

## 平成 15 年度科学研究費補助金 ( 基盤研究 ( S ) ) 研究状況報告書

ふりがな		あまがい まさゆき		所属研究機関 ・部局・職		慶應義塾大学・医学部・専任講師	
研究代表者 氏名		天谷 雅行					
研究 課 題 名	和文	自己免疫性皮膚疾患・天疱瘡における発症機序の解明					
	英文	Clarification of pathophysiological mechanisms of autoimmune skin disease, pemphigus					
研究経費	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総 合 計	
15年度以降は内約額 金額単位：千円	30,300	21,600	14,000	14,000	14,000	93,900	
研究組織 ( 研究代表者及び研究分担者 )							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担 ( 研究実施計画に対する分担事項 )			
天谷 雅行	慶應義塾大学・医学部 ・専任講師		皮膚科学	研究の統括 天疱瘡モデルマウスの解析、T細胞クローンの樹立			
西川 武二	慶應義塾大学・医学部 ・教授		皮膚科学	症例の集積 モノクローナル抗体の解析			
田中 勝	慶應義塾大学・医学部 ・助教授		皮膚科学	黄色ブドウ球菌毒素の作用機序の解析			
石河 晃	慶應義塾大学・医学部 ・専任講師		皮膚科学	マウスの病理学的解析			
小安 重夫	慶應義塾大学・医学部 ・教授		免疫学	トランスジェニックマウスの作成			
岩崎 利郎	東京農工大学・獣医学部 ・教授		獣医皮膚科学	黄色ブドウ球菌毒素の作成			
海外共同研究者 ジョン・R・スタンレー	米国・ペンシルバニア大学 ・医学部・主任教授		皮膚科学	ペプチド解析			
<p>当初の研究目的 ( 交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。 )</p> <p>天疱瘡は、表皮細胞間接着因子であるデスモグレイン ( Dsg ) に対する IgG 自己抗体が Dsg の機能阻害を誘導することにより、皮膚・粘膜に水疱、びらんを生じる致死的重篤な疾患である。天疱瘡において、なぜ Dsg に対する自己抗体産生が開始されるのか。末梢抗原である Dsg に対する免疫寛容は正常においてどのようにして獲得されるのか。本研究の目的は、天疱瘡をモデル疾患とし、自己免疫疾患の発症機序を解明することにある。</p> <p>我々は自己抗原ノックアウトマウスを用いた新しい方法により尋常性天疱瘡モデルマウスを作成している。このモデルマウスから、表皮細胞間接着障害を誘導できる抗 Dsg3 モノクローナル抗体を単離し、疾患誘導活性を持つ抗体と持たない抗体の相違を検討する。さらに、ハイブリドーマ細胞から、H 鎖、L 鎖の cDNA を単離し、抗 Dsg3 抗体を B 細胞膜表面に発現するトランスジェニックマウスを作成する。B 細胞トランスジェニックマウスにおける B 細胞の運命を検討することにより、Dsg3 に対する B 細胞免疫寛容獲得の機序を明らかにする。また、天疱瘡モデルマウスより Dsg3 に特異的に反応する T 細胞クローンを複数単離し、T 細胞クローンとナイーブな B 細胞を Rag-2<sup>-/-</sup>マウスに移植することにより、病的抗体を誘導する T 細胞を同定する。さらに、T 細胞エピトープとその T 細胞から誘導される自己抗体エピトープの関係を明らかにする。本研究の特徴のひとつは、人工的な抗原を過剰発現させた従来の実験系でなく、実際の自己免疫疾患の自己抗原に対する B 細胞、T 細胞の免疫寛容獲得の分子メカニズムを明らかにする点にある。</p> <p>また、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 ( SSSS ) において、黄色ブドウ球菌の産生する表皮剥奪性毒素 ( ETA ) が、落葉状天疱瘡抗原である Dsg1 を特異的に消化する蛋白分解酵素であることを明らかにした。このことにより、皮膚感染症と自己免疫疾患の接点が Dsg1 において認められたことになる。他の表皮剥奪性毒素 ( ETB など ) を含め、ET の作用機序を解明するとともに、ET 作用後の生体における Dsg1 に対する免疫応答を検討する。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

### 1. 天疱瘡モデルマウスより疾患誘導性抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離、およびそのエピトープ解析

尋常性天疱瘡は、表皮細胞間接着因子デスマグレイン 3 (Dsg3) を標的とした IgG 自己抗体により誘導される。天疱瘡モデルマウスより、8 クローンの抗 Dsg3 mAb (AK シリーズ) を単離した。これらの抗体はすべて *in vivo* において Dsg3 と結合することができるが、ハイブリドーマ細胞をマウスの腹腔に接種したところ AK23 mAb のみ天疱瘡の表現型を誘導した。さらに、AK23 のエピトープは Dsg3 のアミノ酸 V3、K7、P8、D59 に存在することを明らかにした。驚くべきことに AK23 のエピトープ (V3、K7、P8、D59) は、結晶構造から予想されるカドヘリン分子接着面を形成する Dsg3 特異的アミノ酸に一致していた。他の疾患誘導性のない AK mAb は、機能的にあまり重要と考えられない Dsg3 細胞外領域中央部あるいは C 末の膜に近い領域を認識していた。これらの事実により、天疱瘡患者間における重症度の違いがみられる分子的機序のひとつとして、抗体の認識するエピトープが関与することを初めて実証することができた。さらに多くのモノクローナル抗体を単離し、疾患誘導性との関連を詳細に検討している。

### 2. Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウスの作成および Dsg3 反応性 B 細胞のトレランス機序の解明

AK7 mAb の H 鎖及び L 鎖の可変領域を持つトランスジェニックマウスを作成した。トランスジェニックマウスでは、Dsg3 に反応性を示す IgM<sup>a</sup> 陽性の B 細胞が骨髄のみならず、末梢リンパ臓器である脾臓およびリンパ節にも認められた。さらに、これらの Dsg3 反応性 B 細胞は、抗原刺激に反応し、不活化もされていないことを明らかにした。従って、Dsg3 反応性 B 細胞は、トレランスによる除去、不活化から逃れることが明かとなった。これらの事実は、自己抗原に対する B 細胞トレランスの研究に、新しい方向性を示すこととなった。AK7 mAb は疾患誘導性を持たない mAb である。疾患誘導性の有無により B 細胞のトレランスによる運命が異なる可能性がある。現在、疾患誘導能を持つ AK23 mAb の H 鎖及び L 鎖の可変領域を持つトランスジェニックマウスを作成中である。同一抗原に対する B 細胞の運命が、疾患誘導性の有無により異なることがあれば、疾患の発症機序を解明する上で重要な知見となる。

### 3. 天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析

天疱瘡モデルマウスより、Dsg3 による増殖反応を示す T 細胞クローンの単離を試みている。現在までに、Dsg3 に対する反応性をしめす培養条件が整い、クローンを単離中である。

### 4. ブドウ球菌外毒素である表皮剥脱毒素 ETB、ETD の標的蛋白の検討

ETB 産生株より ETB 遺伝子を単離し、組換え ETB を作成した。ETB を新生仔マウスに投与後、皮膚において E-Cad および Dsg3 の染色性は変わらないものの、Dsg1 の染色性は消失していた。組換え Dsg1、Dsg3 蛋白と ETB を *in vitro* で反応させると、ETB は Dsg1 を特異的に、濃度依存性に切断することが確認された。さらに、皮膚感染症から分離培養された黄色ブドウ球菌の遺伝子から、ETA、ETB と相同性を示す ETD が単離された。ETD においても同様の検討を加えてみると、Dsg1 を特異的に消化することが明らかにされた。

### 5. ET の Dsg1 消化における分子メカニズムの解明

ETA、ETB の結晶構造の解析から、セリンを活性中心に持つセリンプロテアーゼの一種であることが予想されていた。そこで、ETA、ETB の活性中心であるセリンをアラニンに変異させると、変異 ET は Dsg1 に特異的に結合する結合活性は保っているものの、Dsg1 を切断する活性を完全に失っていた。さらに、ET の結晶構造解析から、基質蛋白のグルタミン酸 (E) の直後を切断することが予想されていたが、Dsg1 の切断端の配列を解析してみると、ETA、ETB、および ETD のすべての ET が、EC3 と EC4 の結合部付近にある N 末から 381 番目のグルタミン酸の直後で切断していることが確認された。従って、ET は、Dsg1 特異的なセリンプロテアーゼであることが証明された。

### 6. SSSS 感染後の Dsg1 に対する免疫応答

ET 産生黄色ブドウ球菌感染後に ET により Dsg1 が皮膚において分解され、血中に流出し、免疫系に曝露されることが考えられる。そこで、インフォームドコンセント取得後に、患児より罹患時、罹患後 2 週後、4 週後の採血を行い、Dsg1 に対する IgM、IgG 抗体産生の有無を ELISA にて検討している最中である。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

### 1) 天疱瘡自己抗原分子上の病的ホットスポットの同定

天疱瘡に認められる自己抗体抗体価は、単一の患者で時間経過による変化を観察した場合、病勢と平行して推移することが知られている。しかし、異なる患者間で比較した場合、抗体価は重症度を表す絶対的な指標とならない。すなわち、抗体価が高くても軽症を示す例、抗体価が低くても重症を示す例が存在する。同じ自己抗原を認識する抗体間に、病的活性の違いがあるのであろうか。あるとすれば、その分子メカニズムは何であろうか。

本研究において、天疱瘡モデルマウスから、8種の抗 Dsg3 IgG モノクローナル抗体 (AK mAb シリーズ) を単離し、病的活性とエピトープの関係につき解析した。これらの抗体はすべて *in vivo* において Dsg3 と結合することができるが、ハイブリドーマ細胞をマウスの腹腔に接種したところ AK23 mAb のみ天疱瘡の表現型を誘導した。AK23 のエピトープは、Dsg3 の接着機能上最も重要な、カドヘリン分子間が接着する接着面に存在することが明かとなった。病的活性を認めない他の AK mAb は、機能的にあまり重要と考えられない領域を認識していた。これらの結果により、エピトープの違いにより自己抗体の病的活性が異なることを天疱瘡において初めて実証した (Tsunoda et al, *J Immunol*, 2003)。

今後、分子上の病的活性のホットスポットを同定することは、重症度の指標となりうる単一エピトープ ELISA 法の開発、あるいは重症な表現型を誘導する自己抗体のみを選択的に除去するエピトープ特異的自己抗体除去法の開発につながる。

### 2) Dsg3 特異的 B 細胞トレランスの解析

B 細胞トレランスのドグマは、HEL(henn egg lysozyme)あるいは MHC class I 分子に対する抗体遺伝子より作成した B 細胞トランスジェニックの解析をもとにしている。自己免疫疾患の実際の抗原に対するトレランスの成立機序を解析した例はない。今回、我々は、AK7 抗 Dsg3 抗体の遺伝子より、Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウスを作成し、Dsg3 反応性 B 細胞の運命を解析した。予想に反して、Dsg3 反応性 B 細胞は、抹消リンパ組織であるリンパ節、脾臓においても認められ、不活化もされていなかった。従って、AK7-Dsg3 反応性 B 細胞は、トレランスによる除去・不活化から逃れていることになる。AK7 mAb は、疾患誘導性を持たない抗体である。現在、疾患誘導性を持つ AK23 mAb より B 細胞トランスジェニックマウスを作成中であり、疾患誘導性の有無により Dsg3 反応性 B 細胞のトレランスメカニズムの違いがあるか検討する予定である。実際の自己免疫疾患の自己抗原に対するトレランスメカニズムの解析は、人工的な抗原を使用したトランスジェニックモデルにより得られた結果と異なる可能性が十分あり、自己免疫発症機序の解明に向けて新たな展開を生み出すことが期待される。

### 3) 黄色ブドウ球菌・表皮剥奪性毒素(Exfoliative Toxin, ET)の作用機序の解明

ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) 及び伝染性膿痂疹 (いわゆる “とびひ”) の基本的病態は、1970 年に黄色ブドウ球菌の産生する ET の同定により明らかにされた。しかし、その後 30 年間、ET が表皮に水疱を誘導する分子メカニズムは不明であった。我々は、2000 年に ET のうち ETA が、表皮細胞間に重要な役割をする Dsg1 を特異的に分解するプロテアーゼであることを発見した (Amagai et al, *Nature Medicine*, 2000)。本研究により、もう一つの血清型である ETB も ETA と全く同様の機序で、Dsg1 を消化することを確認した (Amagai et al, *J Invest Dermatol*, 2002)。さらに遺伝子検索により、さらに多くの ET 遺伝子が存在することが確認され、ETD を同定し、Dsg1 の分解活性を確認した。これらの ET はすべて、Dsg1 の N 末より 381 番目のグルタミン酸の後を切断し、ET の活性中心であるセリンをアラニンに変異させると全く切断活性を失うことを確認した。従って、ET はすべてグルタミン酸特異的セリンプロテアーゼであることが明らかにされた (Hanakawa et al, *J Clin Invest*, 2002)。一連のこれらの結果より、従来まで不明であった ET の分子メカニズムを解明することができた。さらに多くの ET のアイソタイプが存在する可能性があり、また皮膚感染症における SSSS あるいは伝染性膿痂疹以外の皮膚感染症においても ET が関与している可能性もでてきている。今後は、ET を中心に、皮膚感染症の病態解明において新たな潮流が形成されるかもしれない。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号) 最初と最後のページ、発表年(西暦) 及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

### 英語論文

1. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M: Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. **J Immunol** 167: 5439-5448, 2001
2. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, Nishikawa T: Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. **Br J Dermatol** 147: 261-265, 2002
3. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, Stanley JR: Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. **J Invest Dermatol** 118: 845-850, 2002
4. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Umezawa A, Hata J, Nishikawa T: Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 118: 199-204, 2002
5. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fubada Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, Stanley JR: Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 110: 53-60, 2002
6. Amagai M: Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. **Keio J Med** 51: 133-139, 2002
7. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai M: Identification of Staphylococcus aureus etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect Immun** 70: 5835-5845, 2002
8. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, Nishikawa T: The ultrastructural changes of mice actively producing antibodies to desmoglein3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch Dermatol Res** 294: 318-323, 2002
9. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S: Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol** 32: 627-633, 2002
10. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M: Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol** 170: 2170-2178, 2003
11. Amagai M: Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. **J Am Acad Dermatol** 48: 244-252, 2003
12. Amagai M: Active disease mouse model for pemphigus. **Ann Dermatol Venereol** : in press, 2003
13. Nagata Y, Velez AMA, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, Hashimoto T: Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol Sci** : in press, 2003

### 日本語論文 (抜粋)

1. 天谷雅行: 自己免疫性水疱症の最新知見。日本臨床免疫学会雑誌 25: 28-31, 2002
2. 天谷雅行: ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) におけるデスモグレイン1の関与。臨床皮膚科 56: 58-61, 2002
3. 天谷雅行: 天疱瘡の分子生物学。現代医療 34: 1846-1851, 2002
4. 天谷雅行: 天疱瘡と Dsg3 ノックアウトマウス。Annual Review 2003 免疫 : 280-285, 2002
5. 天谷雅行: 表皮細胞接着と皮膚疾患。日本皮膚科学会雑誌 112: 1569-1575, 2002

### 国際学会発表 (抜粋)

1. Tsunoda K, Aoki M, Ota T, Nagai T, Yamada T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M: A pathogenic anti-desmoglein3 monoclonal antibody recognizes N-terminal adhesive region of desmoglein3. The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, 2002. 5. 15-18.
2. Amagai M: New concept in acquired bullous diseases (**Plenary Lecture**). 20th World Congress of Dermatology, Paris, 2002. 7. 1-5.
3. Amagai M: Pemphigus model mice by adoptive transfer of autoantigen knockout lymphocytes. COE International Symposium on Recent Advances of Basic and Clinical Neuroimmunology, Nagasaki, 2003. 3. 12-13.
4. Amagai M: Pemphigus: a simple logic behind a complex disease (**SID William Montagna Lecture**). International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30- 5.4.
5. Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Shimoda K, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S: Tolerance escape of autoreactive B lymphocytes against desmoglein 3 in transgenic model mice (Plenary session). International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30- 5.4.