

(2) 学会発表

1. 益田公彦,永井英明,川辺芳子,倉島篤行: 多剤耐性結核に対する活性化T細胞輸注療法 の 3 例 結核(0022 9776) 79(3):253, 2004.
2. 鈴木純子, 川辺芳子, 土屋香代子, 益田公彦, 田村厚久, 永井英明, 赤川志のぶ, 長山直弘, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅, 藤田由希子: 抗酸菌症血清診断の有用性の検討 結核(0022 9776) 79(3):214, 2004.
3. 川辺芳子, 鈴木純子, 益田公彦, 齊藤若奈, 原弘道, 宮本牧, 土屋香代子, 永井英明, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅, 原田登之, 樋口一恵: 新しい結核感染診断キット QuantiFERON TBの臨床評価 とくに判定基準の検討 結核(0022 9776) 79(3):201, 2004.
4. 川辺芳子, 鈴木純子, 益田公彦, 原弘道, 齊藤若奈, 永井英明, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅, 森亨, 原田登之: 結核感染診断キット QuantiFERON-TBの有用性の検討 日本呼吸器学会雑誌(1343 3490) 42(増刊):107, 2004.
5. 永井英明, 川辺芳子, 倉島篤行, 宍戸雄一郎, 原弘道, 鈴木純子, 益田公彦, 馬場基男, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 四元秀毅: 結核合併AIDS症例におけるrifampicin投与下 efavirenzの血中濃度の検討. 日本呼吸器学会雑誌 41(増刊): 88, 2003.
6. 川辺芳子, 鈴木純子, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅: 検査室での結核菌のCross-contaminationの発生と臨床経過, 結核 78(3): 287, 2003.
7. 町田和子, 川辺芳子, 馬場基男, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 赤川志のぶ, 倉島篤行, 四元秀毅: 結核患者治療支援事業 東京病院保健所結核連携システムについて. 結核 78(3): 263, 2003.
8. 斎藤若奈, 宍戸雄一郎, 原弘道, 鈴木純子, 益田公彦, 馬場基男, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 赤川志のぶ, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅: INH又はRFP耐性結核の治療成績. 結核 78(3): 237, 2003.
9. 町田和子, 川辺芳子, 鈴木純子, 益田公彦, 馬場基男, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 赤川志のぶ, 倉島篤行, 四元秀毅: 肺結核における栄養学的な側面と初回短期化学療法について. 結核 78(3): 235, 2003.

H.知的財産の出願・登録状況
未定

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

活動性結核症患者の末梢血単球／マクロファージのIFN- γ に対する低応答性の原因
に関する研究

分担研究者 土肥義胤 大阪大学名誉教授/甲子園大学大学院栄養学研究科教授

研究要旨

活動性結核症患者の末梢血単球は、BCG菌をin vitro食菌した後、IFN- γ の存在下でも細胞内増殖を許すので、IFN- γ receptorのdown-regulationが考えられた。喀痰に結核菌を排出している活動性結核患者の末梢血の個々の単球について、細胞内のIFN- γ receptorの γ 鎖、 γ 鎖のmRNAについて、in situ hybridizationの手法により発現を精査した結果、どの細胞も均等に両者を発現していることが明らかになり、低応答性はreceptorのdown-regulationによるのではなく、細胞内のsignal transductionによることが示唆された。

A. 研究目的

結核菌が生体内に侵入した場合、発病するヒトと発病しないヒトがある。この差異を生じる原因を追究することは、結核発病の原因を知る上で重要と考えられた。此れまでに、活動性結核症患者の末梢血単球／マクロファージ内では、IFN- γ の存在下でも食菌されたBCG菌が増殖し、IFN- γ に対する低応答性を報告してきた。今回は、その低応答性が、IFN- γ receptorの発現低下によるのではないかと考え、個々の単球のIFN- γ receptorのmRNAの発現をin situ hybridizationにより検索することを目的とした。

B. 研究方法と研究結果・考察

活動性（未治療）結核症患者3名の末梢血単球におけるIFN- γ receptorのmRNAの発現を調べた結果、どの患者においても、個々の単球細胞が（予想に反して）IFN- γ receptorのmRNAを均等に発現してい

た。この事実は、患者における菌増殖が食細胞のIFN- γ receptor発現欠如によるのではないことを示している。また、単球のIFN- γ 応答性に関して、Th1-typeの炎症性反応でup-regulateされているとされるモノカインIP-10 (IFN- γ inducible protein 10) の産生を追求した。結核患者の血清中には、健康人より有意に高いIP-10が検出され、BCG菌を食菌した結核患者の単球が、IFN- γ の添加により高いIP-10を産生し、BCG菌の食菌状態でIFN- γ に対する応答性をもつことが明らかになった。一方、BCGを食菌した健康人のそれは、IFN- γ の添加によりIP-10を産生しなくなり、IFN- γ 刺激によるsignal transductionが複雑であることを示唆している。

C. 結論

活動性結核症患者の末梢血単球は、BCG菌をin vitro食菌した後、IFN- γ の存在下で

も細胞内増殖を許すので、IFN- γ receptorのdown-regulationが考えられた。喀痰に結核菌を排出している活動性結核患者の末梢血の個々の単球について、細胞内のIFN- γ receptorの γ 鎖、 γ 鎖のmRNAについて、in situ hybridizationの手法により発現を精査した結果、どの細胞も均等に両者を発現していることが明らかになり、低応答性はreceptorのdown-regulationによるのではなく、細胞内のsignal transductionによることが示唆された。

D. 研究発表

(1) 論文発表

1. M. Takashima, F. Shirai, M. Sageshima, N. Ikeda, Y. Okamoto, Y. Dohi. Distinctive Bacteria-binding Property of Cloth Materials. Am. J. Infection Control 32: 27-32 2004.

(2) 学会発表

1. 白井文恵、土肥義胤 肺結核症患者のマクロファージのBCG菌殺菌能の低下。第77回日本細菌学会総会 日本細菌学雑誌 59(1): 289 2004.
2. 白井文恵、平山幸雄、土肥義胤 肺結核患者の末梢血単球のBCG菌貪食がIP-10産生に及ぼす影響。第78回日本細菌学会総会 日本細菌学雑誌 60(1): 159 2005.
3. 岡田有加里、野澤由加利、近藤聖子、白井文恵、三宅眞実、堀口安彦、松田守弘、土肥義胤 抗破傷風ヒト単クローン性中和抗体の可変部位 (ScFv-G6) の発現酵母株の樹立と産物の毒素

親和性。第78回日本細菌学会総会 日本細菌学雑誌 60(1): 93 2005.

4. 野澤由加利、岡田有加里、近藤聖子、松田守弘、土肥義胤 細胞タンパク質合成阻害を指標とした毒素中和法の定量法 第78回日本細菌学会総会 日本細菌学雑誌 60(1): 94 2005.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核に対する新しいワクチンの開発及び動物を用いた効果判定に関する研究

分担研究者 菅原勇

研究要旨

結核ワクチンの検定にモルモットが使われるが、効果判定に必要な免疫学的マーカーが存在しない。我々は、モルモットに発現するサイトカインmRNAを調べるために、RT-PCRを開発した。調べられるサイトカインは、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-1、IL-12、IL-10、GM-CSFである。このほかにTGF- β 、iNOSがある。このマーカーを使用することにより、結核菌感染とワクチン効果の判定が詳しく調べられるようになった。

A. 研究目的

モルモットのサイトカインを調べるため、最適なRT-PCRを確立することを目的とした。

B. 研究方法

既知のモルモット サイトカイン遺伝子がほとんどわかっていないので既知のマウス、ラット遺伝子の相同性を利用して部分的にモルモット サイトカイン遺伝子を推定した。プライマを作製し、結核菌感染モルモット肺からRNAを抽出後、逆転写を行い、RT-PCRを行った。インターナルコントロールとしてGAPDH遺伝子を利用した。IFN- γ 、TNF- α については、RT PCRを行った。

C. 研究結果

インターナルコントロールとしてGAPDH mRNAのサイズは452bpであった。IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-2、IL-10、IL-12、iNOS、GM-CSF増幅産物の大きさは、それぞれ171、184、303、430、353、367、296、456、171bpであり、

ゲル泳動で鮮明に認められた。とくにIFN- γ 、TNF- α 、IL-2 mRNA発現は、感染の時間経過に比例して強くなった。RT PCRに使用したGAPDH、IFN- γ 、TNF- α のアンプリコンの大きさは、それぞれ64、65、68 bpであった。これらの増幅の程度は、RT-PCRの増幅の程度と一致した。

D. 考察

モルモットIFN- γ 、TNF- α のゲノム構造は発表されていたが、他の遺伝子構造は発表されていなかったため、既知のマウス、ラット遺伝子を利用して部分的にシーケンスして、最適なプライマを設計した。試行錯誤の末、最適なプライマを見つけたと考える。今後、結核ワクチン予防実験において、予防効果が出た場合、これらのサイトカイン、iNOS mRNAがどのように変化するかを調べることは興味深いし、意義深い。

E. 結論

困難を伴ったが、主なモルモットサイトカイン、iNOS、TGF- β mRNA発現を調べ

る系が出来たことは意味のあることである。RT-PCRでもRT-PCRのデータと平行するデータが得られた（文献7参照）。

F. 健康危険情報

動物実験なので、健康危険情報はない。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno: Pathological and immunological profiles of rat tuberculosis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 85: 125-134, 2004.
2. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno: Mycobacterial infection in spontaneously diabetic Goto Kakizaki rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 204: 135-145, 2004.
3. I. Sugawara, K. Otomo, S. Mizuno, Y. Kazumi, M. Takahashi, K. Nemoto, S. Watanabe, Toru Yanagi, G. Wang, C. Du and G. Zhang: Recent advances on multidrug-resistant tuberculosis testing and identification among various Mycobacteria. *Res. Adv. In Microbiology* 4, p1-15, 2004. Rsearch Global Network, India.
4. Y. Kazumi, K. Otomo, M. Takahashi, S. Mitarai, I. Sugawara, J. Izumi, A. Andoh, H. Hasegawa: M. Shinshuense isolated from cutaneous ulcer lesion of right lower extremity in a 37-year-old woman. *Kekkaku*, 79: 437-441, 2004.
5. I. Sugawara, H. Yamada, R. Shi: Pulmonary tuberculosis in various gene knockout mice with special emphasis on roles of cytokines and transcription factors. *Current Respiratory Medicine Review*, 1:7-13 2005.
6. K. Hiramatsu, A. Azuma, H. Takizawa, S. Kudoh, I. Sugawara: The effects of inhalation of diesel exhausts on murine mycobacterial infection. *Exp. Lung Res.*, 31: 1-11, 2005.
7. H. Yamada, T. Udagawa, S. Mizuno, K. Hiramatsu, I. Sugawara: A reliable and reproducible method for evaluating cytokine and iNOS mRNA expression in guinea pig lung tissues by RT-PCR using newly designed primer sets. *Experimental Animals*, 2005 (in press).

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌症の病態解明とDCを用いた細胞遺伝子治療の開発に関する研究

分担研究者 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授

研究要旨

結核に対する細胞免疫療法の有用性を検討するため、マウス由来の樹状細胞（dendritic cell：DC）を結核菌抗原で感作し、これをマウスに投与した。その結果、抗原特異的CD8陽性T細胞が誘導され、BCGを腹腔内感染（全身感染モデル）させるとコントロールマウスと比較してPEC・脾臓において有意な菌数の減少が認められた。以上より、結核菌抗原感作DCを用いた細胞免疫療法は抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対するワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。一方、強力なIFN- γ 産生の誘導を有する転写因子であるT-bet遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクター（SeV-Tbet）を用いてマウス脾臓由来DCへの導入を試みたところ、SeV-Tbet導入樹状細胞において有意なIFN- γ 産生能とT細胞増殖能を持つことがin vitroで示された。T-bet遺伝子導入DCによる細胞遺伝子療法は技術的に十分可能であり、今後も結核感染マウスモデルにおいてその有用性を検討する予定である。

A. 研究目的

我々はこれまで抗酸菌易感染性患者の病態について解析を行い、本邦で初めて4症例の常染色体優性遺伝形式をとるIFN- γ レセプター1欠損症を同定し報告した。このような抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対する新たな治療戦略の開発が求められている。その一つとして強力かつ抗原特異的なTh1の誘導を目的とした樹状細胞（dendritic cell：DC）を用いた細胞遺伝子治療の開発が重要かつ有用な治療と考えている。特に転写因子であるT-betはIFN- γ 産生を誘導しTh1への分化を規定する最も重要な分子であることから、T-betを導入した樹状細胞は新たな細胞療法として有用な可能性が示唆される。

我々はマウスにおける細胞免疫療法モデ

ルを作製し、新規ウイルスベクターであるセンダイウイルスを用いたマウス樹状細胞へのT-bet遺伝子導入方法の確立とT-bet導入マウス樹状細胞の細胞内寄生性細菌に対する免疫学的効果の検討を目標に研究を行った。

B. 研究方法

(1) マウスにおける細胞免疫療法モデルの作製

- ① 抗原感作DCの作製：C57BL/6マウスの大腿骨および脛骨から骨髓細胞を取り出し、IL-4およびGM-CSF添加RPMI培地で培養を行った。培養7日目にLPSを添加して一晚培養し、翌8日目に結核菌由来ペプチドであるTB2ペプチド（MHCクラスIb拘束性）、MPT64ペプチド（MHCクラスIa拘束

性) 添加し培養した。培養3時間後、遠心洗浄し結核菌抗原感作DCを作製した。

② 細胞性免疫能の解析：上記作製した結核菌抗原感作DCをC57BL/6マウスに静脈内投与し、経時的に解析を行った。結核菌抗原感作DC投与マウスより肺、脾臓、PECを摘出し、これら浮遊細胞に結核菌抗原ペプチド(TB2ペプチド、MPT64ペプチド)を各々加え培養した。抗原特異的CD8陽性T細胞におけるIFN- γ 産生細胞数についてフローサイトメトリで解析を行った。

③ 抗酸菌に対する免疫能の解析：TB2ペプチドおよびMPT64ペプチド単独で感作したDCを作製しC57BL/6マウスに静脈内投与した。投与後6日目および60日目にBCG(Tokyo株)を 1.0×10^6 CFU腹腔内感染あるいは 1.0×10^5 CFU気道内感染させ、感染6日後に抗原特異的CD8陽性T細胞におけるIFN- γ 産生能の解析および臓器内菌数の測定を行った。

(2) センダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への遺伝子導入法の検討

C57BL/6マウスから脾臓を採取し、コラゲナーゼ処理して細胞浮遊液を作成した。MACSにてCD11c陽性細胞を採取し、Sendai virus(SeV)-Tbetを導入、24時間培養をおこなった。培養後、このSeV-Tbet導入脾臓由来樹状細胞(以下DC-Tbet)を 1×10^6 cells/mlに調整し、96wellsのプレートに 200μ lずつ入れた。これにIL-12を10ng/mlとなるように添加して刺激を行い、72時間培養した。培養上清を回収し、ELISAにて上清中のIFN- γ について定量した。またこのDC-TbetとBALB/cマウス脾臓からT細胞を共培養し、MLR(mixed

lymphocyte reaction)を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析研究「BCG副反応例および抗酸菌感染症発症に関連する宿主遺伝子要因の解明」として九州大学大学院医学研究院 遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) マウスにおける細胞免疫療法モデルの作製

マウス骨髄細胞から樹状細胞を作成し、結核菌抗原であるMPT64ペプチド(MHC class Ia拘束性)およびTB2ペプチド(MHC class Ib拘束性)で感作した。ペプチド感作樹状細胞投与後、脾臓・肺・PECにおける抗原特異的CD8陽性T細胞の経時的変化を調べた。樹状細胞投与6日目に各臓器でMHC class IaおよびIb拘束性抗原特異的CD8陽性T細胞数がともにピークとなった。肺では投与9日目には抗原特異的CD8陽性T細胞が著明に減少したが、PECでは投与40日目でも持続してみられた。またペプチド感作樹状細胞投与から6日後にBCGを気道内および腹腔内感染させ脾臓・肺・腹腔内の生菌数測定し比較したところ、気道内感染では腹腔内感染と比べて菌の排除が悪かった。ペプチド感作樹状細胞投与60日後にもBCGを気道内および腹腔内感染させても同様な結果が得られた。またペプチド間で比較を行ったところ、MPT64ペプチド感作DC投与群の方が、TB2ペプチド感作DC投与群よりも菌の排除が優れている傾向があった。以上よりペプチド感作樹状細胞静脈内投与による免疫において、全身感染モデルでは有効であるこ

と、肺ではマイコバクテリアに対する免疫誘導能が悪い可能性が示唆された。

(2) センダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への遺伝子導入法の検討

マウス脾臓由来樹状細胞にSeVを導入し、表面マーカー解析およびIL-12刺激下で培養を行い上清中のIFN- γ 定量を行った。DC-LacZおよびコントロールと比較してDC-TbetではCD86、CD40、MHCクラスIIの発現の増強と有意なIFN- γ 産生の増加がみられた。またBALB/c由来T細胞と共培養してMLRを行ったところ、DC-Tbetにおいて他と比べて有意なT細胞増殖能、IFN- γ 産生の増加がみられた。

D. 考察

DCを用いた結核菌に対する細胞免疫療法について、結核菌抗原感作DCをマウスに投与することにより経時的に抗原特異的CD8陽性T細胞の誘導を解析したところ、肺では脾臓・PECと比べて抗原特異的T細胞の維持は悪かった。さらにBCG感染マウスモデルにおいて菌の排除能についても調べたところ、全身感染モデルである腹腔内感染では結核菌抗原感作DC投与マウスにおいて有意な菌の排除は認められたが、局所感染モデルである気道内感染では菌の排除は弱かった。結核菌抗原感作樹状細胞投与によるワクチン療法は効果が期待できるものの、特に気道内感染では菌の排除が弱いため、抗酸菌感染時における免疫反応の解析やさらに強力に抗原特異的CD8T細胞を誘導することができるスーパー樹状細胞の作製が不可欠であると考えられた。

以前行った報告でT-bet遺伝子はIFN- γ 遺伝子に対する強いプロモーター活性を有していることを示した。我々はT-bet遺伝子を導入したセンダイウイルスベクターを開発し、マウス樹状細胞への導入を今回

検討してみた。マウス脾臓由来樹状細胞にSeV-Tbetを導入したところ、CD86、CD40、MHCクラスIIの発現の増強およびIFN- γ の産生が高まり、強いT細胞増殖能をもつことが示され、T-bet遺伝子導入樹状細胞はスーパー樹状細胞として有用である可能性が考えられた。今後、in vivoでの系において有用性の確認を行うとともに、マウス骨髄由来樹状細胞へ導入における免疫反応の解析を行う予定である。

E. 結論

結核菌抗原感作DC投与により細胞性免疫が誘導され抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対するワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。またT-bet遺伝子を導入したDCによる細胞性遺伝子療法の試みは技術的に十分可能であり、今後さらに結核感染マウスモデルにおいてその有用性を検討する予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, Tsukada S, Miyawaki T, Hara T: Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood* 103:185-187, 2004
2. Takada H, Ohga S, Mizuno Y, Nomura A, Hara T: Increased IL-16 levels in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr*

- Hematol Oncol 26:567-573, 2004
3. Nomura A, Takada H, Ohga S, Ishii N, Inoue T, Hara T: T-cell-depleted CD34+ cell transplantation from an HLA-mismatched donor in a low birth weight infant with X-linked severe combined immunodeficiency. J Pediatric Hematol Oncol (in press)
 4. Ohga S, Nomura A, Takada H, Tanaka T, Furuno K, Takahata Y, Kinukawa N, Imai S, Hara T: Dominant expression of interleukin-10 and transforming growth factor- β genes in activated T-cells of chronic active Epstein-Barr virus infection. J Med Virol 74:449-458, 2004
 5. Yamamoto K, Ishii E, Sako M, Ohga S, Furuno K, Suzuki N, Ueda I, Imayoshi M, Yamamoto S, Morimoto A, Takada H, Hara T, Imashuku S, Sasazuki T, Yasukawa M: Identification of novel MUNC13-4 mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes. J Med Genet ;41:763-767, 2004
 6. Nagatomo T, Ohga S, Takada H, Nomura A, Hikino S, Imura M, Ohshima K, Hara T: Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. Clin Exp Immunol ;138:47-53, 2004
 7. Furuno K, Yuge T, Kusuhara K, Takada H, Nishio H, Khajoe V, Ohno T, Hara T: CD25+ CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. J Pediatr ;145:385-390, 2004
 8. Kimura J, Takada H, Nomura A, Ohno T, Mizuno Y, Saito M, Kusuhara K, Hara T: Th1 and Th2 cytokine production is suppressed at the level of transcriptional regulation in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol ;137:444-449, 2004
 9. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T: Human cord blood CD25+ CD4+ T cells: a novel immunoregulatory population with naive phenotype. Exp Hematol 32:622-629, 2004
 10. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hara T: Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of anti-tumor effect by neutrophils. Cancer Res, 64: 1037-1043, 2004.
 11. Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T: Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. Neurol 62:457-60, 2004.
 12. Sasaki Y, Ihara K, Matsuura N, Kohno H, Nagafuchi S, Kuromaru R, Kusuhara K, Takeya R, Hoey T,

- Sumimoto H, Hara T: Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet. *Hum Genet* 115:177-84, 2004.
13. Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S, Shono K, Ihara K, Hara T, Suita S: Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 39:63-68, 2004
 14. Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Satoh K, Kubo N, Iida T, Fujii Y, Hara T: Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci* 74:1039-1049, 2004
 15. Kariyazono H, Ohno T, Khajooe V, Ihara K, Kusuhara K, Kinukawa N, Mizuno Y, Hara T: Association of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF receptor gene polymorphisms with Coronary Artery Lesions of Kawasaki Disease. *Pediatr Res* 2004 (in press)
 16. Nakayama H, Ihara K, Hikino S, Yamamoto J, Nagatomo T, Takemoto M, Hara T: Thrombocytosis in preterm infants: A possible involvement of thrombopoietin receptor gene expression. *J Mol Med* (in press)
 17. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Kanemitsu S, Hara T: Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is responsible for glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer*. (in press)
 18. Suita S, Tajiri T, Takamatsu H, Mizote H, Nagasaki A, Inomata Y, Hara T, Okamura J, Miyazaki S, Kawakami K, Eguchi H, Tsuneyoshi M: Improved survival outcome for hepatoblasma based on an optimal chemotherapeutic regimen-A report from the study group for pediatric solid malignant tumors in the kyushu area. *J Pediatric surgery* 39(2): 195-198, 2004
 19. Takada H, Saito Y, Nomura A, Ohga S, Kuwano K, Nakashima N, Aishima S, Tsuru N, Hara T: Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia as an initial manifestation in a girl with systemic lupus erythematosus. *Pediatric Pulmonology* in press.
 20. Toubo T, Suga N, Ohga S, Nomura A, Onoe Y, Takada H, Morihana E, Hara T: Successful unrelated cord blood transplantation for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease with hemophagocytic syndrome. *Int J Hematol* 2004 (in press)
 21. Sanefuji M, Ohga S, Kira R, Yoshiura T, Hara T: Moyamoya syndrome in a splenectomized patient with β -thalassemia intermedia *J Child Neurol* (in press)

22. Kusahara K, Nomura A, Nakao F, Hara T: Tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome with a novel mutation in the TNFRSF1A gene in a Japanese family. *Eur J Pediatr* 163:30-2, 2004.
23. Miyako K, Kohno H, Ihara K, Kuromaru R, Matsuura N, Hara T: Association study of human Mut T homologue 1 gene polymorphisms with type 1 diabetes mellitus. *Endocr J* 51(5):493-8, 2004
24. Miyako K, Kuromaru R, Kohno H, Hara T: Improved diabetes control by using 'close adjustment algorithms'. *Pediatr Int* (in press)
25. Suminoe A, Matsuzaki A, Hattori H, Koga Y, Kinukawa N, Ishii E, Hara T: mRNA expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukemia: low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis. *Leukemia* 18: 365-368, 2004
26. Furuno K, Ohno T, Masuda M, Hara T: Asthma-like attacks resulting from isolated congenital left pulmonary artery agenesis with right main bronchus stenosis. *Review Series Pediarics* (in press)
27. 原 寿郎: 原発性免疫不全症とは. *小児内科* 36: 1686-1690, 2004
28. 原 寿郎: 中枢神経系における感染防御機構. *小児内科* 36: 1007-1012, 2004
29. 大賀正一、原 寿郎: サイトカイン—state of arts—サイトカインの病態への関与. その他の炎症性疾患 (1)血球貪食症候群. *医学のあゆみ 別冊 State of arts* (2004年8月号)
30. 大賀正一、原 寿郎: 「免疫異常症の臨床」2.免疫異常あるいは免疫不均衡が基盤にある疾患. SIRS (systemic inflammatory response syndrome), ARDS (acute respiratory distress syndrome). *アレルギー・免疫*11巻12号 2004年12月号
31. 高田英俊、金兼弘和、野村明彦、宮脇利男、原 寿郎: Non-random X inactivation により女兒に発生したBTK 欠損無ガンマグロブリン血症. *臨床免疫* 42: 36-42, 2004
32. 高田英俊、野村明彦、原 寿郎: 高 IgE 症候群. *日本臨床免疫学会会誌* 印刷中
33. 高田英俊、野村明彦、原 寿郎: IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)症候群. *アレルギー・免疫* 11: 36-40, 2004
34. 高田英俊、野村明彦、原 寿郎: IPEX症候群. *小児内科*36: 1817-1820, 2004
35. 楠原浩一、吉良龍太郎、原 寿郎: SSPEにおける宿主側遺伝要因の解析. *Neuroinfection* 9(1): 66-71, 2004
36. 佐々木由佳、楠原浩一、原 寿郎: IL-12レセプター欠損と免疫不全症. *臨床免疫* 42: 43-5, 2004
37. 古賀友紀、松崎彰信、原 寿郎: 悪性リンパ腫の全て、原発性免疫不全症. *血液腫瘍科* 49: 123-128, 2004

38. 大野拓郎、古野憲司、池田和幸、原 寿郎：川崎病。日本臨牀「免疫症候群（下）」（印刷中）
39. 原 寿郎（分担執筆）：今日の治療指針 2005年版。学校伝染病と対策
40. 原 寿郎（分担、編集）：標準小児科学 第6版 小児の成長、小児の発達
41. 原 寿郎（編集、分担）：看護のための最近医学講座改訂第2版。第14巻 新生児・小児科疾患。小児の成長と発達
- (2) 学会発表
1. Hara T, Sasaki Y, Kusuhara K: Genetic susceptibility to mycobacterial infection in Japan. Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 5.1-4, 2004 San Francisco, CA
 2. Hara T: Autoimmune CNS disorders in childhood. Child Neurology Society Philippines, 4th Scientific Convention, Manila, 2004.11.15
 3. Hara T, Kusuhara K, Kira R: The Immunology and Genetics of SSPE Child Neurology Society Philippines, 4th Scientific Convention, Manila, 2004.11.15
 4. Hara T: Autoimmune CNS disorders in Childhood. Korea Pediatric Neurology Society. 2004.5.14, Jeju, Korea
 5. Hara T, Takahata Y, Takada H, Ohga S, Sakaguchi S: CD25+ CD4+ T cells in human cord blood. 12th International Congress of Immunology, 2004.7.18-23. Montreal, Canada
 6. Takada H, Nomura A, Kanegae T, Miyawaki T, Hara T: Female agammaglobulinemia due to Bruton' s tyrosino Kinase deficiency. 12th International Congress of Immunology, 2004.7.18-23. Montreal, Canada
 7. Ueda I, Ishii E, Yamamoto K, Ohga S, Sako M, Yasukawa M, Inaba T, Hibi S, Takada H, Hara T, Sugimoto T, Morimoto A, Imashuku S, Japan HLH Study Group: Genotype-phenotype correlation in 3 subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) patients. 20th Annual Meeting of the Histiocyte Society 2004 Sep 12-14, Stockholm
 8. Hikino, S., Hara T.: Twins and Brain damage, The Fetus as a Patient 2004 XX International Congress, Apr 23-26, 2004, Fukuoka, Japan
 9. Hikino S, Kanda T, Nakashima T, Yamamoto J, Nakayama H, Nakano H, Hara T: Twin to Twin Transfusion Syndrome -Past, Present, and Future- 15th Fukuoka International Symposium on Perinatal Medicine, Sep 11-12, 2004 Fukuoka, Japan
 10. Seki M, Sato K, Hikino S, Hara T, Nakayama H: Outcomes of Very Low Birth Weight Infants. 15th Fukuoka International Symposium on Perinatal Medicine, September

11-12, 2004, Fukuoka, Japan

11. Furuno K, Kusuhara K, Takada H, Khajooe V, Ohno T, Hara T: CD25+ CD4+ Regulatory T Cells in Patients with Kawasaki Disease. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montréal, Québec, Canada 2004.7. 18-23
12. 土居岳彦、西村仁志、矢島俊樹、原寿郎、吉開泰信: 結核菌由来ペプチド感作樹状細胞投与によるマイコバクテリア感染防御能の解析. 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3 札幌
13. 佐々木由佳、齋藤光正、曳野俊治、楠原浩一、村山康郎、山下博徳、松本直子、久木田穰次、原寿郎: 早期産児にみられる低ガンマグロブリン血症とインフルエンザワクチン接種後の抗体反応. 第36回日本小児感染症学会 2004.11.12-13 東京
14. 原寿郎: 小児感染症の免疫遺伝学的発症要因. 第7回中国地区小児薬物療法研究会. 広島
15. 原寿郎: 教育講演 小児喘息の遺伝子解析とテーラーメイド医療. 日本小児アレルギー学会. 2004.11.26-27, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

T-bet遺伝子多型と疾患との関連で
特許申請中

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨

TLRを介したシグナル伝達の分子機構を解析した。TBK1, IKKi/εのノックアウトマウスの解析から、TBK1, IKKi/εがTLR3, 4を介したIRF-3活性化に必須であることが明らかになった。さらに、TLR刺激で発現が誘導されるIkB ζ の生理機能を、ノックアウトマウスを用いて解析した結果、IkB ζ がTLRを介した遺伝子発現の中でIL-6などのあるサブセットの誘導に必須であることが明らかになった。そして、TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するTRIF/MyD88二重欠損マウスを用いて、結核感染防御における自然免疫系の役割を解析した。TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、他のマウスに比してBCG感染に対する感受性が高まっていた。このことから、TLRを介した自然免疫系の活性化が、結核感染防御に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLRファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムをToll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

まず、TLRを介した自然免疫系の活性化機構を、引き続きTLRを介したシグナル伝達機構の解析を行い明らかにする。TLRを介した細胞内シグナルでは、MyD88がすべてのTLRを介した炎症反応の誘導に必須であるが、MyD88非依存性のシグナルの存在も明らかになっている。昨年度までに、MyD88非依存性のシグナルではTRIFが必須の役割を果たすことを明らかにしてきた。MyD88非依存性(TRIF依存性)のシグナルでは、転写因子IRF-3が活性化され、I型IFNの産生が誘導される。IRF-3を活性化するキナーゼとしてIKK関連分子であるTBK1, IKKi/εが同定された。TBK1, IKKi/εのTLRを介したシグナル伝達経路における役割を、ノックアウトマウスを作製し解析した。

また、TLRシグナルによりマクロファージにおいて発現が誘導されるIkB ζ の生理機能

を、ノックアウトマウスを作製し解析した。これまでの解析から、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、TLRシグナルが完全に消失することが明らかになっている。TLRを介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88二重欠損マウスを作製し解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

TBK1, IKKi/εのTLRを介したシグナル伝達経路における役割を、ノックアウトマウスを作製し解析した。TBK1ノックアウトマウスは胎生致死であるが、IKKi/εノックアウトマウスは正常に出生した。TBK1欠損線維芽細胞では、TLR4, TLR3刺激によるIL-6の産生は正常であるものの、IRF-3の活性化、I型IFN遺伝子の誘導が障害されていた。一方、IKKi/ε欠損線維芽細胞では、単独で異常は認められなかったが、TBK1, IKKi/εの二重欠損マウス由来の胎児線維芽細胞では、TLR4, TLR3刺激によるIRF-3の活性化、I型IFN遺伝子の誘導が完全に消失していた。これらの結果は、TBK1, IKKi/εがTLR3, TLR4を介するMyD88非依存的経路に必須の役割を果たすことを示している。

次に、TLR刺激で発現が誘導されるIκBζの生理機能を、ノックアウトマウスを作製し解析した。IκBζノックアウトマウスのマクロファージでは、TLR刺激による、IL-6,

IL-12 p40などの遺伝子の発現がほとんど観察されなかった。しかし、IκBζノックアウト細胞でも、NF-κBやAP-1などの転写因子の活性化は認められた。IκBζが核内タンパク質であることから、核内においてIκBζの発現誘導がこれらの遺伝子発現に関与することが示唆された。実際、IκBζがNF-κBのサブユニットp50と会合することが明らかになり、TLRシグナル伝達経路においてp50がIκBζと協調することにより遺伝子が発現することを明らかにした。

このように、TLRシグナル伝達機構の概要が明らかになってきた。そこで、TLRシグナルの結核感染における役割を検討した。マウスにワクチン株であるBCGを感染させたところ、正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは感染2週間以内に壊死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところTRIF/MyD88二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。これらのことから、TRIF/MyD88二重欠損マウスはBCG感染に高感受性を示すことが明らかになった。

D. 考察

TBK1, IKKi/εのノックアウトマウスの解析から、TLRを介したIRF3活性化の分子機構が明らかになった。この結果、TLRを介したシグナル伝達機構の概要が明らかになってきた。さらに、TLR刺激による遺伝子発現誘導の分子機構の一端もIκBζの生理機能解析から明らかになった。さらに、TLRを介したシグナルがすべて消失するTRIF/MyD88二重欠損マウスでは、結核感染防御機構に障害が認められた。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。今後、TRIF/MyD88二重欠

損マウスがBCG感染に高感受性になる分子機構を解析する。

E. 結論

自然免疫系のTLRを介した活性化機構の概要が、シグナル伝達経路の解析から明らかになった。また自然免疫系の活性化が結核感染防御に重要な役割を担っていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M., and Whitsett, J. A.: Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113, 28-37 (2004).
2. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S., and Shibata, K.: Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation. *Cell. Microbiol.* 6, 187-199 (2004).
3. Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., and Seya, T.: Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64, 757-764 (2004).
4. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E.: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528 (2004).
5. Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Leroith, D., Takeda, K., Akira, S., and Kasuga, M.: Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10, 168-174 (2004).
6. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y.: Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 85, 423-428 (2004).
7. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L. D.: Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J.*

- Immunol. 172, 3686-3694 (2004).
8. Yukawa, K., Hoshino, K., Kishino, M., Mune, M., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Tanaka, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira S.: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int. J. Mol. Med.* 13, 515-520 (2004).
 9. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A.: Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 172, 4463-4469 (2004).
 10. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., and Himeno, K.: IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* 11, 941-948 (2004).
 11. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., and Matsuda, H.: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 135, 376-385 (2004).
 12. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazato, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Interferon- γ production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes. Infect.* 6, 339-349 (2004).
 13. Gorogawa, S., Fujitani, Y., Kaneto, H., Hazama, Y., Watada, H., Miyamoto, Y., Takeda, K., Akira, S., Magnuson, M. A., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., and Hori, M.: Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1159-1170 (2004).
 14. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S.: The roles of two I κ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641-1650 (2004).
 15. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Mune, M.: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1826-

- 1834 (2004).
16. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Yamamoto, S., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saito, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Muta, T., Takeda, K., and Akira, S.: Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature* 430, 218-222 (2004).
 17. Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S., and Sato, M.: Expression of Toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a Streptococcal preparation. *Cancer Res.* 64, 5461-5470 (2004).
 18. Yang, R., Murillo, F. M., Lin, K.-Y., Yutzy IV, W. H., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B. S.: Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations. *J. Immunol.* 173, 2624-2631 (2004).
 19. Sato, N., Takahashi, N., Suda, K., Nakamura, M., Yamaki, M., Ninomiya, T., Kobayashi, Y., Takada, H., Shibata, K., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., Noguchi, T., and Udagawa, N.: MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 α . *J. Exp. Med.* 200, 601-611 (2004).
 20. Nakasone, C., Kawakami, K., Hoshino, T., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 72, 6176-6180 (2004).
 21. Yang, R., Murillo, F. M., Cui, H., Blosser, R., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78, 11152-11160 (2004).
 22. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197-3207 (2004).
 23. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K.,

- Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-1762 (2004).
24. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
25. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
26. Yamamoto, M., Takeda, K., and Akira, S.: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40, 861-868 (2004).
27. Takeda, K., and Akira, S.: TLR signaling pathway. *Seminar Immunol.* 16, 3-9 (2004).
28. Takeda, K., and Akira, S.: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34, 73-82 (2004).
29. Akira, S., and Takeda, K.: Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511 (2004).
30. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors: ligands and signaling. *Innate Immune Response to Infection* 257-270 (2004).
31. Takeda, K., and Akira, S.: Biological roles of the STAT family in cytokine signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* 166, 97-121 (2004).
32. Akira, S., and Takeda, K.: Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327, 581-589 (2004).
33. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
- (2) 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, Role of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways. *International Workshop on The Immune System: Development, Activation, and Manipulation, 2004.* 2.16-17, Tokyo
2. Kiyoshi Takeda, Regulation of

- chronic intestinal inflammation by innate immune cells. (invited) 13th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2004.7.2, Osaka
3. Kiyoshi Takeda, Innate immune recognition by Toll-like receptors (Organizer) Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1st Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface」 2004. 7. 9-10, Tokyo
 4. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors (Invited) The 3rd Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2004.8.29-9.2, Hyogo, Japan
 5. Kiyoshi Takeda, Toll-like receptors for mucosal immunity (Invited) 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Development of Mucosal Vaccines, 2004.10.24-27, Seoul, Korea
 6. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immunity by Toll-like receptors (invited) International Mini-Symposium : Advanced Research on Innate Immunity, 2004.11.12, Kumamoto, Japan
 7. Kiyoshi Takeda, Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors (Symposium: Invited) The 8th conference of the International Endotoxin Society, 2004.11.15-18, Kyoto, Japan
 8. Kiyoshi Takeda, Involvement of Toll-like receptor-mediated activation of innate immunity in mycobacterial infection. 40th anniversary of Japan-US, Program for Tuberculosis and Leprosy panel, 2004. 12.9, Kyoto, Japan
 9. 竹田潔, Toll-like receptorによる自然免疫応答の制御, 第2回九州大学生体防御医学研究所・東京大学医科学研究所, 「感染・免疫・ゲノム」合同シンポジウム, 2004.7.6、東京
 10. 山本雅裕、竹田潔、審良静男, Toll-like receptorを介した細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現制御, 第25回日本炎症・再生医学会, 2004.7.13、東京
 11. 竹田潔, Toll-like receptorによる自然免疫系の活性化機構 (シンポジウム、招待講演) 第17回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2004.11.25、北九州
 12. 竹田潔, 遺伝子改変による免疫系シグナル伝達機構の解析 (免疫学会受賞講演) 第34回日本免疫学会学術集会、2004. 12.1-3、札幌
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし