75. 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.

76. 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.

77. 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

78. 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

79. 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.

80. Susuki K, Yuki N. Effect of methylprednisolone in patients with Guillain-Barré syndrome. **Lancet** 363:1236-1237, 2004

81. 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

82. 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

83. 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

84. 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

85. 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

86. Mori I, Koga M, Hirata K, Yuki N. Hand weakness onset Guillain-Barré syndrome. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 75:169-170, 2004

87. Pan CL, Shun CT, Susuki K, Yuki N, Hsieh ST. Pharyngeal-brachial palsy after cytomegalovirus colitis. **Neurology** 62:153-154, 2004

88. 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

89. 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

90. Kuwana M: b_2-glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. **Thromb Res** 114: 347-355, 2004

91. 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

92. 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

93. 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

94. 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

95. 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

96. 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

97. 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

98. 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

99. Mizuno, M., M. Masumura, C. Tomi, A. Chiba, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: Synthetic glycolipid OCH prevents insulitis and diabetes in NOD mice. **J. Autoimmun.** 23:293-300, 2004

100. 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

101. 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

102. 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-restrotced NKT cell responses by using N-acyl variants of a-galactosylceramides. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102: 3383-3388, 2005

103. 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 abberant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. **Neurobiol. Dis.** in press

104. 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

105. 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

106. Kuwana M, Ikeda Y: The role of autoreactive T cells in the pathogenesis of ITP. **Int J Hematol** in press.

107. Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki K, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of b_2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. **Blood** in press.

108. 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

109. Ehlert FJ, Griffin MT, Abe DM, Vo TH, Taketo MM, Manabe T, Matsui M. The M_2 muscarinic receptor mediates contraction through indirect mechanisms in mouse urinary bladder. **J Pharmacol Exp Ther.** in press

110. Oki T, Takagi Y, Inagaki S, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Yamada S. Quantitative analysis of binding parameters 6of [^{3}H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Brain Res Mol Brain Res.** in press

学会発表（主なもの）

1. Aoki M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Tanaka S, Koyasu S, Amagai M, Nishikawa T: Blockade of CD40/CD40L Interaction Has Therapeutic Benefits in Pemphigus Vulgaris Mouse Model. **The 63rd Society for Investigative Dermatology,** Los Angeles, 2002. 5. 15-18.

2. Tsunoda K, Aoki M, Ota T, Nagai T, Yamada T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M: A pathogenic anti-desmoglein3 monoclonal antibody recognizes N-terminal adhesive region of desmoglein3. **The 63rd Society for Investigative Dermatology,** Los Angeles, 2002. 5. 15-18.

3. Amagai M: Immune response in experimental murine pemphigus. **International Meeting on bullous diseases,** Groningen, the Netherlands, 2002. 6. 28-29.

4. Amagai M: New concept in acquired bullous diseases (Plenary Lecture). **20th World Congress of Dermatology,** Paris, 2002. 7. 1-5.

5. Amagai M: Pemphigus: a simple logic behind a complex disease (SID William Montagna Lecture). **International Investigative Dermatology,** Miami Beach, Florida, 2003. 4.30- 5.4.

6. Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Shimoda K, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S: Tolerance escape of autoreactive B lymphocytes against desmoglein 3 in transgenic model mice (Plenary session). **International Investigative Dermatology,** Miami Beach, Florida, USA, 2003. 4.30- 5.4.

7. Amagai M: Pemphigus as a paradigm of autoimmunity. **Symposium "Frontiers in Allergy and Autoimmunity",** Mainz, Germany, 2004. 5. 21-22.

H．知的所有権の出願・取得状況

国際特許　（３件）

１．国際出願番号：ＰＣＴ／ＪＰ０２／０８９８７（国際出願日：２００２年９月４日）
出願人：学校法人慶應義塾
発明者：角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：天疱瘡モノクローナル抗体（Pemphigus monoclonal antibody）

２．国際出願番号：ＰＣＴ／ＪＰ０３／０４２１

9（国際出願日：２００３年４月２日）
出願人：学校法人 慶應義塾
発明者：天谷雅行、西川武二
発明の名称：ＣＤ４０Ｌアンタゴニストを有効成分とする天疱瘡治療剤（Remedies for pemphigus containing CD40L antagonist as the active ingredient）

3．国際出願番号：ＰＣＴ／ＪＰ０３／０４７６５（国際出願日：２００３年４月１５日）
出願人：学校法人 慶應義塾
発明者：天谷雅行、西川武二、大山　学
発明の名称：遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（Drugs to be used in gene therapy for recessively transmitted genetic diseases）

国内特許（４件）

1．出願番号：特許出願２００１－１５６１２６（出願日：２００１年５月２４日）
公開番号：特許公開２００２－３４５３６４（公開日：２００２年１２月３日）
出願人：学校法人慶應義塾
発明者：天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：自己免疫疾患モデル動物の作製方法

2．出願番号：特許出願２００１－２６７６５３（出願日：２００１年９月４日）
出願人：学校法人慶應義塾
発明者：角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：天疱瘡モノクローナル抗体

3．出願番号：特許出願２００２－１０１８８６（出願日：２００２年４月３日）
出願人：学校法人慶應義塾
発明者：天谷雅行、西川武二
発明の名称：ＣＤ４０Ｌアンタゴニストを有効成分とする天疱瘡治療剤

4．出願番号：特許出願２００２－１１２７２２（出願日：２００２年４月１５日）
公開番号：特許公開２００３－３０６４４８（公開日：２００３年１０月２８日）
出願人：学校法人慶應義塾
発明者：天谷雅行、西川武二、大山　学
発明の名称：遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤

Ⅲ．　分担研究報告書

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 年度分担研究報告書

ノックアウトマウスを駆使したムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析

分担研究者　松井　稔　東京大学医科学研究所　助手

研究要旨　ムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの疾患モデル動物としての意義を確立するため以下のような研究を行った。脳の各部位における各サブタイプの分布をバインディングアッセイで調べた。平滑筋における M2 サブタイプの果たす働きについて詳細な解析を行った。M4 がカタレプシー反応の治療において必須の役割を果たすことを明らかにした。海馬の内因性カンナビノイドによるシグナル伝達においてムスカリン性受容体 M1 および M3 の両者が重要であることを証明した。胃酸分泌において M3 受容体が必須の働きをしていることを発見した。In vitro での膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌を M3 への刺激によって促進できることを示した。海馬の抑制性シナプスにおける M1, M2, M3 の役割を解明した。唾液分泌における M1, M3 の役割を解明した。排尿機構における M2, M3 の役割を解明した。腸管ニューロンからのアセチルコリン分泌制御における各サブタイプの役割を解明した。

共同研究者
エール大学 Dr. WS Zawalich ら
京都薬科大学　岡部進　ら
金沢大学　狩野方伸　ら
東京大学　中村健　ら
信州大学　井川靖彦　ら
静岡県立大学　山田静雄　ら
U.C. Irvine Dr. Ehlert ら
大阪府立大学　竹内正吉　ら

A.　研究目的

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

B.　研究方法

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

C.　研究結果

1. インスリン分泌における M3 の意義について。本研究はエール大学の Dr. Zawalich との共同研究として行われた。Dr. Zawalich らはランゲルハンス島を単離して、各種刺激に対するインスリン分泌を in vitro で経時的に検出することができる。野生型のランゲルハンス島では、15mM のグルコースで刺激した上に 10 microM のカルバコールで刺激すると、インスリン分泌反応の亢進が観察される。しかしながら、M3 KO マウスから単離したランゲルハンス島では、このカルバコールに対する反応が見られなかった。従って、ランゲルハンス島には M3 が発現しており、インスリン分泌を促進する能力を持っていると考えられる。

2. 平滑筋での heterologous desensitization における M2, M3 の役割。本研究は U.C. Irvine の Dr. Ehlert との共同研究として行われた。アセチルコリンで前処置しておくと、PGF2α による平滑

筋収縮が減じることが知られている。これを heterologous desensitization と呼ぶ。M2 KO マウスおよび M3 KO マウスから摘出した平滑筋ではこのような heterologous desensitization が欠失していた。すなわちこの反応のためには M2 と M3 の両者が共に必要であることが判明した。

3. 胃酸分泌における M3 の意義。本研究は京都薬科大学の岡部らとの共同研究として行われた。M3 KO マウスの胃内 pH は野生型に比べて有意に高かった（5.9 ± 0.4 vs. 3.0 ± 0.4）。これは基礎胃酸分泌にとって M3 が必須であることを示す。カルバコールで刺激すると野生型より弱いながらも胃酸分泌は刺激され胃内 pH は低下したので、M3 以外の mAChR（M1 ?）を介した胃酸分泌は少なくとも外因性の刺激によっては起こり得ることも分かった。

4. M1 および M3 を介するカンナビノイドシグナル伝達増強効果。本研究は金沢大学の狩野らとの共同研究として行われた。シナプス後膜を脱分極させると、一過性の IPSC の抑制が起こる（depolarization-induced suppression of inhibition; DSI）。この現象は、内因性カンナビノイドを神経伝達物質とした逆行性シグナル伝達に基づくことが知られている。野生型において、カルバコールはこの DSI を増強する。しかし、M1 KO や M3 KO ではこのカルバコールによる DSI 増強反応が弱くなっており、さらに M1/M3-compound KO では、ほぼ完全に消失していた。従って、M1 と M3 の両者がカルバコールによる DSI 増強効果に相加的に関与していることが明らかとなった。

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

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

7. 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。本研究は金沢大学の狩野らとの共同研究として行われた。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。これら二つの機構は同じシナプスで同時に起こることはないようである。

8. 唾液分泌における M1, M3, M5 の役割について。本研究は東京大学医科学研究所の中村健らとの共同研究として行われた。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。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。M3 ノックアウトマウスでは、乾いた餌を食べる際に頻回に水をなめるという特異な行動が見られた。以上より、コリン性の唾液分泌においては、M3 が最も重要な役割を果たしていると結論した。ちなみに、10 mg/kg のピロカルピン（非選択的ムスカリン性アゴニスト）を投与して唾液分泌量を測定したところ、M3 ノックアウト

マウスにおいても唾液の分泌は認められたが、M1/M3 ダブルノックアウトマウスでは唾液の分泌は検出されなかった。

9. 排尿機構における M2, M3 の役割。本研究は信州大学の井川らとの共同研究として行われた。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。

10. 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。本研究は静岡県立大学の山田らとの共同研究として行われた。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。

11. 排尿筋収縮における M2 の役割。本研究は UC Irvine の Dr. Ehlert らとの共同研究として行われた。まず、M3 ノックアウトマウスの排尿筋では PGF2α に対する感受性が亢進していることが分かった。次に、選択的に M3 のシグナル伝達を抑える 4-DAMP マスタードで処理すると、野生型では弱い収縮が残ったが、M2 ノックアウトではほとんど失われた。このことから M2 を介した直接的な平滑筋収縮が弱いながらもあることが示された。cAMP 濃度を増やす前処置をした上で、oxotremorine-M（非選択的ムスカリン性アゴニスト）に対する収縮反応を検討し、M2 ノックアウトではかなり収縮が失われるような実験条件を確立した。この収縮は M2 よりは M3 が起こすのに近い反応であったので、M2 を介した反応は M3 の収縮を強める作用に基づいているのではないかと考えられた。

12. 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。本研究は大阪府立大学の竹内らとの共同研究として行われた。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。

D. 考察

ムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの解析を通してムスカリン性アセチルコリン受容体各サブタイプの機能についての理解を深めることができた。

E. 結論

以上の研究成果から考えて、ムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスならびにムスカリン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスを用いた自己免疫モデルマウスは、糖尿病、認知症、パーキンソン病、消化性潰瘍、炎症性腸疾患、口腔内乾燥症、排尿障害、腸運動障害等のモデルマウスとして利用できると考えられる。

F. 研究発表（平成 14～16 年度）

1. 論文発表

英語論文

1. 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)

2. Ehlert FJ, Griffin MT, Abe DM, Vo TH, Taketo MM, Manabe T, Matsui M. The M_2 muscarinic receptor mediates contraction through indirect mechanisms in mouse urinary bladder. **J Pharmacol Exp Ther.** (in press)

3. Oki T, Takagi Y, Inagaki S, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Yamada S. Quantitative analysis of binding parameters 6of [^{3}H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice.

Brain Res Mol Brain Res. (in press)

4. Igawa Y, Zhang X, Nishizawa O, Umeda M, Iwata A, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Andersson KE. Cystometric findings in mice lacking muscarinic M_2 or M_3 receptors. **J Urol.** 172: 2460-2464, 2004

5. Nakamura T, Matsui M (corresponding author), Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N, Nakamura K, Manabe T, Taketo MM, Mikoshiba K. M_3 muscarinic acetylcholine receptor plays critical role in parasympathetic control of salivation in mice. **J Physiol.** (London). 558: 561-575, 2004

6. 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: M_2-mediated direct suppression and M_1/M_3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling. **Eur J Neurosci.** 19: 2682-2692, 2004

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

8. 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

9. 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 M_2 and M_3 receptors. **J Pharmacol Exp Ther** 308: 339-49, 2004

10. 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 M_3 Muscarinic Receptor-knockout Mice. **Gastroenterology** 125: 1774-1784, 2003

11. Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M. Postsynaptic M_1 and M_3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. **Eur J Neurosci** 18: 109-16, 2003

12. Karasawa H, Taketo MM, Matsui M(corresponding author), Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. **Eur J Pharmacol** *468* 15-19, 2003

13. 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 M_2 Receptor Knockout Mice. **J Pharmacol Exp Ther** *305* :106-113, 2003

14. 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

日本語論文

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

松井稔，舩田正彦．ムスカリン性受容体サブタイプと疾患 -最近の展開-．精神保健研究．48: 43-51, 2002

学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

上村雄一郎　他５名、ムスカリン受容体（mAChR）ノックアウトマウス　脾臓単核白血球におけるムスカリン受容体遺伝子発現レベルの検討、第７６回日本薬理学会年会、平成１５年　３月２４～２６日

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

G.　知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

１．特許取得
各ムスカリン性アセチルコリン受容体について新規疾患モデルとしての特許出願を準備中

２．実用新案登録
なし

３．その他
なし

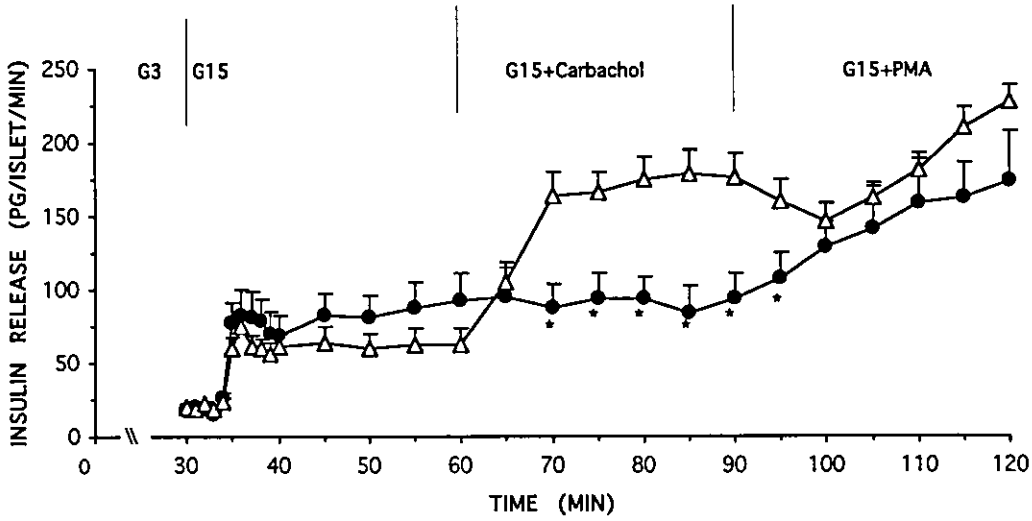

図1　M3 KO マウスのランゲルハンス島（黒丸）はカルバコール刺激によるインスリン分泌増強効果を欠失している。

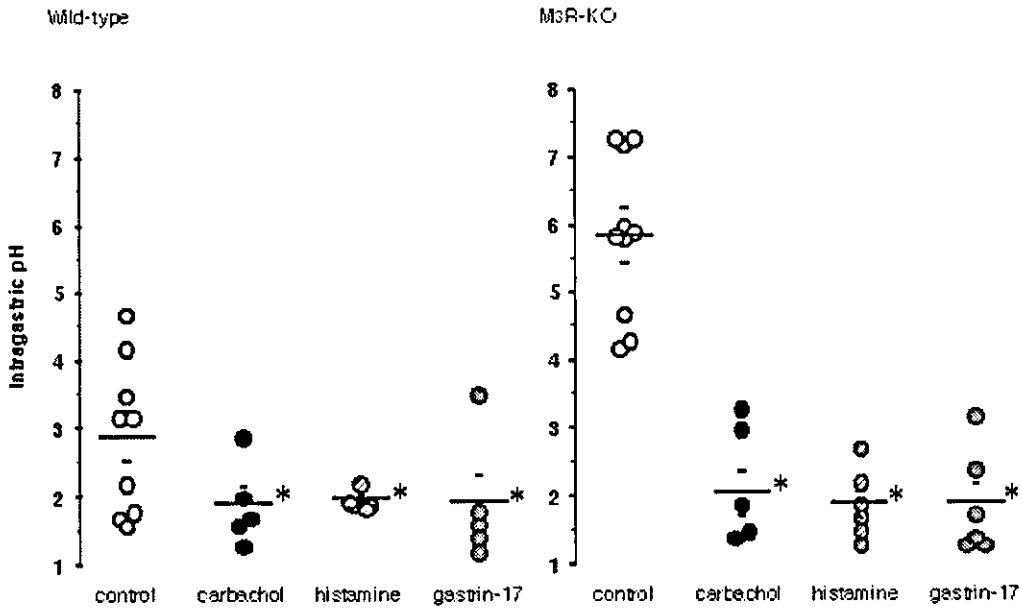

図2　M3 KO マウスの胃内 pH は野生型より顕著に高い。しかしカルバコール投与によりほぼ正常化する。

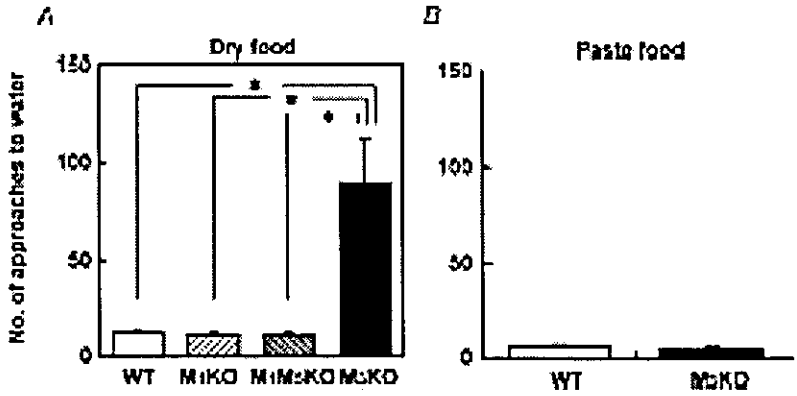

図３　M3 ノックアウトマウスは乾燥餌を食べる際に頻回の飲水行動を行う。

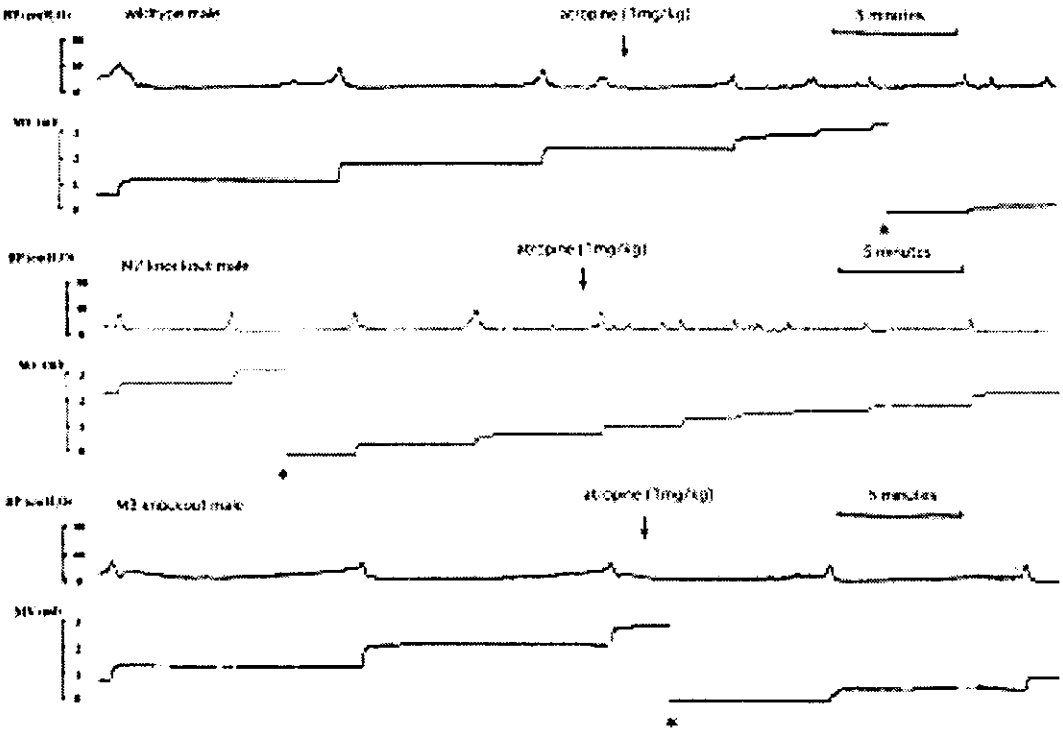

図４　シストメトリーの例。M3 ノックアウトマウスでは排尿間隔が長い。

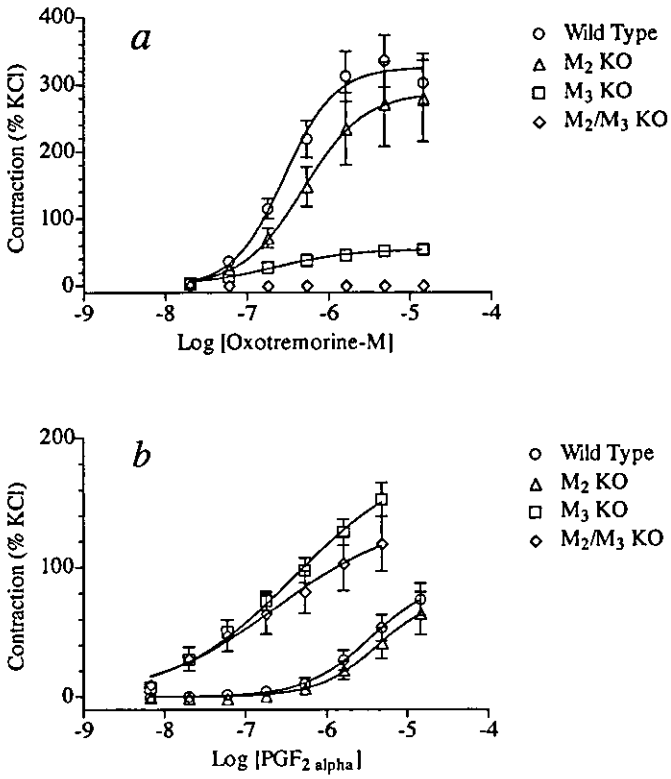

図5　M3 を欠失したマウスでは、コリン性収縮が減弱するが PGF2α による収縮が増強している。

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、「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た。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、自己免疫性心筋症に関連する可能性が考えられる。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 rag-2 KO マウスに尾静脈経由で移植して、マウスの観察を行った。その結果、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、組織傷害ならびに心肥大を認めた。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。デスモグレイン 3 を標的とした尋常生天疱瘡モデルに続き、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 を標的とした自己免疫性心筋炎モデルの作成に成功したことは、我々が開発した方法が広く応用可能であることを示す。

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。

一方、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、ひいては拡張型心筋症などが誘発される可能性を示唆する。事実、これまでに心筋ミオシンやβ1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拡張型心筋症モデル動物が作成されている。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を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 μg/headを完全フロインド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 x 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こっ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。

M3 に関しては、N 端部位の融合タンパク質を作成するとともに、第２細胞内ループのペプチドを合成し、これらを免疫原とした。M3 KO マウスに抗原 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変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

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β１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ることを示す。

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。

一方、 M3 に関しては N 端部位の融合タンパク質や第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。M2 の場合と同様な第２細胞外ループを用いても明らかな自己免疫を誘導できなかったので、比較的長い第一細胞外ドメインを用いてみたが、それでも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に実際の M3 の第２細胞外ループの構造を反映しない可能性も考えられる。事実、第２細胞外ループの合

成ペプチドを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た。

以上の結果より、M2 に関しては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。M3 に関しては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。

本法は、KO マウスが致死でなく、免疫系に大きな異常が見られないことが満たされれば、理論的にはどのような遺伝子産物に対しても自己免疫反応を誘導することが可能である。デスモグレイン３を標的とした尋常生天疱瘡モデルに続き、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 を標的とした自己免疫性心筋炎モデルの作成に成功したことは、この理論を裏付けている。本法においては、標的抗原の KO マウスと、リコンビナントタンパク質、さらに Rag-2 KO マウスがあれば基本的には十分であり、多くの抗原に応用可能な点で効率の良い自己免疫反応の誘導法であると考えられる。さらに、本法の特長は、生理的機能が不明な遺伝子産物であっても、自己免疫反応を誘導することによって、その表現系から機能を類推することを可能にする。この点からも有用な方法である。

E.研究発表（平成 14-16 年度）

原著論文

1) Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nishikawa, T. (2002) Immunological and histopathological characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. **J. Invest. Dermatol.** 118:199-204.

2) Tsunoda, K., Ota, T., Suzuki, H., Ohyama, M., Nagai, T., Nishikawa, T., Amagai, M. and Koyasu, S. (2002) 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.

3) Fukao, T., Yamada, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Takayama, T., Asano, T., Takeuchi, T., Kadowaki, T., Hata, J. and Koyasu, S. (2002) Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. **Nat. Immunol.** 3:295-304.

4) 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. (2002) Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. **Clin. Immunol.** 103:34-42.

5) Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in dendritic cells. **Nat. Immunol.**3:875-881.

6) Murata, Y., Ohteki, T., Koyasu, S. and Hamuro, J. (2002) IFN-g production by macrophages and dendritic cells dictated by intracellular thiol redox status. **Eur. J. Immunol.** 32:2866-2873.

7) Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Tsunoda, K., Koyasu, S., Amagai, M. and Nishikawa, T. (2002) The ultrastructureal changes of mice actively producing antibodies to desmoglein 3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. **Arch. Dermatol. Res.** 294:318-323.

8) Shinoda, M., Shimazu, M., Matsuda, S., Wakabayashi, G., Tanabe, M., Hoshino, K., Kamei, S., Koyasu, S. and Kitajima, M. (2002) c-Jun N-terminal kinase activation during warm hepatic ischemia/reperfusion injuries in a rat model. **Wound Repair Regen.** 10:314-319.

9) Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor mediated signal transduction. **Nat. Immunol.** 4:280-286.

10) Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S.

(2003) *In vivo* role of IFN-g produced by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur. J. Immunol.** 33:2666-2675.

11) Ohyama, M., Ota, T., Aoki, M., Tsunoda, K., Harada, R., Koyasu, S., Nishikawa, T. and Amagai, M. (2003) Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: an implication for gene therapy. **J. Invest. Dermatol.** 120:610-615.

12) Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T. and Amagai, M. (2003) Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J. Immunol.** 170:2170-2178.

13) Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature** 423:762-769.

14) Esashi, E., Sekiguchi, T., Ito, H., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2003) A possible role for $CD4^+$ thymic macrophages as professional scavengers of apoptotic thymocytes. **J. Immunol.** 171:2773-2777.

15) Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y. and Handa, M. (2003) Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85a null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation. **Blood** 102:541-548.

16) Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G. B., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Lam, E. W.-F. (2003) BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85a subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. **Oncogene** 15:2248-2259.

17) Nakaoka, Y., Nishida, K., Fujio, Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., Sugiyama, S., Matsuda, S., Koyasu, S., Yamauchi-Takihara, K., Hirano, T., Kawase, I. and Hirota, H. (2003) Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. **Circ. Res.** 93:221-229.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

21) 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.

22) 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.

23) 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. (2003) The role of PI3K in immune cells. **Nat. Immunol.** 4:313-319.

2) Fukao, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K in negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.** 24:358-363.

2) Fukao, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mice. **J. Mol. Med.** 81:524-535.

4) Matsuda, S. and Koyasu, S. (2003) Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. **Curr. Top. Med. Chem.** 3:1358-1367.

5) Koyasu, S. (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

特許出願 5 件

1）出願番号：特願平 11-218008 号
発明者：小安重夫、松田達志
発明の名称：「単一シグナル伝達系を標的としたスクリーニング系」
出願人：小安重夫
出願日：1999/07/30
公開日：2001/2/13（特開 2001-37497）

2）出願番号：特願 2000-113938 号
発明者：小安重夫、松田達志、竹鼻健司、小林幹
発明の名称：「Th2 反応に特異的な免疫寛容誘導剤」
出願人：慶應義塾、味の素（株）
出願日：2000/04/14
公開日：2001/10/23（特開 2001-294527）

3）出願番号：特願 2000-607462
発明者：天谷雅行、西川武二、鈴木春巳、小安重夫
発明の名称：「自己免疫疾患モデル動物」
出願人：慶應義塾
出願日：2000/03/30
査定日：2002/6/16、特許第 3326770 号

4）出願番号：特願 2001-156126 号
発明者：天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：「自己免疫疾患モデル動物の作製方法」
出願人：慶應義塾
出願日：2001/05/24
査定日：2002/4/11、特許第 3306625 号

5）出願番号：特願 2001-267653 号
発明者：角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫
発明の名称：「天疱瘡モノクローナル抗体」
出願人：慶應義塾
出願日：2001/09/04
公開日：2003/3/13（特開 W003-020769）

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 14-16 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。この仮説を検証するために、野生型マウス、P0+/-マウス、P0-/-マウスを、ドナーまたはレシピエントとする胸腺移植実験を行い、胸腺内 P0 発現レベルと、P0180-199 に対する Th1 recall response の程度が逆相関することを確認した。この結果は、我々の仮説を支持するものであり、ヒトの慢性炎症性脱髄性神経炎（CIDP）の病態との関連が推測される。さらに、ヒト Charcot-Marie-Tooth 病の病態に近い P0 の点突然変異を導入したノックインマウスや、CIDP 病態を早く発症する P0+/-マウスの確立にも挑戦した。

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

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。なぜ自己抗原の変異が自己免疫疾患の感受性に関連しているか不明なところが多いが、一つの可能性として、自己反応性レパトアに対する中枢性、あるいは末梢性寛容がうまく機能しない可能性が考えられる。

P0 蛋白のヘテロ欠損マウスでは、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 P0 の胸腺内発現が低下し、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可能性を考えていた。この仮説を証明し、ヒトの病態解明に応用するのが、本研究の目的である。また、P0+/-マウスを基本型とし、解析のより容易なモデル動物を作出することも目指した。

B.研究方法

野生型 B6 マウス、P0+/-、P0-/-の新生マウスを用い、胸腺移植実験を行った。最初の実験では、野生型マウスをレシピエントとして、まず、胸腺摘出をしてから、野生型、P0+/-、あるいは P0-/-由来の胸腺を胸腔内に移植した。つぎに、野生型、P0+/-、