

ウスに投与しても水疱形成などの明らかな病原性を有しない。AK7 ハイブリドーマ細胞より RNA を精製し、一本鎖抗体(scFv)の技術にて AK7-scFv を作成し、H 鎖、L 鎖の可変領域の塩基配列を決定した。得られた塩基配列に、それぞれの鎖に特異的なプロモータ、定常領域を組み合わせ、ベクターを作成した。得られたベクターを用い H 鎖、L 鎖を有するマウス (AK7-LH1)、もしくは H 鎖のみを有するマウス (AK7-H18) を C57Bl/6 遺伝的背景のもとにて作成した。なお H 鎖は IgM^a のアロタイプを用いた。従って C57Bl/6 の H 鎖は IgM^b で有るため、アロタイプ特異的な抗体を用いることによりトランスジーン発現 B 細胞と内在性 B 細胞を区別することができる。

・モノクローナル抗体の精製

天疱瘡モデルマウスより得られたハイブリドーマ細胞 AK7、AK9、AK23 の培養上清を rProteinA Separose FF (Amersham) にて精製した。

C. 研究結果

・Dsg3 反応性 B 細胞は末梢リンパ組織に存在する。

Dsg3 の発現部位は、皮膚、粘膜に発現であり、骨髄に発現していないことより、Dsg3 特異的な B 細胞は骨髄では検出されるが、末梢リンパ組織で脾臓、リンパ節では検出されないはずである。AK7-LH1 マウスのそれぞれの臓器 B 細胞を解析したところ、IgM^a 陽性細胞は全ての臓器で認められた (図 1)。L 鎖に関しては allelic-exclusion が不完全であるため、内在性の L 鎖が発現することにより、抗体の特異性が失われている可能性がある。従って、脾細胞を組替え蛋白である rDsg3 と反応させ、続いて Tag に対する抗体を用い染色を行ったところ、IgM^a で染色した場合とほぼ同一の結果が得られ IgM^a 陽性 B 細胞は Dsg3 と反応することが確認された。Dsg3 特異的自己反応性 B 細胞は末梢にて除去されていないことが明らかとなった。

また AK7-H18 マウスのリンパ組織において、H 鎖はトランスジーンを発現するが

L 鎖は内在性由来であるため、得られる抗体の反応は多様性を有する。もし Dsg3 に対する何らかの排除機構が存在するのであれば、Dsg3 反応性 B 細胞は検出されないと考えられた。しかし AK7-H18 マウスの脾臓において B 細胞の約 20% は rDsg3 に対し結合性を示した。従って Dsg3 反応性 B 細胞は末梢リンパ組織において除去されないことが明らかにされた。

・Dsg3 反応性 B 細胞は不活化されていない。

AK7-LH1 マウスにて自己反応性の B 細胞は、骨髄だけではなく、脾臓、リンパ節にも検出された。では、これらの B 細胞は不活化されているのであろうか。細胞内 Ca-mobilization 試験と血中抗体価の測定を行い、確認した。

1. 細胞内 Ca-mobilization 試験

成熟 B 細胞は Ig レセプター刺激にて、一時的に細胞内 Ca 濃度の上昇が認められるが、不活化した B 細胞の場合、この反応は認められない。脾細胞を Fluo-3 で染色し、Ig レセプターを介した刺激を行った。AK7-LH1 マウス脾細胞は抗 IgM 抗体、rDsg3 の刺激により細胞内 Ca 濃度の上昇がみられた。野生型マウスでは抗 IgM 抗体には反応するが、rDsg3 には反応性を示さなかった (図 2)。これらの結果は B 細胞は不活化されていないことを示唆した。

2. 血中抗体価の測定

さらに野生型マウス、AK7-LH1 マウス、AK7-H18 マウスの血中総 IgM 濃度、抗 Dsg3-IgM 抗体価を検討した。血中総 IgM 濃度は 3 つの全てのマウスにて、ほとんど優位差を認めなかったが、抗 Dsg3-IgM 抗体価では AK7-LH1 マウスのみ高い抗体価を示し、AK7-H18 では rDsg3 に反応する B 細胞の分画を有していたが抗体価はきわめて低かった。

さらに硬口蓋を基質とした直接蛍光抗体法により粘膜上皮細胞間への抗 IgM 抗体の in vivo での沈着が確認された。従って AK7-LH1 マウスでは Dsg3 と反応する IgM を血中に分泌し、in vivo において Dsg3 と反応していることが確認された。

以上の結果より AK7-Dsg 3 反応性 B 細胞は除去、不活化によるトレランスから逃れ、末梢に存在することが明らかにされた。

・ Dsg3 特異的な B 細胞の消失

抗 Dsg3-IgG 抗体の B 細胞へのトレランスの影響を明らかにするため、精製した AK23 0.2mg を AK7-Tg マウス腹腔内に接種し、1 週間後に脾細胞を解析した。驚くべきことに、脾臓には Dsg3 反応性 B 細胞はほとんど検出されなかった。またこの現象は用量依存性であり、明らかな病原性を持たない抗体 AK7、AK9 では、同様の現象はみられなかった。(図 3)

D. 考察、結論

Dsg3 に特異的なトランスジェニックマウスを作ることにより、自己反応性の B 細胞は末梢で不活化されることなく存在することが示され、分泌された抗 Dsg3-IgM は生体内の Dsg3 を認識した。従って少なくとも明らかな病原性を有しない抗体 (AK7) の場合、B 細胞トレランスから逃れている可能性が考えられた。従って、ヒトにおいてもある頻度で自己抗体を発現している B 細胞が末梢に存在する可能性ある。実際、Dsg1 に対する自己免疫疾患であるブラジル天疱瘡は風土病であり、その地域では発症していない健常人にも Dsg1 に対する抗体が認められることが示されている。近年、我々は、水疱形成を誘導し、病原性を有する抗体 AK23 を得ることができた。

AK23 は Dsg3 の N 末端を認識し、Dsg3 の接着能を物理的に阻害していると考えられている。病原性を有する抗体を発現している B 細胞と、有しない B 細胞では、成熟段階での挙動は異なる可能性がある。現在我々は AK23 を用いた B 細胞トランスジェニックマウスを作成し、病原性を有する Dsg 3 特異的 B 細胞の挙動を解析する予定である。

今回作製したトランスジェニックマウスは IgM であり、IgG へはクラススイッチは起こさない。一方ヒトの天疱瘡患者において、Dsg3 に対する抗体のほとんどは IgG である。従って抗 Dsg3-IgG 抗体をトランスジェニックマウスに接種することにより、トレランスへの影響を解析した。非常に興味深いことに病原性を有する抗体 AK23 の接種のみにて、脾臓から Dsg3 に反応する B 細胞は消失した。この現象は明らかな病原性を有しない抗体ではみられなかった。本メカニズムに対する詳細な機構は現在のところ明らかではないが、臓器特異的な抗原に対し、抗体を評価するフィードバックメカニズム存在する可能性が示唆された。

これらの B 細胞トレランスの解析は天疱瘡の発症における免疫的なメカニズムの解明に役立つのみならず、臓器特異的な B 細胞のトレランスに対する新たな展開を生むことが期待できる。

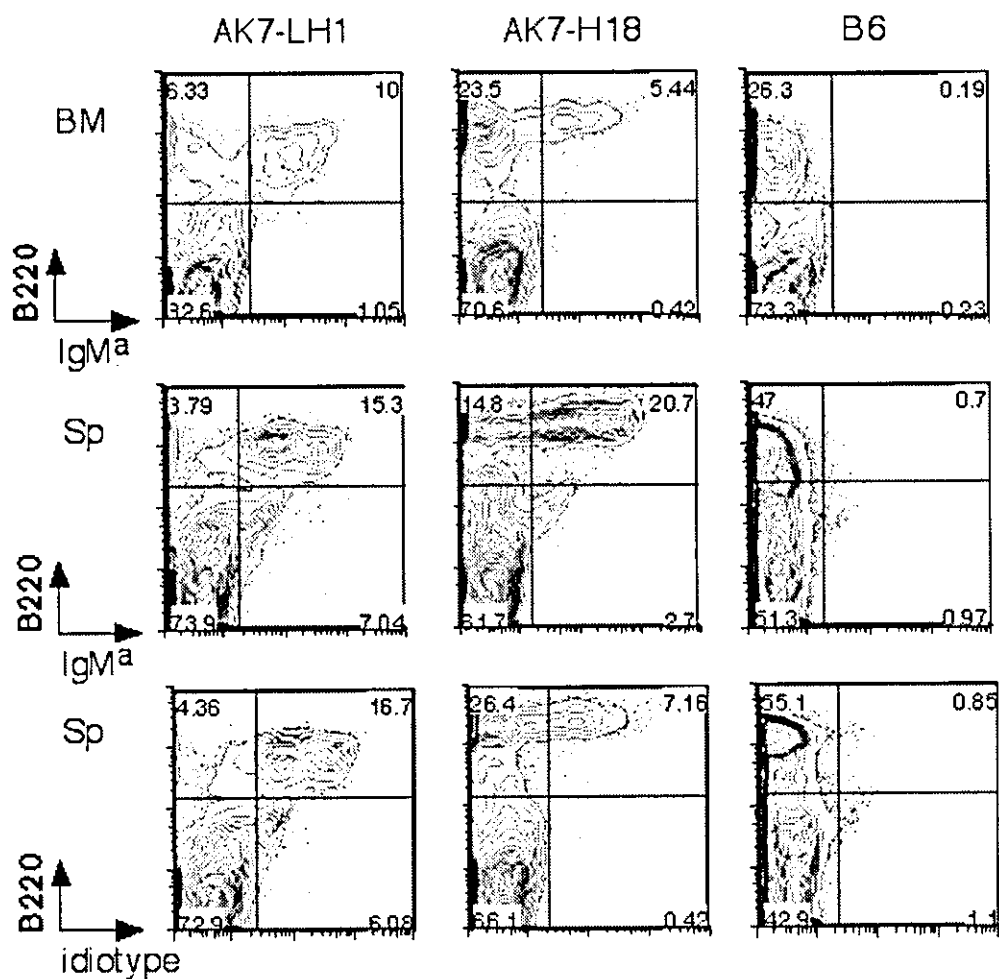


図1
 トランスジェニックマウス、リンパ組織における FACS 解析
 AK7-LH1、AK7-H18 ならびに野生型マウス (C57Bl/6) の骨髄、脾臓、リンパ節の B 細胞の解析結果を示す。AK7-LH1 マウスにて IgM^a を発現している B 細胞は、骨髄だけではなく、脾臓、リンパ節にも認められた。また Dsg 3 を用いた染色では(idiotype)、IgM^a による染色パターンとほぼ同一であった。また H 鎖のみを有する AK7-H18 マウスでも約 20%の細胞は Dsg3 を認識した。

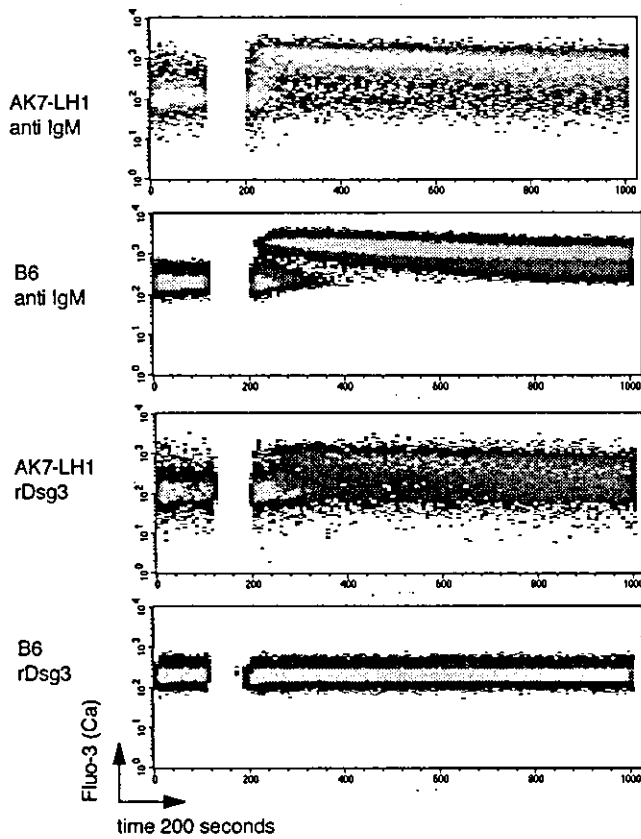


図2 細胞内 Ca-mobilization 試験

C57Bl/6 もしくは AK7-LH1 マウス脾細胞を Fluo-3 で染色し、刺激後の細胞内カルシウム濃度の変化を FACS にて検出した。AK7-LH1 マウス B 細胞はレセプターの架橋、抗原刺激にて細胞内カルシウム濃度の一時的な上昇を示した。

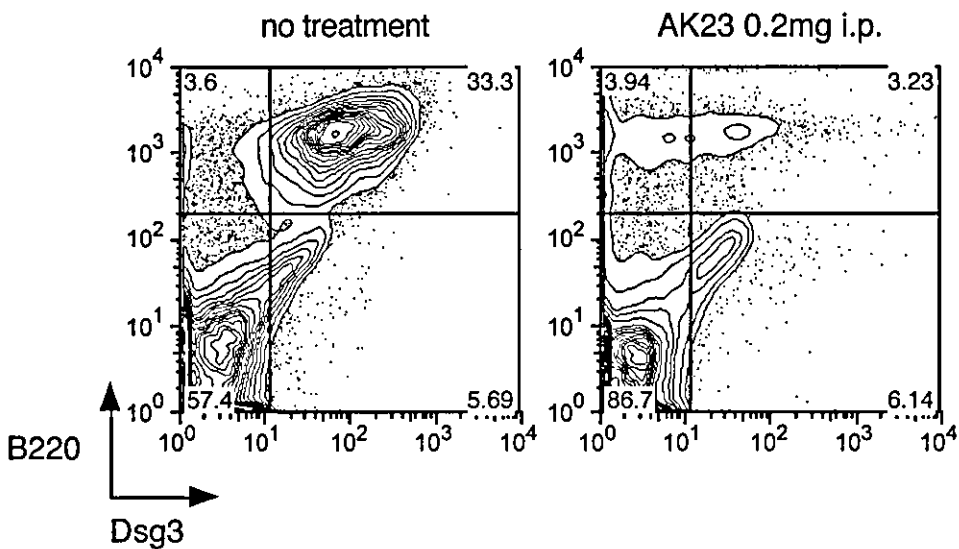


図3 AK23 0.2mg 腹腔内接種 6 日目で脾臓に存在する Dsg3 特異的 B 細胞は著明に減少した。

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 14-16 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)において病原性を有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 Dsg3 反応性 T 細胞の特性を明らかにすることを目的とした。予備実験により Dsg3^{-/-}マウスからの Dsg3 特異的 T 細胞クローニング法を確立し、その手法を用いて現在までに Dsg3 反応性 T 細胞株を 5 株樹立した。このうち、Th0 型の T 細胞クローンは Dsg3^{-/-}B 細胞と共に Rag2^{-/-}マウスに移入すると IgG 抗 Dsg3 抗体産生とともに PV の発現型を誘導したが、Th1 型の T 細胞クローンは病原性を示さなかった。現時点で解析した Dsg3 反応性 T 細胞クローン数は少なく結論に至っていないが、今回確立した動物モデルを用いた手法により病原性を規定する因子を明らかにすることが可能で、他の自己免疫疾患の病態解析や治療標的の選択に有用と考えられた。

共同研究者

高橋勇人、天谷雅行

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

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 アレ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’を有するかについてはいまだ明らかでない。最近、Amagai らは Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を免疫不全マウスに移入することで抗 Dsg3 抗体産生と PV 発現型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 細胞の解析にこの PV モデルマウスの系を用いることを着想した。本研究は、1)Dsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスからの Dsg3 反応性 T 細胞クローンの樹立、2)T 細胞クローンの特性（抗原認識機構、サイトカイン産生能など）の解析、3)T 細胞クローンを Dsg3^{-/-}マウス B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスへ移入し、抗 Dsg3 抗体産生や PV 発現型による病原性の確認、の 3 段階から構成される。さらに、個々の Dsg3 反応性 T 細胞クローンの特性と病原性を比較することで、病原性と関連する T 細胞の特性（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)が抽出できる。その結果は PV に対する新しい治療標的の同定につながる。

3年の研究期間で Dsg3^{-/-}マウスからの T細胞クローン株樹立法を確立し、それを用いて Dsg3 反応性 T細胞クローン株の病原性の評価が可能なることを示した。

B. 研究方法

a) リコンビナントマウス(m)Dsg3 の作成

2つの発現系でリコンビナントマウス Dsg3 を作成した。バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞の培養系で mDsg3 の細胞外ドメインと E-tag, His-tag との融合タンパク (rmDsg3) を発現、精製した。高純度の抗原を得るため、His-tag と E-tag のアフィニティーによる精製を段階的に行った。また、大腸菌の発現系を用いて 10 個以上のアミノ酸を重複した 9 つの mDsg3 断片 (rmDsg3-1~rmDsg3-9) を maltose-binding protein (MBP) との融合タンパクとして発現、精製した。それぞれの精製リコンビナント蛋白の純度は SDS ポリアクリルアミド電気泳動後のクマシーブルー染色により評価した。

b) rmDsg3-1~5 に対する T細胞増殖反応の検出

未免疫 Dsg3^{-/-}マウスより採取した脾臓を RPMI-1640 内ですりつぶし、ACK lysing buffer (BioWhittaker, Walkersville, ND) 中で溶血処理を行うことで単核球を調製した。96 穴丸底プレートに 10⁴ cell/well の脾細胞を 5 μg/ml の rmDsg3-1~5、MBP で 2 ウェルずつ培養し、rmDsg3-1~5 に対する特異的 T細胞増殖反応を検出した。

c) mDsg3 反応性 T細胞のクローニング

CFA で乳化した 10 μg の rmDsg3 を Dsg3^{-/-}マウスの両足底に免疫した。1 週間後に膝窩リンパ節と脾臓から単核球を分離した。培地として 1% の C56BL/6 由来血清を添加した RPMI-1640 を初回刺激時に用い、以後は 10% FBS 添加 RPMI-1640 を用いた。まず Day0 に単核球 (3 x 10⁶ cell/well) を 24 穴平底プレートにまき、5 μg/ml の抗原 rmDsg3-1~5 を加えた。

Day10 に凍結保存しておいた自己の脾細胞 (10⁶ cell/well) に X 線照射 (40Gy) し、mDsg3-1~5 (各 5 μg/ml) とともに培養中に加えた。サイトカインとして Day3, 7, 10, 14, 17, に 1, 2, 5% T-STIMTM

(Becton-Dickinson, Bedford, MA) を加えた。Day21 に抗原特異的増殖反応を検討し、特異的な反応を示した株のみを限界希釈法に用いた。T細胞株は 3~4 日ごとのサイトカインの添加と 10~14 日ごとの抗原刺激により維持した。

d) 抗原特異的増殖反応

96 穴丸底プレートで 10⁴ cell/well の T細胞を 2 x 10⁴ cell/well の X 線照射脾細胞とともに 5 μg/ml の rmDsg3-1~5 または MBP 存在下で培養した。56 時間後に 0.5 μCi/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 に対する反応性は MBP 存在下での放射活性との比として表わし、特異性の確認のためさらに MHC クラス II 拘束性を検討した。

e) MHC クラス II 拘束性の検討

T細胞の抗原特異的増殖反応において、培養液中に 5 μg/ml の抗マウス MHC class II モノクローナル抗体 (M5/114, ラット IgG_{2b}, κ) あるいはアイソタイプが一致したコントロール抗体を添加した。抗原刺激により誘導された T細胞増殖反応が 80% 以上抑制された場合を MHC クラス II 拘束性と判定した。

f) TCRVβ 遺伝子再構成の検出と各種サイトカイン遺伝子発現の解析

T細胞株を PMA(25ng/ml)とイオノマイシン(1 μg/ml)存在下で 3 日間培養後、CD4 および CD8 Dynabeads (Dyna biotech, Oslo, Norway)を用いて T細胞を回収した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA)を用いて total RNA を抽出し、AMV RTase XL(TAKARA, Japan)存在下で cDNA を合成し、以下の PCR に用いた。TCRVβ 遺伝子再構成の検出には 23 種の TCRVβ 遺伝子特異的な 5'側プライマーと共通する TCRCβ 遺伝子に対応す

る3'側プライマーを用いた family PCR を行った。さらに PCR 産物の塩基配列を 3100 Genetic Analyzer(ABI PRISM)を用いて同定した。各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β)の発現は特異的なプライマーを用いた PCR により解析した。

g) T 細胞クローン株の病原性の検討

培養 T 細胞クローン株($0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個)を Dsg3^{-/-}B 細胞(5×10^6 個)とともに Rag2^{-/-}マウスに移入し、抗 Dsg3 抗体産生と皮膚粘膜に生じる PV 発現型により病原性を調べた。Dsg3^{-/-}B 細胞は PV モデルマウス作成法に準じて免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾細胞から MACS CD4 および CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany)を用いて T 細胞を除去した後に MACS B220 MicroBeads により得た。リンホセパール II(ABL, Japan)を用いた比重遠心法により死細胞を除去した培養 T 細胞株を使用した。陽性コントロールとして、培養 T 細胞株の代わりに脾臓から CD4 および CD8 MicroBeads を用いて分画した T 細胞($5 \sim 10 \times 10^6$ 個)を用いた。陰性コントロールとして、Dsg3 に対して特異的な反応を示さない培養 T 細胞株を同数用いた。マウス移入後 7 日ごとに採血し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価を ELISA 法で測定し、Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を用いた直接蛍光抗体法により口蓋、皮膚組織に沈着する IgG を検討した。

C. 研究結果

a) rmDsg3 の作成

rmDsg3 の純度は 80%、rmDsg3-1~5 の純度は 95%以上であった。

b) rmDsg3-1~5 に対する T 細胞増殖反応

Dsg3^{-/-}マウス脾細胞の rmDsg3-1~5 との 3 日間の培養では、rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に対する T 細胞の特異的反応が検出された。

c) Dsg3 反応性 T 細胞株の樹立

限界希釈法により計 21 個の Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立した。T 細胞株の反応性は多様で、rmDsg3-1~4 のいずれかを認

識した。また、すべての T 細胞株は MHC class II 拘束性であった。5 株は TCR β 鎖遺伝子解析によりクローンであることが確認された。

d) TCRV β 遺伝子再構成の検出

Dsg3 反応性 T 細胞クローンの V β 遺伝子を表 1 に示す。V β 遺伝子と認識する Dsg3 断片との間に関連はみられなかった。また、CDR3 領域のアミノ酸配列にも特定のモチーフは見出されなかった。

e) サイトカイン発現解析

Dsg3 反応性 T 細胞クローンのサイトカイン mRNA 発現パターンを表 1 に示す。3 株が Th1 型(IFN- γ)、1 株が Th2 型(IL-4)、1 株が Th0 型(IFN- γ &IL-4)であった。

f) Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の病原性の検討

長期の培養が可能であった Dsg3 反応性 T 細胞クローン 2 株で病原性の検討を行った。B 細胞と共に Th1 型クローン 129#30 を移植したマウスでは抗 Dsg3 抗体価上昇、PV 発現型を認めなかった。一方、Th0 型クローン 140#27 を移植したマウスでは抗 Dsg3 抗体価が上昇した(図 1)。これらマウスでは陽性コントロールと同様に PV 発現型を示し、直接蛍光抗体法で口蓋組織の上皮細胞間に IgG の沈着を認めた。

D. 考察

我々は PV モデルマウスの系を用いることで、Dsg3 反応性 T 細胞クローンを樹立し、それらの *in vivo* での病原性の解析を行った。この実験系は PV に限らず広く自己免疫疾患に応用可能で、自己免疫病態と関連する因子の同定、さらにはそれらに対する分子標的療法の開発に有用と考えられる。

PV モデルマウスから樹立した T 細胞株はすべて MHC クラス II 拘束性であったが、抗原特異性、TCRV β 鎖、サイトカイン発現能は多彩であった。現時点で病原性の解析を行えたのは 2 つのクローンにすぎないが、一方は *in vivo* での病原性を有し、他方に病原性はなかった。Th1 でなく Th0 の T 細胞クローンが病原性を有していたこ

とはTh2 サイトカインの重要性を想定させるが、結論を得るにはさらにデータ集積が必要である。今後、さらに多数の Dsg3 反応性 T 細胞クローンを検討することにより、病原性を規定する要因の同定が可能と考えられた。

E. 結論

PV モデルマウスを用いることで Dsg3 反応性 T 細胞クローンの病原性を解析する実験系を確立した。今後、多数の T 細胞クローンを解析することにより、病原性を規定する因子の同定が可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表 英語論文

- 1) Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M. Restricted T cell receptor b-chain usage by T cells autoreactive to b₂-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. **Blood** 99: 2499-2504, 2002
- 2) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. **J Immunol** 168: 3675-3682, 2002
- 3) Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. **Hum Immunol** 63: 1156-1163, 2002
- 4) Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. **Blood** 101: 621-623, 2003
- 5) Suzuki S, Tanaka K, Yasuoka H, Fukuuchi Y, Kawakami Y, Kuwana M. Autoreactive T cells to the P3A⁺ isoform of AChR a subunit in myasthenia gravis. **J Neuroimmunol** 137: 177-186, 2003
- 6) Kuwana M. Autoreactive CD4⁺ T cells to b₂-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. **Autoimmun Rev** 2: 192-198, 2003
- 7) 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

- 8) 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
- 9) Kuwana M: b₂-glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. **Thromb Res** 114: 347-355, 2004
- 10) Yasuoka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata M, Inoko H, Ikeda Y, Kuwana M: Autoreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related molecule A in patients with Behçet's disease. **Arthritis Rheum** 50: 3658-3662, 2004
- 11) Kuwana M, Ikeda Y: The role of autoreactive T cells in the pathogenesis of ITP. **Int J Hematol** In press.
- 12) Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki K, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of b₂-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. **Blood** In press.

日本語論文

- 1) 桑名正隆: 膠原病の病態と自己抗原反応性 T 細胞. **アレルギー・免疫** 9: 40-46, 2002
- 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: 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
- 4) 桑名正隆: ITP の発症機序と新たな治療戦略. **医学のあゆみ** 209: 93-97, 2004
- 5) 桑名正隆: 自己免疫疾患の遺伝子学. **最新医学** 59: 78-92, 2004.

2. 学会発表

国内

- 1) 桑名正隆: リウマチ性疾患における病因的

自己反応性 CD4⁺T 細胞と樹状細胞を用いたその人為的制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会(神戸). 2002. 4.

- 2) 桑名正隆: 自己免疫疾患の発症機序と自己反応性 T 細胞を標的とした免疫療法. 第 32 回日本免疫学会総会(東京). 2002. 12.
- 3) 桑名正隆、池田康夫: ITP の免疫動態と新たな治療標的. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会(京都). 2004. 9.

海外

- 1) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Matsuura E. Binding of b₂-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.

- 2) Kuwana M. b₂-glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Sydney). 2004. 11.

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. Dsg3 反応性 T 細胞クローンの解析結果

クローン名	認識する抗原	TCRV β	Th型	サイトカイン	in vivoでの病原性
CE129#30	3	8.3	Th1	IL-2, IFN- γ , TGF- β	なし
CE129#35	3	8.3	Th1	IFN- γ , TGF- β	不明
CE135#30	1	8.2	Th2	IL-4, 10, TGF- β	不明
CE140#27	3	6	Th0	IL-2, 4, 10, IFN- γ TGF- β	あり
CE141#70	1	6	Th1	IL-2, IFN- γ , TGF- β	不明

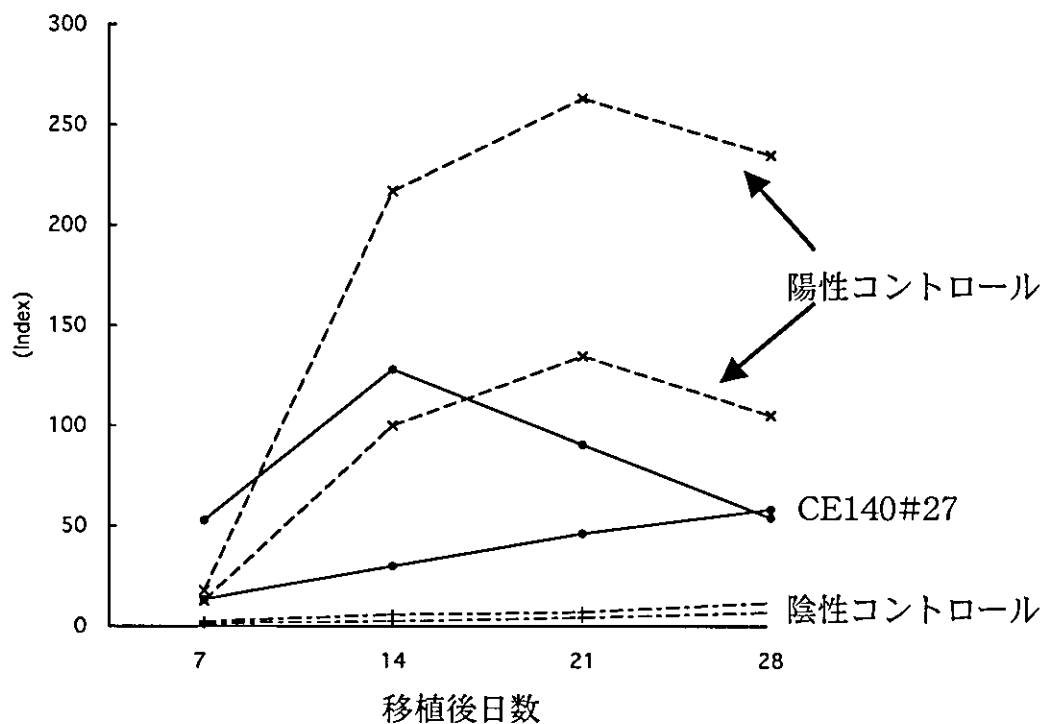


図 1. マウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞クローン (CE140#27) 移植後の抗 Dsg3 抗体価の推移。T 細胞クローン CE140#27 を Dsg3^{-/-}B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスに移入し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価を ELISA で経時的に調べた。陽性コントロールは脾 T 細胞、陰性コントロールは Dsg3 に対して反応を示さない培養 T 細胞株。いずれの群も 2 匹の結果を示す。

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

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 近年、様々な末梢抗原タンパクの胸腺内発現が示唆され、末梢抗原に対する免疫寛容獲得に胸腺が何らかの役割を果たしている可能性が考えられている。我々は天疱瘡抗原のひとつであるデスマグレイン 3 (Dsg3) の胸腺内発現を組織化学的に検討したところ、野生型マウス胸腺において少数の髄質胸腺上皮細胞に Dsg3 の発現を認めた。また、これらの細胞は他のデスモゾーム構成タンパクおよび他の臓器特異的な末梢抗原とともに発現しており、胸腺における Dsg3 は細胞接着因子としてではなく Dsg 3 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

マウス胸腺組織における Dsg 3 発現の局在を解析し、その意義を検討する。

B. 研究方法

野生型成人マウスおよび、Dsg 3 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、パラフィン包埋切片を作製した。我々の既に作成した抗マウス Dsg 3 モノクローナル抗体および、既存の抗マウス Dsg 3 抗体および、ケラチン, Dsg 1, 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 Dsg 3 陽性細胞を少数認めた。この細胞は、形態、局在、および二重染色でケラチン陽性であったことから髄質胸腺上皮細胞であると考えた。対照

として Dsg 3 ノックアウトマウス胸腺では Dsg 3 陽性所見が得られないことを確認した。さらに野生型マウス胸腺における Dsg 3 陽性細胞は Dsg 1, 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では Dsg 3 の発現は著明に減弱していた。

D. 考察

近年、今まで臓器特異的と考えられてきた様々な末梢抗原が髄質胸腺上皮細胞において発現していることが示唆され、末梢抗原に対する免疫寛容と胸腺の関連が注目されている。Dsg3 は自己免疫性水疱症である天疱瘡の標的抗原の 1 つで、その胸腺内発現は今まで mRNA レベルでのみ確認されていたが、本研究によってタンパクレベルでも示され、さらに Dsg3 発現細胞は他の様々な末梢抗原の発現が確認されている髄質胸腺上皮細胞であることがわかった。このことから Dsg3 は、末梢においては細胞接着の機能を担うデスモゾーム構成タンパクだが、胸腺においては他の末梢抗原と同じ意義を持って、すなわち末梢抗原に対する免疫寛容誘導のために発現しているのではないかと推察された。多くの末梢抗原の胸腺内発現は Aire 遺伝子の支配下にあ

ることが示唆されており、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し多臓器に自己免疫性炎症が見られることが知られている。今回 Aire ノックアウトマウス胸腺において Dsg3 発現の減弱を認めたことで、胸腺における Dsg3 発現の意義が免疫寛容誘導にある可能性がさらに示唆された。

E. 結論

野生型マウス胸腺において髄質胸腺上皮

細胞の一部が Dsg3 を発現する。胸腺における Dsg3 発現は Dsg3 に対する免疫寛容を誘導している可能性がある。

G. 研究発表（平成16年度）

学会発表

第796回日本皮膚科学会東京地方会

マウス胸腺におけるデスマグレイン3発現

の検討 和田直子、西藤公司、天谷雅行（慶大）、山田健人（同病理）

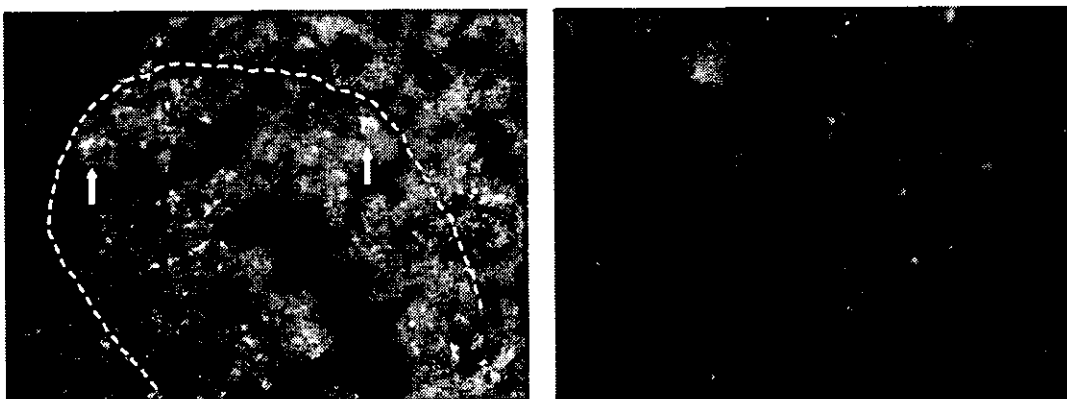


図1 マウス胸腺 凍結組織切片 抗マウス Dsg3 抗体染色 蛍光抗体法
左：野生型マウス胸腺（点線は皮髄境界部）
右：Dsg3 ノックアウトマウス胸腺

野生型マウス胸腺において少数の髄質胸腺上皮細胞が Dsg3 を発現する。

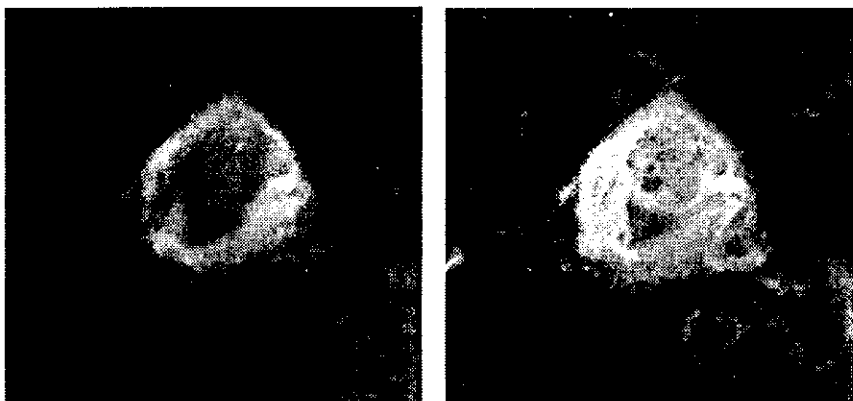


図2 野生型マウス胸腺 凍結組織切片 蛍光抗体二重染色法（左右同一切片）
左：抗 Dsg3 抗体染色 右：抗 Dsg1 抗体染色

Dsg3 陽性の同一細胞が Dsg1 陽性である。

天疱瘡に存在する抗デスマグレイン 4 自己抗体の病因的意義の検討

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 デスマグレイン (Dsg) はデスモゾームにあるカドヘリン型接着蛋白で、角化細胞間の接着に重要な役割を持つ。最近、18 番染色体上に存在する Dsg gene cluster の遺伝子解析の結果、既報告の 3 種のアイソタイプ (Dsg1, Dsg2, Dsg3) に加え、新たな Dsg4 が同定された。本研究では天疱瘡における Dsg4 自己抗体の反応性および水疱形成における役割について検討した。ヒト Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を基質とした天疱瘡血清による免疫沈降法の結果、抗 Dsg1 抗体を有する粘膜皮膚型尋常性天疱瘡血清ならびに落葉状天疱瘡血清の大多数が hDsg4-His と反応性を示した。一方、抗 Dsg1 抗体を持たない粘膜優位型尋常性天疱瘡血清は hDsg4-His を認識しなかった。さらに、抗 Dsg1 抗体を Dsg1 カラムにて除去すると、血清の Dsg4 との反応性は完全に消失した。一方、抗 Dsg4 抗体を除去しても、血清の Dsg1 との反応性に著変はなかった。以上の結果より、天疱瘡患者血清中には Dsg4 のみを認識する自己抗体は存在せず、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応することが示された。次に、免疫吸着法にて落葉状天疱瘡患者血清から抗 Dsg4 抗体を除去しても、新生仔マウスにおける水疱形成能を明らかに低下させることはなく、さらにアフィティー精製した抗 Dsg4 抗体は新生仔マウスに水疱を誘導することもなかった。従って、天疱瘡の血清中には Dsg4 を認識する IgG 自己抗体は、水疱形成に重要な役割はしていないことが考えられた。Dsg4 は皮膚に加え毛嚢上皮にも発現していると報告されており、原因不明とされている脱毛症の自己抗原の一つである可能性もある。Dsg4 ノックアウトマウスを用いた自己免疫性脱毛症モデルマウスを作成し、さらなる Dsg4 の機能解析をすすめることにより、自己免疫性脱毛症の病態解明につながり、新たな展開を生む可能性がある。

共同研究者

長坂 武 (慶應義塾大学医学部助手)
西藤公司 (慶應義塾大学医学部特別研究員)

A. 研究目的

本研究の目的はヒト Dsg4 組換え蛋白を用い、天疱瘡における血清の Dsg4 との反応性および天疱瘡の水疱形成における Dsg4 の関与を検討することである。

B. 研究方法

a) 免疫沈降法による患者血清と Dsg4 の反応性に関する検討

ヒト頭皮から抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR を行い、Dsg4 細胞外領域をコードする cDNA を単離した。この cDNA を用いてバキュロウイルス発現系で Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を作成。血清

と Dsg4 との反応性の有無に関して、落葉状天疱瘡 (PF) 血清 20 例、粘膜皮膚型尋常性天疱瘡 (PV-MC) 血清 19 例ならびに粘膜優位型尋常性天疱瘡 (PV-M) 血清 16 例を用いて検討した。また組換え Dsg 蛋白を用いた免疫吸着法にて自己抗体を除去後、血清と Dsg との反応性についても検討した。

b) 天疱瘡の水疱形成における Dsg4 の関与についての検討

まず Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を充填したカラムを作成し、落葉状天疱瘡 (PF) 患者血清から抗 Dsg4 抗体を除去した (n=2)。処理された PF 血清は抗 Dsg4 抗体除去してない PF 血清とともに硫酸アンモニウム沈殿により IgG 分画が濃縮された。抗 Dsg4 抗体の病原性を評価するため、我々は PF 血清中の IgG 分画、抗 Dsg4 抗体を除去した IgG 分画を段階希釈した後、生後 12-24 時間の新生仔マウス・ICR マウス (体重 1.6-1.8g) に皮下注射し、9-24 時間後における肉眼的・顕微鏡的水疱形成の有無を観察した。さらに、PF 血清からアフィニティー精製された IgG 分画 (抗 Dsg4 抗体) (n=2) も同様に新生仔マウスに皮下注射し、水疱形成能について検討した。

C. 研究結果

a) hDsg4-His を基質とした免疫沈降法の結果、抗 Dsg1 抗体を有する粘膜皮膚型 PV 血清 19 例中 13 例 (68.4%) ならびに PF 血清 20 例中 17 例 (85.0%) が hDsg4-His を認識した。一方、抗 Dsg1 抗体を持たない粘膜優位型 PV 血清 16 例全て (0%) が hDsg4-His を認識しなかった (図 1)。さらに抗 Dsg1 抗体を組換え Dsg1 による免疫吸着法にて除去すると、全ての血清の Dsg4 との反応性は完全に消失した (n=30) (図 2a, c)。一方、抗 Dsg4 抗体を除去しても、血清の Dsg1 との反応性に著変はなかった (n=11) (図 2b, d)。

b) 血清中の IgG 分画 (n=2)・血清から抗 Dsg4 抗体を除去した IgG 分画 (n=2) を濃縮後、等倍および 2 倍希釈し、新生仔マウスに注射した。いずれのマウスにおいても 13 時間以内に肉眼的・顕微鏡的に水疱

形成が観察された (n=16)。一方 4 倍以上に希釈したいずれの IgG 分画においても 24 時間後に水疱は誘導されなかった

(n=16)。すなわち血清の IgG 分画・血清から抗 Dsg4 抗体を除去した IgG 分画両者間でマウスにおける水疱形成能に差異はなかった。さらにアフィニティー精製した抗 Dsg4 抗体を新生仔マウスに注射、24 時間観察したところ、水疱は誘導されなかった (n=15) (図 3)。

D. 考察

以上より抗 Dsg1 抗体を有する PF、PV-MC 患者血清の大部分が Dsg4 を認識することが判明した。そして天疱瘡患者血清中に Dsg4 のみを認識する自己抗体は存在せず、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応することが示された。さらに Dsg4 は天疱瘡における水疱形成にほとんど関与していないことが判明した。Dsg 分子のアミノ酸配列を比較すると、全体で Dsg4 は Dsg1 と 41% の相同性がある。一方、抗原抗体反応に重要なエピトープが存在すると考えられる N 末端側の EC1 領域に注目すると、Dsg4 は Dsg1 と 82% の相同性を示す。特にデスマグレインの接着機能に重要と考えられている、トリプトファン接着面のドナーであると予測されるアミノ酸は Dsg1 と Dsg4 とでは 15 中 14 アミノ酸と高率に保存されている。しかしながら本研究に示したように、患者血清中に Dsg4 のみを認識する自己抗体はなかった。よって我々は Dsg4 が天疱瘡の自己抗原ではなく、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応すると考えた。この Dsg4 はヒトでは表皮に加え毛嚢上皮にも発現していると報告されている。また Dsg4 ノックアウトマウスはその皮膚に水疱・びらん形成を認めない一方、“lanceolate hair (槍さき状の毛髪)” と称される異常な毛髪形成が観察されるという。よって Dsg4 は表皮細胞接着よりもむしろ毛嚢形成に重要な役割を果たしていることが想定され、原因不明とされている脱毛症の自己抗原の一つである可能性がある。既に我々は免疫した Dsg3 ノックアウトマウスの脾細胞を免疫不全マウスに移植することにより天疱瘡モデルマウスの作成

に成功している。同様の手法を用いて我々はすでに Dsg4 ノックアウトマウスを用いて自己免疫性脱毛症モデルマウスを作成に着手しており、さらなる Dsg4 の機能解析を予定している。

E. 結論

本研究で天疱瘡患者血清中には新しいデスマogleイン Dsg4 のみを認識する自己抗体は存在せず、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応することが初めて証明された。また Dsg4 は天疱瘡における水疱形成にほとんど関与していないことが初めて証明された。Dsg4 は表皮細胞接着よりもむしろ毛嚢形成に関与している可能性があると考えられる。今後、我々がすでに着手している Dsg4 ノックアウトマウスを用いた自己免疫性脱毛症モデルマウスの作成により、さらなる Dsg4 の機能解析をすすめる。これらは原因不明の脱毛症の病態解明、種々の免疫抑制治療法の評価などにつながり重要であると考えられる。

F. 研究発表

学会発表

西藤公司、長坂武、大田孝幸、Neil V Whittock、西川武二、天谷雅行
天疱瘡および膿痂疹の病態におけるデスマogleイン 4 の関与の検討
第 10 回分子皮膚科学フォーラム
京都、2003 年 11 月 21 日

長坂武、西藤公司、大田孝幸、Neil V Whittock、天谷雅行
天疱瘡患者血清中に存在する抗デスマogleイン 4 抗体の水疱形成における関与
第 29 回日本研究皮膚科学会
京都、2004 年 4 月 14 日

西藤公司、長坂武、大田孝幸、天谷雅行
天疱瘡におけるデスマogleイン 4 反応性 IgG 自己抗体の解析 第 11 回分子皮膚科学フォーラム、旭川、2004 年 10 月 23 日

Nishifuji K、Nagasaka T、Ota T、Whittock NV、Amagai M
Is desmoglein 4 involved in the blister formation in pemphigus or impetigo?
The 65th meeting of the Society for Investigative Dermatology
Providence, Rhode Island, April 30th, 2004

論文

Nagasaka T、Nishifuji K、Ota T、Whittock NV、Amagai M: Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest* 114: 1484-1492, 2004

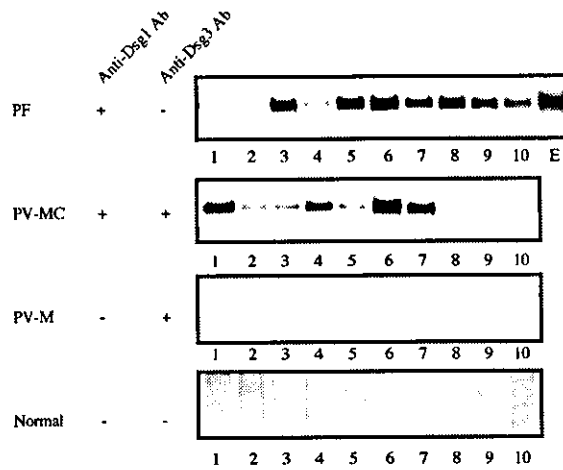


図1 免疫沈降法による患者血清と Dsg4 の反応性に関する検討
 抗 Dsg1 抗体を有する粘膜皮膚型 PV 血清 19 例中 13 例 (68.4%) ならびに PF 血清 20 例中 17 例 (85.0%) が hDsg4-His を認識した。一方、抗 Dsg1 抗体を持たない粘膜優位型 PV 血清 16 例全て (0%) が hDsg4-His を認識しなかった。なお健常人 34 例において hDsg4-His は認識されなかった。

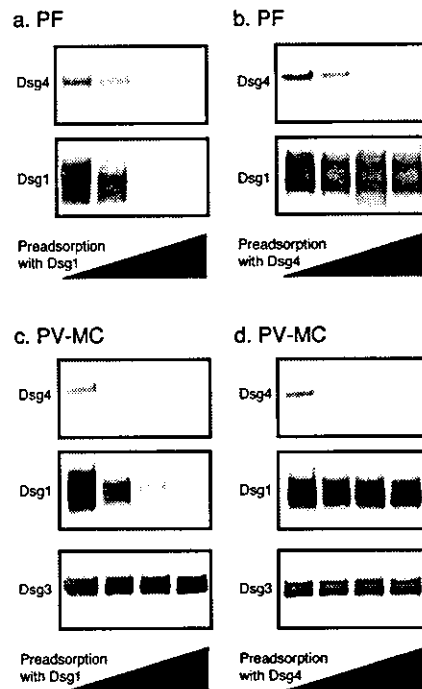


図2 抗 Dsg1 抗体除去による血清と Dsg4 との反応性の消失
 a. c. 組換え Dsg1 蛋白を用いて抗 Dsg1 抗体を除去すると、血清と Dsg4 との反応性は完全に消失した。一方、血清と Dsg3 との反応性は影響されなかった。
 b. d. 組換え Dsg4 蛋白を用いて抗 Dsg4 抗体を除去しても、血清と Dsg1 との反応性に著変はなかった。なお黒三角印は抗体除去に使用された組換え蛋白の量を示す。

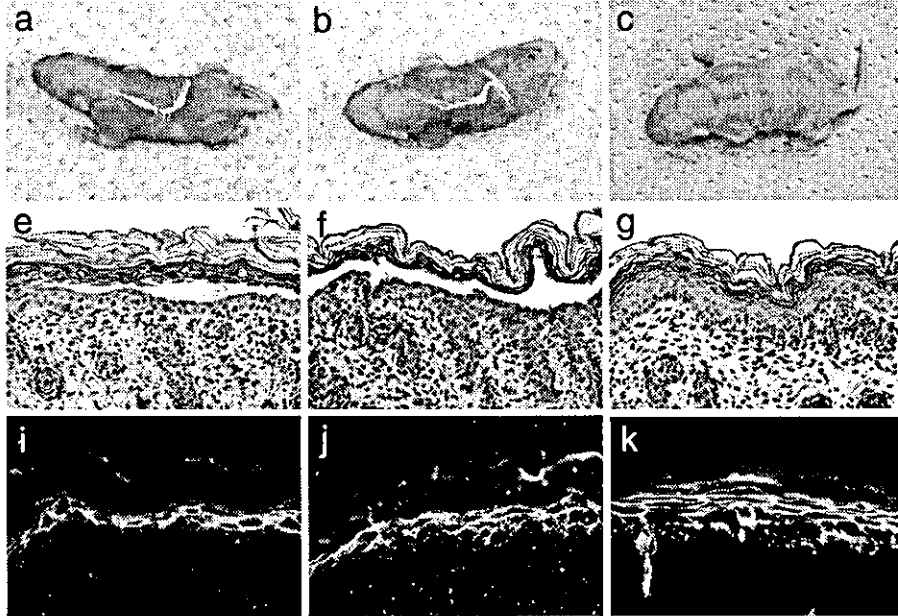


図3 Dsg4 反応性 IgG 分画は天疱瘡における水疱形成に関与しない
 PF 血清 (A, E, I)、抗 Dsg4 抗体を除去した PF 血清 (B, F, J)、アフィニティー精製した抗 Dsg4 抗体 (C, G, K) を新生仔マウスに皮下注射し、病的活性について検討した。図に肉眼的所見 (A-C)、病理組織所見 (E-G)、直接蛍光抗体法所見 (I-K) を示す。抗 Dsg4 抗体を除去しない PF 血清 (A, E, I) と抗 Dsg4 抗体を除去した PF 血清 (B, F, J) を注射したマウスにおいて、同様な肉眼的・顕微鏡的水疱が観察された。アフィニティー精製した抗 Dsg4 抗体は表皮細胞間に IgG の沈着を認める一方、水疱は誘導されなかった (C, G, K)。

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

天疱瘡自己抗体病的活性の in vitro デジタル測定法の開発

分担研究者 田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科 助教授

研究要旨 尋常性天疱瘡患者血中には、細胞間接着因子であるデスマグレイン 3 (Dsg3) に対する抗体が存在し、その抗体が表皮細胞接着を阻害し、水疱形成を誘導することが明らかにされている。病勢の指標として、蛍光抗体法間接法や ELISA 法で測定された抗体価が使用されている。しかしながら、これらの方法で得られる抗体価は、個々の抗体の細胞間接着阻害能を直接示す値ではない。本研究では、天疱瘡患者血清中自己抗体の細胞間接着阻害活性を測定する in vitro の検査法を開発した。正常ヒト表皮由来ケラチノサイトをシート状に培養し、抗 Dsg3 モノクローナル抗体、あるいは患者血清を添加後、細胞シートをピペッティングによる機械的ストレスを加え、分断された細胞集塊数を計測し、細胞接着阻害活性の指数(Dissociation Score : DS)とした。天疱瘡モデルマウスより単離されたモノクローナル抗 Dsg3 抗体を用いて検討したところ、明らかに病的活性を持つ抗体 AK23 で処理をした細胞シートは、多数の細胞塊に分断されたのに対し、マウスモデルで明らかな病的活性を示さない抗体 AK20 で処理した細胞シートは分断されなかった。次に、患者血清を用いて検討したところ、活動期の天疱瘡患者血清 (n=10) の平均 DS は 42.2、正常人血清 (n=5) の平均 DS は、15.6 であり、有意に患者血清は高い DS 値を示した。さらに、Dsg3 ELISA 値が同程度で、活動期の患者血清 (n=3)、寛解期の患者血清 (n=3) を比較すると、活動期の患者血清において、DS 値は、27~60 と高値を示したのに対し、寛解期の患者血清における DS 値は 10~20 と低値を示し ELISA 値よりも病勢を正確に反映する値が得られた。以上より、本検査法は、天疱瘡自己抗体の細胞間接着阻害活性を測定する簡便で客観的な測定法となると考えられた。

共同研究者

石井 健 東京電力病院
慶應義塾大学医学部
天谷雅行 慶應義塾大学医学部専任講師
白方裕司 愛媛大学医学部皮膚科助手
橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科教授

A. 研究目的

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

これらの方法で得られる抗体価は、個々の抗体の細胞間接着阻害能を直接示す値ではなく、かならずしも、重症度を反映しない。

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

B. 研究方法

Dissociation Assay 法

デスマグレイン3とデスマグレイン1を主に発現している正常ヒト表皮由来の培養ケラチノサイトを使用した。培養ケラチノサイトをコンフルエントの状態まで培養した後、カルシウムを含む培養液に換えることにより、細胞間接着能を誘導し、細胞をシートの状態にする。各種血清、抗体を加え、一晚静置する。実験の二時間前に、exfoliative toxin Aを加えることによりデスマグレイン1を分解する。dispaseを用いて細胞シートをdishより剥離し、さらに、ピペッティングにより機械的ストレスを与えることにより、細胞シートを分断する。分断された細胞塊の数を細胞接着阻害活性の指数 (Dissociation Score : DS) として使用した。

C. 研究結果と考察

この検査法が、抗デスマグレイン3抗体のうち、病的活性を持つ抗体のみを検出することができるかどうか検討した。モノクローナル抗 Dsg3 抗体 AK7、AK20、AK23 の3種類を用いた。AK7は、ヒト Dsg3 ELISA で陰性を示し、ヒト Dsg3 への反応性を示さない抗体、AK20は、Dsg3 ELISA 陽性であるが、新生仔マウスに抗体を投与しても水疱形成を示さなかった抗体である。また、AK23は Dsg3 ELISA 陽性で、しかも、病的活性をもつ抗体である。抗体を加えない細胞シートにおいては、細胞シートはほとんど分断されなかった。ヒト Dsg3 抗体と反応性を有さない AK7、病的活性を持たない抗体 AK20 を加えた細胞シートは、抗体を加えていない群と同様にほとんど細胞シートは分断されなかった。

一方、病的活性のある AK23 を加えた群では、dose dependent に細胞シートが分断されているのが認められた。この結果より、この検査法は、抗 Dsg3 抗体のなかでも病的活性を持つ抗体のみを検出できることが明らかになった。(図1)

さらに、天疱瘡患者血清を用いて、この検査法で検討した。活動期の尋常性天疱瘡 (PV) 患者血清10例、正常人血清を5例を使用し、DS 値を比較した。正常人血清においては、DS 値の平均値は 15.6 を示したのに対し、PV 血清の平均 DS 値は、42.5 と有意に高値を示し、DS 値がより高い値を示した(図2)。患者血清においても、血清中の細胞接着阻害活性を検出できると考えられた。

次に、この検査法の DS 値が、ELISA の Index 値と比較して天疱瘡自己抗体の病的活性をより反映するかどうかを検討した。検討した血清は、Dsg3 ELISA index 値が約 100 程度の血清で、活動期の患者血清3例、寛解期の患者血清3例を比較した。ELISA 値が同等程度にもかかわらず、活動期の患者血清において、DS 値が 27-50 と高値を示したのに対し、寛解期の患者血清においては、DS 値は 10-19 と低値を示し、ELISA 値よりも病勢を正確に反映する値が得られた。

D. 結論

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

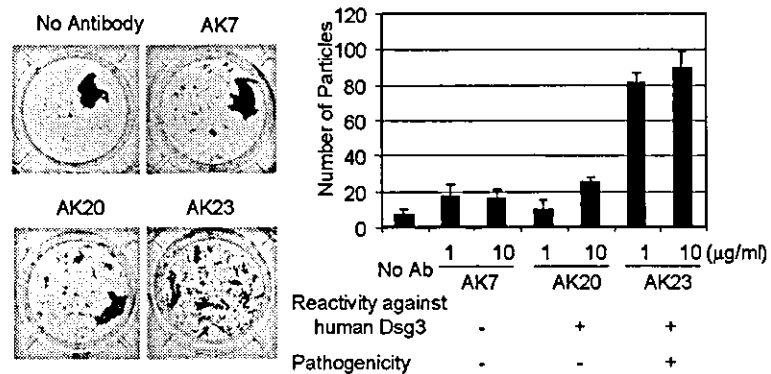


図1. モノクローナル抗 Dsg3 抗体の細胞接着阻害活性の測定。モノクローナル抗 Dsg3 抗体 AK7, AK20, AK23 の3種類を用いて、方法に欄に示す如く Dissociation Assay を施行した。(AK7: Dsg3 ELISA で陰性を示し、ヒト Dsg3 への反応性を示さない抗体、AK20: Dsg3 ELISA 陽性であるが、新生仔マウスに抗体を投与しても病的活性を示さなかった抗体、AK23: Dsg3 ELISA 陽性で、しかも、病的活性をもつ抗体。) AK23 で処理した細胞シートのみ、用量依存的に細胞シートがばらばらに分裂するのが認められた。

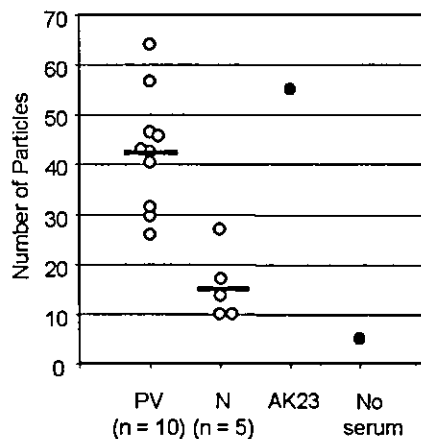


図2. 尋常性天疱瘡患者血清と正常人血清の Dissociation Score(DS)の比較。活動期の尋常性天疱瘡患者 (PV) 血清 10 例、正常人血清 5 例を Dissociation Assay で測定。PV 患者の DS の平均値は正常人血清の DS の平均値よりも有意に高値を示した。