

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592346

研究課題名(和文)

病原性モノクローナル抗体を用いた天疱瘡の口腔粘膜病変発症機序の解明

研究課題名(英文)

Analysis of oral mucosal lesion of pemphigus using pathogenic pemphigus monoclonal antibodies

研究代表者

角田 和之 (TSUNODA KAZUYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60265915

## 研究成果の概要(和文):

本研究において口腔粘膜に生じる難治性自己免疫疾患である尋常性天疱瘡の自己抗体の解析を行った。その結果、天疱瘡には様々な病原性を有する自己抗体が存在する事をモノクローナルなレベルで確認した。また、自己免疫疾患における自己免疫反応性 IgM 抗体の詳細を解析するために、IgM クラスの天疱瘡モノクローナル抗体を作製し、IgM クラスの自己抗体には明らかな病原性がないことを確認した。これらは天疱瘡発症機序を解明する上で重要な知見となる。

## 研究成果の概要(英文):

Pemphigus vulgaris is an autoimmune blistering disease of oral mucosa. We analyzed pathogenic activity of pemphigus antibodies monoclonal level. In patient serum, the pemphigus autoantibody that has heterogenous pathogenicity was confirmed. We also analyzed the pemphigus IgM autoantibodies as monoclonal level. We confirmed that pemphigus IgM antibody did not have apparent pathogenic activity. These finding will dissect the pathophysiological mechanism of pemphigus.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：天疱瘡、自己抗体、病原性、口腔病変、デスモグレイン

## 1. 研究開始当初の背景

粘膜・皮膚に生じる自己免疫性水疱形成疾患である尋常性天疱瘡(PV)の自己抗原蛋白は細胞間接着分子であるデスモグレイン(Dsg)3で、Dsg3に対する病原性の抗Dsg3自己抗体が細胞接着障害を引き起こすことが明らかにされている。PVでは、ほぼ全例において病初期の段階で口腔粘膜のみに水疱、びらん形成が生じるがその初期病変の重症度は軽症から非常に重症な症例まで様々で

ある。また治療抵抗性の難治病変が口腔粘膜に生じることはしばしばで、これらの現象は抗Dsg3抗体の病原性が深く関与しているものと考えられる。

## 2. 研究の目的

PVの口腔粘膜症状の解析とその治療法の開発を大きな目的として本研究を行った。これまでに我々が作製したPVモデルマウス、抗Dsg3モノクローナル抗体を用いてPV患者

血清の質的解析を期間中に行い PV の口腔粘膜病変の病態解析及び治療法開発の基礎データとする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ELISA 法を用いた自己抗体の病原性解析

これまでに我々が単離した、マウス抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK mAb シリーズ) を用いて、PV 患者の自己抗体が認識するエピトープと口腔内病変の重症度の相関関係を解析した。従来、天疱瘡の患者血清はポリクローナル抗体で、その、モノクローナルなレベルにおける抗 Dsg3 抗体の病原性については全く不明であった。AK mAb (5 クローン) は Dsg3 と Dsg1 のスワッピング分子を用いたエピトープの解析より、Dsg3 の細胞外領域の大きく分けて、N 末端領域、中央部、C 末端領域を認識する抗体であることが確認されている。そこでこれらの異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体を用いて、PV の口腔内病変重症度と自己抗体のエピトープの相関関係を解析した。

#### (2) エピトープ依存的な患者血清中の自己抗体の病原性の検討

AK mAb を利用して患者血清中の異なるエピトープを認識する自己抗体を精製し、*in vitro* dissociation assay を用いて解析した。本アッセイはヒト培養角化細胞をもちいた抗 Dsg3 抗体の病原性評価法で技術的に確立されており、この結果は患者血清中のモノクローナルなレベルでの病原性を初めて示すことが可能である。

#### (3) 病原性天疱瘡モノクローナル抗体を用いた自己反応性 IgM 抗体の病原性解析

AK mAb の中でも強い病原性を有する AK23 mAb の超可変部位を有するトランスジェニックマウスを作製し、そのマウスの解析を行った。更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を単離し、その病原性を AK23 IgG と比較検討した。

### 4. 研究成果

ELISA 法を用いた自己抗体の病原性解析では、ELISA 法に必要な抗原蛋白およびモノクローナル抗体が大量に必要な。そこで先ず抗 Dsg3 モノクローナル抗体 (AK mAb) の大量精製と組み換え Dsg 蛋白の作製、精製を行った。PV モデルマウスより作製した複数の AK mAb のハイブリドーマを大量に培養し、r protein A column にて精製した。また ELISA 法の抗原蛋白として使用する rDsg3 蛋白をバキュロウイルス発現系にて作製し TALON affinity column にて精製した。これらを用いてヒト Dsg3 組み換え蛋白を抗原とした ELISA 法により、PV 患者血清中の抗 Dsg3 自己抗体の解析を行った。AK mAb はマウス、ヒト Dsg3 に交差反応性を有するクローンが存

在し、Dsg3 細胞外領域の N 末端領域を認識し病原性を有する AK mAb (AK23)、中央部 (AK18) および C 末端領域 (AK20) を認識し明らかな病原性を有さない抗体に分類することが可能である (図 1)。

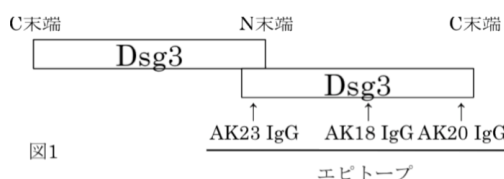


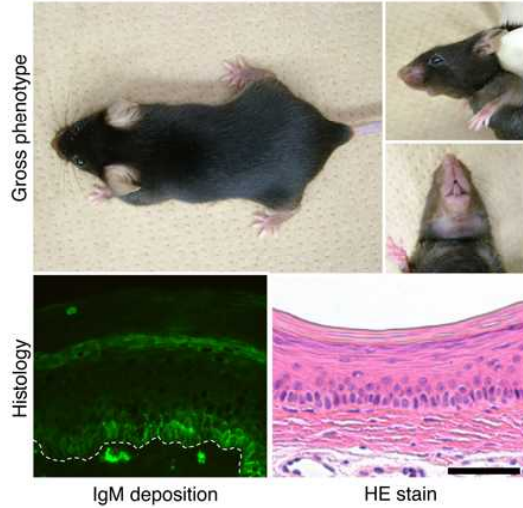
図1

これらの mAb を利用し、ヒト Dsg3 を抗原として用いた ELISA 法にて各モノクローナル抗体を 1 次抗体として反応させ、2 次抗体として患者血清を反応させた。また陽性コントロールとして AK mAb 単独での OD 値を測定し、両者間での競合率 (ブロック率) を算出した。その結果、活動期 PV 血清の約 70% で AK23 と競合するエピトープを認識する自己抗体を有し、AK18、AK20 のエピトープを認識する自己抗体は約 3 割以下であることが確認された。本来ポリクローナル抗体である PV 患者血清をモノクローナルなレベルで、解析することが可能であった。

次に抗 Dsg3 抗体のエピトープ依存的な病原性の解析を行った。そのための方法として *In vitro* dissociation assay を用いて PV 自己抗体の病原性の検討を行った。まず *in vitro* dissociation assay の条件を設定するために初代培養正常ヒト角化細胞を 24 ウェルプレートにてコンフルエントまで培養した後に、様々な濃度のカルシウムを添加し重層化の度合いを比較検討した。そして抗 Dsg3 抗体の病原性を評価するうえで Dsg1 の接着機能を調節する事が可能な exfoliative toxin A の添加量を比較検討し詳細な条件設定を行った。次にエピトープ依存的な患者血清の病原性を評価する前段階として、臨床症状と抗 Dsg3 抗体価の相関関係を *in vitro* dissociation assay を行い、assay の妥当性を評価した。その結果臨床症状が active な患者血清はその dissociation score が高く、また臨床症状が remission の患者ではその dissociation score が低いことが確認され、本方法は抗 Dsg3 自己抗体の病原性を定量的な評価に適した方法であると考えられた。

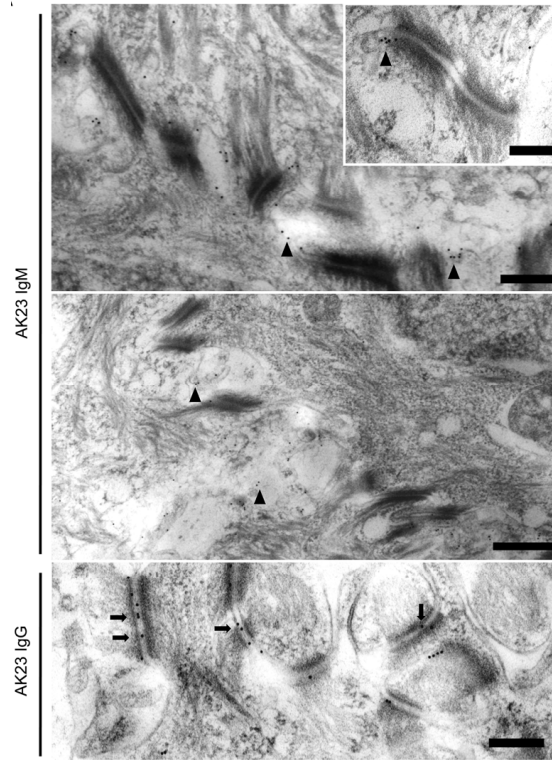
さらに PV 自己抗体の病原性解析を行う目的で、PV モノクローナル IgG 抗体 (AK IgG mAb) を用いて PV 自己抗体のクラスの違いにおける病原性解析を行った。以前に我々は非病原性の AK7 IgG mAb の超可変部位を有する AK7 B 細胞トランスジェニックマウス (B-Tg) を作製し、自己反応性 IgM 抗体を産生する B 細胞は抹消リンパ組織中に排除されることなく存在していることを明らかにした。そこで本研究期間中に強い病原性を有する AK23 IgG mAb の超可変部位を有する AK23 B-Tg を作製

した。AK23 B-Tg では病原性を有する超可変部位を有するにもかかわらず、AK7 B-Tg と同様に自己反応性 B 細胞が抹消リンパ組織中に排除されることなく存在し、さらには分泌された抗 Dsg3 IgM 抗体の上皮細胞間への沈着を認めるものの、明らかな PV の表現型は誘導されなかった (図 2)。

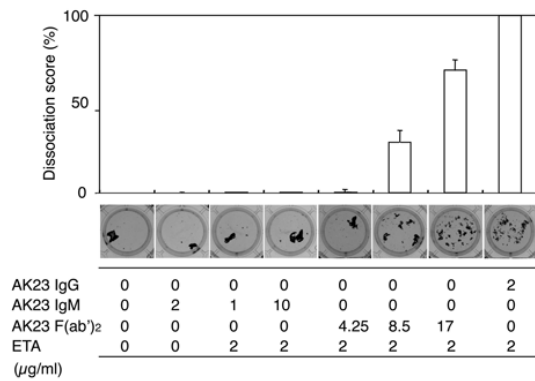


(図 2)

そこで AK23 B-Tg より病原性超可変部位を有する PV モノクローナル IgM 抗体 (AK23 IgM) を単離した。in vitro dissociation assay による病原性解析では、AK23 IgM は明らかな病原性を示さなかった。さらに AK23 IgM ハイブリドマを接種し腹水化したマウスの口蓋粘膜の免疫電顕を実施し In vivo における AK23 IgM の病原性を観察した。その結果 AK23 IgM はデスモゾーム内に沈着することなく、優位にデスモゾーム周囲に沈着している像が観察された (図 3)。これは AK23 IgM は膜上の Dsg3 には結合するものの、デスモゾームに組み込まれた Dsg3 には結合していないためであると考えられた。そこで AK23 IgM をペプシンで消化し F(ab')<sub>2</sub> 化したところ、in vitro dissociation assay にて病原性が確認された (図 4)。以上の事実より PV での水疱形成においては、免疫グロブリンが病原性を発揮するためにはデスモゾームに組み込まれた Dsg3 蛋白に IgG クラスの抗体が結合する事が、一つの重要な因子であることが確認され、発症機序の一端が明らかにされた。(Tsunoda et al, American journal of pathology, in press)。



(図 3)



(図 4)

## 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5件)

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 (in press, 査読有り)

角田和之, 加藤伸, 大内健嗣, 石河晃: 【白い皮膚病】臨床例 口腔粘膜に生じた白色海綿状母斑, 皮膚病診療 2010, 32:955-958 (査読有り)

Saito H, Shimizu A, Tsunoda K, Amagai M, Ishiko A: Subcellular localization of desmosomal components is different between desmoglein3 knockout mice and pemphigus vulgaris model mice, J Dermatol Sci 2009, 55:108-115 (査読有り)

Ota T, Aoki-Ota M, Tsunoda K, Nishikawa T, Koyasu S, Amagai M: Autoreactive B-cell elimination by pathogenic IgG specific for the same antigen: implications for peripheral tolerance. Int Immunol 2008, 20:1351-1360 (査読有り)

Mori T, Hasegawa K, Okabe A, Tsujimura N, Kawata Y, Yashima T, Kobayashi N, Kondo S, Aisa Y, Kato J, Tsunoda K, Nagai T, Nakagawa T, Shigematsu N, Kubo A, Ikeda Y, Okamoto S: Efficacy of mouth rinse in preventing oral mucositis in patients receiving high-dose cytarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Int J Hematol 2008, 88:583-587 (査読有り)

[学会発表](計11件)

Keratin 13 gene mutation cases oral white sponge nevus. Tsunoda K, Kato S, Ouchi T, Ishiko A. 37th Annual Meeting of the SCUR, Helsinki, Finland, 09.07-08 2010, (poster presentation)

小池晶彦, 宮下英高, 高森康次, 木村彩, 角田和之, 池内 忍. 口腔内増殖性天疱瘡が疑われた1例, 第20回日本口腔粘膜学会総会, 大阪, 2010.07.31-08.01 (口頭)

宇賀允悠, 角田和之, 加藤伸, 小高利絵, 角田博之, 大内健嗣, 石河晃, 中川種昭: ケラチン13遺伝子変異により生じた白色海綿状母斑の1例, 第20回日本口腔粘膜学会総会 大阪, 2010.7.31-8.01 (口頭)

角田和之: 口腔粘膜疾患のトランスレショナルリサーチ 天疱瘡の基礎研究とその臨床応用, 第19回日本口腔粘膜学会総会・学術集会, 神奈川県三浦郡, 2009.06.05-06 (シンポジウム)

小池晶彦, 角田和之, 柴秀行, 新里知佳, 加藤伸, 永井哲, 天谷雅行, 中川種昭: 粘膜類天疱瘡の1例. 第19回日本口腔粘膜学会総会・学術集会, 神奈川県三浦郡, 2009.06.05-06 (口頭)

Binding kinetic analysis of anti-desmoglein 3 monoclonal antibodies by Biacore. Tsunoda K, Nakagawa T, Amagai M: 6th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Miami, USA, 04.30-05.03 2009(oral presentation)

角田和之, 中川種昭: 天疱瘡の病原性エピトープを認識する抗デスモグレイン3 IgM抗体の病原性解析. 第63回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 浜松, 2009.4.16-17 (口頭)

角田和之, 中川種昭, 天谷雅行: 天疱瘡モノクローナル抗体の結合カイネティクス解析による新たな病原性因子の探索. 第53回日本口腔外科学会, 徳島, 2008.10.20-21: (口頭)

角田和之, 畑毅, 清水篤, 石河晃, 山田健人, 中川種昭, 天谷雅行: デスモグレイン3の天疱瘡病原性エピトープを認識するIgM抗体の作製とその病原性解析. 日本口腔粘膜学会雑誌 東京, 2008.09.19-20 (口頭)

IgM to IgG isotype switching of anti-desmoglein 3 antibodies is an essential step for pathogenesis of pemphigus vulgaris. Tsunoda K, Ota T, Hata T, Shimizu A, Yamada T, Nakagawa T, Amagai M: International Investigative Dermatology, annual meeting, Kyoto 05.14-17 2008 (poster presentation)

角田和之, 口腔粘膜にびらん・潰瘍を生じる疾患, 日本皮膚科学会総会, 京都 2008.04.18-20 (教育講演)

[図書](計3件)

角田和之, 天谷雅行: 口腔粘膜に水疱・びらん・剥離ができていない患者が来院したら?, 医師・歯科医師のための口腔診療必携: 金原出版, 2010, P10

加藤伸, 新里知佳, 角田和之, 永井哲夫: 小児の口腔粘膜疾患, 小児歯科臨床: 全国小児歯科開業医会, 2010, 15: P10-19

角田和之: 口腔外科ハンドマニュアル'08 天疱瘡・類天疱瘡: クインテッセンス出版, 2008, P27-38

〔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・助教  
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

なし