

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

2. 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

3. 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

4. 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)

5. 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)

6. 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)

7. Matsui M (corresponding author), 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

日本語論文
なし

2. 学会発表

西山達明 他 5名、Protease-activated receptor-2 (PART-2)を介した新たな唾液分泌機構の検討、第9回シェーグレン症候群市川セミナー2004、平成16年4月10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：自律神経機能と脳機能、学習院大学理学部生命分子科学研究所セミナー、平成16年4月27日

西山達明 他 8名、Protease-activated receptor-2 (PAR-2)を介した唾液分泌機構の解析、第93回日本病理学会総会、平成16年6月9日～11日

豊原辰幸 他 6名、マウス気管筋収縮反応におけるM₂、M₃受容体の意義、Airway Club in Sendai 第13回研究会、平成16年9月10～11日

篠江 徹 他 2名、Cholinergic regulation of hippocampal synaptic plasticity via M₁ muscarinic receptors. 第27回日本神経科学大会、平成16年9月21～23日

豊原辰幸 他 6名、マウス気管筋収縮反応におけるM₂、M₃受容体の意義、第54回日本アレルギー学会総会、平成16年11月4～6日

田中圭介 他 4名、マウス小腸縦走筋の収縮反応におけるムスカリン受容体の役割：ムスカリン受容体欠損マウスを用

いた検討、第106回日本薬理学会近畿部会、平成16年11月5日

豊島真紀子 他 7名、マウス胃幽門部輪走筋での電気刺激誘発持続性弛緩とムスカリン受容体による調節、第106回日本薬理学会近畿部会、平成16年11月5日

相原 剛 他 4名、Gastric acid secretion in mice lacking M_1 or M_3 muscarinic acetylcholine receptor、第2回 Science and Research Symposium (ファイザー) . 平成16年11月11日

泉 和樹 他 7名、選択的ムスカリン M_3 受容体拮抗薬の大腸癌担癌マウスにおける抗腫瘍効果、日本消化管学会第1回学術集会、平成17年1月28~29日

相原 剛 他 3名、Cholinergically stimulated gastric acid secretion is

mediated by M_3 and M_5 , but not M_1 , muscarinic acetylcholine receptors in mice. 第78回日本薬理学会年会、平成17年3月22~24日

泉 和樹 他 7名、A selective M_3 muscarinic receptor antagonist suppresses Colon 38 tumors in mice. 第78回日本薬理学会年会、平成17年3月22~24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、第78回日本薬理学会年会、平成17年3月24日

