

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09790

研究課題名(和文)核内抗原自己抗体による膠原病皮膚病変の発症機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of cutaneous lesion in collagen disease induced by intranuclear autoantibody.

研究代表者

樋口 哲也 (HIGUCHI, Tetsuya)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：00334425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：CD40リガンドTgマウス由来のVL鎖であるVk38cは抗Sm/RNP抗体等でも見られたため、Vk38cTgマウスを作成したところ皮膚炎と脱毛を生じた。このマウスはconventional環境下で次第に皮膚の炎症反応が増強し、病理組織学的に湿疹反応に近い表皮内炎症が見られ、血清総IgE量が高いマウスが出現してきた。炎症により起こる脱毛は病理組織学的にも炎症が強いが、長期に飼育して起こってくる脱毛部の病理組織像は、炎症も表皮肥厚もなくヒトの円形脱毛症に近い病理組織であることが確認された。Vk38Tgマウスの自己抗体が、飼育環境による炎症の有無や脱毛の病理組織学的差異に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vk38c type VL chain, derived from CD40 ligand transgenic (Tg) mouse, was observed in anti-Sm/RNPAb, and dermatitis and alopecia were observed in Vk38c Tg mouse. Under conventional condition, dermatitis in Vk38g Tg mice was enhanced, and intraepidermal inflammation similar to eczematous reaction was observed in histology. In these mice serum IgE levels were elevated. In alopecia lesion induced by skin inflammation, lymphocytic inflammation was augmented in histology. In contrast, histological finding of alopecia lesion of Vkc Tg mouse kept long-term in conventional condition was similar to human alopecia areata, lacking inflammation and epidermal proliferation. It is suggested that autoantibody in Vk38c Tg mouse influenced the histological difference of dermatitis and alopecia, in conventional conditions.

研究分野：皮膚免疫・アレルギー

キーワード：CD40リガンド トランスジェニックマウス アトピー性皮膚炎 脱毛症

## 1. 研究開始当初の背景

### 膠原病の自己抗体と皮膚病変の関連

全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群などの膠原病では、抗核抗体や疾患特異的な自己抗体の出現を伴い、また蝶型紅斑や円盤状皮疹などの皮疹の出現を認めるが、これらの自己抗体が皮膚症状の発症についてどのように関与しているかについては明らかになっていない。また抗 SS-A 抗体や抗 SS-B 抗体がシェーグレン症候群における環状紅斑の発症に臨床的に有意に相関することは分かっているが、この抗体が病変の形成にどのように関与するかは明らかになっておらず、また同抗体は欧米人においては亜急性皮膚エリテマトーデスの皮疹という別の皮膚症状にも相関する。

このようなことから、膠原病においては皮膚構成分子に対する臓器特異的でない自己抗体が、どのように皮疹部でのリンパ球性の炎症に関与するかを明らかにすることは、難治疾患である膠原病における皮膚病変の病態解析・治療に必要であると考えられる。

### CD40 シグナルの過剰による B 細胞トレランス破綻

既に研究代表者は B 細胞への CD40 シグナルの過剰により B 細胞トレランスが破綻し、抗核抗体や抗 DNA 抗体が出現し、自己免疫性腎炎が発症することを CD40 リガンド (CD40L) トランスジェニックマウスにおいて明らかにした。この CD40 シグナルによる B 細胞トレランス破綻の機序を解析するために、このトランスジェニックマウスと、すべての B 細胞が DNA と高い親和性の VH 鎖を持つトランスジェニックマウス (56R をマウス) を交配させて解析した。

この結果、56R マウス単独ではトレランス機構により、抗 DNA 抗体は産生されないが、ダブルトランスジェニックマウス (CD40L/56R) では、トレランスが破綻し細胞核内の Sm/RNP に対する自己抗体が産生されること、またそのメカニズムとして、多くの B 細胞の VL 鎖が Vk38C などの特定のレパトアの組み合わせになっていることを明らかにした。すなわち Vk38C は抗 Sm/RNP 抗体など全身性エリテマトーデスと関わりのある、VL 鎖であると考えられる。CD40L トランスジェニックマウス、CD40L/56R トランスジェニックマウスでは自己抗体は産生されるものの、皮膚病変は認められなかったが、すべての VL 鎖が Vk38c であるトランスジェニックマウス (Vk38C マウス) をさらに作成したところ、このマウスの一部で皮膚に炎症を来し、脱毛がおこることが確認された。この結果により、Vk38C マウスが抗細胞核内抗体による全身性エリテマトーデス皮膚病変の解析に適することが強く示唆され、これまでの CD40 シグナル過剰による B 細胞トレランスの破綻と膠原病皮膚病変の関連を解析し、臓器非特異的自己抗体

が皮膚病変の発症にどのように関与するかを解析することを明らかにする。

## 2. 研究の目的

トランスジェニックマウスを用いた解析で、B 細胞への CD40 シグナルの過剰により B 細胞トレランスが破綻し、抗核抗体や抗 DNA 抗体が出現し、自己免疫性腎炎が発症することをすでに明らかにし、その B 細胞トレランス破綻のメカニズムについても明らかにした。その際に作成した Vk38C トランスジェニックマウスの一部で自己抗体が産生され皮膚に炎症を来し、脱毛がおこることが確認された。これまでのトランスジェニックマウスでは皮膚病変は見られなかったが、このマウスにおいて自己抗体が皮膚の炎症を起こしているのではないかと推測される。このマウスの病理組織学的解析や免疫学的解析を用いて臓器非特異的自己抗体が皮膚病変の発症にどのように関与するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

Vk38C トランスジェニックマウスにおける皮膚症状について、病理組織学的に検討し皮膚症状の発症機序について解析する。また、Vk38C トランスジェニックマウスにおける自己抗体の皮膚での反応部位を、同マウスの血清と正常マウス皮膚を反応させて解析する。

全身性エリテマトーデスなどでは紫外線暴露による皮膚病変の増悪が見られることなどから、同マウスの飼育環境や紫外線照射などを行い皮膚病変が誘導される条件を解析する。

同マウスから B 細胞または T 細胞のみを精製、正常マウスに移入し皮膚病変の発症にどの細胞が関与しているか解析する。

### Vk38C トランスジェニックマウスの皮膚病変の病理組織学的解析

Vk38C トランスジェニックマウスでは比較的早期から炎症細胞の浸潤を伴う体毛の脱毛半を認める。このマウス及びコントロールマウスの皮膚病変部および正常皮膚の病理組織標本を作製する。病理組織像を観察するとともに、免疫染色にて病変部への免疫グロブリンの沈着や浸潤するリンパ球の phenotype を観察する。

### 皮膚における自己抗体の認識部位の解析

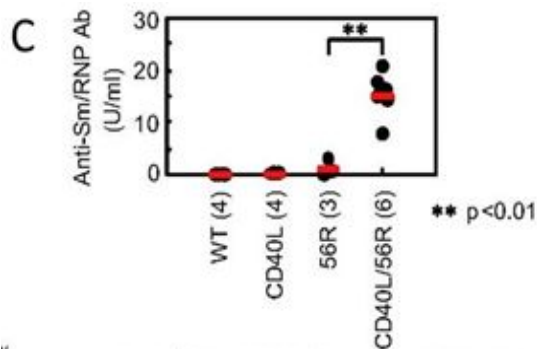
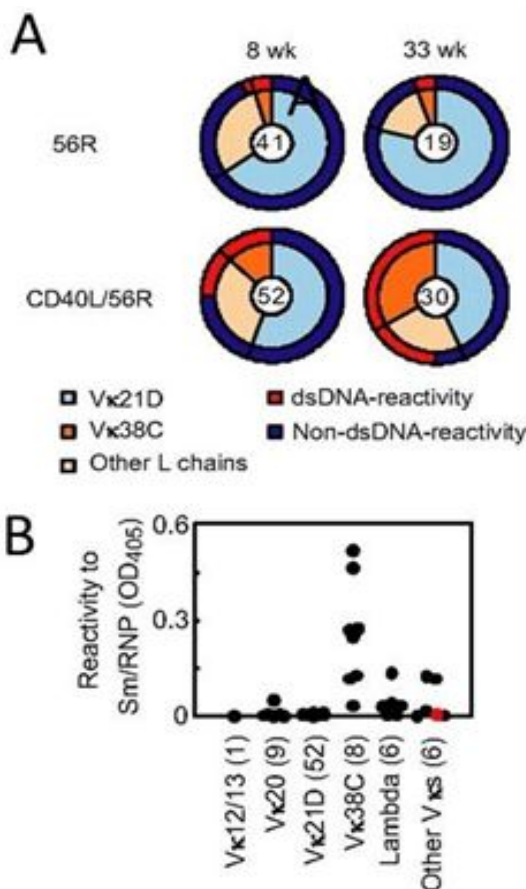
病理組織学的検索による、このマウスの皮膚病変の発症部位の同定後、実際にマウスの血中の自己抗体が、皮膚病変部位に沈着しているか、さらにどの細胞に認められるかを解析する。トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの血清と、正常マウス皮膚に反応させ、二種のマウス血清での免疫染色での違いを観察することで、

免疫グロブリンの沈着部位を解析する。正常マウス皮膚でも免疫グロブリンの沈着が非特異的に認められる場合は、異種（ヒトなど）の皮膚を用いて、抗マウス IgG 抗体などを二次抗体として、トランスジェニックマウスの血清中自己抗体が、強く沈着する部位を同定する。

また、免疫プロット法を並行して行い、皮膚構成成分のどの分子量の蛋白質に自己抗体が強く結合するかを解析し、自己抗体の認識部位を明らかにしていく。

#### 4. 研究成果

CD40 リガンドトランスジェニックマウスを用いたこれまでの解析から、Vk38c は抗 Sm/RNP 抗体など全身性エリテマトーデスとかわりのある VL 鎖であると考えられたため、産生する全ての免疫グロブリンの VL 鎖が Vk38c であるトランスジェニックマウス (Vk38c マウス) を作成したところ、一部のマウスで皮膚に炎症が起こり、脱毛がおこることが確認された。このことから核内自己抗原に対する自己抗体が膠原病の皮膚病変の発症に関与すると考えられた。



- A.** CD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスから作成されたB細胞ハイブリドーマ全体では、CD40シグナルによりB細胞トランスが破綻し、dsDNAに反応するクローンが徐々に増え、中でもVL鎖がVk38cの割合が増える。
- B.** Vk38cハイブリドーマの培養上清はSm/RNPとよく反応する。
- C.** さらにマウス血清中にも抗Sm/RNP抗体が産生されるが皮膚病変は認めない。

しかし、すべてのVL鎖がVk38cであるVk38cトランスジェニックマウスでは、皮膚炎を発症する。

H27年度からH29年度にかけてマウスの数を増やし、conventional環境下とspecific pathogen free (SPF)環境下で飼育し、皮膚病変の観察と病理組織学的検討、血清解析を行った。皮膚病変としてconventional環境下で飼育すると、次第に皮膚の炎症反応が出現するマウスの増加が見られ、病理組織学的にも湿疹反応に近い表皮内でのリンパ球を主体とした炎症が見られた。その割合はSPF環境下で飼育しているマウスよりconventional環境下で飼育しているマウスでより高い傾向がみられた。

conventional環境下のマウス群では血清中の血清総IgE量が高い傾向がみられ、湿疹反応を起こすマウスに見られたが、炎症を起こさないマウスでも長期に飼育をしておくとも血清総IgE量が上がってくるのがH28年度までに確認された。さらに炎症を起こさないマウスでも、長期に飼育していくとも脱毛を起こしてくるマウスが増えてくることもH29年度に確認された。

病理組織像を比較検討したところ、炎症とも起こる脱毛は病理組織学的にも炎症が強いが、長期に飼育して起こってくる脱毛部の病理組織像は、炎症は表皮肥厚もなくヒトの円形脱毛症に近い病理組織であることが確認された。

Vk38cマウスの自己抗体が、飼育環境による炎症の有無や脱毛の病理組織学的差異に影響する可能性が示唆され、核内自己抗原に対する自己抗体の存在と、皮膚環境の条件により皮膚症状が発症することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<https://www.lab.toho-u.ac.jp/med/sakura/dermatology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 哲也 (HIGUCHI, Tetsuya)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：00334425

(2) 研究分担者

井川 健 (IGAWA, Ken)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00372441

(3) 連携研究者

鐺田 武志 (TSUBATA, Takeshi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：80197756

(4) 研究協力者

( )