

細胞質画分と、沈澱（不溶性）のデスモソームを含む細胞骨格画分とに分画した。6%SDS-PAGE後、免疫ブロット法を用いてPGとDsg3を検出（anti-PG mAb; PG5.1、anti-Dsg3 pAb; AHP319使用）した。ペプチドバンドをATTO Lane Analyzerによって数値化し、PG、 $\beta$ カテニンおよび $\alpha$ アクチンをコントロールとした時のDsg3の減少率を算出した。

#### 4) 天疱瘡およびAK23抗体刺激と細胞間接着力測定

AK23とAK20を0.5mg/ml、PV-IgGを0.5mg/ml、および陰性コントロールとして正常マウスIgGを0.5mg/mlで刺激を行った。24時間後、抗体液を除去し、500 U/mlのDispaseで37°C30分反応させてディッシュから細胞を剥がした。細胞を回収後、PBSで洗いながら残りの細胞をさらに2.0mlのエッペンドルフチューブに回収した。P1000ピペットマンで5回ピペッティングを繰り返して物理的刺激を加えた。後に最終濃度50%エタノールで5分固定し、最終濃度1  $\mu$ g/ml DAPI（核染色液）を加えて15分反応させた。2000rpmで5分の遠心分離により細胞コロニーを沈殿として集め、FluorSaveに浮遊させてスライドグラスに滴下、伸展して観察用試料作成した。上清についても細胞が残っていないか確認するため、同様にサンプルを作製した。蛍光顕微鏡にて340nmの波長で観察した。1サンプルあたり10枚の画像を撮り、核の集まりとして観察される各細胞コロニーの蛍光強度をImage-Jにより測定した。

細胞数と蛍光強度の関係を求めるためにスライドグラスにサンプリングしたDJM-1細胞のコロニーの細胞が1個から300個までのコロニーの蛍光強度を測定し、横軸に細胞の個数を、縦軸に蛍光強度を取りグラフを作成した。その結果蛍光強度と細胞個数には比例の関係にあったため（結果、図1）、蛍光強度を細胞数の指標とした。画像1枚中の30個以上のコロニーの総細胞

数/30個以下のコロニーの総細胞数の比を求め、抗体刺激後の前述した一定の可視数のピペッティングによって大きなコロニーから分離した小細胞数コロニーの割合がどの程度増えるかを検討した。

### C. 研究結果

#### 1) Dsg3の免疫ブロットによる判定量のための内部標準の検討

これまでは内部標準としてPGを用いてきたが、PGはデスモソームの成分でありDsg3とも結合しているため、内部標準として適当かどうか問題であった。そこで、今回デスモソームとは直接関連性のない $\beta$ カテニンと $\alpha$ アクチンを内部標準にして、検討した。細胞をPV-IgG、AK23 mAbで30分、24時間刺激してその全細胞抽出画分内のDsg3減少率を比較したところ、図1のA、B、Cに示すようにPV-IgG刺激ではどれを標準にとってもコントロールIgG刺激に対して、90%の減少率を示し、AK23 mAb刺激では30%の減少率を示した。

しかし、1%Tx100可溶性画分と不溶性画分に分化して検討すると、1%Tx100可溶性画分では全く問題なかったが、1%Tx100不溶性画分では $\beta$ カテニンはDsg3ペプチドバンドと比較すると極めて薄くしか反応しなかった。さらに、 $\alpha$ アクチンは1%Tx100不溶性画分では全く検出されなかった（図1のD）。

#### 2) AK23 mAbにnon-AK23 mAbsを添加した時のDsg3減少活性

AK23 mAbに他の抗Dsg3モノクローナル抗体（non-AK23 mAb）を添加した時のDsg3の減少活性を比較した。その結果、AK23 mAbにnon-AK mAbを一種添加した時より2種添加した時の方がDsg3減少活性は増加し、4種のAK mAbを混合した時が最もDsg3減少活性が高かった。しかし、AK23mAb AK23+AK19、+AK18 or +AK20）、（AK23+AK19+AK18、+AK19

+AK20 or +AK18+AK20) (AK23 +AK19 +AK18 +AK20) の組み合わせのように添加しても、AK20 添加前と同程度の Dsg3 減少活性しか見られなかった (図 2)。すなわち、AK20 mAb には Dsg3 減少活性が単独でも、添加でも見られなかった。

### 3) PV-IgG, AK23 mAb, AK20 mAb 単独刺激とAK mAb 4種混合刺激による細胞間接着力減少活性

その結果、病原性のない AK20 mAb 刺激では Dsg3 の減少も見られなかったが (図 3 B)、細胞間接着力の減少も見られなかった (図 3 A)。AK23 mAb 刺激で Dsg3 が約30%減少し (図 3 A)、接着力も約30%減少した (図 3 B)。PV-IgG と AK mAb 4 種混合刺激は共に細胞間接着力の減少は50%であったが、その Dsg3 の減少率は異なってそれぞれ90%と75%であった (図 3 A, B)。これは、細胞間接着力は Dsg3 の50%減少までは Dsg3 残量に相応して減少するが、それ以上 Dsg3 が減少しても約50%にまでにしか減少しないことを示している。これは他のデスモソームカドヘリンが代償していると推察される。

## D. 考察

我々はこれまでに病原性マウスモノクローナル抗体 AK23 の Dsg3 への結合は、尋常性天疱瘡抗体と同様に24時間刺激により Dsg3 減少デスモソームを形成し、抗 Dsg3 抗体の結合による特異的な反応であることを示した。しかし、AK23 抗体刺激時には PV-IgG 刺激程の顕著な Dsg3 減少は見られなかった。一方、AK23 の長時間刺激では、抗体濃度に関わらず PV-IgG 刺激減少率約90%の半分程度の約40%のままプラトーに達し、変化が見られなかった。このことから、抗体の結合により引き起こされる Dsg3 の減少は、全か無かの法則のような一義的な反応なのではなく、エピトープやアフィニティなど異なる抗体がそれぞれに異なる Dsg3 減少活性を持ち、それらの

相加的な反応として観察されるのではないかと推測した。

これまでの報告では、Dsg3 の免疫ブロットによる半定量では PG を内部標準に用いていたが、デスモソームの構成成分であり Dsg3 と結合することから、疑問が提出されていた。そこで、 $\beta$ カテニンと  $\alpha$ アクチンを内部標準としたときと PG を内部標準とした時を比較した。その結果、PG でも他の2種の蛋白と同様に内部標準として用いることが示された。これは、PG が Dsg3 と結合しているものの、まだ他のデスモソームカドヘリン、クラシカルカドヘリンに結合している部分と細胞質内プールの部分が多いため、内部標準として使用できると推察した。また、 $\beta$ カテニンと  $\alpha$ アクチンはトリトン X 不溶性画分では検出できなかったため、使用しなかった。

AK mAb の混合刺激は、単独刺激よりも Dsg3 の減少率が強くなり、全4種混合では最大になり、かつ、細胞間接着力も最大になった。このことから患者からの PV-IgG が極めて強い Dsg3 減少活性と、細胞間接着力減少活性を持つことはそのポリクロナリティによるものであると推察できる。しかし、Dsg3 が一定以上減少しても、細胞間接着力が50%程度でプラトーに達することは他のデスモソームカドヘリンやアドヘレンスジャンクションが Dsg3 減少による細胞間接着減少を補填していると推察され、デスモグレイン代償説を肯定すると考えられる。

## E. 結論

以上から、病原性の強度は抗 Dsg3 抗体のエピトープ部位の差異のみならず、1分子の Dsg3 に結合している抗体数が多い (すなわちポリクローナルである) ほど Dsg3 減少活性が強く、細胞間接着力が減少したことによるという可能性が示唆された。また、Dsg3 消失しても細胞間接着力は減弱するものの、他の接着分子によって

ある程度は代償されるということが推察された。

この内容の一部は *J Biological Chemistry* 2007に発表したものである。

## 参考文献

- (1) Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: Involvement of protein kinase C. **J Invest Dermatol Symp Proc** 4:137-144, 199
- (2) Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y, A pathogenic autoantibody, pemphigus IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. **Eur J Immunol** 29:2233-2240, 1999
- (3) Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3(Dsg3) from the triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. **J Invest Dermatol** 112:67-71, 1999
- (4) Tsunoda K, Amagai M., Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol.** 170:2170-8, 2003.
- (5) 北島康雄、厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)平成16年度分担研究報告書
- (6) Sato M, Aoyama Y, Kitajima Y. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. **Lab Invest** 80:1583-1592, 2000

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表 (平成18年度)

### 1. 論文発表

英語論文

1. Amagai M, Ahmed AR, Kitajima Y, Bystryn JC, Milner Y, Gniadecki R, Hertl M, Pincelli C, Kurzen H, Fridkis-Hareli M, Aoyama Y, Frusic-Zlotkin M, Muller E, David M, Mimouni D, Vind-Kezunovic D, Michel B, Mahoney M, Grando S. Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just “witnesses of disease”? **Exp Dermatol** 15(10):815-831, 2006
2. Kitajima Y, Aoyama Y. A perspective of pemphigus from bedside and laboratory-bench. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology 31: Special issue on “Immunologic Skin Diseases”**: in press
3. Chernyavsky AI, Arredondo J, Kitajima Y, Sato-Nagai M, Grando SA. Desmoglein vs non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. **J Biol Chem** : in press
4. Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda

- K, Amagai M, Kitajima Y. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MARK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. **Autoimmunity** : 39(7):587-590, 2006
5. Aoyama Y, Asai K, Hioki K, Funato M, Kondo N, Kitajima Y. Herpes gestationis in a mother and child: immunoclinical perspectives based on a weekly follow-up study of BP-180 NC16a ELISA index. **Arch Dermatol** : 2007. in press
  6. Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Anti-desmoglein3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. **J Biol Chem** : 2007. in press
2. 北島康雄 (分担). 類天疱瘡: VI水疱症. 皮膚疾患最新の治療2007-2008: 瀧川雅浩・渡辺晋一編集 (南江堂): 115-117, 2006
  2. 学会発表
    1. Kitajima Y. Blistering mechanisms of pemphigus vulgaris: biochemical and ultrastructural studies. 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research (6月8~10日, 於 Warszawa, Poland)
    2. Aoyama Y, Kanno M, Nagai M, Yamamoto Y, Ozawa M, Kitajima Y. The cytoplasmic membrane-proximal region of desmoglein 3 is critical for p120-catenin binding to desmoglein 3. The 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (5月3~6日, 於 Philadelphia, USA)
    3. Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Different anti-desmoglein 3 monoclonal antibodies exert epitope-specific regulation of p120-catenin phosphorylation and of p120-catenin binding to desmoglein 3 in human squamous cell line, DJM-1 cell The 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (5月3~6日, 於 Philadelphia, USA)
    4. 北島康雄. 天疱瘡の発症機序と治療の実際 (血漿交換、ステロイドパルス、免疫抑制剤) 日本皮膚科学会第338回福岡地方会【特別講演】 (9月23日, 於八幡)
    5. 北島康雄. 類天疱瘡とその類症の病態と治療. 第56回日本皮膚科学会中部支部学会【教育講演】 (10月7~8日, 於名古屋)

#### 日本語論文

1. 北島康雄 (分担). 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症: Part4 水疱を呈する先天性皮膚疾患. **Visual Dermatology** 5(8):798-799, 2006
2. 北島康雄、青山裕美. 表皮の構造と機能 **Visual Veterinary Dermatology** 2(2) : 59-63, 2006
3. 青山裕美、北島康雄. 真皮の構造と機能 **Visual Veterinary Dermatol** 2(4) :341-345, 2006

#### 日本語著書

1. 北島康雄 (分担). 自己免疫水疱症; I 天疱瘡 a) 病態難治性皮膚疾患の病態と治療: 小川秀興編集 (第102回日本皮膚科学会総会記念出版): 1-5, 2005

6. 河崎優希、青山裕美、角田和之、天谷雅行、北島康雄. 抗デスモグレイン (Dsg) 3 モノクローナル抗体による Dsg3 結合型 p120-catenin のリン酸化と結合性の検討. 第31回日本研究皮膚科学会 (5月31日~6月2日、於京都)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

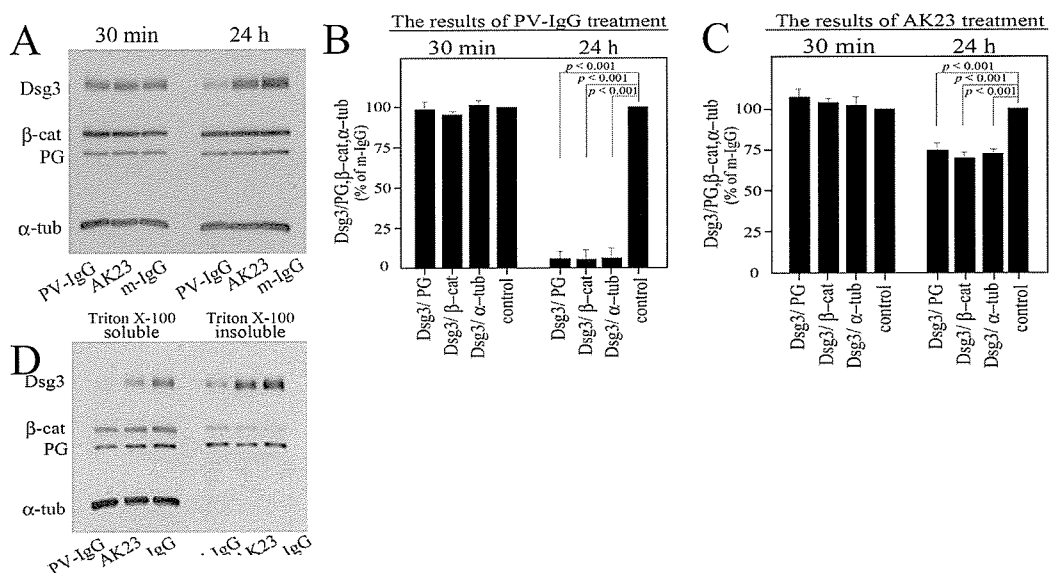


図1. 免疫プロットによる Dsg3 の判定量に関する内部標準の検討

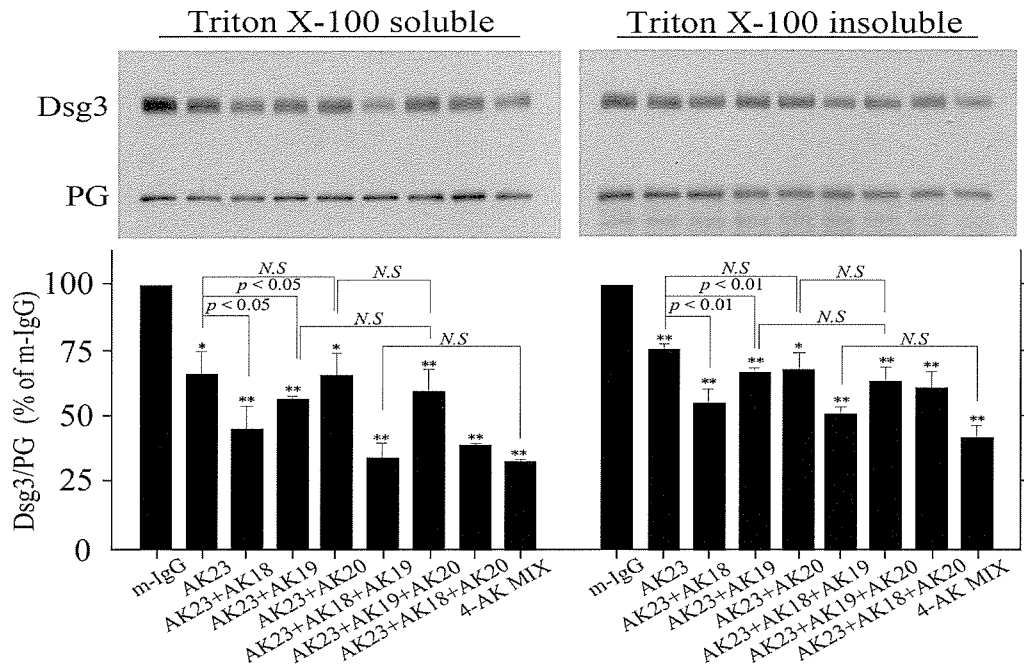


図 2. AK23 mAb にほかの AK mAb を添加した時の Dsg3 減少活性

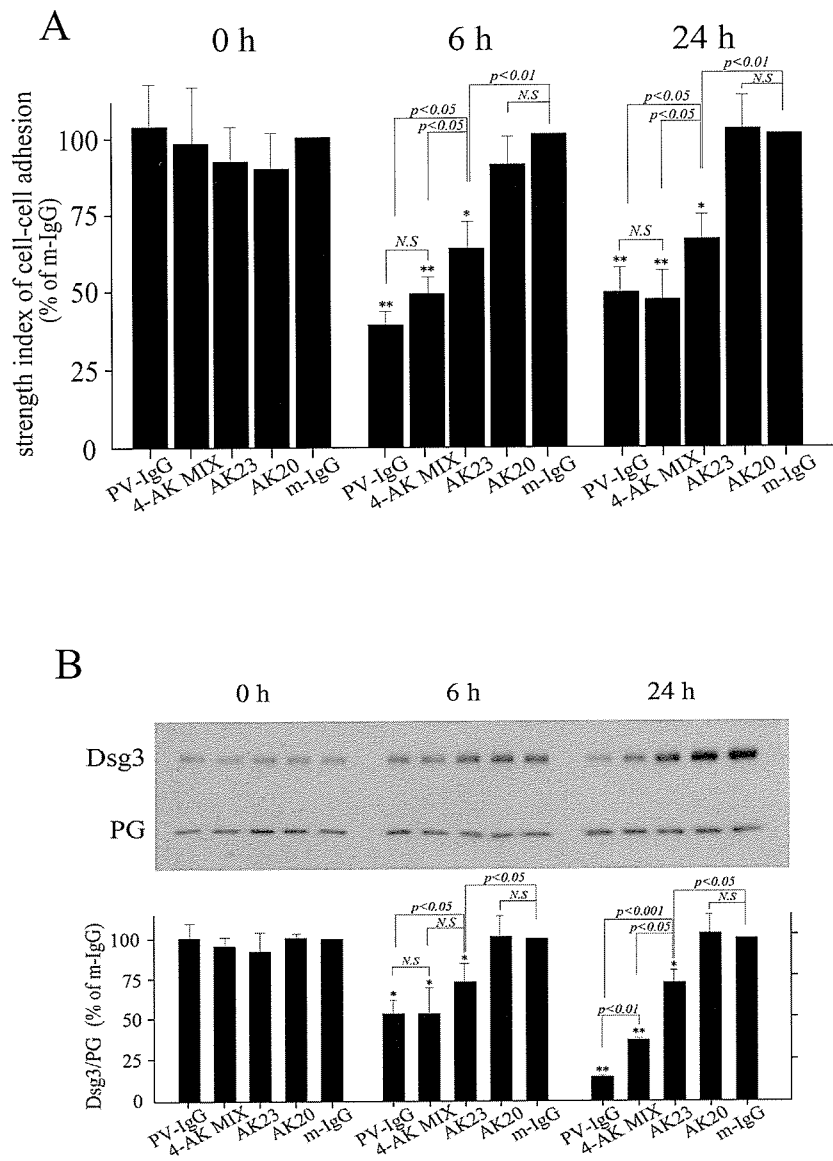


図 3. PV-IgG, AK23 mAb, AK20 単独刺激と AK mAb 4 種混合刺激による細胞間接着力減少活性

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

抗デスモグレイン3モノクローナル抗体による病原性相乗効果

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授

**研究要旨** 天疱瘡は自己免疫性の水疱形成疾患でその自己抗原はデスモグレイン3 (Dsg3) である。これまでに我々は Dsg3<sup>-/-</sup> を Dsg3 蛋白で免疫し、その脾細胞を免疫不全マウスに移植する方法で尋常性天疱瘡 (PV) モデルマウスを作製した。さらに PV モデルマウスより複数の抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (mAb) を単離し、その病原性は抗体の認識するエピトープが重要であることを示した。今回我々は未免疫の Dsg3<sup>-/-</sup> 脾細胞を移植して作製した PV モデルマウスより複数の抗 Dsg3 mAb を複数単離し、その詳細について検討した。

共同研究者  
角田和之 慶應大学医学部皮膚科

**A. 研究目的**

未免疫 Dsg<sup>-/-</sup> 脾細胞移植により作製した PV モデルマウスより抗 Dsg3 mAb を単離し、その病原性を解析する。

**B. 研究方法**

a) モノクローナル抗体の作製

未免疫 Dsg3<sup>-/-</sup> 脾細胞移植により作製した PV モデルマウス脾細胞をポリエチレングリコールを用いてマウス骨髄腫細胞株 P3 と細胞融合した。ハイブリドーマはマウス Dsg3ELISA およびマウス角化細胞 PAM212 を用いた live keratinocyte staining にてスクリーニングした。その後ハイブリドーマを大量培養し HiTrap rProtein A FF column (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) にて精製後、desulting column (Amersham Bioscience) にて脱塩し PBS に置換した。

