

あるいは P0<sup>-/-</sup>マウスをレシピエントとして、同じく胸腺摘出を行ったあと、野生型マウスの胸腺を移植した。生後 8-10 週で、P0180-199 ペプチドを感作し、同ペプチドに対する recall response をインターフェロンガンマの産生で評価した (ELISA および ELISPOT)。

P0 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  $\gamma$ 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<sup>+/-</sup>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

#### (胸腺移植実験)

野生型マウスをレシピエントとした実験では、P0180-199 ペプチドに対する recall response の強度は、インターフェロンガンマ産生で評価した場合に、P0<sup>-/-</sup>胸腺 > P0<sup>+/-</sup>胸腺 > 野生型胸腺の順であった。また野生型マウスの胸腺を、異なるレシピエントに移植する実験では、レシピエントの P0 発現レベルは影響を与えないことがわかった。これらの結果は、胸腺内自己抗原発現レベルが、中枢性寛容を支配するという作業仮説に一致した。

#### (新しい動物モデル作出の試み)

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<sup>+/-</sup> FcR  $\gamma$ IIB<sup>-/-</sup>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

一連の解析結果から、胸腺内自己抗原発現レベルによって、自己反応性 T 細胞レパトアが影響を受けることが示された。ただし、この結論は、あくまで特定の抗原量の範囲の中で認められる現象である。例えば Desmoglein-3 KO マウスでは、ホモ KO とヘテロ KO の差が検出できないが、これは野生型マウスにおける発現量が P0 よりもはるかに多く、ヘテロ KO でも negative selection の誘導に充分だからであろうと推測される。このことを支持する結果として、最近胸腺内の自己抗原発現を制御する遺伝子として発見された AIRE のヘテロ KO マウスでは、野生型マウスよりも、自己反応性が亢進していることが示されている。

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<sup>+/-</sup> 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+/-マウスの自然発症神経炎は、ユニークな自己免疫疾患モデルであり、本モデルを基本型として、さらに有用なモデルが開発されることが期待される。

## F. 研究発表

### 英文原著

- 1) Gumperz, J.E., S. Miyake, T. Yamamura, and M.B. Brenner: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195: 625-636, 2002
- 2) Araki, M., T. Kondo, J.E. Gumperz, M.B. Brenner, S. Miyake and T. Yamamura: Th2 bias of CD4<sup>+</sup> NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* 15: 279-288, 2003
- 3) Miyamoto, K., S. Miyake, M. Schachner, and T. Yamamura: Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide. *Eur. J. Immunol.* 33: 656-665, 2003
- 4) Koike, F., J-i. Satoh, T. Kondo, S. Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Kanda, T. Fukazawa, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies IFN $\beta$ -regulated genes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139: 109-118, 2003
- 5) Nakamura, T., K.-H. Sonoda, D.E. Faunce, J. Gumperz, T. Yamamura, S. Miyake, J. Stein-Streilein: CD4<sup>+</sup> NKT cells, but not conventional CD4<sup>+</sup> T cells, are required to generate efferent CD8<sup>+</sup> T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J. Immunol.* 171:1266-1271, 2003
- 6) Bedoui, S., S. Miyake, Y. Lin, K. Miyamoto, S. Oki, N. Kawamura, A. Beck-Sicking, S. von Hoersten, and T. Yamamura: Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y<sub>1</sub> receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J. Immunol.* 171: 3451-3458, 2003
- 7) Stanic, A.K., R. Shashidharamurthy, J.S. Bezradica, N. Matsuki, Y. Yoshimura, S. Miyake, E.Y. Choi, T.D. Schell, L. Van Kaer, S.S. Tevethia, D.C. Roopenian, T. Yamamura and S. Joyce: Another view of T cell antigen recognition: Co-operative engagement of glycolipid antigens by V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 natural TCR. *J. Immunol.* 171:4539-4551, 2003
- 8) 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  $\alpha$ -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 50:305-313, 2004
- 9) Illes, Zs., M. Shimamura, J. Newcombe, N. Oka, and T. Yamamura: Accumulation of V $\alpha$ 7.2J $\alpha$ 33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004
- 10) 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
- 11) Satoh, J-i., T. Yamamura, and K. Arima: The 14-3-3 protein  $\epsilon$  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

- 12) 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
- 13) 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
- 14) Nakai, Y., K. Iwabuchi, S. Fujii, N. Ishimori, N. Dashtsoodol, K. Watano, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J.S. Bezradica, 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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 V $\alpha$ 14 natural killer T cells in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 11:35-41, 2005
- 18) 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-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of  $\alpha$ -galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3383-3388, 2005
- 19) 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)
- 20) 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- $\gamma$ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. *Blood* (in press)
- 21) Chiba, A., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: The involvement of V $\alpha$ 14 NKT cells in the pathogenesis of murine models of arthritis. *Arthr. Rheumat.* (in press)

和文原著

- 1) 長山成美、三宅幸子、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）におけるNK細胞/NK-LAK細胞の体内動態および疾患抑制性の検討。神経免疫学 10:104-105, 2002
- 2) 宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡伸幸、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の治療における選択的COX-2阻害剤の効果。神経免疫学 10:106-107, 2002
- 3) 林 幼偉、三宅幸子、山村 隆：CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の調節。神経免疫学 10:108-109, 2002
- 4) 山村 隆：シンポジウム「日本における多発性硬化症の多様性とその病態」動物モデルからの提言。臨床神経学 42:1201-1203, 2002
- 5) 荒木 学、三宅幸子、山村 隆：多発性硬化症におけるNKT細胞減少は長期ステロイド治療により補正される。神経免疫学 12:175-179, 2004

## 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)
- 5) 宮本勝一、三宅幸子、山村 隆: 糖脂質による自己免疫病の制御. 感染・炎症・免疫 32:200-201, 2002
- 6) 山村 隆、宮本勝一、長山成美、三宅幸子: NK・NKT 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症制御. 蛋白質核酸酵素増刊号「免疫研究の最前線: 高次複雑系免疫システムの包括的理解をめざして」47: 1115-1120, 2002
- 7) 宮本 勝一、三宅 幸子、山村 隆: 自己免疫性脳脊髄炎に対する NKT 細胞糖脂質リガンド療法. 神経免疫学 10:209-211, 2002
- 8) 佐藤 準一、山村 隆: 多発性硬化症におけるインターフェロンベータ療法の効果発現機序. 医療 57: 441-455, 2003
- 9) 山村 隆: NKT 細胞と自己免疫. 調節性 CD4<sup>+</sup> NKT 細胞の役割. *Molecular Medicine* 40: 562-568, 2003
- 10) 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

## 和文総説

- 1) 山村 隆: 多発性硬化症の動物モデル. -実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE). *Current Insights in Neurological Science* 10: 10-11, 2002
- 2) 三宅幸子、山村 隆: NKT 細胞と実験的自己免疫性脳脊髄炎. 免疫病研究の最先端. 分子制御というアプローチ. *Mebio* 19:61-67, 2002
- 3) 荒木 学、高橋 和也、山村 隆: 多発性硬化症における NK 細胞、NKT 細胞の関与. *神経内科* 56:312-318, 2002
- 4) 山村 隆: NKT 細胞と新しい自己免疫病治療薬. *Medical Science Digest* 28:306-307, 2002
- 11) 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
- 12) 佐藤 準一、山村 隆: 多発性硬化症治療への新しい展望. *最新医学* 58:1926-1938, 2003
- 13) 長山 成美、山村 隆: 抗コレステロール薬による Th2 優位の誘導 -MS の治療への応用は可能か?-. *臨床免疫* 40: 205-208, 2003
- 14) 長山 成美、山村 隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎と多発性硬化症. 特集 *Molecular mimicry* (分子模倣) と疾患. *医学のあゆみ* 206:845-848, 2003
- 15) 山村 隆: 近未来の多発性硬化症治療. *BIO Clinica* 18: 1069-1073, 2003
- 16) 佐藤 準一、山村 隆: 多発性硬化症における

インターフェロンベータ応答遺伝子. Bio Medical Quick Review Net (印刷中), 2003

- 17) 山村 隆, 林 幼偉, 三宅 幸子: 多発性硬化症の進行を抑制する免疫細胞. 特集 脳と免疫. Brain Medical 15: 401-405, 2003
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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)
- 22) 山村 隆: 多発性硬化症における免疫抑制薬の使い方: 神経免疫疾患. 最新医学 (印刷中), 2005

## 和文著書

- 1) 山村 隆: 臓器特異的自己免疫病の NK/NKT 細胞による調節. 別冊・医学のあゆみ, 免疫疾患-state of arts. Ver. 2. (今西二郎, 淀井淳司, 湊長博, 山本一彦編), 医歯薬出版 (東京), pp 443-446, 2002
- 2) 三宅 幸子, 山村 隆: NKT 細胞糖脂質リガンドによる自己免疫性疾患制御. Annual Review 免疫 2003 (奥村康, 平野 俊夫, 佐藤昇志 編), 中外医学社 (東京), pp 71-77, 2002
- 3) 山村 隆, 三宅 幸子: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対する NKT 細胞の機能制御治療とその応用. Molecular Medicine 臨時増刊号「免疫 2004」(岸本忠三編集), 中山書店 (東京), pp 305-311, 2003
- 4) 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
- 5) 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

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 14-16 年度分担研究報告書

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

分担研究者 結城伸泰 獨協医科大学神経内科 助教授

【背景】 Guillain-Barré 症候群（GBS）は急性に四肢筋力低下をきたす神経・筋疾患のうち最も頻度が高く、多くの患者で神経症状発現の 1-3 週前に感冒や下痢などの感染症状が先行する自己免疫病である。【目的】 自己抗原ノックアウトマウスを利用して、GBS モデルマウスの作成と抗ガングリオシド抗体産生機構を解明する。【方法】 複合型ガングリオシドを合成できない GalNAcT<sup>-/-</sup>マウスに、*Campylobacter jejuni* のリポオリゴ糖（LOS）を感作し、脾細胞を rag-2 ノックアウトマウスへ移入した。GalNAcT<sup>-/-</sup>および GalNAcT<sup>+/+</sup>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。【結果】 運動麻痺は呈さず、末梢神経の病理組織学的変化もみられなかった。*C. jejuni* 菌体感作により、脾臓での BAFF の発現を認めた。GalNAcT<sup>-/-</sup>マウス脾臓 B 細胞の 0.2-0.3% が GD1a を結合した。

共同研究者

薄敬一郎 獨協医科大学助手

駒ヶ嶺朋子 獨協医科大学学生

松本幸恵 獨協医科大学助手

#### A. 研究目的

GBS は、急速に発症する四肢筋力下と腱反射低下・消失を主徴とする自己免疫性末梢神経疾患である。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 *C. jejuni* が 3 割を占め、最も頻度が高い。これまでに、患者の血中 IgG 抗体が末梢神経の構成分子のひとつ GM1 ガングリオシドに結合することを見出し、患者から分離された *C. jejuni* の LOS が GM1 の末端糖鎖と共通する構造を有することを明らかにしてきた。分子相同性による抗 GM1 抗体の産生が発症に関わると考えられる。ウサギに GM1 を感作することにより、IgG 抗 GM1 抗体を誘導し弛緩性運動麻痺を出現させ、病理

組織学的にもヒトの軸索型 GBS に一致する所見が得られている。また、患者から分離された *C. jejuni* の菌体をウサギに感作することでも同様のモデルが得られている。これらは抗 GM1 抗体の病原性を証明し、分子相同性仮説を支持する結果である。微生物の病原性を証明するためには Koch の 4 条件を満たす必要があるように、自己免疫性疾患であることの証明には、Witebsky が提案した定義を満たすことが指標として用いられる。自己免疫性疾患としての軸索型 GBS 発症機序として、これまでに 4 つのことが明らかになっている。①患者血中の臓器特異抗体としての抗 GM1 抗体、②抗体に対応する特異抗原としての GM1、③ウサギへの GM1 感作による抗 GM1 抗体産生、④ヒト軸索型 GBS に対応したモデルウサギの運動神経における病理組織学的所見、である。残る項目として、病原抗体や病原抗体産生細胞を健常動物に移入し、発症を呈する受動免疫モデルの樹立が求め

られている。

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<sup>-/-</sup>マウスに、GM1、GD1a 糖鎖構造を有する種々の抗原を感作した。その結果、*C. jejuni* 菌体有感作すると、高力価の抗 GM1、抗 GD1a 抗体が産生されるのに対し、GM1、GD1a を高発現したマウスの細胞を感作しても抗体は全く産生されなかった。このことから、抗ガングリオシド糖鎖抗体の産生には、菌体由来の共刺激が必要であることが示唆された。一方、GalNAcT<sup>-/-</sup>マウスと同腹の GalNAcT<sup>+/+</sup>マウスは、*C. jejuni* 菌体有感作しても、抗 GM1、抗 GD1a 抗体を全く産生しなかった。このことから、GalNAcT<sup>+/+</sup>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。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。

