

Manabe, N., and Yamamoto, K.
Nanocrystalline diamond particles
dispersed by solutions

Trans Mater Res Soc Jpn . 2009,
34(2)313-316

Fujioka, K., Futamura, Y., Shiohara, T.,
Hoshino, A., Kanaya, F., and Yamamoto, K.
Amino Acid Synthesis in Supercritical
Carbon Dioxide with Water System

*International Journal of Molecular
Sciences* . 2008, 9(6),
2722-2732. doi:10.3390/ijms10062722 *Epub
ahead of print, 15 June 2009.*

Hoshino, A., Manabe, N., Nakayama, T., and
Yamamoto, K. Immune Response Induced by
Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots in
vitro and in vivo

IEEE Transactions on NanoBioscience .
2009; Mar;8(1):51-57. *Epub ahead of print,
Mar 16, 2009.*

2. 学会発表

宮負 健一・稲澤 晋・荒川 正幹・船津 公人・
花田 三四郎・山本 健二・山口 由岐夫
統計解析及び in vitro 試験によるナノ材料
のハザード評価
化学工学会 第75回年会 2010年3月, 鹿児島

Hoshino A, Ueha S, Matsushima K, Yamamoto
K
"Role of chemokine receptor CCR1 and CCR5
in bone homeostasis."
*39th Japanese Society for Immunology
Research Conference.* Dec 3 2009, Osaka,

Japan.

Hoshino A, Yamamoto K.

"Fluorescent nanocrystal quantum dot for
bioimaging and nanomedicine -from
chemical synthesis to biological
function- "

Supergreen 2009 Oct 15-17, 2009.
Sendai, Japan. (invited speaker).

Yamamoto K.

"Novel production method for plant
polyphenol from livestock excrement using
subcritical water. "

Supergreen 2009 Oct 15-17, 2009.
Sendai, Japan

Noriyoshi Manabe, Sanshiro Hanada,
Yasuhiro Futamura, and Kenji Yamamoto,
Tadafumi Adschiri

"Re-disperse of Aggregated Nanoparticle
for Recycle Engineering"

Supergreen 2009 Oct 15-17, 2009.
Sendai, Japan

Sanshiro Hanada, Kohki Fujioka, Yasuhiro
Futamura, Noriyoshi Manabe, Akiyoshi
Hoshino and Kenji Yamamoto

"The evaluation of novel and safe
drug-modified nanoparticles"

Supergreen 2009 Oct 15-17, 2009.
Sendai, Japan

花田 三四郎・藤岡 宏樹・二村 泰弘・山本 健
二 炎症薬剤修飾ナノ粒子の薬効および毒
性評価 化学工学会 第41回秋季大会 2009
年9月, 広島

Hoshino A, Ueha S, Imai T, Matsushima K,
Yamamoto K.

"The Roles of Endogenously-produced
Chemokines in the development of
Tissue-specific Myeloid-lineage Cells and
Macrophages"

*The 9th World Congress on Inflammation
2009* Jul 6-10, 2009. Tokyo, Japan.

(Young Investigator Award, Nominated)

Hoshino A, Ueha S, Imai T, Matsushima K,
Yamamoto K.

"DEFICIENCY OF CHEMOKINE RECEPTORS CCR1,

CCR5 AND CX3CR1 CAUSES DEFECTIVE
OSTEOCLAST DIFFERENTIATION AND DEFECTIVE
BONE REMODELING"

*36th European Symposium on Calcified
Tissues 2009* May 23-27, 2009. Vienna,
Austria.

(ECTS New Investigator Award)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 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) 分担研究報告書

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)

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：狩野繁之・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

協力研究者：奥 浩之・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

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化研究を行い、次の3点について成果を得た。即ち(1)二重蛍光標識人工抗原ナノ微粒子の作成(2)in vitro および in vivo における微粒子の崩壊、抗原放出の解析(3)生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性、についてである。

A：研究目的

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。

B：研究方法

以下の3点について研究を進めた。即ち：

(1)二重蛍光標識人工抗原ナノ微粒子の作成、(2) in vitro および in vivo における微粒子の崩壊、抗原放出の解析、(3)生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性、についてである。将来の効果的なマラリアワクチン開発に向けて、これらの基礎データの蓄積を行っている。いずれも高分子化学、ペプチド化学、有機合成化学、免疫化学の融合した手法を用いた。

(1)二重蛍光標識人工抗原ナノ微粒子の作成

人工抗原ペプチドはエノラーゼの部分ペプチドである AD22 を用いた(22残基、ASEFYNSENKTYDLDFKTPNND)。この人工抗原ペプチドの抗原性を長期的に持続させることを目的として、抗原を生分解性高分子であるポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)に内包させた徐放性微粒子を作製した。平成21年度は、微粒子の崩壊、抗原の放出の様子を観察するために、AD22にはHylite Fluor 645、PLGAにはCF(5(6)-carboxyfluorescein)で蛍光ラベルした微粒子を合わせて作製した(Figure 1)。

C, D：研究結果と考察

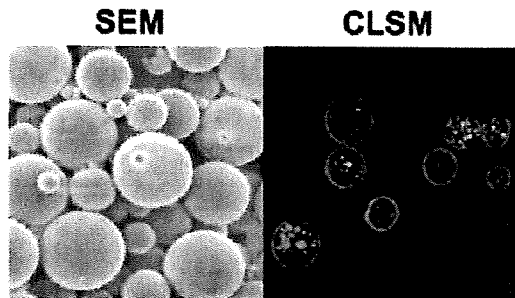


Figure 1. 生分解性高分子 PLGA を CF (5(6)-carboxyfluorescein)により、蛍光標識した微粒子の電子顕微鏡(SEM)および共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)の写真。

(2) *in vitro* および *in vivo* における微粒子の崩壊、抗原放出の解析

様々な蛍光微粒子を用いて *in vitro* 条件での抗原放出を蛍光観察したところ、抗原放出は4週間にわたり持続的に維持されることがわかった。一方、ヌードマウス皮下では3つのフェーズで抗原の消失が見られた。すなわち、(a)1-2日目の急減、(b)2-12日目には皮下での維持、(c)12-49日目にかけてゆっくりとした消失が見られた。また投与箇所の皮膚組織、筋肉組織についてパラフィン切片を作製、観察したところ抗原は皮下の脂肪組織に蓄積していることが判明した (Figure 2)。なお、動物実験に際しては、国立国際医療センター研究所実験

動物施設の倫理規定に基づいて実施した。

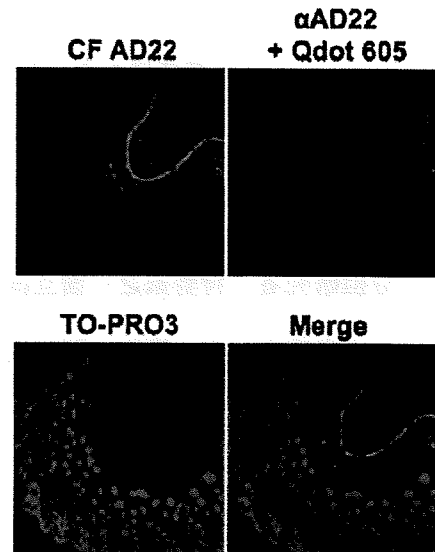


Figure 2. 蛍光標識された抗原微粒子を皮下投与した部位の皮下組織切片。

(3) 生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性

微粒子の抗原性について、Balb/c マウスに皮下投与により検討を行った。投与後3週目頃より人工抗原に対する特異抗体の上昇が観察された。その後も抗体価は序々に上昇し続け、40週後も抗体価を維持していた。

E: 結論

本年度はナノ技術を用いて、(1) 人工抗原ナノ微粒子の作成、(2) *in vitro* および *in vivo* における微粒子の崩壊、抗原放出の解析、(3) 生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性、について研究を行った。これまでの結果より、本研究のナノ微粒子が持続的に抗原を徐放し、抗体価を長期に維持するワクチン材料となることが明らかになってきた。さらに、感染実験や抗原ナノ微粒子の免疫系での局在やプロセッシングを追跡することで、効果的な予防ワクチンとなることが期待される。

F: 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) 奥浩之、山田圭一、片貝良一、鈴木守、矢野和彦、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫に由来する人工抗原を含んだ微粒子の作成と性質、平成21年度繊維学会年次大会研究発表会、東京都江戸川区、2009.06.10.
- 2) 奥浩之、矢野和彦、福本恵、狩野繁之：生体分解性高分子に内包させた熱帯熱マラリア原虫に由来する人工抗原の微粒子材料の作成と性質、第17回分子寄生虫学ワークショップ、群馬県草津町、2009.08.06.
- 3) 矢野和彦、福本恵、奥浩之、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マラリアワクチンへの応用研究、第69回日本寄生虫学会東日本大会、国立国際医療センター研究所(東京)、2009.10.03.
- 4) 矢野和彦、福本恵、奥浩之、狩野繁之「熱帯熱マラリア原虫由来人工抗原ペプチド生分解性ナノ微粒子を用いたワクチン開発研究」、第50回日本熱帯医学会大会、沖縄コンベンションセンタ

ー、2009.10.22-23.

- 5) Shigeyuki Kano, Kazuhiko Yano, Megumi Fukumoto, and Hiroyuki Oku: A Non-Adjuvanted Polypeptide Nanoparticle Vaccine Targeting *Plasmodium falciparum* Enolase Continues to Induce High Antibody Titers In Mice. The Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases Conference, The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, San Diego, USA, 2010.01.10.
- 6) Hiroyuki Oku, Kazuhiko Yano, Megumi Fukumoto, and Shigeyuki Kano: Nanosphere Materials Containing a Synthetic Antigenic Peptide Sequence of *Plasmodium falciparum* Enolase. Joint International Tropical Medicine Meeting 2009, Bangkok, Thailand, 2009.12.04.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 奥浩之、依義宣、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、特許出願 2009-059789.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）分担研究報告書

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)

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 小宮ソフィヤ 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
協力研究者 大塩智之 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

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、CCL1 ケモカイン阻害活性のある化合物が、マウス術後癒着の予防に有効であることがわかった。本年度はこの化合物の腹腔マクロファージにおける作用を検証するとともに、腹腔癌転移モデル、子宮内膜症モデルを用いて CCL1 阻害の治療応用の可能性を検討した。その結果、子宮内膜症モデルでは、CCL1 欠損により播種は阻止されないが、その後の組織の増大が阻止される可能性が示された。また、腹腔マクロファージにおいては、低分子化合物が低濃度で LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症剤としての性質が証明された。

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。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、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受けると CCL1 ケモカインを産生し、PMF が CCL1 受容体 CCR8 を発現して細胞塊を形成しながら癒着を誘導することがわかった。この結果に基づき、CCL1/CCR8 の阻害により開腹術後の癒着を予防できることを *in vivo* モデルでも示した(*J Immunol*, 178: 5296, 2007)。そこで、この CCL1 による Ca^{2+} flux 阻害剤を低分子化合物ライブラリーからスクリーニングし、得られたヒット低分子化合物 R243 は *in vivo* でも癒着阻害効果のあることが明らかになった。

本年度は、R243 の *in vitro* での作用を検証するとともに、術後癒着以外の腹腔内疾患への応用を目指し、胃癌腹膜播種、子宮内膜症への効果を検討した。

B:研究方法

1. 低分子化合物の PMF における作用

マウス PMF を LPS で刺激し、R243 を加えた時の、培養上清における TNF- α , IL-6, IL-10 を測定した。

2. 胃癌腹膜播種モデル

ヒト胃癌細胞株 KATOIII をヌードマウス腹腔内に移植した。抗マウス CCL1 抗体または R243 を移植当日及び3日めに腹腔内投与し、10週後に開腹して転移巣を観察した。

3. 子宮内膜症モデル

エストロゲン投与を行った wild type (WT)C57BL/6 または CCR8 ノックアウトマウスより、子宮内膜を採取し細切して、同様にエストロゲン前投与したレシピエントマウスにそれぞれ腹腔内移植した。さらにエストロゲン投与を続け、移植後2週間目に開腹して腹腔内を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は動物愛護に十分配慮して計画し、動物実験委員会の審査をへて承認されている。

C:研究結果

1. 低分子化合物の PMF における作用

R243 は 0.1-10 μ M の間で濃度依存性に LPS 刺激による IL-6, TNF- α , IL-10 の産生を 20-25%にまで抑制した。

2. 胃癌腹膜播種モデル

腹腔内転移巣の incidence は対照群・抗 CCL1 抗体投与群ともに 100%(6/6)、R243 投与群で 80%(4/5)であり、転移臓器にも各群での差は見られなかった。

3. 子宮内膜症モデル

腹腔内内膜組織形成の incidence は WT マウ

スで42%、CCR8KOマウスで83%であり、統計学的有意差には達しなかったがKOマウスでより多くの病変が形成される傾向があった。しかしながら、病変の大きさ(最大径)はWTマウスのものが4.417±2.396mm(mean±Std. deviation)に比較してCCR8KOマウスでは1.138±0.594mmと有意に小さかった(P=0.0014)。WTマウスに見られた病変は実質組織がめだち、出血も見られたが、CCR8KOマウスではほとんどが小型の透明なcyst状のものであった。

D:考察

本研究により評価を行ったCCR8阻害活性をもつ低分子化合物R243は、0.1µM濃度で、腹腔マクロファージのLPS刺激による炎症性サイトカイン産生を抑制することがわかった。CCR8は腹腔マクロファージに特異的なケモカイン受容体であることを我々は見いだしており、さまざまな炎症反応を正の方向に制御している可能性があるが、R243の作用点もCCR8のみではない可能性も考えられ、腹腔以外のマクロファージに対する作用を含めて今後も解析を継続する。

癌転移モデルではCCL1阻害の効果は明らかでなかったが、今回使用した系はヒト胃癌細胞であり、そのために、マウスマクロファージとの相互作用の小さい系であったことが影響している可能性がある。子宮内膜症では内膜組織の腹腔内への播種を阻止することはできなかったが、組織の増殖は阻止されている可能性がある。この事実は既に内膜症が形成された症例で増悪進行を抑制できる可能性

を示しており、症状緩和にも効果があるのではないかと予想している。

E:結論

腹膜癒着阻害活性のある低分子化合物R243は腹腔マクロファージに対して炎症性サイトカイン応答の阻害効果があった。CCL1/CCR8作用の阻害によって、子宮内膜症の進展を抑制できる可能性がある。

F:健康危機情報

なし。

G:研究発表

1. 論文発表

1. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, Burkly LC. TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology* 136:912-923, 2009.

2. 学会発表

1. Kawashima R, Kawamura YI, Phongsisay V, Okada T, Toyama-Sorimachi N, Kawamura Y, Konishi F, Dohi T. Intraperitoneal Secretion of Cytokines and Chemokines in Response to the Surgical Stress. *Digestive Disease Week 2009, Chicago, June 3, 2009*
2. 土肥多恵子, Linda C. Burkly. TWEAK/Fn14経路による消化管自然免疫応答 パネルディスカッション11 自然免疫と消化管 第51回日本消化器病学会大会, 京都, 2009年10月15日

3. その他の業績

1. 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 臨床免疫・アレルギー科 51(2):168-173, 2009

H:知的所有権の出願・取得状況(予定を

含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他
なし

1. 特許取得状況 (特許庁特許データベース等による調査結果)

特許庁特許データベース等による調査結果は、本報告書に記載の発明に係る特許権の取得状況は、特許権の取得がなされていない。

2. 実用新案登録状況 (特許庁特許データベース等による調査結果)

特許庁特許データベース等による調査結果は、本報告書に記載の発明に係る実用新案登録権の取得状況は、実用新案登録権の取得がなされていない。

3. 特許権の取得状況 (特許庁特許データベース等による調査結果) 本報告書に記載の発明に係る特許権の取得状況は、特許権の取得がなされていない。

4. 実用新案登録権の取得状況 (特許庁特許データベース等による調査結果) 本報告書に記載の発明に係る実用新案登録権の取得状況は、実用新案登録権の取得がなされていない。

5. 特許権の取得状況 (特許庁特許データベース等による調査結果) 本報告書に記載の発明に係る特許権の取得状況は、特許権の取得がなされていない。

6. 実用新案登録権の取得状況 (特許庁特許データベース等による調査結果)

本報告書に記載の発明に係る特許権の取得状況は、特許権の取得がなされていない。

本報告書に記載の発明に係る実用新案登録権の取得状況は、実用新案登録権の取得がなされていない。

本報告書に記載の発明に係る特許権の取得状況は、特許権の取得がなされていない。

本報告書に記載の発明に係る実用新案登録権の取得状況は、実用新案登録権の取得がなされていない。

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)

蛍光ナノ粒子を用いた高感度染色法による Gasp 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 早川国宏 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

我々は胸腺に特異的に発現する新規遺伝子 Gasp を単離同定した。量子ドット (QD) 標識した抗体を用いた高感度染色法により、Gasp 分子は細胞質に特異的に存在することを明らかにした。さらに、Gasp 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、Gasp が胸腺細胞の正の選択に必須であること、しかしながら負の選択には必要ないことを見出した。さらに興味深いことに、Gasp は末梢での恒常性維持増殖、抗原受容体による活性化においても必要ないことがわかり、正の選択にのみ関与していることが明らかとなった。正の選択にだけ必須で他の T 細胞受容体シグナルには必要ないという分子はこれまで見つかっておらず、Gasp のユニークな機能を解析することにより正の選択の分子機構に迫ることができると考えられる。

A:研究目的

量子サイズ効果によって強力な蛍光を放出する半導体ナノ粒子は、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利用されている。染色における蛍光色素としてだけでなく動態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が、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特徴を活かし、蛍光粒子を本研究に有効に利用した。

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り、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。

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このGaspである。このGasp遺伝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Gasp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、その表現型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Gaspの機能を解析した。解析の際には、蛍光ナノ粒子を用いた高感度細胞内染色法を利用し、細胞内におけるGasp蛋白の局在を可視化した。

B:研究方法

1) Gasp 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4Kb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、桑実胚に注入してキメラマウスを作出した。

2) ノックアウトマウスの表現型解析

ノックアウトマウスの胸腺を採取し、表面分化マーカーを染色して、フローサイトメトリーを用いてポピュレーション解析を行った。胸腺だけでなく、脾臓、リンパ節、末梢血についても同様の解析を行った。

3) 胸腺内選択の解析

T細胞受容体(TCR)トランスジェニックマウス(Tg)を用いて、正の選択における表現型をより詳細に解析した。Gasp ノックアウトマウスと3種類のTCR Tgマウスをそれぞれ交配して解析を行った。クラスI拘束性のTCR-Tg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オスの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) 成熟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、Ca²⁺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Gasp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、Gasp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、抗Gasp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蛍光顕微鏡観察を行った。

C:研究結果

Gasp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GaspのmRNA発現量を測定したところ、胸腺、脾臓などのリンパ器官にのみGaspは発現しており、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。

Gasp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産まれてきた。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た。新生児胸腺におけるT細胞初期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、Gasp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。

次にTCR-TgとGaspノックアウトマウスを交配し、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を明らかにした。さらに興味深いことに、胸腺での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であった。

いっぽう、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、負の選択におけるGasp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、Gasp 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、Gasp は負の選択には必要ないことが明らかとなった。

ホモロジー検索から Gasp 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 Gasp タンパク質を抗原として用いて抗 Gasp 抗血清および抗 Gasp モノクローナル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 (QD) 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、Gasp タンパク質は細胞質内に均一に存在していることがわかった。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、Gasp は正の選択以外の TCR 依存性のシグナル伝達に関与していないことが明らかとなった。

D:考察

1) 達成度について：我々はGasp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。この結果は2009年にPNAS誌に掲載された。Gasp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、正の選択にのみ必須な未知の新規遺伝子が存在することを論文として発表することができ、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：Gasp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4つのグループから同時にこの分子に関する報告がなされ、世界的にも注目されている新規分子である。

3) 今後の展望について：我々はGasp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高度に保存されている遺伝子である。正の選択に必須の働きをしている新規遺伝子であり、この分子の機能、構造などを詳細に解析してゆくことにより、T細胞分化における分子メカニズムの解明に大きく貢献できるのみならず、創薬の新しい対象としても非常に興味深い。

E:結論

胸腺特異的に発現する新規遺伝子Gaspのノックアウトマウスを作製することにより、Gasp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を明らかにした。QD蛍光ナノ粒子を用いた高感度蛍光染色法を用い、Gaspが細胞質に存在するタンパクであることを明らかにした。ナノ粒子を用いた高感度蛍光顕微鏡観察によって初めて観察可能になったことであり、今回の我々の研究結果は、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するものである。

F:健康危機情報

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)

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiko Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Teruo Kirikae, Shun-ichiro Iemjura, Mutsunori Shirai, Takaya Abe, Tohru Natsume, Takehiko Sasazuki and Harumi Suzuki, □Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytes □*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 16345-16350 (2009)

Yoshinori Sato, Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yukari Baba, Ahmed A. Rus'd, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki □*Rac GTPases*

are involved in development, survival and homeostatic proliferation of T cells
□ *Immunol. Let.* 124:27-34 (2009)

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. 300: 32-36 (2009)

○ 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 33--Kinase □ *J. Immunol.* (2009) 182: 957-962

- (和文) なし
- 2. 総説 (和文) なし
- 3. 著書 なし
- 4. 学会発表 (国際学会)

Harumi Suzuki, Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, □ Gasp (Themis) is a novel protein essential for positive selection but for negative selection nor for peripheral

activation, □ The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2009.12) □ Late braking talk, Osaka, Japan

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato, Shinichi Aizawa, Toru Natusme and Harumi Suzuki, A novel gene ISC4 is critically required for positive selection of thymocytes, □ The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2009.6) Kyoto Japan

Harumi Suzuki, Hiroyo Oda and Michael S. Patrick, □ A novel thymus specific gene ISC4 plays a critical role in positive selection in the thymus, □ The 2009 Midwinter Conference of Immunologists at Asilomar (2009.1) Pacific Grove, USA

(国内学会)

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki □ A novel Grb2 associating protein Gasp is critically required for positive selection of thymocytes □ 第39回日本免疫学会学術集会 2009.12 大阪 □

Kunihiro Hayakawa, Michael S. Patrick, Hiroyo Oda and Harumi Suzuki □ Analysis of novel T cell-specific gene ISC22 □ 第39回日本免疫学会学術集会 2009.12 大阪 □ □

DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析

- ANCA 関連血管炎と neutrophil extracellular traps (NET)形成 -

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

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 に利用できる量子ドット(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し、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。一方、活性化された好中球の新たな機能として NET(neutrophil extracellular traps)が見つかり、特に、NET 形成は、好中球における抗菌機能に加えて、自己免疫疾患にも関連性も示唆されている。そこで、本年度は、NET 形成反応性を解析することで、局所での好中球の機能制御の可能性について検討した。マウス血管炎を惹起する抗 MPO 抗体(MPO-IgG: MPO-ANCA)で刺激し好中球が NET を誘導するかを、好中球の蛍光イメージング観察より調べた。さらに、NET 形成への MPO 分子の関与を調べるため、MPO-KO マウスを用いて解析した。野生型マウス好中球を MPO-IgG で刺激することにより、NET 形成が確認された。しかし、MPO-KO マウスでは、phorbol ester(PMA)で NET 形成を誘導できたものの、MPO-IgG 刺激では NET 形成は検出できなかった。これらの結果は、MPO-ANCA は、活性化された好中球表面に保養出した MPO と反応し NET を誘導することが示された。

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、われわれは活性化され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)。活性化された好中球は、血管炎の発症の要因とな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(RPGN)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。

最近、好中球が、貪食という免疫機能に加えて、細胞死の後にもその抗菌・抗真菌機能を発揮するために、neutrophil extracellular traps (NET)の放出という、ネクロシスやアポトーシスとは異なる新しい細胞死形態を有することが報告された。さらに、ANCAによる刺激でNETが形成されることが報告され、非常に注目を集めている。

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、DDS のモニタリングや局所治療や種々の生体機能に欠かせない方法として急速に定着してきている。

本年度は、MPO-ANCA が誘導するNET 形成のイメージング解析により、NET 形成イメージングが、MPO-ANCA 関連腎炎の mediator となるかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 好中球の NET 形成のイメージング解析

(1) 好中球の prime と刺激濃度の条件検討：C57BL/6 および MPO-KO マウスの骨髄から好中球を分離し、37°C、10 min 予備加温し、TNF- α (5 ng/ml) を加えて、37°Cで 10 min で予備刺激した。TNF- α により予備刺激した細胞を Fibonectin-coat の glass slide chamber に入れ、その後、anti-MPO 抗体を加え、240 min CO₂ incubator 中で加温した。その後、4%PFA にて固定し、Hoechst33342 にて染色し、蛍光顕微鏡にて NET の形成を観察・イメージング解析した。

(2) anti-MPO 抗体の反応性：anti-mMPO (250mg/ml, 25mg/ml, 0.25mg/ml)の濃度で、検討した。Control には、fMLF (1 \times 10⁻⁵M, 1 \times 10⁻⁷M)、PMA (1 μ M, 100 nM, 10 nM)および HBSS を用いて刺激により評価した。

2) 好中球の NET 形成への ROS の関与

NET 形成の経路の上流と考えられている NADPH-oxidase による ROS (Reactive oxygen) 産生の関与による NET 形成を catalase による阻害効果により判定した。

TNF α (5 ng/ml)にて priming し、37°C で 10min 加温後、catalase (1 mg/ml) あるいは catalase-PEG (100 units/ml) を 添加し 30min 加温し、anti-MPO poly Abs (250 μ g/ml)を加えて、さらに、240min CO₂ インキュベータ中で反応させた。尚、anti-MPO poly Abs の Control として、PMA (100nM) および HBSS にて反応させた。固定および測定は、1) と同様に行った。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、千葉大学大学院 医学研究院実験動物委員会および国立感染症研究所および指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1) 好中球の NET 形成のイメージング検討

(% NETs/200neutrophils)

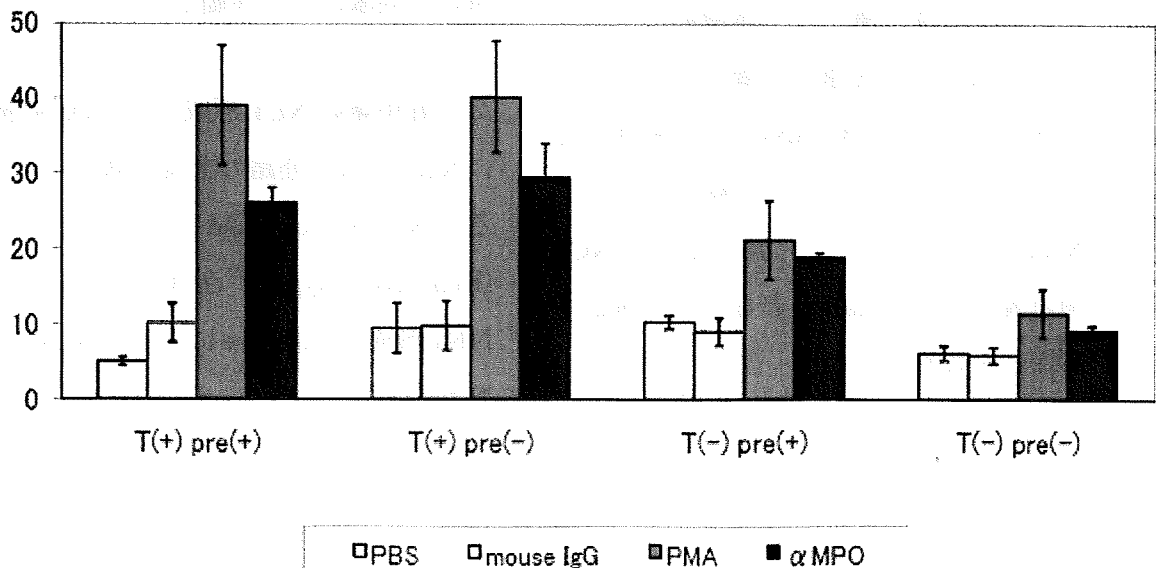


図1. TNF- α プライミングによる NET 形成率

TNF- α によるプライミング効果：図1に見られるように、NET 形成誘導に TNF- α のプライミングにより上昇していることが示された (図1)。

anti-MPO 抗体：さらに、anti-MPO 抗体により、NET 形成を誘導されたことがイメージング解析により確認された。また、anti-MPO 抗体による NET 形成誘導に、濃度依存性が見られた (図2)。

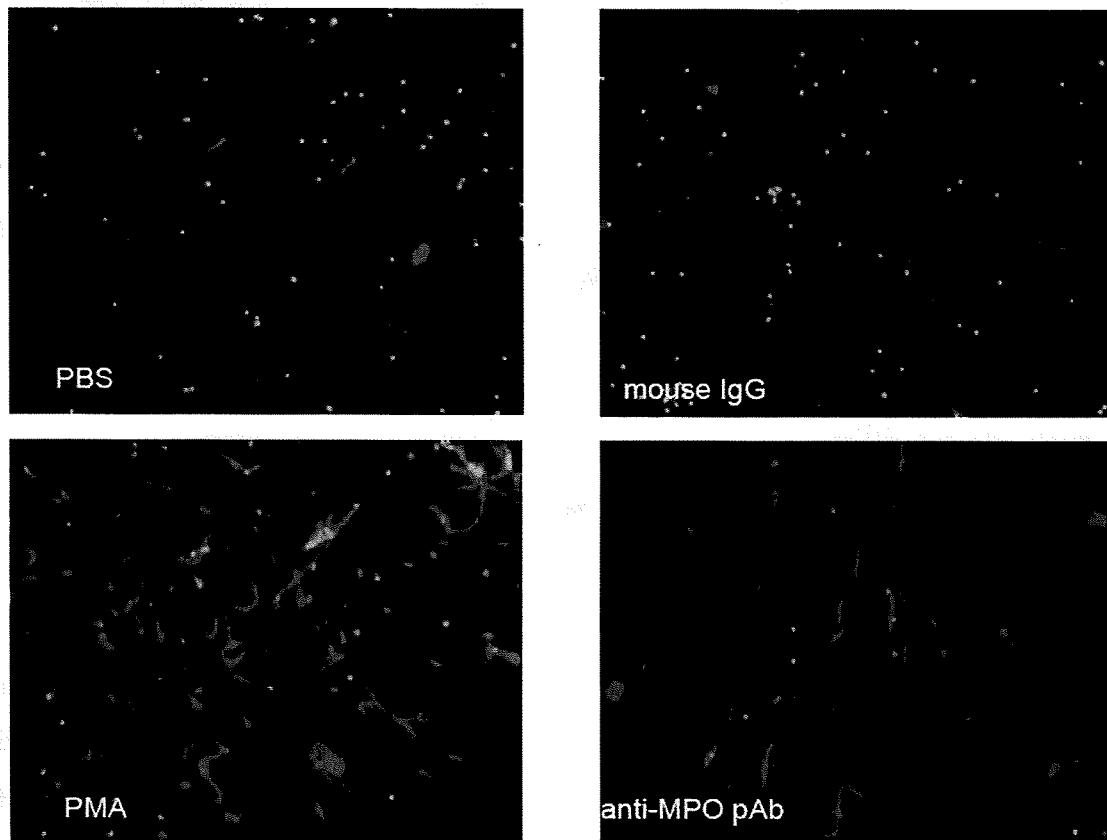


図2. Anti-MPO 抗体による NET 形成

2) Catalase による NET 形成抑制

NET 形成経路の上流には、NADPH-oxidase による ROS 産生が関与していることが報告されている。anti-MPO 抗体によって誘導される NET 形成に ROS の経路が関与しているかを確かめるために catalase を用いて阻害効果を検討した。PMA 処理による NET 形成は catalase で阻害され ROS 依存的であることが確認できた。しかし、anti-MPO 抗体による NET 形成には catalase による阻害がほ

とんど確認できなかった。

D. 考察

これまで、DDS 開発を目標として、QD 標識 MPO 抗体を用いた好中球および腎糸球体内皮細胞への MPO-ANCA の作用を検討し、好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出する好中球活性化を判定する指標を示してきた (Hohino et al, Microbiol Immunol, 2007)。また、サイトカイン刺激により活性化好中球の細胞表面に出た MPO と MPO 抗体が結合して糸球体の機能に影響を与えることが考えられる。一方、QD 標識 MPO 抗体の投与により、MPO 抗体

のトレースから、CAWS 投与による糸球体への好中球浸潤には、炎症性サイトカイン・ケモカインの変動が関わっていること、これらサイトカイン・ケモカインが、ICAM-1 の発現上昇を伴う内皮細胞の障害にかかわり、かつ、好中球浸潤および好中球活性化に深く関与していることが示唆された。そこで、本年度の本研究では、以下について検討した。

1) 好中球の NET 形成のイメージング解析：NET 形成誘導に TNF- α のプライミングにより上昇していることが示され、好中球が活性化され MPO が細胞表面に表出し、その MPO に anti-MPO 抗体が反応することから、NET 形成を誘導することが強く示唆された。

2) Catalase による NET 形成抑制：一方、NET 形成経路の上流には NADPH-oxidase による ROS 産生が関与していることが報告されており、anti-MPO 抗体を用いた NET 形成に同様の経路が関与しているかを catalase の阻害実験より検討した。PMA による ROS 経路の NET 形成は報告されているように ROS 依存的事であることが示唆された。しかし、anti-MPO 抗体による NET 形成が catalase によって阻害されなかったことから、anti-MPO 抗体による NET 形成は、ROS 非依存的事である可能性が示された。

報告されている NET 形成には ROS が

関与しているが、anti-MPO 抗体による刺激では関与していない可能性が予想されることから、今後は、anti-MPO 抗体関与の NET 形成のシグナル経路は、他の刺激による NET 形成と異なった経路を經由しているかを検討し、NET が関与しているとされる MPO-ANCA 関連血管炎の発症・重症化との関係について検討する。

E. 結論

DDS 開発を目標として、QD 標識 MPO 抗体を用いた好中球および腎糸球体内皮細胞への MPO-ANCA の作用を検討し、好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出する好中球活性化を判定する指標を示してきた。炎症性サイトカイン・ケモカインの変動は、血管内皮細胞の障害と好中球浸潤および好中球活性化に深く関与している。本年度は、活性化好中球の NET 形成のイメージング解析について検討した。活性化された好中球が MPO を細胞表面に表出し、その MPO に anti-MPO 抗体が反応すること、NET 形成を誘導することが強く示唆された。一方、anti-MPO 抗体による NET 形成が catalase によって阻害されなかったことで、anti-MPO 抗体による NET 形成は、ROS 非依存的事である可能性が示された。anti-MPO 抗体関与の NET 形成のシグナル経路が、固有の経路を經由しているかを検討し、NET が関与しているとされる MPO-ANCA 関連血管

炎の発症・重症化との関係について今後解析を進める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Akiko Ishida-Okawara, Hitomi Yamada, Yoshiaki Kaneshiro, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Administration of human immunoglobulin inhibited development of vasculitis in a murine model of vasculitis induced with CAWS, *Candida albicans* water soluble fraction. Modern Rheumatol. in press
2. Masumitsu Hatta, Natsuo Yamamoto, Akiko Miyazato, Kiwamu Nakamura, Ken Inden, Tetsuji Aoyagi, Kazuo Suzuki, Mitsuo Kaku, Kazuyoshi Kawakami. Early production of tumor necrosis factor- α by Gr-1+CD11b+ mononuclear cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; in press.
3. Akihiro Hasegawa, Katsuhiko Hayashi, Hiroyuki Kishimoto, Meng Yang, Soichi Tofukuji, Kazuo Suzuki, Hiroshi Nakajima, Robert Hoffman, Mutsunori Shirai, Toshinori Nakayama. Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. J Allergy Clin Immunol 2010;125:461-8..
4. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. J Immunol. 183(5):3417-24 (2009).
5. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, Stavrakis G, Shimosawa T, Xiao L, Nagahama Y, Suzuki K, Fujita T,

Mayadas TN. Circulation. 120(13):1255-65 (2009).

6. Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Analysis of cytokines in broncho-alveolar lavage fluids of patients with ARDS: Increase of IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β . JJSICM(Journal of Japanese Society of Intensive Care. in press 2009.
7. Shoji Kawachi, San Thi Luong, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Thi Bich Phung, Phuc Huu Phan, Hiroyuki Nunoi, Liem Thanh Nguyen, Kazuo Suzuki. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. J. Infectious Dis. 2009; 200: 510-515.
8. Chiaki Kaga, Shigeyuki Nomura, Mina Okochi, Tomoko Nozu, Tomokazu Nagao, Atsushi Nagai, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki, Hiroyuki Honda. Screening of epithelial cell-adhesive peptides from fibronectin loop region and its cell specificity. J Chem. Engineering Japan 2009; 4:298-302.
9. Tomoko Nozu, Mitsuko Kondo, Kazuo Suzuki, Jun Tamaoki, Atsushi Nagai. A Comparison of the Clinical Features of ANCA-Positive and ANCA-Negative Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. Respiration 2009;77:407-415.
10. 長尾朋和、鈴木和男 ANCA 関連血管炎と Neutrophil Extracellular Traps(NETs、好中球細胞外補足構造) リウマチ科 (科学評論社) in press

書籍

1. 鈴木和男 インフルエンザ感染と免疫応答免疫学事典 (朝倉書店:桂監修) in press
2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎と血管内皮細胞 「腎臓と透析」 東京医学社 in press
3. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎モデルマウスの新知見 「脈管学」メディカルトリビューン社 in press

4. 橋本博史、小林茂人、藤元昭一、湯村和子、高橋啓、猪原登志子、平橋淳一、鈴木和男：血管炎の新分類基準、新治療や発症機構研究の世界的動向（前編）。日本医事新報 No.4470:43-51, 2009
 5. 橋本博史、小林茂人、藤元昭一、湯村和子、高橋啓、猪原登志子、平橋淳一、鈴木和男：血管炎の新分類基準、新治療や発症機構研究の世界的動向（後編）。日本医事新報 No.4472:46-52, 2010
 6. 鈴木和男 ナノ粒子の知恵の塊-ドラッグデリバリーシステムのイメージング 技術評論社刊「光る生き物—ここまで進んだバイオイメージング技術」pp140-153、2009年11月1日刊行
 7. 長尾朋和、鈴木和男「好中球機能異常による血管炎・腎炎」、細胞(ニューサイエンス社)、41(2)、pp.60-63、2009.
 8. 長尾朋和、鈴木和男「ANCA 関連血管炎」ANCA 関連血管炎—発症機構解析・モデルマウス・新たな治療法—炎症と免疫(先端医学社)、2009年17巻(6)11月 707-713
 9. 鈴木和男、安田英典:「わが国の新型インフルエンザの影響予測とその対策」、インフルエンザ(メディカルレビュー社)、10、143-149、(2009.4)
2. 学会発表
- 【国内学会】
1. 平橋淳一、鈴木和男、藤田敏郎 ANCA 関連血管炎と Neutrophil シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第 52 回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成 21 年 6 月 3-5 日
 2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA が直接誘導する糸球体血管内皮細胞活性化の分子機構 シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第 52 回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成 21 年 6 月 3-5 日
 3. 鈴木和男 総合討論：ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合 シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第 52 回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成 21 年 6 月 3-5 日
 4. 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 インフルエンザウイルス 感染誘導による劇症型 ARDS の発症機構の解析 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009 年 6 月 26-27 日
 5. 常賀、長尾朋和、中山俊憲、鈴木和男 IVIg 治療による活性化血管内皮細胞からのサイトカイン産生調節機序の解析 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009 年 6 月 26-27 日
 6. 鄒軍、長尾朋和、志賀由佳、前原康宏、土橋英紀、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 ARDS 病態モデルの肺組織傷害初期に産生する TNF- α と連動するサイトカイン・ケモカイン IL-6 と KC 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009 年 6 月 26-27 日
 7. 三浦典子、高野雄介、安達禎之、塙晴雄、相澤義房、鈴木和男、大野尚仁 C AWS 血管炎に対する IL-10 遺伝子治療の効果 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009 年 6 月 26-27 日
 8. 鈴木和男 感染症初期の好中球の役割と慢性炎症疾患「平成 21 年度東京麻酔専門医会リフレッシュコース」平成 21 年 7 月 25 日(土)、26 日(日)、東京
 9. 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、富澤一夫、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 インフルエンザウイルス PR-8(H1N1)感染による肺傷害機構の解析 20 回日本生体防御学会学術集会、東京、2009 年 7 月 25-26 日
 10. 鈴木和男 「プライマリーケア医が血管炎を見つける」血管炎の国際情報普及フォーラム、栃木、2009 年 9 月 20 日
 11. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
 12. Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Tomokazu Nagao and Kazuo Suzuki. Genetic dissection of dendrocytosis related to the