b) 新生マウスへの受動免疫

生後12—24時間の ICR (Institute of cancer research) 新生マウスにそれ自身では水疱形成を誘導しない量の落葉状天疱瘡 (PF) 血清を段階希釈にて決定し、そ

の半量と各 NAK mAb を同時にマウス注射後18—24時間で水疱形成の有無を確認した。

c) 成熟マウスを用いた腹水形成法

$5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  個のハイブリドーマを Rag2<sup>-/-</sup> 免疫不全マウスの腹腔内に接種し、14日経過後、腹水形成が十分に見られた段階で体重減少、被毛脱毛の有無、口腔粘膜 (口蓋) 上皮における IgG の沈着および病理組織学的水疱形成の有無を確認した。

d) In vitro dissociation assay

ICR 新生マウス皮膚より採取した、初代培養角化細胞を用いて mAb の角化細胞における接着機能障害能を解析した。

新生マウス皮膚を採取後 Dispase で処理し、続いて0.25%トリプシンにて処理した。その後細胞を12ウェルプレートにて培養し角化細胞シート作製した。コンフルエントに到達した時点で1.2mMカルシウムおよび NAK mAb を加えて培養した後に、Dsg1 を特異的に消化する Exfoliative toxin A (ETA) を加えて培養した。ピペッティングにより生じた細胞断片数を測定し数値化した。

**C. 研究結果**

a) 抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離



とその特異性

細胞融合の結果、10クローンの抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (NAK mAb) を単離した。アイソタイプは IgG1 $\kappa$  が 4 クローン、IgG2a $\kappa$  が 6 クローンであった。組み換え Dsg 蛋白を抗原として用いた ELISA 法では全てのクローンがマウス Dsg3 に反応し、ヒト Dsg3 のみ、ヒト Dsg1 のみヒト Dsg3 とマウス Dsg1、ヒト Dsg3 とヒト Dsg1、と交差反応するクローンがあり反応性は多様であった。また全てのクローンが live keratinocyte staining で反応性を有していた (表 1、図 1)。

b) 新生マウスを用いた受動免疫法による NAK mAb の病原性の確認

NAK mAb を単独で投与したところ、NAK3 では明らかな水疱形成は認めなかったが (図 2 c, h)、NAK9 では病理組織学的にのみ水疱形成を認めた (図 2 a, f)。次にマウス皮膚に共発現している Dsg1 の接着機能を調節するために、それ自身では水疱形成を誘導しない量の落葉状天疱瘡 (PF) 患者血清を titration した (図 2 e, j)。そこで当該量の PF 血清と NAK mAb を同時投与したところ、NAK3 では肉眼的および病理組織学的に明らかな水疱形成は認めなかったが (図 2 d, i)、NAK9 では肉眼的、病理組織学的に水疱形成を認めた (b, g)。

c) 腹水形成法による NAK mAb の病原性の確認

Rag2<sup>-/-</sup> 免疫不全マウスの腹腔内にハイブリドーマを接種し、水疱形成の有無にて NAK mAb の病原性を確認した。接種後約 2 週で NAK1 単独接種のマウスでは体重増加、十分な腹水の貯留が見られ、免疫組織学的に角化細胞表面への IgG の沈着が認められたが、病理組織学的に水疱形成を認めなかった (図 3 a, b, c 表 2)。一方、複数の NAK mAb ハイブリドーマを同時に接種したマウスでは高度の体重減少、被毛の脱毛、IgG の沈着、加えて病理組

織学的に基底層直上の PV に特徴的な水疱の形成が認められ (図 3 d, e, f 表 2)、それ単独では明らかな病原性を示さない抗体も、複数組み合わせることにより病原性が相乗的に強くなる事が確認された。

d) In vitro dissociation assay による NAK mAb の細胞接着障害能の評価

マウス初代培養角化細胞シートを用いた In vitro dissociation assay にて NAK mAb の細胞接着障害能を評価した。非常に強い細胞接着障害能を有する AK23 mAb と ETA と共に作用させた結果を陽性コントロール、mAb を含まないウェルを陰性コントロールとし、以下の計算式にて dissociation index を求めて定量化し比較検討した。Dissociation score = (mAb の細胞断片数 - mAb を含まない細胞断片数) / (AK23 の細胞断片数 - mAb を含まない細胞断片数) x 100。NAK mAb 単独ではその細胞接着障害能はいずれも弱かったものの、NAK mAb を複数混合することにより単独に比べて強い細胞障害能を示した。特に複数の NAK mAb (NAK 1, 2, 4, 7, 9, 10, 12) を同時に作用させた場合は AK23 mAb と同様の細胞接着障害能を呈していた (図 4)。腹水形成法の結果と併せると in vitro dissociation assay における病原性の閾値はおおよそ 60% (dissociation index) であると考えられた。

#### D. 考察

本研究ではナイーブ脾細胞移植 PV モデルマウスより 10クローンの抗 Dsg3 mAb を単離した。それらの NAK mAb の病原性評価を、新生マウスをもちいた受動免疫法、成熟マウスを用いた腹水形成法そして In vitro dissociation assay の 3 通りの方法を用いて行った。受動免疫法にて NAK mAb の 80% (8/10) が水疱形成を誘導したが、腹水形成法においては単一クローンでは水疱形成は誘導されなかった。しかし

複数のクローンを同時に作用させて腹水形成することにより水疱形成が誘導されたことから、単独では明らかな病原性を示さない mAb も複数組み合わせることによって強い病原性を示し、病原性の相乗効果が確認された。しかしこれらの 2 方法では定性的には病原性を評価することが可能でも定量的な評価は困難である。そこで In vitro dissociation assay において定量的な mAb の病原性評価を試みた。その結果単独で明らかな病原性を示さない mAb あるいは微小水疱形成能のみを有する mAb のグループの中でもその病原性に強弱が存在することが明らかになった。

#### E. 結論

これまでのさまざまな研究成果により抗 Dsg3 抗体の病原性には、抗体の量（抗体価）、抗体の認識するエピトープが重要な因子の一つであることが示されている。そして本研究の結果により、それらの因子に加えて、複数にわたる抗体の組合せも病原性を左右する一つの重要な因子であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表（平成17年度）

##### 1. 論文発表

英語論文

Kawasaki H, Tsunoda K, Hata T, Ishii K, Yamada T, Amagai M: Synergistic Pathogenic Effects of Combined Mouse Monoclonal Anti-Desmoglein 3 IgG Antibodies on Pemphigus Vulgaris Blister Formation. **J Invest Dermatol** 126:2621-2630, 2006

日本語論文

特になし

##### 1. 学会発表

特になし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

図とその説明

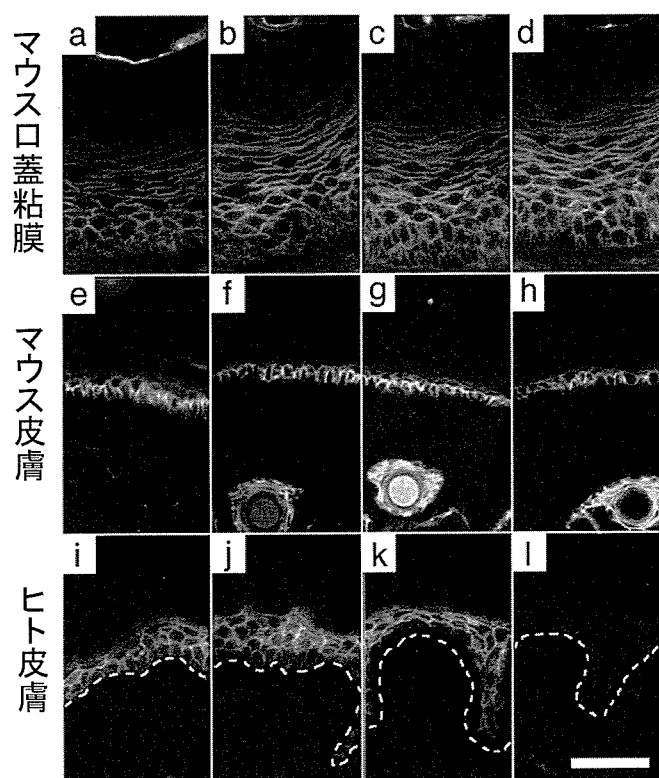


図1 代表的な NAK mAb とマウスおよびヒトの組織を基質とした間接蛍光抗体。各 NAK mAb の反応性は ELISA 法による反応性の解析結果と乖離を認めなかった。

