

厚生労働科学研究費補助金
〔肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）〕
分担研究報告書

HBV感染症におけるNK-DC相互作用の解析

研究分担者：考藤 達哉 国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

研究要旨：HBVの完全排除のためには、HBV複製抑制に加えて、免疫系が活性化することが必要である。初年度はin vitroでHBV複製を維持できる肝癌細胞株（HepG2.2.15）を用いて、ヒト末梢血から分離したDCサブセットと共培養することで、PDCはIFN- α/β 、IFN- λ を産生することを明らかにした。昨年度（2年目）は1.4倍長のHBVゲノムをHuh7に遺伝子導入する系（HBV-Huh7）を用いた。この系ではHBVゲノムの複製から粒子形成までのHBVの生活環の後期過程を再現できる。HBV-Huh7、PDC、NK細胞との共培養系を用いて、HBV複製抑制においてはDCとNKの相互作用が重要であり、PDCはNK細胞のHBV複製抑制効果を増強することを明らかにした。今年度（3年目）はHBV-Huh7で発現するISGを網羅的に解析し、NK-DCによるNon-cytopathic機序を介したHBV複製抑制にPDC産生IFN- α によるISG（APOBEC3Gなど）が関与することを示した。またNK細胞のCytopathic機序によるHBV抑制にはTRAIL、NKG2Dが関与していた。以上の結果より、PDCはHBVを認識して、NKとの相互作用によりNKを更に活性化し、HBV複製抑制に関与することが示された。

A. 研究目的

樹状細胞（DC）はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。DCがHBVを感知するシステムとして、TLRやC-typeレクチンなどが想定されるが、その詳細は明らかではない。またNK細胞はIFN- γ 産生を介してHBV感染細胞の障害やHBV複製抑制に関与する。効率のよいDC-NK活性化がHBV複製の抑制に重要であると考えられるが、その詳細は明らかでない。今年度は

HBV抑制効果に関与するDC-NK相互作用の機序と、その責任分子を明らかにし、治療標的としての有用性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

HBVに感染していない健康成人のPBMCからソーティングによってDCサブセット（PDC、MDC、BDCA3+DC）とNK細胞を採取した。1.4倍長のHBVゲノムをHuh7に遺伝子導入する系（HBV-Huh7）を用いた。

HBV-Huh7 を、ヒト末梢血から分離した DC サブセットと NK 細胞と共培養し、I 型、II 型、III 型 IFN の産生と肝細胞 ISG の誘導、及び HBV 複製抑制効果との関連性を検討した。また HBV-Huh7 単独、NK/PDC との共培養条件での Huh7-HBV 内の遺伝子発現を網羅的に解析し、HBV 複製抑制に関与する因子を抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に検体提供者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

NK 細胞は HBV-Huh7 との共培養で IFN- γ を産生し、HBV 複製を抑制した。PDC は HBV-Huh7 との共培養で IFN- α 、IFN- λ を産生し、NK の Granzyme B、TRAIL 発現を亢進させ、HBV 複製抑制効果を増強した。HBV-Huh7 細胞内に IFN- α 誘導性 ISG 群 (APOBEC3G、ISG15、IFIT1、MxA など) が誘導された。IFN- α 中和抗体、抗 TRAIL 抗体、抗 NKG2D 抗体の添加によって HBV 複製抑制は減弱した。

D. 考察

NK 細胞、PDC は HBV 感染肝がん細胞を異なる機序で認識することで活性化し、IFN を産生すると考えられた。NK 細胞と PDC の共存では IFN- α 、 γ 、 λ 産生量が増加したことより、NK-PDC 相互作用により活性化が増強される。HBV の認識機構や NK-PDC 相互作用の機序の解明は、治療標的の同定に繋がる可能性がある。

E. 結論

HBV の複製抑制に PDC と NK の相互活性化作用が関与しており、Cytopathic、Non-cytopathic 両方の機序が関与していた。I 型、II 型、III 型 IFN の産生を介する肝細胞 ISG の誘導や NK に発現する TRAIL の誘導が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, **Kanto T**, Masaki N, Mizokami M. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. *J Virol Methods*. 207: 169-77, 2014.
- 2) Yamada, R., Hiramatsu N*, Oze T, Morishita N, Harada N, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, **Kanto T**, Hayashi N and Takehara T. Significance of liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse (ARFI) among hepatitis C patients. *J Med Virol* 2014 86:241-247.

2. 学会発表

- 1) **Kanto T**, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. **The 2nd Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links**. Hiroshima, Japan, 2014.
- 2) Yoshio S, **Kanto T**, Shouji H, Mano Y,

Sugiyama M, Mizokami M. Human BDCA3+ dendritic cells enhance NK cell-mediated non-cytopathic inhibition of HBV replication. (Distinguished poster presentation) **The 11th JSH Single Topic Conference, Hepatitis B-recent progress in Basic and Clinical research**, Hiroshima, Japan, 2014.

3) Yoshio S, **Kanto T**, Sugiyama M, Shouji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M. Distinct helper roles of dendritic cell subsets in NK cell-dependent HBV suppression in bystander infected cells. **The Liver Meeting AASLD 65th Annual Meeting and Postgraduate Course**, Boston, MA, USA, 2014.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

B型肝炎における自然免疫応答の解明

研究分担者：高橋 健 京都大学医学部附属病院 消化器内科 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは宿主の核内に長期にわたり安定して存在し、ウイルスRNA産生のための鋳型として機能する。cccDNAは現在の抗HBV治療薬の要である核酸アナログ製剤では駆除できず、そのことがHBVの完全排除が困難な大きな原因となっている。cccDNAの制御と排除のための新たな治療法を確立するには、免疫系によるcccDNAの制御機構の解明が重要であるが、現在は不明な点が多い。本分担研究では、B型肝炎における宿主免疫応答、特に自然免疫の役割を解明する。具体的には、B型肝炎患者の免疫細胞やHBV感染ヒト肝細胞を研究対象とし、新たな遺伝子発現解析手法であるRNA-seqを用いてB型肝炎における自然免疫応答の解析を行う。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎では、宿主免疫応答が病原体排除と肝炎発症の両者に深く関わっていることが知られているが、その制御機序に関しては不明な点も多い。特にB型肝炎では、C型肝炎と比べ、自然免疫の理解が不十分といえる。本研究では、新たな解析ツールである次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析（RNA-seq）を行い、B型肝炎における免疫応答を遺伝子発現レベルで網羅的に解析する。

B. 研究方法

(1) インターフェロン処理を行った健常人由来の末梢血単核球、(2) インターフェロン治療中のB型肝炎急性増悪患者から採取した末梢血単核球、(3-1) *Fah*^{-/-}*Rag2*^{-/-}*I12rg*^{-/-}マウスをベースとしたヒト肝細胞

キメラマウスに *in vivo* で HBV 感染をさせ採取した HBV 感染肝細胞、(3-2) *in vitro* の実験系として HBV の entry factor NTCP を安定して発現する HepG2-NTCP 細胞に HBV を感染させて得た HBV 感染肝細胞、のそれぞれを対象として、次世代シーケンサー Ion Proton システム(ライフテクノロジー社)を用いて RNA-seq を行い、遺伝子発現プロファイルを解析した。

(倫理面の配慮)

動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「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」に従う。当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施する。ヒト由来臨床検体の解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、本人からのインフォームドコンセントを取得

したうえで実施する。

C. 研究結果

(1) 予備実験として行った健常人末梢血単核球のインターフェロン刺激サンプルを用いた RNA-seq では、既知や未知のインターフェロン誘導性遺伝子 (ISG) が数多く検出された。(2) インターフェロン治療中の B 型肝炎急性増悪患者を対象とした RNA-seq では、治療前・中・後の末梢血単核球で、自然免疫関連遺伝子を含む多くの遺伝子で発現変動を認め、内因性の ISG 発現が一部示唆された。(3-1, 3-2) ヒト肝細胞キメラマウスへの *in vivo* HBV 感染実験から得られたウイルス感染肝細胞と、HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞を対象として行った RNA-seq では、非感染細胞との比較にて自然免疫関連遺伝子の有意な発現変動を認めなかった。遺伝子 Ontology 解析において、HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞では核内輸送関連の遺伝子が有意に抽出された。

D. 考察

今回行った RNA-seq では、HBV 感染に伴う自然免疫関連遺伝子の発現変動を、患者由来の免疫細胞では検出したが、HBV 感染細胞では *in vivo*, *in vitro* の二つの独立した実験系で検出しえなかった。最近になり、HBV 感染細胞では 1 型ではなく 3 型インターフェロンが産生されるという報告がなされ (Immunity 42:123-132, 2015)、今回の研究結果との乖離を説明する要素として、アッセイ感度やウイルス感染期間の違いなどがあげられ、今後の検討課題と考えられた。

E. 結論

RNA-seq は B 型肝炎における免疫応答の解析に有用であることが示唆された。HBV 感染細胞における自然免疫応答は RNA-seq の感度以下のレベルである可能性が考えられたが、自然免疫応答の有無に関する結論に至るにはさらなる実験条件の検討を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inuzuka T, **Takahashi K**, et al. Mouse Models of Hepatitis B Virus Infection Comprising Host-Virus Immunologic Interactions. *Pathogens*. 3: 377-389, 2014.
- 2) Wieland SF, **Takahashi K**, et al. Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. *J Virol*. 88:752-7, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

B型肝炎ウイルス感染が宿主のアポトーシスに与える影響の解析

研究分担者：加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の複製モデルを用い、HBVが宿主細胞のアポトーシス感受性に与える影響を解析した。遺伝子型が異なるHBV株を用い、さらに成人でのB型急性肝炎から慢性化した症例から得られた株を含む計8株について複製コンストラクトを作製し検討を行った。これらの複製コンストラクトをHepG2細胞に導入し、その後TNF- α とActinomycin Dで処理することでアポトーシスを誘導した。その後、HBc抗原と活性化Caspaseを染色することにより、HBV感染が宿主のアポトーシス感受性に与える影響を評価した。その結果、HBV陽性細胞ではアポトーシス感受性が亢進していたが、遺伝子型Bj株の導入細胞では高く遺伝子型A株の導入細胞では低いアポトーシス感受性を示した。また、成人でのB型急性肝炎慢性化症例から得られた株の導入細胞では、他の株に比べアポトーシス感受性が低下していた。これらのアポトーシス感受性に与える影響の差は、HBV株が得られた症例の臨床像と関連している可能性が考えられた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は血液中のウイルス粒子内では不完全2本鎖DNAとして存在している。肝細胞に感染すると核内で完全2本鎖となり、covalently closed circular DNA（cccDNA）と呼ばれる閉環らせん状のDNAとして存在する。このcccDNAは、B型肝炎寛解後、血中にHBs抗原やHBV-DNAが検出されない状態でも肝細胞内に存在し、免疫能が低下した時などにHBVが再活性化し肝炎が再燃する事が知られている。従って、B型肝炎の根本的治療にはcccDNAの排除が必要であるが、現行治療で用いられている核酸アナログなどの薬剤ではcccDNAを排除することは難しく、

cccDNAが存在する肝細胞を免疫機構により排除することが必要と考えられている。

そこで本研究では、HBVの培養細胞での複製モデルを用い、HBV複製が宿主細胞のアポトーシスに与える影響の解析を行った。培養細胞にHBV発現コンストラクトを導入し、アポトーシス刺激を加える事で、HBV複製が免疫細胞により誘導される宿主のアポトーシスに与える影響を評価した。今年度は成人のB型急性肝炎から慢性化した症例に注目し、慢性化例から分離されたHBV株がアポトーシス感受性に与える影響を解析した。

B. 研究方法

培養細胞での複製とウイルス粒子生成が可能な 1.4 倍長の HBV ゲノムを持つコンストラクトを作製した。遺伝子型 A, B, C, H の HBV 株で、成人での B 型急性肝炎から慢性化した症例から得られた HBV 株を含む 8 クローンについて検討を行った。これらの HBV 全長を発現するコンストラクトを HepG2 細胞に遺伝子導入し、さらに TNF- α と Actinomycin D で処理することによりアポトーシスを誘導した。HBV 陽性細胞と陰性細胞は、HBV 遺伝子導入細胞を固定した後に抗 HBc 抗体による染色を行い Flow Cytometry により選別した。アポトーシス細胞の検出は活性化された Poly-Caspase の蛍光染色により行った。さらに Caspase-8, -9, -3/7 の個別の Caspase を染色により、アポトーシスシグナルの活性化部位を推定した。

(倫理面の配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株および HBV 株であり倫理面での問題はない。HBV 複製モデルに用いた HBV 発現コンストラクトは患者血清中から分離された株を用いており大臣確認実験にはあたらない。

C. 研究結果

HBV 遺伝子型 A 株 2 種類 (A40; 慢性肝炎患者由来、AC20; 急性肝炎慢性化例由来)、遺伝子型 Bj 株 2 種類 (B18; 急性肝炎患者由来、B35W; 慢性肝炎患者由来)、遺伝子型 C 株 3 種類 (CL8; 慢性肝炎患者由来、EC3P; 慢性肝炎患者由来、CC23; 急性肝炎慢性化例由来)、遺伝子型 H 株 1 種

類 (H14M; 急性肝炎慢性化例由来) の合計 8 株の HBV 1.4 倍長ゲノムを持つコンストラクトを作製し、HepG2 細胞へ遺伝子導入した。導入効率は HBc 抗体による FCS 解析により確認し、50%以上であることを確認した。またこれらの株の培養細胞内での複製はサザンブロット法にて確認した。これらの HBV 導入細胞を TNF- α と Actinomycin D で処理することによりアポトーシスを誘導した。HBV 感染がアポトーシス感受性に与える影響の解析は、HBV 陽性細胞の Poly-Caspase 陽性率が陰性細胞の陽性率の何倍になっているかを比較し行った。その結果、遺伝子型 A 株 HBV の陽性細胞では陰性細胞と比較し、ほぼ同程度のアポトーシス誘導率であったが、遺伝子型 Bj 株 HBV の陽性細胞では陰性細胞と比較しアポトーシスが誘導された細胞が多く認められた。遺伝子型 C 株 HBV の陽性細胞では、アポトーシス誘導率は遺伝子型 A 株と B 株の中間の値を示し、アポトーシス感受性は株によって異なっていた。遺伝子型 H 株 HBV を含む急性肝炎慢性化例由来株の導入では、他の株に比べ低いアポトーシス感受性を示した (図 1)。さらにアポトーシスに関わる Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3/7 において、どの Caspase がアポトーシス感受性に関わっているかを検討したところ、すべての Caspase の活性化プロファイルは Poly-Caspase のプロファイルとほぼ同様であり、アポトーシス感受性の高い細胞では最も上流の Caspase-8 の活性化が起こっていると考えられた。

Apoptosis Index (Fold of HBV(-))

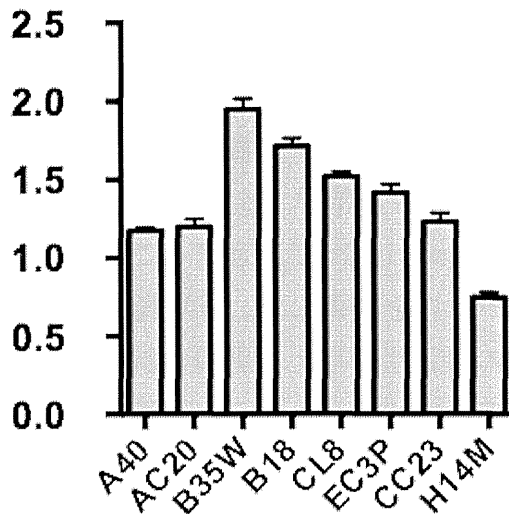


図 1. HBV 株によるアポトーシス感受性の違い

D. 考察

遺伝子型が異なり、成人での B 型急性肝炎慢性化症例から得られた株を含む 8 株の HBV を発現するコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、それらの HBV 株の複製がアポトーシス感受性に与える影響を検討した。今回の検討では、HBV 感染細胞はアポトーシス誘導に対して感受性が高くなっていた。遺伝子型 B_j 株の導入細胞では高く、遺伝子型 A 株の導入細胞では低いアポトーシス感受性を示した。また、成人での B 型急性肝炎慢性化症例から得られた株の導入細胞では、他の導入細胞に比べアポトーシス感受性が低下していた。

E. 結論

今回の検討により、HBV 感染細胞は免疫細胞によるアポトーシス誘導に対して感受

性が高いことが示された。しかし、成人の急性肝炎後の慢性化例が多い遺伝子型 A 株や、急性肝炎慢性化例から得られた株の導入ではアポトーシス感受性の低下が観察されており、これらの事象は用いた HBV 株が得られた症例の臨床像と関連している可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. World J Gastroenterol, 20(11), 3044-9, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)]

分担研究報告書

TCRクローニングとTCRを用いた細胞治療

研究分担者：村口 篤 富山大学医学薬学研究部免疫学講座 教授

研究要旨：我々はヒト末梢血中の抗原特異的プライマリーT細胞から単一細胞レベルで、ヒトT細胞受容体 (TCR) を迅速に取得するための技術 (hTEC10: human TCR efficient cloning within 10 days)を開発した (Nat Med. 2013 Nov;19(11):1542-6)。昨年度は、抗原ペプチド/MHC四量体の結合に加えて、抗原ペプチドの刺激により抗原特異的T細胞が活性化されて分泌されるIFN- γ や、発現が増強される活性化マーカー (CD137) を指標に、hTEC10法で抗原特異的プライマリーT細胞を検出し、抗原特異的TCR遺伝子を取得できたことを示した。今年度は、金沢大学でB型肝炎患者のT細胞を活性化できることを確認したB型肝炎ウイルス (HBV) 由来ペプチドを用いて、患者および健常人よりHBV特異的細胞傷害性T細胞を同定し、そのTCR遺伝子を取得することを試みた。

A. 研究目的

金沢大学が同定したB型肝炎患者の末梢血Tリンパ球を活性化することができるHBV由来ペプチドを用いて、抗原特異的プライマリーT細胞1個1個からTCR α/β 遺伝子をペアで取得できる技術 (hTEC10) を用いてHBV特異的T細胞を同定し、そのTCRを取得することを目的とした。

B. 研究方法

HBV由来ペプチドは、金沢大学にて同定したHLA-A24結合性のペプチド21, 43, 53, 55, 81, 91の6種類を用いた。

リンパ球は健常人ドナーの末梢血リンパ球 (PBL) を用いた。

PBLに、抗原ペプチド6種類を混合したペ

プチドミ混合物で刺激し、活性化マーカーCD137の発現を指標に、ペプチド混合物により活性化されたT細胞を検出した。セルソータを用いて1ウェルに1細胞が入るように回収した。回収した単一の細胞よりTCR cDNAを増幅し、TCR遺伝子の配列を決定し、TCRレパートリーを解析した。

現在、同じTCR α 鎖と β 鎖のペアをもつ、クローナルに増殖していると考えられるT細胞クローンのTCRを発現ベクターに導入し、内在性TCRを発現していないTG40 T細胞株に導入し、抗原特異性を検証している。
(倫理面への配慮)

血液提供者には、説明文書を用いて研究内容・危険性について十分に説明し、同意を得ている (インフォームドコンセント)。

また、これらの実験については、富山大学の倫理委員会の承認を得て、富山大学の医の倫理に関する規則等に従って行っている。

C. 研究結果

HLA-A24陽性の健常人6名のPBLをHBV由来ペプチド混合物を用いて刺激し、4名(donor1、2、4、5)のリンパ球においてコントロール群と較べて抗原ペプチドで刺激した群でCD137の発現増強が観察されたため、CD137陽性CD8陽性細胞を単一細胞ソートした。

ソートした細胞のTCR α 鎖、 β 鎖のアミノ酸配列を単一細胞レベルで解析した結果、CDR3の部分も含めて完全に配列が一致する細胞群が、それぞれのドナーに複数観察された。これらの細胞群は、抗原により特異的に活性化され、クローナルに増殖したT細胞と考えられ、これらの中にHBV特異的細胞傷害性T細胞由来TCRが含まれると思われる。そこで、得られたTCR cDNAを発現ベクターに組み込み、内在性TCR陰性のTG40 T細胞株で発現させて、抗原特異性の解析を行っている。現在までに、ドナー2からは4種類のTCRの発現ベクターを作製し、HBVペプチドに対する反応を調べたが、ペプチド特異性を示すことはできていない。現在、さらに解析を進めている。

D. 考察

HBV ペプチド刺激に反応し CD137 発現細胞が増加したこと、さらに TCR レポートリーの解析から、クローナルな増殖が観察されたことから、健常人ドナーの PBL 中に HBV に特異的な T 細胞が存在することが示

唆された。現在までに解析した TCR は HBV ペプチドの特異性が観察されなかったが、これは、1 個の T 細胞に 2 種類の TCR が発現することが頻繁に見られることが知られているので、現在までに解析した TCR と別の同一 T 細胞由来の TCR を解析し直すことで、抗原特異性を示せると考えている。

E. 結論

健常人ドナーの末梢血リンパ球中に HBV ペプチドに反応する細胞傷害性 T 細胞が存在する事を示唆する結果が得られた。今後、解析を進め実証していく必要がある。さらに、B 型肝炎患者の末梢血のリンパ球も解析していく予定である。また、1 個の T 細胞中の 2 種類の TCR を、どのように迅速かつ効率よく解析していくかも、今後の課題としてあげられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Horii M, Hamana H, Nagai T, Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Feb; 444(3): 319-24.

2) Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 2014 Jan; 3(1): e27258.

2. 学会発表

1) Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Ozawa T,

- Muraguchi A. Cis-interaction of TCR and antigen/MHC class I complexes on a CD8⁺ T cell. 第43回日本免疫学会学術集会 ; 2014 Dec 10-12 ; 京都.
- 2) Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. Development of simple and efficient method for amplification of TCR ab cDNA from single human T cells. 第43回日本免疫学会学術集会 ; 2014 Dec 10-12 ; 京都.
- 3) 岸 裕幸, 小林栄治, 杉山 大介, 西川博嘉, 坂口志文, 村口 篤. メラノーマ患者および健常人PBMC中のCD4⁺T細胞の単一細胞レベルでのレパートリー解析. 第73回日本癌学会学術総会 ; 2014 Sep 25-27 ; 横浜.
- 4) 岸 裕幸, 浜名 洋, 小林栄治, 杉山 大介, 西川博嘉, 鬼塚志乃, 坂口志文, 村口 篤. メラノーマ患者および健常人の末梢血CD4⁺T細胞の単一細胞レベルでのレパートリー解析. 第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会 ; 2014 Sep 6 ; 京都.
- 5) 中河秀俊, 水腰英四郎, 清家拓哉, 山宮大典, 米島 淳, 稲田悠記, 木田明彦, 梶喜一郎, 玉井利克, 熊谷将史, 寺島健志, 北原征明, 飯田宗穂, 小林栄治, 岸裕幸, 村口 篤, 金子周一. がんペプチドワクチン療法におけるTCRレパートリーの経時的変化の検討. 第18回日本がん免疫学会総会 ; 2014 Jul 30-Aug 1 ; 松山.
- 6) Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Terashima T, Kitahara M, Iida N, Kishi H, Muraguchi A, Kaneko S. Functional features of antigen-specific T-cell receptors reflected clinical responses of a-fetoprotein-derived

peptides vaccine treatment for advanced hepatocellular carcinoma. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; 2014 Nov 7-11; Boston.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

TCR遺伝子導入リンパ球の作製とそれを用いた細胞療法の開発

研究分担者：池田 裕明 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：B型慢性肝炎の治療においては、肝炎ウイルスの増殖を低下させ、cccDNAを中心とするHBVの再活性化機構を制御することが重要である。cccDNAの制御と排除を行う治療法を開発するためには、cccDNAの存在様式と遺伝子発現の調節機構といったcccDNAの基本的な動態を解明するとともに、cccDNAに対してどのような免疫が作動しているかを明らかにして研究開発を行うことが必要である。国内外においてhistone修飾を標的とする薬剤、あるいはsmall RNAなどの核酸医薬を用いて直接にcccDNAを標的とする治療薬研究が進められているが、逆に再活性化の可能性が指摘されるなど、有効な治療法が開発されていない。本研究は、最先端の免疫学の技術を用い、cccDNAの制御と排除を行う新規治療薬の開発研究を目指す。cccDNAの細胞内の動態と、それを持つ肝細胞に対する免疫の状態を明らかにする。標的とする抗原、その抗原エピトープを認識するT細胞レセプター（TCR）を同定し、TCR遺伝子導入T細胞、ペプチドなどを作製し、動物モデルを用いてcccDNAの制御と感染細胞の排除に対する有効性と作用機序を明らかにする。本分担研究者は特にTCR遺伝子導入リンパ球の作製とそれを用いた細胞療法の開発を目指す。

A. 研究目的

B型肝炎に対しては、国内外においてhistone修飾を標的とする薬剤、あるいはsmall RNAなどの核酸医薬を用いて直接にcccDNAを標的とする治療薬研究が進められている。しかし、逆に再活性化の可能性が指摘されるなど、有効な治療法が開発されていない。本研究は、こうした直接的な抗ウイルス剤の開発と異なり、世界最先端の免疫学の技術を用いたcccDNAの制御と排除をめざす開発研究を行う。

本分担研究者は、本事業の研究者らと連

携し、標的とする抗原とその抗原エピトープを認識するT細胞レセプター（TCR）を同定し、TCR遺伝子導入T細胞を用いた画期的な新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

(1)我々の開発したMAGE-A4特異的HLA-A2402拘束性TCRとNY-ESO-1特異的HLA-A0201拘束性TCRについて、正常組織由来エピトープに対する交差反応性の可能性を検討した。エピトープペプチドのアラニン置換スキャンを行い、エピトープに必須の

アミノ酸を同定し、データベース検索により必須アミノ酸を共有する正常組織由来エピトープペプチド候補を検索した。交差反応性候補ペプチドを合成し、TCR 遺伝子導入細胞による認識の有無を確認した。(2) フェージディスプレイライブラリー法を用いて、HLA-A*24:02 と WT1 抗原由来エピトープペプチドとの複合体を認識する scFv 抗体を取得し、この抗体を利用したキメラ抗原受容体 (CAR) 発現 T 細胞を作製した。(倫理面の配慮)

本研究に用いるヒト末梢血等の検体の採集、解析はヘルシンキ宣言にのっとり行なわれ、全て三重大学医学部研究倫理委員会にて承認されたプロトコールに従い、被験者本人の書面による同意書を得て実施される。採取した検体は本人特定不可能な暗号化がなされ盗難防止処置を施した冷蔵庫、液体窒素タンクに保存する。被験者個人情報に関しては匿名化され、個人のプライバシー、遺伝子解析の結果が外部に漏洩されないよう厳重な注意、処置が施行される。

レトロウイルスを用いたヒト末梢血単核球への腫瘍抗原特異的 TCR の導入実験は三重大学の組換え DNA 実験審査委員会及び三重大学医学部研究倫理委員会において承認されている。これらの実験は三重大学において承認を受けた P2 レベルの研究室にて行なわれる。

実験動物を用いた T 細胞輸注療法、遺伝子免疫療法の研究は三重大学の組換え DNA 実験審査委員会、三重大学医学部研究倫理委員会、動物実験審査委員会においてすでに承認を受けており、三重大学において承認を受けた実験室、飼育室において実施さ

れる。

C. 研究結果

(1)我々の開発した MAGE-A4 特異的 HLA-A2402 拘束性 TCR と NY-ESO-1 特異的 HLA-A0201 拘束性 TCR について、認識エピトープペプチドの中で HLA-A2402 への結合と TCR による認識に必須のアミノ酸配列を同定した。データベース検索により必須のアミノ酸配列を共有する正常組織由来エピトープペプチドがそれぞれ複数見つかった。これらのペプチドを合成し、ペプチドパルス細胞に対する TCR 遺伝子導入 T 細胞の反応性を検討したが、いずれのペプチドに対する反応性も確認されなかった。(2)HLA-A*24:02 と WT1 抗原ペプチドの複合体を特異的に認識する scFv 抗体を取得した。本 scFv 抗体、CD3 ゼータ鎖細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するヒトリンパ球を作製すると、抗原ペプチドパルス細胞及び内因性に WT1 抗原を発現する HLA-A*24:02 陽性細胞を特異的に認識し破壊した。

D. 考察

我々の開発した MAGE-A4 特異的 HLA-A2402 拘束性 TCR と NY-ESO-1 特異的 HLA-A0201 拘束性 TCR は正常細胞タンパク質由来のエピトープに交差反応する可能性は低いと考えられた。また、WT1 抗原と HLA-A24:02 の複合体を特異的に認識するキメラ抗原受容体 (CAR) 発現 T 細胞の作製に成功した。

E. 結論

我々の開発した MAGE-A4 特異的 HLA-A2402 拘束性 TCR 及び NY-ESO-1 特異的 HLA-A0201 拘束性 TCR を用いた TCR 遺伝子治療は正常組織に交差反応する可能性が低く、安全に実施可能であると考えられた。また、細胞内発現タンパク質由来のペプチドと MHC との複合体を認識する CAR が作製可能であり、従来の細胞表面抗原のみならず、細胞内抗原を標的とした CAR 療法が実施可能となる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishihara M, Seo N, Mitsui J, Muraoka D, Tanaka M, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. Systemic CD8+ T Cell-Mediated Tumoricidal Effects by Intratumoral Treatment of Oncolytic Herpes Simplex Virus with the Agonistic Monoclonal Antibody for Murine Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor. PLoS One, 9(8):e104669. 2014.
- 2) O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Gross E, Tran M, Mayfield SP, Ikeda H, Bui JD. Interleukin-17D mediates tumor rejection through recruitment of natural killer cells. Cell Rep., 7(4):989-998, 2014.
- 3) Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaike C, Wang L, Orito Y, Yamane M, Ueno H, Ideno M, Nukaya I, Enoki T, Mineno J, Takesako K, Hirano S, Shiku H. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8⁺ T cells. Eur J. Immunol., 44:1727-1758, 2014.

2. 学会発表

- 1) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Isao Tawara, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Naoyuki Katayama², Hiroshi Shiku. Tumor-specific TCR-engineered donor lymphocyte infusion therapy with reduced GVHD induction utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. American Society of Hematology 56th annual meeting, SF, USA, 2014.
- 2) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Tumor-specific donor Lymphocyte infusion therapy with allogeneic T cells utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. Society for immunotherapy of Cancer 29th Annual Meeting. National Harbor, MD, USA, 2014.
- 3) 池田裕明 TCR遺伝子改変T細胞輸注による新しいがん免疫療法の臨床開発 2014第63回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会 名古屋 2014.
- 4) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Uneno, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京 2014.
- 5) Yasushi Akahori, Motohiro Yoneyama, Hiroaki Ikeda, Yuki Orito, Yoshihiro Miyahara, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of

chimeric antigen receptor immunotherapy targeting intracellular WT1 gene product. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京 2014.

6) Hiroaki Uneno, Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第18回日本がん免疫学会総会 松山 2014.

7) 赤堀泰 米山元裕 池田裕明 宮原慶裕 織戸由貴 天石泰典 岡本幸子 峰野純一 竹迫一任 珠玖洋 WT1ペプチド-HLA-A24複合体を認識するヒト抗体の単離とそれを用いたCAR治療法の開発 第18回日本がん免疫学会総会 松山 2014.

8) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Naoyuki Katayama, Hirofumi Yoshioka, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Junichi Mineno, Kazuto Takesako, Hiroshi Shiku. Clinical application of TCR gene-transduced lymphocytes for patients with epithelial cancer and other types of malignancy: In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes with anti-tumor reactivity in patients. American Society of Gene & Cell Therapy 17th Annual meeting. Washington DC, USA, 2014.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

ペプチド+アジュバント併用療法の開発

研究分担者：石井 健 （独）医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究は主としてペプチドを抗原としたB型肝炎ワクチンの開発の為に、新規アジュバントの開発を目的とする。これまでに、モデル抗原およびモデルペプチドを用いて新規アジュバント開発研究を行っており、前年度（平成25年度）にナノ粒子状のTLR9リガンドである、K3-SPGの開発に成功し、ペプチドワクチンとしての効果および霊長類であるカニクイザルにおいても、強いアジュバント効果を確認している。本年度（平成26年度）は、研究班員にK3-SPGを提供する事で、B型肝炎治療法としての有用性の評価を開始した。さらに、2種類の自然免疫活性化分子を組み合わせた新しいワクチンアジュバント開発を試みた。

A. 研究目的

安全で有効性の高いワクチン開発のために、現在世界中で新規アジュバントの開発研究が行われている。実際に、国内においてアルミニウム塩アジュバントのみがワクチンの添加剤に含まれており、ワクチンの効果を高めている。しかしながら、ある種のウイルス感染にはアルミニウム塩では十分な免疫応答を誘導する事が困難である事から、新たなアジュバント、特に細胞傷害性T細胞を誘導し得るアジュバントの開発は必須である。また、現在ペプチドワクチンの開発も精力的に進められており、ペプチドワクチンのためのアジュバントの開発も重要な課題である。本研究は主としてペプチドを抗原としたワクチン候補に供与するアジュバントの開発を行う事で、B型肝炎の治療法およびワクチンの開発を目的と

する。

B. 研究方法

本研究では、昨年度に開発に成功したナノ粒子型TLR9リガンドであるK3-SPGを他の研究班員に供与し、B型肝炎の治療に有用であるか検討した。また、新たなワクチンアジュバント開発のため、TLR9リガンドであるK3を基盤とし、異なる自然免疫活性化分子と組み合わせる事で、アジュバントとしての効果をヒト細胞、マウスを用いて検討を行った。

（倫理面の配慮）

使用された実験動物は、医薬基盤研究所動物実験委員会規程に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減等に配慮した指針に従って実験を行った。ヒト細胞に関しては、医薬基盤研究所倫理委員会の

承認を得た上で、倫理面に配慮し、実験を行った。

C. 研究結果

昨年度に TLR9 リガンドである CpG ODN (K3) と β グルカンであるシゾフィラン (SPG) との複合体である凝集塊のないナノサイズの粒子状アジュバント K3-SPG の開発に成功した。K3-SPG はペプチドワクチンのアジュバントとしても働く事、さらにはヒト末梢血単核球に作用し、強力に IFN- α 、IFN- γ 産生を誘導した。この新規アジュバント K3-SPG の B 型肝炎治療としての有用性を検討する為に、共同研究先への提供を行った。いくつかの共同研究先では、B 型肝炎治療における K3-SPG の有用性を示す結果が得られている。

さらに、通常の CpG ODN のみではアジュバント効果および自然免疫活性可能が低い事から、CpG ODN を基盤とした新しいアジュバントの開発を行う為に、異なる自然免疫活性化分子である cGAMP を用いて検討を行った。この cGAMP は二本鎖 DNA の代謝産物であり、STING と呼ばれる分子を直接活性化することで自然免疫応答を誘導する事が知られている。この cGAMP と CpG ODN である K3 を同時にヒト末梢血単核球に刺激する事で、単独での刺激時に比べて強い IFN- α 、IFN- γ 産生を誘導した。さらに、この組み合わせはマウスに抗原と投与する事で、非常に強力なアジュバントとして働く事を見いだした。

D. 考察

今年度は、昨年開発に成功した K3-SPG

を大量に作製する事で、他の班員との共同研究を始める事が出来た。実際に、いくつかの系で、K3-SPG の有用性が確認出来たため、今後は投与量などを検討するとともに、GMP ロットの開発も行って行く必要がある。

また、K3-SPG とは異なるアプローチとして CpG ODN に cGAMP を加える事で強力なアジュバントとして働く事を見いだした。この結果は、異なる作用機序を有するアジュバントを組み合わせる事で、それぞれの特徴を生かした獲得免疫応答を誘導する事ができ、B 型肝炎治療または予防に適したアジュバントの開発が期待される。今後は、これら組み合わせがペプチドワクチンのアジュバントとしても有用であるか、また B 型肝炎治療に適しているかの検討が必要である。さらには、これらのアジュバントが cccDNA を除去する事が可能であるかの検討を進めて行く事が重要である。

E. 結論

上記の通り、ペプチドワクチンに最適化された K3-SPG アジュバントを、共同研究先に提供することで、B 型肝炎治療への有用性が検討されている。現在は GMP ロット化を進めており、より臨床での使用に近い形での提供が今後は重要であると考えられる。また、cccDNA の除去にかかわる自然免疫の機序を利用したアジュバント単独免疫療法開発にも着手していく事が B 型肝炎治療には重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khatoo M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *J Biol Chem*. 2015 Jan 26. pii: jbc.M115.636365. [Epub ahead of print]
- 2) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jonai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur J Immunol*. 2014 Dec 22. doi: 10.1002/eji.201445132. [Epub ahead of print]
- 3) Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1064-9.
- 4) Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 Sep 29;32(43):5607-13.
- 5) Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine*. 2014 Sep 15;32(41):5295-300.
- 6) Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014 Jul 10;9(7):e101835.
- 7) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8+ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *Biomed Res Int*. 2014;2014:158128.
- 8) Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, Aoshi T, Matsumoto Y, Ishii KJ, Egwang TG, Druilhe P, Horii T. Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *LoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98460.
- 9) Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014 May 14;15(5):551-63.
- 10) Onishi M, Kitano M, Taniguchi K,

- Homma T, Kobayashi M, Sato A, Coban C, Ishii KJ. Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. *Vaccine*. 2014 May 23;32(25):3004-9.
- 11) Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat Commun*. 2014 Apr 10;5:3566.
- 12) Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, Croxford JL, Koo CX, Ishii KJ, Akira S, Raulet DH, Gasser S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res*. 2014 Apr 15;74(8):2193-203.
2. 学会発表
- 1) Kuroda E, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 2) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvanticity. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 3) Kobiyama K, Ishii KJ. Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvanticity in immunogenicity of DNA vaccine. 2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA. Jul 21-23, 2014.
- 4) Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ. Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 5) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 6) Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ. AdvaxTM, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 7) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 8) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. Antigen free systemic monotherapy by nano-

- particulate TLR9 agonist induces CTL responses for the tumor regression. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 9) Kuroda E, Ozasa K, Kobiyama K, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 10) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine adjuvant. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 11) Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN production. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 招待講演
- 1) 2014年4月27~30日 23th.National Congress of Immunology 「Good and Bad Inflammation During Vaccination」
- 2) 2014年5月14日 熊本大学 最先端研究セミナー (リエゾンラボ研究会) 「Adjuvant Innovation for influenza and cancer vaccination」
- 3) 2014年6月1日 第40回神戸薬科大学卒業研修講座「ワクチン開発研究の最前線 安全安心なワクチンを目指して」
- 4) 2014年7月2日~4日 第41回日本毒性学会学術年会 教育講座 座長「がんワクチン開発の現状と課題」シンポジウム 座長「ワクチンの安全性評価」
- 5) 2014年7月11日 京都府立医科大学 特別講義「ワクチン、アジュバントの基礎と臨床：細胞死とマクロファージの役割」
- 6) 2014年8月25日~26日 第2回免疫記憶ーワクチン国際研究会シンポジウム 「Innovation and renovation of vaccine adjuvant」
- 7) 2014年9月11日~12日 第21回日本免疫毒性学会学術年会 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」
- 8) 2014年9月18日 日本生物科学研究所 第二研究会「アジュバント開発研究の最前線“免疫の種差と動物ワクチン”」
- 9) 2014年9月25~26日 第73回日本癌学会学術総会「次世代アジュバントの開発研究」
- 10) 2014年10月8日~13日 Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. 「Nucleic Acids as "Built-in" or "Inducible" Adjuvant during Vaccination」
- 11) 2014年10月16日 「医薬品等区分」俯瞰に関するワークショップ「次世代ワクチン<アジュバント>」
- 12) 2014年10月18日 第87回日本生化学会大会「RNA Polymerase-IIIは細胞質のRNA:DNAハイブリッドと細胞内miRNA発現を制御する」
- 13) 2014年10月18日~19日 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会「過去の歴史から学ぶこれからのワクチン開発と戦