

櫻井 和朗

北九州市立大学 国際環境工学部・教授

研究題目：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. 研究実施体制

### (1) 北九大グループ

- ① 研究代表者：櫻井 和朗(北九州市立大学国際環境工学部、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」
  - ・異常X線小角散乱(ASAXS)を測定するための脂質合成
  - ・高分子ミセル系へのASAXSの応用
  - ・多糖核酸複合体の物性と薬理効果の相関：腸炎の系で証明
  - ・ウイルス模倣の立方体ミセル系の構築

### (2) 東大グループ

- ① 共同研究者：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」
  - ・pH 応答性ナノゲルの構造解析の精密化
  - ・過渡的なダイナミクスの XPCS を用いた解析
  - ・高分子ミセルの構造揺らぎの準弾性X線散乱法による解析に関する検討

### (3) JASRIグループ

- ① 共同研究者：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」
  - ・時分割小角散乱測定法の開発
  - ・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 計算による分子集合体の構造決定

#### (4) 慈恵医大グループ

- ①共同研究者:横山 昌幸(東京慈恵会医科大学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」
  - ・ 内核-外殻界面での PEG 密度を制御したミセルの作製と評価
  - ・ 高分子ミセルの生体内での ABC 現象

#### (5) 医薬基盤研グループ

- ①共同研究者: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、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」
  - ・ ヒト化 CpG -SPG 複合体 (CpG-SPG)の in vivo における免疫組織への取込みの検証実験
  - ・ CpG-SPG のアジュバント効果とその免疫学的解析

## § 2. 研究実施内容

我が国を代表する薬物運搬 (DDS) 用粒子である、高分子ミセル (横山)、多糖核酸複合体 (櫻井) とカチオン性脂質/DNA 複合体 (櫻井) に関して、放射光を用いた正確な特性解析を行う (雨宮、八木) なかで、薬理活性 (横山、石井) を詳細に調べ、構造と機能の相関を把握することが、本課題の目的である。

世界で初めて、ASAXS を DDS に適用して、高分子ミセルの内部構造や生体親和性に重要な PEG の構造を明らかにした。また、多糖核酸複合体に関しては、サルでの試験結果から霊長類にも有用であるとの結果がでて、インフルエンザワクチンの有効なアジュバント開発に向けて、国内の大手製薬メーカーと協議中である。

### (1) 櫻井(北九大)グループ

#### ASAXSを用いた高分子ミセルの薬剤内包状態の解析

高分子ミセルに内包される剤のモデル化合物として、tetrabromobenzenediol を選び、内包率を変化させた数種類の高分子ミセルの構造について、ASAXSを用いて調べた。薬剤の添加率が低い時は疎水鎖が形成するコアの内部に薬剤が留まっているが、添加率が増加するにつれて、プローブであるBrの存在範囲はコアの外側の約1nm まで広がっていることが分かった。この結果は論文として投稿済み。

疎水性コアの外側に薬剤が存在することは極めて興味深く、薬剤のリリース挙動との相関に関して検討していく予定である。

#### ASAXSを用いた脂質 DNA 複合体の解析

脂質・DNA 複合体を ASAXS で解析するためには、ビームダメージに比較的強く、水中で安定なミセル形成する系が必要である。これまで探索を行ってきたが、今年度ようやくビームダメージが

少ない化学構造を見出すことができた。この系を用いて、DNA を添加する前と添加した後の複合体の構造を ASAXS で決定することに成功した。前者については論文化済み (Chemistry Letters . Vol. 40 (2011) , p.1340-1342、Phys. Chem. Chem. Phys., 2011, 13, 15899-15905)。

#### 多糖を用いた核酸医薬の DDS

多糖と核酸の複合体の溶液中での形態を、放射光と FFF や GPC を用いて明らかにした (J. Phys. Chem. B, 2012, 116 (1), pp 87–94)。形態が明らかになったことにより、精密な製剤スペックの決定が可能となった。これにより、急性肝炎モデルマウスを用いた系で、従来のアンチセンス DNA の投与量のなんと 1/500 の低い量で効果が発揮された。また、共同研究先の久留米医科大学では、炎症性腸炎のモデルマウスでも効果が確認された。これら動物実験の結果は IP が高い医学系の雑誌で論文化した (Controlled Release. Volume 151, Issue 2, 30 April 2011, 155-161、Nature Molecular Therapy , (14 February 2012))

