

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791097

研究課題名(和文)

レトロウイルスベクターを用いた自己免疫性水疱症の病態解明

研究課題名(英文)

The analysis of pathophysiology of autoimmune bullous diseases by using retrovirus vector

研究代表者

河野 通良 (KOHNO MICHIOYOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30403182

研究成果の概要(和文):

尋常性天疱瘡(PV)は表皮細胞間接着分子であるデスモグレイン3(Dsg3)に対する自己抗体により誘導される自己免疫疾患である。これまでに樹立したDsg3反応性T細胞クローンから単離したT細胞受容体(TCR)鎖、鎖をレトロウイルスベクターによりマウスのCD4(+)Tリンパ球に導入し、*in vivo*での反応を調べたところ、PVの表現型とは全く異なる、表皮へのリンパ球浸潤を伴う皮膚炎(interface dermatitis)が誘導された。

研究成果の概要(英文):

Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune bullous disease with circulating IgG autoantibodies against desmogleins (Dsg). We recently established Dsg3-specific T cell clones that induced PV phenotype and isolated cDNA clones of their T cell receptors (TCR). Herein, we retrovirally transduced wild type CD4⁺ T cells with these TCR cDNAs (rvDsg3 T cells) to clarify their pathogenic roles for antigen-specific autoimmune processes in skin. When rvDsg3 T cells were transferred with Dsg3^{-/-} B cells into Rag2^{-/-} mice, the recipient mice neither showed clinical PV phenotype, anti-Dsg3 IgG production, nor histological evidence for acantholysis, but instead developed scaly and erythematous skin lesions. Histology revealed interface dermatitis only in skin, mucous membranes and esophagus, where Dsg3 was expressed.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：自己免疫、T細胞受容体、皮膚炎、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

尋常性天疱瘡(PV)は表皮細胞間接着分子であるデスモグレイン3(Dsg3)に対する自己抗体により誘導される自己免疫疾患であり、全身の皮膚および粘膜のびらん、水疱形成を

きたす重篤な疾患である。これまでに当研究室ではPV自己抗原であるDsg3を欠失したマウス(Dsg3^{-/-}マウス)の脾細胞をDsg3を発現する免疫不全Rag2^{-/-}マウスに移植することにより、抗Dsg3IgG抗体産生、水疱、びら

んの形成など PV の表現型が誘導されるモデルマウスを作製し、本疾患の病態解明を行ってきた。さらに近年、このモデルマウスから *in vivo* で抗 Dsg3 抗体産生と PV の表現型を誘導できる複数の Dsg3 反応性 T 細胞クローンを樹立し (Takahashi H *et al*, J Immunol. 2008) そこから T 細胞受容体 (TCR) 鎖、鎖の cDNA を単離することに成功している。これらの TCR 鎖、鎖をレトロウイルスベクターにより野生型 C57BL/6 マウスの CD4(+)T リンパ球に導入したところ、その発現が確認された。また、*in vitro* の実験系において抗原特異性と、MHC classII 拘束性を示した。本研究では、この TCR 鎖、鎖を導入することにより再構築した自己反応性 T 細胞を *in vivo* の実験系において解析した。

2. 研究の目的

これまでに樹立された Dsg3 反応性 T 細胞クローンの解析により、単一の T 細胞クローンによって疾患が規定されうことは解明された。しかし、その自己反応性 T 細胞クローン由来の TCR 鎖、鎖のみで疾患が規定されうかどうかについてはいまだ分かっていない。本研究では Dsg3 反応性 TCR 鎖、鎖遺伝子を野生型マウスリンパ球にウイルスベクターを用いて導入し、PV の表現型を再現することができるか検討した。さらに、内在性の自己抗原に特異的な T 細胞受容体遺伝子によって反応性を規定された T 細胞の皮膚での免疫応答について検討した。

3. 研究の方法

Dsg3 に対する抗原特異性を有した 2 種類の T 細胞クローンから得られた TCR 鎖、鎖遺伝子を、それぞれレトロウイルスベクターを用いて、野生型 C57BL/6 マウスの T 細胞に導入し、それぞれを TCR-H, TCR-M と名付けた。*in vitro* における抗原特異性が確認された 2 種類の遺伝子導入 T 細胞を、免疫不全 Rag2^{-/-} マウスに経静脈投与し、皮膚における表現型の解析を行った。さらに、サイトカインとの相関について調べるために、これらの TCR を導入した IFN- γ , IL-17 欠損 T 細胞をマウスに経静脈投与し、表現型の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) Dsg3 に対する抗原特異性を有した 2 種類の TCR 遺伝子導入 T 細胞 TCR-H, TCR-M の *in vivo* での免疫反応を調べるため、これらの TCR 遺伝子導入 T 細胞を、免疫不全 Rag2^{-/-} マウスに対して経静脈投与したところ、いずれにおいても抗 Dsg3 抗体産生と PV の表現型は認められなかったが、投与 4 週間後から耳、顔面、足底、尾部に鱗屑、痂皮を付着した湿疹、皮膚炎様の皮疹が認められた (図 1A)。皮疹部の組織解析の結果、真皮および表皮内へのリンパ球浸潤、表皮基底細胞の空胞変性、液状変性、表皮肥厚を認め、interface dermatitis の組織像を呈していた。(図 1B)。

Dsg3 反応性 T 細胞を移入したマウスの各組織を調べたところ、Dsg3 を発現している口蓋上皮、食道上皮、皮膚において上皮組織内へのリンパ球浸潤を認め、Dsg3 を発現していない小腸、大腸、肝臓では認められなかった (図 2)。以上の結果から 2 つの異なる Dsg3 特異的 TCR 導入によって、抗原特異的な細胞浸潤を誘導し得ることが確認された。

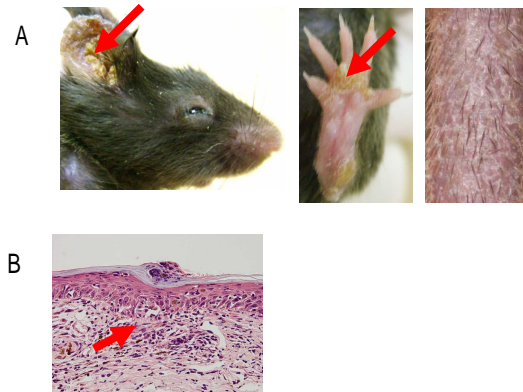


図 1 TCR 導入 T 細胞による皮膚炎の誘導

A : TCR 導入 T 細胞を移入したマウスの耳介、足底、尾部において落屑、痂皮を伴う皮疹を認めた (矢印)

B : 尾部の組織 H.E 染色像において表皮内へのリンパ球浸潤と表皮基底細胞の空胞変性、液状変性を認めた (矢印)

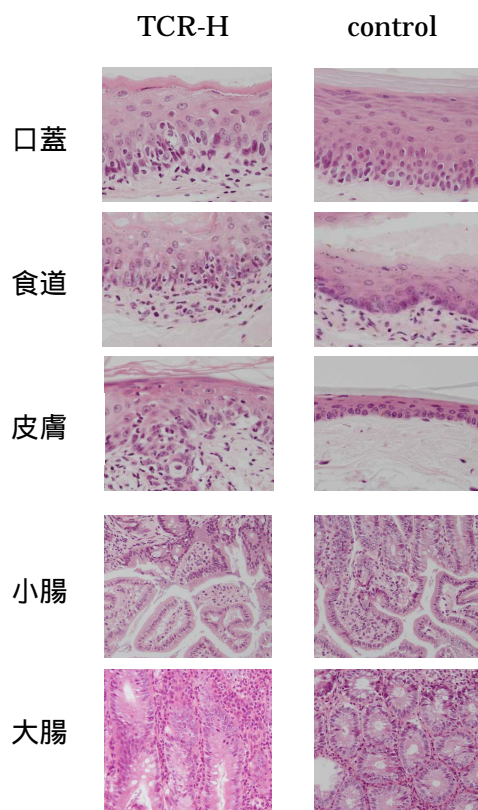


図 2 TCR 導入 T 細胞による抗原特異的な細胞浸潤の誘導

Dsg3 を発現している口蓋、食道、皮膚において TCR 導入 T 細胞を移入したマウスでは上皮内へのリンパ球浸潤が認められた。Dsg3 を発現していない小腸、大腸、においては上皮内へのリンパ球浸潤は認められなかった。いずれの組織においても、コントロールの GFP 導入 T 細胞を移入したマウスでは細胞浸潤は見られなかった。

(2) TCR 遺伝子導入 T 細胞を移入したマウスの皮膚、頸部リンパ節からリンパ球を採取して、それらのサイトカイン産生を FACS にて解析したところ、IFN- γ 産生細胞が多く認められた(図 3)。誘導された皮膚炎と炎症性サイトカイン IFN- γ 、IL-17 との関連を調べるため、これらの TCR を IFN- γ 、IL-17 欠損 T 細胞に導入して、免疫不全 Rag2^{-/-} マウスに対して経静脈投与したところ、IFN- γ 欠損 T 細胞では皮膚炎が誘導されなかった(図 4)。

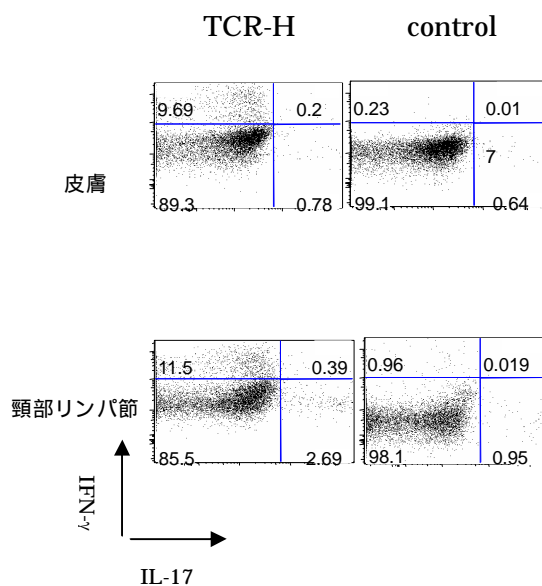


図 3 TCR 導入 T 細胞を移入したマウスの皮膚、頸部リンパ節でのリンパ球のサイトカイン産生

コントロールの野生型マウスと比較して TCR 導入 T 細胞を移入したマウスの皮膚、頸部リンパ節には IFN- γ 産生細胞が多く認められた。

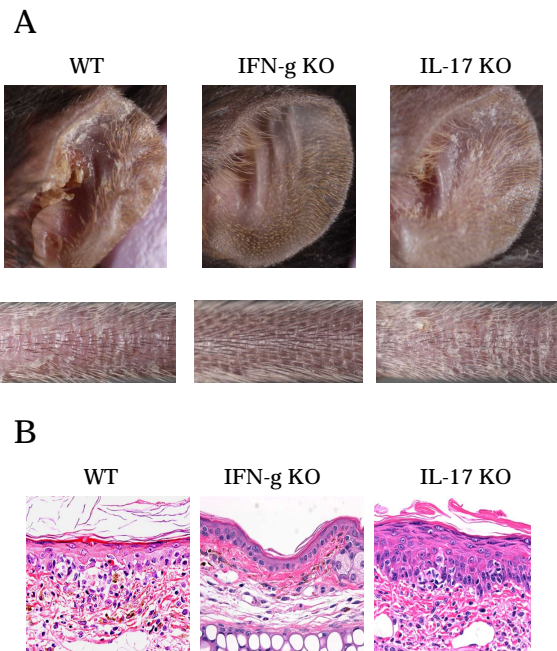


図 4 サイトカインを欠損させた TCR 導入 T 細胞による表現型の変化

A: TCR を導入した IFN- γ 欠損 T 細胞を移入したマウスの耳介、尾部においては落屑、痂皮を伴う皮疹が認められなかった(図、中央)。

B: TCR を導入した IFN- γ 欠損 T 細胞を移入したマウス尾部の組織 H.E 染色像において炎症所見は認められなかった(図、中央)。

以上の結果から、Dsg3 反応性を規定する TCR を導入した T 細胞が抗原特異的な、IFN- γ 依存性の細胞性免疫による皮膚炎を誘導することがわかった。

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 4 件)

1. M Kouno, H Takahashi, T Yamada, K Nagao, M Amagai; Desmoglein 3-specific T cells induce Experimental Autoimmune Dermatitis (EAD), a novel model for interface dermatitis; 40th annual ESDR meeting, Helsinki, Finland, 2010 年, 9 月. 8-10 日
2. M Kouno, H Takahashi, T Yamada, K Nagao, M Amagai; Induction of autoreactive dermatitis by T cells with retrovirally modified T cell receptor specificity to desmoglein 3; 70th annual SID meeting,

Atlanta, USA, 2010年, 5月. 5-8日

3. M Kouno, H Takahashi, T Yamada, M Amagai ; Retroviral-mediated expression of desmoglein 3-specific T cell receptor induces cellular immune response to the skin and mucous membranes ; 日本研究皮膚科学会第 34 回年次学術大会、総会、福岡、2009年、12月 4-5日

4. 河野通良、高橋勇人、山田健人、天谷雅行 ; レトロウィルスベクターを用いてデスモグレイン3反応性T細胞受容体遺伝子を導入した CD4 陽性 T 細胞による interface dermatitis の誘導 ; 第 16 回分子皮膚科学フォーラム、札幌、2009年、11月. 20-21日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

河野 通良 (KOHNO MICHIOYOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 30403182

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし