

図3 血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンの測定結果

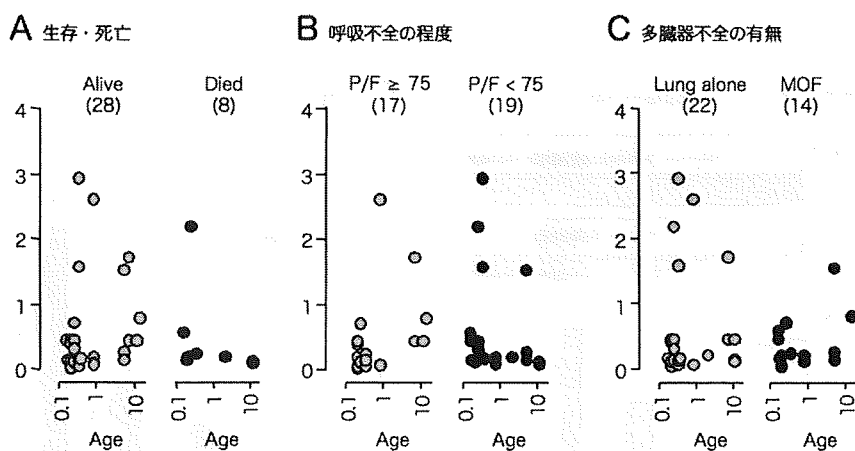


図4 血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンのレベルと病態との関連性

(A) 予後との関連性、(B) 呼吸不全の程度、(C) 多臓器不全の有無と、3-NTのレベルの関連性を検討した。

## 劇症型 ARDS の量子ドットによる microRNA 治療に向けて

研究分担者 山本健二 国立国際医療センター研究所際臨床研究センター・センター長

研究協力者 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** 現在、遺伝子治療を行なうには一般的にはレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター利用している。ところが、細胞増殖のコントロールがうまくできていないため現状ではその開発研究は急速に低下した。その原因は、現在不明であるがアデノアソシエイトウイルスを用いて研究が再現している。アデノアソシエイトウイルスを用いた研究は、1980年代中頃まで研究が進んでいたが、当時はレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターの開発の勢いに圧倒されて来た。安全性については、それら2つのウイルスより高い事が当時から判っており、近年再び開発研究が進められている。

一方薬剤伝達システムは、臓器特異的、細胞特異的、細胞内器官特異的に薬剤を伝達する事が一部可能と成っている。本研究は、この技術を利用し遺伝子伝達システムを開発する。現在まで GFP 遺伝子を量子ドットに結合し核移行シグナルを用いて細胞の核に伝達し発現させる事に成功した

### A. 研究目的

ARDS の発症は、原因不明の場合も有るが、インフルエンザなどの感染症がトリガーとなり誘導する場合は有る。本研究は鳥インフルエンザに罹患し、発病した患者が、劇症型 ARDS を発症するような場合、非常に高い致死率が高くなることをターゲットとし救命率を高める治療法の検討をする事が目的である。

そのために本研究では、iRNA を用いウイルスノ増殖を抑制する方法を用い、劇症型 ARDS に至までに成らないよう、その原因と成る物が、患者の免疫系を自己免疫的に肺に於ける大炎症を起こす前に沈静化する、或は根本的にそうならないよう阻止する手段を検討する。

### B. 研究方法

本研究に於いて、必要なものは、iRNA を運ぶキャリアーである。DNA ガンのように必要な部位にまで注射器等で必要な部位にまで到達し、その組織に必要な iRNA を打ち込む事も一つの方法である。しかしながらこの方法では深部に到達する事に問題が残りました、繰り返し行なうには適していないキャリアーである事からである。そこで我々は、ナノ粒子を用いて行なう事を計画した。これまでに我々は、半導体ナノ粒子を用い、これに薬物を添加させ薬物キャリアーとしてマウスを使ったモデル実験に成功している。そのとき使ったモデル薬物は、抗高血圧剤であるカプトプリルである。カプトプリルは、アミノ酸であるシステイン

のアミノ基をメチル基に置き換えたアミノ酸誘導体とプロリンのジペプチドである。この分子を半導体ナノ粒子表面に結合させた

遺伝子断片付加半導体ナノ粒子の作成については、遺伝子フラグメントを半導体ナノ粒子結合させたプラスミッドを作成し遺伝子全体はポリメラーゼ連鎖反応にて核生物においても発現できる GFP 遺伝子を装着する

また肺臓器におけるマクロファージ発生において重要なケモカインとケモカインレセプターについて標的遺伝子と成りうるか否かの検討を行った。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝子発現

培養動物細胞を用いて遺伝子フラグメント結合半導体ナノ粒子による遺伝子導入実験を行った。その結果、下図に示してある様に緑の蛍光蛋白を細胞内で発現し、その蛍光を確認する事ができた。

今回解析したマウス肺胞マクロファージについて、研究方法にリストしたケモカインレセプターの発現量は、骨髄のナイーブなマクロファージとケモカインレセプター発現量と有為な差は見つからなかった。

## D. 考案

### 1) 達成度について

iRNAの伝達システム開発まで、半導体ナノ粒子をキャリアーとして開発することの可能性は一步前進した。今後動物を用いて伝達可能か否かを検討する必要が有り、またその有効なiRNAを設計する必要背が有る。

ターゲット遺伝子としてアルベオラマク

ロファージの炎症に関する遺伝子を検討したい。

本研究では、それらの思索について可能性のある事を今回示すことができた。大きな計画の一部であるが、大きな成果を得たと考えている。

### 2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

2008年5月28日、デンマークの生物製薬会社・Santaris Pharma社は、C型肝炎の治療薬として開発されているマイクロRNA標的薬・SPC3649 (LNA-antimiR-122) の第1相試験の開始を発表している。国際的に見ても、iRNAによる治療は国際的に見ても大きな潮流となって多くの研究が成されている。我々の行っている研究はARDSやその他の難病に対する新しい治療法であり現在更に日進月歩で進化している。

### 3) 今後の展望について

本研究により遺伝子導入が効率よく行なわれるウイルスベクターを用いない方法を新しく開発することが可能と成った。

今後iRNAを結合させ細胞内に導入し、ターゲット細胞内の発現状態を制御することによりインフルエンザウイルス感染による劇症ARDSに有効な治療法の開発に向けて研究開発を行なう。

今回は、肺臓器に関連する3種類のマクロファージ、腹腔マクロファージ、肺間質マクロファージ、胸膜マクロファージに対して肺胞マクロファージについて解析したが、今回試みた腹腔マクロファージでは有為な差は認められなかったため、肺胞特異的ケモカインレセプター、および特異的ケモカインは同定出来なかった。

今後残りの2つの細胞について検討すると

ともに、その他の有効な遺伝子を探索する

## E. 結論

近年、わずか20数個の塩基が連なった「マイクロRNA」が「タンパク質合成」を調節することがわかってきました。マイクロRNAは、特定のmRNAに作用して、mRNAの翻訳を抑制します。マイクロRNAは、がんの発症や記憶の形成など、極めて広範囲の高次生命現象に関わることが明らかになりつつある。

最近マイクロRNAの表現の変化を統合失調症に発見している。ノースカロライナ大学のダイアナ・パーキンス等の研究チームは、亡くなった15人の統合失調症と統合失調情緒障害（統合失調と情緒障害の両方が現れる精神障害）の患者の脳を、21人の亡くなった健康な人の脳と比較して、その違いを発見した。違いは高度の思考と決断をする前頭前野皮質にあり、この脳の異常が統合失調症発症に関連しているとされている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表.

1. Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Manome Y. Detection of thyroid carcinoma antigen with Quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems. *J. Nanomater.* 2010; in press
2. Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K. High-Definition Slit Lamp Video Camera System. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging* January/February 2010 Vol 41, No 1; in press Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K, Lim T, Yamamoto K, Northcote P, Tilley RD. Chemical Reactions On Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots. *J Am Chem Soc.* 2010 Jan 13;132(1):248-253.
3. Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y, Okuda T, Manome Y, Yamamoto K. Combination of Real-Value Smell and Metaphor Expression Aids Yeast Detection. *PLoS ONE* 4 (11), e7939, 2009.
4. Prabakar. S, Shiohara. A, Hanada. S, Fujioka. K, Yamamoto. K, and Tilley. RD Size Controlled Synthesis of Germanium Nanocrystals with Hydride Reducing Agents and their Biological Applications *Chemistry of Materials*, in press.
5. Sudoh K, Hirakuri K, Fujioka K, Manabe N, Yamamoto K. Nanocrystalline diamond particles dispersed by solutions. *Trans Mater Res Soc Jpn.* 2009, 34(2)313-316
6. Fujioka K, Futamura Y, Shiohara T, Hoshino A, Kanaya F, Manome Y, 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.
7. Hoshino A, Hanada S, Manabe N, Nakayama T, 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.
8. Osinski M, Jovin TM, Yamamoto K. Introduction to the special section on colloidal quantum dots for biomedical applications.(Review) *IEEE Transactions on NanoBioscience* . 2009; Mar;8(1):1-3. Epub ahead of print, Mar 16, 2009.
9. Hoshino A, Hanada S, Manabe N, Nakayama T, Yamamoto K. Immune Response Induced by Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots in vitro and in vivo. *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2008;in press.
10. Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K. High-Definition Slit Lamp Video Camera System. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging* 2008; in press
11. Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Hanada S, Yasuhara M, Kondo A, Yamamoto K.,

- GFP expression by intracellular gene delivery of GFP-coding fragments using nanocrystal quantum dots. *Nanotechnology* 2008 Dec 10;19(49):pp1-12. Epub ahead of print, 18 November 2008.
12. Fujioka K, Hiruoka M, Sato K, Manabe N, Miyasaka R, Hanada S, Hoshino A, Tilley RD, Manome Y, Hirakuri K, Yamamoto K. Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration. *Nanotechnology* 2008 Oct 15;19(41):415102. Epub ahead of print, Sep 3, 2008.
  13. Osinski M, Jovin TM, Yamamoto K. Biomedical applications of colloidal nanocrystals. *J Biomed Biotechnol.* 2007; 2007:82752. Published online 2008 June 4. doi:10.1155/2007/82752.
  14. Yamamoto M, Futamura Y, Fujioka K, Yamamoto K. Novel production method for plant polyphenol from livestock excrement using subcritical water. *International Journal of Chemical Engineering* 2008; in press.
  15. Hoshino A, Nagao T, Nagi-Muira N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Nakayama T, Suzuki K. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *Journal of Autoimmunity* 2008;31(1):79-89. Epub ahead of print, Apr 21, 2008

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

## ARDS における Th1/Th2 バランスの異常

研究分担者 中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 教授  
研究協力者 長谷川明洋 山口大学大学院医学系研究科 講師

**研究要旨** ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリーT 細胞に分化する。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスをとりながら生体防御機構における中心的な役割を担っており、感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な関係があると考えられている。CD69 分子は c-type lectin ファミリーに属する II 型の膜分子で、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。機能の詳細はこれまであまり明らかにされていないが、炎症局所に浸潤する炎症細胞はすべて CD69 分子を発現していることから、さまざまな炎症反応の誘導・維持に重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに CD69 ノックアウトマウスを作製し、疾患との関わりを解析を進め、CD69 ノックアウトマウスではアレルギー性喘息が起きないことを見出した。アレルギー性喘息は抗 CD69 抗体の投与でも抑制され、治療効果が認められた。またイメージング技術を駆使した解析により、特に T 細胞上の CD69 分子がアレルギー性喘息の発症に重要であることが明らかになった。さらに ARDS の実験モデルを用いて ARDS の発症にともなう肺への免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析を行うとともに CD69 分子の関与について検討したところ、抗 CD69 抗体投与により肺への免疫炎症細胞浸潤が抑制できることが明らかになり、CD69 分子をターゲットにした ARDS の新規治療法の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリーT 細胞に分化する。Th1 細胞は IFN- $\gamma$  を産生して細胞内感染病原体に対する細胞性免疫に関与し、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 など産生して細胞外感染病原体に対する液性免疫やアレルギー反応に関与する。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバラ

ンスをとりながら生体防御機構における中心的な役割を担っており、感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な関係があると考えられている。

CD69 分子は、c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、45kd の膜蛋白であるが、通常はホモダイマーとして存在している（図 1）。T 細胞や B 細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇し、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く

用いられている。また胸腺内で分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現がみられる。コレセプターとして抗原レセプターからのシグナル伝達を増強する機能が推測されているが、詳細は不明である。リガンドは現在までのところ、同定されていない。一方、血小板には恒常的に発現しており、活性化した好中球や好酸球などにも発現がみられることから、血小板の機能発現や局所の炎症反応における役割が推測されている。

樹立した CD69 ノックアウト (CD69-KO) マウスを用いて、生体内での CD69 分子の役割の解析を進めることを目的として、卵白アルブミン (OVA) を用いた気道炎症モデルを用いた解析を行った。

このアレルギー性喘息モデルは Th2 細胞依存性であるが、Th2 細胞は数の上では浸潤細胞の数パーセント程度で、Th2 細胞が実際の肺の炎症の場でどのような機序で炎症誘導における重要な機能を果たしているのかに関してはほとんど明らかになっていない。そこで、蛍光を発する GFP トランスジェニックマウスの Th2 細胞を移入するシステムを使って、喘息を起こしたマウスの肺での Th2 細胞の浸潤を蛍光顕微鏡を用いて定量的に解析できるイメージング解析システムを構築し、炎症巣の形成における Th2 細胞の役割を解析するとともに、喘息肺への T 細胞浸潤における CD69 分子の役割を解析した。

ARDS は免疫炎症細胞浸潤をともなう急性の肺傷害で、予後不良な重症病態を示す。現在ステロイド投与などによる対症療法的な治療法しかなく、有効な治療法の開発が急務となっている。これまでの研究から、

肺胞洗浄液や肺組織中の炎症性細胞数と肺機能所見との相関も報告されており、炎症細胞から放出される蛋白分解酵素などのケミカルメディエーターが関与していると考えられているが、炎症細胞の浸潤過程についてはほとんど明らかになっていない。そこで、GFP トランスジェニックマウスの T 細胞や好中球を移入する方法を使って、ARDS を発症したマウスの肺での浸潤過程をイメージング解析するとともに CD69 分子の役割を解析した。

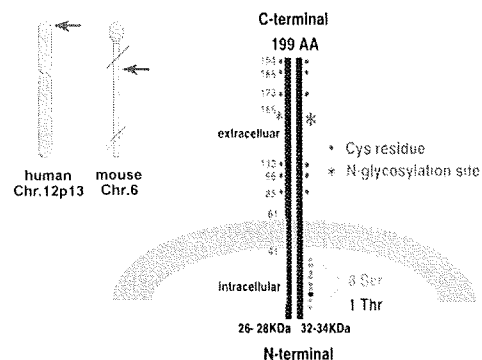


図1 CD69 の分子構造

## B. 研究方法

### 1) アレルギー性喘息の誘導

マウスでのアレルギー性喘息モデルとして、卵白アルブミン (OVA) で免疫後、OVA を吸入させて気道炎症を誘導する系を用いた。気道炎症誘導後、肺胞洗浄を行い、浸潤細胞の種類と数と調べた。また気管支および肺の組織切片を作製し、炎症細胞の浸潤や腺分泌の程度を比較した。メタコリン誘導性の気道過敏症モデルを用いて、機能面の評価を行った。さらに抗 CD69 抗体を用いて急性の気道炎症を抑制する試みを行った。炎症の誘導前に投与、また炎症誘導の後に投与を行っ

て、その効果を解析した。

## 2) T細胞浸潤のイメージング解析

蛍光を発する GFP トランスジェニックマウスを OVA と alum で免疫し、脾臓の CD4 T 細胞を精製分離し、同系の免疫していない C57BL/6 マウスに移入した。また抗原特異的 Th2 細胞の解析では、蛍光を発する GFP トランスジェニックマウスからナイーブ CD4T 細胞を精製分離し、in vitro で抗原特異的 Th2 細胞を調製して同系の免疫していない C57BL/6 マウスに移入した。2 日後に OVA を吸入させ、その後肺に集積してくる GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

## 3) ARDS の誘導と炎症細胞浸潤のイメージング解析

マウスでの ARDS モデルとして、LPS を経鼻投与する系を用いた。GFP トランスジェニックマウスから CD4T 細胞や好中球を精製分離し、同系の C57BL/6 マウスに移入した。1 日後に 10 mg/kg の LPS を経鼻投与した後、経時的に肺を取り出し、肺に集積してくる GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察した。さらに抗 CD69 抗体を用いて急性の細胞浸潤を抑制する試みを行った。ARDS の誘導前に投与し、その効果をイメージング解析した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は千葉大学および山口大学の実験動物委員会の定める規定を遵守して行った。

## C. 研究結果

### 1) CD69 ノックアウトマウスでのアレルギー

一性喘息

CD69 ノックアウトマウスでは、肺胞洗浄液中の浸潤細胞、とくに好酸球の数が有意に減少していた。肺の組織染色を行ったところ、CD69 ノックアウトマウスでは細胞浸潤や気道炎症に伴う腺分泌が抑制されており、メタコリン誘導性の気道過敏症も減少していた。抗 CD69 抗体の投与でも喘息反応は抑制された。詳細な経時的解析を行ったところ、気道炎症が誘導された後でも抗 CD69 抗体の投与によって、炎症が強く抑制されることが明らかになった。また野生型マウスから T 細胞や B 細胞、好中球、マクロファージなどを個別に単離して CD69 ノックアウトマウスに注射した後、喘息を誘導する実験を行ったところ、T 細胞を移入した場合に喘息発症の抑制が解除された。

### 2) 抗原感作された T 細胞のイメージング解析

OVA 免疫した GFP トランスジェニックマウスから CD4T 細胞を精製分離し、同系の野生型マウスに移入して 2 日後に OVA 吸入を行うと、その 1 日後には肺への GFP 陽性細胞の集積が観察できた (図 2)。タイムコースを追った実験を行ったところ、GFP 陽性細胞の肺への集積は抗原吸入後 18~24 時間でピークに達し、その後も肺に留まることが明らかになった。この肺への集積は OVA プライミング依存的で、免疫していない GFP トランスジェニックマウスの CD4T 細胞は肺に集積しなかった。また、CD8T 細胞でも同様の集積が観察された。このマウスの喘息モデルでもステロイド剤を投与すると炎症が抑制されることがわかっているが、OVA 吸入と同時にステロイド剤を投与すると GFP 陽性 CD4T 細



胞の浸潤が抑制されることが明らかになった。次にこのイメージングシステムを用いて CD69 ノックアウトマウスの CD4T 細胞について、抗原吸入後の肺への集積能を野生型マウスの CD4T 細胞と比較したところ、CD69 ノックアウトマウスの CD4T 細胞は肺への集積能が低かった。したがって、特に T 細胞上の CD69 分子がアレルギー性喘息の発症に重要であることが明らかになった。

でピークに達し、その後も肺に留まることが明らかになった (図 3)。また、抗原特異的 Th2 細胞は好酸球などの他の炎症細胞よりも先に肺に集積して focus とよばれる細胞集団を形成し、その後の炎症巣の形成を制御していることが明らかとなった。さらに抗 CD69 抗体のほか、抗 ICAM-1 抗体や抗 VCAM-1 抗体の投与により、アレルギー性喘息の誘導にともなう肺への T 細胞集積や focus 形成が抑制されることが明らかになった。

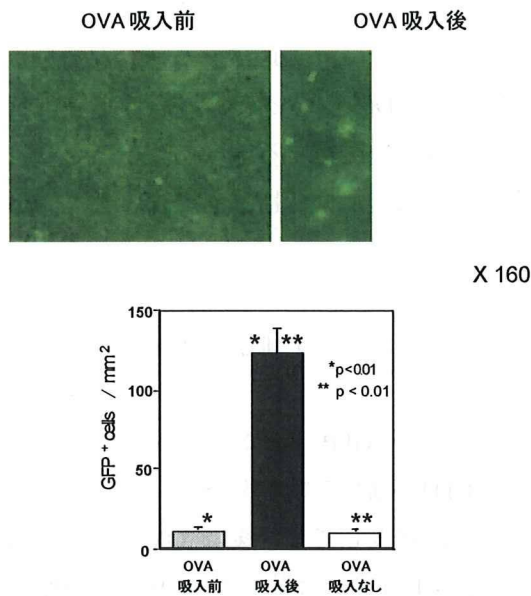


図 2 OVA 吸入により肺に集積した GFP 陽性 CD4T 細胞

### 3) 抗原特異的 Th2 細胞浸潤のイメージング解析

GFP トランスジェニックマウスからナイーブ CD4T 細胞を精製分離し、in vitro で抗原特異的 Th2 細胞を調製して同系の野生型マウスに移入した。2 日後に OVA 吸入を行うと、肺への GFP 陽性細胞の集積が観察できた。タイムコースを追った実験を行ったところ、GFP 陽性細胞の肺への集積は抗原吸入後 6 時間後から観察され、18~24 時間

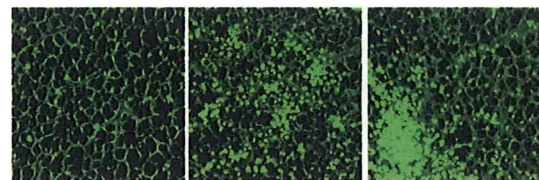


図 3 喘息肺の内部を撮影したスチール写真

### 4) ARDS の誘導にともなう炎症細胞浸潤のイメージング解析

GFP トランスジェニックマウスから CD4T 細胞や好中球を精製分離し、同系の C57BL/6 マウスに移入した後、LPS を経鼻投与して ARDS を誘導した。経時的に肺を取り出し、肺に集積してくる GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、LPS 投与 12 時間後から肺への細胞集積が観察され、CD4T 細胞、好中球とも 24 時間でピークに達し、ARDS の誘導にともなう免疫細胞の集積過程が明らかとなった。さらに抗 CD69 抗体を用いて急性細胞浸潤に対する効果を調べたところ、抗 CD69 抗体投与により肺への好中球の集積が抑制できることが明らかとなった (図 4)。

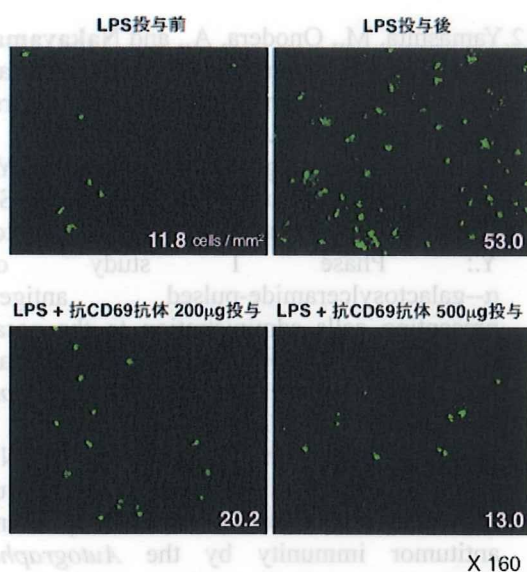


図4 ARDSの発症にともなう好中球浸潤に対する抗CD69抗体の抑制効果

#### D. 考案

アレルギー性喘息を起こした正常マウスでは、浸潤した炎症細胞上にCD69の発現がみられ、CD69ノックアウトマウスでは喘息が起きないことから、CD69分子が喘息の発症に重要な役割を果たしていると考えられた。また、抗CD69抗体の投与によっても喘息反応が抑制できたことから、CD69分子を標的にした新しい治療法の可能性が考えられた。さらに正常マウスからの細胞移入実験の結果から、特にT細胞上のCD69分子がアレルギー性喘息の発症に重要であると考えられた。一方、これまで抗原特異的Th2細胞が実際の肺の炎症の場でどのような機序で炎症誘導における重要な機能を果たしているのかに関してはほとんど明らかになっていなかったが、イメージング解析によりTh2細胞がfocusを形成して炎症巣の形成を制御していることが明らかとなった。

また、イメージング解析によりARDSの

発症にともなう好中球などの免疫炎症細胞の浸潤過程が明らかになった。さらに抗CD69抗体の投与により、その細胞浸潤が抑制できることが明らかとなった。従ってこれまで有効な治療法がないARDSに対して、CD69分子を標的にしたまったく新しい治療法の開発が可能になるかもしれない。

#### E. 結論

CD69ノックアウトマウスではアレルギー性喘息が起きないことを見出した。特にイメージング解析の結果からT細胞上のCD69分子がアレルギー性喘息の発症に重要であると考えられた。また抗CD69抗体投与により、肺のアレルギー性炎症を抑制する治療効果が有ることが分かった。さらにARDSの発症にともなう肺への免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析により、抗CD69抗体投与により急性免疫細胞浸潤を抑制できることが分かった。今後、免疫炎症細胞浸潤を抑制する至適条件の検討を行い、抗体治療の可能性を追求することが望まれる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagao, T., Matsumura, M., Mabuchi, A., Ishida-Okawara, A., Koshio, O., Nakayama, T., Minamitani, H., and Suzuki, K.: Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:77-87, 2007.
2. Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C. R., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and Nakayama, T.: Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells. *Mol. Immunol.* 44:2249-2256, 2007.
3. Iwamura, C., and Nakayama, T.: Role of  $\alpha$ -galactosylceramide - activated V $\alpha$ 4 natural killer T cells in the regulation of allergic

- diseases. *Allergology International* 56:1-6, 2007.
4. Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Hatta, M., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Iwakura, Y., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K.: Role of interferon- $\gamma$  in V $\alpha$ -14<sup>+</sup> natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes and Infection* 9:364-374, 2007.
  5. Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Miki, T., Hasegawa, A., Sugaya, K., Yamashita, M., Ishii, S., and **Nakayama, T.**: Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers *in vivo*. *J. Immunol.* 178:4926-4936, 2007.
  6. Iwamura, C., Kimura, Y. M., Shinoda, K., Endo, Y., Hasegawa, A., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Int. Immunol.* 19:755-762, 2007.
  7. Usui, T., Yamagami, S., Kishimoto, S., Seich, Y., **Nakayama, T.**, and Amano, S.: Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:3545-3550, 2007.
  8. Masuda, K., Kakugawa, K., **Nakayama, T.**, Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H.: T cell lineage determination precedes the initiation of *TCR $\beta$*  gene rearrangement. *J. Immunol.* 179:3699-3706, 2007.
  9. Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., Yonekura, S., and **Nakayama, T.**: Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. *Allergy* 62:1451-1455, 2007.
  10. Morita, M., Fujino, M., Li, X-K., Kimura, H., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Sugioka, A.: Spontaneous tolerance involving natural killer T cells after hepatic grafting in mice. *Transpl. Immunol.* 18:142-145, 2007.
  11. Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Kitajima, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Schnurri-2 controls the generation of memory Th1 and Th2 cells. *13th International congress of Immunology* pp.475-479, 2007.
  12. Yamashita, M., Onodera, A., and **Nakayama, T.**: Immune mechanisms of allergic airway diseases: Regulation by transcription factors. *Crit. Rev. Immunol.* 27:539-546, 2007.
  13. Uchida, T., Horiguchi, S., Tanaka, Y., Yamamoto, H., Kunii, N., Motohashi, S., Taniguchi, M., **Nakayama, T.**, and Okamoto, Y.: Phase I study of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 57:337-345, 2008.
  14. Kitajima, M., Abe, T., Miyano, K. N., Taniguchi, M., **Nakayama, T.**, and Takaku, H.: Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*. *Mol. Ther.* 16:261-268, 2008.
  15. Motohashi, S., and **Nakayama, T.**: Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci.* 99:638-645, 2008)
  16. Yamashita, M., Kuwahara, M., Suzuki, A., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Iwama, A., and Nakayama, T.: Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the *Noxa* gene. *J. Exp. Med.* 205:1109-1120, 2008.
  17. Hoshino, A., Nagao, T., Nagi, M. N., Ohno, N., Yasuhara, M., Yamamoto, K., Nakayama, T., and Suzuki, K.: MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils *in vitro* via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmun.* 31:79-89, 2008.
  18. Ito, H., Ando, K., Ishikawa, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, K., Imawari, M., Moriwaki, H., Yokochi, T., Kakumu, S., and Seishima, M.: Role of V $\alpha$ -14<sup>+</sup> NKT cells in the development of hepatitis B virus specific CTL: Activation of V $\alpha$ -14<sup>+</sup> NKT cells promotes the breakage of CTL tolerance. *Int. Immunol.* 20:869-879, 2008.
  19. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Initiation and maintenance of Th2 cell identity. Truncated title: Regulation of Th2 responses. *Curr. Opin. Immunol.* 20:265-271, 2008.
  20. Ito, T., Hasegawa, A., Hosokawa, H., Yamashita, M., Motohashi, S., Naka, T., Okamoto, Y., Fujita, Y., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I., and Nakayama, T.: Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from

- Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. *Int. Immunol.* 20:849-860, 2008.
21. Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, J. M., Iwamoto, I., and Nakajima, H.: Development and characterization of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 205:1369-1379, 2008.
  22. Hirahara, K., Yamashita, M., Iwamura, C., Shinoda, K., Hasegawa, A., Yoshizawa, H., Koseki, H., Gejyo, F., and Nakayama, T.: Repressor of GATA regulates T<sub>H</sub>2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122:512-520 e11, 2008.
  23. Hossain, M. B., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Watarai, H., Taniguchi, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Lymphoid enhancer factor interacts with GATA-3 and controls its function in T helper type 2 cells. *Immunology* 125:377-386, 2008.
  24. Kawamura, T., Murakami, K., Bujo, H., Unoki, H., Jiang, M., Nakayama, T., and Saito, Y.: Matrix metalloproteinase-3 enhances the free fatty acids-induced VEGF expression in adipocytes through toll-like receptor 2. *Exp. Biol. Med.* 233:1213-1221, 2008.
  25. Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., and Nakayama, T.: Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 283:28216-28225, 2008.
  26. Terashima, A., Watarai, H., Inoue, S., Sekine, E., Nakagawa, R., Hase, K., Iwamura, C., Nakajima, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* 205:2727-2733, 2008.
  27. Motohashi, S., and Nakayama, T.: Natural killer T cell-mediated immunotherapy for malignant diseases. *Frontiers in Bioscience* i S1:108-116 (2009).
  28. Motohashi, S., and Nakayama, T.: Invariant natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Immunotherapy* 1:73-82 (2009).
  29. Motohashi, S., Nagato, K., Kunii, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., Taniguchi, M., Fujisawa, T., and Nakayama, T.: A phase I-II study of  $\alpha$ -Galactosylceramide(KRN7000)-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182:2492-2501 (2009).
  30. Kunii, N., Horiguchi, S., Motohashi, S., Yamamoto, H., Ueno, N., Yamamoto, S., Sakurai, D., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y.: Combination therapy of *in vitro* expanded natural killer T cells and  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* 100:1092-1098 (2009).
  31. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83, 2009.
  32. Nakayama, T., and Kimura, Y. M.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled by schnurri-2. *Memory T-Cells*, edited by Maurizio Zanetti., 2009.
  33. Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zfp35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183:5388-5396, 2009.
  34. Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W. F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., and Satake, M.: The Runx3 transcription factor augments T<sub>H</sub>1 and down-modulates T<sub>H</sub>2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol.* 183:7817-7824, 2009.
  35. Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215, 2009.
  36. Iwata, A., Watanabe, N., Oya, Y., Owada, T., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kanari, H., Kawashima, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwamoto, I., and Nakajima, H.: Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis. *J. Immunol.* 184:127-133, 2010.

37. Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffman, R. M., Shirai, M., and Nakayama, T.: Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J Allergy Clin. Immunol.* 125:461-468, 2010
38. Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., and Nakayama, T.: Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergology International* in press.
2. 学会発表
1. Hashimoto, K., Suzuki, T., Sakai, R., Miyazawa, Y., Saito, R., Yamamoto, H., Nakayama, T., Miyano-Kurosaki, N., and Takaku, H.: Innate immunity activation in mouse dendritic cells infected by Baculovirus. Immunology. (Miami beach, FL, USA), May 18-22, 2007.
  2. Motohashi, S., Kunii, N., Yamamoto, H., Okita, K., Nagato, K., Fujisawa, T., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: A phase I/II study of  $\alpha$ -GalCer-pulsed dendritic cells in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. (Yokohama Japan), October 3-5, 2007.
  3. Motohashi, S., Kunii, N., Yamamoto, H., Okita, K., Nagato, K., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: 原発性肺癌に対する NKT 細胞免疫療法/A Phase I/II study of  $\alpha$ -GalCer-pulsed dendritic cells lung cancer. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  4. 岩村千秋、鈴木茜、篠田健太、太刀川彩保子、中山俊憲 転写因子 Schnurri-2 によるアレルギー-気道炎症制御/Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  5. 斉藤諒、酒井亮、宮武克年、山本紘士、宮澤悠樹、高久洋、板倉光夫、中山俊憲、橋本香保子 脾臓 B 細胞の分化にともなう分泌小胞輸送複合分子の解析/The submit of exocyst complex molecule; Sec8 expression in activated B cell. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  6. Tomizawa, K., Nagao, T., Saiga, K., Oshima, M., Kobayashi, K., Nakayama, T., Suzuki, K.: MPO-ANCA 関連腎炎自然発症 SCG/Kj マウスにおける 15-Deoxyspergualin による MPO-ANCA およびリスクエピトープ治療成績 /Decrease of MPO-ANCA involving risk epitopes by treatment with 15-Deoxyspergualin in spontaneous MPO-ANCA-related vasculitis model SCG/Kj mouse. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  7. Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., and Nakayama, T.:慢性副鼻腔炎の病態形成に及ぼす喘息合併の意義-NKT 細胞とサイトカイン産生の検討から-/Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  8. 青柳哲史、内山美寧、國島広之、八田益充、仲村究、位田剣、宮里明子、伊藤俊広、中山俊憲、賀来満夫、川上和義 23 価肺炎球菌ワクチン接種症例における自然免疫リンパ球の動態に関する検討 /Analysis of innate immune lymphocytes in patients with injection of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  9. Kakugawa, K., Masuda, K., Nakayama, T., and Kawamoto, H.: T cell differentiation occurs before cell cycle arrest for TCRb gene rearrangement. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  10. 鈴木茜、木村元子、岩村千秋、Hossain, M. B., 北島雅之、遠藤裕介、堀内周、山下政克、中山俊憲 Schnurri-2 によるメモリー Th1/Th2 細胞形成調節/Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers *in vivo*. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  11. Yamashita, M., Kuwahara, M., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., and Nakayama, T.: Bmi1 は Noxa 遺伝子の発現抑制を介してメモリー Th 細胞の生存を維持する/Bmi1 regulates memory Th cell survival via repression of the

- Noxa gene. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
12. Hoshino, A., Nagao, T., Miura, N., Ohno, N., Nakayama, T., and Suzuki, K.: MPO-ANCA induces IL-17A production by activated neutrophils of murine systemic vasculitis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 品川, 11月20-22日, 2007.
  13. Hosokawa, H., Yamashita, M., Koseki, H., van Lohuizen, M., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell development by Polycomb group gene *bmi-1* through the stabilization of GATA3. Chromatin Structure & Function, (Antigua), Nov. 27-30, 2007.
  14. 山下政克, 桑原誠, 新中須亮, 細川裕之, 中山俊憲 *Bmi1* は Noxa 遺伝子の発現調節を介してメモリー-CD4 T 細胞の生存を制御する 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学学会大会 合同大会 BMB2007. 横浜, 12月11-15, 2007.
  15. Nakayama, T.: Initiation and maintenance of Th2 cell identity: Regulation by Polycomb and Trithorax group molecules. National Jewish Medical and Research Center, University of Colorado at Denver and Health Sciences Center. (Denver, USA), February 22, 2008.
  16. Iwamura, C., Onodera, A. and Nakayama, T.: *Schnurri-2* regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Keystone Symposia. (Colorado, USA), February 24-29, 2008.
  17. Nakayama, T.: Initiation and maintenance of Th2 cell identity: Regulation by Polycomb and Trithorax group molecules. Karp Family Research Laboratories, One Blackfan Circle, 10<sup>th</sup> Floor Conference Room. (Boston, USA), March 3, 2008.
  18. Nakayama, T.: Initiation and maintenance of Th2 cell identity: Regulation by Polycomb and Trithorax group molecules. Allergy Symposium Program La Jolla Institute for Allergy and Immunology (LIAI). (USA), April 4, 2008.
  19. Nakayama, T.: *Bmi1* regulates memory Th2 cell survival via repression of the Noxa gene. Experimental Biology 2008, San Diego Convention Center. (San Diego, USA), April 5-9, 2008.
  20. 中山俊憲 NKT細胞免疫系を利用した癌の免疫細胞治療 特別講演 第4回北海道癌免疫制御研究会. 札幌, 6月7日, 2008.
  21. Nakayama, T.: Regulation of memory Th2 cell survival and function by the Polycomb group and Trithorax group gene products. Immunochimistry & Immunobiology, Magdalen College. (Oxford, UK), August 17-22, 2008.
  22. 中山俊憲 免疫システム、その統御による免疫治療の開発研究 招待講演 第84回千葉医学会学術大会, 千葉, 9月5日, 2008.
  23. 中山俊憲 メモリー-Th1/Th2細胞の形成と維持機構 第44回日本移植学会総会, 大阪, 9月19-21日, 2008.
  24. 中山俊憲, 本橋新一郎 A Phase I/II study of  $\alpha$ -GalCer-pulsed dendritic cells in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer. 日本臨床免疫学会総会シンポジウム, 新宿, 10月17-18日, 2008.
  25. Nakayama, T.: Initiation and maintenance of Th2 cell identity: Regulation by Polycomb and Trithorax group molecules. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12月1日~3日, 2008.
  26. 楠怜奈, 長尾朋和, 富澤一夫, 雑賀寛, 城兼輔, 中山俊憲, 鈴木和男 SCG/Kj mice に対する 15-deoxyspergualin 治療による CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>細胞の減少 第14回MPO研究会, 東京, 10月24-25日, 2008.
  27. 富澤一夫, 長尾朋和, 雑賀寛, 大島正道, 小林和夫, 中山俊憲, 田之倉優, 鈴木和男 SCG/Kj マウスにおける MPO-ANCA リスクエピトープと CD24<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> の発現について 第14回MPO研究会, 東京, 10月24-25日, 2008.
  28. 長尾朋和, 松村実美子, 荒谷康昭, 中山俊憲, 南谷晴之, 鈴木和男 MPO-ANCA による糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現 第14回MPO研究会, 東京, 10月24-25日, 2008.
  29. 常賀, 長尾朋和, 中山俊憲, 鈴木和男 In Vitro における IVIg 治療の作用機序解析 第14回MPO研究会, 東京, 10月24-25日, 2008.
  30. 郷軍, 長尾朋和, 前原康宏, 土橋英紀, 志賀由佳, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男 ARDS 病態モデルの肺組織障害に連動するサイトカインストーム開始時の TNF- $\alpha$  の役割 第14回MPO研究会, 東京, 10月

- 24-25 日, 2008.
31. Nakayama, T.: Combination therapy of *In vitro* expanded natural killer T cells and  $\alpha$ -GalactosylCeramide pulsed APCs in patients with recurrent head and neck carcinoma. The Second International Cell Therapy Conference Present and Future of Cell Therapy, (Seoul, Korea), November 20, 2008.
  32. 常賀、長尾朋和、鄒軍、中山俊憲、鈴木和男 *In vitro* におけるIVIg 治療の作用機序解析と判定法の確立/Modulation of endothelial cell function by intravenous immunoglobulin *in vitro*. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  33. Terashima, A., Inoue, S., Nakagawa, R., Sekine, E., Iwamura, C., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Watarai, H.: 喘息発症に關与する IL-17RB 陽性 NKT 細胞のサブセット/A novel subset of mouse iNKT cell bearing IL-17 receptor B responsible for the development of asthma. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  34. Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of Th2-derived allergic airway inflammation. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  35. Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Kitajima, M., and Nakayama, T.: Gfi1 は GATA3 蛋白質の安定化を介して Th2 細胞分化を制御する/Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  36. 細川裕之、Hossain, M. B., 堀内周、佐々木哲也、花澤麻美、山下政克、中山俊憲 Lymphoid enhancer factor 1 (LEF1) は GATA3 に会合しその機能を調節する/Lymphoid enhancer factor interacts with GATA3 and controls its function in T helper type 2 cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  37. Suzuki, A., Iwamura, C., Endo, Y., Yamashita, M., and Nakayama, T.: *Polycomb* group protein Ring1B regulates Th2-dependent airway inflammation through the control of Th2 cell differentiation and apoptosis. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  38. Ito, T., Hirasaki, Y., Hasegawa, A., Hosokawa, H., Motohashi, S., Yamashita, M., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I., and Nakayama, T.: BCG Tokyo-172 から分離精製した LAM/LM 分子による Human Th1 分化誘導機構/ Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  39. 鄒軍、前原康宏、長尾朋和、戸高玲子、大島正道、小林和夫、志賀由佳、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 ARDS 病態モデルの肺組織変化に連動するサイトカインストームの意義/The pathological findings of Lung involved in cytokine storm from an animal model of ARDS. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  40. Yamashita, M., Kuwahara, M., Onodera, A., Hosokawa, H., and Nakayama, T.: Bmi1 は Noxa 遺伝子の発現抑制を介してメモリー Th 細胞の生存を制御する/Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  41. Hasegawa, A., Shirai, M., and Nakayama, T.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of colitis induced by dextran sulphate sodium. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.
  42. Nakayama, T. Regulation of memory Th1/Th2 cell survival and function by the Polycomb group and Trithorax group gene products. 徳島大学ストレス栄養科学教育研究センター 第 2 回国際シンポジウム, 徳島, 1 月 22 日-23 日, 2009.
  43. Nakayama, T., and Yamashita, M. Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. Keystone Symposia 2009, (Colorado, USA), February 8-13, 2009.
  44. Nakayama, T. iNKT cell based immunotherapy for cancer. The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells (Kamakura), March 23-27, 2009.
  45. 中山俊憲 免疫システム、その統御による免疫治療の開発研究 特別講演 第 9 回

- Cardiovascular Frontier Conference (CFC), 東京, 4月4日, 2009.
46. Nakayama, T., Hirahara, K., and Yamashita, M. ROG, repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 96th Annual Meeting the American Association of Immunologists Immunology 2009 (Seattle, USA), May 8-12, 2009.
  47. Tokoyoda, K., Nakayama, T., and Radbruch, A. Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes reside and rest in the bone marrow. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009, (Japan), June 1-4, Kyoto, 2009.
  48. Nakayama, T., Yamashita, M., Hosokawa, H., and Iwamura, C. Regulation of memory Th cell survival and function by the polycomb and trithorax group gene products. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009, (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009.
  49. 中山俊憲 CD4 陽性 T 細胞の機能分化：機能獲得と維持のメカニズム 特別講演 第 21 回日本比較免疫学会学術集会, 藤沢, 8月3-5日, 2009.
  50. 櫻本昌輝、山本紘士、斎藤諒、澤田景子、板倉光夫、中山俊憲、橋本香保子 抗原提示細胞にみられる分泌小胞輸送分子 Sec8 と抗原ペプチドの動態 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9月3-5日, 2009.
  51. 松長修、田口純、岡田美鈴、櫻本昌輝、中山俊憲、橋本香保子 B 細胞のプラズマ細胞化とその分化マーカー分子のイメージング解析 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9月3-5日, 2009.
  52. 長谷川明洋、中山俊憲、白井睦訓 喘息肺への T リンパ球細胞浸潤のイメージング 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9月3-5日, 2009.
  53. Nakayama, T., and Yamashita, M. Bmi1 regulates memory Th2 cell survival via repression of the noxa gene. European Journal of Immunology 2009 (Berlin, Germany), September 13-16, 2009.
  54. 植草康浩、稲嶺絢子、堀口茂俊、本橋新一郎、中山俊憲、岡本美考 アレルギー性鼻炎モデルマウスに対する GalCer-pulsed DC 細胞療法 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 10月29-31日, 2009.
  55. 稲嶺絢子、大川翼、堀口茂俊、米倉修二、植草康浩、中山俊憲、岡本美考 Lactobacillus paracasei KW3110 刺激により活性化された樹状細胞はアレルギー性鼻炎炎症を抑制する 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 10月29-31日, 2009.
  56. 中山俊憲 アレルギー疾患の合併をどのように考えるか? 基礎研究からの考察 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム, 秋田, 10月29-31日, 2009.
  57. 中山俊憲 ヒト免疫疾患におけるメモリー-T 細胞の役割: 新展開 第 37 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム, 東京, 11月13-15日, 2009.
  58. Yamashita, M., Kuwahara, M., and Nakayama, T. Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪, 12月2-4日, 2009.
  59. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Radbruch, A., and Nakayama, T. Professional memory CD4 T lymphocytes reside and rest in bone marrow. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪 12月2-4日, 2009.
  60. Motohashi, S., Okita, K., Yamasaki, K., Nagato, K., Hijikata, A., Kitamura, H., Fujii, S., Taniguchi, M., Ohara, O., and Nakayama, T. NKT 細胞療法によるインターフェロン産生増強および生存期間延長に相関するバイオマーカーの検討/A set of genes whose expression is associated with the IFN-response/survival undergoing NKT cell-based immunotherapy. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪 12月2-4日, 2009.
  61. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Fukasawa, T., Radbruch, A., and Nakayama, T. 記憶ヘルパー-T リンパ球は骨髄に定着している /Professional memory CD4 T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
  62. Kuwahara, M., Yamashita, M., Tofukuji, S., Shinoda, K., Onodera, A., Suzuki, J., Iwamura, C., and Nakayama, T. Sox4 は GATA3 によって誘導される Th2 細胞分化および Th2 型炎症反応を制御する /Sox4 regulates GATA3-induced Th2 cell differentiation and



- Th2-dependent inflammatory responses.  
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
63. 田口純、櫻本昌輝、松長修、常世田好司、岡田美鈴、中山俊憲、板倉光夫、橋本香保子 分泌小胞輸送複合体 exocyst complex のサブユニットである Sec8 分子の脾臓 B 細胞の分化過程における機能解析/The involvement of Sec8 molecule, a subunit of exocyst complex which supports vesicle trafficking, for activation process of B cell. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
64. Sawada, K., Taguchi, J., Ito, T., Nakayama, T., and Hashimoto, K. 樹状細胞に発現する CD69 分子の IL-17 産生細胞誘導への関与/The function of CD69 molecules on dendritic cells to induce IL-17 producing cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
65. Hasegawa, A., Nakayama, T., and Shirai, M. 腸炎の発症における CD69 分子の役割 /Crucial role for CD69 in the pathogenesis of experimental colitis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
66. 岩村千秋、北島雅之、篠田健太、渡邊友紀子、平崎能郎、遠藤裕介、鈴木茜、中山俊憲 Zfp35 欠損マウスにおける Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症反応の亢進/Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
67. 櫻本昌輝、澤田景子、田口純、石川裕美子、山本俊一、板倉光夫、中山俊憲、橋本香保子 マクロファージ細胞株にみられる分泌輸送分子 Sec8 の貧食システムへの関与 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.
68. 山下政克、桑原誠、東福寺聡一、中山俊憲 Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.
- 含む)
1. 特許取得
- 1) 出願中  
出願番号：特願 2005-210606 号  
発明の名称：アレルギー性喘息の治療薬  
発明者：中山俊憲、長谷川明洋
- 2) 出願中  
出願番号：PCT/US2008/078506 (米国)  
発明の名称：Imageable rodent model of asthma  
発明者：Akihiro Hasegawa, Toshinori Nakayama, Meng Yang
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を

## インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗因子とその発現誘導の解析

研究分担者 大島正道 国立感染症研究所 室長

研究要旨：外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。気管支系の細胞株 NCI-H292 はこの戦いに勝ちインフルエンザウイルスを排除できるが肺胞系の細胞株 A549 は排除できず死滅する。ジーンチップによる解析の結果インフルエンザウイルス感受性の A549 細胞ではウイルス感染誘導遺伝子(VSG)の発現は抵抗性の NCI-H292 細胞に比べて抑制されている。細胞のウイルス抵抗性因子の誘導発現の相違が一次防御における結果の相違をもたらしていることが示唆される。VSG の誘導発現の系を作製してこのメカニズムを解析する。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルスは人に呼吸器系感染を起こす。生体の防御機構として IFN 系ならびに TLR 系の自然免疫機構が備わりインフルエンザウイルスを始め種々の感染に抵抗している。従って病原体が最初に接するこの気管支細胞および肺胞上皮細胞は一次防御の点で重要な位置を占めている。しかしながら呼吸器系の細胞でも気管支系の細胞と肺胞系の細胞ではウイルスに対する感受性が大きく異なっている。細胞のウイルス感染抵抗性因子をさらに解析し H5N1 インフルエンザウイルスがサイトカインストームを通して ARDS を起こすメカニズムを解明し治療法の開発につなげる。

### B. 研究方法

・ これまでに A549 と NCI-H292 でウイルス感染誘導遺伝子の発現に数倍の差異が見ら

れている遺伝子(VSG)が多数認められている。これらウイルス抵抗性遺伝子は多くの場合細胞に対して傷害的で構成的に発現させることが困難である。従って誘導的にその遺伝子を発現させる系を作製した。昆虫細胞由来の誘導的転写システム (RhoSwitch(NEB)) をレトロウイルスベクターに組み込みアンホトロピックレトロウイルスのパッケージング細胞株 (293T 細胞に pgagpol<sup>bs</sup> と pAE<sup>puro</sup> をコトランスフェクションしてマウス白血病ウイルスの gag-pol とアンホトロピックウイルスのエンベロープを発現するパッケージング細胞 293-A を作製した。) に導入する。そこにインフルエンザウイルスをチャレンジして細胞の抵抗性の変化を GeneChip で解析する。

<レトロウイルスベクターの作製> pMo-2 LTR のマルチプルクローニングサイトに Rh

eoSwitch Mammalian Inducible Expression System (NEB) (参考1) のレセプターアクチベータープラスミドpNEBR-R1のSnaBI(655)-BsiWI(8109)フラグメントをサブクローンしレトロウイルスベクターpd2LTR-R1を作製した。同様にpNEBR-X1のPciI(3161)-BspHI(942)フラグメントとpEGFPまたはpPURをpMo-2LTRにサブクローンしてpd2LTRCMGFP-X1およびpd2LTRCMpuro-X1を作製した。さらにインターフェロン誘導遺伝子(VSG)をX1にサブクローンしてレトロウイルスベクターpd2LTRCMGFP(VSG)およびpd2LTRCMpuro(VSG)を作製した。同様にp2LTR-R1に直接VSGを組み込んだベクターd2LTR-R1-VSGも作製する。

＜シュードタイプウイルスの作製＞293T-Aにpd2LTR-R1、pd2LTRCMGFP(VSG)またはpd2LTRCMpuro(VSG)あるいはd2LTR-R1-VSGをトランスフェクションしてそれぞれシュードタイプウイルスを回収する。

＜シュードタイプウイルスの感染＞作製したシュードタイプウイルスをヒト由来細胞株(A549, NCI-H292, huh7-it)に導入する。

＜誘導遺伝子導入細胞での発現誘導＞

二つのベクター(pd2LTR-R1、pd2LTRCMGFP(VSG)またはpd2LTRCMpuro(VSG))あるいはp2LTR-R1に直接VSGを組み込んだベクターを作製する。薬剤RSL1による誘導でルシフェラーゼ活性の制御が実現できクローンを選択する。28クローン中7クローン選択できた例を示す。(図1)

＜ウイルスのチャレンジ＞シュードタイプ

ウイルスで遺伝子導入した細胞株にウイルス(インフルエンザウイルスPR8株、Udorn/72株、H5N1(ベトナム株、インドネシア株))をチャレンジし上清に回収されるウイルスをplaque assayしてウイルス抵抗性の有無を確認する。

### C. 研究結果

シュードタイプウイルスによる感染及びトランスフェクションによりRheoSwitch System R1のActivatorおよびReceptorをA549, NCI-H292, huh7-it及びMDCK細胞に遺伝子導入しbrastidine(bsr), puromycine(pur)を選択マーカーとして薬剤選択しNCI-H292-AR細胞及びMDCK-AR細胞を作成した。

MDCK-AR細胞にVSGとしてMxA, PKR, IFI44, UBE2L6, NT5C3, G1P2を遺伝子導入しRheoSwitch Systemによる誘導発現細胞(MDCK-AR-MxA, MDCK-AR-PKR, MDCK-AR-IFI44, MDCK-AR-UBE2L6, MDCK-AR-NT5C3, MDCK-AR-G1P2)を作製した。Realtime PCRにより目的とした遺伝子が誘導されることを確認した。(図2)

耐性遺伝子を組み込んだ遺伝子導入MDCK-AR-VSG細胞に耐性遺伝子誘導あるいは非誘導の条件でインフルエンザウイルスUdorn株をチャレンジした。ウイルス感染後時間を追って培養上清中に放出されるウイルス感染価をplaque assayにより測定した。(RSL1による誘導は細胞毒性が無視でき、遺伝子誘導が認められる濃度で行った。)耐性遺伝子の誘導、非誘導によるウイルス産生量の相違、あるいはウイルス産生の遅れは認めなかった。

認めなかった。

#### D. 考案

MDCK、A549,NCI-H292細胞は共にインフルエンザウイルス許容細胞である。しかし今回対象としたMDCK細胞はベースとなるウイルス産生レベルが最も高いため個々の耐性遺伝子の影響が十分に大きくない場合明らかになってこない可能性がもっとも考えられる。今後単独ではなく複数の抵抗性遺伝子を同時に誘導発現させ抵抗性を検討する必要があると思われる。また直接A549細胞に抵抗性遺伝子を導入し検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

- ①宿主抵抗性遺伝子を誘導発現できる培養細胞を作成した。
- ②インフルエンザ高感受性のMDCK細胞はウイルス抵抗性遺伝子(VSG)候補として上がった遺伝子(MxA,PKR,IFI44,G1P2, UBE2L6,NT5C3,TNFSF10)単独ではウイルス産生に影響をあたえなかった。

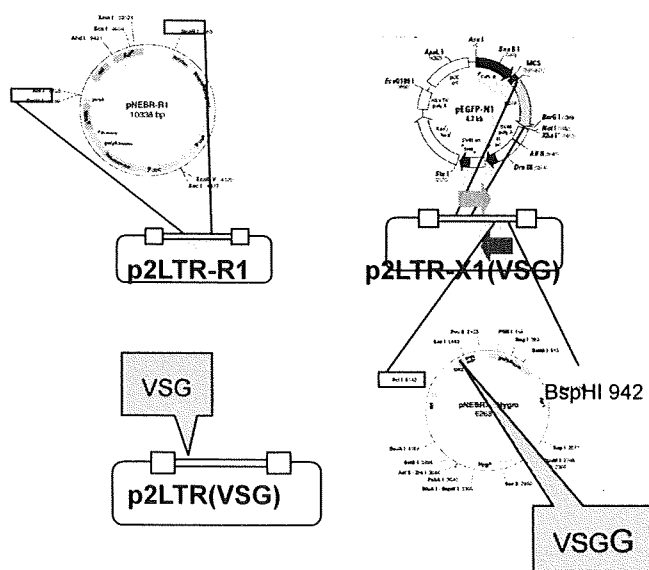
#### G. 発表

1. 論文発表
  - 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 J Urban Health, 2008Jul ;85(4):619-35
2. 学会発表
  - 1) 肝炎ウイルス感染に対する宿主細胞応答の解析 第55回ウイルス学会2007年10月

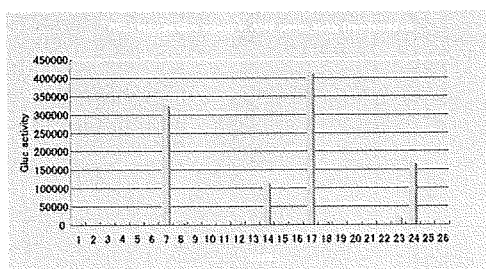
#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
該当しない
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

「参考1. レトロウイルスベクター」



「図1」



「図2」

RealTime PCR  
(copy number: ratio against actin mRNA)

