

分担研究報告

膵島移植における拒絶反応機構の解析とその回避に関する研究

分担研究者 井上 一知 京都大学再生医科学研究所

研究要旨 元来血管の乏しい皮下部位に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放デバイスを移植に先立ち処置することで、同種同系・同種異系膵島の皮下移植における生着期間の延長が認められた。また、拡散チャンバーを用いたカプセル化膵島移植の場合、同種移植では炎症性因子の発現抑制が見られたものの、異種移植ではIL-1 β の発現等による膵島細胞の障害が示唆された。

A. 研究目的

臨床膵島移植において、移植後に免疫抑制剤を使用しない方法の一つに免疫隔離機能を持つ膜に膵島細胞を封入することが考えられる。しかし、動物を用いた検討では移植後のバイオ人工膵の生着期間等に問題があった。このため、バイオ人工膵の周囲に血管新生を誘導し、移植バイオ人工膵の生着期間の延長や機能維持・向上に適した移植環境の構築を試みた。

また我々は免疫隔離膜を利用した膵島移植治療を目指して、マウスやラット等のげっ歯類を使った研究において、数種の膵島細胞カプセル化技術を開発し、それらが糖尿病動物の血糖値の長期正常化に有効であることを確認してきた。しかし移植後の異物反応や拒絶反応の詳細な機構については明瞭化に至っておらず、更なる免疫隔離デバイスの改良のために、同種・異種移植時に動員される免疫系細胞群の動態や炎症関連分子の発現状態の検査を行った。

B. 研究方法

糖尿病モデル Lewis 系ラット(8 週齢)はストレプトゾトシン(STZ)を用いて作製した。血管誘導デバイスはポリエチレンテレフタレート(PET)メッシュで作製した拡散チャンバー(2×1.5cm, バッグ型)に、bFGF 含浸ハイドロゲルを封入して作成し、糖尿病ラット皮下に移植した。デバイス移植 1 週間後に、同系

あるいは SD 系雄性ラット(8-10 週齢)からコラゲナーゼ消化法で分離した膵島(約 3,500 IEQ)を 5%アガロースと混合後、チャンバー内に封入した。

移植免疫に関する検討には、STZ 注射により作成した糖尿病 C57BL/6 マウスをレシピエントに用い、同種異系グラフトとして BALB/c マウスの膵島を、異種グラフトとして Lewis 系ラットの膵島を用いた。裸の膵島移植には腎皮膜下移植法を、カプセル化膵島移植には太鼓型ディフュージョンチャンバーに膵島を封入し、レシピエントとドナーの細胞の直接接触を絶った状態にしたものを腹腔内に移植する方法をとった。移植初期の炎症・拒絶反応を検査するために、移植後 5 日から 7 日目の移植部位、あるいはカプセル化膵島におけるリンパ球のフローサイトメトリー解析と各種サイトカインの RT-PCR 解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、科学的かつ倫理的な実施を図るため、「ヘルシンキ宣言」および「動物の保護および管理に関する法律」に基づき実施した。

C. 研究結果

bFGF 徐放デバイス処置することで、組織学的検討、あるいは組織中ヘモグロビン量、血流量を指標とした評価においても皮下部位

に良好な血管新生誘導が認められた。

血管新生誘導群では同系膵島移植 3 週間以内に全例正常血糖値を示すに至り、膵島移植前の血糖値(547.0 ± 39.4 mg/dl)が移植 4 週後で 164.6 ± 29.2 mg/dl、12 週後で 175.8 ± 43.7 mg/dl と、少なくとも 3 ヶ月間の血糖値の正常化が認められ、移植膵島の長期生着、機能維持が確認できた。また、移植動物の体重に関しても増加が認められた。一方、対照(血管新生非誘導)群では移植後一時的に血糖値の低下が見られるものの、正常化には至らず、7 日以内に血糖値の再上昇が認められた。同様の結果が 5% アガロースに封入した同種膵島の皮下移植実験でも得られている。

マウス腎皮膜下への同種、異種膵島移植では、移植 5 日目の移植部位で活性化した CD4、CD8 陽性 T 細胞が増加しているのが認められ、このとき TNF- α 、IFN、IL-1 β 、iNOS、IL-4、IL-2 の発現が昂進していた。同種グラフトと異種グラフト間に違いも認められ、異種グラフトでは IL-1 β 、iNOS、IL-4 の発現がより高かった。

一方、全てのカプセル化膵島細胞で IFN、IL-2 の発現は検出されなかったものの、iNOS の発現は弱く見られた。異種グラフトでは IL-1 β 、iNOS の発現が同種グラフトより高く、このときインスリン発現レベルの低下が認められた。

D. 考察

移植部位としての皮下は術式が簡便で低侵襲性であるなどの利点を備えているが、血管が乏しくそのままでは移植片が生着しにくいという難点もあった。我々が試みた皮下への至適移植環境構築の検討で、血管新生誘導前処置が、移植部位への栄養供給や移植膵島産成分の分泌・排泄の改善を促し、移植膵島生着期間の延長や機能維持を導いたと考えられる。これらの結果は臨床膵島移植においての移植環境因子の重要性を示唆すると共に、bFGF を用いた血管新生が膵島移植での移植環境向上に応用可能であることを示唆する。

移植免疫に関する検討で、同種、異種移植

共に各種サイトカインの発現上昇が検出されたが、異種膵島移植では顕著な IL-4 の発現が見られ、Th2 優位な反応が起きていることが示唆された。

Nuclepore 膜でレシピエントとドナーの直接的細胞接触を絶った膵島移植において、同種グラフトでは炎症性因子の発現が抑制されたが、異種グラフトでは IL-1 β 、iNOS 等の発現が見られた。IL-1 β による膵島細胞の障害はよく知られており、実際に *in vitro* の系で IL-1 β を処理すると膵島のインスリン分泌機能が著しく低下し、このとき膵島細胞では iNOS 発現の上昇が見らる。移植膵島の障害は IL-1 β と iNOS に因るところが大きいと予想される。

E. 結論

低侵襲性である皮下移植の可能性を模索する過程で、移植部位には良好な血流状態など移植片が生着するのに適した環境が必要であり、移植部位に前処置的に新生血管を誘導することが移植膵島の生着期間の延長や機能維持に大きな効果をもたらすことが明らかとなった。

更に隔離膜の改善のために、移植膵島の機能廃絶機構を明らかにするとともに、膵島移植において細胞の直接接触の阻止が拒絶反応回避をどれだけ満たしているのかといった検討や人工物に対する異物反応についての評価も必要であろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y.J., Gu, M. Miyamoto, W.X., Cui, B.Y. Xu, Y. Kawakami, T. Yamasaki, H. Setoyama, N. Kinoshita, H. Iwata, Y. Ikada, M. Imamura, K. Inoue, Effect of Neovascularization-inducing Bioartificial Pancreas on Survival of Syngeneic Islet Graft. *Transplant Proc.* 32, 2494-2495, 2000
2. Y.J., Gu, M. Miyamoto, W.X., Cui, B.Y. Xu, Y. Kawakami, T. Yamasaki, H. Setoyama, N. Nagata, A.N. Balamurugan, Y. Morimoto, A. Satake, H. Iwata, M. Imamura, M. Nozawa, K. Inoue.

Development of a New Bio-artificial Pancreas Possessing Angiogenesis-inducing Function. Transplant Proc. 32, 2475, 2000

3. Kawakami Y., Iwata H., Gu Y.J., et.al, Successful subcutaneous pancreatic islet transplantation using angiogenic growth factor releasing device. Pancreas (in press)

4. Kinoshita N., Echigo Y., Shinohara S., Y.J. Gu., Miyazaki J., Inoue K., Imamura M. Regulation of Cell Proliferation using Tissue Engineering in MIN6 cells. Cell transplantation (in press)

5. Y.J.Gu., Tabata Y., Kawakami Y., A.N. Balamurugan., Hori H., Nagata N., Satake A., W.X.Cui., R.M.G Qi., Misawa Y., Toma M., Miyamoto M., Nozawa M., Inoue K., Development of a new method to induce angiogenesis at subcutaneous site of streptozotocin-induced diabetic rats for islet transplantation. Cell transplantation (in press)

6. Nagata N., Y.J.Gu., Hori H., A.N. Balamurugan., Toma M., Kawakami Y., Weijing Wang., Satake A., Misawa Y., Baba T., Miyamoto M., Nozawa M., Tabata Y., Inoue K. : Evaluation of Insulin Secretion of Isolated Rat Islets Cultured in Extracellular Matrix. Cell transplantation (in press)

7. A.N. Balamurugan., Y.J.Gu., Tabata Y., Miyamoto M., W.X.Cui., Hori H., Satake A., Nagata N., W.J.Wang., Inoue K. : Prevascularized Intermuscular Space: A Potential Site for Bioartificial Pancreas Transplantation. Cell transplantation (in press)

2. 学会発表

国内学会

1. 顧 元駿、田畑泰彦、川上義行、佐竹 晃、宮本正章、野澤真澄、井上一知

第 27 回膵・膵島移植研究会 (2000 年 3 月 仙台) 糖尿病ラットにおける血管誘導後の同種膵島皮下移植に関する検討

2. 顧 元駿、田畑泰彦、川上義行、佐竹 晃、宮本正章、野澤真澄、井上一知 日本外科学会 (2000 年 4 月 東京) 血管新生誘導性バイオ人工膵を用いたラット同種膵島

移植に関する検討

3. 顧 元駿、田畑泰彦、川上義行、佐竹 晃、宮本正章、野澤真澄、井上一知

第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2000 年 5 月 名古屋) 糖尿病ラットにおける皮下血管誘導後の同種膵島移植に関する検討

4. 顧 元駿、田畑泰彦、Balamurugan A.N., 堀 洋、長田奈津紀、藤間真紀、宮本正章、野澤真澄、井上一知 第 36 回日本移植学会総会 (2000 年 10 月 岐阜) 糖尿病ラットの皮下血管新生誘導法の確立

5. 堀 洋、顧 元駿、森元良彦、長田奈津紀、藤間真紀、A.N. Balamurugan、宮本正章、野澤真澄、井上一知 第 36 回日本移植学会総会 (2000 年 10 月 岐阜) 6ヶ月齢ブタ膵内分泌細胞の単離・培養と移植応用

6. 長田奈津紀、顧 元駿、堀 洋、A.N. Balamurugan、藤間真紀、井上一知 第 23 回日本分子生物学会 (2000 年 12 月 神戸) 培養単離膵内分泌細胞と培養単離膵島における内分泌機能の評価と比較検討 国際学会

1. Balamurugan A.N., Gu Y.J., Tabata Y., Cui W.X., Miyamoto M., Nozawa M., Inoue K. : International Congress of the Transplantation Society (2000. 8 Rome, Italy) Survival and function of transplanted rat islets at prevascularized intermuscular site-effect of angiogenesis induction.

2. Gu Y.J., Tabata Y., Balamurugan A.N., Miyamoto M., Nozawa M., Inoue K., The fifth international symposium on tissue engineering for therapeutic use (2000.11 Tsukuba, Japan) Development of a method to induce angiogenesis at subcutaneous site of diabetic rats for islet transplantation.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明者：岩田博夫、井上一知、筏 義人；

生体内に毛細血管が豊富な組織を作成するの
のに用いる新生血管床形成用用具
特許第 3080299；特許権者：京都府京都市
左京区吉田本町36の1 京都大学長

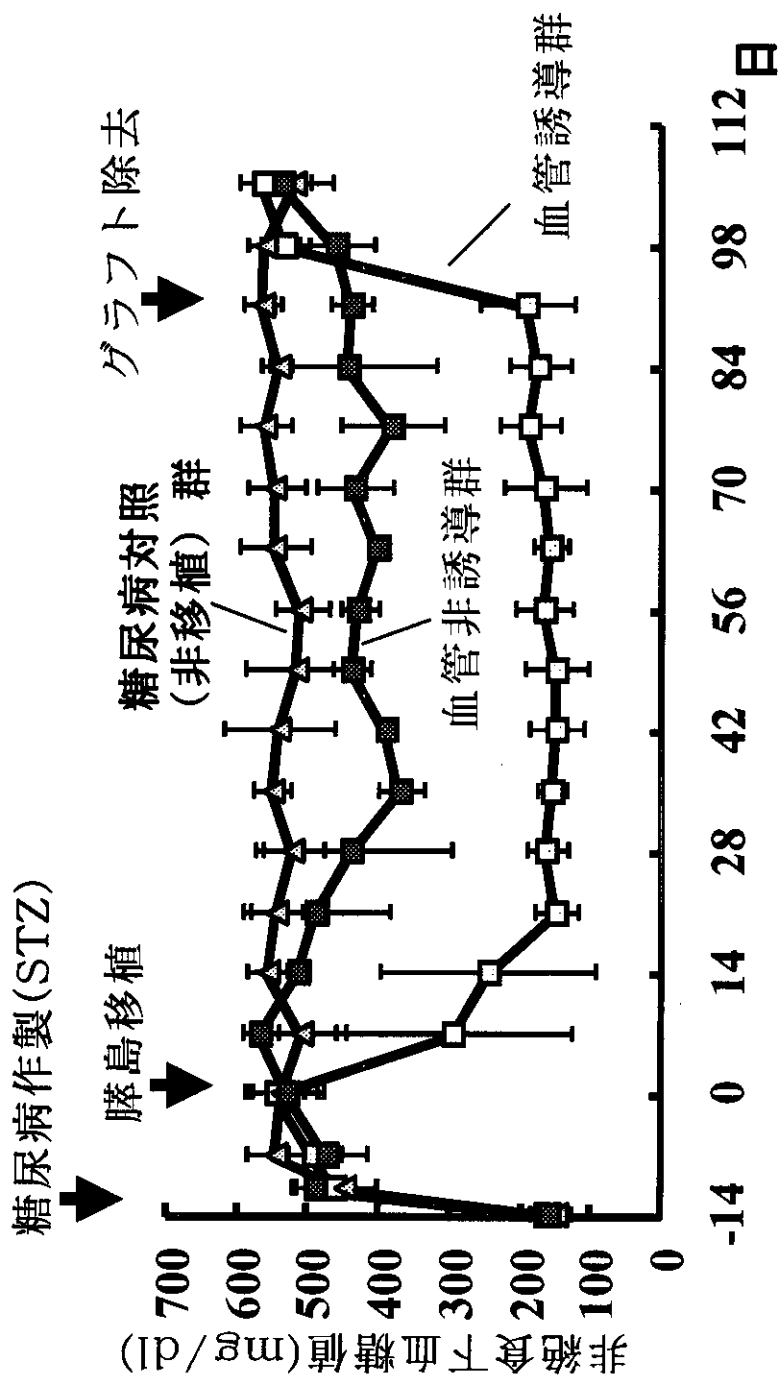
2. 実用新案登録

無し

3. その他

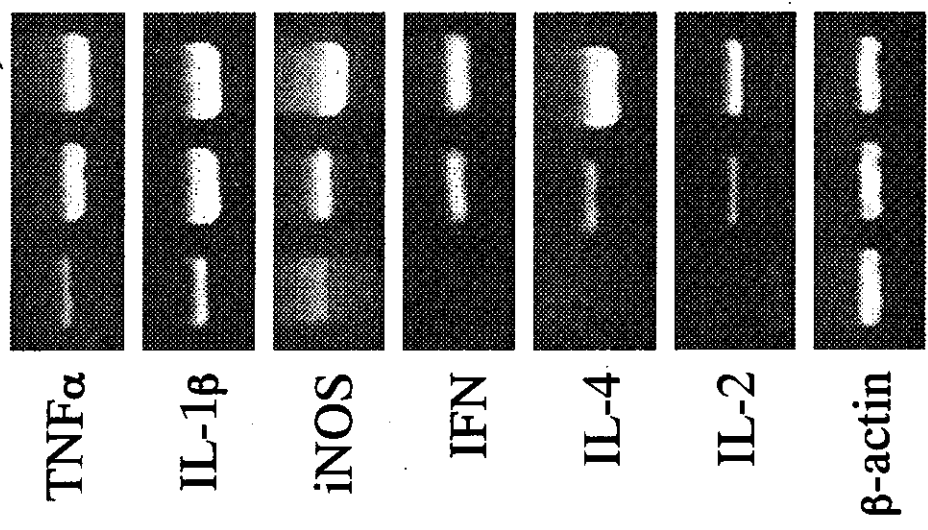
無し

膵島皮下移植
(ラット→ラット同系移植)

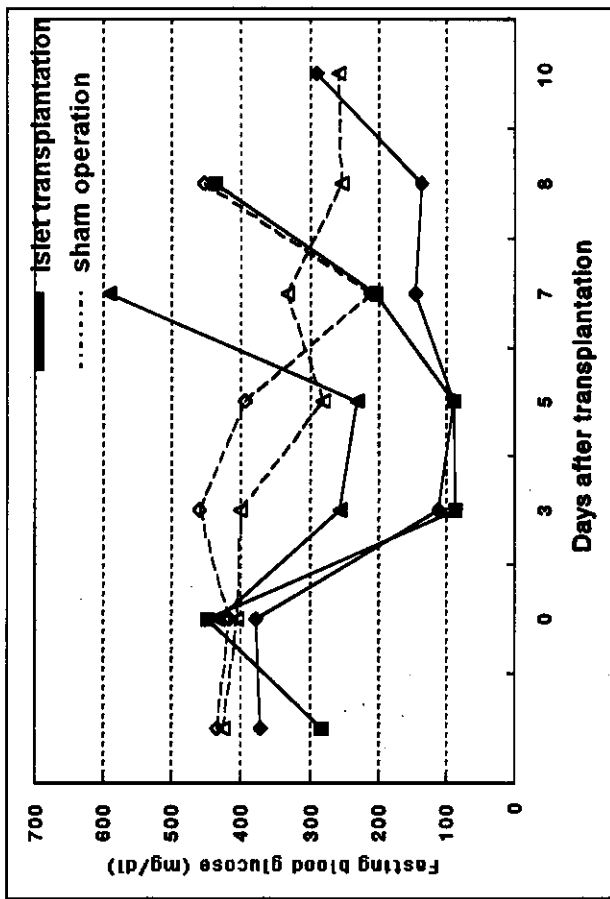


腎皮膜下膵島移植5日目の移植片におけるRT-PCR解析

isograft
allograft
xenograft

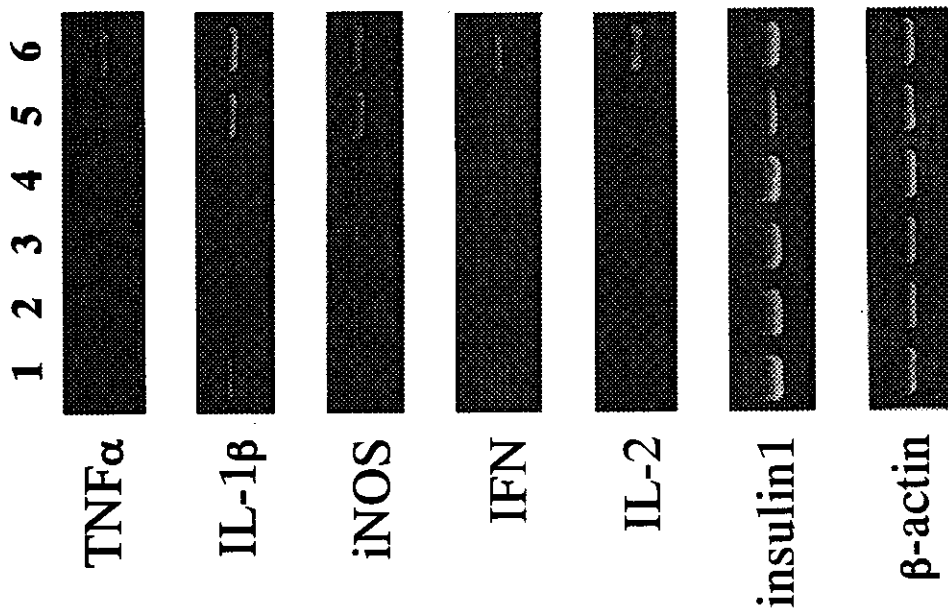


マウス同種膵島移植後の血糖値の変化

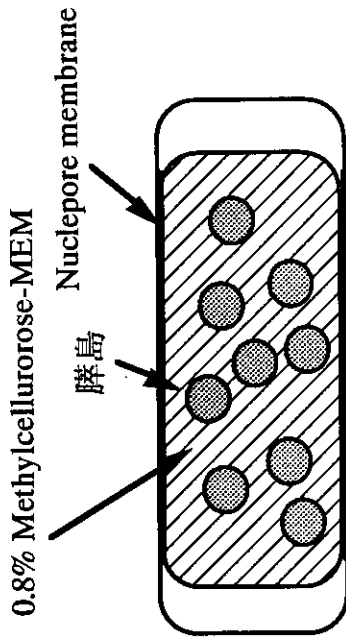


recipient: C57BL/6 mouse
isograft: C57BL/6 islet
allograft: BALB/c islet
xenograft: Lewis rat islet

カプセル化膵島移植



膵島をディフュージョンチャンバーに封入し、レシビエントマウスの腹腔内に移植



- lane
1. non-treated islet
 2. capsuled isograft
 3. capsuled allograft
 4. capsuled allograft
 5. capsuled xenograft
 6. positive control

NKT細胞移入による移植免疫制御

分担研究者 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究科・助教授

患者本人のNKT細胞や樹状細胞をin vitroで増殖・活性化させ、自己の使った細胞療法によって、これまでの免疫抑制剤だけではコントロールできなかった移植の慢性拒絶をコントロールすることを目的としている。今年度の研究から、つぎの3点が明らかになった。(1)ゼノ及びアロのラ氏島の移植実験モデルでは、免疫寛容の誘導は抗CD4抗体の移入、FK506投与などで可能である。その免疫寛容の維持(慢性拒絶の回避)には、NKT細胞の存在が必須であることが、NKT細胞のないノックアウトマウスを用いた研究で分かった。(2)さらに、免疫寛容を効率よく誘導する目的でリンパ球への遺伝子治療を行う場合に、どの遺伝子にターゲットを絞ったらよいかを評価する目的で、アデノウイルスレセプターの遺伝子導入マウスを樹立した。このマウスのT細胞を用いて、T細胞へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が効率よく行える条件の検討が終わった。(3) In vitroでヒトのNKT細胞を増殖させる実験条件、ヒト末梢血から樹状細胞を増殖・活性化させる条件について無血清培地を用いて検討し、至適培養条件が明らかになった。これらの研究成果をふまえて、今後は、NKT細胞由来の抑制性サイトカインや抑制シグナル誘導分子などに焦点を当てて、免疫寛容の維持をになう分子機序を解明する。アデノウイルスでT細胞やNKT細胞に抑制性サイトカインなどの遺伝子導入を行い、T細胞の機能阻害をin vitro及びin vivoで検討する。これによって、まず動物モデルで細胞治療による免疫寛容の維持の誘導(慢性拒絶の回避)を目指す。ヒトのNKT細胞や樹状細胞の培養で、GMPグレードに沿った大量培養系の樹立を目指す

A. 研究目的

ラ氏島移植は、最近注目を浴びるようになった新しい糖尿病の治療法である。治療自体の侵襲が小さく、確立されれば貢献度は計り知れない。米国では、これまでに約450例の実績が報告されている。しかし、現在のところ免疫抑制剤だけで移植拒絶を十分コントロールできていないのも、事実である。ラ氏島移植が遅れている一因として、免疫寛容の誘導機序が十分解明されていないことがあげられる。これまでに、細胞療法については、ガン患者でLAK療法などが行われてきたが、移植医療の分野での報告はまだない。

NKT細胞は、NK細胞のマーカーであるNK1.1とT細胞に特異的なT細胞抗原レセプター(TCR)を両方発現している細胞集団で、ヒトでは末梢血リンパ球の約0.1%以下と少なく、これまで解析が遅れてい

た。このNKT細胞抗原受容体のダイバーシティーは非常に限られていて、マウスではV α 14、ヒトではV α 24を選択的に使っている。リガンドも通常のTCRでのMHC(主要組織適合遺伝子複合体)分子と蛋白ペプチドではなく、CD1d分子と糖脂質であることが分かっている。NKT細胞は、CD1d分子に提示された糖脂質(α GalCer)を認識すると、活性化されて短時間のうちにIL-4やIFN- γ を産生する。これによって、獲得免疫系のタイプ1(Th1)やタイプ2(Th2)のヘルパーT細胞の分化を調節している。さらに、未知の分子で腫瘍細胞を認識し、強力なパーフォリン依存性の抗腫瘍細胞活性を発揮する。そのほかに、アレルギーの発症制御、自己免疫疾患の発症制御をしていると言われ、NKT細胞が移植免疫系で機能しているかどうか調べた。

B. 研究方法

1) ゼノのラ氏島移植：まず、ゼノのラ氏島移植の実験プロトコルを説明する。まず、7-10週令のC57BL/6マウスやV α 14NKTノックアウトマウスに、streptozotocin (STZ; 200mg/Kg)を静注し、膵臓のラ氏島を破壊する。1-2日後には、血漿中のグルコースレベルが400mg/dlになり、糖尿病がおこる。STZ投与後、5-8日目に、分離したLewisラットのラ氏島500個を経門脈的に注射する。移植が成功すれば、血糖値が正常範囲(100mg/dl以下)に戻る。その後、血糖値が2日以上200mg/dlに上昇した場合に第1日目を拒絶日とする。通常は1週間程度でほとんど拒絶が起こるが、移植後、0, 2, 4日後に50 μ gの抗CD4抗体を注射すると、トレランスが誘導され、30日以上の生着マウスの比率は75%以上となる。これは、CD4陽性のT細胞がマウスの生体からいなくなることで、約14日目にNKT細胞が復帰してくることに関係があるようである。この系を使い、ホストにV α 14NKTノックアウトマウスなどを用いてトレランス誘導とNKT細胞の必要性について検討した。

2) アデノウイルスを用いた遺伝子治療のための基礎実験：アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスを用いて行った。T細胞をはじめとするリンパ球にはアデノウイルスのレセプターが発現しておらず、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験はリンパ球では非常に難しいのが現状である。しかし、アデノウイルスの遺伝子導入の系は、増殖していない細胞にも感染し遺伝子導入が出来ること、7.9kbといった大きな遺伝子が入ること、数時間で遺伝子発現が起こること、高いタイトルのウイルス液が容易に調整できることなどの、大きなメリットがある。そこで、ヒトのアデノウイルスレセプター(CAR)をT細胞に強制発現させたマウスを樹立し、そのマウスのT細胞を用いて感染実験を行った。

3) ヒトNKT細胞の分離・増殖の実験条件の確立：末梢血中のNKT細胞を抗ヒトV α 24と抗V β 11抗体で染色して検出したNKT細胞を、*in vitro*で1-2週間培養し、NKT細胞の数をFACSで計算する。

(倫理面への配慮)

動物実験は千葉大学の動物実験指針に従った。ヒトの末梢血中のNKT細胞の計測も、倫理委員会承認されたプロトコルに従ってインフォームドコンセントを十分にを行った。

C. 研究結果

今回の我々の実験で、抗CD4抗体で誘導したゼノのラ氏島の移植免疫寛容には、NKT細胞の存在が必須であることが分かった。生存曲線を図に示す。レシピエントにV α 14NKTノックアウトマウスを用いると、抗CD4抗体で誘導される免疫寛容の誘導が非常に困難になる。約2週間でほとんどのマウスでは拒絶が起こり、30日では全て拒絶された。この状態のV α 14NKTノックアウトマウスでも、移植直後にNKT細胞を門脈から移入すると、トレランスの誘導が有意に回復することが分かった。約半数では60日以上の生着が観察されている。これらの実験から、NKT細胞の存在がゼノのラ氏島の移植免疫寛容に必須であることが分かった。

今後の実験の進展を待たなければならないが、NKT細胞を細胞移入することで、トレランスの誘導をラ氏島移植患者の拒絶反応抑制に応用出来ないであろうか？この可能性を追究すべくヒトでのNKT細胞の研究を開始した。1型の糖尿病患者ではNKT細胞の機能不全が報告されている。さらに、60才以上の高齢者ではNKT細胞数は減少していることがわかった。末梢血中のNKT細胞を抗ヒトV α 24と抗V β 11抗体で染色して検出した。20-30才のヒトでも末梢血のNKT細胞数は個人差が大きい特徴があるが、この実験では60才以上のヒトの細胞数は0.01%程度で非常に少ないことが分かった。また、これまでの我々の実験から、*in vitro*で α GalCerで刺激し、ヒトのNKT細胞を約2週間で100倍程度に増殖させることが出来るようになった。

アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスの樹立には、CD2のエンハンサー、Ickのプロモーター、ヒト成長ホルモンエンハンサーの入ったトランスジェニック作成用のカセットに、細胞質内部分の欠損したヒトのCAR遺伝子(CARd1)をいれてトランスジェニックマウスを作成した。胸腺細胞と脾臓細胞を抗CD4、抗CD8抗体で染色したCD4/CD8プロフィールから判断すると、このマウスでのT細胞の分化は正常に起こっていることが分かる。次に、胸腺細胞のCD4/CD8の各分画および、脾臓のCD4およびCD8T細胞の細胞上のCAR分子の発現を特異的抗体で染色して調べたところ、ほとんどの細胞でその発現がみられることが分かった。

次に、緑の蛍光を発するGFP遺伝子をアデノウイルスに組み込んだベクターを用いて、脾臓

のT細胞への感染効率を検討すると、野生型のナイーブCD4T細胞ではほとんど感染しないにもかかわらず、CARトランスジェニックマウスのCD4T細胞では、90%以上の細胞に感染が観察された。また、抗TCR抗体でCD4T細胞を活性化した場合には、蛍光強度が増強し、遺伝子導入の効率が上がっていることも分かる。いずれにしても、非常に高い感染効率と遺伝子導入が可能であることが分かった。

D. 考察

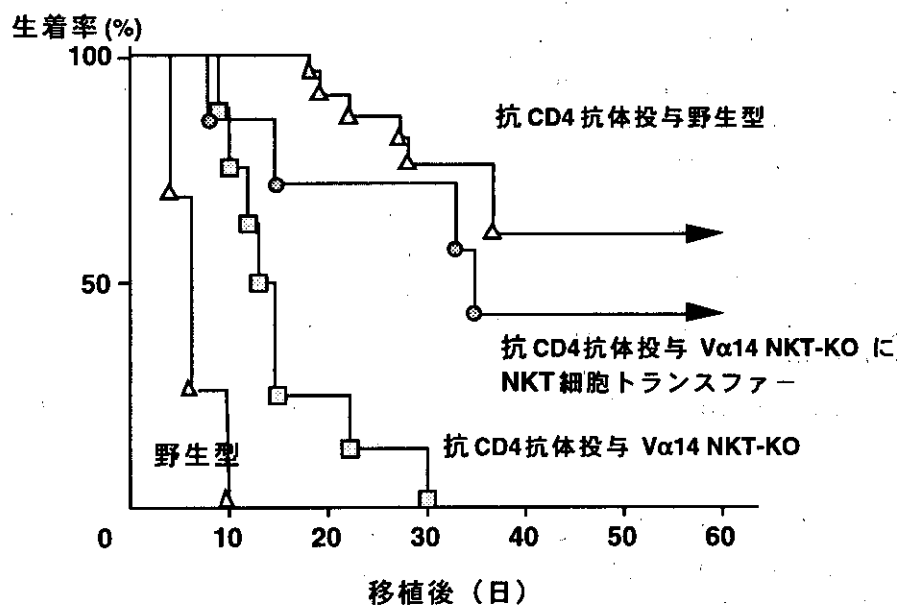
これらの実験結果を踏まえ、現在、我々の樹立したNKT細胞のない遺伝子操作マウスをホストにして、正常マウスから調整したNKT細胞を移入し、「数、移入ルート、タイミング、活性化の必要性」などの移入条件を確立中である。ヒトのNKT細胞はマウスとほとんど同じ性質を持つため、NKT細胞を用いた細胞療法の基礎実験を、まずマウスで行っている。また、アデノウイルスレセプタートランスジェニックマウスのNKT細胞やT細胞に、免疫寛容を誘導するサイトカインの遺伝子導入を行って細胞移入し、どのようなもので実際に免疫寛容が誘導できるかについての研究を計画している。ヒトでのNKT細胞療法においてこの遺伝子治療を応用するためには、そのためのベクターの開発を待たなければならない。しかし、将来的には

移植拒絶、特に慢性拒絶のコントロールに遺伝子治療を施した患者自身のリンパ球を用いる細胞療法は、非常に有望であると思われる。NKT細胞や樹状細胞の培養で、GMPグレードに沿った大量培養系の樹立を目指し、そのための試薬・機器などを調達している。

E. 結論

今年度の研究から、つぎの3点が明らかになった。(1)ゼノ及びアロのラ氏島の移植実験モデルでは、免疫寛容の誘導は抗CD4抗体の移入、FK506投与などで可能である。その免疫寛容の維持(慢性拒絶の回避)には、NKT細胞の存在が必須であることが分かった。(2)さらに、免疫寛容を効率よく誘導する目的でリンパ球への遺伝子治療を行う場合に、どの遺伝子にターゲットを絞ったらよいかを評価する目的で、アデノウイルスレセプターの遺伝子導入マウスを樹立した。このマウスのT細胞を用いて、T細胞へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が効率よく行える条件の検討が終わった。(3) In vitroでヒトのNKT細胞を増殖させる実験条件、ヒト末梢血から樹状細胞を増殖・活性化させる条件について無血清培地を用いて検討し、至適培養条件が明らかになった。

図 ゼノ腓ラ氏島移植において $V\alpha 14$ NKT細胞は生着に重要な役割を持つ



F. 研究発表

1. 発表論文

1. Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by IL-4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* 191:105-114, 2000.
2. Adachi, T., Wakabayashi, C., Nakayama, T., Yakura, H., and Tsubata, T.: CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J. Immunol.* 164:1223-1229, 2000.
3. Ito, K., Karasawa, M., Kawano, T., Akasaka, T., Koseki, H., Akutsu, Y., Kondo, E., Sekiya, S., Sekikawa, K., Harada, M., Yamashita, M., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Involvement of decidual V α 14 NKT cells in abortion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:740-744, 2000.
4. Tokoyoda, K., Takemoto, Y., Nakayama, T., Arai, T., and Kubo, M.: Synergism between the calmodulin-binding domain and the auto-inhibitory domain on calcineurin is essential for the induction of their phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 275:11728-11734, 2000.
5. Ikehara, Y., Yasunami Y., Kodama, S., Nakano, M., Maki, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Ikeda, S.: CD4+ V α 14 NKT cells are essential for acceptance of intrahepatic rat islet xenografts in mice treated with anti-CD4 antibody. *J. Clin. Invest.* 105:1761-1767, 2000.
6. Gonzalez-Aseguinolaza, G., De Oliveira, C., Tomaska, M., Hong, S., Bruna-Romero, O., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bendelac, A., Van Kaer, L., Koezuka, Y., and Tsuji, M.: α -GalCer-activated V α 14 NKT cells mediate protection against murine malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8461-8466, 2000.
7. Yamashita, M., Katsumata, M., Iwashima, M., Kimura, M., Shimizu, C., Kamata, T., Shin, T., Seki, N., Suzuki, S., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: TCR-induced calcineurin activation regulates Th2 cell development by modifying the IL-4 receptor signaling complex. *J. Exp. Med.* 191:1869-1879, 2000.
8. Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C-R., Koezuka, Y., and Kronenberg, M.: Tracking the response of NKT cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers: The response to α -galactosylceramide is dynamic and highly compartmentalized. *J. Exp. Med.* 192:741-754, 2000.
9. Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S., Shibata, S., Asano, Y., Gondo, H., Sekiguchi, K., Nakayama, K., Nakayama, T., Okamura, T., Okamura, S., Niho, Y., and Nakayama, K.: Tyk2 plays a restricted role in IFN α signaling although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* 13:561-571, 2000.
10. Andrews, K. J., Ribas, A., Butterfield, L. H., Vollmer, C. M., Eilber, F. C., Dissette, V. B., Nelson, S. D., Shintaku, P., Mekhoubad, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Glaspy, J. A., McBride, W. H., Economou, J. S.: Adenovirus-interleukin-12-mediated tumor regression in a murine hepatocellular carcinoma model is not dependent on CD1-restricted natural killer T cells. *Cancer Res.* 60:6457-6464, 2000.
11. Taniguchi, M., and Nakayama, T.: Recognition and function of V α 14NKT cells. *Sem. Immunol.* 12:543-550 (2000).

2. 学会発表

1. Nakayama, T., Kimura, M.: Impaired Ca/calcieneurin pathway in in vivo anergized CD4 T cells. Keystone Symposia, Colorado, January 28-February 3, 2000.
2. Nakayama, T.: The ability to differentiate into Th1 and Th2 cells in developing CD4 single positive thymocytes. Immunology 2000 AAI/CIS Joint annual meeting, Washington, May 12-16, 2000.
3. 中山俊憲、谷口克 活性化V α 14NKT細胞を利用したガン細胞転移抑制 第4回基盤的癌免疫研究会 札幌 8.3-4, 2000.
4. 安波洋一、中村嘉一郎、平川栄二、鍋山健太郎、池田靖洋、中山俊憲、谷口克 拒絶反応制御におけるV α 14NKT細胞の役割: マウス同種膵島移植の系を用いた解析 第36回日本移植学会総会 岐阜 10.11-13, 2000.
5. 中山俊憲 「アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスを用いたT細胞への遺伝子導入」 第3回移植遺伝子工学研究会 岐阜 10.12, 2000.
6. Nakayama, T., Yamashita, M., Taniguchi, M.: TCR-mediated signal transduction pathways that regulate Th2 cell differentiation. 第30回日本免疫学会総会シンポジウム 仙台 11.14-16, 2000.
7. 鎌田憲明、飯島洋、木村要、原田通成、清水英子、本橋新一郎、吉田泰司、田中裕二郎、河野鐵、中山俊憲、酒井輝行、谷口克 糖脂質をV α 14NKT細胞に提示するために重要なマウスCD1d内のアミノ酸の同定 第30回日本免疫学会総会 仙台 11.14-16, 2000.
8. 原田通成、鎌田憲明、伊藤俊広、河野鐵、小池順造、中山俊憲、谷口克 CD1dを介したマウスV α 14 NKT細胞の細胞障害活性の抑制 第30回日本免疫学会総会 仙台 11.14-16, 2000.
9. Yasunami, Y., Ikehara, Y., Kodama, S., Nakano, M., Maki, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Ikeda, S.: Essential roles of V α 14 NKT cells for acceptance of rat islet xenografts in mice treated with anti-CD4 monoclonal antibody. 第30回日本免疫学会総会 仙台 11.14-16, 2000.
10. 清野研一郎、村本賢三、谷口克、中山俊憲、場集田寿、竹田和由、八木田秀雄、奥村康、深尾立 移植免疫寛容誘導におけるNKT細胞の役割 第30回日本免疫学会総会 仙台 11.14-16, 2000.
11. 竹田潮、山下政克、谷口克、中山俊憲 アデノウイルスベクターを利用したT細胞への高効率な遺伝子導入法の確立 第30回日本免疫学会総会 仙台 11.14-16, 2000.
12. 中山俊憲、木村元子、谷口克 ポリコーン遺伝子群によるTh1/Th2細胞の分化調節機能 第50回日本アレルギー学会総会シンポジウム 横浜 11.30-12.2, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

平成12年度(2001年3月)
厚生科学研究費補助金
「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」研究報告書

発行

事務局 国立佐倉病院
〒285-8765
千葉県佐倉市江原台2-36-2
Tel 043-486-1151(代)

印刷所 株式会社文友堂印刷
〒260-0001
千葉県千葉市中央区都町998
Tel 043-231-7301
