

200400838A

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 16 年度研究報告書

主任研究者 天谷雅行

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成16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16年度分担研究報告書	
天疱瘡モデルマウスと Dsg3 欠損マウスにおけるデスモソーム分子構築の免疫電顕的比較検討	17
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 石河 晃	
マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析	22
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
表面プラズモン共鳴センサーを用いた抗 Dsg3 モノクローナル抗体総合カイネティクス解析	24
慶應義塾大学医学部 皮膚科 教授 西川 武二	
天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 I	27
慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学 教授 小安 重夫	
天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 II	31
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
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	35
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	41
慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学 教授 小安 重夫	
遺伝性末梢神経疾患における自己免疫応答の関与とモデル動物開発に関する研究	45
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	
細菌感染後 BAFF の共刺激による糖鎖特異的 B 細胞の維持	48
獨協医科大学 神経内科 助教授 結城 伸泰	

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……………52

慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行

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……………54

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

新規デスモグレイン Dsg4 の天疱瘡での水疱形成における役割の検討 ……………59

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……………63

V. 平成16年度班会議プログラム……………69

I. 平成16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
	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16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 16 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、3年計画の最終年度として、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^{-/-}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が作成された。自己免疫性神経炎では、末梢神経抗原である P0 の点突然変異を導入したノックインマウスが作成された。天疱瘡モデルマウスでは作成法の効率化が行われ、129/Sv バックの Dsg3 (天疱瘡抗原) ^{-/-}マウスと Rag2^{-/-}マウスを使用することにより、純系化した天疱瘡モデルマウスが作成され、より詳細な免疫学的な検討が可能となった。また、天疱瘡モデルを用いて詳細な免疫電顕的解析がなされ、水疱形成におけるデスモゾーム裏打ち蛋白の関与が示唆された。胸腺における Dsg3 発現の詳細な検討がなされ、胸腺では Dsg3 は接着因子としてではなく、免疫寛容を誘導するために発現している可能性が示唆された。表面プラズモン共鳴センサーを用いた抗 Dsg3 モノクローナル抗体結合カイネティクス解析が行われ、抗体により結合カイネティクスが異なることが明らかとなり、エピトープの他に病原性を左右する可能性が示唆された。さらに、Dsg3 に特異的に反応する B 細胞トランスジェニックマウスを用いて、CD4⁺T 細胞もしくは樹状細胞を介した新しいトレランスメカニズムが存在することが示唆された。また、PV モデルマウスより Dsg3 反応性 T 細胞クローンが樹立され、病的抗体産生に関与する T 細胞の解析が可能となった。これらの結果により、我々が開発した自己免疫モデル作成法が広く応用が可能であり、開発されたモデルマウスを用いて、自己免疫発症機序を解明する数多くの有用な知見が得られることが実証された。

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

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

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することを目的として、これらのマウスの表現型の詳細な解析を行いつつある。

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 KO マウスと M3 KO 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 KO 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 KO マウスは、真貝らによって作製された rag-2 KO 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 KO マウスを用いた。免疫原として、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 の第 2 細胞外ループをリコンビナント分子として発現精製したもの、ならびに M3 の第 2 細胞外ループの合成ペプチドを用いた。

3) 自己免疫性神経炎モデルマウスの作成及び解析

多発性硬化症や CIDP など臓器特異的自

己免疫疾患の研究において、遺伝因子と環境因子の両面からのアプローチが重要なのは言うまでもない。遺伝因子としては、免疫細胞の発現する遺伝子群に興味が集まってきたが、標的臓器あるいは標的抗原の遺伝子変異についても、その重要性を示唆する報告が散見されるようになっている。特に末梢神経を冒す炎症疾患、慢性炎症性脱髄性神経炎 (CIDP) では、末梢神経ミエリンの構成蛋白である P0 の点突然変異を伴う例の報告が集積されている。逆に、ミエリンの構成蛋白の点突然変異に起因する遺伝子神経疾患 Charcot-Marie-Tooth 病では、ステロイドに反応する症例や Guillain-Barre 症候群を併発する症例の報告があり、自己免疫と標的抗原の異常の間に、何らかの関連があることが示唆される。

P0 蛋白のヘテロ欠損マウスでは、生後 9 か月までに CIDP 様の末梢神経炎を自然発症するが、RAG-1 KO マウスと交配することにより、神経炎は発症しなくなることから、T 細胞や B 細胞が病態に関与することが推測されている。我々は、同マウスでは、胸腺内の P0 発現が低下し、その結果 P0 ペプチドに対する中枢性免疫寛容が破綻していることを、胸腺移植の実験などにより証明してきた。

本年度は、ヒト CIDP で見られるような点突然変異を有するマウスにおいて、中枢性免疫寛容の破綻が生じるか否かを検証した。すなわち、ヒト末梢神経疾患を忠実に再現するような動物モデルの確立を目指した。また、P0 ヘテロ KO マウスの CIDP 様神経炎の早期発症を誘導させるために、FcR γ IIb ノックアウトマウスとの交配を行った。

4) ギラン-バレー症候群モデルマウス作製及び解析

Guillain-Barré 症候群 (GBS) では、患者血中に高頻度に抗ガングリオシド抗体が検出される。発症前に何らかの先行感染症状が認められることが多く、病原体としては急性下痢症起因菌である *Campylobacter jejuni* が 3 割を占める。患者から分離された *C. jejuni* LPS の糖鎖構造が、ガングリオシド糖鎖と共通しており、菌体 LPS 糖鎖を

抗原として産生された抗体が、神経に豊富に存在するガングリオシドと交叉反応し、神経を障害する自己免疫疾患であることが明らかになってきた。

抗ガングリオシド抗体産生機序を調べるため、複合型ガングリオシドを合成できない GalNAcT^{-/-}マウスに、GM1、GD1a 糖鎖構造を有する種々の抗原を感作した。その結果、*C. jejuni* 菌体有感作すると、高力価の抗 GM1、抗 GD1a 抗体が産生されるのに対し、GM1、GD1a を高発現したマウスの細胞を感作しても抗体は全く産生されなかった。このことから、抗ガングリオシド糖鎖抗体の産生には、菌体由来の共刺激が必要であることが示唆された。

一方、GalNAcT^{-/-}マウスと同腹の GalNAcT^{+/+}マウスは、*C. jejuni* 菌体有感作しても、抗 GM1、抗 GD1a 抗体を全く産生しなかった。このことから、GalNAcT^{+/+}マウスでは、抗ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞が、自己ガングリオシドに曝され、ネガティブセレクションを受けていることが示唆された。

B 細胞活性化の共刺激としては、活性化 T 細胞に発現する CD40L が良く知られているが、樹状細胞やマクロファージに発現する BAFF や TLR のリガンドも共刺激活性があり、T 細胞非依存性に B 細胞を活性化している可能性がある。

本研究では、ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞を検出し、その生存および活性化に菌体由来の BAFF の共刺激が関与しているかどうか明らかにする。

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

免疫電顕用試料は、Dsg3^{-/-}マウスおよびそのコントロールの B6 マウス、PV モデルマウスおよびそのコントロールの Rag2^{-/-}マウスのそれぞれの口腔粘膜を採取した。採取した組織は、それぞれ 1mm³ 以下に細切し、凍結固定装置 (KF80) を用い、-190℃ に冷却した液体プロパンにて急速凍結固定し、凍結置換装置 (REICHERT AFS) にて、-80℃ に冷却したメタノールにて 48 時間凍結置換し、Lowicryl K11M に -60℃ 下

で 48 時間、室温下で 48 時間の UV 重合包埋により免疫電顕用ブロックを作成した。超薄切片を作成後、免疫染色を施し、透過型電子顕微鏡下にて観察した。

6) 天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討

免疫学的研究を行うにあたり、遺伝的背景の均一化は重要である。従来我々が用いていた Dsg3^{-/-}マウスの遺伝的背景は C57BL/6 と 129/Sv が混合しており、一方で Rag2^{-/-}マウスは C57BL/6 の背景を持ち、均一とはいえなかった。遺伝的背景の均一化を図るために Dsg3^{-/-}マウスを C57BL/6 と Balb/c の 2 系統に 12 代の戻し交配をしたが、結果として得られたマウスではホモ個体が生後間もなく死亡することが明らかとなり、モデルマウスに用いることが困難であった。

そこで我々はさらに 129/Sv に 12 代の戻し交配を行い、129/Sv-Dsg3^{-/-}マウスを用いて従来と同様に天疱瘡モデルマウスの作成が可能か検討した。また、生育不良を示す C57BL/6-Dsg3^{-/-}マウスの表現型をレスキューするために、表皮下層部で Dsg1 を発現する Dsg1 トランスジェニックマウスの作成をした。

7) マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析

野生型マウス、Dsg3 ノックアウトマウス、Aire ノックアウトマウスの胸腺を摘出し、凍結切片を作製した。我々の既に作成した抗マウス Dsg3 モノクローナル抗体および Dsg1, desmoplakin, PSA, S-100, renin のそれぞれに対する既存の抗体を反応させ、蛍光抗体法 (二重染色法) により観察した。

8) 表面プラズモン共鳴センサーを用いた抗 Dsg3 モノクローナル抗体結合カイネティクス解析

表面プラズモンセンサー・Biacore 200 (Biacore 社) を用いて種々の抗 Dsg3 モノクローナル抗体の結合カイネティクスの解析を行った。センサーチップ CM5 に 2000

(Resonance Unit; RU)のAK mAb をアミノカップリング法にて固定化した。ランニングバッファー (HBS-P: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.005% Surfactant P20, 0.5mM CaCl₂p, H7.4) 中に各 Dsg 蛋白をアナライトとして混濁し一定の流速で反応させた。再生バッファーは 10mM Gly-HCl pH2.0 を用いた。

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

天疱瘡モデルマウスより得られた Dsg3 に対するモノクローナル抗体 AK7 を用い、IgM を発現する B 細胞トランスジェニックマウスを作成した。なお AK7 は明らかな病原性を有していない。本マウスでは B 細胞は正常に成熟し、末梢において、除去、不活化の影響を受けていなかった。天疱瘡の患者で検出される自己抗体は IgG4, IgG1 である。従って我々は病原性を有する抗体 AK23 mAb を AK7-Tg マウスへ接種し、Dsg3 に特異的なトレランスのメカニズムへの影響を検討した。

10) Dsg3 反応性 T 細胞の同定および解析

本年度は、1) Dsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスからの Dsg3 反応性 T 細胞クローンの樹立、2) T 細胞クローンの特性 (抗原認識機構、サイトカイン産生能など) の解析、3) T 細胞クローンを Dsg3^{-/-}マウス B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスへ移入し、抗 Dsg3 抗体産生や PV 発現型による病原性の確認を主に行った。さらに、個々の Dsg3 反応性 T 細胞クローンの特性と病原性を比較し、病原性と関連する T 細胞の特性 (たとえば、特定の T 細胞エピソードやサイトカイン産生能) の抽出を試みた。

11) 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

免疫沈降法による天疱瘡患者血清と組換え Dsg4 の反応性を検討した。Dsg4 組換え蛋白 (hDsg4-His) を充填したカラムを作成し、落葉状天疱瘡 (PF) 患者血清から抗 Dsg4 抗体を除去した (n=2)。処理された

PF 血清は抗 Dsg4 抗体除去処理していない PF 血清とともに硫酸アンモニウム沈殿によりその IgG 分画が濃縮された。さらに hDsg4-His を充填したカラムからアルカリを用いてアフィニティー精製された IgG 分画 (抗 Dsg4 抗体) も濃縮された (n=2)。これらの IgG 分画は免疫沈降法によりその反応性について検討した。

抗 Dsg4 抗体の病原性を評価するため、PF 血清中の IgG 分画、抗 Dsg4 抗体を免疫吸着した IgG 分画を濃縮した。さらにそれぞれを段階希釈し、生後 12-24 時間の新生仔マウス・ICR マウス (体重 1.6-1.8g) に皮下注射後、9-24 時間で肉眼的・顕微鏡的に水疱形成の有無を観察した。同様に、アフィニティー精製された抗 Dsg4 抗体を濃縮した後、新生仔マウスに皮下注射し、水疱形成能について検討した。

(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。(慶應義塾大学承認番号 034062, 045113, 042013; 獨協医科大学承認番号 0208, 0302; 東京大学医科学研究所承認番号 13-116)

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. 海馬の抑制性シナプス伝達における M1, M2, M3 の役割について。ムスカリン性の刺激は海馬の抑制性シナプス伝達を 2 つの方法で抑えることが分かった。一つは、シナプス前部に存在する M2 受容体が活性化された結果、GABA の放出が減少すると機構である。もう一つは、シナプス後部に存在する M1 や M3 受容体が活性化された結果、内因性カンナビノイドの放出が起こり、シナプス前部にあるカンナビノイド受容体 (CB1) を活性化されて、GABA の放出が減少するという機構である。

2. 唾液分泌における M1, M3, M5 の役割について。分散したマウス顎下腺細胞を様々な濃度のカルバコール (非選択的コリン性アゴニスト) で刺激し、細胞内の一過

性カルシウム濃度上昇を可視化して、細胞の反応性の指標とした。この結果、M3 ノックアウトマウスの唾液腺細胞では、応答が極めて弱くなることが判明した。M1 ノックアウトマウスや M5 ノックアウトマウスでは、そのような減少はほとんど起こらなかった。さらに、M1 と M3 の両者が欠失したノックアウトマウスでは、カルバコールに対する応答は完全に消失していた。これらのことから、カルシウム応答については M3 が主要な役割を担い、ごく一部を M1 が担っていると結論できた

3. 排尿機構における M2, M3 の役割。麻酔下のマウスでシストメトリーを行い、排尿動態を調べた。オスにおいては、M3 ノックアウトマウスで排尿間隔が長くなっており、一回排尿量が増えていることから、膀胱容量が増加していると結論された。メスにおいては、M2 ノックアウトマウス、M3 ノックアウトマウスの両者において排尿間隔が長く、一回排尿量が増加していた。アトロピンを全身投与したところ、M3 ノックアウトマウスでは変化が見られなかった。これらのことから、マウスの排尿においては M3 が重要な役割を担うと結論された。

4. 中枢神経系におけるムスカリン性アセチルコリン受容体各サブタイプの分布。脳の各部位について、非選択的なムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストである N メチルスコポラミンの結合を評価した。この結果、M1 は大脳皮質や海馬で多く発現していることが分かった。線条体では M1 と M4 が多く発現していた。M2 は視床、視床下部、中脳、橋、延髄、小脳、脊髄において優勢なサブタイプであることが分かった。

5. 腸管神経叢からのアセチルコリン放出におけるムスカリン性アセチルコリン受容体各サブタイプの役割。M2 と M4 の両者を共に欠失したマウスにおいては、アトロピンによるアセチルコリン放出増強反応が失われていたことから、ムスカリン性アセチルコリン受容体によるアセチルコリン放出の抑制はこれら二つのサブタイプが担うと結論された。

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

今年度は、M3 の第2細胞外ループのペプチドを用いて免疫した M3 KO マウスの脾臓細胞の移植によっては、rag-2 KO マウスにシェーグレン様症状を引き起こすことは出来なかった。合成ペプチドによる免疫では、糖鎖などの修飾がない為実際 M3 の第2細胞外ループの構造を反映しない場合がある。事実、野生型マウスに免疫した場合でも KO マウスと同程度に抗体価が上昇し、自己抗原に成り得ていない可能性が考えられる。

一方、M2 の第2細胞外ループを標的とした自己免疫反応を誘発するマウスを作製することにより、炎症細胞の浸潤、自己抗体の産生と心筋表面への IgG の沈着、心重量の増加が観察され、マウスに心筋炎を惹起することに成功した。臨床において拡張型心筋症は、重篤な心不全をきたす予後不良の難治性疾患であり、その発症機序や治療法開発の観点からモデル動物の作製は極めて重要である。心筋炎は、拡張型心筋症に至る過程で起こるという考え方がある。その証拠として、急性心筋症の原因となるウイルスゲノムや、急性心筋炎患者において見出される抗心筋抗体が、拡張型心筋症患者でも検出されることが知られている。

