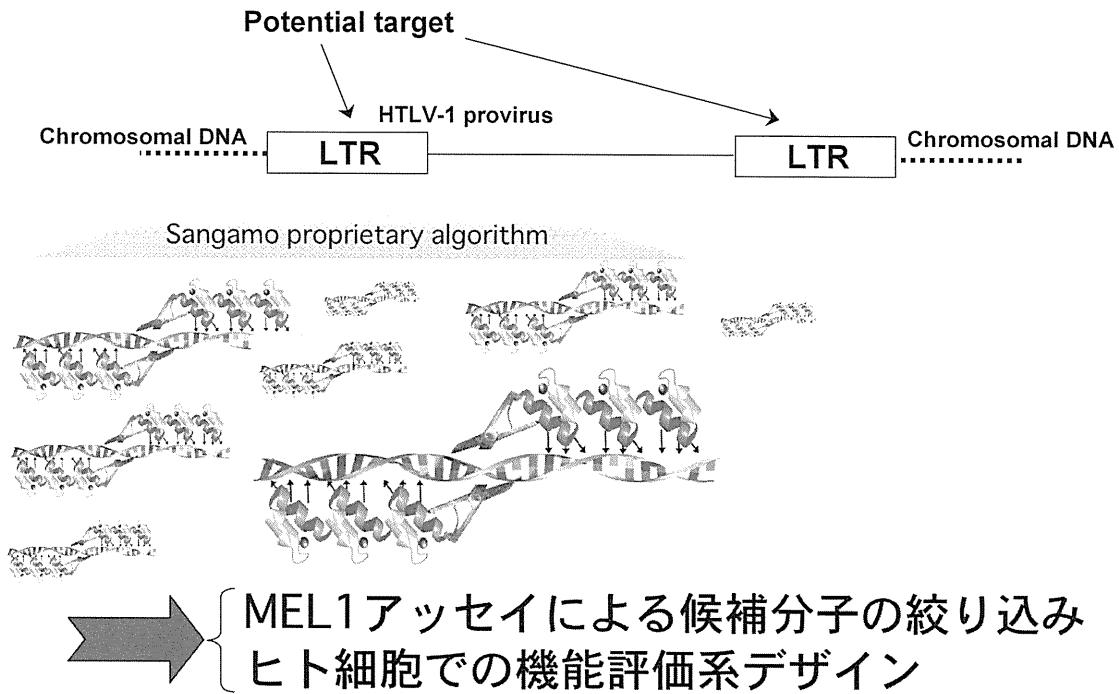


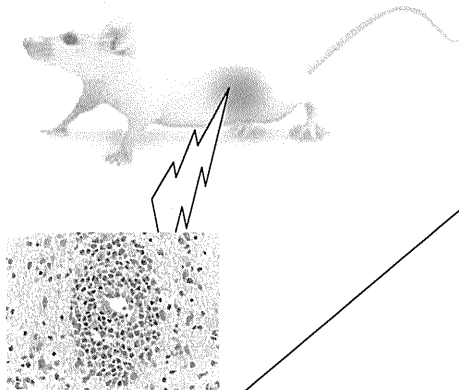
Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

HTLV-1プロウイルスを不可逆的に機能破壊する治療分子として多種のZFN候補デザインとその選抜



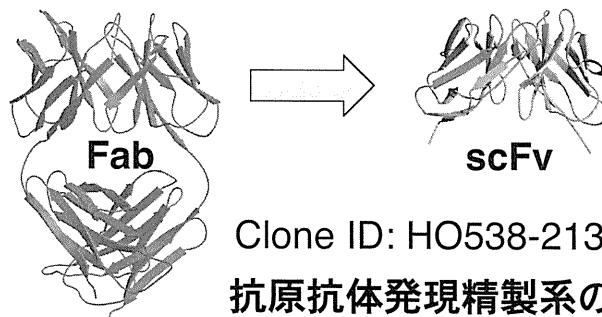
治療分子の生体内治療効果評価系の開発

蛍光を利用した生体内HTLV-1
増腫瘍性モニター系を開発



治療分子送達法の開発

抗体工学による健常人由来
CD4反応性抗体のscFv化に成功



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1995年4月—1999年3月 北海道大学医学部大学院医学研究科 博士課程
 1999年4月—2002年3月 Wisconsin 大学 Madison 校 博士研究員
 2002年4月—2005年3月 国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員
 2005年4月—現在 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究員
 2007年4月—現在 京都大学ウイルス研究所 客員講師(併任)
 2010年6月—現在 奥羽大学 非常勤講師(併任)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

国立成育医療研究センター 藤原 成悦 部長
 京都大学 ウイルス研究所 小柳 義夫 教授
 千葉大学大学院薬学研究院 星野 忠次 准教授

National Cancer Institute, National Institute of Health Dr. Yves Pommier
 Dr. Eric Freed、
 Dr. Peter Kwong

東京医科歯科大学 玉村 啓和 教授
 清水 則夫 准教授

北里大学 生命科学研究所 森川 裕子 教授
 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 竹腰 正隆 講師
 東京農工大学構造生化学研究室 高橋 信弘 教授
 大阪大学免疫フロンティア研究所 斎藤 達哉 准教授
 東京都立駒込病院病理部 比島 恒和 医師
 国立感染症研究所 村上 努 室長

深澤 秀輔 室長
 森 一泰 主任研究官

MBL 社 久原 基樹グループリーダー

タカラ社 蝶野 英人 研究員

コロラド大学化学生物科学部 Hubert Yin 博士

北海道大学 遺伝子疾患研究所 吉山 裕規 准教授

・主な研究課題

独立した研究チームを率いて以下の研究を推進した。

- (1) 細胞とヒト免疫不全ウイルスの分子相互作用に関する研究
 - HIV-1 の遺伝子産物の構造-機能相関に関する研究
 - HIV-1複製を制御する宿主因子に関する研究
- (2) 細胞の悪性化とがんの生物学に関する研究
 - EBV関連B細胞性リンパ腫(エイズリンパ腫)に関する研究

HTVL-1関連T細胞性リンパ腫(ATL)に関する研究

癌転移を促進するCXCR4の機能制御に関する研究

(3) ウイルス工学に基づく核酸・タンパク質の新規デリバリー法の開発

レンチウイルスベクターの改善に関する研究

安全性の高い新規細胞質内タンパク質送達法LENAの開発とその応用に関する研究

(4) 難治疾患の治療法開発に関する研究

HIV-1感染症治療薬の開発：逆転写酵素内在性RNase H阻害薬

インテグラーゼ阻害薬

Gag重合阻害薬

HIV-1 Protease依存性感染細胞除去遺伝子の開発

抗体医薬の開発：中和抗体によるタミフル耐性インフルエンザウイルス感染症治療法

抗CD4抗体によるHIV-1感染症治療

細胞内標的に対する抗体医薬による癌・感染症治療法の開発

新規治療分子種の開発：Tリンパ腫アポトーシス誘導能を有するCASP3変異体の開発

・ これまでの研究実績

研究業績

原著論文（欧文）ただし*は責任著者を示す。

1*: Takizawa M, et al. AIDS. 2011 In press.

2*: Watanabe T, et al. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 In press.

3: Imadome K, et al. PLOS Pathog. 2011 In press.

4*: Urano E, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2011. In press.

5*: Aoki T, et al. Gene Ther. 2011. In press.

6*: Miyauchi K, et al. Cancer Sci. 2011. In press.

7: Yanagita H, et al. Bioorg Med Chem. 2011; 19, 816-25.

8*: Aoki T, et al. Gene Ther. 2010 Sep;17(9):1124-33.

9: Suzuki S, et al. Bioorg Med Chem. 2010 Sep 15;18(18):6771-5.

10: Suzuki S, et al. J Med Chem. 2010 Jul 22;53(14):5356-60.

11*: Urano E, et al. Vaccine. 2010 May 26;28 Suppl 2:B68-74.

12*: Hamatake M, et al. Eur J Immunol. 2010 May;40(5):1504-9.

13*: Kariya Y, et al. Cancer Sci. 2010 Apr;101(4):876-81.

14: Hassan R, et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):458-68.

15: Murakami T, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jul;53(7):2940-8.

16*: Fuji H, et al. J Med Chem. 2009 Mar 12;52(5):1380-7.

17*: Hamatake M, et al. Cancer Sci. 2009 Jan;100(1):95-102.

18*: Urano E, et al. J Gen Virol. 2008 Dec;89(Pt 12):3144-9.

19*: Urano E, et al. FEBS Lett. 2008 Dec 10;582(29):4053-8.

- 20*: Urano E, et al. AIDS. 2008 May 31;22(9):1081-3.
 21: Yoshida T, et al. Traffic. 2008 Apr;9(4):540-58.
 22: Ryo A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 8;105(1):294-9.
 23: Kameoka M, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 3;359(3):729-34.
 24*: Shimizu S, et al. AIDS. 2007 Mar 12;21(5):575-82.
 25*: Futahashi Y, et al. Cancer Sci. 2007 Mar;98(3):373-9.
 26*: Miyauchi K, et al. Antivir Chem Chemother. 2006;17(4):167-74.
 27: Miyauchi K, et al. Jpn J Infect Dis. 2006 Apr;59(2):77-84.
 28: Miyauchi K, et al. J Virol. 2005 Apr;79(8):4720-9.
 29*: Komano J, et al. Mol Biol Cell. 2004 Dec;15(12):5197-207.
 30: Kennedy G, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):14269-74.
 31: Komano J, et al. J Virol. 2001 Feb;75(3):1561-4.
 32: Komano J, et al. J Virol. 1999 Dec;73(12):9827-31.
 33: Komano J, et al. J Virol. 1998 Nov;72(11):9150-6.

特許等 4件

- 1: Tetsuo Narumi, Wataru Nomura, Chie Hashimoto, Aki Ohya, Jun Komano, Kosuke Miyauchi, and Kazuhiro Tamamura. HIV外被蛋白質gp41のC34領域ペプチドの三量体の創製と阻害剤およびワクチンとしての開発 (出願2010年11月4日)
- 2: Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年11月19日 特願2009-263587) .
- 3: Masataka Takekoshi, Jun Komano, et al. Use of anti-CD4 antibody from a healthy individual as a therapeutic drug against HIV-1 infection (出願2009年1月28日 特願2009-017340) .
- 4: Jun Komano, Gregory Kennedy, Bill Sugden. Inventory of a method to develop EBNA-1 inhibitors (US Patent No. 6,811,983). Approved in Dec 10, 2004

著書 2件

総説 欧文3件、邦文13件

海外招待講演等 4件

国内招待講演等 12件

受賞数 1件

学会等座長 5件

研究費審査委員 4件

特記事項 International Retrovirology Association が発行する学術誌 AIDS Res and Human Retroviruses の Review board

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発に関する研究

課題番号： H23-新興-一般-029
 予定期間： H23 年度から H25 年度まで
 研究代表者： 長谷川秀樹
 所属研究機関： 国立感染症研究所
 所属部局： 感染病理部
 職名： 部長
 年次別研究費(交付決定額)：1 年目 31,190,000 円

I. 研究の意義

- (1) 国内に 100 万人を超える感染者がおり過去 20 年間でその数は僅かに減ったのみであり感染者を減らす為に感染予防ワクチンの開発を目的とする。
- (2) HTLV-1 感染症は、低頻度ながらも ATL 等重篤な疾患を引き起こす感染症である。本研究は、この HTLV-1 感染症の克服に向け、HTLV-1 感染の予防、感染者の発症予防あるいは ATL 発症者の治療に結びつくワクチンの開発を目指すものである。
- (3) HTLV-1 の感染によって引き起こされる成人 T 細胞性白血病の発症機構を解明しその機構に基づいた発症予防ワクチン構築を目指す。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 先進国で由一の HTLV-1 流行国である日本から HTLV-1 感染者を無くす目的で HTLV-1 感染予防ワクチンの開発を行う。
- (2) HTLV-1 感染増殖あるいは ATL 細胞増殖の抑制効果を有する細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応の標的抗原を同定し、その抗原特異的 CTL 反応誘導法を開発することを目的とする。感染予防、発症予防あるいは治療効果を有する CTL 誘導ワクチン開発に結びつくことが期待される。
- (3) 老化に伴い発症する ATL の発症メカニズムを解明し発症予防ワクチンの開発を目指す。

III. 1 年間の研究成果

- ・ 研究代表者 (長谷川秀樹)
- (1) HTLV-1 ワクチンの開発の為、ターゲット分子となりうるエンベロープ蛋白をコードする遺伝子をコドンオプティマイズし哺乳動物細胞を用いた発現系を作成した。
 - (2) HTLV-1 tax 遺伝子導入マウスにおけるマウス ATL 発症とその SCID マウスへの移植系を確立し野生マウスへの移植は拒絶される事を確認。
 - (3) モデル抗原を用いて経鼻でワクチン接種した際に母乳中に抗原特異的 IgA 抗体と IgG 抗体を誘

導することを確認、経母乳感染する HTLV-1 の感染防御ワクチンのワクチンルートとして粘膜投与の可能性が示唆された。

・研究分担者(俣野 哲朗)

- (1) 標的抗原同定のための各種抗原特異的 CTL 反応測定法の確立を進めた。また、HTLV-1 Tax 発現ワクチンベクター構築を進めた。

・研究分担者(梁明秀)

- (1) HTLV-1 のコードすべての遺伝子をヒトコドンでオプティマイズした人工 cDNA を合成し、コムギ無細胞を発現ベクターである pEU-E01-bls-MCS vector へサブクローニングを行った。
- (2) コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて上記の遺伝子についてビオチン化標識された全長タンパク質の合成を行った。現在のところ Rex, p27, Tac, p30, HBZ, Gag の 6 つの全長タンパク質の合成が確認できている。

・研究分担者(外丸詩野)

- (1) 発症予防ワクチンの有効性を検討するために用いる老化マウスモデルを用い、マウスモデルの免疫応答の基礎的データを集積した。
- (2) 老化マウスモデルでは、サイトカインの産生や CD8⁺ T 細胞機能の低下を認め、いわゆる免疫老化に類似した異常を呈している可能性が示された。

・研究分担者(田中正和)

- (1) NOG マウス骨髄内にヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植することで作成したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させ“HTLV-1 感染ヒト化マウス”を構築した。抗 HTLV-1 ワクチン開発におけるモデル動物として利用できることが示された。

IV. 平成 24~25 年度の課題

- (1) ラットを用いた母子感染モデルの確立を行う。
- (2) マウスにおいて、HTLV-1 Tax あるいは HBZ 特異的 CTL 反応を誘導し、Tax あるいは HBZ 発現細胞増殖抑制効果を検討する。さらに、ATL 細胞を標的とする CTL 反応の同定を試みる。一方、これらの抗原発現ベクターワクチンのサルでの抗原特異的 CTL 誘導能を検討する。
- (3) コムギ無細胞タンパク質合成系で作製した HTLV-1 全長タンパク質を抗原として活用し、患者血清中の微量抗 HTLV-1 抗体を検出するためのアッセイ系を構築する。
- (4) 野生型マウスで Tax 発現細胞の腫瘍増殖抑制が確認されている TaxDNA ワクチンおよび樹状細胞抗 Tax ワクチンの感染細胞増殖抑制効果および抗 Tax CTL 誘導能を HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いて検証する。
- (5) 老化マウスモデルにおけるプロテアソームサブユニットの発現変化と抗原ペプチドの変化を明らかにすることで、ワクチン抗原への影響を明らかにする。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 先進国で唯一の HTLV-1 流行国として HTLV-1 ワクチンの開発は国内だけでなく国際貢献の為に重要である。
- (2) 本研究により HTLV-1 感染症に対する有効な CTL 誘導法を開発することができれば、前臨床試験、臨床試験を経て、HTLV-1 感染症の予防あるいは治療に結びつくワクチンの臨床応用に結びつくことが期待され、HTLV-1 感染症の克服に大きく貢献できると考えられる。
- (3) 本年より妊婦健診での抗体検査が義務化された HTLV-1 のワクチンの開発は検査により陽性と判断された人への解決策を与えるだけでなく発症の不安を抱えて生活する HTLV-1 キャリアの不安の除去へ結びつく。

:

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

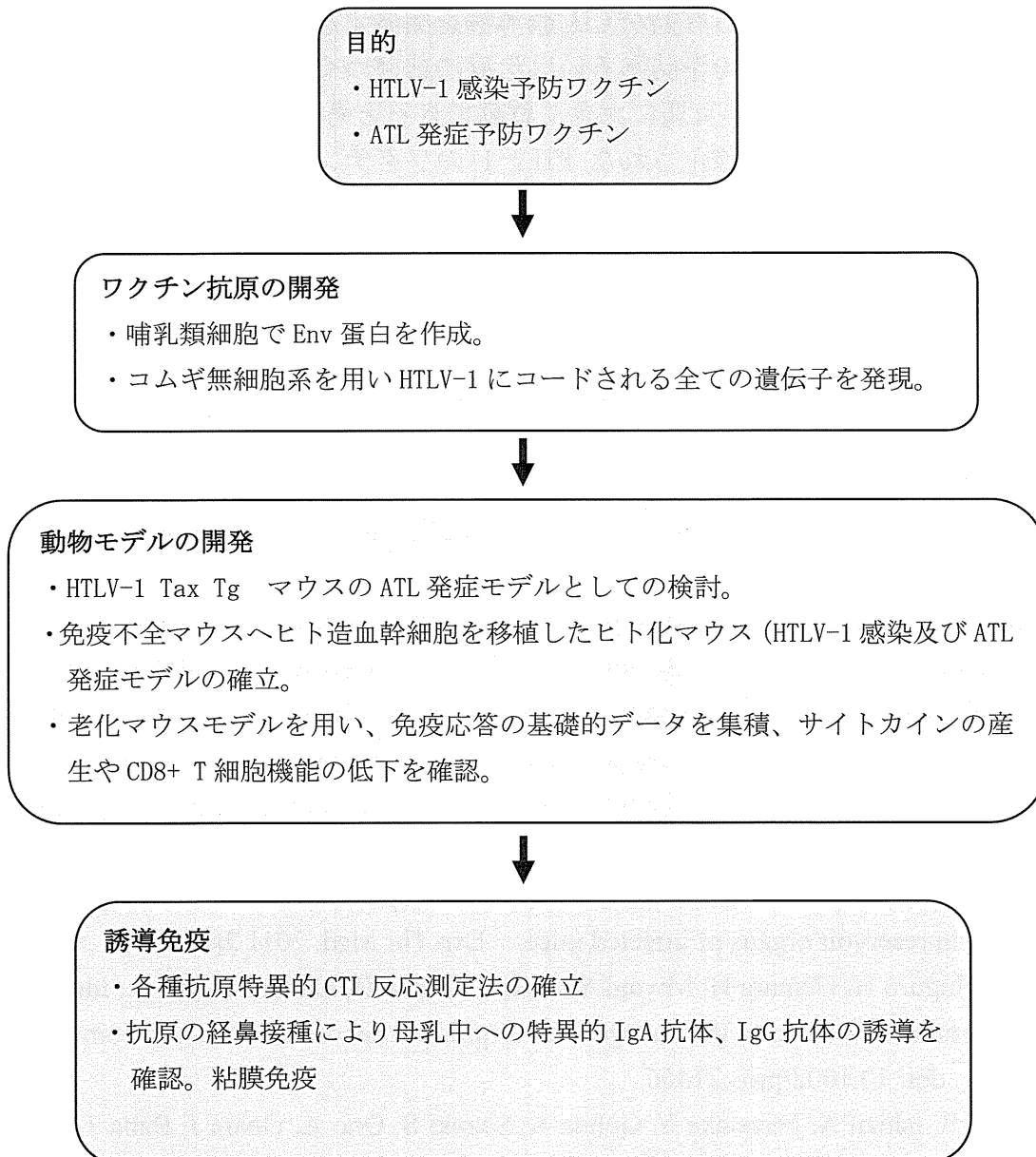
※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

- (1) Aina A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. Hum Vaccin. 2011 1;7:174-82.
- (2) Ishii, H., Kawada, M., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Matsuoka, S., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Naruse, T.K., Kimura, A., Takiguchi, M., and Matano, T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. J. Virol., in press.
- (3) Tanaka M, Nitta T, Sun B, Fujisawa J, Miwa M. The route of primary HTLV-1 infection regulates HTLV-1 distribution in reservoir organs of infected mice. Exp Thr Med. 2011 2(1): 89-94.
- (4) Endoh K, Nishi M, Ishiguro H, Uemura H, Miyagi Y, Aoki I, Hirano H, Kubota Y, Ryo A. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. Prostate. 2011 Aug 1. doi: 10.1002/pros.21466.
- (5) Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. Am J Pathol. In press.
- (6) Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Marukawa K, Matsuno Y, Kasahara M. Expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in thymic epithelial tumors. Am J Surg Pathol. 2011 Sep;35(9):1296-304.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

北海道大学

国立予防衛生研究所

ロックフェラー大学（米国）

ユニバーシティー・カレッジ・ダブリン（アイルランド）

国立感染症研究所

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

・ William W Hall (University College Dublin)

・ 長嶋和郎（北海道大学）

・ 倉田毅（国立感染症研究所）

・ 澤洋文（北海道大学）

・主な研究課題

・ HTLV-1 の感染機構の解明

・ 成人 T 細胞性白血病（ATL）発症メカニズムの解明とモデル動物の作成

・ 粘膜免疫を活用したワクチンの開発

・ インフルエンザの病態解明と経鼻ワクチンの開発

・これまでの研究実績

- 1) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of Neutralizing Antibodies in Adults After Intranasal Vaccination With an Inactivated Influenza Vaccine. *J Med Virol*, in press
- 2) Suzuki T, Aina A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):719-26.
- 3) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2011 Aug 26. doi: 10.1038/modpathol.2011.125. [Epub ahead of print]
- 4) Aina A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin*. 2011 Jan 1;7:174-82.
- 5) Hajj E H., El-Sabban M, Hasegawa H, Zaatari G, Ablain J, Saab T. S, Janin A, Mahfouz R, Nasr R, Kfoury Y, Nicot C, Hermine O, Hall WW, de The H, Bazarbachi A. Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating cell activity in murine ATL. *J Exp Med*. 2010 Dec 20;207(13):2785-92.
- 6) Ichinohe T, Aina A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D,

- Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol*. 2010 Oct;82(10):1754-61
- 7) Watters KM, Dean J, Hasegawa H, Sawa H, Hall W, Sheehy N. Cytokine and growth factor expression by HTLV-1 Lck-tax transgenic cells in SCID mice. *AIDS Res Human Retrovir*. 2010 May;26(5):593-603
- 8) Aina A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M, Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol*. 2010 Mar;82(3):476-84
- 9) Ichinohe T, Aina A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol*. 82:128-137, 2010
- 10) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Aina A, Sata T, Okamoto T, Hall W.W, Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1 α -CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. *Blood* 2009 Oct 1;114(14):2961-8. Epub 2009 Aug 5
- 11) Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall W. W, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T-Cell Leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 2009 Sep 24;114(13):2709-20. Epub 2009 Jul 7
- 12) Ichinohe T, Aina A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6276-9
- 13) Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag*. 2009 Feb;5(1):125-32
- 14) Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses *Mucosal Immunol*. 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
- 15) Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Cross-protection against H5N1 influenza virus infection afforded by intranasal administration of seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis*. 2007 Nov 1;196(9):1313-20. Epub 2007 Oct 5.
- 16) Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40. 2007 Jul 1; [Epub ahead of print]
- 17) Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):811-819
- 18) Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.

- 19) Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol*, 2006 78:954-963.
- 20) Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine* 2006 Apr;12(4):466-472.
- 21) Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 2005 Mar;79(5):2910-9.
- 22) Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2005 Jan; 75:130-136.
- 23) Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. *Leuk Lymphoma*. 2004 Oct;45(10):2169-72.
- 24) Watanabe I, Ross TM, Tamura S, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, SawaH, Chiba J, Kurata T, SataT, HasegawaH* Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* 2003 Nov 7;21(31):4532-8.
- 25) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N. Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J Virol*. 2003 May;77(9):5286-94.
- 26) Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K and Hall WW.: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002, 18: 1253-1260.
- 27) Hasegawa H*, Kadowaki S, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T.: Persistent influenza virus infection of irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. *Vaccine* 2002, 20: 1050-1057.
- 28) Hasegawa H*, Kadowaki S, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T. Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. *Vaccine*. 2000, 22: 2560-2565.
- 29) Egan JF, O'Leary B, Lewis MJ, Mulcahy F, Sheehy N, Hasegawa H, Fitzpatrick F, O'Connor JJ, O'Riordan J, Hall WW, High rate of human T lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1- infected intravenous drug abusers in Ireland. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999, 15: 699-705.
- 30) Takai S. Hasegawa H, Kiyokawa E, Yamada K, Kurata T, Matsuda M.: Chromosomal Mapping of the Gene Encoding DOCK180, a Major-Crk-Binding Protein, to 10q26.13-q26.3 by Fluorescence in Situ Hybridization. *GENOMICS* 1996, 35: 403-404.
- 31) Hasegawa H., Kiyokawa E, Tanaka S, .Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M: DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, Alters Cell Morphology upon Translocation to the Membrane. *Mol Cell Biol*,1996, 16:

1770-1776.

- 32) Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, Hattori S. CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 1994, 14: 5495-500.

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：野兔病菌亜種間の病原性相異および動物種間の野兔病感受性の相異に関する研究

課題番号 : H23-新興-若手-022
 予定期間 : H23 年度から H24 年度まで
 研究代表者 : 堀田 明豊
 所属研究機関 : 国立感染症研究所
 所属部局 : 獣医科学部
 職名 : 主任研究官
 年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 1,549,000 円

I. 研究の意義

- (1) 野兔病菌亜種 *tularensis* と *holarctica* の亜種間の病原性相異のメカニズムは不明。
- (2) 亜種 *holarctica* の生物型 I, II および *japonica* (日本分離株) 間の性状の相異は不明。
- (3) 動物種間で野兔病菌に体する感受性の相異のメカニズムは不明。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 野兔病菌日本分離株と海外由来株（亜種 A と B の生物型 I および II）の性状相異が明らかになる。
- (2) 野兔病菌日本分離株と海外由来株の病原性の有無を明らかにする。
- (3) マウスとラットの野兔病菌感受性の相異のメカニズムが解明される。

III. 1 年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

- 研究代表者

- (1) 保有野兔病菌各株の自家凝集性、リポ多糖体構造および補体抵抗性を解析した。これらの結果より 5 株が弱毒変異株である可能性が示唆された。
- (2) 遺伝子解析により保有株は 5 つのグループに分類された。
- (3) マウス感染実験により供試 13 株の病原性の有無が確認される予定である。

- 研究分担者(なし)

- (1)
- (2)
- :

IV. 平成24～25年度の課題

- (1) マウスで得られた結果をもとにラット感染実験を行う。
 - (2) 経時的に得られたデータからマウスとラットの病態進行の相異を解析する。
 - (3)
- :

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 野兔病菌を使用したバイオテロ、アグリテロ対策の基礎資料となる得る
 - (2) 海外より野兔病感染動物が侵入した場合の
 - (3) 疫学調査のためのサーベイランス対象動物種の選定の基礎資料となる得る
- :

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

- (1)無し
 - (2)
 - (3)
- :

Ⅶ. Ⅲ (1 年間の研究成果) の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

研究期間は 2 年間で予定している。

1 年目 (平成 23 年度) は保有する野兔病菌 Type A および B 株について培養細胞における感染性および増殖性を解析する。これらの解析より長期継代により病原性が著しく低下したと考えられた株を供試株候補から削除する。これらの解析より動物感染実験に供する海外由来 Type A および B 株、日本分離 Type B 株から計 6-9 株を選定し、マウス感染実験に供する。

2 年目 (平成 24 年度) はラット感染実験をマウス感染実験と同様に行う。接種菌量はマウスとラットの体重差より算定し、第 1 実験として 1 株について 3 種の異なる菌量を接種し、適当な接種菌量を考察する。第 2 実験ではその接種菌量をマウスおよびラット感染実験にて得られた材料の検査を詳細に進め、病態進行と菌の増殖、宿主免疫の関係を比較解析する。

平成 23 年度 (本年度)

12 月 マウス感染実験 (供試 13 株の病原性の有無の確認)

1-3 月 マウス感染実験 (皮内接種によるマウスの病態進行の比較解析)

3 月 病態の進行についての株、生物型、亜種間の相異について考察する。

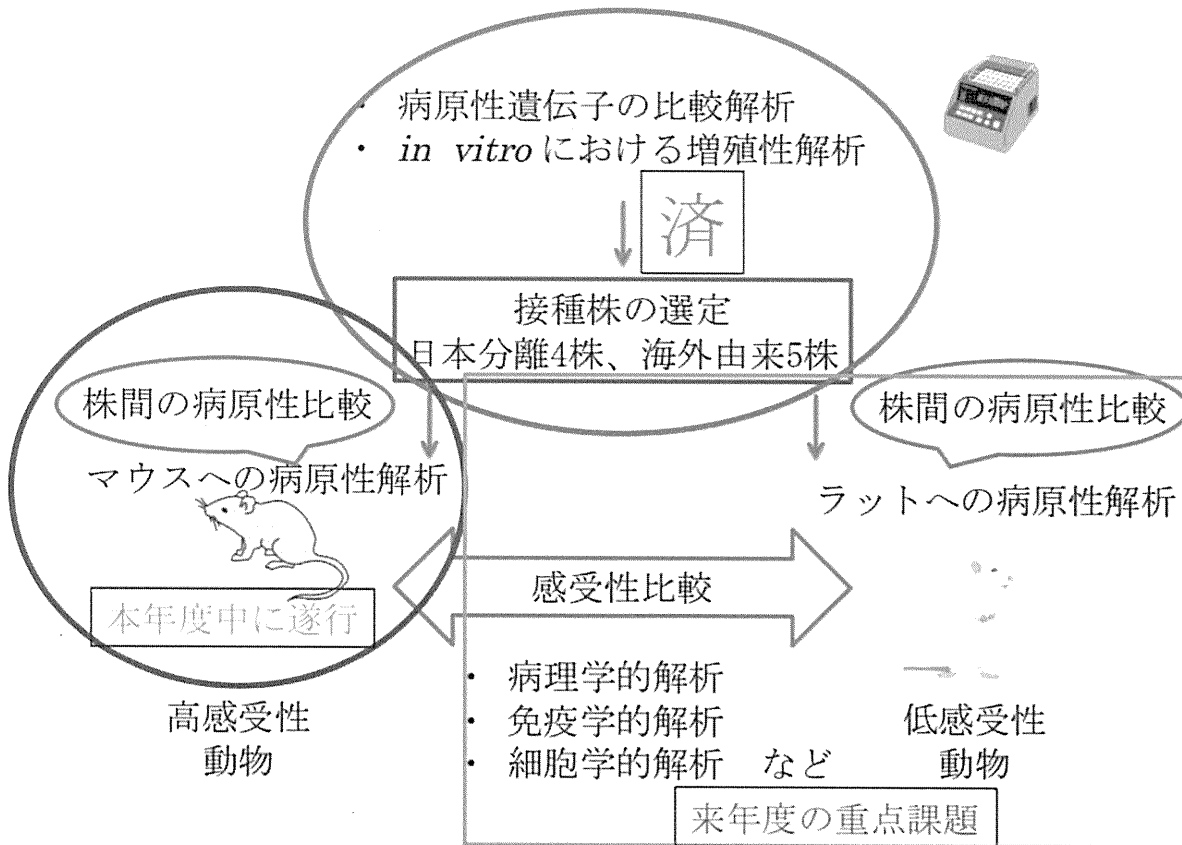
平成 24 年度 (次年度)

5-7 月 ラット感染実験 (ラットにおける野兔病菌感染による病態進行と接種菌量と確認)

7-11 月 ラットおよびマウス感染実験 (経時的に採材し動物種間の反応の相異を比較解析する)

11-1 月 採材した材料について免疫化学的、病理学的解析を進める

2-3 月 結果をまとめ、科学雑誌へ論文投稿する。



●研究代表者の研究歴等

※ 研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

2008年4月 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官に着任

2003年10月 国立感染症研究所 獣医科学部第3室研究員に着任

野兎病菌に対するモノクローナル抗体の作出、国内生息野生動物における野兎病血清疫学調査、トリインフルエンザウイルスの検出・分離など

2003年4月 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 リサーチレジデント

国立感染症研究所獣医科学部に流動研究員として赴任

野兎病の診断方法、菌分離、菌体検出および血清抗体価測定方法に関する研究

2003年3月 岐阜大学大学院連合獣医研究科博士課程を修了 学位授与

学位論文題目「*Coxiella burnetii*の抗原性に関する研究」

論文本数 主著7 共著14 取得特許1

・過去に所属した研究機関の履歴

岐阜大学獣医学科家畜微生物学講座

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平井克哉 (岐阜大学 名誉教授)

福士秀人 (岐阜大学 教授)

山口剛士 (鳥取大学 教授)

山田章雄 (国立感染症研究所 獣医科学部部長)

棚林清 (国立感染症研究所 獣医科学部第3室室長)

・主な研究課題

「野兎病を主とした動物由来感染症に関する研究」

「国内生息野生動物における野兎病の血清疫学調査」

「Q熱起因菌 *Coxiella burnetii* の抗原性に関する研究」

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、太字・斜体文字で記載してください)

※ 発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

1. Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. ○Hotta A, Tanabayashi

- K, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Mizoguchi T, Yamada A. Zoonoses and Public Health. 印刷中
2. トウホクノウサギ (*Lepus brachyurus angustidens*) の症例-野生動物の病理解剖の意義と感染リスク-. 朴天鎬、中西中、畑井仁、小山田敏文、佐藤久聡、進藤順治、藤田修、○堀田明豊、井上智、棚林清 獣医畜産新報. 63:197-200, 2010
 3. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, Tersteeg C, Masegi T, ○Hotta A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, McMurray DN, Samuel JE. Infection and Immunity. 77: p5640-5650, 2009.
 4. Pathological and Microbiological Studies of Japanese Hare (*Lepus Brachyurus Angustidens*) Naturally Infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Park C-H, Nakanishi A, Hatai H, Kojima D, Oyamada T, Sato H, Kudo N, Shindo J, Fujita O, ○Hotta A, Inoue S, and Tanabayashi K, The Journal of Veterinary Medical Science. 71: p1629-1635, 2009.
 5. Survival of Avian H5N1 Influenza A Viruses in *Calliphora nigribarbis* (Diptera: Calliphoridae). Sawabe K, Tanabayashi K, ○Hotta A, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Yamada A, Kurahashi H, Shudo C, Kobayashi M. Journal of Medical Entomology. 46: p852-855, 2009.
 6. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. Fujita O, Uda A, ○Hotta A, Okutani A, Inoue S, Tanabayashi K, Yamada A, Microbiology and Immunology. 52: p270-276, 2008
 7. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, ○Hotta A, Yamamoto Y, and Yamada A., Japanese Journal of Infectious Diseases. 60: p355-361, 2007.
 8. Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. ○Hotta A, Uda A, Fujita O, Tanabayashi K, Yamada A, Clinical Vaccine Immunology. 14: p81-84, 2007.
 9. Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, Kurahashi H, Tanabayashi K, ○Hotta A, Saito T, Yamada A, Kobayashi M. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75: p327-332, 2006
 10. ○堀田明豊、棚林清, 野兎病. 獣医畜産新報 (2006) No. 8: p644-648
 11. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, ○Hotta A, Terao K, Yamada A., Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics (2005) No. 57:p189-197
 12. Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens. ○Hotta A, Zhang G Q, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K, The Journal of Veterinary Medical Science. 60: p1289-1291, 2004.

13. SCID mouse model for lethal Q fever. Andoh M, Hotta H, Zhang G Q, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K, Infection and Immunity. 71: p4717-4723, 2003
14. Use of monoclonal antibodies to lipopolysaccharide for antigenic analysis of *Coxiella burnetii*. Hotta A, Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, Amano K and Hirai H, Journal of Clinical Microbiology. 41: p1747-1749, 2003
15. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. Hotta A, Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K, Infection and Immunity. 70: p4747-4749, 2002.
16. Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of *Coxiella burnetii* as an immunodiagnostic reagent Zhang GQ, Hotta A, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. Microbiology and Immunology. 42:423-428. 1998
17. Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR. Zhang GQ, Hotta A, Mizutani M, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. Journal of Clinical Microbiology. 36: p2210-2213. 1998
18. Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. To H, Hotta A, Zhang GQ, Nguyen SV, Ogawa M, Yamaguchi T, Fukushi H, Amano K, Hirai K. Microbiology and Immunology. 42: p81-85, 1998
19. Antigenic characteristic of the lipopolysaccharides of *Coxiella burnetii* isolates. To H, Hotta A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. J Vet Med Sci. 60:p267-270. 1998
20. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. Zhang GQ, Nguyen SV, To H, Ogawa M, Hotta A, Yamaguchi T, Kim HJ, Fukushi H, Hirai K. Journal of Clinical Microbiology. 36:p77-80. 1998

特許権

1. 簡便かつ迅速で安全なQ熱診断方法および診断薬 特許第4614313号(特願2004-184260、出願2004.6.22、登録2010.10.29) 平井克哉、福士秀人、山口剛士、長縄崇、堀田明豊、小宮智義、荒井節夫

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題 : 体表面サイトカインクロストークならびに抗原動態の最適制御による新規インフルエンザ粘膜ワクチンアジュバントの開発 (H23-新興-若手-023)

課題番号 : H23-新興-若手-023

予定期間 : H23 年度から H25 年度まで

研究代表者 : 吉川 友章

所属研究機関 : 大阪大学大学院薬学研究科

所属部局 : 毒性学分野

職名 : 助教

年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 4,420,000 円也 (うち間接経費 1,020,000 円)

I. 研究の意義

昨今の新型インフルエンザの大流行に見られるように、新興・再興ウイルスのパンデミックに対する根本的な予防手段として、ワクチンの予防接種が必要不可欠となっている。経鼻ワクチンは、侵襲性が低く二次感染の恐れが無い上、あらゆるウイルス株に対して交叉防御能を有する分泌型 IgA を全身粘膜表面に誘導できる。即ち経鼻ワクチンはパンデミックに対応出来るのみならず高病原性鳥インフルエンザに対しても有効性を示す可能性を秘めたワクチンシステムである。しかし、現状の経鼻インフルエンザワクチン (flumist®) は、弱毒ウイルスを含むため、安全性の観点からはサブユニット経鼻ワクチンが理想的である。一方で、サブユニット経鼻ワクチンは抗原送達効率や免疫賦活活性、さらには安全性に関して致命的な課題があるため実用化されていない。こうした中、サイトカインとナノマテリアルとを融合して粘膜面における炎症応答と抗原動態を最適に制御する方法を構築し、これを利用して安全かつ有効性の高い経鼻インフルエンザワクチンを開発する事を目的とする当該研究事業は以下の点で意義のある事業である。

- (1) 粘膜ワクチンはインフルエンザの根本的な予防法の開発に貢献
- (2) 安全性と有効性の両立を目指して毒性学 (安全科学) を起点とした新しいワクチン開発戦略を切り開く
- (3) 粘膜面 (体表面) におけるサイトカインの役割や微粒子物質の吸収機構の解明に向けた足がかりになる

II. 研究の目的、期待される成果

本課題の目的は、サイトカインとナノマテリアルとを融合して粘膜面における炎症応答と抗原動態を最適に制御する方法を構築し、これを利用して安全かつ有効性の高い経鼻インフルエンザワクチンを開発する事である。近年、インフルエンザ感染に対する根本的な予防手段としてワクチンに

期待が寄せられている。しかし、現行の注射型ワクチンは、①ウイルス感染後の発症・重傷化を予防できるが感染は防げない、②ワクチン株と流行株が一致しない場合には効果が低い、③消化管感染する高病原性鳥インフルエンザには全く効果が無い、などの致命的な問題点を抱えている。こうした中、独自に見出したサイトカインの粘膜ワクチンアジュバントとして応用し、本法のお家芸とも言えるナノテクノロジーを活用することで既存の課題を克服した抗インフルエンザ粘膜ワクチンを開発しようとする本申請課題は、下記のような成果を提供するものと期待される。

- (1) 国内発インフルエンザ予防ワクチンのシーズ発掘
- (2) 副作用（ベル麻痺など）を誘導しない安全なサブユニットワクチンの開発の足がかりの提供
- (3) ナノテクノロジーを応用した新たな産業の創出に向けたヒントの提供（産業発展の支援）

Ⅲ. 1年間の研究成果

当該事業の最終目的は、サイトカイン等を用いて体表面における免疫応答を適切に制御し、その上でナノマテリアル等のナノ抗原キャリアを適用することで、安全かつ有効なインフルエンザワクチンシステムを構築する事である。本目的を迅速かつ効率的に達成するために、H23年度は、①プロトタイプワクチン（TNF- α +ナノシリカ：nSP）のワクチン効果と②新規ナノ抗原キャリアの探索を推進した。その結果、特筆すべき結果として、TNF- α とナノ抗原キャリアとしての直径30 nmのナノシリカ（nSP30）を併用することで、抗原特異的IgG産生誘導効果を10倍以上も増強出来ることを見出した。また、新規ナノ抗原キャリアとして、直径2、5、10、30、50、100 nmの金ナノコロイドの免疫誘導効果をパイロット的に比較したところ、直径50 nmの金ナノコロイドが最も強い効果を示した（データは示さず）。この点については、今後、サイトカインとの併用効果等を検討する予定である。今後は、IgE産生や嗅球における炎症（ベル麻痺の原因とされる）の有無など、安全性の観点からTNF- α の有用性を比較検討すると共に、金ナノコロイドとサイトカインを併用した際のワクチン効果の評価や新たなサイトカインアジュバントの探索等を鋭意推進する予定である。以上、H23年度は当初目標を完遂すると共に、一部前倒しで他のサイトカイン・ナノ粒子の有用性評価をも達成するなど、当初予定を大幅に上回る成果を得ているため、本事業は極めて順調に進んでいると言える。

・研究代表者（吉川友章）

- (1) 粘膜ワクチンアジュバントとしてのTNF- α とナノ抗原キャリアとしての非晶質ナノシリカを、経鼻粘膜面に共投与することで、TNF- α 単独投与群よりも10倍以上強く、かつ、コレラトキシン適用群よりも強力に、抗原特異的抗体産生（IgG）を誘導出来る事を初めて見出した。

・研究分担者（吉岡靖雄）

- (1) 新規ナノ抗原キャリアの探索を実施し、直径50 nmの金ナノコロイドが優れた抗原キャリアになり得る可能性を先駆けて見出した。

・研究分担者（阿部康弘）

- (1) 粘膜ワクチンアジュバントとしての TNF- α およびその活性増強型変異体の創製・精製法を確