

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 16 年度分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスと Dsg3 欠損マウスにおける

デスモソーム分子構築の免疫電顕的比較検討

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 過去に尋常性天疱瘡(PV)の疾患モデルとなりうるマウスとしてPVの標的抗原であるデスモグレイン 3(Dsg3)のノックアウト(-/-)マウスおよびPVモデルマウスが作成されており、両者は棘融解発生の機序が異なるものの臨床および病理学的・電顕学的に類似したPV同様の表現形質を示す事を観察してきた。本研究では後包埋金コロイド免疫電顕法を用いてデスモソーム(DM)構成分子の微細局在をより詳細に解析し、2種のマウスの分子レベルでの違いを検討することにより、PVの水疱発生の機序の解明に迫った。Dsg3-/-マウスは、DM構成分子の分布を検討した結果、デスモプラキン(DP)のみが9nm有意に細胞内側に偏位していた。また、それぞれのDM構成分子の1デスモソームあたりの分子数を検討した結果、プラコグロビン(PG)のみに有意な減少を認めた。一方、PVモデルマウスでは、DPのみが24nmとより大きく有意に細胞内側に偏位していたが、1デスモソームあたりの分子数では有意な変化を示すものを認めなかった。DsgはPGとはDM内で直接強く結合しているが、DPとはPGを介して間接的に結合しているとされている。Dsg3-/-マウスでは、Dsg3の欠損によりデスモソーム内に組み込まれるPGの数が減少しているが、DPの数は正常であった。そのため相対的にPGがDPを保持する力が減少し、DPは細胞内骨格をになうケラチンに引っ張られ、細胞内に偏位していると考えた。一方、PVモデルマウスではPGの数や位置の変化を伴わずにDPが偏位していることから、自己抗体のDsg3への結合のシグナルが、直接結合してない細胞内のDPに伝達されたことが示唆された。以上より、本研究においてDsg3-/-マウスとPVモデルマウスのデスモソームで生じている変化に差があることが示された。また、PVモデルマウスにおける自己抗体結合後デスモソーム内にシグナルが伝達される機序の存在が示唆され、その結果PGとDPの間の相互作用に変化を生じていると考えられた。

共同研究者
齋藤 京
(慶應義塾大学医学部皮膚科助手)

尋常性天疱瘡(PV)は細胞間接着構造であるデスモソームの構成蛋白の一つであるデスモグレイン 3(Dsg3)を標的抗原とする自己免疫性疾患であるが、自己抗体がDsg3に結合してから水疱形成までの発症機序つ

A. 研究目的

いては未だ不明な部分が多い。過去に PV の疾患モデルとなり得るマウスとして Dsg3 ノックアウト(-/-)マウスおよび PV モデルマウスが作成されているが、両者は本来棘融解発生の機序が根本的に異なる。それにも関わらず、両者はその臨床および病理学的に極めて類似しており、ともに尋常性天疱瘡類似の表現形質を示す。さらに我々は、電顕学的観察においても両者の所見が酷似している事を平成 12 年度の本厚生科学研究報告書の分担研究として報告した。本研究では後包埋金コロイド免疫電顕法を用いてデスモソーム構成分子のデスモソームにおける微細分布および 1 デスモソームあたりの数を詳細に解析し、2 種のマウスの違いを比較検討することにより、PV の水疱発生の機序に迫ることを目的とした。

B. 研究方法

後包埋金コロイド免疫電顕法

免疫電顕用試料は、Dsg3-/-マウスおよびそのコントロールの B6 マウス、PV モデルマウスおよびそのコントロールの 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。免疫染色においてはデスモソーム構成分子を検出する一次抗体として 1: rabbit anti-desmoplakin (DP) (1:40, Research Diagnostics; Flanders, NJ, USA), 2: rabbit anti-plakoglobin (PG) (1:40, H80, Santa Cruz Biochnology, Santa Cruz, California), 3: mouse anti-plakophilin1 (1:4, 5C2, PROGEN, Heidelberg, Germany), 4: guinea pig anti-desmocollin1 (1:100, gp899, a kind gift from Dr. PJ Koch), 5: guinea pig anti-desmocollin3 (1:400, gp2280, a kind gift from Dr. PJ Koch), 6: mouse anti-desmoglein1 (1:40, DG3.10,

Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA) の 6 種の抗体を用意し、Dsg3-/-マウスは 6 種、PV モデルマウスは使用可能な 1, 2, 4, 5 の 4 種 (免疫動物がマウスでない抗体) を用いた。おのおのの一次抗体を 4℃ 下で一晩反応させさらに 5nm 金コロイド標識の二次抗体を室温下で 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。

観察および統計学的検討

免疫染色を施した標本の金コロイド標識の分布を免疫電顕にて観察し、細胞膜が垂直に切れた形態の良いデスモソームを選択して多数撮影する。その際、棘融解を生じていない有棘層中層のものに統一して観察した。それぞれの抗体によって免疫染色を施した標本の電顕写真上にてデスモソーム上にラベリングされた金標識 (最低 300 個以上) の距離を細胞膜から計測して (図 1) ヒストグラムを作成しコントロールとの間で生じる差を Dsg3-/-マウスと PV モデルマウスで比較することで、構成分子の位置の変化を検討する。また同時に 1 デスモソームあたりの金標識数をデスモソーム最低 25 個以上につきカウントし、コントロールとの差を統計学的に比較することで、構成分子の数の変化を検討する。

C. 研究結果

Dsg3-/-マウス

抗原分布の検討では、Dsg3-/-マウスはコントロールと比較して DP のみが平均値において 9nm 有意に細胞内側に偏位し、他の構成分子は有意な変化を認めなかった (図 2)。また、1 デスモソームあたりの抗原標識数の検討では PG に有意な減少を認め、他の構成分子は有意な変化を認めなかった。

PV モデルマウス

抗原分布の検討では、PV モデルマウスはコントロールと比較して Dp のみが平均値において 24nm と大きく有意に細胞内側に偏位し、他の構成分子は有意な変化を認めなかった (図 3)。また、1 デスモソーム

ムあたりの抗原標識数の検討では PG を含めたすべての構成分子において有意な変化を認めなかった。

D. 考察

過去の研究論文によると、デスモソーム内の主要分子の構築では (図 4) Dsg は PG とは直接強く結合しているが、DP とは PG を介して間接的に結合しているとされている。Dsg3^{-/-}マウスにおける PG の数が減少していたは、直接結合すべき Dsg3 の欠損によりデスモソーム内に組み込まれる PG 分子が減少したためと考えた。また、DP の数は Dsg3 の欠損の影響を受けず、変化していないため、相対的に DP を係留すべき PG の数が不足し、PG が DP を保持する力が減少するため、DP はもう一方の端で結合するケラチンに引っ張られ、細胞内に偏位していると考えた。

一方、PV モデルマウスは PG の数の変化がないことから、DP の大きな偏位を Dsg3^{-/-}マウスと同様の機序では説明できない。PV モデルマウス内では PG の位置の変化を伴わずに DP が偏位していることから、変化は PG と DP の間で起きていると考えられた。つまり自己抗体が Dsg3 へ結合したシグナルが何らかの機序で細胞質内に伝達され、PG と DP 間の分子間相互作用が変化し DP が大きく偏位したと考えるのが妥当であると思われた。

PV の水疱発生機序には抗体による分子間結合の直接阻害、自己抗体結合のシグナルの伝達による細胞内変化、Dsg3 分子の減少による結合の脆弱化などがあり、どの機序が、どのように、どの程度水疱形成に関与しているのか、現在共通の見解を得られていない。今回の研究結果からは PV の *in vivo* におけるシグナル伝達機序の存在が示唆された。

E. 結論

類似の表現形を呈する Dsg3^{-/-}マウスと PV モデルマウスであるが、デスモソームで生じている変化に両者に差があることが証明された。また、PV モデルマウスにおける自己抗体結合後デスモソーム内にシグナルが伝達される機序の存在が示唆され、その結果 PG と DP の間の相互作用に変化を生じていると考えられた。

F. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表

英語論文
作成中

2. 学会発表

齋藤 京、清水 篤、石河 晃、西川武二
デスモグレイン 3^{-/-}マウスにおけるデスモソーム構成蛋白微細局在の免疫電顕的解析。第 789 回日本皮膚科学会東京地方会、東京、2004.03.

