

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791096

研究課題名(和文)

デスモグレイン 3 - GFP 遺伝子組み換えマウスを用いた天疱瘡病態機序の検討

研究課題名(英文)

The analyses of mechanism to induce pemphigus using desmoglein 3 -GFP transgenic mice

研究代表者

吉田 和恵 (YOSHIDA KAZUE)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70383776

研究成果の概要(和文):我々は尋常性天疱瘡の自己抗原であるデスモグレイン 3 (Dsg3)を green fluorescent protein を用いて可視化した遺伝子組み換えマウスを作成した。本マウス耳に蛍光標識した抗 Dsg3 抗体を皮内注射し、水疱形成過程における Dsg3, 抗 Dsg3 抗体の動態を *in vivo* で二光子顕微鏡により観察した。本知見は、今後、尋常性天疱瘡の水疱形成を抑制する疾患特異的な治療法を開発する上で有用である。

研究成果の概要(英文): Pemphigus vulgaris is serious autoimmune blistering disease induced by autoantibodies against desmoglein3 (Dsg3). To make Dsg3 visible, we made a Dsg3 -GFP transgenic mouse. When we injected fluorescent labeling anti -Dsg3 antibody into Dsg3 -GFP mouse ear skin, we have succeeded in observing the movement of Dsg3 and anti -Dsg3 antibody *in vivo*. Our observation would be useful to develop the disease -specific therapy to inhibit bulla formation in pemphigus vulgaris in the future.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：皮膚科学

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，デスモグレイン

1. 研究開始当初の背景

尋常性天疱瘡は、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性疾患であり、全身の皮膚およ

び粘膜にびらん、水疱形成をきたす重篤な疾患である。尋常性天疱瘡の現在の治療は、他の自己免疫性疾患と同様に副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤など免疫を非特異的に抑制する治療

が中心であり，副作用が多く，より疾患特異的な治療の開発が強く望まれる．将来的に，疾患特異的な治療法を開発するには，尋常性天疱瘡における水疱形成機序の解明が極めて重要である．尋常性天疱瘡の水疱発症機序に関しては，細胞表面の Dsg3 に自己抗体が結合することで，細胞間の Dsg3 同士の結合を直接破壊する，細胞表面の Dsg3 が細胞内に取り込まれて減少することで細胞間結合が消失する，細胞内のシグナル伝達の活性化が起き，細胞間結合が崩壊する，などが唱えられているが，正確な機序は明らかではなかった．*in vitro* の実験系では，ヒト表皮培養細胞に天疱瘡患者の IgG すなわち Dsg3 に対する自己抗体を投与すると，Dsg3 と自己抗体の複合体は，Dsg3 に細胞内で結合するプラコグロビンとともに細胞内に取り込まれ（*internalization*），細胞間結合を消失させることが明らかにされており（Calkins CC et al., J Biol Chem, 281: 7623, 2006），また，Dsg3 の *internalization* は，細胞内シグナル伝達を担う tyrosine-kinase inhibitor である genistein により阻害されることが示されている（Delva E et al., J Biol Chem, 283: 18303, 2006）．しかし，いずれも培養細胞を単層で観察した実験系を用いており，実際の生体内で重層扁平上皮を構成する細胞においても Dsg3，抗 Dsg3 抗体が同様の動態を示すかは不明であった．天疱瘡では重層扁平上皮を構成する垂直方向の細胞間接着が崩壊し，水疱形成を来すのに対し，培養細胞の実験系では単層なので水平方向

の接着しか観察することができなかった．天疱瘡の病態で最も問題となる水疱形成の過程を明らかにするには，細胞間結合を担う Dsg3 およびその自己抗体がどのような細胞内動態を示し，細胞間結合を崩壊させるのか，生体内での検討が必須であった．

2．研究の目的

我々は，Dsg3 を green fluorescent protein（GFP）を用いて可視化した遺伝子組み換えマウス（Dsg3-GFP マウス）を作成した．この Dsg3-GFP マウスに抗 Dsg3 抗体を投与して生体内における自己免疫状態を再現し，生体内での抗 Dsg3 抗体と Dsg3 の動態をライブ観察することにより天疱瘡の水疱形成過程を明らかにすることを目的とした．

3．研究の方法

(1) wild type のマウス，Dsg3-GFP マウスにおける抗 Dsg3 抗体による水疱形成の検討

我々の研究室では，天疱瘡モデルマウスから病原性の異なる複数の抗 Dsg3 モノクローナル抗体（AK mAb）を単離した．すでに *in vivo* において病原性の違いが示されており，AK23，AK15 それぞれを新生仔マウスに投与すると，ともに皮膚基底層に沈着するが，AK23 は病理組織学的に水疱形成を来すのに対し，AK15 は明らかな水疱形成を来さない（Tsunoda K et al. J Immunol 170:2170, 2003）．また，マウス皮膚基底層では Dsg1 も細胞接着構造を担うため，AK23 単独で

は肉眼的な水疱形成を来さず、黄色ブドウ球菌による作られるセリンプロテアーゼの一種であり、Dsg1 を特異的に分解する ETA を投与すると肉眼的に水疱形成を来すことが示されている。そこで、AK23、AK15 それぞれを ETA 添加時、および非添加時の条件で、wild type マウスと Dsg3-GFP マウス耳皮内に投与する。投与後の耳皮膚を用いて、凍結標本を作製し、抗マウス IgG 抗体を用いて免疫組織学的に抗 Dsg3 抗体の沈着の有無と、パラフィン切片を作成して、HE 染色で病理組織学的に表皮内水疱の形成の有無を確認した。抗体の投与量および投与後の経過時間を、
において検討し、免疫組織学的に抗 Dsg3 抗体が沈着し、水疱形成を来す条件を決定した。

(2)天疱瘡水疱形成過程における Dsg3 および抗 Dsg3 抗体の動態の観察

Dsg3-GFP マウスに全身麻酔を施行し、耳をオイルを滴下したカバーガラスディッシュに固定した。1)にて確認した、免疫組織学的に抗 Dsg3 抗体の沈着が確認され、病理組織学的に明らかに水疱形成を来した条件で、Dsg3-GFP マウスの耳に蛍光抗体で標識した AK23 を皮内注射し、表皮内水疱を形成する際の Dsg3 およびデスモゾームの動態を、二光子顕微鏡を用いてリアルタイムに dual mode で観察した。

(3)細胞分裂期における Dsg3 および抗 Dsg3 抗体の動態の観察

Dsg3-GFP マウスの表皮基底層を *in vivo* でライブ観察する事で、細胞分裂時の Dsg3 およびデスモゾームの動態を観察した。

4. 研究成果

(1)wild type のマウス、Dsg3-GFP マウスにおける抗 Dsg3 抗体による水疱形成の検討

in vivo でのライブ観察には成体マウスの耳が適しているため、AK23、AK15 それぞれを ETA 添加時、および非添加時の条件で、wild type マウスと Dsg3-GFP マウス耳皮内に投与したところ、AK23、AK15 とともに、ETA 添加時、非添加時ともに病理組織学的に水疱形成を確認できなかった。同一抗体を新生児マウス背部に投与したところ、ETA を添加した AK23 を投与した場合のみ水疱形成を来した。いずれの場合も、免疫組織学的には抗 Dsg3 抗体は表皮内に沈着していることが確認できた。そこで、従来新生児マウスで病原性の確認できていた抗体よりも病原性の強い抗 Dsg3 抗体を得るために、AK23 の作成、濃縮方法を検討し、成体マウス耳において ETA を添加した AK23 を投与した場合に、病理組織学的に水疱を形成することに成功した。

(2)天疱瘡水疱形成過程における Dsg3 および抗 Dsg3 抗体の動態の観察

1)にて確認した、免疫組織学的に抗 Dsg3 抗体の沈着が確認され、病理組織学的に明らかに水疱形成を来した AK23 を Alexa568 で蛍光標識した抗 Dsg3 抗体を作成した。Alexa568 標識

AK23 を成体マウス耳に皮内注する
事で水疱形成過程における Dsg3 , 抗
Dsg3 抗体の動態を *in vivo* で二光子
顕微鏡により観察することができた .

**(3)細胞分裂期における Dsg3 および
抗 Dsg3 抗体の動態の観察**

Dsg3-GFP マウスの表皮基底層を
in vivo でライブ観察したが , 基底細
胞が細胞分裂するまでの過程を観察
するにはより長時間のライブ観察を
可能にしなければならず , 今後麻酔条
件などを検討し直す必要がある .

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

吉田 和恵 (YOSHIDA KAZUE)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号 : 70383776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし