

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 14～16 年度 総合研究報告書

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14～16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. 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	21
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	29
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	35
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	
自己抗原ノックアウトマウスを利用したGuillain-Barré症候群モデルマウス作成と 抗ガングリオシド抗体産生機構解明	41
獨協医科大学 神経内科 助教授 結城 伸泰	
天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 I	46
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	50
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
天疱瘡モデルマウス由来抗デスマグレイン3モノクローナル抗体の解析	53
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
天疱瘡モデルマウスの免疫電顕的解析	59
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 石河 晃	
天疱瘡モデルマウスを用いた抗CD154抗体療法の評価	65
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を用いた免疫抑制療法の評価	71
慶應義塾大学医学部 皮膚科 教授 西川 武二	
Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウスを用いた B 細胞免疫寛容獲得機序の解析	77
慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学 教授 小安 重夫	
天疱瘡抗原ノックアウトマウスを用いた病原性を有する自己反応性 T 細胞の同定および解析	82
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	
マウス胸腺における天疱瘡抗原発現様式の解析	88
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
天疱瘡に存在する抗デスモグレイン 4 自己抗体の病因的意義の検討	90
慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師 天谷 雅行	
天疱瘡自己抗体病的活性の in vitro デジタル測定法の開発	95
慶應義塾大学医学部 皮膚科 助教授 田中 勝	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	99
主な業績論文	109

I. 平成14～16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
	田中 勝	慶應義塾大学医学部皮膚科	助教授
	石河 晃	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師
	桑名正隆	慶應義塾大学医学部先端医科学研究所	専任講師
	松井 稔	東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野	助手
事務局	岡嶋万里子	慶應義塾大学医学部皮膚科 〒160-8582 新宿区信濃町 35 tel 03-5363-3823 fax03-3351-6880 E-mail : nagatomi@sc.itc.keio.ac.jp	秘書
経理事務連絡 担当責任者	鈴木 文子	慶應義塾大学医学部 信濃町研究支援センター 〒160-8582 新宿区信濃町 35 tel 03-5363-3879 fax03-03-5363-3610 E-mail : fumiko.suzuki@adst.keio.ac.jp	係主任

Ⅱ. 平成14～16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 14-16 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 本研究では、自己抗原ノックアウトマウスが欠失している自己抗原に対し免疫寛容が成立していない事実を利用した新しい方法論により実際の疾患により近い自己免疫疾患モデルマウスを作成し、未だ不明である発症病態を明らかにし、より副作用の少ない抗原特異的な治療法の開発することを目的とした。本作成法は、きわめて応用範囲が広く、自己抗原ノックアウトマウスが、致死的でない、免疫能に影響を与えない、というふたつの条件をクリアすれば、あらゆる標的抗原に応用が可能である。実際に、自己免疫性皮膚疾患である天疱瘡、自己免疫性心筋炎においてモデルマウスが作成され、シェーグレン症候群、ギラン・バレー症候群、自己免疫性神経炎、自己免疫性脱毛症に関してモデルマウスの作成が進行中である。天疱瘡モデルマウスを用いて、天疱瘡を誘導する病的モノクローナル抗体（AK mAb）が複数単離され、それらの抗体のエピトープ解析により、水疱形成の分子メカニズムの解明が進んだ。さらに、AK7 mAb 可変領域 cDNA より、Dsg3 反応性 B 細胞トランスジェニックマウスを作成し、末梢抗原に対する B 細胞トランスとして新しい機序が存在する可能性が示唆された。さらに、病的抗体産生に関与する自己反応性 T 細胞の解析も進行中である。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。本研究により作成されたモデルマウスは、それぞれの疾患の病体解明、新しい治療法の開発に有用なツールとなり、数々の難治性疾患を克服する上で、国際的・学術的・社会的に高い意義を持つ。

分担研究者

西川武二 慶應義塾大学医学部皮膚科教授

小安重夫 慶應義塾大学医学部微生物・免疫学教授

山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部部長

結城伸泰 獨協医科大学神経内科助教授

田中 勝 慶應義塾大学医学部皮膚科助教授

石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師

桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究専任講師

松井 稔 東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野助手

A. 研究目的

本研究の目的は、自己抗原ノックアウトマウスが欠損した自己抗原に対する免疫寛容が成立していない事実を利用した新しい方法により、自己免疫モデルマウスを作成することである。さらに、作製されたモデルマウスを用いて、自己免疫疾患の発症機構および病態の解明、治療法評価系の確立、疾患特異的治療法の開発をする事である。

自己免疫性疾患は、21世紀を迎えた現在においても、未だその発症機構が解明されず、多くの人を苦しめている難治性疾患である。未だ特異的な治療法はなく、ステロイド、免疫抑制剤、血漿交換療法など免疫系全般を抑制する治療法が主流である。新しい免疫抑制剤が今後数多く開発されることが期待されるが、前臨床試験としてヒト疾患の免疫環境を反映したモデルマウスは不可欠である。このような現状をふまえて、実際の病態にできるだけ近い臓器特異的自己免疫疾患のモデルマウスを作成し、それぞれの疾患の病態を解明し、副作用の少ない疾患特異的、抗原特異的な免疫抑制療法の開発することは、国民の受ける医療の向上につながるばかりでなく、医療費全般の削減となり厚生行政に寄与すること期待される。

B. 研究方法

2-1 天疱瘡モデルマウスの作成および解析

尋常性天疱瘡は、表皮細胞間接着分子であるデスマoglein 3 (Dsg3) に対する IgG 自己抗体により表皮細胞間接着が障害され、口腔粘膜、全身の皮膚に水疱・びらんが形成される致死的な疾患である。組換え Dsg3 にて免疫した、あるいは免疫しないナイーブの Dsg3^{-/-}マウスの脾細胞を Dsg3 を発現する Rag2^{-/-}マウス (免疫不全マウス) に移植することにより、6ヶ月以上の長期間におよぶ抗 Dsg3 IgG 自己抗体を産生する天疱瘡モデルマウスを作成する。

天疱瘡モデルマウスをより安定にかつ再現性高く作成するために Dsg3^{-/-}マウスの遺伝的背景を均一にする。さらに、天疱瘡モデルマウスを病理学的に免疫電顕を用い

て詳細に検討し、Dsg3^{-/-}マウスおよびヒト疾患との類似性を検討する。天疱瘡モデルマウスより水疱形成を誘導できるモノクローナル抗体の単離を行い、エピトープと水疱誘導能の関係を詳細に検討する。

2-2 自己免疫性心筋炎モデルの作成および解析

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す。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する。C57BL/6 バックグラウンドの M2^{-/-}マウスと M3^{-/-}マウス、ならびに C57BL/6 バックグラウンドの Rag-2^{-/-}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。ノックアウトマウスにリコンビナント抗原 10 µg/head を完全フロイントアジュバントを用いて免疫し、2週間後に 2 µg を ImmuneEazy (QIAGEN) を用いて 2 回ブーストした。その後、免疫したマウスの脾臓細胞を調製し、Rag-2^{-/-}マウス 1 頭あたり 5 x 10⁷ 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。

2-3 自己免疫性神経炎モデルマウスの作成および解析

末梢神経抗原である P0 の遺伝子変異は、Charcot-Marie-Tooth 病などの遺伝性神経疾患の原因になる。逆に自己免疫疾患とされる慢性炎症性多発神経炎 (CIDP) において、P0 の遺伝子変異が報告されている。また P0 のヘテロノックアウトマウス (P0^{+/-}) では、CIDP 様の神経炎を自然発症する。本研究では、P0 変異マウスを実験材料として確立し、自己抗原の変異が自己免疫応答の亢進につながるメカニズムを解析した。P0^{+/-}を P0 ペプチドで感作すると P0 に対する強い免疫応答が誘導され、神経炎を発症する。初年度は、この実験系

に胸腺移植などの方法を導入し、P0+/-マウスにおける自己寛容破綻の機構を解析した。二年度以降は、P0+/-マウスにおける神経炎発症効率をあげるために、FcR γ IIB-/-マウスとの交配を行い、さらに P0 に点変異を導入したノックインマウスの系統確立に精力を傾けた。

2-4 ギラン・バレー症候群モデルマウスの作成および解析

自己抗原（ガングリオシド GM1、GD1a）を発現していないアセチルガラクトサミンルトランスフェラーゼ（GM2/GD2 合成酵素）ノックアウトマウス（GalNAcT^{-/-}マウス）に、GM1 様 LOS、GD1a 様 LOS を有する *C. jejuni* 死菌を感作した。高力価の IgG 抗 GM1、抗 GD1a 抗体が誘導された GalNAcT^{-/-}マウスの脾細胞を Rag-2 ノックアウトマウスに移入した。臨床徴候の経時的観察、病理組織学的検討を行った。抗ガングリオシド抗体と BAFF の産生を調べた。GalNAcT^{-/-}マウスの末梢に存在する GM1、GD1a 糖鎖特異的 B 細胞を、ガングリオシドおよび特異抗体で染色、あるいは、蛍光標識ガングリオシド含有リポソームで染色し、フローサイトメトリーで検出した。

2-5 天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法評価系の確立

既に日常診療において用いられている薬剤として dexamethasone（DEX）、methylprednisolone（m-PSL）、azathioprine（AZP）、cyclophosphamide（CPA）、cyclosporine A（CYA）、tacrolimus hydrate（FK506）、mycophenolate mofetil（MMF）の計 7 種類の効果を天疱瘡モデルマウスを用いて検討した。

また、抗 Dsg3 抗体産生および表現型を示した PV モデルマウスに対して抗 CD40L 抗体を投与し、治療効果を検討した。また、症状および抗体産生が安定した PV モデルマウスに対して、1 mg の抗 CD154（CD40L）抗体（MR1）あるいは Hamster IgG を週 2 回計 12 回投与した。各群のマウスは MR1 投与開始後 56 日まで観察し、血

中抗体価および表現型の変化によって抗 CD154 抗体の治療効果を検討した。

2-6 末梢抗原に対する免疫寛容獲得機構の解明

B 細胞のトレランスとして、clonal deletion と anergy が提唱されてきた。しかし、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。尋常性天疱瘡抗原である Dsg3 は主に皮膚、粘膜に発現しており、骨髄には発現していない。天疱瘡モデルマウスより単離したモノクローナル抗体 AK7 の H 鎖 L 鎖の可変領域 cDNA を単離し、B 細胞表面に抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、生理的な環境下での自己抗原に対する B 細胞の運命を解明することを試みた。

2-7 天疱瘡モデルマウスにおける自己反応性 T 細胞の解析

マウス Dsg3 細胞外領域全長を重複してカバーするリコンビナント蛋白を T 細胞刺激用の抗原として作製した。Dsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウスの脾臓およびリンパ節細胞を抗原提示細胞存在下で Dsg3 により繰り返し刺激し、限界希釈法により Dsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立した。得られた Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の病原性の有無は Dsg3^{-/-}B 細胞と共に免疫不全マウスに移入した後のマウスにおける発現型および抗 Dsg3 抗体産生から判断した。さらに、個々の T 細胞株の CD4/CD8 フェノタイプ、MHC 拘束性、T 細胞エピトープ、サイトカイン産生能、T 細胞受容体（TCR）遺伝子を決定し、病原性の有無により T 細胞クローン株の特性を比較した。

（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

3-1 天疱瘡モデルマウスの作成および解析

天疱瘡モデルマウスは、基底層直上での水疱形成を認め、病理学的に光顕レベル、電顕レベルにおいて、天疱瘡患者と同一の所見を呈した。

天疱瘡の表現型をもつモデルマウスより、20 クローンの抗 Dsg3 mAb (AK, NAK シリーズ) を単離した。得られた AK mAb のハイブリドーマ細胞を Rag2^{-/-}マウスの腹腔に接種したところすべての抗体において、in vivo で表皮細胞表面への沈着を認めた。AK23 ハイブリドーマを接種した Rag2^{-/-}マウスのみにおいて、接種後約 7-10 日で天疱瘡の特徴的な表現型を誘導した。次に、これらの AK mAb の 3次元エピトープ解析を行ったところ、AK23 のエピトープは Dsg3 のアミノ酸 V3, K7, P8, D59 に存在することが示され、Dsg3 分子同士が結合する接着面を攻撃していることが明らかとなった。他の疾患を明らかに誘導しない AK mAb は、細胞外ドメイン中央部あるいは C 末の分子機能上重要でない領域を認識していた。病的モノクローナル抗体の単離とそのエピトープ解析は、細胞接着および、天疱瘡における水疱形成の分子機構の解明への重要な手がかりとなる。さらに、病原性あるいは非病原性の抗 Dsg3 mAb は角化細胞の増殖や分化を研究する上で重要なツールになると考えられる。また診断的には、病勢を反映する単一エピトープ ELISA 法の開発も可能である。治療においても、天疱瘡の抗原特異的血漿交換療法や抗原特異的 B 細胞除去などの標的療法の開発に有用な知見を提供した。

天疱瘡モデルマウスより単離し水疱形成を誘導する AK23 抗 Dsg3 mAb を投与したマウスの口腔粘膜上皮における免疫電顕所見を検討したところ、非水疱部ではデスモゾームの接着板間に、水疱部では半割デスモゾームの細胞外領域に IgG の沈着を認めた。AK23 mAb は デスモゾームの接着板間 (幅約 30nm) の中央に局在のピークを認めた。従って、疾患誘導性の抗 Dsg3 抗体は、N 末端で接着している Dsg3 分子の

接着面に IgG が結合することにより、直接的に機能を阻害することにより水疱形成を誘導することが確認された。

オリジナルの Dsg3^{-/-}マウスは C57BL/6 と 129 の mixed genetic background であるため、C57BL/6 および BALB/c へそれぞれ 12 代の戻し交配し、ヘテロザイゴート同士の交配により Dsg3^{-/-}マウス産生を試みたところ、ほとんどが離乳前に死亡してしまうことが確認された。これは、Dsg3 欠損による接着障害により天疱瘡患者同様口腔内にびらんを生じ、摂食障害によるものと考えられた。そこで、Dsg3^{-/-}マウスを 129 に 12 代戻し交配したところ、129 バックの Dsg3^{-/-}マウスは離乳前に死亡せず、生育することを確認した。したがって、129 を遺伝子背景とした Dsg3^{-/-}、Rag2^{-/-}マウスを用いることにより、安定した天疱瘡モデルマウスを供給できることが判明した。

さらに、C57BL/6 バックの Dsg3^{-/-}マウスの表現型をレスキューするために、ケラチン 5 プロモーターの下流にマウス Dsg1 cDNA を持ったコンストラクトを構築し、Dsg1 トランスジェニックマウスを作成した。Dsg3^{-/-}・Dsg1Tr マウスは、Dsg1 が欠損した Dsg3 の接着機能を補い C57BL/6 バックにおいても、離乳時の死亡はなく、C57BL/6 バックの Dsg3^{-/-}マウスが作成出来たことになる。