Saito H, Ishiko A, Shimizu A, Nishikawa T. The ultrastructural localization of desmosomal components in Desmoglein3 knockout mouse. 31st Annual Meeting SCUR, Roma, Italy, 2004. 05.

齋藤 京、清水 篤、石河 晃、天谷雅行、西川武二
天疱瘡モデルマウスにおけるデスモソーム構成蛋白微細局在の免疫電顕的解析 第 31 回日本電顕皮膚生物学会学術大会、鹿児島、2004.10.

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

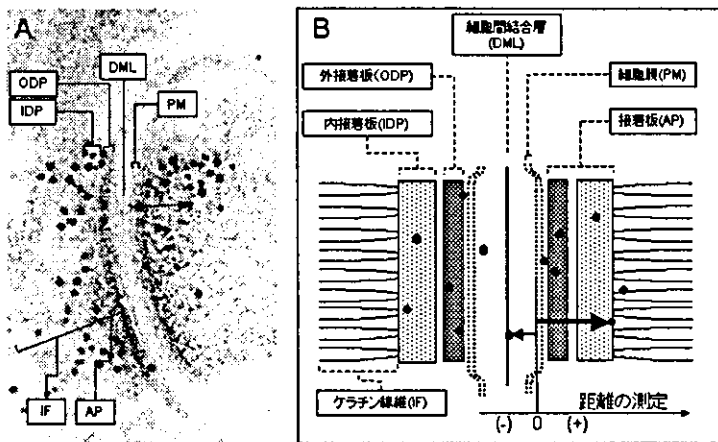


図1 後包埋金コロイド免疫電顕法で撮影したデスモソームの写真(A)と模式図(B)。黒点が金コロイドの標識であり、矢印の如く細胞膜外層と金標識との距離および1デスモソームあたりの金標識数を計測した。

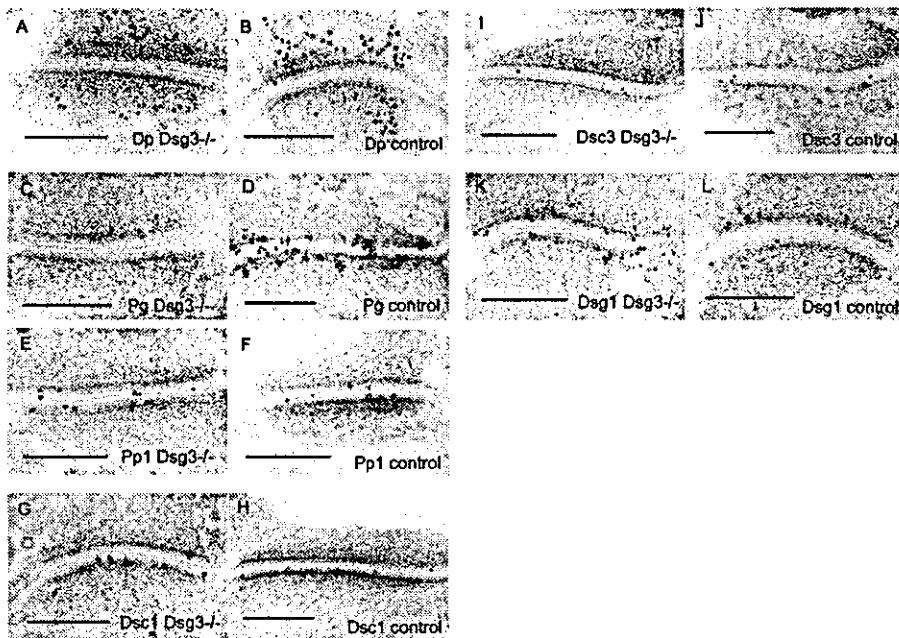


図2 A,C,E,G,I,KはDsg3^{-/-}マウス、B,D,F,H,J,Lはコントロールマウスにおけるデスモソームの免疫電顕的所見である。すべての構成分子においてDsg3^{-/-}マウスとコントロールマウスとの明らかな差を認めない。抗デスモブラキン(Dp)抗体(A,B)は細胞内領域に主にラベルが分布し、抗プラコグロビン(Pg)抗体(C,D)、抗デスモグレイン1(Dsg1)抗体(K,L)は外接着板領域に、抗プラコフィリン1(Pp1)抗体(E,F)、抗デスモコリン1(Dsc1)抗体(G,H)、抗Dsc3抗体(I,J)は細胞膜近傍に分布した。Bar=200nm

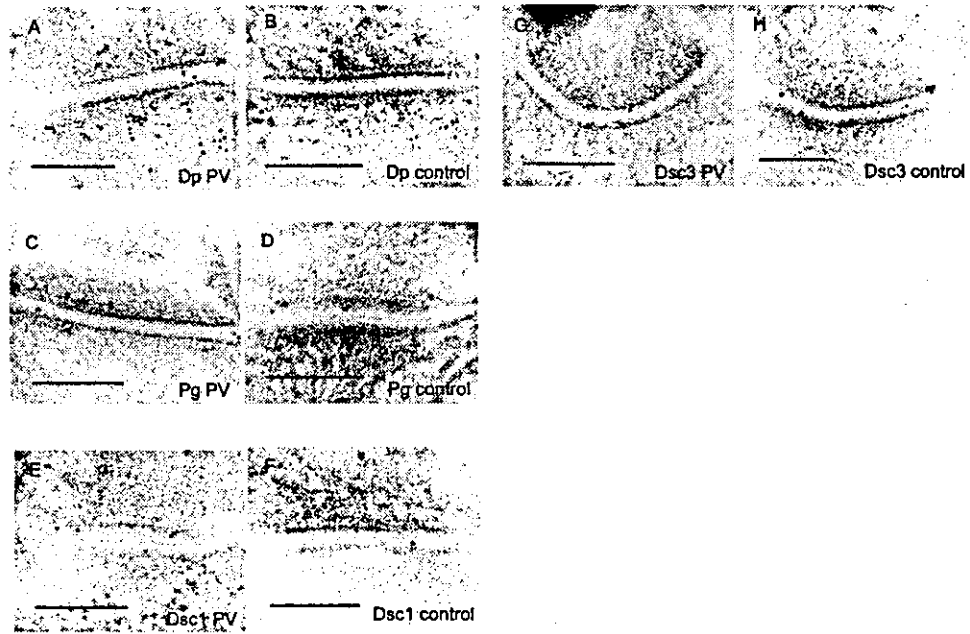


図3 A,C,E,GはPVモデルマウス、B,D,F,Hはコントロールマウスにおけるデスモソームの免疫電顕的所見である。注意して観察すると抗デスモプラキン(Dp)抗体はPVモデルマウス(A)の方がコントロールマウス(B)と比較し分布がより細胞内領域にばらけて分布していた。抗プラコグロビン(Pg)抗体(C,D)は外接着板領域に、抗デスモコリン1(Dsc1)抗体(E,F)、抗Dsc3抗体(G,H)は細胞膜近傍に分布し、特にPVモデルマウスとコントロールマウスで明らかな差を認めない。Bar=200nm

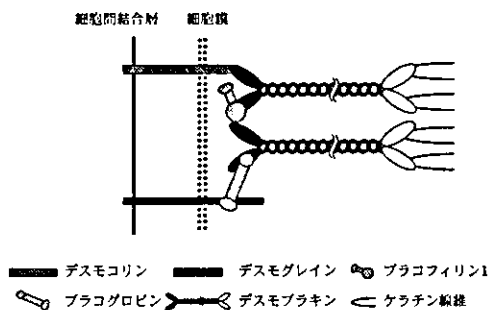


図4 過去の報告を元に作成したデスモソーム内の構成分子の模式図。デスモプラキンとデスモグレインはプラコグロビンを介して間接的に結合している。

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 専任講師

研究要旨 前年度までに我々は、天疱瘡抗原であるデスマグレイン3（Dsg3）が、野生型マウス胸腺において少数の髄質胸腺上皮細胞に発現していることを確認した。今年度、胸腺におけるDsg3陽性細胞はDsg3以外のデスモゾーム構成タンパクを共に発現していることを二重染色法により示し、さらにこれらの細胞は角化細胞が通常発現しえない末梢抗原をも発現していることを示した。胸腺において発現されるDsg3は、細胞接着因子としてではなくDsg3に対する免疫寛容を誘導するために存在する可能性が示唆された。

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

胸腺組織におけるDsg3発現の意義を検討する。

B. 研究方法

野生型マウス、Dsg3ノックアウトマウス、Aireノックアウトマウスの胸腺を摘出し、凍結切片を作製した。我々の既に作成した抗マウスDsg3モノクローナル抗体およびDsg1, desmoplakin, PSA, S-100, reninのそれぞれに対する既存の抗体を反応させ、蛍光抗体法（二重染色法）により観察した。

C. 研究結果

野生型マウス胸腺におけるDsg3陽性細胞は、Dsg1, desmoplakin, PSA, S-100, reninがともに陽性であった。Aireノックアウトマウス胸腺においては明らかなDsg3陽性所見を認めなかった。

D. 考察

Dsg3は重層扁平上皮のデスモゾームに存在し、細胞接着機能を持つタンパクである。しかし胸腺においてDsg3は個細胞性

に、細胞間ではない部位に発現しており、その細胞は角化細胞が通常発現しえない他の末梢抗原をも発現していることが、今年度の実験によって新たに示された。近年、胸腺における種々の末梢抗原の発現がAire遺伝子の支配下にあることが示唆され、Aireノックアウトマウスでは多臓器に自己免疫反応がおこることが知られている。

また、Aireノックアウトマウスの胸腺でDsg3発現の著明な減弱を認めたことから、Dsg3はAire遺伝子の支配下に髄質胸腺上皮細胞で発現される種々の末梢抗原の1つであり、胸腺におけるDsg3の存在意義はDsg3に対する免疫寛容誘導にある可能性が示唆された。

E. 結論

野生型成熟マウス胸腺においてDsg3を発現する髄質胸腺上皮細胞は、他のデスモゾームタンパク（Dsg1, desmoplakin）および性質の異なる末梢抗原（PSA, S-100, rennin）を共に発現する。胸腺におけるDsg3の発現はDsg3に対する免疫寛容誘導に関与している可能性がある。

G. 研究発表

学会発表

和田直子、西藤公司、天谷雅行（慶大）、山田健人（同病理）マウス胸腺におけるデスマグレイン3発現の検討 第796回日本皮膚科学会東京地方会 2004年12月18

日、東京

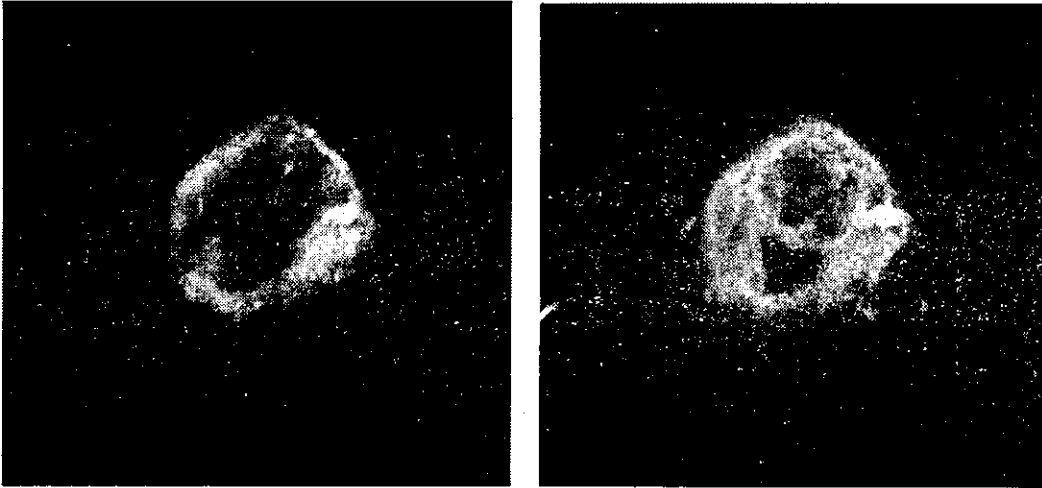


図1 野生型マウス胸腺 凍結組織切片蛍光抗体二重染色法（左右同一切片）
左：抗 Dsg3 抗体染色 右：抗 Dsg1 抗体染色
Dsg3 陽性の同一細胞が Dsg1 陽性である。

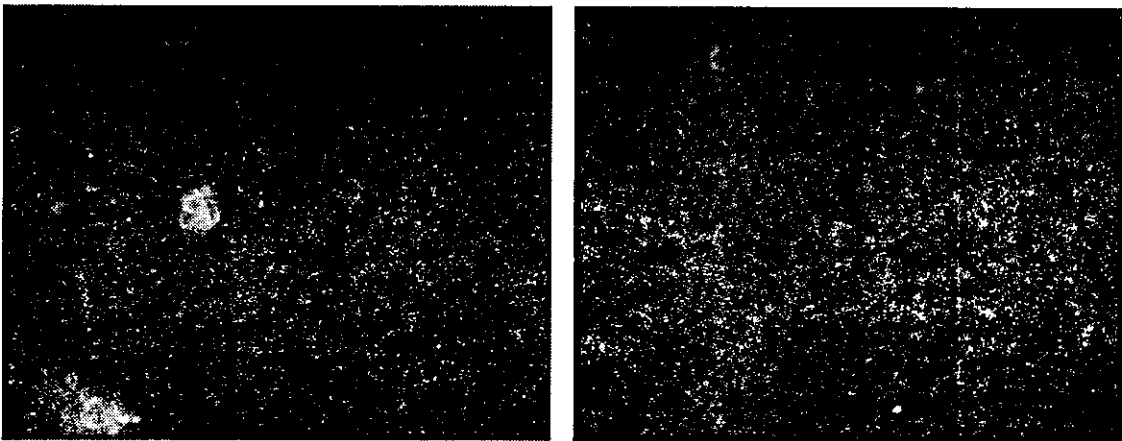


図2 マウス胸腺 凍結組織切片 抗 Dsg3 抗体染色蛍光抗体法
左：野生型マウス胸腺 右：Aire ノックアウトマウス胸腺
Aire ノックアウトマウス胸腺では Dsg3 発現が著明に減弱している。

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16年度分担研究報告書

表面プラズモン共鳴センサーを用いた抗Dsg3モノクローナル抗体

結合カイネティクス解析

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 これまでにわれわれは、尋常性天疱瘡（PV）モデルマウスより抗 Dsg3 モノクローナル抗体（mAb）を複数作製し、その病原性、エピトープに関する詳細な解析を行った。その結果、mAb の病原性を規定する一つの因子として、抗体のエピトープが重要である事を示してきた。今回われわれはエピトープの他に mAb の病原性に関与する可能性がある因子として抗 Dsg3 mAb と Dsg 蛋白の抗原抗体反応カイネティクスに注目し解析を行った。AK mAb の Dsg3 に対する結合カイネティクスは病原性と明らかな相関は認められなかったものの、抗体により結合カイネティクスが異なることが明らかとなり、エピトープの他に病原性を左右する可能性が示唆された。

共同研究者

角田和之（慶應義塾大学医学部皮膚科・
総合医科学研究センター特別研究助手）
天谷雅行（慶應義塾大学医学部皮膚科専
任講師）

A. 研究目的

PV モデルマウスより作製した抗 Dsg3 mAb と Dsg 蛋白における結合カイネティクスを測定し、抗体の特異性との相関関係を解析する。

B. 研究方法

a)モノクローナル抗体の作製

PV の表現型を有する PV モデルマウスより抗 Dsg 3 マウス IgG mAb (AK mAb) を単離し、HiTrap rProtein A FF column (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)にて精製後、desulting column (Amersham Bioscience)にて脱塩した。

b)結合カイネティクスの測定

表面プラズモンセンサー・Biacore 200 (Biacore 社)を用いて結合カイネティクス

の解析を行った。センサーチップ CM5 に 2000 (Resonance Unit; RU)の AK mAb をアミノカップリング法にて固定化した。ランニングバッファー (HBS-P: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.005%Surfactant P20, 0.5mM CaCl₂p, H7.4) 中に各 Dsg 蛋白をアナライトととして混濁し一定の流速で反応させた。再生バッファーは 10mM Gly-HCl pH2.0 を用いた。

C.結果

本研究ではそれぞれ特性の異なる以下の代表的な 3 クローンの AK mAb を用いた。

1, AK9 mAb はマウス Dsg3 の細胞外領域の C 末端側を認識する。2, AK18 mAb は中央部を認識する。また両クローン共に明らかな病原性を有さない。3, AK23 mAb は N 末端側を認識し強い病原性を有するクローンである事が確認されている。これらのクローンと mouse Dsg3 の反応性に関する解析を行った。

表面プラズモンセンサーにて AK mAb と Dsg 蛋白の結合反応を観察することが可能であった (図 1, 図 2)。これらの反応より得られたパラメーターより結合カイネ

ティクス；解離定数 (K_D) を以下の式によって求める。K_D = 解離速度定数 (K_{dissociation}; K_d) / 結合速度定数 (K_{association}; K_a)。K_a 値は AK23 mAb、AK18 mAb、AK9 mAb の順で大きかった。また K_d 値は AK9 mAb、AK23 mAb、AK18 mAb の順で大きかった。以上の結果より算出される K_D 値は AK18 mAb、AK23 mAb、AK9 mAb の順で小さく、総合的には AK18 mAb のアフィニティが mouse Dsg3 に対しては最も高いと考えられた (表 1)。

つぎに、同一チップ上に同量の各 AK mAb (2000RU) を固定し、同時に mouse Dsg3 を反応させた結果、アフィニティが最も強かったのは AK18 mAb で続いて AK23 mAb、AK9 mAb の順であった。一方、同条件下で human Dsg3 と反応させたところそのアフィニティは AK18 mAb、AK9 mAb に比較して AK23 mAb が圧倒的に強かった (図 2)。

D. 考察

現在までにわれわれは AK mAb の特異性について以下の結果を得ている。1, 複数存在するクローンの中で、AK19 mAb と AK23 mAb は新生マウスの受動免疫で水疱形成を誘導する。2, AK23 mAb のみが成体マウスを用いた腹水形成法で水疱形成を誘導する。3, 病原性を有するクローンは Dsg3 の Ca 依存性の三次元エピトープを認識する。4, 明らかな病原性を有さないクローンは Dsg3 の細胞外領域の中央部からカルボキシ末端領域を認識し、病原性を有するクローンはアミノ末端を認識する。5, 強い病原性を示す AK23 mAb は Dsg3 のアミノ末端の V3、K7、P8、D59 を認識する。

これらのアミノ酸はカドヘリンの接着面を形成するアミノ酸である。

以上の事実より AK mAb の病原性はそのエピトープによって定義づけることが可能であることを示した。

一方、抗原と抗体の結合の強さ (アフィニティ) は病原性を定義する事ができる可能性があると考えられる。そこで本研究では AK mAb の病原性と結合カイネティクスに何らかの相関関係が存在するかについて検討した。AK mAb とマウス Dsg3 との反応性においては、明らかな病原性を有さない AK18 mAb のアフィニティが最も強く、続いて AK23、AK18 mAb の順であった。現時点では病原性の強さとアフィニティの強さにおける明らかな相関関係は見いだせていない。一方、AK mAb と human Dsg3 のアフィニティを検討してみると AK23 mAb が明らかに他の mAb に比べて強いものであった。この事実は、AK23 mAb を mouse、human の ELISA 法で抗体価を測定すると human に対する抗体価が mouse に比べて数倍高く、Biacore における結果と一致していた。

本研究では mAb の結合性の heterogeneity を確認することができたが、今後さらなる条件設定による検討が必要になると思われる。またエピトープや結合カイネティクスの他にも何らかの病原性に関与する因子が存在する可能性もあり、さらなる検討が必要であると考えられた。

	AK 9	AK18	AK23
K _{ass} (1/Ms)	0.25	0.22	0.18
K _{diss} (1/s)	1.0 x 10 ⁻³	2.0 x 10 ⁻⁴	2.6 x 10 ⁻⁴
K _D (mM)	4.1 x 10 ⁻³	9.4 x 10 ⁻⁴	1.4 x 10 ⁻³

表 1 AK mAb と mouse Dsg3 における結合カイネティクス

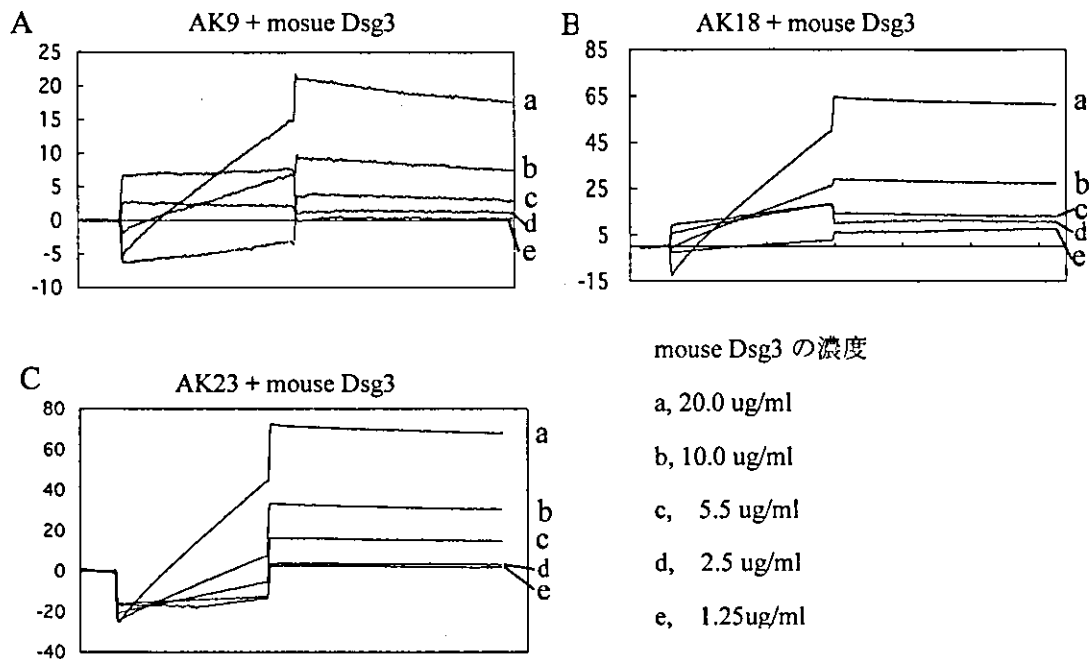


図 1、AK mAb と mouse Dsg3 のセンサーグラム
 A、AK9 mAb、B、AK18 mAb、C、AK23 mAb を固定化したセンサーチップに、同じ流速 (10ul/min) で mouse Dsg3 蛋白を反応させたセンサーグラム。各 AK mA とともに濃度に依存した結合量の推移を認めた。

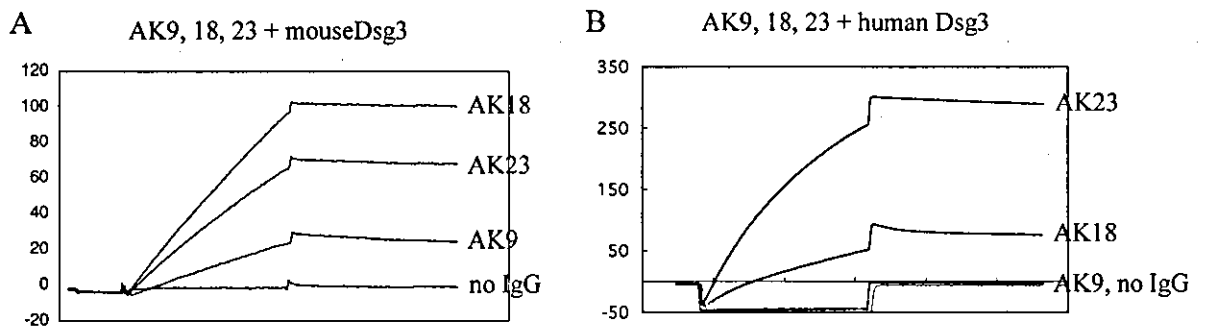


図 2、AK mAb と mouse・humanDsg3 のセンサーグラム
 同一チップ上に同量 (2000RU) の AK18・AK23・AK9 mAb を固定し、50ug/ml の mouse Dsg3 を同時に反応させた。A、mouse Dsg3 に対する結合量は AK18 mAb が一番大きかった。B、ヒト Dsg3 に対する反応性は AK23 mAb がもっとも強かった。