現在までに拡張型心筋症モデル動物は、心筋ミオシンや β 1 アドレナリン受容体を長期間に渡って強制免疫することで作製できることが報告されている。我々が行ったように、M2 KO マウスに対し M2 由来のペプチドを免疫することで、短期間に高い抗体価を得られるばかりでなく、同受容体に対する細胞性免疫が誘導出来る点が強みである。rag-2 KO マウスに上記の脾臓細胞を移植することで、液性免疫のみならず細胞性免疫による自己免疫性心筋炎が誘導出来、心筋症様変化をきたす過程が観察されたことは、この方法が自己免疫疾患モデルマウスを作製するのに優れていたと考えられる。

3) 自己免疫性神経炎モデルマウスの作

成及び解析

P0 sub は生後数週間で明らかな後肢麻痺を呈し、病理学的には Charcot-Marie-Tooth 病 type 1B に類似している。ドイツから搬入した 3 系統のうち、2 系統についてはコロニーの確立に成功し、日本国内で実験が行えるようになった。

P0+/- FcR γ IIB-/-マウスは、これまで 3 匹観察しているが、生後 3 か月まで特に神経症状を表さないことがわかった。

臓器特異的自己免疫疾患を自然発症するマウスとしては NOD マウスが広く使われているが、最近では、ZAP-70 分子に異常のあり関節炎を発症する SKG マウスや、シェーグレン様症候群を発症する Id3 ノックアウトマウスなど、多様なマウスモデルが利用できるようになっている。しかし、いずれも T 細胞シグナルに関する分子の異常であり、標的臓器の自己抗原発現の異常で発症する P0+/- 神経炎は、きわめてユニークである。このモデルを基本として、さらに解析が容易か、あるいは、ヒトの病態に近いモデルが作出できれば、大きなインパクトがあると考えている。現在のところ、成功には至っていないが、引き続き研究を継続していく予定である。

4) ギラン-バレー症候群モデルマウス作製及び解析

1. *C. jejuni* 菌体感作による BAFF の発現

C. jejuni 菌体で感作した GalNAcT^{-/-} および GalNAcT^{+/-} いずれのマウスの脾臓にも BAFF 分子の誘導が認められた。一方、マウス細胞 LA-30 を感作したマウスでは BAFF 分子の誘導は認められなかった

(n=3)。腸管膜リンパ節には、いずれの抗原で感作したマウスにも BAFF の発現は認められなかった。

脾臓の免疫組織染色で BAFF の発現は検出できなかった。しかし、in situ ハイブリダイゼーションでは赤脾随に BAFF の発現が認められた。

2. ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞の検出

GalNAcT^{-/-}マウスの脾細胞および胸腺細胞を染色した結果、B220 陽性細胞の

0.2~0.3%が GD1a を結合した (n=3)。ネガティブコントロールの胸腺細胞では 0.02%の非特異的結合があった。一方、GalNAcT^{+/-}マウスでは、ビオチン標識抗 GD1a mAb で染色しただけでも、かなりの数の細胞が染まり、自己の GD1a を検出してしまうことがわかった。そこで、抗 GD1a mAb を使わずに染色する方法が必要になった。

GalNAcT^{-/-}マウスと GalNAcT^{+/-}マウスでは、*C. jejuni* 菌体糖鎖に対する反応性が明らかに異なる。これは、GalNAcT^{+/-}マウスでは、ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞が GalNAcT^{-/-}マウスよりも少ないためかも知れない。それを確かめるため、両マウスに存在する GD1a 糖鎖特異的 B 細胞の検出を試みたが、検出方法の限界から GalNAcT^{-/-}マウスでしか検出できなかった。GalNAcT^{+/-}マウスでの検出は今後の課題である。

骨髄で分化した IgM⁺の immature B 細胞は、脾臓でさらにセレクションを受ける。脾臓の移行期 T1 の B 細胞は、自己抗原によりネガティブセレクションされるが、移行期 T2 の B 細胞は抗原刺激で増殖、活性化されることが報告されている。BAFF が移行期 T2 以降の B 細胞の survival に働くという報告が多数あり、また、T1 期から T2 期への移行にも関与していることが示唆されている。GalNAcT^{-/-}マウスの脾臓に存在する、ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞を、自己抗原ガングリオシドで刺激するとどうなるか、その際 BAFF の共刺激を加えるとどうなるかを調べるのも、今後の課題である。

以上より、ガングリオシド GD1a を発現しない GalNAcT^{-/-}マウスの脾臓には、GD1a 糖鎖特異的 BCR を持つ B 細胞が存在した。また、*C. jejuni* 菌体感作で脾臓マクロファージに BAFF が誘導された。BAFF が、抗ガングリオシド抗体産生の共刺激として働くか否かの結論には至っていない。

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

抗原分布の検討では、Dsg3^{-/-}マウスは

コントロールと比較して DP のみが平均値において 9nm 有意に細胞内側に偏位し、他の構成分子は有意な変化を認めなかった。また、1 デスモソームあたりの抗原標識数の検討では PG に有意な減少を認め、他の構成分子は有意な変化を認めなかった。

PV モデルマウスはコントロールと比較して Dp のみが平均値において 24nm と大きく有意に細胞内側に偏位し、他の構成分子は有意な変化を認めなかった。また、1 デスモソームあたりの抗原標識数の検討では PG を含めたすべての構成分子において有意な変化を認めなかった。

以上のことより、類似の表現形を呈する Dsg3^{-/-}マウスと PV モデルマウスであるが、デスモソームで生じている変化に両者に差があることが証明された。また、PV モデルマウスにおける自己抗体結合後デスモソーム内にシグナルが伝達される機序の存在が示唆され、その結果 PG と DP の間の相互作用に変化を生じていると考えられた。

6) 天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討

Dsg3にて免疫した129/Sv-Dsg3^{-/-}マウスより脾細胞を採取し、129/Sv-Rag2^{-/-}マウスに移植したところ、移植後7日目から抗Dsg3抗体の出現が認められ、移入後2週目ころより、耳介周囲、頭頂部、顔面など、機械的刺激のある部位から脱毛、さらに体重減少が認められた。以上の結果より、129/SvバックのDsg3^{-/-}マウスと129/SvバックのRag2^{-/-}マウスを用いてPVモデルマウスを作製する事が出来る事が確認された。今後、129/Svマウスの特定の分画の脾細胞を、129/SvバックのDsg3^{-/-}マウスの脾細胞と供移植する事により、天疱瘡の発症遅延・治療が可能であるかどうかを検討して行く予定である。

また、K5 プロモーターを用いて表皮下層に Dsg1 を発現させる遺伝子を構築し、マウスに導入したところ、Dsg1 の発現が表皮下層の細胞間に確認された。また同マウスに AK23 を接種すると、野生型マウスに比べ、脱毛と体重減少の抑制が観察された。K5Dsg1TG+と Dsg3+/-との交配により、

K5Dsg1TG+Dsg3^{-/-}を得た。C57BL/6 の Dsg3^{-/-}マウスの生存率が 0% であるのに対し、このマウスの生存率は 50% であり、大きな効果が得られた。以上より、バックグラウンドを C57BL/6 に揃えた PV モデルマウス作製系の構築に向けた成果を得ることが出来た。

7) マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析

野生型マウス胸腺における Dsg 3 陽性細胞は、Dsg 1, desmoplakin, PSA, S-100, renin がともに陽性であった。Aire ノックアウトマウス胸腺においては明らかな Dsg 3 陽性所見を認めなかった。

Dsg 3 は重層扁平上皮のデスモソームに存在し、細胞接着機能を持つタンパクである。しかし胸腺において Dsg 3 は個細胞性に、細胞間ではない部位に発現しており、その細胞は角化細胞が通常発現しえない他の末梢抗原をも発現していることが、今年度の実験によって新たに示された。近年、胸腺における種々の末梢抗原の発現が Aire 遺伝子の支配下にあることが示唆され、Aire ノックアウトマウスでは多臓器に自己免疫反応がおこることが知られている。

また、Aire ノックアウトマウスの胸腺で Dsg 3 発現の著明な減弱を認めたことから、Dsg 3 は Aire 遺伝子の支配下に髄質胸腺上皮細胞で発現される種々の末梢抗原の 1 つであり、胸腺における Dsg 3 の存在意義は Dsg 3 に対する免疫寛容誘導にある可能性が示唆された。

8) 表面プラズモン共鳴センサーを用いた抗Dsg3モノクローナル抗体結合カイネティクス解析

本研究ではそれぞれ特性の異なる以下の代表的な 3 クローンの AK mAb を用いた。AK9 mAb (マウス Dsg3 の細胞外領域の C 末端側を認識する非病原性抗体)、AK18 mAb (中央部を認識する非病原性抗体)、AK23 mAb (N 末端側を認識する病原性抗体)。

表面プラズモンセンサーにて AK mAb と Dsg 蛋白の結合反応を観察することが可能

であった。これらの反応より得られたパラメーターより結合カイネティクス；解離定数 (KD) を以下の式によって求める。KD = 解離速度定数 (K dissociation; Kd) / 結合速度定数 (K association; Ka)。Ka 値は AK23 mAb、AK18 mAb、AK9 mAb の順で大きかった。また Kd 値は AK9 mAb、AK23 mAb、AK18 mAb の順で大きかった。以上の結果より算出される KD 値は AK18 mAb、AK23 mAb、AK9 mAb の順で小さく、総合的には AK18 mAb のアフィニティが mouse Dsg3 に対しては最も高いと考えられた。

つぎに、同一チップ上に同量の各 AK mAb (2000RU) を固定し、同時に mouse Dsg3 を反応させた結果、アフィニティが最も強かったのは AK18 mAb で続いて AK23 mAb、AK9 mAb の順であった。一方、同条件下で human Dsg3 と反応させたところそのアフィニティは AK18 mAb、AK9 mAb に比較して AK23 mAb が圧倒的に強かった。

以上より、AK mAb の Dsg3 に対する結合カイネティクスは病原性と明らかな相関は認められなかったものの、抗体により結合カイネティクスが異なることが明らかとなり、エピトープの他に病原性を左右する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

精製した AK23 mAb 0.2mg/mouse を AK7-Tg マウス腹腔内に接種し、1週間後に脾細胞を解析したところ、脾臓には Dsg3 反応性 B 細胞は検出されなかった。またこの現象は用量依存性であり、明らかな病原性を持たない抗体 AK7、AK9 では、同様の現象はみられなかった。

さらに、AK7-Rag2^{-/-}マウスに AK23 mAb を投与したところ、Dsg3 反応性 B 細胞は残存し、完全に消失しなかった。Rag2^{-/-}には T 細胞が存在しないため、B 細胞が消失しなかった、もしくは DC の機能異常のため消失しなかったと仮説を立て、正常マウス CD4 細胞を移入し、1週間後に AK23 を接種したところ、B 細胞は脾臓から消失した。従って AK23 の作用には DC

もしくは CD4 T 細胞が関わっていると考えられた。

現在まで病原性を持つ抗体の免疫学的な影響はほとんど不明であった。今回我々は Dsg3 に特異的な B 細胞トランスジェニックマウスに近年得ることができた病原性を持つ抗体 AK23 を接種することにより検討した。非常に興味深いことに、接種されたマウスでは、脾臓より B 細胞の消失が観察された。AK7-Rag2^{-/-}マウスでは AK23 mAb の効果は減弱し、CD4 細胞移入により回復することから、CD4 細胞もしくは DC による新しいトランスメカニズムが存在することが示唆された。本研究は詳細に検討すべき点が多く残されているものの、このメカニズムを明らかにすることは抗原特異的な自己免疫疾患への新たな治療法へ結びつくと考えられる。

10) Dsg3 反応性 T細胞の同定および解析

限界希釈法により計 21 個の Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立した。T 細胞株の反応性は多様で、rmDsg3-1~4 のいずれかを認識した。また、すべての T 細胞株は MHC class II 拘束性であった。5 株は TCRβ鎖遺伝子解析によりクローンであることが確認された。

Dsg3 反応性 T 細胞クローンの Vβ遺伝子を表 1 に示す。Vβ遺伝子と認識する Dsg3 断片との間に関連はみられなかった。また、CDR3 領域のアミノ酸配列にも特定のモチーフは見出されなかった。

Dsg3 反応性 T 細胞クローンのサイトカイン mRNA 発現パターンを表 1 に示す。3 株が Th1 型 (IFN-γ)、1 株が Th2 型 (IL-4)、1 株が Th0 型 (IFN-γ&IL-4) であった。

長期の培養が可能であった Dsg3 反応性 T 細胞クローン 2 株で病原性の検討を行った。B 細胞と共に Th1 型クローン 129#30 を移植したマウスでは抗 Dsg3 抗体価上昇、PV 発現型を認めなかった。一方、Th0 型クローン 140#27 を移植したマウスでは抗 Dsg3 抗体価が上昇した (図 1)。これらマウスでは陽性コントロールと同様に PV 発現型を示し、直接蛍光抗体法で口蓋組織の上皮細胞間に IgG の沈着を認めた。

、以上の結果より、PV モデルマウスを用いることで Dsg3 反応性 T 細胞クローンの病原性を解析する実験系を確立した。今後、多数の T 細胞クローンを解析することにより、病原性を規定する因子の同定が可能と考えられた。

1 1) 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

Dsg4 反応性 PF 血清から hDsg4-His を充填したカラムを用いて抗 Dsg4 抗体を除去すると Dsg4 に対する反応性は完全に消失した。このカラムからアフィニティー精製した IgG 分画は Dsg1 とともに Dsg4 との反応性を示した。一方 Dsg3 との反応性はなかった。

さらに、血清から抗 Dsg4 抗体を除去し濃縮した IgG 分画を等倍および 2 倍希釈し、新生仔マウスに注射した。いずれのマウスにおいても 13 時間以内に肉眼的・顕微鏡的に水疱形成が観察された。一方 4 倍以上に希釈したいずれの IgG 分画においても 24 時間後に水疱形成を認めなかった。すなわち血清を濃縮した IgG 分画・血清から抗 Dsg4 抗体を除去し濃縮した IgG 分画両者間でマウスにおける水疱形成能に差異はなかった。さらにアフィニティー精製された抗 Dsg4 抗体を新生仔マウスに注射、24 時間観察したところ、水疱は誘導されなかった。

以上より、以上より Dsg4 は天疱瘡における水疱形成にほとんど関与していないことが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

英語論文 60 編

1. 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.

2. Araki, M., T. Kondo, J.E. Gumperz, M.B. Brenner, S. Miyake and T. Yamamura: Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol* 15: 279-288, 2003

3. Miyamoto, K., S. Miyake, M. Schachner, and T. Yamamura: Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide. *Eur. J. Immunol* 33: 656-665, 2003

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

5. Nakamura, T., K.-H. Sonoda, D.E. Faunce, J. Gumperz, T. Yamamura, S. Miyake, J. Stein-Streilein: 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

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

7. Stanic, A.K., R. Shashidharamurthy, J.S. Bezradica, N. Matsuki, Y. Yoshimura, S. Miyake, E.Y. Choi, T.D. Schell, L. Van Kaer, S.S. Tevethia, D.C. Roopenian, T. Yamamura and S. Joyce: Another view of T cell antigen recognition: Co-operative engagement of glycolipid antigens by Val4Ja18 natural TCR. *J. Immunol* 171:4539-4551, 2003

8. 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** 122:1145-1153, 2004.
9. 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** 151:346-354, 2004.
10. Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, and Stanley JR. Desmosomes and diseases: Pemphigus and bullous impetigo. **Curr Opin Cell Biol** 16:536-543, 2004.
11. Ota T, Aoki-Ota M, Tsunoda K, Simoda K, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S. Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int Immunol** 16:1487-1495, 2004.
12. Anzai H, Fujii Y, Nishifuji K, Aoki-Ota M, Ota T, Amagai M, and Nishikawa T. Conformational epitope mapping of antibodies against desmoglein 3 in experimental murine pemphigus vulgaris. **J Dermatol Sci** 35:133-142, 2004.
13. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, and Hashimoto T. The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. **Br J Dermatol** 151:73-83, 2004.
14. Takahashi H, Anzai H, Suzuki Y, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T: Parallel fluctuation of anti-desmoglein 3 and anti-BP180 autoantibody titres in a patient with bullous pemphigoid. **Clin Exp Dermatol** 29:608-611, 2004
15. Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, Whittock NV, and Amagai M. Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 114:1484-1492, 2004.
16. Niizeki H, Kumagai S, Kanagawa S, Amagai M, Yamashina Y, Asada H, Nishikawa T, and Miyagawa S. Exclusion of the TAP1 and TAP2 genes within the HLA class II region as candidate susceptibility genes to pemphigus in the Japanese population. **J Dermatol Sci** 36:122-124, 2004.
17. Igawa Y, Zhang X, Nishizawa O, Umeda M, Iwata A, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Andersson KE. Cystometric findings in mice lacking muscarinic M₂ or M₃ receptors. **J Urol**. 172: 2460-2464, 2004
18. Nakamura T, Matsui M (corresponding author), Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N, Nakamura K, Manabe T, Taketo MM, Mikoshiba K. M₃ muscarinic acetylcholine receptor plays critical role in parasympathetic control of salivation in mice. **J Physiol. (London)**. 558: 561-575, 2004
19. Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T, Kano M. Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M₂-mediated direct suppression and M₁/M₃-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling. **Eur J Neurosci**. 19: 2682-2692, 2004
20. Matsui M, Yamada S, Oki T, Manabe T, Taketo MM, Ehlert FJ. Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice (invited review). **Life Sci**. 75: 2971-2981, 2004
21. 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
22. 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
23. Matsuda, S., Miwa, Y., Hirata, Y., Minowa, A., Tanaka, J., Nishida, E. and Koyasu S. Negative feedback loop in T cell activation through MAPK-catalyzed threonine phosphorylation of LAT. **EMBO J.** 23: 2577-2585, 2004
 24. Godschalk PCR, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HPh. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in the Guillain-Barré syndrome. **J Clin Invest** 114:1659-1665, 2004.
 25. Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101:11404-11409, 2004.
 26. Susuki K, Nishimoto Y, Koga M, Nagashima T, Mori I, Hirata K, Yuki N. Various immunization protocols for an acute motor axonal neuropathy rabbit model compared. **Neurosci Lett** 368:63-67, 2004.
 27. Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanesaka T, Hattori T, Yuki N. Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barré syndrome? **Neurology** 63:529-533, 2004
 28. Nishimoto Y, Koga M, Kamijo M, Hirata K, Yuki N. Immunoglobulin improves a model of acute motor axonal neuropathy by preventing axonal degeneration. **Neurology** 62:1939-1944, 2004
 29. Nagashima T, Koga M, Odaka M, Hirata K, Yuki N. Clinical correlates of serum anti-GT1a IgG antibodies. **J Neurol Sci** 219:139-45, 2004.
 30. Susuki K, Yuki N. Effect of methylprednisolone in patients with Guillain-Barré syndrome. **Lancet** 363:1236-1237, 2004
 31. Susuki K, Odaka M, Mori M, Hirata K, Yuki N. Acute motor axonal neuropathy after *Mycoplasma* infection: evidence of molecular mimicry. **Neurology** 62:949-956, 2004
 32. Galassi G, Susuki K, Quaglino D, Yuki N. Post-infectious acute ataxia and facial diplegia associated with anti-GD1a IgG antibody. **Eur J Neurol** 11:790-791, 2004
 33. 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. **Review Series Pediatrics** 2:22-23, 2004
 34. Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Yuki N. Usefulness of anti-GQ1b IgG antibody testing in Fisher syndrome compared with cerebrospinal fluid examination. **J Neuroimmunol** 148:200-205, 2004
 35. Odaka M, Yuki N, Tatsumoto M, Tateno M, Hirata K. Ataxic Guillain-Barré syndrome associated with anti-GM1b and anti-GalNAc-GD1a antibodies **J Neurol** 251:24-29, 2004
 36. Mori I, Koga M, Hirata K, Yuki N. Hand weakness onset Guillain-Barré syndrome. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 75:169-170, 2004
 37. Pan CL, Shun CT, Susuki K, Yuki N, Hsieh ST. Pharyngeal-brachial palsy after cytomegalovirus colitis. **Neurology** 62:153-154, 2004
 38. Matsuo M, Odaka M, Koga M, Tsuchiya K, Hamasaki Y, Yuki N. Bickerstaff's brainstem encephalitis associated with IgM antibodies to GM1b and GalNAc-GD1a. **J Neurol Sci** 217:225-228, 2004
 39. 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
40. Kuwana M: b₂-glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. *Thromb Res* 114: 347-355, 2004
41. Yasuoka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata M, Inoko H, Ikeda Y, Kuwana M: Autoreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related molecule A in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 50: 3658-3662, 2004
42. Chiba, A., S. Oki, K. Miyamoto, H. Hashimoto, T. Yamamura, and S. Miyake: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of a-galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 50:305-313, 2004
43. Illes, Zs., M. Shimamura, J. Newcombe, N. Oka, and T. Yamamura: Accumulation of Va7.2Ja33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004
44. Oki, S., A. Chiba, T. Yamamura and S. Miyake: The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J. Clin. Invest.* 113: 1631-1640, 2004
45. Satoh, J-i., T. Yamamura, and K. Arima: The 14-3-3 protein e isoform, expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis, binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *Am. J. Pathol.* 165: 577-592, 2004
46. Rosen, D.B., M. Araki, J.A. Hamerman, T. Chen, T. Yamamura and L.L. Lanier: A structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J. Immunol.* 173: 2470-2478, 2004
47. Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Miyake, and T. Yamamura: The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127: 1917-1927, 2004
48. Nakai, Y., K. Iwabuchi, S. Fujii, N. Ishimori, N. Dashtsoodol, K. Watano, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J.S. Bezbradica, T. Nakayama, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura, A. Kitabatake, S. Joyce, L. Van Kaer, and K. Onoe: Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood* 104: 2051-2059, 2004
49. Mizuno, M., M. Masumura, C. Tomi, A. Chiba, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.* 23:293-300, 2004
50. Hashimoto, D., S. Asakura, S. Miyake, T. Yamamura, L. Van Kaer, C. Liu, M. Tanimoto, and T. Teshima: Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J. Immunol.* 174: 551-556, 2005
51. Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal T helper type 1/T helper type 2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of Va14 natural killer T cells in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 11:35-41, 2005
52. Yu, K.O.A., J.S. Im, A. Molano, Y. Dutronc, P.A. Illarionov, C. Forestier, N. Fujiwara, I. Arias, S. Miyake, T. Yamamura, Y-T. Chang, G.S. Besra, and S.A. Porcelli: Modulation of CD1d-restrocted NKT cell responses by using N-acyl variants of a-galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3383-3388, 2005
53. Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, S. Miyake, T.

- Yamamoto, M. Kawai, S. Kukuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. **Neurobiol. Dis.** in press
54. Ota, T., K. Takeda, H. Akiba, Y. Hayakawa, K. Ogasawara, Y. Ikarashi, S. Miyake, H. Wakasugi, T. Yamamura, M. Kronenberg, D.H. Raulet, K. Kinoshita, H. Yagita, M.J. Smyth, and K. Okumura: IFN-g-mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NG2. **Blood** in press
55. Chiba, A., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: The involvement of Va14 NKT cells in the pathogenesis of murine models of arthritis. **Arthr. Rheumat.** in press
56. Kuwana M, Ikeda Y: The role of autoreactive T cells in the pathogenesis of ITP. **Int J Hematol** in press.
57. Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki K, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of b₂-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. **Blood** in press.
58. Takeuchi T, Fujinami K, Goto H, Fujita A, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Hata F. Roles of M2 and M4 muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. **J Neurophysiol.** in press
59. Ehlert FJ, Griffin MT, Abe DM, Vo TH, Taketo MM, Manabe T, Matsui M. The M₂ muscarinic receptor mediates contraction through indirect mechanisms in mouse urinary bladder. **J Pharmacol Exp Ther.** in press
60. Oki T, Takagi Y, Inagaki S, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Yamada S. Quantitative analysis of binding parameters of [³H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Brain Res Mol Brain Res.** in press
- 日本語論文 (代表的なもの)
1. 山村 隆: NKT 細胞のリガンドと Th1/Th2 バランス. **臨床免疫** 41: 14-17, 2004
 2. 宮本 勝一, 山村 隆: 多発性硬化症の新しい治療薬の開発. **Clinical Neuroscience** 22: 847-850, 2004
 3. 山村 隆: MS FRONTIER. 多発性硬化症の DNA マイクロアレイ解析. **Current Insights in Neurological Science.** Vol 12, No. 3, pp 10-11, 2004
 4. 山村 隆, 高橋 和也, 荒木 学: 多発性硬化症と免疫調節細胞. **日本臨床 2005年増刊. 臨床免疫学 (下) -基礎研究の進歩と最新の臨床-** (印刷中)
 5. 山村 隆: 多発性硬化症における免疫抑制薬の使い方: 神経免疫疾患. **最新医学** (印刷中), 2005
 6. 桑名正隆: 自己免疫疾患の遺伝子学. **最新医学** 59: 78-92, 2004.
 7. 天谷雅行: 水疱性疾患の自己抗体. **臨床検査** 48: 283-288, 2004
 8. 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** 17: 136-140, 2004
 9. 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
 10. 天谷雅行: 天疱瘡. **アレルギー科** 17: 136-140, 2004
 11. 角田和之, 天谷雅行: 自己抗原ノックアウトマウスを用いた天疱瘡モデルマウス. **細胞工学** 23: 1198-1201, 2004
 12. 天谷雅行: 抗デスマグレイン自己免疫疾患・天疱瘡の病態解明-この10年の進歩-, **細胞** 36: 477-480, 2004
 13. 大田孝幸, 天谷雅行: 自己抗原ノックアウトマウスモデルからB細胞トランスジェニックマウスへ. **Molecular Medicine**: 印刷中
- G. 知的所有権の取得状況
- なし

Ⅲ. 平成16年度分担研究報告書