

櫻井和朗

北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科 ・ 教授

DDS 粒子のナノ界面と鳥インフルエンザワクチン等への応用

§1. 研究実施の概要

次世代の医薬品開発の要となる DDS ナノ粒子の溶液中での構造とその薬理効果に関して、世界で最も輝度が高い放射光 X 線を用いた測定と動物試験や生物的な評価を組み合わせる俯瞰的に研究を進めている。H22 年度は遺伝子導入に用いる DNA と脂質の複合体の構造を検討する上で ASAXS(異状 X 線小角散乱)の可能性を検討した結果、日本では初めてソフトマテリアルからの放射光を用いた高精度の構造解析の可能性が見出された。また、インフルエンザのワクチンとして従来にない安全で高効率なアジュバントの効果に関して、大型動物での試験を開始した。高分子ミセルにおいては、ABC 効果(免疫誘導)に関して、自然免疫が重要であることが示唆される新しい知見が得られた。

§2. 研究実施体制

(1) 北九大グループ

- ① 研究分担グループ長: 櫻井 和朗(北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科・教授)
- ② 研究項目「生体条件下での DDS 構造の解明と多糖核酸複合体の界面構造」
 - ・カチオン性脂質と DNA 形成する複合体の ASAX に関するモデル脂質の合成
 - ・高分子ミセル系の SAXS
 - ・散乱可視化のためのモデル系の合成
 - ・多糖核酸複合体の物性と薬理効果の相関: TNF α の系での実証

(2) 東大グループ

- ① 研究分担グループ長: 雨宮 慶幸(東京大学大学院 新領域創成科学研究科・教授)

②研究項目「X線光子相関法を用いたゲル中でのナノ粒子ダイナミクスの解析」

- ・ ナノ粒子充填材料における Aging 挙動の観察
- ・ pH 応答性ミセル(ナノゲル)の小角X線散乱解析

(3)JASRIグループ

①研究分担グループ長: 八木 直人((財)高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・副部門長)

②研究項目「高精度の散乱測定技術の確立」

- ・ 小角広角同時測定法の開発
- ・ Pilatus300K-W の性能評価
- ・ カラム溶出タンパク質の実時間X線散乱測定法
- ・ *ab initio* 形状決定ソフトと MD モデルを組み合わせて分子構造を決定

(4)慈恵医大グループ

①研究分担グループ長: 横山 昌幸(東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター医用エンジニアリング研究室・准教授)

②研究項目「高分子ミセルの薬物・造影剤封入内核の構造解析」

(5)医薬基盤研グループ

①研究分担グループ長: 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・プロジェクトリーダー)

②研究項目「ナノ DDS 粒子を用いた新規ワクチン開発研究」

- ・ SPG-CpGDNA 複合体のヒト化(Humanization)を行うためのヒト型 CpGODN のうち K-タイプ、D-タイプのヒト型 CpG 配列を用いて SPG 複合体を作成
- ・ マウス、ヒト免疫細胞を用いて活性のスクリーニング、複合体構造の最適化
- ・ ヒト臨床試験に向けたサルの動物実験による免疫学的解析

§ 3. 研究実施内容

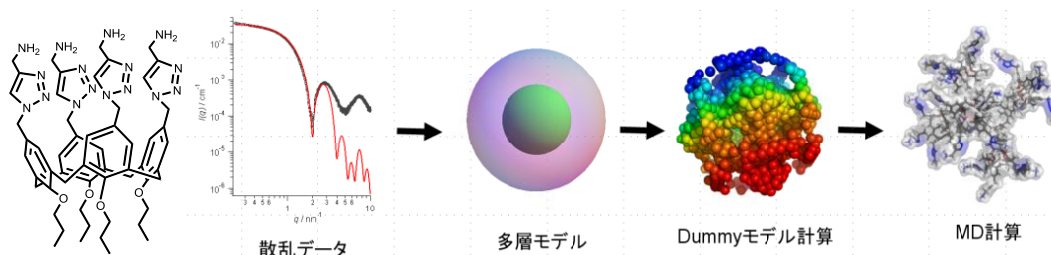
(文中の右肩の番号は(4-1)に対応する)

(1) 北九大グループ

高分子ミセル系の SAXS

フィールド・フロー・フラクショネーション(FFF)が会合系やミセル系などの巨大会合系の分析に有効であることが判明した。FFF に接続されている光散乱から分子量と会合数を求め SAXS から内核の形状を求めることで精密な解析が可能となった。²⁾

散乱の可視化のためのモデル系の合成



右端のカリクサレン誘導体は水中でミセルを形成し、その散乱から極めて分布の狭い形状を取っていることがわかる。これは従来の単純化された2層モデルでは散乱を説明することが困難であり、タンパク質の化学で用いられている形状決定計算で構造を解析すると、正6面体構造であることが示された。この形状をもとにして、MD 計算を試みたところ、散乱を完全に説明することが可能となった。

多糖核酸複合体の物性と薬理効果の相関:TNF α の系での実証

構造と物性、薬理効果の関係を見るために、TNF α の系でモデル動物試験の系を立ち上げた。特異的な DDS をしているために、従来の投与量の 1/10 から 1/100 の濃度でも有効な治療効果があることが示された。これらの結果は DDS 学会誌の特集号に取り上げられた。



(2) 東大グループ

X線光子相関分光法 (XPCS) のナノ粒子充填ソフトマテリアルへの応用

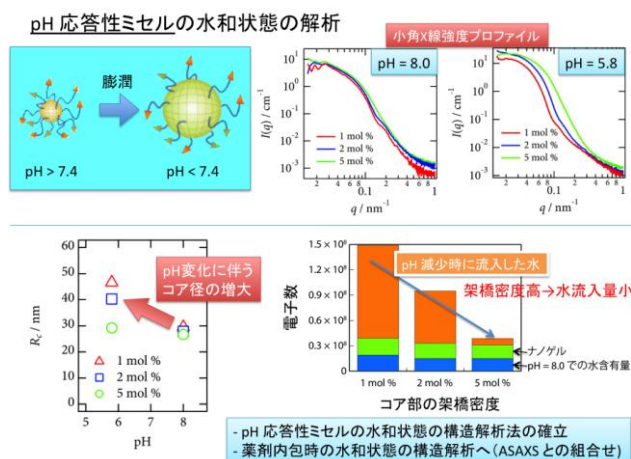
JASRI グループと共同で XPCS 用検出器の高度化に取り組むとともに、ナノ粒子充填液晶を対象とした予備的検討を実施した。これまでにナノ粒子の充填量や液晶の相に応じて異なるダイナミクスが観測されている。一方、当グループがこれまで実施してきたナノ粒子充填ゴム材料の XPCS 実験において、ナノ粒子とゴムの混練りからの経過時間に応じてダイナミクスが緩和時間にして一桁程度変化することが明らかとなった。これはナノ粒子を充填したソフトマターについて

XPCS 実験をする際に常に測定上問題となると考えられる。

小角X線散乱を用いた pH 応答性ミセル(ナノゲル)の構造解析

pH 変化に敏感に応答して膨潤・収縮の構造変化を示す pH 応答性ナノゲルを筑波大・長崎研より提供して頂き、小角X線散乱法を用いた構造解析を実施した。小角X線散乱法の結果、これまで明らかではなかった膨潤に伴うコアの構造変化を解明することに成功した。さらに北九州大・櫻井グループによる FFF-MALS の結果と組み合わせることで、図に示すように構造変化に伴う物質流入量を定量的に解析することに成功し、

コア部のナノゲル架橋密度に依存して膨潤時の水流入量が変化することを明らかにすることができた。これらの成果は pH 応答性ミセルの水和状態の構造解析法の確立につながり、次年度以降、異常小角X線散乱法と組み合わせることで薬剤内包時の水和状態の構造解析につながると期待される。



(3)JASRIグループ

タンパク質結晶構造解析用検出器を用いた小角広角同時測定法の開発

(タンパク質の結晶構造解析には FFF/MALS と連動した SAXS 測定は非常に有効であると考えられる。その前段階として以下のプログラムを作製した。)