天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 I

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 教授

研究要旨 我々は、既にデスマグレイン3 ノックアウト (Dsg3^{-/-}) マウスを組み換え Dsg3 で免疫し、抗 Dsg3 抗体の産生を確認後、その脾細胞を T 細胞 B 細胞を欠く Rag2^{-/-}マウスに移植する事で尋常性天疱瘡 (PV) モデルマウスを作製してきた。従来使用されていた Dsg3^{-/-}マウスの遺伝的背景は、C57BL/6 と 129/Sv のミックスバックであり、詳細な免疫反応を検討する際の障害となっていた。C57BL/6 あるいは BALB/c に 12 代戻し交配した Dsg3^{-/-}マウスは、生育不良となり、不適當であった。今回、129/Sv に 12 代戻し交配した Dsg3^{-/-}マウスは生育可能であることを確認し、129/Sv バックの Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を 129/Sv バック Rag2^{-/-}マウスに移植することにより作成した天疱瘡モデルマウスが、従来のモデルマウスと同様の表現型を呈することを確認した。129/Sv バックの Dsg3^{-/-}マウスを用いて作成した天疱瘡モデルは、今後詳細な免疫反応を検討する上で有用である。

共同研究者
横山知明、天谷雅行
慶應義塾大学医学部皮膚科学

A. 研究目的

免疫学的研究を行うにあたり、遺伝的背景の均一化は重要である。従来我々が用いていた Dsg3^{-/-}マウスの遺伝的背景は C57BL/6 と 129/Sv が混合しており、一方 Rag2^{-/-}マウスは C57BL/6 の背景を持ち、均一とはいえなかった。遺伝的背景の均一化を図るために Dsg3^{-/-}マウスを C57BL/6 と Balb/c の 2 系統に 12 代の戻し交配をしたが、結果として得られたマウスではホモ個体が生後間もなく死亡することが明らかとなり、モデルマウスに用いることが困難であった。

そこで我々はさらに 129/Sv に 12 代の戻し交配を行うこととした。今回、8 代目の戻し交配によってホモ個体が生後まで成育することが分かったため、このマウスと 129/Sv の遺伝的背景を持つ Rag2^{-/-}マウスを用いてモデルマウスの作成が可能である

事を確認することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1.PV モデルマウスの作成 (免疫)

129/Sv バックの Dsg3^{-/-}マウスを、10 μg の組み換え Dsg3 蛋白と、complete Freund's adjuvant にて免疫した。1 週間後、同量の Dsg3 蛋白と imcomplete Freund's adjuvant にて免疫し、さらに 1 週間後に同様に免疫した。その後、Dsg3 蛋白のみにて 2 回の免疫を行った。抗 Dsg3 抗体産生を、マウスケラチノサイトの cell line である PAM212 細胞を用いた living keratinocyte staining と ELISA 法で確認した。抗体産生の確認後、Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を 1 匹あたり 4.5x10⁷ 個または 1.3x10⁷ 個ずつ、129/Sv バックの 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、糜爛・脱毛などの臨床症状の観察、体重減少の確認、ELISA 法による抗 Dsg3 抗体価の測定によって行った。マウス Dsg3 抗体価が中等度

の PV モデルマウス血清を陽性コントロール、正常マウスの血清を陰性コントロールとした。波長 450nm にて吸光度を測定し、次式で計算し Index 値を算出した。
$$\text{Index} = (\text{検体の OD} - \text{陰性コントロールの OD}) / (\text{陽性コントロールの OD} - \text{陰性コントロールの OD}) \times 100。$$

2. PV モデルマウスの作成 (未免疫)

129/Sv バックの未免疫の Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を、129/Sv バックの Rag2^{-/-}マウスに 1 匹あたり 5.0×10^7 個ずつ、経静脈的に移植した。

モデルマウスの発症の確認は、糜爛・脱毛などの臨床症状の観察、体重減少の確認、ELISA 法による抗 Dsg3 抗体価の測定によって行った。上記と同様に Index 値を算出した。

C. 研究結果

1. PV モデルマウスの作成 (免疫)

脾細胞移入後の血清中抗 Dsg3 抗体価の ELISA の結果 (図1)、体重変化のグラフ (図2)、臨床症状 (図3) を示す。移入後 7 日目から抗 Dsg3 抗体の出現が認められ、移入後 14 日頃に抗体価は最大値を示し、その後一旦減少するものの、移入後 100 日を経過しても抗体の産生が認められた。脾細胞の移入後 2 週目ころより、耳介周囲、頭頂部、顔面など、機械的刺激のある部位から脱毛が見られるようになってきた。体重については、移入後 11 日目ころから減少し始め、いったん平行線となるものの、35 日目すぎから再び減少し始めると言う経過を取った。

次に硬口蓋の病理組織像を示す (図4)。H.E. 染色にて、表皮基底層直上での裂隙形成が確認された。

モデルマウスの硬口蓋への IgG 沈着を見るために蛍光抗体直接法を行い、IgG の沈着が確認された (図5)。

2. PV モデルマウスの作成 (未免疫)

免疫した脾細胞を移入した系に比べ少し遅れて、移入後 3 週目ころから抗体価が上昇し始めた。移入後 60 日ころに最大値に達し、100 日過ぎから下降傾向となった。

臨床所見については、脾細胞移入後 21 日

目頃より耳介周囲、顔面に脱毛が見られ始めた。現在脾細胞の移入後 200 日以上を経過しているが、顔面を中心とした糜爛性病変が継続して認められている。体重については、脾細胞移入後 21 日目頃から減少し始め、60 日過ぎ以降は大きな体重変化は認められなくなった。

D. 考察

今回、129/Sv バックの Dsg3^{-/-}マウスと同バックの Rag2^{-/-}マウスを用いて PV モデルマウスを作製する事が出来る事が示された。今後、129/Sv マウスの特定の分画の脾細胞を、129/Sv バックの Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞と供移植する事により、天疱瘡の発症遅延・治療が可能であるかどうかを検討して行く予定である。

また、遺伝的背景の均一なモデルマウスが作製できたことから、今後発症機序などの免疫学的研究を進める事が可能となった。

E. 結論

129/Sv バック Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を 129/Sv バック Rag2^{-/-}マウスに移入することにより、天疱瘡モデルマウスを安定して作製することが出来る。

F. 研究発表 (平成 12 年度)

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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.抗Dsg3抗体価ELISA

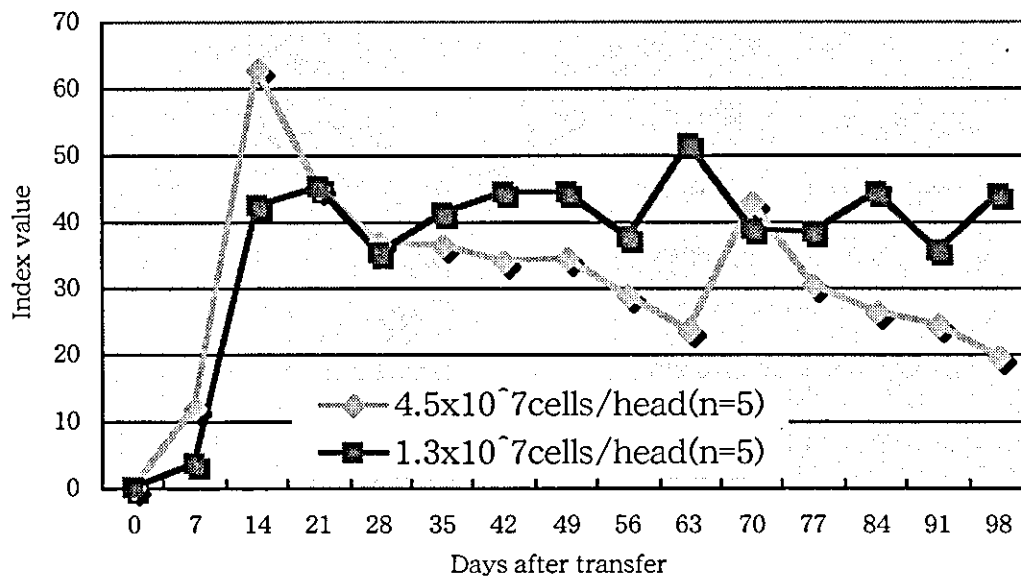


図 1. 脾細胞移入後 7 日目から抗 Dsg3 抗体の出現が認められ、移入後 14 日頃に抗体価は最大値を示した。移入後 100 日後も抗体産生は継続している。

