

図1. 予防投与後の各群における抗 Dsg3 抗体価の推移

コントロール群では移植14日以降に明らかな抗 Dsg3 抗体産生が認められた（破線、◆）が、抗 CD40L 抗体投与群においては観察期間を通じて抗体産生は抑制された（実線、○）。

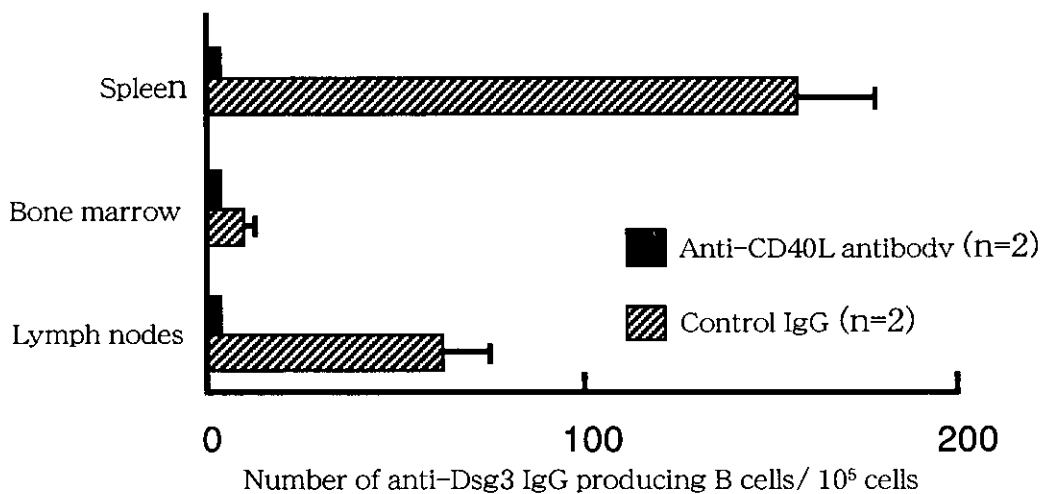


図2. 予防投与後の抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞数の測定 (Day 28)

コントロール群の脾臓およびリンパ節において抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞が多数検出された（斜線）のに対し、抗 CD40L 抗体投与群では抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞はほとんど検出されなかった（黒）。

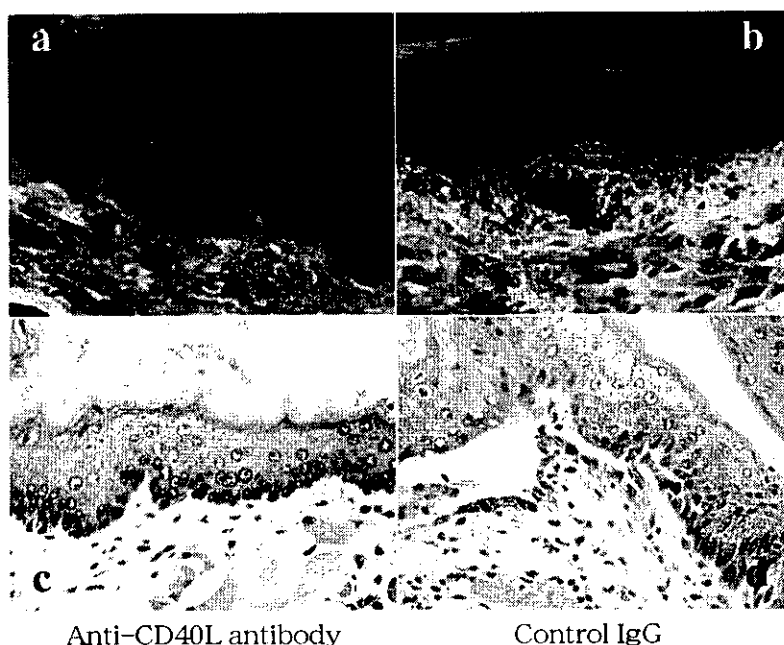


図3. 口腔粘膜上皮におけるIgG沈着および水疱形成 (Day 28)

コントロール群では口腔粘膜上皮細胞間へのIgGの沈着およびPVに特徴的な基底膜直上での水疱形成が認められた (b, d) が、抗CD40L抗体投与群においては明らかなIgGの沈着および水疱形成は認められなかった (a, c)。

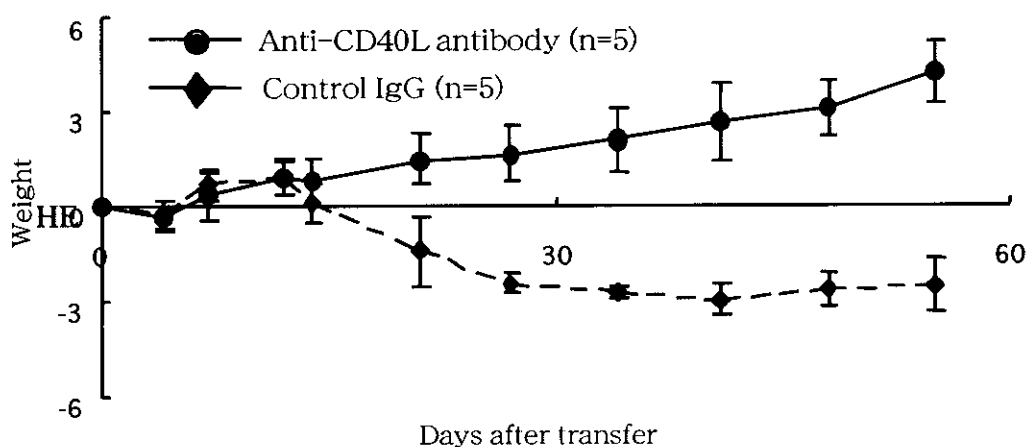


図4. 抗CD40L抗体投与による体重減少の抑制

コントロール群においては口腔内のびらんによる体重減少が認められた (破線、◆) が、抗CD40L抗体投与群では体重減少は明らかに抑制された (実線、●)。



Anti-CD40L antibody

Control IgG

図5. 抗 CD40L 抗体投与による表現型出現の抑制

コントロール群においては、PV モデルマウスに特徴的な体重減少および休止期脱毛が認められたのに対し、抗 CD40L 抗体投与群においてはこれらの PV モデルマウスに特徴的な表現型は認められなかった。(Day 66)。

## 免疫電顕法を用いた水疱形成誘導能を持つ抗デスマogleイン3 モノクローナル抗体のエピトープ解析

分担研究者 石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

**研究要旨** これまでに我々のグループはPVモデルマウスを用いて、複数の抗マウスデスマogleイン3 (Dsg3) モノクローナル抗体 (MAb) の生成に成功している。なかでもAK23は、そのハイブリドーマ細胞をRag2<sup>-/-</sup>免疫不全マウス腹腔内に接種することで水疱形成を誘導するMAbである。AK23はDsg3細胞外領域のN末端部分をエピトープとして認識することが明かにされている。本研究では、AK23接種マウスの超微形態の観察と、後包埋免疫電顕法を用いたAK23結合部位の生体内での局在部位を解析することで、AK23の標的エピトープのマウス表皮細胞での微細局在の解析をおこなった。その結果、AK23接種マウスは表皮基底細胞の墓石状配列、半割デスマゾーム (Half-DM) の形成などの電顕的にPVに特徴的な表現型を誘導することが認められた。また免疫電顕からAK23は、非棘融解部ではデスマゾーム (DM) の接着板間に、棘融解部ではHalf-DMの細胞外領域に特異的な局在を認めた。さらに、AK23はHalf-DMの免疫二重染色法から、DM裏打ち蛋白のDesmoplakinおよびケラチン線維と共に局在した。DM内での超微局在部位の統計学的解析から、AK23はDMの接着板間（幅約30nm）の中央に存在する細胞間結合層付近に局在のピークを、Half-DMの細胞外領域では細胞膜から16nm付近に局在のピークを認めた。すなわち、AK23は水疱形成誘導能を有したMAbであり、その病原エピトープは、DM接着板間の中央に局在していると考えられた。以上から、向かい合うDsg3分子は細胞間結合層においてN末端部分でわずかに重なり合い結合していると考えられ、この部位にIgGが結合することで、Dsg3分子間の接着阻害が引き起こされ、ケラチン退縮を伴わずに棘融解が誘導されると示唆された。

### 研究協力者

清水 篤 慶應義塾大学医学部皮膚科大学  
院医学研究科専攻生

### A. 研究目的

これまでに我々のグループは、ヒト尋常性天疱瘡 (PV) とよく似た表現型を実験的に誘導するPVモデルマウスの作製に成功している。また、この実験モデルを用いて、幾つかの抗マウスデスマogleイン3

(Dsg3) モノクローナル抗体 (MAb) を生成している。なかでもAK23は、そのハイブリドーマ細胞をRag2<sup>-/-</sup>免疫不全マウスの腹腔内に接種することで、体内で産製された抗体により水疱形成が誘導される。本研究の目的は、水疱形成誘導能をもつ抗Dsg3MAbであるAK23を接種したマウス

の超微細形態的变化を観察し、免疫電顕的手法を用いて、デスマゾーム (DM) および半割デスマゾーム (Half-DM) に局在するAK23結合部位の超微細局在を解析することで、AK23の認識する水疱誘導に関与するエピトープの生体内での局在部位を明らかにし、棘融解発生のメカニズムを解明することにある。

### B. 研究方法

電顕および免疫電顕用試料はAK23腹腔内接種マウスの口腔粘膜より採取した。

電顕：採取した試料をそれぞれ<2mm<sup>3</sup>に細切し、2%グルタルアルデヒド、1%オスミウム酸にて二重固定、エタノールによる脱水、置換を行い、Epon 812に包埋した。厚さ80nmの超薄切片を作製し、酢酸

ウラニル、クエン酸鉛による電子染色後、透過型電子顕微鏡(JEOL1200EX II)により観察を行った。

**免疫電顕**：採取した試料は、 $<1\text{mm}^3$ に細切、凍結固定装置(KF80)を用いて、 $-190^\circ\text{C}$ に冷却した液体プロパンにて急速凍結固定を行った。固定した試料は、凍結置換装置(REICHERT AFS)にて、 $-80^\circ\text{C}$ に冷却したメタノールにより48時間凍結置換し、Lowicryl K11Mに $-60^\circ\text{C}$ 下で48時間、室温下で48時間のUV重合包埋を行った。超薄切片を作成し、免疫染色、電子染色の後、透過型電子顕微鏡により観察した。

**免疫染色法**：一次抗体として rabbit anti-mouse IgG (H+L) (1:320, American Qualex Antibodies, California, USA)を、 $4^\circ\text{C}$ 下で一晩、二次抗体として、5nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG (1:40, Amersham, Olen, Belgium)を、室温下で2時間反応させた。

**免疫二重染色法**：本染色法は M. Bendayan ら (1982) の方法に若干改良を加え施行した。ニッケルグリット上の超薄切片が完全に露出している面をA面とし、反対面、グリットのバーを切片上に認める面をB面とする。A面を、一次抗体として rabbit anti-Desmoplakin (1:40, Research diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA)を、 $4^\circ\text{C}$ 下で一晩、二次抗体として、5nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG (1:40)を室温下で2時間反応させた。次に、B面を、一次抗体として rabbit anti-mouse IgG (H+L) (1:320)にて、 $4^\circ\text{C}$ 下で一晩、二次抗体として、15nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG (1:40)を、室温下で2時間反応させた。電子染色後、超薄切片に炭素蒸着を施行した。

**統計解析**：DM内に局在する金粒子の垂直方向の分布の解析を、統計学的に行った。DMは隣接する二つの細胞間に形成される事から、基準線をDMの中心にとり、基準線から金粒子の中心までの距離(a)を測定、さらに向かい合う細胞膜間の距離(b)を測定(図1. A)し、aをbに対する相対距離( $a/b \times 100$ )に変換したものを、145個計測しヒストグラム化した。また、Half-DM上に局在する金粒子の分布の解析も施行した。Half-DMの細胞膜を基準線とし、基準線から金粒子の中心までの距離を

80個計測(図1. B)し、それらの分布をヒストグラム化した。

### C. 研究結果

**電顕所見**：口腔粘膜において基底細胞直上での棘融解像を認める。棘融解を呈する基底細胞は、基底膜によって真皮との接合を保っており、PVに特徴的な墓石状配列を認め、またDMが半割した像であるHalf-DMを多数認める(図2. A)。拡大像から、Half-DMは細胞質内領域にトノフィラメントの付着を認める(図2. B)。

**免疫電顕所見**：口腔粘膜の免疫電顕から、DM上にIgGの特異的な局在を認める(図3. A, B)。強拡大像から、金粒子はDMの向かい合う接着板の間の細胞外領域に特異的な局在を認め、DM以外の細胞膜上および細胞質内にIgGの特異的な局在は認めない(図3. C)。一部のDMでは、IgGが細胞間結合層(DML)に沿って局在している像を認めた(図3. D)。さらに、棘融解部の免疫電顕像では、Half-DMの細胞外領域において、金粒子の特異的な局在を認めた。(図4. A, B)

**免疫二重染色**：IgGとDesmoplakinの二重染色から、Half-DMの細胞外領域にIgGの特異的な局在を、接着板とケラチン線維の付着部にはDesmoplakinの局在をそれぞれ認めた(図4. C)。

**統計解析**：垂直方向の金粒子の分布を解析したヒストグラム(図5)から、金粒子の局在はそのほとんどがDMの細胞外領域に局在していた。また、細胞質内に金粒子はほとんど認められなかった。さらにその分布パターンは、40%以上の金粒子が、DMの中心であるDMLに認めた。すなわち、AK23のエピトープはDML上にあることが推定された。

