

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790801
 研究課題名（和文） デスマグレイン 3 反応性 T 細胞の病原性規定因子の同定とその阻害療法の検討
 研究課題名（英文） Identification of pathogenicity determining factors of desmoglein3-reactive T cells and evaluation of its blockade therapy.
 研究代表者
 高橋 勇人（TAKAHASHI HAYATO）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：40398615

研究成果の概要：

尋常性天疱瘡(PV)において病態と関連する抗デスマグレイン 3(Dsg3)抗体の産生には Dsg3 を認識する自己反応性 T 細胞の関与が推測されている。そこで、PV モデルマウスを利用し、Dsg3 反応性 T 細胞の特性を解析した。まず Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立し、この T 細胞株の中には PV を誘導できる病原性の有る株と無い株が存在することを明らかにした。さらにこの病原性にとって IL-4 が重要な分子であり、IL-4 を阻害することにより PV 発現型が抑制されることを示した。以上より IL-4 を標的とする新規治療法の可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：天疱瘡

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マグレイン 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。B 細胞からの自己抗体産生には、自己抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞からのヘルパー活性が不可欠とされるが、Dsg3 反応性 T 細胞が抗 Dsg3 抗体産生を介して天疱瘡の病態を誘導する病原性を規定している要因は明らかでなかった。そこで、本研究を通じてこの要因を明らかにすることにより PV の新規治療標的を同定するこ

とを考えた。

2. 研究の目的

近年、申請者らは Dsg3^{-/-}マウスから Dsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立し、これを Dsg3^{-/-}マウス脾臓由来 B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスに移植することにより、天疱瘡病変を誘導できることを示した。この *in vivo* における T 細胞の病原性スクリーニング法の確立により、Dsg3 反応性 T 細胞株の中には天疱瘡病変を誘導できないものも含まれていることを明らかにした。そこで、本研究では病原性を有した Dsg3 反応性 T 細胞株と病原性を

有さなかつたT細胞株を比較することにより、病原性を有する Dsg3 反応性 T 細胞に特徴的な因子を抽出し、それらを標的とした新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1)リコンビナントマウス(rm)Dsg3の作成

2つの発現系でリコンビナントマウスDsg3を作成した。バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞の培養系でmDsg3の細胞外ドメインとE-tag、His-tagとの融合タンパク(rmDsg3)を発現、精製した。高純度の抗原を得るため、His-tagとE-tagのアフィニティーによる精製を段階的に行った。また、大腸菌の発現系を用いてDsg3細胞外領域を10個以上のアミノ酸を重複した5つのmDsg3断片(rmDsg3-1~rmDsg3-5)に分割し、maltose binding protein (MBP)との融合タンパクとして発現、精製した。それぞれの精製リコンビナント蛋白の純度はSDSポリアクリルアミド電気泳動後のクマシーブルー染色により評価した。

(2)mDsg3反応性T細胞のクローニング

CFAで乳化した10mgのrmDsg3をDsg3^{-/-}マウスの両足底に免疫した。1週間後に膝窩リンパ節と脾臓を摘出し、RPMI-1640内ですりつぶした。脾臓はACK lysing buffer (BioWhittaker, Walkersville, ND)を用いて溶血処理を行い、単核球を調製した。培地として1%のC56BL/6由来血清を添加したRPMI-1640を初回刺激時に用い、以後は10%FBS添加RPMI-1640を用いた。まずDay0に単核球(3 x 10⁶ cell/well)を24穴平底プレートにまき、5 mg/mlの抗原rmDsg3-1~5を加えた。Day10に凍結保存しておいた自己の脾細胞(10⁶ cell/well)にX線照射(40Gy)し、mDsg3-1~5(各5 mg/ml)とともに培養中に加えた。サイトカインとしてDay3, 7, 10, 14, 17, に1, 2, 5%T-STIM™ (Becton Dickinson, Bedford, MA)を加えた。Day21に抗原特異的増殖反応を検討し、特異的な反応を示した株のみを限界希釈法に用いた。T細胞株は3~4日ごとのサイトカインの添加と10~14日ごとの抗原刺激により維持した。

(3)TCRVb遺伝子再構成の検出と各種サイトカインおよびケモカイン受容体遺伝子発現の解析

T細胞株をPMA(25 ng/ml)とイオノマイシン(1 mg/ml)存在下で3日間培養後、CD4およびCD8 Dynabeads (DynaL biotech, Oslo, Norway)を用いてT細胞を回収した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA)を用いてtotal RNAを抽出し、AMV RTase XL(TAKARA, Japan)存在下でcDNAを合成し、以下のPCR

