慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	尋常性天疱瘡モデルマウスを用いた病原性抗デスモグレイン3モノクローナル抗体作製とエピトープ解析
Sub Title	
Author	角田, 和之(Tsunoda, Kazuyuki)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.48-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0048

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

尋常性天疱瘡モデルマウスを用いた病原性抗デスモグレイン３モノクローナル抗体作製とエピトープ解析

角　田　　和　之

内容の要旨

尋常性天疱瘡（pemphigus vulgaris；PV）は臓器特異的な自己免疫性の水疱性疾患である。皮膚・粘膜角化細胞の細胞接着装置であるデスモゾームに存在する、カドヘリンタイプの細胞接着因子であるデスモグレイン３（desmoglein；Dsg3）に対して自己抗体が産生されることにより、細胞接着障害が生じ水疱が形成される。臨床的に皮膚・粘膜に広範囲な水疱を形成し、治療は免疫系全般を抑制する方法が一般的である。天疱瘡は臓器特異的自己免疫疾患の中でも、最も解明の進んだ疾患であるが、その水疱形成機序についてはいまだ明らかになされていない。最近我々は、Dsg3ノックアウトマウスの脾細胞をRag2ノックアウトマウス（免疫不全マウス）に移植する方法でPVモデルマウスを作製した。このモデルマウスは移植により生着した免疫担当細胞が、病原性を有する抗Dsg3抗体を産生しPVに特徴的な水疱形成、IgGの沈着などの表現型が誘導される。本研究ではPVモデルマウスよりDsg3に特異的に反応する抗Dsg3 IgGモノクローナル抗体（mAb）を単離し、その病原性およびエピトープを解析し、水疱形成機序を明らかにする事を目的とした。

細胞融合法により８クローンの抗Dsg3 mAb（AKシリーズ）を単離し、AK mAbのエピトープをDsg1/Dsg3スワッピング分子を用いた免疫沈降法で解析した。その結果、Dsg3細胞外領域のアミノ末端領域、中央部、カルボキシ末端領域を認識する抗体に大きく分類された。各領域を認識するmAbのハイブリドーマを免疫不全マウス腹腔内に接種し、PVの表現型誘導の有無により病原性を確認したところ、アミノ末端領域を認識するAK23 mAbはPVの表現型を誘導する強い病原性を有する事が確認された。そこでAK23の詳細なエピトープ解析を、Dsg1/Dsg3点変異蛋白を用いた免疫沈降法でおこなった。Dsg3のアミノ末端領域のアミノ酸配列はDsg1との相同性が非常に高い。そこでDsg1分子上にDsg3特異的なアミノ酸V3、K7、P8、D59を導入した点変異蛋白を用いたところAK23はその点変異蛋白に強く反応した。また、興味深い事に、これら４個のアミノ酸は最近明らかになったクラッシックカドヘリンの接着面を形成するアミノ酸とほぼ同一であることが判明した。以上の結果よりAK23 mAbはカドヘリンの接着に重要なアミノ酸を認識し、Dsg3の接着機能を直接的に障害することによって水疱を形成していることが明らかになった。本研究で得られた結果は、細胞間接着機構の解明や抗原特異的な自己抗体除去療法などの研究開発、および臨床応用において有用であると考えられた。

論文審査の要旨

尋常性天疱瘡（以下PV）は臓器特異的な自己免疫性の水疱性皮膚疾患である。皮膚・粘膜角化細胞の細胞接着装置であるデスモゾームに存在する、カドヘリンタイプの細胞接着因子であるデスモグレイン（以下Dsg）に対して自己抗体（抗Dsg3単独またはDsg3およびDsg1抗体）が産生されることがきっかけとなり水疱が形成される。本研究では、PVマウスモデルにおいて、表現型の発現がT細胞とB細胞どちらの自己寛容の破綻によるかを検討するとともに、水疱形成機序を解明するために、PVモデルマウスを用いてDsg3に特異的に反応する抗Dsg3 IgGモノクローナル抗体（mAb）を単離し、その病原性およびエピトープを解析した。その結果、PVモデルマウスの表現系の発現にはT細胞とB細胞の両者をDsg3-/-マウスから得る必要があり、T、Bの両方において自己寛容の破綻が必要であることが示唆された。次に、PVモデルマウス脾細胞から、８クローンの抗Dsg3mAb（AKシリーズ）を単離し、そのなかでアミノ末端領域を認識するAK23 mAbがPVの表現型を誘導する、最も強い病原性を有することを確認した。ついでAK23の詳細なエピトープ解析をDsg1/Dsg3点変異蛋白を用いた免疫沈降法で行った結果、このmAbがカドヘリンの接着に重要なアミノ酸を認識していることがあきらかになり、Dsg3の接着機能を直接的に障害することにより水疱が形成されると考えた。

審査では、まず、Dsg3-/-T細胞とDsg3-/-B細胞コンビネーション移植の系で８匹中３匹に表現型の誘導ができなかった理由が質問されたが、おそらく細胞の活性低下など技術的な問題が原因であると回答された。また、産生IgGがヒト患者ではIgG4であるのにモデルマウスではIgG1 isotypeである理由についても明らかではないが、いずれも補体活性化能が乏しい点が類似していると回答された。AK19とAK23との病原性の差についてはaffinityの差と回答された。モデルマウスのAK23mAbと同じエピトープを認識する抗体がPV患者に存在するかについては可能性を示唆する成績は得られているが、特異的なエピトープを有する点変異蛋白ELISAでは検出されていないと説明された。さらに成熟マウスの腹水形成法で表現型が誘導されたと判定されたマウスではIgG沈着が扁平上皮を有する部位すべてに見られること、また脱毛の機序については休止期毛の係留にDsg3が関与していることと関連してAK23mAbの接着障害を考えると説明された。最後に水疱形成と細胞接着障害とシグナル伝達、炎症反応の関わりについては少なくとも水疱形成の初期段階においては抗体による細胞接着障害を考えたいとの意見が述べられた。

以上のごとく、本研究は更なる検討課題はのこしているものの、自己免疫性水疱症である尋常性天疱瘡の水疱形成機序の解明に寄与する有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　皮膚科学　西川　武二
微生物学・免疫学　小安　重夫　　病理学　岡田　保典
先端医科学　河上　　裕
学力確認担当者：北島　政樹、小安　重夫
審査委員長：小安　重夫

試問日：平成16年３月29日