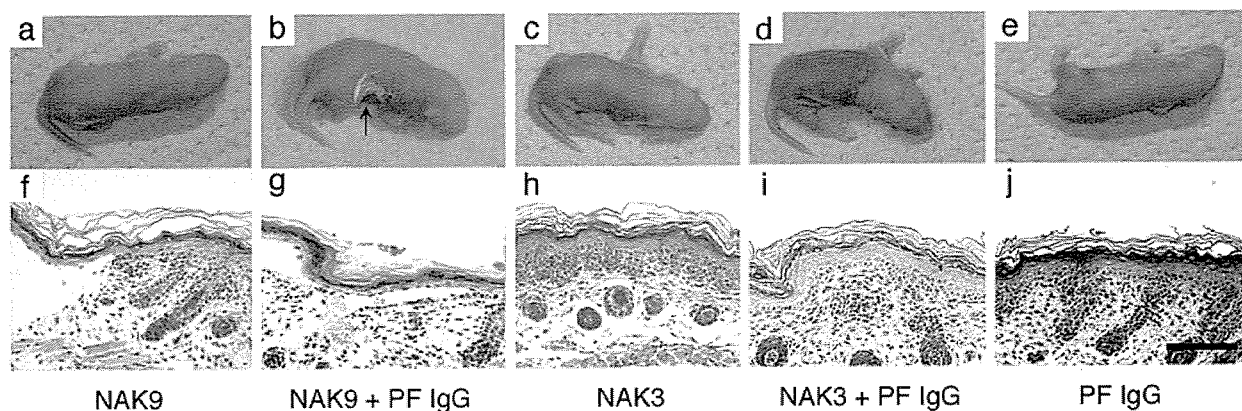


図2 新生マウスを用いた NAK mAb の受動免疫による病原性の確認

NAK mAb 単独投与では NAK9 では微小水疱の形成のみが認められたが (f), NAK3 では認めなかった (h)。また両 mAb 共に明らかな肉眼的水疱形成は認めなかった (a, c)。またそれ単独では肉眼的、病理組織学的に水疱形成を誘導しない量の PF IgG (e, j) の同時投与では NAK3 では水疱形成が誘導されなかったが (d, i)、NAK9 では肉眼的、病理組織学的に水疱形成が誘導された (b, g)。

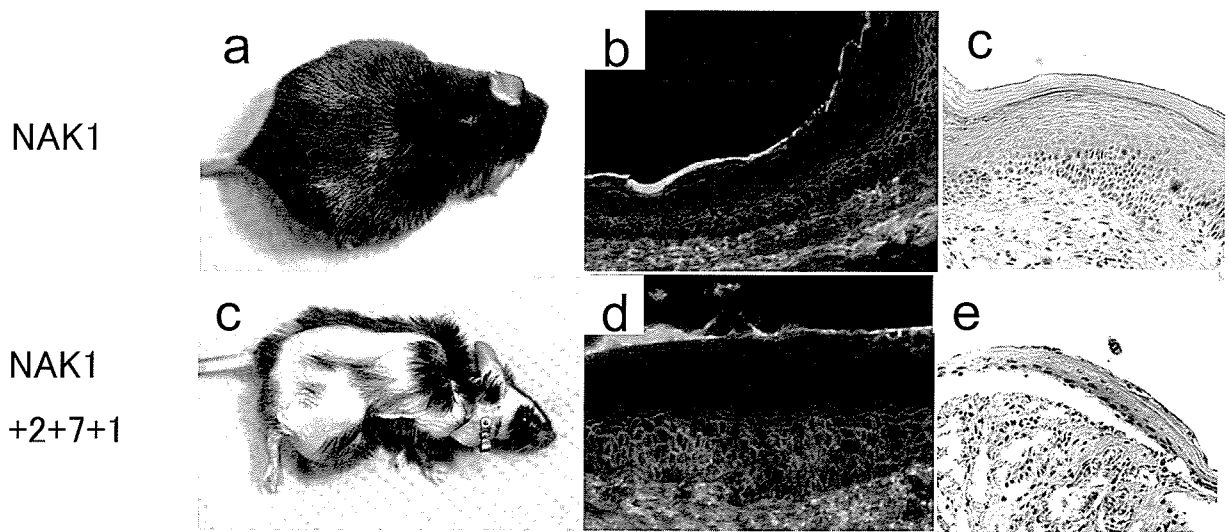


図3 成熟マウスを用いたNAK mAbの腹水形成法による病原性の確認

NAK1ハイブリドーマ単独接種のマウスでは腹水形成とIgGの沈着が見られるが明らかな水疱形成は認められなかった(a, b, c)。NAK1、2、7、10を混合接種したマウスでは脱毛、体重減少、IgGの沈着に加えて水疱の形成が認められた。

