

11) 長谷川秀樹: ワクチン対策の現状と課題
インフルエンザワクチン 化学療法の領
域 (0913-2384)29 巻 2 号 Page230-234
2013.01

2. 学会発表

国際学会

- 1) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Elly van Riet, Shi-ichi Tamura, Kazuyuki, Ikeda, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Takeshi Kurata: ANTIBODY RESPONSES IN SERUM AND NASAL MUCUS INDUCED BY THE INTRANASAL VACCINATION WITH A WHOLE-VIRION INACTIVATED VACCINE OF A(H5N1) VIRUS IN HEALTHY NAÏVE HUMAN ADULTS. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 2) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Shin-ichi Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa: ANTIBODY RESPONSES INDUCED BY INTRANASAL VACCINATION OF A WHOLE INACTIVATED INFLUENZA VIRUS IN MICE PREVIOUSLY INFECTED OR VACCINATED. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 3) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainai, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa: IMPACT OF THE QUATERNARY STRUCTURE OF HUMAN SECRETORY-IGA ON NEUTRALIZATION

POTENCY TO INFLUENZA A VIRUS IN UPPER RESPIRATORY TRACT. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone Colorado, USA, January 2014.

国内学会

- 1) 長谷川秀樹: 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン. (Intranasal Influenza Vaccine as a vaccine for next generation) 第86回日本細菌学会総会(幕張) 2013年3月
- 2) 岡田清吾, 長谷川俊史, 長谷川秀樹, 相内章, 池本健三, 佐々木功典, 戸田昌一, 調恒明, 市山高志: インフルエンザ A/H1N1 2009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析. 日本小児科学会学術集会(広島) 2013年4月
- 3) 長谷川秀樹: ワクチン研究の最前線 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチンの開発. 日本薬剤学会第28年会(名古屋) 2013年5月
- 4) 宮崎将也, 王磊, 長谷川秀樹, 津田真寿美, 西原広史, 田中伸哉: ヒト細胞内蛋白質 NS1BP の機能解析. 第102回日本病理学会総会(札幌) 2013年6月
- 5) 中島典子, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹: 感染病理学の新展開 新しい迅速 in situ ゲノム検出法の感染病理への応用. 第102回日本病理学会総会(札幌) 2013年6月
- 6) 片野晴隆, 佐藤由子, 中島典子, 福本瞳, 鈴木忠樹, 黒田誠, 長谷川秀樹: 感染病理学の新展開 病理検体からの不明病原体検出法の最先端. 第102回日本病理学会総会(札幌) 2013年6月

- 7) 長谷川秀樹, 中島典子: 炎症・免疫機構の新基軸と疾病の病理 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ 剖検例からの検討. 第102回日本病理学会総会(札幌) 2013年6月
- 8) 長谷川秀樹: 良く効くインフルエンザワクチンを目指して. 第54回日本臨床ウイルス学会(倉敷) 2013年6月
- 9) 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了: 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析 新型と季節性インフルエンザの比較. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会(札幌) 2013年10月
- 10) 脇口宏之(山口大学 大学院医学系研究科小児科学分野), 岡田清吾, 長谷川秀樹, 相内章, 戸田昌一, 調恒明, 長谷川俊史: 気管支喘息(病態)・免疫不全 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会(札幌) 2013年10月
- 11) 長谷川秀樹, 相内章, 田村慎一, 鈴木忠樹, 浅沼秀樹, 小田切孝人, 田代真人, 倉田毅: 高病原性鳥インフルエンザウイルスA(H5N1)全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの効果. 第17回日本ワクチン学会学術集会(津) 2013年11月
- 12) 鈴木忠樹, 川口晶, 相内章, 田村慎一, 小田切孝人, 田代真人, 長谷川秀樹: 経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体IgA抗体のウイルス感染防御における役割. 第17回日本ワクチン学会学術集会(津) 2013年11月
- 13) 相内章, 田村慎一, 鈴木忠樹, 小田切孝人, 田代真人, 倉田毅, 長谷川秀樹: 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢, 性別あるいは副反応が与える影響. 第17回日本ワクチン学会学術集会(津) 2013年11月
- 14) 渡辺登喜子, 今井博貴, 村上晋, 中島典子, 富田有里子, 山西誠也, 浦木隆太, 西藤岳彦, 内田裕子, 長谷川秀樹, 田代真人, 河岡義裕: 中国でヒトから分離されたH7N9鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
- 15) 中島典子, 佐藤由子, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹: 重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
- 16) 泉地恭輔, 相内章, 鈴木忠樹, 浅沼秀樹, 梁明秀, 長谷川秀樹: 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
- 17) 池田千将, 伊藤良, 相内章, 鈴木忠樹, 田村慎一, 荒尾雄二郎, 田代真人, 浅沼秀樹, 長谷川秀樹: 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
- 18) 相内章, 浅沼秀樹, 鈴木忠樹, 原田勇一, 田村慎一, 田代真人, 長谷川秀樹: 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
- 19) 川口晶, 鈴木忠樹, 相内章, 佐藤由子,

永田典代、田代真人、長谷川秀樹：Nc/Nga
マウスを用いた喘息発作によるインフル
エンザ感染症重症化モデルの炸裂．第 61
回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013
年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

なし

2. 実用新案登録

なし

経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

研究分担者 奥野 良信 (一財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所 所長

研究要旨 前年度には 2012-2013 シーズン用季節性インフルエンザウイルスから免疫応答評価用のワクチン原液を作製した。さらに、ワクチン原液からヒトへの投与を想定した経鼻投与用試作ワクチン製剤を作製し、非臨床試験（ラットを用いた毒性・生殖発生試験、及びサルを用いた安全性薬理試験）を開始した。今年度も非臨床試験を継続し、年度内に完了した。1 回あたりの投与量は、被験動物の体重あたりで予定臨床投与用量の 10 倍以上に相当するものであったが、被験ワクチンに起因する有害事象は認められなかった。また、同じワクチン原液を用いた経鼻投与型ワクチン製剤で、マウスを用いて有効性と持続性を調べたところ、実用上十分と見られる程度の免疫応答が認められた。

A. 研究目的

- (1) 鼻粘膜における経鼻インフルエンザワクチンの有効性を判定する基準を作るための材料の提供
- (2) 有効な経鼻インフルエンザワクチンの開発に寄与する

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm09
- ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
- ・ B/Wisconsin/01/2010 (山形系統)

B. 研究方法

経鼻投与用ワクチン製剤の GLP 試験

昨年度は、作製した季節性不活化全粒子インフルエンザワクチン原液に粘稠剤としてカルボキシビニルポリマー (CVP) 基剤を加え、非臨床試験用の経鼻投与型季節性インフルエンザワクチン製剤を調製した。安全性を確認するため、各株の HA 蛋白含量は、臨床投与予定量の 3 倍の濃度である $90 \mu\text{g HA/株/ mL}$ とした。ワクチン製剤に含まれるワクチン株ウイルス抗原は下記の 3 株である。

上記ワクチン製剤を被験薬とし、ラットを用いた毒性試験（単回投与、反復投与）、生殖発生毒性試験（受胎能および着床までの初期胚発生、出生前および出生後の発生並びに母体の機能、胚・胎児発生に関する試験）、及びサルを用いた安全性薬理試験（中枢神経系に及ぼす影響、覚醒サルの心血管系および呼吸系に及ぼす影響）を実施した。本試験は、三菱化学メディエンス㈱に実施を依頼して行った。被験物質の 1 回あたりの投与量は、成人の体重 (50 kg) あたりの予定臨床投与量 ($15 \mu\text{g HA/株}$) と比較すると、ラット、カニクイザルとも 10 倍以上に相当するものとした。

経鼻投与用ワクチン製剤の有効性・持続性検討

経鼻投与型インフルエンザワクチンの持続性と有効性を確認するため、上記の単味ワクチン原液を用いて3混ワクチン原液とした後、CVP 基剤を加えて経鼻投与型季節性インフルエンザワクチン製剤を作製し、マウスに経鼻投与して免疫応答を確認した。投与群として、低用量、中用量、高用量の3群を設けた。また、対照として中用量の皮下投与群と無投与群を設けた。投与は3週間間隔で2回実施し、2回目の投与から2週間ごとに24週後まで、投与群の一部のマウスから全採血及び鼻腔洗浄液の採取を実施した。

採血した血清からは中和抗体価を、鼻腔洗浄液からは特異的IgA-ELISA抗体価を測定した。中和抗体価は血清の希釈倍数を10倍としたところから測定し、陰性の検体については抗体価5として集計した。鼻腔洗浄液の特異的IgA-ELISA抗体価については、希釈倍率を2倍としたところから測定し、有意な発色が得られた最大の希釈倍数を抗体価として表記した。陰性の検体については抗体価1として集計した。

(倫理面への配慮)

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号、平成18年6月1日)に基づいた試験を行った。

C. 研究結果

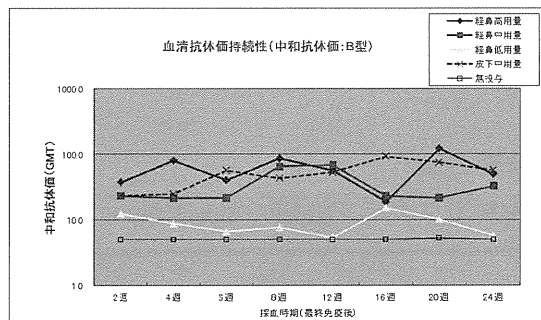
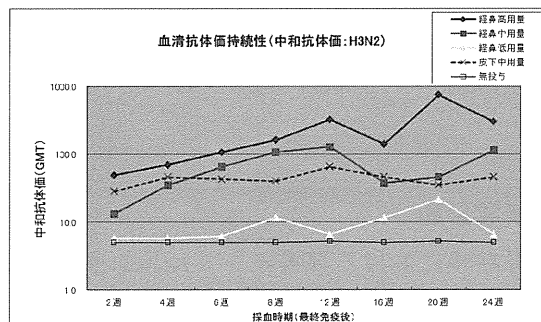
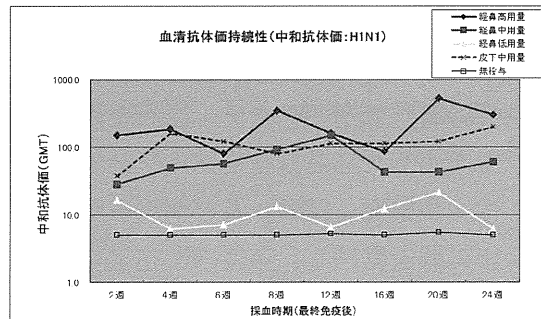
経鼻投与用ワクチン製剤のGLP試験

実施したすべての試験において、被験薬投与群と対照群(生理食塩液投与群)との間に有意な差は無く、被験薬に起因する有害な影響は認められなかった。

経鼻投与用ワクチン製剤の有効性・持続性検討

血清の中和抗体価

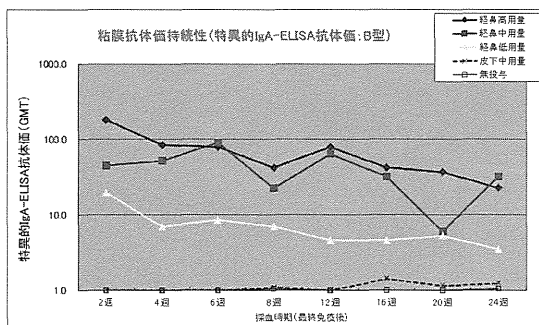
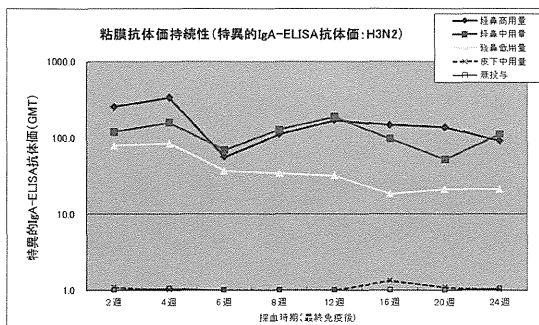
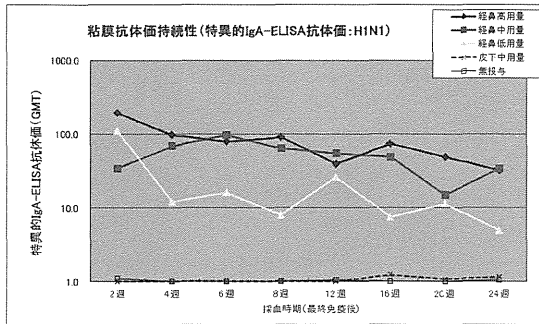
血清の中和抗体価は2回目の接種から24週目まで持続していることが確認された。また、中用量において、経鼻投与群の抗体価は皮下投与群と同程度であった。



鼻腔洗浄液の特異的IgA-ELISA抗体価

鼻腔洗浄液の特異的IgA-ELISA抗体価は徐々に低下する傾向は見られたが、中用量及び高用量のワクチンを経鼻投与した群においては、2回目の投与から24週後でも32倍(経験的に感染防御効果が認められる抗体価)以

上の抗体価が認められた。皮下投与群及び無投与群では特異的IgA-ELISA抗体の反応は認められなかった。



D. 考察

季節性インフルエンザに対するワクチン原液を作製し、非臨床試験用として人体への投与を想定した剤型の試作ワクチン製剤を作製し、GLP試験を実施したところ、被験ワクチンに起因する有害事象は認められなかった。また、マウスを用いた有効性・持続性検討において、液性免疫（血清の中和抗体応答）においては、経鼻投与型ワクチンは同量の皮下投与型ワクチンと同程度の有効性を有して

いた。さらに、粘膜免疫（鼻腔洗浄液における特異的IgA-ELISA抗体価）においては、経鼻投与群においてのみ免疫応答の誘導が認められた。さらに、季節性インフルエンザウイルスの流行期間をカバーできるだけの有効性が持続することも確認された。

以上のことから、本研究において作成した試作ワクチンの有効性・安全性は実用的な水準に達しているものと考えられた。

E. 結論

本研究において作製した、全粒子インフルエンザワクチン原液、及び経鼻投与用季節性インフルエンザワクチン製剤は

- (1) 十分な安全性を有していた。
- (2) 用法・用量・有効性・持続性の根拠となる成績が集積され、実用的な免疫応答を誘導できることが確認された。

以上のことから、本ワクチン製剤は、臨床応用での有用性が望める次世代ワクチン候補として期待できるものであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

経鼻インフルエンザワクチン接種で誘導される抗体レパートリーの解析

研究分担者 田代 真人（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）

協力研究者 Elly van Riet（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター、感染病理部）

相内 章（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）

鈴木忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨 経鼻インフルエンザワクチンは、分泌型 IgA 抗体を気道粘膜上に誘導し感染自体を防ぐことが可能であることから、次世代インフルエンザワクチンとしての実用化が期待されている。近年、亜型を超え広範な中和活性を示す抗体の存在が明らかとなり、そのような抗体を誘導するワクチンの開発が望まれている。本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻ワクチン接種により誘導される抗体の解析を行った。経鼻ワクチン接種の回数依存的に末梢血中の抗体産生形質細胞数が増加し、IgG 抗体産生形質細胞と比較して IgA 抗体産生形質細胞が優位であることが明らかとなった。さらに、誘導された抗体の多様性を解析した結果、抗体の H 鎖において最も多様性に富む相補性決定領域 (CDR3) は、IgG 抗体と比べ IgA 抗体の方でその長さに幅があることが明らかとなった。加えて、現在報告されている広範な中和活性を示す抗体の多くが V 遺伝子として対立遺伝子 VH1-69 から構成されるが、経鼻インフルエンザワクチン接種でも同対立遺伝子を用いる抗体の存在が明らかとなり、広範な中和活性を示す抗体が誘導されている可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

注射により接種される現行インフルエンザワクチンは、血中の IgG 抗体を誘導することで、感染に伴う発症および重症化の防止に有効である。現在、実用化に向けて研究が進められている経鼻インフルエンザワクチンは、血中 IgG 抗体に加えて感染の場となる上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導するため、感染自体を阻止することができる。実用化に向け、経鼻イン

フルエンザワクチンにより誘導される免疫応答を詳細に解析することは、その有効性を明確にする上で非常に重要である。

近年、インフルエンザワクチン接種あるいは自然感染で誘導される抗体の中には、抗原となるウイルス株のみならず亜型を超えて中和活性を示す抗体が存在することが明らかになってきた。これら広範な中和活性を示す抗体 (broadly Neutralizing Antibody, bNAbs) の

多くは、抗体H鎖の可変領域を形成する遺伝子の一つであるV遺伝子として対立遺伝子VH1-69を使用していることが多い。また、これら抗体の多くが、インフルエンザウイルスの主要抗原となるヘマグルチニン(HA)において、変異が入りにくく非常に安定なHAの幹部分(stalk領域)を認識することが知られている。経鼻インフルエンザワクチン接種において、このような抗体が誘導されるか否かは明らかになっていない。経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体レパトリーの解析は、経鼻インフルエンザワクチン開発上、非常に重要で有ると考える。

本研究では、本研究班研究代表者が実施する高病原性鳥インフルエンザウイルスA(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン臨床研究において、末梢血中に誘導される抗体のレパトリー解析を行った。

B. 研究方法

1) ワクチン接種と末梢血リンパ球の回収

本研究班の代表研究者が行う高病原性鳥インフルエンザウイルスA(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン臨床研究において、被験者である健常人ボランティアのうち、19名(男性17名、女性2名)にワクチン接種後の末梢血の提供をお願いした。本臨床研究では、接種(片鼻250 μ l、計500 μ l)あたり45 μ gのヘマグルチニン(HA)を含有する不活化全粒子ワクチンIBCDC-RG2(A/Indonesia/5/05(H5N1)由来;阪大微生物病研究会)を3週間間隔で2回経鼻接種した。なお、本臨床研究では粘稠剤カルボキシビニルポリマー(CVP)添加の有無で2群を設けているが、本研究ではCVP添加の有無での比較は行っていない。初回ワクチン接種前(Day0)、初回

ワクチン接種7日後(Day7)ならびに2回目ワクチン接種7日後(Day28)に、末梢血を提供して頂き、血球分離溶液Lymphoprep™を用いて末梢血リンパ球を回収した。本臨床研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得ている。なお、19名の被験者には、末梢血中抗体産生形質細胞の抗体遺伝子解析に関する承諾を得ている。

2) 抗体産生形質細胞の単離

経鼻ワクチン接種により末梢血中に誘導される抗体産生形質細胞の割合の解析、ならびに抗体産生形質細胞の単離は、FACS Aria (BD Bioscience)を用いて行った。細胞表面マーカーCD2⁻、CD3⁻、CD4⁻、CD10⁻、CD20⁻、IgD⁻、CD19^{low}、CD27^{high}かつCD38^{high}の細胞集団を抗体産生形質細胞とした。末梢血リンパ球に占める抗体産生形質細胞の割合を測定すると同時に、単一細胞として分離・回収を行った。単一抗体産生形質細胞は、各ウェルに45 ngのキャリアRNAを含む滅菌水9 μ lを分注した96穴プレートに回収し、その後の遺伝子解析のサンプルとした。

3) 単一抗体産生形質細胞からのcDNA調製

単一細胞として分離・回収した抗体産生形質細胞からのcDNA調製は、T. Tiller *et al.* (J Immunol Methods, 2008)の報告に則り実施した。上述の各ウェルにSuperscript III RT、Random Hexmer、RNaseOUT(以上Invitrogen)ならびにdNTP mix (Qiagen)を含む6 μ lの混合液を添加し、50 $^{\circ}$ C 50分、85 $^{\circ}$ C 5分の反応を行うことでcDNAを調製した。

4) 抗体アイソタイプの決定

調製した2 μ lのcDNAを用いて各ウェルに単離された抗体H鎖のアイソタイプをReal-time PCRにより決定した。IgG、IgAおよびIgMの各

定常領域に対して TaqMan プローブとプライマーを準備した。IgG、IgA および IgM に対する TaqMan プローブは、それぞれ FAM、HEX および Cy5 による標識とした。QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix (Qiagen) を使用し、LightCycler480 (Roche) を用いて解析を行った。

5) 抗体可変領域遺伝子の増幅とシークエンス
T. Tiller *et al.* (J Immunol Methods. 2008) の報告に則り実施した。調製した 1 µl の cDNA に対して 11.5 µl の HotStarTaq polymerase (Qiagen)、dNTP mix および各抗体可変領域遺伝子を増幅するプライマーセットの混合液を添加し、1 回目の PCR 反応を行った。更にこの PCR 産物 1 µl に対して各遺伝子に対して更に内側に設計したプライマーセットを用いて 2 回目の PCR 反応を行った。いずれの PCR 反応においても、95°C 15 分、(94°C 30 秒、58°C 20 秒、72°C 60 秒) ×43 サイクル、72°C 2 分の条件で増幅を行った。

6) 抗体遺伝子の解析

得られた抗体 H 鎖ならびに L 鎖の可変領域遺伝子に関して、ウェブサイト IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)、IMGT (<http://www.imgt.org/>) ならびに IgAT (Rogosch *et al.*, Front Immunol 2012) により、使用される遺伝子座、CDR3 領域等の解析を行った。

C. 研究結果

今回の臨床研究(本研究班の代表研究者が実施)では、健常人ボランティア 63 名に対し、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) の不活化全粒子ワクチン IBCDC-RG2 (A/Indonesia/5/05 由来) を 45 µg HA/dose

の接種量で、3 週間間隔 2 回の経鼻接種を行った。このうち対象となる 19 名の被験者には、接種前 (Day0)、初回および 2 回目接種の 7 日後 (Day7 および Day28) に血液の提供をお願いし、末梢血中に誘導される抗体産生形質細胞の割合を測定した。末梢血リンパ球中に占める抗体産生形質細胞の割合は、ワクチン接種に伴い増加することが明らかになった。

また、Day28 の 19 名中 9 名の被験者の末梢血からは、単一抗体産生形質細胞を回収し抗体遺伝子レパートリーに関する解析を行った。692 クローンの抗体に関し、抗体重鎖ならびに軽鎖遺伝子シークエンスの解析を行った。抗体アイソタイプは、176 クローンが IgG 抗体、391 クローンが IgA 抗体、そして 125 クローンが IgM 抗体となり、IgG 抗体産生形質細胞と比較して IgA 抗体産生形質細胞が優位であることが明らかとなった (図 1)。H 鎖可変領域を構成する VDJ 遺伝子断片として、VH3 (V 遺伝子)、D3 (D 遺伝子) そして JH4 (J 遺伝子) の使用頻度が最も多かった。DVJ 遺伝子再編成で形成されるこれら遺伝子の接合部位である相補性決定領域 (CDR3) は、長さおよびアミノ酸配列が多様であり、抗原の認識に重要と考えられている。この CDR3 領域の長さの比較を行ったところ、IgG 抗体と比べて IgA 抗体で長さに幅があることが明らかになった (IgG; 9~23 アミノ酸、IgA; 6~25 アミノ酸)。

近年、亜型を超えた広範な中和活性を示す bNAb が多く報告され、これらの抗体の多くは、V 遺伝子として対立遺伝子 VH1-69 を利用していることが明らかになっている。今回の臨床研究において、対立遺伝子 VH1-69 を使用する抗体クローンの探索を行ったところ、IgG 抗体で 3 クローン、IgA 抗体で 5 クローン存在することが明らかになった (表 1)。

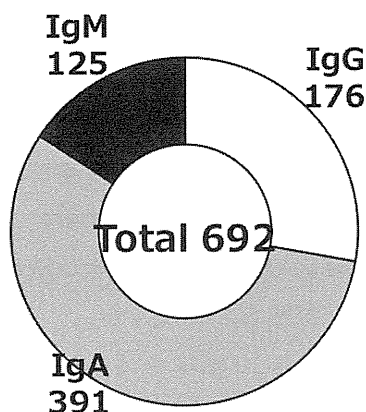


図 1. 9 人の被験者における末梢血中の形質細胞が産生する抗体アイソタイプ
2 回目の経鼻ワクチン接種から 1 週間後 (Day28)、9 人の被験者から回収した末梢血中の抗体産生形質細胞 692 クローンにおける、抗体アイソタイプの割合を示す。IgG 抗体は 176 クローン、IgA 抗体は 392 クローン、そして IgM 抗体は 125 クローンとなった。

表 1. 対立遺伝子 VH1-69 を使用する抗体クローン

アイソタイプ	Clone	重鎖 V遺伝子	軽鎖 V遺伝子
IgG	G2	IGHV1-69*09	IGKV3-20*01
	H10	IGHV1-69*06	IGKV3-20*01
	F11	IGHV1-69*09	IGKV3-11*01
IgA	D11	IGHV1-69*09	IGKV1-NL1*01
	F9	IGHV1-69*09	IGKV3-20*01
	H5	IGHV1-69*01 IGHV1-69D*01	IGLV2-14*01
	B12	IGHV1-69*01 IGHV1-69D*01	IGLV1-44*01
	C1	IGHV1-69*01 IGHV1-69D*01	IGKV1-39*01 IGKV1D-39*01

D. 考察

本研究では、健康成人に対して、これまで暴露された経験のない高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻ワクチン接種を実施した。季節性インフルエンザウイルスとは異なり、A(H5N1) ウイルスに対しては免疫学的に無垢な状態にあるために、主要抗原である HA に対する純粋な抗体応答を評価することが可能であると考えた。これまでの報告では、注射によりワクチン接種を行った場合には、末梢血中は IgG 抗体

を産生する形質細胞が主に誘導されることが明らかになっている。今回の経鼻インフルエンザワクチン接種では、末梢血中の抗体産生形質細胞は、ワクチン接種とともに増加することが明らかとなり、かつ IgA 抗体産生細胞は IgG 抗体産生細胞の約 2 倍程度誘導されることが明らかになった (図 1)。マウスを用いた実験から、経鼻ワクチン接種は上気道粘膜上に加え血中の IgA 抗体応答を強く誘導することが示されているが、ヒトにおける経鼻ワクチン接種も IgA 抗体産生細胞を強く誘導すると考えられる。今回の研究では、HA 特異的抗体産生細胞ではなく抗体を産生する総形質細胞数の測定を行った。ワクチン接種を行ったとき誘導される抗体産生形質細胞の約 80% が抗原特異的な抗体を産生しているという報告があることから、今回誘導された抗体産生細胞の多くは A(H5N1) 特異的な抗体を産生するものと考えられる。

さらに、今回の経鼻ワクチン接種で誘導された抗体レパートリーの解析を行った。抗体の H 鎖は VDJ 遺伝子再編成により可変領域の多様性を獲得することが知られている。VDJ 各遺伝子の使用頻度を調べたところ、IgG および IgA 抗体ともに V 遺伝子は VH3、D 遺伝子は D3 そして J 遺伝子は JH4 の使用頻度が高かった。これは、それぞれの遺伝子を形成する対立遺伝子の総数を反映したものとなったが、VDJ 遺伝子の接合部となる CDR3 領域の長さは IgA 抗体の方で多様性があることが明らかになった。経鼻インフルエンザワクチン接種では、IgA 抗体の方が IgG 抗体と比べて多様性に富む可能性が示唆された。また、亜型を超えて広範な中和活性を示す bNAb の多くが使用する対立遺伝子 VH1-69 を使用する抗体の存在を調べたところ、9 名の被験者において 8 クローンの抗体の存在が明らかとなった。今後これらの抗体の反応性

を詳細に調べる必要があるが、経鼻インフルエンザワクチン接種により bNAb 抗体が誘導可能である可能性は十分にある。

経鼻インフルエンザワクチン接種により誘導される広範な中和活性を有する bNAb 抗体の存在を証明することは、本ワクチンの有効性を科学的に裏付けることにつながると考えられ、引き続き研究を進める必要があると思われる。

E. 結 論

健常成人において、経鼻インフルエンザワクチンの接種は、IgA 抗体産生細胞を優位に誘導することが明らかとなった。さらにこれら IgA 抗体は IgG 抗体と比較して多様性に富む可能性が示唆され、広範な中和活性を示す抗体が存在する可能性がある。インフルエンザウイルスの感染の場となる上気道粘膜上に、このような特徴を有する IgA 抗体を分泌型抗体として誘導可能な経鼻インフルエンザワクチンは、新しいワクチンとして非常に有効性の高いワクチンであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Nagata N, Kanou K, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host serine protease TMPRSS2 is essential for pathogenicity of influenza A virus. *J Virol.* (in press 2014)
- 2) World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group: Bahl J, Besselaar T, Brown IH, Capua I, Chen H, Cox N, Claes F, Davis CT, Donis RO, Fouchier RAM, Guan Y, Hamilton K, Jang Y, Kawaoka Y, Kelso A, McCauley J, Mumford E, Prajitno T, Russell CA, Smith D, Smith GJD, Shu Y, Tashiro M, Shepard S, Vijaykrishna D, Webby R, Webster R, Wong F. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* (in press, 2014)
- 3) Takashita E, Ejimam K, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1) pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *EuroSurveill.* 2014;19(1):pii=20666.
- 4) Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance Response System, Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Yu H, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood P, Lucero M, Roque V Jr, Lee Suy L, Cardon P, Tandoc A 3rd, Olveda RM, Kang C, Young-Joon P, Cutter J, Lin R, Low C, Mai le TQ, Balish A, Kile J, Mei S, Mcfarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xiyan X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J. Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region. *Western Pac Surveill Response J.* 2013 Mar 3;4(3):51-9.

- 5) Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *EuroSurveill.* 2013;18(15):pii=20453.
- 6) Kobayashi M, Takayama I, Kageyama T, Tsukagoshi H, Saitoh M, Ishioka T, Yokota Y, Kimura H, Tashiro M, Kozawa K. Novel reassortant influenza A(H1N2) virus derived from A(H1N1)pdm09 virus isolated from swine, Japan, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013 Dec;19(12):1972-4.
- 7) Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M, Odagiri T. Seroprevalence of a novel influenza A(H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(6):549-51.
- 8) Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29;441(4):953-7.
- 9) Ampofo WK, Baylor N, Cobey S, Cox NJ, Daves S, Edwards S, Ferguson N, Grohmann G, Hay A, Katz J, Kullabutr K, Lambert L, Levandowski R, Mishra AC, Monto A, Siqueira M, Tashiro M, Waddell AL, Wairagkar N, Wood J, Zambon M, Zhang W. Improving influenza vaccine virus selection: report of a WHO informal consultation held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 14-16 June 2010. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013 Sep;7 Suppl 2:52-3.
- 10) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Sep;9(9):1962-70.
- 11) Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(4):276-83.
- 12) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature.* 2013 Sep 26;501(7468):551-5.
- 13) McKimm-Breschkin JL, Williams J, Barrett S, Jachno K, McDonald M, Mohr PG, Saito T, Tashiro M. Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations in non-conserved residues of the neuraminidase. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Oct;68(10):2210-21.
- 14) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H,

- Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013 Nov;7(6):1390-9.
- 15) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol*. 2013 Aug;18:168-73.
- 16) Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. *PLoS One*. 2013;8(3):e59892.
- 17) Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. Mutations at the monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Infect Chemother*. 2013 Oct;19(5):891-5.
- 18) Ato M, Takahashi Y, Fujii H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine*. 2013 Apr 19;31(17):2184-90.
- 19) Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(1):65-8
2. 学会発表
- 1) 坂井 (田川) 優子、高山郁代、影山 努、内田裕子、西藤岳彦、田代真人、河岡義裕：鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスは迅速診断キットで判定可能か？第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
- 2) 影山 努、高橋 仁、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘、改田 厚、久保英幸：Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルスの同定について。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
- 3) 渡辺登喜子、今井博貴、村上 晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕：中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
- 4) 内田裕子、彦野弘一、金平克史、竹前喜洋、信澤枝里、田代真人、西藤岳彦：中国の人から分離された H7N9 亜型インフルエンザウイルスの家禽における性状解析。」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
- 5) 高下恵美、徐 紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤 彩、三浦 舞、田代真人、小田切孝人：ノイラミニダーゼ阻害役耐性変異をもつ A(H7N9) および A(H3N2) インフルエンザウイルス。第 61 回日本ウイルス

- 学会学術集会、2013年11月、神戸
- 6) 岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕：2013年に中国で分離された A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家禽に対する病原性の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 7) 渡辺登喜子、今井博貴、村上晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕：中国でヒトから分離された H7N9鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 8) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、荒尾雄二郎、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 9) 相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、原田勇一、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 10) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内章、田代真人、奥野良信、山本典夫：マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 11) 中村一哉、白倉雅之、武藤亜紀子、内藤忠相、藤崎誠一郎、田代真人、信澤枝里：鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのワクチン製造候補株の開発. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 12) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、永田典代、田代真人、長谷川秀樹：Nc/Ngaマウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症化モデルの作製. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 13) 中内美名、高山郁代、高橋仁、大場邦弘、田代真人、影山努：B型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた識別検出法の構築. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 14) 高山郁代、中内美名、高橋仁、田代真人、影山努：鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理方法についての検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 15) 高橋仁、田中仁喜、西村研吾、高山郁代、中内美名、永田志保、小林美栄、藤博幸、大西和夫、横田（恒次）恭子、田代真人、影山努：H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 16) 藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、高下恵美、今井正樹、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と 2013/14シーズンのワクチン株. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 - 17) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内章、田代真人、山本典生：マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析. 第

- 17 回日本ワクチン学会学術集会、2013 年 12 月、津
- 18) 長谷川秀樹、相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅：高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの効果. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会、2013 年 12 月、津
- 19) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会、2013 年 12 月、津
- 20) 相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢、性別あるいは副反応が与える影響. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会、2013 年 12 月、津
- 21) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、阿戸 学、田代真人、板村繁之：剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状と防御効果の相関. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会、2013 年 12 月、津

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）
なし
2. 実用新案登録
なし

脂質代謝系を介した自然免疫賦活により ワクチンの有効性を高める研究

研究分担者 新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。本研究では脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立する。本年度は、哺乳動物培養細胞を用いて抗ウイルス応答に関与する細胞内シグナル伝達に対する Type 8 PLA₂ の関与を調べた。その結果、Type 8 PLA₂ は IFN β による JAK-STAT 経路の活性化を負に制御する因子であることが明らかとなった。また Type8 PLA₂ の活性を強力に阻害する化合物を見出した。

A. 研究目的

粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。我々はこれまでに Type 8 PLA₂ という脂質代謝酵素を精製・クローニングし、機能解析を行ってきた。最近、Type 8 PLA₂ の欠損細胞ではウイルス感染時の I 型インターフェロン産生が増大することを見出し、本酵素が I 型インターフェロン応答の抑制因子であることが分かった。本研究では脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

抗ウイルス応答に関与する細胞内シグナルにおける Type 8 PLA₂ の関与を調べるために、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に Type8 PLA₂ に対する siRNA、または Type8 PLA₂ 強制発現ベクターをトランスフェクションし、インターフェロン β (IFN β) による JAK-STAT 経路の活性化を ISRE-Luc のレポーターアッセイと OAS1

(2'-5'-oligoadenylate synthetase 1) の定量 PCR により調べた。また IFN β による転写因子 STAT1、STAT2 の活性化（リン酸化）をウェスタンブロッティングにより検出した。

Type8 PLA₂ の活性を阻害する化合物を探索するために Type8 PLA₂ 組み換えタンパク質と放射標識基質を用いた *in vitro* の酵素アッセイをおこない化合物の Type8 PLA₂ の活性に対する影響を調べた。

C. 研究結果

HEK293 細胞において、Type8 PLA₂ を siRNA により発現抑制したところ、IFN β により誘導される OAS1 の mRNA 発現が顕著に増強された。この OAS1 の発現増強は、Type8 PLA₂ の発現プラスミドを導入することによりレスキューされた。同様の結果は ISRE-Luc を用いたレポーターアッセイによっても得られ、また Type8 PLA₂ の過剰発現は IFN β による ISRE-Luc の応答を抑制した。さらに IFN β による JAK-STAT 経路の活性化に対する Type8 PLA₂ の影響を詳

細に解析したところ、Type8 PLA₂の発現抑制により、IFN β 刺激時の STAT1、STAT2 のリン酸化、および STAT1 と STAT2 の結合が亢進した。一方、STAT1/STAT2 の上流である JAK1、TYK2 のリン酸化には影響はみられなかった。

Type8 PLA₂はN末端がミリスチル化されており、細胞質と膜の両方に存在する。Type8 PLA₂による JAK-STAT シグナルの抑制における酵素活性やミリスチル化の必要性を調べたところ、IFN β による ISRE-Luc の応答は酵素活性を欠失した Type8 PLA₂ (S234C) やミリスチル化されない Type8 PLA₂ (G2A) では抑制できなかった。

Type8 PLA₂の *in vitro* の酵素アッセイを用い、Type8 PLA₂の活性を阻害する化合物を探索したところ、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤の一つである methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) が Type8 PLA₂ を IC₅₀=30 nM で阻害することを見出した。

D. 考察

哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type 8 PLA₂は IFN β による JAK-STAT シグナルを負に制御する因子であることが明らかとなった。Type2 PLA₂の発現抑制は STAT1、STAT2 のリン酸化、および STAT1 と STAT2 の結合が亢進したことから、STAT1/STAT2 の上流において Type8 PLA₂が作用していることが示唆された。IFN β による JAK-STAT シグナルは形質膜上の I 型インターフェロン受容体に IFN β が結合することにより惹起される。Type8 PLA₂の作用には膜との相互作用に重要なミリスチル化が必要であったことから、形質膜の受容体直下で JAK-STAT シグナルを制御していることが考えられる。また Type8 PLA₂の作用において酵素活性の必要性も示すことができ、Type8 PLA₂の酵素活性を阻害できる化合物も見出した。本酵素の作用機構を詳細に解析するとともに、特

異的かつ強力な阻害剤の開発・応用も進めていきたい。

E. 結論

今回の哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type 8 PLA₂は IFN β による JAK-STAT シグナルを負に制御する因子であることが明らかとなった。また *in vitro* の解析から MAFP が Type8 PLA₂の酵素活性を阻害することがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol. Biol. Cell.* (2012) 23:4689-700.
- 2) Kitai Y, Ariyama H, Kono N, Oikawa D, Iwawaki T, Arai H. Membrane lipid saturation activates IRE1 α without inducing clustering. *Genes Cells.* (2013) 18:798-809.
- 3) Kono N, Ohto U, Hiramatsu T, Urabe M, Uchida Y, Satow Y, Arai H. Impaired α -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science.* (2013) 340: 1106-10.
- 4) Ohba Y, Sakuragi T, Kage-Nakadai E, Tomioka NH, Kono N, Imae R, Inoue A, Aoki J, Ishihara N, Inoue T, Mitani S, Arai H. Mitochondria-type GPAT is required for mitochondrial fusion. *EMBO J.* (2013)32: 1265-79.
- 5) Hirata Y, Yamamori N, Kono N, Lee HC, Inoue T, Arai H. Identification of small subunit of serine palmitoyltransferase as a lysophosphatidylinositol acyltransferase

1-interacting protein. *Genes Cells*. (2013) 18: 397-409.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Yohsuke Ohba, Takao Inoue, Takeshi Sakuragi, Naoko H. Tomioka, Asuka Inoue, Naotada Ishihara, Junken Aoki, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai 「Mitochondria-type GPAT is required for mitochondrial fusion」 19th International C. elegans Meeting (2013, 6/26-30, Los Angeles, USA)
- 2) Yuta Shimanaka¹, Nozomu Kono, Yoshitaka Taketomi, Kojiro Mukai, Makoto Murakami, Hiroyuki Arai 「The role of type II PAF acetylhydrolase in IgE-mediated mast cell activation」 2013 Gordon Research Conference (2013, 7/21-26, Waterville Valley, NH, USA)
- 3) Nozomu Kono, Umeharu Ohto, Yoshinori Satow and Hiroyuki Arai 「Role of α -TTP-PIPs Interaction in intracellular vitamin E transport」 2013 Gordon Research Conference (2013, 7/21-26, Waterville Valley, NH, USA)
- 4) Hiroyuki Arai 「A new role for glycerol-3-phosphate acyltransferase in mitochondrial fusion」 2013 Gordon Research Conference (2013, 7/21-26, Waterville Valley, NH, USA)

国内学会

- 1) 河野 望, 大戸梅治, 佐藤能雅, 新井洋由 「 α -TTP を介した肝細胞内ビタミンE輸送における PIPs の役割」日本ビタミン学会第 65 回大会 (2013, 5/17-18, 東京)
- 2) 山守なつみ, 平田祐介, 河野 望, 井上貴雄, 新井洋由 「ホスファチジルイノシトール特異的アラキドン酸導入酵素 LPIAT1 の結合

分子の同定」第 55 回日本脂質生化学会 (2013, 6/6-7, 松島)

- 3) 前川大志, 田口友彦, 新井洋由 (東大院・薬) 「PI(3)P phosphatase によるマクロピノサイトーシスの制御」第 55 回日本脂質生化学会 (2013, 6/6-7, 松島)
- 4) 河野 望, 大戸梅治, 佐藤能雅, 新井洋由 「 α -TTP による肝細胞内ビタミンE輸送における PIPs の役割」第 55 回日本脂質生化学会 (2013, 6/6-7, 松島)
- 5) 北井祐人, 有山博之, 河野 望, 新井洋由 「膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い」第 55 回日本脂質生化学会 (2013, 6/6-7, 松島)
- 6) 大場陽介, 井上貴雄, 櫻木健司, 原 直子, 井上飛鳥, 石原直忠, 中臺枝里子, 青木 淳賢, 三谷昌平, 新井洋由 「Intracellular lysophosphatidic acid regulates mitochondrial dynamics」第 13 回東京大学生命化学シンポジウム (2013, 6/8, 東京)
- 7) 山守なつみ, 平田祐介, 河野 望, 井上貴雄, 新井洋由 「ホスファチジルイノシトール特異的アラキドン酸導入酵素 LPIAT1 の結合分子の同定」第 13 回東京大学生命化学シンポジウム (2013, 6/8, 東京)
- 8) 北井祐人, 有山博之, 河野 望, 新井洋由 「膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い」第 13 回東京大学生命化学シンポジウム (2013, 6/8, 東京)
- 9) 北井祐人, 有山博之, 河野 望, 新井洋由 「膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い」平成 25 年度日本生化学会関東支部例会 (2013, 6/15, 山梨)
- 10) 山守なつみ, 平田祐介, 河野 望, 井上貴雄, 新井洋由 「ホスファチジルイノシトール特異的アラキドン酸導入酵素 LPIAT1 の結合

- 分子の同定」第 86 回 日本生化学会大会 (2013, 9/11-13, 横浜)
- 11) 河野 望, 新井洋由「小胞体ストレス応答タンパク質 IRE-1 を介した飽和脂肪酸代謝制御」第 86 回 日本生化学会大会 (2013, 9/11-13, 横浜)
- 12) 北井祐人, 有山博之, 河野 望, 新井洋由「膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い」第 86 回日本生化学会大会 (2013, 9/11-13, 横浜)
- 13) 有山博之, 河野 望, 新井洋由 (東大院・薬)「生体膜脂肪酸組成変化に対する応答機構の解析」第 86 回 日本生化学会大会 (2013, 9/11-13, 横浜)
- 14) 新井洋由, 河野 望「脂質結合蛋白質による細胞内脂質輸送における PIPs の役割」第 86 回日本生化学会大会 (2013, 9/11-13, 横浜)
- 15) 中村将吾, 北井祐人, 有山博之, 河野 望, 新井洋由「膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い」フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (2013, 9/13-14, 福岡)
- 16) 寺坂慎平, 前川大志, 田口友彦, 新井洋由「PI3P-phosphatase MTMR6 によるマクロピノサイトーシスの制御」フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (2013, 9/13-14, 福岡)
- 17) 河野 望, 新井洋由「ビタミン E の肝細胞内輸送機構と先天性欠乏症」フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (2013, 9/13-14, 福岡)
- 18) 寺坂慎平, 前川大志, 田口友彦, 新井洋由「PI3P-phosphatase MTMR6 によるマクロピノサイトーシスの制御」細胞内ロジスティクス・シンポジウム (2013, 9/17-18, 淡路島)
- 19) Yohsuke Ohba, Takao Inoue, Takeshi Sakuragi, Naoko H. Tomioka¹, Asuka Inoue, Naotada Ishihara, Eriko Kage-Nakadai, Junken Aoki, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai¹「Mitochondria-type GPAT is required for mitochondrial fusion」The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (2013, 10/28-11.1, Okinawa)
- 20) Yohsuke Ohba, Takeshi Sakuragi, Asuka Inoue, Naotada Ishihara, Eriko Kage-Nakadai, Junken Aoki, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai¹「Mitochondria-type GPAT is required for mitochondrial fusion」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013, 12/3-6, 神戸)
- 21) 河野 望, 新井洋由「細胞内ビタミン E 輸送における PIP2 脂肪酸鎖の役割」第 25 回ビタミン E 研究会 (2014, 1/24-25, 米子)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表