

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590407

研究課題名(和文) ライソゾーム病における自己抗体産生機序の解明

研究課題名(英文) Study on mechanisms of autoantibody production in the pathophysiology of lysosomal storage disorders

研究代表者

山中 正二 (YAMANAKA SHOJI)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80264604

研究成果の概要(和文)：サンドホフ病(SD)のモデルマウスの自己抗体の産生機序を解明するために胸腺の形態、リンパ球亜集団比、遺伝子発現等を検討した。SDマウス胸腺では、末期の著明な萎縮、未熟T細胞の減少、CD4+T細胞の増加、アポトーシスの増加、T細胞への抗体の沈着、CXCL13の高発現と自己抗体産生に關与するB1細胞の浸潤を認めた。CXCL13の発現、B1細胞の浸潤が抗体産生に關与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study we focused on thymic event from the point of morphology, thymic subpopulation, and gene expression to see the autoimmune mechanisms happening in Sandhoff disease (SD) mice. Thymus from SD mice greater than 15weeks of age showed marked decrease in the percentage of immature T cells and significantly increased CD4+ T cells. During the involution, apoptotic thymic cells and IgG deposition to T cells were increased. CXCL13, one of these genes, was expressed specifically in the thymus, and B1 cells were increased in the thymus. These results suggest that in SD mice it may convert the usually poorly immunogenic thymus into an organ prone to induce autoimmunity, including chemotaxis of B1 cells toward CXCL13.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ライソゾーム病

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾームには数多くのライソゾーム酵素が存在し、複合糖脂質や脂質などの細胞基質を分解する。ライソゾーム蓄積病とはライソゾーム酵素やその活性化因子及び安定化タンパク質等の遺伝的異常、欠損により基質が分解されずライソゾーム内に蓄積する病気である。その中の1つであるスフィンゴリピドーシスの多くは酵素の先天的欠損によ

り、スフィンゴ脂質が主に脳の神経細胞のライソゾームに多く蓄積し、重篤な神経症状を含む様々な症状を呈する。

ガングリオシドはシアル酸を分子内に含む糖脂質の総称であり、シグナル伝達の制御や細胞間の接着など非常に多彩な機能を担っている。ガングリオシドはその役割を終えた後、エンドサイトーシスによりライソゾーム運ばれ、ライソゾーム酵素により代謝される。

GM2 ガングリオシドーシスの一つサンドホフ病(SD)はライソゾーム酵素 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼを構成するHEXB遺伝子の欠損により、その基質であるGM2が主に中枢、末梢神経細胞に蓄積し重篤な神経症状を呈する疾患である。

SDに対する治療法は未だ確立されておらず、発症に伴う合併症に対する治療が中心となる。現在、酵素補充療法、細胞療法、遺伝子治療、基質抑制療法などが基礎研究として進められている。Hexb遺伝子のノックアウトマウス(Hexb<sup>-/-</sup>マウス)が1995年に山中らによって作製され、ヒトSD乳児型同様の病態を呈することから、SDの病態解明および治療法の開発のための有用なモデル動物として使用されている。

ライソゾーム病における病態の発症メカニズムは、神経細胞に糖脂質が蓄積することにより発症すると考えられているが未だその詳細なメカニズムは解明されていない。近年、Hexb<sup>-/-</sup>マウスに正常マウスの骨髄移植を施した報告では、中枢神経系でのヘキソサミニダーゼ活性の上昇、またはガングリオシドの減少はみられなかったにもかかわらず、病態の改善が見られたことから必ずしも蓄積が直接症状に関与しない可能性が示唆された。2004年我々は、SDおよびHexb<sup>-/-</sup>マウスでは分解できなGM2、GA2等の基質に対する自己抗体が産生されていることを報告した。この報告で、自己抗体の役割を明らかにするため、抗原抗体反応に重要な役割をもつFc受容体 $\gamma$ 鎖(FcR $\gamma$ )遺伝子を欠損したHexb<sup>-/-</sup>マウス(Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウス)が作製された。その結果、Hexb<sup>-/-</sup>マウスに比べHexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは種々の病態の改善が見られ、血清中の抗GA2抗体価の減少も認められた。これらのことから、SDの病態の進行には、自己抗体が重要な役割を持っていることが明らかになった。

胸腺はT細胞が分化・成熟するとともに選別される器官であり、中枢性リンパ器官ともよばれる。胸腺ではまず骨髄から胸腺へ移入したリンパ球前駆細胞が皮質において、T細胞受容体を発現する

CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>double-positive(DP)T細胞へと分化し、DP T細胞は皮質において正の選択および負の選択を受ける。正の選択を受けた細胞はさらにCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>single positive(SP)細胞に分化する。一方、約95%の自己反応性T細胞には負の選択によりアポトーシスが誘導され、マクロファージによって速やかに貪食・処理される等の様々な選択をうけ、外来抗原を認識する3-5%の成熟T細胞だけのレパトアが形成される。胸腺の異常がいくつかのライソゾーム病モデル動物において見いだされており、胸腺T細胞の異常がGM1ガングリオシドーシス等で報告されている。

更に、Hexb<sup>-/-</sup>マウスにおいても、iNKT細胞の胸腺における分化異常が報告されている。本研究では、SDにおいて胸腺の異常が自己抗体産生に重要な役割を持っていると示唆されることから、胸腺の異常と自己抗体産生との関連について詳細に検討した。

## 2. 研究の目的

現在までに我々はSDの病態の促進には末梢で産生された蓄積物に対する自己抗体が関与することを見いだしたが、その産生メカニズムは未だに不明である。

中枢神経系では、一般的に免疫的にトレランスであり、自己抗体の産生は末梢臓器で産生されていることが示唆される。そこで我々はHexb<sup>-/-</sup>マウスの全身臓器を検索した結果、病態の進行、自己抗体の産生に合わせて免疫組織である胸腺が萎縮するなどの異常があることを見出し、胸腺の異常が免疫機能の破綻を招き、結果的に自己抗体の産生に繋がったと想定した。

本研究では免疫臓器胸腺に焦点を絞り、SDにおける自己抗体産生メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)マウスと検体：全てのマウスはspecific pathogen-free (SPF)条件下で飼育した。神戸こども病院で解剖された11ヶ月のSD患児の胸腺HE染色スライドはDr. H. Itoh. から拝借した。

(2)形態を主体とした解析

●胸腺の形態変化はHE染色、電子顕微鏡にて観察した。

●T、B、胸腺上皮細胞、その他樹状細胞、組織球などの分布を免疫染色法にて解析した。

●アポトーシス細胞の特定はTUNNEL法にて解析した。

●CXCL-13の発現局在は免疫染色法にて解析した。

●T細胞、B細胞の定量はフローサイトメトリー(FACS)法にて解析した。

●胸腺から特定の細胞群の分離は細胞磁気分離システムを用いて行った。

(3)遺伝子解析

●胸腺発現遺伝子の網羅的解析はマイクロアレイ法にて行った。

●各遺伝子発現量の定量はReal-time RT-PCR法にて行った。

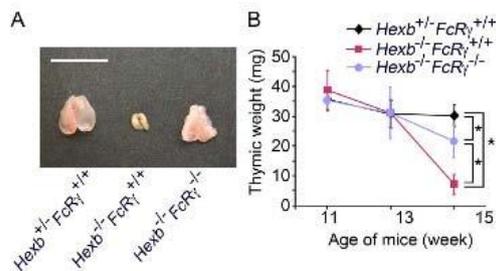
## 4. 研究成果

### (1)Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける進行性の胸腺の異常

Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの自己抗体産生時期である15週齢における免疫臓器を評価したところ、胸腺が著しく萎縮していることが確認された(図1A)。次に胸腺の萎縮が起きる

時期を確認するために、胸腺重量を経時的に評価した結果、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは、13 週齢以降に見られる自己抗体価の上昇に合わせるように胸腺の萎縮が確認でき、15 週齢の時点において重量が Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>に比べて 24.2%程度になるまで萎縮していた(図 1B)。一方、15 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいても退縮は見られたが、退縮の程度は非常に緩やかであった。

図 1. Hexb<sup>-/-</sup>, FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける進行



性的胸腺の異常

(A) 15 週齢における各遺伝子型マウスの胸腺のマクロ写真 Scale bar, 1 cm. (B) 各遺伝子型マウスマウスの各週齢における胸腺の重量。(mean ± S.D.; n = 3-14). \*P < 0.01

(2)Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける胸腺の蓄積物の解明

中枢神経系で見られる GM2, GA2 等の蓄積が Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺においても見られるかどうかを確認するために、15 週齢の胸腺における総糖脂質を薄層クロマトグラフィ法により確認した。15 週齢の Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは GM2, GA2, Gb4 は検出限界以下であったが、同週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>, Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは GM2, GA2, Gb4 等の蓄積が確認された。

(3)Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウス胸腺における形態学的異常

萎縮した 15 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺に形態学的変化を組織学的解析で確認した。15 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは、髄質における細胞密度にあきらかな変化は認められなかったが、皮質において細胞密度が著しく減少し、多数の膨化したマクロファージ様細胞が皮質に局在していることが明らかになった(図 2)。これらのマクロファージ様細胞はアポトーシスを起こした T 細胞に由来すると思われる Hematoxylin 陽性の核の断片を細胞質に含んでいた。また、軽度の退縮が起きている 15 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいては、皮質部分の細胞密度は Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスと明らかな差が見られなかったが、膨化して核の断片を含んだマクロファージ様細胞が確認された。

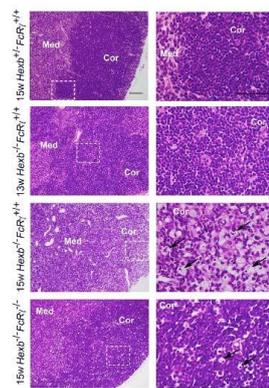


図 2.Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウス胸腺における形態学的異常

15 週齢各遺伝子型マウスおよび 13 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺の HE 染色像。Cor,皮質, Med, 髄質。 Scale bars, 左:100  $\mu$ m, 右: 50  $\mu$ m。

(4)Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける T 細胞集団の変化

組織学的検討の結果、皮質において顕著な T 細胞の脱落が示唆されたことから、15 週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウス胸腺における T 細胞の総細胞数および亜集団に変化が起きているかどうかを Flow cytometry 法で解析した。その結果、皮質に存在する DPT 細胞の割合が顕著に減少し、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>細胞および CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>細胞がいずれも相対的に増加していることが明らかになった(図 3.A)。一方、15 週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>とほぼ同じ集団を持っていた。次に、15 週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおける各亜集団の絶対数を求めたところ、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>, DPT 細胞いずれの亜集団も減少していた(図 3.B)。

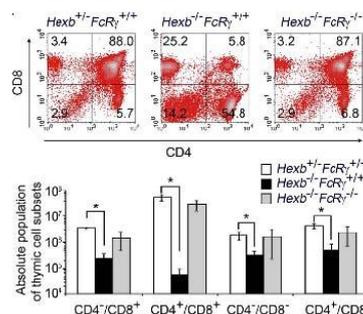


図 3.Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける進行性の胸腺の異常

各遺伝子型マウスの CD4, CD8 染色による胸腺亜集団の割合(A)と細胞数(B)。(mean ± S.D.; n = 3-4). \*P < 0.05.

(5)ヒト SD における形態学的異常

Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける形態学的異

常がヒト SD(11 か月)においてもみられるかどうかを確認した。その結果、Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウス同様、皮質における細胞密度が著しく減少しており、皮髄境界部が不明瞭であった(図 4)。さらに、膨化した細胞質をもつマクロファージ様細胞が多数確認された。

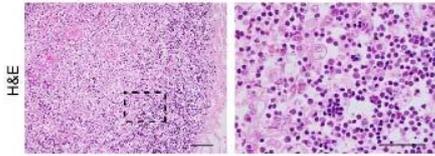


図 4. ヒト SD における形態学的異常  
11 か月のヒト SD 患者の HE 染色。Scale bars, 左, 100  $\mu$ m, 右, 50  $\mu$ m。

### (6) 腫大化したマクロファージ

分解できない基質の蓄積によると思われるマクロファージ/ミクログリアの膨化は他のライソゾーム病で確認されている。HE 染色で確認された 15 週齢の Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+胸腺組織の膨化した細胞がマクロファージであるかどうかを Iba-1 染色により確認した。その結果、膨化した細胞はほぼすべて Iba-1 陽性であり、また、ヘマトキシリン陽性の断片が細胞質内に確認された(図 5)。一方、15 週齢の Hexb-/-FcR $\gamma$ -/-胸腺では Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウスよりも明らかに Iba1 陽性細胞が少ないことが確認された。さらに、腫大化したマクロファージに糖脂質が蓄積しているかどうか糖を染色する Periodic acid-Schiff (PAS) 染色法にて確認した。15 週齢の Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+, Hexb-/-FcR $\gamma$ -/-マウスの腫大化した胸腺マクロファージは PAS 反応陽性であることから、膨張した Iba1 陽性細胞内には GM2 等の糖脂質が蓄積していることが示唆された(図 5)。

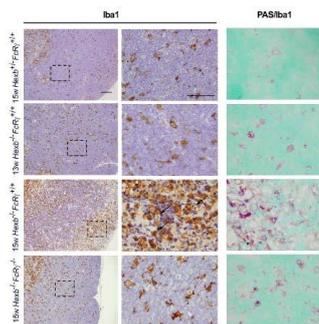


図 5. 腫大化したマクロファージの増加および浸潤

15 週齢各遺伝子型マウス, 13 週齢 Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウスの胸腺の Iba1 染色によるマクロファージの特定。Scale bars, 左:100  $\mu$ m, 右: 50  $\mu$ m. Iba-1 染色と PAS 反応の 2 重染色。Iba-1; DAB(茶), PAS(マゼンタ)。Scale bar: 50  $\mu$ m。

### (7) 胸腺へのマクロファージの浸潤

マクロファージの割合が実際に増加しているかどうかを確認するため、Flow cytometry で Iba-1 陽性の細胞比を計測した。その結果、15 週齢における Hexb+/+FcR $\gamma$ +/+, Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+, Hexb-/-FcR $\gamma$ -/- マウスの胸腺はそれぞれ  $0.93 \pm 0.38$ ,  $4.36 \pm 0.66$ ,  $1.48 \pm 0.25\%$  と Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+ マウスにおいて優位に増加している事が確認された(図 6. A)。

胸腺におけるマクロファージの浸潤に Mip-1 $\alpha$  が関与していることが示唆されることから、胸腺における Mip-1 $\alpha$  mRNA を Real-Time PCR 法にて定量した。その結果、Hexb+/+FcR $\gamma$ +/+ マウスと比較して Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+, の胸腺では 24.6 倍増加していた。一方、Hexb-/-FcR $\gamma$ -/-マウスは Hexb+/+FcR $\gamma$ +/+マウスと比較して 2.69 倍の増加であった(図 6. B)。

これらのことから、Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウスにおけるマクロファージの増加は、Mip-1 $\alpha$  により遊走され浸潤していることが示唆された。

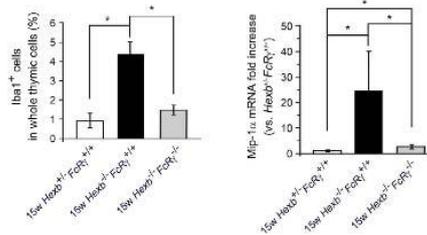


図 6. 肥大化したマクロファージの増加および浸潤

(A) 15 週齢各遺伝子型マウスにおける胸腺マクロファージの定量。(n = 4). \*p<0.01.

(B) 15 週齢各遺伝子型マウス胸腺におけるマクロファージ遊走ケモカイン Mip-1 $\alpha$  mRNA 発現の Real-time RT-PCR 法による定量。(mean  $\pm$  S. D.; n = 5- 9). \*P<0.05。

### (8) Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウスにおける細胞死の増加

細胞内構造の変化を観察するために、15 週齢における Hexb+/+FcR $\gamma$ +/+マウスおよび Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウスを Transmission Electron Microscopy (TEM) を用いて評価した。15 週齢の Hexb-/-FcR $\gamma$ +/+マウスの胸腺細胞内ではアポトーシスによると思われる多数の電子密度の高い核様の断片が確認された。さらに、多数の電子密度の高い核様の断片はマクロファージの細胞質に主に局在していることが確認できた。(図 7. A)。HE 染色および TEM で確認された核様の断片を TUNEL 法を用いて解析した。その結果、核の断片は TUNEL 陽性を示し、アポトーシスによって引き起こされた核の断片であること

が確認できた(図 7. B)。

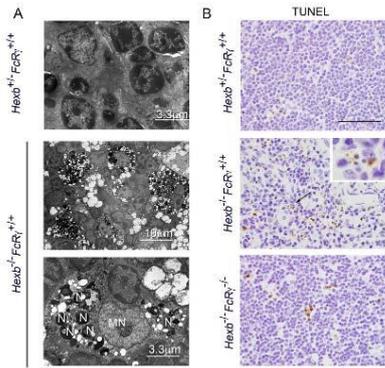


図 7. Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおける細胞死の増加

(A) 15 週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>および Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺の TEM 解析。N, nucleus particle-like structure; MN, macrophage nucleus. (B) 各遺伝子型マウス胸腺の TUNEL 染色による核の断片の検出。Scale bar, 50  $\mu$ m。

### (9) T 細胞への自己抗体の沈着

Fc 受容体のリガンドである IgG 陽性の T 細胞を FACS 法で解析したところ、Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは 0.53  $\pm$  0.20% なのに対し、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは 1.96  $\pm$  0.67% と増加しており、また、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは減少していた(図 8)。このことから、T 細胞の膜表面には GA2 等の自己抗体に対する抗原が発現しており、この抗原に自己抗体が沈着することによる IgG-Fc 受容体を介した T 細胞死が Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおいて起きていることが示唆された。

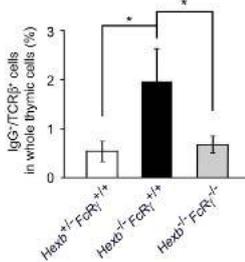


図 8. リンパ球への自己抗体の沈着

Flowcytometry 法による Alexa 488 IgG 陽性 TCR $\beta$ <sup>+</sup> 細胞 T 細胞の検出 (n = 3-5)。\*P  $\leq$  0.01。

### (10) 退縮時における Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウス胸腺の遺伝子発現の網羅的解析

Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺の異常な退縮に伴って起きた変化を網羅的に解析するため、遺伝子発現を cDNA マイクロアレイにて解析した。cDNA マイクロアレイの解析結果は Gene Expression Omnibus (GEO) database に公開されている (No. GSE19641)。Hexb<sup>-/-</sup>

FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup> マウスの胸腺では 8018 のプローブが Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスに比べ相対的に増加していた。一方 7604 プローブが相対的に減少していた。相対的に増加していた遺伝子は主に免疫反応に関係する遺伝子であり、特に Th2 サイトカインの増加が見られた。また、CD11b (Mac-1) 等のマクロファージで発現する遺伝子の増加が確認された。さらに、CD19、CXCL-13 等の B 細胞の増加、浸潤を示唆する遺伝子の増加が明らかとなった。一方で、T 細胞関連遺伝子は減少していた。マイクロアレイの結果のうち、免疫に関与すると考えられる遺伝子について、Real-time RT-PCR 法により再現性の確認を行った結果、ケモカイン CXCL-13 や IL-10 等自己抗体産生に関与すると思われる遺伝子について高発現していることが確認できた。(図 9)。

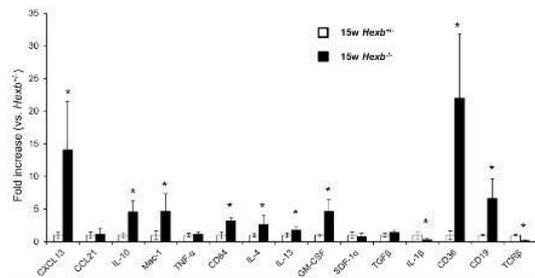


図 9. 退縮時における Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウス胸腺の遺伝子発現

15 週齢 Hexb<sup>+/+</sup>、Hexb<sup>-/-</sup>マウスの胸腺における遺伝子発現の Real-time RT-PCR による定量。(mean  $\pm$  S. D.; n = 4-11)。\*P < 0.05。

### (11) 胸腺の CXCL13 の経時的発現量変化

cDNA マイクロアレイで発現変化が見られた遺伝子のうち、自己抗体産生との関連が報告されている CXCL13 について、さらに詳細に検討を行った。CXCL13 の発現を経時的に定量した結果、11 週齢および、13 週齢では Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスいずれも差はなかった(図 10. A)。しかし、15 週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスでは Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスに比べ 23.3 倍増加していた。次に、異常な CXCL13 の発現上昇が胸腺特異的であるかを確認するため、他のリンパ臓器であるリンパ節および脾臓で確認した。その結果、CXCL13 の発現上昇はいずれの臓器でも認められなかった(図 10. B)。

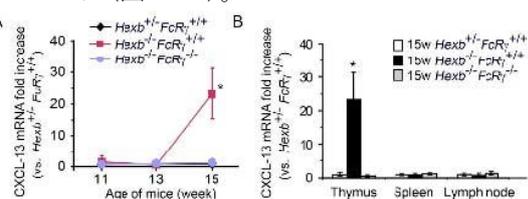


図 10. Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺における異所性の CXCL13 の増加

(A)各週齢における各遺伝子型マウス胸腺の CXCL13 mRNA の real-time RT-PCR による経時的定量。(mean ± S.D.; n=3-8)。\*P < 0.05。  
 (B) 15 週齢各遺伝子型マウスの胸腺、脾臓、リンパ節 における CXCL13 mRNA の定量。(mean ± S.D.; n = 4-8)。\*P < 0.05。

**(12)胸腺における CXCL13 の発現細胞の特定**  
 CXCL13 の産生細胞を同定するため、胸腺における局在を免疫染色で確認したところ、皮質のマクロファージと思われる膨化した細胞の細胞質にもびまん性に発現していることが明らかとなった。さらに CXCL13 を特定するために、細胞磁気分離システムを用いて 15 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウス胸腺の CD11b 陽性細胞を分離し、CXCL13 細胞の発現を定量したところ、CD11b 陰性細胞に比べ 60 倍以上発現していたことから、CXCL13 は主に CD11b 陽性のマクロファージによって産生されていることが確認された(図 11)。

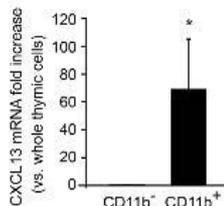


図 11. Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺における CXCL13 の発現細胞の特定  
 15 週齢 Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺における CXCL13 産生細胞の同定。(mean ± S.D.; n = 4)。\*P < 0.05。

**(13)胸腺における B1, B2 細胞の増加**  
 SLE 等の自己免疫疾患では、病変部で異所性の B 細胞遊走性ケモカイン CXCL13 が発現することにより B 細胞が遊走されることが報告されている。さらにこれらの B 細胞のサブポピュレーションは自己抗体産生性 B1 細胞であることが知られている。Flow cytometry により B 細胞のサブポピュレーションの解析を行った。15 週齢の Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスにおいて B1, B2 細胞ともに増加していることが明らかとなった(図 12)。一方、Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは B1, B2 細胞の増加は確認できなかった。

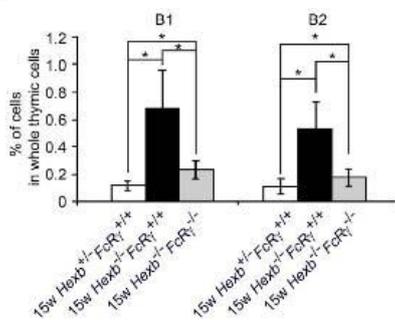


図 12. Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>マウスの胸腺における B1 および B2 細胞の増加  
 15 週齢 Hexb<sup>+/+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>, Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>+/+</sup>,

Hexb<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウス胸腺における CD5/B220/CD19 染色による B 細胞亜集団の検出および定量。(mean ± S.D.; n = 6-9)。\*P < 0.01。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, Yamanaka S: Thymic alterations in GM2 gangliosidosis model mouse. PLoS One 2010, 5(8): pii: e12105.
- ② Sango K, Yamanaka S, Ajiki K, Arai N, Takano M. Involvement of retinal neurons and pigment epithelial cells in a murine model of sandhoff disease. Ophthalmic Res. 2008;40(5):241-8, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

- ①神崎誠一, 山口章, 山口佳代子, 小島良績, 鈴木京子, 高井俊行, 青木一郎, 山中正二. GM2 ガングリオシドーシスにおける末梢免疫システムの異常. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜(横浜)
- ②幸光範子, 神崎誠一, 山口章, 山中正二, 青木一郎: サンドホフ病モデルマウスを用いた網羅的サイトカインの解析. 第 97 回日本病理学会総会, 2008 年 5 月 16 日, 全日空ホテル金沢(金沢)

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~byori2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山中 正二 (YAMANAKA SHOJI)  
 横浜市立大学・附属病院・准教授  
 研究者番号: 80264604

### (2)研究分担者

山口 章 (YAMAGUCHI AKIRA)  
 横浜市立大学・医学研究科・客員研究員  
 研究者番号: 20381585

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: