

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

# 特定疾患に対する自己免疫モデル開発 に関する研究

平成 14 年度研究報告書

平成 15(2003)年 3 月

主任研究者 天 谷 雅 行

## 目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成14年度総括研究報告書	3
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 主任研究者 天谷 雅行	
III. 分担研究者報告書	
アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの作成及びその解析	17
東京大学医科学研究所 基礎医科学大部門 神経ネットワーク分野 助手 松井 稔	
シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み	22
慶應義塾大学医学部微生物学免疫学 教授 小安 重夫	
P0 +/-マウス自己免疫性神経炎の発症機構とヒトにおける類似疾患の検討	27
国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 部長 山村 隆	
天疱瘡モデルマウスより分離された疾患誘導性モノクローナル抗体のエピトープ解析	31
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成	41
慶應義塾大学医学部微生物学免疫学 教授 小安 重夫	
天疱瘡抗原ノックアウトマウスを用いた病原性を有する自己反応性T細胞の同定および解析	45
慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 専任講師 桑名 正隆	
天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価	50
慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 西川 武二	
抗 CD40L 抗体療法による免疫抑制療法の評価	55
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
免疫電顕法を用いた水疱形成誘導能を持つ抗デスマグレイン 3 モノクローナル抗体のエピトープ解析	60
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 石河 晃	

天疱瘡モデルマウスにおける抗原 3 次元エピトープの解析.....	67
慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 西川 武二	
天疱瘡自己抗体の in vitro 病的活性測定法の開発 .....	71
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
尋常性天疱瘡病変部のデジタル解析.....	75
慶應義塾大学医学部皮膚科 助教授 田中 勝	
自己免疫疾患に対する血漿交換療法の客観的評価法の確立.....	78
慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 西川 武二	
イヌ尋常性天疱瘡の病態解析.....	80
慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	85
V. 平成14年度班会議プログラム.....	91

## I. 平成14年度構成員名簿

## 班員構成

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	天谷雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師
分担研究者	西川武二	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授
	小安重夫	慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学	教授
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	部長
	田中 勝	慶應義塾大学医学部皮膚科	助教授
	石河 晃	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師
	桑名正隆	慶應義塾大学医学部先端医科学研究所	専任講師
	松井 稔	東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野	助手
事務局	岡嶋万里子	慶應義塾大学医学部皮膚科 〒160-8582 新宿区信濃町 35 tel 03-5363-3823 fax03-3351-6880 E-mail : nagatomi@sc.itc.keio.ac.jp	秘書
経理事務連絡 担当責任者	江口 正広	慶應義塾大学医学部 信濃町研究支援センター 〒160-8582 新宿区信濃町 35 tel 03-5363-3618 fax03-5363-3620 E-mail : masahiro.eguchi@adst.keio.ac.jp	課長

## Ⅱ. 平成14年度総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業  
総括研究報告書

特定疾患に対する自己免疫モデル開発に関する研究

主任研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師

**研究要旨** 本研究の目的は、自己抗原ノックアウトマウスを用いた新しい方法により実際の病態にできるだけ近い自己免疫モデルマウスを作成し、作製されたモデルマウスを用いて、自己免疫疾患の発症機構および病態の解明、治療法評価系の確立、疾患特異的治療法の開発をする事である。本年度は、自己免疫性皮膚疾患である尋常性天疱瘡のモデルマウスより、疾患誘導性、非誘導性のモノクローナル抗体を単離し、三次元エピトープを比較検討した。疾患誘導性のモノクローナル抗体は標的抗原であるデスマグレイン3分子の機能上重要なカドヘリン接着面に結合し、疾患非誘導性のモノクローナル抗体は機能上重要でない領域に結合した。自己抗体により疾患誘導性の強度が異なるのは、エピトープの違いにより少なくとも部分的には説明できることが明らかとなり、モデルマウスを用いた解析により、天疱瘡の水疱形成分子メカニズムの一端が解明された。5つあるムスカリン性アセチルコリン受容体のうち M2 及び M3 受容体ノックアウトマウスおよびダブルノックアウトマウスが作成され、シェーグレン症候群モデルマウスの作成が試みられている。末梢神経ミエリン主要蛋白である P0 蛋白は、Charcot-Marie-Tooth 病の責任遺伝子となっているが、P0+/-マウスでは P0 に対する免疫寛容が部分的に破綻しているため、慢性炎症性脱髄性多発神経炎に類似した炎症性神経炎を生じることを明らかにした。さらに、慢性炎症性脱髄性多発神経炎患者の中に、P0 遺伝子の変異があることを明らかにした。モデルマウスを用いた治療評価系として、ステロイド療法の効果を検討するとともに、抗 CD40 リガンド抗体が予防的投与により著明な効果を示すことが明らかにされた。さらに、天疱瘡抗原蛋白に特異的に反応するB細胞トランスジェニックマウスが作成され、自己抗原に対する免疫寛容獲得機構の解析を開始している。また、抗原特異的治療法の開発に向けて、天疱瘡抗原反応性T細胞の単離が試みられている。3年計画の1年目として準備を整えることができ、次年度以降のさらなる成果が期待される。

分担研究者  
 西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科教授  
 小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物・免疫学教授  
 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部部長  
 田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科助教授  
 石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師  
 桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究部専任講師  
 松井 稔 東京大学医科学研究部神経ネットワーク分野助手

## A. 研究目的

自己抗原ノックアウトマウスを用いた新しい方法により実際の病態にできるだけ近い自己免疫モデルマウスを作成し、作製されたモデルマウスを用いて、自己免疫疾患の発症機構および病態の解明、治療法評価系の確立、疾患特異的治療法の開発をする。

## B. 研究方法

### 1) アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの作成及びその解析

平滑筋には M2 と M3 が存在することが知られている。M2 ノックアウトマウスと M3 ノックアウトマウスを交配することにより、M2 と M3 の両者が欠失した、いわゆる M2M3 ダブルノックアウトマウスを作成した。このマウスの全身状態を観察し、摘出標本のコリン性アゴニストに対する収縮応答、瞳孔径の観察等を行った。

### 2) シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み

尋常性天疱瘡モデルマウスの作製に用いた方法を他の自己免疫疾患に応用すべく、ムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプ 3 (M3) を標的としシェーグレン症候群モデルマウスの作製を試みる。これはシェーグレン症候群患者の中に M3 に対する自己抗体が見られるという報告や、M3 ノ

ックアウト (KO) マウスにおいて唾液の分泌不全によって離乳後の体重減少が観察されるという事実に基づく。マウス M3 の細胞外ドメインからなるリコンビナントタンパク質の投与によって M3 KO マウスにおいて抗 M3 抗体の誘導し、その脾細胞を Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植することによりモデルマウスを作成する。

### 3) P0<sup>+/-</sup>マウス自己免疫性神経炎の発症機構とヒトにおける類似疾患の検討

ミエリン P0 蛋白(P0)は末梢神経ミエリンの主要構成蛋白で、その遺伝子変異はヒト Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) の原因となる。P0<sup>-/-</sup>マウスは早期発症ニューロパチーを発症するのに対し、P0<sup>+/-</sup>マウスは生後 6-9 ヶ月でヒト慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) に類似した炎症性神経炎を自然発症する。本研究において、P0<sup>+/-</sup>マウスでは P0 に対する免疫寛容が破綻していることを明らかにし、その原因は胸腺 P0 発現低下に伴う P0 反応性 T 細胞の negative selection の欠陥にあることを示す。

臨床的にヒト慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) とされながら後に P0 遺伝子異常の確認された症例を提示し、ヒト炎症性疾患の中に P0<sup>+/-</sup>マウス神経炎と類似した機序で発症する疾患が存在する可能性を検証した。

### 4) 天疱瘡モデルマウスより分離された疾患誘導性モノクローナル抗体のエピトープ解析

天疱瘡モデルマウスより水疱形成を誘導できるモノクローナル抗体の単離を行い、エピトープと水疱誘導能の関係を詳細に検討する。

PV の表現型を有する PV モデルマウス脾細胞を、マウス骨髄腫細胞種 (P3) と細胞融合することにより、ハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマはまずマウス rDsg3 を抗原として用いた ELISA にて 1 次スクリーニングとして、マウス培養角化細胞 PAM212 を用いた live keratinocyte



staining にて2次スクリーニングとして行った。AK mAb の病原性を評価するために、mAb を産生するハイブリドーマを Rag2<sup>-/-</sup>マウスの腹腔内へ接種した。接種後マウスにおける被毛の脱毛と体重減少など天疱瘡表現型の有無を観察した。mAb のエピトープ解析は、Dsg1 と Dsg3 のスワッピング分子あるいは点変異蛋白を用いた免疫沈降法により施行した。

#### 5) 抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成

B 細胞のトレランスとして、clonal deletion と anergy が提唱されてきた。しかし、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。尋常性天疱瘡抗原である Dsg3 は主に皮膚、粘膜に発現しており、骨髄には発現していない。今回我々は、独自に得られた、抗 Dsg3 抗体を産生するクローンから、B 細胞表面に抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、生理的な環境下での自己抗原に対する B 細胞の運命を解明することを試みる。

天疱瘡モデルマウスより作成された AK mAb の中で、マウス Dsg3 に特異的に反応する AK7 mAb の可変領域の cDNA を単離した。さらに、膜型 IgM として発現される発現ベクターを構築し、C57BL/6 マウス (Taconic) 受精卵にマイクロインジェクトすることにより、トランスジェニックマウスを作成した。

トランスジェニックマウスの脾臓、リンパ節、骨髄より単核球を分離し、phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19 (1D3)、FITC-conjugated anti-IgMa (DS-1)、anti  $\mu$  IgM(R6-60.2)で染色し、flow cytometer FACScan で解析した。

#### 6) 天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析

尋常性天疱瘡 (PV) において病態と関連する抗デスモグレイン 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、我々は Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを用いた PV モデルを利用することで、PV の病態を誘導する病原性

Dsg3 反応性 T 細胞の特性を明らかにすることをめざす。

Dsg3<sup>-/-</sup>マウスから Dsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立するためのマウス Dsg3 (mDsg3) の最適な免疫培養条件を検討した。まず、T 細胞刺激用の抗原としてリコンビナントの mDsg3 をバキュロウイルスと大腸菌の系で発現、精製した。5つの異なる条件でリコンビナントマウス Dsg3 で Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを免疫し、採取した脾臓、膝窩リンパ節、単径リンパ節から in vitro での抗原刺激によりマウス Dsg3 に対する T 細胞の特異的反応を検出した。

#### 7) 天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法評価系の確立

既に日常診療において用いられている薬剤として Prednisolone、Dexamethasone、Cyclophosphamide の3種の効果を天疱瘡モデルマウスを用いて検討した。

また、抗 CD40L 抗体の予防的効果を検討するために、500  $\mu$ g/mouse になるように調整した抗 CD40L 抗体を、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を移植する二日前、移植直前2時間前および移植後2、4、7、14日の計6回レシピエントマウス (Rag2<sup>-/-</sup>) に腹腔内投与した。コントロールとして精製 Hamster IgG (CAPPEL 社) を使用し、各群5匹の計10匹について検討した。

#### 8) 天疱瘡モデルマウスの超微形態解析

水疱形成誘導能を持つ抗 Dsg3 モノクローナル抗体 AK23 のハイブリドーマ細胞を接種したマウスに認められる超微形態を透過電顕、抗包埋免疫電顕法を用いて観察、解析した。

#### 9) 天疱瘡モデルマウスにおける抗原3次元エピトープの解析

ヒト天疱瘡における自己抗体のエピトープは3次元構造によるものが主体であり、細胞外領域のN末1-161アミノ酸残基に存在することが知られている。そこで、天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 に対するエピトープを、マウス Dsg3/Dsg1 スワッピング分子を作成し、競合的 ELISA により解

析した。

### 10) 天疱瘡自己抗体の *in vitro* 病的活性測定法の開発

尋常性天疱瘡患者血中にはデスマグレイン3 (Dsg3) に対する抗体が存在し、その抗体が直接病的活性を持ち、水疱形成を誘導することが明らかにされている。天疱瘡の病勢の評価は、現在のところ、蛍光抗体法間接法や組換え Dsg3 を用いた ELISA 法で測定された抗体価が使用されている。しかしながら、これらの検査法は、病的活性を検出する方法ではなく、かならずしも、重症度を反映しない。本研究では、培養細胞を用いて、天疱瘡患者血清中に存在する自己抗体の病的活性を測定する *in vitro* の検査法を開発する。

#### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は各所属施設の動物実験委員会の倫理規定に合致し、承認を得た上で施行される。天疱瘡モデルマウスに関する研究は、慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って遂行され、慶應義塾大学医学部動物実験委員会により、動物福祉の精神に則った適正な計画であることが承認されている(承認番号 012048)。

## C. 研究結果および考察

### 1) アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの作成及びその解析

ムスカリン性受容体を介するシグナル伝達は消化管や泌尿器などの生命維持に関わる臓器の制御に関わっているが、M2M3 ノックアウトマウスは、離乳直後の一過性の成長遅延の後、死に致ることなくアダルトにまで生育した。一過性の成長遅延は、ペースト状の餌を与えることにより軽減するがこれは、M3 を介する唾液腺への刺激が欠失していることに由来する。ムスカリン性受容体は生殖器においても何らかの役割を果たすことが考えられているが、M2M3 ダブルノックアウトマウスはオス、メスとも生殖可能であった。

消化管においては、M2 と M3 の両者が腸管平滑筋の収縮を担う。腸管平滑筋の収

縮は、蠕動運動を含む機能的な腸運動の基礎と考えられている。コリン性刺激の機能不全が関わる acute colonic pseudo-obstruction と呼ばれた病態に例示されるように、蠕動運動の消失は致命的でありうる。従って、我々は M2M3 ダブルノックアウトの腸管では、重篤な機能不全が存在するものと予想した。しかしながら、腹部膨満や便秘を示唆する所見は見いだされなかった。

M2M3 ダブルノックアウトマウスの瞳孔は、M3 ノックアウトマウスよりも常に小さかった。この結果は、M2 が瞳孔の収縮ではなく拡大を起こすことを示唆する。1% のアトロピンを点眼すると完全な散瞳が得られたことから、M1, M4, M5 のいずれかが、M2M3 ダブルノックアウトマウスの瞳孔収縮に寄与している可能性が考えられた。

本研究において、我々はコリン性の平滑筋収縮が、消化管機能やメスの排尿に必須ではないことを示した。これらの情報はアセチルコリン以外の神経伝達物質の重要性に光をあて、自律神経機能異常に関わる疾患に対するよりよい治療指針を与えるかも知れない。そのような疾患としては、尿失禁、過敏性腸症候群、PTSD などが含まれる。これまで、M2 は平滑筋に豊富に存在するもののその機能は比較的小さいものと考えられて来た。私たちのノックアウトマウスは M2 の機能を明らかにするのに大いに役立つであろう。事実、我々は M2 が散瞳作用を持つことを発見し、新たな眼疾患治療薬の開発につながる可能性を示した。

### 2) シェーグレン症候群モデルマウスの作製の試み

M3 は7回膜貫通型タンパク質であることから、リコンビナントタンパク質を作製することは難しいと思われる。そこでまず、最も長い細胞外ドメインである N 端部位を標的とし、GST の c 端に M3 の N 端の細胞外ドメインを結合させた融合タンパク質を作製した。M3 ノックアウトマウスにリコンビナント抗原 10 µg/head を完全フロイントアジュバントを用いて免疫し、2 週間後に 2 µg を Immune Eazy (QIAGEN) を用

いて2回ブーストした。その後、全血を採血してELISA法によって血清中の抗体価を検討したところ、4000倍希釈によっても十分な抗体価が検出された。そこで免疫した脾臓細胞を調製し、rag-2ノックアウトマウス1頭あたり $5 \times 10^7$ の脾臓細胞を尾静脈より移植し、その後6週間にわたってマウスを観察した。観察期間中特に体重減少などの変化は見られなかった。しかし、6週後に唾液腺の組織像を観察したところ、一部にリンパ球の浸潤が観察された。

尋常性天疱瘡モデルマウスにおいて用いた方法を踏襲することにより、M3に対する抗体を誘導できたことは、この方法論が一般性を持つことを示唆する。一部ながら唾液腺へのリンパ球浸潤が観察された事実は、細胞性免疫反応の関与を示唆する。事実、M3が細胞傷害性T細胞が持つタンパク質分解酵素の一つであるグランザイムBによって消化されるという結果も報告されており、M3がMHCクラスIによって提示される可能性が強く示唆される。そこで今後は自己抗体の誘導と細胞性免疫の誘導を検討する。細胞性免疫反応の誘導にはDNAワクチン法を応用し、M3に対する自己免疫反応の誘導を、液性免疫、細胞性免疫の両方から目指したい。

### 3) P0+/-マウス自己免疫性神経炎の発症機構とヒトにおける類似疾患の検討

野生型B6マウスをホストにした場合、P0+/-、P0-/-マウスの胸腺を移植したマウスでは、野生型B6の胸腺を移植したマウスに比較して、有意に強いP0反応性（IFN- $\gamma$ 産生）が確認された（P0-/->P0+/-）。一方、野生型B6の胸腺を、P0遺伝子マウスに移植した場合には、P0に対する反応性は強く抑制された。以上の結果は、P0欠損マウスにおける免疫寛容の破綻が、胸腺内P0発現低下に起因することを証明するものである。

CIDPと考えられた症例（63歳、女性）遺伝子検索を行い、DGGE法にてP0遺伝子のThr124Metヘテロの異常を確認した。

ヒトの遺伝性ニューロパチーはpoint

mutationによるものが多く、マウスのように完全なヘテロにはならない。ただあるmutationにおいては異常タンパクの種類や発現場所、MHCとのavidityなどによっては、マウスと類似の発症機序が働くのではないかと考えられる。つまりヒトにおいても自己抗原の発現異常が自己免疫応答を促進する可能性があるのではないかと思われる。

P0+/-マウスでは、胸腺内P0発現低下に伴うnegative selectionの欠陥がある。このような免疫寛容の破綻が、P0+/-マウス自然発症神経炎の原因となっている可能性が高いと考えられる。また、今回検討した症例は臨床経過、電気生理学的検査結果や治療反応性など、いずれもCIDPに合致し、遺伝子検索によらなければCIDP-variantとされていたものである。このようにCIDP症例の中に背景に遺伝子異常を持つ症例が潜在的に存在するものと思われる。自己免疫疾患の発症リスクを高める因子としての自己抗原胸腺内発現低下は、多くの病態で検討されるべきである。

### 4) 天疱瘡モデルマウスより分離された疾患誘導性モノクローナル抗体のエピトープ解析

天疱瘡の表現型をもつモデルマウスより、8クローンの抗Dsg3 mAb (AKシリーズ)を単離した。すべてのクローンのアイソタイプは重鎖がIgG1で軽鎖が $\kappa$ であった。マウスDsg1と反応したAK1を除いて、全てDsg3にのみ反応性を有していた。

得られたAK mAbのハイブリドーマ細胞をRag2-/-マウスの腹腔に接種したところすべての抗体において、in vivoで表皮細胞表面への沈着を認めた。しかし、AK23ハイブリドーマを接種したRag2-/-マウスのみにおいて、接種後約7-10日で被毛の脱毛が認められ、病理学的に硬口蓋粘膜で尋常性天疱瘡に特徴的な、基底層直上の水疱形成が認められた。さらに、急激な体重減少を認めた。他のmAbでは十分な腹水の貯留が認められたのにもかかわらず、肉眼的に被毛の脱毛、体重減少、病理組織学的に基底層直上の水疱形成は認められなかつ

た。

次に、これらの AK mAb のエピトープ解析を行った。Dsg3 と Dsg1 の種々のスワッピング分子、および点突然変異分子を用いた免疫沈降法により、AK23 のエピトープは Dsg3 のアミノ酸 V3、K7、P8、D59 に存在することが示された。他の、疾患を明らかに誘導しない AK mAb は、Dsg3 細胞外領域中央部あるいは C 末の膜に近い領域を認識していた。

Dsg3 のアミノ酸配列を結晶構造解析からその立体構造が明らかにされている C-カドヘリンの構造に重ね合わせると、カドヘリン分子同士が接着している接着面を形成するアミノ酸は、E1 から P8、P20、K23、T25、S26、D27、D59 である。これらのアミノ酸の中で Dsg3 と Dsg1 の間で保存されていないものは、おそらくデスマグレインの接着特異性を決定するもので、V3、K7、P8、T25、そして D59 である。驚くべきことに疾患誘導性を示した AK23 のエピトープ (V3、K7、P8、D59) は、これら Dsg3 特異的接着面を形成するアミノ酸に一致していた。

分子上の病原性ホットスポットを直接的に障害することは、細胞接着におけるデスマグレイムの役割や、天疱瘡における水疱形成の分子機構の解明への重要な手がかりとなる。さらに、病原性あるいは非病原性の抗 Dsg3 mAb は角化細胞の増殖や分化を研究する上で重要なツールになるものと考えられる。また診断的には、病勢の明確な基準となりうる、単一エピトープに対する ELISA 法の開発も可能であると考えられる。治療においては、Dsg3 上の病原性ホットスポットの解明は天疱瘡の抗原特異的血漿交換療法や抗原特異的 B 細胞除去などの標的療法の開発に有用であると考えられる。

## 5) 抗 Dsg3 抗体トランスジェニックマウスの作成

AK7 の H 鎖及び L 鎖の可変領域を持つトランスジェニックマウスが作成された。トランスジェニックマウスでは、B 細胞の割合の若干の減少を認めたものの Dsg3 に反応性を示す IgM<sup>+</sup> 陽性の B 細胞を骨髄のみならず、末梢リンパ臓器である脾臓およびリンパ節に認めた。さらに、これらのトランスジェニックマウスの口蓋には IgM<sup>+</sup> の沈着を認めた。さらに、血中にも Dsg3 に特異的な抗体を分泌していることも認められた。

末梢抗原に対する B 細胞のトレランスは未だ議論の多いところである。今回 Dsg3 に対するトランスジェニックマウスを作成したが、今までの議論によるとおそらく clonal deletion を受けるか anergy が誘導され自己反応性の B 細胞は脾臓中に認められないと考えられたが、両鎖のトランスジェニックマウスにおいては脾臓中に Dsg3 と反応する B 細胞が認められ、血中抗体価も陽性であり、口蓋にも抗体の沈着が見られた。これらのことから、Dsg3 反応性 B 細胞では、あきらかな免疫寛容による反応性の制御が認められない可能性が示唆された。今後、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスとの交配を行い Dsg3 存在下、非存在下における Dsg3 反応性 B 細胞の動態を比較検討し、Dsg3 に対する B 細胞免疫寛容獲得の機序をさらに解析する予定である。

6) 天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析  
バキュロウイルスを用いて発現させた rmDsg3 および大腸菌で発現させた rmDsg3-1~9 はいずれも 1 mg 以上を精製することができた。

## 6) 天疱瘡モデルマウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析

Schedule①で免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>マウスで、脾臓を用いた場合いずれの T-STIM™濃度でも安定して rmDsg3 に対する T 細胞の反応が得られた。これらの反応はマウス MHC クラス II に対するモノクローナル抗体の添加により抑制された。ただし、膝窩リンパ節、単径リンパ節では rmDsg3 に対する T 細胞の反応は検出できなかった。今回いくつかの免疫培養条件で低いながらも mDsg3 に対する特異的な T 細胞の反応が得られた。今後これらスケジュールを用いて限界希釈法により mDsg3 特異的な T 細胞クローン株の樹立および解析をめざす予定である。

7) 天疱瘡モデルマウスを用いた免疫

## 抑制療法評価系の確立

Prednisolone、Dexamethasone、Cyclophosphamide の3種の薬剤の評価では、Prednisolone の効果はマウスでは乏しく、Dexamethasone が、臨床症状を改善させ抗体価を下げ、生存率を上げることが確認された。Cyclophosphamide を投与したマウスは、抗体価は下がるものの、臨床的改善をあまり認めなかった。

天疱瘡モデルマウスは、抗 CD40L 抗体の予防的効果を評価するのに有用であった。移植後の血中抗 Dsg3 抗体価の推移を ELISA 法により測定したところ、移植 14 日後にコントロール群では抗 Dsg3 抗体産生を確認し、その後も抗 Dsg3 抗体産生は継続したのに対し、抗 CD40L 抗体投与群においては 66 日間の観察期間を通じて抗 Dsg3 抗体産生は著しく抑制されていた。また、ELISPOT 法により移植後 28 日における脾臓、骨髄およびリンパ節における抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞数を検討したところ、コントロールマウスの脾臓およびリンパ節では抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞が多数検出されたが、抗 CD40L 抗体投与マウスにおいてはほとんど検出されなかった。さらに抗 CD40L 抗体投与マウスの口蓋粘膜上皮において上皮細胞間への IgG 抗体の沈着および病理組織学的に PV に特徴的な基底層直上での棘融解は認められなかった。コントロール群では移植 2 週間後から口腔内水疱による摂食障害が原因と考えられる体重減少が認められたが、抗 CD40L 抗体投与群においては体重減少だけでなく PV モデルマウスに特徴的な休止期脱毛も認められなかった。

## 8) 天疱瘡モデルマウスの超微形態解析

AK23 接種マウスの超微形態の観察と、後包埋免疫電顕法を用いた AK23 結合部位の生体内での局在部位を解析することで、AK23 の標的エピトープのマウス表皮細胞での微細局在の解析をおこなった。その結果、AK23 接種マウスは表皮基底細胞の墓石状配列、半割デスモゾーム (Half-DM) の形成などの電顕的に PV に特徴的な表現

型を誘導することが認められた。また免疫電顕から AK23 は、非棘融解部ではデスモゾーム (DM) の接着板間に、棘融解部では Half-DM の細胞外領域に特異的な局在を認めた。さらに、AK23 は Half-DM の免疫二重染色法から、DM 裏打ち蛋白の Desmoplakin およびケラチン線維と共に局在した。DM 内での超微局在部位の統計学的解析から、AK23 は DM の接着板間 (幅約 30nm) の中央に存在する細胞間結合層付近に局在のピークを、Half-DM の細胞外領域では細胞膜から 16nm 付近に局在のピークを認めた。すなわち、AK23 は水疱形成誘導能を有した MAb であり、その病原エピトープは、DM 接着板間の中央に局在していると考えられた。以上から、向かい合う Dsg3 分子は細胞間結合層において N 末端部分でわずかに重なり合い結合していると考えられ、この部位に IgG が結合することで、Dsg3 分子間の接着阻害が引き起こされ、ケラチン退縮を伴わずに棘融解が誘導されると示唆された。

## 9) 天疱瘡モデルマウスにおける抗原 3 次元エピトープの解析

マウス Dsg3 の細胞外領域の N 末側 1/3、2/3、C 末側 1/3、2/3 を有した分子に対する反応を、免疫後の脾細胞を移植した天疱瘡モデルマウス 28 例、ナイーブ脾細胞を移植した天疱瘡モデルマウス 32 例を用いて検討した。競合的 ELISA において吸収率 50%以上を有意な値とした場合、免疫後の脾細胞を移植したモデルマウスでは、マウス Dsg3 の C 末アミノ酸 163-614 が 27/28 例 (96.4%) で有意な吸収率を示し、平均吸収率は 80.3%であった。ナイーブ脾細胞を移植して作成したモデルマウスでは、マウス Dsg3 の C 末アミノ酸 163-614 が 24/32 例 (75.0%) で有意な吸収率を示し、平均吸収率は 69.6%であった。

ヒト PV 患者血清を用いて同様の検討をした結果では、カドヘリン型接着分子の細胞間接着に不可欠といわれる N 末 1/3 アミノ酸の吸収率が有意に高いが、モデルマウスでは C 末 2/3 アミノ酸の吸収率が有意に高かった。モデルマウスにおいては、Dsg

のアイソフォーム間で相同性の低いC末領域に対する抗体がより効率よく産生される傾向にあることがわかる。逆にヒト天疱瘡においては、アイソフォーム間の相同性が高く、かつ接着機能上重要なN末の領域に高率に自己抗体が産生されており、抗体産生機序の違いを反映しているものと考えられる。

#### 10) 天疱瘡自己抗体の *in vitro* 病的活性測定法の開発

*in vitro* 病的活性測定法に用いる細胞として、デスマグレインはお互いのアイソフォームの細胞間接着機能を補い合っていると考えられるため、Dsg1とDsg3は強く発現しているがDsg2の発現の低い正常ヒト表皮由来の培養ケラチノサイトを使用した。また、Dsg1を特異的に分解するために、Exfoliative Toxin Aで処理をした。各種抗体、血清で処理をした後、ピペットにより細胞シートに機械的ストレスを加えた後、分裂した細胞シート片の数を比較した。病的活性を持つ抗Dsg3抗体、AK23、病的活性を持たない抗Dsg3抗体AK18、Dsg3に対する反応性を示さない抗体AK7を比較すると、AK23で処理をした細胞シートのみばらばらに分裂し、抗Dsg3抗体のなかでも病的活性を持つ抗体のみを検出できることが明らかになった。また、尋常性天疱瘡の患者3名の活動期と寛解期の血清を比較すると、活動期の血清で処理した細胞シートは、寛解期で処理した細胞シートよりも約2.1から18.5倍多くの細胞片に分裂していた。以上の結果により、この検査法は、天疱瘡自己抗体の病的活性を測定する簡便で客観的な測定法となると考えられ、天疱瘡の水疱形成、Dsgを介する細胞間接着のメカニズムを解明する手段となりうると考えられた。

#### E. 結論

本研究の目的は、自己抗原ノックアウトマウスを用いた新しい方法により実際の病態にできるだけ近い自己免疫モデルマウスを作成し、作製されたモデルマウスを用いて、自己免疫疾患の発症機構および病態の

解明、治療法評価系の確立、疾患特異的治療法の開発をする事である。自己免疫性皮膚疾患である尋常性天疱瘡のモデルマウスより、疾患誘導性、非誘導性のモノクローナル抗体を単離することができ、*in vivo*においてDsg3と結合できるIgG抗体はすべて等しく水疱形成を誘導するわけではなく、病的活性が異なることが明らかにされた、さらに、それらの抗体の三次元エピトープを比較検討したところ、疾患誘導性のモノクローナル抗体は標的抗原であるデスマグレイン3分子の機能上重要なカドヘリン接着面に結合し、疾患非誘導性のモノクローナル抗体は機能上重要でない領域に結合したことが示され、自己抗体により疾患誘導性の強度が異なるのは、エピトープの違いにより少なくとも部分的には説明できることが明らかとなった。モデルマウスを用いた解析により、天疱瘡の水疱形成分子メカニズムの一端が解明されたことになる。5つあるムスカリン性アセチルコリン受容体のうちM2及びM3受容体ノックアウトマウスおよびダブルノックアウトマウスが作成され、コリン性の平滑筋収縮の生理的意義に関して新たな知見が得られた。さらに、M2及びM3受容体ノックアウトマウスの脾細胞移植によりシェーグレン症候群モデルマウスの作成が試みられており、期待できる結果が得られている。末梢神経ミエリン主要蛋白であるP0蛋白は、Charcot-Marie-Tooth病の責任遺伝子となっているが、P0+/-マウスではP0に対する免疫寛容が部分的に破綻しているため、慢性炎症性脱髄性多発神経炎に類似した炎症性神経炎を生じることを明らかにした。さらに、慢性炎症性脱髄性多発神経炎患者の中に、実際にP0遺伝子の変異があることを明らかにした。モデルマウスを用いた治療評価系として、ステロイド療法の効果を検討するとともに、抗CD40リガンド抗体が予防的投与により著明な効果を示すことが明らかにされた。さらに、天疱瘡抗原蛋白に特異的に反応するB細胞トランスジェニックマウスが作成され、Dsg3特異的B細胞はトレランスによる除去を回避している可能性が示唆された。また、抗原特異

的治療法の開発に向けて、天疱瘡抗原反応性T細胞の単離が試みられている。3年計画の1年目として準備を整えることができ、次年度以降のさらなる成果が期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

英語論文 37 編

1. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker E, and D. Zillikens. Increased incidence of pemphigus vulgaris in Southern Europeans living in Germany compared to native Germans. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 16:68-71, 2002.
2. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, and Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. **Br J Dermatol** 147:261-265, 2002.
3. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Umezawa A, Hata J, and Nishikawa T. Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 118:199-204, 2002.
4. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol** 32:627-633, 2002.
5. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, and Stanley JR. Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. **J Invest Dermatol** 118:845-850, 2002.
6. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, and Sugai M. Identification of *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect Immun** 70:5835-5845, 2002.
7. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, and Stanley JR. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 110:53-60, 2002.
8. Amagai M. Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. **Keio J Med** 51:133-139, 2002.
9. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, and Hashimoto K. Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. **J Invest Dermatol** 119:1224-1230, 2002.
10. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, and Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-232, 2002.
11. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. The ultrastructural changes of mice actively producing antibodies to desmoglein3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch Dermatol Res** 294:318-323, 2002.
12. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. **J Am Acad Dermatol** 48:244-252, 2003.
13. Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: An implication for gene therapy. **J Invest Dermatol**:in press, 2003.
14. Nagata Y, Velez AMA, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, and Hashimoto T. Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of

- endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol Sci**:in press, 2003.
15. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol** 170:2170-2178, 2003.
  16. Watabe, K., T. Sakamoto, Y. Kawazoe, M. Michikawa, K. Miyamoto, T. Yamamura, H. Saya and N. Araki. Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. **Neuropathology** (in press)
  17. Miyamoto, K., S. Miyake, M. Schachner, and T. Yamamura: Heterozygous Null Mutation of Myelin Protein Zero (P0) Enhances Susceptibility to Autoimmune Neuritis Targeting P0 Peptide. **Eur. J. Immunol.** 33: 656-665, 2003
  18. Araki, M., T. Kondo, J.E. Gumperz, M.B. Brenner, S. Miyake and T. Yamamura: Th2 bias of CD4<sup>+</sup> NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. **Int. Immunol** 15: 279-288, 2003
  19. Bedoui, S., N. Kawamura, R.H. Straub, R. Pabst, T. Yamamura, and S. von Horsten: Review. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. **J. Neuroimmunol** 134: 1-11, 2003
  20. Kondo, T., K. Takahashi, N. Kohara, Y. Takahashi, S. Hayashi, H. Takahashi, H. Matsuo, M. Yamazaki, K. Inoue, K. Miyamoto, and T. Yamamura: Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease): Three genetic forms. **Neurology** 59: 1105-1107, 2002
  21. Gumperz, J.E., S. Miyake, T. Yamamura, and M.B. Brenner: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **J. Exp. Med.** 195: 625-636, 2002
  22. Miyamoto, K., N. Oka, T. Kawasaki, S. Miyake, T. Yamamura, and I. Akiguchi: new cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. **Muscle and Nerve** 25 : 280-282, 2002.
  23. Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, and Koyasu S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. **Nat Immunol** 3:875-881, 2002.
  24. Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata Ji J, and Koyasu S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. **Nat Immunol** 3:295-304, 2002
  25. Shinoda M, Shimazu M, Matsuda S, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kamei S, Koyasu S, and Kitajima M. c-Jun N-terminal kinase activation during warm hepatic ischemia/reperfusion injuries in a rat model. **Wound Repair Regen** 10:314-319, 2002.
  26. Piccolo D, Soyer HP, Burgdorf W, Talamini R, Peris K, Bugatti L, Canzonieri V, Cerroni L, Chimenti S, De Rosa G, Filosa G, Hoffmann R, Julis I, Kutzner H, Manente L, Misciali C, Schaeppi H, Tanaka M, Tyler W, Zelger B, Kerl H: Concordance between telepathologic diagnosis and conventional histopathologic diagnosis: a multiobserver store-and-forward study on 20 skin specimens. **Arch Dermatol** 138:53-58,2002
  27. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, and Ikeda Y. Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is a sensitive and specific test for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. **Am J Med.** In press.
  28. Kuwana M, Sato S, Kikuchi K, Kawaguchi Y, Fujisaku A, Misaki Y, Hatamochi A, Kondo H, and Takehara K. Evaluation of functional disability using the Health Assessment Questionnaire in Japanese patients with systemic sclerosis. **J Rheumatol.** In press.
  29. Kuwana M, Kawakami Y, and Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb-IIIa by blockade of



CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. **Blood** 101: 621-623, 2003.

30. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. **Hum Immunol**. 2002; 63(12): 1156-1163.
31. Kuwana M, Kimura K, and Kawakami Y. Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. **Arthritis Rheum**. 2002; 46(10): 2742-2747.
32. Kuwana M, Kimura K, Hirakata M, Kawakami Y, and Ikeda Y. Differences in anti-Th/To autoantibody response between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. **Ann Rheum Dis**. 2002; 61(9): 842-846.
33. Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, and Ikeda Y. Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. **Arthritis Rheum**. 2002; 46(8): 2148-2159.
34. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, and Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. **J. Immunol**. 2002; 168(7): 3675-3682.
35. Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y, and Kuwana M. Restricted T cell receptor b-chain usage by T cells autoreactive to b2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. **Blood**. 2002; 99(7): 2499-2504.
36. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, and Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. **J. Immunol**. 2002; 168(7): 3675-3682
37. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang

J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. **J Neurosci** 2002 Dec 15;22(24):10627-10632

#### 日本語論文

1. 天谷雅行: ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) におけるデスモグレイン1の関与. **臨床皮膚科** 56: 58-61, 2002
2. 天谷雅行: 天疱瘡と Dsg3 ノックアウトマウス. **Annual Review 2003 免疫**: 280-285, 2002
3. 天谷雅行: 表皮細胞接着と皮膚疾患. **日本皮膚科学会雑誌** 112: 1569-1575, 2002
4. 三宅幸子、山村 隆: NKT 細胞と実験的自己免疫性脳脊髄炎. 免疫病研究の最先端. 分子制御というアプローチ. **Mebio** 19:61-67, 2002
5. 荒木 学、高橋 和也、山村 隆: 多発性硬化症における NK 細胞、NKT 細胞の関与. **神経内科** 56:312-318, 2002
6. 山村 隆: NKT 細胞と新しい自己免疫病治療薬. **Medical Science Digest** 28:306-307, 2002
7. 宮本勝一、三宅幸子、山村 隆: 糖脂質による自己免疫病の制御. **感染・炎症・免疫** 32: 200-201, 2002
8. 山村 隆、宮本勝一、長山成美、三宅幸子: NK・NKT 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症制御. 蛋白質核酸酵素増刊号「免疫研究の最前線: 高次複雑系免疫システムの包括的理解をめざして」47: 1115-1120, 2002
9. 宮本 勝一、三宅 幸子、山村 隆: 自己免疫性脳脊髄炎に対する NKT 細胞糖脂質リガンド療法. **神経免疫学** 10:209-211, 2002

#### 学会発表 (代表的なもの)

1. Amagai M. Breakdown of cell-cell adhesion in pemphigus. **New Surface**

- Barrier Immunology Study Group, 2nd International Mucosal Immunology Meeting, Awajishima. 2002. 1. 25-26
2. Aoki M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Tanaka S, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. Blockade of CD40/CD40L Interaction Has Therapeutic Benefits in Pemphigus Vulgaris Mouse Model. The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles. 2002. 5. 15-18
  3. Nishifuji K, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Fudaba Y, Sugai M, Stanley JR, and Amagai M. Exfoliative Toxin B and Newly Identified Exfoliative Toxin D Both Specifically Target Desmoglein 1. The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles. 2002. 5. 15-18
  4. Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Prevention of immune response against transgene product by the blockade of CD40-CD40L interaction in a model of recessive genodermatosis. The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles. 2002. 5. 15-18
  5. Tsunoda K, Aoki M, Ota T, Nagai T, Yamada T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. A pathogenic anti-desmoglein3 monoclonal antibody recognizes N-terminal adhesive region of desmoglein3. The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles. 2002. 5. 15-18
  6. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Sugai M, Yamaguchi T, Fudaba Y, Nishifuji K, Amagai M, and Stanley JR. Molecular Mechanisms for Specific Cleavage of Desmoglein 1 by Exfoliative Toxins., The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles. 2002. 5. 15-18
  7. Anzai H, Aoki M, Tsunoda K, Ota T, Fujii Y, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. Development of pemphigus vulgaris mouse model by adoptive transfer of naive lymphocytes from Dsg3 knockout mouse. The 63rd Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Los Angeles. 2002. 5. 15-18
  8. Amagai M. Immune response in experimental murine pemphigus. International Meeting on bullous diseases, Groningen, the Netherlands. 2002. 6. 28-29
  9. Ishiko A, Shimizu A, Ota T, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T. Immunoelectron microscopic analysis of pemphigus vulgaris mouse model. The 4th joint meeting of the society for cutaneous ultrastructure research and the Japanese society for ultrastructural cutaneous biology, Limoges, France. 2002. 6. 28-29.
  10. Sjimizu A, Ishiko A, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T. A pathogenic anti-Dsg3 monoclonal antibody binds along the dense mid-line of desmosomes. The 4th joint meeting of the society for cutaneous ultrastructure research and the Japanese society for ultrastructural cutaneous biology, Limoges, France. 2002. 6. 28-29.
  11. Ota T, Amagai M, and Nishikawa T. No involvement of IgG autoantibodies against desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus. 20th World Congress of Dermatology, Paris. 2002. 7. 1-5
  12. Ishiko A, Yoshida R, Shimizu A, Amagai M, and Nishikawa T. Generalized argyria due to "Jintan" silver pills for breath freshener. 20th World Congress of Dermatology, Paris. 2002. 7. 1-5
  13. Amagai M. New concept in acquired bullous diseases (Plenary Lecture). 20th World Congress of Dermatology, Paris. 2002. 7. 1-5
  14. Amagai M. New Diagnostic methods: ELISA in pemphigus (Symposium). 20th World Congress of Dermatology, Paris. 2002. 7. 1-5
  15. Chen K-R, Kobayashi M, and Amagai M. Pemphigus vegetans of Hallopeau: report of a case showing close correlation between disease activity and desmoglein 3 ELISA titer. 23rd Symposium of the the International Society of Dermatopathology, Berlin. 2002. 9. 12-14
  16. Amagai M. Understanding pemphigus pathophysiology: from molecules to mice to man. The 27th M. H. Samitz Lecture,

- Philadelphia. 2002. 11. 7
17. Nishifujii K, Amagai M, Ota T, Nishikawa T, and Iwasaki T. Immunoreactivity of antibodies in human and canine pemphigus vulgaris with the extracellular domains of canine desmoglein3 produced by baculovirus. The 1st Asian Veterinary Dermatology Meeting, Taiwan. 2002. 11. 9-11
  18. Amagai M. Pemphigus model mice by adoptive transfer of autoantigen knockout lymphocytes. COE International Symposium on Recent Advances of Basic and Clinical Neuroimmunology, Nagasaki. 2003. 3. 12-13
  19. Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura: Prevention of autoimmune ecephalomyelitis by a novel glycolipid ligand for natural killer T cells. Experimental Biology 2002, New Orleans, Louisiana, April 23, 2002
  20. Koike, F., T. Kondo, T. Fukazawa, and T. Yamamura: Immunomodulatory effects of interferon (IFN)-b1b. cDNA microarray analysis of peripheral blood T and non-T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2<sup>nd</sup> Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002
  21. Chiba, A., T. Yamamura, K. Miyamoto, and S. Miyake: A new synthetic glycolipid OCH prevents collagen-induced arthritis by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2<sup>nd</sup> Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002
  22. Araki, M., T. Kondo, and T. Yamamura: Th2 bias of CD4+ NKT cells in multiple sclerosis. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2<sup>nd</sup> Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002
  23. Miyake, S., A. Chiba, M. Mizuno, and T. Yamamura: A synthetic glycolipid OCH prevents collagen induced arthritis and diabetes in NOD mouse by inducing Th2 bias of NKT cells. CD1 & NK T cell Workshop. 2<sup>nd</sup> International Workshop on CD1 antigen presentation and NK T cells. Woods Hole, MA, USA, Nov 6, 2002
  24. Pyz, E., O. Naidenko, S. Miyake, T. Yamamura, S. Cardell, M. Kronenberg, and

T. Herrmann: Investigation on CD1d restricted rat T cells. CD1 & NK T cell Workshop. 2<sup>nd</sup> International Workshop on CD1 antigen presentation and NK T cells. Woods Hole, MA, USA, Nov 7, 2002

#### G. 知的所有権の取得状況

特許取得 2 件

1. 特許第 3326770 号 (2002/6/16)  
 名称: 「自己免疫疾患モデル動物」  
 発明者: 天谷雅行、西川武二、鈴木春巳、小安重夫  
 出願人: 慶應義塾  
 出願番号: 特願 2000-607462  
 出願日: 2000/03/30
2. 特許第 3306625 号 (2002/4/11)  
 名称: 「自己免疫疾患モデル動物の作製方法」  
 出願番号: 特願 2001-156126 号  
 発明者: 天谷雅行、西川武二、小安重夫  
 出願人: 慶應義塾  
 出願日: 2001/05/24

特許出願 1 件

1. 出願番号: 特願 2001-267653 号  
 国際特許出願: PCT/JP02/08987  
 名称: 「天疱瘡モノクローナル抗体」  
 発明者: 角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫  
 出願人: 慶應義塾  
 出願日: 2001/09/04

### Ⅲ. 分担研究報告