

ヒト血液細胞などに対する遺伝子導入効率改善による効果的DDS技術開発

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長
協力研究者 佐伯 久美子 国立国際医療センター研究所室長
協力研究者 小柳 真 国立国際医療センター研究所研究生

研究要旨 ヒト血液細胞への遺伝子や蛋白などの分子導入が困難で、このことが効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。本研究においては、ヒト血液細胞株を用いて、遺伝子 (オリゴヌクレオチド、プラスミド) の導入効率改善を試みた。蛍光指標としては、FITC などの従来より用いられてきたものの他に、量子ドットも用いた。又、一部の実験においては、マウスの *in vivo* の系への応用も考慮して、マウス細胞株での検討を行った。検討した遺伝子導入手法は、HVJエンベロープベクターで、遺伝子と蛋白の導入において有効であった。また、細胞の系として、血液細胞のみではなくサルES細胞の系の確立につとめた。

A. 研究目的

ヒト血液細胞への分子導入は極めて困難であることは良く知られている。この状況は、正常血球であっても白血病細胞であってもほぼ同様であり、また、導入分子がプラスミドサイズの遺伝子であっても、低分子量のオリゴヌクレオチドであっても、同様である。このような状況は、様々の疾患に対する新しい分子標的療法を行う際の、効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。

今回の研究では、このような状況を打破するためにヒト血液細胞 (株) への効率の良い遺伝子導入法の開発を試みた。また、血液細胞以外の系として、ES細胞の分化の系を検討した。

B. 研究方法

細胞は主にヒト白血病細胞株 (U937, HL-60) とマウス血液細胞株 (P388D1, J774.1) を検討対象とした。

プラスミドの導入効率を検討するために、GFP蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。FITC以外の蛍光マーカーとして、量子ドットを用いた。

今年度において試みた遺伝子導入促進法は、HVJエンベロープベクターであった。

カニクイザルES細胞の分化培養系を試行錯誤した。

C. 研究結果

HVJエンベロープベクターは、遺伝子の導入のみならず蛋白の導入にも応用できることが確認された。

マウス血液細胞株を用いた検討においては、HVJエンベロープベクターは量子ドットの導入効率を著明に改善し、細胞質に直接導入されていると考えられた。

サルES細胞を用いた分化培養系においては、

培養皿底面に基質蛋白を表面塗布して、無フィーダー培養系を確立し、血液細胞、血管内皮細胞などを高い純度で分化誘導することに成功した。

D. 考察

HVJエンベロープベクターを用いた手法によって、ヒトおよびマウス血液細胞株への良好な分子導入が可能であった。これらの手法はいずれも、エンドゾーム形成によって遺伝子の細胞質への移行が阻まれるという欠点が無く、他の手法に比べても極めて有用と考えられた。

また、量子ドットは蛍光の減衰が少なく、極めて優れた蛍光マーカーであった。

ES細胞からの分化誘導系が確立されたが、この培養系は無フィーダーで他の細胞の混入がなく、また、分化細胞が均一な集団で分化の過程をたどることから、次年度以降のDDSの系として有用であると考えられた。

E. 結論

HVJエンベロープベクターを用いた手法により、遺伝子や蛋白を血液細胞株へ効率よく導入することに成功した。次年度以降のDDS細胞系としてのES細胞分化誘導系を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, Yuo A, Suzuki H, Mizutani S: Brp2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 24:8236-8243, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担総括実績書

ナノ粒子の感染症研究への応用について

分担研究者 国立国際医療センター研究所

感染症制御研究部 部長 切替照雄

(研究目的)

様々な波長で安定した高い輝度の蛍光を発するナノ粒子カンタムドットは、将来の感染症学研究や感染症診断への応用にとって欠かすことの出来ない手段となると考えられる。本研究では感染症学研究や感染症診断にカンタムドットがどのように応用できるかを明らかにする。抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて、感染症とくに、肺結核の診断への応用をめざし研究を行った。また、Qdot を標識したデキストランを使用して、マクロファージの貪食機能の検定を実施した。

(平成 17 年度の成果)

Mycobacterium bovis BCG 株を液体培地にて培養し、実験に供した。M. bovis BCG は 2% Glutalaldehyde にて固定した。1% BSA/PBS にて抗体の非特異反応のブロッキングを行い、抗ウサギ M. bovis BCG ポリクローナル抗体を用いて 1 時間反応させ、その後 655nm 抗ウサギ IgG 抗体標識 Qdot を反応させ、共焦点顕微鏡にて観察を行った (図 1)。抗ウサギ M. bovis BCG ポリクローナル抗体の希釈倍率は 1000 倍で、1% BSA/PBS にて希釈した。また 655nm 抗ウサギ IgG 抗体標識 Qdot は 200~1000 倍希釈で行った。陽性コントロールには GFP 蛋白を発現させた M. bovis BCG で実験を行った (図 2)。この方法は、排菌肺結核患者より採取された喀痰中の結核菌を同定することへ応用可能である。現在は結核菌特異的菌体表層蛋白のモノクローナル抗体の作製に取り組んでいる。また、マクロファージの

貪食機能の評価系の確立のために Qdot を標識したデキストランをマクロファージに貪食させた (図 3)。この系を用いて貪食機能の検定法の確立を進めている。



図 1. Qdotを用いた免疫染色
(共焦点レーザー顕微鏡像)



図2. Qdotを用いた免疫染色
(共焦点レーザー顕微鏡像)

さらに結核の virulence の理由であるマクロファージ内での菌の生存に関わる遺伝子について抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて実験を計画中である。virulence 遺伝子である Rv1615c および Rv3812 をクローニングし、その抗体を作製する。マクロファージに *M. bovis* BCG を感染させ、抗 Rv1615c 抗体および抗 Rv3812 抗体をそれぞれ反応させ、その後抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて蛋白の発現を確認する。もしこの2つの結核菌 virulence 因子がマクロファージ内で発現していれば、これらをターゲットにして、カンタムドットを検出試薬としたイムノクロマトグラフィーなどのキット化が可能である。

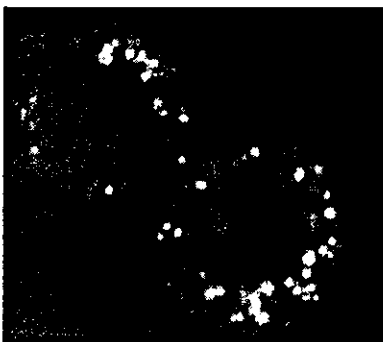


図3. Qdot 標識デキストランを貪食させたマクロファージ

マクロファージの貪食機能の評価系の確立のために Qdot を標識したデキストランをマクロファージに貪食させた(図3)。この系を用いて貪食機能の検定法の確立を進めている。

(研究業績「欧文」)

- 1) Otsuka, Y., Fujino, T., Mori, N., Sekiguchi, J., Toyota, E., Saruta, K., Kikuchi, Y., Sasaki, Y., Ajisawa, A., Otsuka, Y., Nagai, H., Takahara, M., Saka, H., Shirasaka, T., Yamashita, Y., Kiyosuke, M., Koga, H., Oka, S., Kimura, S., Mori, T., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Survey of Human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive patients with mycobacterial infection in Japan., *J. Infect.*, in press.

- 2) Sato, N., Izawa, H., Kamimura, M., Fujino, T., Sekiguchi, J., Saruta, K., Hayashi, S., Henmi, H., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a West-Tokyo hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.*, in press.
- 3) Toyota, E., Sikiguchi, J., Shimizu, H., Fujino, T., Otsuka, Y., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T., Kudo, K.: Further acquisition of drug-resistance in multidrug-resistant tuberculosis during chemotherapy. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:292-294, 2004.
- 4) Sekiguchi, J., Hama, T., Fujino, T., Araake, M., Irie, A., Saruta, K., Konosaki, H., Nishimura, H., Kawana, A., Kudo, K., Kondo, T., Sasazuki, T., Kuratsuji, T., Yoshikura, H., Kirikae, T.: Detection of the antiseptic- and disinfectant- resistance genes *qacA*, *qacB*, and *qacC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Tokyo hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:288-291, 2004.
- 5) Kirikae, T., Tokunaga, O., Inoue, Y., Fujino, T., Saruta, K., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Miyanomae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in a long-term care facility for patients with severe motor and intellectual disabilities. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:226-228, 2004.
- 6) Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C., Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T. : Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.
- 7) Itoyama, S., Keicho, N., Quy, T., Phi, N.C., Long, H.T., Ha, L.D., Ban, V.V., Ohashi, J., Hijikata, M., Matsushita, I., Kawana, A., Yanai, H., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: ACE1 polymorphism and progression of SARS.

- Biochem Biophys Res Commun., 323: 1124-1129, 2004.
- 8) Otsuka, Y., Hanaki, K., Zhao, J., Ohtsuki, R., Toyooka, K., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Yamamoto, K., Kirikae T.: Detection of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin with quantum dot immuno-conjugates. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:183-184, 2004.
- 9) Asagi, T., Kikuchi, Y., Sakurai, Y., Fujino, T., Sekiguchi, J., Saruta, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Sendai hospital in 2003. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:88-90, 2004.
- 10) Kawano, F., Miyazaki, H., Kawasaki, T., Fujino, T., Sekiguchi, J., Saruta, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Kumamoto hospital in 2003. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:86-88, 2004.
- 11) Fujino, T., Sekiguchi, J., Kawana, A., Konosaki, H., Nishimura, H., Saruta, K., Kudo, K., Kondo, T., Yazaki, Y., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo hospital in 2003. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:83-85, 2004.
- 12) Sekiguchi, J., Fujino, T., Kuroda, E., Konosaki, H., Nishimura, H., Saruta, K., Kawana, A., Yamanishi, F., Kudo, K., Kondo, T., Yazaki, Y., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in a hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:78-80, 2004.
- 13) Sekiguchi, J., Fujino, T., Konosaki, H., Nishimura, H., Kawana, A., Kudo, K., Kondo, T., Yazaki, Y., Kuratsuji, T., Yoshikura, H., Kirikae, T.: Prevalence of erythromycin-, tetracycline-, and aminoglycoside- resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamoto. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:74-77, 2004.
- 14) Otsuka, Y., Parniewski, P., Zwolska, Z., Kai, M., Fujino, T., Kirikae, F., Toyota, E., Kudo, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Characterization of a trinucleotide repeat sequence (CGG)₅ and its

- potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*: *J. Clin. Microbiol.*, 42:3538-3548, 2004.
- 15) Liu, F., Shinomiya, H, Kirikae, T., Hirata, H., Asano, Y.: Characterization of murine grancalcin specifically expressed in leukocytes and its possible role in host defense against bacterial infections. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68:894-902, 2004.
- 16) Asagi, T., Kikuchi, Y., Sakurai, Y., Fujino, T., Sekiguchi, J., Saruta, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Sendai hospital in 2003. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57: 88-90, 2004.
- 17) Kawano, F., Miyazaki, H., Kawasaki, T., Fujino, T., Sekiguchi, J., Saruta, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Kumamoto hospital in 2003. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57: 86-88, 2004.
- 18) Fujino, T., Sekiguchi, J., Kawana, A., Konosaki, H., Nishimura, H., Saruta, K., Kudo, K., Kondo, T., Yazaki, Y., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo hospital in 2003. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57: 83-85, 2004.
- (知的財産権の出願・登録状況)
1. 「新規変異を含むpncA遺伝子」出願人：出願人：ニプロ株式会社、発明者：切替照雄（国立国際医療センター）、関口純一郎（国立国際医療センター）、中村友彦（ニプロ株式会社）、末竹寿紀（ニプロ株式会社）、特願2004-376669、平成16年12月27日
 2. 「ピラジナミド耐性菌検出用プローブセット」出願人：ニプロ株式会社、発明者：切替照雄（国立国際医療センター）、関口純一郎（国立国際医療センター）、中村友彦（ニプロ株式会社）、末竹寿紀（ニプロ株式会社）、特願2004-376314、平成16年12月27日
 3. 「結核菌に含まれる薬剤耐性遺伝子を検出する方法、PCR用プライマーセット、塩基配列決定用プライマーセット、及び薬剤耐性結核の診断用キット」出願人：独立行

政法人 科学技術振興機構、発明
者：発明者：切替照雄（国立国際
医療センター）、関口純一郎（国
立国際医療センター）、大槻隆司
（国立国際医療センター）、特願
2003-005370、平成16年1月14日

生物・医療応用
QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

分担研究者 土肥 多恵子 国立国際医療センター 研究所部長
協力研究者 星野昭芳 国立国際医療センター研究所 流動研究員

本研究では消化管に存在する免疫担当細胞がどの様にその特徴的な機能を獲得していくかを明らかにすることを最終目的として、蛍光を発するナノ粒子 QD の特質を利用して細胞をラベルし、消化管と他の臓器との細胞交通を解析することを目指した。マウス腹腔内マクロファージまたは骨髄由来マクロファージを調整し、QD655 によるラベルの後、マウス腹腔内または末梢血中にもどし、同時にトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)の注腸によって急性腸炎を誘導した。24 時間後、ラベルした細胞の分布を解析したところ、骨髄由来マクロファージは投与ルートに関わらず大腸粘膜固有層に達していたのに対して、腹腔内マクロファージは炎症部漿膜と穿孔部に集積し、壁内への浸潤はみられなかった。腹腔マクロファージ集積のメカニズムとして、炎症刺激による腹腔マクロファージ由来ケモカイン CCL1 の分泌とその受容体 CCR8 の特異的な上昇が明らかになった。

A. 研究目的

生体防御の第一線である消化管粘膜局所においては、物理的および機能的バリアーの形成とともに、病原体と常在菌の認識、抗原に対する免疫応答と免疫寛容の緻密な調節がごくあたりまえに行われている。しかしその調節機構はいわゆる全身免疫とは作用する細胞もその作用機構も異なっていることが解明されつつある。更に、消化管疾患における腹腔内の免疫応答の研究はほとんど行われていないが、消化管の漿膜病変は全層性潰瘍や外科的侵襲による癒着等、QOL には大きな影響をもたらす。本研究では腸管免疫の特徴に加えて消化管炎症時時の腹腔内の免疫応答を解明し、局所の漿膜側の免疫応答をも明らかにすることを目的として、消化管と腹腔内との細胞交通を解析した。ラベルに用いる半導体ナノ粒子は蛍光が明るく、褪色が少ないという特色があり、これを利用して腹腔内及び骨髄マクロファージをラベルし腸を含む腹腔内臓器との交通を解析した。

B. 研究方法

① マウス腹腔及び骨髄由来マクロファージの腸炎における細胞の分布

C57BL/6 マウスより腹腔細胞を採取し、培養プレートに付着する細胞を腹腔内マクロファージとして用いた。また、骨髄細胞から M-CSF により誘導したマクロファージを用いた。QD655 を取り込ませて細胞をラベルし、 1×10^6 個を腹腔内または経静脈投与した。同時に 2%トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)：エタノール=1：1 溶液を TNBS 100 μ g/g weight として注腸投与し、急性大腸炎を誘導した。24 時間後、腹腔内細胞を回収するとともに組織の凍結切片片でラベルした細胞を検出した。QD ラベル後 24 時間では生細胞率に変化はなく、LPS などの炎症刺激に対するサイトカイン応答などもラベルを行わない細胞と同等である事を *in vitro* で確認した。

② 炎症刺激によるマクロファージによるケモカイン受容体の発現

使用した条件の TNBS 腸炎誘導後 24 時間では、穿孔性潰瘍が頻発し、その潰瘍底及び病変部炎症部漿膜には細胞塊（ブランク）が形成される。またこの部分を中心として、しばしば周辺臓器との漿膜性癒着も認められる。連続切片の免疫染色によりこの部分の細胞塊が CD11b 陽性細胞の集積である事を確認し、その部分からマイクロダイセク

ションにより mRNA を抽出して、種々のケモカイン受容体の発現を定量 RT-PCR により解析した。この結果を無刺激のマウスから採取したナイーブ腹腔マクロファージの結果と比較した。

C. 研究結果

① 腹腔及び骨髄由来マクロファージの炎症誘導後の分布

骨髄由来マクロファージは投与ルートに関わらず大腸粘膜固有層の管腔側に達していたのに対して、腹腔内マクロファージは炎症部漿膜と穿孔部に集積し、壁内への浸潤はみられなかった。結果を表1にまとめた。また、腹腔内の細胞構成も非炎症時とは大きく異なり、CD11b^{hi}の細胞が減少し、CD11b^{lo} Gr-1⁺の骨髄由来細胞と思われる分画が増加していた。

表1. マクロファージの炎症後臓器分布

投与ルート	分布	マクロファージの由来	
		腹腔	骨髄
腹腔内	潰瘍漿膜側*	++	+
	粘膜下層	-	-
	粘膜固有層	-	+
経静脈	潰瘍漿膜側*	+	-
	粘膜下層	-	+
	粘膜固有層	+	+

*穿孔部プラークを含む

② 炎症刺激によるマクロファージによるケモカイン受容体の発現

炎症のない定常時の腹腔マクロファージにおいては、検索したすべてのケモカイン受容体の mRNA が発現していた。これに対し、穿孔部に集積してのプラークを形成するマクロファージにおけるケモカイン受容体の発現は大きく異なり、mRNA 発現の認められる受容体は CCR8, CCR9, CCR10 に限定されていた。特に CCR8 の発現はナイーブマクロファージに比して強く亢進していた。興味深い事に、CCR1, CCR2 を含むこの他の多くの炎症性ケモカイン受容体発現には低下が認められた (表2)。また、LPS などの炎症刺激をナイーブ腹腔マクロファージに加えると CCR8 のリガンドである CCL1 の発現上昇が見られた。この事から自己分泌したケモカインに対する受容体を高発現する事により、腹腔内マクロファージは傷害の起こった一点に凝集すると考えられた。

表2. 炎症部漿膜側に集積したマクロファージにおけるケモカイン受容体発現

ケモカイン受容体	mRNA 発現 (無刺激マクロファージに対する変動)
CCR1	↓
CCR2	↓
CCR3	↓
CCR4	↓
CCR5	→
CCR6	→
CCR7	↓
CCR8	↑↑
CCR9	↑
CCR10	↑
CXCR1	→
CXCR2	↓
CXCR3	↓
CXCR4	↓
CXCR5	↓

D. 考察

1) 達成度について

量子ドットを応用し、炎症時の細胞交通解析を行った。マクロファージ系統の細胞の標識およびその標識された細胞の生体内導入が可能であり、効率よく検出された。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的には、量子ドットによるラベルを行い、細胞をトレースした結果、骨髄由来マクロファージにはみられない、腹腔マクロファージの特徴的な動員とその機構が明らかとなった。本研究は QD の強い蛍光により可能であったもので、QD の有用性が示された。また、漿膜の炎症機構は社会的にも問題となっている腹膜癒着のトリガーとも考えられるため、今回の成果はその予防のためのターゲットとしての意義がある。

3) 今後の展望について

ラベルした細胞の回収と、その機能をさらに解析する。動物が生きた状態での生体

内動態を観察できるような量子ドットの検出器を利用できれば、診断への応用ができる可能性がある。

E. 結論

半導体ナノ粒子を用いたマクロファージ様細胞の蛍光標識により、大腸炎の際の細胞交通を解析し、大腸炎における腹腔マクロファージの特異な機能とその機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsujimura Y, Kikuchi-Maki A, Dohi T, Onoda A, Koyasu S, Inaba K, Karasuyama H, Toyama-Sorimachi N: Ly49Q1 is Expressed on Myeloid Lineage Cells and Involved in Regulation of Cell Adhesiveness. 1. Immunology in press,
2. Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, Tabuchi Y, Kojima I: Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. Gastroenterology in press, in press:
3. Toyama-Sorimachi N, Omatsu Y, Onoda A, Iyoda T, Kikuchi-Maki A, Sorimachi H, Dohi T, Inaba K, Karasuyama H: Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. J Immunol in press,
4. Shirasawa S, Sugiyama S, Baba I, Inokuchi J, Sekine S, Ogino K, Kawamura YI, Dohi T, Fujimoto M, Sasazuki T: Epiregulin-deficiency results in dermatitis and critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101:13921-13926
5. Shirai Y, Hashimoto M, Kato R, Kawamura YI, Kirikae T, Yano H, Takashima J, Kirihara Y, Saito Y, Fujino MA, Dohi T: Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10-producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: Low MD-2 mRNA expression in

the colonic macrophages. J Clin Immunol 2004, 24:42-52

6. Kawamura T, Kanai T, Dohi T, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Okamoto R, Nakamura T, Higuchi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M: Expansion of ectopic CD40 ligand-expressing B cells and development of chronic colitis in mice. J Immunol 2004, 172:6388-6397
7. Dohi T, Fujihashi K, Koga T, Etani Y, Yoshino N, Kawamura YI, McGhee JR: CD4⁺CD45RB^{Hi} interleukin-4 defective T cells elicit antral gastritis and duodenitis. Am J Pathol 2004, 165:1257-1268

学会発表

1. Hoshino A, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Specific recruitment of peritoneal macrophages into perforating ulcers in murine trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. Presented at the 第34回日本免疫学会総会、, 札幌, 2004年12月1日、
2. 土肥多恵子: Neutralization of activins by follistatin ameliorates colonic inflammation in murine colitis. Presented at the 第90回日本消化器病学会総会, 仙台, 2004年 4月23日
3. 川島 麗, 河村由紀, 水谷紀子, 反町典子, 土肥多恵子: マウス放射線照射後の小腸粘膜固有層細胞の変化. Presented at the 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004年12月1日
4. Shirai Y, Kawamura YI, Hashimoto M, Kirikae T, Saito Y, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T: Characteristically Low MD-2 mRNA Expression in Human Colonic Macrophages and its Alteration in Ulcerative Colitis. Presented at the International Conference of Immunology, Motreal, 2004, July

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願

1 件

腎疾患治療に向けた DDS

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター 部長

我々はこれまで、ステロイド剤を内封した塩基性脂質添加ポリエチレングリコール修飾リポソームが半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて糸球体に集積し、フリーのステロイド剤よりはるかに少量で治療効果を示し、腎炎治療に有効な DDS となり得ることを報告した。今年度は、このステロイド剤内封リポソーム製剤が示す治療効果のメカニズムについて調べた。その結果、フリーのステロイド剤は糸球体内への白血球浸潤や炎症性メディエーターの産生を抑制して治療効果を示すのに対し、リポソーム製剤の場合には浸潤白血球数や炎症性メディエーターの mRNA のレベルは未治療群と差がなく、ボーマン嚢上皮細胞の増殖や線維化（細胞外マトリックス産生）に違いがあることがわかった。ステロイド剤内封リポソーム製剤はフリーのステロイド剤とは異なる機序で治療効果を示すことが示唆された。

A. 研究目的

慢性糸球体腎炎の治療にしばしばステロイド剤が使用されるが、その強い副作用が問題になることも多い。従って、腎糸球体への選択的な DDS は腎炎のステロイド治療において有用と考えられる。

我々はこれまで、慢性に進行するラット半月体性糸球体腎炎モデルを用いて、糸球体内の炎症像が顕著で尿蛋白が増加した腎炎惹起後 7 日目からメチルプレドニゾン (30 mg/kg 体重/day) の連日投与を行うと、尿蛋白の増加や腎機能低下を抑制し、さらに糸球体への白血球浸潤やサイトカイン産生が抑制されることを示した。さらに我々は、一昨年の本研究において、ある種の塩基性脂質を添加したポリエチレングリコール修飾リポソームにステロイド剤を内封させたリポソーム製剤が、フリーのステロイド剤と比べて、同モデルに対して強い治療効果を示すことを明らかにした。すなわち、リポソームに内封させたリン酸プレドニゾン (3 mg/kg 体重) を 1 週間に 1 回投与すると、尿蛋白の上昇や腎機能の低下を抑制し、また病理学的にも、半月体の減少が観察された。

そこで今年度は、この塩基性脂質含有リポソームという DDS 系におけるステロイド剤の治療効果発現のメカニズムについて調べた。

B. 研究方法

カチオン化脂質 TRX を添加したポリエチレングリコール修飾リポソーム (TRX リポソーム) にリン酸プレドニゾンナトリウムを内封させた製剤を調製した。また何も内封しない空のリポソームを調整し、コントロールとした。

半月体性糸球体腎炎モデルは Wistar Kyoto 系ラット (雄、90-110 g 体重) にウサギ抗ラット糸球体基底膜抗血清 (50 μ L/100 g 体重) を尾静脈投与して作製した。このモデルでは、腎炎惹起後 7 日目までに尿蛋白の上昇が見られ、組織学的には単球やリンパ球の糸球体への浸潤も顕著であり、多くの糸球体に細胞性半月体が形成される。そこで、同モデルに対する治療効果を調べるために、腎炎惹起後 7 日目から薬剤の投与を開始し、以降は 1 週間に一度の間隔で投与を行った。すなわち、7 日目の尿蛋白を測定した後にラットを 1) 正常ラット群、2) 疾患コントロール無治療群、3) 空リポソームコントロール群、4) フリーステロイド 1 mg/kg 群 (Free-PSL/1)、5) フリーステロイド 3 mg/kg 群 (Free-PSL/3)、6) リポソーム内封ステロイド 1 mg/kg 群 (Lipo-PSL/1)、及び 7) リポソーム内封ステロイド 3 mg/kg 群 (Lipo-PSL/3) の計 7 群に分け、各治療を行った。

C. 研究結果

これまで報告したように、腎炎惹起後 7 日目より 1 週間に 1 回 3 mg/kg のリポソ-

ム封入ステロイド剤を投与すると蛋白尿の増加や腎機能の低下を抑制し、組織学的には半月体形成を有意に抑制する。一方、等量のステロイド剤をそのまま投与しても臨床的及び組織学的に治療効果を示さない。また腎炎を惹起したラットに投与されたリポソームは腎臓内において、糸球体に選択的に集積するが、正常ラットではこのような集積は見られない。従って、同腎炎モデルにリポソーム封入ステロイド剤を投与すると、炎症を有する糸球体に選択的に集積し、その結果、封入されたステロイド剤が糸球体内の炎症を抑えたと考えられた。

そこで先ず、糸球体内の炎症の程度を調べるために、糸球体内の単球やリンパ球の数を測定したところ、リポソーム封入ステロイド剤治療群と未治療群の間に差はなかった。さらに糸球体内の炎症性サイトカイン mRNA レベルにも差はなく、リポソーム封入ステロイド剤の治療効果は、糸球体内の炎症の抑制ではないことが示唆された。

半月体の形成過程では、細胞の増加だけでなく細胞外マトリックスの増加も起き、細胞性半月体から線維性半月体へと変化していく。そこで糸球体内のフィブロネクチン及び I 型コラーゲンの mRNA レベルを調べたところ、未治療群と比べて、リポソーム封入ステロイド剤治療群でどちらの mRNA も顕著な抑制が観察された。さらに線維化のメディエーターとして知られる Connective Tissue Growth Factor (CTGF) の mRNA レベルも有意に抑制されていた。これらの結果は、光顕レベルで観察された半月体形成の抑制の結果とよく一致した。

本研究で用いている動物モデルにおいて、CTGF はボーマン囊上皮細胞が産生するとの報告がある。また半月体形成における細胞成分の増加には、炎症細胞の浸潤とともにボーマン囊上皮細胞の増殖が重要であることが知られている。従って、上記の CTGF 産生抑制という結果は、ボーマン囊上皮の増殖抑制の可能性を示唆すると考えられた。そこで同細胞のマーカーである PGP 9.5 の糸球体内 mRNA レベルで調べたところ、リポソーム封入ステロイド剤治療群で顕著な抑制が観察された。さらに PGP 9.5 に対する抗体を用いた免疫染色においても同様の

結果が見られた。

以上の結果から、本モデルにおけるリポソーム封入ステロイド剤の治療効果は、フリーのステロイド剤を大量に連日投与した場合とは異なり、糸球体内への炎症細胞の浸潤やそれらの細胞による炎症性メディエーターの産生は抑制しないが、ボーマン囊上皮細胞の増殖や、その後起きる細胞外マトリックスの蓄積を抑制することがわかった。

D. 考察

糸球体内の炎症反応が糸球体毛細血管壁の破壊を伴わなければ、炎症が血管内のみにとどまり、管外増殖性変化（すなわち半月体形成）には至らない。このような炎症であれば、不可逆的な糸球体の破壊はまぬがれることが期待される。半月体形成の分子機序には未だに不明な点が多く、リポソーム封入ステロイド剤の具体的な標的細胞や標的分子が何かは明らかではないが、同製剤で局所的に高濃度になったステロイド剤は、糸球体毛細血管壁の破壊の過程を抑制、あるいは一度壊れた毛細血管壁の修復に寄与して、疾患の進展を阻止することが示唆された。

E. 結論

塩基性脂質含有リポソームによる DDS は糸球体腎炎におけるステロイド剤治療に有効であり、その作用機序はフリーのステロイド剤の場合と異なる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Role of mast cells in the development of renal fibrosis: Use of mast cell-deficient rats. S. Miyazawa, O. Hotta, N. Doi, Yu. Natori, K. Nishikawa, Y. Natori, *Kidney Int.* 65:2228-2237, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

半導体などナノ粒子による DDS

分担研究者 加藤規弘 国立国際医療センター研究所部長

本研究の目的は、低侵襲な方法（注射等）により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入する方法を開発することである。本年度は、血圧降下薬の一つカプトプリルに量子サイズドット（Quantum Dot：QD）をラベルしてラットに経静脈投与した際、未ラベルのものと同程度に、血圧降下作用があること、また QD の発する蛍光をもとに臓器および細胞内局在を検証できることを確認した。

A. 研究目的

近年、重篤な疾患に対して、微量でありながら強い治療効果を発揮する医薬品が数多く開発されている。しかし、標的部位に効率良く投与することが難しく、全身性の副作用が問題となっている。

本研究では、ナノ技術のうち、量子サイズ効果（長時間の蛍光保持と、粒子サイズにより蛍光色が異なるという特異的な性質）を医療に応用するために、半導体ナノ粒子の製造・表面加工を行い、薬物に結合させて実験動物に投与して、心血管系における薬物動態を解析することを目的とする。

B. 研究方法

主要な血圧調節機序の一つ、レニン-アンジオテンシン系の律速段階であるアンジオテンシン変換酵素の阻害薬、カプトプリルに QD をラベルして遺伝的高血圧ラット（高血圧自然発症脳卒中易発症ラット：SHRSP）に経静脈投与する。初めに予備実験として、QD ラベルした異なる薬物量をラットに投与し、十分な降圧効果の得られる至適投与量を決定する。その後、本実験へと進み、生理食塩水のみ、QD ラベルしていないカプトプリル、QD ラベルしたカプトプリルの 3 種類を各々 n=3 ずつ経静脈投与し、その後の血圧変化を経時的に測定した。

C. 研究結果

予備実験において、異なる薬物量でその降圧効果を比較したが、いずれにおいても投与後 30 分以内に収縮期血圧 30mmHg 以上

の血圧下降を認めた。経静脈投与であったためか、経口投与時よりも降圧効果の持続は短く、ほぼ 4 時間後にはほぼ消失した。また未ラベルのものと比較して、降圧の度合いはほぼ同等であったが、その薬物効果がやや遷延する傾向があった（n=3 ずつのため、有意差は認めず）。

血圧計測等が終わった後に、屠殺して摘出した臓器を用いて、薬物の臓器局在を検討したところ、脳内にも十分な蛍光を認めた。

D. 考察

1) 達成度および意義について

この手法により、薬物だけでなく、遺伝子やタンパク質の標的臓器への導入状態を追跡できれば、その体内動態を把握するうえで（特に臓器分布レベルより副作用の危険を評価できる）、かつ低侵襲な治療が可能となり、その社会的な意義は極めて大きい。今回、未ラベルの薬物と同等の効果が見られたことは、治療的応用の可能性を示すうえでも大きい一歩である。

3) 今後の展望について

次年度以降は、今年度作成した蛍光を示す融合ナノ粒子を用いて、細胞内や生体内におけるナノ粒子の動態についての詳細を明らかにしていくとともに、標的臓器の特異性を高められるか否かを明らかにする予定である。また、動態の可視化について更なる検討を行う予定である。

E. 結論

以上のように本研究を通じて、QD ラベルした薬物が、未ラベルのものと同等の薬物効果を示し、標的細胞への搬送を追跡できる DDS としての有効性が明らかとなり、今後の医療への応用の基礎を示すことができたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に大きな危険を及ぼす可能性は見られない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi F, Yanai K, Morii T, Ishinaga Y, Taniguchi-Yanai K, Nagano S, Kato N. Linkage disequilibrium grouping of SNPs reflecting haplotype phylogeny for efficient selection of tag SNPs. *Genetics*. in press.
- 2) Inomata H, Watanabe T, Iizuka Y, Liang Y-Q, Mashimo T, Nabika T, Ikeda K, Yanai K, Gotoda T, Yamori Y, Isobe M, Kato N. Identification of quantitative trait loci for cardiac hypertrophy in two different strains of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens Res*. in press.
- 2) Nawata H, Shirasawa S, Nakashima N, 他 35 名, Kato N, Yasuda K, Yamamoto K, Sasazuki T. Genome-wide linkage analysis of type 2 diabetes mellitus reconfirms the susceptibility locus on 11p13-p12 in Japanese. *J Hum Genet*. 2004, 49: 629-34.

2. 学会発表

- 1) 第 68 回日本循環器病学会学術集会, Comprehensive investigation of quantitative trait loci for blood pressure and associated metabolic traits in the spontaneous hypertensive rat strains. Inomata H, Watanabe T, Liang Y-Q, Nabika T, Isobe M, Yazaki Y, Sasazuki T, Kato N
- 2) 第 40 回高血圧自然発症ラット (SHR) 学会総会, SHR 系統における網羅的 QTL 解

析からスピードコンジェニック作成への展開. 猪又兵衛、渡辺岳博、梁一強、磯部光章、柳内和幸、加藤規弘

- 3) 第 27 回日本高血圧学会総会：高血圧の素因遺伝子に関するポジショナルクローニング. 柳内和幸、水沼真紀子、梁一強、猪又兵衛、渡辺岳博、金玲、並河徹、加藤規弘
 - 4) 第 27 回日本高血圧学会総会：カンデサルタン投与後の臓器別発現プロファイリング. 水沼真紀子、梁一強、金玲、柳内和幸、加藤規弘
 - 5) 第 27 回日本高血圧学会総会：降圧剤のクラス効果の探究：心臓における 6 種類の降圧剤投与後の遺伝子発現比較. 金玲、水沼真紀子、梁一強、森居俊行、柳内和幸、加藤規弘
 - 6) 第 13 回分子高血圧研究会, SHR における食事負荷に伴う遺伝子発現変化の DNA マイクロアレイ解析. 金玲、水沼真紀子、柳内和幸、加藤昌之、梁一強、加藤規弘、矢崎義雄
- #### H. 知的所有権の出願・取得状況
- 特になし

血管炎の治療と解析を目的とした DDS 用 Qdot 標識抗 MPO 抗体の開発

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質 室長

研究要旨 血管炎の発症要因の解析と治療法開発を目的とし、DDS 用 Qdot 標識抗 MPO 抗体を開発している。本年度、ナノイメージングによる血管炎発症機序用プローブを開発し、DDS および解析への応用を検討した。血管炎の発症にかかわる活性化好中球の表面には、MPO-ANCA(好中球自己抗体-myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody)の抗原 MPO が表出する。病因・病態の解明には、MPO 抗原の表出の定量が不可欠であったが、これまでの蛍光標識物質では、ほとんど定量できなかった。そこで、Qdot で標識し、mouse MPO に対する rabbit 抗体を使用することにより定量性を確保できた。本結果より、組織に侵入した活性化好中球を標的とする DDS 法の開発が可能となった。

A. 研究目的

血管炎の発症要因の解析と治療法開発には、DDS 用 Qdot 標識抗 MPO 抗体の開発が不可欠である。血管炎の発症の要因に、活性化した好中球の関与が推定されている (Arimura, Y., et al. Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. Arthritis Rheumatism 44:921-930, 2001)。特に、急速進行性糸球体腎炎の発症には好中球自己抗体 (MPO-ANCA) が関与しており、血液力学的因子も関与していることから、*in vivo* でのイメージング技術も含めた総合的な検討が欠かせない。一方、われわれが提唱した *in vivo* imaging は、バイオイメージングによる生体内の動態を解析することに利用され、常套手段として行われるようになってきている。本法は、種々の生体機能に欠かせない方

法として急速に定着しつつある。この *in vivo* imaging には、ナノプローブの利用が必須である。そこで、本研究により、QDot を用いた血管炎の発症要因の解析と DDS 治療への応用について検討した。具体的には、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、myeloperoxidase (MPO) 抗体を投与して血管炎発症過程をしらべた。また、MPO 抗体を QD で標識し (QD-antiMPO) し、病態組織での活性化好中球表面の MPO の動態と抗体の動的変化の解析を試みた。

すなわち、血管炎の発症にかかわる活性化好中球の表面には、MPO-ANCA の抗原 MPO が表出する。病因・病態の解明には、MPO 抗原の表出の定量が不可欠であったが、これまでの蛍光標識物質では、ほとんど定量できなかった。そこで、Qdot

で標識した mouse MPO に対する rabbit 抗体を使用することにより、定量性を確保できた。

本年度は、上記プローブ QD-antiMPO を開発し、ナノイメージングによる血管炎発症機序の解析および DDS への応用を検討した。本結果より、組織に侵入した活性化好中球を標的とする DDS 法の開発が可能となった。

B. 研究方法

1) QD-antiMPO の作製

QD-antiMPO は、QD で蛍光標識した抗 MPO 抗体を作製した。抗 MPO 抗体を QD 標識するにあたり、2 段階の反応を行った。(1)まず、セレン化カドミウム QD の表面にチオプロピオン酸を配位させ、さらに QD 表面をシステインで被覆した。(2)つぎに、QD 表面に抗 MPO 抗体をアミノ酸カップリングにより結合させた(A. Hoshino, *et al.* Nanolett. 4:2163-2169, 2004)。

2) 活性化好中球表面への MPO 表出

ヒト末梢血好中球画分ならびに 8%カゼイン誘導マウス好中球を単離し、fMet-Leu-Phe (FMLP)により好中球を刺激した。ついで、作成した QD 標識 MPO 抗体を添加し、好中球表面あるいは内部の MPO と反応させた免疫組織染色を行い、蛍光顕微鏡により好中球の活性化による MPO の細胞表面への表出を可視的に検討した。

3) CAWS 誘導血管炎マウスでの QD-aMPO をつかった MPO 抗体の生体内動態

CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction、カンジダ標準株 IFO1385 由来, 100 µg/ml) を 0.4 mg/Mouse と anti-rmMPO 抗体を C57BL/6 に iv 投与し、5 日後に、再度 CAWS と QD-antiMPO-immunoconjugates を iv 投与し、12、24 時間後に固定し、腎、肺、脾、肝の各組織標本の QDs の蛍光を検出し、臓器の活性化によって細胞表面に表出した好中球を可視的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1) QD-antiMPO の作製

QD-antiMPO は、電子顕微鏡の観察から QD 表面に 8 個の IgG が結合した(図 1)。

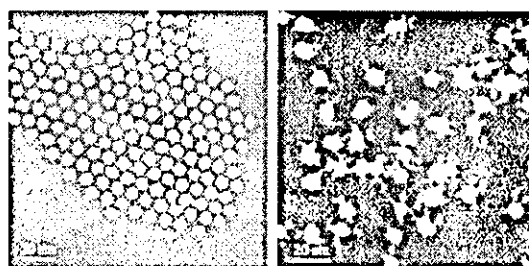


図 1. QD-antiMPO の電子顕微鏡写真

2) 活性化好中球表面への MPO 表出

FMLP で活性化したヒト好中球表面には MPO が表出し、QD-aMPO が結合しているのが蛍光顕微鏡にて観察された (図 2)。

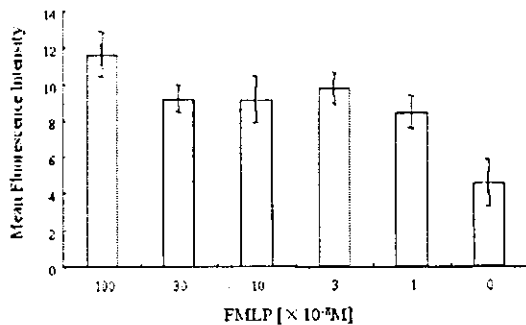
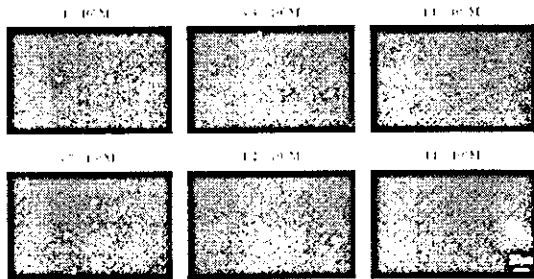


図 2. FMLP 濃度によって活性化したヒト好中球表面への QD-antiMPO の結合。上段：好中球写真、下段：その定量値

3) QD-antiMPO の生体内動態

CAWS と anti-rmMPO 抗体を C57BL/6 マウスに前処置 5 日後に、再度 CAWS および QD-antiMPO-immunoconjugates を iv 投与して腎、肺、脾、肝の各組織標本の QDs の蛍光を検出した。また、腎臓からの抗体の漏出も 12 時間でピークとなった (図 3)。

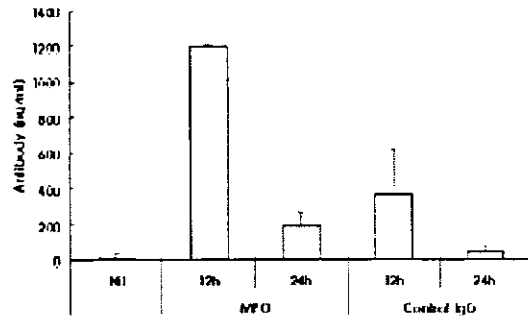


図 3. QD-antiMPO の尿中への漏出

D. 考察

セレン化カドミウム蛍光ナノ粒子 (Quantum dot: QD) は、直径約 4 ナノメートルの超微粒子である。QD の蛍光は高輝度かつ耐光性に優れているため、新規蛍光標識物質としてライフサイエンス分野における幅広い応用が推進されている。本年度、我々は活性化好中球に発現し血管炎発症に関与することが知られているライソゾーム酵素 MPO に対する抗体を、QD で蛍光標識した抗 MPO 抗体を作製した。本抗体より高感度に MPO を検出することで、MPO の血管炎の発症メカニズムへの関与を検討することができた。

その結果、ナノプローブ標識 MPO 抗体 (QD-antiMPO) は、FMLP 刺激で活性化した好中球の細胞表面に特異的に結合した。しかし、未刺激状態のヒト好中球には QD-antiMPO は結合しなかった。これらのことから、活性化好中球表面に表出している MPO との特異的な反応であることがわかった。マウス好中球においても同様の結果が得られた。ヒトならびにマウ

スの好中球が活性化に伴って MPO を細胞表面に漏出させることが示された。これらの結果は、QD をアミノ酸で表面加工することによって抗体やペプチドを標識することができ、QD 標識した抗 MPO 抗体により MPO の高感度検出が可能になった。また、本研究により、ヒトならびにマウスの好中球が FMLP 等による活性化に伴って MPO を細胞表面に漏出させることが示された。今後は、抗 MPO 抗体が血管炎の発症メカニズムにどのように関与するかについて検討中する。

本研究は、星野昭芳、山本健二（以上国立国際医療センター研究所）、大川原明子（国立感染研・生物活性物質）、長尾朋和（国立感染研・生物活性物質、現コーネル大・医[ニューヨーク]）、三浦典子、大野尚仁（以上東京薬大・薬）、南谷晴之（慶應大・院理工）の多数の施設の先生方の協力によった。

E. 結論

FMLP をはじめ、TNF- α 、IL-1 β 、により好中球を刺激し QD-aMPO にて処理して細胞表面の MPO との反応を解析した。いずれも MPO の細胞表面への表出が認められ、FITC、PE では見えない結合が観察できた。腎炎・血管炎マウスにおいては、糸球体に顕著に観察された。以上から、これまでの蛍光標識物質では、ほとんど定量できなかった活性化好中球表面の MPO 抗原の表出の定量が可能になった。また、組織に侵入した活性化好中球

を標的とする DDS 法の開発が可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol.Immunol.* 49: 181-189, 2005.
2. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakayama, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, K., M. Yasuhara, K. Yamamoto. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells *Microbiol. Immunol.* 48: 985-994, 2004
3. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26:527-543, 2004.
4. Y. Kameoka, A. S. Persad and K. Suzuki. Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S12-13, 2004
5. Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M.C.

- Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S15, 2004
6. E. Muso, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Imai, K. Yamagata, A. Akamatsu, K. Suzuki. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S17-18, 2004
 7. Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, and Yamamoto K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol.Immunol.*48:669-676, 2004.
 8. Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. and Tanokura, M.: ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignments of the cytokine LECT2. *Journal of Biomolecular NMR* 29:543-544, 2004.
 9. C. Ovejero, C. Cavard, A. Perianin, T. Hakvoort, J. Vermeulen, C. Godard, M. Fabre, P. Chafey, K. Suzuki, B. Romagnolo, S. Yamagoe, C. Perret. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of s-catenin in the liver. *Hepatology* 40:167-176, 2004.
 10. T. Saito, A. Okumura, H. Watanabe, M. Asano, A. Ishida-Okawara, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Hatano-Yokoe, T. Abo, Y. Iwakura, K. Suzuki, and S. Yamagoe. Increase of Hepatic NKT Cells in LECT2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J Immunol.* 173:579-585, 2004.
 11. S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, K. Yamamoto, K. Miyazaki, M. Nakamura, K. Yu, A. Kumatori. Critical roles of Interferon regulatory factor-4 in CD11b^{high}CD8⁺ dendritic cell development *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:8981-8986, 2004.
 12. A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, E. Muso, T. Ono, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol., Dial. Transplant.* 19:1708-1715, 2004.
 13. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* 327: 195-200, 2004.
 14. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.
- 和文発表
1. 鈴木和男「バイオイメージングが切り開く新たな診断・治療評価技術」*医学のあゆみ* 210巻 171

2. 長尾朋和、鈴木和男「血管炎初期反応のイメージング」医学のあゆみ 210 巻 196-199
 3. 長尾朋和、村山 研、越尾 修、大野尚仁、三浦典子、高橋 啓、馬渕綾子、南谷晴之、鈴木和男 腎臓血管傷害のイメージング PharmaMedica22: 185-189, 2004 (医療薬学雑誌)
2. 学会発表
国際会議
1. Kazuo Suzuki, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Toshiko Ito-Ihara, David Scott, Richard Watts, Oliver Flossmann, Suzanne Lane, and David Jayne. Japan-UK Vasculitis Epidemiology Study - First meeting, Emmanuel College, Cambridge, UK
 2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. The 4th international Peroxidase Meeting, October, 2004 (Japan).
 3. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30 (Kyoto)
 4. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan 2004. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30, Kyoto
 5. Akiyoshi Hoshino, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Masato Yasuhara, Taeko Dohi, Kenji Yamamoto, and Kazuo SUZUKI Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots - MPO expressed on surface of activated neutrophils with Quantum dot-conjugated antibody. 4th International Peroxidase Meeting. Oct 27-30, 2004, Kyoto
- 国内会議
1. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 血管炎における活性化好中球の CD69 分子 第 34 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
 2. 宇野賀津子、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、鈴木和男、岸田綱太郎、武曾恵理 腎炎患者における末梢血リンパ球分画の IL12/IL18 への反応性の検