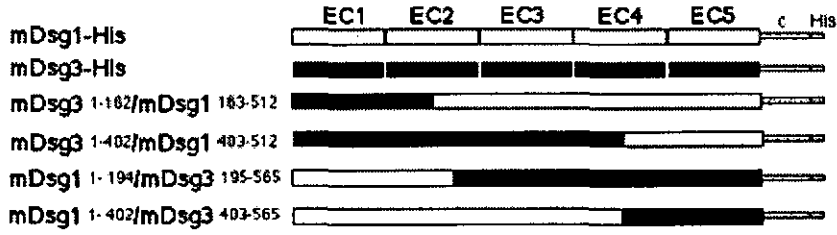


a



b

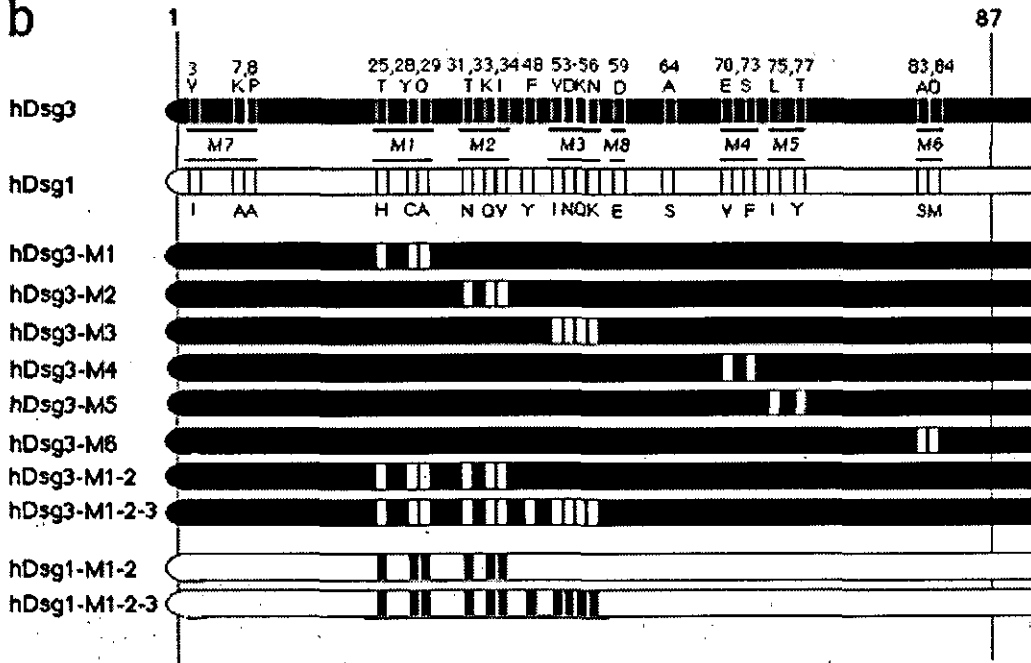


図3 Dsg1/Dsg3 スワッピングおよび点変異分子の分子構造

すべての組み換え蛋白は C 末端側に E-tag と His-tag を有する。アミノ酸残基の番号は成熟型 Dsg1、Dsg3 の N 末端側から換算した。a、マウス Dsg1/Dsg3 スワッピング分子。b、ヒト Dsg1/Dsg3 点変異分子。

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

マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析

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 近年、自己免疫疾患に関わる様々な末梢抗原タンパクが胸腺で発現している可能性が示唆され、高度に分化した末梢抗原においてもその免疫寛容獲得機構に胸腺が関与している可能性が考えられている。我々は野生型マウス胸腺組織を抗 Dsg3 抗体を用いた免疫組織化学染色、蛍光抗体法で観察し、胸腺上皮細胞のごく少数の細胞が Dsg3 を発現していることを示した。

共同研究者
和田直子
慶應義塾大学医学部皮膚科学助手
山田健人
慶應義塾大学医学部病理学専任講師

A. 研究目的

マウス胸腺組織における Dsg 3 発現の局在を解析する。

B. 研究方法

野生型成熟マウスおよび、対照として Dsg 3 ノックアウトマウスの胸腺を摘出し、凍結切片、パラフィン包埋切片を作製した。既存の抗マウス Dsg 3 抗体および、我々の既に作成したモノクローナル抗体を反応させ、免疫組織化学染色、蛍光抗体法により観察した。

C. 研究結果

野生型成熟マウス胸腺において、ごく少数の細胞に抗 Dsg 3 抗体染色陽性所見を得た。その細胞は抗ケラチン抗体染色陽性であり、胸腺上皮細胞のごく一部が Dsg 3 を発現していると思われる。

D. 考察

近年、胸腺上皮細胞においてインスリン、アミラーゼ、SAP など多数の末梢抗原の mRNA が示された。それらの発現は多くが Aire 遺伝子の支配下にあり、Aire ノッ

クアウトマウスでは胸腺での末梢抗原発現が減少するとともに多臓器に炎症が見られることから、Aire および胸腺における末梢抗原発現と自己免疫性疾患との関連が考えられている。

Dsg は皮膚粘膜に存在する細胞接着の機能を担うデスモゾーム構成タンパクで、自己免疫性疾患である天疱瘡の標的となる末梢抗原である。今回、Dsg 3 についても、今まで証明された他の末梢抗原と同様に胸腺上皮細胞で発現していることが確認できた。また、胸腺組織切片を用いた形態的観察により、Dsg 3 陽性細胞は胸腺上皮細胞の中のごく少数でしかないことがわかった。このことから、胸腺における Dsg 3 が細胞接着機能のために存在しているとは考えにくい。免疫寛容との何らかの関連が推測されるが、一方で、この少数の末梢抗原陽性細胞が胸腺での T 細胞成熟過程においてそれら全ての細胞に接触しうるとは考えにくく、免疫寛容獲得機序のさらなる解明のためには胸腺の発生段階での末梢抗原発現様式の検討が必要であると思われる。

E. 結論

野生型成熟マウス胸腺上皮細胞では、そのごく一部に Dsg3 を発現している。胸腺における末梢抗原の存在意義の検討は、末梢抗原の免疫寛容や自己免疫疾患発症の解明につながる可能性が考えられる。



図 野生型マウス胸腺 凍結組織切片蛍光抗体法 (左右同一切片)
左: 抗パンケラチン抗体染色 右: 抗マウス Dsg3 抗体染色
ケラチン陽性の胸腺上皮細胞の一部が Dsg3 陽性である。

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。昨年我々はこの 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、DEX および CPA に効果があることを示した。今回、更にその効果を見るため、脾細胞移植前から以下の薬剤を投与し、PV モデルマウス発症の予防的効果を検討した。薬剤は、dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate(FK506)and mycophenolate mofetil (MMF) の7種類を選択した。CPA は有意差をもって効果があると考えられ、また他薬剤も抑制効果を認めた。天疱瘡モデルマウスは、今後新しい免疫抑制療法の前臨床試験としてとして、有用な評価系になり得る。

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) 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週間後、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2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 1.5x10⁷ 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。

b) 投薬

使用薬剤は、dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate(FK506)and mycophenolate mofetil (MMF) の計7種類を用いた。投与は脾細胞移植の2日前から始め、投与経路は DEX、m-PSL、CPA、CYA、FK506 は腹腔内投与で、AZP、MMF は経口投与とした。投与量は以下の通りに行った。

- DEX : 10 mg/kg/日
- m-PSL : 100 mg/kg/日
- AZP : 30 mg/kg/日
- CPA : 40 mg/kg/週 3 日
- CYA : 40 mg/kg/日
- FK506 : 5 mg/kg/日
- MMF : 80 mg/kg/日

薬剤投与は基本的に 28 日までとし、投与中止後更に 28 日観察を行った。コントロール群への投薬は、腹腔内投与薬剤 (DEX、mPSL、CPA、CYA、FK506) を投与した群は PBS を等量投与し、AZP 投与した群は等量の 0.5%CMC-Na 溶液、MMF を投与した群は等量の蒸留水を経口投与した。ただし、口腔内びらんに伴う摂食不良からくる衰弱による死亡が見られるため、マウスが経過中に死亡した場合は、死亡時の体重と抗体価がその後持続していたと仮定し、データに組み入れた。

c) 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背部からの全体像と顔面側方 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) DEX 投与群

DEX 投与群の ELISA の結果および体重減少のグラフ、表現型の写真をそれぞれ表 1、2、図 1 に示す。ELISA score は対照群に比して低値を示し、また体重減少も軽度であり、抑制効果はあると思われたが、表現型に差は認めなかった。

b) CPA

CPA 投与群の ELISA の結果および体重減少のグラフ、表現型の写真をそれぞれ表 3、4、図 2 に示す。CPA の投与は脾細胞移植後 35 日目まで行ったが、薬物投与中は、ELISA score は有意差をもって完全に抑制され、また体重減少も認めず表現型の出現も認められなかった。CPA 投与中止後およそ 2 週間後に、CPA 投与群は ELISA score の上昇(表 5)と体重減少を認め(表 6)、また表現型の出現(図 3)も認められた。

以上、同様に他、m-PSL、AZP、CYA、FK506、MMF の投与を行った。

その比較のため、脾細胞移植 14 日目の ELISA score と体重減少の値を同日の対照群との比で表した (表 7)。CPA のみが有意差をもって抑制効果が見られた。

D. 考察

今回、昨年に引き続き、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。

昨年の PV モデルマウスの観察から、発症したモデルマウスのびらんの改善の評価が難しいことを実感していた。そこで今年度は、移植前からの薬剤投与により発症抑制が可能かどうかでその免疫抑制効果を評価した。

治療評価に先立ち、使用した 7 種類の薬剤につき、次のような予測を立てた。細胞傷害性の強い CPA や AZP は抑制効果が強く、それに次いで T、B 細胞の DNA 合成阻害剤である MMF およびステロイド剤である m-PSL、DEX、そして T 細胞に対してのみ抑制効果のある、CYA、FK506 は抑制効果が弱いと考えた。

結果、CPA は ELISA score および表現型ともに完全な発症抑制効果を認めた。AZP も抑制効果を認めたが副作用として貧血が見られ、投与量の問題があったかもしれない。MMF は予想に反して効果が弱かった。CYA の抑制効果は CPA に次いで強かったが、同系統薬剤である FK506 は抑制効果が弱かった。ステロイド剤はある程度の効果はあったものの、7 割程度の抑制効果であった。

また CPA 投与群は投与中止後 2~3 週間で症状の出現をみた。このことは、CPA による免疫抑制効果が可逆的であることを示しており、ヒトの PV の症状を正確に反映しているものと捉えることができる。

以上まとめると、

- CPA は薬剤投与中は完全に抗体産生抑制作用を認め、中止後約 2 週間で症状の出現を認めた。
- AZP は抑制効果を認めたが、副作用を認め、投与量を再考する必要があると思われた。
- MMF は効果が弱かった。

- ・ T 細胞特異的な薬剤である CYA と FK506 は、予想に反して、CYA のみに抑制効果を認めた。作用点は同じであるにも関わらず相反する結果の理由は不明である。
- ・ DEX、m-PSL は共に 7 割程度の効果を認めたが、完全に抑制効果は認めなかった。

今回、ヒトの PV に対して使用されている主な薬剤の評価を行った。完全にヒトと同じ抑制効果を示したとは言いがたいが、一定の抑制効果を示した。今後新しい免疫抑制療法の前臨床試験としてとして、有用な評価系になりうると考えられる。

今後は、自己免疫疾患の抗体産生の仕組みについて研究し、抗体特異的治療について究明していきたい。

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
高江雄二郎、天谷雅行、西川武二：天疱瘡モデルマウスを用いた Cyclophosphamide の免疫抑制効果の検討：第 787 回日本皮膚科学会東京地方会(研究地方会)

