

Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezradica JS, N. Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S: Another view of T cell antigen recognition: Cooperative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural TCR. *J. Immunol.* 171:4539-4551, 2003

Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T, and Miyake S: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 50:305-313, 2004

Illes Zs, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, and Yamamura T: Accumulation of Va7.2Ja33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004

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
なし

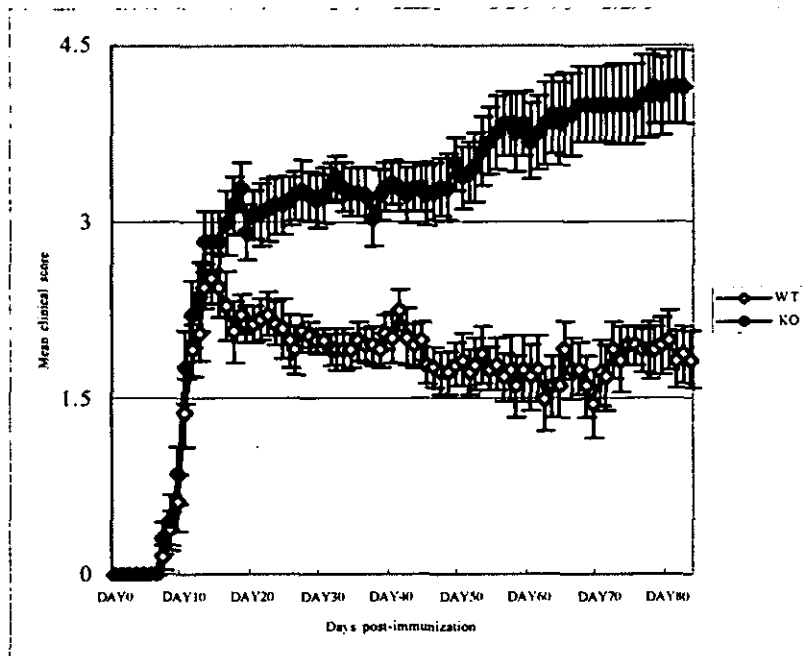


図1 野生型 B6 マウス(WT)と Apo E KO (KO)に誘導した MOG35-55 感作 EAE の比較。各群 10 匹のマウスを同時に感作し、臨床症状の変化を観察した。

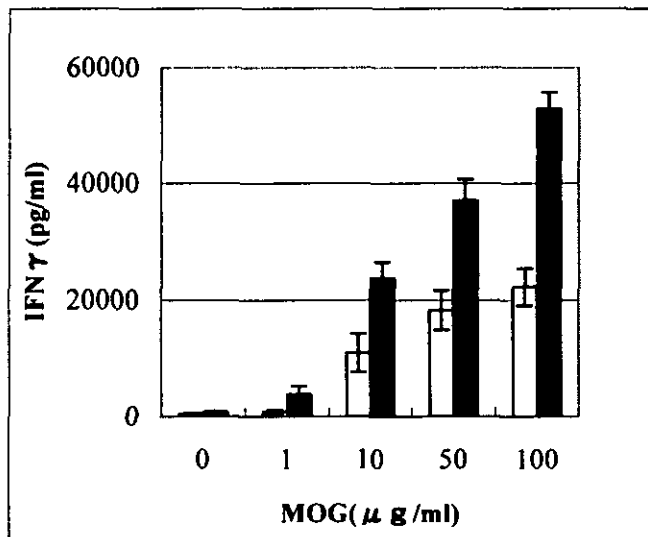


図2 MOG35-55 感作リンパ節細胞の IFN- γ 産生。WT (open column) と KO (closed column) から感作 10 日目に細胞を調製し、MOG35-55 で刺激した (本文参照)。

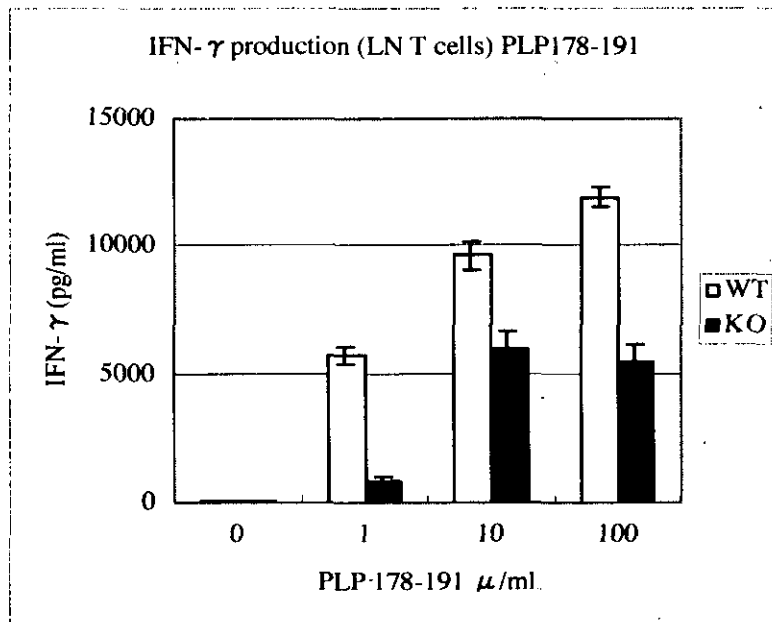


図3 PLP178-191 感作リンパ節細胞の IFN- γ 産生。WT (open column) と KO (closed column) から感作 10 日目に細胞を調製し、PLP178-191 で刺激した (本文参照)。

受動免疫による Guillain-Barré 症候群モデルマウス作製の試み

分担研究者 結城伸泰 獨協医科大学神経内科 助教授

研究要旨 【背景】 Guillain-Barré 症候群（GBS）は急性に四肢筋力低下をきたす神経・筋疾患のうち最も頻度が高く、多くの患者で神経症状発現の 1~3 週間前に感冒様症状や下痢などの先行感染症状を認めることから自己免疫的機序による発症が以前から考えられてきた。【目的】 発症機序のさらなる解析と治療法の評価を目指している。【方法】 軸索が一次的に傷害される軸索型 GBS における標的分子は GM1 であることから、抗 GM1 抗体の受動免疫により、発症および免疫染色による病理組織学的所見の有無を検討した。患者より精製した IgG、抗体産生ハイブリドーマ、感作マウスの脾細胞をそれぞれ異なる免疫機構を有するノックアウトマウスへ移入した。【結果】 いずれも、運動麻痺は呈さず、末梢神経の病理組織学的変化もみられなかった。モデルマウス作製にあたって、血中を循環する抗体が末梢神経上の抗原に接するまでには血液神経関門通過という課題が残されている。

共同研究者

薄 敬一郎 獨協医科大学助手
駒ヶ嶺 朋子 獨協医科大学学生

A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群（GBS）は、急速に発症する四肢筋力下と腱反射低下・消失を主徴とする自己免疫性末梢神経疾患である。末梢神経の髄鞘が障害される脱髄性疾患と信じられてきたが、軸索が一次的に傷害される軸索型 GBS の存在も知られ、この型は欧米に比べて日本に多い。発症前に何らかの先行感染症状が認められることが多く、病原体としては急性下痢症起因菌である *Campylobacter jejuni* が 3 割を占め、最も頻度が高い。

これまでに、患者の血中 IgG 抗体が末梢神経の構成分子のひとつ GM1 ガングリオシドに結合することを見出し、患者から分離された *C. jejuni* のリポオリゴ糖が GM1 の末端糖鎖と共通する構造を有することを明らかにしてきた。分子相同性による抗 GM1 抗体の産生が発症に関わると考えられる。ウサギに GM1 を感作することにより、IgG 抗 GM1 抗体を誘導し弛緩性運動麻痺を出現させ、病理組織学的にもヒトの軸索型 GBS に一致する所見が得られてい

る。また、患者から分離された *C. jejuni* の菌体をウサギに感作することでも同様のモデルが得られている。これらは抗 GM1 抗体の病原性を証明し、分子相同性仮説を支持する結果である。

微生物の病原性を証明するためには Koch の 4 条件を満たす必要があるように、自己免疫性疾患であることの証明には、Witebsky が提案した定義を満たすことが指標として用いられる。自己免疫性疾患としての軸索型 GBS 発症機序として、これまでに 4 つのことが明らかになっている。① 患者血中の臓器特異抗体としての抗 GM1 抗体、② 抗体に対応する特異抗原としての GM1、③ ウサギへの GM1 感作による抗 GM1 抗体産生、④ ヒト軸索型 GBS に対応したモデルウサギの運動神経における病理組織学的所見、である。残る項目として、病原抗体や病原抗体産生細胞を健常動物に移入し、発症を呈する受動免疫モデルの樹立が求められている。また、治療効果の判定やさらなる精査のためには、種々のノックアウトが存在し、操作の簡便なマウスでのモデル樹立が有用であると考えられる。

B. 研究方法

今回、3 つの方法を用いて、発症の有無、

および免疫染色による神経病理組織学的変化を検証した。

(1) Fc γ R IIb ノックアウトマウスへの GBS 患者抗体静注による試み

Park *et al.* J Clin Invest 1998 を参考に、Fc γ R IIb ノックアウトマウス (B6/129 系) (東北大高井俊行教授より供与)を用いて、患者より精製した IgG の移入を行った。

Fc γ R IIb は免疫抑制性モチーフを持つことから、この受容体をノックアウトすることによりエフェクター機構の活性化が得られる。抗 GM1 抗体として患者抗体を移入し、その抗体へのマウス抗体を産生させることで Fc γ R IIb ノックアウトマウスでみられるエフェクター機構の過剰活性化を利用する。

実験日初日にヒト免疫グロブリン製剤をアジュバントとともに感作し、ヒト IgG への抗体を産生させ、実験日第 4 日に GBS 患者の血清から精製した IgG 抗 GM1 抗体を静脈注射し、8 日間の経過を観察した。実験日第 12 日に採血し同日 2%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。血清のヒト IgG 抗 GM1 抗体の抗体価、およびマウス抗ヒト IgG 抗体の抗体価を ELISA 法にて測定した。固定後脊髄神経根・馬尾神経を取り出し、その凍結標本をクリオスタットで 6 μ m に薄切し、抗マウス抗体および抗ヒト抗体で染色し、神経根に結合する IgG の有無を観察した。

(2) ヌードマウスへの抗 GM1 抗体産生ハイブリドーマ腹腔内移植による試み

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウス (B6 系) (名古屋大学古川鋼一教授より供与) は GBS の標的分子である GM1 を含む複合型ガングリオシドを発現していない。このマウスに Complete Freund's Adjuvant (CFA)、Keyhole Limpets Hemocyanin (KLH) とともにエマルジョン化した *C. jejuni* のリポオリゴ糖を 2 週に一度感作し、ELISA 法によって抗体価を測定した。抗 GM1 抗体の上昇が見られた個体から脾細胞を取り出し、腫瘍細胞とフュージョンをし、培養したコロニーをクローニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株を樹立した。このハイブリド-

マを NK 細胞と胸腺を発現していないヌードマウスの腹腔に接種し、経過を観察し、腹水中および血中の抗体価を ELISA 法にて測定した。ELISA 法はスクリーニングとして一律に、GM1 を固相化し、カゼイン PBS に 500 倍希釈した血清を 4 $^{\circ}$ C にて一晚置き 1000 倍希釈した二次抗体を用いて測定した。腹水の産生と腫瘍の増殖による体重増加が実験日初日より 10g を越えた時点で 2%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。脊髄神経根・馬尾神経を取り出し、凍結標本をクリオスタットで 6 μ m に薄切し、protein G で IgG を染色し、神経根に結合する IgG の有無を光学顕微鏡で観察した。

(3) 自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫疾患モデル動物の作製法による試み

前述の GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスを自己抗原ノックアウトマウスとして用いた。前述の方法でエマルジョン化した *C. jejuni* のリポオリゴ糖を 2 週に一度感作し、抗体価の上昇が得られた個体の脾細胞を取り出し、*rag-2* ノックアウトマウスに 10⁷ の脾細胞を眼窩静脈叢より注射し経過を観察した。スクリーニングとしての血中抗体価は前述の ELISA 法にて測定した。

C. 研究結果

いずれの実験においても、運動麻痺は見られなかった。これらのマウスの脊髄神経根・馬尾神経からも GBS としての病理組織学的所見すなわち IgG の軸索への沈着、Waller 様変性は見られなかった。

(1) Fc γ R IIb ノックアウトマウスへの GBS 患者抗体静脈注射の実験では、8 日後の血清から高力価のマウス抗ヒト IgG 抗体ならびに、ヒト抗 GM1 抗体が検出された。抗 GM1 抗体は 8 日間に渡って体内を循環していたにも関わらず、おそらくは血液神経関門を通過せず、神経上の抗原分子まで到達しなかったと考えられる。

(2) ヌードマウスへの抗体産生ハイブリドーマ移植実験では、GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスの感作により得られたモノクローナル IgG 抗体のサブクラスは

IgG2b であった。ハイブリドーマ接種後、ヌードマウスの血清抗体価は1~2週で著しく上昇していた。にも関わらず、運動麻痺など GBS と考えられるような神経学的所見はみられず末梢神経の病理組織学的検討においても GBS とみられる変化は認められなかった。

(3) 自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞の *rag-2* ノックアウトマウスへの移入実験は、動物管理において不足があり、脾細胞の生着の確認まで至らなかった。

D. 考察

今回行った3種の受動免疫方法によって、GBS のマウスモデルは得られなかった。ELISA 法によって血清の抗 GM1 抗体の上昇は充分量確認されたにも関わらず、ウサギモデルで観察されたような神経病理学的変化はみられなかった。このことは、循環血漿中の抗 GM1 抗体の上昇だけでは GBS 発症が導かれない可能性を示唆している。抗体以外に関与するものとしていくつか考えられるが、究極的には血液神経関門の破綻という課題が挙げられる。血液中を循環する抗体が神経系の標的抗原にたどりつくまでには、血液神経関門が存在する。GBS の発症機転には、血液神経関門の破綻が想定されているが、そのメカニズムは明らかではない。患者血清中に見られる IgG 抗 GM1 抗体のサブクラスは IgG1 および IgG3 であり、これにより GBS 病因抗体産生には T 細胞のヘルプを要することが示唆される。T 細胞の動員とともに TNF- α や IL-1 β といったサイトカインの産生が起こり、血液神経関門の透過性を亢進させる可能性も考えられる。

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスの感作により得られたモノクローナル IgG 抗体のサブクラスは IgG2b であった。これはヒトの IgG2 に相当し、補体結合能、マクロファージ結合能に乏しい。エフェクター機構の有効な活性化も病態再現には必要であると考えられることから、ヒトの IgG1 に相当する IgG2a を得る必要がある。今後、発症に関与する新たな細胞、物質の解析を予定している。

E. 結論

受動免疫によって、現在までに GBS の発症は導かれていない。血液神経関門の抗体通過が課題である。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

G. 研究発表 (平成15年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Yuki N., Saperstein DS: Axonal Guillain-Barré syndrome subtypes: do we need more splitting? *Neurology* 61: 598-599, 2003.
2. Koga M, Yuki N., Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y: CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor repertoire in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *J Neuroimmunol* 141:112-117, 2003.
3. Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N.: Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol* 54:393-388, 2003.
4. Odaka M, Yuki N., Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S: Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Brain* 126: 2279-2290, 2003.
5. Odaka M, Yuki N., Hirata K: Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 250: 913-916, 2003.
6. Ikuta N, Fukusako T, Yuki N., Morimatsu M, Koga M: Acute oropharyngeal palsy associated with anti-GM1b IgG antibody. *J Neurol* 250: 881-882, 2003.
7. Sekiguchi K, Susuki K, Funakawa I, Jinnai K, Yuki N.: Cerebral white matter lesions in acute motor axonal neuropathy. *Neurology* 61: 272-273, 2003.
8. Susuki K, Johkura K, Yuki N., Kuroiwa Y: Clinical deterioration in Bickerstaff's brainstem encephalitis caused by overlapping Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 211: 89-92, 2003.
9. Odaka M, Yuki N., Kokubun N, Hirata K, Kuwabara S: Axonal Guillain-Barré syndrome associated with axonal Charcot-Marie-Tooth

disease. *J Neurol Sci* 211: 93-97, 2003.

10. Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N., Hattori T: Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci* 210:41-45, 2003.

11. Odaka M, Koga M, Yuki N., Susuki K, Hirata K: Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Sci* 210: 99-103, 2003.

12. Koga M, Yuki N., Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S: Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 60: 1514-1518, 2003.

13. Odaka M, Yuki N.: Antibodies to GM2 ganglioside in neurological disorders. *Intern Med* 42:220-221, 2003.

2. 学会発表

海外

1. Yuki N., Koga M, Susuki K, Hirata K: "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" Peripheral Nerve Society. Banff, Canada. July 28, 2003.

2. Yuki N., Koga M, Susuki K, Hirata K:

"Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" 12th

International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Aarhus, Denmark. September 7, 2003.

3. Yuki N., "Carbohydrate mimicry between humanganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipo-oligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome"

Symposium on Glyco-Neurobiology- Glycolipids, Glycoproteins and other Glycoforms.

A Satellite Meeting of the Biennial Meeting of the International and Asia-Pacific Societies for Neurochemistry.

Taipei, Taiwan. February 11, 2004

H. 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

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 15 年度分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスにおける

水疱発生のメカニズム免疫電顕的解析

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 これまでに我々は、尋常性天疱瘡(PV)モデルマウスにおいて、自己抗体(IgG)がデスモゾーム(DM)に存在する標的抗原、デスモグレイン 3 (Dsg3) に直接結合することを免疫電顕的に明らかにしてきた。本研究では、*in vivo* で結合している IgG と裏打ちタンパクの一つデスモプラキン(DP)の超微細局在を後包埋金コロイド免疫電顕法にて、より詳細に解析することで、PV における水疱発生のメカニズムのさらなる解析を行った。棘融解部では多数の半割 DM が認められ、その細胞外領域には IgG の結合、細胞内領域では接着板(接着板)に DP を介したケラチン線維の挿入が認められた。このことは、DM の分割に Dsg3 の枯渇が関与している可能性が低いことを示唆している。次に、非棘融解部では、隣り合う基底細胞間に、IgG が集簇した奇妙な DM 様の構造物を認めた。この構造物と正常 DM との連続性を持つ部分も認め、DM の崩壊物と考えられたが、細胞質内にはケラチン線維の挿入はなく、周囲に存在するケラチン線維上に DP の局在を認めた。これらの所見から、この構造物は DM の接着板からのケラチン線維の退縮によって形成された可能性が高いものと考えられた。以上より、PV における水疱発生には、IgG が直接 DM に局在する Dsg3 に結合することで、細胞接着機能を障害し DM を分割する機序と、IgG の結合により DP とケラチン線維の退縮を起こし DM が崩壊する機序の二つが存在する可能性が示唆された。また、前者は基底細胞上面で、後者は基底細胞側面において主に機能している可能性が高いと考えられた。

研究協力者

清水 篤 慶應義塾大学医学部皮膚科特別
研究助手

A. 研究目的

これまでに我々は PV モデルマウスを用いた実験から、PV 自己抗体(IgG)がデスモゾーム(DM)上のデスモグレイン 3(Dsg3)と直接結合することを免疫電顕的に解明してきた。PV 自己抗体の水疱発生機序には諸説あり、1) 細胞膜上にプールされている Dsg3 が IgG と結合し細胞内に取り込まれることで、DM から Dsg3 が枯渇し DM の結合が障害されるという説、2) DM の向かい合う狭い接着板(接着板)間に存在する Dsg3 へ PV 自己抗体が到達し直接結合することで隣り合った細胞の Dsg3 分子の結合が障害されるという説、3) IgG が Dsg3 と結合することで、何らかのシグナル伝達が生じ、細胞質内の変化によって細胞接着能が障害される説、などが

議論されているが、それらについての結論は未だ出ていない。本研究では、*in vivo* で結合している IgG と裏打ちタンパクの一つデスモプラキン(DP)に着目し、その超微細局在を後包埋金コロイド免疫電顕法にて詳細に解析することで、PV における水疱発生のメカニズムのさらなる解析を行なう。

B. 研究方法

透過型電子顕微鏡検査

2 mm³に細切した PV モデルマウスの口腔粘膜より採取した試料を 2%グルタルアルデヒドと 1%オスミウムにて固定した後、型のごとく包埋し透過型電子顕微鏡下にて観察した。

後包埋金コロイド免疫電顕法

免疫電顕用試料は、PV モデルマウスおよびコントロールとして Rag2^{-/-}マウスの、それぞれの口腔粘膜を採取した。採取

した組織は、それぞれ1mm³以下に細切し、凍結固定装置 (KF80)を用い、-190℃に冷却した液体プロパンにて急速凍結固定し、凍結置換装置 (REICHERT AFS)にて、-80℃に冷却したメタノールにて48時間凍結置換し、Lowicryl K11Mに-60℃下で48時間、室温下で48時間のUV重合包埋により免疫電顕用ブロックを作成した。超薄切片を作成後、免疫染色を施し、透過型電子顕微鏡下にて観察した。PVモデルマウスのIgGまたはDPを検出するため、一次抗体としてrabbit anti-mouse IgG (H+L) (1:320, American Qualex Antibodies, California, USA)またはrabbit anti-desmoplakin (1:40, Research diagnostics, Inc; Flanders, NJ, USA)を4℃下で一晩、二次抗体として、5nmもしくは15nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG (1:40, Amersham, Olen, Belgium)を、室温下で2時間反応させたものを、それぞれIntenSE™ M silver enhancement kit (Amersham)により適切な大きさになる様に銀増感反応を施した。また、コントロールマウスのDsg3またはDPを検出するため、PVモデルマウス血清またはrabbit anti-desmoplakin (1:40)をRag2^{-/-}マウスより採取した超薄切片上にて4℃下で一晩反応させたものをそれぞれ金コロイドにて染色を行った。

Double-sided immunogold labelling 法

超薄切片を支持膜を張っていないニッケルグリッド上に乗せる。切片がすべて露出している面をA面として、A面をRabbit anti- β -catenin (1:40, H-102, Santa Cruz biotechnology, Inc; Delaware, CA, USA)またはrabbit anti-desmoplakin (1:40)の溶液上に浮かべ4℃下で一晩反応させる。二次抗体として5nm金コロイド標識を行った後にグリッドを反転させB面をrabbit anti-mouse IgG (H+L) (1:320)の溶液上に浮かべさらに4℃下で一晩反応させる。二次抗体として15nm金コロイドを標識し電子染色後、カーボン蒸着を施した物を、透過型電子顕微鏡下にて観察した。

C. 研究結果

通常の電顕による観察にて、棘融解を呈した基底細胞上面には多数の半割DMの形成が認められた(図1a)。免疫電顕による半割DMの強拡大像では、DMの細胞外領域に多数のIgGの沈着が認められた(図1b)。また、細胞質内にはDPの局在がDM接着板とケラチン線維との間に認められた(図1c)。半割DMにおけるケラチン線維の退縮は認められなかった。

PVモデルマウスの隣り合う基底細胞の側面にはIgG (15nm gold)が集簇した奇妙な構造物が認められた(図2)。この構造物は水疱部、非水疱部のいずれにも認められ、その細胞間隔はDMとほぼ同様(およそ30nm)であった。また接着板やケラチン線維の挿入は全く認められないものの、向かい合う細胞膜の中心には細胞間結合層(Dense mid-line, DML)(図2a、矢尻)と思われる構築が認められた(図2a)。ある部位ではこの構造物と小さなDM(図2d, e、白抜き矢印)が隣接している像が認められた(図2d; e)。免疫二重染色を施した結果、この構造物の細胞内領域に、痕跡的にDP(5nm gold)が局在している像を認め(図2b)、さらにこの構造物近傍の細胞質内にはケラチン線維に付随する様にDPが集簇して局在している像が認められた(図2e)。 β -catenin (5nm gold)の局在は認められなかったことから、この構造物はアドヘレンスジャンクションではないことが確認された(図2c)。

D. 考察

これまでに我々は、DMの細胞外領域におけるPV-IgGと標的抗原であるDsg3の水平方向と垂直方向のそれぞれの分布パターンの解析を行った結果、PV-IgGの局在部位が標的抗原の微細局在と一致していることを報告している。すなわちPV-IgGはDMの細胞外領域に存在する標的抗原であるDsg3に対し、直接到達し結合することが可能であることを免疫電顕的に証明してきた。

今回の実験から、棘融解部での半割DMの細胞外領域に、PV-IgGが結合していることが確認できた。また、半割DMにはDPが正常に局在していることが認められ、

接着板内へのケラチン線維の挿入も認められた。これらの結果は DM の半割に Dsg3 の枯渇が関与している可能性が低いことが示唆していると同時に、PV の水疱形成が IgG の Dsg3 の細胞外領域への直接阻害によって引き起こされている可能性が高いことを示唆するものであった。

また、さらに興味深い所見として、基底細胞の側面の一見正常に見える細胞膜上に IgG の集簇した像が認められた。この構造物はその形態学的な特徴、すなわち DML を向かい合う細胞膜の中央に認めること、その幅がおよそ 30nm と DM とほぼ同様であること、DM との連続しているものがあること、また DP との免疫二重染色から、DP がこの構造物の細胞膜付近に痕跡的に認められたこと、さらに細胞膜近縁の細胞質内にケラチン線維と共に DP が局在している像を認めたことなどから、DM との関連が強く推察され、おそらく DM の接着板からの DP の消失と共にケラチン退縮が生じたことにより形成された可能性が高いと考えられる。また、この構造物は、水疱部、非水疱部のいずれの基底細胞間にも認められた。以上の所見より、IgG が Dsg3 に結合した後の変化として、Dsg3 の接着機能障害による DM の半割とケラチン線維の退縮による DM の崩壊、の二つの機序の存在が示唆された。しかしながら、後者は基底細胞側面においてのみ認められること、水疱部、非水疱部のいずれにも認められること等から水疱形成の主役を担っているとは考えにくい。一方、半割 DM の形成は、PV 水疱部に特異的な所見であり、IgG による Dsg3 機能の直接阻害が水疱発生のメカニ

ズムの中心をなすと考えるのが妥当であると思われた。

E. 結論

DM に存在する Dsg3 の細胞外領域に対し IgG が直接結合し Dsg3 の細胞接着機能を阻害することが PV における水疱発生の主要なメカニズムであると示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (平成 15 年度)

1. 論文発表

英語論文

Shimizu A, Ishiko A, Tsunoda K, Ota T, Amagai M, Nishikawa T. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model

J Invest Dermatol. In press.

2. 学会発表

1. Shimizu A, Ishiko A, Tsunoda K, Ota T, Amagai M, Nishikawa T. Cleavage of desmosomes occurs without keratin retraction in vivo in pemphigus vulgaris model mice. International Investigative Dermatology 2003, Miami Beach, Florida USA, 2003. 04.

2. 石河晃, 清水篤, 大田孝幸, 角田和之, 天谷雅行, 西川武二: 尋常性天疱瘡 (PV) 水疱形成機序の免疫電顕による検討—自己抗体の役割について. 第 780 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2003.03.

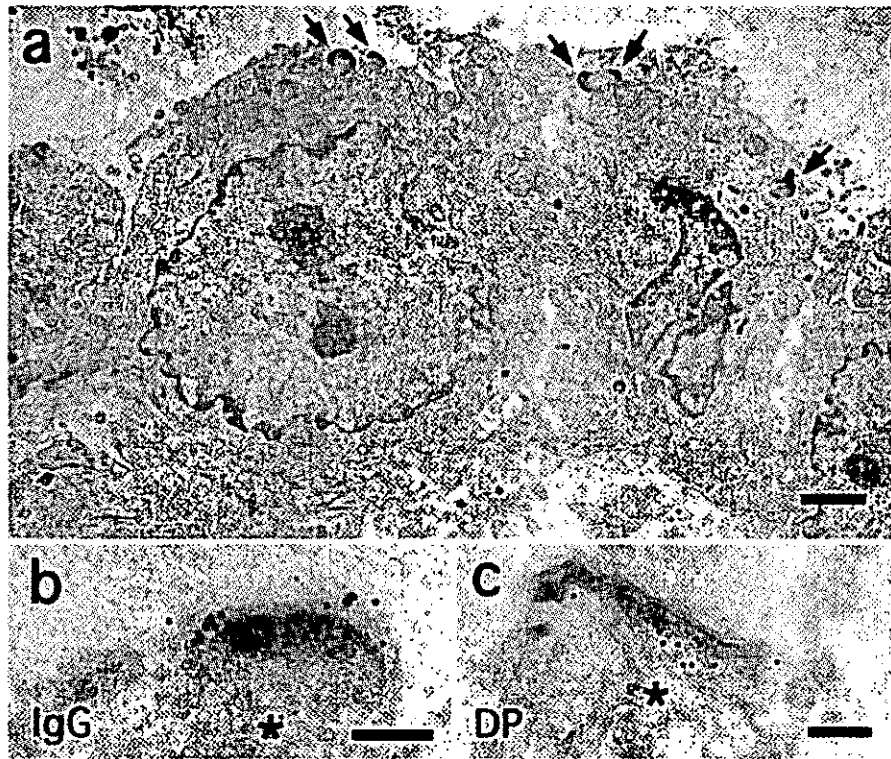


図 1. 透過型電子顕微鏡による棘融解部の基底細胞の上面には多数の半割デスモゾーム (DM) が認められる(a)。免疫電顕による半割 DM の拡大像では、半割 DM の細胞外領域に自己抗体 (IgG) が結合している像を認め(b)、細胞内領域ではデスモプラキン (DP) の局在が DM 接着板とケラチン線維との間に認められる(c)。Bars; (a) 1 μ m, (b and C) 100nm



図 2. 隣り合う基底細胞の側面には IgG(15nm gold)が集簇した奇妙な構造物を認める。接着板やケラチン線維の挿入は全く認められないものの、向かい合う細胞膜の中心には細胞間結合層 (矢尻) と思われる構築が認められる(a)。ある部位ではこの構造物と小さな DM(白抜き矢印)が隣接している像が認められた (d, e)。免疫二重染色から、この構造物の細胞内領域に、痕跡的に DP (矢印) (5nm gold)の局在を認め (b)、さらに近傍の細胞質内にはケラチン線維に付随する様に DP が集簇して局在している像が認められる(e)。β-catenin (5nm gold)の局在は認めない (c)。Bars; (a-c) 100nm, (d and e) 200nm

ナイーブ脾細胞移植による天疱瘡モデルマウスを用いた

抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離及び解析

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 我々は、既にデスモグレイン 3 (Dsg3) ノックアウトマウスを組み換え Dsg3 で免疫後、Rag2 ノックアウトマウスにその脾細胞を移植し尋常性天疱瘡 (PV) モデルマウスを作製している。PV モデルマウスの脾細胞を細胞融合し抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (mAb) を複数単離し、その中で AK23 mAb が強い病原性を有する事を報告した。最近、Dsg3^{-/-}マウスを免疫することなくナイーブな Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を Rag2^{-/-}に移植する事によっても PV モデルマウスの作製が可能である事が確認された。本年度は、ナイーブ脾細胞移植により作製した PV モデルマウスより抗 Dsg3 抗体を複数単離し、その特異性および病原性の解析を行った。

共同研究者
角田和之
慶應義塾大学医学部歯科口腔外科助手

A. 研究目的

ナイーブ脾細胞移植により作製した 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 週齢の未免疫の Dsg3^{-/-}マウス脾細胞 (5x10⁷/マウス) 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。陽性クローンはマウス培養角化細胞 PAM212 を用いた live keratinocyte staining にて 2 次スクリーニングした。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 (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。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用い 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イ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イルスを昆虫細胞 High Five に感染させ、組み換え Dsg 蛋白を培養液中より回収し、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 法は既報告にしたがい行った。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°C、5%CO₂ インキュベーターにて 30 分間培養した。-20°C 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。(PF IgG 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 NAK 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。微少水疱形成の陽性基準は、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) 成熟マウスを用いた腹水形成法

成熟マウスにおける mAb の病原性を検討するためにハイブリドーマの腹腔内接種を用いる方法にて検討した。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^{-/-}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の推移および腹水の形成 (腹部の膨隆度) 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、病理組織学的にヘマトキシリン・エオジン染色にて免疫組織学的に直接蛍光抗体にて検討した。同様に各 NAK mAb 数種をさまざまな組み合わせで接種し表現型誘導の有無を確認した。

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°C 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 10 クローンの抗 Dsg3 mAb を単離し NAK と命名した。全てのクローンが培養マウス角化細胞を用いた live keratinocyte staining 陽性で in vivo で Dsg3 に反応性を有していた。

アイソタイプは重鎖が 6 クローンで IgG2a、4 クローンが IgG1 であった。また軽鎖は全てのクローンで κ であった。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反応した。ELISA 法による解析では、数クローン (NAK1、4、7、8、9) がマウス Dsg3 の他にヒト Dsg3 に交差反応した (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小水疱形成を観察した。その結果すべての NAK 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、すべての NAK mAb を移入したマウスの皮膚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、NAK mAb 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、NAK 1, NAK2, NAK4, NAK7, NAK8, NAK 9, NAK10, NAK11 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, 図 2)。免疫組織学的にはすべての NAK mAb で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) 成熟マウスの腹水形成による病原性

の確認

Dsg3 を正常に発現する成熟免疫不全マウス (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 PV 患者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、各 NAK mAb を単独で接種した場合は肉眼的には十分な腹水の貯留が認められたにもかかわらず、脱毛は認められなかった。また免疫組織学的に細胞間に IgG の沈着は認められたものの、病理組織学的には明らかな水疱形成は認められなかった。そこで数種類の NAK mAb を組み合わせるポリクローナルとしての病原性を確認したところ NAK1, NAK2, NAK4, NAK7, NAK8, NAK9, NAK10, NAK11 (計 8 種)、NAK1, NAK2, NAK4, NAK7, NAK9, NAK10 (計 7 種)、NAK1, NAK2, NAK7, NAK9, NAK11 (5 種)、NAK1, NAK2, NAK7, NAK11 (計 4 種) の全ての組み合わせにおいて接種後約 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角化細胞表面への IgG の沈着が認められた。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。NAK mAb は単独では AK23 のように強い病原性は示さなかったものの、複数組み合わせる事により天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する可能性がある mAb であることが確認された (表 1)。

d) NAK mAb は Dsg3 分子上の異なるエピトープを認識する。

NAK mAb のカルシウム依存性の有無を確認するために EDTA 処理によるマウス Dsg3 蛋白に対する反応性の確認を行った。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 NAK2, NAK10, NAK11 のみで rDsg3 に対する反応性が消失した。これらの所見より NAK2, NAK10, NAK11 はカルシウム依存性のエピトープを認識

し、他の NAK mAb はカルシウム非依存性のエピトープを認識する事が確認された。

次に Dsg3/Dsg1 のスワッピング分子および点変異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。NAK mAb のエピトープは大きく Dsg3 細胞外領域の N 末端側、中央部、C 末端側を認識する 3 種類に分類する事ができた。N 末端側を認識する mAb としては NAK1 が Dsg3 アミノ酸 25、28、29 を NAK9 が Dsg3 アミノ酸 25、28、29、53~56 を NAK4、NAK7、NAK8 は Dsg3 アミノ酸 1-162 を、中央部を認識する mAb としては NAK2、NAK5 が Dsg3 アミノ酸 195-402 を、C 末端を認識する mAb としては NAK3 が Dsg3 アミノ酸 403-565 を、N 末端から中央部を認識する mAb としては NAK11 が Dsg3 アミノ酸 1-402 をそれぞれ認識した (表 1、図 3)。

D. 考察

以前われわれは rDsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに移植して作製した PV モデルマウスより抗 Dsg3 mAb (AK シリーズ) を作製しそのなかで、AK19 と AK23 は新生マウスへの受動免疫で水疱形成誘導が確認され、さらに AK23 のみで成熟マウスへのハイブリドーマ接種で PV モデルマウスの表現型の誘導が可能で、非常に強い病原性を有する事が確認された。さらに、エピトープの解析で、AK23 はカドヘリンの接着面を形成する Dsg3 特異的な少なくとも 4 個のアミノ酸を認識する事により細胞接着機能を阻害し、水疱を形成すると考えられた。また明らかな病原性を示さなかった AK mAb は Dsg3 の接着にはあまり重要ではないと考えられる、Dsg3 細胞外領域の中央から C 末端部を認識する抗体である事が確認された。

本研究での細胞融合にはナイーブ Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞 移植により作製した PV モデルマウス脾細胞を使用した。単離された mAb はすべて *in vivo* で Dsg3 に反応性を有しておりそのアイソタイプは

AK シリーズでは IgG 1 のみであったのに対して、IgG 1 と IgG 2 a の 2 種類であった

病原性の確認では、AK シリーズとは異なり、全てのクローンが新生マウスを用いた受動免疫の系で水疱形成誘導能を有している事が確認された。しかし、成熟マウスを用いた腹水形成法ではハイブリドーマを各クローン単独で接種した場合には AK23 のように強い病原性を有している mAb は無かった。そこで NAK mAb の複数クローンを組み合わせて接種したところ、AK23 の場合と同様に PV モデルマウス表現型の誘導が確認された。AK シリーズの場合、AK23 はそのエピトープが Dsg3 の接着面を認識する強い抗体であり、その他の AK mAb で水疱形成が誘導されなかった原因は、そのエピトープが異なるために違いが生じているものと推測された。本研究では AK23 のようにアミノ酸レベルまで詳細にはエピトープの解析が行われてはいないものの、それ単独で強い病原性を示さない mAb でも、複数組み合わせポリクローナルな状態にする事により水疱形成を誘導する事が可能である事が確認された。PV 患者血清はポリクローナルであり、この腹水形成法の結果は、PV 患者中で起こっている現象を反映しているものと考えられた。また AK シリーズでは水疱形成能を有する抗体のみがカルシウム依存性を有していたのに対して、NAK シリーズでは弱いながらもその病原性を有しているにもかかわらずカルシウム依存性でない mAb も存在した。これらの結果から立体構造を認識せずに、Dsg3 分子に結合するのみの抗体でも病原性を有する可能性が示唆された。今後さらに NAK mAb の詳細な解析を行う事で細胞接着障害における自己抗体の役割が明らかになるものと考えられた。

E. 結論

PV の水疱形成において、モノクローナルでは明らかな病原性を誘導しない抗体でも、異なったエピトープを認識する抗体がポリクローナルで作用すると病原性を誘導することが確認された。これらの mAb は天疱瘡の発症機序の解明や、治療

法の開発に有用なツールであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 15 年度）

1. 論文発表

英語論文

なし

日本語論文

なし

2. 学会発表

K. Tsunoda, H. Kawasaki, M. Aoki, T. Nagai,
T. Nakagawa, T. Nishikawa, M. Amagai.

Production of anti-desmoglein3 monoclonal antibodies from pemphigus vulgaris mouse model produced by naïve splenocytes adoptive transfer. International Investigative Dermatology, 64th annual meeting, 2003, 04. Florida

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

なし

表2 NAK モノクローナル抗体の反応性

NAK	Isotype	IIF ^A		ELISA				Live keratinocyte staining	Ca dependency ^B	Pathogenic activity		Epitope ^C
		mouse	human	mouse Dsg3	mouse Dsg1	human Dsg3	human Dsg1			Passive transfer	Ascites formation	
1	IgG1 κ	+	+	+	+	+	-	-	+	-	25,28,29	
2	IgG1 κ	+	-	+	-	-	+	-	+	-	195-402	
3	IgG2a κ	+	-	+	-	-	+	-	+	-	403-565	
4	IgG1 κ	+	+	+	-	+	+	-	+	-	1-162	
5	IgG1 κ	+	-	+	-	-	+	-	+	-	195-402	
7	IgG2a κ	+	-	+	-	-	+	+	+	-	1-162	
8	IgG2a κ	+	-	+	-	-	+	-	+	-	1-162	
9	IgG2a κ	+	+	+	-	+	+	+	+	-	25,28,29 53-56	
10	IgG2a κ	+	-	+	-	-	+	+	+	-	1-162	
11	IgG2a κ	+	-	+	-	-	+	+	+	-	1-402	

^A マウス口腔粘膜、ヒト皮膚を基質として用いた間接蛍光抗体法。

^B NAK mAb のカルシウム依存性は EDTA+, - の条件で免疫沈降法とマウス Dsg3ELISA で検討。+は EDTA による反応性の消失を示す。

^C NAK2, NAK3, NAK4, NAK5, NAK7, NAK8, NAK10, NAK11 mAb のエピトープをマウス Dsg3 のアミノ酸残基にて示す。NAK1, NAK9 mAb のエピトープはヒト Dsg3 のアミノ酸残基数で示す。

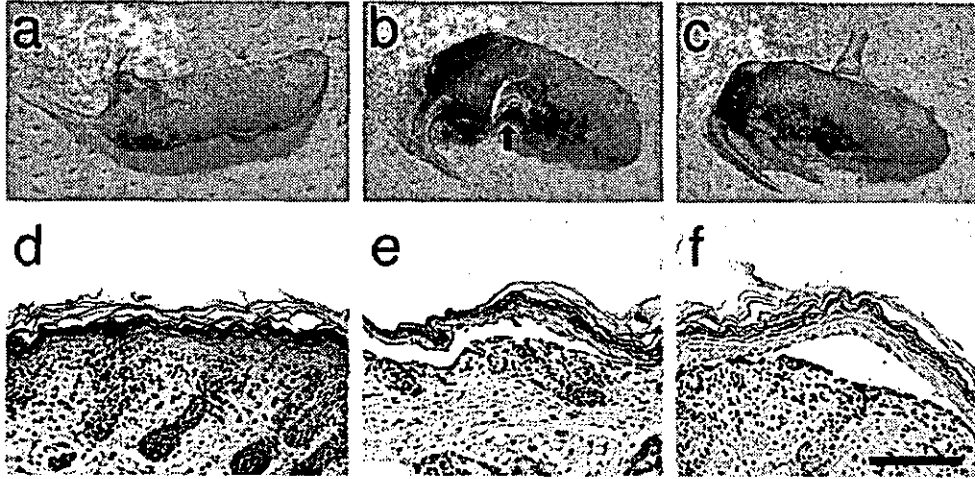


図1 新生仔マウスを用いた病原性の確認

PF IgG⁻ (それ自身では肉眼的および病理組織学的に水疱形成を認めない量) のみを注射したマウスでは肉眼的(a)、病理組織学的に水疱形成を認めない(b)。同量の PF IgG に加えて NAK9 を注射したマウスでは肉眼的 (b, 矢印)、病理組織学的に水疱形成を認めた(e)。NAK9 を単独で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(c)、病理組織学的に微少水疱の形成を認めた(f)。Bar=50 μ m

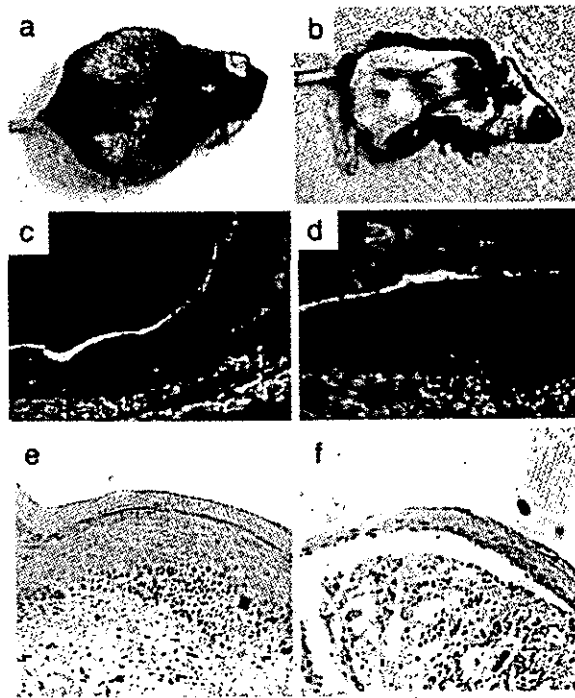


図2 成熟マウスを用いた NAK mAb の病原性の確認

NAK9 ハイブリドーマを接種したマウスでは接種後、十分な腹水形成による腹部の膨満を認める(a; 口蓋粘膜)。免疫組織学的に細胞間接着部に一致して IgG の沈着を認める(c; 口蓋粘膜)ものの、病理組織学的に水疱形成を認めない(e)。NAK1, 2, 7, 11 ハイブリドーマを混合して接種したマウスでは、AK23 ハイブリドーマを接種した際と同様に明らかな腹水の貯留を認めないものの広範囲な被毛の脱毛を認めた(c)。免疫組織学的には細胞間接着部位に一致して IgG の沈着を認め(d)、病理組織学的に PV に特徴的な基底層直上の水疱形成を認めた(f)。