次にHalf-DM上の金粒子の局在を示すヒストグラム(図6)から、ほとんどの金粒子の局在が細胞外領域に認められた。金粒子の出現頻度は、0~16nmの細胞外領域間でなだらかな増加を認め、分布のピークは0および16nmの部分にそれぞれ認められ、最大値は16nmの領域に認めた。またHalf-DMの細胞膜から20nm以上離れた領域では、金粒子の出現頻度は急峻な減少を認めた。

## D. 考察

電顕的観察から、AK23 が、PV に特徴的な表現型、すなわち、基底細胞直上での棘融解および墓石状配列、Half-DM 構造を誘導する病原性 MAbs であることが形態学的に示された。

次に、免疫電顕から、AK23 は DM の細胞外領域に特異的に結合し、Half-DM の細胞外領域では、DM とケラチン線維とを結合する Desmoplakin を細胞質内に伴っていることから、AK23 の認識する病原エピトープは DM の細胞外領域に存在しており、DM はケラチンの剥離と退縮といった形態的な構造の変化をきたさずに棘融解が引き起こされている可能性が高いと考えられた。すなわち、培養系で観察されてきた自己抗体結合に伴う Dsg3 の枯渇、ケラチン線維の退縮は棘融解の主要メカニズムではなく、病原エピトープへの抗体の結合による、Dsg3 分子間の直接的な接着障害が棘融解の主要メカニズムである可能性が高いことが示唆された。

さらに、AK23 の病原エピトープは Dsg3 分子の N 末端を認識することから、AK23 の結合部位は、DM 内での Dsg3 分子細胞外領域 N 末端の局在を示している。つまり、AK23 は①DM の細胞外領域において、DML 上に分布のピークを認めること、②Half-DM の細胞外領域の細胞膜から細胞外へおよそ 16nm 付近に分布のピークを認め、20nm 以上離れた領域ではほとんど検出されないこと、③DM 細胞外領域の幅はおよそ 30nm 程であることなどから、向かい合う Dsg3 分子は、DM 細胞外領域の DML 上で、N 末端部分をわずかに重ね合いながら接着する、いわゆる Adhesion zipper 構造をとっている可能性が高いと推測される。

## E. 結論

AK23 により誘導された水疱は、電顕形態学的に PV の病態を示した。また、Dsg3 分子の細胞外領域の N 末端は DM の DML 上に存在し、隣り合う細胞上の向かい合う Dsg3 分子は DM 内で互いにわずかに重なり合いながら接着する、いわゆる Adhesion zipper 構造をとっている可能性が高いと考えられる。また、この N 末端に局在する病原エピトープへ AK23 が結合し、Dsg3 分子間に直接的な接着障害を引き起こすこと

で棘融解が引き起こされていると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

A Shimizu, A Ishiko, T Ota, K Tsunoda, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa. Pemphigus vulgaris (PV) mouse model has an ultrastructural phenotype parallel to human-PV. Arch Dermatol Res 294:318-323, 2002.

### 学会発表

1) A Ishiko, A Shimizu, T Ota, K Tsunoda, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa.

Immunoelectron microscopic analysis of pemphigus vulgaris mouse model. 4<sup>th</sup> joint meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research and the Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology, Limoges, France, 2002, 06.

2) A Shimizu, A Ishiko, T Ota, K Tsunoda, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa.

A pathogenic anti-Dsg3 monoclonal antibody binds along the dense mid-line of desmosomes. 4<sup>th</sup> joint meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research and the Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology, Limoges, France, 2002, 06.

3) 清水 篤, 石河 晃, 角田和之, 天谷雅行, 西川武二. 水疱形成誘導能を持つ抗デスマグレイン 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, 京都, 2002, 08.

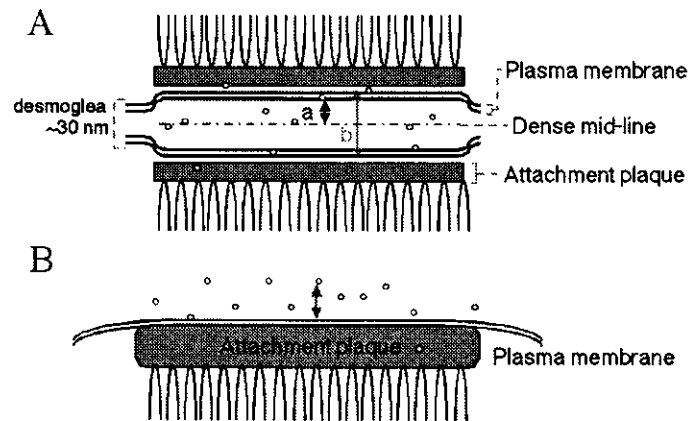


図1. (A) Desmosome における金粒子の垂直方向の分布計測方法. (B) Half-desmosome に分布している金粒子の垂直方向の分布計測方法.

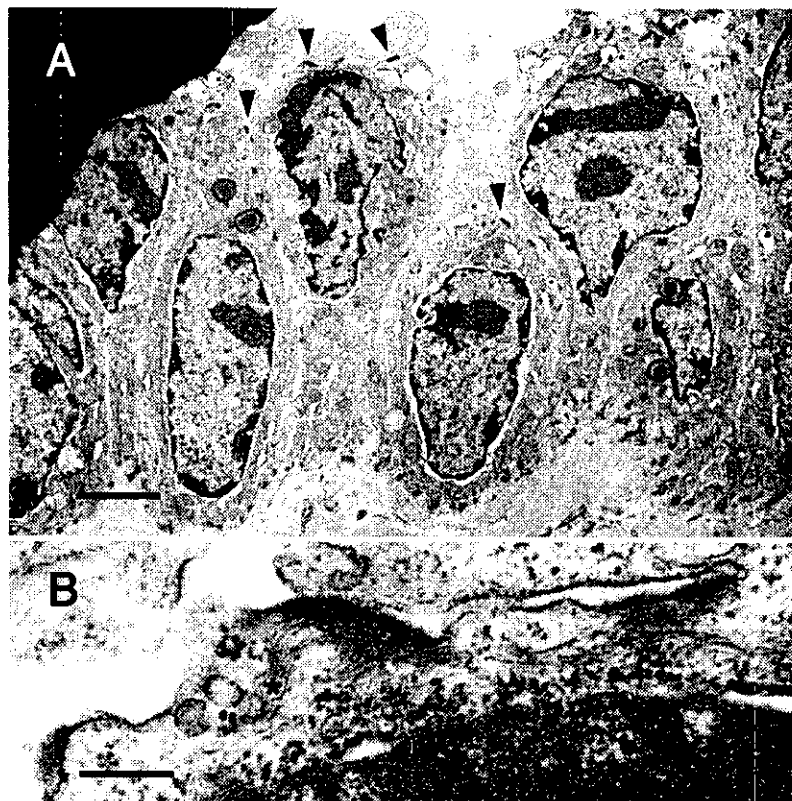


図2. AK23 腹腔内接種マウスの口腔粘膜の透過型電顕像. (A) 口腔粘膜上皮, 基底層において認められた棘融解像. 基底細胞は基底膜により真皮との結合を保持しており, PV に特徴的な墓石状配列を認める. 基底細胞には棘融解によって多数の半割デスモゾーム (矢尻) を認める. (Bar:  $1\mu\text{m}$ ) (B) 半割デスモゾームにはトノフィラメント (\*) の付着を認める. (Bar:  $200\text{nm}$ )