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
なし

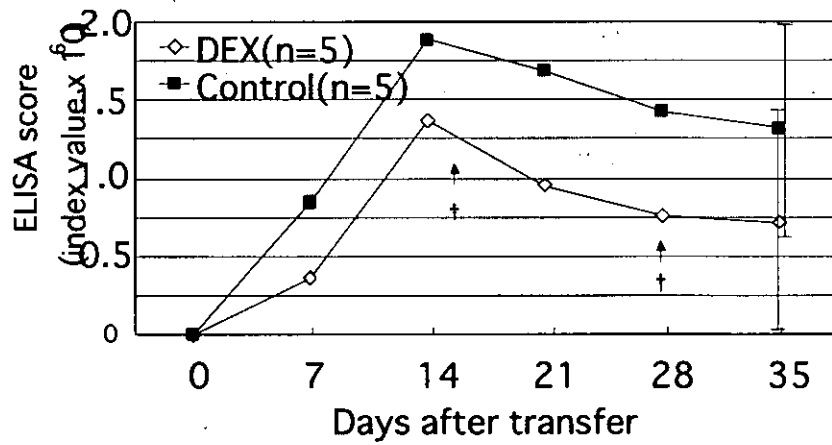


表1 DEXを投与したマウスのELISA score
DEX投与により、抑制効果は見られたが有意差はなかった。

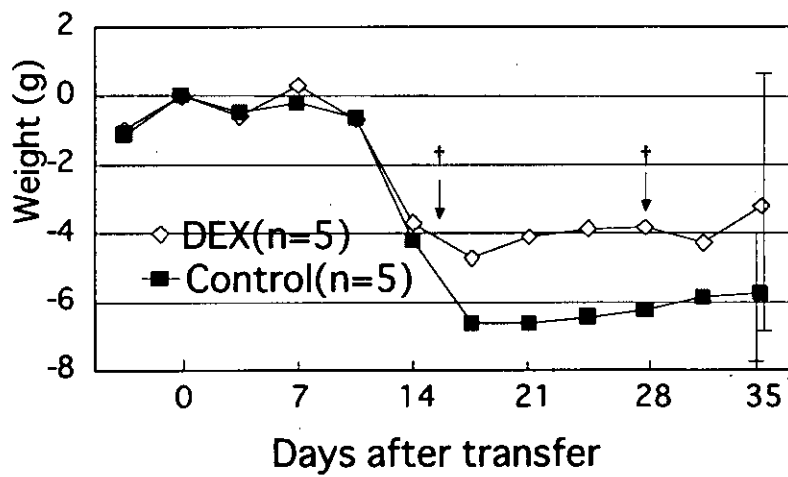


表2 DEXを投与したマウスの体重減少のグラフ
DEX投与群の体重減少は軽度だが、対照群と比して有意差は認めない。

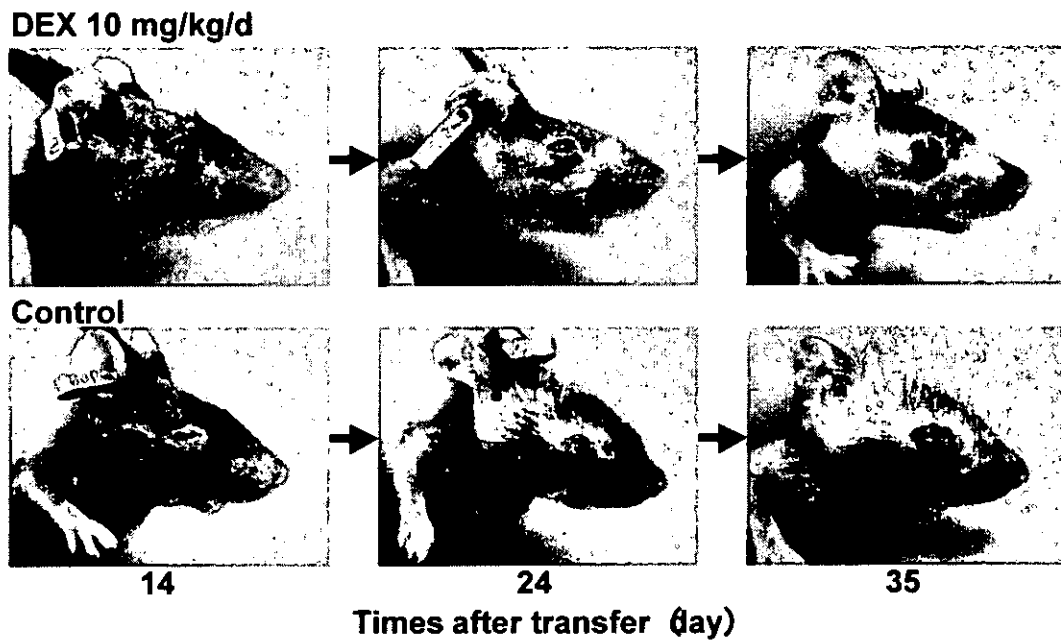


図1 DEX 投与群と対照群の表現型の写真（写真下の数字は移植日を0とし、経過した日にちを示す）
DEX 投与にても、対照群と比較して表現型に差はなかった。

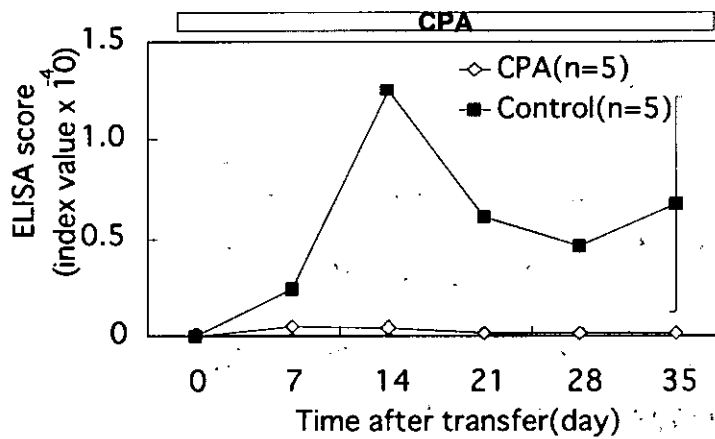


表3 CPA を投与したマウスの ELISA score(35 日目まで)
CPA 投与群の抗体産生は完全に抑制された。

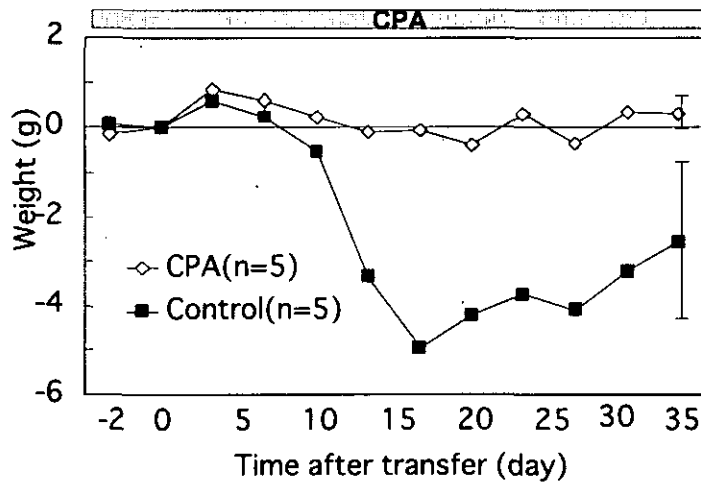


表4 CPA投与したマウスの体重減少のグラフ(35日目まで)
CPA投与群は体重減少を認めなかった。

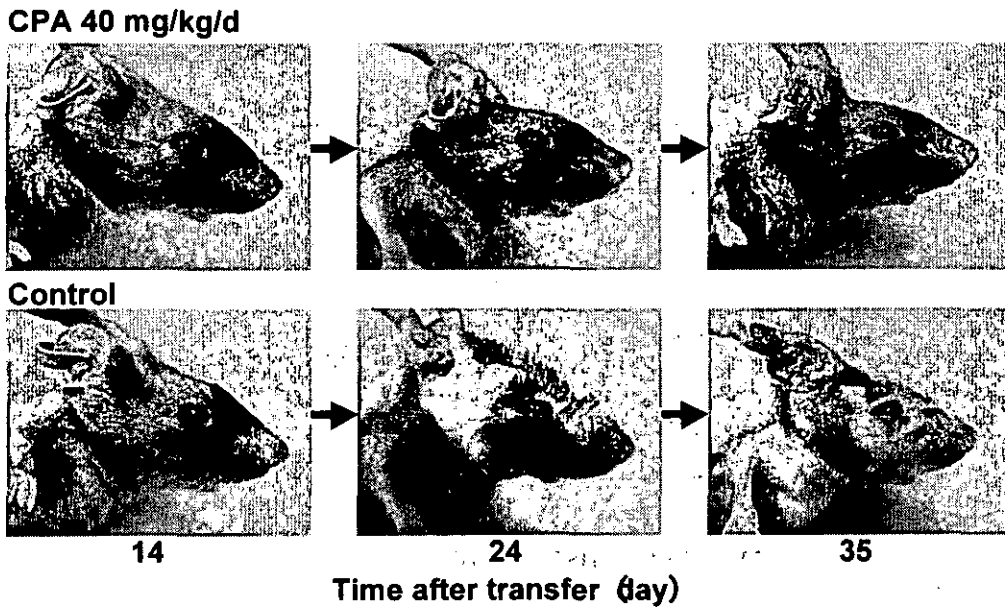


図2 CPAを投与したマウスの表現型の写真(35日目まで)
CPA投与により、表現型の出現は完全に抑制された。

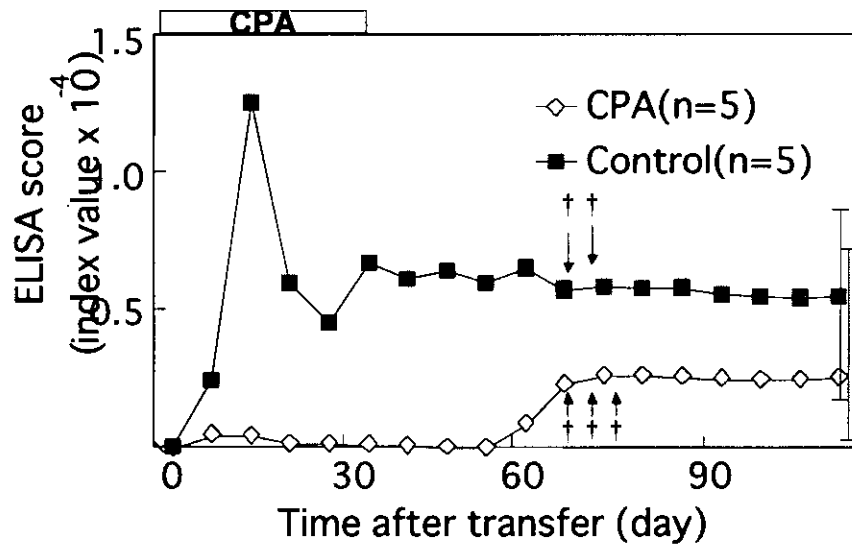


表5 DEX を投与したマウスの ELISA score(CPA 投与中止後)
CPA 投与中止後、2 週間ほどで抗体価の上昇を認めた。

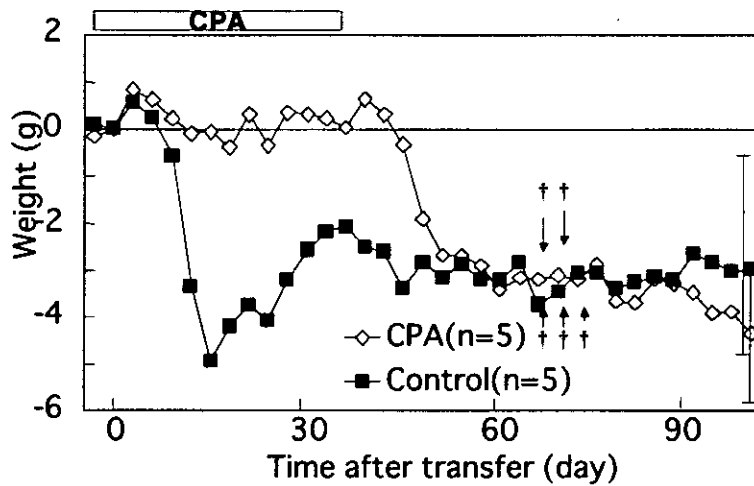


表6 CPA 投与したマウスの体重減少のグラフ(CPA 投与中止後)
CPA 投与中止後およそ 3 週間で体重減少を認めた。

CPA 40 mg/kg/d

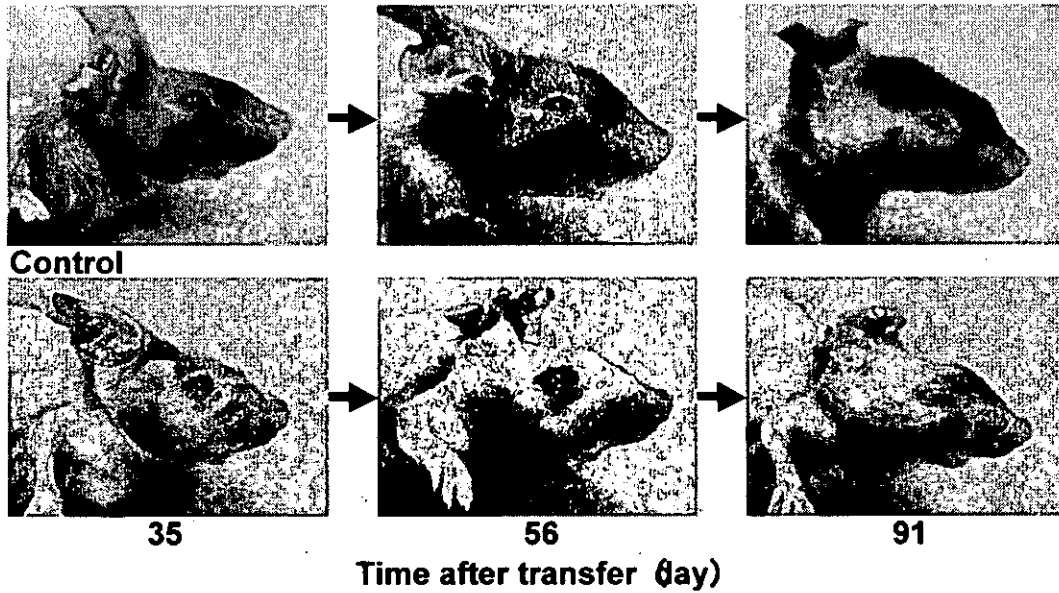


図3 CPAを投与したマウスの表現型の写真(CPA投与中止後) CPA投与中止により、表現型の出現を認めた。

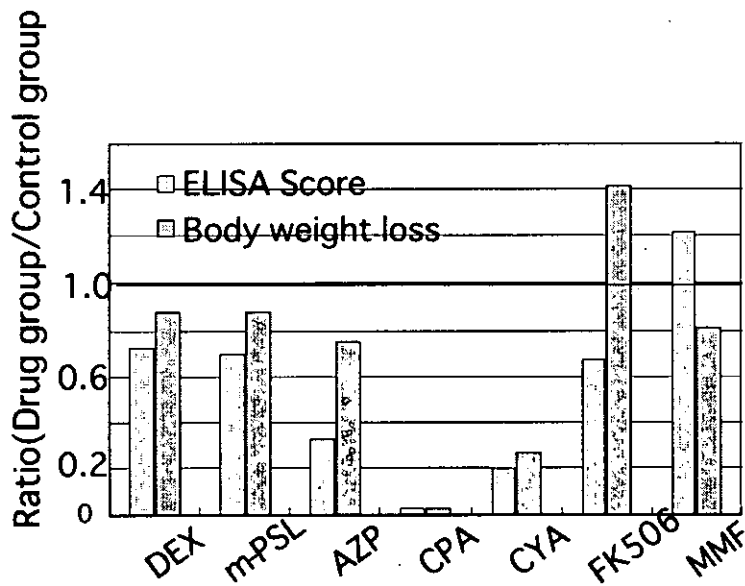


表7 脾細胞移植14日目のELISA scoreと体重減少値の対照群との比 CPA投与群が最も強い抑制効果を示し、有意差を認めた。

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

Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウスを用いた

B 細胞免疫寛容獲得機序の解析

