

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253065

研究課題名(和文)皮膚自己免疫疾患発症に関する末梢免疫寛容機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of peripheral tolerance mechanism involved in the onset of autoimmune skin diseases

研究代表者

天谷 雅行 (Amagai, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：90212563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：デスモグレイン3(Dsg3)特異的T細胞(H1T細胞)を用いて、末梢性免疫寛容機構の同定及び解析が可能な2つの実験系を確立した。ヌードマウスへの胸腺移植により胸腺でのみDag3を欠損するマウスを作成し、H1-tgマウスの骨髄を移植する。するとDsg3欠損胸腺で成熟したH1T細胞がDsg3の存在する末梢組織中で消失する。他方、H1-Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの末梢組織中のH1T細胞を野生型マウスに養子移入すると、移入された細胞は分裂後に消失する。これらを応用し、末梢性免疫寛容機構が皮膚リンパ節での抗原提示から始まること、分裂と消失の過程に分けられ、複数の細胞群から成立していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Utilizing desmoglein3 (Dsg3)-specific T cells (H1 T cells), two experimental models were established for clarification and analysis of peripheral immune tolerance mechanism. In the first model, we made mice, which lack Dsg3 only in the thymus by applying thymus transplantation into Nude mice, and then performed bone marrow transplantation to these mice from H1-tg mice. In these mice, H1 T cells matured in Dsg3 deficient thymus, and then, disappeared in Dsg3 expressing periphery. In the other model, H1 T cells existing in the periphery of H1-Dsg3<sup>-/-</sup> mice were adoptively transferred into WT mice. In these WT mice, H1 T cells disappeared after proliferation. Taking advantage of these models, we clarified that peripheral immune tolerance mechanism is initiated by antigen presentation to H1 T cells in skin-draining lymph node, and divided into proliferation phase and disappearance phase, orchestrated by some kinds of cell populations.

研究分野：皮膚科学

キーワード：自己免疫 免疫寛容 天疱瘡 マウスモデル デスモグレイン

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡はカドヘリン型表皮細胞間接着分子のデスモグレイン(Dsg)に対する IgG 自己抗体によって生じる自己免疫性水疱症である。現在までに私たちの研究室では天疱瘡自己抗原を発見し、組換え蛋白を用いた ELISA による診断法の確立など、天疱瘡の臨床的知見の大きな発展に貢献してきた。しかし未だにステロイドや免疫抑制剤に頼らない、より副作用の少ない抗原特異的な治療法が必要であり、その確立を最終目標に研究を推進している。そのための基礎研究として天疱瘡モデルマウスの開発に端を発し、Dsg3 特異的 B 細胞および T 細胞の解析を確実に進めてきた。特に T 細胞の解析においては、Dsg3 特異的 T 細胞クローン株から単離した Dsg3 特異的 T 細胞受容体(TCR)遺伝子をもとに、TCR トランスジェニックマウス(Dsg3H1 マウス)を作成し、その解析の結果、Dsg3 に対する免疫寛容機構が実在することを明らかにした。この事実は、作成した Dsg3H1 マウスが免疫寛容機構を解析するためのツールとして有用であることを意味する。一方、天疱瘡患者においては、Dsg3 特異的 B 細胞や T 細胞が末梢血中に存在しており、免疫寛容機構がすでに破綻した状態で診断される。免疫寛容機構は胸腺でなされる中枢性と胸腺外の末梢組織中でなされる末梢性のものに大別できるが、これは生体が本来備えている免疫監視機能であり、これを有効に活用することで、有害な免疫応答の制御が可能と期待される。成人では胸腺が退縮することを考慮すると、患者においては末梢性免疫寛容機構の破綻が疾患発症に大きく関与している可能性が高いと考えられている。

2. 研究の目的

(1) Dsg3 特異的末梢性免疫寛容機構の同定と解析システムの確立

過去の免疫寛容機構を解析した研究では、ケラチンプロモーターを用いて人工抗原を胸腺に発現させた為に、末梢組織の皮膚でも同抗原が発現していた。しかし末梢組織における免疫寛容の可能性は十分に考慮されずに、胸腺による寛容機構として結果が解釈され、免疫学におけるドグマが形成されてきた。そこで我々は免疫寛容機構の詳細な解析を行うため、胸腺と末梢組織で Dsg3 の発現が異なる実験動物の作出を試みてきた。そのような動物を利用し、Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構を同定し、さらに解析可能な実験系の確立を目指す。

