

国際会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
Horie S, Watanabe Y, hen R, Tomita N, Oosawa F, Fujisawa S, Ono M, Fukumoto M, Mori S, Matsumura Y, Kodama T.	Bladder cancer therapy using nanobubbles and two different intensities of ultrasound.	The 2008 Nanomedicine Conference.	Program	p5.	19-24 September 2008.	Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain.
Chen R, Chiba M, Watanabe Y, Horie S, Tomita N, Fukumoto M, Mori S, Kodama T.	Local gene delivery system of nano/microbubbles-enhanced ultrasound aimed for treatment of gingival tumor.	2008 International Conference on Frontiers of Dental and Craniofacial Research.	Program pp	96-97.	November 1-3, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China,
Tomita N, Horie S, Oosawa F, Rui C, Watanabe Y, Morikawa H, Ohki K, Fukumoto M, Mori S, Kodama T.	Development of diagnostic imaging system for regional lymph node micrometastasis with high-frequency ultrasound.	2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).	Abstract Book	p388.	November 2-5, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China.
Chen R, Tomita N, Baba T, Oosawa F, Watanabe Y, Horie S, Mori S, Fukumoto M, Kodama T.	Contrast-Enhanced High-Frequency Ultrasound Imaging of Liver Metastases in preclinical models.	2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).	Abstract Book	p391.	November 2-5, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China.

国内会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
小玉哲也, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 佐久間基成, 陳鋭, 大木宏介, 森川秀広, 森士朗, 小野栄夫.	高周波超音波イメージングシステムによるシスプラチン抗腫瘍効果の定量化.	第46回日本生体工学会大会	プログラム・抄録集	277頁.	2008年05月08日-10日	神戸国際会議場
宮下仁, 森士朗, 富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	ナノバブル超音波システムを用いた抗癌剤および抗腫瘍分子導入による新たな癌治療法の開発.	第32回日本頭頸部癌学会/第29回頭頸部手術技研究会	34巻2号	148頁.	2008年6月11日-13日	ハイアットリージェンシー 東京.
森士朗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	口腔癌の診断・治療のためのナノバブルと超音波を用いた画像診断・分子導入システムの開発.	第32回日本頭頸部癌学会/第29回頭頸部手術技研究会.	頭頸部癌2008年34巻2号	165頁.	2008年6月11日-13日	ハイアットリージェンシー 東京
木宏介, 森士朗, 堀江佐知子, 富田典子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	ナノバブルを用いた腫瘍血管造影法による口腔癌早期診断システムモデルの開発.	第32回日本頭頸部癌学会/第29回頭頸部手術技研究会.	頭頸部癌2008年34巻2号	165頁.	2008年6月11日-13日	ハイアットリージェンシー 東京
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 陳鋭, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 森士朗, 小玉哲也.	マウス骨格筋でのNa/I symporter (NIS) 遺伝子発現の可視化.	日本機械学会2008年度年次大会	講演論文集 Vol.2.	23-24頁	2008年08月03日~07日	横浜国立大学

陳銳, 千葉美麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 林治秀福本学, 森士朗小玉哲也.	歯周組織への遺伝子導入を目指した新しい非ウイルス法の開発.	日本実験力学会 2008 年度年次講演会	講演論文集	52-53 頁.	2008 年 6 月 30 日-7 月 2 日	北海道大学学術交流会館
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 森士朗, 小玉哲也.	ナノ・マイクロバブルと超音波によるシスプラチンの抗腫瘍効果の増強.	日本超音波医学会 第 36 回	東北地方会学術集会プログラム抄録集	5 頁	2008 年 9 月 21 日.	山形テルサ
富田典子, 堀江佐知子, 大澤ふき, 李麗, 渡辺夕紀子, 陳銳, 大木宏介, 森川秀広, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	高周波超音波を利用した腫瘍性リンパ節内血管構築による早期診断法の開発.	東北大学イノベーションフェア 2008 in 仙台			2008 年 9 月 30 日	仙台国際センター
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 富田典子, 大澤ふき, 小野栄夫, 藤澤優, 森士朗, 福本学, 松村保広, 小玉哲也	膀胱がん治療のための分子デリバリーシステムの開発.	東北大学イノベーションフェア 2008 in 仙台.			2008 年 9 月 30 日	仙台国際センター.
渡邊 夕紀子, 堀江 佐知子, 富田 典子, 大澤ふき, 陳 銳, 船木 善仁, 菊地洋平, 酒巻 学, 山崎 浩道, 石井 慶造, 森 士朗, 小野 栄夫, 小玉哲也.	各種疾患モデルマウス前脛骨筋における NIS 遺伝子発現の PET による可視化.	東北大学イノベーションフェア 2008 in 仙台.			2008 年 9 月 30 日.	(仙 台 国 際 セ ン タ ー
大木宏介, 森士朗, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広	ナノバブルと超音波を用いた腫瘍血管造影法による口腔癌診断システムモデルの開発.	第 53 回日本口腔外科学会総会.	日本口腔外科学会雑誌 54 号	139 頁.	2008 年 10 月 20 日-21 日	アステイトくしま.