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 尋常性天疱瘡は水疱形成を主体とする自己免疫疾患であり、表皮細胞間接着因子の 1 つであるデスマグレイン 3 (Dsg3) に対する IgG 自己抗体により水疱形成が誘導される。末梢抗原である天疱瘡抗原に対する B 細胞レベルの免疫寛容獲得機構は不明である。天疱瘡モデルマウスより単離された抗 Dsg3 モノクローナル抗体 AK7 (Dsg3 との反応性は示すが、水疱誘導はない) より、可変領域の cDNA を単離し、Dsg3 反応性 B 細胞トランスジェニックマウスを作成した。AK7 Dsg3 反応性 B 細胞が、骨髄のみならず、末梢リンパ組織である脾臓、リンパ節においても存在することが確認された。さらに、AK7 Dsg3 反応性 B 細胞は、*in vitro* において組換え Dsg3 の添加により増殖活性およびカルシウムの一時的上昇を認め、不活化されていないことが確認された。以上の結果より、AK7 Dsg3 反応性 B 細胞は、除去あるいは不活化による免疫寛容からエスケープしていることが示唆された。天疱瘡抗原に対する B 細胞レベルの免疫寛容は、当初考えられていたよりも、leaky である可能性が示唆された。

共同研究者

大田孝幸 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
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。

自己反応性の B 細胞のトレランスのメカニズムは様々な系を用いて明らかにされてきた。しかしながら末梢抗原のモデルにおいては自己抗原の発現部位によりその結果は異なる。トレランスのメカニズムは deletion、editing、anergy の 3 種に分類される。Dsg3 は主に皮膚、粘膜に発現しており、末梢抗原にあたる。Dsg3 に対し、B 細胞はどのようにしてトレランスを獲得するのかは不明である。今回我々は mouse Dsg3 に特異的なモノクローナル抗体 AK7 を用い IgM を発現する B 細胞トランスジェニックマウスを作製し、B 細胞の運命を検討することにより、天疱瘡抗原に対する

免疫寛容獲得機構を解明する。

B. 研究方法

1. トランスジェニックマウスの作成
抗 mDsg3 IgM 抗体の H 鎖と L 鎖のベクター 7AK-H、7AK-L を H 鎖のみ、もしくは H 鎖、L 鎖を当量混合し、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10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

末梢血は ACK lysis buffer にて赤血球を除いた。細胞は phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19 (1D3)、 FITC-conjugated anti-IgMa (DS-1), anti μ IgM(R6-60.2)で染色した。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. 骨髄および脾臓 B 細胞の解析

Dsg3 の発現部位よりトランスジェニック由来 B 細胞は末梢において除去されていることが予想された。しかしながら両鎖のトランスジェニックマウス AK7-LH1 では、骨髄だけではなく脾臓中に H 鎖のトランスジーン(IgM⁺)陽性細胞を認めた。しかしながら L 鎖においては allelic exclusion が不完全な為陽性である可能性がある。Dsg3 との反応性を確認したところ、ほぼ 90%の細胞が陽性であった。すなわちトランスジーン由来 L 鎖も適切に発現していると考えられた。さらに AK7-LH1-Rag2^{-/-}でも、トランスジーン陽性の B 細胞を脾臓中に認めた。従って末梢において B 細胞は除去されていないと考えられた。(図 1A,B)

また自己反応性の B 細胞の多くは腹腔内に認めると考えられている。本マウスではいわゆる B1B 細胞が減少しており、さらに Dsg3 との反応性を検討したところ、明らかな反応性を認めなかった。さらに AK7-LH1-Rag2^{-/-}では B1 細胞を全く認めなかった。従ってトランスジーン陽性の B 細胞は B1B 細胞に分化できないと考えられた。

2. Proliferation assay と Calcium mobilization assay

末梢においてトランスジーン陽性の B 細胞の存在は明らかになったが、これらの細胞は anergy が誘導され、不活性かされている可能性がある。従って、B 細胞を脾臓から B220 マイクロビーズを用い精製し、様々な刺激を加え検討した。B 細胞はコン

トロールの LPS で増殖し、細胞表面のレセプターの架橋を anti-IgM もしくは recombinant Dsg3 で行ったところ、増殖した。従って anergy は誘導されていないと考えられた。

次に不活化されていない B 細胞は様々な刺激により細胞内の Ca 濃度が一時的に上昇することが知られている。そこで、トランスジェニック由来の B 細胞を anti-IgM もしくは recombinant Dsg3 にて刺激した。B6 由来の B 細胞と異なりトランスジェニック由来の B 細胞は anti-IgM だけではなく、特異的な刺激である recombinant Dsg3 にて一時的な細胞内の Ca 濃度の上昇を認めた。これら 2つの結果から Dsg3 反応性 B 細胞は不活化されていないと考えられた。

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検討を行った。Dsg3 は主に末梢に発現しているため、Dsg3 反応性 B 細胞は骨髄では認められるが脾臓、リンパ節などの末梢リンパ節組織では除去されることが予想されたが、Dsg3 反応性 B 細胞は少なくとも末梢において除去されず、さらに、不活化もされていない。AK7 は基本的には水疱形成などの病原性を有してしないため、トレランスの誘導が行われなかった可能性がある。病原性の有無により B 細胞の挙動は異なる可能性も考えられる。今後我々は病原性を有する抗体 AK23 を用いトランスジェニックマウスを作製し、本マウスと B 細胞免疫寛容獲得機構の相違について比較検討する予定である。

E. 結論

病原性を有さない AK7 モノクローナル抗体から作成された B 細胞トランスジェニックマウスを用いた解析では、Dsg3 反応性 B 細胞は、除去、不活化も受けずに末梢リンパ組織に存在することが明らかにされた。皮膚及び粘膜の重層扁平上皮に発現する天疱瘡抗原に対する B 細胞レベルのトレランスは、当初考えられていたよりも、leaky である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
学会発表

Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Shimoda K,
Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S.
Tolerance escape of autoreactive B

lymphocytes against desmoglein 3 in transgenic
model mice (Plenary session). International
Investigative Dermatology, Miami Beach,
Florida, USA. 2003. 4.30- 5.4

H. 知的所有権の出願・登録状況（予
定を含む）

特になし

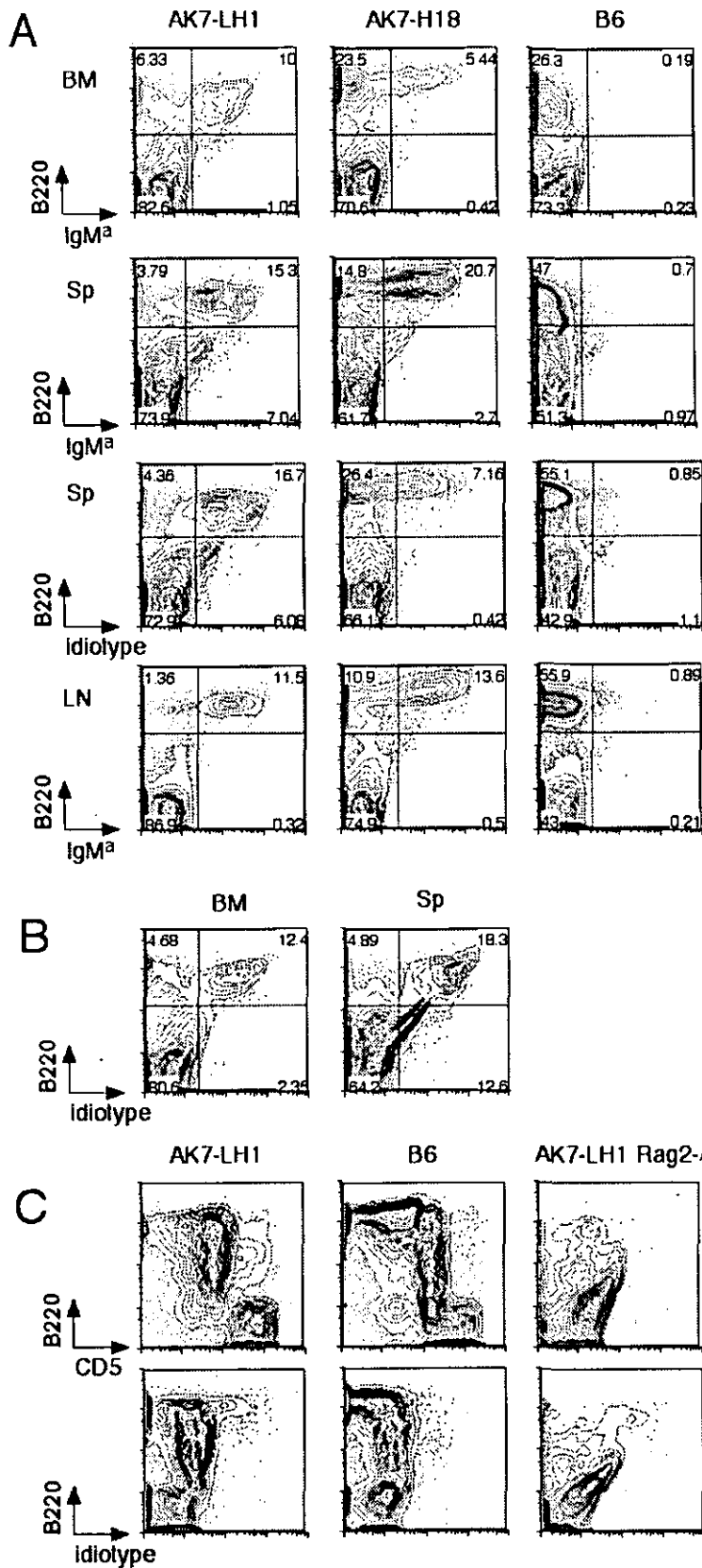


図1 H鎖、L鎖を含むAK7-LH1並びにH鎖のみを含むAK7-H18トランスジェニックマウスの解析

(A) AK7-LH1、AK7-H18トランスジェニックマウスの骨髄、脾臓、リンパ節の細胞をflow cytometryにて検討した。AK7-LH1マウスではIgM^a陽性細胞を骨髄だけではなく脾臓、リンパ節にも認めた。またこれらの細胞はDsg3と反応した。

(B) AK7-LH1-Rag2^{-/-}マウスにおいても骨髄と脾臓においてIgM^a陽性細胞を認めた。

(C) 腹腔内においてAK7-LH1マウスはB1B細胞の減少を認め、Dsg3との反応性を示しなかった。AK7-LH1-Rag2^{-/-}マウスにおいてはほとんどB細胞を認めなかった。

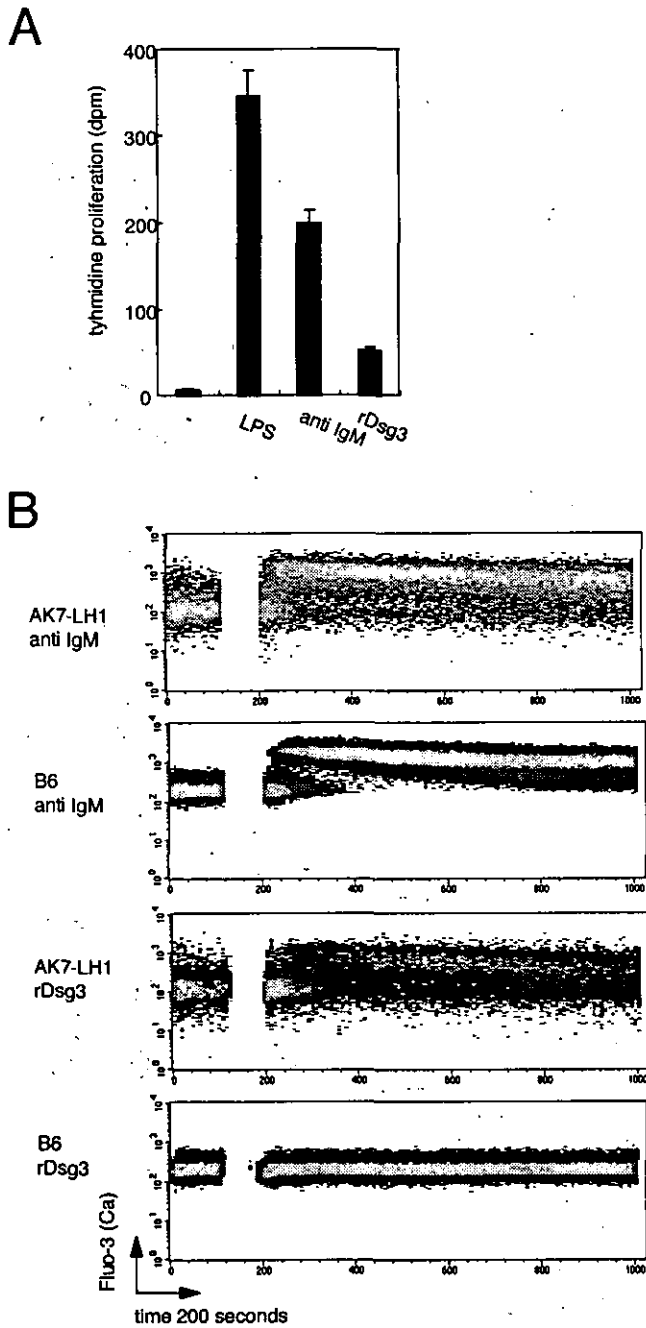


図 2 Proliferative assay と calcium mobilization assay.

(A) AK7-LH1 B 細胞は LPS、anti-IgM F(ab)₂'、rDsg3 の刺激にて増殖した。
 (B) Calcium mobilization assay. AK7-LH1 B 細胞は Fluo-3 でラベル calcium レベルを anti-IgM F(ab)₂' もしくは rDsg3 の刺激後測定した。B6 由来脾臓 B 細胞をコントロールとして用いた。

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を持つ Dsg3 反応性 T 細胞の特性を明らかにすることを目的としている。本年度は、大腸菌で作成したマウス Dsg3 (mDsg3) の細胞外ドメインをコードするリコンビナント断片を用いて mDsg3 特異的 T 細胞の検出を試みた。未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに移植することで作成した PV モデルマウスまたは未免疫 Dsg3^{-/-}マウスを用いて、*ex vivo* あるいは *in vitro* での抗原刺激により得られた T 細胞株における mDsg3 断片に対する T 細胞の反応性を検討した。その結果、*ex vivo* では mDsg3 に対する特異的 T 細胞の反応を検出できたが、特異性を維持したまま *in vitro* で増幅することは困難であった。今後、免疫および培養条件を検討することで実験系の最適化を目指す予定である。

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

A. 研究目的

尋常性天疱瘡 (PV) は皮膚角化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強い親和性を有する。また、抗 Dsg3 抗体産生と特定の HLA クラス II アリ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 細胞の解析が複数の研究グループにより行われてきたが、Dsg3 反応性 T 細胞が 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は明らかでない。最近、Amagai

スに移入することで抗 Dsg3 抗体産生と PV 発現系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 PV モデルマウスを用いることを着想した。本研究では、1)マウス Dsg3 (mDsg3) で免疫した Dsg3^{-/-}マウスからの mDsg3 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 mDsg3 抗体産生や PV 発現型の有無による mDsg3 反応性 T 細胞クローン株の病原性の確認、の 3 段階から構成される。さらに、個々の mDsg3 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（たとえば、特定の T 細胞エピ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もある。

昨年度に確立した Dsg3^{-/-}マウスの免疫条件および採取した脾細胞、リンパ節細胞

の培養条件に基づいてT細胞クローン株の樹立を試みてきたが、現時点でmDsg3に特異的なT細胞クローン株は得られていない。その原因のひとつとして、用いた昆虫細胞で発現させたリコンビナントmDsg3抗原の純度の低さが考えられた。そこで、現在より純度の高い抗原を作成し、それを用いた免疫培養条件の確立を目指している。ただし、リコンビナントmDsg3の純度を上げたために回収量が極端に減少したことから、大腸菌で発現、精製したりコンビナントmDsg3断片の併用を考えている。本年度は、大腸菌で作成したmDsg3の細胞外ドメインをカバーするリコンビナント断片を用いてmDsg3特異的T細胞を検出できるかどうかを検討した。

B. 研究方法

a) リコンビナント mDsg3 の作成

mDsg3を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た (rmDsg3-1~rmDsg3-9)。それぞれのリコンビナント蛋白は amylose resin を用いたアフィニティーにより精製した。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) PV モデルマウスを用いた mDsg3 と反応する T 細胞の検出

未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに移植し PV モデルマウスを作成した。PV 発現型を確認後に採取した脾臓をすりつぶし、ACK lysing buffer

(BioWhittaker, Walkersville, MD) を用いた溶血処理により脾細胞を調製した。以下の2つの方法でrmDsg3-1~5に対するT細胞の検出を試みた。

まず、脾細胞に含まれるT細胞の ex vivo での rmDsg3-1~5 に対する T 細胞の反応を調べた。10%仔牛胎児血清 (FBS) 添加 RPMI-1640 で調整した脾細胞 (2×10^4 cell/well) を 96 穴丸底プレートにまき、rmDsg3-1~5 および MBP (各 5 μ g/ml) を加えて 3 日間培養し、抗原刺激により誘導される T 細胞増殖反応を調べた。すなわ

ち、培養 56 時間後に 0.5 μ Ci/well の ³H-thymidine を添加し、その 16 時間後に細胞を回収して ³H-thymidine の取り込みを測定した。rmDsg3-1~5 に対する特異的反応は、個々のリコンビナント蛋白存在下で取り込まれた放射活性と MBP 存在下での放射活性との比を Stimulation Index (SI) として算出した。SI が 2 以上を特異的反応と判定した。

さらに、rmDsg3-1~5 による抗原刺激を in vitro で 2 回行うことで得られた T 細胞株の rmDsg3-1~5 に対する特異的反応も検討した。1%の C56BL/6 由来血清を添加した RPMI-1640 を初回刺激時の培地として用い、以後は 10%FBS 添加 RPMI-1640 を用いた。脾細胞 (3×10^6 /well) を 24 穴平底プレートにまき、rmDsg3-1~5 をそれぞれ 5 μ g/ml の終濃度で加えた。10 日目に凍結保存しておいた自己脾細胞 (1×10^6 /well) に X 線照射 (40Gy) し、rmDsg3-1~5 (各 5 μ g/ml) とともに培養中に加えた。サイトカインとして 3, 7, 10, 14, 17 日目に 1, 2, 5%の T-STIM™ (Becton-Dickinson, Bedford, MA) を加えた。21 日目に 96 穴丸底プレートに生存細胞 (10^4 /well) を X 線照射脾細胞 (2×10^4 /well) および 5 μ g/ml の rmDsg3-1~5, MBP とともに 3 ウェルずつ培養した。56 時間後に 0.5 μ Ci/well の ³H-thymidine を添加し、その 16 時間後に細胞を回収し、³H-thymidine の取り込みを測定した。rmDsg3-1~5 に対する特異的な T 細胞株の反応は SI により評価した。

c) Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を用いた mDsg3 と反応する T 細胞の検出

未免疫 Dsg3^{-/-}マウスより採取した脾細胞を用いて、上記と同様の方法で ex vivo (4 日間の培養) および in vitro での抗原刺激により得られた T 細胞株における rmDsg3-1~5 に対する特異的な T 細胞の反応を検出した。

d) 統計学的検定

2 群間の連続変数の比較は Mann-Whitney の U 検定により行った。

C. 研究結果

精製後の rmDsg3-1~5 の純度は 95% 以上であった。まず、これらリコンビナント断片を用いて PV モデルマウス脾 T 細胞の ex vivo での rmDsg3-1~5 に対する反応性を 11 例で検討した。特異的反応は rmDsg3-2 で 4 例、rmDsg3-3 で 1 例、rmDsg3-4 で 5 例に検出された。そこで、in vitro での繰り返し刺激により mDsg3 と反応する T 細胞株の樹立を試みたが、2 回の抗原刺激による 3 週間の培養中に、サイトカイン濃度と無関係にほぼ全ての細胞が死滅した。

