

Claudin 標的型粘膜ワクチンの開発に向けた 粘膜免疫応答システムの解析

研究分担者 國澤 純 (独)医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究協力者 鈴木 英彦 同上 プロジェクト研究員

研究要旨

抗原を“吸う・飲む”といった方法で投与し、多くの病原体の感染初発部位である粘膜面に免疫防御を形成できる粘膜ワクチンが注目されており、すでいくつかの病原体に対するワクチンは粘膜ワクチンとして実用化されている。今後、粘膜ワクチンを多くの感染症に対するワクチンとして汎用化するためには、ワクチン抗原のデザインやアジュバントの開発だけでなくワクチン抗原送達技術の開発が必要となる。本研究では、粘膜上皮細胞のバリア機能を担う Claudin を標的とした粘膜ワクチン開発を目指した研究を展開する。本事業の3年目になる平成25年度は上記目的の達成に向け、研究代表者である近藤が開発した2種類の Claudin-4 指向性分子を用いた粘膜ワクチンの有効性評価を行った。Claudin-4 結合分子の一つとしてウエルシュ菌毒素 C 末断片 C-CPE (C-terminal fragment of *Clostridium perfringens enterotoxin*)を用い、肺炎球菌共通抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA)と融合したものを経鼻ワクチンとして用いた際の免疫応答の解析を行った。その結果、肺炎球菌感染防御に関わる PspA 特異的血清 IgG、鼻腔 IgA および BALF IgG、IgA の誘導が認められ、これらの免疫応答により肺炎球菌感染防御効果が示された。さらに別の結合分子として Claudin-4 特異的抗体 (5D12 抗体)のワクチン送達担体としての有効性の検証を行ったところ、5D12 抗体は代表的な粘膜免疫組織であるパイエル板をはじめとする粘膜組織の上皮細胞への結合性が認められ、ワクチン抗原送達担体としての有用であることが示唆された。

A. 研究目的

口腔、鼻腔、腸管に代表される粘膜組織は多くの病原微生物の侵入門戸となっている。生体は粘膜組織に粘膜免疫システムと呼ばれる精密かつダイナミックな免疫制御システムを備えることで、粘膜組織を介し侵入してくる病原体に対する生体防御を行っている。

これら粘膜免疫システムによる生体防御を利用した粘膜ワクチンが注目を集めている。“吸う、飲む”といった方法で投与する粘膜ワクチンは従来の全身免疫のみを誘導できる注射型ワクチンと異なり、粘膜免疫と全身免疫の双方を誘導可能である。すなわち、粘膜ワクチンは感染初発部位である粘膜組織での病原体の感染予防と体内に侵入

してきた病原体の排除による感染症の重篤化阻止が可能である。諸外国では複数の粘膜ワクチンが臨床応用されており、日本国内でも近年口タウウイルスに対する2種類の経口ワクチンが承認されている。

このように実用化が進んでいる粘膜ワクチンだが、汎用性を高めていくためには克服すべき課題が多くある。その一つはワクチン抗原の送達技術の開発である。粘膜ワクチンはワクチン抗原を単に粘膜に投与するだけでは有効な免疫応答が誘導されず、ワクチン抗原を効率よく粘膜組織へ送達し、上皮細胞をくぐり抜けてその下層にある免疫担当細胞に認識される必要がある。

本事業においてはワクチン抗原の送達標的とし

て上皮細胞層のバリア機能構成の本体分子である Claudin に着目した粘膜ワクチン開発を展開する。本事業の3年目となる平成25年度は、研究代表者である近藤が開発した Claudin-4 結合分子であるウエルシュ菌毒素 C 末断片 C-CPE (C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin)の経鼻肺炎球菌ワクチンとしての有効性評価、および Claudin-4 特異的抗体 (5D12)の粘膜組織への結合性の解析を行った。

B. 研究方法

B-1. PspA-C-CPE 融合タンパク質の調整

PspA、PspA-C-CPE、PspA-C-CPE Y306A/L315A 発現 pET16b plasmid 1 μ l を BL21(DE3)5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、42 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 1 コロニーを LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晩培養した。翌日 TA 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した後、10000 rpm で 2 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

大腸菌を氷上で溶解した後、buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride、1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol)を用いての可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm、15 分間遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA、MilliQ、NiSO₄、buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP にサンプルを流し、PspA および PspA-C-CPE タンパク質を吸着させた。100 mM の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、500 mM の imidazol 溶液 10 ml で PspA および PspA-C-CPE タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

PspA および PspA-C-CPE 融合タンパク質が溶

解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS (-)を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Chelating HP で得た溶出液 1 ml を流した。PBS (-) を 500 μ l ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン を標準液として BCA™ Protein Assay Kit を用い、560 nm における吸光度を測定し、PspA および PspA-C-CPE 融合タンパク質の濃度を算出した。

B-4. PspA-C-CPE を用いた経鼻免疫と免疫誘導能評価

7 週齢の雌性、BALB/c マウスに PspA、PspA-C-CPE、PspA-C-CPE Y306A/L315A を PspA 量として 5 μ g/20 μ l mouse/time となるように調整し、週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫を行った。最終免疫の 1 週間後、血清、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液を回収し、サンプル中の PspA 特異的抗体を ELISA 法にて測定した。

B-5. PspA-C-CPE による肺炎球菌感染防御

7 週齢の雌性、BALB/c マウスに PspA、PspA-C-CPE、PspA-C-CPE Y306A/L315A を PspA 量として 5 μ g/20 μ l mouse/time となるように調整し、週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫を行った。最終免疫の 1 週間後、ルシフェラーゼ発現肺炎球菌 (Xen10)をイソフルランによる麻酔下で 5 x 10⁶ CFU/40 μ l となるように呼吸器感染させ、経時的にマウスの生存を観察した。

B-6. PspA-C-CPE の NALT への結合性

8 週齢の雌性、BALB/c マウスから NALT を摘出し、OCT compound により組織ブロックを作製した。クリオスタットを用い凍結切片を作製し、100% アセトンで 4°C、1 分間固定した。作製した凍結切片に 2% FCS-PBS を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後にビオチン化した PspA、PspA-C-CPE、PspA-C-CPE Y306A/L315A およ

び UEA1-FITC をそれぞれ滴下し、4°Cで一晩静置した。PBS で洗浄後に Streptavidin 546 を滴下し、室温で 30 分間静置した。PBS で洗浄後、DAPI を 50 μ l 滴下し室温 10 分間静置した。PBS で洗浄後、Fluoromount を 1 滴たらし、カバーガラスをのせ、BZ-9000 (KEYENCE)で観察した。

B-7. Claudin-4 抗体の各種粘膜組織への結合性

8 週齢の雌性、BALB/c マウスから NALT、気道、小腸、大腸を摘出し、4% PFA で一晩固定した。翌日、10%スクロース、20%スクロースの順に 12 時間ずつ浸透作用後、OCT compound により組織ブロックを作製した。クリオスタットを用い、凍結切片を作製した。別固定の方法として、摘出した臓器を PFA による固定を行わず、OCT compound により組織ブロックを調整後、凍結切片を作製し、100%アセトンで室温、1 分間固定した。

作製した凍結切片に 2% FCS-PBS を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後に 1 次抗体：Rat anti-Claudin-4 (5D12)、Rabbit anti-EpCAM、UEA1-FITC を 4°C、一晩暗所で静置した。翌日、PBS で洗浄後、Goat anti-mouse IgG Cy3、Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647 を滴下し、室温、暗所で 30 分間静置した。PBS で洗浄後 DAPI を 50 μ l 滴下し室温 10 分間静置した。PBS で洗浄後、Fluoromount を 1 滴たらし、カバーガラスをのせ、BZ-9000 (KEYENCE)で観察した。

C. 研究結果

C-1. PspA-C-CPE 経鼻ワクチン効果

昨年度の研究から、肺炎球菌の共通抗原である PspA (Pneumococcal surface protein A)と融合体とした C-CPE が PspA 特異的鼻腔 IgA 抗体を産生誘導出来ることを示した。本年度はさらに肺炎球菌感染防御に重要である PspA 特異的 serum IgG、BALF IgG、IgA の誘導を検証した。PspA 量として 5 μ g の抗原を週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫した。最終免疫の 1 週間後に血清、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液を回収し、PspA 特異的 IgG および IgA 産生を測定した。その結果、PspA-C-CPE では

PspA 単独投与群に比べて、顕著に高い抗体価の増強が認められた (図 1)。

さらに PspA-C-CPE により誘導された免疫応答の肺炎球菌感染に対する防御効果を検証する目的で、PspA 量として 5 μ g の抗原を週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫したマウスに最終免疫から 1 週間後に肺炎球菌 (5.0 \times 10⁶ CFU/mouse)を呼吸器感染させた。その結果、PspA-C-CPE では PspA 単独免疫に比べて生存日数の延長が認められたことから、PspA-C-CPE により肺炎球菌の感染防御に十分な免疫応答が誘導されていることが示された (図 2)。

これら PspA-C-CPE による免疫誘導での Claudin-4 依存性を検証する目的で Claudin-4 結合性が減弱している C-CPE 変異体 (C-CPE Y306A/L315A)を作製し、PspA と融合体にして経鼻免疫した際の免疫誘導活性を検証した。その結果、PspA-C-CPE Y306A/L315A においては野生型である PspA-C-CPE に比べて免疫誘導が顕著に減少していた (図 3)。さらに鼻腔免疫誘導組織の一つである NALT への結合性を検証したところ、PspA-C-CPE では抗原取り込み細胞である M 細胞を含む NALT の上皮細胞への結合が認められたが、PspA-C-CPE Y306A/L315A では結合性が減弱していた (図 4)。これらのことから C-CPE の持つ Claudin-4 結合性がワクチン効果において重要であることが示された。

C-2. Claudin-4 抗体の各種粘膜組織への結合性

研究代表者である近藤が独自に樹立した Claudin-4 特異的抗体 (5D12 抗体)のワクチン抗原送達担体としての有用性を検証する目的で各粘膜組織 (パイエル板、NALT、気道、大腸)への結合性を組織学的に解析した。5D12 抗体はパイエル板、NALT、気道、大腸の上皮細胞への結合性が認められた。経鼻、経口ワクチン開発においては粘膜関連リンパ組織、特に抗原取り込み細胞である M 細胞へのワクチン抗原送達が重要であると考えられている。この点において 5D12 抗体は NALT やパイエル板に発現する M 細胞への結合

性も認められたことから、5D12 抗体がワクチン抗原送達担体として有用であると考えられる (図5)。

D. 考察

今回の検討において、C-CPE によるワクチン抗原送達技術が肺炎球菌に対する経鼻ワクチンとして有効であることが示された。実際の病原体感染に対する生体防御も十分に認められたことから、本年度得られた知見は、感染症に対する経鼻ワクチンキャリアとしての C-CPE の有用性を示す大きな研究成果であると考えられる。この知見をもとに霊長類を用いた肺炎球菌ワクチンとしての有効性評価や肺炎球菌以外の感染症に対するワクチンとしての有効性を検証することで、C-CPE を用いたワクチンの有効性と汎用性を検証していくことが今後の重要な課題であると思われる。

また、研究代表者である近藤が樹立した Claudin-4 抗体は粘膜免疫組織の上皮細胞への結合性を示し、経口、経鼻ワクチンにおけるワクチン抗原送達担体として有効であることが示された。本抗体を用いたワクチン抗原送達により抗原特異的免疫応答の誘導を検討することは本抗体を用いたワクチンの有用性を検証する上で重要と思われる。また、興味深いことに今回の検証でパイエル板と NALT で異なる Claudin-4 の染色パターンが確認された。パイエル板では上皮細胞の頂端、基底に発現する Claudin-4 に結合性が認められたのに対し、NALT では頂端に強く結合性を示した。同一抗体にも関わらず組織により異なる染色パターンを示したことは NALT の頂端、基底側の Claudin-4 の構造や遺伝子の一部に違いがある可能性を示している。今後 Claudin-4 を標的とした粘膜ワクチン開発を展開する上でこのような Claudin-4 の特徴を精査していくことはより優れたワクチン抗原送達技術開発にもつながると共に、学術的にも重要な知見をもたらすと期待される。

E. 結論

C-CPE を用いた Claudin-4 標的システムが、経鼻ワクチンの抗原送達に優れており、肺炎球菌に対する経鼻ワクチンとして有効であることを示した。また、樹立した Claudin-4 抗体が粘膜免疫組織の上皮細胞上の Claudin-4 に結合性を示し、本抗体がワクチン抗原送達に適していることを示した。

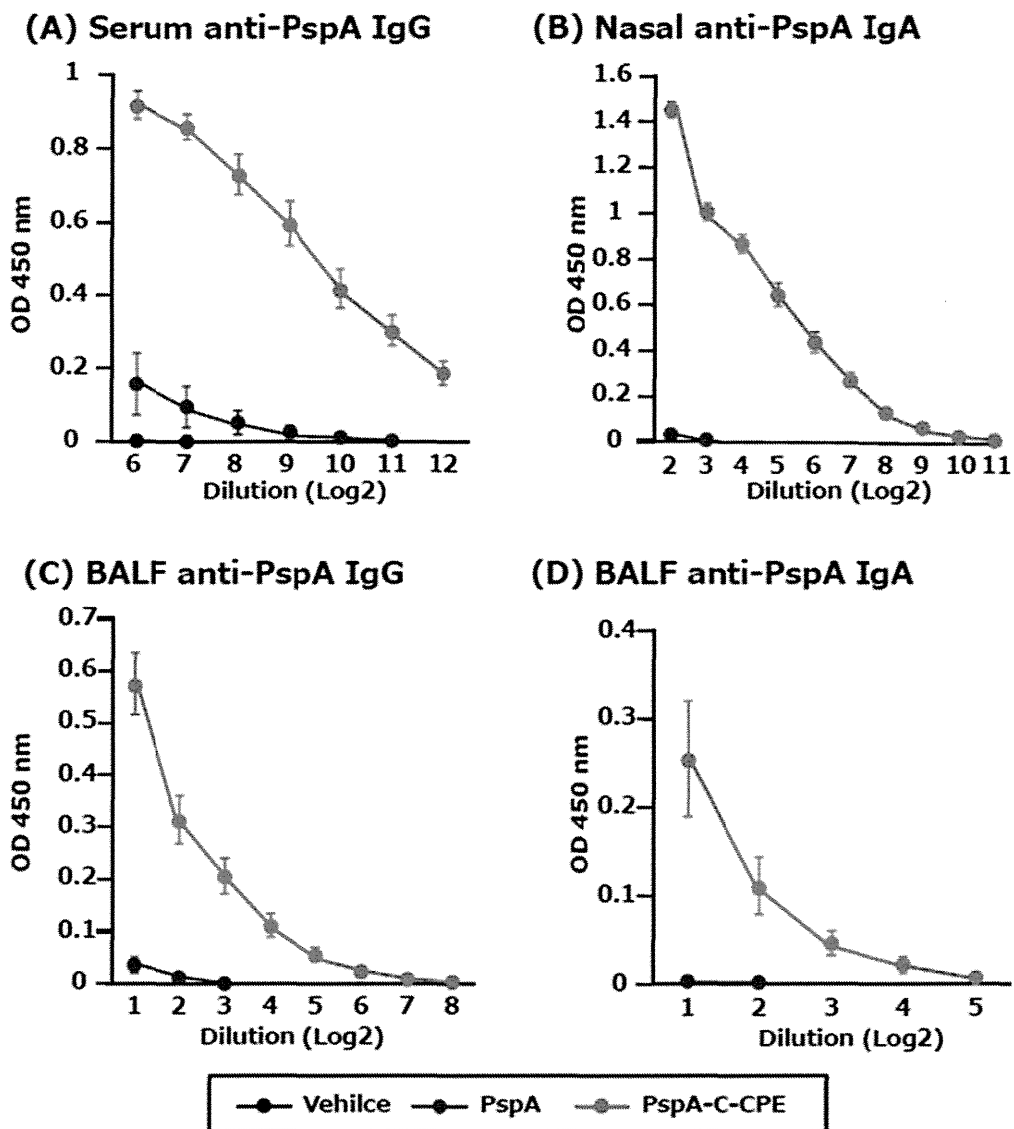


図1 PspA-C-CPEによる免疫誘導を検証したところ、PspAとC-CPEとの融合体として免疫した群において、PspA特異的抗体産生の誘導増強が認められた。(n=4または5)

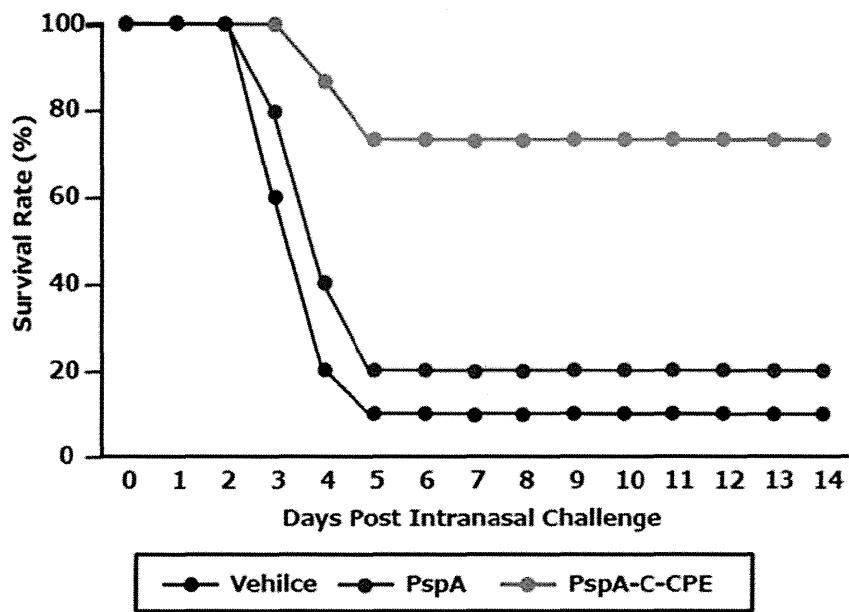


図2 PspAを免疫したマウスに*S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/40 μ l)を麻酔下で呼吸器感染させ、肺炎球菌に対する防御効果を検証したところ、PspA-C-CPE融合体として免疫した群において強い防御効果が認められた。(n=10または15)

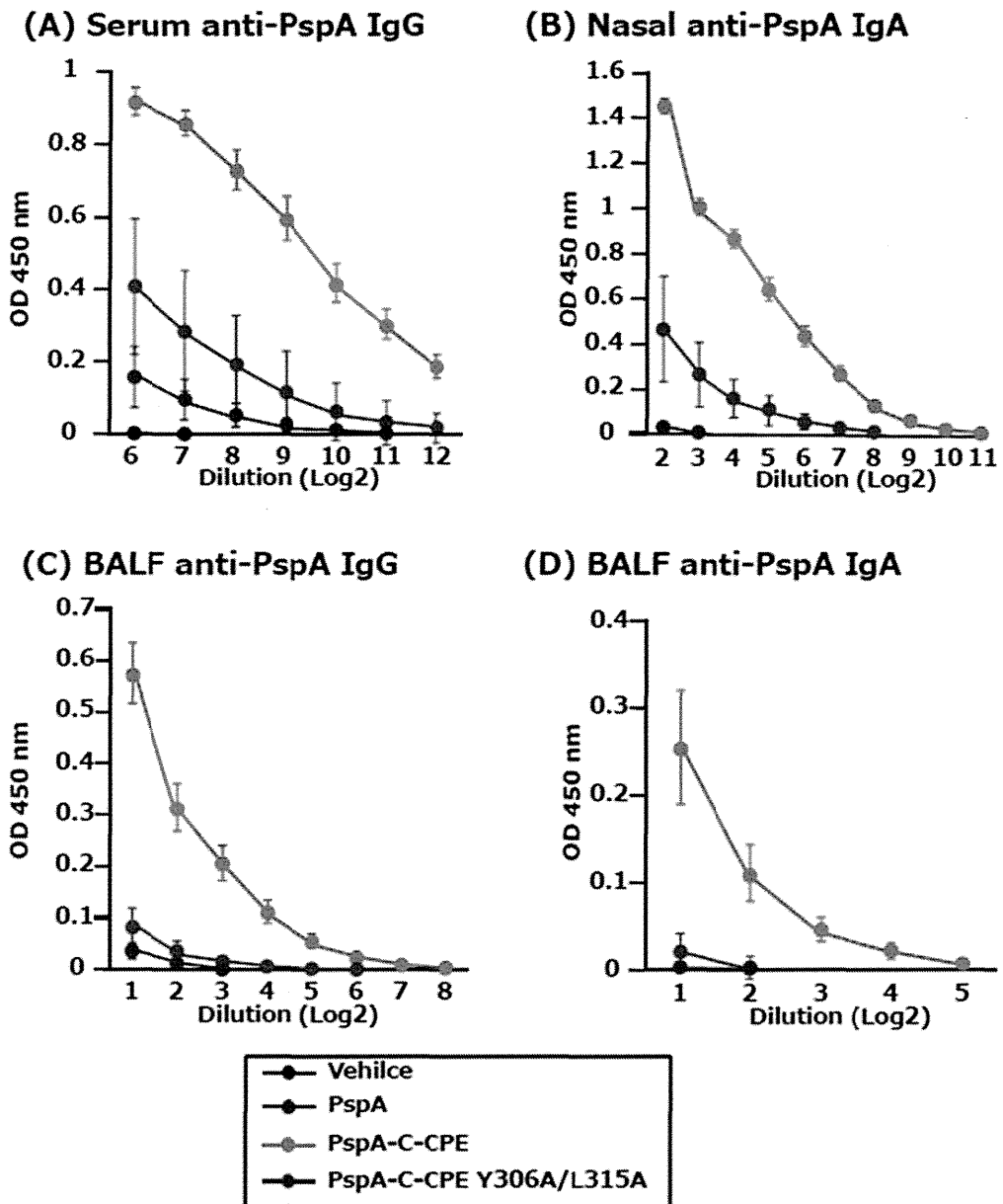
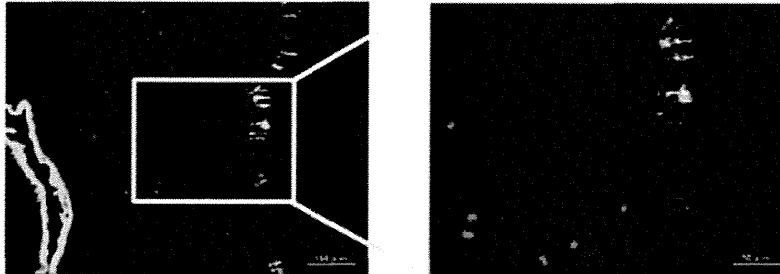
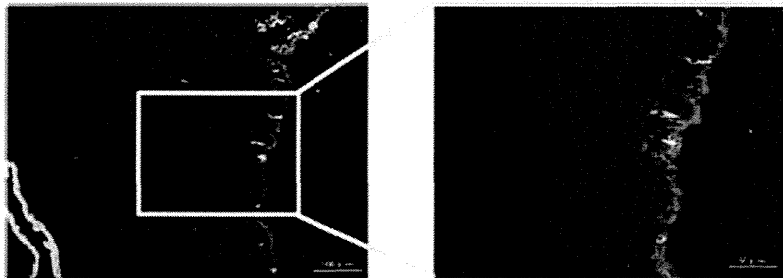


図3 Claudi-4に対する結合性を欠失した変異型C-CPE (C-CPE-Y306A/L315A)による免疫応答を検証したところ、野生型C-CPEを用いた場合と比べ、抗体産生誘導能が低下することが示された。(n=4または5)

(A) PspA alone



(B) PspA-C-CPE



(C) PspA-C-CPE Y306A/L315A

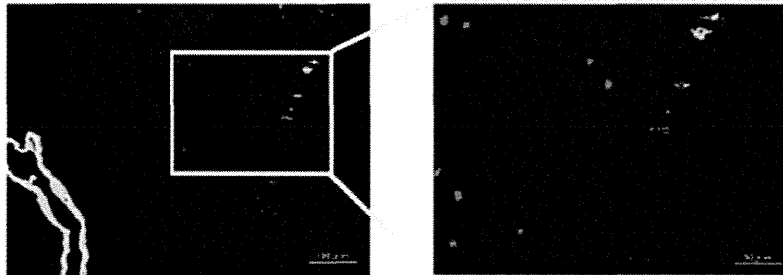
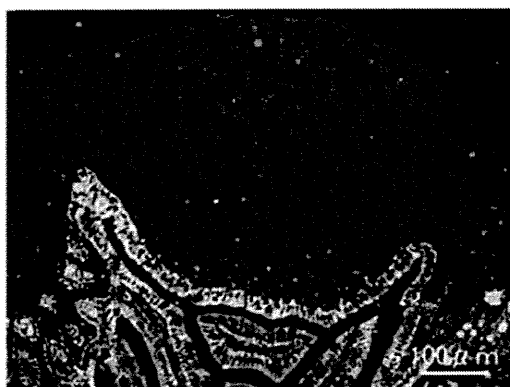
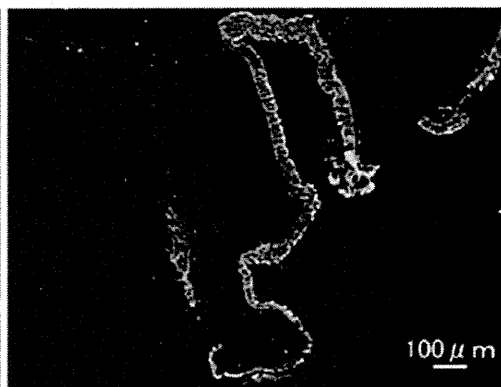


図4 PspA (A)、PspA-C-CPE (B)、PspA-C-CPE Y306A/L315A (C)のNALTへの結合性を検証したところ、PspA-C-CPEはM細胞を含むNALT上皮細胞に結合していたが、その他ではほとんど上皮細胞層への結合は認められなかった (赤: Claudin-4、緑: M細胞、青: DAPI)。

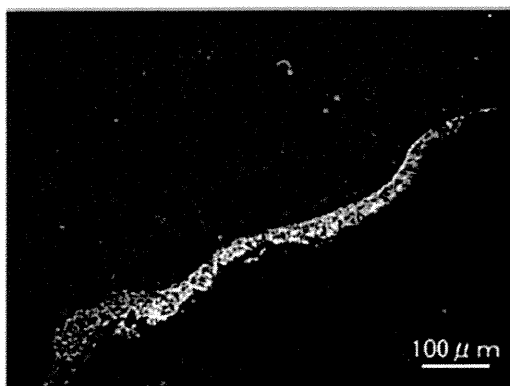
(A) パイエル板



(B) NALT



(C) 気道



(D) 大腸

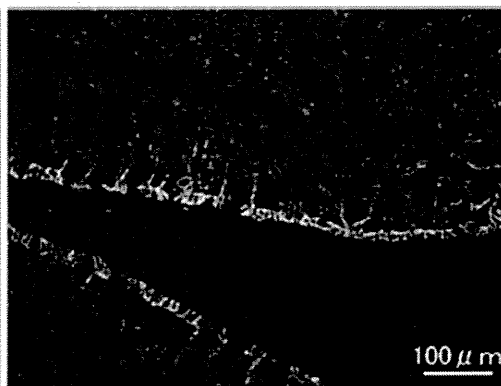


図5 Claudin-4抗体 (5D12)のパイエル板 (A)、NALT (B)、気道 (C)、大腸 (D)への結合性を検証したところ、上皮細胞へ結合していた。パイエル板やNALTにおいてはM細胞への結合も認められた。(赤: Claudin-4、緑: M細胞、青: DAPI、水色: EpCAM)

DNA メチル化による血管内皮細胞特異的遺伝子発現制御

研究分担者 岡田 欣晃 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

タイトジャンクション関連タンパク質結合物質 (binder) が血液脳関門の物質透過性に与える影響を *in vitro* で簡便に評価するための実験系構築を行った。血液脳関門の機能には、Claudin-5 等のタイトジャンクション形成タンパク質を発現する血管内皮細胞が重要な役割を担っていることから、簡便評価系としてヒト正常内皮細胞を用いた血管透過性評価系の利用を考えた。まず、内皮細胞を播種し経内皮電気抵抗値を測定する解析から、播種後、3~7日目にタイトジャンクションが形成された安定な内皮細胞の層が形成されることが明らかになった。また、この期間に血管透過性を亢進することが知られている TNF α を処置すると、透過性亢進が見られ本評価系が良好に機能することが示された。さらに、本評価系を用いて開発中のタイトジャンクション関連タンパク質の binder の評価を行い、血管透過性亢進活性がある可能性を示した。

行い 48 時間 TEER の測定を行った。

A. 研究目的

本プロジェクトではタイトジャンクション関連タンパク質を標的とした血液脳関門透過性制御物質の開発を目指している。今回我々は、開発された結合物質の血液脳関門制御能を簡便に評価する実験系を構築すべく、ヒト内血管内皮細胞を用いた血管透過性評価系の構築を行った。本評価系は低コストかつ簡便であり、血液脳関門制御活性の初期スクリーニング系として有用であると考えられる。

B. 研究方法

B-1. 血管透過性評価系の構築

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) をセルカルチャーインサートに播種し、経内皮電気抵抗値 (TEER) を 24 時間毎に 8 日間測定した。また、HUVEC を播種後 3 日目に、TNF α で処理を

B-2. 構築した評価系を用いた新規 binder 評価

HUVEC を播種後 3 日目に、開発中のタイトジャンクション関連タンパク質に結合する binder で処理を行い 48 時間 TEER の測定を行った。

C. 研究結果

C-1. 血管透過性評価系の構築

HUVEC を播種後、3 日目に TEER は最大値を示し、その後、7 日目まで安定に高値が維持されていた (Fig. 1)。この結果から、HUVEC 播種後、3-7 日の間は、タイトジャンクション形成による内皮細胞の安定な層が形成されていることが示されたため、以後、透過性評価は細胞播種後 3 日目から行うことにした。さらに、この評価系を用いて物質が血管透過性に与える影響を正しく評価できるかを検討するため、既知の血管透過

性亢進を誘導する因子である TNF α で処理したところ、添加 0.5 時間後から 48 時間後にかけて TEER の有意な減少がみられた (Fig. 2)。この結果から、本評価系で物質が血管透過性に与える影響を良好に評価できることが示された。

C-2. 構築した評価系を用いた新規 binder 評価

現在、近藤らのチームにより開発中であるタイトジャンクション構成タンパク質への binder が血管透過性に与える影響を、構築した評価系を用いて解析した。その結果、binder を添加し 24 時間後の TEER は binder 添加しない場合に比べ約 50% と顕著に減少していた。この結果から、開発中の binder が血管透過性亢進能を有する可能性が示された。

D. 考察

今回構築した評価系は、既知の血管透過性亢進因子を良好に評価できたことから、血液脳関門制御分子の簡便スクリーニング系として利用できることが示唆された。今後、TEER のみならず、種々の分子量を持つ色素の透過性を指標に行っていくことで、どれくらいの分子量の物質を透過させるかの具体的な情報を得られる系へと改良していく必要がある。また、開発中のタイトジャンクション関連タンパク質の binder が血管透過性を亢進させる結果が得られたことから、binder の開発も良好に進んでいることが示唆された。

E. 結論

今回の検討により、血液脳関門制御分子の簡便スクリーニング系として、ヒト内皮細胞を用いた血管透過性評価系を構築した。さらに本評価系を用いて、開発中のタイトジャンクション関

連タンパク質 binder が血液脳関門制御活性を持つ可能性があることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Okada Y, Watanabe M, Nakai T, Kamikawa Y, Shimizu M, Fukuhara Y, Yonekura M, Matsuura E, Hoshika Y, Nagai R, Aird WC, Doi T. RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J Thromb Haemost.* (9):1742–50 (2013)

2) Yoshikawa M, Mukai Y, Okada Y, Tsumori Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Aird WC, Yoshioka Y, Okada N, Doi T, Nakagawa S. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody–drug conjugates based on the rapid isolation of the anti–Robo4 cell–internalizing antibody. *Blood.* 121(14):2804–13 (2013)

3) Yakura Y, Ishihara C, Kurosaki H, Kazuki Y, Komatsu N, Okada Y, Doi T, Takeya H, Oshimura M. An induced pluripotent stem cell–mediated and integration–free factor VIII expression system. *Biochem Biophys Res Commun.* 431(2):336–41 (2013)

2. 学会発表

1) 岡田欣晃、血管内皮細胞特異的レセプター Robo4 の発現制御メカニズムの解析、第 14 回 Pharmaco–Hematology シンポジウム、2013 年 6 月 1 日、日本薬学会長井記念ホール(東京)

2) 酒井美貴、真鍋詩織、山本奈那、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の IL-6 産生への寄与の解析—敗血症発症メカニズムの解析—、第 63 回日本薬学会近畿支部

総会・大会、2013年10月12日、同志社女子大学京田辺キャンパス(京都)

3) 柿内康司、西山侑児、鈴木綾乃、舟橋伸昭、岡田欣晃、土井健史、Robo4 プロモーターの組織特異的なDNAメチル化パターンが決定されるメカニズムの解析—DNAメチル化による血管内皮細胞特異的な遺伝子発現制御—、第63回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013年10月12日、同志社女子大学京田辺キャンパス(京都)

4) 真鍋詩織、酒井美貴、山本奈那、Aird WC、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 のノックダウンが炎症応答遺伝子発現に与える影響の解析、2014年3月27-30日日本薬学会第134年会(熊本)

5) 田中亨、Aird WC、岡田欣晃、土井健史 Robo4 近位プロモーターの DNAメチル化の Robo4 遺伝子発現への寄与 2014年3月27-30日、日本薬学会第134年会(熊本)

6) 山本奈那、酒井美貴、真鍋詩織、Aird WC、山本剛史、小比賀聡、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の発現抑制核酸を用いた敗血症治療の可能性、2014年3月27-30日、日本薬学会第134年会(熊本)

7) 白倉圭佑、山内沙織、Aird WC、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の過剰発現が炎症応答に及ぼす影響の解析、2014年3月27-30日日本薬学会第134年会(熊本)

G.知的所有権の出願・取得状況

該当なし

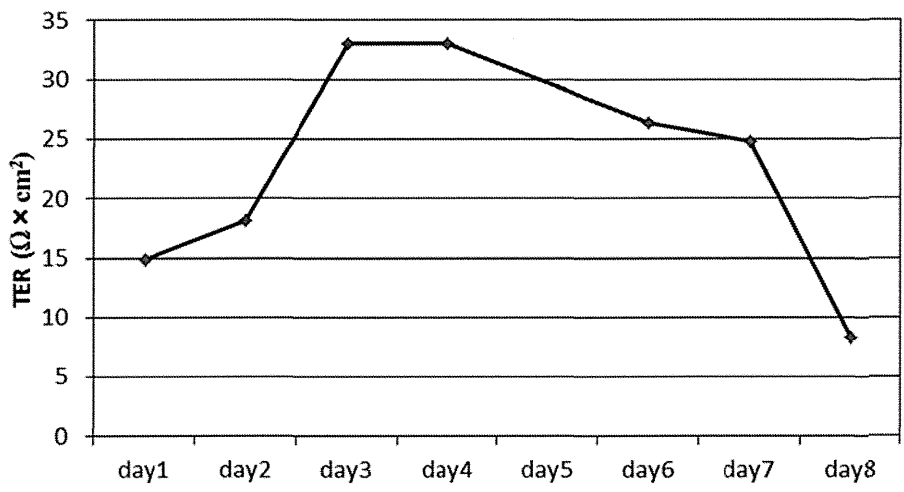


Fig.1

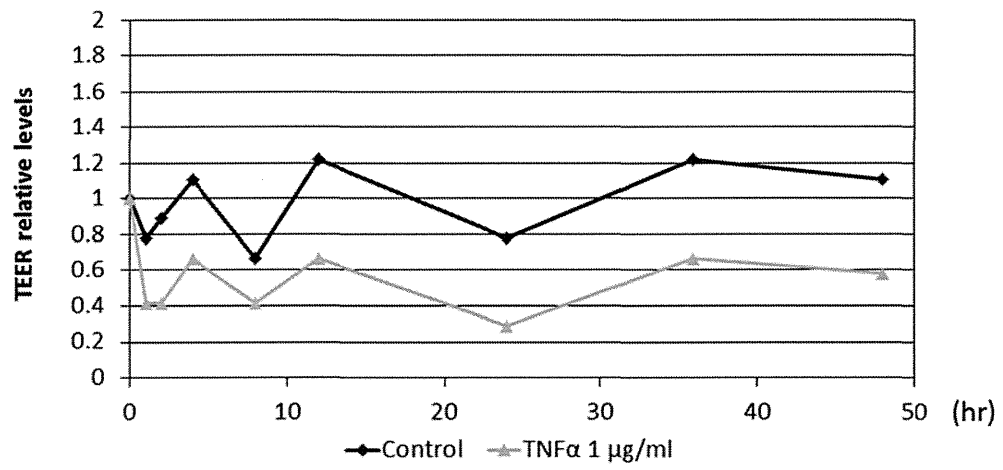


Fig.2

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
土山遼 長瀬翔太郎、八木清仁、近藤昌夫	タイトジャンクションを標的とした薬物吸収促進技術	寺田弘 中川晋作	応用が広がるDDS-人体環境から農業・家電まで	株式会社エヌ・ティー・エス	東京	2012	103-110
Kuniyasu H, Luo Y, Fujii K, Ohmori H	HMGB1 alters the immunity and metabolism of cancer-burden patients.	Sunitha M	Current research in cancer 7	Research Media	Kerala, India	2013	1-7
Sasaki T, Yamashita Y, Kuniyasu H	Significance of EGFR and the targeting in gastroenterological cancers.	Sunitha M	Current research in cancer 7	Research Media	Kerala, India	2013	13-19
Sasahira T, Kuniyasu H	Molecular biology of oral cancer	Kirita T, Omura K	Oral Cancer - Diagnosis and Therapy	Springer	Tokyo Japan		in press
多田稔, 石井明子, 川崎ナナ	第4章 第2節、「ヒト初回投与量設定方法ーバイオ医薬品ー」		新薬開発にむけた臨床試験(第I~III相臨床試験)での適切な投与量設定と有効性/安全性評価	サイエンス&テクノロジー	東京	2013	72-86
國澤 純	粘膜における免疫ホメオスタシス	谷口克、宮坂昌之、小安重夫	標準免疫学	医学書院	東京	2013	197-205

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida, T.; Kondoh, M.; Mizuguchi H.; Yagi, K.	Development of an adenovirus vector containing a hepatitis C virus expression cassette and its application	Yakugaku Zasshi	133	305-311	2013
Yamagishi Y.; Watari A.; Hayata Y.; Li X.; Kondoh M.; Tsutsumi Y.; Yagi K.	Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice	Pharmazie	68	178-82	2013
Iida, M.; Yoshida, T.; Watari, A.; Yagi, K.;	A baculoviral display system to assay viral entry	<i>Biol Pharm Bull,</i>	36	1867-1869	2013
Li, X.; Saeki, R.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M.	Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin.	<i>Eur J Pharm Sci,</i>	52	1532-1537	2014
Iida, M.; Yagi, K.; Kondoh, M.	The cutting edge of claudin-targeted drug development.	<i>Membrane</i>	38	174-180	2013
Nagase, S.; Doyama, R.; Yagi, K.; Kondoh, M.	Recent advances in claudin-targeting technology.	<i>Biol Pharm Bull,</i>	36	708-714	2013
Sakurai, F.; Kondoh, M.	New approaches to drug discovery research and medical treatment using viruses-Viruses are valuable materials-	Yakugaku Zasshi	133	289	2013

Yamagishi, Y.; Watari, A.; Hayata, T.; Li, X.; Kondoh, M.; Yoshioka, Y.; Tsutsumi, Y.; Yagi, K.	Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice	<i>Nano Res Lett</i>	8	395	2013
Sasaki T, Kuniyasu H, Yamashita Y	The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment.	<i>Biomed Res Int</i>	546318	http://dx.doi.org/10.1155/2013/546318 , 2013	2013
Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK, Kurihara M, Kirita T, Kuniyasu H	Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma.	<i>Clin Exp Metasta</i>	30	165–176	2013
Luo Y, Chihara Y, Fujimoto K, Sasahira T, Kuwada M, Fujiwara R, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H	High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy	<i>Eur J Cancer</i>	49	741–751	2013
Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Ohmori H, Fujii K, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H	Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma.	<i>Hum Pathol</i>	44	1098–1106	2013
Goto K, Kawahara I, Luo Y, Obata K, Misawa H, Ishikawa T, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M	In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine.	<i>PLOS One</i>	8	e54814	2013
Kurihara M, Kirita T, Sasahira T, Ohmori H, Matsushima S, Yamamoto K, Bossert AK, Kuniyasu H	Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma.	<i>Br J Cancer</i>	108	1460-1469	2013

Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H, Hirao Y	Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis.	<i>BMC Cancer</i>	13	275	2013
Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y	Increased phosphorylation of AKT in high-risk gastric mucosa	<i>Anticancer Res</i>	33	3295-3300	2013
Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y	AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer.	<i>Pathobiology</i>	81	36-41	2014
Aoki K, Obata K, Kurihara M, Kuniyasu H, Kirita T, Takaki M	Clinically observed taste disorder-related peripheral mechanism in an anticancer drug, S-1 administered rats.	<i>Int J Clin Oncol</i>			in press
Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, Sasaki T, Shimbo K, Eto S, Kato Y, Miyano H, Kobayashi T, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H	Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository.	<i>Cancer Res</i>	74	330-340	2014
Sasaki T, Kuniyasu H, Yamashita Y	The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment.	<i>Biomed Res Int</i>	546318	http://dx.doi.org/10.1155/2013/546318 , 2013	2013

Maehama T Fukasawa M Date T Wakita T Hanada K	A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication.	Biochem Biophys Res Commun	440	150-156	2013
Fukasawa M Cornea A Varlamov O	Selective control of SNARE recycling by Golgi retention	FEBS Letters	587	2377-2384	2013
Murakami Y Fukasawa M Kaneko Y Suzuki T Wakita T Fukazawa H.	Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling.	Microbes and Infection	16	114-122	2014
Iwamoto M Watashi K Tsukuda S Aly HH Fukasawa M Fujimoto A Suzuki R Aizaki H Ito T Koiwai O Kusuhara H Wakita T.	Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP	Biochem. Biophys. Res. Commun.	443	808-813	2014
石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ	「抗体医薬品の分子設計」	薬剤学	74(1)	1-8	2014
Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa*, and H. Kiyono	Skin-barrier homeostasis through Cyp26b1-mediated inhibition of ATP-dependent mast cell activation by fibroblasts	<i>Immunity</i>			2014 (accepted)

S. Kishino, M. Takeuchia, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, and J. Ogawa	Novel fatty acid metabolism in gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	110	17808–17813	2013
T. Obata, N. Shibata, Y. Goto, I. Ishikawa, S. Sato, J. Kunisawa*, and H. Kiyono	Critical role of dendritic cells in T-cell retention in the interfollicular region of Peyer's patches	<i>J Immunol</i>	191	942–8	2013
Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, R.S. Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, J.R. McGhee, K. Fujihashi	Potential roles of CCR5 ⁺ CCR6 ⁺ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses	<i>PLoS One</i>	8	e60453	2013
I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono	Nanogel-based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by Pneumococcus	<i>Infection and Immunity</i>	81	1625–34	2013
T. Kusu, H. Kayama, M. Kinoshita, S. G. Jeon, Y. Ueda, Y. Goto, R. Okumura, H. Saiga, T. Kurakawa, K. Ikeda, Y. Maeda, J. I. Nishimura, Y. Arima, K. Atarashi, K. Honda, M. Murakami, J. Kunisawa, H. Kiyono, M. Okumura, M. Yamamoto, and K. Takeda	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine	<i>J Immunol</i>	190	774–83	2013
T. Nagatake, and J. Kunisawa	Unique functions of mucosa-associated lymphoid tissues as targets of mucosal vaccines	<i>Curr Topics Pharmacol</i>			2014 (in press)

A. Lamichhane, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development	<i>J Gastroenterol Hepatol</i>	28	18-24	2013
J. Kunisawa and H. Kiyono	Vitamin-mediated regulation of intestinal immunity	<i>Front in Immunol</i>	4	189	2013
M. Kamioka, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Herbal medicine-initiated approaches for the elucidation of immunological network in the intestine	<i>J Tradition Med</i>	30	56-61	2013
長竹貴広、國澤 純	脂質を介した腸管免疫システムの制御	<i>医学のあゆみ</i>			2014 (印刷中)
鈴木英彦、國澤 純	微生物の有する粘膜組織指向性を用いた粘膜ワクチンデリバリー開発への展望	<i>薬学雑誌</i>			2014 (印刷中)
國澤 純	東洋医学を起点とした粘膜免疫の基礎的解明と病態制御への展開	<i>日本医科大学医学雑誌</i>	9	214-217	2013
鈴木英彦、國澤 純	ビタミンを介した腸管免疫の制御と疾患	<i>細胞</i>	45	12-16	2013
倉島洋介、國澤 純、清野 宏	粘膜マスト細胞と疾患	<i>最新医学</i>	68 巻 3 月増刊号	704-727	2013
田尻 創、清野 宏、國澤 純	腸管免疫疾患における脂質メディエーター	<i>遺伝子医学 MOOK</i>	24	241-245	2013
Yakura Y Ishihara C Kurosaki H Kazuki Y Komatsu N Okada Y Doi T Takeya H Oshimura M	An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	431(2)	336-341	2013
Yoshikawa M Mukai Y Okada Y Tsumori Y Tsunoda S Tsumumi Y Aird WC Yoshioka Y Okada N Doi T Nakagawa S.	Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody.	<i>Blood.</i>	121(14)	2804-2813	2013