に用いた。TCRVb遺伝子再構成の検出には23種のTCRVb遺伝子特異的な5'側プライマーと共通するTCRCb遺伝子に対応する3'側プライマーを用いたfamily PCRを行った。さらにPCR産物の塩基配列を3100 Genetic Analyzer(ABI PRISM)を用いて同定した。各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β)およびケモカイン受容体(CCR7, CCR4, CXCR5, CRTH2, CXCR3)の発現は特異的なプライマーを用いたPCRにより解析した。

(4)T細胞株の病原性の検討

培養T細胞株(1 x 10⁶個)をDsg3^{-/-}B細胞(5 x 10⁶個)とともにRag2^{-/-}マウスに移植し、抗Dsg3抗体産生と皮膚粘膜に生じるPV発現型により病原性を調べた。Dsg3^{-/-}B細胞はPVモデルマウス作成法に準じて免疫したDsg3^{-/-}マウス脾細胞からMACS CD4およびCD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany)を用いてT細胞を除去した後にMACS B220 MicroBeadsにより得た。培養T細胞株は移植前にリンホセパールII(IGL, Japan)を用いた比重遠心法により死細胞を除去して使用した。陽性コントロールとして、培養T細胞株の代わりに脾臓からCD4およびCD8 MicroBeadsを用いてT細胞をエンリッチした分画(10 x 10⁶個)を用いた。陰性コントロールにはDsg3^{-/-}B細胞のみを移植したマウスや、病原性を示さなかつたDsg3反応性T細胞とDsg3^{-/-}B細胞を移植したマウスを作成した。移植後、経時的に採血し、血漿中のIgG抗Dsg3抗体価をELISA法で測定した。採血終了後、マウス口蓋粘膜を採取し病理組織学的検討とAlexa488標識抗マウスIgG抗体を用いた直接蛍光抗体法により口蓋に沈着するIgGの検討を行った。

(5)T細胞株のホーミング能の検討

T細胞の病原性を検討した後にマウス脾臓を採取し、その凍結切片を抗CD19抗体(RM4-5; Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ)と抗TCRb鎖抗体(H57-597; BD)で共染色した。リンパ濾胞中のTCRb鎖陽性細胞数をCD19陽性細胞との接触の有無に分けて計測し、その比率を算出した。

(6)各種サイトカインがDsg3^{-/-}B細胞からの抗Dsg3抗体産生に与える影響の検討

Dsg3^{-/-}B細胞をd)と同様の方法で単離し、10%FBS添加RPMI-1640を用いて96穴平底プレートにまき(2 x 10⁵ cell/well) 500 ng/mlのs CD40L (R&D, Minneapolis, MN)存在下で各種サイトカイン IL-4, IL-10, IFN- γ を濃度別(0, 1, 2, 4, 6, 8 pg/ml)に添加し、7日間培養した。培養後、培養上清を採取し、ELISA法で上清中のIgG抗Dsg3抗体価を測定した。

(7) 組み換えアデノウイルスを用いたサイトカイン阻害効果がT細胞の病原性に与える影響の検討

AdEasy™ Adenoviral Vector System (Stratagene, La Jolla, CA)を用いて IL-4Ra、IL-10Ra、IFN- γ R1 の各細胞外領域を発現する組み換えアデノウイルスおよび対照組み換えアデノウイルス(mock)を作成した。ウイルスはCsCl₂密度勾配遠心法による濃縮およびPBSでの透析でマウス投与用に準備した。Rag2^{-/-}マウス尾静脈より1x10⁹ IFUの各組み換えアデノウイルスを投与し、5日後に培養T細胞株(1 x 10⁶ 個)とDsg3^{-/-}B細胞(5 x 10⁶ 個)をd)の方法に準じて尾静脈より投与し、IgG抗Dsg3抗体価の測定およびPV発現型の観察を経時的に行った。

4. 研究成果

a) Dsg3 反応性 T 細胞株の樹立

限界希釈法により本研究終了時まで、合計 59 個の Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立し、20 株についてその病原性を検討した。

b) TCRVb 遺伝子再構成の検出

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株の Vb 遺伝子を RT-PCR で検出した結果、病原性と再構成された Vb 遺伝子の間に関連性はみとめなかった。

c) サイトカイン発現解析

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現パターンを RT-PCR で検討した結果、7 株が Th1 型(IFN- γ ⁺IL-4⁻)、13 株が Th0 型(IFN- γ ⁺IL-4⁺)であった。個々の発現サイトカインについて病原性との関連を検討したところ、IL-4 および IL-10 の発現と病原性との間に関連を認めなかった (P = 0.04)。

d) ケモカイン受容体発現解析

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現パターンを RT-PCR で検討した結果、病原性と関連性を示すケモカイン受容体は認めなかった。

e) T 細胞株のホーミング能の検討

脾臓リンパ濾胞内に存在する T 細胞数を組織学的に T 細胞領域と B 細胞領域にわけて計測した結果、ホーミング能と病原性との間に関連性は認めなかった。

f) 各種サイトカインが Dsg3^{-/-} B 細胞からの抗 Dsg3 抗体産生に与える影響の検討

sCD40L 存在下で Dsg3^{-/-} B 細胞から産生される抗 Dsg3 抗体価は IL-4 の添加により増加した。一方、IL-10 あるいは IFN- γ の添加は抗 Dsg3 抗体産生に影響を与えなかった。

g) 組み換えアデノウイルスを用いたサイトカイン阻害効果がT細胞の病原性に与える影響の検討

各種組み換えアデノウイルスを Rag2^{-/-}マウスに投与した後に、T細胞株とDsg3^{-/-}B細胞を移植しPV発現型の誘導を試みた。sIL-4Raを発現させたRag2^{-/-}マウスでは、PV発現型が抑制された。一方、sIL-10RaやsINF- γ R1の発現は抗Dsg3抗体産生、PV発現型を抑制しなかった。

以上のことから、Dsg3 反応性 T 細胞の病原性規定因子として IL-4 を同定し、IL-4 の阻害療法は PV の新規治療法の一つとして、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 2 件)

Takahashi H, Kuwana M, Amagai M. A Single Helper T cell Clone Is Sufficient to Commit Polyclonal Naive B cells to Produce Pathogenic IgG in Experimental Pemphigus Vulgaris. **J Immunol** 182(3): 1740-1745, 2009 査読有

Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, Fujii Y, Kawakami Y, Kuwana M. Novel System Evaluating In Vivo Pathogenicity of Desmoglein 3-Reactive T-Cell Clones Using Murine Pemphigus Vulgaris. **J Immunol** 181(2): 1526-1535, 2008 査読有

[学会発表](計 7 件)

高橋 勇人、桑名正隆、天谷雅行、デスモグレイン 3 反応性 T 細胞クローンは多クローン IgG 型抗 Dsg3 抗体産生を誘導する、第 822 回日本皮膚科学会東京地方会、2008.12.20、東京

高橋 勇人、桑名正隆、天谷雅行、天疱瘡モデルマウスにおいて、デスモグレイン 3 反応性 T 細胞クローンは多クローン IgG 型抗デスモグレイン 3 抗体産生を誘導する、第 38 回日本免疫学会、2008.12.1、京都

Hayato Takahashi, Masataka Kuwana, Masayuki Amagai, Dsg3-reactive T cells; a key player in the autoantibody production in pemphigus, International Meeting on Autoimmune Bullous Disease, 2008.5.18, Otsu, Japan

Hayato Takahashi, Masataka Kuwana, Masayuki Amagai, Single desmoglein 3-reactive CD4⁺ T cell clones activate polyclonal naïve B cells and promote the production of pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris, International Investigative Dermatology 2008, 2008.5.17, Kyoto, Japan

高橋勇人、天谷雅行、西川武二、桑名正隆、天疱瘡モデルマウスを用いた自己反応性T細胞株の *in vivo* 病原性評価法の確立、第 816 回東京支部研究地方会、2007.12.15、東京

Hayato Takahashi, Masayuki Amagai, Takeji Nishikawa, Yutaka Kawakami, Masataka Kuwana, Interleukin-4 as a critical mediator derived from desmoglein 3-reactive T cells in the mouse pemphigus vulgaris model, The 37th annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 2007.11.20, Tokyo

Hayato Takahashi, Masayuki Amagai, Takeji Nishikawa, Yutaka Kawakami, Masataka Kuwana, A novel system for evaluation of *in vivo* pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones: a critical role of interleukin-4 in the mouse pemphigus vulgaris model, The Society for Investigative Dermatology 68th Annual Meeting,

Philadelphia, USA, 2007.5.12

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勇人

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40398615

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし