

健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

論文(欧文)

- 1) Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K. Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo. *The Journal of urban Health* 2008; *in press*
- 2) ○Hoshino A, Nagao T, Nakasuga A, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K, Nanocrystal Quantum Dot-Conjugated Anti-Myeloperoxidase Antibody as the Detector of Activated Neutrophils. *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2007;6(4):341-345.
- 3) ○Futamura Y, Fujioka K, Yamamoto K. Hydrothermal Treatment of Glycine and Adiabatic Expansion Cooling: Implications for Prebiotic Synthesis of Biopolymers. *Journal of Materials Science* 2007; *in press*
- 4) ○Hoshino A, Ohnishi N, Yasuhara M, Yamamoto K, Kondo A. Separation of Murine Neutrophils and Macrophages by Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles. *Biotechnology Progress*

2007;23(6):1513-1516 *Epub ahead of print, Oct 20, 2007*

- 5) ○Hoshino A, Omata K, Takami S, Adschiri T, Terada N, Funatsu T, Yasuhara M, Yamamoto K. Fluorescence Millisecond Oscillation in Polar Solvents regulates Fluorescence Intensity of Colloidal Quantum Dots' solution. *Journal of Nanophotonics* 2007; (1) 013516, doi:10.1117/1.2767608 (E-pub only journal).
- 6) ○Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine surface modification regulates biological function, including cytotoxicity *The Journal of Artificial Organs*. 2007;10 (3) :149-157
- 7) ○Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K. Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice. *Microbiology and Immunology*. 2007;51 (5) :551-566
- 8) ○Futamura Y, Yahara K, Yamamoto K. Evidence for the production of fluorescent pyridine derivatives using supercritical water. *The Journal of*

Supercritical Fluids 2007;41(2)279-284
9) ○Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T. Inhibition of CCL1-CCR8 Interaction Prevents Aggregation of Macrophages and Development of Peritoneal Adhesions. *The Journal of Immunology* 2007;178(8):5296-5304

10) ○Yamamoto S, Manabe N, Fujioka K, Hoshino ○A, Yamamoto K. Visualizing Vitreous using Quantum Dots as Imaging Agents. *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2007;6(1)94-98

2. 学会発表

1. Fujioka K, Hiruoka M, Manabe, N, Hoshino A, Sato K, Hirakuri K, Yamamoto, K. "Evidence based toxicity of probes" *SPIE Biomedical Optics 2008*. Jan. 20-23, 2008. San Jose, CA, USA.

2. Hoshino A, Nagao T, Miura NN, Ohno N, Nakayama T, Suzuki K. "MPO-ANCA induces IL-17A production by activated neutrophils of murine systemic vasculitis." *37th Japanese Society for Immunology Research Conference*. November 20th-22th 2007, Tokyo, Japan.

3. Hiruoka M, Sato K, Fujioka K, Hirakuri K, Yamamoto K, Higami T, Funakubo A, Fukui Y. "Toxicity test of luminescent nanocrystalline silicon particles" *XXXIV. Annual Congress of the European*

Society for Artificial Organs. Aug. 2007, Krems, Austria

(国内学会)

1. 宇佐美克明, 竹内英之, 藤岡宏樹, 高田礼人, 河岡義裕, 入村達郎, "エボラウイルス感染における, マクロファージガラクトース型C型レクチン(MGL/CD301)とエボラウイルス糖タンパク質上O-結合型糖鎖との相互作用の重要性" 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 2007年12月, 横浜

2. 藤岡宏樹, 昼岡正樹, 真鍋法義, 星野昭芳, 佐藤慶介, 平栗健二, 山本健二. "シンポジウム講演「ナノ粒子毒性の諸相」" 粉体工学会・秋期研究発表会 2007年10月, 大阪

3. 真鍋 法義, 山本 悟, 藤岡 宏樹, 星野 昭芳, 山本 健二. "ナノ粒子を用いた硝子体病変の視覚化" 粉体工学会・秋期研究発表会 2007年10月, 大阪

4. 佐藤慶介, 昼岡正樹, 平栗健二, 舟久保昭夫, 福井康裕, 藤岡宏樹, 山本健二, 樋上哲哉. "可視発光機能性シリコンナノ粒子の生体安全性および生体内流動性試験" 第5回ナノ学会, 2007年5月, 筑波

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

蛍光ナノ粒子による高感度組織染色法を用いたT細胞の分化機構の解明

分担研究者 鈴木春巳 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・部長

協力研究者 小田浩代 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・流動研究員

協力研究者 マイケルパトリック 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・流動研究員

研究要旨

RhoHノックアウトマウスは胎生致死にはならず、メンデリズムに従い産まれてきた。RhoHはRacの機能を抑制するという報告があり、RacはT細胞分化に必要であることが知られているので、RhoHを欠損させるとT細胞が異常活性化することが考えられた。しかしながら、予想に反してノックアウトマウスの胸腺は小さく、細胞数も野生型の1/5~1/3程度まで減少していた。CD4CD8ダブルポジティブ (DP) 細胞の数が減少しており、胸腺での β 選択の過程が抑制されていることが示唆された。実際、胎生16、17、18日におけるDPの分化がノックアウトマウスで遅れていることから、RhoHが β 選択に重要な働きをしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

蛍光物質である半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を放出するため、蛍光プローブとしてこれまで使用されてきた蛍光色素より優れており、染色における蛍光色素としてだけでなくトレーサーとして動物を追跡することが可能である。組織染色においては顕微鏡観察時の退色が著しく、この退色を克服することが技術的な課題であった。蛍光強度が強かつ減衰が少ない蛍光ナノ粒子は組織染色に使用する色素として極めて優れた性質を有し

ていると考えられる。我々はこの蛍光ナノ粒子の優れた長所を免疫系の実験に有効利用することを試みた。

T細胞は免疫応答の中心的な役割を果たすリンパ球であり、獲得免疫の要である。T細胞は胸腺において分化する際に、自己と非自己を見分ける教育を受けて成熟する(正および負の選択)。T細胞分化における選択の分子機構を解明することは、トランスの成立、維持のメカニズムを理解することであり、自己免疫疾患の病因、病態の解明および新たな治療法の開発に必須であ

ると考えられる。

我々は、これまでにT細胞が分化する場である胸腺に特異的に発現する新規遺伝子の探索、およびその機能の解明に力を注いで来た。EST 発現データベース解析をもとにした *in silico* 解析により胸腺に特異的に発現する未知遺伝子を 5 個ピックアップし、その解析を進めているが、そのうちの 하나가 Rho ファミリー低分子Gタンパク質である RhoH である。この分子の機能を解明する目的で RhoH 遺伝子のトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを作製し、T細胞分化における異常を解析することにより、T細胞分化および活性化における RhoH 分子の機能を解明することを目的とする。その際に、蛍光ナノ粒子を用いた高感度組織染色法を利用し、特に腸管におけるリンパ球のサブポピュレーションの可視化を試みる。

B. 研究方法

1) RhoH ノックアウトマウスの作製

常法に従い BAC クローンより 8Kb および 4 Kb のアームを PCR クローニングし、ターゲティングベクターを構築した。これを TT2-ES 細胞に導入し、PCR スクリーニング、その後のサザン解析によって相同組み換えを確認し、桑実胚にインジェクションしてキメラマウスを作出した。

2) ノックアウトマウス胸腺の表現型解析

キメラマウスからの交配によって得られたノックアウトマウスの胸腺を採取し、表面抗原の染色後、フローサイトメトリーによ

りポピュレーション解析を行った。胸腺のみならず、脾臓、リンパ節、末梢血も同様に採取し、解析を行った。

3) 正の選択、負の選択の解析

正の選択を可視化するために T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス(Tg)と RhoH ノックアウトマウスを交配した。クラス I 拘束性の TCR トランスジェニックとして OT-I TCR-Tg を、クラス II 拘束性として OT-II TCR-Tg を用いた。負の選択の解析には HY TCR-Tg を使用し、胸腺の CD4、CD8 発現パターンと細胞数で評価した。

4) アゴニスト選択の評価

アゴニスト選択を受けるとされる制御性T細胞および腸管の CD8 $\alpha\alpha$ 型 IEL (腸管上皮間T細胞) の数および機能を解析した。腸管における IEL の解析には、蛍光ナノ粒子を用いた高感度組織染色法を用いて CD8 α 分子、CD8 β 分子をそれぞれ可視化した。制御性T細胞の検出は FoxP3 の細胞内染色によって評価した。

5) T細胞の機能解析

末梢に存在するT細胞のシグナル伝達を解析するために、脾臓細胞より MACS を用いて CD4 シングルポジティブT細胞を単離し、抗 CD3 抗体で刺激した際のT細胞の増殖、ZAP-70、LAT、ERK 等のシグナル伝達分子の活性化をリン酸化特異的抗体を用いたウェスタン解析によって検討した。

C. 研究結果

RhoH ノックアウトマウスは胎生致死にはならず、メンデルリズムに従い産まれてき

た。RhoHはRacの機能を抑制するという報告があり、RacはT細胞分化に必要であることが知られているので、RhoHを欠損させるとT細胞が異常活性化することが考えられた。しかしながら、予想に反してノックアウトマウスの胸腺は小さく、細胞数も野生型の1/5~1/3程度まで減少していた。CD4CD8ダブルポジティブ (DP) 細胞の数が減少しており、胸腺での β 選択の過程が抑制されていることが示唆された。実際、胎生16、17、18日におけるDPの分化がノックアウトマウスで遅れていることから、RhoHが β 選択に重要な働きをしていることが明らかとなった。

同時に、CD4シングルポジティブ(SP)細胞、CD8-SP細胞の割合も減少しており、ノックアウトマウスにおいて正の選択が阻害されていることが予想された。末梢においても脾臓、リンパ節ではCD4-SP、CD8-SP共に細胞数が激減しており、この結果も正の選択が阻害されていることと一致した。

さらに、OT-I およびOT-II TgマウスとRhoHノックアウトマウスを交配した結果、OT-IにおけるCD8-SPの生成およびOT-IIにおけるCD4-SPの生成の割合は著しく減少していた。いずれのの MausもRAG2欠損バックグラウンドであり、完全に単一のTCRを発現している。以上の結果から、RhoHが正の選択に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、HY TCR-Tg マウスと RhoH ノックアウトマウスを交配することにより、自己反応性クローンの除去、すなわち負の選択

における RhoH の機能を検討した。HY-Tg マウスのオスでは胸腺内で自己抗原と遭遇するため、負の選択によって胸腺細胞数は激減するが、RhoH ノックアウトにおいては胸腺細胞数が増加し、自己反応性のはずのCD8-SP が出現していた。この表現型は正の選択が起こる HY メスの表現型と酷似しており、RhoH の欠損により TCR のシグナルが減衰して負の選択が正の選択へとシフトした可能性が考えられる。

さらに興味深いことに、RhoH ノックアウトマウスにおいては通常のT細胞の分化は著しく抑制されているのに対し、アゴニスト選択を受ける制御性T細胞およびCD8 α IEL の分化は全く抑制されていないことを見いだした。この発見は、蛍光ナノ粒子を用いた高感度組織染色法によって腸管内の IEL (CD8 α および CD8 β 分子) を高感度で可視化できた結果であり、蛍光ナノ粒子を用いたことによるところが大きい。

成熟T細胞のシグナル伝達に関しては、TCR 刺激による増殖はほぼ完全に阻害されていた。RhoH ノックアウトT細胞ではTCR 刺激によるLAT、ERK のリン酸化が強く抑えられており、RhoH が TCR の下流でシグナル伝達に関与していることが示された。

D. 考察

1) 達成度について: 我々はRhoHのノックアウトマウスを世界に先駆けて作製し、この分子がT細胞の正のおよび負の選択に重要であることを示した。シグナル伝達におけるRhoHの役割についても解析を進め、

本年度の研究の達成度はきわめて高い。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について: RhoHは我々が独自に単離した遺伝子であり、独自にノックアウトマウスを作製し、成果をあげており、国際的にもオリジナリティーが高い。

3) 今後の展望について: 我々はT細胞のみならず、マスト細胞にも異常があることを予備的な実験からすでに見いだしており、今後はマスト細胞におけるRhoHの機能を詳細に検討する予定である。マスト細胞はアレルギーの主役であり、この新規分子がマスト細胞活性化に関与していれば、新規創薬の対象として優れているものと考えられる。

E. 結論

造血系特異的GタンパクRhoHのノックアウトマウスを作製することにより、RhoHがT細胞の分化、選択に重要であるが、アゴニスト選択には必要でないことが明らかとなった。この発見は、蛍光ナノ粒子を用いた高感度組織染色の技法によるところが大きい。腸管には非特異的な自然蛍光を発する食物由来の物質が多く含まれるため、組織蛍光染色においてバックグラウンドが必然的に高くなり、目的分子の発現が弱い場合は検出が難しいが、今回の我々の結果は蛍光ナノ粒子の強く持続するシグナルが、腸管における組織染色に非常に有利であることを証明した。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (欧文)

Dai Chida, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Harumi Suzuki, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Yoichiro Iwakura, Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007) 104:18205-18210.

○Fumiko Shiroki, Satoshi Matsuda, Tomomitsu Doi, Mari Fujiwara, Yoshito Mochizuki, Takashi Kadowaki, Harumi Suzuki and Shigeo Koyasu □The p85a regulatory subunit of classIA phosphoinositide 3-kinase regulates b-selection in thymocyte development. *J. Immunol.* (2007) 178: 1349-1356

○Hiroyo Oda, Harumi Suzuki*, Kouhei Sakai, Seiji Kitahara, Michael S. Patrick, Yoshinao Azuma, Kazuro Sugi, Toshio Kitamura, Jonathan Kaye and Mutsunori Shirai □*[Corresponding author] □Rac1 mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 single positive differentiation of a CD4+CD8+ immature thymocyte line □*J. Leuko. Biol.* (2007) 81: 500-508

Masayuki Murata, Yoshinao Azuma, Koshiro Miura, Mohd. Akhlakur Rahman, Minenosuke Matsutani, Masahiro Aoyama, Harumi Suzuki, Kazuro Sugi and Mutsunori Shirai □Chlamydial SET domain protein functions as a histone methyltransferase □*Microbiology* (2007) 153: 585-592

(和文) なし

2. 総説 (和文)

○T細胞分化における非定型Gタンパク質RhoHの機能
鈴木春巳、小田浩代、日本臨床免疫学会誌
印刷中 2008年2月号

3. 著書 なし

4. 学会発表

小田浩代、Michael S. Patrick、佐藤義則、酒井幸平、北原誠司、千田大、相澤慎一、白井睦訓、鈴木春巳 □T細胞分化におけるRhoHの機能、□第17回 KTCC 2007.6 京都

Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yoshinori Sato, Kohei Sakai, Takehiko Sasazuki, Sinichi Aizawa, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki □FUNCTION OF RHOH IN T CELL DEVELOPMENT, □Rolduc Workshop on T cell Biology 2007.5 Kerkrade, Netherland

Hiroyo Oda, Michael Patrick, Yoshinori Sato, Dai Chida, Takehiko Sasazuki, Mutsunori Shirai, Harumi Suzuki Function of RhoH in T cell development and activation 第37回日本免疫学会学術集会 2007.11 東京

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

分担報告書

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)
分担研究報告

腹腔内炎症応答制御法の開発と応用

分担研究者 土肥多恵子 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 部長
協力研究者 河村由紀 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員
協力研究者 水谷紀子 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員
協力研究者 川島 麗 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員

研究要旨

マウスを用いて腹腔マクロファージ(Pmf)が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、以下に示す腹腔内の新規自然免疫応答が明らかになった。

すなわち、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受けるとケモカイン CCL1 を産生する。Pmf も炎症刺激及び CCL1 により CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現する。CCL1 のオートクリン機構には positive feedback 機構が働く。さらに Pmf の接着分子の発現も高くなる。このため Pmf は傷害中皮細胞の局所にとどまって細胞塊を形成しながら癒着を誘導する。これらの結果に基づき我々は CCL1-CCR8 作用の阻害により開腹術後の癒着を阻害できることを in vivo モデルでも示した。本研究ではこれまでのマウスの研究成果に基づき、ヒト及びマウス腹腔内の CCL1 の検出を試み、また、その応用として、開腹術における腹腔内炎症が、癌の転移巣形成促進効果があることを検証する in vivo 実験を行った。

B. 研究方法

1) マウス腹腔内 CCL1 の検出

2%トリニトロベンゼンスルホン酸溶液及びエタノールの混合液を麻酔を行ったマウスの大腸内に注入し、穿孔性潰瘍を誘導した。その1日後腹腔内洗浄液を回収し、ELISA によって CCL1 を測定した。

A. 研究目的

腹腔に何らかの侵襲が加わるという状況は、生体にとって重篤なストレスである。例えば、外傷が腹腔内に及んだときや、腹腔内臓器の組織が炎症などによって傷つき組織傷害が漿膜側に及ぶ状態である。とくに、消化管の主な内容物が腸内細菌であることから、消化管の組織傷害が漿膜側に及んで穿孔がおこると、細菌成分によって強力な自然免疫応答が誘導されその免疫応答が致命的となることもある。さらに、今日日常的に行われている開腹を伴う外科手術における腹腔内侵襲に際しても同様な生体防御反応が生じているはずである。とくに、消化管の漿膜病変は、腹膜癒着を合併することによって、消化管の通過傷害、機能障害の原因となるだけでなく、時には致命的な病態に至る場合もある。実際、開腹手術後や消化管炎症による腹膜の炎症から起こる腹腔内臓器の組織癒着は、イレウス、不妊など重篤な合併症をもたらし、再手術の原因となるだけでなく、長期にわたる深刻な後遺症を引き起こして患者の QOL を著しく損なう。また、無症候性であっても再手術の際の手術時間延長・出血・他臓器損傷のリスクが高くなることは多くの外科医が認識している。癒着は、救命のため最初に行われる手術の際には重大に取り上げられない合併症で、その実態報告も多くないが、開腹術を受けた患者の 34.1%がその後 10 年間に癒着が原因と思われる理由で再入院しているという報告がある(Ellis et al, Lancet, 2005)。このように、癒着が原因で医療に費やされる負担は実は非常に大きく、

医療経済的にも大きな問題である。

手術創漿膜の治癒過程においては、組織の低酸素状態、乾燥等が引き金となって、炎症応答が惹起され、好中球の遊走、腹膜中皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ (mf) などの細胞の活性化、炎症性サイトカインの産生、血液成分の滲出と凝固、それに続く細胞間基質の増生が起こり、漿膜組織が修復される。この際、線維化を伴う組織再構築の結果として起こるのが癒着形成の機構であるとされている。癒着防止の標的として、これまでに実験的に効果の明らかかなものは、低分子ヘパリン・ステロイド・COX2 阻害など炎症反応の抑制であるが、出血と感染のコントロールが最優先される術後管理においては現実には受け入れがたいものも多い。結局、現在一般に使用されているのはヒアルロン酸ベースの膜を術野に留置する方法であるが、高価で、癒着防止効果が局所に限られるため必ずしも満足の行く結果が得られている訳ではない。

申請者らは、マウスを用いて腹腔マクロファージ(Pmf)が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、以下に示す腹腔内の新規自然免疫応答が明らかになった。すなわち、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受けるとケモカイン CCL1 を産生する。Pmf も炎症刺激及び CCL1 により CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現する。CCL1 のオートクリン機構には

positive feedback 機構が働く。さらに Pmf の接着分子の発現も高くなる。このため Pmf は傷害中皮細胞の局所にとどまって細胞塊を形成しながら癒着を誘導する。これらの結果に基づき我々は CCL1-CCR8 作用の阻害により開腹術後の癒着を阻害できることを *in vivo* モデルでも示した。

本研究ではこれまでのマウスの研究成果に基づき、ヒト及びマウス腹腔内の CCL1 の検出を試み、また、その応用として、開腹術における腹腔内炎症が、癌の転移巣形成促進効果があることを検証する *in vivo* 実験を行った。

B. 研究方法

2) マウス腹腔内 CCL1 の検出

2%トリニトロベンゼンスルホン酸溶液及びエタノールの混合液を麻酔を行ったマウスの大腸内に注入し、穿孔性潰瘍を誘導した。その1日後腹腔内洗浄液を回収し、ELISAによってCCL1を測定した。

3) ヒト開腹術における腹腔内 CCL1 の検出

自治医科大学さいたま医療センター外科の協力を得て、消化管摘出を目的とした開腹術の際に定量の生理的食塩水を用いて腹腔内を洗浄し、出来るだけ多くを回収するという方法で、可能な限り洗浄液を定量的に回収した。細胞成分を遠心により除き、フィルター濾過の後、アルブミン除去等の前処理を行って濃縮したサンプルを用いてELISAによりCCL1の定量をおこなった。

また洗浄液の総蛋白濃度を測定した。

4) 胃癌の経腹膜遠隔転移巣形成マウスモデルにおける開腹術侵襲の影響

マウス腹腔内に、ヒト胃癌細胞株 KATOIII を、注射針を用いて穿刺により投与した。別の群のマウスには同数の細胞を腹壁正中1cm長の切開創から投与した。切開創は細胞投与後4針の縫合を行った。12週間後、肝臓、脾臓その他の腹腔内臓器組織の観察を行い、肉眼的転移巣の数を調べた。

C. 研究結果

1) マウス腹腔内 CCL1 の検出

癒着を起こしているマウスでは腹腔内 CCL1 濃度が優位に上昇していた。

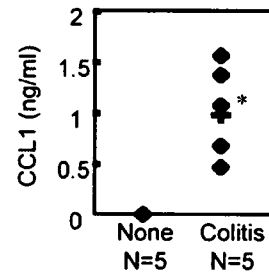


図1. マウス腹腔内洗浄液中の CCL1 濃度

2) ヒト開腹術における腹腔内 CCL1 の測定

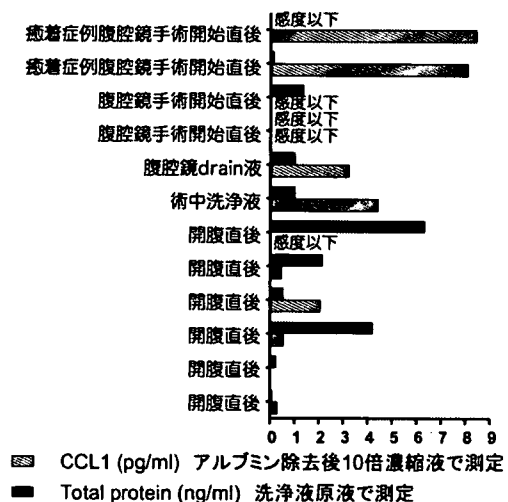


図2.ヒト腹腔内洗浄液中の CCL1 濃度

図2に示すようにかなり低い濃度であったがアルブミン除去後の濃縮液で CCL1 が測定可能であった。特筆すべき点は総蛋白濃度とは無関係に CCL1 の分泌がみられ浮こである。総蛋白濃度は手術操作による出血の影響が大きいと予想されるが、CCL1 はそれと関連無く開腹術中の腹腔内に分泌されていると考えられる。

3) マウス胃癌転移巣形成における開腹術侵襲の影響

穿刺により癌細胞を腹腔内投与した場合、12週後には、すべてのマウスにおいて転移巣の形成はみられなかった。これに対して、腹壁の切開と縫合を加えた群においては83%のマウスに転移巣形成がみられた。この結果は我々がこれまで明らかにしてきた開腹術侵襲による腹腔内応答が、癌細胞の遠隔転移を促進する方向に働いていることを示している。

D. 考察

1) 達成度について

マウス及びヒトで腹腔内遊離 CCL1 を検出することができた。また、癌の遠隔転移予防に、腹腔内炎症応答の制御を応用するための基礎的知見が得られた。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々が見いだした、ケモカイン分子の一つ腹腔内の炎症や手術侵襲における重要な役割は、生体深部における自然免疫応答のメカニズムとして学術的に重要な発見であ

る。また、ヒトでの検証は今後の展開に必須の試験であった。ケモカイン作用の阻害による腹腔内炎症応答の制御が可能となれば、これを術後癒着の予防に応用することによって、日常的に多数行われている開腹術の予後を改善することが可能であると予測される。これによって、患者の QOL を改善し、医療経済の負担を減じる効果によって社会的な意義をもたらすことができる。さらに癒着の予防だけに限らず今回の成果により、がんの遠隔転移にも影響する可能性が示唆された。

3) 今後の展望について

CCL-CCR8 作用の阻害により腹膜癒着の予防だけでなく、がんの遠隔転移の予防効果の有無についても阻害剤を用いて *in vivo* での検討を続ける。

E. 結論

本年度は、侵襲が加わった腹腔内での CCL1 の検出を行い、ヒトの術中洗浄液でも確認した。また、開腹術操作によって癌の経腹膜遠隔転移が促進されることを示した。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

○ 1) Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T. Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. *J Immunol* 2007;178:5296-5304.

2) Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T. Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J. Immunol.* 2007;79:7478-7487.

(和文) なし

2. 総説 ・(欧文と和文、分けて下さい)
(欧文)

1) Dohi T, Kawamura YI. Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;15:15.

(和文) なし

3. 著書 ・(欧文と和文、分けて下さい)
なし

4. 学会発表

○ 1) 土肥多恵子: 消化管穿孔性病変における腹腔内生体防御機構, 第 4 4 回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2007 年 7 月 8 日

○ 2) 土肥多恵子: 消化管の免疫/炎症と組織修復, 第 5 回広島消化器免疫研究会, 広島, 2007 年 4 月 10 日

○ 3) 土肥多恵子: 消化管炎症における免疫応答と組織修復, 神戸免疫アレルギー談話会, 神戸, 2007 年 6 月 14 日

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

マalariaワクチン開発に向けてのナノメディシン研究

分担研究者 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・部長 狩野繁之
協力研究者 群馬大学大学院工学研究科応用化学生物化学専攻・准教授 奥 浩之

研究要旨: 本年度はナノ技術によって、マalaria感染に対する予防効果を持つと期待されるマalariaワクチンのDDS化研究を行い、次の3点について成果を得た。(1)DDS化に用いる7種類の高分子材料の化学合成。(2)生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子について作成法の比較と改良。(3)マalaria原虫とワクチンを可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成。

A. 目的

これまでに我々は、熱帯熱マalaria原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼをマalariaワクチン候補抗原と想定し、そのワクチン材料と DDS の開発をナノスケールで達成することを目的とした研究を、群馬大学工学部と共同研究している。開発する材料としては、蛋白抗原を徐々に放出できる材料(すなわち徐放性人工抗原)を目標として研究を行っている。

B. 研究方法

今年度は以下の3点を重点に研究を行った。即ち、(1)DDS化ワクチンに用いる高分子材料の化学合成。(2)生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子について作成法の比較と改良。(3)マalaria原虫とワクチンを可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成。いずれも高分子化学、ペプチド化学、有機合成化学、の手法を用いている。

C, D. 研究結果と考察

(1)ワクチンのDDS化に用いる高分子材料の化学合成

アミノ酸を原料とする人工抗原ペプチドと強い相互作用の予想される、アミノ酸とヒドロキシカルボン酸からなるポリデブシペプチドの合成研究を行っている。今年度は4残基または5残基の繰り返し配列からなる高分子材料を7種類合成した。これらの高分子材料の詳細は特許出願後に公表

を行う。

(2)生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子

熱帯熱マalaria原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼのアミノ酸配列をもとにしたワクチン候補抗原と生分解性高分子をもちいて微粒子化に成功した。



Figure 1. 人工抗原ペプチドを内包したナノ微粒子の水中への分散の様子。速やかに分散する点で優れている。

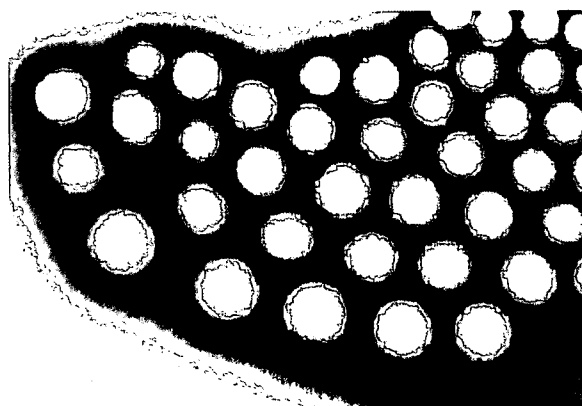


Figure 2. 人工抗原ペプチドを内包したナノ微粒子の透過電子顕微鏡写真。

微粒子の基材には(a)研究室で開発中のポリデプシペプチド、および(b)市販の高分子材料を選択した。また人工抗原ペプチドは水系溶液として用いた。得られた W/O/W エマルジョンを攪拌後、有機溶媒を揮発させ、微粒子を得た。電子顕微鏡観察と AFM (= 原子間力顕微鏡) により、微粒子は球状で、その大きさは主に数百 nm で分布することがわかった。

微粒子の大きさを制御するために、水系溶液の条件を様々に検討した。これによって、マラリア原虫人工部分抗原を内包したナノオーダー微粒子の作成に成功した。本研究で開発された微粒子で免疫した場合、抗原としてだけでなく、一定のアジュバント効果も期待される。今後は本材料を用いて実験動物に様々な方法で免疫するなど、その抗原性の強さ、抗原リリース持続期間等を解析し、微粒子抗原としての有用性を解析してゆく。微粒子化技術に関し学会発表(1)と特許出願(1)を予定している。

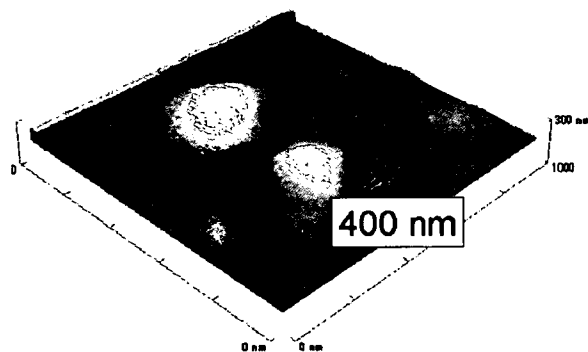


Figure 3. 人工抗原ペプチドを内包したナノ微粒子の AFM 写真。

(3) マラリア原虫とワクチンを可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成

マラリア原虫やワクチンを分子プローブで可視化することを目的に、カルボキシフルオレセイン (CF) で蛍光標識化した、アンホテリシン B (AmB) と人工抗原ペプチドを合成した。AmB が酸に弱くポリエンを保持していることから保護基として Fmoc 基を選択した。また AmB と CF を結ぶリンカーには、6-アミノヘキサン酸からアミド化およびホフマン転

移反応から合成したペンタメチレンジアミンを用いた。また、ワクチン用の人工抗原ペプチドは活性エステル法で CF 蛍光標識を行った。研究成果として学会発表(2,3)を行った。

E. 結論

本年度はナノ技術によって、(1) DDS 化に用いる 7 種類の高分子材料の化学合成、(2) 生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子について作成法の比較と改良、(3) マラリア原虫とワクチンを可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成。これらを総合的に用いることで、効果的な予防ワクチンを開発できるように、特性評価や改良を進めてゆきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし(特許出願を予定しているため)

2. 学会発表

- (1) 俵 義宣、奥 浩之、山田圭一、花岡宏史、遠藤啓吾、狩野繁之、片貝良一「熱帯熱マラリア原虫由来の人工抗原を内包したナノ・マイクロ微粒子に関する研究」第 88 回日本化学会春期年会、池袋、2008.3.28.
- (2) 山口武志、奥 浩之、山田圭一、片貝良一、畑生俊光、嶋田淳子、川合 覚、狩野繁之「抗マラリア原虫薬としてのアンホテリシン B の蛍光標識化研究」日本化学会第 1 回関東支部大会、八王子、2007.11.3.
- (3) Takeshi Yamaguchi, Hiroyuki Oku, Keiichi Yamada, Ryoichi Katakai, Toshimitsu Hatabu, Junko Shimada, Satoru Kawai, and Shigeyuki Kano「Synthesis and Antiplasmodial Properties of an Amphotericin B and Carboxyfluorescein Conjugate」、群馬国際化学シンポジウム(The 2nd Gunma International Symposium on Chemistry, GIS2007, Pre-ISNA-12)、桐生、2007.7.21.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

- (1) 奥 浩之、俵 義宣、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、狩野繁之「熱帯熱マラリア原虫蛋白質を内包したナノ・マイクロ微粒子の製造法」国立大学法人群馬大学、2008 年 3 月特許出願予定

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)
分担研究報告

破骨細胞形成および活性化過程における細胞動態のバイオイメージング
—骨破壊病態モデル動物を用いて—

分担研究者 鈴木恵子 昭和大学歯学部歯科薬理学教室・講師

協力研究者 星野昭芳 国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・流動研究員

研究要旨

遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を使用した破骨細胞形成実験の結果から、複数の単核細胞が融合して多核細胞を形成する破骨細胞分化過程において、細胞遊走性に関与するOPN, CD44, CCR1, CCR5が重要であることが示された。また、これらの細胞を細胞骨格構成タンパク質(actin, tubulin, paxillin)、その再構成のために必要とされているシグナリング分子(Rac1, Cdc42, PI3K, WASP, WAVE2)に対する抗体を用いて免疫2重染色を行った結果、それらの細胞内局在が厳密に制御されていることが示された。さらに、CCR1遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞では骨形成を担当する骨芽細胞の分化が顕著に低下しており、ミネラル沈着が全く観察されなかったことから、骨吸収と骨形成間のアンカプリングが起きていることが示唆された。今後、まだ解明されていない生理的な骨代謝回転に必要なカプリングファクターを検索するうえで重要な情報を与えることが期待される。

A. 研究目的

本研究は、病的骨吸収疾患の効果的な治療法の開発を最終目的としている。

ヒトを含む動物は、成体においても骨吸収と骨形成がカップルした骨代謝を継続的に行い、常に骨改造を行うことにより身体支持・運動という動物にとって不可欠な機能を維持している。また、この両反応は厳密に制御される必要がある。ところが関節リウマチ、歯周病、骨転移腫瘍などでは骨代謝バランスの崩壊（骨吸収異常亢進）

により、重篤な骨破壊が起こる。その結果、歩行困難・歯の喪失・耐え難い骨痛などが生じ、患者のQOLは著しく損なわれる。これら成因の異なる複数の疾患において骨破壊を起こす唯一の細胞である破骨細胞は造血幹細胞に由来するが、多くの調節因子およびそれらの受容体を免疫・炎症に関与する細胞と共有するため、炎症性骨破壊の病態は極めて複雑である。たとえば関節リウマチでは増殖した滑膜細胞と免疫系の過剰な活性化により骨代謝バランスの崩壊が誘

導されると考えられている。したがって、効果的な治療法の開発という最終目的を果たすためには、まず、このように複数の細胞種が相互に関連する病的骨破壊機構の解明をめざす必要がある。本研究計画の初年度にあたる今年度は、バイオイメージング手法を用いて *in vitro*, *in vivo* 両面から研究を行う準備として、以下に示すような我々独自の研究手法を確立することを目的とした。

1) 半導体ナノ粒子を用いたバイオイメージング手法の確立

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって強力な蛍光を出す。この物理現象は理論的には古くから証明されていたが、近年、レーザー共焦点顕微鏡など蛍光観察技術の進歩と相まって、医療・生物学への応用が確立され急速に進展している。半導体ナノ粒子は、蛍光強度が高いことに加えて、単一励起波長照射でも粒子サイズの差により異なる波長をもつ蛍光を発すること、また長時間の励起光照射によっても蛍光強度が減衰しないという特徴を持つ。そのため、蛍光減衰曲線を読みとることにより他の蛍光分子と区別することもできる。すなわち複数の蛍光特性をもつ分子と併用し、標的分子の細胞内および生体内での動態を追跡することで、時空間的な相互作用を解明することが可能である。このような可視化技術は非侵襲の状態で体外からの観察が可能であることから、麻酔下で生きたままの動物、すなわち同一動物体内の変化を詳細に検討できるという極めて有用な手法である。

2) 炎症性骨破壊の病態モデル動物作製と骨破壊評価法の確立

転移部位において骨破壊を起こす T 細胞リンパ腫由来細胞 (BW5147) から、我々がクローニングした新規骨吸収因子 γ -GTP (GGT) はリウマチ関節炎の患者、関節炎モデル動物で血中濃度上昇が認められたことから、病的骨破壊の原因物質のひとつであると考えられる。さらに歯周病菌由来 GGT をラット歯肉溝に投与することにより歯槽骨破壊が惹起された。このときの組織レベルでの検討の結果、破骨細胞の局在は GGT 投与後の時間経過にもなつて 2 相性の変化を示すことが示された。すなわち、早期の破骨細胞集積はすでに近傍に存在していた成熟破骨細胞の遊走を示し、その後の変化は破骨細胞への分化能を有する細胞（生体内においてはまだ同定されていない）が未知の全身を制御する情報伝達手段により活性発現部位（骨破壊誘導局所）に送達されていることを示すものである。このことから、腫瘍骨転移と骨破壊部位への破骨前駆細胞の移動は共通因子により制御される類似のメカニズムによる可能性もあることが示唆された。従来、炎症性骨破壊は炎症反応により産生されたサイトカインなどにより、はからずも破骨細胞が活性化されてしまう望ましくない生体反応であると考えられていた。しかし、最近、破骨細胞による組織破壊は、炎症局所への細胞の速やかなリクルートに必要な反応であるという説も提唱されている。これを解明するために複数の細胞種がインタクトな状態

で相互作用する *in vivo* の解析手法の確立をめざす。

B. 研究方法

1) 培養破骨細胞形成系を用いる研究

本研究で使用する破骨前駆細胞は継代培養が不可能であるため、ラット骨髄由来細胞を M-CSF, RANKL 共存下で培養することにより、成熟破骨細胞を誘導する。また、実験によっては遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を使用し、野生型と比較することにより破骨細胞分化や活性化に対する標的分子の必要性についても検討する。現在、所有している遺伝子欠損マウスは細胞遊走性に関与することが知られている細胞接着因子としてオステオポンチン(OPN) および CD44、同じく細胞遊走性に関与するケモカイン受容体のうち、破骨細胞分化過程で上昇が認められる CCR1, CCR5 (東大・松島教授より供与) と歯周病菌の菌体成分およびその産生物がリガンドとして作用するために必須である Toll-like receptor (TLR)-2, TLR4 を標的としたものであり、いずれも骨破壊担当細胞である破骨細胞の分化や機能発現に重要な役割を果たす分子であることが知られている。

上記方法で形成された破骨細胞 (異なる分化段階の細胞を取得する) について、real time RT-PCR, Western blot により、生化学的に検討する。また、細胞を固定したのちに免疫蛍光染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡により画像取得し、画像解析することにより標的分子の細胞内局在について検討す

る。

2) 炎症性骨破壊の病態モデル動物を用いる研究

我々はすでに歯周病菌由来 GGT をラット歯肉溝に局所投与して歯槽骨破壊を起こす病態モデルを確立している。本研究ではこの方法を用いて、グラム陽性菌の産物を用いた歯槽骨破壊モデルを作製する。また、小動物において口腔内に投与するという手技の難しさが難点であるため、さらに効率よく安定して作製できるよう改善点をみつける。

C. 研究結果

1) 高輝度の蛍光を発するナノ粒子を負荷した破骨前駆細胞から成熟破骨細胞を誘導することができた。また、Luciferase transgenic ラットの繁殖に成功し、このラット由来の骨髄細胞から野生型と同様の破骨細胞を誘導することができた。Luc Tgラット由来骨髄細胞を野生型ラットに導入し、その生体内動態について発光により観察する *in vivo* imaging についての準備を進めている。

2) 歯周病にみられる歯根吸収や歯槽骨破壊はグラム陰性菌由来のリポポリサッカライドが原因であると考えられているが、本研究において、口腔内に存在するグラム陽性菌 (*Streptococcus mutans* 109c, *gordonii* *challis*) 菌体およびその培養上清が強い破骨細胞誘導活性をもつことをあらたに見出した。また、グラム陽性菌産生物に加えて GGT も、破骨細胞形成に必須の因子として知られる RANKL 非存在下で破骨細胞を誘

導することが示され、炎症局所では生理的骨吸収とは少なくとも一部異なる機構で骨破壊が起こる可能性が示唆された（論文執筆中）。現在、菌体成分をラット歯肉溝に局所投与することにより、炎症性骨破壊病態モデルを作製中である。

3) 遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を使用した破骨細胞形成実験の結果から、複数の単核細胞が融合して多核細胞を形成する破骨細胞分化過程において、細胞遊走性に関与するOPN, CD44, CCR1, CCR5が重要であることが示された。また、これらの細胞を細胞骨格構成タンパク質(actin, tubulin, paxillin)、その再構成のために必要とされているシグナリング分子(Rac1, Cdc42, PI3K, WASP, WAVE2)に対する抗体を用いて免疫2重染色を行った結果、それらの細胞内局在が厳密に制御されていることが示された。さらに、CCR1遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞では骨形成を担当する骨芽細胞の分化が顕著に低下しており、ミネラル沈着が全く観察されなかったことから、骨吸収と骨形成間のアンカプリングが起きていることが示唆された。今後、まだ解明されていない生理的な骨代謝回転に必要なカプリングファクターを検索するうえで重要な情報を与えることが期待される。

D. 考察

1) 達成度について

本年度の2つの目的、すなわち、①半導体ナノ粒子を用いたバイオイメーキング手法の確立、②炎症性骨破壊の病態モデル動

物作製およびその評価法の検討について順調に成果をあげることができた。とりわけ、イメージングに使用するナノ粒子負荷およびルシフェラーゼ遺伝子を発現させた破骨前駆細胞からも通常通り成熟破骨細胞が形成されることが確認されたこと、さらに生きたままの麻酔動物のエックス線 CT 画像取得および骨形態計測法を確立することもでき、今後、本研究を継続することで一定の成果が得られると考えられる。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

生きたままの動物を使用したIn vivo imagingは国際的にみてもまだ数が少なく先進的な研究である。これに培養細胞系を用いた生化学・分子生物学・細胞生物学的な研究成果を加えることにより、トランスレーショナル・リサーチとして当該分野の学術的発展に多大な影響を与えることが予想される。また病態モデル動物での実験は、麻酔下で同一動物での時空間変化が検討できるため、得られる結果は非常に信頼性が高く、動物数削減の観点からも有用な手法である。すなわち、最低限の動物使用により、ヒトでの疾患治療薬開発に貢献する重要な示唆を与える可能性が高いことから社会的に大きな意味をもつと考えられる。

3) 今後の展望について

In vivo imaging手法を用いた研究により種々の標的分子および細胞の体内動態の追跡ができるようにする。また炎症性骨破壊の病態を解明するとともに、現在開発中の治療薬を適用してその有効性について同時

に解析可能にする予定である。

E. 結論

本研究計画の初年度にあたる本年度の研究では以下の結果が得られた。

- 1) 高輝度の蛍光を発するナノ粒子を負荷した破骨前駆細胞から成熟破骨細胞を誘導することができた。
- 2) Luciferase transgenicラット由来の骨髄細胞から野生型と同様の破骨細胞を誘導することができた。
- 3) 口腔内に存在するグラム陽性菌 (*Streptococcus mutans* 109c, *gordonii* challis) 菌体およびその培養上清が強い破骨細胞誘導活性および培養頭蓋冠の骨吸収活性をもつことを見出した。現在、菌体成分をラット歯肉溝に局所投与することにより、炎症性骨破壊病態モデルを作製中である。
- 4) 上記のグラム陽性菌産物に加えGGTでも破骨細胞形成に必須の因子として知られるRANKL非存在下で破骨細胞を誘導することが示され、炎症局所では生理的骨吸収とは一部異なる機構で骨破壊が起こる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, and Yamada S: Functional significance of intracellular form of osteopontin in the migration and fusion of

osteoclasts. *Dentistry in Japan*, 43: 150-153, 2007.

2) Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami and Shoji Yamada: Pharmacological topics of bone metabolism: A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis, *J Pharmacol. Sci.*, in press.

- 3) Suzuki K, and Yamada S: Rac1 and Cdc42, members of Rho-family GTPase, have different subcellular distributions in osteoclasts. *Oral Ther Pharmacol*, in press.

2. 総説 なし

3. 著書 なし

4. 学会発表

1) 鈴木恵子、山田庄司：“メタボローム解析による難治性疾患治療法の基盤構築—リウマチ関節炎発症メカニズムの解明”（平成18年度昭和大学共同研究成果発表会, Tokyo, March 2007）

2) Keiko Suzuki, Sawako Moriwaki, Shumpei Niida, Shoji Yamada. γ -glutamyltranspeptidase (GGT), a marker of inflammation, induces osteoclastogenesis by stimulating cytoskeletal rearrangement of preosteoclasts. (The 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Nagoya, March 2007)

3) Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami, and Shoji Yamada. A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. (The 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Nagoya, March 2007)

4) Keiko Suzuki, Sadaaki Takeyama, Shinobu Murakami, Hisashi Shinoda and Shoji Yamada. Relationship between bone resorption and bone formation in neonatal calvaria cultured with bisphosphonates. (The 25th Annual Meeting of The Japanese Society for Bone and Mineral Research, July 2007)

5) Keiko Suzuki, Susan R. Rittling, David T. Denhardt, Shoji Yamada and Jaro Sodek. Intracellular Form of Osteopontin Plays an Important Role in Osteoclastogenesis and Bone Resorption. (Gordon Research Conference, Biddeford, USA, August 2007)

6) S. Moriwaki, K. Suzuki, M. Takami, K. Ikeda, S. Niida. GGT gamma-Glutamyltranspeptidase Stimulates Osteoclast formation by Acting Directly on Osteoclast Precursor Cells. *J Bone Min Res*,

○

22 (suppl 1) (29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Hawaii, USA, September 2007)

7) 鈴木恵子、山田庄司：骨吸収メカニズムの解明とそれに基づいた創薬の試み、(ハイテクリサーチセンター整備事業成果報告会、Tokyo, March 2008)

8) Keiko Suzuki, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto and Shoji Yamada: Pam₃CSK₄, a TLR2 agonist, induces osteoclastogenesis RANKL-independently. (The 81st Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2008)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし