

ウスモデルを用いて経鼻免疫した。

(5) ラットモデルを用いた HTLV-1 潜伏感染モデルを作成中。

・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。
- (2) マウスにおいて、HTLV-1 Tax 特異的 CTL 反応を誘導し、Tax 発現細胞増殖抑制効果を検討する。さらに、ATL 細胞特異的に誘導される CTL 反応を解析する。一方、STLV 感染サルでの Tax・HBZ 特異的 CTL 反応を解析する。

・研究分担者(梁 明秀)

- (1) コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、HTLV-1 のコードするすべての全長タンパク質の合成に成功した。
- (2) 合成したタンパク質の可溶化条件を詳細に検討し、大量合成系を確立した。
- (3) Env、HBZ、Tax はすでに合成済み（下記 a-c）
  - (ア) Env：すでにラットへの免疫抗原として使用済み
  - (イ) HBZ：田中勇悦先生に送付、モノクローナル抗体の作製（田中班との共同研究）
  - (ウ) Tax：マンノース被覆リポソームへ封入中、今後ラットまたはマウスに免疫予定
- (4) 上記タンパク質ライブラリーを活用し、HTLV-1 タンパク質に対する微量抗体測定法を開発した。（現在血清を用いて予備実験中）
- (5) 外丸先生の老化マウスと野生型マウスの脳のプロテオミクス解析を実施した。
- (6) ESI-TOF-MS を用いて老化マウスにおいて発現の増加または減少しているタンパク質をプロファイリング

・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) 老化マウスモデルとしてプロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス ( $\beta 5t$ -Tg) を用い、免疫応答の異常について詳細な解析を行った。プロテアソーム機能の低下により CD8+T 細胞の減少、TCR 発現の低下、抗原反応性が減弱することが明らかとなった。HTLV-1 関連疾患のワクチン制御には免疫応答の年齢による変化とワクチン誘導に対して有効な免疫賦活化が必要となる可能性が考えられる。

・研究分担者(田中正和)

- (1) ヒト造血幹細胞の NOG マウス骨髄内への移植により作製したヒト化マウス (IBMI-huNOG) に HTLV-1 を感染させることで、抗 HTLV-1 抗体および Tax 特異的 CTL の誘導とともに、ATL に特徴的な感染ヒト CD4+CD25+T リンパ球細胞のクローナル増殖と花弁様分葉核を持つ T リンパ球の出現が再現された。
- (2) HTLV-1 感染細胞を経口感染させ低レベルでの感染が持続する感染キャリアのモデルを作成し

た。同マウスを用いた CTL の活性化が感染細胞の抑制につながる可能性が示唆された。今後、この感染キャリアモデルを用いることで、DNA ワクチンやペプチドワクチン等、ATL 発症予防ワクチンの評価が可能であると考えられる。

#### IV. 平成 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 TaxCTL 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も重要である。
- (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)

・研究代表者 (長谷川秀樹)

1. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol*. 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
2. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
3. Inoue N, Matsushita M, Fukui Y, Yamada S, Tsuda M, Higashi C, Kaneko K, Hasegawa H, Yamaguchi T. Identification of a varicella-zoster virus replication inhibitor that blocks capsid assembly by interacting with the floor domain of the major capsid protein. *J Virol*. 2012 Nov;86(22):12198-207. doi: 10.1128/JVI.01280-12. Epub 2012 Aug 29.
4. van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
5. Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in burmese rhesus macaques. *J Virol*. 2012 Jun;86(12):6481-90. Epub 2012 Apr 4.

6. Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *J Virol*. 2012 May;86(9):5264-77. doi: 10.1128/JVI.06913-11. Epub 2012 Feb 22.
7. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. *ACS Chem Biol*. 2012 Mar 16;7(3):552-62. Epub 2012 Jan 13.
8. 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* 2012 Feb;84(2):336-44.
9. Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Aina A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PLoS One*. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.
10. 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.

・研究分担者（俣野哲朗）

1. Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect*, in press.
2. Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques. *Microbes Infect* 14:1169-1176, 2012.
3. Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbio* 3:234, 2012.
4. Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64:669-678, 2012.
5. Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura , Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
6. Tee KK, Kamarulzaman A, Matano T, Takebe Y. Phylodynamic inference of infectious diseases caused by the human immunodeficiency virus, enterovirus 71, and the 2009 swine-origin human influenza virus. *Future Virol* 7:1-10, 2012.
7. Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9:3, 2012.
8. Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbio* 2:267, 2012.
9. 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 TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
10. Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64:131-141, 2012.
11. Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29:8557-8563, 2011.
12. Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55:768-773, 2011.
13. Matsuoka S, Matano T. Strategy for prevention of HIV-1 transmission. *Journal of Disaster Research* 6:421-425, 2011.
14. Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63:501-509, 2011.
15. Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
16. Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y-J, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect* 13:58-64, 2011.
17. Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. A structural constraint for

functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.

18. Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Broadening of CD8<sup>+</sup> cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24:2777-2787, 2010.
19. Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62:601-611, 2010.
20. Yu S, Feng X, Shu T, Matano T, Hasegawa M, Wang X, Li H, Li Z, Zhong R, Zeng Y. Comparison of the expression and immunogenicity of wild-type and sequence-modified HIV-1 gag genes in a recombinant Sendai virus vector. *Curr HIV Res* 8:199-206, 2010.
21. Yamamoto H, Matano T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine* 28S:B13-B17, 2010.

・研究分担者 (梁 明秀)

1. Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka I, Morita Y, Ryo, A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogasawara Y, Nishina A, Shimoda M, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan. *J Clin Microbiol*, in press.
2. Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. *PLoS One*, in press.
3. Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. Seroepidemiology of scaffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 in Japan. *J Infection*, in press.
4. Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-Induced SCYL2 Limits Release of HIV-1 by Triggering PP2A-Mediated Dephosphorylation of the Viral Protein Vpu. *Sci. Signal.* 2012 Oct 9 ;24(5):73
5. Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Aug 24;425(2):284-9.
6. Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics.* 2012 Aug 3;75(3):4863-73.
7. Nakamura K, Kosugi I, Lee DY, Hafnerc A, Sinclair DA, Ryo A and Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 regulates neuronal differentiation via  $\beta$ -catenin. *Mol Cell Biol.* 2012 Aug; 32(15):2966-78.
8. Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *J Med Microbiol.* 2012 Jun;61(Pt 6):820-9.
9. Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H. Effects of DNA Binding of the Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on the Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry.* 2012 Jan 23;51(7):1510-17.(IF:3.226)
10. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 2011 Oct 20;61(3):410-9.
11. 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;72(6):626-637.
12. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of scaffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 2011 Aug; 43(8):669-671.
13. Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis.* 2011 Jun 10;11:168.
14. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 2011 Apr 1;286(13):11593-603.
15. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem.* 2011 Mar 25;286(12):10051-7.
16. Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Yamamoto N, Ryo A. Vaccination with human induced pluripotent stem cells

creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology*, 2011 Feb 22;2:27.

・研究分担者（外丸詩野）

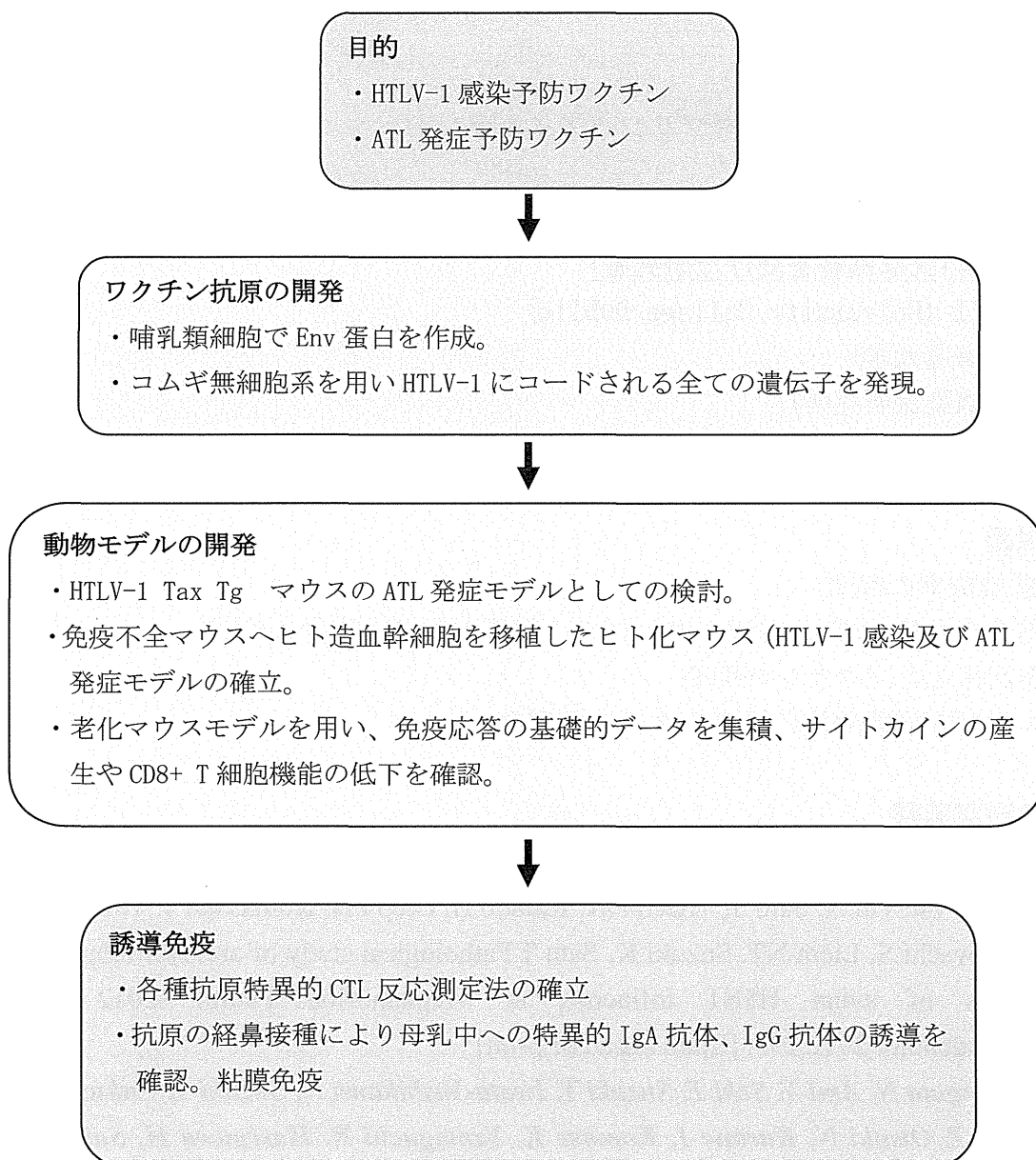
1. Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immun*. 2012;doi:10.3389/fimmu.2012.00333
2. Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- $\alpha$ -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest*. 2012;doi: 10.1038/labinvest.2012.153.
3. Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One*. 2012;7(9):e44113.
4. Baba T, Badr Mel S, Tomaru U, Ishizu A, Mukaida N. Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of Sirp $\alpha$ + dendritic cells: a murine model. *PLoS One*. 2012;7(7):e41154.
5. Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(11):3779-87.
6. Tomaru U, Yamada Y, Ishizu A, Kuroda T, Matsuno Y, Kasahara M. Proteasome subunit  $\beta$ 5t expression in cervical ectopic thymoma. *J Clin Pathol*. 2012;65(9):858-9.
7. 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*. 2012;180(3):963-72.
8. 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;35(9):1296-304.
9. Watari H, Michimata R, Yasuda M, Ishizu A, Tomaru U, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N. High prevalence of multiple human papillomavirus infection in Japanese patients with invasive uterine cervical cancer. *Pathobiology*. 2011;78(4):220-6.
10. Sutoh Y, Kondo M, Ohta Y, Ota T, Tomaru U, Flajnik MF, Kasahara M. Comparative genomic analysis of the proteasome  $\beta$ 5t subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes. *Immunogenetics*. 2012;64(1):49-58.
11. Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Tomaru U, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A. Plasma-dependent, antibody- and Fc $\gamma$  receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. *Cytometry A*. 2011;79(1):46-56.

・研究分担者（田中 正和）

1. 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*. 2: 89-94. 2011.
2. 田中正和、ウシラクトフェリンによる HTLV-1 抗腫瘍効果について(ラクトフェリン学会賞 受賞研究).ラクトフェリンニューズレター.第1巻,p8-9.2011.
3. 田中正和、鄭真美、長谷川翔、和田直樹、橋本岩男、津田洋幸、藤澤順一、三輪正直、ウシラクトフェリンによる HTLV-1 抗腫瘍効果について.ラクトフェリン 2011.p14-20.2011.
4. Tsuda M, Tanaka M, Mushiake M, Takahashi J, Tanaka K, Watase J, Fujisawa JI, Miwa M. A novel pathway of centrosome amplification that dose not require DNA lesions. *Cancer. Sci*. 103: 191-196.2012

## VII. III (2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・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. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
2. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. *Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. J Virol.* 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
3. Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M. Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(8):814-23. Epub 2012 Oct 1.
4. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. *Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. Blood.* 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
5. Inoue N, Matsushita M, Fukui Y, Yamada S, Tsuda M, Higashi C, Kaneko K, Hasegawa H,

- Yamaguchi T. Identification of a varicella-zoster virus replication inhibitor that blocks capsid assembly by interacting with the floor domain of the major capsid protein. J Virol. 2012 Nov;86(22):12198-207. doi: 10.1128/JVI.01280-12. Epub 2012 Aug 29.*
6. *van Riet E, Ainal A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. Vaccine. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.*
  7. *Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in burmese rhesus macaques. J Virol. 2012 Jun;86(12):6481-90. Epub 2012 Apr 4.*
  8. *Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. J Virol. 2012 May;86(9):5264-77. doi: 10.1128/JVI.06913-11. Epub 2012 Feb 22.*
  9. *Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. ACS Chem Biol. 2012 Mar 16;7(3):552-62. Epub 2012 Jan 13.*
  10. *Ainal 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 2012 Feb;84(2):336-44.*
  11. *Suzuki T, Ainal 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.*
  12. *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]*
  13. *Ainal 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.*
  14. *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.*
  15. *Ichinohe T, Ainal 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*



16. 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
17. 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
18. 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
19. 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 $\alpha$ -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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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  $\beta$ -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses *Mucosal Immunol*. 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
24. 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.
25. 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]
26. 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
27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Watanabe I, Ross TM, Tamura S, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H\* Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* 2003 Nov 7;21(31):4532-8.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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: 5495-5500.

・特許権等知的財産権の取得及び申請状況

(1) 発明の名称：粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン

特許権者：一般財団法人阪大微生物病研究会、国立感染症研究所長

発明者：長谷川秀樹、倉田 毅、佐多徹太郎、森山雅美、田村慎一、谷本武史

特許第 4817625 号（登録日 平成 23 年 9 月 9 日）

(2) 発明の名称：経鼻ワクチン

特許権者：独立行政法人理化学研究所、国立感染症研究所長

発明者：清野研一郎、谷口克、田代卓哉、富宿賢一、森謙治、長谷川秀樹

特許第 4909264 号（登録日 平成 24 年 1 月 20 日）

## HTLV-1感染症予防ワクチンの 開発に関する研究

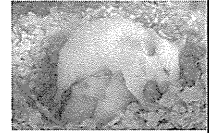
研究代表者: 長谷川 秀樹・国立感染症研究所感染病理部  
 分担研究者:

俣野哲朗・国立感染症研究所・エイズ研究センター  
 梁 明秀・横浜市立大学大学院医学研究科・分子生体防御学  
 外丸 詩野・北海道大学大学院医学研究科・分子病理学  
 田中正和・関西医科大学・微生物学講座

## 目的と背景

HTLV-1感染症を我が国をはじめとする流行地域から減少させる目的で感染阻止、HTLV-1関連疾患の発症阻止を目指したワクチン開発を目的とする。

- ✓ HTLV-1の主な感染経路は母乳を介した母子感染である。感染防御を目的として新生児の免疫獲得には工夫が必要である。粘膜を介して感染する感染症においては粘膜上で働く特異的IgA抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。IgA抗体は母乳中にも積極的に分泌される事が知られている。血中IgG抗体に加えてIgA抗体が誘導される事により感染防御効果が高まる事が期待できる。
- ✓ また感染細胞を標的とした細胞障害性T細胞の誘導も発症予防の観点から重要である。
- ✓ 新生児へのワクチン接種は、免疫機構が未成熟であるため、有効な効果が期待できない。しかし、新生児の時こそHTLV-1に対する免疫が必要である。



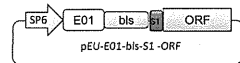
HTLV-1の感染防御免疫の標的抗原の同定、  
 有効な免疫の検討、ワクチン投与ルート、  
 免疫方法の検討、アジュバントの検討、評価モデル動物の検討

## コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV1Aタンパク質の合成 (梁秀明・横浜市立大学医学部)

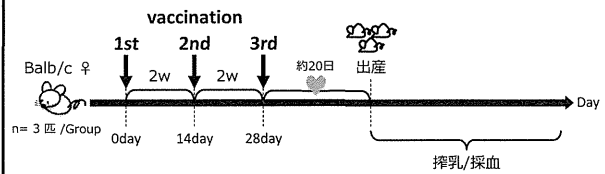
Name	bp	aa	kDa	isoform
1 HTLV1A gag	1302	429	47.5	
2 HTLV1A gag-pro	1970	651	71.6	
3 HTLV1A gag-pro-pol	4401	1462	162.5	
4 HTLV1A env	1481	488	53.9	
5 HTLV1A TAX-1	1076	353	39.5	
6 HTLV1A HBZ	644	209	24.89	
7 HTLV1A p27REX	584	189	20.5	p27REX, missing in p27REX 1-78
8 HTLV1A p27I	470	151	17.2	p27I, missing in p27I 1-53
9 HTLV1A p30II	740	241	26.7	p30II, missing in p30II 1-154

DNA配列: Human T-cell leukemia virus 1 (strain Japan ATK-1 subtype A)

HTLV1A gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27I, p30II  
 pEU-E01-bls-S1-MCS vector へ乗せ換え



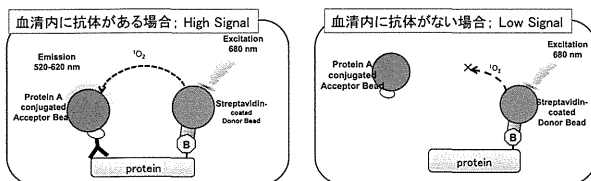
## HTLV-1 Envを用いた感染予防ワクチンの開発



ワクチン抗原: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製したHTLV-1全長Env (gp46)

Group	route	volume (μL)	1st		2nd		3rd	
			HTLV-1 Env (μg)	Poly(I:C) (μg)	HTLV-1 Env (μg)	Poly(I:C) (μg)	HTLV-1 Env (μg)	Poly(I:C) (μg)
経鼻	i.n	15	10	10	10	10	10	10
皮下	s.c	50	10	10	10	10	10	10
コントロール	-	-	-	-	-	-	-	-

## 血清内の抗体検出



## 次年度以降の計画

感染阻止、発症阻止の為のワクチン開発

- ・作成された種々の抗原による防御能の検討
- ・アジュバント、投与ルートの検討
  - 1) 感染源となる細胞の破壊
  - 2) 粘膜上での感染の防御
  - 3) 感染細胞を標的とした細胞障害性T細胞の誘導
- ・感染モデル、発症モデルを用いたワクチン効果の検討

## 平成24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： パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発  
課題番号： H23-新興-若手-024  
予定期間： H23年度からH25年度まで  
研究代表者： 渡利 彰浩  
所属研究機関： 大阪大学  
所属部局： 大学院薬学研究科  
職名： 助教  
年次別研究費(交付決定額)：1年目 4,160,000 円 2年目 4,030,000 円

### I. 研究の意義

- (1) 経口ワクチンは粘膜免疫と全身系の体液性・細胞性免疫の両方を賦活化する作用をもち、非侵襲的に投与可能で、安全性も兼ね備えていることから理想的なワクチンであるにも関わらず、開発が著しく立ち遅れている。
- (2) 経口ワクチンに最適な消化酵素による分解回避特性を有する抗原送達法が存在しない。
- (3) 有効な経口ワクチンを開発するためには、消化酵素による分解を回避しつつ腸管粘膜免疫組織パイエル板へ効率よく抗原を送達する方法が求められている。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 腸管粘膜免疫組織パイエル板に claudin-4 (CL-4)が高発現していることに着目し、独自の CL-4 指向性分子を有効活用し、初めてのパイエル板指向性経口ワクチンの開発を目的とする。
- (2) 本研究で開発を試みる経口ワクチンは、粘膜免疫のみならず全身系体液性・細胞性免疫をも賦活化することから、粘膜面から感染し、生体に侵入するウイルスなどの感染症において高い予防効果が期待できる。
- (3) 経口によるワクチン接種は、非侵襲的な投与方法であり、粘膜・全身系免疫賦活化作用が可能な経鼻ワクチンと比べても高い安全性が期待できる。
- (4) 経口ワクチン開発の際に問題となる消化酵素による分解に対し、耐性をもった CL-4 指向性分子を利用するため、効率よく抗原を腸管粘膜免疫組織へ送達できる。

### III. 2年間の研究成果

・研究代表者(渡利 彰浩)

- (1) 当グループが独自に開発した CL-4 binder である C-CPE を prototype として用い、高親和性 CL-4 アンタゴニスト創出のための新規 C-CPE 構造変異体ライブラリを構築した。
- (2) CL-4 提示出芽バキュロウイルスを用いた CL-4 binder スクリーニング系を利用することで、C-CPE 構造変異体ライブラリから既存の C-CPE に比して CL-4 への結合性が高い CL-4 高結合性 C-CPE 変異体の取得に成功した。
- (3) CL-4 高結合性 C-CPE 変異体とモデル抗原である卵白アルブミン (OVA) との融合タンパク

質を用いて、予備検討として経鼻投与による免疫賦活化作用を検証した結果、新規 CL-4 binder は既存の C-CPE よりも高い免疫賦活化作用およびワクチン効果を発揮させる抗原送達能を示した。

- (4) CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を修飾したリポソームの中から CL-4 への結合性が高いリポソームを選別した。また、モデル抗原 OVA を封入した C-CPE 変異体修飾リポソームを作製し、本リポソームにおける CL-4 結合性を確認した。

・研究分担者(鈴木 亮)

- (1) 新規 C-CPE 構造変異体ライブラリの中から当グループが独自に確立した CL-4 binder スクリーニング系を利用し、CL-4 高結合性ファージを複数取得した。
- (2) CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を修飾したリポソームを複数作製した。

#### IV. 平成 25 年度の課題

- (1) 取得した CL-4 高親和性 C-CPE をもとに、リポソーム修飾条件の最適化を試みることで経口ワクチンに資する CL-4 binder 修飾リポソームの作製を目指す。
- (2) ローダミンなどの蛍光標識された脂質を用いて CL-4 修飾リポソームを調製し、*in vivo* イメージングアナライザーを用いた *in vivo* 動態を解析する。
- (3) 肺炎双球菌関連抗原 (PspA)等の疾病関連抗原を封入したリポソームを作製し、疾病抗原特異的免疫応答および感染予防効果を評価する。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新型インフルエンザの流行でも分かるように、感染症は僅か数日間で世界中までに蔓延してしまう状況にあるため、少子高齢社会の我が国において感染症予防法の確立に繋がる本研究は、国民の安全保障に資すると共に健康維持・増進に貢献できる。
- (2) ワクチンは免疫記憶によりわずか数回の投与で予防・治療効果が期待できることから、増加の一途を辿るわが国の医療費削減に貢献できる。
- (3) 本研究は独自のパイエル板指向性分子を開発し、初めてのパイエル板指向性経口ワクチンの創出を試みるものであり、我が国のワクチン産業に特徴あるワクチン開発力を寄与することが期待できる。
- (4) 以上、本研究成果は、国民の健康維持・増進、完治に伴う医療費の削減、本邦製薬会社の育成、感染症問題を抱える国々への国際貢献等、厚生労働行政に多大な貢献が期待される。

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 (渡利 彰浩)

- (1) Takahashi A., Kondoh M., Suzuki H., Watari A. and Yagi K., Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies., *Drug Discov. Today*, 17(13-14), 727-32, 2012.
- (2) Suzuki H., Takahashi A., Matsushita K., Li X., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T. and Yagi K., Preparation of a broad-specific claudin binder by using

- Clostridium perfringens enterotoxin., *FASEB J.*, 26 851.8, 2012.
- (3) Kondoh M., Watari A. and Yagi K., Development of a reporter assay system to screen chemicals for claudin-4 modulator activity., *FASEB J.*, 26, 848.10, 2012.
  - (4) Yagi K., Yamane S., Suzuki H., Watari A., Kondoh M. and Uchida H., Development of novel claudin-4 binder and its application in mucosal vaccine., *FASEB J.*, 25, 1b389, 2011.
  - (5) Kakamu Y., Matsushita K., Saito Y., Takahashi A., Matsuhisa K., Watari A., Kondoh M. and Yagi K., Biochemical analysis of a novel dual claudin binder., *FASEB J.*, 25, 620.11, 2011.
  - (6) Takahashi A., Saito Y., Matsuhisa K., Kakamu Y., Kodaka M., Watari A., Kondoh M. and Yagi K., Preparation of a dual claudin binder using a fragment of Clostridium perfringens enterotoxin.. *FASEB J.*, 25, 623.3, 2011.
  - (7) Suzuki H., Kakutani H., Kondoh M., Watari A. and Yagi K., The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin., *Pharmazie*, 65(10), 766-9, 2010.
  - (8) Saeki R., Kondoh M., Kakutani H., Matsuhisa K., Takahashi A., Suzuki H., Kakamu Y., Watari A. and Yagi K., A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334(2), 576-82, 2010.
  - (9) Suzuki H., Kondoh M., Kakutani H., Hamakubo T., Watari A., and Yagi, K., Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder. *FASEB J.*, 24, 773.4, 2010.

研究分担者 (鈴木 亮)

- (1) Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Matsuki Y, Kato Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Systemic delivery systems of angiogenic gene by novel bubble liposomes containing cationic lipid and ultrasound exposure., *Mol Pharm.* 9:1834-1840, 2012.
- (2) Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y, Involvement of Ca<sup>2+</sup> and ATP in enhanced gene delivery by bubble liposomes and ultrasound exposure., *Mol Pharm.* 9: 1017-1023, 2012.
- (3) Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Enhanced gene delivery using Bubble liposomes and ultrasound for folate-PEG liposomes., *J Drug Target.* 20: 355-363, 2012.
- (4) Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M, Efficient suppression of murine intracellular adhesion molecule-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation., *Hepatology.* 56: 259-269, 2012.
- (5) Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama K, Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis., *J Control Release* 160: 362-366, 2012.
- (6) Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Kato Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound., *Int J Pharm* 422: 504-509, 2012.
- (7) Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y, Gene delivery system involving Bubble liposomes and ultrasound for the efficient in vivo delivery of genes into mouse tongue tissue., *Int J Pharm.* 422: 332-337, 2012.

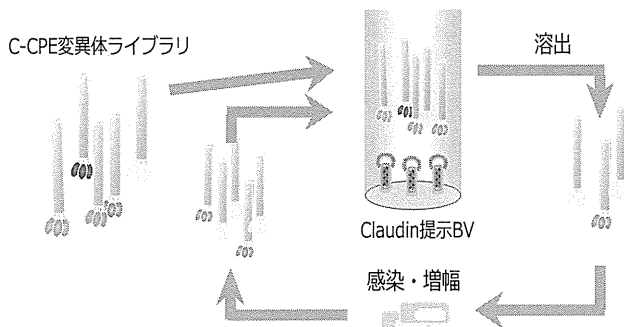
### Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

## 研究成果 (2年間) の概要図

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチン開発のため、

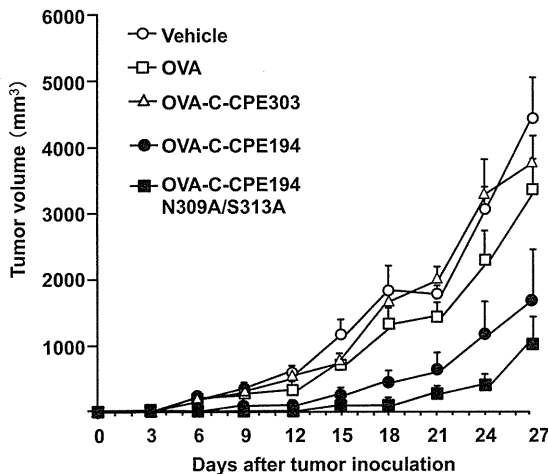
- ① C-CPE構造変異体ライブラリから高親和性CL-4 binderを取得した
- ② モデル抗原(OVA)との融合蛋白質は既存のC-CPEより高い免疫賦活化作用を示した
- ③ 高親和性CL-4 binder修飾リポソームを作製した

### ①高親和性CL-4 binderの取得



(1) C-CPEをprototypeとして使い、高親和性CL-4 アンタゴニスト創出のための新規C-CPE構造変異体ライブラリを構築した。  
 (2) CL-4提示出芽バキュロウイルスを用いたCL-4 binderスクリーニング系を利用することで、作製したC-CPE構造変異体ライブラリから既存のC-CPEに比してCL-4への結合性が高いCL-4高結合性C-CPE変異体の取得に成功した。

### ②モデル抗原を用いた免疫賦活化作用の解析



CL-4高結合性C-CPE変異体とモデル抗原である卵白アルブミン (OVA) との融合タンパク質を用いて、予備検討として経鼻投与による免疫賦活化作用を検証した結果、新規CL-4 binderは既存のC-CPEよりも高い免疫賦活化作用およびワクチン効果を発揮させる抗原送達能を示した。

左図 OVA発現がん細胞を移植した担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍ワクチン効果の検証  
 既存のC-CPE; C-CPE194  
 CLへの結合性が消失したC-CPE変異体; C-CPE303  
 CL-4高結合性C-CPE変異体 (C-CPE 194 N309A/S313A)

### ③高親和性CL-4 binder修飾リポソームの作製



CL-4高結合性C-CPE変異体修飾リポソームを複数作製し、CL-4への結合性に優れたリポソームを選択した。

☐ : ポリエチレングリコール      ▲ : C-CPE



## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

平成 19 年 3 月：大阪大学医学系研究科生体制御医学専攻 博士課程修了（医学博士）  
 平成 19 年 4 月～平成 21 年 8 月：大阪大学微生物病研究所発癌制御研究分野 特任研究員  
 平成 21 年 9 月～現在：大阪大学 大学院薬学研究科 助教  
 平成 23 年 12 月 日本薬学会近畿支部奨励賞 受賞

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大阪大学微生物病研究所在職中は、岡田雅人教授の下、細胞のがん化メカニズムおよび原がん遺伝子の進化的機能変化の解析を行った。大阪大学大学院薬学研究科に異動後、八木清仁教授の下、C 型肝炎研究、近藤昌夫准教授および医薬基盤研堤康央プロジェクトリーダー（現阪大院薬教授、医薬基盤研リーダー併任）の下、claudin binder および modulator 研究に着手した。当該申請課題は、上述した先生に加え、丸山一雄博士（帝京大薬教授、メビオファーム株式会社取締役（リポソーム製剤のベンチャー企業、現在アメリカでリポソーム製剤の臨床試験を実施中）、國澤純博士（東京大学医科学研究所講師、粘膜免疫学の専門家）にご指導を仰ぎつつ、新規経口ワクチンの開発を試みるものである。

### ・主な研究課題

- (1) Claudin-4 を標的とした粘膜ワクチンの開発
- (2) Claudin-4 を標的とした claudin modulator の開発
- (3) Claudin-1 を標的とした C 型肝炎阻害薬の開発
- (4) 肝臓に対するナノマテリアルの安全性評価

### ・これまでの研究実績

- (1) Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Tsutsumi Y. and Yagi K., Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice., *Die Pharmazie*, In press.
- (2) Watari A., Nature of Cancer Explored from the Perspective of the Functional Evolution of Proto-oncogenes., *Yakugaku Zasshi*, 132(10), 1165-70, 2012.
- (3) Watari A., Yagi K. and Kondoh M., A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators., *Biochem Biophys Res Commun.*, 426(4), 454-60, 2012.
- (4) Takahashi A., Kondoh M., Suzuki H., Watari A. and Yagi K., Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies., *Drug Discov. Today*, 17(13-14), 727-32, 2012.
- (5) Watari A., Li Y., Higashiyama S. and Yutsudo M., A Novel Proapoptotic Gene PANO encodes a Post-translational Modulator of the Tumor Suppressor p14ARF., *Exp. Cell. Res.*, 318(3), 187-95, 2012.
- (6) Li X., Kondoh M., Watari A., Hasezaki T., Isoda K., Tsutsumi Y. and Yagi K., Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice., *Die Pharmazie*, 66(4), 282-6, 2011.
- (7) Suzuki H., Kakutani H., Kondoh M., Watari A. and Yagi K., The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin., *Die*

*Pharmazie*, 65(10), 766-9, 2010.

- (8) Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Watari A., Kobayashi M., Tamesada M. and Yagi K., Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury., *Biol. Pharm. Bull.*, 33(6), 983-7, 2010.
- (9) Watari A., Iwabe N., Masuda H. and Okada M., Functional transition of Pak proto-oncogene during early evolution of metazoans., *Oncogene*, 29(26), 3815-26, 2010.
- (10) Saeki R., Kondoh M., Kakutani H., Matsuhisa K., Takahashi A., Suzuki H., Kakamu Y., Watari A. and Yagi K., A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334(2), 576-82, 2010.
- (11) Watari A., CapG., *Encyclopedia of Cancer*, Springer, 2007.
- (12) Ohba Y., Kanao Y., Morita N., Fujii E., Hohrai M., Takatsuji M., Miura D., Watari A., Yutsudo M., Zhao H., Yabuta N., Ito A., Kita Y. and Nojima H., Oleamide Derivatives suppress the spontaneous metastasis by inhibiting connexin 26., *Int. J. Cancer*, 121, 47-54, 2007.
- (13) Watari A., Takaki K., Higashiyama S., Li Y., Satomi Y., Takao T., Tanemura A., Yamaguchi Y., Katayama I., Shimakage M., Miyashiro I., Takami K., Kodama K. and Yutsudo M., Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG., *Oncogene*, 25(56), 7373-80, 2006.
- (14) Shimakage M., Inoue N., Ohshima K., Kawahara K., Oka T., Yasui K., Matsumoto K., Inoue H., Watari A., Higashiyama S. and Yutsudo M., Down-regulation of ASY/Nogo transcription associated with progression of adult T-cell leukemia/lymphoma., *Int. J. Cancer*, 119(7), 1648-1653, 2006.
- (15) 渡利 彰浩, 湯通堂 満寿男, 不老不死への道 (細胞編) *化学と生物*, 42(5), 323-325, 2004.
- (16) Qi B., Qi Y., Watari A., Yoshioka N., Inoue H., Minemoto Y., Yamashita K., Sasagawa T. and Yutsudo M., Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP., *J. Cell. Physiol.*, 196(2), 312-318, 2003.
- (17) Watari A. and Yutsudo M., Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4 : apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration., *Apoptosis*, 8(1), 5-9, 2003.

平成25年1月24日

平成24年度厚生労働科学研究費補助金  
 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
 研究発表会

## パイエル板指向性分子を利用した 経口ワクチンの開発

(課題番号：H23-新興-若手-024)

- ・ 研究代表者：渡利 彰浩 (大阪大学大学院 薬学研究科)
- ・ 研究分担者：鈴木 亮 (帝京大学 薬学部)

### ワクチン

感染症対策の最重要基本戦略

- 1) 病原体の侵入門戸である粘膜面に感染防御網を構築
- 2) 生体内に侵入した病原体および感染細胞を排除

	注射型ワクチン	経鼻ワクチン	経口ワクチン
全身免疫賦活化	○	○	○
粘膜免疫賦活化	×	○	○
侵襲性	高い	低い	極めて低い
安全性など	医療廃棄物の発生	抗原の脳内移行の危険性	安全性に優れる

経口ワクチンが理想的な感染症対策

しかしながら、消化酵素による分解を回避しつつ  
 粘膜免疫組織へのワクチン抗原送達方法の確立が遅延

### Claudin-4と粘膜免疫組織

- ・ 分子量~23 kDaの四回膜貫通蛋白質
- ・ 20種類以上の分子が存在
- ・ 発現に組織特異性がある

Trends Cell Biol, 2006

鼻腔・腸管粘膜組織を覆う上皮細胞およびM細胞において  
claudin-4が高発現

- 粘膜上皮細胞
- M細胞
- リンパ球
- 抗原提示細胞

腸管粘膜免疫組織 (パイエル板)

Claudin-4を標的とした経口ワクチン開発の可能性

### 現在までの研究概要

#### ウエルシュ菌下痢毒素断片C-CPE

- ・ ウエルシュ菌下痢毒素の受容体結合領域
- ・ 細胞毒性なし
- ・ 分子量14 kDaのポリペプチド
- ・ 唯一のclaudin-4 ligand (Claudin-4に対して抗体並みの親和性)
- ・ トリプシン耐性

J Biol Chem, 2008

C-CPEをclaudin-4 binderのモデル分子として活用し、

研究成果1：Claudin-4を標的とした粘膜ワクチン戦略を提唱 (PCT/JP2009/71291)

研究成果2：Claudin-4指向性リボソームを作製

研究成果3：新規claudin-4 binder創製システムを構築 (特願2010-25259)

### Claudin-4を標的とした経鼻粘膜ワクチン

OVA-C-CPE    claudin-4結合領域

OVA    C-CPE

Claudin-4結合性あり

OVA-C-CPE303

OVA    C-CPE303

Claudin-4結合性なし

血清中 抗OVA IgG

鼻粘膜 抗OVA IgA

腸管粘膜 抗OVA IgA

Claudin-4を標的とした粘膜ワクチン技術を開発  
 しかしながら、経口投与しても抗体価上昇せず

### C-CPE修飾リボソームの経鼻粘膜ワクチン

ワクチン抗原の消化酵素分解を回避するために、  
 消化酵素耐性リボソームを利用

○ : ポリエチレングリコール  
 □ : C-CPE

血清中 抗OVA IgG

鼻粘膜 抗OVA IgA

Claudin-4指向性リボソームは粘膜ワクチンとして応用可能  
 しかしながら、経口投与しても抗体価は上昇せず  
 消化酵素耐性の高親和性claudin-4 binderの開発が必要

