

様式6 (第15条第1項関係)

平成29年4月 10日

独立行政法人
日本学術振興会理事長 殿

研究機関の設置者の所在地	〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地	
研究機関の設置者の名称	国立大学法人京都工芸繊維大学	
代表者の職名・氏名	学長 古山 正雄 (記名押印)	
代表研究機関名 及び機関コード	京都工芸繊維大学	14303

平成28年度戦略的国際研究交流推進事業費補助金
実績報告書

戦略的国際研究交流推進事業費補助金取扱要領第15条第1項の規定により、実績報告書を提出します。

整理番号	S2802	補助事業の 完了日	平成29年3月31日	関連研究分野 (分科細目コード)	7701 (昆虫科学)
------	-------	--------------	------------	---------------------	----------------

補助事業名 (採択年度) 日英共同「PODS国際研究ネットワーク」による病理・生理・細胞生物学の新たな展開 (平成28年度)	補助金支出額 (別紙のとおり) 23,317,311円
---	--------------------------------

代表研究機関以外の協力機関
なし

海外の連携機関
University of Cambridge ケンブリッジ大学
Cell Guidance Systems セル ガイダンス システムズ

1. 事業実施主体

フリガナ 担当研究者氏名	所属機関	所属部局	職名	専門分野
主担当研究者 モリ ハジメ 森 肇	京都工芸繊維大学	大学法人	理事・副学長	昆虫ウイルス学
担当研究者 ヤマグチ マサミツ 山口 政光	京都工芸繊維大学	応用生物学系	教授	遺伝学
イトウ マサノブ 伊藤 雅信	京都工芸繊維大学	応用生物学系	教授	遺伝学
タカノ トシユキ 高野 敏行	京都工芸繊維大学	昆虫先端研究推進センター	教授	遺伝学
イノウエ ヨシヒロ 井上 喜博	京都工芸繊維大学	昆虫先端研究推進センター	准教授	細胞生物学

コタニ エイジ 小谷 英治 計 6 名	京都工芸繊維大学	応用生物学系	准教授	昆虫生理学
-------------------------------	----------	--------	-----	-------

フリガナ 連絡担当者	所属部局・職名	連絡先（電話番号、e-mailアドレス）
ヤマノウチ ケイ 山之内 啓	研究推進課・研究協力係長	075-724-7714 research_cooperation@jim.kit.ac.jp

※2頁以降は、交付決定を受けた時点の事業計画の項目に合わせて必要に応じて修正すること。

2. 本年度の実績概要

1. コールドチェーン不要なワクチンに関する研究

エボラウイルス、ジカウイルス、デングウイルス、ラッサウイルス、ノロウイルスがコードするタンパク質を昆虫ウイルスが作るタンパク質微結晶である多角体に包埋することで、これらのタンパク質を安定化させ、冷蔵・冷凍の輸送・保存設備（コールドチェーン）の無い途上国で利用できるワクチン開発を目的としている。

代表研究機関側（京都工芸繊維大学）では、ノロウイルスの主要キャプシドタンパク質 VP1 からなるウイルス疑似粒子をこの多角体に包埋することに成功した。また、海外連携機関側の一つであるケンブリッジ大学病理学研究所において、エボラウイルス、ジカウイルス、デングウイルス、ラッサウイルスの構成タンパク質の多角体への内包化を完了した。今後、これらの多角体に内包化した疑似粒子やウイルスタンパク質の抗原性を確認するとともに、動物を用いた免疫誘導に関する研究を行う。

2. 連続した細胞分化制御系に関する研究

多角体を構成する上で重要な多角体タンパク質分子（polyhedrin）の N 末端の α ヘリックス構造の H1 と、polyhedrin の β シート構造の S1,S3 に存在するチロシンクラスターとの間の相互作用は、アミノ酸置換による変異によって弱められることがわかっている。これによって変異型 polyhedrin からなる多角体は野生型のそれよりも低い pH で溶解する。

代表研究機関側では、変異型と野生型の polyhedrin からなる 2 層の多角体を作成し、それぞれに異なるタンパク質を固定できれば、その溶解性の違いから pH 変化によって放出されるタンパク質の種類を段階的に分けることができる担体の作製に取り組み、内側は野生型、外側は変異型 polyhedrin からなる層を持つ多角体を作製し、それぞれに異なるタンパク質の内包化を行った。

海外連携機関側では、まず Cell Guidance System 社において 25 種類の細胞増殖因子を内包化した多角体のライブラリー化と大量生産化を行った。そして、この中の FGF-2 を内包化した多角体については、ケンブリッジ大学においてヒト iPS 細胞から神経細胞、さらに神経ネットワーク形成までの一連の過程の中で、ある特定の期間に局所的に FGF-2 を作用させるためにこの FGF-2 を内包化した多角体は極めて有効であることを示した。

さらに、代表研究機関側と海外連携機関側で、NGF を内包化した多角体は神経の前駆細胞として分化などの研究に広く使われている PC12 細胞を、NGF 多角体をスポットした周囲に列に並べることができる現象を見出した。これは、今後神経細胞を一列に長く配列化できる技術にもつながることから、両機関側での特許の共同出願を計画している。

3. オーフアン受容体チップに関する研究

液体中で分散する小さな分子であっても、多角体に内包化することで、その低分子を固体のように扱うことが可能になる。そこで、代表研究機関側において、新たな性質を持つ多角体の作製を目的とし、昆虫ステロイドホルモン（20-ヒドロキシエクダイソン（20E））の受容体である、エクダイソン受容体のリガンド結合部位（EcR-E）の内包化を行った。その際に、polyhedrin 分子内の L4 Loop 部位の 192～194 番目のアミノ酸を欠損すること

で、低分子化合物を含浸しやすくした空洞を持つ多角体を作製し、エクダイソン受容体のリガンド結合部位の内包化を行った。そして、リガンドとの結合能力の評価を行った。この結合能の評価に関しては、さらに海外連携機関側でも評価を行う。

3. 到達目標に対する本年度の達成度及び進捗状況

コールドチェーン不要なワクチンに関する研究については、当初の予定通り、5種類のウイルス構成タンパク質および疑似粒子の多角体への内包化を終えた。今後これらの多角体に内包化したウイルスタンパク質の抗原性に関する試験の後、動物実験に移行する予定である。

連続した細胞分化制御系に関する研究については、Cell Guidance System社は25種類の細胞増殖因子を内包化した多角体の準備を終え、その一部をケンブリッジ大学に提供することで、PODSと呼んでいるタンパク質を内包化した多角体の有効性を示した（論文作成中）。また、骨の再生に有効であるBMP-2多角体については、来年度、治験に向けた前臨床試験を行う計画であり、これに関しては海外連携機関側のCell Guidance System社、ケンブリッジ大学と共に実施する。

オーファン受容体チップに関する研究については、空洞を持つ多角体を作製し、これはホルモンなどの低分子化合物を含浸するのに有効であることをACS Nanoに発表した。

4. 日本側研究グループ（実施主体）の研究成果発表状況（本年度分）

①学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文又は著書

論文名・著書名 等	
（論文名・著書名、著者名、掲載誌名、査読の有無、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）について記入してください。）（以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。） ・査読がある場合、印刷済及び採録決定済のものに限って記載して下さい。査読中・投稿中のものは除きます。 ・さらに数がある場合は、欄を追加して下さい。 ・著者名について、責任著者に「※」印を付してください。また、主担当研究者には <u>二重下線</u> 、担当研究者については <u>下線</u> 、若手研究者については <u>波線</u> を付してください。 ・海外の連携機関の研究者との国際共著論文等には、番号の前に「◎」印を、また、それ以外の国際共著論文等については番号の前に「○」印を付してください。また、主要連携研究者については <u>斜体・太下線</u> 、連携研究者については <u>斜体・破線</u> としてください。	
1	Abe, S., Tabe, H., Ijiri, H., Yamashita, K., Hirata, K., Atsumi, K., Shimoi, T., Akai, M., <u>Mori, H.</u> , Kitagawa, S., ※Ueno, T. Crystal Engineering of Self-Assembled Porous Protein Materials in Living Cells. ACS Nano DOI : 10.1021/acsnano.6b06099（査読あり）
2	
3	
4	
5	

②学会等における発表

発表題名 等

(発表題名、発表者名、発表した学会等の名称、開催場所、口頭発表・ポスター発表の別、審査の有無、発表年月(西暦)について記入してください。)(以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。)

- ・発表者名は参加研究者を含む全員の氏名を、論文等と同一の順番で記載すること。共同発表者がいる場合は、全ての発表者名を記載し、責任発表者名は「※」印を付して下さい。発表者名について主担当研究者には二重下線、担当研究者については下線、若手研究者については波線を付して下さい。
- ・口頭・ポスターの別、発表者決定のための審査の有無を区分して記載して下さい。
- ・さらに数がある場合は、欄を追加して下さい。
- ・海外の連携機関の研究者との国際共同発表には、番号の前に「◎」印を、また、それ以外の国際共同発表については番号の前に○印を付して下さい。また、主要連携研究者については斜体・太下線、連携研究者については斜体・破線として下さい。

1	
2	
3	
4	
5	

5. 若手研究者の派遣実績(計画)

【海外派遣実績(計画)】

年度	平成28年度	平成29年度	平成30年度	合計
派遣人数	2人	4人 (2人)	4人 (4人)	4人

※当該年度は実績、次年度以降は計画している人数を記載

【本年度の海外派遣実績】

派遣者①の氏名・職名：高木圭子・助教

(当該若手研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動)

研究内容：コールドチェーン不要なワクチンに関する研究、オーファン受容体チップに関する研究

- ・エボラウイルスタンパク質の多角体への固定化
- ・オーファン受容体の多角体への固定化とそのライブラリー化
- ・生体抽出物からのリガンド探索
- ・新規リガンド探索

(具体的な成果)

VP3あるいはH1タグを付加したノロウイルスVP1の融合タンパク質を発現するリコンビナントバキュロウイルスと、polyhedrinを発現するリコンビナントバキュロウイルス

スを、昆虫細胞に共感染させることでノロ多角体を得た。この多角体について抗ノロウイルス VP1 抗体を用いた Western blot を行ったところ、ノロウイルス VP1 が固定化されていることが確認できた。しかし原子間力顕微鏡を用いた観察の結果、ノロ多角体表面に粒子を確認できなかった。これらの結果から、ノロウイルス VP1 は発現しているものの、粒子を構築するのに必要な構造をとっていないのではないかと考えられた。そこで、バキュロウイルス発現系のカテプシンとキチナーゼを除いたウイルスを用いた。カテプシンはシステインプロテアーゼの一種で、タンパク質中のペプチド結合を加水分解する酵素である。一方、キチナーゼは小胞体に結合し、タンパク質の分泌を阻害する働きがあるほか、カテプシンの立体構造の構築を助ける働きがある。これら2つの酵素が、ウイルスタンパク質を部分的に分解し粒子構造の構築を阻害していると考えた。カテプシンとキチナーゼの遺伝子を polyhedrin 遺伝子に置換した新たなリコンビナントウイルス (ΔCC ウイルス) を作製した。ΔCC ウイルスにより得られた ΔCC ノロ多角体を抗ノロウイルス VP1 抗体を用いて Western blot で解析したところ、この ΔCC ノロ多角体においてもノロウイルス VP1 が固定化されていることが確認できた。また、同じ抗体を用いた免疫染色でも ΔCC ノロ多角体表面にノロウイルス VP1 が固定化されていることが確認できた。さらに、VP1 の固定化量を ELISA で測定したところ、ΔCC ノロ多角体の方がノロ多角体よりも、その量が多いことがわかった。次に、ΔCC ノロ多角体の表面構造を走査型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いて観察したところ、ノロ多角体には存在していなかった粒子状の構造物と、その粒子が多角体に包埋されている様子を確認することができた。

派遣先 (国・地域名、機関名、部局名、受入研究者)	派遣期間			合計
	平成28年度	平成29年度	平成30年度	
英国、University of Cambridge、Institute of Pathology、Ian Goodfellow	20日	40日	40日	100日
英国、Cell Guidance Systems、Michael Jones	27日	93日	80日	200日

派遣者②の氏名・職名：加藤容子・助教

(当該若手研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動)
 研究内容：連続した細胞分化制御系に関する研究

- ・多層構造多角体への細胞増殖因子の固定化
- ・多層構造多角体による組織・器官形成
- ・ES細胞、iPS細胞などの幹細胞からの細胞の分化制御
- ・ショウジョウバエ個体内における体性幹細胞

(具体的な成果)
 pHが10.5以上で溶解する野生型多角体にEGFPを内包化したWT/H1-EGFP多角体ではpHが高いほど強い蛍光強度を示した。アミノ酸置換によりpH8付近から溶解する変異型多角体にEGFPを内包化したR13A/H1-EGFP多角体では、pH8.0、pH8.5、pH7.5、pH9.0の順に強かった。層構造を持つ多角体の作製では、WT、H1-EGFPの共感染から4時間後にR13A、H1-DsRedの共感染を行ったところ、EGFPしか固定されていなかったが、層を持つと思われる多角体が見られた。ほかにも2層と思われる多角体が見られた

が、内側に EGFP、外側に EGFP、DsRed というように同じ層に 2 種の蛍光タンパクが混ざって固定されていた。このように層構造を持つ多角体の構築が可能であることは分かったが、いずれの層にも同じ蛍光タンパクが内包化される原因については、最初に発現させたタンパク質が細胞内に残っており、次に発現したタンパク質が次の多角体形成時に混ざったためだと考えられるので、今後この点の改良を試みる。

派遣先 (国・地域名、機関名、部局名、受入研究者)	派遣期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
英国、University of Cambridge、Institute of Pathology、Ian Goodfellow	10 日	50 日	40 日	100 日
英国、Cell Guidance Systems、Michael Jones	21 日	89 日	90 日	200 日

※本年度の派遣者毎に作成すること。

6. 研究者の招へい実績 (計画)

【招へい実績 (計画)】

年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	合計
招へい人数	1 人	3 人 (1 人)	4 人 (3 人)	4 人

※当該年度は実績、次年度以降は計画している人数を記載

【本年度の招へい実績】

招へい者③の氏名・職名：Michael Jones・CEO

(当該研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動) 研究内容：連続した細胞分化制御系に関する研究 ・多層構造多角体の機能改変 ・機能改変した多層構造多角体への細胞増殖因子の固定化 (具体的な成果) 招へい者は、Cell Guidance System 社において 25 種類の細胞増殖因子を内包化した PODS の作製と海外連携機関側であるケンブリッジ大学での PODS を用いた研究の加速化に努めるなど、「日英共同「PODS 国際研究ネットワーク」による病理・生理・細胞生物学の新たな展開」の進展に大きく貢献した。				
招へい元 (機関名、部局名、国名) 及び 日本側受入研究者 (機関名)	招へい期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
Cell Guidance Systems、英国 森 肇 (京都工芸繊維大学)	8 日	15 日	30 日	53 日

※本年度の招へい者毎に作成すること。

7. 翌年度の補助事業の遂行に関する計画

該当なし

※ 補助事業が完了せずに国の会計年度が終了した場合における実績報告書には、翌年度の補助事業の遂行に関する計画を附記すること。