

氏 名 (本籍)	西 藤 公 司 (三 重 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第102号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	ヒトおよびイヌ天疱瘡の病態発症機序の解明
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 岩 崎 利 郎 副査 帯広畜産大学 教授 山 田 明 夫 副査 岩 手 大 学 教 授 谷 口 和 之 副査 東京農工大学 教授 山 根 義 久 副査 岐 阜 大 学 教 授 工 藤 忠 明

論 文 の 内 容 の 要 旨

天疱瘡はヒトをはじめ、イヌ、ネコ、ウマ、山羊などに認められる自己免疫性皮膚—粘膜疾患で、しばしば致死的な経過をたどる。天疱瘡はその病型の違いから、主に尋常性天疱瘡 (PV)、落葉状天疱瘡 (PF) の2つに大別される。ヒトや動物の天疱瘡患者体内には重層扁平上皮の細胞間を認識する自己抗体が存在し、それが表皮や粘膜上皮の細胞間接着を障害した結果、それらの臓器に水疱、膿疱あるいはびらんが形成される。ヒト天疱瘡の自己抗体の標的蛋白の同定が過去に行われ、その結果 PV、PF の標的蛋白はデスモソーム構成蛋白のうちカドヘリン型細胞接着因子、それぞれデスモグレイン (Dsg) 3、Dsg1 であることが証明された。しかしこれらの自己抗原がどのようにして抗原特異的な B 細胞を活性化し、抗体産生を促すかという、ヒト天疱瘡の免疫学的な病態発症機序についてはこれまで十分な検討がされていない。これに対し、イヌ天疱瘡の自己抗体の標的蛋白を免疫ブロット法で解析した報告は過去にあるものの、その正体について未だ結論を得るまでには至っていない。

本研究は、ヒト PV の自己抗体産生機序を Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)法により解析したと共に、イヌ PF の自己抗体の標的蛋白について、バキュロウイルス発現系で作成した組換えイヌ Dsg1 と血中抗体との反応性を検討したものである。

第 I 章では、緒論としてヒトや動物の天疱瘡の臨床所見ならびに免疫組織学的所見、ヒト天疱瘡の自己抗原と病型との関連、およびイヌ天疱瘡の自己抗体の標的蛋白に関する過去

の報告について記述し、本研究の目的を述べた。

第Ⅱ章では、ヒト Dsg3 特異的な抗体産生細胞の検出法としての ELISPOT 法を開発した。バキュロウイルス発現系にて作成した組換えヒト Dsg3 を固相化抗原に用いたところ、ヒト Dsg3 特異的な単クローン抗体を産生するマウスハイブリドーマ細胞を定量性を持って検出することが可能となった。また ELISPOT 法により、数多くの抗体非産生細胞中に存在する抗原特異的なハイブリドーマ細胞の検出ならびに定量を試みたところ、プレートに添加した抗体非産生細胞の数が各ウェルあたり 2×10^5 細胞までのとき、抗原特異的な抗体産生細胞が定量性を持って検出できることが明らかとなった。さらに ELISPOT 法により、組換えヒト Dsg3 免疫マウスの生体内に存在する抗原特異的な抗体産生細胞を検出するとともに、その全単核球中における頻度を算出した。ヒト Dsg3 特異的な抗体産生細胞は脾臓および骨髄で高率に検出され、その頻度は単核球 10^5 細胞あたりそれぞれ 14.6 ± 6.5 細胞、 10.6 ± 2.4 細胞であった。リンパ節および末梢血から得られた抗原特異的な抗体産生細胞の頻度は、脾臓と骨髄から得られた頻度よりも低値であった。

以上の結果より、組換えヒト Dsg3 を固相化抗原とした ELISPOT 法により、生体内に存在する抗ヒト Dsg3 抗体産生細胞が定量性を持って検出できることが証明された。

第Ⅲ章では、ELISPOT 法により、ヒト PV 末梢血単核球 (PBMC) 中に存在する抗ヒト Dsg3 抗体産生細胞およびヒト Dsg3 特異的な記憶 B 細胞を検出するとともに、それらの B 細胞の *in vitro* における抗原特異的な自己抗体産生機序について検討した。