宮下仁, 森士朗, 大木宏介, 森川 秀広.	ナノバブルと超音波を用いた抗癌剤および抗腫瘍分子導入による新たな癌治療法の開発	第 53 回日本口腔外科学会総会.	日本口腔外科学会雑誌 54 号	140 頁	2008 年 10 月 20 日-21 日	アステイトくしま.
陳鋭, 富田典子, 馬場泰輔, 大澤 ふき, 渡邊夕紀 子, 堀江佐知子, 森士朗, 福本学, 小玉哲也.	ナノバブルを用いた肝転移診断に関する三次元高周波超音波イメージング.	第 67 回日本癌学会学術総会.	Proceedings	p313.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋国際会議場.
堀江佐知子, 渡 邊夕紀子, 陳鋭, 富田典子, 大澤 ふき, 小野栄夫, 福本学, 藤澤優, 松村保広, 森士 朗, 小玉哲也.	膀胱がん治療のための新しい薬剤到達法の開発.	第 67 回日本癌学会学術総会.	Proceedings	p315.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋国際会議場.
渡邊夕紀子, 堀 江佐知子, 富田 典子, 陳鋭, 大 澤ふき, 船木善 仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井 慶造, 小野栄夫, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	癌疼痛緩和および PET によるイメージング.	第 67 回日本癌学会学術総会.	Proceedings	p388.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋国際会議場.
富田典子, 堀江 佐知子, 大澤ふ き, 陳鋭, 渡邊 夕紀子, 森川秀 広, 大木宏介, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	高周波超音波を利用した新しいリンパ節内微小転移診断システムの開発.	第 67 回日本癌学会学術総会.	Proceedings	p495.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋国際会議場.
堀江佐知子, 渡 邊夕紀子, 陳鋭, 富田典子, 大澤 ふき, 小野栄夫, 福本学, 藤澤優, 松村保広, 森士 朗, 小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いた膀胱がんへの遺伝子導入法の開発.	第 46 回日本癌治療学会総会.	日本癌治療学会誌 第 43 巻第 1 回	113 頁.	2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日	名古屋国際会議場.

渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 船木善仁, 菊池洋平, 酒巻学, 山崎浩道, 石井慶造, 森士朗, 小玉哲也.	半導体 PET による Sodium iodide Symporter (NIS) 遺伝子発現の可視化: ナノバブルと超音波を利用した遺伝子導入法.	第 29 回サイクロトロン共同利用実験研究会 28 頁.			2008 年 11 月 17-18 日	東北大学 サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター
李麗, 富田典子, 森士朗, 大澤ふき, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 阪本真弥, 高橋昭喜, 小玉哲也.	高周波超音波を用いたリンパ節早期転移の画像診断システムの開発.	第 42 回日本生体医工学会東北支部大会.	講演論文集.	34 頁.	2008 年 12 月 13 日	東北大学 青葉記念会館
李麗, 富田典子, 森士朗, 大澤ふき, 堀江佐知子, 陳鋭, 渡邊夕紀子, 阪本真弥, 高橋昭喜, 小玉哲也.	ナノバブルを用いたリンパ節転移診断に関する三次元高周波超音波イメージング法の開発.	日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会	講演論文集	71-72 頁.	2009 年 1 月 23 日-24 日	札幌コンベンションセンター
李麗, 堀江佐知子, 陳鋭, 渡邊夕紀子, 阪本真弥, 高橋昭喜, 森士朗, 小玉哲也.	リンパ節転移早期診断に関する三次元高周波超音波イメージング			1 頁		
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 李麗, 森士朗, 小玉哲也.	表在性膀胱がんに対する新しい遺伝子治療法の開発	日本超音波医学会東北地方会 第 37 回学術集会	プログラム・抄録集	5 頁	成 21 年 3 月 15 日(日)	仙台市情報・産業プラザ (アエル 5 階)

2008年(平成20年)

1. tsuko Aoi, Yukiko Watanabe, Shiro Mori, Masahiko Takahashi, Georges Vassaux, Tetsuya Kodama: Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Bio.* 2008. 34(3):425-34.
2. Shiro Mori, Naoko Tanda, Mitsuko R Ito, Hisashi Oishi, Takahito Tsubaki, Hiroaki Komori, Ming-Cai Zhang, Masao Ono, Masahiko Nishimura, Masato Nose: A novel recombinant congenic mouse strain developing arthritis with enthesopathy. *Pathol Int.* 2008. 58(7):407-414.
3. Hitoshi Miyashita, Shiro Mori, Yutaka Fukumoto, Atsushi Sato, Manabu Fukumoto, Hiroshi Kawamura: Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports.* 2008. 1: 821-825.
4. Yukiko Watanabe, Atsuko Aoi, Sachiko Horie, Noriko Tomita, Shiro Mori, Hidehiro Morikawa, Yasuhiro Matsumura, Georges Vassaux, Tetsuya Kodama : Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Science* 2008 In press

2007年(平成19年)

5. Ming-Cai Zhang, Shiro Mori, Fumiko Date, Hiroshi Furukawa, Masao Ono: A non-MHC locus determines tissue-specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model. *Ann Rheum Dis.* 2007. 66:242-245.
6. Naoko Misu, Ming-Cai Zhang, Shiro Mori, Tatsuhiko Miyazaki, Hiroshi Furukawa, Takeshi Sasaki, Masato Nose, Masao Ono: Autosomal loci associated with a sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. *Eur J Immunol* 2007. 37(10): 2787-2796.

2006年(平成18年)

7. Hiroaki Komori, Hiroshi Furukawa, Shiro Mori, Mitsuko R. Ito, Miho Terada, Ming-Cai Zhang, Naoto Ishii, Nobuhiro Sakuma, Masato Nose, and Masao Ono: A Signal Adaptor SLAM-Associated Protein Regulates Spontaneous Autoimmunity and Fas-Dependent Lymphoproliferation in MRL-*FasIpr* Lupus Mice. *J Immunol.* 2006. 176:395-400.
8. Shiro Mori, Ming-Cai Zhang, Naoko Tanda, Fumiko Date, Masato Nose, Hiroshi Furukawa, Masao Ono: Genetic characterization of spontaneous ankylosing arthropathy with unique inheritance from Fas-deficient strains of mice. *Ann Rheum Dis.* 2006. 65:1273-1278.
9. Tetsuya Kodama, Atsuko Aoi, Georges Vassaux, Shiro Mori, Hidehiro Morikawa, Kenichiro Koshiyama, Takeru Yano, Shigeo Fujikawa, Yukio Tomita. A non-invasive tissue-specific molecular delivery method of cancer gene therapy. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2006. 15(4) 226-229.

10. 千葉夏未, 阪本真弥, 福本 学, 駒井伸也, 篠田 壽, 森 士朗, 村上裕規, 犬飼 健, 飯久保正弘, 鹿島 勇, 笹野高嗣: 卵巣摘出カニクイザル下顎頭の形態学的変化に関するエックス線学的並びに組織学的研究. 歯科放射線 2006. 46(3): 135-141.

- Yasunaga M, Koga Y, Saito Y, Matsumura Y. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer* 2008. in press
2. Matsumura Y. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:899-914.
3. Matsumura Y. Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38:793-802.
4. Nakajima TE, Yanagihara K, Takigahira M, et al. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res* 2008; 68:9318-22.
5. Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, et al. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 2008; 122:2148-53.
6. Saito Y, Yasunaga M, Kuroda J, Koga Y, Matsumura Y. Enhanced distribution of NK012, a polymeric micelle-encapsulated SN-38, and sustained release of SN-38 within tumors can beat a hypovascular tumor. *Cancer Sci* 2008; 99:1258-64.
7. Sumitomo M, Koizumi F, Asano T, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* 2008; 68:1631-5.
8. Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release* 2008; 125:137-44.
9. Watanabe Y, Aoi A, Horie S, et al. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci* 2008; 99:2525-31.
- F. なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告

臨床試験導入用動物実験モデル（肝原発がんおよび転移性がん）の作製
及び前臨床評価

分担研究者 松村 保広

（国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部）

研究要旨：超音波・バブルリポソーム併用の膀胱がんに対する、核酸膀胱内注入療法の非臨床評価モデルとして、ヒト膀胱がん細胞の膀胱内同所移植を確立した。また超音波・バブルリポソームを使った siRNA の膀胱腫瘍導入実験において、*in vitro* における超音波・バブルリポソームの出力、照射時間、濃度設定を行い、*in vitro* では十分 siRNA が導入 されることが分かった。今後は *in vivo* 設定条件を決定する。

A. 研究目的

遺伝子・核酸治療が提唱されて久しいが、なかなか臨床的有用性が証明されないのが現実である。核酸のデリバリーが真剣に検討されていないことも、その原因の一つにあげられる。典型例として、2005 年のアメリカ臨床腫瘍学会において、非小細胞肺癌を対象とした臨床第 3 相試験において protein kinase C アンチセンスの有用性が否定された。遺伝子核酸は実験レベルでは明確な効果がある。この臨床試験の失敗のひとつの要因として、肺癌を選んだこと、そして全身投与を行ったことにあると考える。遺伝子および核酸こそ現場（がん）にデリバリーされないことには効果を発揮しない。少なくとも現時点においては、治療効果を発揮するに十分な量の遺伝子あるいは核酸をデリバリーする方法は殆どない。そこで当研究チームでは、がん

局所投与において遺伝子核酸デリバリーを行うことで必要十分量の核酸を目的の部に送達することを考えた。そのためには局所投与が生命予後の延長を含め、臨床的に意味のあるヒトがん種を選択し、そのモデル系を構築して評価することが最も重要であるとの考えに基づき、合致するモデルとして本年度は特に、膀胱腫瘍への膀胱注入モデルを設定し、超音波・バブルリポソームの設定条件の検討を行った。

B. 研究方法

in vitro における膀胱腫瘍細胞に対する超音波・バブルリポソームの設定：ヒト膀胱がん細胞 RT-112 に対し、超音波プローブは BFC ϕ 30 を用いて、超音波出力強度、超音波照射時間、バブルリポソーム作成後の超音波照射までの時間、脂質濃度換算によるバブ

ルリポソームの至適濃度を検討した。

ルシフェラーゼ強制発現株に対するルシフェラーゼ-siRNA の導入方法の検討は膀胱がん細胞株 RT-112 にホタルルシフェラーゼを発現させた。In vitro において、ルシフェラーゼ siRNA 導入によるルシフェラーゼ抑制効率はルミノメーターにて検討した。

(倫理面への配慮) 遺伝子組み換えに関しては法律 “遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律” 及び関連する法律・政令・省令・告示を遵守して行う。動物実験に関しては、文部科学省 “研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針” 厚生労働省 “動物実験等の実施に関する基本指針” 及び関連する法律・ガイドラインを遵守して行う。

C. 研究結果

In vitro における超音波出力強度は $1\text{W}/\text{cm}^2$ と決定した。それ以上は超音波のみで細胞が傷害を受けることが分かった。超音波の照射時間も同じ理由で 10 秒と決定された。バブルリポソーム作成後から超音波照射までの時間は 5.5 から 10 分とした。バブルリポソームの濃度は脂質換算 $0.2\text{mg}/\text{ml}$ と決定された。

D. 考察

遺伝子治療の全身（静注）投与においては全身に散らばった標的がん細胞への攻撃用弾丸である核酸の効率よい移行とがん細胞内での効率よい発現、加えてその間の攻撃用弾丸である核酸の分解を防ぐといったことをクリアしなければならない。これらの解決のためには弾丸である核酸のデリバリーシステムを確立する以外に遺伝子治療の全身療法は臨床の場に出てこないと考える。臨床応用を考えた場合、当面の間は局所投与法を考えるべきである。本年度の研究において、in vitro における siRNA の導入のための超音波およびバブルリポソームの条件設定を行った。今後は in vivo における条件設定を行う。

E. 結論

超音波・バブルリポソーム治療の膀胱がん非臨床評価系が確立した。今後はバブルリポソームあるいはイムノバブルリポソームによる siRNA 導入治療研究を展開するが、その標的となる分子の選定およびターゲットを高めるパイロット分子としてのヒト膀胱がん特異抗体の作製を行っていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. Kuroda JI, Kuratsu JI,

DDS用微細球殻気泡の基本物理特性と気泡分散液での超音波減衰に関する研究

研究分担者 藤川 重雄 北海道大学大学院工学研究科教授

研究要旨：次世代の投薬形態として、DDS(Drug Delivery System)に気泡を利用した技術が期待されている。本研究は、DDS 技術実現のための基礎研究として、水中における殻付微細気泡に周波数の異なる超音波を照射し、気泡の共振による超音波の吸収を解析することで、殻付微細気泡の共振周波数を特定することを目的となされたものである。この目的達成のために、殻付微細気泡の形状、径分布等の基本物理特性を明らかにするとともに、これらの特性と吸収との関係を明らかにした。

A. 研究目的

本研究は、DDS 技術実現のための基礎研究として、水中における殻付微細気泡に周波数の異なる超音波を照射し、共振による超音波の吸収を解析することで、殻付微細気泡の共振周波数を特定することを目的となされたものである。

B. 研究方法

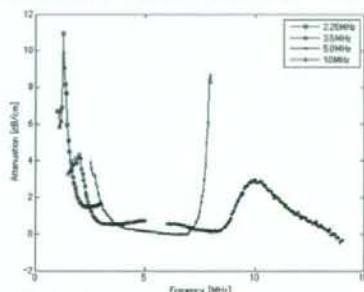
リン脂質膜からなる球状の殻を持ち、内部が液体で満たされたリポソームの粒径は数 μm から数十nmまで広く存在している。実験は、超音波ホモジナイザーによりリポソームの粒径の整え、その内部の液体を C_3F_8 ガスで置換したものを殻付微細気泡として使用した。殻付微細気泡の形状は、走査電子顕微鏡像で観察した。殻付微細気泡を含んだ懸濁液を希釈し、異なる濃度での超音波照射の実験を行った。（倫理面への配慮）殻付微細気泡の基本物理特性に関する実験であるため、特別な配慮はしなかった。

C. 研究結果

図1は1~2MHz及び10MHz付近において大きな超音波の音響減衰が見受けられ、ピークが2つ存在していることがわかる。粒径分布の測定結果から、実験で用いた試料は200nm、1000nm付近を中心とした2つの粒径を持っていた。超音波減衰図と粒径分布図の2つの異なる測定方法により得

られた結果が、同一の推察を導くことより、本実験では2つの粒径分布を持つ殻付微細気泡によって、2つの超音波減衰のピークが現れたものではないかと考える。

電子顕微鏡による観察によって初めて得られた写真はこの仮説を支えるものである。



D. 結論

本研究では、ナノスケールの殻付微細気泡を通過した超音波は特定の周波数において減衰を伴うことを明らかにした。

E. 研究発表

学会発表（計4件）

- (1) 金川哲也・矢野 猛・渡部正夫・藤川重雄，殻付き微細気泡群を含む液体中における非線形波の伝播，日本流体力学会年会講演論文集(CD-ROM), pp.1-4, 2008.
- (2) Imai, R., Nakagawa, T., Kanagawa, T., Watanabe, M., Fujikawa, S., Acoustic Characteristics of Ultrasound in Water Containing Lipid Microbubbles, ExHFT-7, June 28-July 3, 2009, Krakow, Poland, (Accepted for presentation). 他2編省略。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nariyama N, Ohhigashi T, Umetani K, Shinohara K, Tanaka H, Maruhashi A, Kashino G, Kurihara A, Kondo T, Fukumoto M:	Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation.	Appl Rad Isot	67(1)	155-9.	2009
Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, Kuwahara Y, Fukumoto M, Shokrgozar MA.	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H ₂ O ₂ toxicity.	Arch Med Res	39(6)	560-566	2008
Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S.	Molecular dynamics simulation of structural changes of lipid bilayers induced by shock waves: effects of incident angles.	Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.	1778(6)	1423-1428	2008
Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Fukumoto M, Miyazaki K.	KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer	Br J Cancer	99(12)	2020-2028	2008

Watanabe Y, Aoi A, Horie S, Tomita N, Mori S, Morikawa H, Matsumura Y, Vassaux G, Kodama T.	Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin.	Cancer Science.	99(12)	2525-2531	2008
Kuwahara Y, Li L, Baba T, Nakagawa H, Shimura T, Yamamoto Y, Ohkubo Y, Fukumoto M.	Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays.	Cancer Sci. 2009 [Epub ahead of print]			
Ishibashi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Fukumoto M, Miyazaki K	A BTB/POZ gene, NAC-1, a tumor recurrence-associated gene, as a potential target for Taxol resistance in ovarian cancer.	Clin Cancer Res	14(10)	3149-3155	2008
Li L, Shoji W, Ohshima H, Obinata M, Fukumoto M, Kanno N	Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice.	FEBS Lett	582(16)	2431-2434	2008
Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue, Fujita J:	Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma.	Hepatol	47(2):	493-502,	2008.

Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Maruhashi A, Suzuki M, Kinashi Y, Yong L, Masunaga S, Watanabe M, Ono K	Inductions of DNA double strand breaks and cellular migrations through the bystander effects in the cells irradiated with slit type microplanar beam of the SPring-8 synchrotron.	Int J Radiat Oncol Biol Physic			2009
Ohtake Y., Maruko A., Ohishi N., Fukumoto M, Ohkubo Y	Effect of aging on EGF-induced proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes.	J Hepatol,	48(2):	246-54	2008.
Kodama T, Tomita Y, Watanabe Y, Koshiyama K, Yano T, Fujikawa S.	Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation.	Journal of Biomechanical Science and Engineering	4	124-140	2009
Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y, Okada N, Kadowaki N, Kodama T, Tachibana K, Maruyama K.	A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy.	Journal of Controlled Release.	133	198-205	2009

Roudkenar MH, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M:	Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation.	J Radiat Res	49(1)	29-40	2008.
Miyashita H, Mori S, Fukumoto Y, Sato A, Fukumoto M, Kawamura H:	Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma.	Mol Med Report	1	821-825	2008
Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, Purwana IN, Iida K, Maruyama R, Fukumoto M, Miyazaki K:	Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival.	Oncol Rep	19(3)	775-781	2008
Takeyama J, Sasano H, Fukumoto M:	Giant chordoma occupying the whole abdominal cavity.	Pathology	40(3):	313-314	2008.
Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y.	Stabilities of ^{67}Ga - and ^{111}In -labeled transferrin in vitro.	Protein Pept Lett	16(2)	138-42,	2009

研究成果の刊行物・別刷

Co-inhibitory roles for glucocorticoid-induced TNF receptor in CD1d-dependent natural killer T cells

Shuming Chen¹, Lishomwa C. Ndhlovu^{*1}, Takeshi Takahashi¹, Kazuyoshi Takeda², Yoshinori Ikarashi³, Toshiaki Kikuchi⁴, Kazuko Murata¹, Pier Paolo Pandolfi⁵, Carlo Riccardi⁶, Masao Ono⁷, Kazuo Sugamura¹ and Naoto Ishii¹

¹ Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

² Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

³ Chemotherapy Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

⁴ Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan

⁵ Cancer Biology and Genetics Program, Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

⁶ Department of Clinical and Experimental Medicine, Pharmacology Section, Perugia University Medical School, Perugia, Italy

⁷ Department of Histopathology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

Invariant natural killer T (iNKT) cells are a special subset of $\alpha\beta$ T cells with invariant TCR, which recognize α -galactosylceramide (α -GalCer) presented by CD1d. In addition to signals through the invariant TCR upon stimulation with α -GalCer, costimulatory signals, such as signals through CD28 and OX40, are indispensable for full activation of iNKT cells. In this study, we investigated the functions of a well-known costimulatory molecule, glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR), on Ag-induced iNKT cell activation. Unexpectedly, engagement of GITR by agonistic mAb DTA-1 suppressed proliferation and cytokine production of iNKT cells upon α -GalCer stimulation. In addition, GITR signals in iNKT cells during only the Ag-priming phase was sufficient to inhibit the iNKT cell activation. Consistent with these results, the GITR-deficient iNKT cells showed enhanced proliferation and increased cytokine production upon α -GalCer stimulation both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the *in vivo* administration of α -GalCer suppressed tumor metastasis more efficiently in GITR-deficient mice than in wild-type mice. Collectively, GITR plays a co-inhibitory role in Ag-induced iNKT cell activation.

Key words: Co-inhibitory signal · Glucocorticoid-induced TNF receptor · Invariant NKT cell

Introduction

CD1d-dependent natural killer T (NKT) cells are a unique subset of $\alpha\beta$ T cells that have a *V α 14-J α 18* rearrangement in mice and *V α 24-J α 18* rearrangement in humans. The invariant TCR specifically

recognize a glycosphingolipid, α -galactosylceramide (α -GalCer) presented by an MHC class I-like molecule, CD1d [1]. Once the invariant NKT (iNKT) cells have finished their development in the thymus, they migrate to the periphery, and are primarily maintained in the spleen, liver, and bone marrow [2]. Upon stimulation with the iNKT-specific Ag, α -GalCer, iNKT cells rapidly secrete large amount of various cytokines; they also expand and acquire cytotoxic activity. Accumulating evidence has shown that

Correspondence: Dr. Naoto Ishii
e-mail: ishiin@mail.tains.tohoku.ac.jp

the cytokines secreted by iNKT cells regulate several types of immune responses, including tumor surveillance, autoimmunity, host defense, and immunological tolerance, by modulating the functions of other immune cells [3].

T cell costimulatory molecules, such as the CD28 family and TNF receptor superfamily members, play critical roles in T cell responses. Among them, glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) seems unique for its bidirectional effects on T cell and NK cell activation. GITR was initially identified as a costimulatory molecule for T cell activation [4], and the agonistic anti-GITR mAb, DTA-1, enhances T cell responses in several disease models, such as tumor rejection, autoimmune reaction, GVH disease, and viral infection [5–7]. However, several observations have shown that GITR signals can serve as an inhibitory factor in T cell responses. Ronchetti *et al.* [8] demonstrated that GITR-deficient T cells show higher proliferative responses and enhanced IL-2 production upon stimulation with anti-CD3 mAb, as compared with wild-type (WT) T cells. In contrast, the full stimulation of both TCR and GITR suppresses the Ag-specific proliferation of naive CD4⁺ T cells [9]. A previous report also demonstrated that the allogeneic function of conventional CD4⁺ T cells is impaired by deliberate GITR stimulation [10]. Regarding GITR function on NK cells, a suppressive effect of GITR on NK cells in a culture with GITRL-expressing tumor cells [11] or agonistic anti-GITR mAb [12] has been reported, although a previous paper demonstrated that GITR signals significantly enhanced NK cell activity when GITRL-expressing DC were co-cultured [13]. Furthermore, a recent report has demonstrated that GITRL signals in DC provided by GITR expressed by T cells negatively regulate T cell-mediated allergic inflammation [14]. Thus, the precise roles of the GITR-GITRL interaction on immune responses are still controversial.

With regard to costimulatory signals in NKT cell functions, costimulatory molecules including CD28, ICOS, CD40, and 4-1BB have been demonstrated to promote the Ag-induced activation and cytokine production of NKT cells [15–21]. We have also reported that signals through OX40, a well-known T cell costimulatory molecule, are essential for optimal activation of iNKT cells [22]. Thus, most T cell costimulatory molecules appeared to positively regulate NKT cell function. In addition, a recent report demonstrated that engagement of GITR, which most closely resembles OX40 in their protein and gene structures, on a DN32.D3 NKT hybridoma cell and NK1.1⁺TCR⁺ NKT cells significantly enhanced their functions [23]. However, NK1.1 and TCR co-expression may be an imprecise and potentially misleading criterion for defining NKT cells [3, 24], because V α 14⁺ iNKT cells do not express NK1.1 in some cases, and because some CD1d-independent T cells (a part of CD8⁺ T cells) also express NK1.1 [3, 24]. Therefore, the functions of GITR in CD1d-dependent iNKT cells are still unclear. To address the GITR role in iNKT cells, we carried out a series of experiments using GITR-deficient (GITR-KO) mice and CD1d tetramers loaded with α -GalCer (α -GalCer/CD1d-tetramer), use of which is one of the most reliable ways to identify iNKT cells. Interestingly, the present results demonstrate that GITR signals negatively regulate the Ag-induced activation of α -GalCer/CD1d-

tetramer⁺ iNKT cells, suggesting that GITR has a co-inhibitory role in iNKT cells.

Results

Expression of GITR on iNKT cells

We first examined the GITR expression on iNKT cells in the thymus, spleen, and liver of WT mice. As shown in Fig. 1A, a similar level of GITR on the iNKT cells in these tissues was observed. Next, GITR expression during Ag-induced activation of α -GalCer/CD1d-tetramer⁺ iNKT cells was examined. However, to define iNKT cells only at 24 h after Ag stimulation, intracellular staining of TCR V β 2/7/8, instead of the use of α -GalCer/CD1d-tetramer, was used because surface TCR transiently disappear around 24 h after Ag stimulation [21, 25, 26]. GITR expression on iNKT cells was significantly enhanced during both *in vivo* and *in vitro* activation, and reached the maximum at 72 h (Fig. 1B). The increased expression of GITR upon Ag stimulation indicates that expression profiles of GITR seem to be different from those of other costimulatory molecules and NK cell receptors, which are immediately down-regulated after Ag stimulation [21, 25, 26]. We thus examined the expression of CD28, CD94, NKG2A, ICOS, and OX40 as compared to GITR expression on hepatic iNKT cells 1 day after *in vivo* and *in vitro* stimulation with α -GalCer. Consistent with previous reports, expression of CD28, CD94, NKG2A, and ICOS was remarkably down-regulated, and OX40 remained at a low level while GITR expression was up-regulated (Fig. 1C). To confirm that the activated iNKT cell that lost the surface expression of TCR and other molecules expresses GITR, the cells negative for CD3, NK1.1, CD28, CD94, NKG2A, and CD19 were stained with anti-GITR mAb at 24 h after *in vivo* stimulation with α -GalCer. The frequency of the CD3⁺NK1.1⁻CD28⁻NKG2A⁻CD19⁻ cell population, which contains recently activated iNKT cells, in the mononuclear cells (MNC) of the liver was increased upon Ag stimulation. The ratio of GITR⁺ cells in this population was also elevated (Fig. 1D). These results indicate that recently activated iNKT cells express GITR in spite of the down-regulation of surface expression of TCR and other costimulatory molecules.

Engagement of GITR by DTA-1 mAb inhibits α -GalCer-induced activation of iNKT cells

The significant expression of GITR on activated iNKT cells (Fig. 1) facilitated examining whether GITR signals may affect iNKT cell function upon Ag stimulation. One previous report regarding GITR role in CD4⁺ T cells showed that GITR ligation by recombinant mGITRL promoted proliferation of naive CD4⁺ T cells upon stimulation with lower dose of Ag, while reducing the proliferation when high-dose Ag was used [9]. We thus investigated the role of GITR signals on iNKT cell activation in the presence of different doses of Ag. Hepatic and splenic MNC were *in vitro* stimulated with higher (100 ng/mL) and lower (2 ng/mL) doses of α -GalCer in the

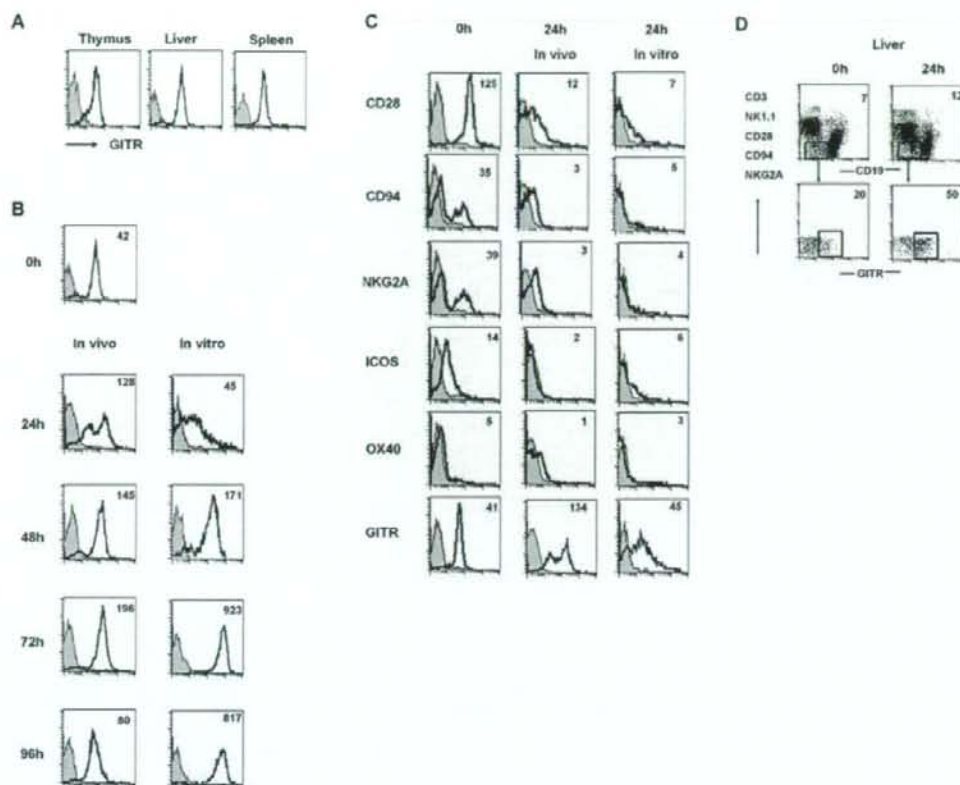


Figure 1. Surface expression of GITR on iNKT cells. (A) MNC from the thymus, liver, and spleen of WT C57BL/6 mice were stained with FITC-TCR β , PE-conjugated α -GalCer/CD1d-tetramer, and allophycocyanin-conjugated anti-GITR mAb. GITR expression on TCR β^+ α -GalCer/CD1d-tetramer $^+$ iNKT cells is demonstrated as a solid line. The filled gray histogram represents a background staining with allophycocyanin-conjugated control Ab. (B) Surface expression of GITR on electronically gated α -GalCer/CD1d-tetramer $^+$ hepatic iNKT cells was analyzed at 0, 48, 72, and 96 h after α -GalCer stimulation. At 24 h after stimulation, GITR expression on intracellular TCR V β 2/7/8 $^+$ cells was analyzed. Left panels: Mice were injected with 2 μ g α -GalCer. Right panels: Hepatic MNC were stimulated with 2 ng/mL α -GalCer. Solid line and filled gray histogram represent a GITR-specific staining and background staining, respectively. The number shown in each panel represents the mean fluorescence intensity for the GITR staining. Similar results were obtained in three independent experiments. (C) Surface expression of the indicated molecules on electronically gated intracellular-TCR V β 2/7/8 $^+$ hepatic iNKT cells were examined 24 h after α -GalCer stimulation *in vivo* (middle panels) and *in vitro* (right panels). The filled gray histograms represent the background staining of isotype-matched control mAb, and the solid lines indicate the staining with the specific mAb for the indicated molecules. The number shown in each panel represents the mean fluorescence intensity of the specific mAb staining. Similar results were obtained in three independent experiments. (D) WT mice were injected with α -GalCer (2 μ g/mouse). After 24 h, MNC were isolated from the liver and incubated with CD19-FITC, anti-GITR-allophycocyanin, and biotin-conjugated CD3, NK1.1, CD28, CD94, and NKG2A mAb followed by streptavidin-PE. The upper panels show FITC (horizontal) and PE (vertical) staining of hepatic MNC. The lower panels show GITR expression on electronically gated CD3 $^+$ NK1.1 $^+$ CD28 $^+$ NKG2A $^+$ CD19 $^-$ cells in the hepatic MNC. The number shown in each panel represents the frequency of the cells in the boxed region. Similar results were obtained in three independent experiments.

presence or absence of the agonistic anti-GITR mAb, DTA-1 [27]. The frequency and the absolute number of α -GalCer/CD1d-tetramer $^+$ TCR β^+ iNKT cells were evaluated on day 4. As shown in Fig. 2A and B, at either concentration, DTA-1 significantly inhibited α -GalCer-induced proliferation of iNKT cells from these tissues. To exclude the possibility that anti-GITR mAb may affect the function of the other GITR-expressing cells, such as T cells, when using MNC, purified iNKT cells were stimulated in the presence of GITR-KO DC, which cannot receive GITR signals, as

APC. Expectedly, addition of the agonistic anti-GITR mAb markedly suppressed the proliferation of iNKT cells from both liver and spleen (Fig. 2C and D, data not shown). Cytokine production by iNKT cells was also reduced by the anti-GITR mAb treatment, as show in Fig. 2E. These results strongly support the idea that GITR signals negatively regulate iNKT cell activation upon Ag stimulation.