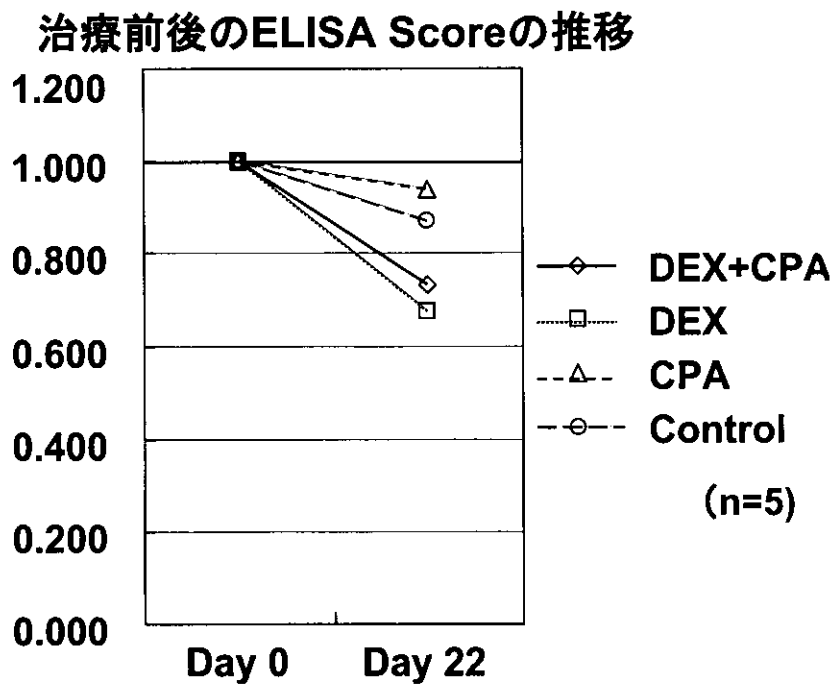


図4 DEX、CPA、DEX+CPA 投与群の ELISA Score(Day 0 を 1.0 とした時の比) DEX 投与群と DEX+CPA 投与群の抗体価の減少が見られる。

Survival Rate

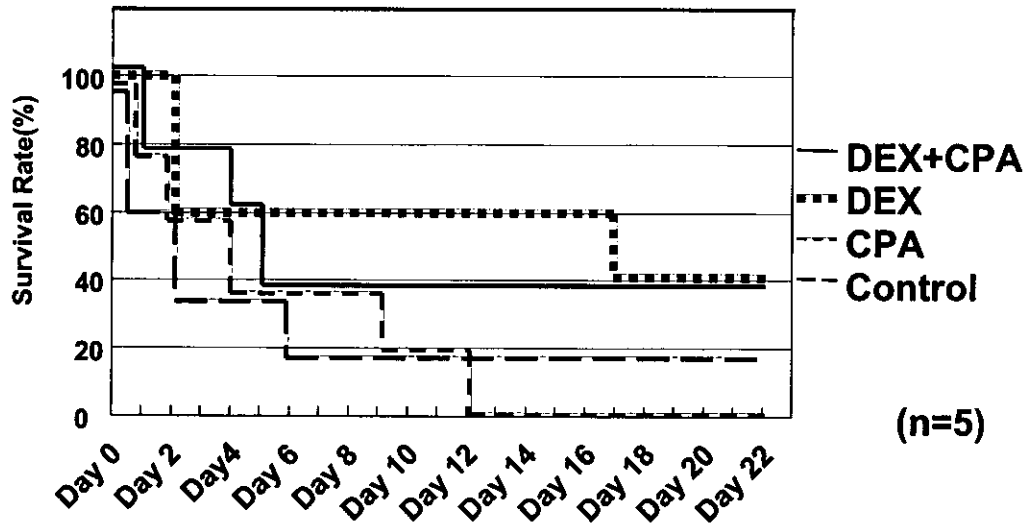


図5 DEX、CPA、DEX+CPA 投与群の Survival rate
DEX および DEX+CPA 投与群の生存率が高い

抗 CD40L 抗体療法による免疫抑制療法の評価

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

研究要旨 以前我々は、Dsg3^{-/-}マウス脾細胞移植による PV モデルマウスの作製法について報告した。近年、抗体産生において抗原特異的な B 細胞、T 細胞の受容体以外に CD40/CD40L などのアクセサリ分子間での相互作用の役割が注目されている。そこで本研究では、抗 CD40L 抗体による CD40/CD40L 相互作用阻害の予防的効果を PV モデルマウスを用いて検討した。抗 CD40L 抗体の予防的効果を検討するために、Dsg3^{-/-}マウス脾細胞移植 2 日前および移植後 0、2、4、7、14 日に一匹あたり 500 μ g の抗 CD40L 抗体をレシピエントマウスに腹腔内投与した(n=5)。コントロールとして精製 Hamster IgG を用い、各群ともに 66 日まで観察した。その結果、コントロール群では抗 Dsg3 抗体の産生および多数の抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞が認められたのに対し、抗 CD40L 抗体投与群では抗 Dsg3 抗体産生および抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞は著明に抑制された。以上のことから抗 CD40L 抗体を用いた CD40/CD40L 相互作用ブロックにより、レシピエントマウスにおける抗 Dsg3 抗体産生が抑制され、PV の表現型の出現が抑制されることが確認された。

共同研究者

青木三代 慶應義塾大学医学部皮膚科
東京農工大獣医学部大学院生

レシピエントマウス (Rag2^{-/-}) に腹腔内投与した。コントロールとして精製 Hamster IgG (CAPPEL 社) を使用し、各群 5 匹の計 10 匹について検討した。各群 2 匹に関しては、28 日で心採血後、脾臓、骨髄およびリンパ節を採取し ELISPOT 法により抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞数を測定した。各群 3 匹は 66 日まで観察し、投与終了後 52 日目まで抗 Dsg3 抗体産生が抑制されるかを ELISA 法により検討した。また各個体の口蓋粘膜上皮について HE 染色および DIF を行い、口腔内での水疱形成および自己抗体の表皮細胞間への沈着の有無を検討した。

A. 研究目的

尋常性天疱瘡(PV)は、デスモグレイン 3 (Dsg3)に対する自己抗体を原因とする自己免疫性水疱性疾患である。以前我々は、Dsg3^{-/-}マウス脾細胞移植による PV モデルマウスの作製法について報告した。近年、抗体産生において抗原特異的な B 細胞、T 細胞の受容体以外に CD40/CD40L などのアクセサリ分子間での相互作用の役割が注目されている。そこで本研究では、抗 CD40L 抗体による CD40/CD40L 相互作用の阻害の予防効果を PV モデルマウスにて検討した。

B. 研究方法

抗 CD40L 抗体の予防的効果を検討するために、500 μ g/mouse になるように調整した抗 CD40L 抗体を組み換えマウス Dsg3 で 8 回免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を移植する二日前、移植直前 2 時間前および移植後 2、4、7、14 日の計 6 回

C. 研究結果

移植後の血中抗 Dsg3 抗体価の推移を ELISA 法により測定したところ、移植 14 日後にコントロール群では抗 Dsg3 抗体産生を確認し、その後も抗 Dsg3 抗体産生は継続したのに対し、抗 CD40L 抗体投与群においては 66 日間の観察期間を通じて抗 Dsg3 抗体産生は著しく抑制されていた(図 1)。また、ELISPOT 法により移植後 28 日における脾臓、骨髄およびリンパ節にお

ける抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞数を検討したところ、コントロールマウスの脾臓およびリンパ節では抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞が多数検出されたが、抗 CD40L 抗体投与マウスにおいてはほとんど検出されなかった

(図 2)。さらに抗 CD40L 抗体投与マウスの口蓋粘膜上皮において上皮細胞間への IgG 抗体の沈着および病理組織学的に PV に特徴的な基底層直上での棘融解は認められなかった (図 3)。コントロール群では移植 2 週間後から口腔内水疱による摂食障害が原因と考えられる体重減少が認められた (図 4) が、抗 CD40L 抗体投与群においては体重減少だけでなく PV モデルマウスに特徴的な休止期脱毛も認められなかった (図 5)。

D. 考察

以上より、抗 CD40L 抗体の予防的投与において PV モデルマウス内の CD40/CD40L 相互作用を阻害することにより、抗 Dsg3 抗体産生が抑制されることが示唆された。

E. 結論

今回の研究において、PV モデルマウスは、抗体価の変動と表現型の観察により、

生きた状態で投与薬剤の効果を判定することが可能であった。このことから PV モデルマウスは自己免疫疾患の新しい治療薬を評価するための疾患モデルとして有用であることが示唆された。今後は発症後の治療投与の効果検討に用いることで、自己免疫疾患の治療評価モデルとしてさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

G. 研究発表 (平成 14 年度)

1. 学会発表

青木三代、角田和之、大田孝幸、岩崎利郎、田中茂、小安重夫、天谷雅行、西川武二
尋常性天疱瘡モデルマウスを用いた CD40/CD40L 相互作用阻害による予防および治療効果の検討 日本研究皮膚科学会第 27 回年次学術大会・総会、京都、2002. 08.

M Aoki, K Tsunoda, T Ota, T Iwasaki, S Tanaka, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa. Blockade of CD40/CD40L Interaction Has Therapeutic Benefits in Pemphigus Vulgaris Mouse Model. The society for Investigative Dermatology, 63rd annual ,meeting, 2002, 05, Los Angels