

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463023

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた天疱瘡自己抗体病原性の評価法開発

研究課題名(英文) Development of pathogenic activity of pemphigus using transgenic mice

研究代表者

角田 和之(tsunoda, kazuyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60265915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡は粘膜と皮膚に生じる自己免疫性の水疱形成疾患である。尋常性天疱瘡患者は全例で口腔粘膜に水疱を形成する。天疱瘡の病態には自己抗体の病原性が大きく関与しており、自己抗体価と病勢には一定の相関関係が認められることが確認されている。しかし実際の臨床では抗体価と病気の重症度が一致しない症例が数多く存在する。そこで本研究では天疱瘡自己抗体の新たな病原性評価法を開発し臨床応用を目指すことを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus is an autoimmune blistering disease of skin and oral mucosa. The all of patients with pemphigus vulgaris have a blister in oral mucosa. Many of cases, pathogenic activity of the autoantibody correlate with clinical phenotype of the pemphigus, and it is confirmed their correlation. However, there are many cases that severity of clinical phenotype does not correlate with antibody titers. Therefore, we tried to develop a novel system to measure the pathogenic activity of the pemphigus autoantibody in this study.

研究分野：口腔粘膜疾患

キーワード：自己免疫疾患 自己抗体 病原性 天疱瘡 口腔

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は粘膜と皮膚に生じる難治性の自己免疫性水疱形成疾患である。天疱瘡自己抗原蛋白は粘膜皮膚角化細胞間の接着装置で、デスモゾームに存在するデスモグレイン (Dsg) であり、尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris; PV) 抗原が Dsg3、落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus; PF) 抗原が Dsg1 である。天疱瘡はこれら Dsg 蛋白に対する IgG 自己抗体が病原性を発揮することにより発症する疾患であり、これまでに我々は自己抗体の病原性の解析を行ってきた。まず PV 自己抗原を遺伝的に欠損する Dsg3 ノックアウトマウス (Dsg3^{-/-}マウス) は Dsg3 蛋白が発現していない為に、Dsg3 に対する免疫寛容が成立していないという免疫学的特性を利用して PV モデルマウスを作製した (Amagai M, Tsunoda K et al. J clin Invest. 2000)。次に PV モデルマウスより抗 Dsg3 モノクローナル抗体を複数単離し、PV 自己抗体の認識するエピトープが病原性に関与する事を明らかにした (Tsunoda K et al: J Immunol. 2003)。さらにモノクローナル抗体の特性を応用し、・天疱瘡自己抗体の量、・アフィニティ、・抗体の internalization、・免疫グロブリンクラスなどの因子が病原性に関与している事を明らかにしてきた (Kawasaki H, Tsunoda K et al. J Invest Dermatol. 2006. Calkins CC, Tsunoda K et al. J Biol Chem. 2006. Tsunoda K et al. Am J Pathol. 2011)。一方で実際の臨床においては PV の診断と治療において重要な指標としては、一般的に抗体価が重要視されている。保険収載され頻用されている組み換え Dsg 蛋白を抗原とした ELISA 法は、抗 Dsg 抗体価の測定が可能であり、天疱瘡の診断のみならず抗体価と病勢が相関するために治療においても有用なツールである事が確認されている。しかし実際の臨床では ELISA 法で「抗体価が低いにもかかわらず非常に重症な症例」や、逆に「抗体価が高いにもかかわらず軽症な症例」がしばしば見られ、抗体価と臨床的重症度の乖離現象が見受けられる。この現象は ELISA 法では抗体の量を評価することは可能であるが、抗体の質 (病原性) を評価することが困難であることに起因すると考えられた。そこで我々は正常ヒト皮膚初代培養角化細胞を用いた in vitro dissociation assay を開発し、患者血清中における抗 Dsg3 抗体の病原性を定量化することに成功した (Ishii K et al: J invest dermatol. 2005)。これは正常ヒト皮膚より角化細胞を単離し、その初代培養細胞シートに PV 患者血清を反応させ、機械的ストレス (ピペッティング) を加えた後に断片数をカウントし定量化する手法である。しかし本法では正常ヒト皮膚を採取し、培養する必要があり細胞の入手が容易ではないという難点も挙げられる。またこれまでに粘膜皮膚型 PV でも検出される、抗 Dsg1 抗体の病原性を定量化する方法は無かった。そこで、本研究ではこれらの問題を解決する

事を目標とした。

2. 研究の目的

天疱瘡の病態には自己抗体の病原性が大きく関与しており、自己抗体価と病勢には一定の相関関係が認められることが確認されている。本研究では実臨床において応用が可能な天疱瘡自己抗体の新たな病原性評価法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1. Dsg3^{-/-}マウスおよび Dsg3^{+/-}マウスを交配する事により、Dsg3^{-/-}マウス、Dsg3^{+/-}マウス、および Dsg3^{+/+}マウスが得られる。マウス皮膚よりの角化細胞単離には被毛を有さない新生仔マウス皮膚が適しているものと考えられた。そこで交配した新生仔マウスの尾を断尾し、genotyping を行い実験に使用可能なマウスの選別を行った。

2. ヒトおよびマウス組換え Dsg 蛋白にて ELISA プレートを作製し、PV 患者血清中の抗 Dsg 抗体価を測定した。

各臨床表現型と抗体価の相関に関してグループ分けを行い、マウス組み換え Dsg 蛋白を抗原とした ELISA 法を用いて PV 患者血清中の抗 Dsg3 抗および抗 Dsg1 抗体のマウス Dsg 蛋白との交差反応性を確認し抗体 (血清) を選別した。

3. 抗体解析を実施した血清を用いて、従来法の正常ヒト皮膚角化細胞を用いた In vitro dissociation assay を実施した。

4. Dsg3^{-/-}および Dsg3^{+/+}新生仔マウス皮膚よりの表皮角化細胞単離と保存法を確立し、同時に各 Dsg アイソフォーム及び接着装置関連蛋白の発現を確認した。

5. マウス初代培養角化細胞シートの作製と in vitro dissociation assay 法の確立培養における諸条件を検討した。

6. マウス角化細胞を用いた in vitro dissociation assay により、予め解析を行った天疱瘡患者血清を用いて病原性解析を実施。マウス Dsg3 と交差反応性を有する天疱瘡患者血清 (粘膜優位型 PV および粘膜皮膚型 PV) を対象として実施した。同じ血清を用いて実施した正常ヒト皮膚角化細胞を用いた In vitro dissociation assay の結果と比較し有用性を検討した。さらに Dsg3^{-/-}マウス初代培養表皮角化シートを用いた In vitro dissociation assay にてマウス Dsg1 と交差反応性を有する天疱瘡患者血清 (PF および粘膜皮膚型 PV) を用いて病原性を検討した。

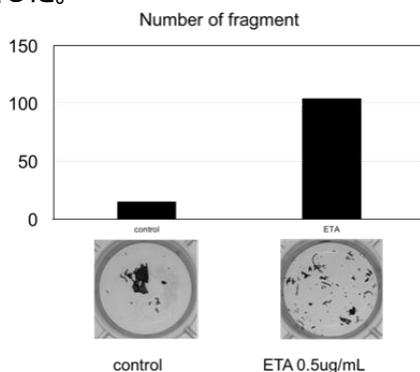
4. 研究成果

1. 本実験の実施に際しては Dsg3 を発現しないマウスの安定した供給と使用が必須であった。そのため Dsg3^{-/-}と比較してさらに安定した供給が可能である Dsg 3 を発現しないマウス (K5-Dsg1-Dsg3^{-/-}; Hata et al. J Dermatol Sci. 63(1): 2011) を使用した。

2. Dsg 組換えタンパクを用いた ELISA プレートにて PV 患者血清中の抗 Dsg 抗体価を測定し、各臨床表現型における「抗体価と臨床症状が相関する群」と「抗体価と臨床症状が相関せずに乖離する群」にグループ分けを行った（各 5 例抽出）。

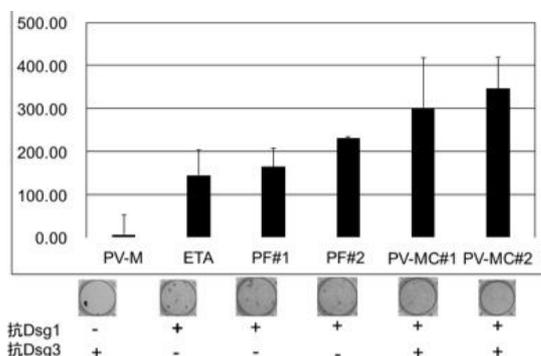
マウス組み換え Dsg 蛋白を抗原とした ELISA 法を用いて PV 患者血清中の抗 Dsg3 抗および抗 Dsg1 抗体のマウス Dsg 蛋白との交差反応性を確認し抗体（血清）を選別した。

3. K5-Dsg1-Dsg3^{-/-}新生仔マウス初代培養角化細胞シートの作製と in vitro dissociation assay 法の確立培養における諸条件（初代培養時の培養液、サプリメント、細胞数、カルシウム濃度、培養時間）を検討し至適条件を確立した。



（図 1）K5-Dsg1-Dsg3^{-/-}新生仔マウス皮膚を用いた in vitro dissociation assay。左：健常人血清、右：陽性コントロールに使用した ETA を反応させたウェルでは細胞断片を多数認める。

4. K5-Dsg1-Dsg3^{-/-}新生仔マウス初代培養角化細胞シートを用いた in vitro dissociation のでは抗 Dsg3 抗体のみを有する粘膜優位型天疱瘡（PV-M）血清に比較して、Dsg 1 を特異的に消化する ETA、抗 Dsg1 抗体のみを有する落葉状患者血清（PF）抗 Dsg1 抗体および抗 Dsg3 抗体を有する粘膜皮膚型天疱瘡（PV-MC）血清では断片数が多かった（図 2）。



（図 2）K5-Dsg1-Dsg3^{-/-}新生仔マウス初代培養角化細胞シートを用いた in vitro dissociation の結果。縦軸に細胞断片数を示す。PV-M：粘膜優位型天疱瘡血清、PF：落葉状

天疱瘡血清、PV-MC:粘膜皮膚型天疱瘡血清。

本研究により、これまでに測定が困難であった抗 Dsg 1 自己抗体の病原性定量化が可能になった。今後、抗 Dsg 抗体を有する様々な自己免疫性水疱症の自己抗体病原性解析への応用が期待される。

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 6 件)

1. Morita M, Asoda S, Tsunoda K, Soma T, Nakagawa T, Shirakawa M, et al. The onset risk of carcinoma in patients continuing tacrolimus topical treatment for oral lichen planus: a case report. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 査読有り,2017;105(2):262-6. DOI: 10.1007/s10266-016-0255-4

2. 加藤伸, 榎田洋平, 佐藤英和, 清水博之, 藤田康平, 遠藤友樹, 中川種昭, 角田和之. 小唾液腺腫脹を伴った IgG4 関連涙腺・唾液腺炎の 1 例. *日本口腔内科学会雑誌*. 査読有り, 2016;22(2):89-94.

URL,DOI: 提出時点で記載無し

3. Ikeura K, Kawakita T, Tsunoda K, Nakagawa T, Tsubota K. Characterization of Long-Term Cultured Murine Submandibular Gland Epithelial Cells. *PloS one*. 査読有り, 2016;11(1):e0147407.

DOI: 10.1371/journal.pone.0147407

4. 角田和之, 中川種昭. 糖尿病と口腔ケア. *日本医師会雑誌*. 査読有り,2015 2015. 06:501-5.

URL,DOI: 提出時点で記載無し

5. 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).

URL,DOI 提出時点で記載無し

6. 池浦一裕, 藤田康平, 加藤伸, 小高利絵, 佐藤英和, 西須大徳, 角田和之, 小澤夏生, 永井哲夫, 川北哲也, 中川種昭, 角田和之. ピロカルピン塩酸塩内服に伴う多汗症状に対する漢方薬の臨床効果. *日本口腔内科学会雑誌*. 査読有り, 2014;20(1):1-7.

URL,DOI: 提出時点で記載無し

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 永井利樹, 遠藤友樹, 佐藤英和, 藤田康平, 池浦一裕, 加藤伸, 角田和之,

中川種昭. 舌に発症したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の 1 例. 第 26 回 日本有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2017. 3. 4 - 5; 石川県・金沢市・金沢歌劇座。(口頭発表)

2. 佐藤英和, 池浦一裕, 潮田裕梨, 藤田康平, 西須大徳, 加藤伸, 加藤淳, 森毅彦, 角田

和之, 中川種昭. 当院における造血幹細胞移植前の口腔機能管理の有効性に関する後方視的検討. 日本がん口腔支持療法学会第2回学術大会; 2016. 12. 17 - 18; 静岡県・静岡市・静岡県立がんセンター. (口頭発表)

3. 森毅彦, 佐藤英和, 角田和之, 櫻井政寿, 加藤淳. 造血幹細胞移植治療と口腔合併症(移植後早期)について. 日本がん口腔支持療法学会第2回学術大会; 2016. 12. 17 - 18; 静岡県・静岡市・静岡県立がんセンター. (口頭発表)

4. 菊池拓, 森毅彦, 佐藤英和, 清水隆之, 甲田祐也, 安部淳平, 角田和之, 岡本真一郎. 放射線照射後に粘膜病変を伴った濾胞性リンパ腫関連腫瘍随伴性天疱瘡の一例. 日本がん口腔支持療法学会第2回学術大会; 2016. 12. 17 - 18; 静岡県・静岡市・静岡県立がんセンター. (ポスター発表)

5. 奥原優美, 井原雄一郎, 角田和之, 中川種昭. 尋常性天疱瘡を伴う広汎型重度慢性歯周炎の患者に対し歯周治療を行った症例. 第59回秋季日本歯周病学会学術大会; 2016. 10. 7 - 8; 新潟県・新潟市・朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター. (ポスター発表)

6. 柴田有紀子, 藤田康平, 加藤伸, 奥積佑太, 石井秀太郎, 久保亮治, 清水篤, 石河晃, 中川種昭, 角田和之. 口腔に発症した白色海綿状母斑の臨床的検討. 第26回日本口腔内科学会第29回日本口腔診断学会合同学術大会; 2016. 9. 23 - 24; 岡山県・岡山市・さん太ホール, さん太ギャラリー, 山陽新聞本社ビル9階大会議室. (口頭発表)

7. 佐藤聡, 池浦一裕, 佐藤英和, 潮田裕梨, 西須大徳, 山上淳, 中川種昭, 角田和之. 尋常性天疱瘡の臨床症状に関する臨床的検討. 第26回日本口腔内科学会第29回日本口腔診断学会合同学術大会; 2016. 9. 23 - 24; 岡山県・岡山市・さん太ホール, さん太ギャラリー, 山陽新聞本社ビル9階大会議室. (口頭発表)

8. 小澤夏生, 藤田康平, 佐藤英和, 加藤伸, 角田和之, 角田博之, 永井哲夫, 中川種昭. 精神心理的側面を留意した再発性アフタの漢方治療. 第31回日本歯科心身医学会総会・学術大会; 2016. 7. 23 - 24; 岩手県・岩手・岩手県歯科医師会館・岩手医科大学. (口頭発表)

9. 藤田康平, 小澤夏生, 佐藤英和, 海住直樹, 池浦一裕, 角田和之, 角田博之, 永井哲夫, 中川種昭. 漢方及び食事指導により改善をみた再発性アフタの1例. 第67回日本東洋医学会学術総会; 2016. 6. 3 - 5; 香川県・高松・サンポートホール高松, JR ホテルクレメント高松. (口頭発表)

10. 佐藤英和, 小澤夏生, 海住直樹, 池浦一裕, 藤田康平, 角田和之, 角田博之, 永井哲夫, 中川種昭. 唾液分泌低下および口唇の異常感を伴った患者に対する白虎加人参湯の使用経験. 第67回日本東洋医学会学術総会; 2016. 6. 3 - 5; 香川県・高松市・サンポートホール高松, JR ホテルクレメント高松

. (口頭発表)

11. 小澤夏生, 佐藤英和, 海住直樹, 池浦一裕, 藤田康平, 角田和之, 角田博之, 永井哲夫, 中川種昭. 唾液分泌低下および口唇の異常感を伴った患者に対する白虎加人参湯の使用経験. 第67回日本東洋医学会学術総会; 2016. 6. 3 - 5; 香川県・高松市・サンポートホール高松, JR ホテルクレメント高松. (口頭発表)

12. 池浦一裕, 角田和之, 中川種昭. マウス顎下腺由来上皮細胞株樹立と増殖性細胞の特性解析に関する研究. 第70回日本口腔科学会学術集会; 2016. 4. 16 - 4. 17 福岡県・福岡市・福岡国際会議場. (口頭発表)

13. 清水博之, 藤田康平, 加藤伸, 佐藤英和, 池浦一裕, 潮田裕梨, 石井秀太, 角田和之, 中川種昭. 当科を受診したIgG4関連涙腺唾液腺炎患者の臨床的検討. 第25回有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2016. 3. 5 - 6; 東京都・東京・タワーホール船堀. (口頭発表)

14. 海住直樹, 笠崎真悟, 角田和之, 中川種昭, von Willebrand病2B型患者の抜歯経験. 第25回有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2016. 3. 5 - 6; 東京都・東京・タワーホール船堀. (口頭発表)

15. 入来景悟, 船越建, 内田理美, 天谷雅行, 角田和之, 此枝生恵, 谷川瑛子. 粘膜類天疱瘡との鑑別を要した嘔声を伴うBehçet病の1例. 第39回皮膚脈管・膠原病研究会; 2016. 1. 22 - 23; 高知県・高知市・高知市文化プラザかるぼーと. (口頭発表)

16. 潮田裕梨, 加藤伸, 角田和之, 舟山一成, 中川種昭, 河奈裕正. 皮膚水疱形成を伴った粘膜優位型尋常性天疱瘡の1例. 第200回日本口腔外科学会関東支部学術集会; 2015. 12. 19; 東京都・東京・東京大学. (口頭発表)

17. 池浦一裕, 川北哲也, 角田和之, 坪田一男, 中川種昭. 唾液腺再生を目的とした野生型マウス由来唾液腺上皮細胞株樹立に関する研究. 第25回日本口腔内科学会学術集会; 2015. 9. 18 - 19; 大阪府・大阪市・大阪大学. (口頭発表)

18. 藤田康平, 佐藤英和, 加藤伸, 西須大徳, 池浦一裕, 潮田裕梨, 石井秀太郎, 角田博之, 天谷雅行, 中川種昭, 角田和之. 当科を受診した腫瘍随伴性天疱瘡症例の臨床的検討. 第25回日本口腔内科学会学術集会; 2015. 9. 18 - 19; 大阪府・大阪市・大阪大学. (口頭発表)

19. 小澤夏生, 藤田康平, 佐藤英和, 加藤伸, 角田和之, 角田博之, 中川種昭, 永井哲夫. 甘麦大棗湯が有効であった口腔異常感症の一症例. 第30回日本歯科心身医学会総会・学術大会; 2015. 7. 18 - 19; 東京都・東京・東京医科歯科大学. (口頭発表)

20. 佐藤英和, 小澤夏生, 池浦一裕, 藤田康平, 角田和之, 角田博之, 永井哲夫, 中川種昭. 長期経過の再発性アフタに茵陈蒿湯が奏功した、腎陰虚証の1例. 第66回日本東洋医学会学術総会; 2015. 6. 12 - 13; 富山県・富山市・富山国際会議場, 富山市民プラザ, ANA

クラウンプラザホテル富山。(口頭発表)

21. 池浦一裕, 川北哲也, 角田和之, 坪田一男, 中川種昭. 野生型マウス顎下腺由来細胞株樹立と増殖性細胞の特性解析. 第 15 回日本抗加齢学会総会; 2015. 05.29 - 31; 福岡県・福岡市・福岡国際会議場。(口頭発表)

22. 池浦一裕, 川北哲也, 角田和之, 坪田一男, 中川種昭. 野生型マウス顎下腺由来細胞株樹立と増殖性細胞の特性解析. 第 69 回日本口腔科学会学術集会; 2015.5.13 - 15; 大阪府・大阪市・大阪国際会議場。(口頭発表)

23. 矢島祥助, 加藤伸, 森川暁, 池浦一裕, 藤田康平, 西須大徳, 佐藤英和, 角田和之, 中川種昭. 当科を受診した HIV 感染症患者の臨床的検討. 第 24 回有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2015.3.20 - 22; 北海道・旭川市・旭川市大雪クリスタルホール。(ポスター発表)

24. 古澤春佳, 佐藤英和, 石井秀太郎, 池浦一裕, 西須大徳, 藤田康平, 加藤伸, 角田和之, 中川種昭. 頬粘膜に発症したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の 1 例. 第 24 回有病者歯科医療学会総会・学術大会; 2015.3.20 - 22; 北海道・旭川・旭川市大雪クリスタルホール。(口頭発表)

25. 向井美穂, 足立剛也, 川島裕平, 山上淳, 和田直子, 角田和之, 海老原全, 天谷雅行. 咀嚼・含嗽様式により難治性びらんを呈した尋常性天疱瘡の一例. 第 859 回日本皮膚科学会東京地方会(城西地区); 2015.1.17; 東京都・東京・京王プラザホテル。(口頭発表)

26. 椎葉勇介, 佐藤英和, 福田仁, 加藤伸, 西須大徳, 池浦一裕, 角田博之, 加藤淳, 森毅彦, 中川種昭, 角田和之. 当科における造血幹細胞移植前後の口腔機能管理プロトコール作成に向けて: 第 1 報 造血幹細胞移植前の歯性病巣感染の検討. 第 24 回日本口腔内科学会学術集会; 2014. 9. 19 - 9. 20; 福岡県・福岡市・九州大学。(口頭発表)

27. 宮下達郎, 加藤伸, 小高利絵, 藤田康平, 山上淳, 中川種昭, 角田和之. Lichen planus pemphigoides の一例. 第 24 回日本口腔内科学会学術集会; 2014. 9. 19 - 9. 20; 福岡県・福岡市・九州大学。(口頭発表)

28. 佐藤英和, 小澤夏生, 池浦一裕, 藤田康平, 角田和之, 角田博之, 中川種昭, 永井哲夫. 茵陳蒿湯が奏功した再発性アフタの 1 例. 第 65 回日本東洋医学会学術総会; 2014. 6. 27-28; 東京都・東京・東京国際フォーラム。(口頭発表)

29. 小澤夏生, 永井哲夫, 佐藤英和, 藤田康平, 角田和之, 角田博之, 中川種昭, 永井哲夫. 再発性アフタと心身一如. 第 65 回日本東洋医学会学術総会; 2014. 6. 27 - 28; 東京都・東京・東京国際フォーラム。(口頭発表)

30. 池浦一裕, 藤田康平, 佐藤英和, 角田和之, 川北哲也, 坪田一男, 中川種昭. ピロカルピン塩酸塩内服に伴う多汗症状に対する漢方薬の臨床効果. 第 14 回日本抗加齢学会総会; 2014. 6.6 - 8; 大阪府・大阪市・大阪国際

会議場。(口頭発表)

31. 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 - 16; 福岡県・福岡・福岡国際会議場。(口頭発表)

〔図書〕(計 1 件)

1. 角田和之, 池浦一裕: (分担執筆) 薬 '17/'18 歯科 疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本. 線維索性唾液管炎(クスマウル病). クインテッセンス出版. 2016, 68-69

〔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・専任講師
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

(4)研究協力者

小高 利絵 (KODAKA, Rie)
藤田 康平 (FUJITA, Kohei)