(2) 末梢性免疫寛容を担う細胞集団の同定

Dsg3 特異的な末梢性免疫寛容機構が存在した時に、その機構における抗原特異性は抗原を実際に提示できる抗原提示細胞が重要

な役割を担っていると推察される。そこで、遺伝子改変マウスを利用して、どのような細胞集団が、あるいはどのような種類の抗原提示細胞が末梢性免疫寛容機構に関与しているのかを明らかにしていく。

(3) 末梢免疫寛容に影響を与える重要分子の同定

末梢性免疫寛容機構の維持において、樹状細胞と T 細胞との相互作用は重要なステップである。その分子レベルでの仕組みを明らかにすることができれば、末梢性免疫寛容機構を人為的に調整することが可能となり、免疫寛容機構を逆手にとって、自己免疫疾患克服につながる可能性がある。そこで、我々の実験系を用いて、末梢性免疫寛容機構にとって重要な分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) Dsg3 特異的末梢性免疫寛容機構の同定と解析システムの確立

我々は既に胸腺移植を利用することで、胸腺と末梢組織で Dsg3 の発現が異なる実験動物を作出している。この実験動物は生来胸腺を欠損するヌードマウスの腎被膜下に Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの胸腺を移植して作成(図 1b)する。比較対象として、野生型胸腺移植ヌードマウス(図 1a)と Dsg3<sup>-/-</sup>(図 1c)マウスも利用し、Dsg3 の発現が異なる 3 種類のマウス((a)胸腺+皮膚+, (b)胸腺-皮膚+, (c)胸腺-皮膚-)で Dsg3H1T 細胞の挙動を観察すると、(b)のマウスでは、胸腺では確認される T 細胞が、脾臓で消失する。この現象は末梢性免疫寛容機構の存在を示唆する。この実験動物を十分な匹数作成し、追試する。また、この実験動物では、胸腺の免疫寛容を受けなかった T 細胞が末梢組織で消失することを 1 個体中で確認可能だが、複数の実験系で末梢性免疫寛容機構を確認することを目的として、(c)のようなマウスの末梢に存在する、胸腺でも末梢でも免疫寛容を受けていない Dsg3H1T 細胞を Dsg3 が末梢組織に存在するマウスに養子移入して、同様の現象が見られることを確認する。この養子移入の系では、種々のレシピエントマウスを用いることでより効率的に末梢性免疫寛容機構を解析することが可能となる。

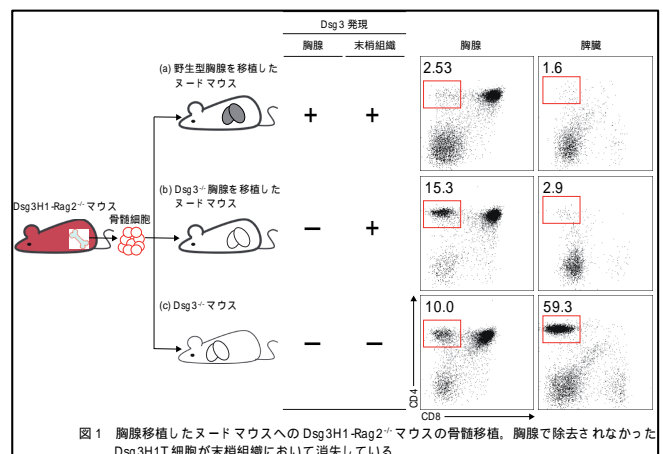


図 1 胸腺移植したヌードマウスへの Dsg3H1-Rag2<sup>-/-</sup>マウスの骨髄移植。胸腺で除去されなかった Dsg3H1T 細胞が末梢組織において消失している。

## (2) 末梢性免疫寛容を担う細胞集団の同定

(1)で確立する養子移入による末梢性免疫寛容機構の同定および解析システムにおいて、種々の操作を加えたレシピエントマウスを用いた際の末梢性免疫寛容機構の破綻の有無を検証する。最初に MHC クラス II<sup>-/-</sup>マウスをレシピエントとして用いることで、MHC クラス II による抗原提示の重要性を確認する。その後、野生型マウスと MHC クラス II<sup>-/-</sup>マウスを相互に骨髄移植し、レシピエントマウスとして用いることで放射線感受性の抗原提示細胞群と放射線耐性の抗原提示細胞群の重要性を検討する。更に、CCR7<sup>-/-</sup>マウス（免疫細胞のリンパ節への遊走に重要なケモカイン受容体 CCR7 を欠失したマウス）や Langerin-ジフテリア毒素受容体（DTR）マウス（ジフテリア毒素の投与によりランゲルハンス細胞および Langerin 陽性樹状細胞を一過性に消失できるマウス）を用いてより詳細に末梢性免疫寛容機構に重要な抗原提示細胞集団を絞り込む。

## (3) 末梢性免疫寛容に影響を与える重要分子の同定

(1)で確立された養子移入の系を応用し、末梢性免疫寛容が機能する過程での Dsg3H1T 細胞の遺伝子発現の変化を RNA-seq を用いて解析し、重要分子の絞り込みを試みる。

## 4. 研究成果

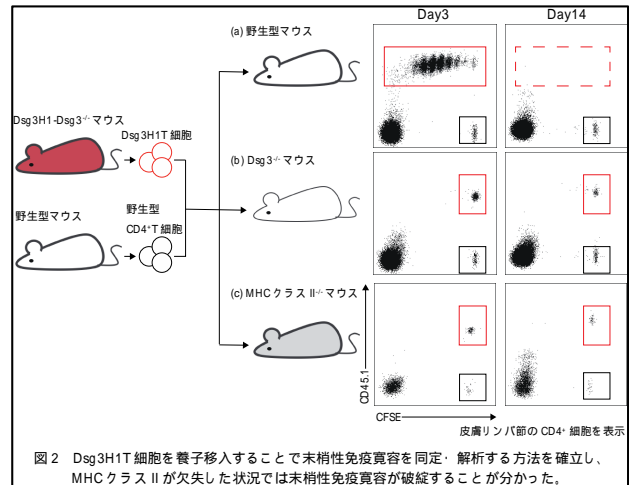
### (1) Dsg3 特異的末梢性免疫寛容機構の同定と解析システムの確立

図 1 と同様の実験を n=7-9 で行った。胸腺で免疫寛容を受けなかった Dsg3H1T 細胞が、(b)のマウスの末梢組織中で、(c)のマウスと比較して減少していることが統計学的有意差をもって示された (P<0.05)。次に養子移入での実験系を確立すべく、Dsg3H1-Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの末梢に存在する Dsg3H1T 細胞を用意し、CFSE で標識した後、野生型マウスおよび Dsg3<sup>-/-</sup>マウスに養子移入した。この際に、CD45.1 or 45.2 のコンジェニックマーカーで移入した Dsg3H1T 細胞を識別すると、Dsg3H1T 細胞は野生型マウス中で移入後 3 日目に分裂が確認された後に、14 日目には消失し(図 2a 赤枠)、同時に移入した野生型 CD4<sup>+</sup>T 細胞は分裂せずに残存した(図 2a)。一方で、Dsg3 の存在しない Dsg3<sup>-/-</sup>マウス中では、Dsg3H1T 細胞は分裂せずに 14 日目でも残存していた(図 2b 黒枠)。この結果から養子移入の系でも、末梢免疫寛容機構を同定および解析可能なことを確認した。

### (2) 末梢性免疫寛容を担う細胞集団の同定

上記の養子移入の系を用いて、Dsg3H1T 細胞を MHC クラス II<sup>-/-</sup>マウスに移入すると、分裂せずに残存した(図 2c)。このことから、末梢性免疫寛容機構には MHC クラス II を介した抗原提示が必要であることが示された。

また、野生型マウスに移入した際に、



FTY720 を連日投与して、Dsg3H1T 細胞を含めたリンパ球の遊走を阻害すると、非投与下では腸管膜リンパ節や脾臓で観察されていた分裂した Dsg3H1T 細胞が、FTY720 投与下では皮膚リンパ節以外では観察されなくなった。更に、Dsg3H1T 細胞を CCR7<sup>-/-</sup>マウスに移入した場合、つまり CCR7 依存性の免疫細胞のリンパ節への遊走が障害された状況では、分裂が著明に抑制され残存した。したがって、Dsg3H1T 細胞への抗原提示は皮膚所属リンパ節で起きており、その抗原提示細胞は CCR7 依存性に遊走していることが示唆された。

次に野生型マウスと MHC クラス II<sup>-/-</sup>マウスを相互に骨髄移植し、放射線感受性の細胞群、放射線耐性の細胞群それぞれが MHC クラス II を欠損する実験動物を作成し、レシピエントマウスとして用いた。その結果、放射線感受性の細胞群が MHC クラス II を欠損する状況では、Dsg3H1T 細胞は分裂も消失もせず、放射線耐性の細胞群が MHC クラス II を欠損する状況では、Dsg3H1T 細胞は分裂した後に残存した。

これらの結果から、末梢性免疫寛容は分裂と消失の過程に分けられること、そして、分裂には CCR7 依存性に皮膚リンパ節に遊走する放射線感受性の抗原提示細胞が、消失には血管あるいはリンパ管内皮細胞などの間葉系細胞を含めた放射線耐性の抗原提示細胞が必要であり、複数の細胞群から末梢性免疫寛容機構が成立していることが分かった。一方で、DTx を投与された Langerin-DTR マウスに移入した場合、つまりランゲルハンス細胞及び Langerin 陽性樹状細胞が一過性に消失した状況下では、野生型マウスと同様に Dsg3H1T 細胞は分裂の後に消失し、ランゲルハンス細胞及び Langerin 陽性樹状細胞の一過性の欠失は末梢性免疫寛容機構に重要でないことが分かった。

### (3) 末梢免疫寛容に影響を与える重要分子の同定

養子移入を利用すると、野生型マウスに移入された後に消失するまでの過程の Dsg3H1T 細胞を経時的に FACS ソートで抽出することが可能である。この抽出された Dsg3H1T 細胞

を用いて、末梢免疫寛容を受けている過程での遺伝子発現の変化を、RNA-seq により解析することを試みた。現在解析中である。

## 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 10 件) 全て査読有り

1. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M: Pemphigus. *Nat Rev Dis Pre*, 2017 (in press).
2. Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, Shiraishi K, Shirakata Y, Stanley JR, Ishiko A: Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. *J Dermatol Sci*, 85 (3), 197-207, 2017.
3. Fujio Y, Kojima K, Hashiguchi M, Wakui M, Murata M, Amagai M, Yamagami J: Validation of chemiluminescent enzyme immunoassay in detection of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid. *J Dermatol Sci*, 85 (3), 208-215, 2017.
4. Okamura A, Nakamura R, Yamagami J, Ishii K, Kawakubo H, Omori T, Takeuchi H, Amagai M, Kitagawa Y: Evaluation of pharyngo-oesophageal involvement in pemphigus vulgaris and its correlation with disease activity. *Br J Dermatol*, 176 (1), 224-226, 2017.
5. 高橋 勇人, 天谷 雅行: 天疱瘡におけるデスマoglein 3 特異的 T 細胞の臓器を越えた病原的役割. *医学のあゆみ*, 259 (2), 159-164, 2016.
6. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, Nagao K: Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med*, 21 (11), 1272-1279, 2015.
7. Saleh MA, Hashimoto R, Kase Y, Amagai M, Yamagami J: Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus. *J Dermatol*, 42 (7), 685-689, 2015.
8. 山上 淳, 天谷 雅行: 天疱瘡: 抗デスマoglein 抗体. *分子リウマチ治療*, 7 (2), 113-116, 2014.
9. 高橋 勇人, 天谷 雅行: デスマoglein 3 特異的 T 細胞によって誘導される多彩な皮膚病理. *実験医学*, 33 (12(増刊)), 1948-1953, 2015.
10. 高橋 勇人, 天谷 雅行: 皮膚疾患における T 細胞の重要な役割. *実験医学*, 32 (17), 2854-2860, 2014.

[学会発表](計 13 件)

1. Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, Stanley JR, Ishiko A: p38MAPK contributes to loss of cell adhesion through

clustering of desmoglein 1 but is not required for blistering in pemphigus foliaceus. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11.

- (仙台国際センター、宮城県仙台市青葉区)
2. Nomura H, Kase Y, Yamagami J, Wada N, Koyasu S, Takahashi H, Amagai M: FcgRIIb is critical to establish clonal ignorance and suppress pemphigus phenotype in pathogenic anti-desmoglein 3 antibody knock-in mice. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (仙台国際センター、宮城県仙台市青葉区)
3. Takahashi H, Nomura H, Iriki H, Mikami Y, Kanno Y, Kubo A, O'shea J, Amagai M: Novel immune regulation by CD4+ T cells via cholesterol 25-hydroxylase pathway. **46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research**, Munich, Germany, 2016. 9. 7- 10.
4. Amagai M: Peripheral tolerance to Dsg3-specific CD4 T cells. **Pathogenesis of Pemphigus and Pemphigoid (PPP) Meeting 2016**, Munich, Germany, 2016. 9. 5- 7.
5. Amagai M: Activities of the research team for rare and intractable skin diseases. **The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Okayama, Japan, 2015. 12. 11-13. (岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市北区)
6. Iriki H, Takahashi H, Wada N, Amagai M: Establishment of thymus transplant model to analyze peripheral T cell tolerance against pemphigus autoantigen, desmoglein 3. **The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, Sapporo, Japan, 2015. 11. 18-20. (札幌コンベンションセンター、北海道札幌市白石区)
7. Amagai M: Cellular autoimmune response in pemphigus. **The 5th Shanghai International Bullous Disease Meeting**, Shanghai, China, 2015. 10. 24-25.
8. Kase Y, Yamagami J, Wada N, Takahashi H, Koyasu S, Amagai M: Intravenous immunoglobulin regulates anti-desmoglein 3 autoantibody production in B220-antibody-producing cells in mice with pemphigus vulgaris. **45th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research**, Rotterdam, The Netherlands, 2015. 9. 9-12.
9. Amagai M: Central and peripheral tolerance to Dsg3-specific CD4 T cells in mice. **Pemphigus Meeting Paris**, France, 2015. 9.7-8.
10. Amagai M: Innovative approaches to immunobullous disease. **95th Annual Meeting of British Association of Dermatologists**, Manchester, UK, 2015. 7. 7-9.
11. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Fukuda K, Ohyama M, Saya H, Yamada T, Amagai M, Nagao K: Skin-infiltrating CD4+ lymphoma cells depend on hair follicle-derived IL-7. **The 39th Annual Meeting of the Japanese Society**

- for **Investigative Dermatology** Osaka, Japan, 2014. 12. 12-14.( ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市)
12. Amagai M: Towards antigen-specific immune suppression in pemphigus **Inflammatory Skin Disease Summit: The Translational Revolution**, Vienna, Austria, 2014. 11. 19-21.
  13. Wada N, Fujii H, Ishikura T, Koseki H, Amagai M, Koyasu S: Tolerance break by immunoglobulin class switch recombination induces pemphigus vulgaris in mice. **The 44th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research**, Copenhagen, Denmark, 2014. 9. 10-13.

〔図書〕(計 3件)

1. 天谷雅行: 抗デスマグレイン 1 抗体 [ 抗 Dsg1 抗体 ], 抗デスマグレイン 3 抗体 [ 抗 Dsg3 抗体 ], 抗 BP180NC16a 抗体, **臨床検査データブック 2017-2018** 医学書院. 総ページ数 1049 (p451-453), 2017.
2. Yamagami J, Takahashi H, Amagai M. Pemphigus. **Immunology of the Skin**. Springer. 総ページ数 504(p405-417). 2016.
3. 天谷雅行: 抗デスマグレイン 1 抗体 [ 抗 Dsg1 抗体 ], 抗デスマグレイン 3 抗体 [ 抗 Dsg3 抗体 ], 抗 BP180NC16a 抗体, **臨床検査データブック 2015-2016** 医学書院. 総ページ数 1112 (p446-448), 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天谷 雅行 (AMAGAI, Masayuki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 90212563

(2) 研究分担者

山上 淳 (YAMAGAMI, Jun)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号: 80327618

(3) 連携研究者

高橋 勇人 (TAKAHASHI, Hayato)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号: 40398615

(4) 研究協力者

なし