

## 目 次

I. 総括研究報告書	中山俊憲	-----	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	18
III. 研究成果の刊行物・別刷		-----	21

# 総括研究報告書

...

## 免疫系の老化をターゲットにした細胞療法に関する研究

主任研究者 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院・教授

免疫系の老化は、T細胞の機能異常が最も顕著にみられ、加齢に伴って病原微生物に対するT細胞依存性の免疫反応が効率よく誘導できなくなる。事実、65歳以上の剖検時での直接の死因の第一位は感染症である(厚生省)。T細胞が効率よく病原微生物に対して免疫反応を起こすためには、異なったリンホカインを産生するTh1またはTh2タイプのメモリーT細胞にバランスよく機能分化する必要がある。我々は、これまでに老化マウスではTh2細胞の分化が障害を受けていることを報告してきた。また、最近、我々の研究室で発見された新しいリンパ球分画NKT細胞は、元々数が少ないために解析が遅れていたが、Th1/Th2細胞の分化調節に重大な役割を果たしていることが分かった。また、感染免疫、自己免疫疾患の発症抑制、ガン免疫などにも重要であることも明らかになった。このNKT細胞は加齢とともに激減し、60才以上のヒトでは、ほとんど検出できない。また、いくつかの自己免疫疾患の患者やがん患者でもその数は、激減している。1997年にこの細胞のみを特異的に活性化させる糖脂質( $\alpha$ -GalCer)が我々の施設で発見され、これを用いてヒトのNKT細胞を*in vitro*で培養し、現在のところ2週間で100倍程度に増殖させることが可能になった。

本研究では、免疫系の老化に伴うT細胞及びNKT細胞依存性の免疫能の低下を防止することを目的とし、老化とともに激減するNKT細胞に焦点をあてた細胞療法に関する基盤研究を行う。まず、自己のNKT細胞を*in vitro*で増やして細胞移入する、または活性化した樹状細胞に糖脂質( $\alpha$ -GalCer)をパルスして移入し、生体内のNKT細胞を効率よく増殖させる、などの手法に関する基礎研究を行う。NKT細胞に焦点を当てた細胞療法に関する臨床研究計画は、千葉大学医学部の倫理委員会で承認されている。米国FDAの細胞治療指針に従った細胞調整を行って、Phase Iに相当する研究を平成13年度から開始した。14年度末までに11例のPhase I相当の臨床研究が行われ、レベル1、レベル2、までの結果がまとまった。

## A. 研究目的

平成 12 年までの 3 年間の厚生科学研究費（長寿科学）などを用いた研究で、加齢にもなって見られる免疫不全は T 細胞の機能不全、特に Th2 細胞の分化の低下がその原因になっていることを、マウスの動物モデルと用いた研究で明らかにした。その後、ヒトの細胞での解析を始めるとともに、細胞治療によって加齢にもなって見られる T 細胞の機能不全を改善できないかどうかについて、研究を開始した。最近、我々の研究室で発見された新しいリンパ球分画 NKT 細胞は、元々数が少ないために解析が遅れていたが、Th1/Th2 細胞の分化調節、感染免疫、自己免疫疾患の発症抑制、ガン免疫などに重要な役割を果たしていることが分かってきた。この NKT 細胞は加齢とともに激減し、60 才以上のヒトでは、ほとんど検出できない。また、いくつかの自己免疫疾患の患者やがん患者でもその数は、激減している。1997 年にこの細胞のみを特異的に活性化させる糖脂質 ( $\alpha$ -GalCer) が我々の施設で発見され、これを用いてヒトの NKT 細胞も *in vitro* で培養すると増殖や活性化が誘導できる。本申請研究では、免疫系の老化に伴う T 細胞及び NKT 細胞依存性の免疫能の低下を改善することを旨として、老化とともに激減する NKT 細胞に焦点をあてた細胞療法に関する基盤研究を行う。

我々の計画している方法は、自己の末梢血リンパ球中の NKT 細胞を用い、*in vitro* で培養、増殖させた後体内に戻したり、自己の樹状細胞を *in vitro* で糖脂質 ( $\alpha$ -GalCer) によって活性化させた後に体内に戻すため、GVH や拒絶反応などの心配はない。 $\alpha$ -GalCer 単

独投与の Phase I の臨床試験は海外において行われており、今のところ毒性は非常に低いことが分かっている。我々の施設では、細胞調整は無菌室を用いて日常的に行っており、NKT 細胞療法のプロトコール樹立には、これまで行ってきた LAK 療法での経験が十分参考になる。さらに、今回は米国 FDA の細胞治療指針に従って細胞調整することを目指している。また、LAK 療法を行っているとき患者さんは風邪もひかないことが、経験的に分かっている。自己のリンパ球を用いた細胞療法は、補助療法として上手く使えば、特に高齢者での感染症予防、根治手術のあとの微小転移などをターゲットにしたがんの治療などに効力を発揮し、国民の保健医療のニーズに大いに貢献すると考えられる。

## B. 研究方法

### 1) 患者末梢血からの樹状細胞単離と効率的な抗原パルス法の確立

既存の樹状細胞の枠にとらわれず、CD1d 分子上に効率良く  $\alpha$ -GalCer を提示し、NKT 細胞をより強力に活性化する樹状細胞の培養条件を検討した。 $\alpha$ -GalCer は、キリンビールより GMP (Good Manufacturing Practice) grade のものを提供してもらって使用した。

### 2) NKT 細胞の分離と機能予測測定系の確立

$\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞の投与による患者生体内の NKT 細胞の活性化（活性化した NKT 細胞のデリバリー）を検出するシステムを確立する目的で検討を行った。

### 3) Single cell sorting/single cell PCR

## method の確立

末梢血中の NKT 細胞特異な機能を解析する方法として、IFN- $\gamma$  に焦点を当てた single cell sorting/single cell PCR method の確立を目指し、種々の条件検討を行った。

### 4) $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞によって活性化・増殖した肺内 NKT 細胞

$\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞を静脈内投与した際に、肺内における NKT 細胞の動態がどのように変化するかを確認する系を確立するために種々の条件検討を行った。活性化した NKT 細胞が、実際に肺内に集積（デリバリー）するかどうか、以下の方法で検討した。

1: C57BL/6 (B6) マウス脾臓細胞より樹状細胞を調整し、 $\alpha$ -GalCer をパルスする。

2: B6 マウスの尾静脈より  $3 \times 10^6$  個の  $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞を投与し、1, 3, 5, 7, 14 日後に肺を摘出する。

3: 摘出肺を細切後、コラゲナーゼ及びトリプシンインヒビターにて分解し、200 ゲージの金属メッシュにて濾過後、通過した細胞を回収し Percoll を用いた比重分離法にて肺単核球を分離する。

4: 得られた単核球を  $\alpha$ -GalCer/CD1d テトラマーを用いて染色し、FACS にて解析した。

### 5) ヒト NKT 細胞の組織分布と細胞数、頻度検出法の確立

肺癌手術患者の摘出標本を用いて肺内における NKT 細胞の同定法を確立するための種々の条件検討を行った。

### 6) NKT 細胞療法 Phase I 相当研究のプロトコールの確立

NKT 細胞療法 Phase I プロトコールの確立をめざし検討を行った。これは細胞調整を米国 FDA の細胞調整基準を遵守したもので、かつ GMP 基準を尊重した品質管理、品質保証を行う点が特徴である。 $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞投与の安全性評価を行うための Phase I 試験を 13 年度から 14 年度にかけて行った。

方法の概要を以下に示す。

Primary endpoint は安全性の評価（本治療との因果関係が否定できない有害事象を検討する）であり、Secondary endpoint は特異的免疫応答性の評価（免疫学的検査を実施し、各測定値の変化を検討する）に置いた。

患者群の適応基準としては、生検もしくは手術で非小細胞肺癌と確認された切除不能進行期肺癌もしくは肺癌術後再発症例で、年齢が 20 歳から 80 歳、Performance status が 0 ~ 2 であること、及び下記の検査値を満たしている症例（登録前 4 週間以内の測定結果）。白血球数  $\geq 3,000/\mu\text{L}$ 、血小板数  $\geq 75,000/\mu\text{L}$ 、血清クレアチン  $\leq 1.5\text{mg/dL}$ 、総ビリルビン  $\leq 1.5\text{mg/dL}$ 、AST (GOT)、ALT (GPT)  $\leq 2.5 \times$  基準値上限。本人及び代諾者からの文書による同意が得られており、末梢血に NKT 細胞が存在する症例（10 個以上/末梢血 1ml）。

除外基準としては、本臨床研究に参加する 6 週以内に化学療法あるいは放射線療法を施行しているか、予後が 6 ヶ月に満たないと考えられる症例。活動性の感染症を有するか肝炎及びその既往を有する症例。HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体又は HTLV-1 抗体が陽性の症例。同時性重複癌の症例もしくは重篤な心疾患のある症例 (NYHA Class III 以上)。併用薬としてコルチコステロイドを使用している症例。妊娠あるいは妊娠の可能性のある女性

および授乳期の女性。以上が除外項目である。

臨床研究期間中の調査・観察・検査項目としては、患者背景として年齢、生年月日、性別、身長、体重、初診年月日、臨床診断名、臨床病期、組織学的分類、前治療の有無、内容、合併症、既往歴、臨床症状、本人及び代諾者の同意の有無を記載することを設定した。一般的臨床所見として、脈拍、血圧、体温、呼吸状態、皮疹をチェックする。臨床検査項目として血液学的検査では白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、末血像、血液生化学検査では総蛋白、アルブミン、尿素窒素、クレアチニン、電解質、総ビリルビン、AST (GOT)、ALT (GPT)、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CRP、尿検査では蛋白、糖、潜血、ウロビリノーゲン、沈査を各細胞投与前後で検査することを設定した。その他心電図、一般肺機能検査を細胞投与前に施行しておく。免疫学的検査項目として末梢血 NKT 細胞数を投与前及び各樹状細胞投与後、観察期間中は毎週施行する。NKT 細胞のサイトカイン産生能として IFN- $\gamma$  産生能を NKT 細胞数の検査とともに検査する。樹状細胞は調製後、投与前に有核細胞数、細胞生存率を算出するとともに、調整した樹状細胞の培養液の汚染がないことを確認するために工程内無菌試験、エンドトキシン定量をそれぞれ施行し無菌性を確保する。

本臨床研究のデザインは、容量漸増法（容量3水準）によるオープン試験であり、その具体的手順として、アフェレーシスを実施して単核球分画採取後、1)樹状細胞 (DC) の患者アフェレーシス細胞からの培養、2)培養した DC への体外での $\alpha$ -GalCer (KRN7000) のパルス、3)パルスされた DC の同患者への

輸注（1週間間隔で2回投与）、の3段階よりなる。上記操作およびその後の3週間の観察期間をもって1クールとして実施。原則とし1クール目に重篤な有害事象の発生がなければ再度アフェレーシスを行い、もう1クール施行する（計2クール）。また、 $\alpha$ -GalCer をパルスした細胞の免疫反応に対する効果を見るために、1クール目には $\alpha$ -GalCer パルス細胞の投与に先立ち、 $\alpha$ -GalCer パルス処理なしの細胞をコントロールとして投与し、その免疫反応への影響を測定する。

具体的な細胞調整方法は以下の様である。

肺癌患者から、lymphapheresis (Spectra、COBE 社、附属病院輸血部) により単核球を分離、採取する。得られたアフェレーシス液を OptiPrep (Nycomed Amersham) 溶液を用いて遠心分離して単核球細胞を回収する（投与分を除いた単核球細胞は凍結保存）。分離した単核球細胞を 800 U/ml GM-CSF 500 U/ml IL-2 100 U/ml を添加した 2.5%アルブミン添加 AIM-V (GIBCO-BRL) 培地にて培養する。投与前日に、NKT 細胞の特異的リガンドである  $\alpha$ -GalCer (KRN7000) 100ng/ml を加えてさらに培養し、 $\alpha$ -GalCer パルス DC とする。

培養終了後、2.5%アルブミン加生理食塩水に懸濁して3回の洗浄処理（細胞の懸濁、遠心分離処理及び遠心上清の除去より成る工程）を行った後、2.5%アルブミン加生理食塩水に懸濁する。最終検査（細胞数、生存率、エンドトキシンの測定）で合格した細胞調製品を同一患者へ輸注する。

凍結保存した単核球細胞は、投与1週間前に解凍し、GM-CSF 及び IL-2 存在下にて培養を開始し、投与前日に $\alpha$ -GalCer を加え培養

し、 $\alpha$ -GalCer パルス DC を調整する。

細胞処理で使用する薬剤は安全性の観点からすべて GMP グレードのものを用いる。体外で用いられるものについては、細胞は洗浄後投与されるため、計算上患者へ直接投与される使用薬剤の量は極めて低く臨床的な直接作用は少ないと予想されたが、実際測ったところ、6.25ng/ml 以下であった。以下の GMP グレードのものを使用した。

### $\alpha$ -GalactosylCeramide (KRN7000)

KRN7000 は沖縄産の海綿 *Agelas mauritianus* より抗腫瘍活性物質として発見されたアゲラスフィンをリード化合物として開発された化合物で、樹状細胞 (DC) 上に発現している MHC クラス I 様分子、CD1d に提示され NKT 細胞を特異的に活性化する。KRN7000 の投与により癌の転移巣増殖を抑制し、担癌マウスの生存率を延長させた。製造元：キリンビール (株)

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade。

安全性：各種動物 (マウス、ラット、イヌ、サル) を用いた KRN7000 の I.V. 投与の安全性試験において、試験した最大の用量である 2200mg/kg まで死亡する動物や全身性の反応を示すような毒性は認められなかった。イヌを用いた 220～2200 mg/kg 用量の I.V. 単回投与の毒性試験においてアナフラキシー様症状が観察されたが、これは剤型中の界面活性剤 (ポリソルベート 20) の影響と考えられた (イヌにおいては、この種の界面活性剤に感受性が高いことが報告されている)。また、固形癌患者を対象とした KRN7000 の I.V. 投与による Phase I 試験においては、50～

4800 mg/m<sup>2</sup> の用量において、全 24 症例中 Grade3 の副作用として全身倦怠感 (3 例)、発熱 (1 例)、高血圧 (1 例)、咽頭痛 (1 例) が観察された。

### GM-CSF

アミノ酸 127 個からなる糖タンパクで、生体内では主に活性化 T 細胞より産生されるほか、内皮細胞、線維芽細胞からも産生される。骨髓細胞で好中球、マクロファージ、好酸球のコロニーを形成する。また、末梢血単核球に作用して樹状細胞への分化を誘導する作用があり、DC 療法では一般的に用いられている薬剤である。

製造元：GeneTech Co., Ltd, China (華北製薬)

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade

安全性：GM-CSF を 5～10 mg/kg/day 用量で I.V. 或は S.C. 投与した場合に、20～30% の患者で発熱、筋肉痛、倦怠感、注射部位反応等が見られた。

### IL-2 (イムネース Imunace)

アミノ酸 134 個からなるポリペプチドで、T 細胞増殖因子として同定された。主として T 細胞や NK 細胞に結合し、活性化することにより、細胞傷害能の高いキラー細胞を誘導し腫瘍を傷害すると考えられている。更に B 細胞やマクロファージにも結合し、免疫を賦活する。

製造元：塩野義製薬株式会社

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade

安全性：IL-2 は、適応症として血管肉腫の単

独承認を受け、第一選択剤として認知されている。1日70万単位を投与した場合の主な副作用として、発熱(71.9%)悪寒・戦慄(35.5%)倦怠感(27.1%)、臨床検査値の異常変動として好酸球増多、GOT上昇、GPT上昇が見られた。

#### 培地 AIM-V

製造元 GIBCO-BRL

品質: Good Manufacturing Practice (GMP) grade

安全性: 無血清合成培地。無菌性試験、エンドトキシンテスト済み。

#### OptiPrep

製造元: Nycomed Amersham

安全性: エンドトキシンテスト済み、滅菌溶液

#### 生理食塩水

製造元: 大塚製薬

品質: 指定医薬品。注射用医薬品の希釈・溶解に用いられるもの。

#### ブミネート 25% (人血清アルブミン)

本剤は、血液を原料としてFDAで認可された方法によりHBs抗原陰性、HCV抗体陰性、HIV-1/HIV-2抗体陰性を確認された純度96%以上のアルブミン濃度25W/V%のアルブミン製剤である。本剤の製造工程において、HIVをはじめとする各種ウイルスが除去・不活化されることが確認されている。本臨床研究においては、生理食塩水に最終2.5%となるように

添加した2.5%アルブミン加生理食塩水として、調製細胞の洗浄及び細胞を懸濁して輸注するために使用するほか、2.5%アルブミン加メディウムとして細胞培養に用いる。

製造元: バクスター

品質: 指定医薬品

安全性: 成人1回20~50ml投与した場合の副作用としては、ショック(呼吸困難、血圧低下、チアノーゼ等)、過敏症(発熱、顔面紅潮、蕁麻疹等)、悪寒、腰痛等がみられることがある。但し、使用成績調査等の副作用発現効率が明確となる調査は実施されていない。

#### セルバンカー 2

本試薬は、アフェレーシスと密度勾配遠心分離操作で回収した細胞を長期に渡って凍結保存するために使用する。血清成分等のタンパク成分を含まない無血清タイプ。

製造元: 日本全薬工業、販売元: 十慈ワールド株式会社

安全性: 品質保証として、無菌試験(細菌、真菌、マイコプラズマ混入なし)、迷入ウイルス否定試験、化学試験(pH、エンドトキシン)済み。

投与する細胞は2.5%アルブミン加生理食塩水に浮遊させた後、生細胞数を計算し、末梢静脈経路にて15分以上かけて患者に輸注する。

各levelにおける投与量はレベル1では $5.0 \times 10^7$ 個/m<sup>2</sup>、レベル2では $2.5 \times 10^8$ 個/m<sup>2</sup>、レベル3では $1.0 \times 10^9$ 個/m<sup>2</sup>、と決定した。次レベルへの移行条件は、研究責任医師が各レベル最後の評価可能症例2クール終



了時の安全性に関するデータをもとに、次レベルへの移行を以下の条件に基づいて決定し、細胞治療効果安全性評価委員会に研究の継続について諮問する。

細胞治療効果安全性評価委員会は、独自に研究責任医師の判断の妥当性について検討し、検討結果を研究責任医師へ答申する。各レベルの症例数は、評価可能症例として各3例ずつとする。少なくとも、最初の患者の1クール目投与後2週間以内にDLT (dose limiting toxicity) が観察されなかった場合、次の2患者のエントリーを可能とする。ただし、DLTが観察された場合は、同一の用量をさらに3例追加して評価する。その場合、患者は2週間の間隔をおいて段階的にエントリーする。

2/6例以上にGrade 3以上の本治療と因果関係の否定できない有害事象を認めた場合は、次投与量へは移行せず、その投与量をMTD (maximum tolerated dose) とする。

なお、何らかの問題が生じ、研究責任医師が研究の継続について検討を要すると判断した場合は、細胞治療効果安全性評価委員会を開催する。細胞治療効果安全性評価委員会は、諮問内容について検討し、研究の継続に対する答申を回答する。

臨床研究に参加する被験者の安全を守るために、臨床研究期間中に自覚症状、他覚所見、臨床検査等で判明した有害事象の全てについて詳細に内容を調査し(有害事象の名称、発現日時、転帰、細胞投与の継続性、併用療法の有無と内容、治療の有無、内容、入院の有無、入院期間の延長の有無、重症度)症例報告書に記載する。また細胞投与との因果関係につき5分類で判定する(明らかに関連あり、多分関連あり、関連の可能性あり、多分関連

なし、関連なし)。発現した有害事象のうち、因果関係が否定できないもの(因果関係:明らかに関連あり、多分関連あり、関連の可能性あり)を副作用として取り扱う。なお、副作用の追跡調査は、可能な限り本治療前の状態に回復するまで行う。

## 倫理面への配慮

動物実験は千葉大学の実験動物委員会の定める規定を遵守して行う。ガン患者でのNKT細胞の細胞移入(千葉大学大学院医学研究院胸部外科学、藤沢武彦教授との共同研究)はすでに千葉大学医学部で倫理委員会の承認を得ている。免疫系の老化をターゲットにした細胞療法に関する研究計画は、具体的なプロトコールが確立した後、千葉大学医学部での倫理委員会に申請する予定である。

## C. 研究結果

### 1) 患者末梢血からの樹状細胞単離と効率的な抗原パルス法の確立

アフエレーシスを行った後、全単核球分画をIL-2とGM-CSFを用いて培養し、1週間後に $\alpha$ -GalCerの抗原提示能をマウスNKT細胞をターゲットにして調べた結果、IL-4(通常の樹状細胞誘導に必要)がなくても十分に抗原提示能があることが明らかになった。また、マウスNKT細胞の抗腫瘍活性誘導能で見た場合も同様であった。また、樹状細胞を分離しても活性の増強はなく、操作過程でのロスを考えると、全単核球分画の使用が妥当であることが分かった(図1)。従って、全単核球分画をIL-2とGM-CSFを用いて培養することに決定した。

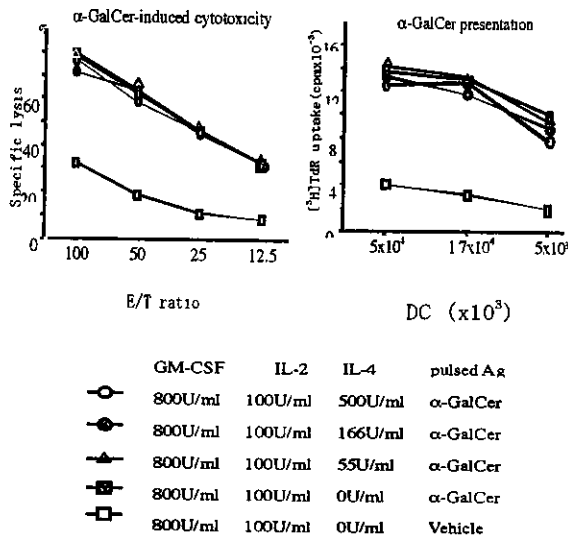


図1 GM-CSF および IL-4 を用いてヒト末梢血単核球より樹状細胞を誘導することが可能である。この方法によって健康人末梢血より GM-CSF、IL-2 および濃度を漸減させた IL-4 を用いて樹状細胞を調整し、それらの細胞傷害活性誘導能 (左図) 及び  $\alpha$ -GalCer 提示能 (右図) を評価した。図に示したように  $\alpha$ -GalCer 提示能および細胞傷害活性誘導能はいずれの IL-4 濃度で誘導した樹状細胞においてもほぼ同等であった。

## 2) NKT 細胞の分離と機能予測測定系の確立

いくつかの方法の中から、患者末梢血中 NKT 細胞を特異的に分離し機能を測定する方法として、PCR amplification Southern blotting method を確立した。以下は確立した方法である。

- 1: 原発性肺癌患者末梢血を約 20ml 採血する。Ficoll を用いた比重遠心法にて単核球を分離する。
- 2: 分離した単核球数を算出した後、単球を panning 法により除去する。
- 3: 単球除去後、再度細胞数を算出し、固相化 anti-CD3 抗体処理した 96 well plate に  $2 \times 10^6$  個/well にて 16 時間刺激を入れる。
- 4: 細胞回収後、TCR anti - V $\alpha$ 24-FITC, anti - V $\beta$ 11 - PE にて染色する。
- 5: FACS Vantage cell sorter ( Becton Dickinson ) を用いて、TCR anti-V $\alpha$ 24-FITC, anti-V $\beta$ 11-PE double positive cell を RNA 抽出のための lysis buffer

が入った 96 well plate に 100 個/well でソートしてくる (図 2)。

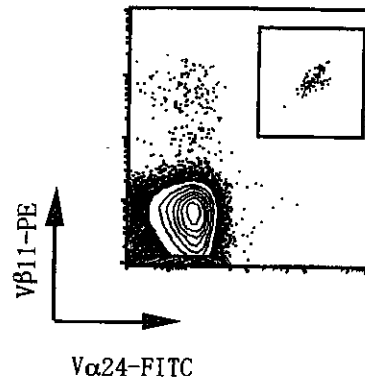


図2 肺癌患者末梢血単核球の FACS profile TCR anti-V $\alpha$ 24-FITC, anti-V $\beta$ 11-PE double positive fraction (四角内) を sorter にて回収し、NKT 細胞のみを解析することが可能となる。

- 6: ソートした細胞は lysis buffer 中で室温下 10 分間処理し、total RNA を抽出する。この RNA より 8  $\mu$ l の 5x buffer (100mM Tris-HCl at pH 8.5, 150 mM KCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM DTT, 0.5mg/ml BSA), 0.5  $\mu$ l の oligo pd(T)<sub>12-18</sub> (500  $\mu$ g/ml, Amersham Pharmacia Biotech), 2  $\mu$ l の dNTPs (2mM), 0.2  $\mu$ l の Superscript II (40 units, Gibco-BRL) 及び DEPC-DDW を加えて計 40  $\mu$ l を用いて cDNA を合成する (42°C で 50 分インキュベート後、70°C で 15 分インキュベート)。
- 7: IFN- $\gamma$  特異的プライマーを用いて PCR 施行し、PCR 産物に対して <sup>32</sup>P でラベルした IFN- $\gamma$  特異的プローブを作製し hybridize させ、得られたバンドの intensity を densitometer で数値化し評価する。
- 8: IFN- $\gamma$  コピー数が既知の PCR 産物に対して  $2.7 \times 10^3$  コピーよりの希釈系列を作製、IFN- $\gamma$  特異的プローブを hybridize させ、得られたバンドの intensity を densitometer で数値化し標準曲線を作製

する(図 3)。得られた標準曲線より、サンプルのコピー数を算出する。

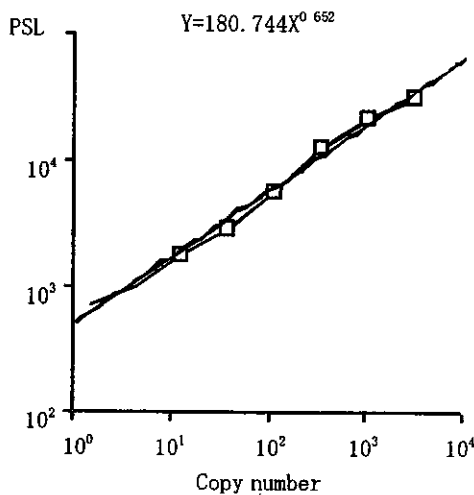


図3 PCR amplification Southern blotting によって得られた standard curve の一例  
( $0.9 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $3.3 \times 10^2$ ,  $1.1 \times 10^2$ ,  $3.7 \times 10^2$  コピー)  
PSL: photostimulated luminescence

これにより  $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞投与後の NKT 細胞特異的免疫反応として、NKT 細胞による IFN- $\gamma$  産生能の評価方法が確立された。

### 3) Single cell sorting/single cell PCR method の確立

高齢者の末梢血 NKT 細胞の機能を解析しようとするとその絶対数が有意に減少しているため、機能解析するための細胞数確保が非常に困難になる。したがって、single cell レベルで、各細胞内で目的とする mRNA が発現しているかどうかを検証する方法を確立した。この方法は、実際に細胞治療を行ったヒトで、活性化した NKT 細胞のデリバリーを機能面で測定するためのシステムの樹立である。

- 1: 末梢血を約 20ml 採血する。Ficoll を用いた比重遠心法にて単核球を分離する。
- 2: 分離した単核球数を算出した後、単球を panning 法により除去する。
- 3: 単球除去後、再度細胞数を算出し、固相化 anti-CD3 抗体処理した 96 well plate に  $2 \times 10^6$  個/well にて 16 時間刺激を入れる。

- 4: 刺激後、細胞回収し、TCR anti-V $\alpha$ 24-FITC, anti-V $\beta$ 11-PE にて染色する。
- 5: FACS Vantage cell sorter ( Becton Dickinson ) を用いて、TCR anti - V $\alpha$ 24 - FITC, anti - V $\beta$ 11 - PE double positive cell を RNA 抽出のための lysis buffer が入った 96 well plate に 1 個/well でソートしてくる。
- 6: ソートした細胞は Lysis buffer 中で室温下 10 分間処理し、total RNA を抽出する。この RNA より 8  $\mu$ l の 5x buffer (100mM Tris-HCl at pH 8.5, 150 mM KCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM DTT, 0.5mg/ml BSA), 0.5  $\mu$ l の oligo pd(T)<sub>12-18</sub> ( 500  $\mu$ g/ml, Amersham Pharmacia Biotech), 2 $\mu$ l の dNTPs (2mM), 0.2 $\mu$ l の Superscript II ( 40 units, Gibco - BRL) 及び DEPC-DDW を加えて計 40  $\mu$ l を用いて cDNA を合成する (42°C で 50 分インキュベート後、70°C で 15 分インキュベート)。
- 7: TCR V $\alpha$ 24 と TCR C $\alpha$  特異的配列のプライマーを用いて nested PCR を施行し、NKT 細胞特異的配列が認められた well に対して、IFN- $\gamma$  特異的プライマーを用いて、その発現を検出する。
- 8: 高齢者肺ガン患者を例にした解析で、検出された NKT 細胞数のうち、IFN- $\gamma$  の mRNA が発現している割合を図に示した。このシステムによって検討した結果、高齢者肺ガン患者の末梢血 NKT 細胞と健康人末梢血 NKT 細胞との IFN- $\gamma$  の産生能の平均値は、55.7%対 58.9%で有意な差がないことが判明した(図 4)。

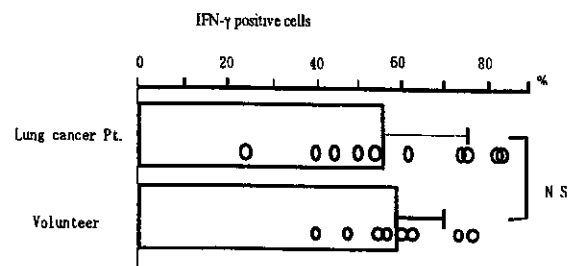


図4 肺癌患者末梢血中 NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生細胞の割合  
肺癌患者及び健康人末梢血より単核球を分離し、anti-CD3 刺激後、NKT 細胞を single cell に分離し、IFN- $\gamma$  の mRNA を検出した細胞数の割合を示す。肺癌患者と健康人との間に有意な差は認めなかった。  
N.S. not significant

#### 4) $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞によって活性化・増殖した肺内 NKT 細胞

図 5 に示すように、 $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞をマウスに投与すると、1 日目には肺内 NKT 細胞数は消失するものの 3 日後には約 10 倍に増加し、1 週間にわたって投与前値より高い状態を維持することが判明した。

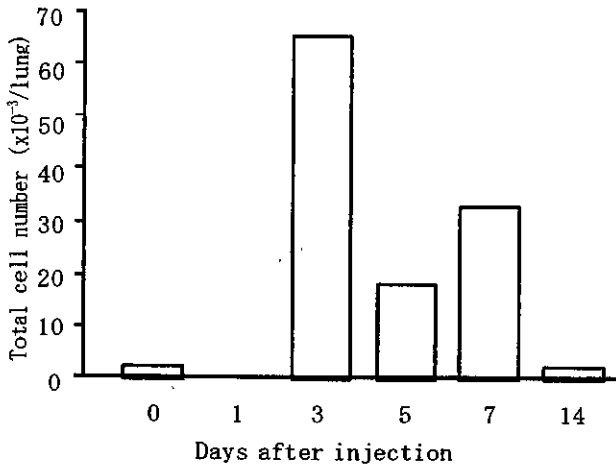


図 5  $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞投与後のマウス肺内 NKT 細胞の動態  
 $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞を肺内投与し、1, 3, 5, 7, 14 日後の肺内 NKT 細胞の絶対数を示す。投与翌日には NKT 細胞は消失するものの 3 日後には回復し投与前より高値が 1 週間にわたり持続することが判明した。

の intensity を densitometer で数値化し標準曲線を作製する。得られた標準曲線より、サンプルのコピー数を算出する。

- 4: この方法により、肺癌切除肺内における非腫瘍部と比較し、腫瘍部は約 2.5 倍の NKT 細胞を含んでいることが判明した (図 6)。

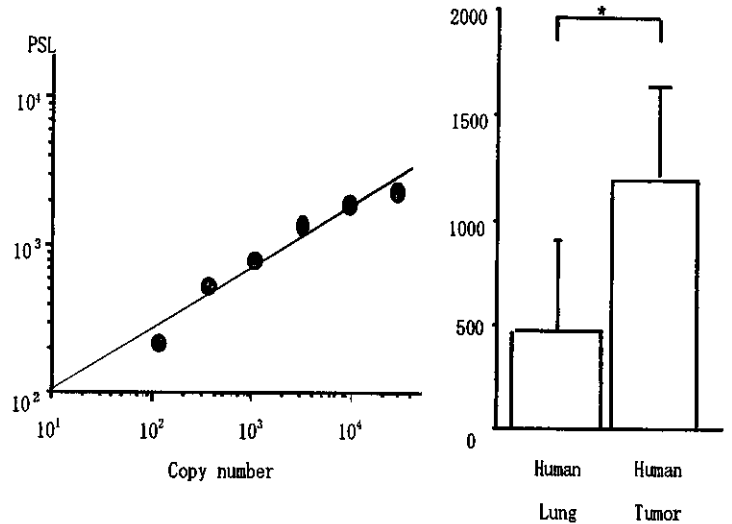


図 6 ヒト肺癌患者切除肺中の腫瘍部および非腫瘍部での NKT 細胞数の解析  
左図・PCR amplified Southern blotting によって得られた standard curve の一例  
(●,  $2.7 \times 10^2$ ,  $9 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $3.3 \times 10^4$ ,  $1.1 \times 10^5$  コピー)  
PSL, photostimulated luminescence  
右図・ヒト肺組織中の腫瘍部と非腫瘍部での NKT 細胞数の比較。腫瘍部は有意に非腫瘍部よりも NKT 細胞数は増加している。  
\* $p=0.02$

#### 5) ヒト NKT 細胞の組織分布と細胞数、頻度検出法の確立

肺癌手術患者の摘出標本肺内における NKT 細胞の同定法を検討し、以下の方法を確立した。

- 1: 原発性肺癌患者の手術時摘出肺の非腫瘍部及び腫瘍近傍部の組織を採取し、genomic DNA を抽出する。
- 2: Va24-JaQ 配列に特異的プライマーを用いて PCR を施行し、PCR 産物に対して <sup>32</sup>P でラベルした Va24-JaQ 配列に特異的プローブを作製し hybridize させ、得られたバンドの intensity を densitometer で数値化する。
- 3: Va24-JaQ 配列のコピー数が既知の PCR 産物に対して  $2.7 \times 10^3$  コピーよりの希釈系列を作製、Va24-JaQ 配列特異的プローブを hybridize させ、得られたバンド

#### 6) NKT 細胞療法 Phase I 相当研究の結果

(I) primary end point としての安全性の評価 (本治療との因果関係が否定できない有害事象を検討する) のまとめ。

これまでに、投与細胞数が最小 ( $5 \times 10^7/m^2$ ) の Level 1 から開始し、平成 15 年 3 月までに Level 1 の 5 例、Level 2 の 3 例を施行した。Level 1 の 2 例は原疾患の悪化のためプロトコール途中にて脱落となった。最終的に評価可能であった 3 例においては細胞投与に関連する重篤な有害事象 (NCI の Common Toxicity Criteria において Grade 2 を越える有害事象) は認められなかった。Grade 2 以下の有害事象としては、1 例で細胞投与直後の頭痛、顔面紅潮、2 例で血清中のカリウ

ム上昇を認め、1例で血清中のクレアチニン上昇を認めた。抗腫瘍効果の面では、2クール終了後に評価可能であった3例においてNo Change (NC) 1例、Progressive Disease (PD) 2例であった。細胞治療効果安全性評価委員会にレベルアップに関して諮問し、承認を受けた後、投与細胞数が  $2.5 \times 10^8/m^2$  の Level 2 を、3例施行することを予定として開始した。 $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞投与の安全性評価につき、投与細胞数が  $2.5 \times 10^8/m^2$  である Level 2 を施行し、平成 14 年度内に 3 例を完了した。Level 2 においても細胞投与に関連する Grade 3 以上の重篤な有害事象は認めなかった。Grade 2 以下の有害事象としては、1例では血清カリウム値の上昇、1例で血清総ビリルビン値の上昇を認めた。これらの有害事象と細胞投与との間には関連性は認められなかった。

(II) Secondary endpoint としての特異的免疫応答性の評価（免疫学的検査を実施し、各測定値の変化を検討する）のまとめ。

Level 1 での  $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞投与と末梢血 NKT 細胞数の変化および NKT 細胞特異的な IFN- $\gamma$  産生能の間には有意な相関を認めなかった。

Level 2 での  $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞投与と末梢血 NKT 細胞数の変化および NKT 細胞特異的な IFN- $\gamma$  産生能の間にも有意な相関を認めなかった。

#### D. 考察

NKT 細胞に関する研究では、NKT 細胞の発見・腫瘍免疫分野での重要性など我々のグループは、世界に先駆けてマウス及びヒトでの研究成果を報告してきた経験がある。NKT 細胞を特異的に活性化させる物質は現在のところ  $\alpha$ -GalCer しか見つかっていない。NKT 細胞数が加齢とともに激減することが、我々のヒトでの解析から明らかになり、自己のリンパ球を *in vitro* で増やし体内に戻してやる

細胞療法によって高齢者での感染症やがんの補助療法に使うことは出来ないか。こういった視点で、NKT 細胞をターゲットにした細胞療法の基礎研究を行っている施設は我々のほかに報告はない。すでに、いくつかの基礎実験（無血清培地を用いた細胞の培養条件の確立、GMP レベルでの細胞調整システムの確立、移入細胞の活性の評価方法、生体内での NKT 細胞の活性化及び数の評価など）はおわり、Phase I 相当の研究を行っている。Phase I の level 3 の研究を続けている。

NKT 細胞療法 Phase I の研究に関しては、一人の患者の治療と経過観察に 2 ヶ月以上の日時がかかるうえ、レベルの上昇にはそれ以前のレベルでの安全性の確認と、細胞治療効果安全性評価委員会の承認という厳格なプロセスをへた上で臨床研究を行っている。これまでわずかに 11 例しか施行されていない理由はそこにある。さらに、本臨床研究では、米国 FDA の細胞調整基準を遵守したやり方、かつ GMP レベルを尊重した細胞調整を行う点は厳格に遵守している。我々はこの点は非常に重要であると考えている。結果の項で述べたように、幸い、これまでに重篤な有害事象は現れていない。マウスを用いた動物実験では、level 3 相当の細胞数での治療によって初めて、十分な NKT 細胞の活性化と抗腫瘍効果が期待できるという基礎データがあり、これからデータが集積される level 3 での治療によって、どの様に NKT 細胞免疫系が反応し、抗腫瘍効果を発揮してくるのか、期待をもって研究を続けている。来年度は、level 3 の治療を完了させるとともに、3 年間の研究をまとめる。

#### E. 結論

今年度の研究で、人の細胞を *in vitro* で培養し、本人に戻すための手順などの基礎研究がほぼ完了したと考えている。いつも同じ

活性の細胞の調整ができたこと、増殖効率が一定して細胞数の予測が可能になったこと、調整細胞の機能の評価を適切に行うことなど、一連の細胞調整手法の樹立についての検討がだいたい終わった。現在のところ level 2 までの細胞数では、特記する重大な有害事象は検出されていない。以上の成果をふまえ、次年度は、Phase I の level 3 ( $1 \times 10^9$ ) の臨床研究を完了させ、細胞治療の基盤を樹立することを目指す。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

1. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A.: Minimal contribution of V $\alpha$ 14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 46:207-210 (2002).
2. Shibata, Y., Kamata, T., Kimura, M., Yamashita, M., Wang, C.-R., Murata, K., Miyazaki, M., Taniguchi, M., Watanabe, N., and Nakayama, T.: Ras activation in T cells determines the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation. *J. Immunol.* 169:2134-2140 (2002).
3. Sfondrini, L., Besusso, D., Zoia, M. T., Rodolfo, M., Invernizzi, A. M., Taniguchi, M., Nakayama, T., Colombo, M. P., Menard, S., and Balsari, A.: Absence of the CD1 molecule up-regulates antitumor activity induced by CpG oligodeoxynucleotides in mice. *J. Immunol.* 169:151-158 (2002).
4. Kikkawa, E., Yamashita, M., Kimura, M., Omori, M., Sugaya, K., Shimizu, C., Katsumoto, T., Ikekita, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 cell differentiation of developing CD4 single-positive thymocytes. *Int. Immunol.* 14:943-951 (2002).
5. Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Omori, M., Inami, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal of the IL-13 gene locus. *J. Biol. Chem.* 277:42399-42408 (2002).
6. Motohashi, S., Kobayashi, S., Magara, K., Iizasa, T., Nakayama, T., Fujisawa, T., and Taniguchi, M.: Preserved IFN- $\gamma$  production of circulating V $\alpha$ 24 NKT cells in primary lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 102:159-165 (2002).
7. Asai, K., Hachimura, S., Kimura, M., Toraya, T., Yamashita, M., Nakayama, T., and Kaminogawa, S.: T cell hyporesponsiveness induced by oral administration of ovalbumin is associated with impaired NFAT nuclear translocation and p27<sup>kip1</sup> degradation. *J.*

*Immunol.* 169:4723-4731 (2002).

(2003).

8. Sugawara, I., Yamada, H., Mizuno, S., Li, C. Y., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice. *Tuberculosis* 82:97-104, 2002.
9. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang C.-R., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: *src* homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Inv.* 111:109-119, 2003.
10. Kubo, S., **Nakayama, T.**, Matsuoka, K., Yonekawa, H., and Karasuyama, H.: Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J. Immunol.* 170:775-780, 2003.
11. Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's Patch. *Int. Immunol.* 15:393-402, 2003.
12. Taniguchi, M., Harada, M., **Nakayama, T.**, and Wakao, H.: The regulatory role of V $\alpha$ 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Ann. Rev. Imm.* 21:483-513 (2003).
13. Nakamura, Y., Yasunami, Y., Satoh, M., Hirakawa, E., Katsuta, H., Ono, J., Kamada, M., Todo, S., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Ikeda, S.: Acceptance of islet allografts in the liver of mice by blockade of an inducible costimulator. *Transplantation* in press.
14. Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., **Nakayama, T.**, and Koseki, H.: Mesenchymal expression of Fok11, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs. *Developmental Biol.* in press.
15. Ashcroft, G. S., Mills, S. J., Lei, K., Gibbons, L., Burow, M., Jeong, M.-J., Taniguchi, M., Horan, M. A., Wahl, S. M., and **Nakayama, T.**: Estrogen modulates cutaneous wound healing by down-regulating macrophage migration inhibitory factor. *J. Clin. Inv.* in press.
16. Shirai, T., Magara, K. K., Motohashi, S., Yamashita, M., Kimura, M., Suwazomo, Y., Nogawa, K., Kuriyama, T., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: Th1-biased immunity induced by exposure to Antarctic winter. *J. Allergy Clinical Immunol.* in press.
17. Akbari, O., Meyer, E., Stock, P., Kronenberg,

M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., DeKruyff, R. H., and Uematsu, D. T.: Critical role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen induced airway hyperreactivity. *Nature Med.* in press.

18. Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T.: Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol.* in press.

## 2. 学会発表

1. 中山俊憲、藤澤武彦、谷口克 NKT 細胞とがん免疫療法 第 61 回日本癌学会総会シンポジウム 2002 年 10 月 1-3 日、東京
2. 中山俊憲、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男 光化学反応による血小板血栓形成のイメージングを用いた CD69 機能の解析 第 11 回日本バイオイメージング学会 2002 年 10 月 30 日-11 月 1 日、名古屋
3. Nakayama, T.: Regulation of histone hyperacetylation at the Th2 cytokine gene loci. 第 32 回日本免疫学会総会シンポジウム 2002 年 12 月 4-6 日、東京
4. 小池順造、石塚祐子、佐藤高明、濱沖勝、

古関明彦、中山俊憲、谷口克 新規 C-type lectin family NK receptor, NKG2Dh の機能解析 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

5. 中井之人、岩淵和也、藤井聡、石森直樹、綿野敬子、三島鉄也、中山俊憲、谷口克、Van KaerLuc、三宅幸子、山村隆、小野江和則  $\alpha$ -GalCer および OCH による NKT 細胞の活性化はいずれも動脈硬化促進性に寄与する 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京
6. 下中美香、片桐晃子、中山俊憲、木梨達雄 ケモカインによる LFA-1/ICAM-1 接着及び遊走亢進における Rap1 の役割 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京
7. 尾高正朗、小谷素子、羽廣克嘉、鈴木恵子、橋詰修人、平田和也、中山俊憲、谷口克、安部良 接触性過敏症誘導におけるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京
8. 山下政克、鵜飼磨貴、谷口克、中山俊憲 Th2 サイトカイン遺伝子座クロマチンリモデリングに必要な GATA3 結合部位の同定 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京
9. 鵜飼磨貴、山下政克、谷口克、中山俊憲 Cre/loxP を用いた新しい Th1/Th2 細胞分化解析系の開発 第 32 回日本免疫学



会総会 2002年12月4-6日、東京

特になし。

10. 勝本拓夫、信賀順、木村元子、谷口克、古関明彦、中山俊憲 新規ポリコーム群遺伝子 MBLR の T 細胞のサイトカイン産生における役割 第 32 回日本免疫学会総会 2002年12月4-6日、東京

## 2. 実用新案登録

特になし。

11. 若尾宏、近藤英介、伊藤俊広、柴田陽一、古関明彦、竹森利忠、中山俊憲、谷口克 パイエル板成熟 T 細胞における RAG2 の発現とその機能 第 32 回日本免疫学会総会 2002年12月4-6日、東京

12. 鵜飼磨貴、山下政克、谷口克、中山俊憲 Cre/loxP システムを使った in vitro Th1/Th2 細胞分化解析系の開発 第 25 回日本分子生物学会年会 2002年12月11-14日、横浜

13. 木村元子、小原収、谷口克、中山俊憲 cDNA マイクロアレイを用いた Th2 細胞の維持機構に関わる遺伝子の検索 第 25 回日本分子生物学会年会 2002年12月11-14日、横浜

14. 山下政克、鵜飼磨貴、谷口克、中山俊憲 IL-4, IL-13 遺伝子座のヒストンアセチル化誘導に必要な GATA3 結合部位の同定 第 25 回日本分子生物学会年会 2002年12月11-14日、横浜

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

## 研究成果の刊行に関する一覧表

...

## 別紙 5

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

なし

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A	Minimal contribution of V $\alpha$ 14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice.	<i>Microbiol. Immunol.</i>	46	207-210	2002
Shibata, Y., Kamata, T., Kimura, M., Yamashita, M., Wang, C.-R., Murata, K., Miyazaki, M., Taniguchi, M., Watanabe, N., and Nakayama, T.	Ras activation in T cells determines the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation.	<i>J. Immunol.</i>	169	2134-2140	2002
Sfondrini, L., Besusso, D., Zoia, M. T., Rodolfo, M., Invernizzi, A. M., Taniguchi, M., Nakayama, T., Colombo, M. P., Menard, S., and Balsari, A.	Absence of the CD1 molecule up-regulates antitumor activity induced by CpG oligodeoxynucleotides in mice.	<i>J. Immunol.</i>	169	151-158	2002
Kikkawa, E., Yamashita, M., Kimura, M., Omori, M., Sugaya, K., Shimizu, C., Katsumoto, T., Ikekita, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T.	T $_H$ 1/T $_H$ 2 cell differentiation of developing CD4 single-positive thymocytes.	<i>Int. Immunol.</i>	14	943-951	2002
Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Omori, M., Inami, M., Taniguchi, M., and Nakayama, T.	Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal of the IL-13 gene locus.	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	42339-42408	2002
Motohashi, S., Kobayashi, S., Magara, K., Iizasa, T., Nakayama, T., Fujisawa, T., and Taniguchi, M.	Preserved IFN- $\gamma$ production of circulating V $\alpha$ 24 NKT cells in primary lung cancer patients.	<i>Int. J. Cancer</i>	102	159-165	2002
Asai, K., Hachimura, S., Kimura, M., Toraya, T., Yamashita, M., Nakayama, T., and Kaminogawa, S.	T cell hyporesponsiveness induced by oral administration of ovalbumin is associated with impaired NFAT nuclear translocation and p27 <sup>kip1</sup> degradation.	<i>J. Immunol.</i>	169	4723-4731	2002
Sugawara, I., Yamada, H., Mizuno, S., Li, C. Y., Nakayama, T., and Taniguchi, M.	Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice.	<i>Tuberculosis</i>	82	97-104	2002
Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami, M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang C.-R., Taniguchi, M., and Nakayama, T.	src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation.	<i>J. Clin. Inv.</i>	111	109-119	2003
Kubo, S., Nakayama, T., Matsuoka, K., Yonekawa, H., and Karasuyama, H.	Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE.	<i>J. Immunol.</i>	170	775-780	2003

Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito, T., Nakayama, T., and Taniguchi, M..	Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's Patch.	<i>Int. Immunol</i>	15	393-402	2003
Taniguchi, M., Harada, M., Nakayama, T., and Wakao, H.	The regulatory role of V $\alpha$ 14 NKT cells in innate and acquired immune response.	<i>Ann. Rev. Imm.</i>	21	483-513	2003
Nakamura, Y., Yasunami, Y., Satoh, M., Hirakawa, E., Katsuta, H., Ono, J., Kamada, M., Todo, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Ikeda, S.	Acceptance of islet allografts in the liver of mice by blockade of an inducible costimulator..	<i>Transplantation</i>			in press
Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., Nakayama, T., and Koseki, H.	Mesenchymal expression of Fok1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs.	<i>Developmental Biol.</i>			in press.
Ashcroft, G. S., Mills, S. J., Lei, K., Gibbons, L., Burow, M., Jeong, M-J., Taniguchi, M., Horan, M. A., Wahl, S. M., and Nakayama, T.	Estrogen modulates cutaneous wound healing by down-regulating macrophage migration inhibitory factor.	<i>J. Clin. Inv.</i>			in press
Shirai, T., Magara, K. K., Motohashi, S., Yamashita, M., Kimura, M., Suwazomo, Y., Nogawa, K., Kuriyama, T., Taniguchi, M., and Nakayama, T.	Th1-biased immunity induced by exposure to Antarctic winter.	<i>J. Clinical Allergy Immunol.</i>			in press
Akbari, O., Meyer, E., Stock, P., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., DeKruyff, R. H., and Uematsu, D. T.	Critical role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen induced airway hyperreactivity.	<i>Nature Med.</i>			in press
Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T.	Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow..	<i>J. Cell Biol.</i>			in press