図2.PVモデルマウスの体重変化

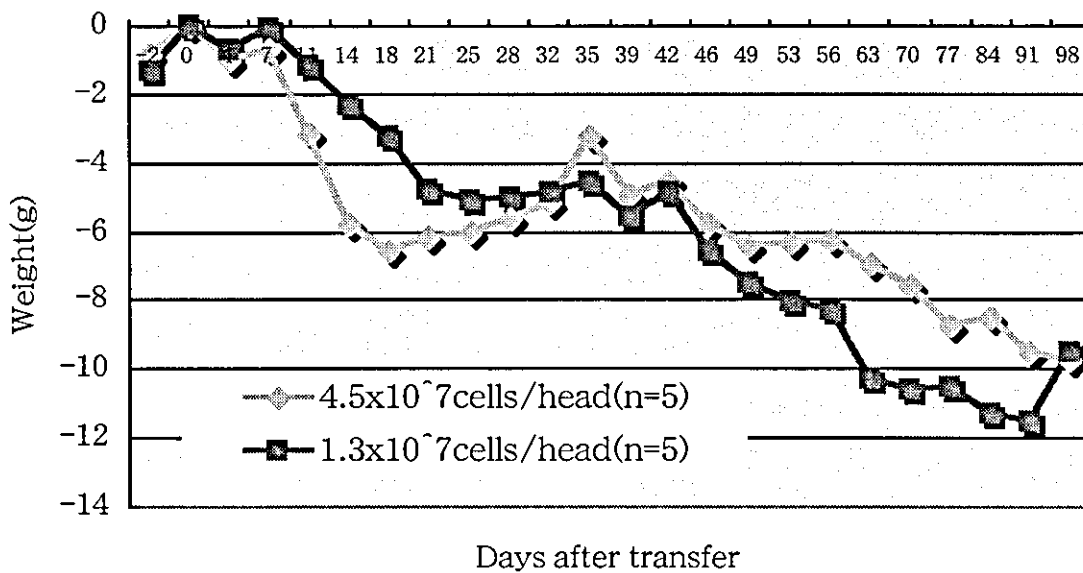


図 2. 体重は、脾細胞移入後 11 日目ころから減少し始め、いったん平行線となるものの、35 日目すぎから再び減少し始めた。



図 3.脾細胞移入後 21 日目の臨床像
顔面、前腕部に脱毛を認める。

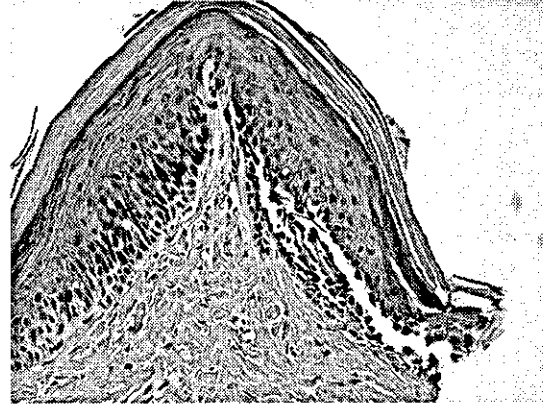


図 4. 硬口蓋の病理組織像
基底層直上での裂隙形成。

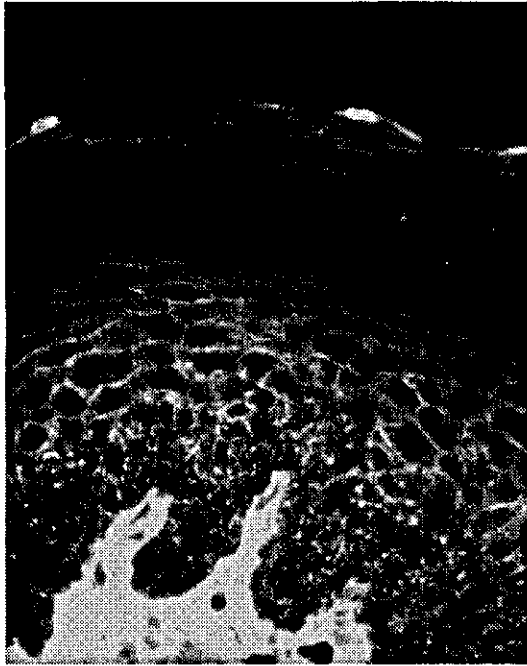


図 5.硬口蓋の蛍光抗体直接法所見
IgG の細胞間への沈着が認められる。

天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 II

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 我々は、C57BL/6 と 129/Sv の混合遺伝子背景をもつデスマグレイ
ン3 ノックアウト (Dsg3^{-/-}) マウスを組み換え Dsg3 で免疫し、抗 Dsg3 抗体の
産生を確認後、その脾細胞を T 細胞 B 細胞を欠く Rag2^{-/-}マウスに移植する
事で尋常性天疱瘡 (PV) モデルマウスを作製してきた。口腔内に出現するびら
んのため強い摂食障害を示し、生育不良となる C57BL/6 に 12 代戻し交配した D
Dsg3^{-/-}マウスをレスキューするために、表皮下層部で Dsg1 を発現する Dsg1
トランスジェニックマウスの作成をした。さらに、Dsg3^{-/-}マウスと交配する
と、接着機能を代償して摂食障害や脱毛を軽減し、生存率を向上させることが
確認された。Dsg1 Tr-Dsg3^{-/-}マウスとすることにより、遺伝背景を C57BL/6
に統一した天疱瘡モデルマウスが作成できることを示している。作成されるモ
デルマウスは、今後さらなる詳細な免疫学的検討に有用である。

共同研究者

畑 毅 (慶應義塾大学医学部大学院専攻生)

西藤 公司 (慶應義塾大学特別研究員)

A. 研究目的

本研究は PV モデルマウス作製における
ドナーである Dsg3^{-/-}マウスの改良を行
い、ドナー、レシピエントとも C57BL/6
をバックグラウンドとするモデルマウス作
製系を確立することを目的とする。

具体的には離乳後すぐに死亡してしまう
C57BL/6 バック Dsg3^{-/-}マウスに遺伝子
導入することにより、表皮下層部に Dsg1
を発現させて口腔内症状を改善し、摂食障
害を軽減して生存率を向上させることを試
みた。

B. 研究方法

**1, トランスジーン (TG)コンストラ
クトの作製**

マウスの表皮下層で Dsg1 を発現させる
ため、ケラチン 5 プロモーターを使用した。
その下流に β グロビンのイントロン、マウ
ス Dsg1 の全長、マーカーとして E-Tag、
そして Poly A を順に繋げてコンストラク

トとした。

2, TG のマウスへの導入

TG のマウスへの導入はトランスジェニ
ックマウスの作製効率を考慮し、Dsg3^{-/-}
に直接行わず、C57BL/6 と C3H の F1 に
マイクロインジェクションにて行なった。
このようにして作製されたマウスの遺伝子
型は、導入された TG 特異的なプライマー
を用いて PCR にて確認した。また目的と
する C57BL/6 バックのトランスジェニック
を得るために C57BL/6 へのバッククロ
スを行なった。

さらに Dsg3^{-/-}マウスへの遺伝子導入
は、上述のように作製した TG ポジティブ
マウス (K5Dsg1TG+) と C57BL/6 の
Dsg3^{+/-}とを交配させることにより行な
った。

**3, K5Dsg1TG+マウスにおける TG
由来 Dsg1 の発現確認**

PCR にて TG の導入が確認された
K5Dsg1TG+マウスの各組織をマーカーと
して導入した E-Tag タンパクに対する抗
体で染色し、TG のタンパクレベルでの発

現とその局在を調べた。

4、TG 由来 Dsg1 の Dsg3 代償効果の確認

当研究室で単離された強い病原性を有する抗 Dsg3 モノクローナル抗体である AK23 を K5Dsg1TG+マウス腹腔内に接種し、一時的に Dsg3 の細胞接着機能を阻害して TG 由来タンパクの Dsg3 代償効果を検証した。具体的には K5Dsg1TG+マウスと野生型マウスのフェノタイプと体重変化を観察し、比較を行った。

5、K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの解析

K5Dsg1TG+マウスと Dsg3+/-マウスを交配させ、誕生した K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの生存率と各組織における TG 由来タンパクの発現状況の確認を行った。

C. 研究結果

1、K5Dsg1TG+マウスにおける TG 由来 Dsg1 の確認

K5Dsg1TG+マウスの各組織を E-Tag 抗体により染色を行ったところ、口蓋下層部と毛包の細胞間に発現していることが確認された (図1)。本結果より導入した TG はマウス表皮の細胞間で発現し、細胞接着にも関与している可能性が示唆された。

2、TG 由来 Dsg1 の Dsg3 代償効果の確認

AK23 を接種した K5Dsg1TG+マウスは野生型マウスに比べ、脱毛が顕著に軽減された (図2)。また体重は接種後3日まで減少したが、減少程度が緩和で、回復も早かった (図3)。

このことから TG+マウスの表皮下層において発現した Dsg1 は Dsg3 の機能を代償し、脱毛や摂食障害を軽減したものと考えられた。また本結果より Dsg3-/-マウスにおいても同様に口腔内症状を改善し、生存率の向上が可能であることが示唆された。

3、K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの解析

K5Dsg1TG+マウスと Dsg3+/-マウスの交配の結果、6匹の K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスが誕生し、そのうちの雄3匹が死亡することなく20週以上生存した。

K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの生存率は50%(3/6)で、Dsg3-/-マウスの100%(0/56)から大きく改善させることに成功した (表1)。K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの組織を抗 E-Tag 抗体にて確認したところ、K5Dsg1TG+と同様口蓋の下層部に染色が認められた。

このことから K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスにおいても表皮下層部に TG 由来の Dsg1 が発現し、Dsg3 の接着機能を代償できることが示された。

D. 考察

作製した K5Dsg1TG+および K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの解析結果から導入した TG が表皮下層で細胞間に発現していることが確認された。この TG 由来の Dsg1 が実際にはどのような形で存在しているのか、またどのようにして細胞同士の接着を担っているのか、さらには物理的にどの程度 Dsg3 の機能を代償できているのかといった内容は今後の研究課題であるが、これまでの研究では TG 由来の Dsg1 が Dsg3 の機能を代償できることを示唆する結果が得られており、「デスマグレイン代償説」を裏付けるものと考えられる。

K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスにはコントロールマウスに比べ、体重が軽いものと同様なものが存在したが、これは TG がヘテロで発現しているかホモで発現しているかに拠っていると思われる。この判別方法については現在検討中であるが、今後はホモ同士の交配を進めてより効率的に K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスを作製し、モデルマウス作製の際のドナーマウスとして使用する予定である。

E. 結論

K5 プロモーターを用いて表皮下層に Dsg1 を発現させる遺伝子を構築し、マウスに導入したところ、Dsg1 の発現が表皮下層の細胞間に確認された

(K5Dsg1TG+)。またこのマウスに AK23 を接種すると、野生型マウスに比べ、脱毛

と体重減少の抑制が観察された。

K5Dsg1TG+と Dsg3+/-との交配により、K5Dsg1TG+Dsg3-/-を得た。C57BL/6 の Dsg3-/-マウスの生存率が 0%であるのに対し、このマウスの生存率は 50%であり、大きな効果が得られた。またこのマウスの解析を行ったところ、K5Dsg1TG+同様表皮下層部に Dsg1 の発現を認めた。

本研究の結果、バックグラウンドを C57BL/6 に揃えた PV モデルマウス作製系の構築に向けた成果を得ることが出来た。

G. 研究発表（平成 16 年度）
学会、論文発表
なし。

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。

	K5Dsg1TG-	K5Dsg1TG+
Dsg3+/+	94.1(128/136)	97.4(75/77)
Dsg3+/-	87.4(132/151)	94.2(49/52)
Dsg3-/-	0(0/56)	50(3/6)

表 1. Dsg3-/-マウスの生存率 (%)。Dsg3-/-の生存率は 0%であったのに対し、K5Dsg1TG+Dsg3-/-マウスの生存率は 50%にまで向上した。

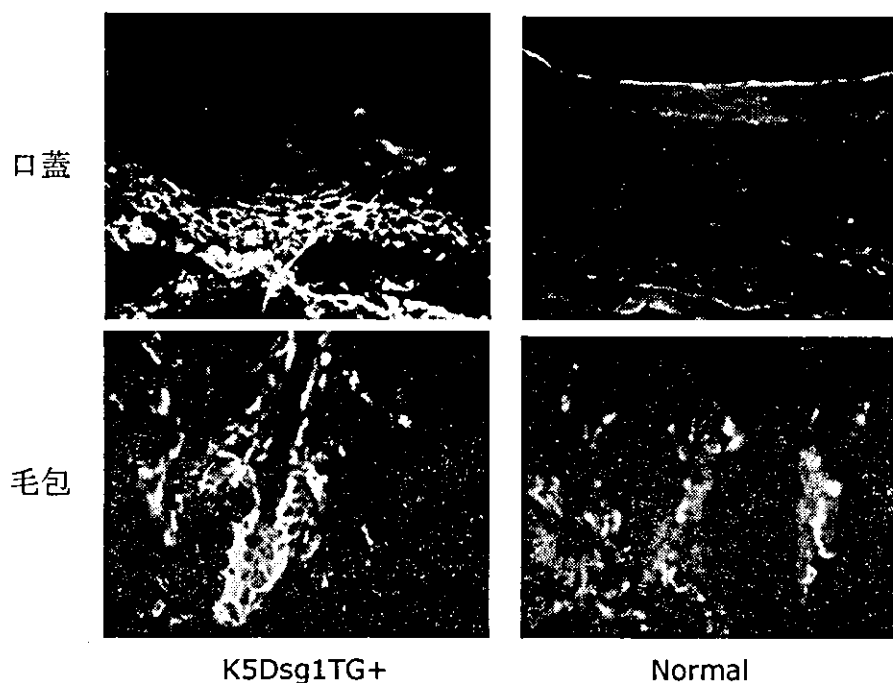


図 1. K5Dsg1TG+マウスにおける E-Tag の蛍光抗体法による発現確認。K5Dsg1TG+マウスでは口蓋、毛包いずれにおいても E-Tag マーカーの発現が見られた。一方ノーマルマウスでは発現は確認されなかった。

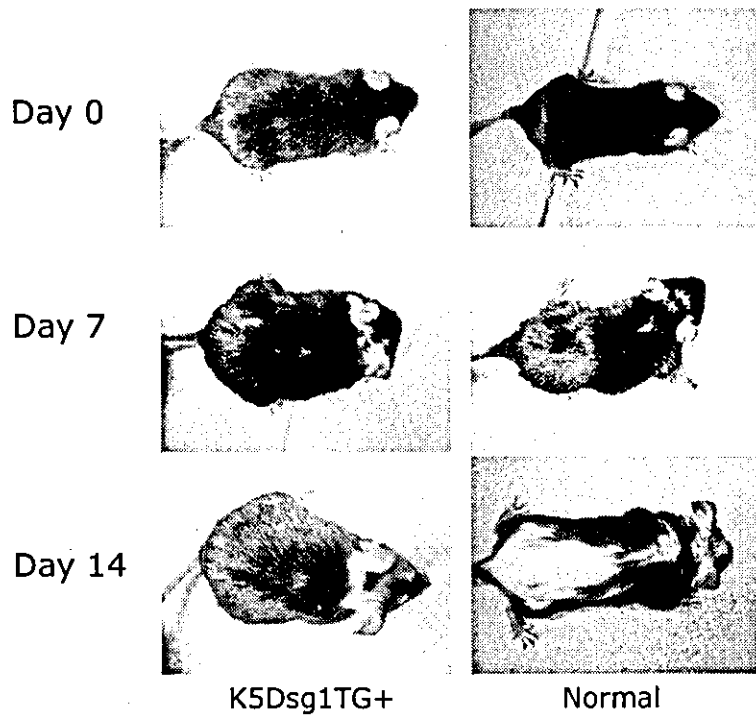


図 2. AK23 接種後のマウス外観の推移。K5Dsg1TG+マウスは野生型マウスに比べ、脱毛が抑制された。

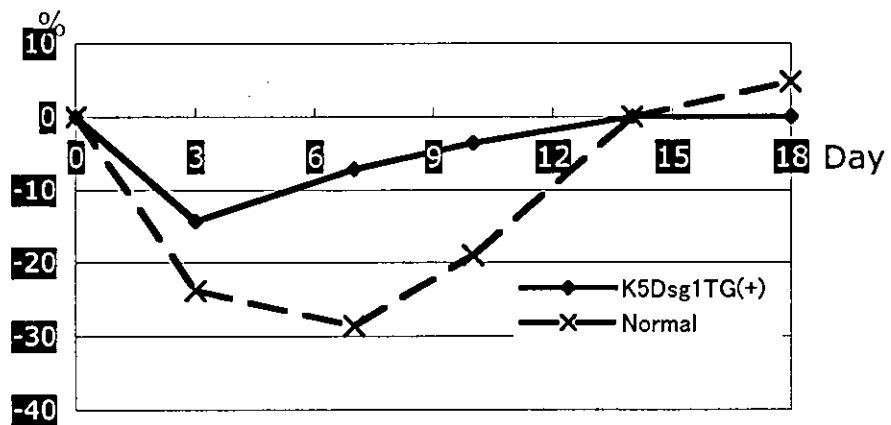


図 3. AK 2 3 接種後のマウスの体重変化。K5Dsg1TG+マウスは野生型マウスに比べ体重の減少割合が少なく、回復も早かった。

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

分担研究者 松井 稔 東京大学医科学研究所 助手

研究要旨 本年度の主な成果は以下の通りである。海馬の抑制性シナプスにおける M1, M2, M3 の役割を解明した。唾液分泌における M1, M3 の役割を解明した。排尿機構における M2, M3 の役割を解明した。脳の各部位における各サブタイプの分布を調べた。腸管ニューロンからのアセチルコリン分泌制御における各サブタイプの役割を解明した。

共同研究者

金沢大学 狩野方伸 ら
東京大学 中村健 ら
信州大学 井川靖彦 ら
静岡県立大学 山田静雄 ら
U.C. Irvine Dr. Ehlert ら
大阪府立大学 竹内正吉 ら

性シナプス伝達を2つの方法で抑えることが分かった。一つは、シナプス前部に存在する M2 受容体が活性化された結果、GABA の放出が減少すると機構である。もう一つは、シナプス後部に存在する M1 や M3 受容体が活性化された結果、内因性カンナビノイドの放出が起こり、シナプス前部にあるカンナビノイド受容体 (CB1) を活性化されて、GABA の放出が減少するという機構である。これら二つの機構は同じシナプスで同時に起こることはないようである。

A. 研究目的

ムスカリン性アセチルコリン受容体は、中枢および末梢神経系に豊富に存在し、多くの疾患に関与していると考えられている。本研究計画では、ムスカリン性アセチルコリン受容体の5つのサブタイプを欠失したマウスがどのような疾患モデルマウス足り得るかをすることを目的として、これらのマウスの表現型の詳細な解析を行いつつある。

2. 唾液分泌における M1, M3, M5 の役割について。本研究は東京大学医科学研究所の中村健らとの共同研究として行われた。分散したマウス顎下腺細胞を様々な濃度のカルバコール（非選択的コリン性アゴニスト）で刺激し、細胞内の一過性カルシウム濃度上昇を可視化して、細胞の反応性の指標とした。この結果、M3 ノックアウトマウスの唾液腺細胞では、応答が極めて弱くなることが判明した。M1 ノックアウトマウスや M5 ノックアウトマウスでは、そのような減少はほとんど起こらなかった。さらに、M1 と M3 の両者が欠失したノックアウトマウスでは、カルバコールに対する応答は完全に消失していた。これらのことから、カルシウム応答については M3 が主要な役割を担い、ごく一部を M1 が担っていると結論できた。次に、1 mg/kg のピロカルピン（非選択的ムスカリン性アゴニスト）を投与して唾液分泌量を測定したところ、M3 ノックアウトマウスではほ

B. 研究方法

当研究施設での解析のみならず、国内外の多くの研究施設の協力を得て、多方面に渡る表現型解析を行う。マウスは全て分担研究者によって同一のストラテジーのもと作出された。目的に応じて C57BL/6J あるいは DBA/2J にバッククロスされたマウスを用いる。

C. 研究結果

1. 海馬の抑制性シナプス伝達における M1, M2, M3 の役割について。本研究は金沢大学の狩野らとの共同研究として行われた。ムスカリン性の刺激は海馬の抑制

とんど唾液の分泌は起こらなかった。そこで、ピロカルピンの投与量を 10 mg/kg に増やしたところ、M3 ノックアウトマウスにおいても唾液の分泌は認められた。しかし、M1/M3 ダブルノックアウトマウスでは唾液の分泌は検出されなかった。さらに、M3 ノックアウトマウスでは、乾いた餌を食べる際に頻回に水をなめるといった特異な行動が見られた。以上より、コリン性の唾液分泌においては、M3 が最も重要な役割を果たしていることが結論することができた。

3. 排尿機構における M2, M3 の役割。本研究は信州大学の井川らとの共同研究として行われた。麻酔下のマウスでシストメトリーを行い、排尿動態を調べた。オスにおいては、M3 ノックアウトマウスで排尿間隔が長くなっており、一回排尿量が増えていることから、膀胱容量が増加していると結論された。メスにおいては、M2 ノックアウトマウス、M3 ノックアウトマウスの両者において排尿間隔が長く、一回排尿量が増加していた。アトロピンを全身投与したところ、M3 ノックアウトマウスでは変化が見られなかった。これらのことから、マウスの排尿においては M3 が重要な役割を担うと結論された。

4. 中枢神経系におけるムスカリン性アセチルコリン受容体各サブタイプの分布。本研究は静岡県立大学の山田らとの共同研究として行われた。脳の各部位について、非選択的なムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストである N メチルスコポラミンの結合を評価した。この結果、M1 は大脳皮質や海馬で多く発現していることが分かった。線条体では M1 と M4 が多く発現していた。M2 は視床、視床下部、中脳、橋、延髄、小脳、脊髄において優勢なサブタイプであることが分かった。

5. 排尿筋収縮における M2 の役割。本研究は UC Irvine の Dr. Ehlert らとの共同研究として行われた。まず、M3 ノックアウトマウスの排尿筋では PGF₂ α に対する感受性が顕著に亢進していることが分かった。次に、選択的に M3 のシグナル伝達を抑える 4-DAMP マスタードで排尿筋を処理すると、野生型では弱い収縮が残ったが、M2 ノックアウトではほとんど

失われた。このことから M2 を介した直接的な平滑筋収縮が弱いながらもあることが示された。イソプロテレノールやフォルスコリンで cAMP 濃度を増やす前処置をした上で、oxotremorine-M (非選択的ムスカリン性アゴニスト) に対する収縮反応を検討することにより、M2 ノックアウトではかなり収縮が失われるような条件を探ることができた。このような収縮に対する AF-DX116 や 4-DAMP の関与を見たところ、M2 よりも M3 に近い反応が見られたので、M2 を介した反応は M3 の収縮を強める作用に基づいているのではないかと考えられた。

6. 腸管神経叢からのアセチルコリン放出におけるムスカリン性アセチルコリン受容体各サブタイプの役割。本研究は大阪府立大学の竹内らとの共同研究として行われた。M2 と M4 の両者を共に欠失したマウスにおいては、アトロピンによるアセチルコリン放出増強反応が失われていたことから、ムスカリン性アセチルコリン受容体によるアセチルコリン放出の抑制はこれら二つのサブタイプが担うと結論された。

D. 考察

ムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの解析を通してムスカリン性アセチルコリン受容体各サブタイプの機能についての理解を深めることができた。

E. 結論

今年度の研究成果から考えて、ムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスならびにムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスを用いた自己免疫モデルマウスは、痴呆、口腔乾燥症、排尿障害、腸運動障害等のモデルマウスとして利用できる可能性があると考えられる。

F. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表 英語論文

1. Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T, Kano M. Two distinct classes of muscarinic