

- (2003) Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. **Circ. Res.** 93:221-229.
32. Koyasu, S. (2003) The role of PI3K in immune cells. **Nat. Immunol.** 4:313-319.
33. Fukao, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K in negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.** 24:358-363.
34. Fukao, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mice. **J. Mol. Med.** 81:524-535.
35. Matsuda, S. and Koyasu, S. (2003) Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. **Curr. Top. Med. Chem.** 3:1358-1367.
36. Koyasu, S. (2003) The role of class I_A PI3K in B lymphocyte development and functions. **Biochem. Soc. Trans.** in press.
37. Koike F, Satoh J-i, Kondo T, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, and Yamamura T. Microarray analysis identifies IFN β -regulated genes in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 139: 109-118, 2003
38. Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T., Miyake S, Stein-Streilein S: CD4⁺ NKT cells, but not conventional CD4⁺ T cells, are required to generate efferent CD8⁺ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. **J. Immunol.** 171:1266-1271, 2003
39. Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sickinger A, von Hoersten S, and Yamamura T. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y₁ receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. **J. Immunol.** 171: 3451-3458, 2003
40. Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezradica JS, N. Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S: Another view of T cell antigen recognition: Co-operative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural TCR. **J. Immunol.** 171:4539-4551, 2003
41. Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T. and Miyake S: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. **Arthr. Rheumat.** 50:305-313, 2004
42. Illes Zs, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, and Yamamura T. Accumulation of Va7.2Ja33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. **Int. Immunol.** 16: 223-230 , 2004
43. Yuki N., Saperstein DS: Axonal Guillain-Barré syndrome subtypes: do we need more splitting? **Neurology** 61: 598-599, 2003.
44. Koga M, Yuki N., Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y: CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor repertoire in Guillain-Barré and Fisher syndromes. **J Neuroimmunol** 141:112-117, 2003.
45. Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N.: Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. **Ann Neurol**

- 54:393-388, 2003.
46. Odaka M, Yuki N., Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S: Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. **Brain** 126: 2279-2290, 2003.
47. Odaka M, Yuki N., Hirata K: Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. **J Neurol** 250: 913-916, 2003.
48. Ikuta N, Fukusako T, Yuki N., Morimatsu M, Koga M: Acute oropharyngeal palsy associated with anti-GM1b IgG antibody. **J Neurol** 250: 881-882, 2003.
49. Sekiguchi K, Susuki K, Funakawa I, Jinnai K, Yuki N.: Cerebral white matter lesions in acute motor axonal neuropathy. **Neurology** 61: 272-273, 2003.
50. Susuki K, Johkura K, Yuki N., Kuroiwa Y: Clinical deterioration in Bickerstaff's brainstem encephalitis caused by overlapping Guillain-Barré syndrome. **J Neurol** 211: 89-92, 2003.
51. Odaka M, Yuki N., Kokubun N, Hirata K, Kuwabara S: Axonal Guillain-Barré syndrome associated with axonal Charcot-Marie-Tooth disease. **J Neurol Sci** 211: 93-97, 2003.
52. Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N., Hattori T: Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. **J Neurol Sci** 210:41-45, 2003.
53. Odaka M, Koga M, Yuki N., Susuki K, Hirata K: Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. **J Neurol Sci** 210: 99-103, 2003.
54. Koga M, Yuki N., Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S: Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome. **Neurology** 60: 1514-1518, 2003.
55. Odaka M, Yuki N.: Antibodies to GM2 ganglioside in neurological disorders. **Intern Med** 42:220-221, 2003.
56. Suzuki S, Tanaka K, Yasuoka H, Fukuuchi Y, Kawakami Y, Kuwana M. Autoreactive T cells to the P3A⁺ isoform of AChR α subunit in myasthenia gravis. **J Neuroimmunol** 137:177-186, 2003
57. Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ishii M, Ikeda Y, Kuwana M. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. **Hepatology** 37:1267-1276, 2003
58. Kuwana M. Autoreactive CD4⁺ T cells to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. **Autoimmun Rev** 2:192-198, 2003
59. Nomura S, Kuwana M., Ikeda Y. Induction of T-cell tolerance in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura by single injection of humanized monoclonal antibody to CD40 ligand. **Autoimmunity** 36:317-319, 2003
60. Kuwana M., Nomura S, Fujimura K, Nagasawa T, Muto Y, Kurata Y, Tanaka S, Ikeda Y. The effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura. **Blood** 103:1229-1236, 2004

英文著書

1. Amagai M. Pemphigus. In *Dermatology*. Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, Horn TD, Mascaro J, Mancini AJ, Salasche SJ, Saurat JH, and Stingl Geditors. London: Harcourt Health Sciences. p449-462. 2003.