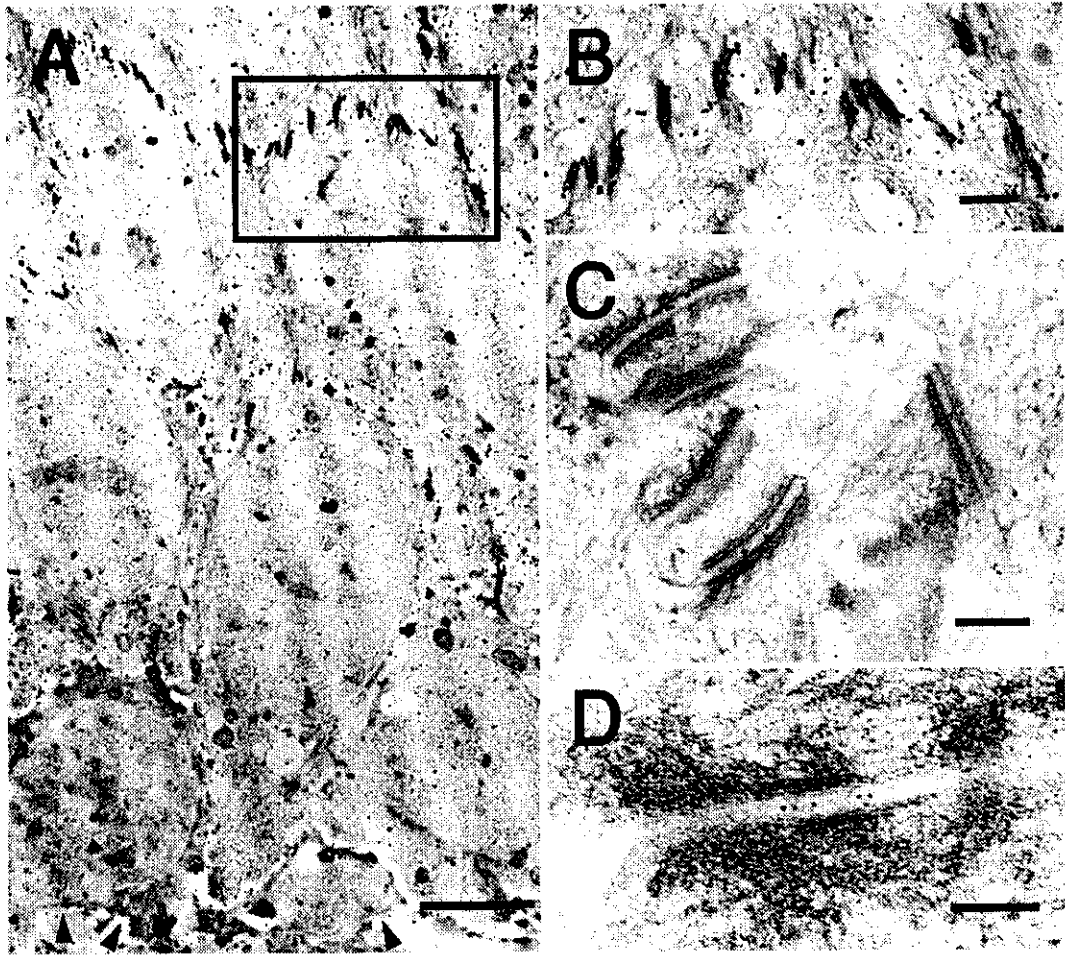


図 3. AK23 接種マウス口腔粘膜上皮の免疫電顕像. (A) ほとんどすべてのデ  
 スモゾームに AK23 の結合を認める. デスマゾーム以外の細胞膜や細胞質内に  
 特異的な結合は認められない. 矢尻, 基底膜. (Bar : 1  $\mu$ m) (B) A の枠の部  
 分の拡大像. AK23 がデスマゾームに特異的に結合しているのが認められる.  
 (Bar : 500nm) (C) デスマゾームに結合している AK23 は, 向かい合うアタ  
 ッチメントプラークの間の細胞外領域に特異的に認められる. (Bar : 200nm)  
 (D) デスマゾーム細胞外領域の細胞間結合層に沿うように AK23 の結合を認  
 める. (Bar : 100nm)



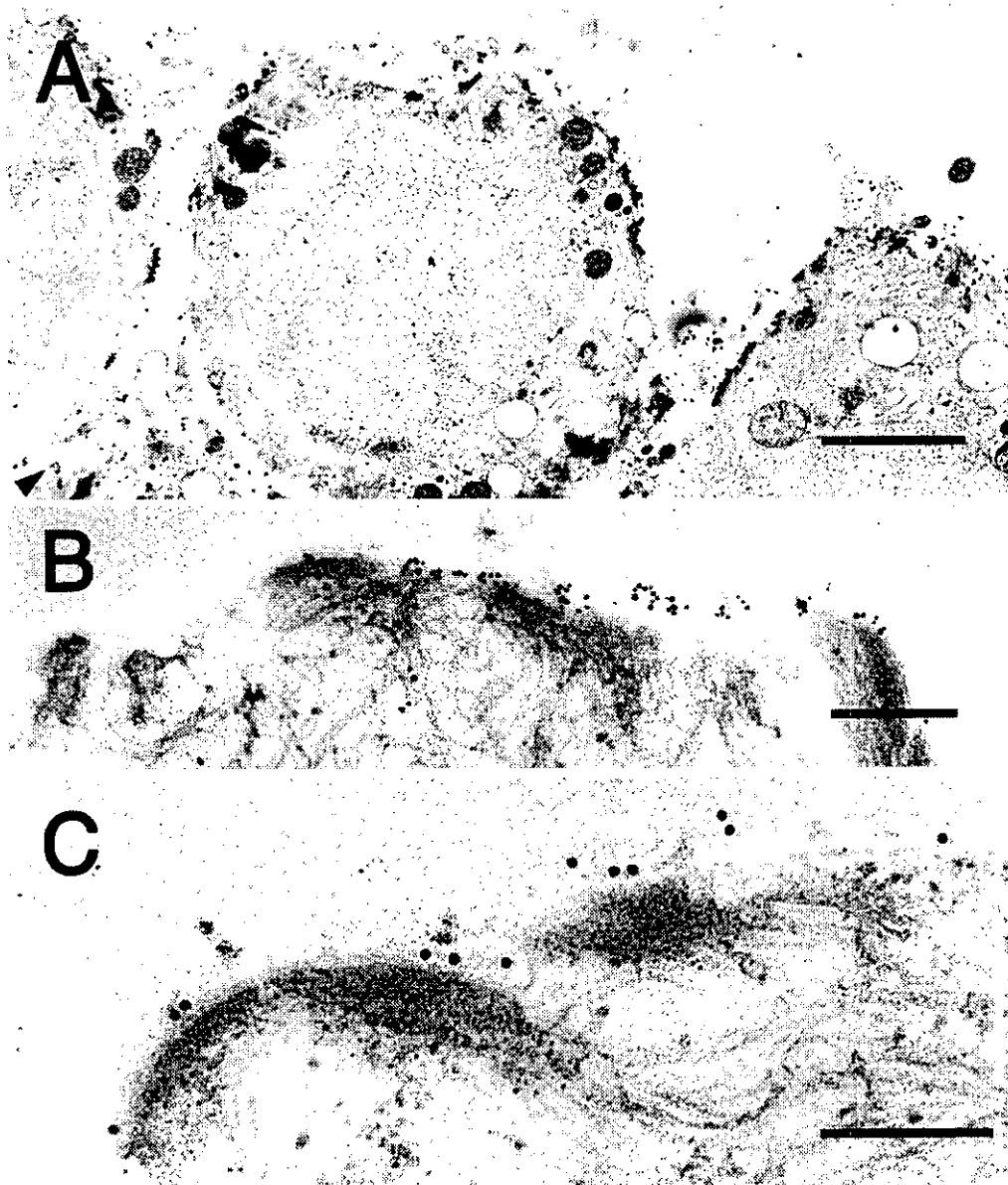


図4. AK23 接種マウス口腔粘膜上皮に認められた棘融解部の免疫電顕像. (A) 棘融解をきたした基底細胞に認められる多数の半割デスモゾームに結合する AK23. 矢尻, 基底膜. (Bar : 2  $\mu$ m) (B) 半割デスモゾームの細胞外領域に結合する多数の AK23. (Bar : 200nm) (C) 半割デスモゾームの免疫二重染色像. 半割デスモゾームの細胞質側のケラチン線維付着部に局在を認める Desmoplakin (5nm 金コロイド) と半割デスモゾームの細胞外領域に結合を認める AK23 (15nm 金コロイド). (Bar : 100nm)

## Vertical distribution in the desmosome

(relative distance : a/b ×100)

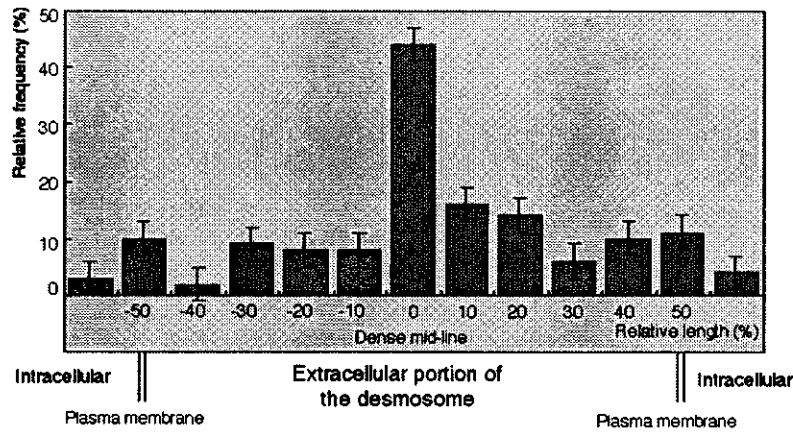


図 5. AK23 のデスモゾーム内での結合部位の分布を示すヒストグラム. そのほとんどは, デスモゾームの細胞外領域に分布している. 分布の最大値は 0 で示される細胞間結合層 (Dense mid-line) に認められ, 全標識のおよそ 40%以上が単一のピークを形成する.

## Vertical distribution in the half-desmosome

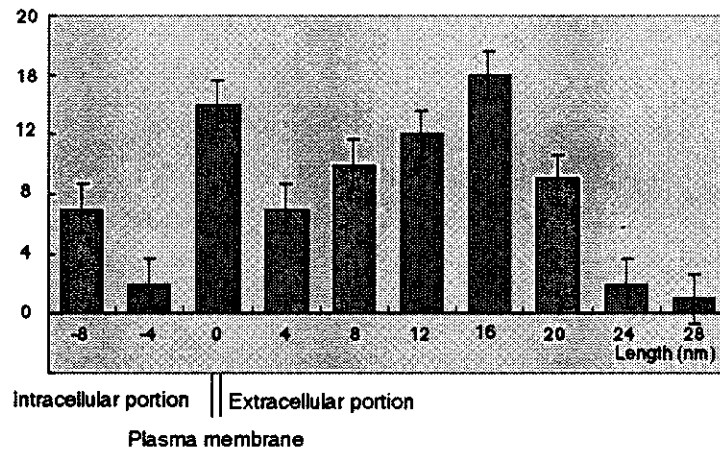


図 6. 半割デスモゾームに結合する AK23 の細胞膜からの距離の分布を示したヒストグラム. ほとんどの AK23 は半割デスモゾームの細胞外領域に分布している. 細胞膜からの距離が 0, 16nm の部分で出現頻度のピークを認め, 16nm の部分に最大値を認める. AK23 の出現頻度は 0~16nm の間でなだらかな増加を認め, 細胞膜から 16nm 以上離れると, 出現頻度は急峻な減少を認める.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスにおける抗原 3 次元エピトープの解析

分担研究者 西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授

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

共同研究者

安西秀美 慶應義塾大学医学部助手  
天谷雅行 慶應義塾大学医学部専任講師

Dsg3 蛋白による免疫を行わずに、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植した。マウス血清中の抗 mDsg3 抗体産生を ELISA にて確認した。

A. 研究目的

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

d) スワッピング分子の作成

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

B. 研究方法

a) Dsg3<sup>-/-</sup>マウス

米国 Jackson laboratory より得られたマウスを使用した。

b) Rag2<sup>-/-</sup>マウス

米国 Taconic 社より購入したマウスを使用した。

c) モデルマウス

従来 of 如く免疫した脾細胞を用いたもの (Imm)、および免疫しない脾細胞を用いたもの (Non-imm) の二種のモデルマウスを使用した。Imm は、すでに報告したように Dsg3<sup>-/-</sup>マウスに、バキュロウイルスの発現系を用いて作成した組み換え蛋白である Dsg3 (細胞外領域全長を含む) を免疫し、抗 Dsg3 抗体価の上昇を確認したのち、その脾細胞を免疫不全マウスである Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植した。Non-imm は組み換え

e) Competition ELISA

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

#### f) スワッピング分子による免疫

4種のスワッピング分子のうち、組み換え Dsg3 蛋白の細胞外領域のN末端3分の1およびC末端3分の1を各々含む2種のスワッピング分子を用いて、c-Immと同様に Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを免疫し(N1/3imm、C1/3imm)、その脾細胞を Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植し、両スワッピング分子間での表現型、抗体価を比較した。

### C. 研究結果

mDsg3 の細胞外領域のN末側 1/3、2/3、C末側 1/3、2/3 を有した分子に対する反応を、Imm モデルマウス 28 例、Non-imm モデルマウス 32 例の血清を用いて検討した。吸収率 50%以上を有意な値とした場合、Imm モデルマウスでは、mDsg3 のC末アミノ酸 163-614 が 27/28 例(96.4%)で有意な吸収率を示し、平均吸収率は 80.3%であった。Non-imm モデルマウスでも、mDsg3 のC末アミノ酸 163-614 が 24/32 例(75.0%)で有意な吸収率を示し、平均吸収率は 69.6%であった。さらに Non-imm モデルマウスでは、N末アミノ酸 1-162、1-404 が各々 4/32 例(12.5%)、19/32 例(59.4%)で有意な吸収率を示し、Imm モデルマウスと有意差を認めた(t 検定 各々 p= 0.0004、0.0002)。

スワッピング分子で免疫した群については、N1/3imm、C1/3imm 共にびらん、脱毛などの天疱瘡の表現型が観察され(15点満点表示)、抗 Dsg3 抗体価の上昇が認められた。C1/3imm の方が、表現型、抗体価とも若干高い傾向にあった。

### D. 考察

すでにわれわれがヒト PV 患者血清を用いて同様の検討をした結果では、カドヘリン型接着分子の細胞間接着に不可欠といわれるN末 1/3 アミノ酸の吸収率が有意に高かった。一方、モデルマウスではC末 2/3 アミノ酸の吸収率が有意に高かったが、これは、デスマグレインのアイソタイプ(Dsg1, Dsg2, Dsg3)間の相同性がN末で最も高く、C末にいくほど相同性が低くなることに関連していると考えられる。すなわち、移植された Dsg3<sup>-/-</sup>リ

ンパ球は、Dsg1 に対しては免疫寛容が成立しているため、宿主の Rag2<sup>-/-</sup>マウス内在性 Dsg1 とより相同性の低い Dsg3 細胞外ドメインのよりC末側に抗体産生が起こり得る。ヒトにおいて、アイソタイプ間の相同性が高く、かつ主要エピトープと考えられるN末 1/3 アミノ酸に高率に自己抗体が産生される機序は、今後解明されるべき課題と考えられた。

また、スワッピング分子による免疫の結果からは、分子間接着に直接関与しないC末側に対する抗体にも、病原性があることが示唆された。現在、同抗体のエピトープを、Competition ELISA および IP-IB 法により解析中である。

### E. 結論

本年度の検討により、我々の作成した PV モデルマウスでは、ヒト PV 患者と異なったエピトープに対する自己抗体産生が認められた。この相違の機序については更なる検討が必要である。

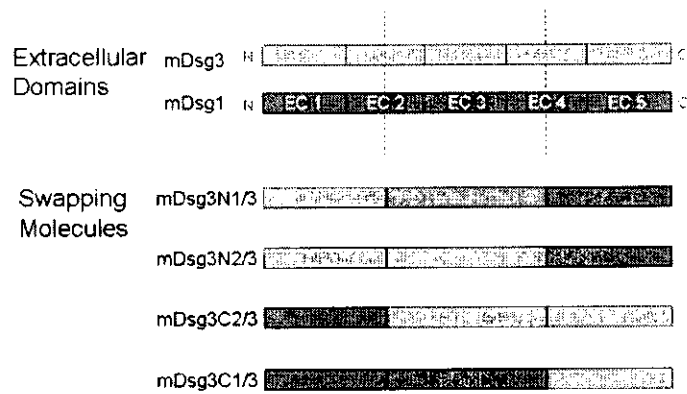


図1. エピトープ解析に用いたマウス Dsg3/Dsg1 スワッピング分子の構造

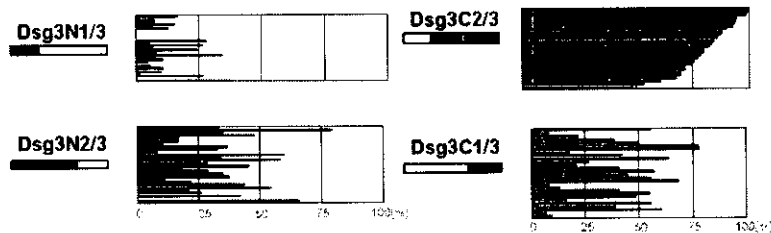


図2 Dsg3 により免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>脾細胞を移植して作成した天疱瘡モデルマウス (28 例) における抗 Dsg3 抗体のエピトープ解析

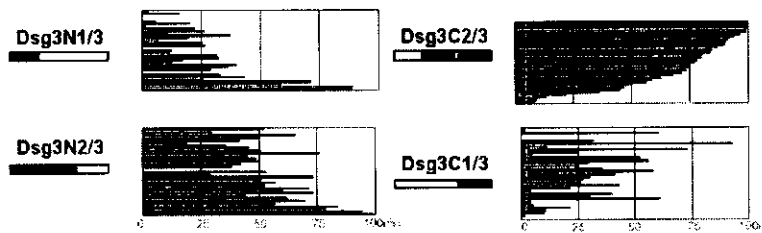
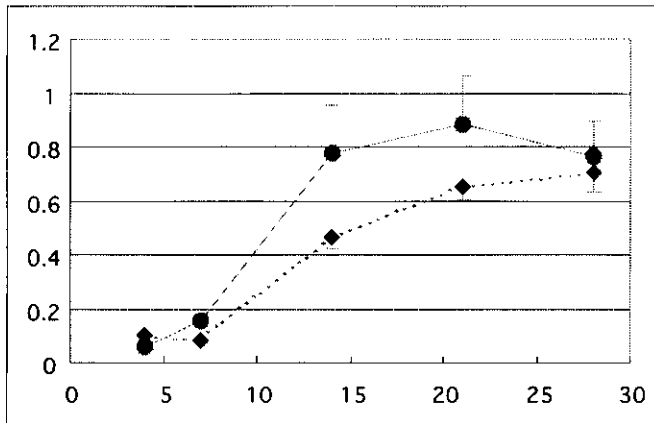


図3. ナイーブ Dsg3<sup>-/-</sup>脾細胞を移植して作成した天疱瘡モデルマウス (32 例) における抗 Dsg3 抗体のエピトープ解析



抗 Dsg3 抗体価(X 軸:日数、Y 軸 : ELISA OD 値)

図 5. Dsg3 細胞外領域 N 末 1/3 および C 末 1/3 の領域に免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>マウス脾細胞を移植したマウスの抗 Dsg3 抗体価の推移。

点線 : Dsg3N1/3 の領域にて免疫した脾細胞を移植した群

実線 : Dsg3C1/3 の領域にて免疫した脾細胞を移植した群

## 天疱瘡自己抗体の *in vitro* 病的活性測定法の開発

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

**研究要旨** 尋常性天疱瘡患者血中にはデスモグレイン3 (Dsg3)に対する抗体が存在し、その抗体が直接病的活性を持ち、水疱形成を誘導することが明らかにされている。天疱瘡の病勢の評価は、現在のところ、蛍光抗体法間接法や組換え Dsg3 を用いた ELISA 法で測定された抗体価が使用されている。しかしながら、これらの検査法は、病的活性を検出する方法ではなく、かならずしも、重症度を反映しない。本研究の目的は、培養細胞を用いて、天疱瘡患者血清中に存在する自己抗体の病的活性を測定する *in vitro* の検査法を開発することである。デスモグレインは、お互いのアイソフォームの細胞間接着機能を補いつているため、本研究においては、Dsg1 と Dsg3 は強く発現しているが Dsg2 の発現の低い正常ヒト表皮由来の培養ケラチノサイトを使用した。また、Dsg1 を特異的に分解するために、Exfoliative Toxin A で処理をした。各種抗体、血清で処理をした後、ピペットにより細胞シートに機械的ストレスを加えた後、分裂した細胞シート片の数を比較した。病的活性を持つ抗 Dsg3 抗体、AK23、病的活性を持たない抗 Dsg3 抗体 AK18、Dsg3 に対する反応性を示さない抗体 AK7 を比較すると、AK23 で処理をした細胞シートのみばらばらに分裂し、抗 Dsg3 抗体のなかでも病的活性を持つ抗体のみを検出できることが明らかになった。また、尋常性天疱瘡の患者3名の活動期と寛解期の血清を比較すると、活動期の血清で処理した細胞シートは、寛解期で処理した細胞シートよりも約2.1 から 18.5 倍多くの細胞片に分裂していた。以上の結果により、この検査法は、天疱瘡自己抗体の病的活性を測定する簡便で客観的な測定法となると考えられ、天疱瘡の水疱形成、Dsg を介する細胞間接着のメカニズムを解明する手段となりうると考えられた。

### 共同研究者

石井 健 東京電力病院

慶應義塾大学医学部皮膚科

検査法は、病的活性を検出する方法ではなく、かならずしも、重症度を反映しない。

本研究の目的は、培養細胞を用いて、天疱瘡患者血清中に存在する自己抗体の病的活性を測定する *in vitro* の検査法を開発することである。

### A. 研究目的

尋常性天疱瘡は、抗体を介する自己免疫性水疱疾患であり、その自己抗原はカドヘリン型細胞接着因子であるデスモグレイン3 (Dsg3)である。また、その自己抗体が直接病的活性を持ち、水疱形成を誘導することが明らかにされている。

天疱瘡は、難治性疾患であり、治療上、病勢を把握することが非常に重要である。病勢の評価は、現在のところ、臨床症状のほか、蛍光抗体法間接法や組換え Dsg3 を用いた ELISA 法で測定された抗体価が使用されている。しかしながら、これらの

### B. 研究方法

#### Dissociation Assay

デスモグレイン3 とデスモグレイン1 を主に発現している正常ヒト表皮由来の培養ケラチノサイトを使用した (図1)。培養ケラチノサイトをコンフルエントの状態まで培養した後、カルシウムを含む培養液に換えることにより、細胞間接着能を誘導し、細胞をシートの状態にする。各種血清、抗

体を加え、一晚静置する。実験する一時間前に、exfoliative toxin A を加えることによりデスマグレイン 1 を分解する。Dispase を用いて細胞シートを dish より剥離し、さらに、ピペッティングにより機械的ストレスを与えることにより、細胞シートがばらばらに分裂するかしないかで細胞間接着能が阻害されているかを測定する。

### C.&D. 研究結果と考察

1)

この検査法が、抗デスマグレイン 3 抗体のうち、病的活性を持つ抗体のみを検出することができるかどうか検討した。モノクローナル抗 Dsg3 抗体 AK7,AK18,AK23 の 3 種類を用いた。AK7 は、Dsg3ELISA で陰性を示し、ヒト Dsg3 への反応性を示さない抗体、AK18 は、Dsg3ELISA 陽性であるが、新生仔マウスに抗体を投与しても病的活性を示さなかった抗体である。また、AK23 は Dsg3-ELISA 陽性で、しかも、病的活性をもつ抗体である。抗体を加えない群では、細胞シートはばらばらにならず。AK23 を加えた群では、dose dependent に細胞シートがばらばらになっているのが認められた。一方、ヒト Dsg3 を認識しない抗体 AK7 で処理をした群では、細胞シートは、ばらばらになっていない。また、病的活性を持たない抗体 AK18 で処理をしても、細胞シートはばらばらにならなかった。(図 2) このことから、この検査法は、抗 Dsg3 抗体のなかでも病的活性を持つ抗体のみを検出できることが明らかになった。

2)

この検査法が天疱瘡自己抗体の病的活性を

反映するかどうか検討するために、尋常性天疱瘡の患者 3 例の血清を用い、各症例で活動期と寛解期の血清をこの検査法で測定した。

図 2 に示す如くに、症例すべてにおいて、活動期の血清で処理した細胞シートは、寛解期の血清で処理したものよりも細胞片数が多く、活動期の血清のほうが、病的活性が強いことが示された。この結果から、本検査法の測定値は天疱瘡患者の重症度を反映していると思われた。

### E. 結論

培養ケラチノサイトを用いて、天疱瘡自己抗体の細胞間接着阻害能を測定する検査法を開発した。この検査法は、病的活性を持つ抗 Dsg3 抗体のみの接着阻害能を測定することが可能であった。測定値は、天疱瘡患者の重症度を反映していた。ケラチノサイトを用いた dissociation assay は、天疱瘡自己抗体の病的活性を測定する簡便で客観的な方法である。この検査法は、デスマグレインを介する細胞接着、天疱瘡自己抗体による水疱形成のメカニズムを探る上で良い手段となりうると思われる。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表 (平成 14 年度)

論文発表

なし。

学会発表

なし。

### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし



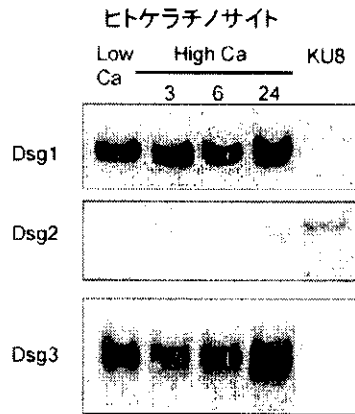


図1. 培養ケラチノサイトのデスモグレインアイソフォームの発現パターン。低濃度カルシウムで培養したケラチノサイト、また、1.2mM カルシウム入りの培養液に交換した後3、6、24時間後のケラチノサイト細胞抽出液を作成した。コントロールとして上皮癌由来の KU8 の抽出液を使用した。7.5% SDS PAGE の後、抗 Dsg1 抗体 (1 8 D4)、抗 Dsg2 抗体 (6 D8)、抗 Dsg3 抗体 (5 H10) を用いて immunoblot を施行した。培養ケラチノサイトにおいては、Dsg1、Dsg3 を主に発現しているのに対し、KU8 では、Dsg2 を主に発現している。

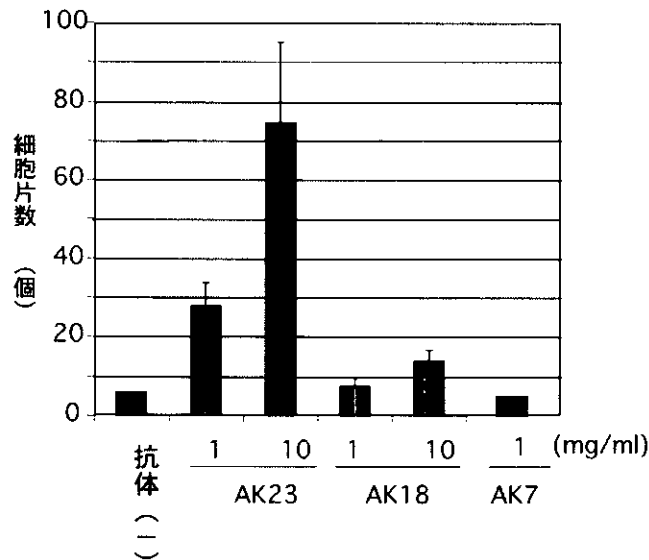


図2. Dissociation Assay は、抗 Dsg3 抗体のうち、病原性を持つ抗 Dsg3 抗体のみを検出することが可能。モノクローナル抗 Dsg3 抗体 AK7, AK18, AK23 の3種類を用いて、方法に欄に示す如く Dissociation assay を施行した。(AK7: Dsg3ELISA で陰性を示し、ヒト Dsg3 への反応性を示さない抗体、AK18: Dsg3ELISA 陽性であるが、新生仔マウスに抗体を投与しても病的活性を示さなかった抗体、AK23: Dsg3-ELISA 陽性で、しかも、病的活性をもつ抗体。) 細胞片を数えることにより数値化した。AK23 で処理した細胞シートのみ、用量依存的に細胞シートがばらばらに分裂するのが認められた。

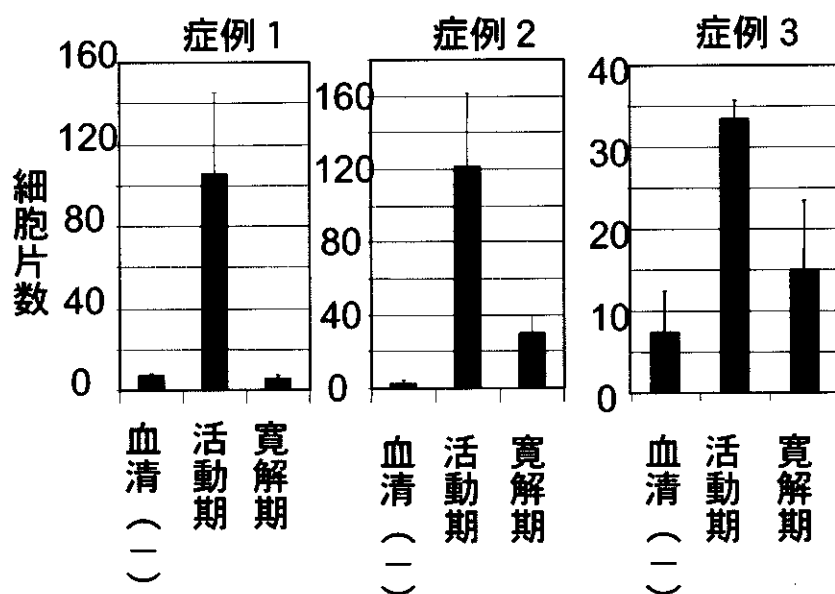


図 3. Dissociation Assay の測定値は、天疱瘡自己抗体の病的活性を反映する。

尋常性疱瘡患者 3 症例の血清を用い、各症例で活動期、寛解期の血清を用いた。全症例において、活動期の血清で処理した細胞シートは、寛解期の血清で処理したものよりも細胞片数が多かった。

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

尋常性天疱瘡病変部のデジタル解析

分担研究者 田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科 助教授

天疱瘡の病変から病勢、治療効果判定は病期の判断および治療の評価に重要であるが、客観的な評価はまだなされていない。そこで写真画像のデジタル解析を行い客観的評価をおこなうことを目標とした。

研究協力者

小林誠一郎 慶應義塾大学医学部助手

A. 研究目的

尋常性天疱瘡の皮疹を画像のデジタル解析を行い客観的評価するのが最終目標である。写真画像をデジタル解析する方法については、すでに前回までに報告したが、その方法を使い、いままで集積できた画像を解析し、さらに ELISA と比較し時系列での相関について検討を行う。

B. 研究方法

画像の解析は、以下の方法で行う。

①対象；過去に撮影された尋常性天疱瘡患者の背中の臨床写真を使用する。これらは、撮影条件、撮影部位、縮尺などの条件はそれぞれ異なっている。すべて 320dpi でフィルムスキャナーにより取り込んだ画像を解析に使う。使用ソフトは画像処理ソフトのフォトショップ (Adobe Photoshop® 5.0) とイメージプロ (Image-Pro® PLUS) を使用する。

②表色系と前処理；問題点に、I 画像中の陰影 II 多彩な病変 (水疱、びらん、紅斑、痂

皮、色素沈着) III 撮影条件 (温度・体温・撮影機材・光源・現像条件など) の違いのため基準色が存在しない、があげられた。そのため L\*a\*b\*表色系 (図 1) を利用しさらに皮疹を反映する赤色系成分色度 a (赤一緑) のみ、256 階調のグレースケール画像に変換する。さらに皮疹抽出にガウスフィルタを使用する。フィルタ使用で得られた画像との差により、皮疹が皮疹の周囲とどの程度色差があるか計算できる。

③色差；国際標準化機構規程され、肉眼的認識度は表 1 のごとくである。これより、別の色と認識できる色差 13 以上で病変抽出を行う。

④抽出範囲；基準値が画像内に含まれていないため、病変の面積と全体の比率を計算する。全体とする範囲は、腋窩から腋窩までを一辺とする正方形で、左腋窩から垂直にのばした延長線と肩との交点が一角とするように定めた。

⑤占有率；抽出された病変面積の和が正方形内の体幹総面積に対して何%になるか計算しこれを占有率とした。

C. 研究結果

時系列で、画像がある症例とさらに ELISA も存在する症例も含め、解析できたものを示す。

症例 1 は、ELISA 確立前の症例であるが、平成 6 年 10/12～平成 7 年 11/20 まで 5～6 ヶ月周期で撮影したものであるが、平成 7 年 4/5 撮影から平成 7 年 11/20 と占有率に大差はない。

症例 2 では、DSG 1 ELISA の数値と客観的病変面積の変動がほぼ平行している。

症例 3 では、ELISA は減少傾向である。病変の占有率は上下があるが、この症例では、同じ日に何枚回写真があり、それぞれについて測定してその平均をとり誤差をか

んがえると経過中は、あまり病変面積はかわっていない。

#### D. 考察・結論

CIE L\*a\*b\*表色系の色差を用い赤色系の病変部の描出する方法は客観的評価に使用できる。現在の占有率算出法では、症例 3 のごとく、病変の占有率が小さい症例では誤差が大きくなる。症例 2 のように ELISA が減少しても、皮疹面積にすぐに変動がない場合があるのは、創傷治癒の速度の個人差も関わる可能性があるからと思われる。経過を追って占有率と ELISA との相関をみるには、一定の周期で採血と撮影を同時に行う必要がある。