

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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 15 年度研究報告書

平成 16 (2004) 年 3 月

主任研究者 天 谷 雅 行

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成15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. 平成15年度分担研究報告書	
ノックアウトマウスを駆使したムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析	23
東京大学医科学研究所 神経ネットワーク分野 助手 松井 稔	
ムスカリン性アセチルコリン受容体を標的とした自己免疫反応の誘導	30
慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学 教授 小安 重夫	
Apolipoprotein E (Apo E) ノックアウトマウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の増強	34
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	
受動免疫による Guillain-Barré 症候群モデルマウス作製の試み	40
獨協医科大学 神経内科 助教授 結城 伸泰	
天疱瘡モデルマウスにおける水疱発生のメカニズム免疫電顕的解析	44
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 石河 晃	
ナイーブ脾細胞移植による天疱瘡モデルマウスを用いた抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離及び解析	49
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析	58
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価	60
慶應義塾大学医学部 皮膚科 教授 西川 武二	
Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウスを用いた B 細胞免疫寛容獲得機序の解析	68
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.....	73
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	
天疱瘡自己抗体病的活性の in vitro デジタル測定法の開発	78
慶應義塾大学医学部 皮膚科 助教授 田中 勝	
新規デスモグレイン Dsg4 に対する天疱瘡血清の反応性についての検討	83
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.....	87
V. 平成15年度班会議プログラム.....	97

I. 平成15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
	結城伸泰	獨協医科大学神経内科	助教授
	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	鈴木 文子	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 03-5363-3879 fax03-03-5363-3610 E-mail : fumiko.suzuki@adst.keio.ac.jp	係主任

Ⅱ. 平成 15 年度総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

平成 15 年度総括研究報告書

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のリンパ球移植による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、各アイソタイプのアセチルコリン受容体ノックアウトマウスの詳細な解析が進み、M2 ノックアウトマウスの脾細胞移植により、心筋内へのリンパ球浸潤が確認され、自己免疫性心筋炎モデルマウス作成が試みられている。リポ蛋白の主要な構成成分で脂質運搬に関与する Apo E のノックアウトマウスでは、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導すると、特定の自己抗原エピトープに対する応答のみが亢進することが明らかにされ、アポ E 多型と疾患感受性の関係が明らかにされた。ギラン・バレー症候群の標的抗原である GM1 の合成酵素を欠失した GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスを用いて、ギラン・バレー症候群モデルマウスの作成が試みられている。ナイーブ脾細胞移植により作成された尋常性天疱瘡モデルマウスより、新たに 10 種の天疱瘡抗原 (Dsg3) に対するモノクローナル抗体が単離され、単独で病原性を示さないクローンを複数組み合わせることにより病原性を獲得することが明らかにされ、疾患病態生理分子メカニズムの解明に貢献した。天疱瘡抗体の病原性強度に関する新たな測定法として、初代培養角化細胞を用いた dissociation assay 法を開発した。また、Dsg3 の胸腺組織で発現様式が初めて蛋白レベルで検出され、T細胞レベルの免疫寛容獲得機構の解明に向けて有用な知見を示した。天疱瘡モデルマウスを用いて、既に自己免疫疾患の治療に使用されている 7 種の薬剤の効果を検討するとともに、抗 CD40 リガンド抗体療法の治療的投与の効果の評価を行い、同モデルマウスが評価判定に有用であることが確認された。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進めている。毛嚢に発現する新しいデスモグレインのアイソフォーム Dsg4 明らかになり、自己免疫脱毛症モデルマウスの作成が期待されている。当研究班は難治性疾患克服研究事業の中で横断的研究班として、種々の自己免疫疾患モデルマウスの作成を試みるとともに、臨床還元のできる研究の方向性を最初に作成された天疱瘡モデルマウスを用いて提示している。

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
結城伸泰	獨協医科大学神経内科助教授
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

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

当研究施設での解析のみならず、国内外の多くの研究施設の協力を得て、多方面に渡る表現型解析を行う。マウスは全て分担研究者によって同一のストラテジーのもと作出された。目的に応じて C57BL/6J あるいは DBA/2J にバッククロスされたマウスを用いる。

2) ムスカリン性アセチルコリン受容体を標的とした自己免疫反応の誘導

松井らによって作製された M2 ノックアウトマウスと M3 ノックアウトマウスを C57BL/6 マウスに最低 8 代の戻し交配をした後にヘテロザイゴート同士の交配によって得られたノックアウトマウスを用いた。

「自己抗原ノックアウトマウスを用いた新たな自己免疫疾患モデル動物の作製法」に

おいて用いる rag-2 ノックアウトマウスは真貝らによって作製された rag-2 ノックアウトマウスを C57BL/6 マウスに 12 代戻し交配をした後にヘテロザイゴート同士の交配によって得られたノックアウトマウスを用いた。免疫源として、N 端にグルタチオン S 転フェラーゼ (GST) タグを付加したマウス M2 の細胞外第 2 ループならびに M3 の N 端部分細胞外ドメインをリコンビナント分子として発現精製したものを用いた。

3) 自己免疫性神経炎モデルマウスの作成及び解析

実験には C57BL/6N マウスおよび、同背景を持つ Apo E KO マウスを用いた。EAE の誘導には MOG35-55 ペプチドを用い、常法通りに完全フロイント・アジュバントと混和した emulsion を皮下に接種した。また、免疫直後および 48 時間後に百日咳毒素 (PT) を静脈内投与した。EAE の臨床評価には、0-5 までの 6 段階評価スコアを用いた。

細胞性免疫応答の解析には、感作後 10 日目の所属リンパ節細胞を用い、96 穴丸底プレートに添加し MOG35-55 ペプチドで 2-3 日間刺激した。細胞増殖反応は培養終了前 18 時間におけるチミジンの取込みにより評価した。また、培養開始後 40 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法によりインターフェロン・ガンマ (IFN- γ) および IL-4 を測定した。

ペプチド感作後 10 日目および 64 日目にマウス血液を採取し、ペプチドに対する抗体価を測定した。未感作マウスにおける MOG35-55 反応性 T 細胞を検出するためには、抗原で感作したマウスのリンパ節細胞を放射線照射した後に抗原提示細胞として利用した。

4) ギラン・バレー症候群モデルマウス作製及び解析

本年度は、3 つの方法を用いて、発症の有無、および免疫染色による神経病理組織学的変化を検証した。

1. Fc γ R IIb ノックアウトマウスへの GBS

患者抗体静注による試み

Fc γ R IIb は免疫抑制性モチーフを持つことから、この受容体をノックアウトすることによりエフェクター機構の活性化が得られる。抗 GM1 抗体として患者抗体を移入し、その抗体へのマウス抗体を産生させることで Fc γ R IIb ノックアウトマウスでみられるエフェクター機構の過剰活性化を利用する。

2. ヌードマウスへの抗 GM1 抗体産生ハイブリドーマ腹腔内移植による試み

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウス (B6 系) は GBS の標的分子である GM1 を含む複合型ガングリオシドを発現していない。*C. jejuni* のリポオリゴ糖を感作し、抗 GM1 抗体の上昇が見られた個体から、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株を樹立した。このハイブリドーマを NK 細胞と胸腺を発現していないヌードマウスの腹腔に接種し、経過を観察し、腹水中および血中の抗体価を ELISA 法にて測定した。ELISA 法はスクリーニングとして一律に、GM1 を固相化し、カゼイン PBS に 500 倍希釈した血清を 4℃にて一晩置き 1000 倍希釈した二次抗体を用いて測定した。脊髄神経根・馬尾神経を取り出し、神経根に結合する IgG の有無を光学顕微鏡で観察した。

3. 自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫疾患モデル動物の作製法による試み

前述の GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスを *C. jejuni* のリポオリゴ糖を 2 週に一度感作し、抗体価の上昇が得られた個体の脾細胞を取り出し、*rag-2* ノックアウトマウスに 10^7 の脾細胞を眼窩静脈叢より注射し経過を観察した。

5) 天疱瘡モデルマウスにおける水疱発生のメカニズム免疫電顕的解析

in vivo で結合している IgG と裏打ちタンパクの一つデスマブラキン(DP)に着目し、その超微細局在を後包埋金コロイド免疫電顕法にて詳細に解析した。

6) ナイーブ脾細胞移植による天疱瘡モデルマウスを用いた抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離および解析

生後 6~10 週齢のナイーブ Dsg3 $^{-/-}$ マウス脾細胞 (5×10^7 /マウス) を C57BL/6 Rag2 $^{-/-}$ の尾静脈より移植し、天疱瘡モデルマウスを作成した。PV 表現型を発症した PV モデルマウスの脾細胞と、マウス骨髄腫細胞種 (P3) を 5:1 で細胞融合しハイブリドーマを作成した。

mAb の病原性を評価するために新生仔マウスへの受動免疫を行った。mAb 単独 (75-200 μ g/mouse)か、あるいは硫酸アンモニウム沈殿にて得られた、それ自身では水疱形成を誘導しない程度の、少量の PF 患者血清と同時に生後 12-24 時間の新生仔マウス・ICR マウスに投与した。投与後 18-24 時間で肉眼的、さらに顕微鏡的に微少水疱形成を観察した。さらに、成熟マウスにおける mAb の病原性を検討するためにハイブリドーマの腹腔内接種を用いる方法にて検討した。C57BL/6 Rag2 $^{-/-}$ マウスの腹腔内へ接種し、マウスにおける被毛の脱毛と体重の推移および腹水の形成 (腹部の膨隆度) を観察した。マウスが表現型を呈した時点、あるいは接種後 14 日経過し腹水の形成が認められた時点で、口腔粘膜および皮膚より生検を施行し、病理組織学的にヘマトキシリン・エオジン染色にて免疫組織学的に直接蛍光抗体にて検討した。同様に各 NAK mAb 数種をさまざまな組み合わせで接種し表現型誘導の有無を確認した。

7) マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析

野生型成熟マウスおよび、対照として Dsg3 ノックアウトマウスの胸腺を摘出し、凍結切片、パラフィン包埋切片を作製した。既存の抗マウス Dsg3 抗体および、我々の既に作成したモノクローナル抗体を反応させ、免疫組織化学染色、蛍光抗体法により観察した。

8) 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 dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、

azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate(FK506)and mycophenolate mofetil (MMF) の計 7 種類の効果を天疱瘡モデルマウスを用いて検討した。

また、抗 Dsg3 抗体産生および表現型を示した PV モデルマウスに対して抗 CD40L 抗体を投与し、治療効果を検討した。症状および抗体産生が安定した PV モデルマウスに対して、1 mg の抗 CD40L 抗体 (MR1) あるいは Hamster IgG を週 2 回計 12 回投与した。各群のマウスは MR1 投与開始後 56 日まで観察し、血中抗体価および表現型の変化によって MR1 の治療効果を検討した。

9) B細胞トランスジェニックマウスを用いた免疫寛容獲得機序の解析

抗 mDsg3 IgM 抗体の H 鎖と L 鎖のベクター 7AK-H、7AK-L を H 鎖のみ、もしくは H 鎖、L 鎖を当量混合し、C57BL/6 マウス (Taconic) 受精卵にマイクロインジェクトし、トランスジェニックを作成した。H 鎖のみのトランスジェニックでは 24 匹中 5 匹に PCR にて遺伝子の存在を確認した。また両鎖を含むマウスは 24 匹中 2 匹に確認した。

10) Dsg3 反応性 T細胞の同定および解析

未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を Rag2^{-/-}マウスに移植し PV モデルマウスを作成した。PV 発現型を確認後に採取した脾臓をすりつぶし、ACK lysing buffer (BioWhittaker, Walkersville, MD) を用いた溶血処理により脾細胞を調製した。脾細胞に含まれる T 細胞の ex vivo での rmDsg3-1~5 に対する T 細胞の反応を調べた。さらに、rmDsg3-1~5 による抗原刺激を in vitro で 2 回行うことで得られた T 細胞株の rmDsg3-1~5 に対する特異的反応も検討した。

11) 天疱瘡自己抗体病的活性の in vitro デジタル測定法の開発

デスマグレイン 3 とデスマグレイン 1 を主に発現している正常ヒト表皮由来の培養

ケラチノサイトを使用した。培養ケラチノサイトをコンフルエントの状態まで培養した後、カルシウムを含む培養液に換えることにより、細胞間接着能を誘導し、細胞をシートの状態にする。各種血清、抗体を加え、一晚静置する。実験の二時間前に、exfoliative toxin A を加えることによりデスマグレイン 1 を分解する。Dispase を用いて細胞シートを dish より剥離し、さらに、ピペッティングにより機械的ストレスを与えることにより、細胞シートを分断する。

分断された細胞塊の数を細胞接着阻害活性の指数 (Dissociation Score : DS) として使用した。細胞塊数の計測は、細胞をホルマリン固定し、ピオクタニン染色した後、デジタルカメラで画像を撮影し、画像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェアを使用して、分断された細胞塊の数を計測した。

12) 新規デスマグレイン Dsg4 に対する天疱瘡血清の反応性についての検討

免疫沈降法による患者血清と組換え Dsg4 の反応性を検討した。ヒト頭皮から抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR を行い、Dsg4 細胞外領域をコードする cDNA を単離した。この cDNA を用いてバキュロウイルス発現系で Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を作成した。血清と Dsg4 との反応性の有無に関して、落葉状天疱瘡 (PF) 血清 20 例、粘膜皮膚型尋常性天疱瘡 (PV-MC) 血清 19 例ならびに粘膜優位型尋常性天疱瘡 (PV-M) 血清 16 例を用いて検討した。また組換え Dsg 蛋白を用いた免疫吸着法にて自己抗体を除去後、血清と Dsg との反応性についても検討した。

(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 034062）。

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

1. インスリン分泌における M3 の意義。野生型のランゲルハンス島では、15mM のグルコースで刺激した上に 10 microM のカルバコールで刺激すると、インスリン分泌反応の亢進が観察される。しかしながら、M3 KO マウスから単離したランゲルハンス島では、このカルバコールに対する反応が見られなかった。従って、ランゲルハンス島には M3 が発現しており、インスリン分泌を促進する能力を持っていると考えられる。

2. 平滑筋での heterologous desensitization における M2, M3 の役割。アセチルコリンで前処置しておくこと、PGF2 α による平滑筋収縮が減じることが知られている。これを heterologous desensitization と呼ぶ。M2KO マウスおよび M3KO マウスから摘出した平滑筋ではこのような heterologous desensitization が欠失していた。すなわちこの反応のためには M2 と M3 の両者が共に必要であることが判明した。

3. 胃酸分泌における M3 の意義。M3 KO マウスの胃内 pH は野生型に比べて有意に高かった (5.9 \pm 0.4 vs. 3.0 \pm 0.4)。これは基礎胃酸分泌にとって M3 が必須であることを示す。カルバコールで刺激すると野生型より弱いながらも胃酸分泌は刺激され胃内 pH は低下したため、M3 以外の mAChR (M1?) を介した胃酸分泌は少なくとも外因性の刺激によっては起こり得ることも分かった。

4. M1 および M3 を介するカンナビノイドシグナル伝達増強効果。シナプス後膜を脱分極させると、一過性の IPSC の抑制が起こる (depolarization-induced suppression of inhibition; DSI)。この現象は、内因性カンナビノイドを神経伝達物質とした逆行性シグナル伝達に基づくことが知られている。野生型において、カルバコールはこの DSI を増強する。しかし、M1

KO や M3 KO ではこのカルバコールによる DSI 増強反応が弱くなっており、さらに M1/M3-compound KO では、ほぼ完全に消失していた。従って、M1 と M3 の両者がカルバコールによる DSI 増強効果に相加的に関与していることが明らかとなった。

5. カタレプシー反応における M4 の意義。M4 KO では、ハロペリドールによって引き起こされるカタレプシー反応をスコポラミンで治療できないことが分かった。これは、スコポラミンによる治療効果が M4 を急性にブロックすることにより発揮されることを示唆する。

6. 弛緩性反応修飾における M2 の意義。cAMP 濃度を上昇させるような前処置 (forskolin や isoproterenol による刺激等) をしておくこと M2 を介した収縮作用を検出できるという報告がある。これは cAMP 上昇に伴う弛緩反応に M2 からのシグナルが拮抗するからではないかと考えられていた。本研究では、M2 KO マウスでは、forskolin や isoproterenol による弛緩 (あるいは収縮抑制) 反応がより強く検出されることを見いだした。

2) ムスカリン性アセチルコリン受容体を標的とした自己免疫反応の誘導

我々は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るための第一歩として、神経系に発現する分子を標的とした自己免疫モデルマウスの作製を目指している。具体的には5種類のムスカリン性アセチルコリン受容体の (M1-M5) を標的とした自己免疫モデルマウスの作製を目標としてこの研究を開始した。

5種類の受容体の中で M1, M3, M5 が Gタンパク質の $\alpha_{q/11}$ と共役するのに対し、M2, M4 は α_i と共役する点で違いが見られるなど、機能的な差異も想像されている。そこでまず M2 と M3 に着目した。まず、以下に挙げるいくつかの理由から、M3 を標的としてシェーグレン症候群モデルマウスを作製する試みを行っている。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がある。これはムスカリン性アセチルコリン受容体の中でも M3 が腺組織に多く発現するという事実と矛盾しない。さらに、松井らによって作製された M3 ノックアウトマウスでは唾液の分泌不全によって離乳後の体重減少が観察されている。さらにムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストがシェーグレン症候群の治療薬として認可されたことも M3 が標的の一つである可能性を支持する。したがって、M3 に対する自己免疫反応の誘導によって、自己抗体による M3 機能の障害、あるいは細胞傷害性 T 細胞による炎症誘導などによって腺組織への障害が起きればシェーグレン様の症状が引き起こされることが予想される。

また、心筋におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の発現検討から、95%以上が M2 であることが明らかになっている。この事実は M2 に対する自己免疫反応が誘導された場合には心筋炎などが誘発される可能性を示唆する。そこで M2 に対する自己免疫反応の誘導を試みた。

M2 も M3 も 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。M2 に関しては N 端部位とともに、細胞外第 2 ループの部分を融合タンパク質として発現させた。M2 ならびに M3 ノックアウトマウスにリコンビナント抗原 10 $\mu\text{g}/\text{head}$ 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。この抗体の反応性は、ELISA を行うにあたって十分な GST にて吸収してもなお反応が見られ、細胞外部位

に対する抗体が生産されていると考えられた。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 5×10^7 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。また、血中の抗体値の上昇も見られなかった。しかし、M2 の場合には 2 週間後から心筋内へのリンパ球の浸潤が観察されている。M3 に関しては当初唾液腺内への浸潤が観察されたが、現在再現性を検討中である。

3) 自己免疫性神経炎モデルマウスの作成及び解析

アポリポプロテイン E (Apo E) はリポ蛋白の主要な構成成分で脂質運搬に関与する。Apo E KO に実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、自己免疫性脳炎における Apo E の役割を解析した。

KO マウスも対照の野生型マウス (WT) も、EAE の発症日は同じであったが、WT では麻痺症状が固定するのに対して、KO においては経時的に臨床症状が進行した。なお、最重症臨床スコアを評価したところ、KO では 4.2 ± 0.3 、WT では 2.3 ± 0.2 と、KO で有意な上昇が確認された。また、WT、KO およびヘテロの KO (HT) に EAE を誘導して比較したが、EAE の重症度は $\text{KO} > \text{HT} > \text{WT}$ の順であった。

さらに血清抗 MOG35-55 抗体価を測定したところ、Apo E KO では抗 MOG35-55 IgG 抗体価の誘導が著明に抑制されていることがわかった。特に IgG1 の上昇が悪く、day 10 と day 64 ではむしろ day 64 で低下する傾向があった。IgG2a については day 10 では低値であったが day 64 で WT に匹敵するレベルに到達した。その結果、Th1/Th2 バランスを反映する IgG1/IgG2a 比は、KO で低い値 (すなわち Th1 偏倚) となった。

EAE を好発する SJL/J マウスでは未感作の状態でも脳炎惹起性ペプチド PLP139-151 に反応する T 細胞数が著明に増加していることが報告されている。そこで、未感作 Apo E KO マウスにおいて、脳炎惹起性 T 細胞のクローン増殖が起こっているかど

うかを検討することにした。未感作マウスの脾臓細胞を直接ペプチドで刺激するアッセイでは結果が得られず、つぎに抗原提示細胞として感作マウスの所属リンパ節細胞を使うことにした。活性化した DC などが増加した、この細胞集団を抗原提示細胞として利用した結果、未感作の Apo E KO マウス脾臓 T 細胞が、MOG35-55 に反応して、強く IFN- γ を産生することを見いだした。このような強い反応は WT では見られず、Apo E KO マウスに固有の現象であることが示唆された。

Apo E を欠損したマウスでは、MOG 35-55 ペプチドによって誘導される EAE が増強する。この増強には、エピトープ特異的な機構が関与しており、正常な自己反応性 T 細胞のレパトア形成過程において Apo E の存在が必須であることを意味する。Apo E KO に一番近い表現型を示すヒト E4 ホモにおいて、自己免疫応答の偏倚が存在するかどうかは、今後明らかにされなければならない重要な課題である。

4) ギラン-バレー症候群モデルマウス作製及び解析

いずれの実験においても、運動麻痺は見られなかった。これらのマウスの脊髄神経根・馬尾神経からも GBS としての病理組織学的所見すなわち IgG の軸索への沈着、Waller 様変性は見られなかった。

1. Fc γ R II B ノックアウトマウスへの GBS 患者抗体静脈注射の実験では、8 日後の血清から高力価のマウス抗ヒト IgG 抗体ならびに、ヒト抗 GM1 抗体が検出された。抗 GM1 抗体は 8 日間に渡って体内を循環していたにも関わらず、血液神経閥門を通過せず、神経上の抗原分子まで到達しなかったと考えられる。

2. ヌードマウスへの抗体産生ハイブリドーマ移植実験では、GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスの感作により得られたモノクローナル IgG 抗体のサブクラスは IgG2b であった。ハイブリドーマ接種後、ヌードマウスの血清抗体価は 1~2 週で著しく上昇していた。にも関わらず、運動麻痺など GBS と考えられるような神経学的所見はみられ

ず末梢神経の病理組織学的検討においても GBS とみられる変化は認められなかった。

3. 自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞の rag-2 ノックアウトマウスへの移入実験は、動物管理において不足があり、脾細胞の生着の確認まで至らなかった。

今回行った 3 種の受動免疫方法によって、GBS のマウスモデルは得られなかった。ELISA 法によって血清の抗 GM1 抗体の上昇は充分量確認されたにも関わらず、ウサギモデルで観察されたような神経病理学的変化はみられなかった。このことは、循環血漿中の抗 GM1 抗体の上昇だけでは GBS 発症が導かれない可能性を示唆している。抗体以外に関与するものとしていくつか考えられるが、究極的には血液神経閥門の破綻という課題が挙げられる。血液中を循環する抗体が神経系の標的抗原にたどりつくまでには、血液神経閥門が存在する。GBS の発症機転には、血液神経閥門の破綻が想定されているが、そのメカニズムは明らかではない。患者血清中に見られる IgG 抗 GM1 抗体のサブクラスは IgG1 および IgG3 であり、これにより GBS 病因抗体産生には T 細胞のヘルプを要することが示唆される。T 細胞の動員とともに TNF- α や IL-1 β といったサイトカインの産生が起こり、血液神経閥門の透過性を亢進させる可能性も考えられる。

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスの感作により得られたモノクローナル IgG 抗体のサブクラスは IgG2b であった。これはヒトの IgG2 に相当し、補体結合能、マクロファージ結合能に乏しい。エフェクター機構の有効な活性化も病態再現には必要であると考えられることから、ヒトの IgG1 に相当する IgG2a を得る必要がある。今後、発症に関与する新たな細胞、物質の解析を予定している。

5) 天疱瘡モデルマウスにおける水疱発生のメカニズム免疫電顕的解析

通常のエレクトロニクによる観察にて、棘融解を呈した基底細胞上面には多数の半割 DM の形成が認められた。免疫電顕による半割 DM の強拡大像では、DM の細胞外領域に多数

の IgG の沈着が認められた。また、細胞質内には DP の局在が DM 接着板とケラチン線維との間に認められた。半割 DM におけるケラチン線維の退縮は認められなかった。

PV モデルマウスの隣り合う基底細胞の側面には IgG (15nm gold) が集簇した奇妙な構造物が認められた。この構造物は水疱部、非水疱部のいずれにも認められ、その細胞間隔は DM とほぼ同様 (およそ 30nm) であった。また接着板やケラチン線維の挿入は全く認められないものの、向かい合う細胞膜の中心には細胞間結合層 (Dense mid-line, DML) と思われる構築が認められた。ある部位ではこの構造物と小さな DM が隣接している像が認められた。免疫二重染色を施した結果、この構造物の細胞内領域に、痕跡的に DP (5nm gold) が局在している像を認め、さらにこの構造物近傍の細胞質内にはケラチン線維に付随する様に DP が集簇して局在している像が認められた。β-catenin (5nm gold) の局在は認められなかったことから、この構造物はアドヘレンスジャンクションではないことが確認された。

これまでに我々は、DM の細胞外領域における PV-IgG と標的抗原である Dsg3 の水平方向と垂直方向のそれぞれの分布パターンの解析を行った結果、PV-IgG の局在部位が標的抗原の微細局在と一致していることを報告している。すなわち PV-IgG は DM の細胞外領域に存在する標的抗原である Dsg3 に対し、直接到達し結合することが可能であることを免疫電顕的に証明してきた。

今回の実験から、棘融解部での半割 DM の細胞外領域に、PV-IgG が結合していることが確認できた。また、半割 DM には DP が正常に局在していることが認められ、接着板内へのケラチン線維の挿入も認められた。これらの結果は DM の半割に Dsg3 の枯渇が関与している可能性が低いことが示唆していると同時に、PV の水疱形成が IgG の Dsg3 の細胞外領域への直接阻害によって引き起こされている可能性が高いことを示唆するものであった。

また、さらに興味深い所見として、基底

細胞の側面の一見正常に見える細胞膜上に IgG の集簇した像が認められた。この構造物はその形態学的な特徴、すなわち DML を向かい合う細胞膜の中央に認めること、その幅がおよそ 30nm と DM とほぼ同様であること、DM との連続しているものがあること、また DP との免疫二重染色から、DP がこの構造物の細胞膜付近に痕跡的に認められたこと、さらに細胞膜近縁の細胞質内にケラチン線維と共に DP が局在している像を認めたことなどから、DM との関連が強く推察され、おそらく DM の接着板からの DP の消失と共にケラチン退縮が生じたことにより形成された可能性が高いと考えられる。また、この構造物は、水疱部、非水疱部のいずれの基底細胞間にも認められた。以上の所見より、IgG が Dsg3 に結合した後の変化として、Dsg3 の接着機能障害による DM の半割とケラチン線維の退縮による DM の崩壊、の二つの機序の存在が示唆された。しかしながら、後者は基底細胞側面においてのみ認められること、水疱部、非水疱部のいずれにも認められること等から水疱形成の主役を担っているとは考えにくい。一方、半割 DM の形成は、PV 水疱部に特異的な所見であり、IgG による Dsg3 機能の直接阻害が水疱発生のメカニズムの中心をなすと考えるのが妥当であると思われた。

6) ナイーブ脾細胞移植による天疱瘡モデルマウスを用いた抗 Dsg3 モノクローナル抗体の単離および解析

本研究では 10 クローンの抗 Dsg3 mAb を単離し NAK と命名した。全てのクローンが培養マウス角化細胞を用いた live keratinocyte staining 陽性で in vivo で Dsg3 に反応性を有していた。アイソタイプは重鎖が 6 クローンで IgG2a、4 クローンは IgG1 であった。また軽鎖は全てのクローンで κ であった。マウスの組織を基質として用いた間接蛍光抗体法

(IIF) では、すべての mAb が硬口蓋や皮膚の重曹扁平上皮細胞表面に反応した。

NAK mAb の病原性の有無を確認するために、新生仔マウスへの受動免疫を行

った。精製した mAb を単独でマウス皮下に注射し、皮膚における肉眼的な水疱形成と顕微鏡的な微小水疱形成を観察した。すべての NAK mAb を移入したマウスの皮膚で微小水疱の形成が認められた。

さらに、Dsg3 を正常に発現する成熟免疫不全マウス (Rag2^{-/-}マウス) を用いた病原性の確認を行った。各 NAK mAb を単独で接種した場合は肉眼的には十分な腹水の貯留が認められたにもかかわらず、脱毛は認められなかった。そこで数種類の NAK mAb を組み合わせてポリクローナルとしての病原性を確認したところ NAK1、NAK2、NAK4、NAK7、NAK8、NAK9、NAK10、NAK11 (計 8 種)、NAK1、NAK2、NAK4、NAK7、NAK9、NAK10 (計 7 種)、NAK1、NAK2、NAK7、NAK9、NAK11 (5 種)、NAK1、NAK2、NAK7、NAK11 (計 4 種) の全ての組み合わせにおいて接種後約 7-10 日で被毛の脱毛が認められた。直接蛍光抗体法では硬口蓋粘膜の角化細胞表面への IgG の沈着が認められた。病理組織学的には硬口蓋粘膜で PV に特徴的な、基底層直上の水疱形成が認められた。

NAK mAb は単独では AK23 のように強い病原性は示さなかったものの、複数組み合わせる事により天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する可能性がある mAb であることが確認された。

Dsg3/Dsg1 のスワッピング分子および点変異分子を用いたエピトープ解析を行った。N 末端側を認識する mAb としては NAK1 が Dsg3 アミノ酸 25、28、29 を NAK9 が Dsg3 アミノ酸 25、28、29、53~56 を NAK4、NAK7、NAK8 は Dsg3 アミノ酸 1-162 を、中央部を認識する mAb としては NAK2、NAK5 が Dsg3 アミノ酸 195-402 を、C 末端を認識する mAb としては NAK3 が Dsg3 アミノ酸 403-565 を、N 末端から中央部を認識する mAb としては NAK11 が Dsg3 アミノ酸 1-402 をそれぞれ認識した。

それぞれ単独で強い病原性を示さない mAb でも、複数組み合わせポリクローナルな状態にする事により水疱形成を誘導

する事が可能である事が確認された。PV 患者血清はポリクローナルであり、この腹水形成法の結果は、PV 患者中で起こっている現象を反映しているものと考えられた。今後さらに NAK mAb の詳細な解析を行う事で細胞接着障害における自己抗体の役割が分子レベルで明らかになるものと考えられた。

7) マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析

野生型成熟マウス胸腺において、ごく少数の細胞に抗 Dsg 3 抗体染色陽性所見を得た。その細胞は抗ケラチン抗体染色陽性であり、胸腺上皮細胞のごく一部が Dsg 3 を発現していると思われる。

Dsg は皮膚粘膜に存在する細胞接着の機能を担うデスモゾーム構成タンパクで、自己免疫性疾患である天疱瘡の標的となる末梢抗原である。今回、Dsg 3 についても、今まで証明された他の末梢抗原と同様に胸腺上皮細胞で発現していることが確認できた。また、胸腺組織切片を用いた形態的観察により、Dsg 3 陽性細胞は胸腺上皮細胞の中のごく少数でしかないことがわかった。このことから、胸腺における Dsg 3 が細胞接着機能のために存在しているとは考えにくい。免疫寛容の成立において、末梢抗原である天疱瘡抗原の胸腺上皮細胞での発現が重要な役割をしていると考えられる。

8) 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

CPA は ELISA score および表現型ともに完全な発症抑制効果を認めた。AZP も抑制効果を認めたが副作用として貧血が見られ、投与量の問題があったかもしれない。MMF は予想に反して効果が弱かった。CYA の抑制効果は CPA に次いで強かったが、同系統薬剤である FK506 は抑制効果が弱かった。ステロイド剤はある程度の効果はあったものの、7 割程度の抑制効果であった。

また CPA 投与群は投与中止後 2~3 週間で症状の出現をみた。このことは、CPA による免疫抑制効果が可逆的であることを示しており、ヒトの PV の症状を正確に反映

しているものと捉えることができる。

今回、ヒトの PV に対して使用されている主な薬剤の評価を行った。完全にヒトと同じ抑制効果を示したとは言いがたいが、一定の抑制効果を示した。今後新しい免疫抑制療法の前臨床試験としてとして、有用な評価系になりうると考えられる。

また、抗 CD40 抗体療法の評価に関しては、免疫した脾細胞を移植後、抗 Dsg3 抗体産生および明らかな PV の表現型を示した PV モデルマウスに MR1 (n=11) と Hamster IgG (n=8) を 1 mg ずつ週 2 回計 12 回投与した。血中抗 Dsg3 抗体価は、MR1 投与群および Hamster IgG 投与群の両群において投与開始から減少傾向が認められ、両群において有意差は認められなかった。PV 表現型の推移を PV スコアによって検討したところ、Hamster IgG 投与群においては、投与期間を通じて著明な改善は認めず、MR1 投与群においては、投与開始後 42 日に PV スコア値の低下が認められたが、コントロール群との間に有意差は認めなかった。

MR1 は、CD40/CD40L 相互作用を阻害することで B 細胞のプラズマ細胞への分化を阻害し、抗体産生を抑制する。一度プラズマ細胞に分化すると、その後の抗体産生には CD40/CD40L 相互作用は不要であり、MR1 の効果は期待できない。そのために高い抗 Dsg3 抗体産生を示す PV モデルマウスにおいて治療効果が認められなかったのではないかと考えられた。骨髄に存在するプラズマ細胞には long-lived のものがあり、抗原刺激なしに長期間抗体産生を維持している可能性を最近指摘されてきている。PV モデルマウスにおいてもこのような長期間抗体産生を維持するプラズマ細胞が存在するために、MR1 の長期投与によっても著明な効果が認められなかった可能性が示唆された。

9) B 細胞トランスジェニックマウスを用いた免疫寛容獲得機序の解析

Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウス AK7-LH1 では、骨髄だけではなく脾細胞中に H 鎖のトランスジーン(IgM⁺)陽性

細胞を認めた。Rag2^{-/-}マウスと掛け合わせた AK7-LH1-Rag2^{-/-}マウスでも、トランスジーン陽性の B 細胞を脾臓中に認めた。従って末梢において B 細胞は除去されていないと考えられた。

また自己反応性の B 細胞の多くは腹腔内に認めると考えられている。本マウスではいわゆる B1B 細胞が減少しており、さらに Dsg3 との反応性を検討したところ、明らかな反応性を認めなかった。さらに AK7-LH1-Rag2^{-/-}では B1 細胞を全く認めなかった。従ってトランスジーン陽性の B 細胞は B1B 細胞に分化できないと考えられた。

末梢においてトランスジーン陽性の B 細胞の存在は明らかになったが、これらの細胞は anergy が誘導され、不活性化されている可能性がある。従って、B 細胞を脾臓から B220 マイクロビーズを用い精製し、様々な刺激を加え検討した。B 細胞はコントロールの LPS で増殖し、細胞表面のレセプターの架橋を anti-IgM もしくは recombinant Dsg3 で行ったところ、増殖した。従って anergy は誘導されていないと考えられた。

さらに、不活性化されていない B 細胞は様々な刺激により細胞内の Ca 濃度が一時的に上昇することが知られている。そこで、トランスジェニック由来の B 細胞を anti-IgM もしくは recombinant Dsg3 にて刺激した。B6 由来の B 細胞と異なりトランスジェニック由来の B 細胞は anti-IgM だけではなく、特異的な刺激である recombinant Dsg3 にて一時的な細胞内の Ca 濃度の上昇を認めた。以上の結果から Dsg3 反応性 B 細胞は不活性化されていないと考えられた。

末梢抗原に対する B 細胞の免疫寛容獲得機序は未だ不明である。Dsg3 反応性 B 細胞は少なくとも末梢において除去されず、さらに、不活性化もされていなかった。AK7 は基本的には水疱形成などの病原性を有してしないため、免疫寛容の誘導が行われなかった可能性がある。同一抗原に対する抗体でも病原性の有無により B 細胞の免疫寛容の掛かり方が異なる可能性も考えられる。今後我々は病原性を有する抗体 AK23 を用いトランスジェニックマウスを作製し、本

マウスとB細胞免疫寛容獲得機構の相違について比較検討する予定である。

1 0) Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析

rmDsg3-1~5 リコンビナント断片を用いて PV モデルマウス脾 T 細胞の ex vivo での rmDsg3-1~5 に対する反応性を 11 例で検討した。特異的反応は rmDsg3-2 で 4 例、rmDsg3-3 で 1 例、rmDsg3-4 で 5 例に検出された。そこで、in vitro での繰り返し刺激により mDsg3 と反応する T 細胞株の樹立を試みたが、2 回の抗原刺激による 3 週間の培養中に、サイトカイン濃度と無関係にほぼ全ての細胞が死滅した。

そこで、未免疫の Dsg3^{-/-}マウス脾 T 細胞の ex vivo における rmDsg3-1~5 に対する反応性を 8 例で検討した。すべてのリコンビナント mDsg3 断片に対する特異的反応が検出されたが、特に rmDsg3-2、rmDsg3-3、rmDsg3-4 に対しては全例が反応性を示した。さらに、rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に対する T 細胞反応性は他のリコンビナント mDsg3 断片に対する反応に比べて有意に高かった。そこで、rmDsg3-1~5 で繰り返し抗原刺激することで得られた T 細胞株の特異性を検討した。rmDsg3-2 と rmDsg3-4 に対する反応性が誘導されやすい傾向があったが、その頻度は低かった。

PV モデルマウス脾細胞を用いた場合、3 週間の培養中にほとんどの脾細胞が死滅した。その理由として、モデルマウス体内で生じた強力な免疫応答のため、in vitro の環境では activation-induced cell death (AICD) により T 細胞が死滅してしまう可能性を考えた。AICD を防ぐことを目的として、サイトカインの種類、濃度を含め培養条件を検討したが、PV モデルマウス脾細胞を用いた特異的 T 細胞株の樹立は困難だった。一方、未免疫 Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を用いると、ex vivo で安定した mDsg3 に対する T 細胞の反応が検出された。ただし、反復した抗原刺激による T 細胞株の樹立を試みたが、再現性のある結果は得られなかった。その原因として in vitro で抗原を加

えるだけの priming では免疫応答を誘導するのに十分でないためと考えた。SI が 2 以上の T 細胞株については限界希釈により T 細胞のクローニングを行うと同時に、今後は昆虫細胞で発現精製した高純度 rmDsg3 をマウスに免疫した後に脾細胞と膝窩リンパ節細胞を in vitro で大腸菌由来抗原を用いて刺激する新プロトコールの検討を行う。

1 1) 天疱瘡自己抗体病的活性の in vitro デジタル測定法の開発

本研究にて開発した検査法が、抗デスモグレイン 3 抗体のうち、病的活性を持つ抗体のみを検出することができるかどうか検討した。ヒト Dsg3 抗体と反応性を有さない AK7、病的活性を持たない抗体 AK20 を加えた細胞シートは、抗体を加えていない群と同様にほとんど細胞シートは分断されなかった。一方、病的活性のある AK23 を加えた群では、dose dependent に細胞シートが分断されているのが認められた。この結果より、この検査法は、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。

さらに、天疱瘡患者血清を用いて、この検査法で検討した。活動期の尋常性天疱瘡 (PV) 患者血清 10 例、正常人血清を 5 例を使用し、Dissociation Score を比較した。正常人血清においては、Dissociation Score の平均値は 15.6 を示したのに対し、PV 血清では、平均 42.5 と有意に高値を示し、DS 値がより高い値を示した。患者血清においても、血清中の細胞接着阻害活性を検出できると考えられた。

次に、この検査法の Dissociation Score が、ELISA の Index 値と比較して天疱瘡自己抗体の病的活性をより反映するかどうかを検討した。ELISA 値が同等程度にもかかわらず、活動期の患者血清において、DS 値が 27-50 と高値を示したのに対し、寛解期の患者血清においては、Dissociation Score は 10-19 と低値を示し、ELISA 値よりも病勢を正確に反映する値が得られた。

以上より、本検査法は、病的活性を持つ抗 Dsg3 抗体のみの接着阻害能を測定することが可能であった。その測定値は、ELISA

法の抗体価よりも正確に天疱瘡患者の重症度を反映していた。ケラチノサイトを用いた dissociation assay 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方法である。この検査法は、デスマグレインを介する細胞接着、天疱瘡自己抗体による水疱形成のメカニズムを探る上で良い手段となりうると思われる。

12) 新規デスマグレイン Dsg4 に対する天疱瘡血清の反応性についての検討

hDsg4-His を基質とした免疫沈降法の結果、抗 Dsg1 抗体を有する粘膜皮膚型 PV 血清 19 例中 13 例 (68.4%) ならびに PF 血清 20 例中 17 例 (85.0%) が hDsg4-His を認識した。一方、抗 Dsg1 抗体を持たない粘膜優位型 PV 血清 16 例全て (0%) が hDsg4-His を認識しなかった。さらに抗 Dsg1 抗体を組換え Dsg1 による免疫吸着法にて除去すると、全ての血清で Dsg4 との反応性は消失した (n=30)。一方、抗 Dsg4 抗体を除去しても、血清の Dsg1 との反応性に著変はなかった (n=11)。

従って、天疱瘡患者血清中には新しいデスマグレイン Dsg4 のみを認識する自己抗体は存在せず、抗 Dsg1 抗体の一部が Dsg4 と交差反応することが明らかにされた。

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。本年度は、難治性疾患克服研究事業の中で横断的研究班として、自己免疫心筋炎、ギラン・バレー症候群、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫脱毛症などの種々の自己免疫疾患モデルマウスの作成を試みるとともに、ヒト疾患病態解明、治療評価系の確立など臨床還元のできる研究の方向性を最初に作成された天疱瘡モデルマウスを用いて具体的に提示することができた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

英語論文 60 編

1. 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* 120:610-615, 2003.
2. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, Foedinger D, Kirnbauer R, and Stingl G. 230 kDa and 190 kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell surface and basement membrane zone immune staining pattern. *Exp Dermatol* 12:646-654, 2003.
3. 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.
4. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol* 48:244-252, 2003.
5. Amagai M. A mouse with an active disease as a model for pemphigus. *Ann Dermatol Venereol* 130:1176-1179, 2003.
6. Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, 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** 32:33-41, 2003.
7. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska, Amagai M, Nagata Y, Strasz Z, and Jabłonska S. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. **J Am Acad Dermatol** 48:117-122, 2003.
 8. Nishifuji K, Amagai M, Ota T, Nishikawa T, and Iwasaki T. Cloning of canine desmoglein 3 and immunoreactivity of serum antibodies in human and canine pemphigus vulgaris with its extracellular domains. **J Dermatol Sci** 32:181-191, 2003.
 9. Ota T, Amagai M, Watanabe M, and Nishikawa T. No involvement of IgG autoantibodies against extracellular domains of desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus or inflammatory bowel diseases. **J Dermatol Sci** 32:137-141, 2003.
 10. Nishifuji K, Amagai M, Nishikawa T, and Iwasaki T. Production of recombinant extracellular domains of canine desmoglein 1 (Dsg1) by baculovirus expression. **Vet Immunol Immunopathol** 95:177-182, 2003.
 11. Parlowsky T, Welzel J, Amagai M, Zillikens D, and Wygold T. Neonatal pemphigus vulgaris: IgG4 autoantibodies to desmoglein 3 induce skin blisters in newborns. **J Am Acad Dermatol** 48:623-625, 2003.
 12. Futei Y, Amagai M, Hashimoto T, and Nishikawa T. Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 49:1023-1028, 2003.
 13. Nagao K, Ishiko A, Yokoyama T, Tanikawa A, and Amagai M. A case of generalized pustular psoriasis treated with topical tacrolimus. **Arch Dermatol** 139:1219, 2003.
 14. Hacker-Foegen MK, Janson M, Amagai M, Fairley JA, and Lin MS. Pathogenicity and epitope characteristics of anti-desmoglein-1 from pemphigus foliaceus patients expressing only IgG1 autoantibodies. **J Invest Dermatol** 121:1373-1378, 2003.
 15. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Nishifuji K, Amagai M, and Stanley JR. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. **J Biol Chem**:279:5268-5277, 2004.
 16. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. **J Invest Dermatol**:in press, 2004.
 17. Preisz K, Horvath A, Sardy M, Somlai B, Harsing F, Amagai M, Hashimoto T, Nagata Y, Fekete S, and Karpati S. Exacerbation of paraneoplastic pemphigus by cyclophosphamide treatment: Detection of novel autoantigens and bronchial autoantibodies. **Br J Dermatol**:in press, 2004.
 18. Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br J Dermatol**:in press, 2004.
 19. Zawalich WS, Zawalich KC, Tesz GJ, Taketo MM, Sterpka J, Philbrick W, Matsui M. Effects of Muscarinic Receptor Type 3 Knockout on Mouse Islet Secretory Responses. **Biochem Biophys Res Commun** 315: 872-876, 2004
 20. Griffin MT, Matsui M, Shehnaz D, Ansari

- KZ, Taketo MM, Manabe T, Ehlert FJ. Muscarinic agonist-mediated heterologous desensitization in isolated ileum requires activation of both muscarinic M₂ and M₃ receptors. **J Pharmacol Exp Ther** 308: 339-49, 2004
21. Aihara T, Fujishita T, Kanatani K, Furutani K, Nakamura E, Taketo MM, Matsui M, Chen D, Okabe S. Impaired Gastric Secretion and Lack of Trophic Responses to Hypergastrinemia in M₃ Muscarinic Receptor-knockout Mice. **Gastroenterology** 125: 1774-1784, 2003
22. Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M. Postsynaptic M₁ and M₃ receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. **Eur J Neurosci** 18: 109-16, 2003
23. Karasawa H, Taketo MM, Matsui M. Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. **Eur J Pharmacol** 468 15-19, 2003
24. Matsui M, Griffin MT, Shehnaz D, Taketo MM, Ehlert FJ. Increased Relaxant Action of Forskolin and Isoproterenol against Muscarinic Agonist-Induced Contractions in Smooth Muscle from M₂ Receptor Knockout Mice. **J Pharmacol Exp Ther** 305 :106-113, 2003
25. Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor mediated signal transduction. **Nat. Immunol.** 4:280-286.
26. Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2003) *In vivo* role of IFN-g produced by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur. J. Immunol.** 33:2666-2675.
27. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature** 423:762-769.
28. Esashi, E., Sekiguchi, T., Ito, H., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2003) A possible role for CD4⁺ thymic macrophages as professional scavengers of apoptotic thymocytes. **J. Immunol.** 171:2773-2777.
29. Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y. and Handa, M. (2003) Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85a null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation. **Blood** 102:541-548.
30. Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G. B., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Lam, E. W.-F. (2003) BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85a subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. **Oncogene** 15:2248-2259.
31. Nakaoka, Y., Nishida, K., Fujio, Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., Sugiyama, S., Matsuda, S., Koyasu, S., Yamauchi-Takahara, K., Hirano, T., Kawase, I. and Hirota, H.