日本語論文 (代表的なもの)

1. 天谷雅行: ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群: SSSS. *小児科診療* 67: 391-395, 2004
2. 天谷雅行: 黄色ブドウ球菌毒素 ET の標的分子. *Medical Science Digest* 29: 254-255, 2003
3. 天谷雅行: 最新の臨床検査 - 天疱瘡の新しい血清診断法: Dsg1, Dsg3 ELISA 法-. *SRL 宝函* 27: 66-72, 2003
4. 天谷雅行: 自己免疫水疱症の最新情報. *日本医師会雑誌* 129: 1425-1429, 2003
5. 天谷雅行: デスマグレインテスト「Dsg3」「Dsg1」について. *皮膚病診療* 25: 1058-1060, 2003
6. 天谷雅行: デスマグレインを標的とする疾患: 天疱瘡とブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群. *日本皮膚科学会雑誌* 113: 1947-1948, 2003
7. 天谷雅行: 自己免疫性水疱症. *皮膚臨床* 43: 1343-1349, 2003
8. 天谷雅行: ELISA による天疱瘡自己抗体価測定法. *臨床皮膚科*: 印刷中, 2004
9. 天谷雅行: 水疱性疾患の自己抗体. *臨床検査*: 印刷中, 2004
10. 天谷雅行: 炎症性皮膚疾患の動物モデル: 天疱瘡. *アレルギー科*: 印刷中, 2004
11. 松井 稔: ムスカリン性アセチルコリン受容体と脳神経機能 ノックアウトマウスを用いた成果. *遺伝子医学*, 47-55, 2003
12. 桑名正隆, 池田康夫: ステロイド/摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガンドを標的と

した治療法. *臨床血液* 44: 82-89, 2003.

13. 桑名正隆: ITP に関する免疫学的研究の進歩. *日本臨床* 61: 670-675, 2003.
14. 桑名正隆: 樹状細胞のサブセット. *臨床検査* 47: 267-273, 2003.
15. 桑名正隆: 樹状細胞. *血液・腫瘍・免疫* 8: 100-106, 2003.
16. 安岡秀剛, 桑名正隆: ベーチェット病の病態における MICA 反応性 CD8⁺T 細胞の関与. *臨床免疫* 39: 475-478, 2003.
17. 桑名正隆: CD40/CD154 相互作用遮断による Tr 細胞の誘導. *臨床免疫* 39: 228-231, 2003.
18. 桑名正隆: 自己免疫疾患における CD40/CD154 シグナル阻害療法. *日本臨床免疫学会会誌* 26: 259-266, 2003.
19. 桑名正隆, 池田康夫: 自己免疫疾患に対する抗 CD154 抗体療法. *最新医学* 58: 81-87, 2003.

日本語著書

1. 天谷雅行 2003. 腫瘍随伴性天疱瘡. 皮膚疾患最新の治療 2003-2004 (pp. 91). 東京: 南江堂.
2. 角田和之, 天谷雅行 2003. 自己免疫性水疱症によるびらん・潰瘍を治す. 皮膚科診療プラクティス 難治性皮膚潰瘍を治すスキル (pp. 260-264). 東京: 文光堂.
3. 天谷雅行: 天疱瘡. in *皮膚免疫ハンドブック* 改訂 2 版. (eds), 中外医学社. 東京. 印刷中, 2004

学会発表 (代表的なもの)

1. Amagai M: Pemphigus: a simple logic behind a complex disease (SID William Montagna Lecture). *International Investigative Dermatology*, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30- 5.4.
2. Hanakawa Y, Selwood T, Woo D, Lin C, Nishifuji K, Amagai M, Schechter NM,

- Stanley JR: Lock and Key: calcium-stabilized conformation of desmoglein 1 is necessary for hydrolysis by staphylococcal exfoliative toxin (Plenary session). International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30-5.4.
3. Shimizu A, Ishiko A, Tsunoda K, Ota T, Amagai M, Nishikawa T: Cleavage of desmosomes occurs without keratin retraction in vivo in pemphigus vulgaris model mice. International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30-5.4.
 4. Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Shimoda K, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S: Tolerance escape of autoreactive B lymphocytes against desmoglein 3 in transgenic model mice (Plenary session). International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30-5.4.
 5. Tsunoda K, Kawasaki H, Aoki M, Nagai T, Nakagawa T, Nishikawa T, Amagai M: Production of anti-desmoglein 3 monoclonal antibodies from pemphigus vulgaris mouse model produced by naive splenocytes adoptive transfer. International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30- 5.4.
 6. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M: In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. International Investigative Dermatology, Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30- 5.4.
 7. Amagai M: Is desmoglein 4 an autoimmune target in pemphigus? Gordon Research Conference : Epithelial Differentiation & Keratinization, Tilton, NH, 2003. 7. 13-18.
 8. Amagai M: Desmoglein as a target in pemphigus and SSSS (Keynote Lecture). Joint Meeting 2003 of Australian College of Dermatologists and Japanese Dermatological Association, Ayers Rock, Australia, 2003. 9. 18-21.
 9. Nagasaka T, Fujii Y, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T: Assessment of the removal rate of pemphigus autoantibodies by plasmapheresis using desmoglein ELISA. Joint Meeting 2003 of Australian College of Dermatologists and Japanese Dermatological Association, Ayers Rock, Australia, 2003. 9. 18-21.
 10. Takae Y, Amagai M, Tanikawa A, Nishikawa T: Does mucosal dominant type of pemphigus vulgaris shift to mucocutaneous type? Joint Meeting 2003 of Australian College of Dermatologists and Japanese Dermatological Association, Ayers Rock, Australia, 2003. 9. 18-21.
 11. Amagai M: Skin autoimmune disease, pemphigus, in man and mice. B cell workshop seminar, Autoimmunity Branch, NIAMS, NIH, Bethesda, MD, 2004. 2. 9.
 12. Yuki N., Koga M, Susuki K, Hirata K: "Ganglioside mimicry of Campylobacter lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" Peripheral Nerve Society. Banff, Canada. July 28, 2003.
 13. Yuki N., Koga M, Susuki K, Hirata K: "Ganglioside mimicry of Campylobacter lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" 12th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms. Aarhus, Denmark. September

15. Yuki N., "Carbohydrate mimicry between humanganglioside GM1 and Campylobacter jejuni lipo-oligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome" Symposium on Glyco-Neurobiology-Glycolipids, Glycoproteins and other Glycoforms. A Satellite Meeting of the Biennial Meeting of the International and Asia-Pacific Societies for Neurochemistry. Taipei, Taiwan. February 11, 2004

16. Kuwana M., Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Matsuura E: Binding of b2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. The 67th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Orlando). 2003. 10.

G. 知的所有権の取得状況

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

公開日：2003/3/13 (特開 W003-020769)

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

分担研究者 松井 稔 東京大学医科学研究所 助手

研究要旨 本年度の主な成果は以下の通りである。M2 ノックアウトマウスを用い、平滑筋における M2 サブタイプの果たす働きについて詳細な解析を行った。M4 ノックアウトマウスを用い、M4 がカタレプシー反応の治療において必須の役割を果たすことを明らかにした。海馬の内因性カンナビノイドによるシグナル伝達においてムスカリン性受容体 M1 および M3 の両者が重要であることを証明した。胃酸分泌において M3 受容体が必須の働きをしていることを発見した。In vitro での膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌を M3 への刺激によって促進できることを示した。

共同研究者

エール大学 Dr. WS Zawalich ら
U.C. Irvine Dr. FJ Ehlert ら
京都薬科大学 岡部進 ら
金沢大学 狩野方伸 ら

A. 研究目的

ムスカリン性アセチルコリン受容体は、中枢および末梢神経系に豊富に存在し、多くの疾患に関与していると考えられている。本研究計画では、ムスカリン性アセチルコリン受容体の5つのサブタイプを欠失したマウスがどのような疾患モデルマウス足り得るかを知ることが目的として、これらのマウスの表現型の詳細な解析を行いつつある。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

1. インスリン分泌における M3 の意義について。本研究はエール大学の Dr. Zawalich との共同研究として行われた。Dr. Zawalich らはランゲルハンス島を単離して、各種刺激に対するインスリン分泌

を in vitro で経時的に検出することができ。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。本研究は U.C. Irvine の Dr. Ehlert との共同研究として行われた。アセチルコリンで前処置しておく、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。M2 KO マウスおよび M3 KO 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。本研究は京都薬科大学の岡部らとの共同研究として行われた。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

低下したので、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。本研究は金沢大学の狩野らとの共同研究として行われた。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。本研究は U.C. Irvine の Dr. Ehlert らとの共同研究として行われた。cAMP 濃度を上昇させるような前処置 (forskolin や isoproterenol による刺激等) をしておくことで 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。

D. 考察

mAChR KO マウスの解析を通して mAChR 各サブタイプの機能についての理解を深めることができた。今年度の研究成果から考えて、mAChR KO マウスならびに mAChR KO マウスを用いた自己免

疫モデルマウスは、糖尿病、痴呆、パーキンソン病、消化性潰瘍、炎症性腸疾患等のモデルマウスとして利用できる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成 15 年度)

1. 論文発表

英語論文

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

日本語論文

松井 稔、モルヒネ依存に関わる新規遺伝子：ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ5 (Dr. Wess らによる報告の紹介記事)、*ファルマシア*、2003年3月号 372ページ

松井 稔、ムスカリン性アセチルコリン受容体と脳神経機能 ノックアウトマウスを用いた成果、*遺伝子医学*、2003年6月号 47～50ページ

2. 学会発表

隠岐知美 他6名、Demonstration of predominant localization of M₂ muscarinic receptor subtype in heart by mice lacking muscarinic subtype genes. 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会、平成15年11月22～24日

Frederick J. Ehlert, 他6名、Role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in short-term desensitization of the contractile response in isolated ileum, *Neuroscience 2003, the Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting*, 平成15年11月8～12日

藤波かおり、他5名、腸神経叢からのACh遊離を抑制するムスカリン受容体のサブタイプ：ムスカリン受容体欠損マウスを用いた検討、第104回日本薬理学会近畿部会、平成15年11月7日

豊島真紀子、他5名、マウス胃幽門部輪走筋での電気刺激誘発性弛緩反応におけるムスカリン受容体の関与、第104回日本薬理学会近畿部会、平成15年11月7日

井川靖彦、他8名、ムスカリン M₂ 受容体ノックアウトマウスおよび M₃ 受容体ノックアウトマウスの膀胱機能の変化、第10回日本排尿機能学会、平成15年9月13～14日

山田静雄、他6名、下部尿路および唾液腺におけるムスカリン性受容体サブタイプの分布、第10回日本排尿機能学会、平成15年9月13～14日

少作隆子、他7名、M₁ および M₃ ムスカリン受容体を介する内因性カンナビノイド放出の促進、第26回日本神経科学大会、平成15年7月25日

松井 稔、他2名、ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4を欠失したマウスにおけるスコポラミンの抗カタレプシー作用の消失、第26回日本神経科学大会、平成15年7月25日

松井 稔、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、国立京都病院臨床研究部夏季特別セミナー、平成15年7月22日

松井 稔、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、国立循環器病センター 特別セミナー、平成15年6月19日

隠岐知美 他5名、Central muscarinic receptor characteristics in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for each subtype. 第4回国際受容体シンポジウム (IRS2003)、平成15年5月23日

中村 健 他6名、顎下腺において M₃ アセチルコリン受容体が副交感神経刺激による Ca²⁺ シグナリングに中心的な役割を果たす、第76回日本薬理学会年会、平成15年3月24～26日

上村雄一郎 他5名、ムスカリン受容体 (mAChR) ノックアウトマウス 脾臓単核白血球におけるムスカリン受容体遺伝子

発現レベルの検討、第76回日本薬理学会
年会、平成15年 3月24～26日

松井 稔 他5名、ムスカリン性受容体
M2 および M3 を欠失したマウスはコリ
ン性の平滑筋収縮を欠くが生存は可能であ
る。第76回日本薬理学会年会、平成15
年3月24～26日

松井 稔、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、鶴見大学歯学部 第2回 Bench to
Clinic セミナー、平成15年3月19日

松井 稔、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、産業医科大学学生体情報系病態情報部
門大学院講義、平成14年12月20日

松井 稔、Functional analysis of
muscarinic acetylcholine receptor
subtypes using knockout mice.
Waggoner Center Seminar (米国テキサ
ス大学オースティン校での講演)、平成1
4年10月31日

松井 稔 他5名、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、第一回脳神経医学専攻フォ
ーラム (投票により第2位に選ばれ優秀賞

を受賞)、平成14年10月5日

松井 稔、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、東京農業大学大学院講義、平成14
年10月8日

中村 健 他6名、マウス顎下腺では M3
アセチルコリン受容体が副交感神経伝達に
おいて中心的な役割を果たす、第16回
唾液腺懇話会、平成14年10月3日

松井 稔、ムスカリン性アセチルコリン
受容体の機能解析：ノックアウトマウス
を用いた新しいアプローチ、共立薬科大
学 大学院講義、平成14年5月21日

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予 定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

図とその説明

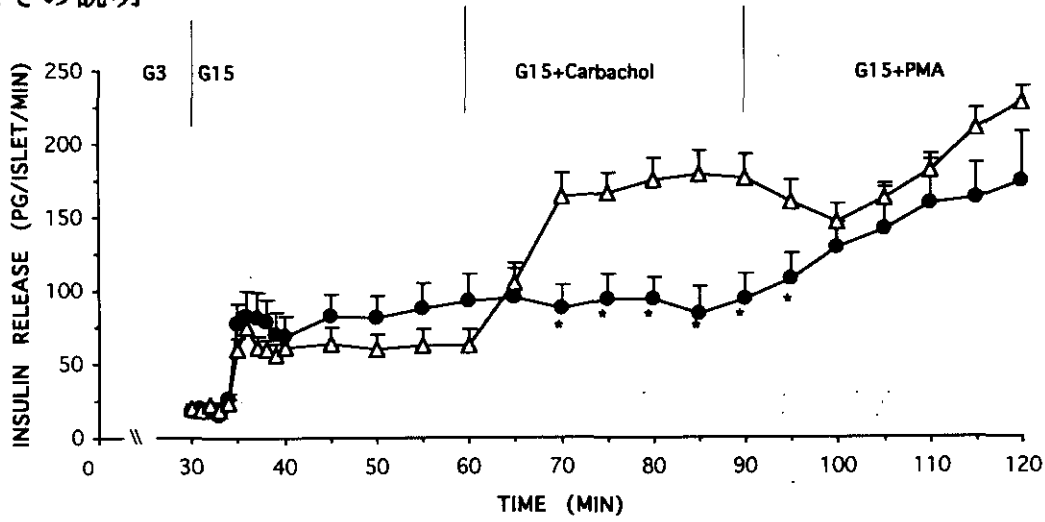


図1 M3 KO マウスのランゲルハンス島（黒丸）はカルバコール刺激によるインスリン分泌増強効果を欠失している。

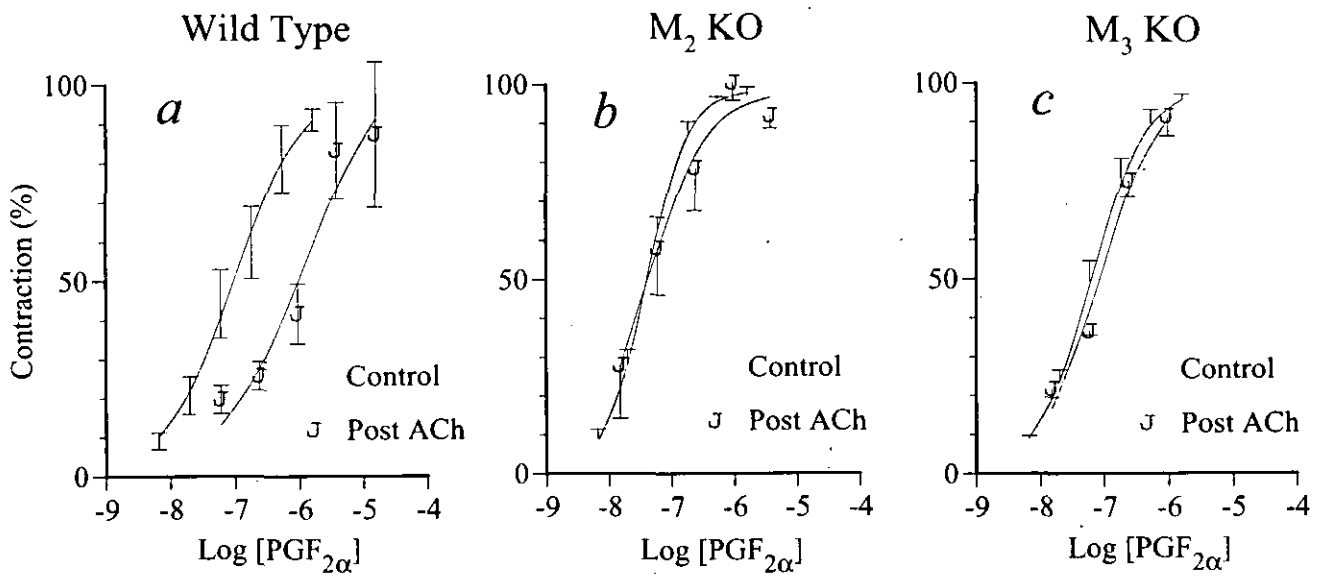


図2 M2 KO および M3 KO の両者で、heterologous desensitization が起こらない。

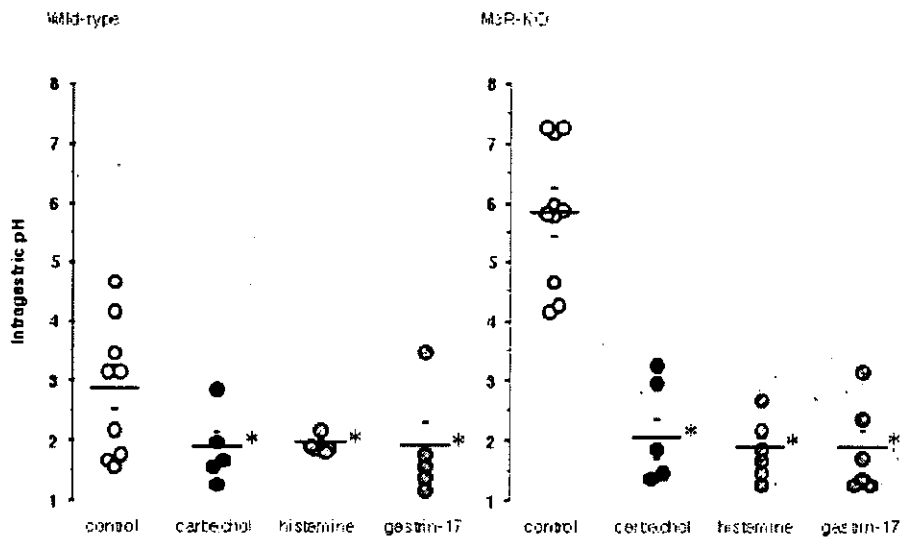


図3 M3 KO マウスの胃内 pH は野生型より顕著に高い。しかしカルバコール投与によりほぼ正常化する。

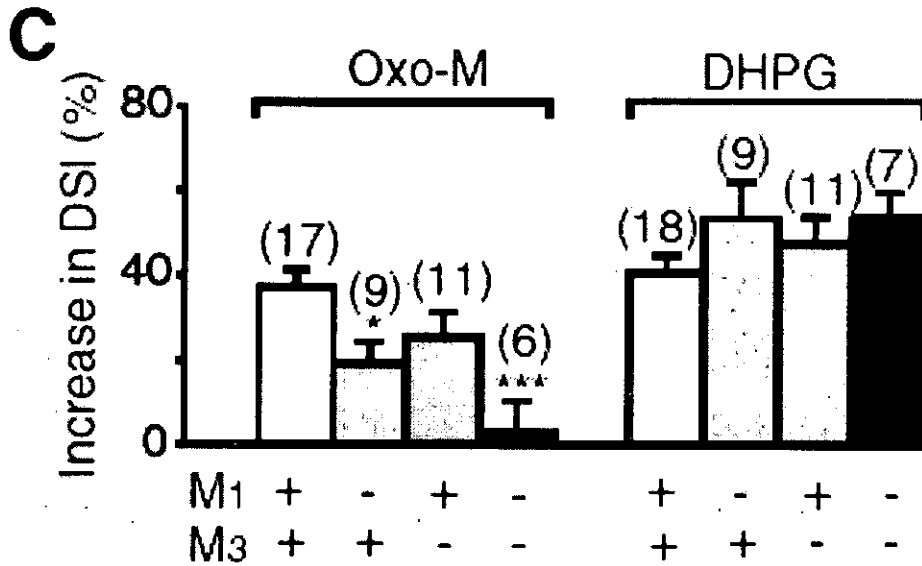


図4 コリン性アゴニストによる DSI 増強効果は M1 KO, M3 KO の両方で減弱しており、M1/M3-compound KO マウスでは欠失している。

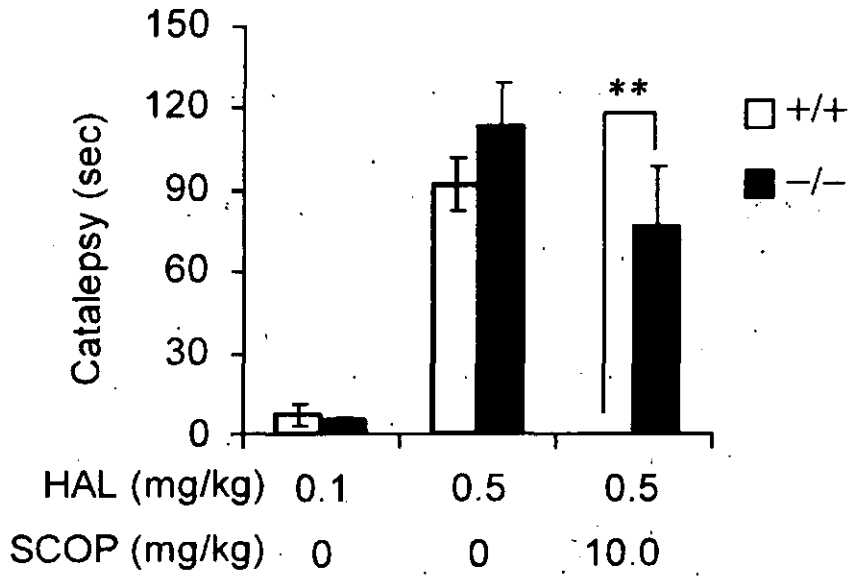


図5 M4 KO マウスではスコポラミンによってカタレプシーを治療することができない。

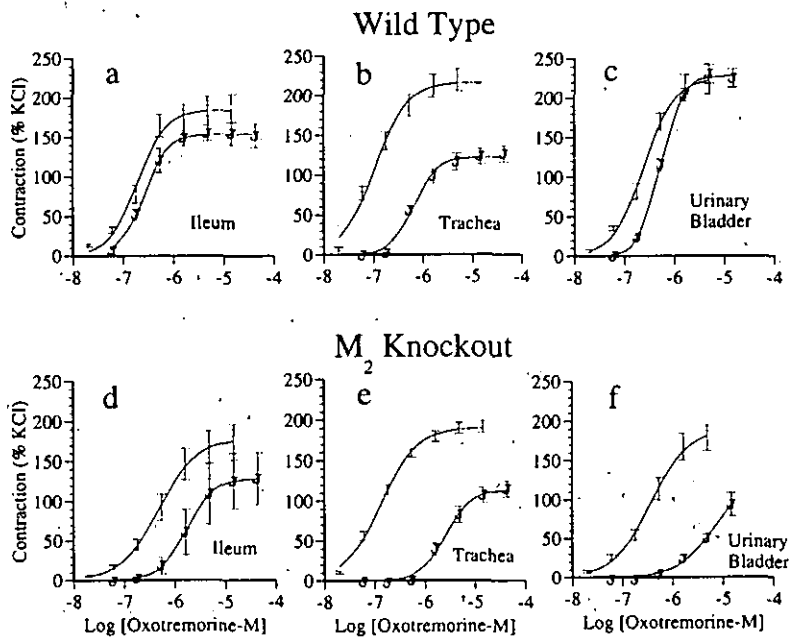


図6 M2 KO マウスでは forskolin による弛緩作用が増強している。

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

分担研究者 小安重夫 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授

研究要旨：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べく、ムスカリン性アセチルコリン受容体（M1-M5）を標的とした自己免疫反応の誘導を試みている。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から M3 がシェーグレン症候群の標的の一つである可能性が考えられることなどによる。今年度は M3 と共に M2 に対する自己免疫反応の誘導を試みた。マウス M2 ならびに 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 M2 ならびに M3 KO マウスにおいて抗 M2 ならびに M3 抗体の誘導を確認した。その後免疫した KO マウスの脾臓細胞を調製し、rag-2 KO マウスに尾静脈経由で移植し、その後マウスの観察を行なっている。顕著な体重減少などの変化は見られていないが、一部のマウスにおいて臓器へのリンパ球浸潤を認めている。

共同研究者

永井重徳、松田達志、吉澤彰宏
（慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学）
大田孝幸、天谷雅行、西川武二
（慶應義塾大学医学部 皮膚科）
松井稔
（東京大学医科学研究所）

A. 研究目的

我々は尋常性天疱瘡モデルマウスの作製に用いた方法、すなわち「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」（特許第 3306625 号ならびに特許第 3326770 号）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。ムスカリン性アセチルコリン受容体に注目した理由は以下の通りである。「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」はノックアウトマウスが致死でな

いこと、また免疫系に大きな異常が見られないことが前提となる。この点で、共同研究者の松井らによりムスカリン性アセチルコリン受容体系は 5 つのサブタイプ全てにおいてノックアウトマウスが作製されており、またこれらのマウスが全て正常に出生することが確認されている。また、これまで解析した限り、これらのノックアウトマウスにおいては免疫系に大きな異常は見られていない。さらに、ニコチン性アセチルコリン受容体と異なり 7 回膜貫通型のつのサブユニットからなる点も利点である。

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 (7) 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 機能の阻害、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。

B. 研究方法

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 転移酵素 (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を用いた。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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、M2 や 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。しかしその一方で、移植後の血中の抗体値の上昇も見られなかったことは必ずしもこの方法で抗体の生産が誘導されるとは限らないことを示唆する。その一方で組織内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は強く示唆されている。なぜある場合には液性反応が有意となり別の場合には細胞性免疫が有意になるかは今後の重要な検討課題である。

今後はさらにムスカリン性アセチルコリン受容体に対する自己免疫反応の誘導を試みるとともに、自己抗体の誘導と細胞性免疫の誘導の機序の違いも検討する予定である。細胞性免疫反応の誘導にはDNAワクチン法を応用する。最近の研究からcDNAのN端にユビキチンを融合させたコンストラクトを用いたDNAワクチン法で効率よく細胞傷害性T細胞を誘導できることがいくつかの系において報告されている。この場合に、ユビキチン部分と目的のタンパク質の境界をタンパク質分解酵素に対して感受性にしたほうが効率が良いという結果と抵抗性にしたほうが良いという結果の両方が報告されている。また、間にいれるスペーサーが重要であるという報告もある。そこでとりあえずいくつかの方法を試みることにし、現在コンストラクトを作製中である。これらの一連の実験を行なうことによってムスカリン性アセチルコリン受容体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。

E. 研究発表 (平成15年度)

原著論文

- 1) 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.
- 2) Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2003) *In vivo* role of IFN- γ produced by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur. J. Immunol.* 33:2666-2675.
- 3) Ohya, M., Ota, T., Aoki, M., Tsunoda, K., Harada, R., Koyasu, S., Nishikawa, T. and Amagai, M. (2003) 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.
- 4) Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T. and Amagai, M. (2003) Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J. Immunol.* 170:2170-2178.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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. (2003) Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. **Circ. Res.** 93:221-229.

総説

- 1) Koyasu, S. (2003) The role of PI3K in immune cells. **Nat. Immunol.** 4:313-319.
- 2) Fukao, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K in negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.** 24:358-363.
- 3) Fukao, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mice. **J. Mol. Med.** 81:524-535.
- 4) Matsuda, S. and Koyasu, S. (2003) Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. **Curr. Top. Med. Chem.** 3:1358-1367.
- 5) Koyasu, S. (2003) The role of class I_A PI3K in B lymphocyte development and functions. **Biochem. Soc. Trans.** in press.

F. 知的所有権の取得状況

特許出願 5 件

- 1) 出願番号：特願平 11-218008 号
発明者：小安重夫、松田達志
発明の名称：「単一シグナル伝達系を標的としたスクリーニング系」
出願人：小安重夫
出願日：1999/07/30
公開日：2001/2/13 (特開 2001-37497)
- 2) 出願番号：特願 2000-113938 号
発明者：小安重夫、松田達志、竹鼻健司、小林幹
発明の名称：「Th2 反応に特異的な免疫寛容誘導剤」
出願人：慶應義塾、味の素 (株)
出願日：2000/04/14
公開日：2001/10/23 (特開 2001-294527)
- 3) 出願番号：特願 2000-607462
発明者：天谷雅行、西川武二、鈴木春巳、小安重夫
発明の名称：「自己免疫疾患モデル動物」
出願人：慶應義塾
出願日：2000/03/30
査定日：2002/6/16、特許第 3326770 号
- 4) 出願番号：特願 2001-156126 号
発明者：天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：「自己免疫疾患モデル動物の作製方法」
出願人：慶應義塾
出願日：2001/05/24
査定日：2002/4/11、特許第 3306625 号
- 5) 出願番号：特願 2001-267653 号
発明者：角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：「天疱瘡モノクローナル抗体」
出願人：慶應義塾
出願日：2001/09/04
公開日：2003/3/13 (特開 W003-020769)

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 年度分担研究報告書

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

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部長

研究要旨 アポリipoprotein E (Apo E) は脂質運搬以外にも生体調節にかかわるさまざまな調節機構に関わることが示唆されている。本研究では、Apo E 遺伝子を欠損するノックアウトマウス (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。B6 背景のマウスに MOG35-55 ペプチドで誘導する系では、Apo E KO における EAE の増悪を臨床および病理学的に確認した。また、感作リンパ節を使った解析により、MOG35-55 ペプチドに対する Th1 応答の亢進が EAE 増悪を説明するものと考えた。しかし、対照として用いた PLP178-191 ペプチドによって免疫した Apo E KO では、同ペプチドに対する Th1 応答はむしろ低下していた。以上の結果より、Apo E KO では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なった。この知見は、ヒトのアポ E 多型と疾患感受性の関係を探る手がかりになる可能性がある。

共同研究者

佐藤 準一

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

中西恵美

荒浪利昌

同 研究員

A. 研究目的

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。しかし、Apo E 多型の中で E4 型を保有する個体でアルツハイマー病発症率が高いことや、多発性硬化症 (MS) の予後が悪いこと等が報告され、従来の考え方では説明できないような多彩な機能を発揮することが推察されている。我々はアポ E と中枢神経系自己免疫疾患 MS との関係を探るために、アポ E 遺伝子を欠損するマウスにおいて MS の動物モデルがどのような病態修飾を受けるか検討した。

B. 研究方法

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、抗原提示細胞として利用した。

C. 研究結果

1) Apo E KO マウスにおける MOG35-55 感作 EAE の増強 :

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 (図 1)。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。

別の実験では、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 $KO > HT > WT$ の順であった。

感作 64 日目にマウスを屠殺し、腰髄 L3 レベルの病理所見を H & E 染色標本で評価した。その結果、Apo E KO マウスにおいて軟膜下の細胞浸潤が、より著しいことが確認された。

2) Apo E KO マウスにおける MOG35-55 感作 EAE の増強と Th1 偏倚 :

感作後 10 日目の所属リンパ節を用いたアッセイでは、Apo E KO で MOG35-55 に対する増殖反応が増強している傾向が見られた。IL-4 の産生は KO および WT 両者で低値を示し、KO、WT 間で有意差を認めなかったが、IFN- γ 産生については KO で有意な増強が認められた (図 2)。

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。

以上の結果から、MOG35-55 に対する T 細胞応答が B6 マウスでは Th1 に偏倚し、その結果 EAE が増強することが考えられた。

3) 未感作 Apo E KO における MOG35-55 反応性 T 細胞のクローン増殖 :

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。

4) Apo E KO における MOG35-55 と PLP178-191 に対する免疫応答の乖離 :

以上の実験結果から、我々は Apo E KO マウスには、免疫応答を抗原非特異的に増強する機構が存在し、MOG35-55 誘導 EAE の増強も、それを反映しているものと考えていた。しかし、別の脳炎惹起性ペプチドである PLP178-191 の感作によって同様の実験を繰り返したところ、予想外の実験結果を得た。すなわち、同ペプチドで感作されたマウスの所属リンパ節細胞のペプチド刺激で誘導される IFN- γ 産生能については、むしろ Apo E KO で低下していた (図 3)。また、感作後 64 日目の抗 PLP178-191 抗体価については、WT と KO 間で総 IgG、IgG1、IgG2a のいずれにおいても、まったく差を認めなかった。以上の結果から、Apo E KO における抗原非特異的な脳炎増

強機構の可能性が除外された。

D. 考察

我々の今回の検討により、MOG35-55 ペプチド感作 EAE が Apo E KO で増強することが証明された。当初 Apo E KO の中枢神経系が炎症に対して脆弱で、それによって EAE が増強する可能性を推測した。しかし、感作リンパ節細胞の IFN- γ 産生能の増強や Th1 偏倚のデータから、我々は現在 Apo E KO で自己免疫 T 細胞応答が亢進し、その結果 EAE が増強するものと考えている。

MOG35-55 特異的 T 細胞の Th1 反応が KO で亢進する理由としては、抗原エピソードには関係しない機構を考えていたが、PLP178-191 ペプチドに対する T 細胞、B 細胞応答が、MOG ペプチドに対するそれと大きく異なることから、エピソード特異的な機構を考える必要がある。すなわち、Apo E KO マウスでは、自己反応性 T 細胞レパトアが偏倚していることが考えられ、それを説明する理論が必要である。

現在自己反応性 T 細胞レパトアの形成に関して、従来隔絶抗原と考えられた組織抗原が胸腺に発現することに興味が集まっている。EAE を誘導する自己抗原である PLP や MBP については、特定の splicing variant のみが胸腺に発現し、その splicing variant に含まれていないエピソードに対しては negative selection が機能しないことを示唆するデータなどが発表されている。

今回の検討で用いた MOG35-55 は胸腺に発現していないと言われるが、PLP178-191 は胸腺に発現していることが複数のグループによって確認されている。この点に着目し、我々は現在 Apo E KO では胸腺に発現していない自己抗原および外来抗原に対する免疫反応が亢進する一方、胸腺に発現している”真の自己”に対する反応は低下する可能性を考えている。実際、外来抗原である OVA に対する反応は、Apo E KO マウスで亢進していることを我々は確認している。また、ペプチドによるアナフィラキシーショックは”真の自己”に対しては起こらないという興味ある結果も Steinman らによって報告されている。今後、この仮

説を検証するため、Apo E KO をさまざまなペプチドで免疫して、今回用いたアッセイで検討を重ねる予定である。

E. 結論

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、エピソード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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成 15 年度）

1. 論文発表

英語論文

Koike F, Satoh J-i, Kondo T, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, and Yamamura T: Microarray analysis identifies IFN β -regulated genes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139: 109-118, 2003

Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S, Stein-Streilein S: CD4⁺ NKT cells, but not conventional CD4⁺ T cells, are required to generate efferent CD8⁺ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J. Immunol.* 171:1266-1271, 2003

Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sickinger A, von Hoersten S, and Yamamura T: Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y₁ receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J. Immunol.* 171: 3451-3458, 2003