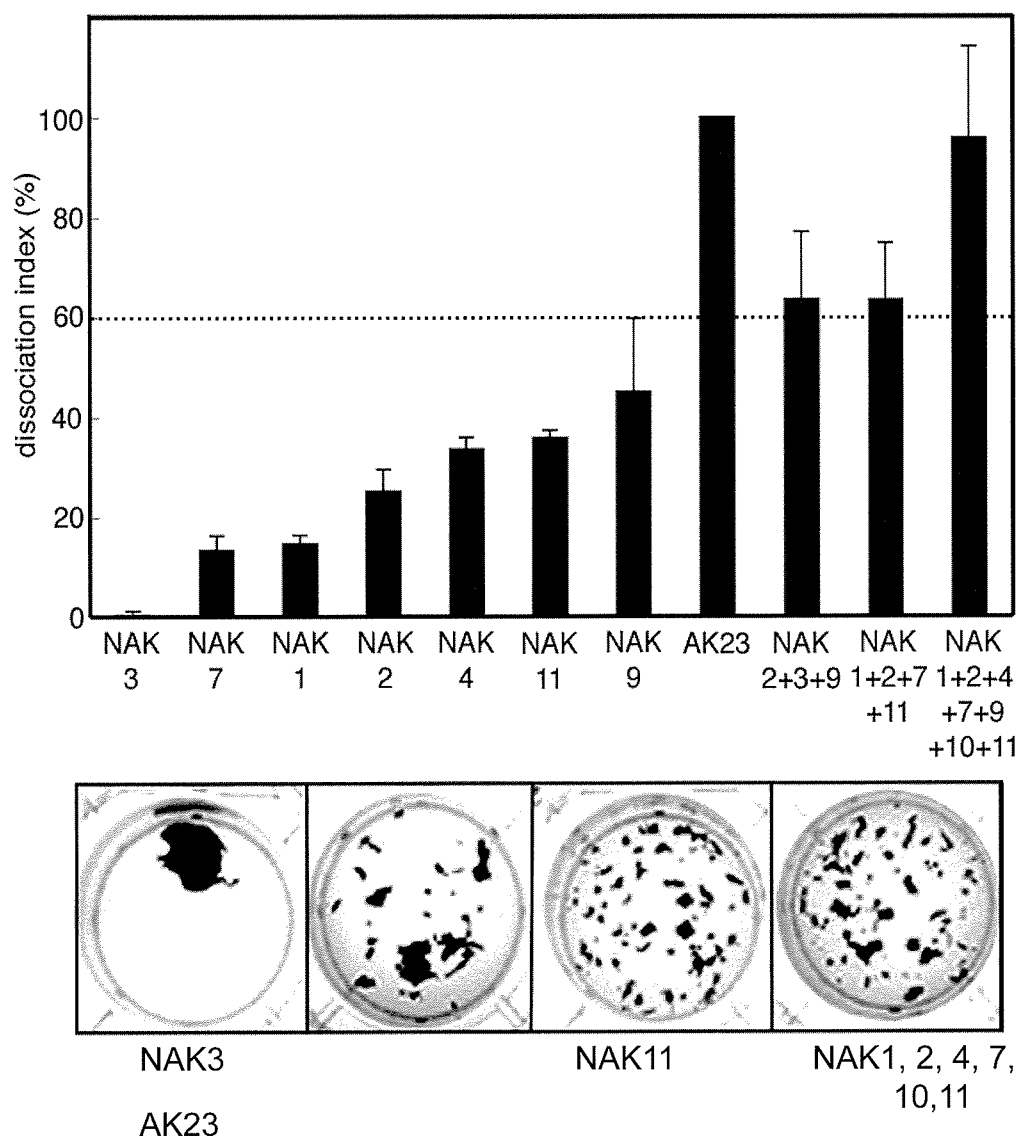


図4 In vitro dissociation assay による細胞接着障害能の評価

NAK mAb 単独では細胞接着障害作用は弱い、複数の NAK mAb を組み合わせる事により陽性コントロールである AK23 mAb と同様の接着障害作用を示した。

表 1 NAK mAb の反応特異性

NAK	Isotype	ELISA						Live Keratinocyte Staining
		IIF		Mouse		Human		
		Mouse	Human	Dsg3	Dsg1	Dsg3	Dsg1	
1	IgG1k	+	+	+	-	+	-	+
2	IgG1k	+	-	+	-	-	-	+
3	IgG1k	+	-	+	-	-	-	+
4	IgG2ak	+	+	+	-	+	+	+
5	IgG1k	+	-	+	-	-	-	+
7	IgG2ak	+	+	+	-	-	+	+
8	IgG2ak	+	+	+	-	-	+	+
9	IgG2ak	+	+	+	-	+	-	+
10	IgG2ak	+	-	+	-	-	-	+
11	IgG2ak	+	-	+	-	-	-	+

表2 腹水形成法による NAK mAb の病原性

NAK mAb	n	PV 表現型
		n (%)
1	7	0 (0)
2	4	0 (0)
4	5	0 (0)
7	3	0 (0)
9	8	0 (0)
10	8	0 (0)
11	6	0 (0)
2, 11	3	1 (33.3)
1, 2, 11	4	2 (50)
1, 2, 7, 11	7	7 (100)
1, 2, 4, 7, 9, 10, 11	3	3 (100)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

天疱瘡モデル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 天谷 雅行 慶応義塾大学皮膚科学教室 教授

**研究要旨** 尋常性天疱瘡（PV）において抗デスマグレイン（Dsg）3 抗体の産生に 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。昨年度までに自己反応性T細胞の *in vivo*における病原性を評価するシステムを確立し、これを用いたT細胞株の解析から、病原性を規定する因子の同定を目指している。今年度は Dsg3<sup>-/-</sup> マウスから Dsg3 反応性T細胞株を新たに10株樹立し、計15株（病原性あり5株、なし10株）とした。個々のT細胞株のサイトカイン発現パターン、T細胞受容体Vβ 遺伝子の発現、T細胞エピトープを解析し統計学的に病原性との関連性を解析した結果、IL-4とIL-10 が病原性と関連した（P=0.04）。今後は今回抽出されたIL-4 とIL-10 に焦点をあてて、PV フェノタイプの誘導におけるサイトカインの役割について検討していく予定である。

共同研究者

桑名 正隆 慶応義塾大学内科学教室  
高橋 勇人 慶応義塾大学皮膚科学教室

A. 研究目的  
目的

尋常性天疱瘡（PV）は皮膚粘膜における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 であり、その CDR 塩基配列には突然変異の存在が確認されている。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<sup>+</sup>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<sup>-/-</sup> マウス脾細胞を免疫不全マウスに移植することで抗

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応用することを着想し、自己反応性T細胞の病原性を評価する系の確立を試みた。本研究は、1) Dsg3 で免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>マウスB細胞とともに Rag2<sup>-/-</sup>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可能性がある。

本年度は昨年度に引き続き、さらに10個の Dsg3 反応性T細胞クローン株を樹立し、合計15株としたうえで、それらの特性および病原性を検討した。



## 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) mDsg3 反応性T細胞のクローニング

CFAで乳化した10 $\mu$ gのrmDsg3をDsg3<sup>-/-</sup>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を摘出し、RPMI-1640内ですりつぶした。脾臓はACK lysing buffer (BioWhittaker, Walkersville, ND) を用いて溶血処理を行い単核球を調製した。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(3x10<sup>6</sup> cell/well)を24穴平底プレートにまき、5 $\mu$ g/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(10<sup>6</sup>cell/well)にX線照射(40Gy)し、mDsg3-1~5(各5 $\mu$ g/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-STIM<sup>TM</sup>(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。

c) 抗原特異的増殖反応

96穴丸底プレートで10<sup>4</sup>cell/wellのT細胞を2x10<sup>4</sup>cell/wellのX線照射脾細胞とともに5 $\mu$ g/mlのrmDsg3-1~5またはMBP存在下で培養した。56時間後に0.5 $\mu$ Ci/wellの<sup>3</sup>H-thymidineを添加し、その16時間後に細胞を回収し、<sup>3</sup>H-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。

d) 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 $\mu$ g/mlの抗マウスMHC class IIモノクローナル抗体(M5/114, ラットIgG<sub>2b</sub>, $\kappa$ )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。

e) TCRV 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 $\mu$ g/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。TCRV $\beta$ 遺伝子再構成の検出には23種のTCRV $\beta$ 遺伝子特異的な5'側プライマーと共通するTCRC $\beta$ 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- $\gamma$ , TGF- $\beta$ )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。

f) 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 (0.5~1 x 10<sup>6</sup>個) を Dsg3<sup>-/-</sup>B 細胞 (5 x 10<sup>6</sup>個) とともに Rag2<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>B 細胞は PV モデルマウス作成法に準じて免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>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 (IBL, 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 (5~10 x 10<sup>6</sup>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細胞株や OVA 反応性 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) Dsg3 反応性 T 細胞株の樹立

限界希釈法により今年度は 10 個の Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立し、病原性の解析をおこなえた T 細胞株を合計 15 個とした。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 (表 1)。また、すべての T 細胞株は MHC class II 拘束性であった。

### c) TCRV $\beta$ 遺伝子再構成の検出

病原性を確認できた 15 株のうち、9 株は TCR $\beta$  鎖遺伝子解析によりクローンであることが確認された (表 1)。V $\beta$  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。

### d) サイトカイン発現解析

Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現解析の結果、6 株が Th1 型 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>、IL-4<sup>-</sup>)、9 株が Th0 型 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>、IL-4<sup>+</sup>) であった (表 1)。各サイトカインの発現と病原性との関連を検討した結果、IL-4 および IL-10 が病原性と有意に相関した (表 2)。

### e) 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 15 株で病原性の検討を行った。Th1 型 T 細胞 6 株は B 細胞と共に Rag2<sup>-/-</sup>マウスへ移植後、マウス体内での抗 Dsg3 抗体価上昇、PV 発現型を認めなかった (表 1)。一方、Th0 型 9 株中 5 株は移植後にマウス体内での抗 Dsg3 抗体価の上昇、PV 発現型を認めた (表 1)。また口蓋粘膜上皮細胞間に IgG の沈着と病理組織学的には PV に特徴的な棘融解像を認めた。また、*in vivo* で抗 Dsg3 抗体産生を誘導した T 細胞株はすべて *in vivo* での病原性を有していた。

## 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うことができた。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 $\beta$  鎖、サイトカイン発現能は多彩であった。解析した 15 株のうち、*in vivo* での抗体産生誘導能をみとめた 6 株すべてで *in vivo* における病原性を認めた。逆に、*in vivo* での抗体産生誘導能を有さない T 細胞株は病原性を発揮できず、*in vivo* での抗体産生誘導能が T 細

胞の病原性と有意に相関した。このことはPVの病態において、自己抗体産生誘導能がT細胞機能として重要であることを意味する。個々のT細胞株をサイトカイン発現パターンにより層別化すると、IL-4およびIL-10がT細胞の病原性と関連した。今後、Dsg3反応性T細胞クローン株の数を増やしてさらに正確な検討をするとともに、IL-4およびIL-10を標的としたサイトカイン中和療法によりT細胞の病原性の抑制効果を確認、PVモデルマウスにおいて重要なサイトカインの同定を行う予定である。

#### E. 結論

PVモデルマウスを用いることでDsg3反応性T細胞クローン株の*in vivo*での病原性を評価する実験系を確立した。本スクリーニング法はT細胞の病原性を規定する因子の同定に有用と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

#### G. 研究発表（平成17年度）

##### 1. 論文発表

##### 英語論文

- 1) Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, Kawakami Y,

Kuwana M. T Helper Type 2-Biased Natural Killer Cell Phenotype in Patients with Pemphigus Vulgaris. **J Invest Dermatol**. 2006 Aug;31 [Epub ahead of print]

##### 日本語論文

なし

##### 2. 学会発表

- 1) Hayato Takahashi, Masayuki Amagai, Takeji Nishikawa, Yutaka Kawakami, Masataka Kuwana, Characterization of desmoglein 3-reactive helper T cells involved in pathogenic IgG production in a mouse model for pemphigus vulgaris, The Society for Investigative Dermatology 67th Annual Meeting, Philadelphia, USA, 2006.5.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

図とその説明

表 1. Dsg3 反応性 T 細胞株の解析結果

名前	エピトープ (rDsg3-X)	TCRV $\beta$ 遺伝子	Th型	病原性
129#30	3	8.3*	Th1	-
141#70	1	6*	Th1	-
145#27	2, 4	6, 14	Th1	-
146#25	4	8.1, 15	Th1	-
151#10	1	5.1*	Th1	-
159#11	1	3, 4	Th1	-
-----				
140#27	3	6*	Th0	+
145#28	1	8.2, 11	Th0	-
146#13	2	1, 4	Th0	-
147#48	3	8.2*	Th0	+
147#27	3	8.2*	Th0	+
152#25	1	1*	Th0	-
153#5	1	5, 7, 8.1	Th0	+
154#33	1	8.2*	Th0	+
161#28	2	6*	Th0	-