タンパク質結晶構造解析用二次元CCD検出器 Jupiter210 を用いて、小角広角同時測定システムを開発した。測定可能 q レンジは、カメラ長に応じて $q = 0.18 \sim 2.1 nm^{-1}$ または、 $q = 0.25 \sim 3.1 nm^{-1}$ である。性能評価を行うと共に、歯エナメル質やラット大脳を試料とした小角広角同時マッピング測定を行った。小角領域と広角領域では大きく強度が異なるため、同一の露光時間では十分なダイナミックレンジを確保できない。そのため、常に2~3種類の異なった露光時間で回折・散乱を記録するソフトウェアを作製した。^{21), a)}

Pilatus300K-W の性能評価と制御ソフトウェアの開発

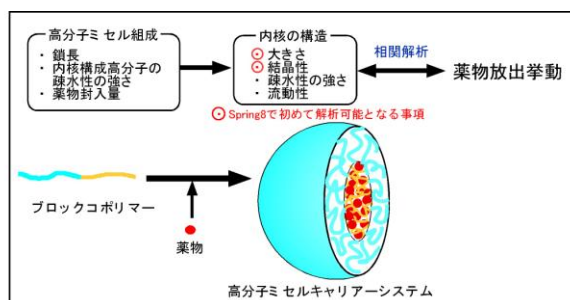
小角広角同時測定用検出器としての Pilatus300K-W の性能評価を行った。検出器をダイレクトビームに対してオフセットして配置することにより、モジュール間ギャップによる不感領域の問題はほぼ解消された。しかし広角領域では測定角度範囲が小さくなるため、完全な円周平均に比べてデータの統計が悪化する傾向が認められた。また Pilatus300K-W の制御においては、外部からのトリガ入力に8秒以内に得られない場合にはタイムアウトするという問題が認められた。これは一定時間おきに測定を繰り返す実験では大きな問題となる。また、試料の放射線損傷を防ぐために X 線シャッターと露光との同期も必要であったため、専用の測定制御ソフトウェアを作成した。

カラム溶出タンパク質の実時間X線散乱測定法の開発

GPC や FFF を用いた DDS 粒子測定実験に向けた技術開発として、カラムから溶出されるタンパク質からのX線溶液散乱をリアルタイムに Pilatus300K-W を用いて測定した。尿素で変性させたリゾチームをゲル濾過カラムに加え、タンパク質濃度は UV モニターで記録、30秒おきに X 線散乱を測定し慣性半径と原点散乱強度を求めた。タンパク質の溶出に伴って原点散乱強度が増加した。慣性半径はほぼ一定の値になり、カラムによって尿素が除かれリゾチームの巻き戻りが生じたことを示している。

(4) 慈恵医大グループ

これまでの SAXS 解析により、PEG-b-P(Asp(Bzl))ブロックコポリマーから成る高分子ミセルに合成レチノイド薬 LE540 を封入したシステムにおいて、Asp 残基での疎水性の Bzl 基の置換率が約 82%を境にミセル内核の大きさ及び結晶性が大きく変化することがわかった。また、薬物 LE540 の封入量もミセル内核内の疎水鎖の局所構造を大きく変化させることがわかっている。この結果に基づき、興味深い組成に焦点を当て、精密な高分子合成を行った。結果を表に示す。今回の合成では、Bzl 置換率80%を越えるなるべく高い置換率を得る事を検討した。その結果、Asp 残基の活性化剤として用いる DBU の量を1等量に厳密に合わせる事が鍵であることを見だし、88.6%と言う最も高い置換率を得ることに成功した。



Run	Diameter			GPC
	N(Asp)	N(Bzl)	% (Bzl)	
1	26.4	20.3	76.9	5.37
2	26.4	21.5	81.4	5.38
3	26.4	23.4	88.6	5.28
4	26.9	17.7	65.8	5.44
5	26.9	22.4	83.3	5.24
6	20.2	16.9	83.7	5.37
7	29.7	24.4	82.2	5.38
8	23.8	20.0	84.0	5.30
9	32.0	24.7	77.2	5.42