これら遺伝子背景を統一した Dsg3^{-/-}マウスは、今後様々な自己免疫反応の免疫学的機序を詳細に検討する上で、有用なツールとなる。さらに、種々の免疫抑制療法を比較検討する上で、マウス個体差を最小にすることが可能である。

3-2 自己免疫性心筋炎モデルの作成および解析

M2 の場合、脾臓細胞移植後 1,2 週間で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。血清中の M2 に対する抗体価を ELISA 法にて測定したところ、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することが明らかになった。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も観察された。第 3 細胞内ループに対する抗体価は、脾臓細胞移植後 12 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きていることを示唆している。また移植後 15 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。以上の成績から、マウスに自己免疫性心筋炎を惹起することに成功したと結論した。

シェーグレン症候群モデルとして期待された M3 に関しては、抗体価の上昇した M3 KO 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。したがって、シェーグレン症候群様の症状の発症には至っておらず、更なる条件検討が必要と結論した。

3-3 自己免疫性神経炎モデルマウスの作成および解析

P0+/-マウスの P0 ペプチド (180-199) 感作による実験系を用い、同マウスでは野生型マウスと比較して、P0 ペプチドに対して、より強い T 細胞免疫応答 (Th1 タイプ) を誘導できることを示した。さらに同ペプチドによる実験的自己免疫性神経炎 (EAN) の症状も増悪することが明らかになった。

このメカニズムとして、胸腺内 P0 蛋白の低発現による免疫寛容誘導の欠陥を推測し、実験により検証した。その結果、仮説の妥当性を示唆する結果が得られた。すなわち、1) P0+/-マウスの胸腺では、実際に P0 遺伝子発現レベルが低下していること、2) 野生型マウスの胸腺を P0+/-マウスに移植すると P0 ペプチドに対する免疫応答が低下すること、3) 逆に P0+/-マウスの胸腺を野生型マウスに移植すると、P0 ペプチドに対する免疫応答が亢進すること、などを示すことができた。これらの結果は、自己抗原のヘテロ遺伝子異常が、異常な自己免疫応答の誘導につながる可能性を明らかにしたものである。ただし、胸腺内の発現量が多い自己抗原 (Dsg3 など) については、ヘテロ異常が免疫寛容誘導の破綻につながるということが推測され留意する必要がある。

P0+/-マウスの自然発症ニューロパチーの病態を解明するため、より早期に発症する系統の確立をねらった。なお P0+/-マウスの CIDP 様ニューロパチーの発症には 9 か月を要する。そこで FcR γ IIB-/-を導入したが、FcR γ IIB-/- P0+/-の確立に時間を費やした。得られたマウスは、まだ生後 2 か月であり、今後の経過を見守る必要がある。

P0 に点変異を導入したノックインマウスをドイツの Scahchner 教授の研究室から 3 系統導入した。このうち、1 系統については安定した維持が可能になった。免疫学的研究のためには、B6 背景にする必要があり、現在バッククロスを進めている。

3-4 ギラン・バレー症候群モデルマウスの作成および解析

Rag-2-/-マウスが感染問題により、実験が中断され、長期間の観察ができなかった。観察期間中、マウスは運動麻痺を呈さなかった。脊髄・馬尾神経根標本を検索したが、神経軸索膜への IgG 沈着や Waller 様変性など、GBS 患者、ウサギモデルで観察された神経病理組織学的所見もみられなかった。

GalNAcT^{-/-}マウスおよび同腹の GalNAcT^{+/-}マウスに、GM1 様 LOS、GD1a 様 LOS を有する *C. jejuni* 菌体有感作した

結果、GalNAcT^{-/-}マウス血中には高力価の抗 GM1、抗 GD1a 抗体が検出されたが、GalNAcT^{+/-}マウスでは検出されなかった。一方、GM1、GD1a を高発現したマウスの細胞を感作した結果、いずれのマウスでも抗 GM1、抗 GD1a 抗体は検出されなかった。感作後、脾臓における BAFF の発現をフローサイトメトリーで調べた結果、*C. jejuni* 菌体感作したマウスでは BAFF の産生増強を認めたが、マウス細胞の感作では BAFF の産生は認められなかった。末梢に存在するガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞を検出するため、脾臓細胞を氷中で GD1a と反応後、抗 GD1a 抗体で染色し、フローサイトメトリーで検出した。その結果、GalNAcT^{-/-}マウス脾臓 B 細胞の 0.2% に GD1a が結合した。GalNAcT^{+/-}マウスでは、自己の GD1a と B 細胞レセプターに結合した GD1a を区別することができなく、この方法で GD1a 特異的 B 細胞を検出することはできなかった。これらの結果から、*C. jejuni* 菌体感作により抗ガングリオシド抗体産生が誘導されるのは、*C. jejuni* LOS により BAFF の発現が増強され、ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞の生存を維持している可能性が示唆された。

3-5 天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法評価系の確立

CPA は抗体産生および表現型ともに完全な発症抑制効果を認めた。MMF は予想に反して効果が弱かった。CYA、AZP の抑制効果は CPA に次いで強かったが、同系統薬剤である FK506 は抑制効果が弱かった。ステロイド剤はある程度の効果はあったものの、マウスでの効果は顕著ではなかった。また CPA 投与群は投与中止後 2~3 週間で症状の出現をみた。このことは、CPA による免疫抑制効果が可逆的であることを示しており、ヒトの PV の症状を正確に反映しているものと捉えることができる。これらの結果から、天疱瘡モデルマウスは、今後新しい免疫抑制療法の前臨床試験としてとして、有用な評価系になりうると考えられた。

生物製剤の例として、抗 CD154 (CD40L) 抗体療法の評価を行った。Dsg3^{-/-}脾細胞

移植時に抗 CD154 抗体 MR1 を 0.5mg ずつ 2 日おきに 5 回予防的投与したところ、ほぼ完全に抗 Dsg3IgG 抗体産生を抑制し、脱毛、体重減少など天疱瘡表現型の出現を抑制した。次に、Dsg3^{-/-}脾細胞を移植後、抗 Dsg3 抗体産生および明らかな PV の表現型を示した天疱瘡モデルマウスに抗 CD154 抗体 (n=11) と Hamster IgG (n=8) を 1 mg ずつ週 2 回計 12 回投与した。血中抗 Dsg3 抗体価は、MR1 投与群および Hamster IgG 投与群の両群において有意差は認められなかった。PV 表現型の推移を PV スコアによって検討したところ、抗 CD154 抗体投与群において若干の改善傾向を示したものの、コントロール群との間に統計学的有意差は認めなかった。抗 CD154 抗体は、CD40/CD40L 相互作用を阻害することで B 細胞のプラズマ細胞への分化を阻害し、抗体産生を抑制する。一度プラズマ細胞に分化すると、その後の抗体産生には CD40/CD40L 相互作用は不要であり、抗 CD154 抗体の効果は期待できない。骨髄に存在するプラズマ細胞には long-lived のものがあり、抗原刺激なしに長期間抗体産生を維持している可能性が最近指摘されてきている。今後、PV モデルマウスにおける long-lived plasma cell の役割を解析する必要がある。

3-6 末梢抗原に対する免疫寛容獲得機の解明

Dsg3 特異的 B 細胞トランスジェニックマウス AK7-LH1 では、骨髄だけではなく脾臓中及びリンパ節中に H 鎖のトランスジーン (IgM^α) 陽性細胞を認めた。Rag2^{-/-}マウスと掛け合わせた AK7-LH1-Rag2^{-/-}マウスでも、トランスジーン陽性の B 細胞を脾臓中に認めた。従って末梢において Dsg3 反応性 B 細胞は除去されず、存在していた。また、B 細胞を脾臓から B220 マイクロビーズを用い精製し、様々な刺激を加え検討した。anti-IgM 抗体もしくは組換え Dsg3 の刺激により、in vitro で増殖活性、および一過性の細胞内 Ca 上昇を示した。以上の結果から Dsg3 反応性 B 細胞は不活化されていなかった。

AK7 は基本的には水疱形成などの病原性

を有してしないため、免疫寛容の誘導が行われなかった可能性がある。同一抗原に対する抗体でも病原性の有無により B 細胞の免疫寛容の機序が異なる可能性も考えられる。今後我々は病原性を有する抗体 AK23 を用いトランスジェニックマウスを作製し、本マウスと B 細胞免疫寛容獲得機構の相違について比較検討する予定である。本研究は、生理的条件下での末梢抗原に対する新しい免疫寛容獲得機序を明らかにする可能性を秘めている。

3-7 天疱瘡モデルマウスにおける自己反応性 T 細胞の解析

現在までに合計 21 個の Dsg3 反応性 CD4 陽性 T 細胞株を樹立し、そのうち 5 株は TCR 遺伝子解析によりクローンであることが確認された。T 細胞株のリコンビナント Dsg3 断片に対する反応性は多様で、Dsg3 の細胞外ドメインに少なくとも 4 カ所の T 細胞エпитープが存在した。T 細胞エпитープ多様性を反映して、Dsg3 反応性 T 細胞株が使用していた TCRV β 遺伝子、CDR3 領域のアミノ酸配列に特定の遺伝子やモチーフは見出されなかった。Dsg3 反応性 T 細胞クローン 3 株のサイトカイン産生能を検討したところ、2 つが IFN- γ 、TGF- β を産生する Th1 型で、残りの 1 つは IL-4、IL-10、IFN- γ 、TGF- β を産生する Th0 型であった。これまで Dsg3 反応性 T 細胞クローン 2 株で病原性の検討を行った。Th0 型のクローンを Dsg3^{-/-}マウス B 細胞とともに免疫不全マウスに移入したところ、Dsg3^{-/-}マウス T 細胞を移入した陽性コントロール群と同様に、抗 Dsg3 抗体価の上昇と共に耳介びらんなどの発現型が観察された。一方、Th1 型の T 細胞クローンの移入では発現型は観察されなかった。

尋常性天疱瘡モデルマウスを用いることで、多彩な抗原特異性とサイトカイン産生能を有する Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立することができた。得られた T 細胞株の中には病原性を持つ株と持たない株が含まれることも確認された。現時点で全解析が終了した株はわずかなため、病原性と関連する Dsg3 反応性 T 細胞の特性の同定に至って

いない。今後、さらに多数の Dsg3 反応性 T 細胞株を検討することが必要と考えられた。

D. 考察

自己免疫疾患モデルの従来作成法は、野生型のマウスに様々な免疫アジュバントを用いて抗原蛋白を強制免疫することにより作成されていた。しかし、マウスの系統あるいはアジュバンドにより自己免疫反応の反応性が異なり、経験主義的な要素が多かった。また、自己免疫反応が一過性である場合も多く、実際の疾患とは異なる部分もあった。本研究では、自己抗原ノックアウトマウスにおいて欠損した抗原に対する免疫寛容が成立していない事実を巧みに利用し、自己抗原ノックアウトマウス（ドナー）の T 細胞、B 細胞を野生型のマウス（レシピエント）に移植すると、ドナーの T 細胞や B 細胞がレシピエントの発現する内在性の抗原に対して反応し、自己抗体の生産や自己組織に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導が期待される。このような方法は国内外においても過去に見あたらず、全く新しい独創的な自己免疫モデルの作成法である。

本作成法により、天疱瘡モデルマウスのみならず、拡張型筋症モデルマウスが作成された。従来作成法として、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方法が知られる。M2^{-/-}マウスを用いた我々の方法では、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。結果として、自己免疫性筋炎が誘導でき、筋症様変化をきたす過程が観察されたことは、本法が自己免疫疾患モデルマウスの作製法として優れていることを示す。

作成されたモデルマウスを用いて、モノクローナル抗体の単離、エピトープマッピング、B 細胞トランスジェニックマウスの作成による B 細胞トレランスの解析など、数多くの自己免疫発症機序の解明に関する知見が、国際的な専門誌に掲載され、国際的・学術的に大きなインパクトを与えている。さらに、モデルマウスを通して得られ

る知見により、より副作用の少ない有効性の高い抗原特異的な治療法の開発されれば、保健行政にも大きく貢献し、社会貢献も多大であると思われる。

本研究班の使命は、実際の病態にできるだけ近い臓器特異的自己免疫疾患のモデルマウスを作成することである。モデルマウスは、臨床検体では症例数が少ない、細胞が生きた状態での検体が得にくいなどの理由により解析困難な病態メカニズムの解明に有用である。さらに、モデルマウスは、現行の副作用の多い免疫全般を抑制するステロイド、免疫抑制剤に代わる抗原特異的、疾患特異的免疫抑制療法の開発に必須である。また、多くの特定疾患の治療は客観的な評価なしに経験主義的になされているが、モデルマウスは、より効果的で副作用の少ない治療プロトコルの客観的評価に有用であり、医療費全般のコストの削減にも貢献する。

具体的には、天疱瘡を臓器特異的自己免疫性疾患のモデル疾患としてとらえ、安定供給体制が整った天疱瘡モデルマウスを用いて、未だ不明である末梢自己抗原に対する免疫寛容獲得機構を解明することを目指す。さらに、病的自己抗体産生に関与するT細胞の本態も不明な点が多く、本モデルを用いて網羅的にT細胞を解析し、病的自己抗体産生機序の解明を目指す。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が、事実、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。本モデルを用いてこれらの可能性の検証を検証し、不明である自己免疫性心筋炎の病態解明を目指す、有効な治療法を開発する。

臓器特異的自己免疫疾患は、稀少であり、臨床検体を用いた解析では、治療の有無の影響もあり、研究遂行が困難である。本モデルマウスは、自己抗原ノックアウトマウスが、致命的でない、免疫能に影響を与え

ない、というふたつの条件をクリアすれば、あらゆる自己免疫疾患に応用が可能である。また、現時点で自己免疫が原因と考えられていない、いわゆる特発性の臓器障害、心筋炎、神経炎、肺炎、肝炎などの病態解明に関して、マウスを用いた解析により自己免疫の側面を明らかにすることができる。従って、標的抗原ノックアウトマウスと同系の免疫不全マウス（あるいは同系野生型マウスを放射線照射したマウス）のみあれば、本作製法はあらゆる抗原に応用可能であり、きわめて効率のよい、利用価値の高い方法である。

E. 結論

本研究では、自己抗原ノックアウトマウスが欠失している自己抗原に対し免疫寛容が成立していない事実を利用した新しい方法論により実際の疾患により近い自己免疫疾患モデルマウスを作成し、未だ不明である発症病態を明らかにし、より副作用の少ない抗原特異的な治療法を開発することを目的とした。本作成法は、きわめて応用範囲が広く、自己抗原ノックアウトマウスが、致命的でない、免疫能に影響を与えない、というふたつの条件をクリアすれば、あらゆる標的抗原に応用が可能である。実際に、自己免疫性皮膚疾患である天疱瘡、自己免疫性心筋炎においてモデルマウスが作成され、シェーグレン症候群、ギラン・バレー症候群、自己免疫性神経炎、自己免疫性脱毛症に関してモデルマウスの作成が進行中である。最初に開発された天疱瘡モデルマウスを用いて、病的モノクローナル抗体の単離、エピトープ解析に続き、B細胞トランスジェニックマウスが作成され、天疱瘡の病態解明、B細胞トレランスの機序解明に向けて大きく前進している。さらに、病的抗体産生に関与する自己反応性T細胞の解析も進行中である。稀少な疾患であるため臨床検体が得られにくい難治性疾患を克服する上で、本法により作成された自己免疫モデルマウスは、国際的・学術的・社会的に高い意義を持つ。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

研究発表

1) 国内	
口頭発表	50件
原著論文による発表	0件
それ以外(レビュー等)の発表	21件

そのうち主なもの
論文発表

1. 天谷雅行: 自己免疫性水疱症の最新知見. 日本臨床免疫学会雑誌 25: 28-31, 2002
2. 天谷雅行: 天疱瘡と Dsg3 ノックアウトマウス. Annual Review 2003 免疫: 280-285, 2002
3. 天谷雅行: 表皮細胞接着と皮膚疾患. 日本皮膚科学会雑誌 112: 1569-1575, 2002
4. 山村 隆: NKT 細胞と自己免疫. 調節性 CD4⁺ NKT 細胞の役割. Molecular Medicine 40: 562-568, 2003
5. 山村 隆: 多発性硬化症の発症機構と NK 細胞/NKT細胞. 日本臨床 61: 1329-1334, 2003
6. 山村 隆: NKT 細胞を介した自己免疫疾患制御. 炎症と免疫 11: 616-622, 2003
7. 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
8. 桑名正隆: 自己免疫疾患の遺伝子学. 最新医学 59: 78-92, 2004.
9. 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

学会発表

1. 清水 篤, 石河 晃, 角田和之, 天谷雅行, 西川武二: 水疱形成誘導能を持つ抗デスマoglein 3 モノクローナル抗体 AK23 は N 末のカドヘリン接着面を認識する. 第 27 回日本研究皮膚科学会, 京都, 2002. 8. 2-3.
2. 角田和之, 大田孝幸, 中川種昭, 永井哲夫, 小安重夫, 西川武二, 天谷雅行: 天疱瘡モデルマウスより作成した抗デスマoglein 3 病

原性モノクローナル抗体のエピトープ解析. 第 32 回日本免疫学会, 東京, 2002. 12. 4-6.

3. 桑名正隆: 自己免疫疾患の発症機序と自己反応性 T 細胞を標的とした免疫療法. 第 32 回日本免疫学会総会(東京). 2002. 12.
4. 林 幼偉, 宮本勝一, 三宅幸子, 橋本修治, 山村 隆: P0(+/-)ヘテロミュータントマウスと類似のヒトの遺伝子疾患の検討. 第 15 回日本神経免疫学会学術集会. 長崎 2003.3.12.
5. Yamamura, T.: P0+/- mutation enhances susceptibility to P0-induced autoimmune neuritis owing to a defect in central tolerance. Unzen Workshop on Immunoregulation and Autoimmunity. Unzen, Nagasaki, 2003.3.15
6. 石井 健, 原田玲子, 松尾聿朗, 白方裕司, 橋本公二, 天谷雅行: 天疱瘡自己抗体の細胞接着阻害活性測定法の開発. 第 29 回日本研究皮膚科学会, 京都, 2004. 4. 14-16.

2) 海外

口頭発表	72件
原著論文による発表	110件

論文発表

1. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, Nishikawa T: Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. Br J Dermatol 147: 261-265, 2002
2. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, and Stanley JR. Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. J Invest Dermatol 118:845-850, 2002.
3. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Umezawa A, Hata J, and Nishikawa T. Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 118:199-204, 2002.

4. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker E, and D. Z. Increased incidence of pemphigus vulgaris in Southern Europeans living in Germany compared to native Germans. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 16:68-71, 2002.
5. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fubada Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, and Stanley JR. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 110:53-60, 2002.
6. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, and Sugai M. Identification of *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect Immun** 70:5835-5845, 2002.
7. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, and Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-232, 2002.
8. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. The ultrastructural changes of mice actively producing antibodies to desmoglein3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch Dermatol Res** 294:318-323, 2002.
9. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, and Hashimoto K. Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. **J Invest Dermatol** 119:1224-1230, 2002.
10. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol** 32:627-633, 2002.
11. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM: Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of smooth muscle contractions but still viable. **J Neurosci** 22: 10627-10632, 2002
12. Fukao, T., Yamada, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Takayama, T., Asano, T., Takeuchi, T., Kadowaki, T., Hata, J. and Koyasu S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. **Nat. Immunol.** 3:295-304., 2002.
13. Agematsu, K., Futatani, T., Hokibara, S., Kobayashi, N., Takamoto, M., Tsukada, S., Suzuki, H., Koyasu S, Miyawaki, T., Sugane, K., Komiyama, A. and Ochs, H. D. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. **Clin. Immunol.** 103:34-42, 2002
14. Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T. and Koyasu S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in dendritic cells. **Nat. Immunol.**3:875-881, 2002.
15. Murata, Y., Ohteki, T., Koyasu S and Hamuro, J. IFN-g production by macrophages and dendritic cells dictated by intracellular thiol redox status. **Eur. J. Immunol.** 32:2866-2873, 2002
16. Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M. Restricted T cell receptor b-chain usage by T cells autoreactive to b₂-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. **Blood** 99: 2499-2504, 2002
17. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in

- patients with immune thrombocytopenic purpura. **J Immunol** 168: 3675-3682, 2002
18. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. **Hum Immunol** 63: 1156-1163, 2002
 19. Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: An implication for gene therapy. **J Invest Dermatol** 120:610-615, 2003.
 20. Karlhofer FM, Hashimoto T, Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, Amagai M, Pieczkowski F, Foedinger D, Kimbauer R, and Stingl G. 230 kDa and 190 kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell surface and basement membrane zone immune staining pattern. **Exp Dermatol** 12:646-654, 2003.
 21. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, and Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol** 170:2170-2178, 2003.
 22. Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, Amagai M, Ogawa MM, Kanzaki T, and Hashimoto T. Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **J Dermatol Sci** 32:33-41, 2003.
 23. Nishifuji K, Amagai M, Ota T, Nishikawa T, and Iwasaki T. Cloning of canine desmoglein 3 and immunoreactivity of serum antibodies in human and canine pemphigus vulgaris with its extracellular domains. **J Dermatol Sci** 32:181-191, 2003.
 24. Ota T, Amagai M, Watanabe M, and Nishikawa T. No involvement of IgG autoantibodies against extracellular domains of desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus or inflammatory bowel diseases. **J Dermatol Sci** 32:137-141, 2003.
 25. Nishifuji K, Amagai M, Nishikawa T, and Iwasaki T. Production of recombinant extracellular domains of canine desmoglein 1 (Dsg1) by baculovirus expression. **Vet Immunol Immunopathol** 95:177-182, 2003.
 26. Futei Y, Amagai M, Hashimoto T, and Nishikawa T. Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 49:1023-1028, 2003.
 27. Hacker-Foegen MK, Janson M, Amagai M, Fairley JA, and Lin MS. Pathogenicity and epitope characteristics of anti-desmoglein-1 from pemphigus foliaceus patients expressing only IgG1 autoantibodies. **J Invest Dermatol** 121:1373-1378, 2003.
 28. 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
 29. 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: 109-116, 2003
 30. 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

31. 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
32. Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T. and Koyasu S. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor mediated signal transduction. **Nat. Immunol.** 4:280-286, 2003
33. Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. and Koyasu S. *In vivo* role of IFN-g produced by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur. J. Immunol.** 33:2666-2675, 2003
34. Yuki N, Saperstein DS. Axonal Guillain-Barré syndrome subtypes: do we need more splitting? **Neurology** 61:598-599, 2003.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Odaka M, Yuki N, Hirata K. Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. **J Neurol** 250:913-916, 2003.
39. 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
40. Sekiguchi K, Susuki K, Funakawa I, Jinnai K, Yuki N. Cerebral white matter lesions in acute motor axonal neuropathy. **Neurology** 61:272-273, 2003
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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.
46. Odaka M, Yuki N. Antibodies to GM2 ganglioside in neurological disorders. **Intern Med** 42:220-221, 2003.
47. Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura.

Blood 101: 621-623, 2003

48. Suzuki S, Tanaka K, Yasuoka H, Fukuuchi Y, Kawakami Y, Kuwana M. Autoreactive T cells to the P3A⁺ isoform of AChR a subunit in myasthenia gravis. **J Neuroimmunol** 137: 177-186, 2003
49. Kuwana M. Autoreactive CD4⁺ T cells to b₂-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. **Autoimmun Rev** 2: 192-198, 2003
50. 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
51. 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.
52. 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
53. 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
54. 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 β -regulated genes in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol** 139: 109-118, 2003
55. 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
56. 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
57. 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: Cooperative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural TCR. **J. Immunol** 171:4539-4551, 2003
58. 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.
59. 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.
60. Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, and Stanley JR. Desmosomes and diseases: Pemphigus and bullous impetigo. **Curr Opin Cell Biol** 16:536-543, 2004.
61. 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.

62. 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.
63. 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.
64. 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
65. 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.
66. 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.
67. 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
68. 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
69. 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
70. 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
71. 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
72. 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
73. 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
74. 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.