### **(2) 雨宮(東大)グループ**

#### pH 応答性ナノゲルの構造解析の精密化

H22 年度に実施した小角 X 線散乱を用いた pH 応答性ナノゲルの構造解析の精密化を図るため、解析方法を再検討した。その結果、pH 変化に応答した膨潤・収縮挙動に関して、ナノゲルコア部の架橋密度に依存したゲルの変形様式に違いがあることを明らかにして論文とした (Tamura et al. 2012)。またその過程で、FFF-MALS などの光散乱法を用いたミセル等の試料の分子量決定方法における結合水の扱いなどの課題を明確にした。これらの知見は、次年度以降、DDS に用いる粒子の構造解析の定量化を進める上で貴重な知見となると期待される。

#### 過渡的なダイナミクスの XPCS を用いた解析

架橋反応が進行中のナノ粒子充填ゴムを対象として、過渡的な(定常状態ではない)状態の XPCS によるダイナミクス解析を実施した。ダイナミクスが変化する様子や、反応に伴うダイナミクスの様式の違い、そこから得られる構造情報に関する知見を得た (Shinohara et al., *Soft Matter*, 2012)。

### **(3) 八木(JASRI)グループ**

#### カラム溶出タンパク質の実時間 X 線散乱測定法の開発

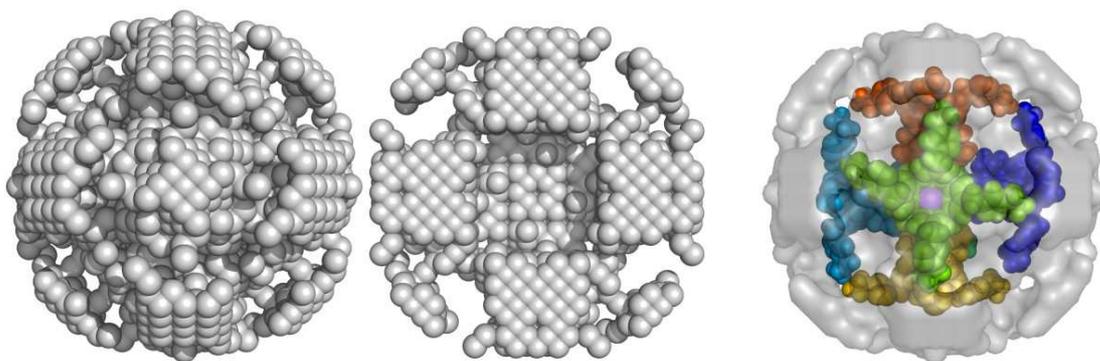
分子量分布が広く、平衡状態にあつて単一組成の光散乱測定が不可能な試料に対しては、試料をカラムで分画した各フラクションについて測定を行う必要がある。

今回、ウマ  $\beta$  ラクトブロブリン(ELG)に対し、ゲル濾過カラム(Superdex75)から溶出される試料の X 線溶液散乱をリアルタイムに Pilatus300K-W を用いて測定した。ELG 濃度は UV モニターで記録し、30秒おきに X 線小角散乱を測定し慣性半径と原点散乱強度を求めた。ELG は、天然状態では単量体と二量体間の平衡状態にあるが、尿素変性後の巻き戻り過程では凝集状態、正常な二量体、非正常な単量体の三つの状態をとった。この非正常な単量体は、Kratky プロット

からコンパクトな球状の形状をとっていると考えられる。これに対して2つまたは4つのシステイン残基をアラニンで置換した ELG は、巻き戻り過程で非正常な二量体中間状態を取り、単量体は天然状態の ELG と同じであった。これらの結果は、ELG の天然状態への巻き戻りにはシステイン残基は関与しない事を示している。

#### ab initio 形状決定ソフトと MD 計算による分子集合体の構造決定

両親媒性 Calix[4]arene 分子のミセル構造を、*ab initio* 形状決定ソフトウェアと分子動力学法 (MD) を用いて検討した。酸性条件下での CaL[4]C3 の小角散乱プロファイルから、*ab initio* ソフトウェア DAMMIN を用いて形状を推定したところ、6つの分子が対称に配置した八面体構造と良く一致することが明らかとなった(下図)。小角散乱の測定から、ミセルの形成には Na イオンの存在が重要であることが認められた。MD 計算において Na イオンをどのようにミセル中に取り込んで安定な構造を得るかを検討中である。また、MD 計算では水和水を考慮しないため、小角散乱データと MD で得られた構造を比較する際には水和水を適切に仮定する必要がある。この点についても検討を進めている。(Langmuir, 2012, 28 (6), pp 3092–3101)

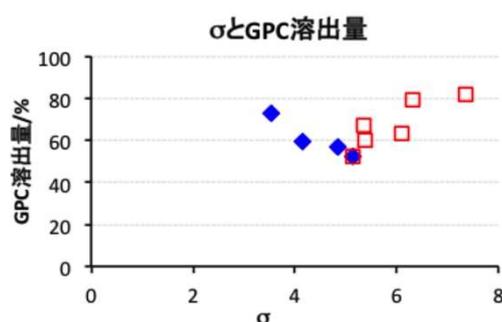


#### (4) 横山(慈恵医大)グループ

「高分子ミセルの薬物・造影剤封入内核の構造解析」

##### 内核-外殻界面での PEG 密度を制御したミセルの作製と評価

高分子ミセルの外殻である PEG の密度はミセルの血中对流性と大きく相関して、極めて重要な問題である。高分子ミセル内核構成高分子鎖の鎖長と疎水性の程度を精密に制御することにより、内核-外殻界面での PEG 密度  $\sigma$  が 3 から 7 程度の各種ミセルを作製することができた。ここで、 $\sigma$  の値は SAXS 測定によって求めた、溶液中の自由な PEG 鎖の体積と、界面での PEG 鎖の体積の比である。また、GPC のカラムから多く溶出してくる試料ほど、外殻が PEG で保護されていて、生体内での安定性も高いことが今までの測定から分かっている。そこで、これらのサンプルについて水系で GPC のカラムへのトラップ率を溶出量として測定することにより、疎水性内核の外界との相互作用の程度を評価した。すると、図に示すように、



興味深いことに  $\sigma$  値 5 を境に青プロットと赤プロットの 2 つの系列に分類された。今後はこのサンプルでの ABC 現象を比べて、ミセル構造と生体との相互作用の相関を解析する。

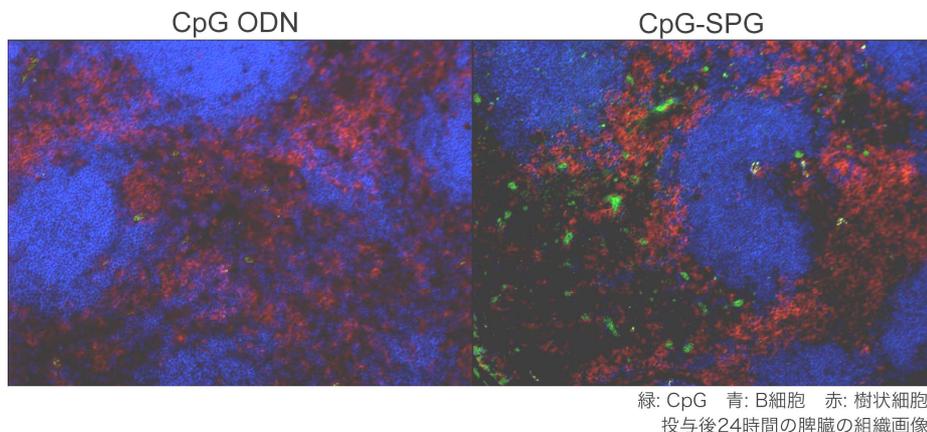
### ABC 現象

昨年までに、PEG 修飾リポソームが ABC 現象を引き起こすのに対して、高分子ミセルでは ABC 現象を全く起こさない、あるいは ABC 現象を起こしたマウスでも高分子ミセルは認識されないなどが判明していた。しかし、同一のマウスでの比較ではなかった。今回、PEG 修飾リポソームを Gd と蛍光色素の両方でラベルすることで、高分子ミセルとリポソームの同時計測を可能とした。その結果、PEG 修飾リポソームが 2 回目投与の際に血中濃度が減少する(ABC 現象を引き起こす)のに対し、それぞれ Gd をラベルした造影剤高分子ミセルも疎水性内核の薬物キャリアー用高分子ミセルも、そのようなことは起こらず、どちらのミセルも ABC 現象を示さない事が同一の個体で実証された。

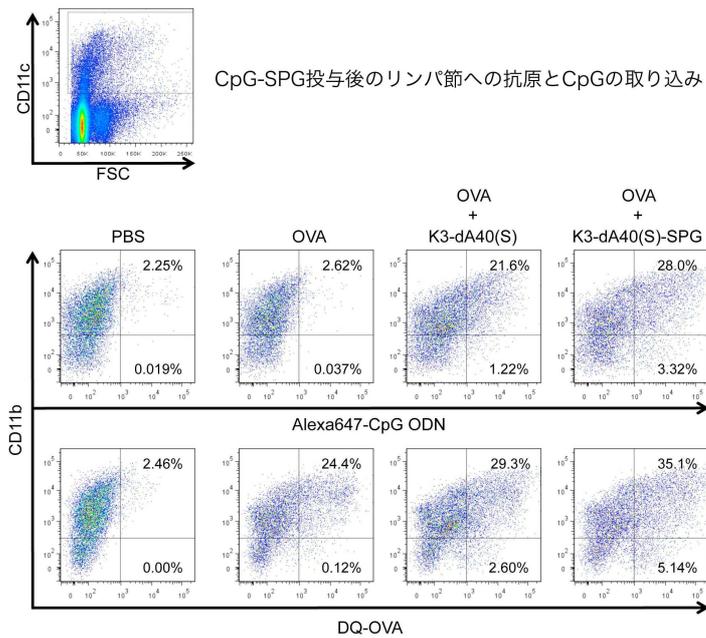
## (5)石井(医薬基盤研)グループ

### CpG-SPG の in vivo における免疫組織への取り込み

これまでに検討を行ってきたヒト型 CpG ODN である K3 と SPG の複合体 (CpG-SPG) の免疫組織への取り込みを検証した。蛍光標識された CpG-SPG 複合体をマウス皮下に投与し、24 時間後の脾臓組織への分布を蛍光顕微鏡を用いて解析した。その結果 CpG ODN (K3) のみの投与では、脾臓への取り込みが弱いのに比べ、CpG-SPG 複合体として投与した場合、

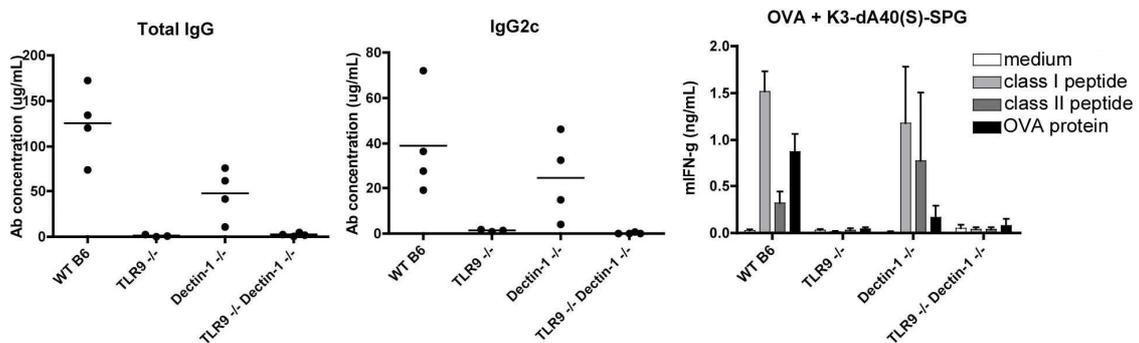


CpG の脾臓への取り込みの亢進が確認された。同様に抗原の取り込みを、フローサイトメーターを用いて検証した。マウスに抗原と CpG-SPG を同時に接種する事で、リンパ節への抗原取り込みの亢進が確認された。同時に、CpG-SPG 自身の取り込みも、CpG ODN (K3) のみの投与時よりも効率よく取り込まれている事が確認された。これらのことから、CpG-SPG 複合体は自身の免疫組織への取り込みを高めるのみならず、抗原の取り込みも促進している事があきらかとなった。



### CpG-SPG のアジュバント効果とその作用機序

これまでに、CpG-SPG のアジュバント効果の検討はインフルエンザワクチンでのみ行っていたが、今回はモデル抗原であるオバルブミンを用いてアジュバント効果を検討した。その結果、オリジナルの CpG に比べ、CpG-SPG の複合体が強く抗原特異的抗体や細胞性免疫を誘導した。この結果は、CpG-SPG がインフルエンザワクチンのみならず、様々なワクチンのアジュバントとして働く可能性を示唆している。また、アジュバント効果の作用機序を明らかにするために、CpG ODN の受容体である TLR9 のノックアウトマウス、また SPG の受容体である Dectin-1 のノックアウトマウスを用いて検討を行った。その結果、CpG-SPG によるアジュバント効果は完全に TLR9 に依存しており、主たる自然免疫活性が TLR9 を介している事が示された。同時に Dectin-1 のノックアウトマウスではアジュバント効果に若干の減弱が確認された。この事は、SPG が DDS としての働きを有しており、Dectin-1 によってアジュバント効果が増強されている可能性が示された。



### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

(北九大グループ)

1. Transformation from Multilamellar to Unilamellar Vesicles by Addition of a Cationic Lipid to PEGylated Liposomes Explored with Synchrotron Small Angle X-ray Scattering. Sakuragi, M.; Koiwai, K.; Nakamura, K.; Masunaga, H.; Ogawa, H.; Sakurai, K. In, *Journal of Physics*. 272(2011), doi:10.1088/1742-6596/272/1/012011
2. Dectin-1 targeting delivery of TNF- $\alpha$  antisense ODNs complexed with  $\beta$ -1,3-glucan protects mice from LPS-induced hepatitis. Shinichi Mochizuki, and Kazuo Sakurai. *Journal of Controlled Release*. Volume 151, Issue 2, 30 April 2011, 155-161
3. Thermosensitive Molecular Assemblies from Poly(amidoamine)Dendron-Based Lipids. Kenji Kono, Etsuo Murakami, Yuki Hiranaka, Eiji Yuba, Chie Kojima, Atsushi Harada, and Kazuo Sakurai. *A journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker Angewandte Chemie* 2011 50/28 p6332-6336 DOI:10.1002/anie.201101007
4. Multipurpose soft-material SAXS/WAXS/GISAXS beamline at SPring-8. Hiroyasu Masunaga, Hiroki Ogawa, Takumi Takano, Sono Sasaki, Shunji Goto, Takashi Tanaka, Takamitsu Seike, Sunao Takahashi, Kunikazu Takeshita, Nobuteru Nariyama, Haruhiko Ohashi, Toru Ohata, Yukito Furukawa, Tomohiro Matsushita, Yasuhide Ishizawa, Naoto Yagi, Masaki Takata, Hideo Kitamura, Kazuo Sakurai, Kohji Tashiro, Atsushi Takahara, Yoshiyuki Amamiya, Kazuyuki Horie, Mikihiro Takenaka, Toshiji Kanaya, Hiroshi Jinnai, Hiroshi Okuda, Isamu Akiba, Isao Takahashi, Katsuhiko Yamamoto, Masamichi Hikosaka, Shinichi Sakurai, Yuya Shinohara, Akihiko Okada and Yasunori Sugihara. *Polymer Journal*.(2011)43, 471-477
5. Metal-ion induced transition from multi-to single-bilayer tubes in histidine bearing lipids and formation of monodisperse Au nanoparticles. Tomoki Nishimura, Takuma Matsuo and Kazuo Sakurai. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011, **13**, 15899-15905 DOI: 10.1039/C1CP21065C
6. Increased Cellular Transfection with Magnetized DNA/Benzyl Amine Lipid Complexes. Mina Sakuragi, Shinichi Mochizuki and Kazuo Sakurai. *Bulletin of the Chemical Society Japan*. Vol.84, No.8, 2011 P839-844, August 15.
7. A Stimulus-Responsive Shape-Persistent Micelle Bearing a Calix[4]arene Building Block: Reversible pH-Dependent Transition between Spherical and Cylindrical Forms. Shota Fujii, Yusuke Sanada, Tomoki Nishimura, Isamu Akiba, and Kazuo Sakurai, Naoto Yagi and Efstratios Mylonas. *Langmuir*, 2012, **28**(6), pp 3092-3101, DOI: 10.1021/la2037668
8.  $\beta$ -1,3-d-Glucan Schizophyllan/Poly(dA) Triple-Helical Complex in Dilute Solution. Yusuke Sanada, Tsubasa Matsuzaki, Shinichi Mochizuki, Tadashi Okobira, Kazuya Uezu, and Kazuo Sakurai. *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**(1), pp 87-94, DOI: 10.1021/jp209027u

9. A New Therapeutic Approach Using a Schizophyllan-based Drug Delivery System for Inflammatory Bowel Disease. Hidetoshi Takedatsu, Keiichi Mitsuyama, Shinichi Mochizuki, Teppei Kobayashi, Kazuo Sakurai, Hiroshi Takeda, Yoshihide Fujiyama, Yoshikazu Koyama, Jun Nishihira and Michio Sata. *Molecular Therapy* , (14 February 2012) doi:10.1038/mt.2012.24
10. Quaternary-ammonium-bearing Aromatic Surfactants: Effect of the Alkyl Chain Positions on Their Micelle and DNA-complex Structures. Takuma Matsuo, Shota Fujii, Yumi Kamikawa, Tomoki Nishimura, Yusuke Sanada, Shinichi Mochizuki and Kazuo Sakurai. *Chemistry Letters*. Vol. 40 (2011) , No. 12 p.1340-1342. doi:10.1246/cl.2011.1340
11. Rapid separation of proteins from the aqueous media using the novel gelation protocol. Takashi Kadono, Yasuaki Fukuta, Kazuya Uezu, Hiroshi Morita, Kazuo Sakurai, and Tomonori Kawano. *Current Topics in Peptide & Protein Research*.
12. Modeling and Evaluation of a Twist Drive Actuator for Soft Robotics. Ivan Godler , Takashi Sonoda and Kazuo Sakurai. *Advanced Robotics* 26 (2012) 765–783. DOI:10.1163/156855312X626307
13. Relationship between DNA-Transfection Efficiency and Chemical Structures of Aromatic Cationic Lipids. Shinichi Mochizuki, Yumi Kamikawa, Koichi Nishina, Shota Fujii, Emi Hamada, Shota Kusuki, Takuma Matsuo, and Kazuo Sakurai. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 85, No. 3, 354359(2012), DOI: 10.1246/bcsj.20110296  
  
(東大グループ)
14. Yuya Shinohara, Hiroyuki Kishimoto, Taketo Maejima, Hisashi Nishikawa, Naoto Yagi, and Yoshiyuki Amemiya, "Observation of Microscopic Dynamics of Carbon Black in Rubber during Vulcanization Process," *Soft Matter*, **8**, 3457-3462, 2012 (DOI: 10.1039/c2sm07165g).
15. Yuya Shinohara, Kosuke Yamazoe, Takashi Sakurai, Shuichi Kimata, Toshiya Maruyama, and Yoshiyuki Amemiya, "Effect of Structural Inhomogeneity on Mechanical Behavior of Injection Molded Polypropylene investigated with Microbeam X-ray Scattering," *Macromolecules*, **45**, 1398-1407, 2012 (DOI: 10.1021/ma202178r)
16. Yutaka Sumino, Hiroyuki Kitahata, Yuya Shinohara, Norifumi Yamada and Hideki Seto, "Formation of a multi-scale aggregate structure through spontaneous blebbing of an interface," *Langmuir*, **28**, 3378-3384, 2012 (DOI: 10.1021/la204323t).
17. Goshu Tamura, Yuya Shinohara, Atsushi Tamura, Yusuke Sanada, Motoi Oishi, Isamu Akiba, Yukio Nagasaki, Kazuo Sakurai, and Yoshiyuki Amemiya, "Dependence of the swelling of a pH-responsive PEG-modified nanogel on the cross-link density," *Polymer Journal*, **44**, 240-244, 2012 (DOI: 10.1038/pj.2011.123).
18. Yuya Shinohara, Hiroyuki Kishimoto, Taketo Maejima, Hisashi Nishikawa, Masakazu Takata, and Yoshiyuki Amemiya, "Observation of Filler Dynamics in Rubber with X-ray Photon Correlation Spectroscopy," *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **24**, 012005, 2011 (DOI:

10.1088/1757-899X/24/1/012005).

(JASRIグループ)

19. N. Yagi. “Mechanism Of *Latency* Relaxation In Frog Skeletal Muscle”. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **105**, 180-186 (2011). (doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.10.002)
20. T. Matsuo and N. Yagi. “Measurement of Persistence in YAG:Ce<sup>3+</sup> Scintillator with Pulsed Synchrotron X-rays”. *J. Synchrotron Rad.* **18**, 601-604 (2011). (doi:10.1107/S0909049511010843)
21. H. Iwamoto and N. Yagi. “Hard X-ray Fourier transform holography from an array of oriented referenced objects”. *J. Synchrotron Rad.* **18**(4), 564-568 (2011). (doi:10.1107/S0909049511009836)
22. D. Yamaguchi, N. Miyamoto, T. Fujita, T. Nakato, S. Koizumi, N. Ohta, N. Yagi and T. Hashimoto. “Aspect-ratio-dependent phase transitions and concentration fluctuations in aqueous colloidal dispersions of charged platelike particles”. *Phys. Rev. E* **85**, 011403 (2012). (DOI: 10.1103/PhysRevE.85.011403)

(慈恵医大グループ)

23. 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) (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.016)
24. Kouichi Shiraishi, Reiko Endoh, Hiroshi Furuhata, Masamichi Nishihara, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yusuke Oda, Jun-ichiro Jo, Yasuhiko Tabata, Jun Yamamoto, Masayuki Yokoyama, A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. International J. of Pharmaceutics, 421, 379-87 (2011) (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.006)
25. Kouichi Shiraishi, Yoshiko Harada, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, Katsuyoshi Hori, Kazuyoshi Yanagihara, Misato Takigahira, and Masayuki Yokoyama, Tumor environment changed by combretastatin derivative (Cderiv) pretreatment that leads to effective tumor targeting, MRI studies and antitumor activity of polymeric micelle carrier systems, Pharmaceutical Research, 29: 178-186 (2012) (DOI: 10.1007/s11095-011-0525-3)

(医薬基盤研グループ)

26. Ezoe H, Akeda Y, Piao Z, Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Ishii KJ, Oishi K. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine*. 2011 29(9):1754-61.
27. Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ, Takeshita F. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J Immunol*. 2011 186(3):1646-55.
28. 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 38(3):688-701.
29. 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, Suzuki K. Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in the thyroid. *Endocrinology*. 2011 152(4):1702-12.
  30. Kimura HJ, Suzuki K, Landek-Salgado MA, Caturegli P, Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F. Application of innate immune molecules for a new class of drugs: infection, inflammation and beyond. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011 11(1):68-75.
  31. 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*. 2011 34(4):514-26.
  32. Matsuzaki-Moriya C, Tu L, Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Tetsutani K, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H. A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1365-75.
  33. 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+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *J Immunol*. 2011;186(11):6287-95.
  34. Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Ishii KJ, Horii T. Plasmodium falciparum serine repeat antigen 5 (SE36) as a malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2011 29(35):5837-45.
  35. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med*. 2011 17(8):996-1002.
  36. Edelson BT, Bradstreet TR, Hildner K, Carrero JA, Frederick KE, Kc W, Belizaire R, Aoshi T, Schreiber RD, Miller MJ, Murphy TL, Unanue ER, Murphy KM. CD8alpha(+) Dendritic Cells Are an Obligate Cellular Entry Point for Productive Infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity*. 2011 Aug 26;35(2):236-48.
  37. Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Novel Strategies to Improve DNA Vaccine Immunogenicity. *Curr Gene Ther*. 2011;11(6) 479-484
  38. Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Current Opinion in Virology*. 2011, 1(4):226-232.

39. Yildiz Zeyrek F , Palacpac N , Yuksel F , Yagi M , Honjo K , Fujita Y, Arisue N, Takeo S, Tanabe K, Horii T, Tsuboi T, Ishii KJ, Coban C. 2011 Serologic Markers in Relation to Parasite Exposure History Help to Estimate Transmission Dynamics of Plasmodium vivax. *PLoS ONE* 6(11): e28126.
40. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 109(9):3451-6.

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)