

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07201

研究課題名(和文)SV40 VLP免疫活性化剤による免疫活性化と獲得免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of immune activation and induction of adaptive immune responses by simian virus 40 virus-like particles

研究代表者

川野 雅章 (Kawano, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30447528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Simian virus 40 (SV40) は、直径50 nmの正二十面体構造のウイルス粒子を構成タンパク質VP1のみで構成している。本研究で我々は、外来抗原を内包したSV40 ウイルス様粒子 (VLP, Virus-like particle) を調製し、内包した外来抗原に対する獲得免疫応答である細胞性免疫応答、および、抗体産生誘導を解析した。その結果、SV40 VLPは、炎症性サイトカインの分泌を誘導することなく、内包した外来抗原に対して高度な獲得免疫応答を誘導した。そこで、SV40 VP1のみで構成された中身が中空のVLPを調製し、SV40 VLP作用に特徴的な免疫応答の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来抗原を内包したSimian virus 40 (SV40) のウイルス様粒子 (VLP, virus-like particle) をマウスに免疫すると、外来抗原に対して抗原賦活物質を加えることなくアラムアジュバントと同等の抗体産生を誘導し、また、古典的な不完全フロイントアジュバントによる細胞性免疫誘導よりも効率良く細胞性免疫を誘導することが判明した。また、SV40 VLPに特有の免疫活性化機構として、抗原提示活性化因子の発現上昇とケモカインの産生を誘導することを発見し、SV40 VLPと結合する細胞性因子も同定した。これらの結果は、新規の免疫活性化誘導法の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Simian virus 40 (SV40) is a monkey polyomavirus. The icosahedral capsid of SV40 is 50 nm in diameter and consists only of major capsid protein SV40 VP1. In this study, we prepared specific antigen incorporated SV40 VLPs (Virus-like particles) from insect cells using baculovirus vector and addressed cell-mediated immunity and antibody production against the incorporated antigens. We revealed that SV40 VLP could induce adaptive immune responses against incorporated antigens without inducing the inflammatory cytokines. In order to reveal the SV40 specific immune responses, we prepared empty SV40 VLP from insect cells and analyzed T-helper differentiation of SV40 VLP-treated naive CD4+ T cells and cytokine/chemokine production by SV40 VLP-treated B cells, CD8+ T cells, natural killer cells, and peritoneal macrophages. In order to reveal the precise molecular mechanism of the SV40 VLP specific immune responses, we also analyzed the cellular proteins that interact with the SV40 VLP.

研究分野：免疫学

キーワード：Polyomavirus Simian virus 40 VP1 Virus-like particle Adjuvant Adaptive immune response Antibody production Cell-mediated immunity

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年のワクチン開発においては、がんワクチンの開発を念頭に極力、副反応の原因の一つとなる炎症性サイトカインなどの炎症誘導物質の放出を促進することなく、高効率に獲得免疫応答である、細胞性免疫応答、および、抗体産生誘導が誘導できる方法の開発が求められている。がんワクチンは、その投与によって、がん細胞で高度に産生されているタンパク質に対して主に、細胞傷害性 T 細胞 (CTL, Cytotoxic T lymphocyte) による細胞性免疫応答を誘導することで、がん抗原を認識した CTL によるがん細胞の破壊効果を期待している。投与されたがんワクチンは、抗原提示細胞に取り込まれ、がん抗原タンパク質そのものであれば、取り込まれた後、細胞内で処理されて、がん抗原由来ペプチドが MHC class I で抗原提示される。mRNA および DNA ワクチンであれば発現したがん抗原タンパク質が細胞内で処理された後、がん抗原由来ペプチドが MHC class I で抗原提示される。そして、このペプチド/MHC class I 複合体を認識できる T 細胞受容体を持つ CTL が活性化し、がん抗原特異的 CTL となる。しかしながら、がん抗原は自己タンパク質抗原であるため、獲得免疫の誘導が非常に難しく、複数回に渡るがんワクチンの投与が必要であると考えられている。

一方我々は、サルポリオーマウイルスの Simian virus 40 (SV40) のウイルス様粒子 (VLP, Virus-like particle) を免疫活性化剤 (アジュバント) として利用するための研究開発を行っている。SV40 ウイルスは、直径が約 50 nm の正二十面体構造の粒子でできており、その粒子は主要構造タンパク質 SV40 VP1 のみで構成されている。粒子を形成するためにまず、5 つの SV40 VP1 が、正五角形の形状に結合し、VP1 五量体と呼ばれるサブユニットを形成する。次に、72 個の VP1 五量体が、宿主因子を必要とせずに、自己集合化能と呼ばれる VP1 五量体自身の機能によって集合化して、正二十面体構造の粒子を構築する。SV40 ウイルス粒子内部には、VP1 五量体 1 つにつき 1 つの非主要構造タンパク質である VP2 または VP3 が粒子に裏打ちする形で結合しており、そのさらに中心部では、5,243 塩基対の環状 2 本鎖 DNA が SV40 ウイルスゲノムとして宿主のヒストンで凝集した形で格納されている。SV40 VP1 は自己集合化する機能を有しているため、組換え体として、SV40 VP1 のみを昆虫細胞内で高発現させることで SV40 VLP を構築する。構築した SV40 VLP を高度に精製し、VLP において VP1 五量体同士を結合させている、ジスルフィド結合およびカルシウムイオンを介した結合を、還元剤であるジチオスレイトール (DTT, Dithiothreitol) および、カルシウムイオンキレート剤 (EGTA, Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetic acid) で処理することで、VP1 五量体サブユニットに解離することができる。解離した VP1 五量体をゲルろ過クロマトグラフィーで高度に単一の VP1 五量体のみを分画し、この画分を適切な溶媒で置換したり、SV40 VLP 誘導物質を添加することで、VP1 五量体の自己集合化能の機能により、試験管内で SV40 VLP へ再集合化させることが可能である。

これまでに我々は、SV40 VLP を医用材料として利用するために、SV40 VLP を *in vitro* および、*in vivo* で作製する技術、SV40 VLP に外来タンパク質や DNA を内包する技術、SV40 VLP 表面を遺伝子的、化学的に修飾する技術、人工粒子を SV40 VLP で被覆する技術を開発してきた。SV40 VLP を免疫活性化剤として利用するために、これらの技術を用いて SV40 VLP 表面に CTL エピトープを挿入した CTL エピトープ挿入 VLP を開発した。この SV40 VLP をマウスに投入すると、投与経路に関係無く、挿入した CTL エピトープに対して、既存の不完全フロイントアジュバント (IFA, Incomplete Freund's adjuvant) を用いた CTL 誘導法に用いる抗原量の 50 分の 1 の抗原量で IFA を用いた方法よりも強く CTL を誘導できることが示された。その一方で、SV40 の属するポリオーマウイルス科の VLP は、抗原提示細胞である樹状細胞に作用しても、他のアジュバントや Lipopolysaccharide などの免疫活性化物質とは異なり、炎症性サイトカインの放出を誘導せず、従って、炎症反応を惹起しないと考えられている。したがって、SV40 VLP による獲得免疫誘導には、抗原提示細胞である樹状細胞を介さない他の機構の存在が示唆されている。このような SV40 VLP が炎症反応を惹起することなく高効率に獲得免疫を誘導するという特徴は、自己抗原に対して獲得免疫を誘導しなくてはならず、炎症などの副作用を誘導せずに安全に複数回免疫を必要とする病気の 1 つである、がんの有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究で我々は、SV40 VLP 表面に抗原エピトープを挿入した、抗原挿入 VLP の開発に加え、抗原を内包した SV40 VLP を構築し、マウスに投入することで、内包抗原に対して獲得免疫としての、細胞性免疫、および、抗体産生の誘導を解析することを目的とした。また本研究で我々は、SV40 VLP が、免疫細胞に対して炎症性サイトカインの産生を誘導することなく、獲得免疫を誘導することを明らかにしたが、その分子メカニズムは不明である。そこで、本研

究ではさらに、SV40 VLP の未熟ヘルパーT 細胞への作用の解析、SV40 VLP が作用した B 細胞が抗体産生を誘導するために必要な条件の探索、および、SV40 VLP の作用による細胞性免疫の活性化機構の解析を行うことを目的とした。さらに、上記の SV40 VLP の免疫細胞に対する作用を誘導する分子機構の解析を行うため、SV40 VLP と相互作用する細胞性因子の探索を行い、SV40 VLP に特有の獲得免疫誘導機構の分子メカニズムの全容を明らかにするための手がかりを得ることを目的とした。SV40 の感染経路としては、SV40 ウイルス粒子が宿主細胞表面に発現しているガングリオシド GM1 や MHC class I を介して結合し、それが引き金となって細胞内に取り込まれ、エンドサイトーシス経路で初期エンドソーム、および、カベロラエンドサイトーシス経路でカベオソームを経て、Endoplasmic reticulum (ER) に移行すると考えられている。そして、SV40 は、ER において、膜を通過して Cytosol に移行し、粒子を解離し、ウイルスゲノムと共に細胞核に移行することで感染が成立するものと考えられている。よって、SV40 VLP に特有の獲得免疫誘導に関与している細胞性因子の候補としては、SV40 の感染経路上に存在する因子が候補になるものと考えている。これらの解析によって得られる知見は、炎症性サイトカインの産生を誘導せずに獲得免疫応答を効率良く誘導するための新規分子機構の解明に繋がるものと期待される。このような分子機構の解明は、複数回に渡るがんワクチンの投与を必要とするがん免疫の分野において、がんに対する免疫の活性化によって、体内からがんを駆逐するための新たな治療法の開発に繋がる可能性が考えられるため、本研究は非常に有用であると考えられる。がんは、日本における死因の第一位で、日本において年間でおよそ 100 万人が新規にがんと診断され、年間でおよそ 40 万人のがん患者が亡くなっている。本研究における知見により、がんワクチンや副作用の少ない効果的な抗がん剤などの新たながん治療法が開発されれば、手術や入院などによるがん患者の負担を軽減し、生活の質の向上に繋がるだけでなく、近年の高齢化社会の進行に伴う医療費の増大における、がんの手術費用や薬の処方、診察のための通院に関わる諸経費の削減にも寄与できるものと考えられるので、本研究結果は意義のあるものであると考えられる。

3. 研究の方法

まず、SV40 VLP による獲得免疫応答としての細胞性免疫および抗体産生の誘導を解析するために、外来抗原を内包した SV40 VLP の調製を行った。外来抗原としては、細胞性免疫の解析のために、A 型インフルエンザウイルスのウイルス粒子の裏打ちタンパク質である Matrix protein 1 (M1) を内包した SV40 VLP (M1/VLP) を調製し、抗体産生の誘導の解析のために、Chicken ovalbumin (OVA) を内包した SV40 VLP (OVA/VLP) を調製した。M1/VLP および OVA/VLP の調製は、各々、SV40 の非主要構造タンパク質である VP2 のカルボキシル末端に M1 (VP2-M1) および OVA (VP2-OVA) を融合させたコンストラクトを作製し、SV40 VP1 およびこれらの融合コンストラクトを発現する組換えバキュロウイルスを調製した後、M1/VLP の調製のためには、昆虫細胞である Sf-9 細胞に SV40 VP1 を発現するバキュロウイルスと VP2-M1 を発現するバキュロウイルスを共感染させることで、Sf-9 細胞内に大量に M1/VLP を発現させた。また、OVA/VLP の調製のためには、Sf-9 細胞に SV40 VP1 を発現するバキュロウイルスと VP2-OVA を発現するバキュロウイルスを共感染させることで、Sf-9 細胞内に大量に OVA/VLP を発現させた。また、中身が中空の SV40 VLP の調製のために、Sf-9 細胞に SV40 VP1 を発現するバキュロウイルスのみを感染させることで、Sf-9 細胞内に大量に SV40 VLP を発現させた。M1/VLP、OVA/VLP、および SV40 VLP を発現している Sf-9 細胞各々を回収し、デオキシコール酸ナトリウムを含む溶液に懸濁した後、超音波破砕で Sf-9 細胞を破砕した。破砕した後、遠心して不溶性画分を除き、回収した細胞上清を塩化セシウム密度勾配遠心により分画した。分画後、M1/VLP、OVA/VLP、および、SV40 VLP 由来のバンドを注射針のついた注射器で回収し、この操作を 2 回行うことで各々のバンドを高度に精製した。精製した M1/VLP、OVA/VLP、および、SV40 VLP の溶媒は各々生理的食塩水 (PBS(-), phosphate buffered saline without calcium and magnesium) に透析法で置換し、置換した M1/VLP、OVA/VLP、および、SV40 VLP 溶液は、以下の免疫反応を解析するための試薬として用いた。

まず、細胞性免疫の解析のために、ヒト HLA A2 を発現しているトランスジェニックマウス (HHD マウス) に、腹腔および経鼻の経路で M1/VLP を投与し、投与 1 週間後のマウスから脾臓細胞を抽出した後、抽出した細胞と M1 の 58-66 アミノ酸領域にに含まれる HLA A2 CTL epitope (M1: 58-66, GILGFVFTL) ペプチドを混合して、M1:58-66 エピトープ特異的に Interferon (IFN)- γ 産生を誘導することを ICS (Intra-cellular cytokine staining) 解析により解析した。また、抗体産生の誘導の解析のために、C57BL/6 マウスに、腹腔および経鼻の経路で OVA/VLP を投与し、投与 1 週間後に再び同じ経路で OVA/VLP を投与した後、初回投与から 2 週間後にマウス心臓より血を回収して血清を抽出した。抽出した血清に含まれる、抗 SV40 VP1 抗体の産生、および、抗 OVA 抗体の産生は、抗原を 96 well plate に敷き ELISA 法により解析した。

次に、SV40 VLP に特有の免疫活性化機構の分子メカニズムを解明するためにまず、未熟ヘルパーT 細胞に対する SV40 VLP の作用を解析することを目的として、C57BL/6 マウスから脾臓リンパ球を調製し、CD4 陽性 T 細胞のみに結合しない抗体カクテルを固定化してある磁性

ビーズ (Magnetic-activated cell sorting (MACS) bead, MACS ビーズ) を用いたネガティブセレクトーションと、CD62L 陽性細胞に特異的に結合する抗体を固定してある MACS ビーズを用いたポジティブセレクトーションにより、未熟 CD4 陽性 T 細胞を単離した。そして、単離した未熟 CD4 陽性 T 細胞と SV40 VLP を混合し、7 日間培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を 1 型ヘルパー T 細胞、2 型ヘルパー T 細胞、17 型ヘルパー T 細胞、濾胞性 T 細胞、制御性 T 細胞の各マーカーで染色し、マーカーの発現が上昇するヘルパー T 細胞を Flow cytometry で解析した。

さらに、SV40 VLP が作用した B 細胞が抗体産生を誘導するために必要な条件の探索を行うために、C57BL/6 マウスから脾臓細胞を抽出し、B 細胞特異的に結合する抗体を固定化してある MACS ビーズを用いた抽出した脾臓細胞からポジティブセレクトーションで B 細胞を単離した。そして、B 細胞を刺激する因子と共に、単離した B 細胞と SV40 VLP を混合し、24 時間培養した後、この B 細胞を C57BL/6 マウスに腹腔投与で戻して、2 週間飼育した。2 週間後、マウス心臓より血を回収して血清を抽出し、血清中に含まれる抗 SV40 VP1 抗体を、SV40 VLP を敷いた 96 well プレートを用いた ELISA 法により検出した。

また、SV40 VLP の作用による細胞性免疫の活性化機構の解析を行うために、C57BL/6 マウス脾臓細胞より MACS ビーズを用いて CD8 陽性 T 細胞および Natural killer (NK) 細胞を単離した。また、チオグリコール酸培地を腹腔投与することで腹腔マクロファージの誘導・蓄積を誘導して、そこから腹腔マクロファージを単離した。そして、これらの単離した細胞と SV40 VLP を混合し、24 時間培養した後、培養上清を回収した。そして、回収した培養上清に含まれる IFN- γ 、Interleukin (IL)-2、および、Granzyme B (GrB) の産生量を ELISA 法で解析した。加えて、C57BL/6 マウスより、様々な免疫細胞を単離し、単離した細胞と SV40 VLP を混合し、24 時間培養した後、細胞と培養上清を回収した。そして、蛍光抗体法を用いた Flow cytometry で回収した細胞における免疫活性化マーカーの発現上昇を解析し、回収した培養上清に含まれるサイトカインおよびケモカインの産生量を ELISA 法で解析した。

一方、SV40 VLP に特異的な獲得免疫誘導機構の分子メカニズムの解明のため、SV40 VP1 と相互作用する宿主因子の探索を目的として Yeast two hybrid (Y2H) 法を用いて探索した。このために、GAL4 DNA binding domain (DNA-BD) と SV40 VP1 を融合したコンストラクトを発現する酵母をベイト、GAL4 transcriptional activation domain (AD) とマウス cDNA ライブラリーを融合したコンストラクトを発現する酵母をプレイとして融合させた後、選択培地で培養し、DNA-BD と AD が相互作用して生存可能となりコロニーを形成した酵母からマウス cDNA ライブラリーの配列を PCR 法により増幅し、その cDNA の配列をシークエンスした。そして、取得したシークエンスした配列を Nucleotide The Basic Local Alignment Search Tool (Nucleotide BLAST) で解析し、遺伝子を同定した。

さらに、SV40 VLP のがん細胞に対するがんワクチンとしての効能を解析することを目的として、がんの増殖抑制効果を解析するために、外来抗原を内包した SV40 VLP をマウス投与した後、外来抗原を一過的に発現するがん細胞を移植して、がん細胞移植後の時間経過に伴うがんの大きさの変化を計測した。

4. 研究成果

外来抗原を内包した SV40 VLP の投与で、内包した外来抗原に対して獲得免疫応答である細胞性免疫が誘導されることを解析するために、HHD マウスに M1/VLP を腹腔および経鼻投与し、投与 1 週間後に脾臓から脾臓細胞を抽出した後、M1 特異的 CTL に由来する、M1:58-66 CTL エピトープ特異的な IFN- γ の産生を ICS で解析した。その結果、腹腔および経鼻投与の両方において、M1:58-66 CTL エピトープ特異的に IFN- γ が産生されることが明らかとなった。このことから、SV40 VLP は内包した外来抗原に対して細胞性免疫を誘導できることが明らかとなった。また、経鼻投与でも細胞性免疫を誘導できることから、SV40 VLP は粘膜を介した粘膜免疫のためのワクチンプラットフォームとして有用であることが示唆された。また、M1:58-66 CTL エピトープに対して、既存の IFA を用いた M1:58-66 CTL ペプチド免疫法の 500 分の 1 の M1/VLP 量で IFA を用いた方法よりも強く M1 特異的 CTL を誘導できることが示唆された。さらに、外来抗原を内包した SV40 VLP の投与で、内包した外来抗原に対して獲得免疫応答である抗体産生が誘導されることを解析するために、C57BL/6 マウスに OVA/VLP を腹腔および経鼻投与し、投与 1 週間後に再び同じ経路で投与した後、初回投与から 2 週間後にマウス心臓より血を回収した。回収した血から血清を抽出し、血清中に含まれる抗 VP1 抗体および抗 OVA 抗体を ELISA 法で解析した。その結果、腹腔投与において、VP1 特異的な抗体産生が確認され、腹腔および経鼻投与の両方において、OVA 特異的な抗体産生が確認された。このことから、SV40 VLP は内包した外来抗原に対して抗体産生を誘導できることが明らかとなった。また、細胞性免疫の誘導と同じく、経鼻投与でも抗体産生を誘導できることから、SV40 VLP は粘膜を介した粘膜免疫のためのワクチンプラットフォームとして有用であることが示唆された。また、OVA/VLP 投与は、既存の Alum adjuvant (アラムアジュバント、水酸化アルミニウムゲルアジュバント) を用いた OVA 免疫法と同等の OVA 特異的な抗体産生を誘導することが示唆された。OVA/VLP は VLP 内部に OVA を内包しているが、OVA に対する抗体産生については、

投与後に OVA/VLP の一部が解離し、OVA が細胞表面の B 細胞受容体 (BCR, B-cell receptor) に結合する可能性、および、OVA/VLP が GM1 を介して B 細胞に取り込まれた後、エンドソーム内で解離し、エンドソーム内の BCR と結合する可能性が示唆される。

また、SV40 VLP に特有の免疫活性化機構を明らかにするために、まず、ヘルパー T 細胞の分化における SV40 VLP の作用を解析することを目的として、未熟 CD4 陽性 T 細胞に SV40 VLP を作用させ、SV40 VLP 作用による T-helper サブセットへの分化誘導を解析した。そのために、未熟 CD4 陽性 T 細胞と SV40 VLP を混合し、1 週間培養した後、細胞を回収した。そして、回収した細胞を 1 型ヘルパー T 細胞、2 型ヘルパー T 細胞、17 型ヘルパー T 細胞、濾胞性 T 細胞、制御性 T 細胞を検出するための核内転写因子に対する蛍光抗体で染色した後、Flow cytometry で解析した。その結果、SV40 VLP の未熟 CD4 陽性 T 細胞への作用により、CD4 陽性 T 細胞において特定の核内転写因子の発現が上昇することが明らかとなった。このことから、SV40 VLP は、未熟 CD4 陽性 T 細胞に直接作用して、特定のヘルパー T 細胞への分化を誘導できることが示唆された。

さらに、SV40 VLP が作用した B 細胞からの抗 VP1 抗体産生が誘導されるために必要な条件を探索するために、様々な B 細胞活性化因子存在下で、C57BL/6 マウスから抽出した B 細胞と SV40 VLP を混合し、24 時間培養した。そして、培養した B 細胞を C57BL/6 マウスに腹腔投与して、2 週間後にマウス心臓より血を回収して血清を抽出した。そして、抽出した血清に含まれる抗 VP1 抗体を ELISA 法により検出した。その結果、SV40 VLP に特定の B 細胞活性化因子で B 細胞を刺激した場合に、抗 VP1 抗体の産生が誘導されることが明らかとなった。このことから、B 細胞からの抗 VP1 抗体の産生には、SV40 VLP の作用のみで十分ではなく、他に B 細胞活性化因子が必要であることが示唆された。

また、SV40 VLP の作用による細胞性免疫の活性化機構の解析のために、C57BL/6 マウスの脾臓細胞から、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、および、腹腔マクロファージを単離し、単離した細胞と SV40 VLP を混合し、24 時間培養した後、培養上清を回収した。そして、培養上清に含まれる IFN- γ 、IL-2、および、GrB の産生量を ELISA 法で解析した。その結果、SV40 VLP はこれらの細胞から IFN- γ 、IL-2、および GrB の産生を誘導しないことが明らかとなった。さらに、C57BL/6 マウスから様々な免疫細胞を調製し、これらの細胞と SV40 VLP を混合し、24 時間培養した後、細胞と培養上清を回収した。そして、これらの細胞における免疫活性化マーカーの発現上昇を Flow cytometry で、培養上清に含まれる、サイトカイン、および、ケモカインの産生量を ELISA 法で解析した。その結果、SV40 VLP は、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、および、NK 細胞の特定の免疫活性化マーカーの発現を直接上昇させ、CD4 陽性 T 細胞および B 細胞からの特定のケモカインの産生を直接誘導し、また、樹状細胞からの特定のサイトカインの産生を直接誘導することが明らかとなった。しかしながら、上記以外のサイトカインの産生は確認できなかった。このことから、SV40 VLP は、獲得免疫応答である、細胞性免疫の誘導において、ヘルパー T 細胞や、CTL、マクロファージにおける細胞性免疫応答の指標となる IFN- γ 、IL-2、および、GrB の産生を誘導することなく、細胞性免疫を誘導していることが示唆された。また、SV40 VLP が様々な免疫細胞に作用しても炎症性サイトカインの産生を誘導しなかったことから、SV40 VLP は内包した外来抗原に対して、炎症性サイトカインの産生を誘導することなく獲得免疫応答である、細胞性免疫の誘導および抗体産生を誘導することが示唆された。

さらに、このような SV40 VLP に特異的な獲得免疫応答を誘導するための分子メカニズムを明らかにすることを目的として、Y2H を用いた SV40 VP1 に結合する細胞性因子の探索を行った。そのために、DNA-BD を融合した SV40 VP1 を発現する酵母をベイト、AD を融合したマウス cDNA ライブラリーを発現する酵母をプレイとして融合させて、栄養要求性培地で培養し、SV40 VP1 とマウス cDNA ライブラリーが相互作用することで増殖可能となって増殖してきたコロニーを 72 個回収し、酵母に含まれるマウス cDNA ライブラリーの遺伝子を PCR 法で増幅した後、シークエンスを行い、Nucleotide BLAST により遺伝子を同定した。

また、SV40 VLP のがんワクチンとしての効能を解析するための実験系を確立するために、外来抗原を内包した SV40 VLP をマウスに腹腔投与した後、外来抗原を一過的に発現するマウス血球系がん細胞および上皮細胞系がん細胞を移植し、がんの大きさの時間変化を解析した。

これらの研究結果は SV40 VLP をプラットフォームとするがんワクチンを含めたワクチン開発および SV40 VLP に特有の獲得免疫誘導機構の分子メカニズムの詳細な解明につながるだけでなく、次世代のがんワクチンなど獲得免疫の誘導が困難で複数回免疫が必要なワクチンの開発にも有用な知見を提供できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawano M, Saika K, Takagi R, Matsui M, Matsushita S. | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Tannic acid acts as an agonist of the dopamine D2L receptor, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis in mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Brain, Behavior, & Immunity - Health | 6. 最初と最後の頁 1-15 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbih.2020.100071 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Saika K, Kato M, Sanada H, Matsushita S, Matsui M, Handa H, Kawano M. | 4. 巻 101 |
| 2. 論文標題 Induction of adaptive immune responses against antigens incorporated within the capsid of simian virus 40. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J. Gen. Virol. | 6. 最初と最後の頁 853-862 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001445 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takagi R, Kawano M, Sato T, Matsushita S. | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Tannic acid, a dopamine receptor agonist, ameliorates periodontitis, atopic dermatitis and psoriasis in animal models. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Curr. Trends Immunol. | 6. 最初と最後の頁 11-17 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tokano Mieko, Kawano Masaaki, Takagi Rie, Matsushita Sho | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Istradefylline, an adenosine A2a receptor antagonist, ameliorates neutrophilic airway inflammation and psoriasis in mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology | 6. 最初と最後の頁 268 ~ 275 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cen3.12658 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 戸叶 美枝子, 松下 祥, 高木 理英, 川野 雅章 |
| 2. 発表標題 アデノシンはエフェクターCD4陽性T細胞に作用しIL-17産生を介して好中球性炎症を惹起する |
| 3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 川野 雅章, 戸叶 美枝子, 高木 理英, 松下 祥 |
| 2. 発表標題 アデノシン受容体を介した好中球性炎症制御 |
| 3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 戸叶 美枝子, 松下 祥, 高木 理英, 川野 雅章 |
| 2. 発表標題 アデノシンはTh17細胞の分化を誘導しアデノシンA2a受容体拮抗薬はEAEを制御する |
| 3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masaaki Kawano, Mieko Tokano, Rie Takagi, Toshimasa Yamamoto, Sho Matsushita |
| 2. 発表標題 Extracellular adenosine induces hypersecretion of IL-17A by T-helper 17 cells through the adenosine A2a receptor to promote neutrophilic inflammation |
| 3. 学会等名 The 50th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計9件

| | | |
|--------------------------------------|--|---------------|
| 産業財産権の名称 アデノシン A 2 A 受容体を標的とする組成物 | 発明者 松下祥、川野雅章、 高木理英、戸叶美枝 子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/24876 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |
| 産業財産権の名称 アデノシン産生酵素を標的とする組成物 | 発明者 川野雅章、松下祥、 高木理英、戸叶美枝 子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-109854 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 アデノシン産生酵素を標的とする組成物 | 発明者 川野雅章、松下祥、 高木理英、戸叶美枝 子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/43886 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |
| 産業財産権の名称 アデノシンA2A受容体の活性化を抑制する組成物 | 発明者 川野雅章、松下祥、 高木理英、戸叶美枝 子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-148336 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 アデノシンA2A受容体を標的とする組成物 | 発明者 松下 祥、川野 雅 章、高木 理英、戸 叶 美枝子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-195478 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 アデノシンA2A受容体の活性化を抑制する組成物 | 発明者 川野 雅章、松下 祥、高木 理英、戸 叶 美枝子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/31777 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 外国 |
| 産業財産権の名称 播種性血管内凝固症候群の予防又は治療用組成物 | 発明者 松下 祥、川野 雅 章、戸叶 美枝子、 高木 理英 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-031972 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 播種性血管内凝固症候群の予防又は治療用組成物 | 発明者 松下 祥、川野 雅 章、戸叶 美枝子、 高木 理英 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-071128 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 播種性血管内凝固症候群の予防又は治療用組成物 | 発明者 松下祥/川野雅章/戸 叶美枝子/高木理英/ 前崎繁文/樽本憲人 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/001353 | 出願年 2022年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|