ヒト PV 患者 11 例から採取した PBMC 13 検体と、健常人 7 例から採取した PBMC 7 検体について ELISPOT 法を行ったところ、3 例の重症 PV 患者から採取した PBMC より抗ヒト Dsg3 IgG 産生細胞が検出され、その頻度は PBMC 10^5 細胞あたり 1.3-2.5 細胞であった。軽症例、寛解例、および健常人の末梢血中からは、これらの細胞は検出されなかった。次に、ヒト PV 患者 14 例から採取した PBMC 21 検体と、健常人 10 例から採取した PBMC 10 検体を *in vitro* で刺激したものについて ELISPOT 法を行い、寛解例を含む様々な病勢のヒト PV 患者末梢血中から抗原特異的な記憶 B 細胞を検出した。さらに 3 例のヒト PV 患者から採取した PBMC より CD4 陽性 T 細胞を除去し、*in vitro* で抗原特異的に刺激したものについて ELISPOT 法を行い、*in vitro* でのヒト Dsg3 特異的な抗体産生が CD4 陽性 T 細胞を除去することによってほぼ完全に阻害されることを証明した。さらに *in vitro* でのヒト Dsg3 特異的な抗体産生に対する、抗 MHC クラス II 抗体の阻害効果について検討を行い、抗 HLA-DR 抗体および抗 HLA-DQ 抗体のいずれかの存在により、*in vitro* でのヒト Dsg3 特異的な抗体産生が阻害されることを証明した。

以上の結果より、ヒト PV 患者末梢血中の抗ヒト Dsg3 IgG 産生細胞は重症例の患者のみに認められ、またヒト Dsg3 特異的な記憶 B 細胞は寛解例を含む様々な重症度の患者末梢血中に認められることが明らかとなった。またヒト PV 患者におけるヒト Dsg3 特異的な自己抗体の産生は、MHC クラス II に拘束された T 細胞と B 細胞の協調により行われる可能性

が示唆された。

第IV章では、培養イヌケラチノサイト細胞株、MCA-B1 細胞を用いた Living keratinocyte staining 法によりイヌ PF 血中自己抗体の検出を試みると共に、その標的蛋白がイヌ Dsg1 であるかを免疫吸着法により検討した。

MCA-B1 細胞を用いた Living keratinocyte staining 法は、イヌ PF 血中自己抗体の検出法として、従来より行われているイヌ口唇を基質とした間接蛍光抗体法よりも感度、特異性の両方において優れていた。またヒト PF 血清を用いた解析の結果、MCA-B1 細胞がその細胞表面にイヌの Dsg1 を発現することを証明した。次に、この MCA-B1 細胞から抽出した mRNA を元に、イヌ Dsg1 の組換え蛋白をバキュロウイルス発現系により作成した。さらに、ヒト PF、ヒト PV、イヌ PF、イヌアトピー性皮膚炎 (AD) の症例より採取した血清と組換えイヌ Dsg1 との反応性について、Living keratinocyte staining 法を併用した免疫吸着法により検討した。その結果、ヒト PF 患者血清の MCA-B1 細胞表面に対する反応性は、組換えイヌ Dsg1 を用いた免疫吸着法により完全に消失したのに対し、ヒト PV、イヌ PF、およびイヌ AD 血清が示す反応性には変化が認められなかった。

以上の結果より、MCA-B1 細胞を用いた Living keratinocyte staining 法が、イヌ PF の血中抗体の検出法として有用であると共に、本法を免疫吸着法と併用することにより、イヌ PF の血中抗体の標的蛋白の同定が可能となることが示された。また組換えイヌ Dsg1 を用いた免疫吸着法の結果から、イヌ PF の自己抗体は少なくともイヌ Dsg1 を主要な標的蛋白としていない可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

天疱瘡はヒトをはじめ、イヌ、ネコ、ウマ、山羊などに認められる自己免疫性皮膚—粘膜疾患で、主に尋常性 (PV)、落葉状 (PF) の2つに大別される。ヒトや動物の天疱瘡患者体内には重層扁平上皮の細胞間を認識する自己抗体が存在し、それが表皮や粘膜上皮の細胞間接着を障害した結果、それらの臓器に水疱、膿疱あるいはびらんが形成される。ヒト天疱瘡の自己抗体の標的蛋白の同定が過去に行われ、その結果 PV、PF の標的蛋白はデスモソーム構成蛋白のうちカドヘリン型細胞接着因子、それぞれデスモグレイン (Dsg) 3、Dsg1 であることが証明された。しかしこれらの自己抗原がどのようにして抗原特異的な B 細胞を活性化し、抗体産生を促すかという、ヒト天疱瘡の免疫学的な病態発症機序についてはこれまで十分な検討がされていない。これに対し、イヌ天疱瘡の自己抗体の標的蛋白を免疫ブロット法で解析した報告は過去にあるものの、未だ結論を得るまでには至っていない。

本研究は、ヒト PV の自己抗体産生機序を Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT) 法により解析したと共に、イヌ PF の自己抗体の標的蛋白について、バキュロウイルス発現系で作成した組換えイヌ Dsg1 と血中抗体との反応性を検討したものである。

1. 抗ヒト Dsg3 抗体産生細胞の検出法としての ELISPOT 法の開発

ヒト Dsg3 特異的な抗体産生細胞の検出法としての ELISPOT 法を開発した。バキュロウイルス発現系にて作成した組換えヒト Dsg3 を固相化抗原に用いたところ、ヒト Dsg3 特異的な単クローン抗体を産生するマウスハイブリドーマ細胞を定量性を持って検出することが可能となった。また ELISPOT 法により、数多くの抗体非産生細胞中に存在する抗原特異的なハイブリドーマ細胞の検出ならびに定量を試みたところ、プレートに添加した抗体非産生細胞の数が各ウェルあたり 2×10^5 細胞までのとき、抗原特異的な抗体産生細胞が定量性を持って検出できることが明らかとなった。さらに ELISPOT 法により、組換えヒト Dsg3 免疫マウスの生体内に存在する抗原特異的な抗体産生細胞を検出するとともに、その全単核球中における頻度を算出した。ヒト Dsg3 特異的な抗体産生細胞は脾臓および骨髄で高率に検出され、その頻度は単核球 10^5 細胞あたりそれぞれ 14.6 ± 6.5 細胞、 10.6 ± 2.4 細胞であった。リンパ節および末梢血から得られた抗原特異的な抗体産生細胞の頻度は、脾臓と骨髄から得られた頻度よりも低値であった。

以上の結果より、組換えヒト Dsg3 を固相化抗原とした ELISPOT 法により、生体内に存在する抗ヒト Dsg3 抗体産生細胞が定量性を持って検出できることが証明された。

2. ELISPOT 法によるヒト PV 自己抗体産生細胞の検出ならびに自己抗体産生における CD4 陽性 T 細胞の役割についての検討

ELISPOT 法により、ヒト PV 末梢血単核球 (PBMC) 中に存在する抗ヒト Dsg3 抗体産生細胞およびヒト Dsg3 特異的な記憶 B 細胞を検出するとともに、それらの B 細胞の *in vitro* における抗原特異的な自己抗体産生機序について検討した。ヒト PV 患者 11 例から採取した PBMC 13 検体と、健常人 7 例から採取した PBMC 7 検体について ELISPOT 法を行ったところ、3 例の重症 PV 患者から採取した PBMC より抗ヒト Dsg3 IgG 産生細胞が検出され、その頻度は PBMC 10^5 細胞あたり 1.3-2.5 細胞であった。軽症例、寛解例、および健常人の末梢血中からは、これらの細胞は検出されなかった。次に、ヒト PV 患者 14 例から採取した PBMC 21 検体と、健常人 10 例から採取した PBMC 10 検体を *in vitro* で刺激したものについて ELISPOT 法を行い、寛解例を含む様々な病勢のヒト PV 患者末梢血中から抗原特異的な記憶 B 細胞を検出した。さらに 3 例のヒト PV 患者から採取した PBMC より CD4 陽性 T 細胞を除去し、*in vitro* で抗原特異的に刺激したものについて ELISPOT 法を行い、*in vitro* でのヒト Dsg3 特異的な抗体産生が CD4 陽性 T 細胞を除去することによってほぼ完全に阻害されることを証明した。さらに *in vitro* でのヒト Dsg3 特異的な抗体産生に対する、抗 MHC クラス II 抗体の阻害効果について検討を行い、抗 HLA-DR 抗体および抗 HLA-DQ 抗体のいずれかの存在により、*in vitro* でのヒト Dsg3 特異的な抗体産生が阻害されることを証明した。

以上の結果より、ヒト PV 患者末梢血中の抗ヒト Dsg3 IgG 産生細胞は重症例の患者のみに認められ、またヒト Dsg3 特異的な記憶 B 細胞は寛解例を含む様々な重症度の患者末梢血中に認められることが明らかとなった。またヒト PV 患者におけるヒト Dsg3 特異的な自

己抗体の産生は、MHC クラス II に拘束された T 細胞と B 細胞の協調により行われる可能性が示唆された。

3. イヌ PF 血中自己抗体の検出および抗原特異的免疫吸着法を用いた自己抗体の標的蛋白についての検討

培養イヌケラチノサイト細胞株、MCA-B1 細胞を用いた Living keratinocyte staining 法によりイヌ PF 血中自己抗体の検出を試みると共に、その標的蛋白がイヌ Dsg1 であるかを免疫吸着法により検討した。MCA-B1 細胞を用いた Living keratinocyte staining 法は、イヌ PF 血中自己抗体の検出法として、従来より行われているイヌ口唇を基質とした間接蛍光抗体法よりも感度、特異性の両方において優れていた。またヒト PF 血清を用いた解析の結果、MCA-B1 細胞がその細胞表面にイヌの Dsg1 を発現することを証明した。次に、この MCA-B1 細胞から抽出した mRNA を元に、イヌ Dsg1 の組換え蛋白をバキュロウイルス発現系により作成した。さらに、ヒト PF、ヒト PV、イヌ PF、イヌアトピー性皮膚炎 (AD) の症例より採取した血清と組換えイヌ Dsg1 との反応性について、Living keratinocyte staining 法を併用した免疫吸着法により検討した。その結果、ヒト PF 患者血清の MCA-B1 細胞表面に対する反応性は、組換えイヌ Dsg1 を用いた免疫吸着法により完全に消失したのに対し、ヒト PV、イヌ PF、およびイヌ AD 血清が示す反応性には変化が認められなかった。

以上の結果より、MCA-B1 細胞を用いた Living keratinocyte staining 法が、イヌ PF の血中抗体の検出法として有用であると共に、本法を免疫吸着法と併用することにより、イヌ PF の血中抗体の標的蛋白の同定が可能となることが示された。また組換えイヌ Dsg1 を用いた免疫吸着法の結果から、イヌ PF の自己抗体は少なくともイヌ Dsg1 を主要な標的蛋白としていない可能性が示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のある内容であるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Nishifuji, K., Amagai, M., Kuwana, M., Iwasaki, T. and Nishikawa, T.(2000) Detection of Antigen-Specific B Cells in Patients with Pemphigus Vulgaris by Enzyme-Linked Immunospot Assay: Requirement of T Cell Collaboration for Autoantibody Production. The Journal of Investigative Dermatology 114,88-94.

1. Amagai, M., Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S. and Nishikawa, T.(2000) Use of Autoantigen-knockout Mice in Developing an Active Autoimmune Disease Model for Pemphigus. *The Journal of Clinical Investigation* 105,625-631.
2. Futei, Y., Amagai, M., Sekiguchi, M, Nishifuji, K, Fujii, Y. and Nishikawa, T.(2000) Use of Domain-Swapped Molecules for Conformational Epitope Mapping of Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology* 115,829-834.
3. Park, S., Ohya, F., Yamashita, K., Nishifuji, K. and Iwasaki, T.(2000) Comparison of Response to Immunotherapy by Intradermal Skin Test and Antigen-specific IgE in Canine Atopy. *Journal of Veterinary Medical Science* 62,983-988.