

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.
Epub ahead of print, May 1, 2008

論文 (和文) 無し。

書籍 (欧文)

Kenji YAMAMOTO and Akiyoshi HOSHINO, "Quantum Dot Modification and Cytotoxicity", MohamedHENINI (ed), Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics, Elsevier, 2008; 799-809.

書籍 (和文)

山本健二、山屋駿一 「スピロヘータ類レプトスピラ凝集反応」(『臨床検査データブック 2008-2009』高久史磨(監修) 春日雅人ら(編) 医学書院、東京)

山本健二、山屋駿一 「スピロヘータ類梅毒血清反応[STS]」(以下、同上)

山本健二、山屋駿一 「スピロヘータ類ボレリア・ブルグドルフェリ抗体<<ライム病診断>>」(以下、同上)

山本健二、山屋駿一 「リケッチャ類 リケッチャ」(以下、同上)

山本健二、山屋駿一 「リケッチャ類 抗オリエンチア・ツツガムシ抗体<<つつが虫病抗体>>」(以下、同上)

学会 (国際)

S Hanada, K Fujioka, A Hoshino, N Manabe, K Hirakuri, **K Yamamoto**. "Toxicity of carbon group quantum dots," *SPIE Biomedical Optics* 2009 Jan.26, 2009. San Jose, CA, USA.

A Hoshino, N Manabe, S Hanada, K Fujioka, M Yasuhara, A Kondo, **K Yamamoto**.

"Intracellular delivery of gene-expressing fragments using quantum dot" *SPIE Biomedical Optics* 2009 Jan.25, 2009. San Jose, CA, USA.

K Yamamoto, A Hoshino, K Fujioka, N Manabe, Y Futamura, S Hanada

"Quantum Dots for the Application of Biological Medical Engineering", *AMN for Advanced Materials and Nanotechnology*, 2009 Feb. 8-Feb.12, University of Otago, New Zealand.

星野昭芳. "蛍光ナノ粒子量子ドットによるバイオイメージング" 第17回 バイオイメージング学会学術集会 2008年10月, 千葉. (奨励賞受賞者講演)

藤岡宏樹、昼岡正樹、佐藤慶介、真鍋法義、宮坂亮介、花田三四郎、星野昭義、Richard D Tilley、馬目佳信、平栗健二、**山本 健二**. "医療応用を目指した蛍光半導体ナノ粒子の開発

第17回 バイオイメージング学会学術集会 2008年10月, 千葉

花田 三四郎, 藤岡 宏樹, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 宮坂 亮介, 昼岡 正樹, 佐藤 慶介, 平栗 健二, **山本 健二**. "炭素族ナノ粒子の光励起による細胞毒性とそのメカニズムの検討"

化学工学会 第40回秋季大会 2008年9月,

仙台

藤岡 宏樹, 花田 三四郎, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 宮坂 亮介, 昼岡 正樹, 佐藤 慶介, 平栗 健二, **山本 健二**. “水溶性シリコンナノ粒子のイメージング及び細胞毒性の検討”

化学工学会 第40回秋季大会 2008年9月, 仙台

村田 裕一, 昼岡 正樹, 藤岡 宏樹, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 宮坂 亮介, Tilley Richard, **山本 健二**, 佐藤 慶介, 平栗 健二. “医療ラベル応用に向けたナノシリコン粒子の細胞毒性評価” 第24回ライフサポート学会大会 2008年9月, 山口

藤岡 宏樹. “ナノ粒子の安全性の諸相” 粉体工学会「粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会」 2008年7月, 愛知

真鍋 法義, 山本 悟, 藤岡 宏樹, 星野 昭芳, **山本 健二**. “蛍光ナノ粒子を用いた硝子体病変の視覚化” 第45回日本臨床分子医学会学術集会 2008年7月, 神戸

藤岡 宏樹, 昼岡 正樹, 佐藤 慶介, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 塩原 あまね, 平栗 健二, **山本 健二**. “医療応用を目指した蛍光半導体ナノ粒子の開発” 第45回日本臨床分子医学会学術集会 2008年7月, 神戸

Fujioka K, Hiruoka M, Manabe N, Hoshino A, Sato K, Hirakuri K, and **Yamamoto K**. “Silicon dots and the cyto-toxicity” *Particles 2008*. May.10-13, 2008. Orlando, FA, U. S. A.

Manabe N, Yamamoto S, Fujioka K, Hoshino A, **Yamamoto K**. “IMAGING TRANSPARENT

VITREOUS OF THE EYE USING NANO PARTICLES” *Particles 2008*. May.10-13, 2008. Orlando, FA, U. S. A.

Fujioka K, and **Yamamoto, K**. “Silicon dots and cyto-toxicity” *BioNano Symposium 2008*. May.7-8, 2008. Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.

Yamamoto, K. “Nanoparticle Safety and Smell Receptors” *BioNano Symposium 2008*. May.7-8, 2008. Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.

学会(国内)

鈴木恵子, 星野昭芳, **山本健二**, 山田 庄司. “Toll-like receptor 2 アゴニストである Pam3CSK4 による RANKL 非依存的な破骨細胞誘導” 第81回日本薬理学会年会 2008年3月, 横浜

真鍋 法義, 山本 悟, 藤岡 宏樹, 星野 昭芳, **山本 健二**. “蛍光ナノ粒子を用いた硝子体病変の視覚化” 第45回日本臨床分子医学会学術集会 2008年7月, 神戸

藤岡 宏樹, 昼岡 正樹, 佐藤 慶介, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 塩原 あまね, 平栗 健二, **山本 健二**. “医療応用を目指した蛍光半導体ナノ粒子の開発、第45回日本臨床分子医学会学術集会、2008年7月, 神戸

花田 三四郎, 藤岡 宏樹, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 宮坂 亮介, 昼岡 正樹, 佐藤 慶介, 平栗 健二, **山本 健二**. “炭素族ナノ粒子の光励起による細胞毒性とそのメカニズムの検討” 化学工学会 第40回秋季大会 2008年9月, 仙台

藤岡 宏樹, 花田 三四郎, 真鍋 法義, 星野 昭芳, 宮坂 亮介, 昼岡 正樹, 佐藤 慶介, 平栗 健二, **山本 健二**. “水溶性シリコンナノ粒子のイメージング及び細胞毒性の検討” 化学工学会 第 40 回秋季大会 2008 年 9 月, 仙台

藤岡宏樹、昼岡正樹、佐藤慶介、真鍋法義、宮坂亮介、花田三四郎、星野昭義、Richard D Tilley、馬目佳信、平栗健二、**山本健二**、医療応用を目指した蛍光半導体ナノ粒子の開発、第 17 回 バイオイメージング学会学術集会、2008 年 10 月、千葉

研究会等

山本健二；「厚生労働厚生科学研究費班会議」（厚生労働科学研究費補助金 医療機器開発研究推進事業 半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発 (H19-ナノ一般-012)

山本健二；劇症型 ARDS の量子ドットによる microRNA 治療に向けて 「厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究班 (H19-新興一般-005) 2008 (H20) 年度 第 2 回 班会議」
(平成 21 年 01 月 17 日)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

マラリア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、マラリア感染に対する予防効果を持つと期待されるマラリアワクチンのDDS研究を行い、次の4点について成果を得た。(1)人工抗原ペプチドの化学合成、(2)微粒子里に有用な新しい高分子材料の化学合成、(3)マラリア原虫とワクチンの可視化に有用なナノ蛍光プローブの効率的化学合成、(4)人工抗原ナノ微粒子の生分解と抗原放出。

A. 目的

これまでに我々は、熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼをマラリアワクチン候補抗原と想定し、その人工抗原ペプチドの化学合成法とワクチンに関連したナノデバイス開発を目的とする研究を、群馬大学大学院工学研究科と行ってきた。

B. 研究方法

今年度は以下の4点を重点に研究を行った。即ち、(1)人工抗原ペプチドの化学合成、(2)微粒子里に有用な新しい高分子材料の化学合成、(3)マラリア原虫とワクチンの可視化に有用なナノ蛍光プローブの効率的化学合成。(4)人工抗原ナノ微粒子の生分解と抗原放出、それぞれペプチド化学、高分子化学、有機合成化学、材料化学、の手法を用いている。

C, D. 研究結果と考察

(1) 人工抗原ペプチドの化学合成

微粒子里に用いる人工抗原ペプチド (AD22 = -Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-) について、昨年度は臨床展開を見据えた液相化学合成法による大規模製造法について研究を行った。

今回は引き続き固相法を援用した同様の研究展開と共に、最も簡便で一般的な Fmoc 固相法についても合成研究を行った。その結果、アミノ酸分析 (Figure 1) で矛盾のない人工抗原を得ることに成功した。

(2) 微粒子里に有用な新しい高分子材料の化学合成

人工抗原ペプチドと強い相互作用を期待して、アミノ酸とヒドロキシカルボン酸からなるポリデシペプチドの合成研究を行った。今回は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15種類合成した。

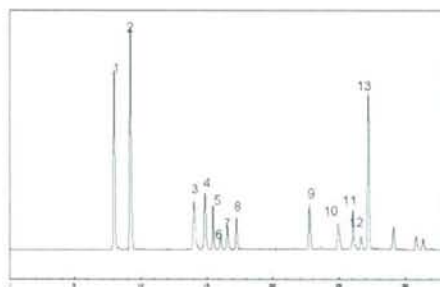


Figure 1. PTC 誘導体を用いた人工抗原ペプチドのアミノ酸分析。分析結果：Asp and Asn, 28.8 (28); Glu, 33.1 (32); Ser 7.9 (8); Thr, 7.7 (8); β -Ala, 1.9 (1); Ala, 3.9 (4); Pro, 4.2 (4); Tyr, 7.8 (8); Leu, 4.0 (4); Phe, 8.0 (8); Trp 1.4 (1); Lys 23.6 (22)。

(3) マラリア原虫とワクチンの可視化に有用なナノ蛍光プローブの効率的化学合成

マラリア原虫やワクチンの研究に際して赤血球や脾臓を可視化することが求められている。そこで赤外領域で検出の可能なナノプローブとして知られている標識用 ICG (Ito ら Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 2689 (1995)) の高効率・高純度な化学合成法を開発し、 ^1H および ^{13}C -NMR の帰属を確立した。

(4) 人工抗原ナノ微粒子の生分解挙動

昨年度は生分解性高分子としてポリ乳酸-グリコール酸共重合体を用いた人工抗原ナノ微粒子の作成を行った。

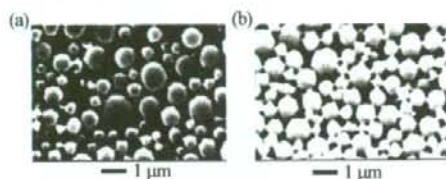


Figure 2. (a) 抗原を含まない微粒子(平均粒径 $0.75 \mu\text{m}$)、および (b) 抗原を内包させた微粒子(平均粒径 $0.65 \mu\text{m}$)の SEM 写真(倍率 15000 倍)。

今回は引き続き *in vitro* と *in vivo* における微粒子分解と抗原放出を観察した。



Figure 3. ヌードマウス皮下への投与における、微粒子からの人工抗原ペプチドの *in vivo* 放出。(蛍光標識人工抗原ペプチド $8.0 \mu\text{g}$ を封入した微粒子 2.0mg を、 0.20mL の生理食塩水に分散させて皮下に投与し経過を観察した。)

E. 結論

本年度はマラリアワクチンのナノメディシンに必要な、人工抗原ペプチド、高分子材料、ナノ蛍光プローブ、ワクチン用抗原微粒子について開発を行った。これらを総合的に用いることで、将来の効果的な予防ワクチンに向けた大きな前進が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Oku, K. Yamada, K. Kobayashi, R. Katakai, M. Ashfaq, H. Hanaoka, Y. Iida, K. Endo, S. Hasegawa, Y. Maekawa, K. Yano, S. Kano, M.

Suzuki. Nano-Particle Materials Prepared From a Synthetic Antigenic Sequence of *Plasmodium falciparum* Enolase. In *Peptide Science 2008*, M. Nomizu, Ed.: Protein Research Foundation: Osaka, in press.

2. 学会発表

- (1) 奥 浩之、山田圭一、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守「熱帯熱マラリア原虫由来の人工抗原を内包した生分解性ナノ微粒子に関する研究」第3回分子イメージング学会、大宮 2008年5月23日

- (2) 奥 浩之、山田圭一、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守「熱帯熱マラリア原虫由来の人工抗原を用いた生分解性ナノ微粒子の作成と性質」第67回日本寄生虫学会東日本支部大会、浜松、2008年10月4日

- (3) 奥 浩之、山田圭一、小林京子、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守「熱帯熱マラリア原虫由来の人工抗原を用いたナノ微粒子研究」第45回ペプチド討論会、東京、2008年10月30日

- (4) 奥 浩之、山田圭一、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守「熱帯熱マラリア原虫由来する抗原ペプチドの蛍光標識化とナノ微粒子研究」第8回放射性医薬品・画像診断薬研究会、京都、2008年12月6日

- (5) 矢野和彦、奥 浩之、山田圭一、片貝良一、鈴木 守、狩野繁之「熱帯熱マラリアエノラーゼ由来人工抗原ペプチドを用いた生分解性ナノ微粒子の特性解析」第78回日本寄生虫学会大会、東京、2009年3月27日

- (6) 奥 浩之、矢野和彦、花岡宏史、長谷川伸、山田圭一、片貝良一、飯田靖彦、遠藤啓吾、前川康成、狩野繁之、鈴木 守「熱帯熱マラリア原虫由来する抗原ペプチドのナノ微粒子化と抗原性に関する研究」日本化学会第89春期年会、船橋、2009年3月29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 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 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
協力研究者 本ソワソフォンサイ 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 流動研究員
協力研究者 岡田俊彦 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 流動研究員

研究要旨

腹腔内の炎症によっておこる腹膜癒着は開腹術後の合併症として頻度の高いものであるが、ときに致命的となることもあり、患者の負担だけでなく医療経済的な負担も大きい。我々は開腹術時に投与することによってその後の癒着を予防する方法を開発することを目的として、マウスを用いて癒着モデルの作成を試み、低分子化合物による癒着の予防効果の評価を行った。その結果、無菌的な癒着モデルに比べて感染を伴うモデルは強い癒着を伴い、無菌的であっても消化管壁の焼灼により癒着が強くなることを見いだした。マクロファージに対するケモカイン作用を抑制する低分子化合物をこれらのモデルの手術直後に腹腔内投与したところ、マクロファージ遊走抑制効果を持つ化合物の癒着防止剤としての有効性が示された。

A. 研究目的

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の合併症として腹膜癒着があるが、これ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。癒着が生じると、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

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に行く結果が得られている訳ではない。

われわれは、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を産生する。Pmf も炎症刺激及び同じケモカイン刺激によりオートクリン機構を持つ。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ケモカイン作用の

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、様々な刺激による開腹術時の腹膜癒着形成を比較し、低分子化合物の癒着阻止効果を検討した。

B. 研究方法

1) 無菌的モデル

A. 正中切開による開腹の後、側腹壁の腹膜を切子でつまみ糸による結紮で ischemic button を作成した。

B. 正中切開による開腹の後、電気メス (Bipolar mode)により、側腹壁の一部を凝固焼灼した。

C. Ischemic button をさらに電気メスにより焼灼した。

これらのモデルは6日後に開腹し癒着の状態を観察した。

2) Cecal ligation and pucture (CLP)モデル

正中切開による開腹の後盲腸先端を体外に出して先端を結紮し、注射針で、穿孔を作って閉腹した。6 日後に開腹して観察した。感染をともなうモデル。

3) 正中切開による開腹の後盲腸先端を体外に出して先端を電気メス凝固モードで焼灼 (Cecal ablation) したのち閉腹し、6 日後に観察した。

4) これらのモデルに、独自の低分子化合物スクリーニングで得られたケモカイン作用阻害分子を一回投与、あるいは複数回投与し、その腹膜癒着阻害効果を評価した。

C. 研究結果

Ischemic button 作成による癒着モデルは飼育環境の変化により、発生頻度およびその程度がかなり変動することが明らかとなった。この方法では大網および fat pad の癒着が主体であり、肝臓や腸管の癒着の頻度は比較的低かった。結紮にかえて電気メスでの側腹壁の焼灼は、さらに癒着の発生頻度が低かった。また、結紮による ischemic button の頂点をさらに焼灼したが、発生頻度や癒着の程度が高くなることはなかった。これに対して cecal ligation and puncture は穿刺部位を中心に、腹壁および腸管、肝臓などとの非常に強い癒着がおり、膿瘍を形成する個体や死亡個体もあった。そこで、盲腸先端の焼灼のみを行う cecal ablation を試みたところ、C57BL/6 マウスで比較的安定して盲腸への癒着がみられた。癒着の数をカウントし、それぞれの癒着点（臓器）について癒着の強さを2段階に評価し田植えで、総計を個体の癒着スコアとして評価した実験結果の例を図1に示す。

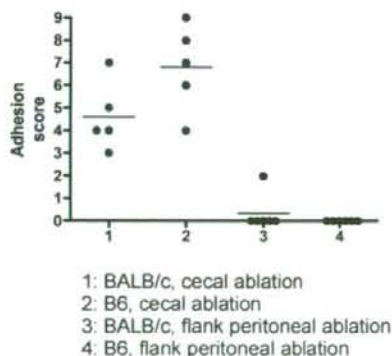


図1. BALB/c および C57BL/6 マウスにおける各

種腹膜癒着モデル。

次に、各モデルについて、ケモカイン阻害剤の効果を評価した。ケモカイン受容体発現細胞におけるリガンド誘導性の Ca^{2+} flux の阻害効果を指標としたスクリーニングによって得られた低分子化合物を DMSO で溶解した後 0.2% normal mouse serum を含む endotoxin free PBS で希釈し 0.2 mg/kg body weight の用量で手術施行直後に腹腔内投与した。Control として化合物のみを含まない同じ溶液を投与した。その結果、ischemic button, cecal ablation のいずれにおいても癒着防止効果がみられた。また術直後投与のみだけでなく、2日後、4日後の3回投与を行うとさらに有効性が明確になった。

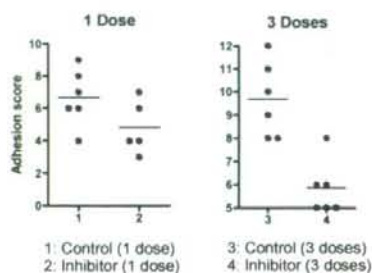


図2 ケモカイン阻害剤による腹膜癒着疎外効果

D. 考察

1) 達成度について

ケモカイン作用阻害活性分子の *in vivo* 腹膜癒着阻害効果を、複数の癒着モデルを用いて評価し、有効性を明らかにすることができた。

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、ケモカイン分子のも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。今回の結果から、腹腔内の感染は、癒着の形成を強く促進することが明らかとなった。以前より我々は、細菌成分が腹腔内マクロファージにおけるケモカイン産生およびその受容体発現を促進することを示しているため、これとよく一致する結果であると思われる。また、側腹壁と腸管は同じ漿膜中皮細胞で被覆されているにもかかわらず、側腹壁の焼灼では癒着が誘導されず、盲腸の焼灼で強い癒着が誘導されるのも同様の機序によると考えられる。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。

3) 今後の展望について

低分子化合物を使用し腹膜癒着が防止できることが明らかとなったが、その効果は複数回投与によりより明瞭となった。腹腔内投与ではなく、経口投与で継続的效果をもたらす投与方法の有効性に期待が持たれる。

E. 結論

ケモカイン作用阻害活性分子の *in vivo* 腹膜癒着阻害効果を、複数の癒着モデルを用いて評価し、有効性を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML., Michaelson JS., Jakubowski A and Burkly LC.. TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology* In press

Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T, DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer *Gastroenterology* 2008;135:142-151

Dohi, T and Kawamura YI, Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1780:467-471, 2008

(和文) なし

2. 総説 (欧文と和文、分けて下さい)

(欧文) なし

(和文)

土肥 多恵子: 腹膜癒着を引き起こす、腹腔マクロファージの特異的ケモカイン応答 免疫アレルギー科 2009

3. 著書 ・ (欧文と和文、分けて下さい)

なし

4. 学会発表

T Dohi. TNF superfamily molecules as next therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. 10th Symposium of Korean Association for the Study of Intestinal Diseases, Invited lecture. Seoul, Dec 13, 2008

Dohi T: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine, 13th. US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century. Tokyo, June 13th, 2008

Dohi T, Borodovsky A, Kawashima R, Wu P, Kawamura YI, Burkly LC. Tweak/Fn14 Pathway: Role in the Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 18th, 2008

Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. Interleukin-13 Induces Tissue Damage with Relocation of β -Catenin and Modification of Cell-Cell Adhesion in the Epithelial Cells. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 20th, 2008

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染色法を用いた ISC4 遺伝子の機能解析

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・バトリック 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

A. 研究目的

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し、なおかつ連続励起による退色が少ないため、蛍光プローブとして非常に優れている。したがって、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も可能である。細胞の染色においては顕微鏡観察時の退色が著しく、この退色効果を克服することが蛍光観察における技術的な大きな課題であった。蛍光強度が長時間にわたって減衰しない蛍光ナノ粒子は細胞の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、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、獲得免疫の要として免疫応答において中心的な役割を果たしているリンパ球である。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、トレランスの成立、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。

T細胞の選択に関与する新規遺伝子を同定し、その機能を解析する目的で、我々は胸腺で特異的に発現している遺伝子を EST 発現データベース解析をもとにした *in silico* 解析により抽出した。胸腺特異的遺伝子として 5 個の未知遺伝子をピックアップしてその解析を進めており、そのうちの 하나가 ISC4 である。この ISC4 分子はホモロジーおよび既知の機能ドメインを持たないため、機能を予測することは困難である。そこで、この機能を解明する目的で ISC4 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 ISC4 の機能を解析した。

その際に、蛍光ナノ粒子を用いた高感度細胞内染色法を利用し、ISC4 蛋白の細胞内局

在の可視化を試みた。

B. 研究方法

1) ISC4 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、ターゲット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 ISC4 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) 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、脾臓細胞よりセルソーターを用いて 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、IL-2 産生、Ca イオンの流入、LAT

や 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。

5) 細胞内蛍光染色

GST タグを付加した ISC4 全長蛋白を細菌に発現させ、精製し、これを抗原としてウサギに免疫することにより、ISC4 特異的抗体 (抗血清) を作製した。胸腺細胞を固定、透過性にし、ISC4 抗体および QD 標識した抗ウサギ抗体を用いて間接蛍光抗体法によって顕微鏡観察を行った。

C. 研究結果

まず最初に、ISC4 の組織特異的発現について検討を行った。マウスの各組織、細胞を調製し、RT-PCR 法により ISC4 の mRNA 発現量を測定したところ、データベースでの予想通り、胸腺、脾臓などのリンパ器官にのみ発現しており、他の臓器での発現はみられなかった。さらに、セルソーターを用いて胸腺細胞を分画したところ、CD4、CD8 ダブルポジティブ (DP) 細胞画分に非常に強い発現がみられた。

ISC4 ノックアウトマウスは胎生致死にはならず、メンデリズムに従って生まれてきた。胸腺の大きさは全く変化がなく、総細胞数も野生型と変らなかったが、CD4 シングルポジティブ (SP) 細胞および CD8-SP 細胞の数が激減しており、胸腺での正の選択が著しく阻害されていることが明らかとなった。新生児においても CD4-SP の分化が抑制されていることから、正の選択が抑制されていることは明らかであり、ISC4 が胸

腺細胞の正の選択に重要な働きをしていることが初めて示された。

さらに、TCR-Tgと交配することにより、クラスI拘束性のTCRも、クラスII拘束性のTCRも、いずれの正の選択も阻害されていることが明らかとなった。また、興味深いことに胸腺におけるCD4-SP、CD8-SPの生成が強く阻害されているのに対し、末梢組織における成熟T細胞数の減少は比較的穏やかなものであった。

一方、HY TCR-Tg マウスと ISC4 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 ISC4 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、ISC4 ノックアウトにおいても自己反応性T細胞の除去は正常に起こっていた。したがって、ISC4 は負の選択には必要ないことが明らかとなった。

ISC4 分子の機能を推測することが困難であるため、このタンパク質の細胞内での局在を検討することは極めて重要である。我々は細菌に発現させた ISC4 タンパク質を抗原として用いて抗 ISC4 抗体を作製することに成功した。胸腺細胞をこの抗体と、蛍光ナノ粒子（カンタムドット）標識した抗ウサギ抗体を用いて、高感度に染色し、蛍光観察を行った。その結果、ISC4 タンパク質は細胞質内に diffuse な状態で存在していることが明らかとなった。この抗体の染色はシグナルが弱く、蛍光ナノ粒子を用いた標識抗体を用いた結果、はじめて可視化

できるようになった。

成熟T細胞のシグナル伝達に関しては、TCR 刺激による増殖およびIL-2 産生は阻害されておらず、ISC4 がシグナル伝達に関与しているかどうかは依然として不明である。

D. 考察

1) 達成度について：我々はISC4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細胞の正の選択に必須であるが、負の選択には必要ないという非常に興味深い結果を得ることができた。残念ながら、その作用機序については、まだほとんど解明されていないが、ホモロジーを持たない未知の新規遺伝子が、正の選択に必須であることを世界で始めて示すことができたことより、研究の達成度はきわめて高いといえる。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について：ISC4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。他のグループからの報告も全く存在しない。

3) 今後の展望について：我々はISC4がT細胞の分化に非常に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて発見した。この遺伝子は脊椎動物の間では高度に保存されており、胸腺内における正の選択に必須の働きをしている新規遺伝子である。今後この分子の機能、構造などを詳細に解析することにより、T細胞分化の分子メカニズムの解明に大きく貢献できるだけでなく、

新しい創薬の対象になることも考えられる。
。

E. 結論

胸腺に特異的に発現している新規遺伝子 ISC4 のノックアウトマウスを作製することにより、ISC4 が T 細胞の分化、特に正の選択に重要な働きをしていることが明らかとなった。蛍光ナノ粒子を用いた高感度蛍光染色法を用いることにより、ISC4 が細胞質中に存在していることを明らかにした。これは、ナノ粒子を用いた蛍光減衰の少ない高感度蛍光顕微鏡観察によって初めて可能になったことであり、今回の我々の結果は蛍光ナノ粒子による強く持続する蛍光シグナルが、細胞内局在を検討する染色実験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; Tsuyoshi Sato; Yoshinori Sato; Mitsumasa Kubo; Tetsuya Yoda; Harumi Suzuki; Yoichiro Iwakura
Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background
Mol Cell Endocrinol. (2008) in press

○Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki* and Mutsunori Shirai
*[Corresponding author] RhoH plays critical

roles in FcεRI-dependent signal transduction of mast cells
J. Immunol. (2008) in press

(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 31, 37-46 (2008)

3. 著書 なし

4. 学会発表

(国際学会)

Seiji Kitahara, Harumi Suzuki, Hiroyo Oda, Kouhei Sakai, Masahiro Tsuchida, Shigeo Koyasu, Katsusuke Naito, Mutsunori Shirai, Role of Phosphoinositide 3-kinase in induction and maintenance of B cell self tolerance, The 95th AAI annual meeting, 2008.4 San Diego, USA

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato and Harumi Suzuki A novel T cell specific gene ISC4 plays a critical role in positive selection in the thymus
Gordon Research Conference, Immunobiology and Immunochemistry
2008.8 Oxford, England

(国内学会)

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato, Shinichi Aizawa and Harumi Suzuki, A novel T cell specific gene ISC4 plays a critical role in positive selection in the thymus 第18回 KTCC 2008.6 京都

SATO Yoshinori¹, ODA Hiroyo¹, PATRIC Michael Scott¹, AIZAWA Shinichi², SHIRAI Mutsunori³, SUZUKI Harumi, T細胞の生存および恒常性維持における Rac1 の機能 第38回日本免疫学会学術集会 2008.12 京都

Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Yoshinori Sato, Shin-ichi Aizawa, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki
Function of RhoH in mast cells signal transduction 第38回日本免疫学会学術集会 2008.12 京都

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori
Sato, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki,
ISC4欠損マウスの胸腺における正の選
択の阻害, 第38回日本免疫学会学術集会
2008.12 京都

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析

分担研究者 鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授

協力者 長尾朋和 千葉大学大学院医学研究院 特任講師
常賀 千葉大学大学院医学研究院 流動研究員
星野昭芳 国立国際医療センター研究所 流動研究員
山本健二 国立国際医療センター
国際臨床研究センター センター長

研究要旨: DDS に利用する量子ドット(QD) 標識抗体を用いて、血管炎の治療法とイメージング法を開発する。これまで QD で標識した Myeloperoxidase 抗体(QD-antiMPO)が、好中球表面の MPO を高感度かつ迅速に検出可能であることを示した。本年度は、QD-antiMPO の反応に加え、好中球を活性化する TNF- α による血管内皮細胞へ作用と IgG による血管内皮細胞の傷害抑制作用を *in vitro* で解析した。血管内皮細胞を、TNF- α あるいは IgG によって刺激し、TNF- α による活性化、および IgG による抑制作用を解析した。TNF- α 刺激で炎症 cytokines は、IL-6, IFN- β および chemokines KC, MIP-2 の発現が誘導された。TNF- α の細胞との反応は、量子ドット QD655 標識 TNF- α (QD-TNF- α) により解析した。TNF- α により活性化された血管内皮細胞の炎症 cytokines および chemokines 産生を IgG が抑制した。

A. 研究目的

DDS に利用する量子ドット (QD) 標識抗体を用いて、血管炎の治療法とイメージング法を開発することを目的とする。これまで、われわれは活性化した好中球が関与する myeloperoxidase 自己抗体 (MPO-ANCA) の動態の解析と血管炎の DDS の治療法開発に不可欠であった QD 標識抗 MPO 抗体の作製に成功し報告してきた(Hohino et al, Microbiol

Immunol, 2007)。活性化した好中球は、血管炎の発症の要因となっていることが報告されており、特に、急速進行性糸球体腎炎の発症には、活性化好中球とともに好中球自己抗体、MPO-ANCA が関与している。

MPO-ANCA 抗体は、好中球の活性化や血管内皮細胞の活性化および傷害性に関与しているためと考えられている。しかし、MPO-ANCA がどのように好中球を活性化し

血管内皮細胞の傷害を誘導しているかは不明である。

一方、血管炎の発症には、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。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、プローブの利用が必須である。

そこで、これまで、QD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てきた。具体的には、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、MPO 抗体を投与して血管炎発症過程をしらべ、糸球体から単離したプライマリー培養の糸球体血管内皮細胞に QD で標識した MPO 抗体を (QD-antiMPO) を加え、*in vitro*での QD-antiMPO の糸球体血管内皮細胞への結合と作用について解析してきた(Hohino et al, *Microbiol Immunol*, 2007)。昨年度までに、QD-antiMPO が、好中球表面の MPO を高感度かつ迅速に検出可能であることを示してきた。また、QD-antiMPO は、血管内皮細胞にも直接結合して血管内皮細胞障害を誘導することを示唆した。また、antiMPO による好中球の活性化機構を自己免疫に関与するサイトカイン IL-17 発現動態により解析してきた。

本年度は、QD-antiMPO の反応に加え、好

中球を活性化する TNF- α や H₂O₂ 刺激による血管内皮細胞へ作用と、IgG による血管内皮細胞の傷害抑制作用を *in vitro*での adhesion molecules、サイトカイン・ケモカインにより解析した。

B. 研究方法

1) QD-antiMPO の好中球、マクロファージへの結合

QD-antiMPO は、QD で蛍光標識した抗 MPO 抗体を作製した。抗 MPO 抗体の QD 標識は、セレン化カドミウム QD と抗 MPO 抗体との結合反応により得た。あらかじめ抗 MPO 抗体(anti-MPO Antibody)をマウスに投与し、腹腔から得た好中球およびマクロファージに QD-antiMPO を反応させ、QD-antiMPO 抗体の細胞への結合を蛍光顕微鏡により可視化した。

2) 抗 MPO 抗体、TNF- α あるいは H₂O₂ 刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の細胞表面への発現

TNF- α あるいは H₂O₂ を血管内皮細胞に加えて刺激し、24 時間後の adhesion molecules ICAM-1 の細胞表面への蛋白質の発現を、Cell ELISA により解析した。

3) TNF- α あるいは H₂O₂ 刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現

TNF- α あるいは H₂O₂ で刺激し、2時間後の adhesion molecules の E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA 発現を PCR により半定量的に解析した。

4) TNF- α によるケモカイン KC の産生への

IgG の抑制作用

TNF- α で刺激し、8時間後の23種類のサイトカイン・ケモカインをBio-Plexにより網羅的に定量した。また、有意差のあったサイトカイン・ケモカインについては、ELISAにて確認した。

5) QD-TNF- α による血管内皮細胞への結合解析

量子ドット QD655 にて標識した TNF- α (QD-TNF- α)により TNF- α の血管内皮細胞への反応を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症研究所および千葉大学医学部実験動物委員会の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1) QD-antiMPO の好中球、マクロファージへの結合

anti-MPO Antibody を投与したマウス腹腔から得た好中球、マクロファージに QD-antiMPO を反応させた。anti-MPO Antibody を投与した好中球には、QD-antiMPO が結合した。対照の IgG 投与のマウス由来好中球にはほとんど QD-antiMPO が結合しなかった。その好中球は Triton X-100 処理して細胞内分子と抗体が反応できる状態により QD-antiMPO の反応性は確認できた (図1)。



図1. QD-antiMPO 抗体の好中球表面への結合

左: QD-antiMPO 抗体の好中球表面への結合、中: QD-Control IgG 抗体による結合、右: Triton X-100 処理好中球への細胞内 MPO への結合。

2) 抗 MPO 抗体、TNF- α あるいは H₂O₂ 刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の細胞表面への発現

抗 MPO 抗体(aMPO)、TNF- α あるいは H₂O₂ で血管内皮細胞を刺激して、24 時間後

の adhesion molecules ICAM-1 の細胞表面への蛋白質の発現を、Cell ELISA により解析した。aMPO 刺激では、血管内皮細胞表面への発現は認められなかったが、TNF- α あるいは H₂O₂ での刺激により、血管内皮細胞の表面へ

の ICAM-1 の発現が有意に上昇した(図 2)。

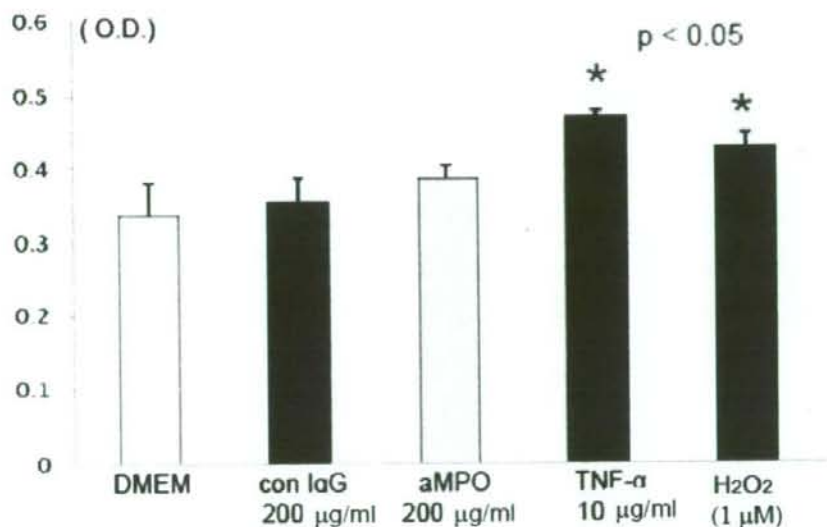


図2. TNF- α あるいはH₂O₂刺激による ICAM-1 の細胞表面への発現

3) TNF- α あるいはH₂O₂刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現

IgG、TNF- α あるいはH₂O₂で血管内皮細胞を刺激し、2時間後の E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA 発現を PCR により半定量的に解析した。E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA 発現は、TNF- α 、H₂O₂ともに上昇した(図 3)。

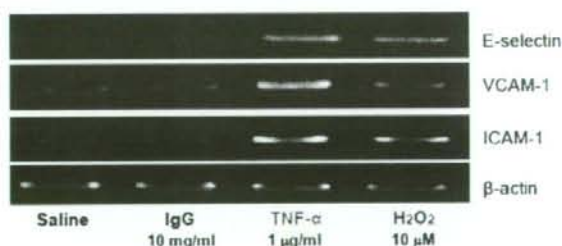


図3. IgG、TNF- α あるいはH₂O₂刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現

4) TNF- α によるケモカイン KC の産生への IgG の抑制作用

TNF- α で血管内皮細胞を刺激し、培養上清中に産生された 23 種類のサイトカイン・ケモカ

インを網羅的に定量した。その結果、特に、ケモカイン KC の産生に大きな変動があり、有意差が確認された。また、KC 産生は、IgG (10, 25 mg/mL)によって有意に抑制された(図 4)。

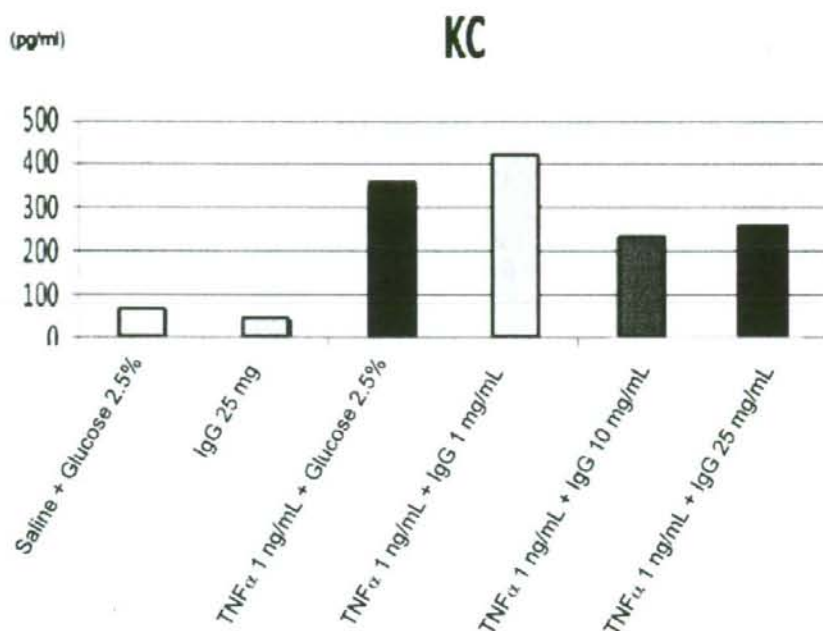


図4. TNF- α によるケモカイン KC の産生への IgG の抑制作用

5) QD-TNF- α による血管内皮細胞への結合解析

量子ドット QD 標識 TNF- α (QD-TNF- α) により TNF- α の血管内皮細胞への反応を解析した。QD-TNF- α を血管内皮細胞に反応させ反応性像が認められた。

以上の結果から、TNF- α や H₂O₂ で血管内皮細胞を刺激することで、血管内皮細胞の活性化やサイトカイン・ケモカインの産生が誘発された。また、IgG によるその抑

制作用も認められた。さらに、QD-antiMPO や QD-TNF- α によりこれらの反応の解析ができる可能性が示された。このように、サイトカイン、活性化好中球が血管内皮細胞作用して血管炎の誘発を惹起する反応の解析に量子ドット QD 標識分子が有用であることが示された。

D. 考察

これまで、DDS 開発を目標として、QD 標