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

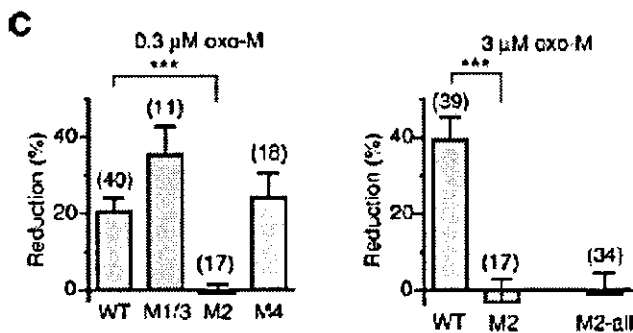


図1-1 M2 ノックアウトマウスでは oxo-M による抑制性シナプス伝達の抑制が見られない。

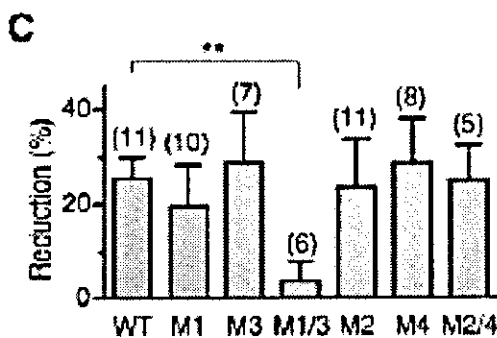


図1-2 M1/M3 ダブルノックアウトマウスでは内因性カンナビノイドを介する抑制性シナプス伝達の抑制が見られない。

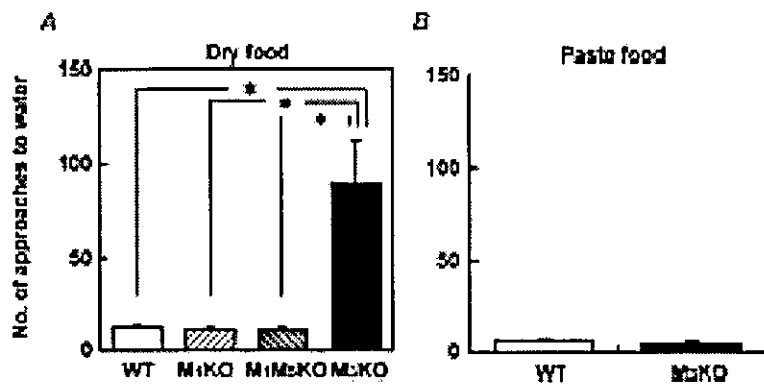


図2 M3 ノックアウトマウスは乾燥餌を食べる際に頻回の飲水行動を行う。

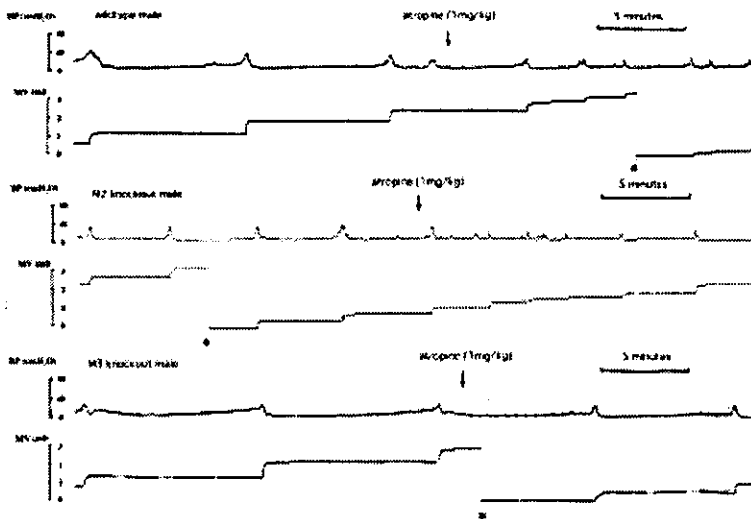


図3 シストメトリーの例。M3 ノックアウトマウスでは排尿間隔が長い。

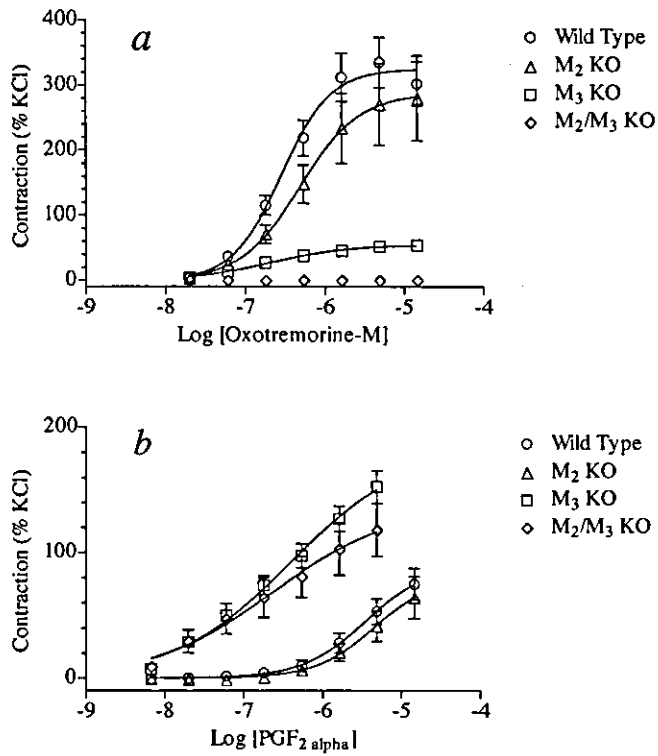


図4 M3 を欠失したマウスでは、コリン性収縮が減弱するが PGF₂α による収縮が増強している。

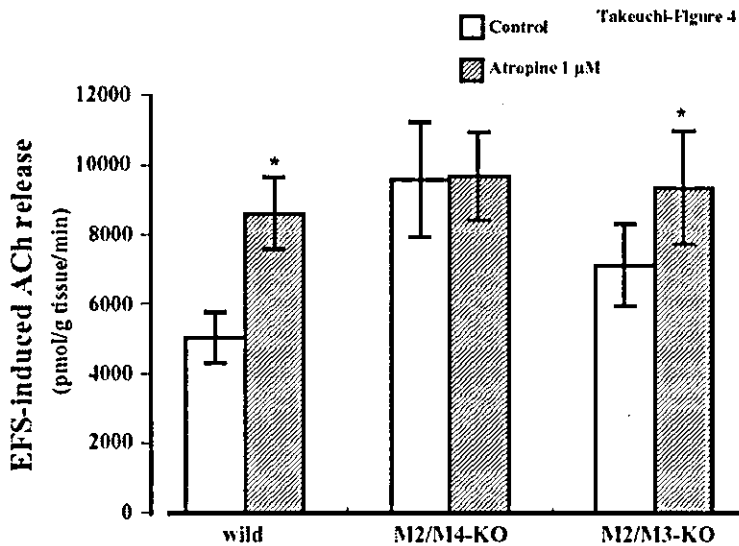


図5 M₂/M₄ ダブルノックアウトマウスではアトロピンによるアセチルコリン放出促進作用が検出されない。

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 年度分担研究報告書

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。また M2 は心臓特異的に発現していることから、前年度に引き続き今年度も 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 並びに抗 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て、マウスの観察を行なっている。M2 においては、脾臓細胞移入後に心臓へのリンパ球の浸潤及び組織傷害を認めた。これはマウスの心筋炎モデルとして有用であると考えられる。

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（KO）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 KO 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 KO 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 KO 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 受容体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 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

トランスフェラーゼ (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。

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 M2 に関しては N 端部位とともに、第 2 細胞外ループの部分融合タンパク質として発現させた。M2 KO 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 ImmuneEazy (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。そこで免疫したマウスの脾臓細胞を調製し、rag-2 KO 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 15 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は見られなかった。

M2 の場合には 1、2 週間後には、心室中隔から右室自由壁にかけて、芽球化したリンパ球と形質細胞が心筋線維間に層状に浸潤している像が観察され、心筋炎の像を呈した。約 3 週間後には全体的な浸潤の程度は軽度となったが、炎症細胞に囲まれた心筋の壊死が見られた。また、炎症細胞浸潤の周囲に、細胞の肥大に伴った核の腫大像が認められたが、これは運動負荷などによる生理的な肥大とは異なる像を示した。6 週間目以降は全体的に浸潤の程度は軽度となり、10 週間目以降は浸潤がほとんど認められなくなった。それに代わって異常な走行を示す心筋線維や、多核化した細胞

が認められるようになった。

脾臓細胞移植後、血清中の M2 に対する抗体価を ELISA 法にて測定した。実際に免疫に使用した M2 の第 2 細胞外ループに対する抗体価は、移植後すぐに上昇した。さらに興味深いことに、普段免疫系に曝されていないはずの M2 の第 3 細胞内ループに対する抗体価の上昇が観察されたことである。第 3 細胞内ループに対する抗体価は、脾臓細胞移植後 1 2 週目以降に遅れて上昇した。これは炎症細胞の浸潤に伴い、実際に心筋細胞の破壊が起こっていることを示唆している。また移植後 1 5 週目には、心重量がコントロール群と比較して有意に増加した。それらの心筋において、蛍光抗体法により IgG の沈着が観察された。なお、IgM、IgA、C3、フィブリノーゲンの沈着は認められなかった。

M3 に関しては昨年度とは異なり、M3 の第 2 細胞内ループのペプチドを合成し、これを免疫原とした。M3 KO マウスに抗原 10 μ g/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 μ g を不完全フロイントアジュバントを用いて 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、十分な抗体価が検出された。抗体価の上昇したマウスの脾臓細胞を、M2 の場合と同様に rag-2 KO マウスに移植し、12 週目以降に各種臓器を解析した。移植マウスの血清中の抗体価は上昇したものの、胃の幽門部に僅かに形態的变化が見られる以外に変化はなく、唾液腺や涙腺などの腺組織は正常であった。

D. 考察

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特長である。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。

今後はこのモデル動物において、心臓超音波検査、カテーテルを用いた心腔内圧の測定、心筋細胞の活動電位の測定等、生理学的な考察を加え、この病態が拡張型心筋症様変化をきたしているかを検討したい。

E. 研究発表 (平成 16 年度)

原著論文

1) Matsuda, S., Miwa, Y., Hirata, Y., Minowa,

- A., Tanaka, J., Nishida, E. and Koyasu, S. (2004) Negative feedback loop in T cell activation through MAPK-catalyzed threonine phosphorylation of LAT. **EMBO J.** 23: 2577-2585.
- 2) Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K. and Karasuyama, H. (2004) Ly49Q, a novel member of Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101:1016-1021.
- 3) Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M. and Nishikawa, T. (2004) A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br. J. Dermatol.** 151:346-354.
- 4) Ota, T., Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Shimoda, K., Nishikawa, T., Amagai, M. and Koyasu, S. (2004) Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int. Immunol.** 16:1487-1495.
- 5) Esashi, E., Ito, H., Ishihara, K., Hirano, T., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2004) Development of CD4⁺ macrophages from intrathymic T cell progenitors is induced by thymic epithelial cells. **J. Immunol.** 173:4360-4367.
- 6) Imai, J., Hasegawa, H., Maruya, M., Koyasu, S., and Yahara, I. (2005) Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. **Int. Immunol.** 17:45-53.

総説

- 1) Koyasu, S. (2004) Role of class I_A PI3K in B lymphocyte development and functions. **Biochem. Soc. Trans.** 32:320-325.

F. 知的所有権の取得状況
なし

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年度分担研究報告書

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

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 部長

研究要旨 P0 遺伝子のヘテロ KO マウスでは胸腺内 P0 蛋白の発現が低下し、その結果、中枢性免疫寛容の破綻が起こり、P0 を標的とする自己免疫疾患の感受性が高まるというモデルを、我々は提唱してきた。ヒトの慢性炎症性脱髄性神経炎（CIDP）で、P0 の点突然変異を伴う症例の報告が蓄積されており、その発症機構が注目される。本年度は、P0 の点突然変異を導入したノックインマウスを導入し、免疫学的解析の準備を開始した。また、P0 ヘテロ KO マウスと FcR γ IIB ノックアウトマウスの交配を行い、末梢神経炎の発症が増強されるか検討した。

研究協力者

三宅 幸子（国立精神・神経センター神経研究所室長）

林 幼偉（国立精神・神経センター神経研究所研究員）

A. 研究目的

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きている。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。

本年度の研究目的は、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することにある。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す。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。

B. 研究方法

P0 蛋白の Ile106Leu 変異を P0 KO に導入したマウス（P0 sub）は、ハンブルク大学の Melitta Schachner 教授より提供を受けた（J Cell Biol 165: 565-573, 2004）。FcR γ IIB マウスは、東北大学の高井教授より供与を受けた。以上の系統の維持および P0 +/- マウスとの交配は、国立精神・神経センター

の動物実験施設で行った。週二回以上の臨床的観察を行い、一部のマウスについては病理学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立精神・神経センターの動物実験倫理規定に則り、あらかじめ動物実験委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

P0遺伝子の遺伝子異常を有するマウスのコロニーを複数確立した。P0+/-マウスを基本として、さまざまな遺伝子改変を導入することにより、将来的にはヒトの病態の解明に貢献するものと考えている。

F. 研究発表

論文発表

英文原著

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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)

8. 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/NKG2. *Blood* (in press)

9. 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)

英文総説

1. Yamamura, T., K. Miyamoto, Zs. Illes, E. Pal, M. Araki, and S. Miyake: NKT cell-stimulating synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 561-567, 2004

2. Miyake, S., A. Chiba and T. Yamamura: Potential of targeting natural killer T cells for the treatment of autoimmune diseases. *Mod. Rheum.* 14: 279-284, 2004

3. Bedoui, S., S. Miyake, R. Straub, von Hörsten, and T. Yamamura: More sympathy for autoimmunity with neuropeptide Y (NPY)? *Trends. Immunol.* 25:508-512, 2004

4. Miyake, S. and T. Yamamura: Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr. Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders.* 2004 (in press)

5. Croxford, J.L. and T. Yamamura: Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of

inflammatory diseases? *J. Neuroimmunol.* (in press)

和文総説

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

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

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

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)

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)

和文著書

佐藤 準一, 山村 隆: サイトカインの生理活性-神経系. Overview. 別冊・医学のあゆみ. サイトカイン -state of arts. (編集 宮坂 信之, 宮島 篤), 医歯薬出版(東京), pp 119-122, 2004

宮本 勝一, 山村 隆: サイトカインの病態への関与. 多発性硬化症. 別冊・医学のあゆみ. サイトカイン -state of arts. (編集 宮坂 信之, 宮島 篤), 医歯薬出版(東京), pp 245-247, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願なし。

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 年度分担研究報告書

細菌感染後 BAFF の共刺激による糖鎖特異的 B 細胞の維持

分担研究者 結城伸泰 獨協医科大学神経内科 助教授

研究要旨 【背景】複合型ガングリオシドを合成できない GalNAcT^{-/-}マウスは、ガングリオシド GM1、GD1a 様糖鎖を有する *Campylobacter jejuni* 菌体感作で、高力価の抗 GM1、抗 GD1a 抗体を産生する。【目的】抗ガングリオシド糖鎖抗体の産生には、糖鎖からの刺激と、菌体由来の共刺激が必要か、明らかにする。【方法】菌体由来の共刺激として、*C. jejuni* 菌体感作後の BAFF の発現を調べた。GalNAcT^{-/-}および 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 細胞を検出し、その数を比較した。ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞を、BAFF の共刺激とともにガングリオシドと刺激すると、抗ガングリオシド糖鎖抗体を産生するか調した。【結果】*C. jejuni* 菌体感作により、脾臓での BAFF の発現を認めた。GalNAcT^{-/-}マウス脾臓 B 細胞の 0.2-0.3%が GD1a を結合した。GalNAcT^{+/+}マウスでは、自己の GD1a を検出してしまい、GD1a の結合を検出できなかった。

共同研究者
松本幸恵 獨協医科大学助手

A. 研究目的

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。

一般に、細菌多糖などの糖鎖に対する抗体のクラスは IgM で、抗体産生には T 細胞のヘルプが関与していないと考えられている。しかし、GBS 患者では T 細胞ヘルプを示唆させる IgG1、IgG3 サブクラスの抗体が検出される。GBS での抗体産生に、果たして T 細胞のヘルプが関与しているか、

T 細胞なしにクラススイッチする機序があるのか、不明な点が多い。

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* 菌体を感作すると、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* 菌体を感作しても、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ことを目的とする。

B. 研究方法

(1) *C. jejuni* 菌体およびガングリオシド高発現細胞による BAFF 分子誘導の検討

GalNAcT^{-/-}マウス（名古屋大学古川鋼一教授より供与）は、獨協医科大学実験動物センターにて 8 代戻し交配後、GalNAcT^{-/-} (♀) x GalNAcT^{+/+} (♂) で維持した。GM1 および GD1a 様糖鎖構造を持つ *C. jejuni* 菌体 CF90-26 または GD1a を高発現したマウスの細胞株 LA-30 を不完全アジュバントとともにエマルジョン化し、GalNAcT^{-/-} および同腹の GalNAcT^{+/+} マウス腹腔に投与した。2 週おきに 3 回感作し、感作 1 週間後に ELISA 法にて抗ガングリオシド抗体価を測定した（ELISA の方法に関しては平成 15 年度報告書参照）。3 回感作後、脾臓、腸管膜リンパ節を取り出した。脾臓の一部はパラホルムアルデヒドで固定後、免疫組織染色用に凍結保存した。脾臓およびリンパ節からはメッシュ法にて細胞を調製した。

BAFF 分子の発現は、細胞をマウス IgG (100μg/ml) でブロッキング後、マクロファージマーカーの Mac-1-FITC で染色し、1% パラホルムアルデヒドで 5 分固定、BD 社 permeabilizing solution で細胞膜の透過処理をした。次いで、マウス IgG (100μg/ml) でブロッキング後、抗マウス BAFF 抗体 (5A8、ラット IgG1、ALEXIS 社) および PE 標識抗ラット IgG, F(ab')₂ (マウス血清吸収済) で染色し、フローサイトメトリーで検出した。

(2) ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞の検出

GalNAcT^{-/-}マウスを *C. jejuni* CF 菌体 90-26 で感作すると、抗 GD1a 抗体価はすべてのマウスで上がったが (n=7)、抗 GM1 抗体価は一部のマウスで上がらなかった。その理由はよくわからないが、この結果から、GM1 よりも GD1a 糖鎖特異的 B 細胞の方

が検出しやすいと考えた。そこで、GD1a 糖鎖特異的 BCR を、以下の方法で染色し、フローサイトメトリーで検出した。脾細胞および胸腺細胞 (B 細胞を含まないネガティブコントロールとして用いた) はメッシュ法で調製した。

【染色方法】

細胞をマウス IgG (100μg/ml) でブロッキング後、氷中で GD1a ミセル (1μg/ml)、ビオチン標識抗 GD1a mAb (GB1、10μg/ml)、ストレプトアビジン-Alexa405 の順に染色し、フローサイトメトリーで検出した。ストレプトアビジン-Alexa405 で染色の際、B 細胞のマーカーとして B220-FITC で 2 重染色した。また、細胞自身の GD1a の検出は、細胞をマウス IgG (100μg/ml) でブロッキング後、氷中でビオチン標識抗 GD1a MAb (10μg/ml)、ストレプトアビジン-Alexa405 の順に染色し、フローサイトメトリーで検出した。

C. 研究結果

(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 を検出してしまふことがわかった。そこで、抗 GD1a mAb を使わずに染色する方法が必要になった。

D. 考察

本研究で明らかにしたかったことは、(1) 抗ガングリオシド糖鎖抗体の産生には、抗原である糖鎖の刺激だけでなく、菌体由来の共刺激 BAFF が関与しているか、(2) ガングリオシド GM1、GD1a を産生できない GalNAcT^{-/-}マウスでは、GM1、GD1a 糖鎖特異的 BCR を持つ B 細胞が存在するのに対し、ガングリオシドを発現する GalNAcT^{+/+}マウスでは、それがネガティブセレクションで除去されているのではないか、(3) ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞は、BAFF の共刺激とともにガングリオシドと刺激すると、抗ガングリオシド糖鎖抗体を産生するか、である。

B 細胞活性化の共刺激として現在報告されているものには、活性化 T 細胞に発現する CD40L、LPS やフラジェリンなど TLR のリガンド、そして、マクロファージや樹状細胞が産生する BAFF 分子がある。C. jejuni 菌体感作の実験では、菌体のタンパク成分により活性化された T 細胞に CD40L が発現し、共刺激として働いている可能性がある。また、菌体の LPS が共刺激として働いている可能性もある。これまでに、BALB/c マウスを抗 CD40 抗体存在下に C. jejuni LPS で感作すると、抗ガングリオシド糖鎖抗体の産生が有意に上昇する、TLR4 のミュータントマウスである C3H/HeJ マウスでは、抗ガングリオシド糖鎖抗体の産生が有意に低下している、という報告がある。BAFF に関しては報告がなかったが、我々は、C. jejuni 菌体感作で BAFF の発現誘導を認め、BAFF も抗ガングリオシド糖鎖抗体産生の共刺激として働いている可能性が示唆された。

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表 (平成 16 年度)

論文発表
英語論文

1. 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* 2004;114:1659-1665.
2. 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* 2004;101:11404-11409.
3. 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* 2004;368:63-67.
4. Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanetsaka T, Hattori T, Yuki N.
Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barré syndrome?
Neurology 2004;63:529-533.
 5. Nishimoto Y, Koga M, Kamijo M, Hirata K, Yuki N. Immunoglobulin improves a model of acute motor axonal neuropathy by preventing axonal degeneration.
Neurology 2004;62:1939-1944.
 6. Nagashima T, Koga M, Odaka M, Hirata K, Yuki N. Clinical correlates of serum anti-GT1a IgG antibodies.
J Neurol Sci 2004;219:139-45.
 7. Susuki K, Yuki N.
Effect of methylprednisolone in patients with Guillain-Barré syndrome.
Lancet 2004;363:1236-1237.
 8. Susuki K, Odaka M, Mori M, Hirata K, Yuki N. Acute motor axonal neuropathy after *Mycoplasma* infection: evidence of molecular mimicry.
Neurology 2004;62:949-956.
 9. 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 2004;148:200-205.
 10. Galassi G, Susuki K, Quaglino D, Yuki N. Post-infectious acute ataxia and facial diplegia associated with anti-GD1a IgG antibody.
Eur J Neurol 2004;11:790-791.
 11. 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 2004;148:200-205.
 14. Mori I, Koga M, Hirata K, Yuki N. Hand weakness onset Guillain-Barré syndrome.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:169-170.
 15. 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 2004;217:225-228.
- 学会発表
国内
1. 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
Gordon Research Conferences. Glycolipid & Sphingolipid Biology.
Hyogo, Japan. July 26-29, 2004.
- 海外
1. Yuki N.
Molecular mimicry and disease model of Guillain-Barré syndrome.
Symposium on Peripheral Neuropathies and Inflammation.
7th International Congress of Neuroimmunology.
Venice, Italy. October 1, 2004.
 2. Yuki N.
Keynote lecture: Immunopathogenesis of acute motor axonal neuropathy and action mechanism of IVIG.
IVIG in Neurological Disease 1st Asia Pacific Symposium.
Singapore. November 25, 2004.
 3. Yuki N.
Plenary lecture: Recent ideas on the immunopathogenesis of axonal GBS.
11th Asian & Oceanic Congress of Neurology.
Singapore. November 28, 2004.

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 年度分担研究報告書

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

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師

研究要旨 本研究では、病原性を有する IgG 抗体(AK23 mAb)のトレランスへの影響を尋常性天疱瘡抗原である Dsg3 に対する B 細胞トランスジェニックマウス(AK7-Tg)を用い検討した。AK7 mAb は明らかな病原性は有せず、AK7-Tg マウスでは B 細胞は Dsg3 存在下でも末梢リンパ組織において不活化もされず認められた。AK23 mAb (0.2mg/mouse)を AK7-Tg マウスへ投与したところ脾臓から Dsg3 特異的な B 細胞は末梢リンパ組織より消失した。ところが、AK7-Rag2^{-/-}マウスでは、AK23 mAb による B 細胞除去の効果は減弱した。また AK7-Rag2^{-/-}マウスへ野生型 T 細胞を移入すると、AK23 mAb による B 細胞除去効果は回復した。従って DC もしくは T 細胞を介した自己反応性 B 細胞に対するトレランスのメカニズムの存在が示唆された。

共同研究者

大田孝幸 慶應義塾大学医学部皮膚科助手
小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物・免疫学教授

A. 研究目的

尋常性天疱瘡は Dsg3 に対する IgG 自己抗体による水疱性自己免疫疾患であり、Dsg3 は主に皮膚、粘膜に発現し、いわゆる臓器特異的な抗原である。また Dsg3 に対する B 細胞のトレランスのメカニズムはほとんどわかっていない。我々は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 もしくは有しない抗体を 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。

B. 研究方法

1. モノクローナル抗体の精製
天疱瘡モデルマウスより得られたハイブリドーマ細胞 AK7、AK23 の培養上清を rProteinA Separose FF(Amersham)にて精製した。
2. FACS による解析
脾臓赤血球は ACK lysis buffer にて除いた。細胞は IgM、B220、CD21、CD23 にて染色した。全ての抗体は PharMingen より購入した。また anti-Etag 抗体は Amersham より購入した。染色した細胞は FACS Calibar で解析し、データ解析には CellQuest software (Becton Dickinson)を用いた。

C. 研究結果

1. Dsg3 特異的な B 細胞の消失
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。驚くべきことに、ほとんどの脾臓には 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。

2. AK7-Rag2^{-/-}マウスにおける AK23 の影響

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。

D. 考察、結論

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。

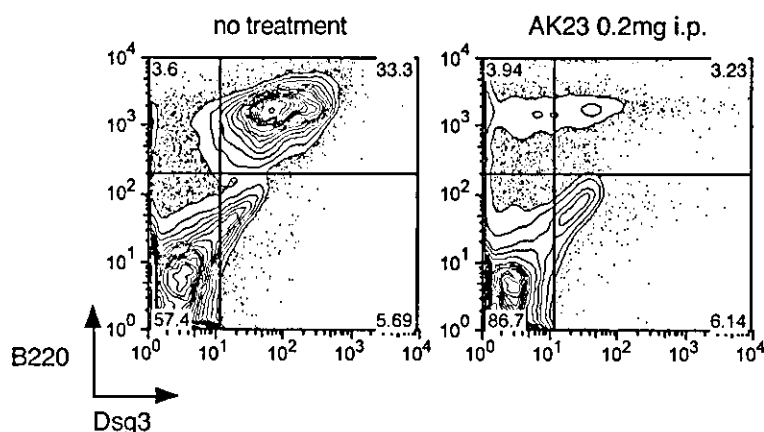


図 1 AK7-Tg マウスに AK23 mAb 投与 6 日目で脾臓 B 細胞は著明に減少した。

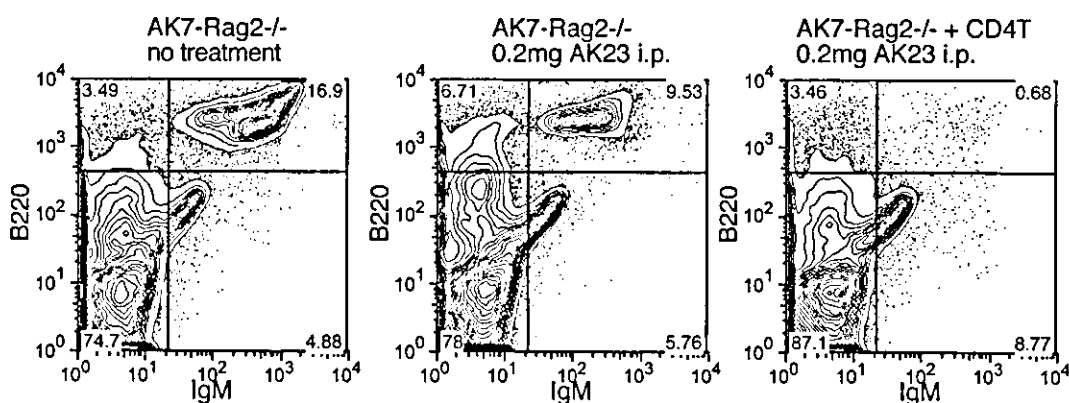


図 2 AK7-Rag2^{-/-}マウスでは AK23 mAb の効果は減弱したが、CD4 の移入にて AK23 mAb の効果は回復した。

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 年度分担研究報告書

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

分担研究者 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

研究要旨 尋常性天疱瘡(PV)において病態と関連する抗デスマグレイン 3(Dsg3)抗体の産生には Dsg3 を認識する自己反応性 T 細胞の関与が推測されている。そこで、我々は Dsg3^{-/-}マウスを用いた PV モデルを利用することで PV の病態を誘導する病原性を持つ Dsg3 反応性 T 細胞の特性を明らかにすることを目的としている。本年度は、昨年度までに確立した T 細胞クローニング法を用いて、Dsg3 反応性 T 細胞クローン 5 株を樹立した。このうち、Th0 型の T 細胞クローンは Dsg3^{-/-}B 細胞と共に Rag2^{-/-}マウスに移入すると IgG 抗 Dsg3 抗体産生とともに PV の発現型を誘導したが、Th1 型の T 細胞クローンはそれら病原性を示さなかった。今後 Dsg3 反応性 T 細胞クローンの解析数を増やすことで、病原性を規定する因子を明らかにする予定である。

共同研究者

高橋勇人

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

天谷雅行

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

A. 研究目的

尋常性天疱瘡 (PV) は皮膚角化細胞に対する自己免疫疾患で、デスマグレイン 3 (Dsg3) に対する自己抗体によりその病態が誘導される。抗 Dsg3 抗体のアイソタイプは主に IgG4 で、Dsg3 分子の接着を阻害する強い親和性を有する。また、抗 Dsg3 抗体産生と特定の HLA クラス II アレルとの強い相関も報告されている。これらの知見から、抗 Dsg3 抗体産生には抗原特異的な CD4⁺T 細胞による B 細胞の活性化が不可欠と考えられる。これまで、PV 患者を対象とした Dsg3 反応性 T 細胞の解析が複数の研究グループにより行われてきたが、Dsg3 反応性 T 細胞が PV の病態に関与する‘病原性’を有するかについてはいまだ明らかでない。最近、Amagai らは Dsg3^{-/-}マウス脾細胞を免疫不全マウスに

移入することで抗 Dsg3 抗体産生と PV 発現型を誘導できることを報告した。そこで、我々は病原性を有する Dsg3 反応性 T 細胞の解析にこの PV モデルマウスの系を用いることを着想した。本研究は、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、の 3 段階から構成される。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することで、病原性と関連する T 細胞の特性（たとえば、特定の T 細胞エピトープやサイトカイン産生能）が抽出できる。その結果は PV に対する新しい治療標的の同定につながる可能性もある。

本年度は、昨年度までに確立した Dsg3^{-/-}マウスからの T 細胞クローン樹立法に従って 5 個の Dsg3 反応性 T 細胞クローンを樹立し、それらの特性および病原性を検討した。

B. 研究方法

a) リコンビナントマウス(m)Dsg3 の作成

2つの発現系でリコンビナントマウス Dsg3 を作成した。バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞の培養系で mDsg3 の細胞外ドメインと E-tag、His-tag との融合タンパク (rmDsg3) を発現、精製した。高純度の抗原を得るため、His-tag と E-tag のアフィニティーによる精製を段階的に行った。また、大腸菌の発現系を用いて 10 個以上のアミノ酸を重複した 9 つの mDsg3 断片 (rmDsg3-1~rmDsg3-9) を maltose-binding protein (MBP) との融合タンパクとして発現、精製した。それぞれの精製リコンビナント蛋白の純度は SDS ポリアクリルアミド電気泳動後のクマシーブルー染色により評価した。

b) mDsg3 反応性 T 細胞のクローニング

CFA で乳化した 10 μ g の rmDsg3 を Dsg3^{-/-}マウスの両足底に免疫した。1 週間後に膝窩リンパ節と脾臓を摘出し、RPMI-1640 内ですりつぶした。脾臓は ACK lysing buffer (BioWhittaker, Walkersville, ND) を用いて溶血処理を行い単核球を調製した。培地として 1% の C56BL/6 由来血清を添加した RPMI-1640 を初回刺激時に用い、以後は 10%FBS 添加 RPMI-1640 を用いた。まず Day0 に単核球 (3 x 10⁶ cell/well) を 24 穴平底プレートにまき、5 μ g/ml の抗原 rmDsg3-1~5 を加えた。Day10 に凍結保存しておいた自己の脾細胞 (10⁶ cell/well) に X 線照射 (40Gy) し、mDsg3-1~5 (各 5 μ g/ml) とともに培養中に加えた。サイトカインとして Day3, 7, 10, 14, 17, に 1, 2, 5%T-STIMTM (Becton-Dickinson, Bedford, MA) を加えた。Day21 に抗原特異的増殖反応を検討し、特異的な反応を示した株のみを限界希釈法に用いた。T 細胞株は 3~4 日ごとのサイトカインの添加と 10~14 日ごとの抗原刺激により維持した。