## B. 研究方法

(1) 「自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫疾患モデル動物の作製法」による試み

GalNAcT<sup>-/-</sup>マウス（名古屋大学古川鋼一教授より供与）を自己抗原ノックアウトマウスとして用いた。GM1 および GD1a 様糖鎖構造を持つ *C. jejuni* (CF90-26) の LOS を感作し、抗体価の上昇が得られた個体の脾細胞を取り出し、*rag-2* ノックアウトマ

ウスに 10<sup>7</sup> の脾細胞を眼窩静脈叢より注射し経過を観察した。スクリーニングとしての血中抗体価は ELISA 法にて測定した。

(2) *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

*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 GalNAcT<sup>-/-</sup> および同腹の GalNAcT<sup>+/+</sup> マウスに感作し、脾臓を取り出した、BAFF 分子の発現をフローサイトメトリーで検出した。

(3) ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞の検出

GalNAcT<sup>-/-</sup>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、フローサイトメトリーで検出した。

## C. 研究結果

(1) 「自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫疾患モデル動物の作製法」による試み

運動麻痺は見られなかった。これらのマウスの脊髄神経根・馬尾神経からも GBS としての病理組織学的所見すなわち IgG の軸索への沈着、Waller 様変性は見られなかった。

(2) *C. jejuni* 菌体感作による BAFF の発現

*C. jejuni* 菌体で感作した GalNAcT<sup>-/-</sup> および GalNAcT<sup>+/+</sup> 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)。

(3) ガングリオシド糖鎖特異的 B 細胞の検出

GalNAcT<sup>-/-</sup>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。

#### D. 考察

今回行った方法では、GBSのマウスモデルは得られなかった。

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、LOS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LOS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 LOS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<sup>-/-</sup>マウスとGalNAcT<sup>+/+</sup>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<sup>-/-</sup>マウスでは、ガングリオシド糖鎖特異的B細胞がGalNAcT<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>マウスでしか検出できなかった。GalNAcT<sup>+/+</sup>マウスでの検出は今後の課題である。

#### E. 結論

GalNAcT<sup>-/-</sup>マウスを利用したGBSモデルマウス作成の試みは中途である。

ガングリオシドGD1aを発現しないGalNAcT<sup>-/-</sup>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

##### 1. 論文発表

##### 英語論文

1. Yuki N, Saperstein DS. Axonal Guillain-Barré syndrome subtypes: do we need more splitting? *Neurology* 2003;61:598-599.
2. 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* 2003;141:112-117.
3. 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* 2003;54:393-388.
4. 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* 2003;126:2279-2290.
5. Odaka M, Yuki N, Hirata K. Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 2003;250:913-916.
6. Ikuta N, Fukusako T, Yuki N, Morimatsu M, Koga M. Acute oropharyngeal palsy associated with anti-GM1b IgG antibody. *J Neurol* 2003;250:881-882.
7. Sekiguchi K, Susuki K, Funakawa I, Jinnai K, Yuki N. Cerebral white matter lesions in acute motor axonal neuropathy. *Neurology* 2003;61:272-273.
8. Susuki K, Johkura K, Yuki N, Kuroiwa Y. Clinical deterioration in Bickerstaff's brainstem encephalitis caused by overlapping Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 2003;211:89-92.
9. Odaka M, Yuki N, Kokubun N, Hirata K, Kuwabara S. Axonal Guillain-Barré syndrome



- associated with axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Sci* 2003;211:93-97.
10. 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* 2003;210:41-45.
  11. 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* 2003;210:99-103.
  12. 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* 2003;60:1514-1518.
  13. Odaka M, Yuki N. Antibodies to GM2 ganglioside in neurological disorders. *Intern Med* 2003;42:220-221.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. Susuki K, Yuki N. Effect of methylprednisolone in patients with Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 2004;363:1236-1237.
  21. 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.
  22. 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.
  23. Galassi G, Susuki K, Quaglini D, Yuki N. Post-infectious acute ataxia and facial diplegia associated with anti-GD1a IgG antibody. *Eur J Neurol* 2004;11:790-791.
  24. 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* 2004;2:22-23.
  25. 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.
  26. 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* 2004;251:24-29.
  27. Mori I, Koga M, Hirata K, Yuki N. Hand weakness onset Guillain-Barré syndrome.

*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:169-170.

28. Pan CL, Shun CT, Susuki K, Yuki N, Hsieh ST. Pharyngeal-brachial palsy after cytomegalovirus colitis. *Neurology* 2004;62:153-154.
29. 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.

## 2. 学会発表

### 国内

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

Yuki N., Koga M, Susuki K, Hirata K.  
Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model.  
Peripheral Nerve Society.  
Banff, Canada. July 28, 2003.

Yuki N., Koga M, Susuki K, Hirata K.  
Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model.  
12<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms.  
Aarhus, Denmark. September 7, 2003.

### Yuki N.

Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome.  
Symposium on Glyco-Neurobiology-Glycolipids, Glycoproteins and other Glycoforms.  
A Satellite Meeting of the Biennial Meeting of the International and Asia-Pacific Societies for Neurochemistry.

Taipei, Taiwan. February 11, 2004

### Yuki N.

Molecular mimicry and disease model of Guillain-Barré syndrome.  
Symposium on Peripheral Neuropathies and Inflammation.  
7<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology.  
Venice, Italy. October 1, 2004.

### Yuki N.

Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome.  
Session: Glycobiology and Disease  
US/Japan Glyco 2004: Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research.  
Honolulu, Hawaii, USA. November 20, 2004.

### Yuki N.

Keynote lecture: Immunopathogenesis of acute motor axonal neuropathy and action mechanism of IVIG.  
IVIG in Neurological Disease 1<sup>st</sup> Asia Pacific Symposium.  
Singapore. November 25, 2004.

### Yuki N.

Plenary lecture: Recent ideas on the immunopathogenesis of axonal GBS.  
11<sup>th</sup> Asian & Oceanic Congress of Neurology.  
Singapore. November 28, 2004.

天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 I

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、既にデスマグレイン 3 ノックアウト (Dsg3<sup>-/-</sup>) マウスを組み換え Dsg3 で免疫し、抗 Dsg3 抗体の産生を確認後、その脾細胞を T 細胞 B 細胞を欠く Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植する事で尋常性天疱瘡 (PV) モデルマウスを作製してきた。従来使用されていた Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの遺伝的背景は、C57BL/6 と 129/Sv のミックスバックであり、詳細な免疫反応を検討する際の障害となっていた。C57BL/6 あるいは BALB/c に 12 代戻し交配した Dsg3<sup>-/-</sup>マウスは、生育不良となり、不相当であった。今回、129/Sv に 12 代戻し交配した Dsg3<sup>-/-</sup>マウスは生育可能であることを確認し、129/Sv バックの Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を 129/Sv バック Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植することにより作成した天疱瘡モデルマウスが、従来のモデルマウスと同様の表現型を呈することを確認した。129/Sv バックの Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを用いて作成した天疱瘡モデルは、今後詳細な免疫反応を検討する上で有用である。

共同研究者  
横山知明、天谷雅行  
慶應義塾大学医学部皮膚科学

事を確認することを目的として実験を行った。

**A. 研究目的**

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

そこで我々はさらに 129/Sv に 12 代の戻し交配を行うこととした。今回、8 代目の戻し交配によってホモ個体が生獣まで成育することが分かったため、このマウスと 129/Sv の遺伝的背景を持つ Rag2<sup>-/-</sup>マウスを用いてモデルマウスの作成が可能である

**B. 研究方法**

**1. PV モデルマウスの作成 (免疫)**

129/Sv バックの Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを、10 μg の組み換え Dsg3 蛋白と、complete Freund's adjuvant にて免疫した。1 週間後、同量の Dsg3 蛋白と incomplete Freund's adjuvant にて免疫し、さらに 1 週間後に同様に免疫した。その後、Dsg3 蛋白のみにて 2 回の免疫を行った。抗 Dsg3 抗体産生を、マウスケラチノサイトの cell line である PAM212 細胞を用いた living keratinocyte staining と ELISA 法で確認した。抗体産生の確認後、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を 1 匹あたり 4.5x10<sup>7</sup> 個または 1.3x10<sup>7</sup> 個ずつ、129/Sv バックの Rag2<sup>-/-</sup>マウスに経静脈的に移植した。

モデルマウスの発症の確認は、糜爛・脱毛などの臨床症状の観察、体重減少の確認、ELISA 法による抗 Dsg3 抗体価の測定によって行った。マウス Dsg3 抗体価が中等度

の PV モデルマウス血清を陽性コントロール、正常マウスの血清を陰性コントロールとした。波長 450nm にて吸光度を測定し、次式で計算し Index 値を算出した。
$$\text{Index} = \frac{(\text{検体の OD} - \text{陰性コントロールの OD})}{(\text{陽性コントロールの OD} - \text{陰性コントロールの OD})} \times 100.$$

## 2. PV モデルマウスの作成 (未免疫)

129/Sv バックの未免疫の Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を、129/Sv バックの Rag2<sup>-/-</sup>マウスに 1 匹あたり  $5.0 \times 10^7$  個ずつ、経静脈的に移植した。

モデルマウスの発症の確認は、糜爛・脱毛などの臨床症状の観察、体重減少の確認、ELISA 法による抗 Dsg3 抗体価の測定によって行った。上記と同様に Index 値を算出した。

## C. 研究結果

### 1. PV モデルマウスの作成 (免疫)

脾細胞移入後の血清中抗Dsg3抗体価のELISAの結果(図1)、体重変化のグラフ(図2)、臨床症状(図3)を示す。移入後7日目から抗Dsg3抗体の出現が認められ、移入後14日頃に抗体価は最大値を示し、その後一旦減少するものの、移入後100日を経過しても抗体の産生が認められた。脾細胞の移入後2週目ころより、耳介周囲、頭頂部、顔面など、機械的刺激のある部位から脱毛が見られるようになってきた。体重については、移入後11日目ころから減少し始め、いったん平行線となるものの、35日目すぎから再び減少し始めると言う経過を取った。

次に硬口蓋の病理組織像を示す(図4)。H.E.染色にて、表皮基底層直上での裂隙形成が確認された。

モデルマウスの硬口蓋へのIgG沈着を見るために蛍光抗体直接法を行い、IgGの沈着が確認された(図5)。

### 2. PV モデルマウスの作成 (未免疫)

免疫した脾細胞を移入した系に比べ少し遅れて、移入後3週目ころから抗体価が上昇し始めた。移入後60日ころに最大値に達し、100日過ぎから下降傾向となった。

臨床所見については、脾細胞移入後21日

目頃より耳介周囲、顔面に脱毛が見られ始めた。現在脾細胞の移入後200日以上を経過しているが、顔面を中心とした糜爛性病変が継続して認められている。体重については、脾細胞移入後21日目頃から減少し始め、60日過ぎ以降は大きな体重変化は認められなくなった。

## D. 考察

今回、129/SvバックのDsg3<sup>-/-</sup>マウスと同バックのRag2<sup>-/-</sup>マウスを用いてPVモデルマウスを作製する事が出来る事が示された。今後、129/Svマウスの特定の分画の脾細胞を、129/SvバックのDsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞と供移植する事により、天疱瘡の発症遅延・治療が可能であるかどうかを検討して行く予定である。

また、遺伝的背景の均一なモデルマウスが作製できたことから、今後発症機序などの免疫学的研究を進める事が可能となった。

## E. 結論

129/SvバックDsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を129/SvバックRag2<sup>-/-</sup>マウスに移入することにより、天疱瘡モデルマウスを安定して作製することが出来る。

## F. 研究発表 (平成 12 年度)

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## 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.抗Dsg3抗体価ELISA

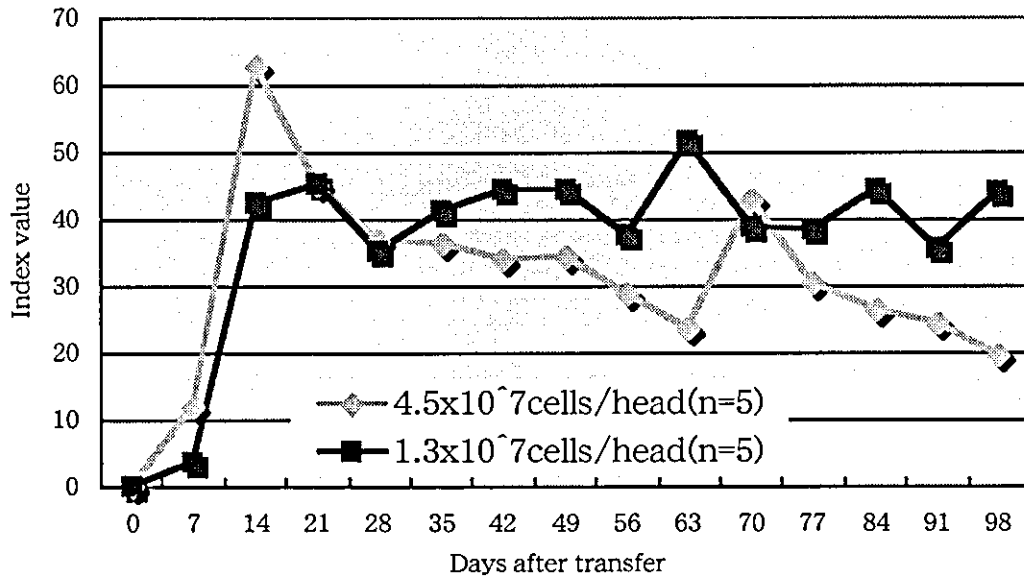


図 1. 脾細胞移入後7日目から抗 Dsg3 抗体の出現が認められ、移入後 14 日頃に抗体価は最大値を示した。移入後 100 日後も抗体産生は継続している。

図2.PVモデルマウスの体重変化

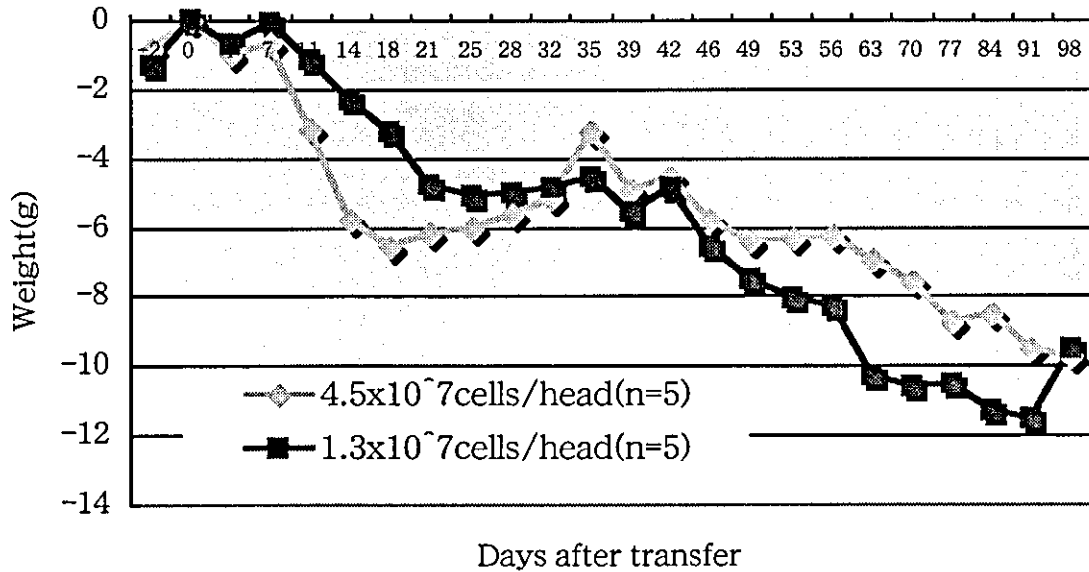


図 2. 体重は、脾細胞移入後 11 日目ころから減少し始め、いったん平行線となるものの、35 日目すぎから再び減少し始めた。



図 3.脾細胞移入後 21 日目の臨床像  
顔面、前腕部に脱毛を認める。

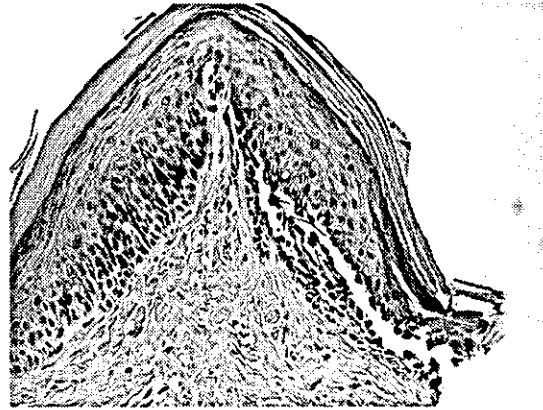


図 4. 硬口蓋の病理組織像  
基底層直上での裂隙形成。

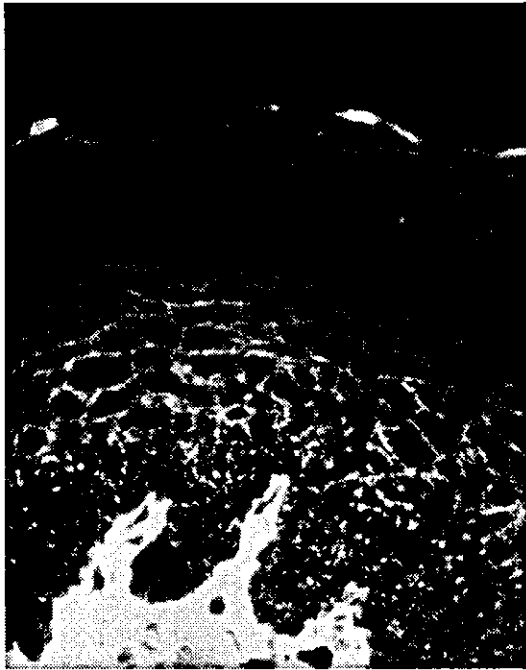


図 5.硬口蓋の蛍光抗体直接法所見  
IgG の細胞間への沈着が認められる。

天疱瘡モデルマウス作成の効率化の検討 II

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** 我々は、C57BL/6 と 129/Sv の混合遺伝子背景をもつデスマグレイ  
ン 3 ノックアウト (Dsg3<sup>-/-</sup>) マウスを組み換え Dsg3 で免疫し、抗 Dsg3 抗体の  
産生を確認後、その脾細胞を T 細胞 B 細胞を欠く Rag2<sup>-/-</sup>マウスに移植する  
事で尋常性天疱瘡 (PV) モデルマウスを作製してきた。口腔内に出現するびら  
んのため強い摂食障害を示し、生育不良となる C57BL/6 に 12 代戻し交配した D  
Dsg3<sup>-/-</sup>マウスをレスキューするために、表皮下層部で Dsg1 を発現する Dsg1  
トランスジェニックマウスの作成をした。さらに、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスと交配する  
と、接着機能を代償して摂食障害や脱毛を軽減し、生存率を向上させることが  
確認された。Dsg1 Tr-Dsg3<sup>-/-</sup>マウスとすることにより、遺伝背景を C57BL/6  
に統一した天疱瘡モデルマウスが作成できることを示している。作成されるモ  
デルマウスは、今後さらなる詳細な免疫学的検討に有用である。

共同研究者

畑 毅 (慶應義塾大学医学部大学院専攻生)

西藤 公司 (慶應義塾大学特別研究員)

**A. 研究目的**

本研究は PV モデルマウス作製における  
ドナーである Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの改良を行  
い、ドナー、レシピエントとも C57BL/6  
をバックグラウンドとするモデルマウス作  
製系を確立することを目的とする。

具体的には離乳後すぐに死亡してしまう  
C57BL/6 バック Dsg3<sup>-/-</sup>マウスに遺伝子  
導入することにより、表皮下層部に Dsg1  
を発現させて口腔内症状を改善し、摂食障  
害を軽減して生存率を向上させることを試  
みた。

**B. 研究方法**

**1, トランスジーン (TG) コンストラ  
クトの作製**

マウスの表皮下層で Dsg1 を発現させる  
ため、ケラチン 5 プロモーターを使用した。  
その下流に  $\beta$  グロビンのイントロン、マウ  
ス Dsg1 の全長、マーカーとして E-Tag、  
そして Poly A を順に繋げてコンストラク

トとした。

**2, TG のマウスへの導入**

TG のマウスへの導入はトランスジェニ  
ックマウスの作製効率を考慮し、Dsg3<sup>-/-</sup>  
に直接行わず、C57BL/6 と C3H の F1 に  
マイクロインジェクションにて行なった。  
このようにして作製されたマウスの遺伝子  
型は、導入された TG 特異的なプライマー  
を用いて PCR にて確認した。また目的と  
する C57BL/6 バックのトランスジェニッ  
クを得るために C57BL/6 へのバッククロ  
スを行なった。

さらに Dsg3<sup>-/-</sup>マウスへの遺伝子導入  
は、上述のように作製した TG ポジティブ  
マウス (K5Dsg1TG+) と C57BL/6 の  
Dsg3<sup>+/-</sup>とを交配させることにより行な  
った。

**3, K5Dsg1TG+マウスにおける TG  
由来 Dsg1 の発現確認**

PCR にて TG の導入が確認された  
K5Dsg1TG+マウスの各組織をマーカーと  
して導入した E-Tag タンパクに対する抗  
体で染色し、TG のタンパクレベルでの発

現とその局在を調べた。

#### 4、TG 由来 Dsg1 の Dsg3 代償効果の確認

当研究室で単離された強い病原性を有する抗 Dsg3 モノクローナル抗体である AK23 を K5Dsg1TG+マウス腹腔内に接種し、一時的に Dsg3 の細胞接着機能を阻害して TG 由来タンパクの Dsg3 代償効果を検証した。具体的には K5Dsg3TG+マウスと野生型マウスのフェノタイプと体重変化を観察し、比較を行った。

#### 5、K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの解析

K5Dsg1TG+マウスと Dsg3<sup>+/-</sup>マウスを交配させ、誕生した K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの生存率と各組織における TG 由来タンパクの発現状況の確認を行った。

### C. 研究結果

#### 1、K5Dsg1TG+マウスにおける TG 由来 Dsg1 の確認

K5Dsg1TG+マウスの各組織を E-Tag 抗体により染色を行ったところ、口蓋下層部と毛包の細胞間に発現していることが確認された。本結果より導入した TG はマウス表皮の細胞間で発現し、細胞接着にも関与している可能性が示唆された。

#### 2、TG 由来 Dsg1 の Dsg3 代償効果の確認

AK23 を接種した K5Dsg1TG+マウスは野生型マウスに比べ、脱毛が顕著に軽減された(図1)。また体重は接種後3日まで減少したが、減少程度が緩和で、回復も早かった(図2)。

このことから TG+マウスの表皮下層において発現した Dsg1 は Dsg3 の機能を代償し、脱毛や摂食障害を軽減したものと考えられた。また本結果より Dsg3<sup>-/-</sup>マウスにおいても同様に口腔内症状を改善し、生存率の向上が可能であることが示唆された。

#### 3、K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの解析

K5Dsg1TG+マウスと Dsg3<sup>+/-</sup>マウスの交配の結果、6匹の K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスが誕生し、そのうちの雄3匹が死亡することなく20週以上生存した。K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの生存率は50%(3/6)で、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの100%(0/56)から大きく改善させることに成功した。K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの組織を抗 E-Tag 抗体にて確認したところ、K5Dsg1TG+と同様口蓋の下層部に染色が認められた。

このことから K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスにおいても表皮下層部に TG 由来の Dsg1 が発現し、Dsg3 の接着機能を代償できることが示された。

### D. 考察

作製した K5Dsg1TG+および K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの解析結果から導入した TG が表皮下層で細胞間に発現していることが確認された。この TG 由来の Dsg1 が実際にはどのような形で存在しているのか、またどのようにして細胞同士の接着を担っているのか、さらには物理的にどの程度 Dsg3 の機能を代償できているのかといった内容は今後の研究課題であるが、これまでの研究では TG 由来の Dsg1 が Dsg3 の機能を代償できることを示唆する結果が得られており、「デスマグレイン代償説」を裏付けるものと考えられる。

K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスにはコントロールマウスに比べ、体重が軽いものと同様なものが存在したが、これは TG がヘテロで発現しているかホモで発現しているかに拠っていると思われる。この判別方法については現在検討中であるが、今後はホモ同士の交配を進めてより効率的に K5Dsg1TG+Dsg3<sup>-/-</sup>マウスを作製し、モデルマウス作製の際のドナーマウスとして使用する予定である。

### E. 結論

K5プロモーターを用いて表皮下層に Dsg1 を発現させる遺伝子を構築し、マウスに導入したところ、Dsg1 の発現が表皮下層の細胞間に確認された (K5Dsg1TG+)。またこのマウスに AK23 を接種すると、野生型マウスに比べ、脱毛



と体重減少の抑制が観察された。

K5Dsg1TG+と Dsg3+/-との交配により、K5Dsg1TG+Dsg3-/-を得た。C57BL/6 の Dsg3-/-マウスの生存率が0%であるのに対し、このマウスの生存率は50%であり、大きな効果が得られた。またこのマウスの解析を行ったところ、K5Dsg1TG+同様表皮下層部に Dsg1 の発現を認めた。

本研究の結果、バックグラウンドを C57BL/6 に揃えた PV モデルマウス作製系の構築に向けた成果を得ることが出来た。

F. 研究発表  
学会、論文発表  
なし。

Day

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

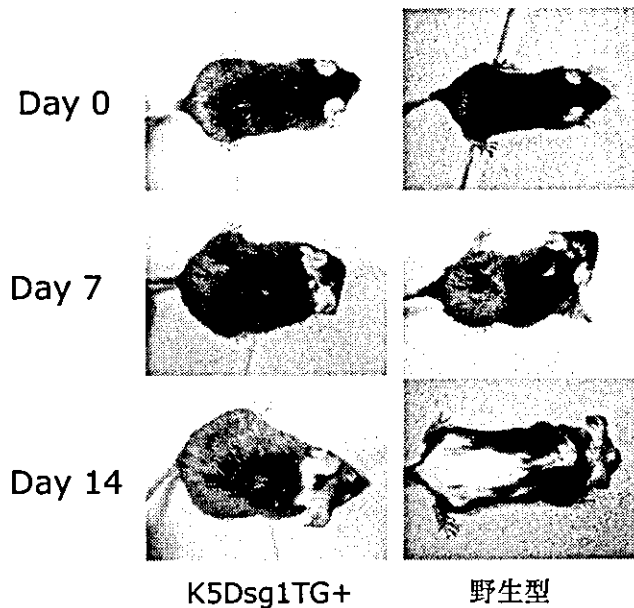


図1. AK23 接種後のマウス外観の推移。K5Dsg1TG+マウスは野生型マウスに比べ、脱毛が抑制された。

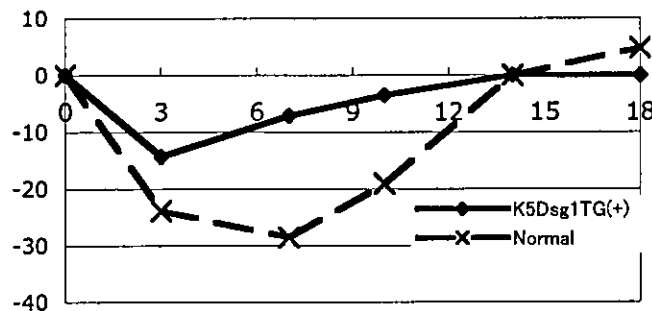


図2. AK 2 3 接種後のマウスの体重変化。K5Dsg1TG+マウスは野生型マウスに比べ体重の減少割合が少なく、回復も早かった。

天疱瘡モデルマウス由来抗 Dsg3 モノクローナル抗体の解析

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** 自己抗原ノックアウトマウスを用いる方法で作製した尋常性天疱瘡（PV）モデルマウスより様々な病原性を有する抗 Dsg3 モノクローナル抗体（mAb）を複数単離した。病原性の強い mAb は、標的抗原である Dsg3（Dsg3）分子上で細胞接着に重要な領域を認識し、病原性を明らかに示さない mAb は細胞接着に重要でないと考えられている領域を認識している事を示し、抗体の病原性とエピトープの関係を明らかにした。また病原性を有さない mAb も複数組み合わせることにより、水疱形成能を示す事を明らかにし、ポリクローナルな効果を分子レベルで再現することができた。さらに抗原抗体結合反応の結合カイネティクスを BIAcore を用いて検討し、抗体により結合カイネティクスが異なることが明らかとなり、エピトープの他に病原性を左右する可能性が示唆された。これらの mAb 用いて得られた知見は、天疱瘡における水疱形成の分子メカニズムの解明に大きく貢献した。

共同研究者

角田 和之（慶應義塾大学医学部皮膚科・  
総合医科学研究センター特別研究助手）  
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

PV モデルマウスより作製した抗 Dsg3 mAb を用いて天疱瘡自己抗体の解析を行う。

B. 研究方法

本研究期間において大きく以下の項目についての研究を遂行した。

a) 免疫脾細胞移植で作製した PV モデルマウスより単離した mAb の解析

PV モデルマウス脾細胞を用いて細胞融合し、抗 Dsg3 IgG mAb（AK mAb）を複数単離した。それらの病原性を新生マウスへの受動免疫、および成体マウスでの腹水形成法にて確認した。さらに mAb の認識するエピトープを Dsg1/Dsg3 キメラ

分子を用いて解析した。

b) 未免疫脾細胞移植で作製した PV モデルマウスより単離した mAb の解析

従来は Dsg3 ノックアウトマウスを Dsg3 蛋白にて免疫し、その脾細胞を免疫不全マウスに移植し PV モデルマウスを作製したが、未免疫のナイーブな脾細胞を移植することによっても PV モデルマウスの作製が可能であることを見いだした。そこでこの PV モデルマウスより、AK mAb と同様の手法で抗 Dsg3 IgG mAb（NAK mAb）を複数単離し解析を行った。

c) AK mAb の結合カイネティクスの解析

mAb のエピトープ以外に病原性に関与する因子を解析するために、表面プラズモンセンサー・Biacore 2000（Biacore 社）を用いて各 AK mAb をリガンドとして固定化し、そこに Dsg3 蛋白を反応させ結合カイネティクスの解析を行った。

C. 結果と考察

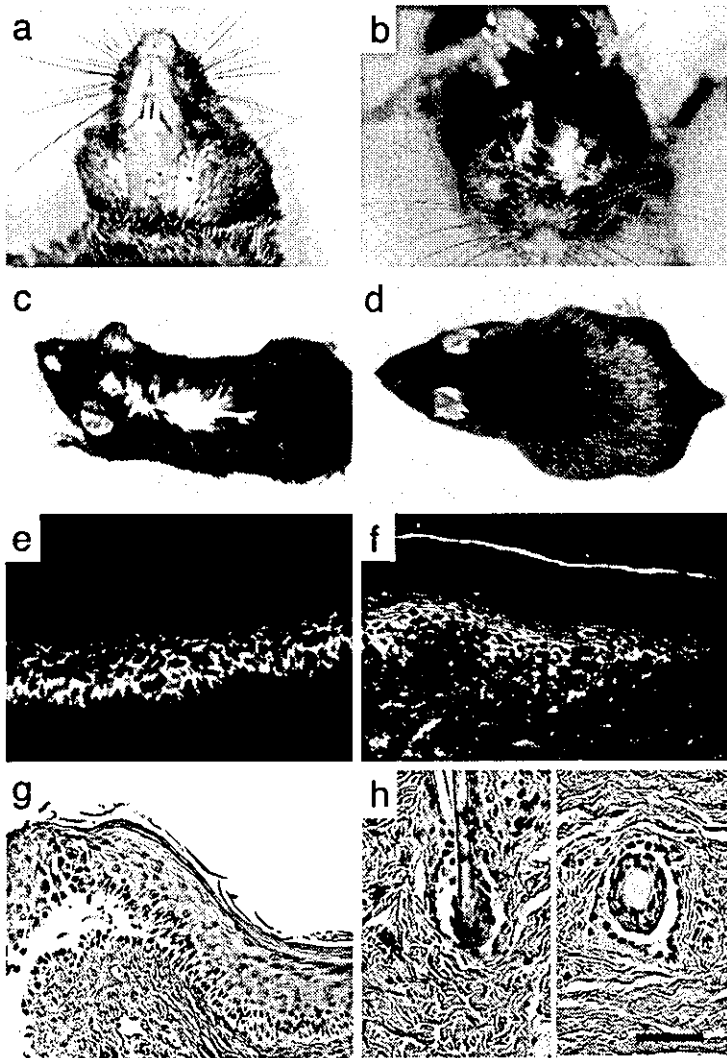


図1. 成体マウスを用いたハイブリドーマの腹腔内接種による病原性の確認。

AK23 ハイブリドーマを接種したマウスでは、口周囲(a)、眼周囲(b)、背部(c)の被毛の脱毛が認められた。AK19 ハイブリドーマを接種したマウスでは明らかな表現型は認められなかった(d)。直接蛍光抗体法では AK23(e)、AK19(f)ともに細胞表面への抗体の沈着が認められた。AK23 を接種したマウスの口蓋(g)では基底層直上および毛根周囲の角化細胞(h)における裂隙の形成が認められた。

Bar=50  $\mu$  m

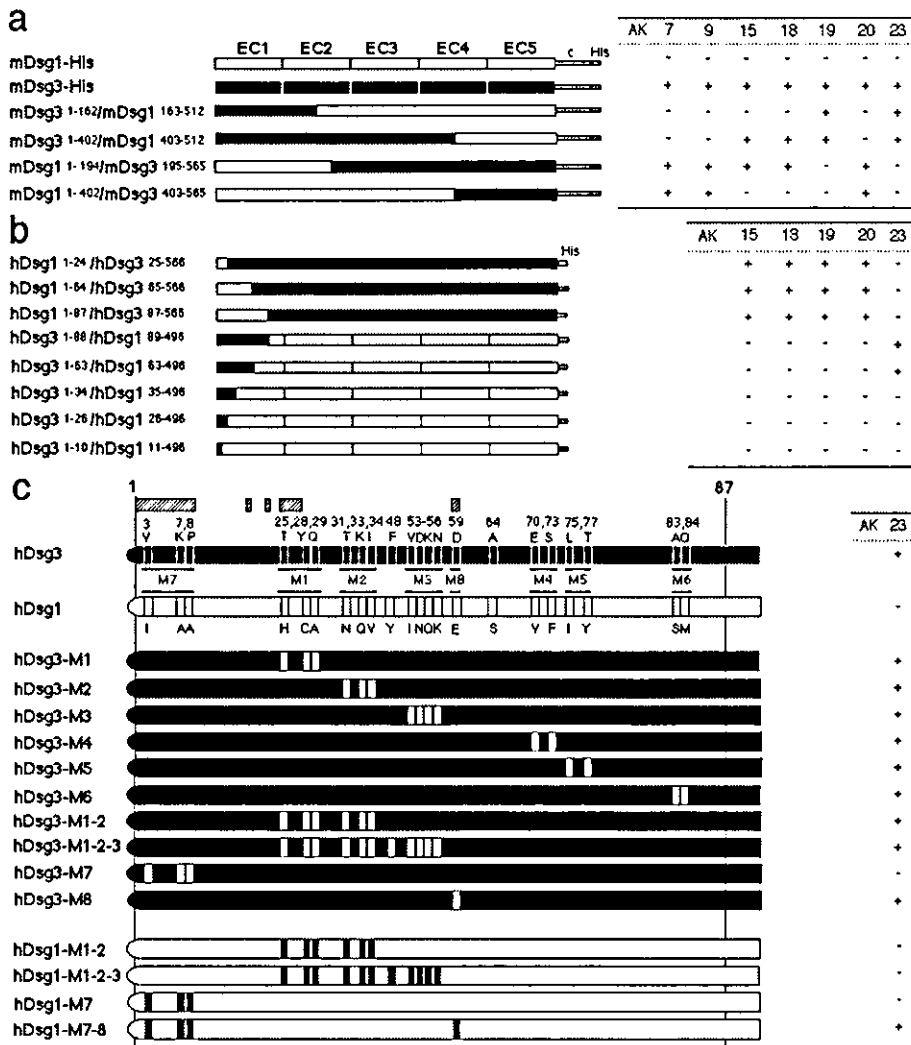


図2. エピトープ解析に用いたキメラ分子の構造模式図と AK mAb の反応性

右側パネルに各 mAb のキメラ分子に対する反応性を示す。病原性を有する AK23 mAb は Dsg3 の細胞外領域のアミノ末端側を認識し(b,c)、点変異蛋白を用いた解析では AK23 のエピトープは Dsg3 特異的なアミノ酸 V3、K7、P8、D59 であり、そのアミノ酸は Cカドヘリンのトリプトファンのドナーである接着面を構成するアミノ酸、E1-P8、P20、K23、T25、S26、D27、D59 と一致する所見であった(c)。