

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592943

研究課題名(和文)自己抗原特異的 IgMモノクローナル抗体による天疱瘡発症機序解明と治療法の開発

研究課題名(英文) development of therapeutic strategy and analysis of pathophysiology of pemphigus using autoantigen specific IgM monoclonal antibody

研究代表者

角田 和之(kazuyuki, tsunoda)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60265915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡における抗Dsg3IgM抗体の詳細な解析を実施した。天疱瘡患者血清中では、病初期血清中には明らかな抗Dsg3IgM抗体は検出されなかった。また天疱瘡モデルマウスでは、発症初期における抗Dsg3 IgM抗体産生が確認されたが、抗Dsg3IgG抗体と比較すると有意な上昇ではなかった。ヒト培養角化細胞を用いたassayおよびマウスを用いた天疱瘡における抗Dsg3IgM抗体の発症抑制と治療効果の検討を行い、現時点では両効果ともにコントロールと比較して明らかな差は確認されていないが、今後評価系確立への条件検討が必要であると考えられた。本研究は天疱瘡の発症機序解明、治療法開発に有用なデータになる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the anti-Dsg3 IgM antibody in pemphigus. In early stage of pemphigus patient serums, apparent anti-Dsg3IgM antibody was not detected. In PV model mice, anti-Dsg3 IgM antibody production in the early stage of the onset of PV was confirmed, however it was not significant than anti-Dsg3 IgG antibody production. Furthermore, we conducted examination for in vivo and in vitro analysis. The in vitro dissociation assay using normal human culture keratinocyte and the passive transfer assay using mouse were performed to confirm the preventive effect and therapeutic effect of the anti-Dsg3 IgM antibody. There are no apparent differences between subjects and controls for both effects. The detailed and continuous examination will be necessary in future. These results are useful for dissection of pathophysiology of PV and development of therapeutic strategy of PV.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：自己免疫疾患 天疱瘡 自己抗体 モノクローナル抗体 病原性

1. 研究開始当初の背景

尋常性天疱瘡 (PV) は粘膜・皮膚に生じる難治性の自己免疫性水疱形成疾患である。PV 自己抗原蛋白は粘膜上皮あるいは表皮の角化細胞間の接着装置であるデスモゾームに存在する、デスモグレイン 3 (Dsg3) であり、Dsg3 に抗 Dsg3 IgG が結合し細胞接着を阻害することにより PV が発症すると考えられている。

これまでにわれわれは、自己抗原ノックアウトマウスを用いた従来にない方法で PV モデルマウスを開発した。その表現型は角化細胞表面への IgG の沈着や基底層直上の水疱形成など、ヒト PV の表現型と同一であった。さらに PV モデルマウスから抗 Dsg3 IgG モノクローナル抗体 (AK IgG シリーズ) を複数単離し、それらのなかには明らかな病原性を有さない複数の AK IgG 抗体や強い病原性を有する AK23 IgG が存在し、AK23 IgG はハイブリドーマによる腹水形成法にて単独で PV モデルマウスと同様の表現型が誘導可能な非常に強い病原性を有する事実が確認された。

続いて最近われわれは、この病原性 AK23 IgG の超可変領域 cDNA を用いて、B cell トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは全ての B 細胞上に AK23 IgG の超可変部位を有する IgM のみを発現し、さらに血中に分泌されるという特徴を有する。非常に興味深いことにこのマウスでは抗 Dsg3 反応性の B 細胞が脾臓やリンパ節などの末梢リンパ組織中に deletion を受けることなく存在し、さらには血中、組織中より抗 Dsg3 IgM 抗体が検出されたにもかかわらず、PV の表現型を認めなかった。そこで次に抗 Dsg3 IgM 抗体の病原性を確認するためにトランスジェニックマウスより抗 Dsg3 IgM モノクローナル抗体 (AK23 IgM) を単離した。その結果、AK23 IgG では腹水形成法にて PV モデルマウスと同様の表現型の誘導が確認できたにもかかわらず、AK23 IgM では組織への IgM の沈着が認められたものの表現型の誘導は認めなかった。さらに AK23 IgM の詳細な検討を行った結果、AK23 IgM は細胞膜上に発現した Dsg3 には結合するものの、明らかな病原性を示さない事が確認された。これらのデータは天疱瘡の発症および病態解明における新たな知見となった。

一般的に IgM 抗体は自然抗体としても知られているが、いわゆる獲得免疫システムにおいては IgG 抗体産生は IgM 抗体産生に引き続いて起こるものと考えられている。しかし PV においては抗 Dsg3 IgM クラス抗体の解析は現在までに殆どなされておらず、病態形成における役割は不明な点が多い。一方、IgM 欠損マウスでは自己抗体を産生する事から、自己免疫疾患発症に抑制的に働いている可能

性が考えられている。これまでの我々の研究結果より、マウスにおいては抗 Dsg3 IgM 抗体単独の状態での病原性についての検討はなされたものの、抗 Dsg3 IgG と抗 Dsg3 IgM の共存下における評価はなされていない。そこで本研究ではわれわれが単離した AK23 IgM を用いて、PV の病態生理の解明および治療の可能性について検討した。

2. 研究の目的

これまでに PV の発症には病原性を有する IgG クラス自己抗体が関与し、その IgG クラス自己抗体の解析を中心になされてきたものの IgM クラスの抗体に関する解析は殆ど行われていない。そこで本研究では、最近われわれが作製した IgM クラス天疱瘡モノクローナル抗体を用いて天疱瘡の病態生理を解明し、さらには天疱瘡の水疱形成における IgM クラス自己抗体の影響について検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

in vivo および In vitro における解析を以下の如く順次行った。

(1) 天疱瘡患者血清中の抗 Dsg3 IgM 抗体の解析

PV モデルマウスにおける抗 Dsg3 IgM 抗体産生について検討し、更に天疱瘡患者における抗 Dsg3 IgM 抗体の有無について確認を行う。天疱瘡患者血清の中から PV 初期の血清を選定し、ヒト組み換え Dsg 蛋白を抗原とした ELISA 法を用いて PV 患者血清中の抗 Dsg3 IgM 抗体の有無をスクリーニングする。

(2) In vitro、In vivo 病原性評価系に用いる PV 患者血清の解析

AK23 IgG と競合するエピトープを認識する抗体を有する PV 患者血清を用いて初代ヒト培養角化細胞を用いた in vitro dissociation assay を行う。すなわち培養した角化細胞シートに患者血清 (抗 Dsg3 抗体) を添加し反応させる。その後ピペッティングによる物理的なストレスを加えて細胞シートを断片化しカウントし、水疱形成能を数値化した dissociation score を算出する。

(3) In vitro、In vivo 病原性評価系における AK23 IgM の preventive effect の検討

in vitro dissociation assay の前処置として AK23 IgM を一次抗体として前処置を行った後に、通常の in vitro dissociation assay を行う。

マウスを用いた in vivo における preventive effect の検討

新生仔マウスへの抗体受動免疫法により抗体の病原性が確認である可能ことがこれまでに確認されている。そこで、AK23 IgG あるいは PV 患者血清を用いて受動免疫した群

をコントロールとし、さらに AK23 IgM をマウス皮下に投与した後に AK23 IgG あるいは PV 患者血清を注射し、24 時間後における水疱形成の有無を観察し、コントロール群と肉眼的及び病理組織学的に比較検討する。

免疫不全マウスの腹腔内にハイブリドーマを接種し病原性を確認する、腹水形成法を行う。AK23 IgM 産生ハイブリドーマを腹腔内に接種した後に AK23 IgG 産生ハイブリドーマを接種し、その体重の増減、生存率および病理組織学的水疱形成を AK23 IgG 単独接種のマウスと比較検討する。

(4) In vivo 病原性評価系における AK23 IgM の therapeutic effect の検討

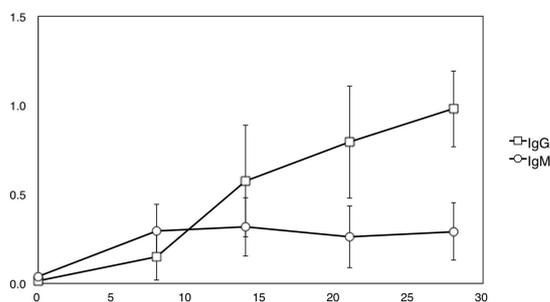
AK23 IgG ハイブリドーマを Rag2^{-/-}マウス腹腔内に投与し、体重をモニタリングし体重の減少が認められた時点において AK23 IgM ハイブリドーマを接種する。その後の体重変化と生存日数を測定し、AK23 IgG ハイブリドーマ単独接種群と比較検討する。

4. 研究成果

PV モデルマウスおよび天疱瘡患者血清中における、抗 Dsg3IgM 抗体産生を ELISA 法を用いて検討した。

まず、天疱瘡患者血清中の抗 Dsg3IgM 抗体の解析を中心に行った。まず解析に使用するヒト組み換え Dsg 蛋白の大量作製を実施した。さらに生成されたヒト組み換え Dsg 蛋白を抗原とした ELISA プレート作製し、病初期の天疱瘡患者血清における抗 Dsg3IgM 抗体の検出を試みた。その結果病初期天疱瘡患者血清中には明らかな抗 Dsg3IgM 抗体は検出されなかった。これは実際に病気を発症している段階においては既に IgM クラス抗体より IgG クラス抗体へクラススイッチがおこなわれているためであると考えられた。本現象を更に検証するためには我々が作製した天疱瘡モデルマウスにおける抗 Dsg3IgM 抗体産生の確認が有用である可能性が考えられた。

次に我々が作製した天疱瘡モデルマウスにおける抗 Dsg3 IgM 抗体産生について、組み換え Dsg 蛋白を抗原とした ELISA 法にて検討を行った結果、天疱瘡モデルマウスの発症初期における抗 Dsg3 IgM 抗体産生が確認されたものの、抗 Dsg3IgG 抗体と比較すると有意な上昇ではなかった(下図)。



さらに病原性を有する抗 Dsg3 抗体である AK23 IgG と競合するエピトープを認識する抗体を優位に有する PV 患者血清を用いて、ヒト培養角化細胞を用いた in vitro dissociation assay を行った。その結果複数の PV 患者血清が in vitro dissociation assay において病原性を有し、定量化が可能であることが確認された。invitro アッセイの結果をふまえ、マウスを用いた in vivo における preventive effect と therapeutic effect の検討を行った。

preventive effect を確認するために新生仔マウスへの抗 Dsg3 IgM モノクローナル抗体の受動免疫および、成体マウスでの抗 Dsg3 IgM 抗体産生ハイブリドーマによる腹水形成法を実施した。これらの結果をもとにして、さらに In vivo における病原性評価を行うために抗 Dsg3 IgM の therapeutic effect の検討を行った。現時点では preventive effect、therapeutic effect とともにコントロールと比較して明らかな差は確認されていないものの、今後さらにマウス数および抗体量や期間など、継続的に詳細な評価系確立への検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

角田和之, 三友啓介, 佐藤英和, 山上淳, 中川種昭, 河奈裕正. 口腔に発生した腫瘍随伴性天疱瘡の1例. 日本口腔外科学会雑誌. 査読有り, 2014;60(5).(in press,)

URL, DOI 提出時点で記載無し

佐藤英和, 角田和之, 加藤伸, 藤田康平, 池浦一裕, 中川種昭. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫を合併したシェーグレン症候群の2例. 有病者歯科医療. 査読有り, 2013.12;22(3):199-206

URL, DOI 提出時点で記載無し

多木陽子, 加藤伸, 飯島佑斗, 佐藤英和, 藤田康平, 山上淳, 永井哲夫, 中川種昭, 角田和之. 小児に発症した尋常性天疱瘡の1例. 日本口腔内科学会雑誌. 査読有り, 2013;19(2):54-9

URL, DOI 提出時点で記載無し

佐藤英和, 中山亮平, 藤田康平, 池浦一裕, 加藤伸, 角田和之, 永井哲夫, 角田博之, 中川種昭. 心理的口臭症と診断された外国人症例を通して. 日本口臭学会会誌. 査読有り, 2013;4:15-18

<http://search.jamas.or.jp/link/ui/2013330482>

足立剛也, 宮本樹里亜, 大内 健嗣, 大山学, 海老原全, 角田和之, 天谷雅行. 骨吸収を伴った小児口唇の線状強皮症の1例. 臨床皮膚科. 査読有り, 2012;66(4):311-5
<http://search.jamas.or.jp/index.php?format=title&pp=&uid=1&module=Advanced&act>

ion=DetailOne&sid=268435457&change_f=on
&nocert=on

Tsunoda K, Ota T, Saito M, Hata T, Shimizu A, Ishiko A, Yamada, T. Nakagawa, T. Kowalczyk, AP. Amagai, M. Pathogenic Relevance of IgG and IgM Antibodies against Desmoglein 3 in Blister Formation in Pemphigus Vulgaris. Am J Pathol. 査読有り, 2011;179(2):795-806
DOI:S0002-9440

〔学会発表〕(計 21 件)

石井秀太郎, 山田由佳, 黄地建仁, 西須大徳, 加藤伸, 佐藤英和, 藤田康平, 池浦一裕, 河奈裕正, 角田和之, 中川種昭. Erdheim-Chester 病患者の歯科治療経験. 第 23 回有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2014.3.14-3.16; 福岡. (口頭発表)

角田和之, 口腔内科診断の理想を求めてケースヒストリーにみる診断・治療の実際 - . 第 23 回日本口腔内科学会学術集会; 2013.9.13 ; 東京(招聘講演・シンポジウム)

池浦一裕, 加藤伸, 小高利絵, 佐藤英和, 藤田康平, 西須大徳, 角田博之, 小澤夏生, 永井哲夫, 中川種昭, 角田和之. 塩酸ピロカルピン内服に伴う多汗症状に対する白虎加人参湯の効果. 第 23 回日本口腔内科学会学術集会; 2013.9.13-9.14; 東京. (口頭)

多木陽子, 加藤伸, 飯島佑斗, 佐藤英和, 山上淳, 中川種昭, 角田和之. 小児に発症した尋常性天疱瘡の 1 例. 第 23 回日本口腔内科学会学術集会; 2013.9.13-9.14; 東京. (口頭)

藤田康平, 小澤夏生, 佐藤英和, 池浦一裕, 角田和之, 角田博之, 永井哲夫, 中川種昭. 当科における漢方医学教育の試み. 第 64 回日本東洋医学会学術総会; 2013.5.31-6.2; 鹿児島. (口頭)

佐藤英和, 小澤夏生, 藤田康平, 角田和之, 角田博之, 中川種昭, 永井哲夫. 半夏厚朴湯が奏功した、口渇を主訴とした口腔異常感症の一例. 第 64 回日本東洋医学会学術総会; 2013.5.31-6.2; 鹿児島. (口頭発表)

玉手秀典, 榎田洋平, 加藤伸, 佐藤英和, 藤田康平, 池浦一裕, 角田和之, 中川種昭. 抜歯を行ったクロイツフェルト・ヤコブ病の 1 例. 第 22 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2013.3.30-3.31; 東京. (口頭)

黄地健仁, 佐藤英和, 藤田康平, 加藤伸, 新里知佳, 榎田洋平, 山上淳, 天谷雅行, 角田和之, 中川種昭. 当科における粘膜類天疱瘡の臨床的検討. 第 22 回日本口腔内科学会学術大会; 2012.9.22-9.23; 東京. (口頭)

山田有佳, 加藤伸, 佐藤英和, 角田博之, 小高利絵, 永井哲夫, 角田和之, 中川種昭. 多発性骨髄腫に合併した口唇アミロイドーシスの 1 例. 第 22 回日本口腔内科学会学術

大会; 2012.9.22-9.23; 東京. (口頭)

伊東可寛, 笠井弘子, 福田理紗, 永尾圭介, 天谷雅行, 角田和之. ELISA 法による抗体価が病勢を反映した口腔粘膜優位の後天性表皮水疱症の 1 例. 第 844 回日本皮膚科学会東京支部東京地方会; 2012.9.8; 東京. (口頭)

小澤夏生, 角田和之, 加藤伸, 佐藤英和, 角田博之, 中川種昭, 永井哲夫. 口腔異常感症に対する東洋医学的対応について. 第 27 回日本歯科心身医学会総会・学術大会; 2012.9.1-9.2; 川崎市. (口頭)

岩崎このみ, 佐藤英和, 池浦一裕, 藤田康平, 榎田洋平, 山田有佳, 加藤伸, 小高利絵, 畑澤知佳, 角田和之, 藤野雅美, 永井哲夫, 中川種昭. 過去 6 年間の当科における自己臭症の臨床的検討. 第 3 回日本口臭学会総会; 2012.7.7-7.8; 東京. (口頭)

中山亮平, 佐藤英和, 軽部健史, 池浦一裕, 藤田康平, 角田和之, 永井哲夫, 中川種昭. 精神心理面への配慮が必要であった外国人口臭症の一例. 第 3 回日本口臭学会総会; 2012.7.7-7.8; 東京. (口頭)

加藤伸, 小高利絵, 角田和之, 臼田聡, 遠藤友樹, 中山亮平, 中川種昭, 柴秀行. Le Fort I 型骨切り術における超音波手術器具の使用経験・下行口蓋動脈周囲への応用. 第 22 回日本顎変形症学会総会; 2012.6.18-6.19 福岡. (ポスター)

佐藤英和, 角田和之, 加藤伸, 小高利絵, 藤田康平, 池浦一裕, 中川種昭. 悪性リンパ腫を発症したシェーグレン症候群患者の 2 例. 第 21 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2012.3.17-3.18; 宇都宮. (口頭)

植野琢也, 角田和之, 加藤伸, 小高利絵, 三友啓介, 井上裕梨, 柴秀行, 中川種昭. ワルファリン服用患者にヘパリン置換療法を行い観血的処置を行った 2 例. 第 21 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2012.3.17-3.18; 宇都宮. (口頭)

三友啓介, 角田和之, 佐藤英和, 加藤伸, 山上淳, 天谷雅行, 中川種昭, 河奈裕正. 口腔に初発した腫瘍随伴性天疱瘡の 1 例. 第 192 回日本口腔外科学会関東地方会; 2011.12.10; 東京. (口頭)

池浦一裕, 角田和之, 加藤伸, 小高利絵, 小池晶彦, 山田有佳, 佐藤英和, 藤田康平, 永井哲夫, 中川種昭. 線維素性唾液管炎の臨床的検討. 第 21 回日本口腔粘膜学会総会; 2011.9.24-25.; 鹿児島. (口頭)

佐藤英和, 筋生田整治, 臼田慎, 森田麻友, 山田有佳, 小高利絵, 中川種昭, 角田和之. 特異な口腔症状を伴った IgG4 関連 Mikulicz 病の 2 例. 第 20 回日本シェーグレン症候群学会; 2011.9.9-9.10; 金沢. (口頭)

小澤夏生, 永井哲夫, 角田博之, 角田和之, 藤田康平, 佐藤英和, 小高利絵, 加藤伸, 中川種昭. 漢方治療により種々の愁訴が改善した口腔異常感症の一例. 第 26 回日本歯科心身医学会総会・学術大会; 2011.7.16-7.17; 札幌. (口頭)

②小澤夏生, 永井哲夫, 角田博之, 角田和之, 藤田康平, 中川種昭. 口腔粘膜の痛みを主訴とする症例の東洋医学的考察. 第 62 回日本東洋医学会学術総会; 2011.6.10-6.12; 札幌. (口頭)

〔図書〕(計 4 件)

角田和之, 加藤伸. 粘膜類天疱瘡の臨床, 病理, 免疫学的所見. 皮膚科臨床アセット・水疱性皮膚疾患・発症機序の解明から最新の診断・治療まで. 19. 東京: 中山書店; 2014.03.20. 97-104.

角田和之, 佐藤英和. 天疱瘡における粘膜疹. 皮膚科臨床アセット・水疱性皮膚疾患・発症機序の解明から最新の診断・治療まで. 皮膚科臨床アセット・水疱性皮膚疾患・発症機序の解明から最新の診断・治療まで. 19. 東京: 中山書店; 2014.03.20. 30-38.

角田和之, 森毅彦. がん治療期患者における口腔の緩和医療 造血幹細胞移植患者. 口腔の緩和医療・緩和ケア. 京都: 永末書店; 2013. 58-61.

角田和之(分担執筆). 単純疱疹(口唇ヘルペス). '12/' 13 歯科疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本. 東京: クインテッセンス出版; 2012. 120-121.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 和之 (TSUNODA, Kazuyuki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 60265915

(2) 研究分担者

中川 種昭 (NAKAGAWA, Taneaki)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 00227745

(3) 連携研究者

加藤 伸 (KATO, Shin)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80383719

小高 利絵 (KODAKA, Rie)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40383723