

efficiency は 82.9%、88.6%、91.4% および 92.9%であった。一方、TP/Cr、Alb/Cr、NAG/Cr では efficiency が 90%以上になる cut off 値は存在しなかった。

#### D. 考察 E. 結論

GM は成熟型 macrophage の形質を有するがその由来は protein-loading cytopathy(HDL が関与?)を受けた上皮細胞(尿細管上皮細胞、Bowman 上皮細胞、糸球体上皮細胞)である。尿中 GM の解析ならびに尿中 mCHO の測定は非選択的蛋白尿に伴う protein-loading cytopathy の視標となり予後の推定、治療効果の評価に有用である。

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

1. Hotta O, Yusa N, Ooyama M, Unno K, Furuta T, Taguma Y: Detection of urinary macrophages expressing the CD16 (Fc  $\gamma$  RIII) molecule: a novel marker of acute inflammatory

glomerular injury. *Kidney Int* 1999;55:1927-1934

2. Hotta O, Furuta T, Chiba S, Yusa N, Taguma Y: Immunosuppressive effect of deoxyspergualin in proliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1999;34:894-901
3. Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y: Urinary macrophages as activity markers of renal injury. *Clinica Chemica Acta* 2000;297:123-133
4. Hotta O, Furuta T, Tomioka S, Chiba S, Taguma Y: Regression of IgA nephropathy: a repeat biopsy study. *Am J Kidney Dis* 2002;39:493-502
5. 堀田 修:尿中単核球解析による内科的腎疾患の病態評価. *臨床病理* 48: 498-504,2000
6. 堀田 修: IgA 腎症と粘膜免疫 医学のあゆみ 2001:199:99-102

H. 知的財産の出願・登録状況  
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

糸球体障害の組織における白血球浸潤と長期予後

分担研究者 齊藤 喬雄 福岡大学医学部内科学第4講座教授

研究要旨 進行性腎障害の代表的疾患である慢性糸球体腎炎で炎症性白血球である単球、顆粒球、マクロファージの浸潤が接着因子やインテグリンを介して腎障害に関わることを示した。また、メサンギウム細胞の増殖および $\alpha$ 平滑筋アクチンの発現などの形質転換を介して、病変の進展や予後の悪化を招くことを示唆した。一方、進行性腎障害の原因疾患として重要な糖尿病性腎症においても、マクロファージが代謝産物を取り込んで病変の形成や進展に影響を与えること明らかにした。

A. 研究目的

糸球体腎炎は難治性かつ進行性であり、やがて腎不全になり透析療法を必要とするものが少なくない。透析療法は腎不全患者の生命予後を延長する画期的な方法とはいえ、患者の社会復帰が難しく、また莫大な医療費を費やすなど、厚生行政上問題も多い。このため、厚生科学特定疾患対策研究事業のうち、進行性腎障害に対する調査研究では、IgA腎症、急速進行性糸球体腎炎、難治性ネフローゼ症候群などの糸球体疾患が重点的に取り上げられ、われわれもその診療指針の作成に加わってきた。さらに、糖尿病性腎症では、これらの腎炎をしのぐ勢いで末期腎不全に至る患者が増加しており、治療の対策が叫ばれている。この疾患の本質的な変化は腎糸球体の硬化といわれているが、我々が明らかにしてきたとおり、マクロファージなど炎症性白血球の浸潤も病因に関わっており、腎炎との共通点が見いだせる。我々はこのような腎

不全の重要な原因疾患である慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症において、その進行に白血球系細胞浸潤がどのように関わるか、今まで研究を重ね発表してきた。ここでは、このように進行する危険性が高い慢性糸球体腎炎のうち、類似の組織像を示しながら腎に限局して発症するとされるIgA腎症と全身的な炎症の一症状と考えられる紫斑病性腎炎を対比して扱い、接着因子やそのリガンドであるインテグリンを有する白血球浸潤の関係、とくにIgA腎症においてはメサンギウム細胞や糸球体上皮細胞の形質転換について分析する。また、慢性腎不全のなかでその割合がもっとも高い糖尿病性腎症において、白血球浸潤と糖化最終産物(AGE)の関係を追究する。以上の結果に加え、それぞれについて組織障害度および臨床的パラメータを測定し、白血球浸潤がさまざまな要因を介して予後にどのように影響するかを検討する。

## B. 研究方法

1) IgA 腎症と紫斑病性腎炎における接着分子、インテグリン、白血球浸潤：年齢のマッチした IgA 腎症と紫斑病性腎炎それぞれ 49 例について、その腎生検標本に対する酵素抗体法にて、各種白血球表面抗原(CD3, CD15, CD68)、インテグリン(LFA1, CR3, CR4)、接着因子(ICAM1、ICAM3)などのモノクローナル抗体を用い、糸球体におけるこれらの細胞や物質の発現を検討した。物質の発現は4段階評価、陽性細胞については糸球体毎に算定し、各症例で平均値を求めた。各症例の臨床的パラメータのほかに、組織上の糸球体障害指数(IGL)、間質容積(%IV)を計測し、免疫染色で得られた結果とそれぞれの値の相関を検討した。

2) IgA 腎症における白血球浸潤と形質転換：IgA 腎症経時腎生検例 38 例の腎生検標本エタノール固定パラフィン包埋切片を用い、酵素抗体法による免疫染色を実施した。対照として糸球体病変のほとんど見られない単独血尿例 14 例の腎生検標本を用いた。検索対象としては、糸球体メサングウム細胞の形質転換の指標として $\alpha$ 平滑筋アクチン(SMA)、高分子カルデスモン(HCLD)、低分子カルデスモン(LCLD)など各種平滑筋骨格蛋白、糸球体上皮細胞障害の指標として補体受容体 CR1(CD35)、糸球体浸潤細胞の指標として前述の各種白血球表面抗原およびインテグリンについて、それぞれのモノクローナル抗体により、糸球体におけるこれらの細胞や物質の発現を検討した。組織学的検討は1)の場合と同様であるが、対象となった経時生検症例を、その臨床経過から、改善ないし不変群(以下改善群)と悪化群の2群に分類し、それぞれにお

ける免疫組織学的パラメータの経時推移と臨床データおよび組織計測パラメータの経時推移との関連を検討することにより、腎組織障害進展における形質転換の関与ならびに白血球浸潤との関連を検討した。

3) 糖尿病性腎症における白血球浸潤と糖酸化物：糖尿病性腎症 43 例と対照群の非糖尿病 10 例の腎生検標本で、各種白血球表面抗原マーカーとともに、糖酸化物であるカルボキシルメチルリジン(CML)、脂質過酸化物である酸化ホスファチジルコリン(Ox-PC)およびマクロファージ・スカベンジャー受容体に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。陽性細胞を各糸球体毎に計測し、糸球体の病変(Gellman 分類、結節の有無)の程度と比較検討した。

4) 倫理面での配慮：腎生検やこの研究に関する検査については対象となる患者に説明してその同意を得た。また、「腎生検標本を利用した各種腎疾患の病態解析」について福岡大学医に関する倫理委員会の承認(No.79)を得た。なお、本研究の研究結果に関して、個人のデータが特定されるような危険性はない。

## C. 研究結果

1) 紫斑病性腎炎と IgA 腎症における接着分子、インテグリン、白血球浸潤：紫斑病性腎炎、IgA 腎症のいずれにおいても糸球体 ICAM-1 発現は、糸球体 LFA-1 陽性細胞及び CR4 陽性細胞をはじめとする各種白血球浸潤と有意の正相関を示した。LFA-1 陽性細胞数は、CD3 陽性 T 細胞、CD15 陽性単球/顆粒球、CD68 陽性マクロファージのそれぞれと有意の正相関を示した。これらの結果により、いずれ

の疾患においても、糸球体の白血球浸潤に ICAM-1/LFA-1 相互作用の関与していることが示唆された。糸球体沈着物に関しては、紫斑病性腎炎では IgA 腎症に比べ fibrin/fibrinogen 関連抗原(FRA)沈着が有意に高度であり、IgA 腎症では紫斑病性腎炎に比べ C3c 沈着が有意に高度であった。これら沈着物と各種インテグリン陽性細胞浸潤との関連では、紫斑病性腎炎では糸球体 FRA 沈着と CR4 陽性細胞の間に有意の正の相関が見られたが、C3c 沈着と CR4 陽性細胞の間には相関が見られなかった。これに対し、IgA 腎症では糸球体 C3c 沈着と CR4 陽性細胞数との間に有意の相関が見られたが、FRA 沈着と CR4 陽性細胞の間には相関が見られなかった。いずれの疾患においても、CR4 陽性細胞数は、CD68 陽性マクロファージと高度の相関を示し、連続切片による検討でも糸球体浸潤マクロファージのほとんどは、同時に CR4 を発現していることが確認された。また、CR4 陽性細胞数は尿蛋白量と有意の正相関を示した。

2) IgA 腎症における白血球浸潤と形質転換： 昨年度の研究結果のごとく、各平滑筋骨格蛋白は IgA 腎症および対照例の動脈中膜に均等に発現していた。しかし、糸球体においては、対照例で、メサンギウムに LCLD の発現のみが観察され、IgA 腎症で、その活動性に依じてメサンギウムに SMA の発現が、またメサンギウムの拡大に応じて LCLD の発現が観察された。SMA および LCLD のメサンギウム発現の程度は、CD15 陽性単球/顆粒球や CD68 陽性マクロファージ、CR3 陽性細胞や CR4 陽性細胞の浸潤、IGL および臨床的に尿蛋白と有意の正相関を示した。LCLD 発現は糸球体上皮細胞におけ

る CR1 発現と有意の逆相関を示し、両者の二重染色では、メサンギウムの LCLD 発現高度の領域では明らかな CR1 発現の減弱が観察された。しかし、そのほかの検索したパラメータとの間に相関はなかった。IgA 腎症経時生検例の改善群では、尿蛋白量、糸球体浸潤白血球、SMA や LCLD 発現の有意の減少が見られ、腎機能や糸球体 CR1 発現は変化なかったのに対し、悪化群では、尿蛋白量、糸球体浸潤白血球、SMA や LCLD 発現の持続が見られ、腎機能や糸球体 CR1 発現は有意に減少していた。

3) 糖尿病性腎症における白血球浸潤と糖酸化物： 結果は以下の5つに要約される。

1. ヒト糖尿病性腎症では、糸球体病変の進行とともに浸潤マクロファージは増加したが、リンパ球の増加はなかった。
2. マクロファージの浸潤は、Kimmelstiel-Wilson(KW)結節を有する糸球体に、有意に多く、糸球体内では、癒着部や KW 結節周辺部、侵出性病変部に多く認められた。
3. 泡沫化マクロファージに、糖酸化物の一種 CML や脂質酸化物である Ox-PC の蓄積が見られた。
4. 酸化物陽性のマクロファージは、糸球体病変の進行とともに増加し、KW 結節を有する糸球体には有意に多く認められた。
5. CML 陽性のマクロファージにはスカベンジャー受容体の発現が見られた。

#### D. 考察

紫斑病性腎炎では、IgA 腎症と同様、白血球浸潤に、ICAM-1/LFA-1 相互作用の関与していることが示された。一方、CR4 陽性マクロファージに関しては、IgAN 腎

症では C3bi/CR4 相互作用が作動している可能性が示されるのに対し、紫斑病性腎炎では fibrinogen/CR4 相互作用が作動している可能性が示され、紫斑病性腎炎と IgA 腎症との間で免疫担当細胞、特に Mf の浸潤機序が異なる可能性が示唆された。しかし、いずれの疾患においてもこれらマクロファージは糸球体障害(蛋白尿)発現に関与していると考えられる。

IgA 腎症において、昨年度の研究報告および今年度研究結果から、単球/顆粒球、マクロファージのうちで CR3 陽性細胞、CR4 陽性細胞の浸潤が、SMA 発現および LCLD 発現増強に強く関与していると考えられる。従来の実験腎炎モデルやヒト腎組織での検討結果を考慮すると、糸球体に浸潤したこれらの細胞から放出されるサイトカインがメサンギウムの増殖やその形質転換を誘導している可能性が考えられる。更に、これら収縮性蛋白の発現が予後と相関する IGL や尿蛋白量とも密接な関係があることから、病変の進展過程で、今回の研究における SMA、LCLD 発現に示されたようなメサンギウム形質転換は重要な要因と考えられた。SMA 等の平滑筋収縮蛋白の発現は、アンジオテンシン II (A II) に対するメサンギウムの反応性亢進を示唆する所見といわれているが、今回の上皮細胞障害指標(CR1)との関連から、このような糸球体内微小循環動態の変化がメサンギウムのみならず、上皮細胞障害を介した糸球体破壊に関与している可能性が示唆された。これらの結果は、近年報告が相次いでいる ACE 阻害薬や A II 受容体拮抗薬の腎保護作用とも関係づけられる可能性がある。

一方、糖尿病性腎症でもマクロファージの浸潤は病変の進展に関与すると考え

られる。とくに今回の研究では、病変の進行とともに CML 陽性および Ox-PC 陽性など糖酸化修飾を受けたマクロファージが糸球体内に増加し、マクロファージスカベンジャー受容体の発現も見られたが、このような所見については従来報告がない。糖尿病性腎症糸球体には、早期から糖酸化物が沈着しているといわれているが、今回の結果は、このような糸球体でメサンギウムに沈着した糖酸化物や脂質酸化物が、発現したスカベンジャー受容体を介して浸潤したマクロファージに取り込まれ、病変形成やその進行に関与することを示唆しており、極めて重要な所見である。

#### E. 結論

進行性の慢性糸球体腎炎の中で、IgA 腎症と紫斑病性腎炎は、病理組織学的に共通性の極めて多い疾患であるが、その臨床経過や予後に関しては大きく異なる面もあり、現在でも疾患としての近縁性や同一性に関する結論は得られていない。今回の研究では、両疾患における、糸球体白血球浸潤機序という病態での相違点が明らかとなった。また、種々の実験腎炎及び紫斑病性腎炎を含むヒト糸球体腎炎において、線溶療法や抗凝固療法が有効である事は既に報告されているが、今回の我々の結果より線溶療法や抗凝固療法は fibrinogen/CR4 相互作用を阻害することにより、CR4 陽性細胞の糸球体内浸潤を抑止する可能性が考えられた。これらの知見は、IgA 腎症や紫斑病性腎炎に代表されるような慢性糸球体腎炎の治療法を考える上で重要な意義を持つものと思われる。とくに、IgA 腎症では、単球、顆粒球、マクロファージなど

の炎症性白血球浸潤が、メサンギウムなど組織細胞の形質転換を促し、メサンギウム拡大や蛋白尿発現のみならず、糸球体構造破壊の要因である糸球体上皮細胞障害にも関与していることが示唆された。

一方、やはり進行性腎障害として重要な糖尿病性腎症において、これまでも、その進展には、マクロファージ浸潤や糖酸化物の糸球体内沈着が重要であるとの研究が行われてきたが、この両者を結び付けた研究はなかった。今回の研究は、マクロファージのような炎症性白血球浸潤とさまざまな代謝産物の腎障害進展の関わりを明らかにしたものであり、糖尿病性腎症の進展を予防する基礎的な研究になると考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Uesugi N, Sakata N, Horiuchi S, Nagai R, Takeya M, Meng J, Saito T, Takebayashi S: Glycooxidation-modified macrophages and lipid peroxidation products are associated with the progression of human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 38(5):1016-1025, 2001

2) Mochizuki S, Moriya T, Naganuma H, Narasaka T, Ueno Y, Sato H, Sasano H, Saito T: Significance of fat stains in serial sections from Epon-embedded tissue samples for electron microscopy in renal diseases. *Clin Exp Nephrol* 5(4):240-245, 2001

3) Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, Soma J, Sato T, Saito T, Ito S: Significance of early

phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*, 39(3):475-485, 2002.

4) Jin S-L, Ootaka T, Soma J, Sato T, Sato H, Ito S and Saito T: The role of beta2 integrins in glomerular leukocytes in Henoch-Schoenlein purpura nephritis: An age-matched comparative study with IgA nephropathy. *Nephrology*, 2002, in press.

5) 金 世蘭、大高徹也、相馬 淳、佐藤 寿伸、佐藤 博、伊藤貞嘉、斉藤喬雄：紫斑病性腎炎白血球浸潤過程における beta2-インテグリンの関与：年齢をマッチした IgA 腎症との比較検討。東北医短紀要 11(1)、2002 年、印刷中

##### 2. 学会発表

1) Jin S-L, Ootaka T, Soma J, Sato T, Sato H, Ito S, Saito T: The involvement of beta2 integrins in glomerular infiltration of leukocytes in Henoch-Schoenlein purpura nephritis: An age-matched comparative study with IgA nephropathy. A0387, 34th American Society of Nephrology Meeting, 2001

2) 大高徹也、大高亮彦、木村朋由、佐藤 博、伊藤貞嘉、佐藤 寿伸、斉藤喬雄：各種増殖性糸球体腎炎における糸球体細胞の転写因子発現について。P-490、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

腎臓への白血球浸潤におけるケモカインの役割

分担研究者 今井 俊夫      カン研究所 所長

研究要旨

ケモカイン受容体 CX3CR1 はヒト細胞障害性リンパ球と単球に選択的に発現し、そのリガンドである fractalkine はこれら細胞の浸潤を特異的に誘導する。進行性腎疾患における浸潤細胞の特性は、CX3CR1-fractalkine 系によって浸潤が制御される細胞の特徴と酷似している。本研究は、進行性腎疾患の細胞浸潤における CX3CR1-fractalkine 系の役割を解明することを主体として実施した。

ヒト検体における研究では、正常人リンパ球上での CX3CR1 と他のケモカイン受容体の発現状態を解析し、CX3CR1 のみがキラー細胞に選択的に発現していることを確認した。また、組織染色、ELISA に適用可能な抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体、組織染色に適応可能な抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体の作製を行った。したがって、ヒト検体の探索に必要な研究材料と理論的傍証が得られたと考えられる。

進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。ところが、CX3CR1 の発現は、ヒトとマウスでは異なり、マウスではリンパ球には CX3CR1 が発現していないとの報告がある。そこで、allo 脾臓細胞移植により CTL を誘導した場合の、キラーリンパ球での CX3CR1 の発現の検討を行った。マウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を作製し、FACS で解析を行った結果、GVHD マウスの脾臓、肝臓に存在する T 細胞に CX3CR1 の発現が確認された。これら CX3CR1 発現 T 細胞の多くは、移植した脾臓細胞由来の CD8 陽性 T 細胞であり、エフェクターキラー細胞と考えられた。したがって、CX3CR1-fractalkine 系の腎疾患における役割を、マウスの腎疾患モデルを用いて解析・治療実験を実施するための基盤的知見が得られたと考えられる。

次に、蛍光標識した GVHD マウスの脾臓細胞を GVHD マウスに投与して、肝臓への浸潤を検討した。その結果、fractalkine を用いて CX3CR1 を脱感作した場合に、ドナー由来 CD8 陽性 T 細胞、すなわちエフェクターキラー細胞の肝臓への浸潤が、選択的に阻害された。また、抗 CX3CR1 イムノトキシンを作製したところ、CX3CR1 発現細胞を選択的に破壊した。これらの知見から、キラー細胞が関与するマウスの腎疾患モデルでの fractalkine の治療効果は、十分期待できると考えられる。

## A. 研究目的

進行性腎障害においては、浸潤免疫細胞による腎組織の不可逆的損傷を抑制することにより、腎障害の進展抑制が可能である。免疫細胞の活性を抑制するには、抗原特異的な活性化反応・サイトカインによる増殖・細胞遊走因子と接着分子による細胞浸潤のいずれかを抑制することが必要である。

疾患や病態により浸潤している免疫細胞の特性が異なることは、知られていたが、このような特異的細胞浸潤のメカニズムは長らく不明であった。最近の細胞遊走因子ケモカイン、およびケモカイン受容体の詳細な解析から、特定の免疫細胞の選択的浸潤機構がケモカインを中心として解明されつつある。

特に、キラー細胞は perforin/granzyme や Fas ligand などを介して、実際に組織の細胞を破壊する役割を担っているが、キラー細胞の特異的浸潤機構についてはほとんど明らかになっていない。我々は、正常ヒト末梢血において、ケモカイン受容体である CX3CR1 が NK 細胞、T 細胞のなかでも強いキラー活性を示すエフェクターキラー細胞に選択的に発現し、リガンドである fractalkine がこれらキラーリンパ球を選択的に遊走させることを明らかにしてきた。

進行性腎疾患における浸潤細胞の特性は、CX3CR1-fractalkine 系によって浸潤が制御される細胞の特徴と酷似している。したがって、進行性腎疾患の細胞浸潤における CX3CR1-fractalkine 系の役割を解明し、疾患のメカニズム解明や治療のターゲットとしての評価を行うことを目的として本研究を実施した。

## B. 研究方法

【キラーリンパ球でのケモカイン受容体の発現】ヒト末梢血は、インフォームドコンセントを得た正常人から採取した。末梢血は、正常人静脈から EDTA 採血によって採取し、ACK 溶液と 5 分間混合することで赤血球を溶解した。1,200 rpm で室温 5 分間遠心して、白血球を沈殿させ、FACS 溶液 (1% FCS, 2% ヒト AB 型血清入り PBS) に懸濁した。白血球懸濁液に抗ヒト CX3CR1 モノクローナル抗体(2A9-1)を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗ラット IgG (H+L)抗体 (セダレーン社製)を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、1%ラット血清入り FACS 溶液を加えて、氷上で 30 分間反応させることで、未反応の FITC 標識抗ラット IgG (H+L)抗体をブロッキングした後、さまざまな細胞表面マーカーや他のケモカイン受容体に対する直接蛍光標識抗体を組み合わせて加え、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、FACScalibur (ベクトンディッキンソン社製)を用いて測定した。

【抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体の作製】抗原は、ヒト fractalkine を C 末端に His タグを付加した融合蛋白としてバキュロウイルスを用いて昆虫細胞に発現させ、培養上清からキレートカラムにより精製したものをを用いた。抗原は TiterMax アジュバンドと混合した後、BALB/c マウスに免疫し、以降抗原のみで追加免疫を行った。血清中の抗体価は ELISA を用いて測定した。精製ヒト fractalkine を 0.2  $\mu$ g/ml の濃度で PBS に溶解し、50  $\mu$ l ずつ 96-well ELISA プレートに固相化した。PBS/Tween-20 (PBS-T) で洗浄後、1% BSA/PBS でブロッキングを行った。抗血

清は PBS-T で段階希釈をおこない、50  $\mu$ l ずつ加えて、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PBS-T で 1000 倍希釈した HRP 標識 protein A (Zymed 社製) を 50  $\mu$ l ずつ加えて、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、TMBZ を用いて発色させ、抗体価を測定した。抗体価が上昇したマウスからリンパ球を分離し、リンパ球:P3 ミエローマ細胞の比率が 5:1 になるように混合し、PEG (ペーリンガー社製) を用いて細胞融合を行った。ハイブリドーマは、RPMI-1640/10% FCS/HAT/10% Origen HCF (ISGN 社製) を用いて、96-well プレートで 1 週間培養した。そして、培養上清を用いて、上記と同様に ELISA を実施し、陽性ウェルを同定した。抗ヒト fractalkine 抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈を 2 回行い、クローニングを行った。モノクローナル抗体は、不完全フロイントアジュバントを投与した BALB/c マウスにハイブリドーマを接種して作製した腹水から、Protein A カラムを用いて精製した。

ヒト fractalkine 発現細胞は、ヒト fractalkine cDNA を pCAGGS ベクターに組み込んだものを、293 EBNA-1 細胞に lipofectamine Plus を用いて transfection して作製した。

FACS による解析は、以下のように行った。ヒト fractalkine 発現細胞は PBS/EDTA 溶液で培養皿から回収し、FACS 溶液で洗浄後、抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (セダレーン社製) を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、死細胞を識別するために PI を加え、FACScalibur (ベクトンディッキンソン社製) を用いて測定した。

免疫染色による解析は、以下のように行った。ヒト fractalkine 発現細胞は 1%ホルマリン/PBS ホルマリン溶液、あるいはアセトンで固定した。正常ロバ血清でブロッキングした後、抗 fractalkine 抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、Cy3 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (ジャクソン社製) を加えて、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、50%グリセロール/PBS を用いて包埋し、蛍光顕微鏡で観察した。

【抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体の作製】ヒト CX3CR1 の C 末端のアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成し (サワディー社製)、KLH とコンジュゲートを作製したものを抗原として用いた。抗原は完全フロイントアジュバントと混合した後、NZW ウサギに免疫し、以降抗原と不完全フロイントアジュバントを混合したもので追加免疫を行った。血清中の抗体価はペプチドを 1  $\mu$ g/ml になるように PBS に溶解したものを固相化して、ELISA を用いて測定した。抗体価が上昇したウサギから血清を採取し、ペプチドを共有結合させた CNBr カラムを用いて、抗ヒト CX3CR1 特異的抗体をアフィニティー精製した。免疫染色による解析は、ヒト CX3CR1 cDNA を発現させた、マウス L1.2 細胞と、Cy3 標識抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (ジャクソン社製) を用いて行った。

【抗マウス CX3CR1 モノクローナル抗体の作製】マウス CX3CR1 の N 末端のアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成し (サワディー社製)、KLH とコンジュゲートを作製したものを抗原として用いた。TiterMax アジュバントと混合した後、アルメニアハムスターに免疫し、以降抗原のみで追加免疫を行った。血清中の抗体価はペプチドを 1  $\mu$ g/ml になるように PBS に溶

解したものを固相化して、ELISA を用いて測定した。ハイブリドーマの作製とクローニングは抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体作製と同様に行った。精製抗体は、ヌードマウスを用いて腹水を作製し、protein A で精製した。FACS による解析は、マウス CX3CR1 cDNA を発現させた、マウス L1.2 細胞と、PE 標識抗ラット IgG (H+L) 抗体 (セダレーン社製) を用いて行った。

【allo 脾臓細胞移植による CTL の誘導】  
C57BL/6 マウスの脾臓を無菌的に取りだし、口径 100  $\mu$ m のナイロンメッシュ上で脾臓をすり潰し、脾臓細胞を回収した。PBS で洗浄後、 $5 \times 10^7$  細胞を、BDF1 マウスに静注して、GVHD を誘導した。2~3 週間後に、脾臓・肝臓を取り出し、口径 70  $\mu$ m のナイロンメッシュ上で組織をすり潰し、細胞を回収した。脾臓の場合は、ACK 溶液と 5 分間混合することで赤血球を溶解して、FACS 解析に用いた。肝臓の場合は、Lympholyte-M (Sedarlane 社製) を用いた低速遠心により単核球細胞を分離した後、FACS 解析に用いた。

【GVHD 脾臓細胞の GVHD 肝臓への *in vivo* 浸潤実験と fractalkine の効果】

GVHD を誘導後のマウスの脾臓を無菌的に取りだし、口径 100  $\mu$ m のナイロンメッシュ上で脾臓をすり潰し、脾臓細胞を回収した。脾臓細胞は、ACK 溶液と 5 分間混合することで赤血球を溶解した。脾細胞は、PBS に懸濁し、終濃度 10  $\mu$ M の CMTMR (Molecular Probe 社製) により 37°C で 30 分間反応させ、蛍光標識した。その後、RPMI-1640/ 10% FCS に置換し、37°C で 15 分静置した。同培地で 2 回洗浄後、マウス fractalkine 15  $\mu$ g/ml で 37°C で 40 分脱感作した後、PBS で 2 回洗浄して、GVHD マウスに静注した。静注して 20 分、2 時

間後のマウスより脾臓・肝臓を取りだし、前項と同様の方法で脾細胞、及び肝臓より単核球細胞を分離した。分離した細胞は、FITC-H2D、APC-CD3、7-AAD を用いて染色し、FACS 解析に用いた。

【Saporin 標識抗 CX3CR1 抗体による CX3CR1 発現細胞特異的増殖抑制】

2A9-1 抗体の saporin 標識とコントロールの saporin は、Advanced Targeting Systems 社から購入した。96 ウェルプレート 1 ウェルあたり、親株の L1.2 あるいは CX3CR1-EGFP 発現 L1.2 細胞を  $10^3$  個、saporin あるいは saporin 標識 2A9-1 抗体を  $10^{-8}$  から  $10^{-14}$  M になるように希釈して、200  $\mu$ l の RPMI-1640/ 10% FCS の培養液を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 日間培養を行った。その後、細胞を懸濁して、20  $\mu$ l の細胞懸濁液中に含まれる LDH 活性を測定して、生細胞数の指標とした。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血は、カン研究所研究倫理委員会規定に従い、インフォームドコンセントを得た正常人から採取した。動物実験は、カン研究所動物実験委員会の指針に従い、承認を得た上で、実験動物に与える苦痛が最小になるように行った。

## C. 研究結果

【キラーリンパ球でのケモカイン受容体の発現】CX3CR1 の発現がキラーリンパ球特異的であることは、他のケモカイン受容体には見られない CX3CR1 に特徴的なことであるか否かを解析した。末梢血を、CX3CR1 と他のケモカイン受容体に対する抗体で 2 重染色して、CX3CR1 と他のケモカイン受容体との発現の相関関係を調べた。その結果、NK 細胞においては CX3CR1 の

発現が大多数で認められるにも関わらず、CCR2, CCR5, CXCR3 の発現は大多数で認められなかった。 $\gamma\delta$ T 細胞においては、CCR5, CXCR3 は大多数で発現しており、CCR2 は大多数で発現していなかったが、CX3CR1 は一部の細胞のみで認められた。CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞では、CCR5 陽性細胞の一部で CX3CR1 の発現が認められ、CCR5 陰性細胞での CX3CR1 の発現はごく一部であり、また、CX3CR1 陽性細胞は大多数が CCR2 と CXCR3 を発現していなかった。したがって、CX3CR1 の発現は他のケモカイン受容体と異なる特徴を有し、CX3CR1 の発現のみがキラーリンパ球特異的であると明らかとなった。

【抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体の作製】組替えヒト fractalkine を BALB/c マウスに免疫して、ハイブリドーマを作製し、最終的に FACS 可能な 3 クローン(2B02-8、6D01-1、7F06-10)について解析を行った。得られた精製抗体を用いて、ヒト fractalkine 発現 293 EBNA-1 細胞の免疫染色を行ったところ、パラフォルムアルデヒド固定とアセトン固定共に、明瞭な染色像を得ることができた。3 クローンの中では、7F06-10 が最も染色強度が強かった。したがって、ヒト検体での組織染色に応用可能な抗体が得られたと考えられる。

【抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体の作製】抗ヒト CX3CR1 モノクローナル抗体は、FACS では特異的に CX3CR1 を検出可能であるが、免疫染色では明瞭な染色像を得ることができない。そこで、免疫染色可能な抗体の作製を試みた。ヒト CX3CR1 の細胞内領域に存在する C 末端領域に対するペプチド抗体をウサギに免疫して作製し、ペプチドを用いたアフィニティー精製で、精製抗体を得た。得られた精製抗体を

用いて、ヒト CX3CR1 発現マウス L1.2 細胞の免疫染色を行ったところ、明瞭な染色像を得ることができた。したがって、ヒト検体での組織染色に応用可能な抗体が得られたと考えられる。

【抗マウス CX3CR1 モノクローナル抗体の作製】進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。ところが、CX3CR1 の発現は、ヒトとマウスでは異なり、マウスではリンパ球には CX3CR1 が発現していないとの報告がある。ヒト末梢血の解析結果から、マウスにおいても CX3CR1 はエフェクターキラー細胞で発現していることが推定されるが、SPF 環境下で飼育されたマウスでは、エフェクターキラー細胞の存在が希であるために、マウスでは CX3CR1 の発現がリンパ球に認められないのではないかと考えた。そこで、FACS を用いてマウス CX3CR1 の発現を解析するために、モノクローナル抗体の作製を試みた。マウス CX3CR1 の細胞外領域に存在する N 末端領域のペプチドをアルメニアハムスターに免疫して、ハイブリドーマを作製し、FACS 可能なクローンが 1 クローン(L2D11-7)が得られた。

【マウスリンパ球での CX3CR1 の発現】allo 脾臓細胞移植により *in vivo* で CTL を誘導した場合の、キラーリンパ球上での CX3CR1 の発現の検討を行った。マウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を用いて、FACS で解析を行った結果、SPF 環境下の BDF1 マウスでは、脾臓、肝臓のいずれにおいても、CX3CR1 の発現はほとんど認められなかった。ところが、C57BL/6 マウスの脾臓細胞を静注して GVHD を誘導した BDF1 マウスの脾臓、肝臓に存在する T 細胞には CX3CR1 の発現が確認され

た。これら CX3CR1 発現 T 細胞の多くは、移植した細胞由来の CD8 陽性 T 細胞であった。したがって、マウスにおいても、CX3CR1 はエフェクターキラー細胞に発現していると考えられる。

【GVHD 脾臓細胞の GVHD 肝臓への *in vivo* 浸潤実験と fractalkine の効果】

CMTMR で蛍光標識した GVHD マウス脾臓細胞を、未処理もしくはマウス fractalkine での CX3CR1 の脱感作して、別の GVHD マウスに静注し、脾臓・肝臓への細胞浸潤を解析した。脾臓・肝臓での移入細胞中の CD8 陽性細胞におけるドナー (H2D 陰性)、レシピエント (H2D 陽性) 細胞を FACS により解析した。その結果、H2D 陽性と陰性の比率は、脾臓では、20 分後と 2 時間後で脱感作の有無による変化がみられなかったが、肝臓では、20 分後では変化が見られないもの、2 時間後では、マウス fractalkine で脱感作していたものが、脱感作していないものに比べ、ドナー細胞、すなわちキラー細胞の存在比率が約半分に低下していた。従って、CX3CR1 は、キラー細胞の GVHD 肝臓への浸潤に関与することが示された。

【Saporin 標識抗 CX3CR1 抗体による CX3CR1 発現細胞特異的増殖抑制】

saporin 標識 2A9-1 抗体は、CX3CR1 発現細胞特異的に増殖抑制を示した。なお、Graphpad Prism ソフトウェアで算出した  $IC_{50}$  は、saporin 標識 2A9-1 抗体の CX3CR1 発現細胞に対する値は 15 pM、saporin 標識 2A9-1 抗体の親株の L1.2 細胞に対する値は 12 nM、saporin の CX3CR1 発現細胞に対する値は 73 nM であり、CX3CR1 発現細胞に対する特異性は少なくとも 1000 倍以上あることが明らかとなった。したがって、Saporin などの毒素を標識した抗 CX3CR1 抗体は、イムノトキシンとして有

効であることが示された。

#### D. 考察

ケモカイン受容体 CX3CR1 は、キラーリンパ球と単球に特異的なケモカイン受容体であり、他のケモカイン受容体 CCR5 などには見られない発現様式を示していることが明らかとなった。したがって、進行性腎疾患における細胞浸潤には、CX3CR1-fractalkine 系の働きが関与している可能性がさらに濃厚となった。

ヒト検体における研究のためには、組織染色可能な抗体が必要である。本研究で得られた抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体と抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体は、生検試料の免疫染色や ELISA を用いた尿中 fractalkine の濃度測定などに応用することが可能である。これらは、進行性腎障害における CX3CR1-fractalkine 系の関与を検索するための有効な手段となり得る。

本研究で得られた成果を臨床検体に応用することで、進行性腎障害の疾患のメカニズム解明に貢献できると考えられる。

一方で、進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。本研究により、マウスにおいてもヒトと同様に、CX3CR1 は、エフェクターキラーリンパ球に発現していることが示唆された。したがって、CX3CR1-fractalkine 系の腎疾患における役割を、マウスをモデル動物として用いて解析・治療実験を実施することは妥当であると考えられる。

エフェクターキラー細胞の GVHD マウスの肝臓への浸潤が、fractalkine を用いた CX3CR1 の脱感作で選択的に阻害されたことより、キラー細胞が関与するマウスの腎疾患モデルでの fractalkine の治療効果は、

十分期待できると考えられる。また、抗 CX3CR1 イムノトキシンによって、CX3CR1 発現細胞を選択的に破壊する方法は、キラー細胞の除去に有用と考えられる。

#### E. 結論

正常人リンパ球においては、CX3CR1 のみがキラー細胞に選択的に発現していることを確認した。組織染色可能な抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体、抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体を作製した。マウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を作製して解析し、マウスにおいても CX3CR1 がエフェクターキラー細胞に発現していることが示唆された。エフェクターキラー細胞の GVHD マウスの肝臓への浸潤が、fractalkine を用いた CX3CR1 の脱感作で選択的に阻害された。

本研究において得られた抗体と新たな知見は、ヒトおよびマウスにおける進行性腎障害の疾患メカニズムの解明と治療のターゲットとしての評価を CX3CR1-fractalkine 系で実施するために有効である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 【論文発表】

- Umehara, H., E. Bloom, T. Okazaki, N. Domae and T. Imai (2001/11/8) "Fractalkine and vascular injury." *Trends Immunol.* **22**(11): 602-607.
- Umehara, H. and T. Imai (2001/10) "Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury." *Drug News Perspect.* **14**(8): 460-464.
- Yoshie O., T. Imai and H. Nomiya (2001/7/4) "Chemokines in immunity." *Adv. Immunol.* **78**: 57-110.
- Umehara H, Goda S, Imai T, Nagano Y, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Bloom ET, Domae N. (2001/6/22) "Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1." *Immunol. Cell. Biol.* **79**(3): 298-302.
- Harrison JK, Fong AM, Swain PA, Chen S, Yu YR, Salafranca MN, Greenleaf WB, Imai T, Patel DD. (2001/6/15) "Mutational analysis of the fractalkine chemokine domain. Basic amino acid residues differentially contribute to CX3CR1 binding, signaling, and cell adhesion." *J. Biol. Chem.* **276**(24): 21632-21641.
- Patel DD, Koopmann W, Imai T, Whichard LP, Yoshie O, Krangel MS. (2001/4/5) "Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients." *Clin. Immunol.* **99**(1): 43-52.
- 今井俊夫 (2001/4/1) "薬物ターゲットとしてのケモカイン受容体" *ファルマシア* **37**(4): 302-306.
- 今井俊夫 (2001/3/15) "ケモカイン受容体" 別冊・医学のあゆみ 7 回膜貫通型受容体研究の新展開, 医歯薬出版: 90-95.
- 今井俊夫、梅原久範 (2001/2/1) "フラクタルカインによる細胞遊走機構" *免疫・Immunology Frontier* **11**(1): 30-35.
- 今井俊夫 (2000/11/20) "CX3CR1" ケモカインハンドブック, 秀潤社: 215-219.
- 今井俊夫 (2000/11/20) "fractalkine" ケモカインハンドブック, 秀潤社: 142-145.
- 今井俊夫 (2000/4/22) "細胞接着、細胞浸潤とケモカイン" *細胞工学* **19**(5): 717-722.

13. Goda, S., T. Imai, O. Yoshie, O. Yoneda, H. Inoue, Y. Nagano, T. Okazaki, H. Imai, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000/4/15). "CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms." *J Immunol* **164**(8): 4313-4320.
14. Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000/4/15). "Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells." *J Immunol* **164**(8): 4055-4062.

【学会発表】

1. 第 30 回 日本免疫学会 シンポジウム (仙台) : Lymphocyte subsets and chemokine receptors: Toshio Imai, Osamu Yoshie
2. 第 30 回 日本免疫学会 (仙台) : エフェクターキラーリンパ球に選択的に発現する Fractalkine レセプター : 西村美由希, 米田 修, 梅原久範, 堂前尚親, 今井俊夫, 義江 修
3. 第 30 回 日本免疫学会 (仙台) : 単球と血管内皮細胞との接着における接着性ケモカイン, fractalkine の機能 : 梅原久範, 合田征司, 米田 修, 井上 博, 今井俊夫, 義江 修, 今井久夫, 堂前尚親
4. 第 30 回 日本免疫学会 (仙台) : Fractalkine による NK 細胞の活性化と IFN- $\gamma$  産生能 : 米田 修, 合田征司, 井上 博, 今井俊夫, 義江 修, 今井久夫, 梅原久範, 堂前尚親
5. 第 31 回 日本免疫学会 (神戸) : Migration of CX3CR1+ T cells producing Th1- or Tc1-type cytokines and granzyme

A, into the synovium of patients with rheumatoid arthritis: Lymphocyte subsets and chemokine receptors: Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Kenji Nagasaka, Yoshinori Nonomura, Ken Taniguchi, and Nobuyuki Miyasaka

6. 第 31 回 日本免疫学会 (神戸) : Fractalkine/CX3CR1 のマウスリンパ球における解析 : 西村美由希, 村本賢三, 今井俊夫
7. 第 31 回 日本免疫学会 (神戸) : Fractalkine による NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生能とその解析 : 米田 修, 井上 博, 西村美由希, 今井俊夫, 南 康博, 堂前尚親, 梅原久範
8. 第 31 回 日本免疫学会 (神戸) : Fractalkine の concanavalin A-induced hepatitis (ConA 肝炎)における機能解析 : 久保井良和, 村本賢三, 菱沼宇春, 西村美由希, 今井俊夫

H. 知的財産の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 名取泰博

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ou ZL, Hotta O, Natori Y, Sugai H, Taguma Y, Natori Y	Enhanced expression of chemokine lymphotactin in progressive IgA nephropathy	Nephron		in press	2002
Ito Y, Kawachi H, Morioka Y, Nakatsue T, Koike H, Ikezumi Y, Oyanagi A, Natori Y, Natori Y, Nakamura T, Gejo F, Shimizu F	Fractalkine expression and the recruitment of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis	Kidney Int		in press	2002
Ou ZL, Nakayama K, Natori Y, Doi N, Saito T, Natori Y	Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis	Am J Kidney Dis	37	411-417	2001

分担研究者 堀田修

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hotta O, Furuta T, Tomioka S, Chiba S, Taguma Y	Regression of IgA nephropathy: a repeat biopsy study.	Am J Kidney Dis	39	493-502	2002
堀田 修	IgA 腎症と粘膜免疫	医学のあゆみ	199	99-102	2001
Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y	Urinary macrophages as activity markers of renal injury.	Clinical Chemica. Acta.	297	123-133	2000
堀田 修	尿中単核球解析による内科的腎疾患の病態評価	臨床病理	48	99-102	2000
Hotta O, Yusa N, Ooyama M, Unno K, Furuta T, Taguma Y	Detection of urinary macrophages expressing the CD16 (Fc $\gamma$ RIII) molecule: a novel marker of acute inflammatory glomerular injury	Kidney Int.	55	1927-1934	1999
Hotta O, Furuta T, Chiba S, Yusa N, Taguma Y	Immunosuppressive effect of deoxyspergualin in proliferative glomerulonephritis.	Am. J. Kidney Dis.	34	894-901	1999

分担研究者 齋藤喬雄

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, Soma J, Sato T, Saito T, Ito S	Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis	Am J Kidney Dis	39(3)	475-485	2002
Jin S-L, Ootaka T, Soma J, Sato T, Sato H, Ito S and Saito T	The role of beta2 integrins in glomerular leukocytes in Henoch-Schoenlein purpura nephritis: An age-matched comparative study with IgA nephropathy	Nephrology	in press		2002
金 世蘭、大高徹也、相馬 淳、佐藤寿伸、佐藤 博、伊藤貞嘉、齋藤喬雄	紫斑病性腎炎白血球浸潤過程における beta2-インテグリンの関与：年齢をマッチした IgA 腎症との比較検討	東北大医短紀要	印刷中		2002
Uesugi N, Sakata N, Horiuchi S, Nagai R, Takeya M, Meng J, Saito T, Takebayashi S	Glycooxidation-modified macrophages and lipid peroxidation products are associated with the progression of human diabetic nephropathy	Am J Kidney Dis	38(5)	1016-1025	2001
Mochizuki S, Moriya T, Naganuma H, Narasaka T, Ueno Y, Sato H, Sasano H, Saito T	Significance of fat stains in serial sections from Epon-embedded tissue samples for electron microscopy in renal diseases	Clin Exp Nephrol	5(4)	240-245	2001

分担研究者 今井俊夫

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Umehara, H. and T. Imai	Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury.	Drug News Perspect	14(8)	460-464	2001
Umehara, H., E. Bloom, T. Okazaki, N. Domae and T. Imai	Fractalkine and vascular injury	Trends. Immunol	22(11)	602-607	2001
Harrison JK, Fong AM, Swain PA, Chen S, Yu YR, Salafraanca MN, Greenleaf WB, Imai T, Patel DD	Mutational analysis of the fractalkine chemokine domain. Basic amino acid residues differentially contribute to CX3CR1 binding, signaling, and cell adhesion.	J. Biol. Chem	276(24)	21632-21641	2001
今井俊夫	ケモカイン受容体	別冊医学のあゆみ		90-95	2001
今井俊夫 梅原久範	フラクタルカインによる細胞遊走機構	免疫 Immun. Frontier	11 巻 1 号	30-35	2001

Yoneda O, Imai T, Goda H, Inoue A, Yamauchi T, Okazaki T, Imai H, Yoshie O, E. T. Bloom, Domae N, Umehara H	Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells	J. Immunol.	164(8)	4055-4062	2000
Goda H, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, E. T. Bloom, Domae N, Umehara H	CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and independent mechanisms	J. Immunol.	164(8)	4314-4320	2000
今井俊夫	細胞接着、細胞浸潤とケモカイン	細胞工学	19巻 5号	717-722	2000

著者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	ページ	出版年
今井俊夫	CX3CR1	ケモカインハンドブック	秀潤社	215-219	2000
今井俊夫	fractalkine	ケモカインハンドブック	秀潤社	142-145	2000