c) 抗原特異的増殖反応

96 穴丸底プレートで 10⁴ cell/well の T 細胞を 2 x 10⁴ cell/well の X 線照射脾細

胞とともに 5 μ g/ml の rmDsg3-1~5 または MBP 存在下で培養した。56 時間後に 0.5 μ Ci/well の ³H-thymidine を添加し、その 16 時間後に細胞を回収し、³H-thymidine の取り込みを測定した。rmDsg3-1~5 に対する反応性は MBP 存在下での放射活性との比として表わし、特異性の確認のためさらに MHC クラス II 拘束性を検討した。

d) MHC クラス II 拘束性の検討

T 細胞の抗原特異的増殖反応において、培養液中に 5 μ g/ml の抗マウス MHC class II モノクローナル抗体 (M5/114, ラット IgG_{2b}, κ) あるいはアイソタイプが一致したコントロール抗体を添加した。抗原刺激により誘導された T 細胞増殖反応が 80% 以上抑制された場合を MHC クラス II 拘束性と判定した。

e) TCRV β 遺伝子再構成の検出と各種サイトカイン遺伝子発現の解析

T 細胞株を PMA(25ng/ml)とイオノマイシン(1 μ g/ml)存在下で 3 日間培養後、CD4 および CD8 Dynabeads (Dynal biotech, Oslo, Norway)を用いて T 細胞を回収した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA)を用いて total RNA を抽出し、AMV RTase XL(TAKARA, Japan)存在下で cDNA を合成し、以下の PCR に用いた。TCRV β 遺伝子再構成の検出には 23 種の TCRV β 遺伝子特異的な 5'側プライマーと共通する TCRC β 遺伝子に対応する 3'側プライマーを用いた family PCR を行った。さらに PCR 産物の塩基配列を 3100 Genetic Analyzer(ABI PRISM)を用いて同定した。各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β)の発現は特異的なプライマーを用いた PCR により解析した。

f) T 細胞クローン株の病原性の検討

培養 T 細胞クローン株(0.5~1 x 10⁶ 個)を Dsg3^{-/-}B 細胞(5 x 10⁶ 個)とともに Rag2^{-/-}マウスに移入し、抗 Dsg3 抗体産生と皮膚粘膜に生じる PV 発現型により病原性を調べた。Dsg3^{-/-}B 細胞は PV モデルマウス作成法に準じて免疫した Dsg3^{-/-}

マウス脾細胞から MACS CD4 および CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany) を用いて T 細胞を除去した後に MACS B220 MicroBeads により得た。リンホセパール II (IBL, Japan) を用いた比重遠心法により死細胞を除去した培養 T 細胞株を使用した。陽性コントロールとして、培養 T 細胞株の代わりに脾臓から CD4 および CD8 MicroBeads を用いて分画した T 細胞 ($5 \sim 10 \times 10^6$ 個) を用いた。陰性コントロールとして、Dsg3 に対して特異的な反応を示さない培養 T 細胞株を同数用いた。マウス移入後 7 日ごとに採血し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価を ELISA 法で測定し、Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を用いた直接蛍光抗体法により口蓋、皮膚組織に沈着する IgG を検討した。

C. 研究結果

a) rmDsg3 の作成

rmDsg3 の純度は 80%、rmDsg3-1~5 の純度は 95% 以上であった。

b) Dsg3 反応性 T 細胞株の樹立

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 TCR β 鎖遺伝子解析によりクローンであることが確認された。

c) TCRV β 遺伝子再構成の検出

Dsg3 反応性 T 細胞クローンの V β 遺伝子を表 1 に示す。V β 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。

d) サイトカイン発現解析

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。

e) Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の病原性の検討

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。

D. 考察

我々は PV モデルマウスの系を用いることで、Dsg3 反応性 T 細胞クローンの樹立し、それらの *in vivo* での病原性の解析を行うことができた。この実験系は PV に限らず広く自己免疫疾患に応用可能で、自己免疫病態と関連する因子の同定、さらにはそれらに対する分子標的療法の開発に有用と考えられる。

PV モデルマウスから樹立した T 細胞株はすべて MHC クラス II 拘束性であったが、抗原特異性、TCRV β 鎖、サイトカイン発現能は多彩であった。現時点で病原性の解析を行えたのは 2 つのクローンにすぎないが、一方は *in vivo* での病原性を有し、他方に病原性はなかった。Th1 でなく Th0 の T 細胞クローンが病原性を有していたことは Th2 サイトカインの重要性を想定させるが、結論を得るにはさらにデータ集積が必要である。今後、さらに多数の Dsg3 反応性 T 細胞クローンを検討することにより、病原性を規定する要因の同定が可能と考えられた。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表 英語論文

- 1) Kuwana M: b₂-glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. **Thromb Res** 114: 347-355, 2004
- 2) Yasuoka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata