

## 自己免疫疾患末梢抗原に対する免疫寛容獲得機構の解明

Elucidation of tolerance mechanism against peripheral target antigens in autoimmune diseases

天谷 雅行 (Amagai, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・教授



### 研究の概要

本研究では、自己免疫疾患における世界基準となる独自の系を構築し、生理的条件下で、臓器特異的自己免疫性疾患の標的抗原に対する免疫寛容獲得機構を解明することを目指す。天疱瘡の標的抗原である Dsg3 に対する T 細胞トランス獲得機序の解明、病的抗体産生に關与する Dsg3 特異的 T 細胞、制御性 T 細胞の解析等を行うとともに、他の臓器特異的自己免疫疾患モデルマウスの作成を試みる。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：免疫学・自己免疫・モデルマウス・天疱瘡・カドヘリン

### 1. 研究開始当初の背景・動機

自己免疫性疾患は、21 世紀を迎えた現在においても、未だその発症機構が明らかにされていない難治性疾患である。免疫寛容獲得機構は、OVA あるいは HEL 等の人工的な抗原に対する T 細胞、B 細胞トランスジェニックマウスを用いた解析によりドグマが形成されている。生理的条件下で発現する疾患標的抗原に対する免疫寛容獲得機序は未だ不明な点も多く、免疫寛容の破綻である自己免疫発症機序を明らかにする上でも解明しなければならない課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、自己免疫疾患における世界基準となる独自の系を構築し、生理的条件下で、臓器特異的自己免疫性疾患の標的抗原に対する免疫寛容獲得機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

- 1) 天疱瘡モデルマウスより単離した抗 Dsg3 モノクローナル抗体の H 鎖、L 鎖の可変領域の cDNA を単離し、Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニック (B Tr) マウスを作成する。
- 2) 天疱瘡モデルマウスより、in vitro で頻回に刺激して、Dsg3 反応性 T 細胞を樹立する。
- 3) Dsg3 反応性 T 細胞の中に、抗 Dsg3 IgG 抗体産生を誘導する T 細胞と誘導しない T 細胞の有無を明らかにし、病的抗体産

生に關与する T 細胞の機能解析をする。

- 4) Dsg3 反応性 T 細胞トランスジェニックマウスを作成し、Dsg3 存在下、非存在下における自己反応性 T 細胞の中核、および末梢免疫寛容機構を解析する。

### 4. これまでの成果

#### 1) B 細胞トランス獲得機序の解明

天疱瘡抗原 (Dsg3) に対し病原性を有さないモノクローナル抗体 AK7 mAb より作成した自己反応性 B 細胞トランスジェニックマウスでは、末梢組織に Dsg3 が存在するにもかかわらず、Dsg3 に反応する B 細胞が脾臓、リンパ節に存在し、不活化もされていない。ところが、このマウスに、病原性を有する抗 Dsg3 抗体 (AK23 mAb) を投与すると、皮膚、粘膜に水疱が誘導され、Dsg3 反応性 B 細胞が、脾臓、リンパ節から消失することが観察された。本研究において、AK7 B 細胞の除去は抗原選択的であり、CD4<sup>+</sup>細胞依存性で、apoptosis が關与することを明らかにした。以上より、病原性を示す自己抗体が産生されると、その標的臓器から何らかの危険信号が発せられ、末梢において自己反応性 B 細胞を除去するという、新しい B 細胞末梢免疫寛容の機序の存在が示唆された。

#### 2) 抗 Dsg3 IgG 抗体産生に關与する T 細胞クローンの単離と解析

平成 19 年度終了時において、Dsg3 反応性 T 細胞を合計 20 株樹立し、Dsg3<sup>-/-</sup>B 細胞とともに Rag2<sup>-/-</sup>マウスへ移植し、抗

Dsg3 IgG 抗体産生、天疱瘡表現型の発現を解析することにより、その *in vivo* における病原性を評価する系を確立した (図)。Dsg3 反応性 T 細胞の中に、病的抗体を誘導できる T 細胞クローンとできない T 細胞クローンが存在することを確認した。さらに、各 T 細胞株の特性 (T 細胞エピトープ、T 細胞受容体遺伝子、発現サイトカイン、ホーミング能) を検討した結果、IL-4 および IL-10 のみに病原性との関連性をみとめた ( $P = 0.04$ )。さらに、sIL-4R $\alpha$ 、sIL-10R $\alpha$ 、sIFN- $\gamma$ R1 を発現する組み換えアデノウイルスを Rag2<sup>-/-</sup>マウスに投与後、Dsg3 反応性 T 細胞株と Dsg3<sup>-/-</sup>B 細胞を移植すると、対照ウイルス投与群にくらべて、sIL-4R $\alpha$  を発現させたマウスでのみ抗体価の上昇や天疱瘡表現型の発現が抑制された。従って、天疱瘡モデルマウス病態において IL-4 が重要なことが示され、IL-4 を標的とする治療法の可能性を示すことができた。

### 3) 自己反応性 T 細胞トランスジェニックマウスの作成

前項で樹立した Dsg3 反応性 T 細胞クローンの TCR (Dsg3TCR) の cDNA をクローニングし、TCR 欠損 T 細胞ハイブリドーマへ遺伝子導入したところ、細胞表面での Dsg3TCR の発現を確認した。Dsg3 細胞外領域のオーバーラップペプチドを作成し、T 細胞エピトープのペプチドレベルでの同定に成功した。さらに、同一エピトープを認識するがアフィニティが異なる TCR、病原抗体産生を誘導する TCR としない TCR を同定することに成功した。これらの TCRcDNA を用いて、Dsg3TCR トランスジェニックマウスを作成中である。

### 5. これまでの進捗状況と今後の計画

若干の研究計画の変更はあるが、制御性 T 細胞の役割、抗原特異的細胞障害性 T 細胞

の誘導など、当初計画されていなかったいくつかの新たな展開が認められ、ひとつの抗原を取り巻く様々な T 細胞の機能を解析できる系へと広がりを見せている。

### 6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)  
<論文>

Takahashi H, **Amagai M**, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, Kawakami Y

and Kuwana M: T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 127: 324-330, 2007

Stanley J R and **Amagai M**: Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 355: 1800-1810, 2006

Kawasaki, H., Tsunoda, K., Hata, T., Ishii, K., Yamada, T., and **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

Aoki-Ota M, Kinoshita M, Ota T, Tsunoda K, Iwasaki T, Tanaka S, Koyasu S, Nishikawa T

and **Amagai M**: Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. *J Invest Dermatol* 126: 105-113, 2006

<受賞: 天谷雅行>

CE.R.I.E.S. Research Award

(シャネル皮膚及び感覚調査研究センターより国際賞) 2005 年 12 月

第 2 回日本学術振興会賞

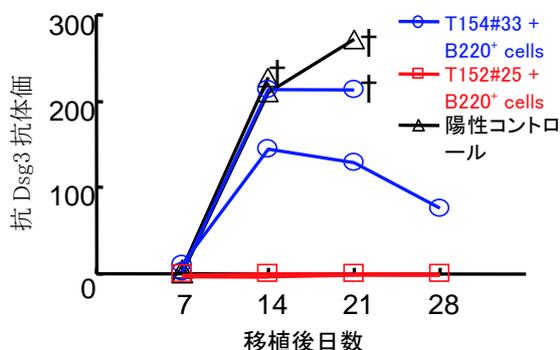
(日本学術振興会より) 2006 年 3 月

第 9 回日本免疫学会賞

(日本免疫学会より) 2006 年 12 月

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/derma/index.html>



T細胞クローン(154#33)は、B細胞と移植すると抗Dsg3抗体産生が認められ、マウス(左)は天疱瘡の表現型を示した。T細胞クローン(152#25)は、抗Dsg3抗体産生、表現型(右マウス)ともに認められなかった。中央マウスは陽性コントロール。矢印はびらん。