

201438126A

厚生労働科学研究委託事業

革新的がん医療実用化研究事業

滑膜肉腫に対する
新設計がんペプチドワクチンと遺伝子改変T細胞療法から成る
複合的がん免疫療法の研究開発

平成26年度

委託業務成果報告書

研究代表者 影山 慎一

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人三重大学が実施した平成26年度「滑膜肉腫に対する新設計がんペプチドワクチンと遺伝子改変T細胞療法から成る複合的がん免疫療法の研究開発」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託事業
革新的がん医療実用化研究事業

滑膜肉腫に対する
新設計がんペプチドワクチンと遺伝子改変T細胞療法から成る
複合的がん免疫療法の研究開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 影山 慎一

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

滑膜肉腫に対する新設計がんペプチドワクチンと 遺伝子改変T細胞療法から成る複合的がん免疫療法の 研究開発に関する研究 -----	1
影山 慎一	

II. 分担研究報告

ワクチンアジュバントの製造・非臨床試験に関する研究 -----	7
石井 健	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	13
-----------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(がん対策推進総合研究事業)
総括研究報告書

「滑膜肉腫に対する新設計がんペプチドワクチンと遺伝子改変 T 細胞療法から成る
複合的がん免疫療法の研究開発」に関する研究

研究代表者 影山 慎一 三重大学 大学院医学系研究科 教授

研究要旨:本研究では滑膜肉腫を対象とする第 I 相治験の実施を目指して、新設計がんペプチドワクチンの非臨床試験を完遂する。本研究のワクチンは、安定した抗原提示に配慮して設計された「長鎖ペプチド抗原」と、ワクチンの迅速・高効率リンパ節内送達を実現する独自のデリバリーシステム「コレステリルプルラン」から成る。さらに独自の高活性アジュバント「K3 CpG オリゴ DNA」を組み合わせ、高性能がんワクチンとして開発する。平成 26 年度は、ワクチン製造に必要な原材料の製造、ワクチン製剤の製法・品質試験法の開発、ならびにワクチンとアジュバントの非臨床 POC 樹立や構造・活性最適化を行った。これらの準備に基づいて、平成 27 年度はワクチン製剤(試験物)の製造と非臨床試験を遂行する。

研究分担者

石井 健

医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト
プロジェクトリーダー

A. 研究目的

本研究では、予後不良の希少がんで治療法が少ない「滑膜肉腫」の新規治療法として新設計がんペプチドワクチンを開発する。本ワクチンは滑膜肉腫に高発現する 3 種のがん抗原(NY-ESO-1, MAGE-A4, WT1)を同時に標的とし、各がん抗原に対応した 3 本の合成長鎖ペプチドをワクチン抗原とする。各長鎖ペプチドは HLA-A0201 と HLA-A2402 に対応するキラー T 細胞エпитープと、複数の HLA クラス II に対応したヘルパー T 細胞エпитープを含有する。各エピトープ間の配列を工夫することで、全てのエピトープが安定に抗原提示されるように長鎖ペプチド抗原を設計している(特許出願技術)。さらにワクチンの性能を高めるべく、長鎖ペプチド抗原を近傍リンパ節に迅速・高率に送達できるデリバリーシステム「コレステリルプルラン(CHP)」を採用している(特許出願技術)。加えて、Toll 様受容体(TLR)9 の強力なアゴニストで独自配列を持つ K3 CpG オリゴ DNA をアジュバントに採用する

ことで、ワクチンによる特異的 T 細胞誘導を徹底的に向上せしめた。本ワクチンの滑膜肉腫での第 I 相治験の実施を可能にするため、本研究では本ワクチンの非臨床試験を遂行する。

B. 研究方法

(1) 長鎖ペプチド抗原の設計

がん抗原蛋白 NY-ESO-1、MAGE-A4、WT1 を同時に標的とするがんペプチドワクチンを目指した。具体的には、NY-ESO-1、MAGE-A4、WT1 それぞれに対応する長鎖ペプチド抗原 3 種を新たに設計した。いずれの長鎖ペプチド抗原も、元の抗原蛋白に由来する HLA クラス I エピトープ(アジア・欧米に多い HLA-A0201 とアジアに多い HLA-A2402)、ならびに promiscuous HLA クラス II エピトープを必ず含むようにした。これらのエピトープを連結した形で長鎖ペプチド抗原とするが、各エピトープの連結部(エピトープ間配列と呼ぶ)をどう設計すべきかは、世界的にも定見はない。申請者らは、抗原提示

細胞内でのエピトーププロセッシング機構を考慮して最適化したエピトープ間配列設計技術を保有しており(平成25年特許出願済)、本研究でこれを利用した。

(2) 長鎖ペプチド抗原の非GMP製造

ペプチドの製造を行っている医薬品製造受託企業(CMO)は国内外に数多く存在するが、40~50残基の長鎖ペプチドをGMP準拠製造で実施できる企業は限られてくる(国内には見つからなかった)。それでも候補は海外10社近くに及んだ。各社と協議を重ね、実績と費用面で最も優れていた米国PolyPeptide社を製造委託先に選定した。同社はFDAとPMDAによる査察等を受けており、とりわけ、日本のアカデミアに対してペプチドワクチンの原薬(ペプチド)を複数回にわたり供給してきた実績がある。

(3) コレステリルプルランとK3 CpGオリゴDNAの製造

コレステリルプルランは、天然多糖のプルランに対してコレステロール基を部分導入した両親媒性のポリマーである。合成は難しくはないが、分散工程に独自の手法を必要とする。日油株式会社はコレステリルプルランの合成技術に関する独自の特許技術を保有し、コレステリルプルランを受託製造できる世界で唯一の企業であり、本研究で用いるコレステリルプルランの合成を同社に委託した。

K3 CpGオリゴDNAは、医薬基盤研究所の石井らが同定したヒトで高活性のTLR9アゴニストである。石井らは日本のジーンデザイン社と協力してK3 CpGオリゴDNAのGMP製造体制を確立している。同社は国内で唯一、オリゴ核酸のGMP製造技術を保有しており、本研究で用いるK3 CpGオリゴDNAの合成を同社に委託した。

(4) がんペプチドワクチンの製造方法と品質試験法の開発

各長鎖ペプチド抗原は生化学的特性に配慮し、溶媒の選定、ペプチド:コレステリルプルラン配合比の最適化、3種のペプチド:コレステリルプルラン複合体混合物(最終製

剤)試作、工場生産への移管を前提としたスケールアップ、予備的安定性試験を行った。品質分析法としてHPLCやゲル電気泳動、発色法を用いたペプチドとペプチド:コレステリルプルラン複合体分析を試行した。

(5) がんペプチドワクチンの非臨床POC樹立

マウスモデルを用いたがんペプチドワクチンの非臨床POC研究として、コレステリルプルランとマウスがん抗原蛋白に由来するモデル長鎖ペプチド抗原を用いたワクチンを作製した。これを投与したマウスにおいてワクチン特異的T細胞応答と抗がん効果に対するコレステリルプルラン利用と長鎖ペプチド抗原設計技術の影響を解析した。その機序として、コレステリルプルランによるワクチン抗原のデリバリーの詳細を分析した。

(1)で設計した長鎖ペプチド抗原をコレステリルプルランと複合体化したワクチン製剤(本来の試験物)の生物活性を確認するために、ヒトB細胞株を抗原提示細胞とする試験管内抗原提示反応系を準備し、ワクチン製剤による特異的T細胞刺激を測定した。

C. 研究結果

平成26年度

(1) 長鎖ペプチド抗原の設計と非GMP製造

設計したNY-ESO-1長鎖ペプチド抗原、MAGE-A4長鎖ペプチド抗原、WT1長鎖ペプチド抗原は、いずれもシステイン残基を一つずつ含む。システインは分子間SS結合によるペプチド二量体化の原因となるため、品質管理の面からは、できれば他のアミノ酸に置換することが望ましい。しかしいずれのシステインもT細胞エピトープ上に存在するため、アミノ酸置換によりエピトープがT細胞に認識されなくなる恐れがあった。そこで、アミノ酸置換として各長鎖ペプチド抗原のシステインをセリンやアラニン等に置換した各長鎖ペプチド抗原を試作し、独自のin vitro抗原提示反応系で評価したところ、全ての長鎖ペプチド抗原でアミノ酸置換によって該当のエピトープが機能しなくなったことから、システインの排除は断念することとした。

申請者らはPolyPeptide社を訪問し、長鎖

ペプチド抗原の非GMP製造(と将来のGMP製造)について議論を行った。同社は長鎖ペプチド抗原からのシステインの排除を勧めたが、システインはワクチンの活性に必要で排除できないことを説明した。ある長鎖ペプチド抗原については、安定化のためにC末端にグリシンを付加することをPolyPeptide社は推奨した。このグリシン付加はワクチンの活性に影響を及ぼさないと判断して了承した。同社のGMP製造施設を全て見学したところ、長鎖ペプチド抗原の製造と品質管理に十分な設備と技術を備えていることが確認された。

同社と協議の上、100ミリグラムスケール(純度85%以上)で各長鎖ペプチド抗原の試作を行った結果、いずれの長鎖ペプチド抗原も特に問題なく合成された。引き続き5グラムスケール(純度85%以上)での非GMP製造を行い、予想した収率を若干下回することはあったが、概ね順調に合成を終えた。得られた長鎖ペプチド抗原は日本へ輸送され、平成27年度の試験物(がんペプチドワクチン)の製造に使用される。

(3) コレステリルプルランとK3 CpGオリゴDNAの製造

日油社で200グラムのコレステリルプルラン製造を行い、ジーンデザイン社で20グラム規模のK3 CpGオリゴDNA製造を行った。いずれも純度・収量・構造等の規格を満たす目的物入手した。いずれも平成27年度の試験物(がんペプチドワクチン)の製造に使用される。

(3) がんペプチドワクチンの製法・品質試験法の検討

ペプチドは配列により水溶性や凝集性などの化学的性質に偏りが出やすい。そのため、本研究で用いる各長鎖ペプチド抗原について最適な溶媒を求める必要がある。各長鎖ペプチド抗原を様々なpHの水系バッファ―や有機溶媒に溶解したところ、MAGE-A4長鎖ペプチド抗原とWT1長鎖ペプチド抗原は中性の水系バッファ―によく溶解した一方、NY-ESO-1長鎖ペプチド抗原はpH10以上でしか溶解しなかった。一般にアルカリ条

件下ではペプチドは分解しやすいため、pH10の水系バッファ―を溶媒に用いるのは不適である。そこでNY-ESO-1長鎖ペプチド抗原についてはDMFを溶媒として用いることとした。DMFの使用により品質試験において残留溶媒の測定が必須となるが、止むを得ない対応と考えた。

定めた溶媒に溶解した各長鎖ペプチド抗原とコレステリルプルランの配合比の最適化を行った。目論見としてはペプチド濃度をなるべく高く維持したいために、ペプチドの投入量を上げる試みを行った。これに伴い、コレステリルプルランの投入量も増量した。その結果、コレステリルプルランは10 mg/mLの濃度より高くするとゲル化する傾向があり、10 mg/mLを超える濃度は不適と判断された。一方で、各長鎖ペプチド抗原は2 mg/mLを上回ると不溶物が発生する傾向があり、これも2 mg/mLを上回らない濃度とした。以上の結果から、最適な配合比を決定した。

ペプチドとコレステリルプルランの複合体化工程において、溶媒交換が必要となる。実験室ではこれを透析法で行うが、透析法は工場生産では利用できない。代わりに限外濾過法の適用を試みながら、反応系のスケールアップを行った。その結果、分子量カットオフ値10kDaの限外濾過では目詰まりなどの障害が生じて不適であったが、同30kDaの限外濾過では問題なく全行程を遂行できた。以上の所見を基に将来、工場規模での製法を確立する。

有効成分たる各長鎖ペプチド抗原と、その最終形態であるペプチド:コレステリルプルラン複体の品質試験法の確立は、工場生産に向けて必須事項である。一般にペプチド分析には逆相HPLCが有用であるが、コレステリルプルランと複合体化した後では適用できないことが判明した。他方、ゲル濾過HPLCは複体の形成を判別可能であった。ペプチドの定量法として、逆相HPLCではなく発色法とUV吸収法は有用であった。また、ポリアクリルアミド電気泳動法により、ペプチドの多量体形成を定性的に分析することも可能であった。今後、以上の成果を元に、品質試験法一式を確立する。

(4) がんペプチドワクチンの非臨床 POC 樹立

マウスがん抗原蛋白をモデル抗原として、長鎖ペプチド抗原とコレステリルプルランの複合体を作製した。本モデルワクチンのマウスにおけるT細胞誘導能力と抗がん効果、体内動態を解析して、本ワクチンの有効性と作用機序を探った。その結果、コレステリルプルランはリンパ節の髄質に局在し優れたワクチン抗原提示能を有する新しいマクロファージ「髄質マクロファージ」へワクチン抗原を選択的に送達することを見出した。コレステリルプルランを用いた長鎖ペプチドワクチンは、アジュバント(TLRリガンド等)存在下で著しく増強された免疫誘導作用と抗がん効果を発揮する(平成24年特許出願済)。これはリンパ節マクロファージが樹状細胞よりもTLR刺激感受性が高いという特性に基づいている。

長鎖ペプチド抗原に含まれる各エピトープ間の配列の最適化について、マウスモデルで検討した。マウスキラーT細胞に認識される3つのエピトープを連結し、その連結部の配列について、細胞内抗原処理機構の仕組みに配慮しながら数種の候補配列を評価した。その結果、ある特定のエピトープ間配列群を用いることで、長鎖ペプチド抗原に含まれるすべてのエピトープが安定に提示されることを見出した。前後のエピトープによっては、最適なエピトープ間配列が異なることもあることも明らかとなった。

以上の所見に基づいて設計された長鎖ペプチド抗原:コレステリルプルラン複合体から成るワクチン製剤の生物活性として、ヒトB細胞株を抗原提示細胞に採用した試験管内抗原提示反応での特異的T細胞刺激活性を評価した。その際、最適なエピトープ間配列を改めて選定した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物倫理に配慮して実施された。

D. 考察

長鎖ペプチド抗原の設計では、エピトープ間配列の選び方によっては、長鎖ペプチド抗原に含まれるエピトープの活性(抗原提

示)が著しく減弱することを経験した。エピトープ間配列の安易な選択がワクチンの有効性を損なう恐れを示唆しており、ワクチン設計上の注意点として広く周知する必要がある。また、現在のペプチド合成技術にも限界があり、ワクチンとして最適の長鎖ペプチド抗原を設計しても、その配列の化学的特性から化学合成に向かないことがある。化学的特性によって、溶解可能な溶媒が著しく異なることも経験した。こうした結果を踏まえて、今後のペプチドワクチンの設計では、初期段階からペプチド合成化学者の意見が重要と考える。

E. 結論

滑膜肉腫に高発現するがん抗原蛋白 NY-ESO-1、MAGE-A4、WT1 に由来するキラーT細胞エピトープとヘルパーT細胞エピトープを同時に含む3種の長鎖ペプチド抗原を新規設計した。設計にあたり、全てのエピトープが期待通りに提示されるようにエピトープ間配列の最適化を行った。これをデリバリーシステム・コレステリルプルランと複合体化したワクチン製剤の有効性と作用機序をマウスモデルとヒト免疫細胞系で確認した。確定した長鎖ペプチド抗原とコレステリルプルラン、ならびにアジュバントの CpG オリグDNA の高品質原材料の製造に成功し、次年度のワクチン製造に向けて適切に保管中である。そのワクチン製造に備えて製造方法の最適化と品質試験法の開発を行った。以上の準備を基に、次年度のワクチン製剤(試験物)製造と非臨床試験の順調な遂行が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, Bloy N, Castoldi F, Abastado JP, Agostinis P, Apte RN, Aranda F, Ayyoub M, Beckhove P, Blay JY, Bracci L, Caignard A, Castelli

- C, Cavallo F, Celis E, Cerundolo V, Clayton A, Colombo MP, Coussens L, Dhodapkar MV, Eggermont AM, Fearon DT, Fridman WH, Fučíková J, Gabrilovich DI, Galon J, Garg A, Ghiringhelli F, Giaccone G, Gilboa E, Gnjatic S, Hoos A, Hosmalin A, Jäger D, Kalinski P, Kärre K, Kepp O, Kiessling R, Kirkwood JM, Klein E, Knuth A, Lewis CE, Liblau R, Lotze MT, Lugli E, Mach JP, Mattei F, Mavilio D, Melero I, Melief CJ, Middendorf EA, Moretta L, Odunsi A, Okada H, Palucka AK, Peter ME, Pienta KJ, Porgador A, Prendergast GC, Rabinovich GA, Restifo NP, Rizvi N, Sautès-Fridman C, Schreiber H, Seliger B, Shiku H, Silva-Santos B, Smyth MJ, Speiser DE, Spisek R, Srivastava PK, Talmadge JE, Tartour E, Van Der Burg SH, Van Den Eynde BJ, Vile R, Wagner H, Weber JS, Whiteside TL, Wolchok JD, Zitvogel L, Zou W, Kroemer G. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014 Dec 30;5(24):12472–508.
- 2) Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T. Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation. *PLoS One*. 2014 Sep 25;9(9):e108494.
 - 3) Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y. High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine*. 2014 Oct 14;32(45):5901–7.
 - 4) Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Tahara Y, Momose F, Sawada S, Mukai SA, Akiyoshi K, Shiku H. Nanogel-based immunologically stealth vaccine targets macrophages in the medulla of lymph node and induces potent antitumor immunity. *ACS Nano*. 2014 Sep 23;8(9):9209–18.
 - 5) 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*. 2014 Aug 8;9(8):e104669.
 - 6) Ochi F, Fujiwara H, Tanimoto K, Asai H, Miyazaki Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Barrett J, Ishii E, Yasukawa M. Gene-modified human α/β -T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res*. 2014 Mar;2(3):249–62.
 - 7) 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*. 2014 Jun;44(6):1747–58.
 - 8) Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T. Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation. *PLoS One*. 2014 Sep 25;9(9):e108494.
 - 9) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S,

Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. J Hematol Oncol. 2014 Jan 6;7:3.

2.学会発表

- 1) Targeting Lymph Node Medullary Macrophage with Immunologically Stealth Nanogel Vaccine Induces Enhanced Anti-Tumor T Cell Response, Naozumi Harada, Daisuke Muraoka, Tae Hayashi, Fumiyasu Momose, Yoshiro Tahara, Shin-ichi Sawada, Kazunari Akiyoshi, and Hiroshi Shiku, CIMT (Germany), May 2014.
- 2) 原田直純、村岡大輔、秋吉一成、珠玖洋、免疫ステルスナノゲルワクチンはリンパ節マクロファージへの抗原デリバリーを介して強力な抗腫瘍T細胞応答を誘導する。第73回日本癌学会学術総会。横浜。2014.
- 3) 宮原慶裕、藤井啓介、瀬尾尚弘、原田直純、珠玖洋。簡便且つ半定量性のある新規免疫モニタリング法の開発。第73回日本癌学会学術総会。横浜。2014.
- 4) 珠玖洋。がん免疫療法の新しい流れ。第73回日本癌学会学術総会。横浜。2014.

H.知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(がん対策推進総合研究事業)
分担研究報告書(平成 26 年度)

ワクチンアジュバントの製造・非臨床試験に関する研究

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

A. 研究目的

現在、効果的で安全性の高い新たなワクチン開発のために、世界中で新規アジュバントの開発が進められている。実際に、いくつかのアジュバントは臨床試験が進んでいる。本研究では、我々がこれまでに開発研究を行ってきた CpG ODN アジュバントを基盤としたがんワクチンへの応用を目的とする。

B. 研究方法

我々が開発を行っているヒト型 CpG ODN である K3 を用いてアジュバント効果および抗腫瘍活性を検討した。さらに、K3 の効果を改善及び高める為に、異なる自然免疫活性化機構を有する cGAMP を組み合わせた併用療法 (K3 + cGAMP)を用いて、同様に検討した。

C. 研究結果

ヒト型 TLR9 リガンドである K3 の抗腫瘍効果を検討するために、担がん状態のマウスの腫瘍に K3 を投与した結果、抗腫瘍効果が確認された。しかしながら、K3 単独でのアジュバント効果および抗腫瘍効果は低く、CTL の誘導能に関しても十分ではないため、異なる自然免疫活性化機構を有する cGAMP を用いて検討を行った。cGAMP のみでは Th2 型の免疫応答が誘導されるが、K3 と cGAMP を組み合わせる事により、強力な Th1 型免疫応答を誘導する事に成功した。さらに、K3 + cGAMP は強力に CTL をも誘導する事が確認された。

併用療法 (K3 + cGAMP)の抗腫瘍効果を検討するために、マウスモデルを用いて検討を行った結果、K3 単独に比べて、併用療法を行う事で、強力な抗腫瘍

効果が確認された。これらの抗腫瘍効果は抗原を必要とせず、アジュバントを腫瘍に直接投与する事で効果を発揮する事が確認された。

D. 考察

本研究ではこれまでに開発研究を行ってきた CpG ODN を基盤とすることで、さらに強力な Th1 アジュバントおよび抗腫瘍薬の開発に成功した。実際に、これらアジュバントは非常に強力に CTL を誘導する事が確認されている。また、作用機序に関しても解析が進んでおり、標的となる細胞の同定も行われている。

今後は、これらアジュバントの安全性を確立するために、非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いて、安全性の検討を行う予定である。さらには、新規アジュバントの GMP 規格の開発に着手する予定である。

E. 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, Furuhata 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. *PLoS 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 adjuvant activity. 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 adjuvant activity 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. Advax™, 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-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略」
- 14) 2014年10月20日～21日 The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 (東京大学)「Nucleic acids as ‘built-in’ or ‘inducible’ adjuvant during vaccination」
- 15) 2014年11月6～7日 The 2014 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」
- 16) 2014年11月10日～12日 第62回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム「次世代のワクチン開発～Next generation vaccine development」 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」
- 17) 2014年12月4日～5日 第12回日本糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム「新規アジュバント開発に向けて」
- 18) 2014年12月4日～5日 第27回日本バイオセラピー学会学術集会「がん免疫療法に資する核酸医薬を基盤としたアジュバントの開発」
- 19) 2015年2月3日 琉球大学 講義「アジュバント開発研究の新展開:安全でよく効くワクチンを目指して」
- 20) 2015年3月25日～28日 日本薬学会第135年会「アジュバント開発研究の最前線:データベースを駆使した安全性、有効性のバイオマーカー」

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

- 1) 特願 2013-196206, PCT/JP2014/

074835 「免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途」平成 26 年 9 月 19 日、石井健・小檜山 康司・青枝 大貴・武下文彦・粕谷 祐司・丹羽 貴子・小泉誠、独立行政法人医薬基盤研究所・第一三共株式会社

- 2) 特願 2014-235934 「異なる核酸アジュバントの組み合わせによる新規 Th1 誘導性アジュバントおよびその用途」平成 26 年 11 月 20 日、石井健、黒田 悦史、Temizoz Burcu
- 3) PCT/JP2014/084772 「免疫賦活活性を有する核酸多糖複合体の抗腫瘍薬としての応用」平成 26 年 12 月 26 日、石井 健・青枝 大貴・小檜山康司、独立行政法人医薬基盤研究所

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

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「滑膜肉腫に対する新設計がんペプチドワクチンと遺伝子改変T細胞療法から成る複合的がん免疫療法の研究開発」

機関名 国立大学法人 三重大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Targeting Lymph Node Medullary Macrophage with Immunologically Stealth Nanogel Vaccine Induces Enhanced Anti-Tumor T Cell Response (ポスター)	Naozumi Harada, Daisuke Muraoka, Tae Hayashi, Fumiyasu Momose, Yoshiro Tahara, Shin-ichi Sawada, Kazunari Akiyoshi, and Hiroshi Shiku	CIMT (Germany)	May 2014	国外
免疫ステルスナノゲルワクチンはリンパ節マクロファージへの抗原デリバリーを介して強力な抗腫瘍T細胞応答を誘導する (口頭)	原田直純、村岡大輔、秋吉一成、珠玖 洋	第 73 回日本癌学会学術総会	2014年10月	国内
がん免疫療法の新しい流れ (口頭)	珠玖 洋	第 73 回日本癌学会学術総会	2014年10月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Nanogel-based immunologically stealth vaccine targets macrophages in the medulla of lymph node and induces potent antitumor immunity.	Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Tahara Y, Momose F, Sawada S, Mukai SA, Akiyoshi K, Shiku H.	ACS Nano.	2014 Sep 23	国外

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「滑膜肉腫に対する新設計がんペプチドワクチンと遺伝子改変T細胞療法から成る複合的がん免疫療法の研究開発」

機関名 独立行政法人医薬基盤研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
ポスター 「Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages.」	Kuroda E, Ishii KJ	22 nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe.	June 2-3, 2014	国内
ポスター「K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvanticity.」	Kobiyama K, Ishii KJ.	22 nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe.	June 2-3, 2014	国内
口頭・ポスター「Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvanticity in immunogenicity of DNA vaccine.」	Kobiyama K, Ishii KJ.	2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA.	Jul 21-23, 2014	国外
口頭・ポスター「Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology.」	Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ.	The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA.	Oct 8-13, 2014.	国外
ポスター「Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant.」	Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ.	Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA.	Oct 8-13, 2014	国外
口頭・ポスター「Advax™, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen.」	Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ.	Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA.	Oct 8-13, 2014.	国外
口頭・ポスター「K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL	Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ.	Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine	Oct 8-13, 2014.	国外