

脳梁欠損マウスの免疫系

-神経と免疫の接点を探る研究戦略の一例-

田原淳輔, 荒舘忠, 片桐達雄

1. 概要

脳神経系に生じた器質的あるいは機能的障害により免疫抑制や免疫力低下が認められる事例は臨床の場では古くから報告がある。これらの現象論に基づき神経系と免疫系が相互に影響し合っていることは多くの研究者が広く認めるところである。しかし、その科学的なメカニズムについてはほとんど不明であった。近年ようやく、基礎生物学の進展により、そのメカニズムに関する研究が報告されるようになってきた。このような背景の下、我々は、神経系と免疫系のクロストークを解明する糸口として、脳梁欠損マウスの免疫系を正常マウスと比較解析することで脳梁形成に関わる神経領域の発生不全、もしくは脳の器質的異常が、免疫システムに何らかの影響を及ぼすか否かを検討した。

脳梁欠損マウスと正常マウスの免疫担当臓器である胸腺と脾臓を材料とし、それらの形態学的比較、これら臓器に由来する細胞の集団構成パターン、各細胞集団の反応性そして発現タンパク質の網羅的解析を行った。この結果、脾臓・胸腺において、形態変化、総細胞数、リンパ球亜集団（T細胞/B細胞バランス および CD4/CD8 バランス）について有意差は認められなかった。この結果は、脳梁形成に関わる因子、もしくは脳梁未形成状態は、脾臓・胸腺に器質的な影響を与えないものと考えられた。ところが、興味深いことに、一見正常な免疫臓器の形状とは異なり、各臓器を形成する個々の細胞の反応性に関しては差異が認められた。すなわち、胸腺または脾臓より比重分離した各臓器由来の大リンパ球と小リンパ球を過酸化バナジウム酸（Pervanadate）で刺激して得られるタンパク質のチロシンリン酸化パターンは脳梁欠損マウスと正常マウスで大きく異なることが明らかとなったのである。2008年11月の文献検索では、脳梁欠損マウスにおいて免疫不全が併発するとの報告は見あたらない。したがって、今回得られた結果より、脳梁欠損マウスのリンパ球は、抗原受容体からのシグナル伝達システムに異常を持つ可能性が高く、詳細に検討すれば、最終的な生体防御反応に何らかの影響がある可能性が強く示唆された。

さらに、我々は、脳梁欠損マウスのリンパ球に発現するタンパク質の網羅的解析を行って、正常マウスと異なる複数のスポットを確認した。これらのスポットは、このシグナル伝達に影響を及ぼすタンパク質もしくは、シグナル異常の影響を受けたタンパク質である可能性が高い。

2. 背景

中枢神経系・末梢神経系の物理的な傷害や精神的なストレスと免疫応答には密接な関わりがあることは、

古くから経験的な臨床像として知られてきた。交通事故による大脳損傷後に免疫力が低下して感染症に弱くなる事例や精神的なストレスが感染症を増悪させた事例など身近な例については枚挙にいとまがない。しかし、これらの事例について科学的な解析が加わったのはつい近年のことである¹⁾。

現在報告されているメカニズムの一例は、内分泌システムを仲介とする神経と免疫系の相互作用である。ストレスが加わると脳の視床下部からCRH (corticotropin-releasing hormone) が分泌され、それが脳下垂体からACTH (adrenocorticotrophic hormone) を分泌させ、これがT細胞の機能を抑制する。また脳下垂体からプロラクチンが放出されてT細胞、B細胞、NK細胞の機能を抑制する事が報告されている(1-2)。またACTHは副腎皮質を刺激して、ステロイド(副腎皮質ホルモン)を分泌させる。これは、リンパ球減少、胸腺萎縮、脾臓におけるNK細胞機能抑制など種々の局面に置いて免疫を抑制する(2)。これら内分泌を介する免疫系への精神ストレスの影響だけでなく、神経系の基質的な障害が免疫機能に及ぼす効果についてもまた、近年報告が蓄積し始めた。やはり臨床医学の場で、脳外傷や脳外科手術後に免疫抑制や感染症の増加が見られる事が報告されている^{1, 3)}。

一方、逆に免疫系の異常が神経系に向かったために病態を引き起こしていると考えられる事例については多く報告がある^{1, 3)}。自己免疫疾患による神経傷害の例としては、シェーグレン症候群において、脳に炎症を起こした際に脳梁部の破壊が認められることが最近確認された^{1, 3)}。また、神経系・免疫系の関与する行動障害として、リウマチ性の緊張がある状態で小脳・脳梁が不安定となった場合、免疫系が昂進し、代謝系が減退、アトピー性皮膚炎や花粉症が起こる例、免疫系機能障害により行動が攻撃的になる等、行動障害が起こるとの報告もでている³⁾。

このように、神経と免疫を結ぶ機構が生理学レベルで徐々に解明されると同時に分子生物学的なアプローチも報告されるようになってきた。例えば、シグナル分子であるNotchタンパク質に異常が生じると、脳神経系において遺伝的アルツハイマー病の原因となると同時に免疫系ではリンパ球分化に影響することが報告されている⁶⁾。また、同様にシグナル分子であるSrcファミリーキナーゼの一つとして免疫系のシグナル伝達に重要なFynに異常があった場合には情動障害として恐怖反応が亢進すること等が報告された⁶⁾。これらの報告に見られるように、神経系と免疫系とのクロストークを分子のレベルで明らかにすることは、神経-免疫の連携から生じる病態を理解するだけでなく、神経難病や自己免疫疾患のあらたな対策の糸口が発見される可能性につながるものである。

今回、我々は脳梁欠損マウス⁸⁻¹⁰⁾を材料として、脳梁欠損に起因する免疫系の影響の有無について一連の解析を行った。このマウスは、ヒト脳梁欠損のモデルマウスとして非常に有用であると思われる。脳梁は、文字通り左右の大脳半球を結ぶ神経の架け橋である。解剖学的にも明瞭なこの構造は、機能的にも重要な働きを担うと考えられている。脳梁は前側が知的機能に関するもの、後ろが小脳関係、真ん中が意識などに関する伝達をしていると考えられており、欠損すればそれぞれの機能が失われるとされている。例として、脳梁が損傷を受け左右の連絡が無くなると、右手と左手の動きが一致しなくなるエイリアンハンド症候群を発症することなどが知られている。また、脳梁を完全に切断すると、左手失書、片側失行、拮抗失行などの症状が観察される。ところが、これら後天的な脳梁の機能不全に対して、先天的脳梁欠損による直接的な障害は不明な点が多い。ヒトの先天性疾患である先天性脳梁形成不全症の患者(Agenesis of the corpus

callosum :ACC) と健常者で臨床像を比較しても大きな差異は認められないとする報告も多数ある¹⁰⁾。このため、他の脳検査で偶然に脳梁欠損が見つかった例、病理解剖時の脳所見等で初めて脳梁欠損が確認された例も多く、言動や発達に大きな異常が見られない潜在的な脳梁欠損者は相当な人数に上るのではないかと考えられている。一方、少なくとも実験マウスでは、大脳新皮質の正常な発達に脳梁軸索が必要とされており¹³⁾、ヒトで先天的に脳梁が欠損しても多くの患者において、一見、大脳新皮質の発達に影響がない理由は現在のところ不明である。最近になってヒトにおける先天性脳梁欠損症に関して興味深い報告がなされている。注意欠陥多動性障害 (ADHD : attention-deficit hyperactivity disorder) 児において脳梁欠損の割合が多いことが報告されたのである。ADHD では、注意力や落ち着きが著しく欠落する。この精神障害の原因は、神経系障害によるのではないかと疑われていたが、正常児と ADHD 児の比較を検証したところ、ADHD 児では脳梁欠損の割合が多いことが分かり、先天的な脳梁欠損が原因の一つとであろうと考えられはじめた^{14, 15)}。

現在までのところ、脳梁の先天的な欠損に伴う免疫機能への影響については一切報告がない。これを持って脳梁形成と免疫系への影響をなしとするのは早計である。ヒトでは脳梁欠損症や脳梁形成不全の小児は脳梁欠損だけでなく他の合併症を併発する事例が多く、重度の畸形や合併症がある場合には長期の生存は難しい。また、モデルマウスに置いては、実験動物として最初からクリーン環境にあるため感染源に対する強弱が不明である場合が多いからである。実際、今回の研究により、脳梁欠損マウスでは、免疫細胞の発生については一見正常であるが個々の細胞内でのシグナル伝達に異常が認められることが初めて明らかとなった。

3. 材料と方法

マウス

脳梁欠損マウス⁸⁻¹⁰⁾ Ln/J は富山医科薬科大学・尾崎宏基教授より供与されたものを使用した。正常対照群として BALB/c (♀) マウス 9-10 週齢を日本エスエルシー (静岡) から購入したものを実験に使用した。これらマウスは、実験に供する免疫担当細胞等を調製後、ホルマリン固定脳切片より Ln/J において脳梁が完全に欠損していること、また、BALB/c において脳梁の形成が正常であることを確認した。

免疫担当細胞の調製

BALB/c マウス及び Ln/J マウスより、脾臓と胸腺を摘出し、速やかに氷冷 PBS 中でピンセットおよびスライドグラスを用いてホモジネートし、細胞懸濁液とした。この懸濁液を、セルストレーナー (Falcon 35-2235) を透過することにより組織破片等を除去し、シングルセルサスペンションとした。1,500rpm 5 分間遠心後、沈殿した細胞を PBS で 2 回洗浄して、赤血球溶解用緩衝液 10mL (0.75% NH₄Cl, 0.17M Tris-HCl : Wako Purechemicaol Industrial, Ltcl., OSAKA, JAPAN) にて溶血処理した。残存したリンパ球を 1 × 10⁷ cells / mL に調製した。

細胞表面マーカーの解析

BALB/c マウス及び Ln/J マウスの脾細胞と胸腺細胞を 50 μL (5 × 10⁵ cells) ずつ各 2 本ラウンドチューブに分注し、細胞表面を [1] 抗 Thy1-PE 抗体 × 1,000 50 μL / 抗 B220 抗体 × 2,000 50 μL [2] 抗 CD4-PE 抗体 × 500 50 μL / 抗 CD8-FITC 抗体 × 2000 50 μL (各抗体は本学医学部免疫学教室村口篤教授より恵与) を加えて 20 分間インキュベートした。次にリンパ球を 2 度洗浄してから、フローサイトメトリー (FACS

Caliber, Becton-Dickinson and Company. NJ. USA) で解析した。死細胞をゲートアウトし、ゲート内の細胞が 10,000 カウントに達するまで測定して、正常および脳梁欠損マウス由来リンパ球の細胞集団を比較した¹⁶⁾。

リンパ球の比重分離

細胞内シグナル伝達の違いを検討するため、脾リンパ球・胸腺リンパ球をシグナルレスポンスが異なるとされる 2 群に分離した。すなわち、比重分離により、細胞比重の小さい単球/ブラスト化リンパ球と、細胞比重の高い小リンパ球・ナイーブ細胞の分離である。試験管に Percol (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO. USA) 濃度勾配 (下層: 70% Percol 溶液 2.5mL / 上層: 60% Percol 溶液 2.5mL) を作製し、ゆっくりと正常・脳梁欠損それぞれの脾臓・胸腺細胞浮遊液を重層した。4℃, 20 分間遠心して Percol 濃度の異なる 2 つの境界面にリンパ球を分離した。上層 (Fr. 1) には単球やブラスト化した細胞が、下層 (Fr. 2) には小リンパ球・ナイーブ細胞が分離された。それぞれの層から細胞を回収し、Percol を除去するため、PBS で 2 回洗浄を行った。

細胞の刺激と調製

比重分離したリンパ球は、 1×10^6 cells / mL に調製してからエッペンドルフチューブに 1mL ずつ各 2 本に分注した。各細胞は、無刺激あるいは、Pervanadate (5% H₂O₂: 健栄製薬, 日本, 0.5mM Na₃VO₄: SIGMA) 100 μL を加えて 1 分間刺激した。冷却した PBS-VE で刺激を停止し、3000rpm 30 秒遠心してからペレットを TNE (NaCl 150mM, Tris (pH8.0) 10mM, NP-40 1%, EDTA 1mM, Na₃VO₄ 2mM, Aprotinin 0.2 μg/mL, Leupeptin 2 μg/mL) で溶解させた。氷上で 30 分静置後、15,000rpm, 3 分で遠心して得られた上清を細胞溶解液とした。

チロシンリン酸化シグナルの解析

細胞溶解液 50 μL を SDS-PAGE サンプルバッファー (DW 4.0ml, 0.5M Tris-HCl pH6.8 1.0ml, Glycerol 0.8ml, 10% SDS 1.6ml, 2-β Mercaptoethanol 0.4ml, 0.05% (w/v) Bromophenol Blue 0.2ml) 50 μL と混和し 98℃ で 5 分間加熱した。10% アクリルアミドゲルのウェルに混和液を 15 μL ずつアプライして 20mA/枚・60 分間 SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 展開後、アクリルアミドゲルを Western Blotting トランスバッファー (25mM Tris, 192 mM Glycine, 20% メタノール) で 20 分間平衡化した後、ミニタンクブロット装置 (BioRad. Laboratories, CA. USA. ミニプロテイン III) にセットして、90V・180 分間ブロッキングを行った。タンパクが転写されたメンブレンを 5% BSA (SIGMA) 溶液にて、Over Night ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を取り除いたのち、メンブレンを TTBS 5 分×2回・TBS 5 分×2回で洗浄し、一次抗体として α-PY 抗体 (4G10-Biotin または PY100) を加えて一晩インキュベートした。メンブレンを TTBS 5 分×2回・TBS 5 分×2回で洗浄後、一次抗体の検出は、ECL またはアルカリホスファターゼによる酵素発色のいずれか、または双方で行った。ECL 発色は、二次抗体: 抗 Mouse-HRP (anti-Mouse IgG-HRP x1/5,000 Santa Cruze SC-2005) または、Avidin-HRP を加えて 50 分間インキュベート後、メンブレンを TTBS 5 分×2回・TBS 5 分×2回で洗浄し、ECL 反応液 (アマシャム) を加えて室温で 5 分反応させた後、X 線フィルム上に発色させた。一方、アルカリホスファターゼによる酵素発色は、Goat- 抗-Mouse alkaline phosphatase (BioRad) で 50 分間インキュベートした。メンブレンを洗浄したのち、alkaline phosphatase 発色キット (BioRad) で発色させた。

脾細胞または胸腺細胞内に発現するタンパクの網羅的解析

脾細胞または胸腺細胞の 5×10^6 個を遠心沈殿として、200 μ L の 2D Lysis バッファー (9.5 M 尿素, 2% Triton X-100, 2% Ampholine (pH3.5-10), 5% 2-Mercaptoethanol) で溶解し、氷上で 30 分静置後、15,000rpm, 3 分間遠心した上清をサンプルとした。上清 13 μ L と Rehydration Buffer 117 μ L とを混和し、IPG ストリップ (pI 5-8 BioRad) にアプライして 12 時間膨潤させた。電気泳動は、BioRad の PROTEAN IEF CELL を用いた。1 次元目の泳動後、平衡化 buffer 1 をストリップ 1 本あたり約 3ml 滴下して 10 min 平衡化し、続いて平衡化 buffer 2 約 3ml で 10 min 平衡化させてから、2 次元目の泳動を行った。Buffer は、BioRad の 2D キットを用いた。二次元展開したタンパク質のスポット検出は、ゲルを銀染色キット (第一化学: 2D-銀染色・第一) で染色して乾燥させた後、スキャナーで取り込みコンピューター画像解析を行った。解析アプリケーションは BioRad の PDQuest を用いた。

二次元電気泳動に用いた試薬類、Urea, 2-Mercaptoethanol, Tris, Sodium Dodecylsulfate, Glycerol, Iodoacetamide は、和光純薬より購入した特級試薬を用いた。その他の試薬 10% Triton X-100 (Fluka), 40% Ampholyte 3/10 (BIORAD), DTT (SIGMA) をそれぞれ用いた。銀染色は、電気泳動用 2D-銀染色試薬・II 「第一」 (Daiichi Purechemicals Co., Ltd. TOKYO, JAPAN) を用いた。銀染色の試薬調製のため、メタノール、酢酸 (和光純薬) を用いた。

4. 結果

脳梁欠損マウスと正常マウスの免疫担当臓器の比較

正常マウスと脳梁欠損マウスの胸腺・脾臓を摘出し、概観と大きさを比較観察した。同週齢のマウスにおいて、胸腺は共に大きさ形状等に基質的な差異は認められなかった。脾臓についても形状や大きさに関して形態的な差異は肉眼では認められなかった。各臓器を破砕し、細胞数を計測したところ、正常マウスと脳梁欠損マウスでは有意な差は認められなかった (Data not shown)。

正常マウスと脳梁欠損マウスの脳の比較

正常マウスと脳梁欠損マウスの頭部をホルマリン固定後、全脳を摘出し、比較観察したところ、脳の外見・大きさに肉眼で検知しうる差異は認められなかった (Fig. 1)。

脳梁形成の有無を確認するためにそれぞれの脳の前額断面標本を作製した。大脳全長の約 1/2 やや後方前額断面でスライスを作成し、切断面より脳梁を確認したところ、正常マウスでは脳細胞から伸び出ている軸索線維束が中央で交連することにより脳梁を形成しているのに対し、脳梁欠損マウスでは軸索線維束が途切れ脳梁が形成されていないことが確認できた。

この方法で実験に用いたすべてのマウスについて脳梁の有無を確認した結果、用いた脳梁欠損マウスの全個体において、脳梁欠損率は 100% であり、一方、正常マウスにおいてはすべてのマウスで脳梁を確認することができた。

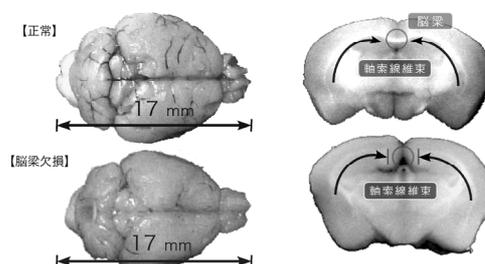
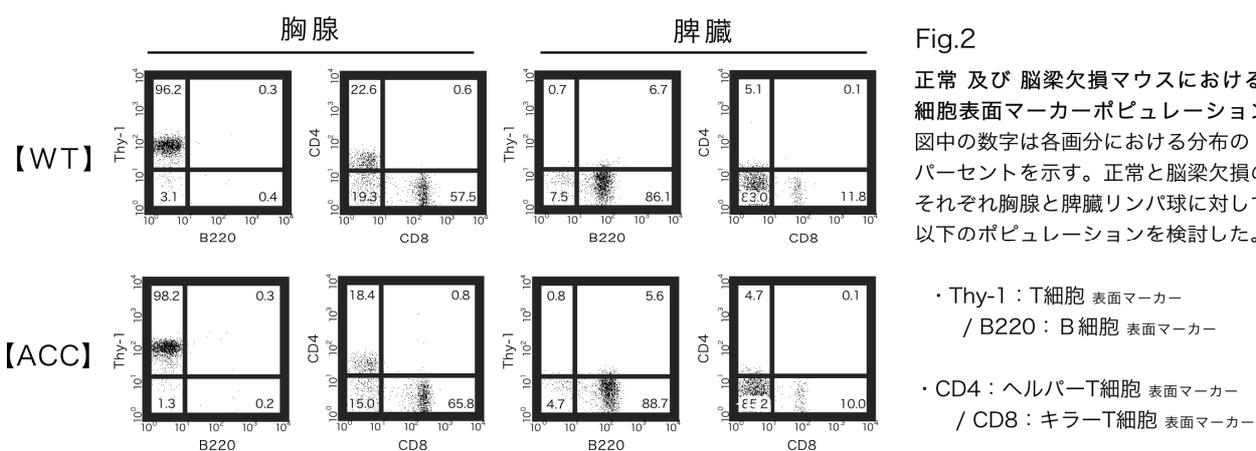


Fig. 1 正常マウスと脳梁欠損マウスの脳全体図 及び 前額断面図

細胞表面マーカー解析によるリンパ球集団構成の比較

脾臓・胸腺リンパ球表面における Thy1・B220, CD4・CD8 の発現を FACS にて解析した。この結果, 脾臓リンパ球において正常マウス・脳梁欠損マウス間で T 細胞/B 細胞比率の有意な差異は認められなかった。同様に, 胸腺細胞における CD4/CD8 比率においても有意な差は認められなかった。少なくとも, Thy1・B220 や CD4・CD8 は脳梁欠損マウスでも正常マウスと同程度発現しており, それぞれの細胞表面マーカーを持つ細胞集団の構成にほとんど差がないことが明らかとなった。



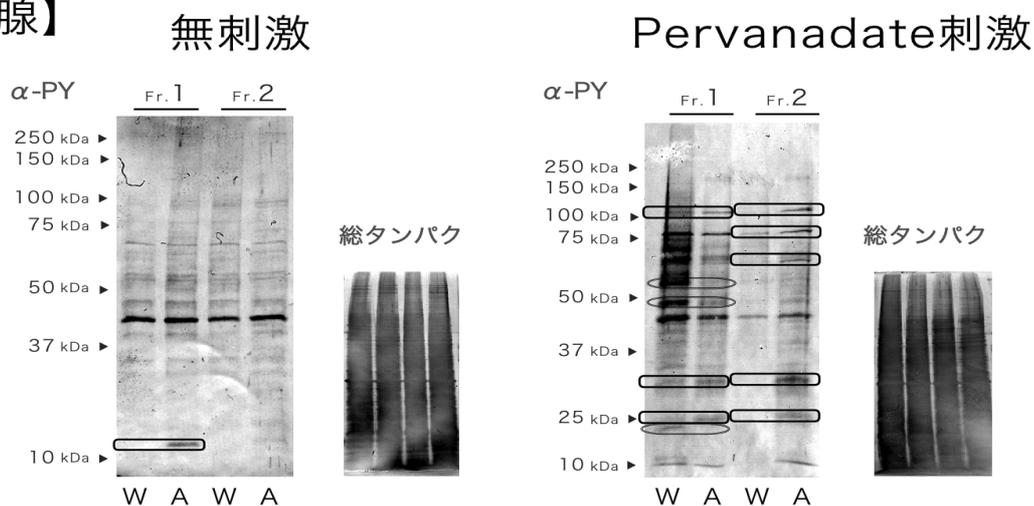
細胞内チロシンリン酸化シグナルの比較解析

上記で比較解析を行ったリンパ球細胞表面マーカーに差異が認められなかったため, 次に細胞内のシグナル伝達経路に差異が認められるか否かを検討した。細胞内チロシンリン酸化シグナルの解析に際し, リン酸化シグナルの挙動が異なるとされる小リンパ球とブラストリンパ球の2群にリンパ球を比重分離した。正常マウスと脳梁欠損マウス由来の胸腺・脾臓細胞の浮遊液を60%と70%のPercol濃度勾配層を用いて遠心分離したところ, 濃度の異なる境界面に細胞が集まり, 上層(Fr.1)に集まったブラスト細胞や単球と下層(Fr.2)に集まったナイーブ細胞や小リンパ球に分離した。回収できた細胞をカウントし, 同細胞数でサンプルを調製し, 無刺激/過酸化バナジウム(Pervanadate)刺激を行った。総タンパク質可溶化液中のチロシンリン酸化タンパク質の違いを抗リン酸化チロシン特異抗体にてウェスタンブロッティングで検討した。この結果, いずれの細胞においてもPervanadate刺激をすることにより, 細胞内タンパク質のチロシンリン酸化が誘導されたが, それぞれのリン酸化のパターンは, 量的・質的に異なることが示された (Fig3)。

胸腺細胞では, Fr1 画分のリンパ球において, 正常マウス由来リンパ球のチロシンリン酸化シグナル誘導に比べ, 脳梁欠損マウスでのリン酸化は弱かった (Fig3 右上. レーン左から1と2)。一方, 小リンパ球画分Fr2 においては, 脳梁欠損マウス由来リンパ球の反応性が, 正常マウス由来リンパ球よりも亢進していた (Fig3 右上. レーン左から3と4)。また, 脾臓細胞を材料とした同様の実験では, Fr1 画分のリンパ球, およびFr2 のリンパ球画分において, 総タンパク質のチロシンリン酸化量は, 正常マウスよりも脳梁欠損マウスで増強されていることが明らかとなった。また, 総タンパク質のチロシンリン酸化量のみならず, 個々の分

子種のチロシンリン酸化パターンにおいても特徴的な異同が認められた。特に異同が顕著であった分子種の一覧を Table 1 に示した。

【胸腺】



【脾臓】

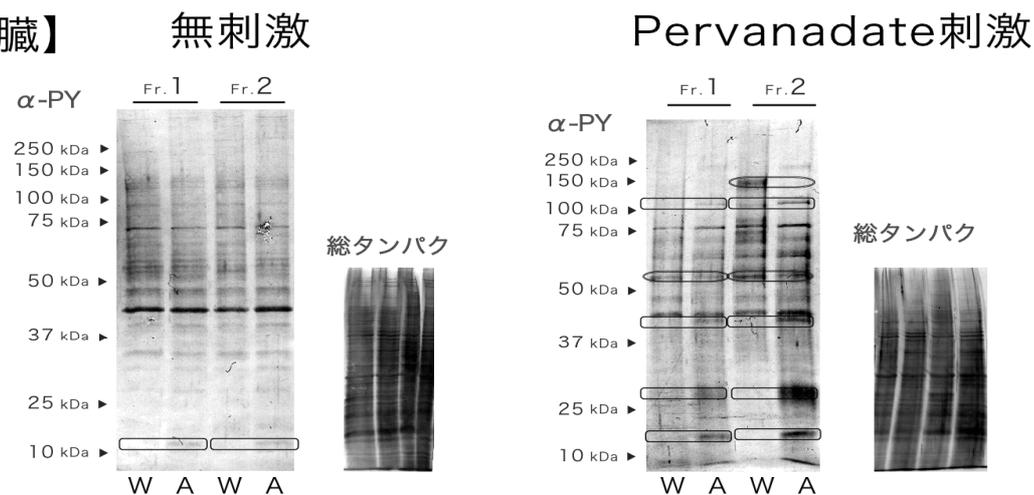


Fig.3 チロシンリン酸化パターン結果

W：正常 A：脳梁欠損

- 正常に強いバンドパターンが確認された部位
- 脳梁欠損に強いバンドパターンが確認された部位

Table1. 正常マウスと脳梁欠損マウスの
リン酸化チロシンパターン強度の比較

【胸腺】

	Fr.1		Fr.2		Candidate
	WT	ACC	WT	ACC	
110 kDa	±	+	—	+	Vinculin variant.
80 kDa	+	+	±	+	Transferrin variant
63 kDa	+	±	—	+	Ribophorin I
56 kDa	++	—	—	—	Src Family kinase
48 kDa	+++	±	±	±	β - actin
30 kDa	±	+	—	++	14 - -3 - 3
25 kDa	±	+	—	+	Small G Protein (Ras)
22 kDa	+	—	—	—	GTP-binding protein

【脾臓】

	Fr.1		Fr.2		Candidate
	WT	ACC	WT	ACC	
150 kDa	—	—	++	—	
110 kDa	—	±	±	++	Vinculin variant.
55 kDa	+	±	++	++	Src Family kinase
41 kDa	—	+	—	+	ERK kinase
28 kDa	—	±	—	+++	Small G Protein (Ras)
16 kDa	—	+	—	++	Ribosomal P protein

脳梁欠損マウスと正常マウス由来リンパ球の発現タンパクの網羅的解析

チロシンリン酸化パターンの差異が、真にチロシン残基のリン酸化量を反映しているのか、あるいは、タンパクの発現量に起因するのかを検討するため、また、脳梁欠損マウスと正常マウス由来リンパ球の細胞内タンパク質に総合的な量と質の違いがあるのか否かを検討するため、二次元電気泳動解析で網羅的に発現タンパクの確認を行った。

無刺激のリンパ球をサンプルとし、予備的試験では多くのタンパクが pI 5-8 付近に集中していることが確認されたため(Data not shown)、このPI領域を重点的に解析した。この結果、大部分のタンパク質スポットが脳梁欠損マウスと正常マウスで一致することが示された(Fig4)。しかし、コンピューター画像解析を行った結果、一部のスポットは片方の群にのみ特徴的に発現していることが明らかとなった(Fig 4, Table2)。

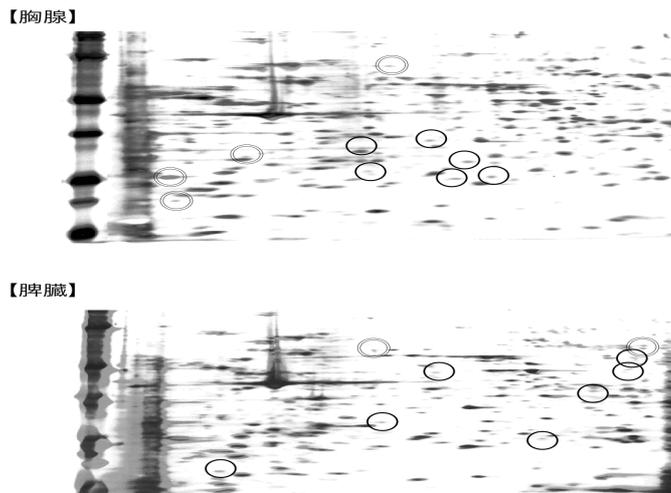


Fig.4 発現タンパクの網羅的な解析

- 正常マウスのみ発現していたタンパク
- 脳梁欠損マウスのみ発現していたタンパク

正常マウスと脳梁欠損マウスの二次元電気泳動マップ画像を重ね合わせたものにおいて、発現タンパクの違いを観察した

Table. 2 正常マウスと脳梁欠損マウスの発現タンパクの比較

それぞれ片方のマウス群のみに発現しているタンパクを分子量と等電点を手掛かりに、候補となるタンパクを挙げた

【胸腺】

	MW	pI	WT	ACC	Candidate
1	69	7.9	+		PTP1D
2	60	6.4	+		CCT - gamma
3	53	7.8		+	Terminal deoxynucleotidyl transferase
4	48	7.8		+	RCC1 - protien
5	46	6.7		+	Csk variant
6	40	7.6		++	α 2-macroglobulin - protein
7	30	6.4		+	Phosphoglycerate mutase variant
8	25	7.3		+	proteasomal component C3
9	16	5.5		++	Stahmin variant

【脾臓】

	MW	pI	WT	ACC	Candidate
1	71	6.5	+		Lamin A variant
2	35	5.3	+		Vac-beta variant.
3	35	6.7		+	CPP32
4	34	6.3		++	ERK (MAP) kinase variant.
5	31	5.7	±		IGUP I-5111
6	30	6.9		++	Phosphoglyceromutase
7	27	6.3		+	Triosephosphate isomerase
8	27	7.0		+	Phosphoglyceromutase
9	25	5.3	+++		Crk
10	25	6.8		++	Ran variant
11	20	5.3	+		APRT

5. 考察

マクロ解剖学的な臓器レベルでの比較解析において、脳梁欠損 (Ln/J) マウスと正常 (BALB/c) マウスのあいだに胸腺および脾臓の状態 (形態および重量) に有意な差異が認められなかった (Fig1)。さらに、FACS を用いた細胞表面マーカー解析の結果においても T 細胞: B 細胞の比率, および胸腺細胞の CD4:CD8 陽性率, そしてそれぞれのポジティブ・ネガティブの細胞構成に差異が認められなかった (Fig2)。これらの結果より, 少なくとも Ln/J マウスの発生分化段階に置いて, 脳梁形成に関わる要因は, T 細胞と B 細胞の発生分化段階にほとんど影響しないのではないかと考えられる。

一方, このような免疫担当細胞の分化に伴う集団分布に対する差異が検出されなかったのとは異なり, 大変興味深いことに個々のリンパ球のシグナル伝達機能に関しては, Ln/J マウスと正常マウスで大きな違いが認められた。細胞内チロシンリン酸化シグナルの強弱と誘導パターンに明らかな差異が認められたのである (Fig. 3)。T 細胞・B 細胞に代表される各種免疫担当細胞においては, 細胞内タンパク質のチロシンリン酸化シグナルが種々の局面で重要な意味を担っている。実験に用いた pavanadate は, 細胞内のチロシンリン酸化酵素 (PTK) の強力なアゴニストであると同時に一部のタンパク質チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) のインヒビターとして, 広くシグナル伝達の解析に用いられている。Fig. 3 の結果, 胸腺細胞においては比重の低い, 大型の胸腺細胞集団 (Fr. 1) のチロシンリン酸化シグナルの誘導が, Ln/J マウス由来の胸腺細胞において極度に低いことが示された。この結果と対照的に脾臓細胞においては, より比重の高い小型の細胞集団 (Fr. 2) において Ln/J マウス由来細胞がより亢進したチロシンリン酸化パターンを示すと同時に正常コントロールとは大きく異なるリン酸化タンパク質のパターンを示した。胸腺細胞においては, 56kDa, 47kDa に位置する分子種の差異が顕著であり, 一方, 脾臓細胞においては, 28kDa, 16kDa に位置する分子種の差異が顕著であった。これら分子の性状についてはさらなる厳密な解析が必要である。

このように正常マウスと Ln/J マウスの免疫細胞の細胞内チロシンリン酸化シグナル伝達のパターンに大きな違いがあるという事実は, 以下に述べる二つの可能性を示唆しているものと思われる。一つは, 脳梁欠損発現に関わる因子が免疫担当細胞において, 脳梁形成誘導とは異なる働きを有しており, リンパ球のシグナル伝達に関与している可能性である。神経系の発生と免疫系のシグナル伝達において共に重要な働きをする分子であり, かつ, チロシンリン酸化に関与する分子としては, Fyn キナーゼが有名である^{6, 17, 18)}。今回, Fyn キナーゼにターゲットを絞った解析を試みることはできなかったが, Fyn キナーゼそのもの, もしくは Fyn キナーゼの機能に関わるシグナル伝達分子が今回認められたシグナルの違いに関与している可能性があるかもしれない。Fyn の分子量は, 約 60kDa であり, 今回差異が認められた分子種にはちょうど 60kDa に相当するものは含まれなかった。しかし, 分子量 50~60 kDa 前後のタンパクとして Fyn 以外の Src ファミリーキナーゼの関与も考えられる。Fyn 以外の Src ファミリーキナーゼの中では, 神経系の増殖や分化だけでなく, 癌化や血球系にも影響するチロシンキナーゼである Src の関与が考えられる。Src は, 様々な組織でほぼ普遍的に発現しているが, 神経系の細胞で特に高い発現が認められている。Src は主として様々なレセプターと会合して機能していることが示されており, リガンド刺激により活性化されて標的タンパク質のチロシン残基をリン酸化することにより, これらのレセプターからのシグナルを伝達している。もう一つの可能性として, Fyn や Src 等のチロシンリン酸化酵素活性は, チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) によっても精密に制

御されており²⁰⁻²²⁾、脱リン酸化酵素が脳梁形成とリンパ球シグナル伝達に共通する Key Molecule であるかもしれない。実際、脳の発生分化に関与する PTP はいくつか報告され始めている^{23, 24)}。チロシンリン酸化パターンに変化の見られた分子種に関しては、アミノ酸配列の解析ならびに酵素活性を計測してみる必要もあろう。

最後にLn/Jマウスの免疫細胞内のタンパク質発現パターンについて二次元泳動方を用いて展開して、網羅的に正常マウスのタンパク質発現パターンと比較解析した。この結果、Fig. 4 に示した。展開して明瞭な差異が認められた分子種についてタンパク質データベースにより、分子量と等電点から候補に挙げられたタンパク質の一覧をTable 2に示した。今回の結果では、直接的に脳梁形成と免疫細胞シグナル伝達の双方に関与する分子を同定するには至らなかったが、少なくとも、今回、二次元電気泳動で検出することができた300種以上のスポットの中より、標的タンパク質の候補を36分子種に脳梁欠損特異的タンパク質として候補に絞り込むことができた。もちろん、この36分子種中に脳梁形成に直接関与する目標タンパク質が必ず含まれるという証拠を得るためにはいっそうの解析が必要である。しかし、今までほとんど報告されることがなかった脳梁欠損マウスと正常マウスの差異において、細胞内チロシンリン酸化パターンの明確な違いが見つかったことは大きな進歩であり、今後今回見つかった分子種とその性質、分子量とpIを手がかりにして、神経と免疫系に共通する重要なシグナル経路の解析が進展することはおおいに期待できると考えられる。

大変興味深いことに、日本の森永乳業株式会社のグループが2003年に「脳梁又は精子の形成不全の診断及び治療に有用な新規遺伝子」としてBT-IgSF遺伝子を報告している。BT-IgSF遺伝子産物は、46kDaの接着分子であり精巣及び脳で発現し、脳の中では特に脳梁において最も強く発現していることが示された²⁵⁾。BT-IgSF発見グループは、この遺伝子の発現が脳中でも脳梁に限定されているという極めて特異な特徴から、脳梁の形成に関わる細胞接着分子として機能するのではないかと予想している。彼らの報告では、BT-IgSFは、胸腺・脾臓における発現は高くないとされているが、再度、詳細な検討が必要であろう。このように、我々の得たタンパク質のデータと今後次々と明らかになるであろう脳梁形成関連遺伝子との関わりをプロファイリングしていくことで、ヒトにおける脳梁形成不全による顔面奇形、精神発達遅滞、言語障害等との病態発祥のメカニズム解明が進むことを期待したい。

謝 辞

本研究の実験材料を提供していただいた旧富山医科薬科大学(現富山大学)医学部生物学教室 教授尾崎宏基博士、解析に用いた研究試薬の一部を分与していただいた同医学部免疫学教室の村口篤教授ならびに FACS 解析技術を指導いただいた同教室員の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

1. Elenkov, IJ., Wilder, RL., Chrousos, GP and Viz IS. The Sympathetic Nerve—An Integrative Interface between Two Super systems: The Brain and the Immune System. *Pharmacol Rev.* 2000. 52:595–638.
2. Elenkov, IJ and Chrousos, GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2002. 966:290-303.

3. 田中正美・湯浅龍彦 編 別冊「医学のあゆみ」 21世紀の神経免疫学展望
医歯薬出版株式会社 2001年11月
4. Benyahia, B., Amoura, Z., Rousseau, A., Le Clanche, C., Carpentier, A., Piette, JC and Delattre JY. Paraneoplastic antineuronal antibodies in patients with systemic autoimmune diseases. *J Neurooncol.* 2003. 62(3):349-51.
5. Phiel, CJ., Wilson, CA., M.-Y. Lee, V and Klein, PS. GSK-3 regulates production of Alzheimer's disease amyloid-s peptides. *Nature.* 2003. 423, 435-439.
6. Maillard, I., Adler, SH and Pear, WS. Notch and the immune system. *Immunity.* 2003. 19(6):781-91.
7. Miyakawa, T., Yagi, T., Kitazawa, H., Yasuda, M., Kawai, N., Tsuboi, K and Niki, H. Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: relation to NMDA-receptor function. *Science.* 1997. 278(5338):698-701.
8. Ozaki, HS and D, Wahlsten. Timing and origin of the first cortical axons to project through the corpus callosum and the subsequent emergence of callosal projection cells in mouse. *J Comp Neurol.* 1998. 400(2):197-206.
9. Ozaki, HS and D, Wahlsten. Cortical axon trajectories and growth cone morphologies in fetuses of acallosal mouse strains. *J Comp Neurol.* 1993. 336(4):595-604,
10. Ozaki, HS and D, Wahlsten. Prenatal formation of the normal mouse corpus callosum:a quantitative study with carbocyanin dyes. *J Comp Neurol.* 1992. 323(1):81-90.
11. Abreu-Villaca, Y., Silva, WC., Manhaes, AC and Schmidt SL. The effect of corpus callosum agenesis on neocortical thickness and neuronal density of BALB/cCF mice. *Brain Res Bull.* 2002. 15; 58(4): 411-6.
12. Magara F, et al. The acallosal mouse strain I/LnJ: a putative model of ADHD? *Neurosci Biobehav Rev.* 2000. 24: 45-50.
13. Davids, E., Zhang, K., Tarazi, FI and Baldessarini, RJ. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Res Rev.* 2003. 42(1): 1-21.
14. Chicoine, AJ., Proteau, L and Lassonde, M.
Absence of interhemispheric transfer of unilateral visuomotor learning in young children and individuals with agenesis of the corpus callosum. *Dev Neuropsychol.* 2000. 18(1): 73-94.
15. Devinsky, O and Laff, R. Callosal lesions and behavior: history and modern concepts. *Epilepsy Behav.* 2003. 4(6): 607-17.
16. 高津聖志 瀧 伸介 編「免疫研究の基礎技術」 羊土社 : 32 - 41
17. Ohnuma, T., Kato, H., Arai, H., McKenna, PJ and Emson, PC. Expression of Fyn, a non-receptor tyrosine kinase in prefrontal cortex from patients with schizophrenia and its correlation with clinical onset. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003. 10;112(1-2):90-4.
18. Arnaud, L., Ballif, BA., Forster, E and Cooper, JA. Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol.* 2003. 8;13(1):9-17.
19. Negishi, I. et al: Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature.* 2002. 376, 435 – 438.
20. Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Arimura, Y., Mitomo, K., Okada, M., Clark, MR., Mizuno, K and Yakura, H.
CD45 negatively regulates Lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol.* 1999. 163: 1321-1326
21. Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Arimura, Y., Mitomo, K., Mizuno, K and Yakura, H. CD45 differentially regulates B cell antigen receptor-mediated tyrosine phosphorylation in immature and mature B cells. In "Kinases and Phosphatases in Lymphocyte and Neuronal Signaling" (ed, Yakura, H). 1997. Springer-Verlag, Tokyo. pp.328-329
22. Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Mizuno, K and Yakura, H. Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in

immature B cells. *J Biol Chem.* 1995. 270: 27987-27990.

23. 水野一也 神経細胞分化におけるチロシンホスファターゼの役割. 蛋白質 核酸 酵素 (6月号増刊「プロテインホスファターゼの構造と機能」 田村眞理, 矢倉英隆, 武田誠郎, 宮本英七編集) (1998) 43: 1136-1143

24. 水野一也, 矢倉英隆 神経系のチロシンホスファターゼ. 蛋白質 核酸 酵素 (2月号増刊「脳における情報伝達-神経機能素子と素過程」 芳賀達也, 三品昌美, 植村慶一, 宮本英七編集) (1997) 42: 446-452.

25. Hirata, K., Ishida, T., Penta, K., Rezaee, M., Yang, E., Wohlgemuth, J and Quertermous, T. Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001. 276: 16223-16231.