

図3 成体マウスを用いた NAK mAb の病原性の確認。
 NAK9 mAb 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)。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(b；口蓋粘膜)ものの、病理組織学的に水疱形成を認めない(e；口蓋粘膜)。NAK1, 2, 7, 11 mAb 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；口蓋粘膜)、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；口蓋粘膜)。

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 14-16 年度分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスの免疫電顕的解析

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 尋常性天疱瘡(PV)はデスモソーム (DM) 構成蛋白の一つデスモグレイン 3 (Dsg3) に対する IgG 自己抗体の結合により生じる自己免疫性水疱性疾患である。これまでに我々は、新たな手法により PV モデルマウスを作成し、いくつかの抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (mAb) のクローニングに成功している。本研究では 1) PV マウスより得られた水疱形成誘導能を有する抗 Dsg3mAb (Dsg3 の N 末端を認識する) の超微細局在部位を解析することで、DM における Dsg3 分子形態および病原エピトープの分子局在を明らかにする 2) *in vivo* における PV 自己抗体および DM の裏打ち蛋白であるデスモプラキン (DP) の超微細局在の解析から、PV モデルマウスにおける水疱発症機序を考察 3) PV モデルマウスおよび Dsg3^{-/-}マウスの DM 構成蛋白の超微細局在の比較解析から、棘融解発生機序の考察、の三点について、後包埋免疫電顕法を用いて検討した。その結果、1) Dsg3 の病原エピトープ、すなわち N 末端は DM の向かい合う細胞膜の中央部（いわゆる細胞間結合層; DML）に局在し、それぞれ向かい合う Dsg3 の細胞外領域は DML において N 末端部でわずかに重なり合い結合していると考えられた。2) *in vivo* において PV 自己抗体は DM および棘融解部基底細胞上面に認められる半割 DM の細胞外領域に特異的に結合し、さらに、基底細胞側面では基底細胞間に、DML を有し、痕跡的に DP を細胞質内領域に認める DM 様構造物を認めた。3) Dsg3^{-/-}マウスでは 1DM あたりのプラコグロビン (PG) の数がコントロールマウスと比較して有意に減少を認めた。また、PV モデルマウスでは DP の細胞膜からの距離がコントロールと比較して細胞質内方向へ有意に変位を認めた。ケラチン線維を DM に架橋している DP は、PG を介し間接的に Dsg3 と結合していることが知られており、Dsg3^{-/-}では Dsg3 の減少によりその裏打ち蛋白である PG も減少したものと考えられる。一方、PV マウスでは PG の減少は認めないが、DP の細胞質内側への変位を認める。このことは DP と PG との間に何らかの相互作用があるものと考えられた。

研究協力者

研究 1、2) 清水 篤 (慶應義塾大学
医学部皮膚科特別研究助手)

研究 3) 齊藤 京 (慶應義塾大学医
学部皮膚科助手)

研究 1) 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

A. 研究目的

本研究では、AK23 の認識する病
原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。

B. 研究方法

電顕：採取した試料を電子染色後、
透過型電子顕微鏡 (JEOL1200EX II)
により観察。

免疫電顕：採取した試料を急速凍結
固定を行った後、Lowicryl K11M に
包埋。免疫染色後、電子染色し、透
過型電子顕微鏡により観察。

免疫染色法：一次抗体として rabbit
anti-mouse IgG (H+L)、二次抗体
として 5nm gold-labelled goat
anti-rabbit IgG を用いた。

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。A 面を、一次抗体
として rabbit anti-Desmoplakin、
二次抗体として 5nm gold-labelled
goat anti-rabbit IgG を、B 面を、
一次抗体として rabbit anti-mouse
IgG (H+L)、二次抗体として 15nm
gold-labelled goat anti-rabbit IgG
を用いた。電子染色後、超薄切片に
炭素蒸着を施行。

統計解析：DM 内に局在する金粒子
の垂直方向の分布を 145 個計測しヒ
ストグラム化。

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。また
DM が半割した像である Half-DM を

棘融解部に多数認めた。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。

免疫電顕所見：IgG は DM 上に特異
的に局在。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
外領域に特異的に局在。一部の DM
では、IgG が細胞間結合層 (DML)
に沿って局在 (図 1)。また、棘融解
部の免疫電顕像から、Half-DM の細
胞外領域に金粒子の特異的な局在を
認めた。二重染色から、Half-DM の
細胞外領域に IgG、接着板とケラチ
ン線維の付着部にはデスマプラキン
の局在を認めた。

統計解析：40%以上の金粒子を DM
の細胞外領域の中心に認めた。

D. 考察

電顕的観察から、AK23 が水疱形成
誘導能を有した病原性 mAb であるこ
とが形態学的に示された。

免疫電顕から病原性 mAb、AK23
(Dsg3 の N 末端) は DM の細胞外
領域に特異的に局在。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
起こされており、病原エピトープへ
の抗体の結合による、Dsg3 分子間の
直接阻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。また、Dsg3 分子の N 末端は DML
上に局在していることから、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
に重ね合わせながら接着している可
能性が高いと推測される。

E. 結論

Dsg3 分子の細胞外領域の N 末端は
DM の DML 上に存在。向かい合う
Dsg3 分子は DM 内でわずかに重なり
合いながら接着している可能性が
高いと考えられ、この N 末端に局在
する病原エピトープへの AK23 の結
合が、Dsg3 分子間に直接的な接着障
害を引き起こすこし棘融解が引き起

こされていると考えられた。

F. 研究発表

英文論文

A Shimizu. et, al. Ultrastructural change in mice actively producing antibodies to desmoglein 3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. Arch Dermatol Res 249. 318-323 2002.

学会発表

- 1) A Ishiko. et, al. 4th Joint Meeting of The Society for Cutaneous Ultrastructure Research and The Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology, Limoges, France, 2002. 06.
- 2) A Shimizu. et, al. 同上
- 3) 清水 篤他、日本研究皮膚科学会第27回年次大会・総会、京都、2002、8.

研究2) 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

A. 研究目的

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、その超微細局在から 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

電顕：研究1) に準じた方法にて施行。
免疫電顕：研究1) に準じた方法にて施行。また、コントロール用一次抗体として PV モデルマウス血清、二次抗体として rabbit anti-desmoplakin (1:40) を用いた。
免疫二重染色法：研究1) に準じた方法にて施行。

C. 研究結果

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 が沈着。また、細胞質内には DP の局在を DM 接着板とケラチン線維間に認めた。また、半割 DM における

ケラチン線維の退縮は認めない。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を認めた(図2)。この構造物への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、痕跡的な DP (5nm gold) が局在を確認(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を認めた(図2e)。

D. 考察

今回の実験では、棘融解部での半割 DM の細胞外領域に、IgG の結合を認めた。半割 DM には接着板内へのケラチン線維の挿入および DP の局在を認めた。すなわち、DM の半割に Dsg3 の枯渇が関与している可能性が低く、PV の水疱形成は 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を強く示唆するものであった。基底細胞側面の細胞膜上に認める IgG の集簇は、形態学的な特徴から DM との関連が推察され、DM の接着板からの DP の消失と共にケラチン退縮により生じた可能性が示唆された。

E. 結論

Dsg3 の接着機能障害による DM の半割が棘融解を生じさせるが、ケラチン線維の退縮による DM の崩壊は直接的に棘融解に関与していないことが示唆された。

F. 研究発表

英文論文

Shimizu A. et, al. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. J Invest Dermatol 122. 1145-1153 2004.

学会発表

- 1) Shimizu A. et, al. International Investigative Dermatology 2003, Miami Beach, Florida USA, 2003. 04.

- 2) 石河 晃他、第 780 回日本皮膚科学会東京地方会、東京、2003、03.

研究 3) 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

A. 研究目的

免疫電顕法を用いて DM 構成分子の DM における微細分布および 1 DM あたりの数を解析し、Dsg3^{-/-}マウスと PV モデルマウスにおける水疱発生機序の違いを比較検討した。

B. 研究方法

免疫電顕：研究 1) に準ずる方法にて免疫電顕を施行。

免疫染色；Dsg3^{-/-}マウスおよび PV モデルマウスの口蓋粘膜を用いて、一次抗体として 1:rabbit anti-desmoplakin (DP)、2: rabbit anti-plakoglobin (PG)、3:mouse anti-plakophilin1、4:guinea pig anti-desmocollin1、5:guinea pig anti-desmocollin 3、6: mouse anti-desmoglein1 を用いた。

統計解析：それぞれのマウスの DM 上の金粒子 (300 個以上) の細胞膜からの距離を計測しヒストグラムを作成。また、1 DM あたりの金粒子の数 25 個以上の DM においてカウント。

C. 研究結果

Dsg3^{-/-}マウス：コントロールと比較して DP のみ有意に 9nm 細胞内側に偏位。1DM あたりの PG に有意な (60%) 減少を認めた。(表 1A)。

PV モデルマウス：コントロールと比較して DP のみ有意に 24nm 細胞内側に偏位。1DM あたりのすべての構成分子の数において有意な変化を認めなかった (表 1B)。

D. 考察

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。Dsg3^{-/-}における PG

の数の減少は、直接結合すべき Dsg3 の欠損により PG 分子の取り込みが減少したためと考えられる。

PV モデルマウスは PG の数の変化がなく DP が偏位していることから、自己抗体が Dsg3 へ結合したシグナルにより、何らかの機序で PG と DP 間の分子間相互作用に変化を生じ 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。

E. 結論

Dsg3^{-/-}マウスと PV モデルマウスの DM 分子の分布、密度には差があるにもかかわらず超微細形態に差が認められないことから、PV モデルマウスにおいて Dsg3 の機能欠損が起こることが水疱発生機序として示唆された。

F. 研究発表

学会発表

1) Saito H. et, al. 31th Annual Meeting The Society for Cutaneous Ultrastructure Research Joint Meeting with the European Society of Dermatopathology, Roma, Italia, 2004. 5.

2) 齊藤 京他、第 789 回日本皮膚科学会東京地方会、東京、2004、03.

3) 齊藤 京他、第 31 回日本電顕皮膚生物学会学術大会、鹿児島、2004、10.

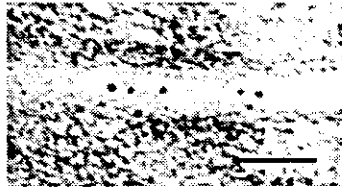


図 1. AK23 接種マウス口腔粘膜上皮の免疫電顕像。デスモゾーム細胞外領域の細胞間結合層に沿うように AK23 の結合を認める。(Bar : 100nm)

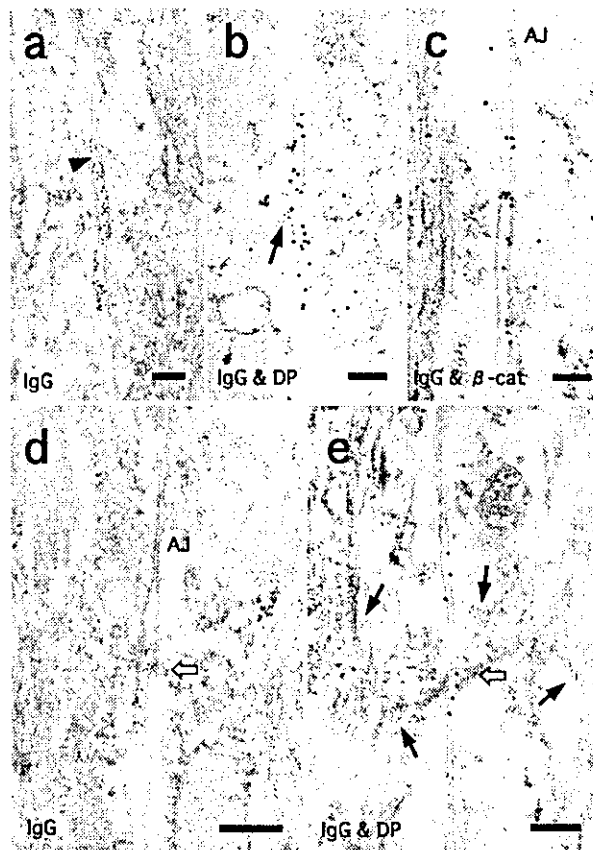


図 2. 隣り合う基底細胞の側面には IgG(15nm gold)が集簇した奇妙な構造物を認める。接着板やケラチン線維の挿入は全く認められないものの、向かい合う細胞膜の中心には細胞間結合層(矢尻)と思われる構築が認められる(a)。ある部位ではこの構造物と小さな DM(白抜き矢印)が隣接している像が認められた(d、e)。免疫二重染色から、この構造物の細胞内領域に、痕跡的に DP(矢印)(5nm gold)の局在を認め(b)、さらに近傍の細胞質内にはケラチン線維に付随する様に DP が集簇して局在している像が認められる(e)。β-catenin(5nm gold)の局在は認めない(c)。Bars;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

Table A	Mean number \pm SE	
	Dsg3 ^{-/-}	control
Dp C-terminus	80.6 \pm 5.19 (n=35)	89.9 \pm 8.27 (n=33)
Pg N-terminus ^{**}	24.7 \pm 1.42 (n=33)	41.3 \pm 3.02 (n=33)
Pp1 N-terminus	11.9 \pm 0.756 (n=61)	11.3 \pm 0.964 (n=47)
Dsc1 N-side of ICD	6.05 \pm 0.487 (n=88)	8.31 \pm 0.835 (n=65)
Dsc3 N-side of ICD	4.05 \pm 0.293 (n=123)	4.90 \pm 0.377 (n=110)
Dsg1 C-side of ICD	29.7 \pm 3.26 (n=31)	34.7 \pm 2.60 (n=39)

SE, standard error; ICD, intracellular domain

^{**}, significantly different at P<0.0001

Table B	Mean number \pm SE	
	PVmodel	control
Dp C-terminus	49.6 \pm 4.96 (n=30)	49.2 \pm 3.96 (n=29)
Pg N-terminus	38.7 \pm 3.27 (n=25)	39.9 \pm 2.94 (n=29)
Dsc1 N-side of ICD	7.31 \pm 0.749 (n=51)	5.95 \pm 0.746 (n=56)
Dsc3 N-side of ICD	5.57 \pm 0.300 (n=132)	4.62 \pm 0.392 (n=91)

SE, standard error; ICD, intracellular domain

表 1. デスモソームあたりの金標識の数の検討 (数値の表記は平均 \pm 標準誤差、n は数えたデスモソーム数)。Dsg3^{-/-}マウス(A)ではプラコグロビンのみが有意に数の減少を認めた (P<0.001)。一方 PV モデルマウス (B) においては、コントロールと有意な差を認める構成分子はなかった。

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 14-16 年度分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスを用いた抗 CD154 抗体療法の評価

分担研究者 西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 尋常性天疱瘡（PV）は、表皮ケラチノサイト間の接着蛋白である Dsg3 が自己抗体により障害された結果、表皮や粘膜上皮に弛緩性水疱やびらんを生じる自己免疫性水疱性皮膚疾患である。近年、我々は Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を移植することで PV モデルマウスの作成に成功した。抗体産生の過程では抗原特異的な B 細胞、T 細胞の受容体以外に CD40/CD154 などのアクセサリ一分子間での相互作用の役割が注目されている。本研究では、PV モデルマウスを用いて、抗 CD154 抗体の予防投与および治療投与を行い、抗体産生および PV 発症における CD40/CD154 相互作用の役割を検討した。予防投与では、抗 CD154 抗体を Dsg3^{-/-}脾細胞の移植前から投与した。抗 CD154 抗体投与群では、抗 Dsg 3 抗体産生がほぼ完全に抑制され、PV 表現型の発現も認められなかった。次に明らかな抗 Dsg3 抗体産生および PV 表現型を示したモデルマウスに対して、抗 CD154 抗体の治療投与を行った。抗 CD154 抗体の投与により、明らかな抗 Dsg 3 抗体産生抑制効果を認めず、有意な PV 表現型の改善も認めなかった。以上の結果から、PV において抗体産生の開始、発症には CD40/CD154 経路が必要であるが、抗体産生の維持には CD40/CD154 経路が必ずしも重要な役割をしていないことが示唆された。抗 CD154 抗体療法は、病初期あるいは再燃初期に投与することにより、効果が得られると考えられた。

共同研究者

青木三代

（慶應義塾大学医学部共同研究員）

天谷雅行

（慶應義塾大学医学部専任講師）

ナル抗体である MR1 を使用した。また、精製ハムスター IgG を対照として使用した。

2) PV モデルマウスの作製

Dsg3^{-/-}マウスは、129/SV および C57BL/6J(H-2^b)の遺伝的背景を有する Dsg3^{-/-}マウスの雌雄交配により得られたものを使用した。免疫した脾細胞を得るために、6-8 週齢の Dsg3^{-/-}マウスを Dsg3 の細胞外領域の組み換え蛋白 (rmDsg3) を用いて免疫した。最初に、10 μg の精製 rmDsg3 を等量の complete Freund's adjuvant と混合し、Dsg3^{-/-}マウスに皮下投与した。ついで一週間ごとに 2 回ずつ incomplete Freund's adjuvant と混合し

A. 研究目的

PV モデルマウスを用いて、抗 CD154 抗体の予防投与および治療投与を行い、抗体産生および PV 発症における CD40/CD154 相互作用の役割を検討した。

B. 研究方法

1) 抗体

ハムスター抗マウス CD154 モノクロー

た rmDsg3 を皮下投与し、rmDsg3 のみは腹腔内投与した。マウス一匹あたり、免疫した脾細胞を 2×10^7 細胞/500 μ l PBS になるように調整し、Rag2^{-/-}マウスに静脈内投与し、PV モデルマウスを作製した。

3) 予防的投与

抗 CD154 抗体投与により、レシピエントマウスにおいて PV の発症が抑制されるかを検討するために、移植する 2 日前に 500 μ g の抗 CD154 抗体をレシピエントマウスに腹腔内投与した (n=8)。さらに免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を移植する 1 時間前、移植後 2, 4, 7 および 14 日に繰り返し抗 CD154 抗体の腹腔内投与を行った。対照として 500 μ g の Hamster IgG を同様にレシピエントマウスに腹腔内投与した (n=8)。すべてのマウスは 28 日まで観察し、その時点で各群 2 匹のマウスについては *in vivo* での IgG 沈着および Dsg3 特異的 B 細胞数について検討を行った。さらに長期にわたる効果を検討するために各群 6 匹のマウスは 70 日まで観察を継続した。

4) 治療的投与

症状および抗体産生が安定した PV モデルマウスに対して、1 mg の抗 CD154 抗体あるいは Hamster IgG を週 2 回計 12 回投与した (n=10)。各群のマウスは抗 CD154 抗体投与開始後 56 日まで観察し、血中抗体価および症状の変化によって抗 CD154 抗体の治療効果を検討した。

5) ELISA 法

血中抗 Dsg3 抗体の測定には既報告にあるように、mDsg3 を抗原とした ELISA 法を用いた。陽性対照として、rmDsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスの血清を、陰性対照として免疫していないマウスの血清を用いた。ELISA の結果は、 $(OD_{450} \text{ of sample} - OD_{450} \text{ of negative control}) / (OD_{450} \text{ of positive control} - OD_{450} \text{ of negative control}) \times 100$ で算出されるインデックス値で表した。各検体は、100 倍希釈を基準にして行った。OD 値が 1.2 を越えた場合はさらに希釈した検体を用いて行い、イン

デックス値も基準倍率からの希釈倍率をかけて算出した。

6) 直接蛍光抗体法 (DIF)

抗 CD154 抗体を投与したレシピエントマウスのケラチノサイト表面への IgG の沈着を確認するために直接蛍光抗体法 (DIF) を行った。移植後 28 日のレシピエントマウスから口蓋を採取し、OTC compound にて包埋した。5 μ m に薄切した切片に 100 倍希釈した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG を室温にて 60 分間反応させた。反応後、PBS にて 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡 (Eclipse E8000, Nikon, Tokyo, Japan) にて鏡検した。

7) ELISPOT 法

30 μ g/ml の精製 rmDsg3 を固相化抗原として PVDF-bottomed 96-well Amicon multiter plate に 4°C で一晚固相化した。その後、プレートを PBS-Ca で 3 回洗浄し、1%BSA 加 PBS-Ca を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。プレートの調整は全て使用直前に行った。

抗 CD154 抗体投与マウスおよび対照群のマウスの脾臓、リンパ節および骨髄から単核球を分離し、浮遊液をプレート上で 37°C で 4 時間培養した。その後プレートを 0.05% Tween 20 加 PBS-Ca で洗浄し、膜状に結合した IgG を PBS を用いて 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体と反応させて膜状にスポットを形成した。得られたスポット数を実体顕微鏡下で計数し、それぞれの細胞浮遊液中に存在する mDsg3 に特異的な IgG 産生 B 細胞の頻度を 10^5 単核球あたりのスポット数として算出した。

8) PV スコア

PV モデルマウスの症状の重症度を評価するために、病変部の数を点数化した。モデルマウスの症状の特徴として、びらん、脱毛および口腔内のびらんで固形食の摂取が困難になることによる前歯の過長があげられる。これらの症状から、各部のびらん、前歯の過長および顔面全体および背部全体の脱毛を各 1 点、顎下および腹部の脱毛を各 0.5 点とし、計 15 点とした。

C. 研究結果

1) 予防的投与による抗 Dsg3 抗体産生の抑制

各群のマウスにおける、血中抗 Dsg3 抗体産生を mDsg3 を抗原とした ELISA 法により確認した。Hamster IgG を投与した対照群のマウスでは移植後 14 日目に明らかな抗 Dsg3 抗体産生が認められ、これらのマウスではその後も観察期間を通じて持続的な抗体産生が認められた。対照的に抗 CD154 抗体を投与した全てのマウスで、抗 Dsg3 抗体産生は著明に抑制された。さらに抗 CD154 抗体投与による抗体産生抑制は、投与終了後から 2 ヶ月経過しても維持されていた (図 1-a)。PV モデルマウスにおいては口腔内びらんによる摂食障害から、抗 Dsg3 抗体産生とともに体重減少が認められるのが特徴である。また、生後 4 週から 8 週のマウスをレシピエントとして用いるため、発症がない場合には体重増加は正常である。対照群のマウスでは、明らかな抗 Dsg3 抗体産生が認められた移植後 14 日から明らかに体重が減少したが、抗 CD154 抗体を投与したマウスでは、体重減少は全く認められず、観察期間を通じて正常な体重増加が観察された (図 1-b)。移植後 28 日で行った DIF で *in vivo* における IgG 沈着を評価したところ、対照群のマウスではケラチノサイト表面への著明な IgG 沈着が認められたのに対し、抗 CD154 抗体投与マウスでは明らかな IgG 沈着は認められなかった (図 2-a, b)。また、対照群のマウスでは、病理組織学的に PV モデルマウスに特徴的な粘膜上皮における基底層直上での水疱形成が認められたのに対し、抗 CD154 抗体投与マウスにおいては明らかな水疱形成はなかった (図 2-c, d)。また、対照群のマウスでは、移植後 14 日から、PV モデルマウスに特徴的な休止期脱毛、口周囲のびらん、痂皮形成および体重減少などの症状が認められたのに対し、抗 CD154 抗体投与マウスにおいてはこれらの症状は観察期間を通じて全く認められなかった (図 2-e)。

対照群のマウスの全てで、明らかな抗 Dsg3 抗体産生および体重減少などの症状

が認められた移植後 28 日に、抗 CD154 抗体投与マウスおよび対照群のマウスの脾臓、骨髓およびリンパ節から単核球を分離し、*in vitro* で Dsg3 に反応し、抗 Dsg3 抗体産生する B 細胞の頻度を ELISPOT 法により検討した。対照群のマウスでは、単核球 10^5 個あたり脾臓で 157.3 ± 21.3 個、リンパ節で 63.1 ± 12.9 個および骨髓で 9.2 ± 4.0 個の抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞が検出されたのに対し、抗 CD154 抗体投与マウスでは抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞はどの臓器にもほとんど検出されなかった (脾臓; $0.0 \pm 0.0/10^5$ 細胞, リンパ節; $0.0 \pm 0.0/10^5$ 細胞, 骨髓; $0.0 \pm 0.0/10^5$ 細胞)。

2) 抗 CD154 抗体の治療効果の検討

移植後、抗 Dsg3 抗体産生および明らかな PV の症状を示した PV モデルマウスに抗 CD154 抗体 (n=11) と Hamster IgG (n=8) を 1 mg ずつ週 2 回計 12 回投与した。投与開始後 2 週間ごとに採血および症状の観察を行った。血中抗 Dsg3 抗体価は、抗 CD154 抗体投与群および Hamster IgG 投与群の両群において投与開始後も明らかな減少を認めず、抗体産生抑制効果は認められなかった (Fig. 12a)。PV 症状の推移を PV スコアによって検討した。Hamster IgG 投与群においては、投与期間を通じて著明な改善は認めなかったが、抗 CD154 抗体投与群においては、投与開始後 42 日の症状で PV スコア値が低下した。しかし、両群の間に有意差は認めなかった (Fig. 12b)。

D. 考察

尋常性天疱瘡 (PV) は、表皮ケラチノサイト間の接着蛋白である Dsg3 が自己抗体により障害された結果、表皮や粘膜上皮に弛緩性水疱やびらんを生じる自己免疫性水疱性皮膚疾患である。抗 Dsg3 抗体産生には T 細胞および B 細胞の両方における免疫寛容の破綻が必要であると考えられている。近年、抗体産生の過程で、抗原特異的な B 細胞、T 細胞の受容体以外に CD40/CD154 などのアクセサリ一分子間での相互作用の役割が注目されている。CD154 は、抗原刺激を受けた活性化 CD4+ T 細胞に一過性に発現誘導される蛋白であ

る。CD154 の受容体である CD40 は、B 細胞、樹状細胞、単球/マクロファージおよび血管内皮細胞などに発現している。T-B 細胞間相互作用は、B 細胞の増殖、抗体産生、抗体のクラススイッチ、胚中心の形成、メモリーB細胞の産生およびT細胞活性化に関与する機能分子の発現を誘導し、体液性免疫応答に重要な役割を担っている。抗 CD154 抗体が結合する CD154 は、活性化した CD4 陽性 T 細胞上に一過性に発現する蛋白であるため、従来の免疫抑制剤に比べて抗原特異的な作用を有すると考えられている。また、CD40/CD154 相互作用が抗 CD154 抗体により阻害されると T 細胞は抗原に対して免疫寛容の状態に誘導され、長期間にわたる抗原特異的な抑制効果が期待できると考えられている。この抗原刺激を受けた T 細胞に結合するという性質から、抗 CD154 抗体は従来の免疫系全体を抑制する免疫抑制剤にかわる新しい治療薬として働く可能性がある。今回の結果から、免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を移植する前から抗 CD154 抗体を投与したマウスでは、抗 Dsg3 抗体産生は明らかに抑制され、表現型も認めなかった。抗 CD154 抗体により、B 細胞を含む抗原提示細胞と T 細胞の間の相互作用を阻害することで、B 細胞による抗体産生が抑制されることが示された。また、抗体の投与が終了した後も長期にわたって抗体産生が抑制されたことから、抗 CD154 抗体により抗原特異的な T 細胞に抗原に対する免疫寛容が誘導された可能性が示唆された。抗 CD154 抗体を週 2 回計 12 回投与したが、抗体産生は対照群との間に有意差がなかった。抗 CD154 抗体は、抗原刺激を受けた T 細胞に一過性に発現する CD154 に結合してその機能を阻害する抗体であり、プラズマ細胞に分化した B 細胞に対する阻害作用はない。治療投与においては抗原特異的なリンパ球はすでに抗原刺激を受け、活性化および分化しているため、抗原刺激の時点で阻害作用を示す抗体のみでは抗体産生を十分に抑制できないことが示された。

治療投与の結果から、抗体価が高く、病勢の活発な時期の患者に対する抗 CD154 抗体の治療効果はほとんど期待できないことが示された。

E. 結論

PV モデルマウスに対する抗 CD154 抗体の発症前投与および治療投与の結果から、PV の発症には CD40/CD154 相互作用が不可欠であるが、発症してからの抗体産生の維持には CD40/CD154 相互作用が必ずしも必要ではないことが示された。

PV は、多くの自己免疫疾患の中で自己抗体産生と病態の発生がよく理解されている疾患である。PV モデルマウスはこの疾患の特徴である自己抗体の産生および自己抗体による症状の発現をよく反映しており、この疾患の病態解明および種々の治療法の評価系として非常に有用であると考えられた。

F. 研究発表（平成 14-16 年度）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. M Aoki, K Tsunoda, T Ota, T Iwasaki, S Tanaka, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa. Efficacy of blockade of CD40/CD40L interaction in pemphigus vulgaris mouse model. Society of Investigative Dermatology, 63rd annual meeting, 2002, 05, Los Angeles.

2. M Aoki, K Tsunoda, T Ota, T Iwasaki, S Tanaka, S Koyasu, M Amagai and T Nishikawa. Efficacy of blockade of CD40/CD40L interaction in pemphigus vulgaris mouse model. 第 27 回日本研究皮膚科学会, 2002, 08, 京都。

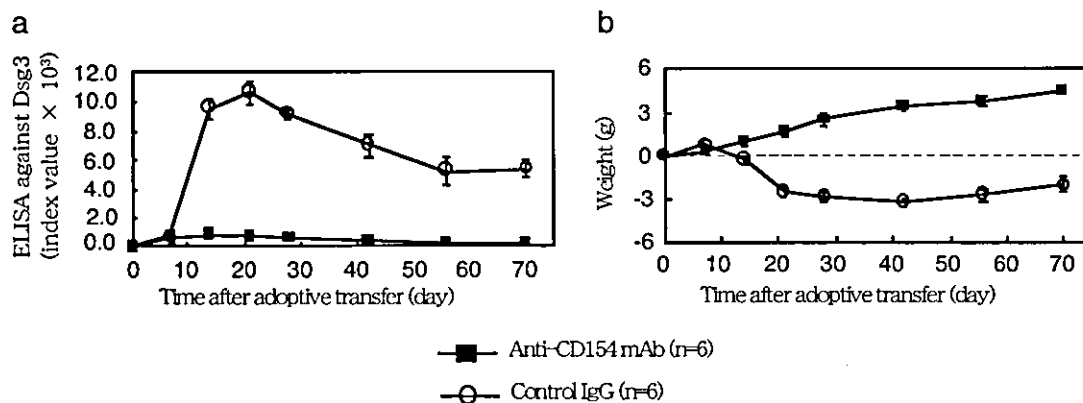


図1. 抗CD154抗体の予防投与による抗Dsg3抗体産生の抑制

(a) 対照群(○, n=6)では移植後14日で明らかな抗Dsg3抗体産生を認めたが, 抗CD154抗体投与群(■, n=6)では移植後70日でも抗Dsg3抗体産生は著明に抑制された。

(b) 対照群では抗Dsg3抗体産生にともない, 体重減少を認めたが, 抗CD154抗体投与群では体重は正常に増加した。

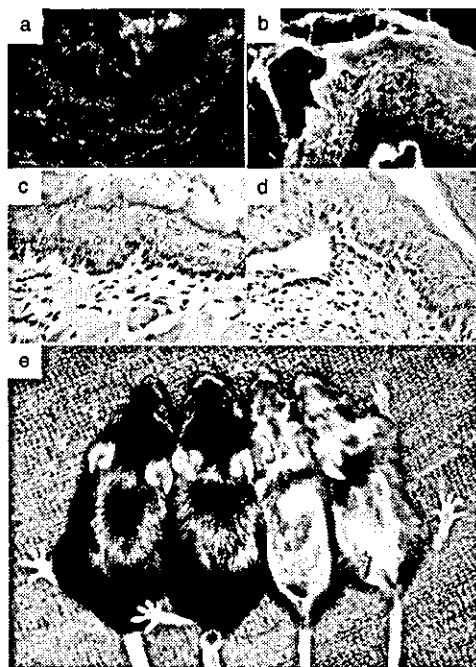


図2. 抗CD154抗体の予防投与によるPV表現型出現の抑制

対照群では, 移植後28日においてケラチノサイト表面へのIgG沈着を認め(口蓋;c), PVに特徴的な基底層直上での棘融解を認めた(口蓋:e)が, 抗CD154抗体投与群で明らかなIgGの沈着および水疱形成は認めなかった(口蓋;b,d)。対照群では移植後14日には体重減少および休止期脱毛などの表現型が認められた(a,右)が, 抗CD154抗体投与群ではこれらの所見は移植後65日においても認めなかった(a,左)。

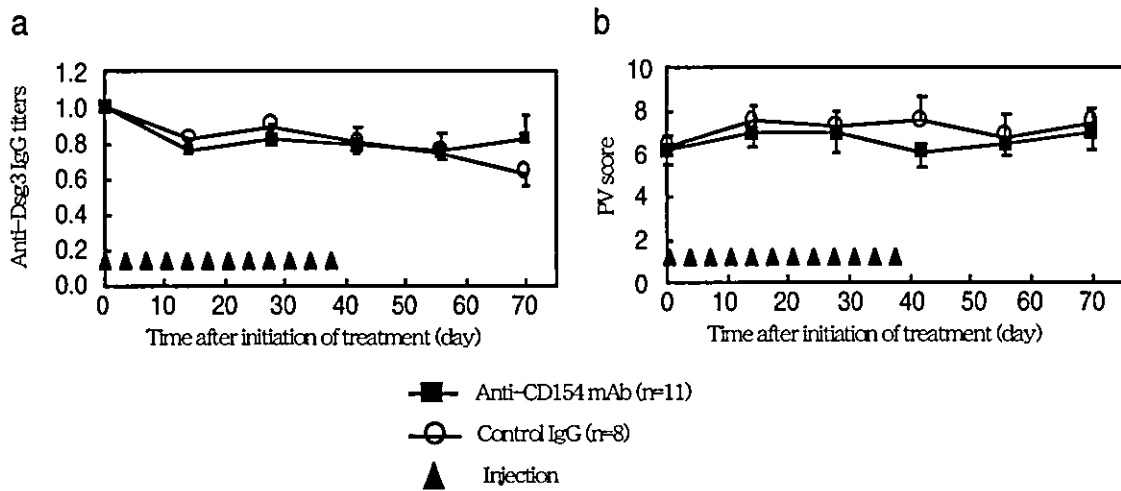


図3. PV モデルマウスにおける抗 CD154 抗体の治療効果

(a) 抗 CD154 抗体投与群 (■, n=11) および対照群 (○, n=8) において抗 CD154 抗体投与による明らかな抗 Dsg3 抗体産生抑制効果は認められなかった。(b) 表現型において, 抗 CD154 抗体投与群では投与開始後 42 日において PV スコア値の減少が認められたが, 対照群との間に有意差は認めなかった。矢印は抗体投与を示す。

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 14-16 年度分担研究報告書

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 教授

研究要旨 自己免疫性疾患に対する治療は、副腎皮質ステロイドおよび様々の免疫抑制薬の投与が主であるが、その投与法は経験主義的に決定されているのが現状であり、客観的な治療評価系の確立が囑望されている。天疱瘡（PV）モデルマウスは、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カ月以上に渡り持続的に認められ、PV に特徴的な病理所見を有する水疱、びらんの形成を認める。PV モデルマウスでは、同一個体の血中抗体価と表現型を経時的観察することにより、様々な治療の効果を経時的にみるのがき、治療評価系として有用である。そこで我々はこの PV モデルマウスを用い現在のヒトの PV の治療に用いられている薬剤として、dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate (FK506)、mycophenolate mofetil (MMF) の7種類を選択した。すべての薬剤が、コントロール群（無投与群）に比し有意の免疫抑制効果を認め、投与された薬剤の中では CPA がもっとも強い抑制効果を示した。PV 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) 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 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。抗体産生の確認後、Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を1匹あたり 1.5 \times 10⁷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

i) 治療評価

使用薬剤は、prednisolone(PSL)、dexamethasone(DEX)、cyclophosphamide (CPA) の3種を用いた。PV モデルマウス発症後より投与を開始した。投与経路は腹腔内投与で、投与量は以下の通りに行った。

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

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。

ii) 予防的効果

使用薬剤は、dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate (FK506) そして 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

i) 治療効果

実験 1

a) PSL

PSL 投与マウスには臨床症状の改善を認めなかった。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。

b) DEX

DEX 投与マウスは臨床症状の改善をみたが、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。

c) CPA

CPA 投与マウスは、臨床症状の改善はなかったが、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。

実験 2

a) 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。

b) 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。

ii) 予防的効果

a) DEX 投与群

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 1、2、図 1 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 の上昇と体重減少を認め、また表現型の出現も認められた。

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、ELISA Score と体重減少、および Survival rate をそれぞれ表 3、4、5 にまとめた。CPA のみが有意差をもって抑制効果が見られ、他の薬剤も抑制効果は認めた。

D. 考察

われわれは 3 年間、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てきた。

治療的薬剤投与で効果をみた初年度は、PV モデルマウスの表現型の観察から、発症したモデルマウスのびらの改善の評価が難しいことを実感していた。次年度は、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ところ、一定の抑制効果を見ることができた。以下にその結果をまとめる。

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結果は類似しなかった。
- 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。

ヒトの PV に対して使用されている主な薬剤の評価を PV マウスモデルを用いて行った。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といえるだろう。実際に最も抑制効果のあった、CPA はヒトの PV 治療において効果が証明されている。PV マウスモデル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うると考えられる。

近年、自己免疫疾患の抗体産生に関わる長寿命形質細胞の存在が指摘されてきている。この細胞は細胞分裂することなく持続的に抗体産生をするため、さまざまな薬剤に対して抵抗性であると考えられる。自己抗体産生のひとつの役割を担っていると思われる。今後はマウスを用いて自己抗体産生の仕組みを明らかにし、抗体産生細胞に対する特異的な治療を見出していきたい。

E. 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)

Y Takae, M Amagai, T Nishikawa:
 Pemphigus mouse model as a tool to
 evaluate various immunosuppressive
 therapies: The 65th Annual meeting of
 the Society for Investigative
 Dermatology

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

F. 知的所有権の出願・登録状況 (予

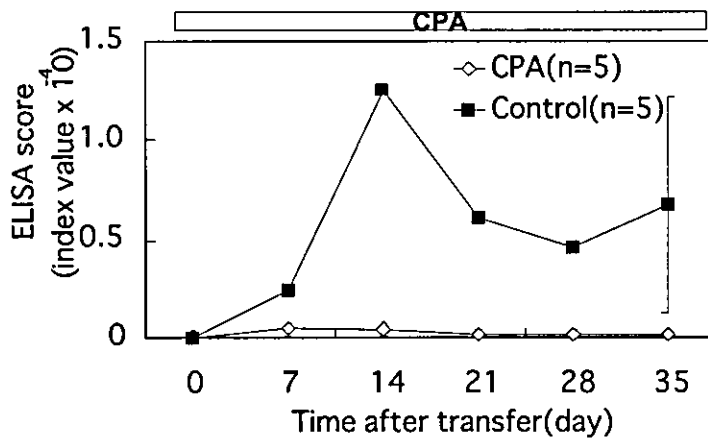


表1 CPA を投与したマウスの ELISA score(35 日目まで)
 CPA 投与群の抗体産生は完全に抑制された。

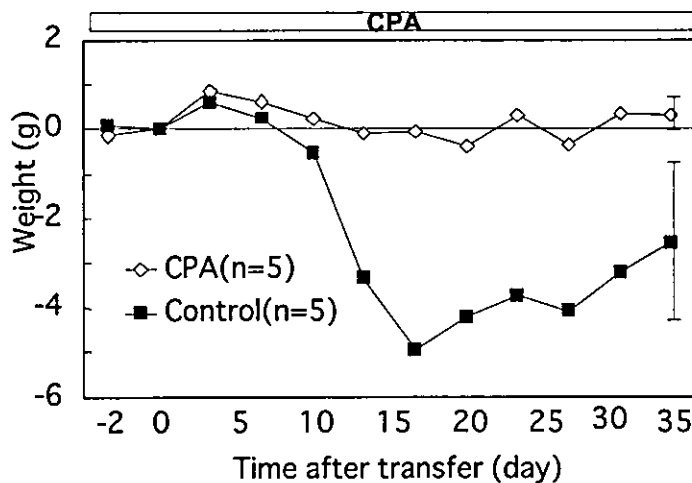


表2 CPA 投与したマウスの体重減少のグラフ(35 日目まで)

CPA 投与群は体重減少を認めなかった。

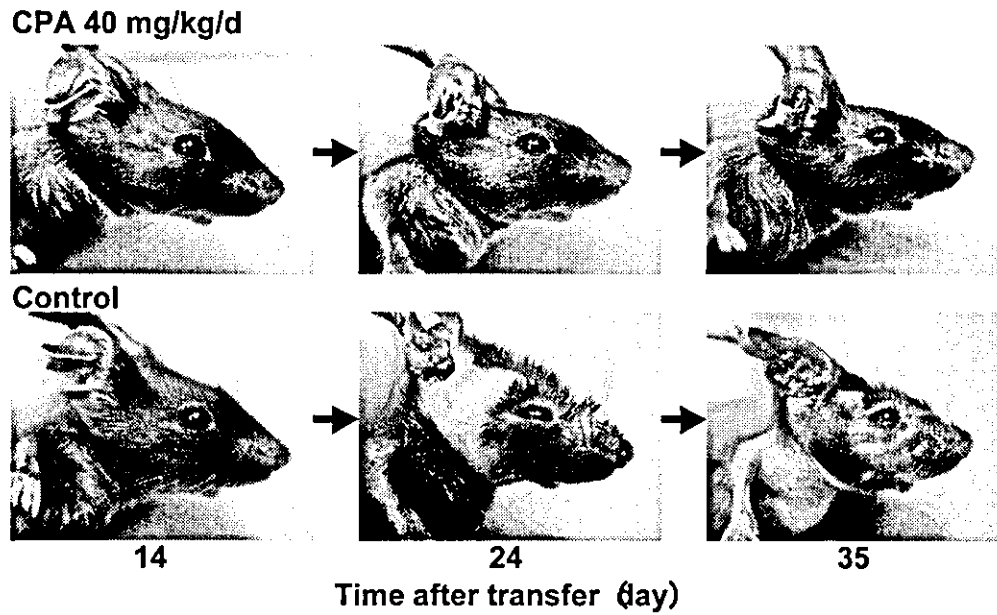


図1 CPAを投与したマウスの表現型の写真(35日目まで)
CPA投与により、表現型の出現は完全に抑制された。

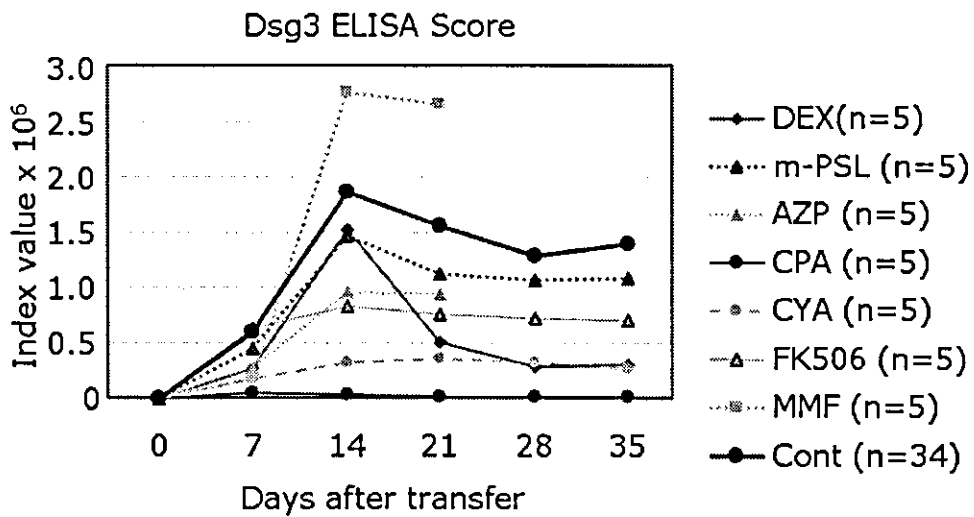


表3 7薬剤のELISA Scoreの比較
CPAは抗体産生を完全に抑制した。

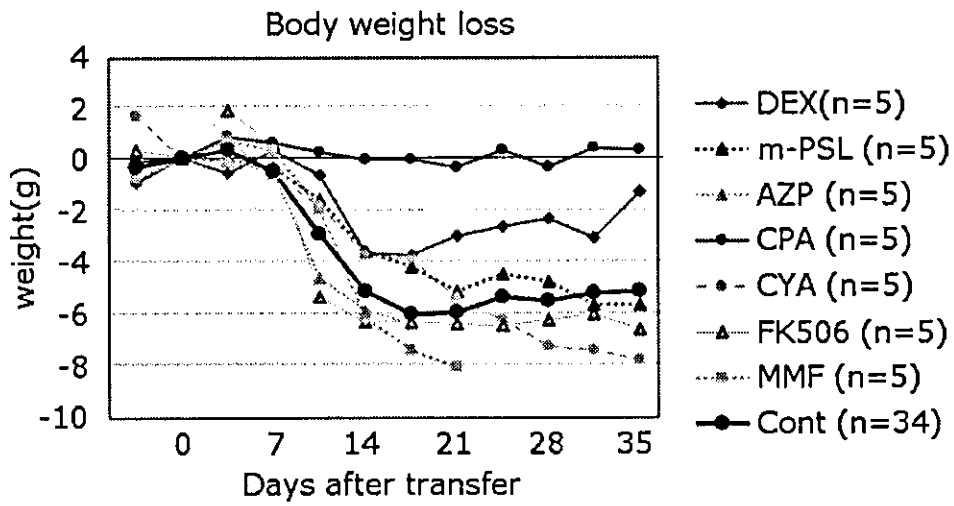


表4 7種薬剤の体重減少の比較
CPA投与群は体重減少を認めなかった。

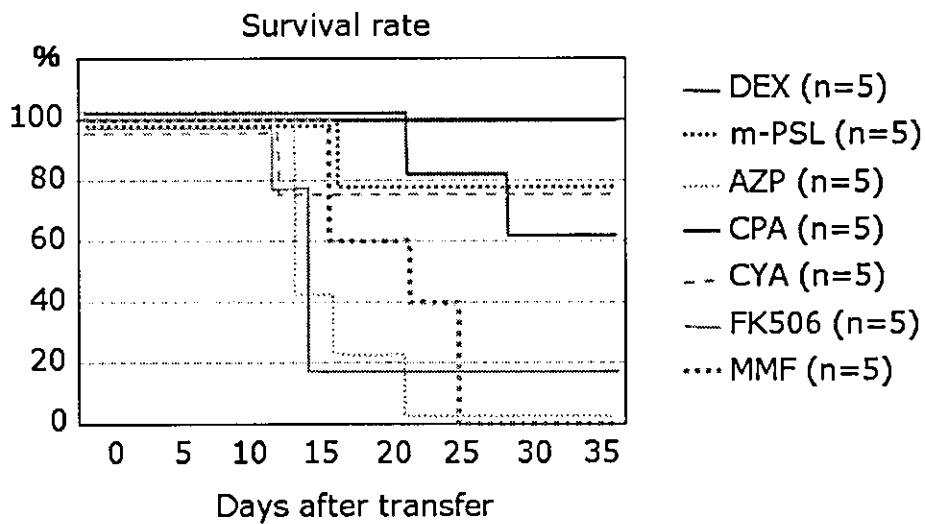


表5 7種薬剤の生存率の比較
CPA投与群は100%生存した。

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 16 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 教授

研究要旨 末梢抗原に対する B 細胞トレランスのメカニズムは未だ不明な点も多い。天疱瘡抗原であるデスマグレイン 3 (Dsg3) に反応するモノクローナル抗体をより 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、B 細胞の挙動を解析した。本マウスでは Dsg3 に特異的な B 細胞は骨髄だけではなく末梢臓器である脾臓、リンパ節にもみられ、機能面において不活化もされていなかった。したがって、臓器特異的な抗原に対する自己反応性 IgM-B 細胞は末梢に存在する可能性が示唆された。また本トランスジェニックマウスに病原性を有する IgG 抗体、AK23 の接種により、Dsg3 特異的な B 細胞は脾臓から消失したが、病原性を有しない IgG 抗体の接種では B 細胞の消失はみられなかった。すなわち末梢抗原に対する新たなトレランスのメカニズムの存在が考えられた。

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

A. 研究目的

様々なモデルマウスを用い、B 細胞トレランスは、receptor-editing、除去、不活化の 3 つの機構からなると提唱されてきた。しかしながら、末梢抗原に対する自己反応性 B 細胞の反応は明らかでない点も多い。同一分子に対しでも、発現臓器が肝臓や皮膚に変わることにより、自己反応性 B 細胞の挙動が異なる。またこれらのモデルでは人工的な抗原を用いているため、生理的な反応と異なる可能性がある。実際の臓器特異的自己免疫疾患の標的抗原に対する B 細胞トレランスはどのようになっているのだろうか。

尋常性天疱瘡はデスマグレイン 3 (Dsg3) に対する IgG により誘導される水疱性自己免疫疾患である。Dsg3 はガドヘルン型の細胞間接着因子の 1 つであり、IgG 自己抗体により、Dsg3 の接着機能が阻害され

るため水疱が誘導される。Dsg3 は主に水疱形成がみられる皮膚、粘膜に発現し、骨髄には発現していないため、いわゆる臓器特異的な抗原である。

我々は天疱瘡モデルマウスを作成し、そのマウスから数々の抗 Dsg3 モノクローナル抗体を単離した。さらに可変領域の cDNA より Dsg3 反応性 B 細胞トランスジェニックマウスを作成した。特に B 細胞の発生段階に焦点を絞るため IgM を発現する B 細胞トランスジェニックマウスを作成し、自己反応性 B 細胞の挙動を解析した。またトランスジェニックマウスに抗 Dsg3-IgG 抗体を接種し、B 細胞のトレランスへの影響を解析した。

B. 研究方法

・B 細胞トランスジェニックベクターの作成

天疱瘡モデルマウスより得られたモノクローナル抗体、AK7 を用い B 細胞トランスジェニックマウスのベクターを構築した。なお AK7 は受動免疫により新生仔マ