PEG を外側に有するキャリアーシステムにみられる免疫現象である ABC 現象の機構解析を行った(医薬基盤グループとの共同研究)。まず、ABC 現象を起こす PEG-修飾リボソームを用い、炎症性サイトカインの誘導が抑制されている MyD88KO マウスを用いたところ、ABC 現象の発現は著しく低かった。この結果は、ABC 現象には自然免疫の寄与が大きいことがわかり、獲得免疫のみの解析が成されていた従来の研究とは異なる新規の知見を得た。次年度には、この結果に基づき、高分子ミセルを用いた解析を行う。²⁾

(5) 医薬基盤研グループ

ヒト型 CpGDNA の最適化

知られている 2 種類のヒト型 CpG DNA の配列を持った DNA を5'末端、3 末端、もしくは両方

にもった ODN を作成し、dA40 配列に対するベータグルカン(シゾフィラン:SPG)との複合体を作成した。その複合体のうち、Dタイプの CpG 配列(D35)を3'末端に配備したものは白濁し、GMP ロット作成に不向きであり、かつそれぞれの複合体が異なるサイズのナノ粒子を形成することが判明した。D35 が 5'末端にあるものは白濁が見られず、今後 GMP ロット開発に向けて最適であると考えられた。

これらのヒト型 CpG/ODN-ベータグルカン複合体 (SPG) のサイトカイン産生能と、インフルエンザワクチンのアジュバントとしての免疫原性誘導能を解析した。FLT3L,および GM-CSF にて誘導した2つの樹状細胞 (FL-DC,GM-DC) にて IL-12、IFN α 産生能を検討したところ、ベータグルカンを結合するdA40 配列の 5', 3'末端のどちらか、もしくは両方に CpG 配列があるか、また、ベータグルカンと複合化するかしらないでサイトカイン産生能が著しく変化した。IL-6 などほかのサイトカインや、脾臓などの実験も加えて結果を総合すると K-タイプ、D-タイプともに 5'末端に CpG-配列をもつ DNA-ベータグルカン複合体 (SPG) がもっとも活性が強く、かつベータグルカンに複合化することがその活性に必須であることが明らかになった。(図1)

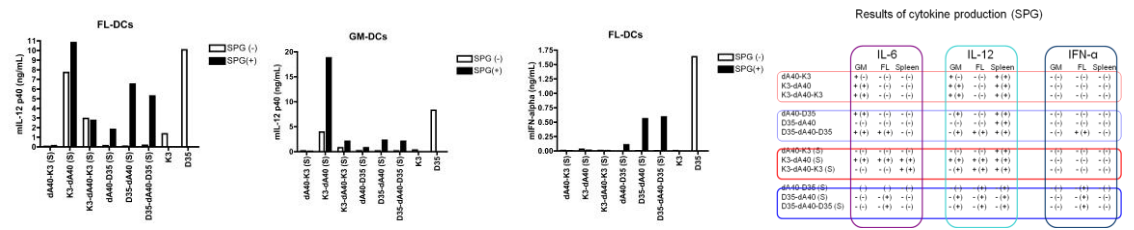


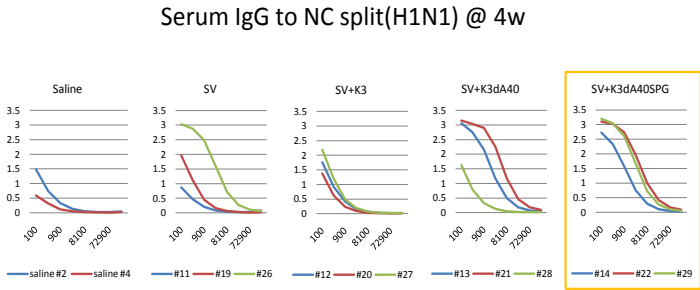
図1:アジュバントの自然免疫活性化における、異なるヒト型 CpG 配列 (K3,D35) とベータグルカン結合配列 (dA40) の位置の違いと複合化の有無の役割

アジュバント効果の確認

K3 タイプのアジュバントを実際に市販のスプリットインフルエンザワクチンと混合し、経鼻ワクチンとしてマウスに投与したところ、Th1 型の血清 IgG2a、鼻腔 IgA 抗体価が、上記の In vitro の結果と同様 5'末端に CpG 配列をもつベータグルカン複合体がもっともアジュバント効果が高いことが判明した。さらには同様の実験を皮内接種で行ったところKタイプ、Dタイプともにベータグルカン複合体 (SPG) のアジュバント効果が著名に高いことが抗原特異的抗体価、T細胞の計測で明らかになった。

人に近い大型動物での実証試験

マウスで効果があった K3タイプのアジュバントを、カンクイザルの系で試験をした。結果を右に示す。SPG 化で明らかに免疫活性が向上していることが分かった。現在、これらのデータを製薬会社を示して、実用化を目指した協議を検討中である。



カンクイザル免疫実験
Influenza split vaccine + CpG-SPG adjuvant immunization
Split 5ug + CpG 30ug(4.7nmol相当) (s.c.) x2回

肩があるほうが High affinity

- TA429-4; 8群23頭
- 1. PBS 2頭
- 2. Flu Split vaccine(H1N1)5ugのみ 3頭
- 3. Flu Split vaccine(H1N1) + K3(30ug=4.72nmol) 3頭
- 4. Flu Split vaccine(H1N1) + K3-dA40(s)(92ug=4.71nmol) 3頭
- 5. Flu Split vaccine(H1N1) + K3-dA40(s)[SPG]

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Cevayir Coban, Yoshikatsu Igari, Masanori Yagi, Thornik Reimer, Shohei Koyama, Taiki Aoshi, Keiichi Ohata, Toshihiro Tsukui, Fumihiko Takeshita, Kazuo Sakurai, Takahisa Ikegami, Atsushi Nakagawa, Toshihiro Horii, Gabriel Nunez, Ken J. Ishii, and Shizuo Akira¹. Immunogenicity of Whole-Parasite Vaccines against Plasmodium falciparum Involves Malarial Hemozoin and Host TLR9. Cell Host & Microbe. Volume7, Issue 1, 50-61, (2010)
2. Akiba, I.; Terada, N.; Hashida, S.; Sakurai, K.; Sato, T.; Shiraishi, K.; Yokoyama, M.; Masunaga, H.; Ogawa, H.; Ito, K.; Yagi, N. Encapsulation of a Hydrophobic Drug into a Polymer-Micelle Core Explored with Synchrotron SAXS. Langmuir, 26, 7544-7551(2010) DOI: 10.1021/la904355p
3. Tomoki Nishimura, Hiroyasu Masunaga, Hiroki Ogawa, Isamu Akiba and Kazuo Sakurai. Cation-specific Transition from Vesicle to Lamella for an Aromatic Diamine Lipid in Aqueous Solutions. Chemistry Letters. Vol. 39 , No. 7 p.686 (2010) doi:10.1246/cl.2010.686
4. Shohei Koyama, Taiki Aoshi, Takeshi Tanimoto, Yutaro Kumagai, Kouji Kobiyama, Takahiro Tougan, Kazuo Sakurai, Cevayir Coban¹, Toshihiro Horii, Shizuo Akira, and Ken J. Ishii. Plasmacytoid Dendritic Cells Delineate Immunogenicity of Influenza Vaccine Subtypes. Science, Transl. Med 3 25 (2010) 10.1126/scitranslmed.3000759 [doi]
5. Yasuya Kudo ,Mina Sakuragi , Satoshi Hashida , Tsutomu Ishii , Hiroyasu Masunaga, Kazuo Sakurai. Flexibility and Local Structure of the Wormlike Cylinder in the Organogel of Self-Assembled Discotic Triazine Triamide. Polymer Journal. (2010)42, 812-817 doi:10.1038/pj.2010.72
6. Tomoki Nishimura, Takeshi Cho, Andrew M. Kelley, Magdalena E. Powell, John S. Fossey, Steven D. Bull, Tony D. James, Hiroyasu Masunaga, Isamu Akiba, Kazuo Sakurai. Synthesis of a Highly Hydrophobic Cationic Lipid and its Structural and Thermodynamic Studies for Interaction with DNA. Vol. 83 (9), 1010-1018, Bulletin of the Chemical Society of Japan. doi:10.1246/bcsj.20100072
7. Shinichi Mochizuki and Kazuo Sakurai. β -1,3-glucan/Antisense Oligonucleotide Complex Stabilized with Phosphorothioation and its Gene Suppression. Bioorganic Chemistry Vol. 38. P260-264 (2010) doi:10.1016/j.bioorg.2010.07.001
8. Minari, Jusaku; Mochizuki, Shinichi; Matsuzaki, Tsubasa; Adachi, Yoshiyuki; Ohno, Naohito; Sakurai, Kazuo. Enhanced Cytokine Secretion from Primary Macrophages due to Dectin-1 Mediated Uptake of CpG DNA/ β -1,3-glucan Complex. Bioconjugate Chemistry (HP 上で掲載) DOI: 10.1021/bc1001196
9. Matsuura, Kazunori; Watanabe, Kenta; Matsuzaki, Tsubasa; Sakurai, Kazuo; Kimizuka, Nobuo. Self-Assembled Synthetic Viral Capsids from a 24-mer Viral

- Peptide Fragment. *Angewandte Chem.* 49. P9662-9665, (2010). DOI: 10.1002/ange.201004606
10. Minari, Jusaku; Mochizuki, Shinichi; Matsuzaki, Tsubasa; Adachi, Yoshiyuki; Ohno, Naohito; Sakurai, Kazuo. Enhanced Cytokine Secretion from Primary Macrophages due to Dectin-1 Mediated Uptake of CpG DNA/ β -1,3-glucan Complex. *Bioconjugate Chemistry* Volume22, Number1,9-15,(2011) DOI: 10.1021/bc1001196
 11. Isamu Akiba, Yusuke Akino, Hiroyasu Masunaga and Kazuo Sakurai. Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers Containing Poly(n-octadecyl acrylate) Block in Aqueous Solution. *Mater. Sci. Eng.* 14 012009 (2010). 10.1088/1757-899X/14/1/012009
 12. Megumi Sakou, Atsuro Takechi, Masashi Handa, Yuya Shinohara, Yoshiyuki Amemiya, Hiroyasu Masunaga, Hiroki Ogawa, Naoto Yagi, Kazuo Sakurai, and Isamu Akiba. Anomalous Small-angle X-ray Scattering Study on Aggregation of a Block Copolymer in a Selective Solvent *Journal of Physics: Conference Series* 2011, 272, 012022 doi: 10.1088/1742-6596/272/1/012022
 13. Hiroyasu Masunaga, Ayumi Nakano, Kenji Yamamoto, Kazuya Uezu, Kazuo Sakurai, and Isamu Akiba. Metalation-induced Micelle Formation of a Block Copolymer in Non-selective Solvent *Journal of Physics: Conference Series* 2011, 272, 012023 doi: 10.1088/1742-6596/272/1/012023
 14. Yuya Shinohara, Hiroyuki Kishimoto, Naoto Yagi, and Yoshiyuki Amemiya, "Microscopic Observation of Aging Behavior of Silica Particles in Unvulcanized Rubber", *Macromolecules*, vol. 43, pp.9480-9487, 2010 (DOI: 10.1021/ma102095b)
 15. Yuya Shinohara, Ryo Imai, Hiroyuki Kishimoto, Naoto Yagi, and Yoshiyuki Amemiya, "Indirectly Illuminated X-ray Area Detector for X-ray Photon Correlation Spectroscopy", *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 17, 737-742, 2010. (DOI: 10.1107/S090904951003726X)
 16. Masashi Handa, Yuya Shinohara, Hiroyuki Kishimoto, Yusuke Tamenori, and Yoshiyuki Amemiya, "Feasibility Study on Anomalous Small-Angle X-ray Scattering near Sulphur K-edge" *Journal of Physics: Conference Series*, vol.247, 012006, 2010 (DOI: 10.1088/1742-6596/247/1/012006).
 17. A. Inomata, Y. Sakai, C. Zhao, C. Ruslim, Y. Shinohara, H. Yokoyama, Y. Amemiya, and K. Ito, "Crystallinity and Cooperative Motions of Cyclic Molecules Sparsely Arranged in Solid-State Polyrotaxanes" *Macromolecules*, vol.43, 4660-4666, 2010 (DOI: 10.1021/ma100259t).
 18. M. Handa, Y. Shinohara, H. Kishimoto, Y. Tamenori, N. Yagi, and Y. Amemiya, "Improvement of SAXS Measurement near the Sulfur K-edge" *Journal of Physics: Conference Series*, 272, 012014 (2011) doi: 10.1088/1742-6596/272/1/012014
 19. G. Tamura, Y. Shinohara, I. Akiba, A. Tamura, M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Sakurai, and Y. Amemiya, "pH-Responsive Structural Change of PEGylated Amine-Bearing Nanogel Explored by Small Angle X-ray Scattering," *Journal of Physics:*

Conference Series, 272, 012018 (2011) doi: 10.1088/1742-6596/272/1/012018

20. N. Igarashi, Y. Watanabe, Y. Shinohara, Y. Inoko, G. Matsuba, H. Okuda, T. Mori, and K. Ito, "Upgrade of the small angle X-ray scattering beamlines at the Photon Factory" *Journal of Physics: Conference Series*, 272, 012026 (2011) 10.1088/1742-6596/272/1/012026
21. Yagi, N., N. Ohta, T. Matsuo, T. Tanaka, Y. Terada, H. Kamasaka, and T. Kometani. A Microbeam Small-Angle X-ray Scattering Study on Enamel Crystallites in Subsurface Lesion. *J. Physics: Conference Series*, 247 (2010) 012024 doi:10.1088/1742-6596/247/1/012024
22. K. Uesugi, M. Hoshino and N. Yagi "Comparison of lens- and fiber-coupled CCD detectors for X-ray computed tomography" *J. Synchrotron Rad.* (2011). 18, 217-223 doi:10.1107/S0909049510044523
23. N. Yagi "A scanning SAXS/WAXS study of rat brain" *Journal of Physics :Conference Series* 272 (2011) 012009 doi:10.1088/1742-6596/272/1/012009
24. Huili Ma, Kouichi Shiraishi, Takuya Minowa, Kumi Kawano, Masayuki Yokoyama, Yoshiyuki Hattori, and Yoshie Maitani, Accelerated Blood Clearance Was Not Induced for a Gadolinium-Containing PEG-poly(L-lysine)-Based Polymeric Micelle in Mice, *Pharmaceutical Research*, 27, 296-302 (2010)
25. Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, Vital microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels: macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 549–562 (2010)
26. Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, The Combretastatin Derivative Cderiv, a Vascular Disrupting Agent, Enables Polymeric Nanomicelles to Accumulate in Microtumors, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(6), 2914-25 (2010).
27. Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, and Masayuki Yokoyama, Synthesis of Poly(ethylene glycol)-b-Poly(L-lysine) Block Copolymers Having Gd-DOTA as MRI Contrast Agent and Their Polymeric Micelle Formation by Polyion Complexation, *Journal of Controlled Release*, 148(2):160-7 (2010)
28. Michiko Yokosawa, Yukihiro Sonoda, Shin-ichiro Sugiyama, Ryuta Saito, Yoji Yamashita, Masamichi Nishihara, Taku Satoh, Toshihiro Kumabe, Masayuki Yokoyama, and Teiji Tominaga, Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts, *Tohoku J. Exp. Med.*, 221(4), 257-64 (2010).
29. Yoshiko Harada, Tatsuhiro Yamamoto, Masaru Sakai, Toshiharu Saiki, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, Masayuki Yokoyama, Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles *International Journal of Pharmaceutics*, 404: 271–280 (2011)

30. Ezoe,H., Akeda,Y., Piao,Z., Aoshi,T., Koyama,S., Tanimoto,T., Ishii,K.J., and Oishi,K., Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine* 2011. in press 10.1016/j.vaccine.2010.12.117 [doi]
31. Jounai,N., Kobiyama,K., Shiina,M., Ogata,K., Ishii,K.J., and Takeshita,F., NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1. *J.Immunol.* 2011. In press 10.4049/jimmunol.1001654 [doi]
32. Coban,C., Igari,Y., Yagi,M., Reimer,T., Koyama,S., Aoshi,T., Ohata,K., Tsukui,T., Takeshita,F., Sakurai,K., Ikegami,T., Nakagawa,A., Horii,T., Nunez,G., Ishii,K.J., and Akira,S., Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host.Microbe* 2010. 7: 50-61. 10.1016/j.chom.2009.12.003 [doi]
33. Koyama,S., Aoshi,T., Tanimoto,T., Kumagai,Y., Kobiyama,K., Tougan,T., Sakurai,K., Coban,C., Horii,T., Akira,S., and Ishii,K.J., Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci.Transl.Med.* 2010. 2: 25ra24. 10.1126/scitranslmed.3000759 [doi]
34. Yamaguchi,T., Kawabata,K., Kouyama,E., Ishii,K.J., Katayama,K., Suzuki,T., Kurachi,S., Sakurai,F., Akira,S., and Mizuguchi,H., Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010. 107: 17286-17291. 10.1073/pnas.1009823107 [doi]
35. Coban,C., Horii,T., Akira,S., and Ishii,K.J., TLR9 and endogenous adjuvants of the whole blood-stage malaria vaccine. *Expert.Rev.Vaccines.* 2010. 9: 775-784. 10.1586/erv.10.60 [doi]
36. Horii,T., Shirai,H., Jie,L., Ishii,K.J., Palacpac,N.Q., Tougan,T., Hato,M., ohta,n., Bobogare,A., Arakaki,N., matsumoto,y., Namazue,J., Ishikawa,T., Ueda,S., and Takahashi,M., Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. *Parasitol.Int.* 2010. 59: 380-386. 10.1016/j.parint.2010.05.002 [doi]
37. Coban,C., Yagi,M., Ohata,K., Igari,Y., Tsukui,T., Horii,T., Ishii,K.J., and Akira,S., The malarial metabolite hemozoin and its potential use as a vaccine adjuvant. *Allergol.Int.* 2010. 59: 115-124. 10.2332/allergolint.10-RAI-0194 [doi]
38. Reimer,T., Shaw,M.H., Franchi,L., Coban,C., Ishii,K.J., Akira,S., Horii,T., Rodriguez,A., and Nunez,G., Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. *Eur.J.Immunol.* 2010. 40: 764-769. 10.1002/eji.200939996 [doi]
39. Kobiyama,K., Takeshita,F., Jounai,N., Sakaue-Sawano,A., Miyawaki,A., Ishii,K.J., Kawai,T., Sasaki,S., Hirano,H., Ishii,N., Okuda,K., and Suzuki,K., Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J.Virol.* 2010. 84: 822-832. 10.1128/JVI.01339-09 [doi]
40. Kawashima A, Tanigawa K, Akama T, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y,

Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ, Hirano H, Kimura H, Sakai T, Ishii N and Suzuki K. “Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in thyroid.” *Endocrinology*, 2011 February 8 doi:10.1210/en.2010-1132 In press

(未発行論文)

- a. N. Yagi. A Scanning SAXS/WAXS Study of Rat Brain. *J. Physics: Conference Series* (in press)
- b. Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y. “Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms.” *Immunity* in press 2011
- c. Fujimoto K, Karuppuchamy T, Takemura N, Shimohigoshi M, Machida T, Haseda Y, Aoshi T, Ishii KJ, Akira S, Uematsu S. “A new subset of CD103+CD8alpha+ DCs in the small intestine express TLR3, TLR7 and TLR9, and induce Th1 response and CTL activity” *J. Immunol.* In press 2011
- d. Daito H, Kikuchi T, Sakakibara T, Gomi K, Damayanti T, Zaini J, Tode N, Kanehira M, Koyama S, Fujimura S, Ebina M, Ishii KJ, Akira S, Takai T, Watanabe A, Nukiwa T. “Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9-MyD88 in lung CD11b+, CD11c+ cells.” *Eur Respir J.* 2011 Jan 27. PMID: 21273385. In press
- e. Kobiyama K, Jounai N, Ishii KJ, Horii T, Suzuki K, Ryo A, Takeshita F. “Modulation of intracellular signaling using protein-transduction technology.” *Crit Rev Immunol.* 2010;30(5):395-421. (REVIEW)

(4-2) 知財出願

①平成22年度特許出願件数(国内 0 件)

②CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)