そこで、未免疫の Dsg3^{-/-}マウス脾 T 細胞の ex vivo における rmDsg3-1~5 に対する反応性を 8 例で検討した (図 1)。すべてのリコンビナント mDsg3 断片に対する特異的反応が検出されたが、特に rmDsg3-2、rmDsg3-3、rmDsg3-4 に対しては全例が反応性を示した。さらに、rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に対する T 細胞反応性は他のリコンビナント mDsg3 断片に対する反応に比べて有意に高かった。そこで、rmDsg3-1~5 で繰り返し抗原刺激することで得られた T 細胞株の特異性を検討した。表 1 に示すとおり、rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に対する反応性が誘導されやすい傾向があったが、その頻度は低かった。また、添加したサイトカイン濃度との関連も認められなかった。

D. 考察

本研究では PV モデルマウス脾細胞と未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞の 2 つの実験系を用いて rmDsg3-1~5 反応性 T 細胞の誘導を試みた。PV モデルマウス脾細胞を用いた場合、3 週間の培養中にほとんどの脾細胞が死滅した。その理由として、モデルマウス体内で生じた強力な免疫応答のため、in vitro の環境では activation-induced cell death (AICD) により T 細胞が死滅してしまう可能性を考えた。AICD を防ぐことを目的として、サイトカインの種類、濃度を含め培養条件を検討したが、PV モデルマウス脾細胞を用いた特異的 T 細胞株の樹立は困難だった。一方、未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を用いると、ex vivo で安定した mDsg3 に対する T 細胞の反応が検

出された。ただし、反復した抗原刺激による T 細胞株の樹立を試みたが、再現性のある結果は得られなかった。その原因として in vitro で抗原を加えるだけの priming では免疫応答を誘導するのに十分でないためと考えた。SI が 2 以上の T 細胞株については限界希釈により T 細胞のクローニングを行うと同時に、今後は昆虫細胞で発現精製した高純度 rmDsg3 をマウスに免疫した後に脾細胞と膝窩リンパ節細胞を in vitro で大腸菌由来抗原を用いて刺激する新プロトコールの検討を行う。

Dsg3^{-/-}マウス脾細胞では rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に対する T 細胞の反応が得られやすかった。このことは Dsg3^{-/-}マウスにおいて Dsg3 反応性 T 細胞により認識される主要な T 細胞エピトープは rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に存在することを示唆する。PV 患者で検出された Dsg3 反応性 T 細胞が認識する T 細胞エピトープも rmDsg3-2 に相当するヒト Dsg3 部分に集中しており、MHC クラス II がヒト、マウス間で異なり、また自己と同種免疫の違いがあるにも関わらず、エピトープの類似性を認めた点は興味深い。

E. 結論

PV モデルマウスおよび未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞の ex vivo の解析において、mDsg3 に対する T 細胞の検出が可能であった。ただし、mDsg3 反応性 T 細胞の特異性を維持したまま in vitro で増幅することは困難であった。今後は、純度の高いリコンビナント mDsg3 抗原を用いて免疫および培養条件の最適化を目指す。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成 15 年度)

1. 論文発表

英語論文

- 1) Suzuki S, Tanaka K, Yasuoka H, Fukuuchi Y, Kawakami Y, Kuwana M. Autoreactive T cells to the P3A⁺ isoform of AChR α subunit in myasthenia gravis. **J Neuroimmunol** 137:177-186, 2003
- 2) Kajihara M, Kato S, Okazaki Y,

Kawakami Y, Ishii M, Ikeda Y, Kuwana M. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. **Hepatology** 37:1267-1276, 2003

3) Kuwana M. Autoreactive CD4⁺ T cells to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome.

Autoimmun Rev 2:192-198, 2003

4) Nomura S, Kuwana M, Ikeda Y. Induction of T-cell tolerance in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura by single injection of humanized monoclonal antibody to CD40 ligand.

Autoimmunity 36:317-319, 2003

5) Kuwana M, Nomura S, Fujimura K, Nagasawa T, Muto Y, Kurata Y, Tanaka S, Ikeda Y. The effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura. **Blood** 103:1229-1236, 2004

日本語論文

1) 桑名正隆、池田康夫: ステロイド/摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガンドを標的とした治療法. **臨床血液** 44: 82-89, 2003.

2) 桑名正隆: ITP に関する免疫学的研究の進歩. **日本臨床** 61: 670-675, 2003.

3) 桑名正隆: 樹状細胞のサブセット. **臨床検査** 47: 267-273, 2003.

4) 桑名正隆: 樹状細胞. **血液・腫瘍・免疫** 8: 100-106, 2003.

5) 安岡秀剛、桑名正隆: ベーチェット病の病態における MICA 反応性 CD8⁺T 細胞の関与. **臨床免疫** 39: 475-478, 2003.

6) 桑名正隆: CD40/CD154 相互作用遮断による Tr 細胞の誘導. **臨床免疫** 39: 228-231, 2003.

7) 桑名正隆: 自己免疫疾患における CD40/CD154 シグナル阻害療法. **日本臨床免疫学会会誌** 26: 259-266, 2003.

8) 桑名正隆、池田康夫: 自己免疫疾患に対する抗 CD154 抗体療法. **最新医学** 58: 81-87, 2003.

2. 学会発表

1) 安岡秀剛、河上裕、平形道人、池田康夫、桑名正隆: ベーチェット病における MICA 多型領域を認識する HLA-B51 拘束性 T 細胞の検出. 第 47 回日本リウマチ学会総会(東京). 2003. 4.

2) 安岡秀剛、水木信久、西田朋美、河上裕、平形道人、池田康夫、桑名正隆: ベーチェット病における細胞傷害性 T 細胞の活性化レベルの検討. 第 31 回日本臨床免疫学会(東京). 2003. 10.

3) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Matsuura E: Binding of β 2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. The 67th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Orlando). 2003. 10.

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし。