

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）コムギ無細胞合成系による蛋白質生産支援・高親和抗体構築技術開発
（モノクローナル抗体作成支援および結晶至適化高親和型 Fab の構築）
（英語）Research and development of technologies for membrane protein
production and high-affinity antibody against membrane protein based
on the wheat cell-free system. (Support for generation of monoclonal
antibodies, and construction of high-affinity Fab suitable for
crystallization)

補助事業担当者（日本語）富山大学大学院医学薬学研究部 教授 村口篤

所属 役職 氏名：（英語）Atsushi Muraguchi, Professor, Graduate School of Medicine and
Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

《支援》モノクローナル抗体作製技術を用いた支援

迅速かつ網羅的に抗原特異的抗体を得る ISAAC 法を用いて、ヒト、マスウ、ウサギモノクローナル抗体の取得支援を行った。それぞれリンパ球を分離し、ISAAC 法により特異的抗体産生細胞の検出と回収を行い、多くの特異的抗体が得られた。これら抗体を支援先研究者に提供した。

【支援 1】タンパク質複合体に対するウサギ抗体の作製を行い、10 種類以上の特異的抗体が得られた。

【支援2】 ウイルスタンパク質に対するヒト抗体の作製を行い、3種類の特異的抗体が得られた。

【支援3】 ウイルスタンパク質に対するマウス抗体の作製を行い、10種類以上の特異的抗体が得られた。

【支援4】 ペプチドに対するウサギ抗体の作製を行い、7種類の特異的抗体が得られた。

【支援5】 自己免疫疾患 (A) 患者から自己抗体の取得を行い、12種類の特異的抗体が得られた。

【支援6】 自己免疫疾患 (B) 患者から自己抗体の取得を行った。1種類の特異的抗体が得られた。

【支援7】 自己免疫疾患 (C) 患者から自己抗体の取得を行った。1種類の特異的抗体が得られた。

【支援8】 自己免疫疾患 (D) 患者から自己抗体の取得を行った。17種類の特異的抗体が得られた。

【支援9】 ウイルスタンパク質に対するウサギ抗体作製を行い、2種類以上の特異的抗体が得られた。

【支援10】 支援2で得られたウイルスタンパク質に対するヒト抗体を用いて、ウイルスタンパク質との共結晶を作製してX線結晶構造解析を行うために、これら得られた抗体のFab化を行った。

《高度化》膜タンパク質結晶至適化高親和抗体の構築

GPCRに対するウサギ抗体の作製を行った。愛媛大学の澤崎先生らがコムギ無細胞合成系により作製したGPCRの一種であるDRD1のプロテオリポソームをウサギに免疫し、そのリンパ球を分離した。ISAAC法により特異的抗体産生細胞の検出と回収を行い、6種類の特異的抗体が得られた。同様の方法で、別のGPCR特異的抗体も2種類得られた。これらの結果より、ISAAC法とコムギ無細胞合成系を用いる事で、GPCR特異的ウサギモノクローナル抗体が得られることが示された。

X線結晶構造解析を行うためのFab化抗体を、簡便に精製できるプロトコールを確立した。抗体に様々な遺伝子改変を行い精製することで、従来のパピイン処理法と比較して簡便に調整できる系を確立した。この簡便かつ大量の抗体を得ることができるプロトコールで精製したFab抗体がX線結晶構造解析に有益であるかどうかを構造解析のグループと共同で検証した。モデルとして、ペプチドとその抗体を用いて行った。合計3種類のペプチド/Fab化抗体から共結晶が得られた。これら共結晶のX線回折データを測定した結果、いずれも2~2.4Åの分解能の結果を得ることができた。これらの結果より、今回開発したFab化抗体の発現/精製系を用いる事で、迅速かつ簡便にX線回折データが得られるFab化抗体を作製できる事が示された。

Support projects: support using monoclonal antibodies (mAbs) generation technology

We provided support of generation of human, mouse and rabbit mAbs by ISAAC technology that is a rapid, efficient, and high-throughput system for identifying and recovering objective antibody-secreting cells (ASCs) using microwell array chips. We detected many cells that produced antigen-specific antibodies, and retrieved these cells from the chip. Then, we obtained many mAbs that specifically bound antigens. These antibodies were offered to researchers.

Support projects 1: We provided support of generation rabbit mAbs to protein complex, obtained more than 10 mAbs.

Support projects 2: We provided support of generation human mAbs to virus protein, obtained 3 mAbs.

Support projects 3: We provided support of generation mouse mAbs to virus protein, obtained more than 10 mAbs.

Support projects 4: We provided support of generation rabbit mAbs to peptide, obtained 7 mAbs.

Support projects 5: We provided support of generation human auto-monoclonal antibodies from autoimmune disease (A) patients, obtained 12 mAbs.

Support projects 6: We provided support of generation human auto-monoclonal antibodies from autoimmune disease (B) patients, obtained 1 mAb.

Support projects 7: We provided support of generation human auto-monoclonal antibodies from autoimmune disease (C) patients, obtained 1 mAb.

Support projects 8: We provided support of generation human auto-monoclonal antibodies from autoimmune disease (D) patients, obtained 17 mAbs.

Support projects 9: We provided support of generation rabbit mAbs to virus protein, obtained more than 2 mAbs.

Advanced projects: Establishment of generation methods for high-affinity antibodies to membrane protein.

We generated rabbit antibodies to GPCRs. We prepared purified DRD1 (kind of GPCR) proteoliposome that was produced by *in vitro* wheat germ cell-free protein synthesis system (Sawasaki et al, Ehime Univ.), and immunized a rabbit with it. After sacrifice, lymphoid cell cells were collected and rabbit IgG+ cells were concentrated and spread on a microwell array chip. We detected many cells that produced DRD1 proteoliposome-specific antibodies, and retrieved these cells from the chip. Then, we obtained 6 mAbs that specifically bound DRD1 proteoliposome. We also obtained 2 mAbs that specifically bound other GPCR. These results demonstrated that the ISAAC technology and the wheat cell-free synthesis system are valuable for generation of rabbit mAbs to GPCR.

We established the convenient-purification methods of Fab fragment for X-ray crystallography. We modified of the antibodies gene, established the protocol that can be conveniently purified compared with conventional papain-treatment method. Next, we and structural analysis group confirmed availability for X-ray crystallography of Fab fragment that generated by our methods. As a model, we used peptide and Fab fragment that recognized them. We obtained cocrystal from 3 kinds of peptide/Fab fragment complex. We obtained X-ray diffraction data with resolution of 2 to 2.4 Å at each cocrystal. These results demonstrated that our convenient-purification methods of Fab are valuable for X-ray crystallography

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 23 件)

- 1) Ozawa T., Piao X., Kobayashi E., Zhou Y., Sakurai H., Andoh T., Jin A., Kishi H, and Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. PLoS ONE, 2012, 7, e52383.

- 2) Ozawa T., Horii M., Kobayashi E., Jin A., Kishi H., and Muraguchi A.: The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-CD3 antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 422, 245-249.
- 3) Sun X., Saito M., Sato Y., Chikata T., Naruto T., Ozawa T., Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A., and Takiguchi M.: Unbiased analysis of TCR α / β chains at the single-cell level in human CD8⁺ T-cell subsets. *PLoS ONE*, 2012, 7, e40386.
- 4) Honda H., Nagai Y., Matsunaga T., Saitoh S., Akashi-Takamura S., Hayashi H., Fujii I., Miyake K., Muraguchi A., and Takatsu K.: Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor Toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012, 91, 967-976.
- 5) Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of patients with cancer within 10 days. *Nat Med.* 2013, 19, 1542-6.
- 6) Ohnaga T, Shimada Y, Moriyama M, Kishi H, Obata T, Takata K, Okumura T, Nagata T, Muraguchi A., Tsukada K. Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells. *Biomed Microdevices.* 2013, 15, 611-6.
- 7) Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *OncoImmunology.* 2014, 3, e27258.
- 8) Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Horii M, Hamana H, Nagai T, Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 444, 319-24.
- 9) Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nakagawa H, Jin A, Lin Z, Muraguchi A. A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 453, 798-803.
- 10) Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, Hayashi H, Fujii I, Ikutani M, Hirai Y, Muraguchi A., Takatsu K. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *J Leukoc Biol.* 2014, 96, 1087-100.
- 11) Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A., Joh T, Tanaka Y. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One.* 2015, 10, e0118062.
- 12) Tsuda R, Ozawa T, Kobayashi E, Hamana H, Taki H, Tobe K, Sugiyama E, Iwamoto M, Imura J, Kishi H, Muraguchi A. Monoclonal antibody against citrullinated peptides obtained from rheumatoid arthritis patients reacts with numerous citrullinated microbial and food proteins. *Arthritis Rheumatol.* 2015, 67, 2020-31.
- 13) Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A., Jih PJ, Morishita R, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T, Iwasaki T, Endo Y, Sawasaki T. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. *Sci Rep.* 2015, ;5, 11333.

- 14) Mizukoshi E, Nakagawa H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Fushimi K, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Kaneko S. Immunological features of T cells induced by human telomerase reverse transcriptase-derived peptides in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2015, 364, 98-105.
- 15) Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, Hu C, Yi W, Liu D, Khadem F, Okwor I, Jia P, Shitaoka K, Wang S, Ndao M, Petersen C, Chen J, Rafati S, Louzir H, Muraguchi A, Wilkins JA, Uzonna JE. Identification of broadly conserved cross-species protective Leishmania antigen and its responding CD4+ T cells. *Sci Transl Med.* 2015, 7, 310ra167.
- 16) Hamana H, Shitaoka K, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. A novel, rapid and efficient method of cloning functional antigen-specific T-cell receptors from single human and mouse T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 474, 709-14.
- 17) Piao X, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology.* 2016, 5, e1131380.
- 18) Kawasaki Y, Sakimura A, Park CM, Tomaru R, Tanaka T, Ozawa T, Zhou Y, Narita K, Kishi H, Muraguchi A, Sakurai H. Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. *Sci Rep.* 2016, 6, 31502.
- 19) Hao Z, Han X, Sun X, Shen M, Huang J, Li Y, Ozawa T, Pang D, Jin S, Kishi H, Muraguchi A, Jin A. Fully human monoclonal antibodies to TRAIL-R1 enhance TRAIL-induced apoptosis via activation of caspase-8 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 475, 238-44.
- 20) Ohnaga T, Shimada Y, Takata K, Obata T, Okumura T, Nagata T, Kishi H, Muraguchi A, Tsukada K. Capture of esophageal and breast cancer cells with polymeric microfluidic devices for CTC isolation. *Mol Clin Oncol.* 2016, 4, 599-602.
- 21) Nagatoshi Y, Ikeda M, Kishi H, Hiratsu K, Muraguchi A, Ohme-Takagi M. Induction of a dwarf phenotype with IBH1 may enable increased production of plant-made pharmaceuticals in plant factory conditions. *Plant Biotechnol J.* 2016, 14, 887-94.
- 22) Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Tamai T, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Muraguchi A, Kaneko S. Association Between High-Avidity T-Cell Receptors, Induced by alpha-Fetoprotein-Derived Peptides, and Anti-Tumor Effects in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 2017 in press
- 23) Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S. Identification of an HLA class I allele closely involved in the auto-antigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood*, 2017 in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

- 1) A novel human TCR efficient cloning system confers candidate for TCR gene therapy within 10 days. ポスター発表 Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Hamana H., Nagai T., Ozawa T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., and Muraguchi A.: 27th Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer, 2012, 10, 26-28, 国外

- 2) Analysis of cellular responses at single cell levels with a hybrid magnetic microwell array chip. ポスター発表. Kishi H., Obata T., Takami S., Kazui M., Ogawa A., Ozawa T., and Muraguchi A.: International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012, 11, 27-28, 国内.
- 3) がんの TCR 遺伝子治療にむけた候補 TCR 遺伝子の迅速クローニング法. ポスター発表. 岸裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 金子周一, 村口篤: 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19-21, 国内.
- 4) Detection of antigen-stimulated cytokine secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. ポスター発表. 岸裕幸, 金艾順, 小林栄治, 小澤龍彦, 浜名洋, 村口篤: 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 国内.
- 5) The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C α antibody. 口頭発表, 小澤龍彦, 小林栄治, 金艾順, 岸裕幸, 村口篤: 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 国内.
- 6) Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy. 口頭発表, 小林栄治, 岸裕幸, 浜名洋, 小澤龍彦, 中河秀俊, 金艾順, 村口篤: 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 国内.
- 7) Rapid generation of super-antibodies using rabbit ISAAC. ポスター発表. 朴秀虹, 小澤龍彦, 小林栄治, 岸裕幸, 村口篤: 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 国内.
- 8) Comparison of TCR repertoires in EBV-specific T cells detected by three different staining methods. 口頭発表, 浜名洋, 小林栄治, 岸裕幸, 小澤龍彦, 金艾順, 村口篤: 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 国内.
- 9) マイクロウェルアレイチップを用いたウサギモノクローナル抗体の迅速作製法の開発. 口頭発表, 小澤龍彦, 朴秀虹, 小林栄治, 周越, 櫻井宏明, 安東嗣修, 金艾順, 岸裕幸, 村口篤: 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012, 12, 11-14, 国内.
- 10) Rabbit ISAAC (rabbit immunospot array assay on a chip) allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. 口頭発表. Piao X, Muraguchi A., Hamana H, Ozawa T, Kobayashi E, Jin A, Kishi H. Keystone Symposia 'Antibodies as Drugs'; 2013 Jan 27-Feb 1; 国外.
- 11) Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. 口頭発表. Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Nagai T, Muraguchi A. Measuring Antigen-Specific Immune Responses (MASIR) 2013; 2013 May 29-Jun 1; 国外.
- 12) Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. ポスター発表. Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Nagai T, Muraguchi A. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; 国外.
- 13) A monoclonal CCP-antibody derived from RA patients binds to several citrullinated antigens in the human cellular components. ポスター発表. Ozawa T, Tuda R, Kobayashi E, Hounoki H, Shinoda K, Taki H, Tobe K, Kishi H, Muraguchi A. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; 国外.
- 14) A. Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy. ポスター発表. Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Hamana H, Nagai T, Ozawa T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; 国外.

- 15) Swiprosin-1/EFhd2 is involved in the initial reaction of the IgE Fc receptor signal. 口頭発表. Mitsuhashi Y, Hachiya M, Aradate T, Yamanoi Y, Kanamori M, Muraguchi A, Mietenz D, Katagiri T. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; 国外.
- 16) The role of Prohibitin (PHB) in the initial reaction of the IgE Fc receptor signal from lipid raft. ポスター発表. Ichii T, Aradate T, Mitsuhashi Y, Hachiya M, Tani N, Yamanoi Y, Kanamori M, Muraguchi A, Katagiri T. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; 国外.
- 17) Polyporus alveolaris extract (PAE) have the ability to stimulate macrophages against tumor with unique manner. ポスター発表. Sasajima Y, Kawamura M, Aradate T, Muraguchi A, Katagiri T. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; 国外.
- 18) 末梢血リンパ球中の抗原特異的 CD8⁺T 細胞および T 細胞受容体の網羅的・迅速解析. 口頭発表. 岸裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 浜名洋, 長井輝美, 中河秀俊, 金艾順, 金子周一, 村口篤. 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 ; 2013 Aug 24 ; 国内.
- 19) リンパ球チップを用いたヒトモノクローナル抗体の迅速作製. 口頭発表 (招待講演) 村口篤, 小澤龍彦, 岸裕幸. 第 86 回日本生化学会大会 ; 2013 Sep 11-13 ; 国内.
- 20) がん抗原特異的 TCR 遺伝子の迅速クローニング法. 口頭発表. 小林栄治, 水腰英四郎, 岸裕幸, 金子周一, 村口篤. 第 72 回日本癌学会学術総会 ; 2013 Oct 3-5 ; 国内.
- 21) リン酸化ペプチド及び GPCR 特異的ウサギモノクローナル抗体の迅速作製法の開発. ポスター発表. 小澤龍彦, 朴秀虹, 小林栄治, 竹田浩之, 澤崎達也, 周越, 櫻井宏明, 安東嗣修, 金艾順, 岸裕幸, 村口篤. 第 36 回日本分子生物学会年会 ; 2013 Dec 3-6 ; 国内.
- 22) Cis-interaction of TCR and antigenic peptides with MHC class I molecules on a CD8⁺ T-cell. 口頭発表. Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Kobayashi E, Ozawa T, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.
- 23) Rapid generation of rabbit monoclonal antibodies against phosphorylated peptides and G-protein coupled receptor. ポスター発表. Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.
- 24) Cloning and functional analysis of human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-specific TCRs from peptide-vaccinated patients. 口頭発表. Kobayashi E, Nakagawa H, Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Jin A, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.
- 25) hTEC4 system that enable us to clone TCR cDNA from antigen specific single T cells with in 4 days. ポスター発表. Hamana H, Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Nakagawa H, Jin A, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.
- 26) Construction of T cell antigen-exploring system. ポスター発表. Piao X, Hamana H, Kishi H, Kobayashi E, Ozawa T, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.
- 27) Functional analysis of anti-cyclic citrullinated protein antibodies derived from rheumatoid arthritis. ポスター発表. Tsuda R, Ozawa T, Kobayashi E, Taki H, Kishi H, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.
- 28) Comparison of a-fetoprotein-specific TCR repertoires from hepatocellular carcinoma patients after peptide vaccine treatment and healthy donors. ポスター発表. Nakagawa H, Kobayashi E, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 国内.

- 29) Rapid generation of human monoclonal Abs and TCRs from single human lymphocyte: application for gene therapy of infectious diseases and cancer. 口頭発表(Invited Lecture) Muraguchi A. The 6th China-Russia International Conference on Medicine; 2014 Jul 1-3; 国外.
- 30) Functional features of antigen-specific T-cell receptors reflected clinical responses of a-fetoprotein-derived peptides vaccine treatment for advanced hepatocellular carcinoma. ポスター発表 Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Terashima T, Kitahara M, Iida N, Kishi H, Muraguchi A. Kaneko S. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; 2014 Nov 7-11; 国外.
- 31) 無細胞タンパク質合成系を用いた新規高親和性ペプチドタグの開発. 口頭発表. 矢野智也, 竹田浩之, 小澤龍彦, 村口篤, 澤崎達也. 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 ; 2014 Jun 6-7 ; 国内.
- 32) コムギ無細胞タンパク質合成系を基盤とした甘味受容体機能解析のための技術開発. 口頭発表. 栄谷紘一, 竹田浩之, 小澤龍彦, 村口篤, 三坂巧, 澤崎達也. 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 ; 2014 Jun 6-7 ; 国内.
- 33) がんペプチドワクチン療法における TCR レパートリーの経時的変化の検討. 口頭発表. 中河秀俊, 水腰英四郎, 清家拓哉, 山宮大典, 米島淳, 稲田悠記, 木田明彦, 梶喜一郎, 玉井利克, 熊谷将史, 寺島健志, 北原征明, 飯田宗穂, 小林栄治, 岸裕幸, 村口篤, 金子周一. 第 18 回日本がん免疫学会総会 ; 2014 Jul 30-Aug 1 ; ポスター発表.
- 34) メラノーマ患者および健常人の末梢血 CD4⁺T 細胞の単一細胞レベルでのレパートリー解析. 口頭発表. 岸裕幸, 浜名洋, 小林栄治, 杉山大介, 西川博嘉, 鬼塚志乃, 坂口志文, 村口篤. 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会 ; 2014 Sep 6 ; 国内.
- 35) メラノーマ患者および健常人 PBMC 中の CD4⁺T 細胞の単一細胞レベルでのレパートリー解析. 口頭発表. 岸裕幸, 小林栄治, 杉山大介, 西川博嘉, 坂口志文, 村口篤. 第 73 回日本癌学会学術総会 ; 2014 Sep 25-27 ; 国内.
- 36) 単一 B 細胞からの抗体の作製と評価. 口頭発表 (招待講演) . 村口篤. 第 87 回日本生化学会大会フォーラム ; 2014 Oct 15-18 ; 国内.
- 37) 抗膜タンパク質ウサギモノクローナル抗体のエピトープ配列を由来とする新規高親和性ペプチドタグの開発. ポスター発表. 矢野智也, 竹田浩之, 小澤龍彦, 村口篤, 澤崎達也. 第 87 回日本生化学会大会 ; 2014 Oct 15-18 ; 国内.
- 38) GPCR 特異的ウサギモノクローナル抗体の迅速作製法の開発. ポスター発表. 小澤龍彦, 朴秀虹, 小林栄治, 竹田浩之, 澤崎達也, 岸裕幸, 村口篤. 第 37 回日本分子生物学会年会 ; 2014 Nov 25-27 ; 国内.
- 39) Cis-interaction of TCR and antigen/MHC class I complexes on a CD8⁺ T cell. ポスター発表. Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Ozawa T, Muraguchi A. 第 43 回日本免疫学会学術集会 ; 2014 Dec 10-12 ; 国内.
- 40) Rapid generation of rabbit monoclonal antibodies against G-protein coupled receptor and application of these antibodies. 口頭発表. Ozawa T, Piao X, Kishi H, Muraguchi A. 第 43 回日本免疫学会学術集会 ; 2014 Dec 10-12 ; 国内.
- 41) Development of simple and efficient method for amplification of TCR ab cDNA from single human T cells. ポスター発表. Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. 第 43 回日本免疫学会学術集会 ; 2014 Dec 10-12 ; 国内.

- 42) Identification of T cell antigen by an artificial reporter-cell system. ポスター発表. Piao X, Kobayashi E, Kishi H, Hamana H, Ozawa T, Muraguchi A. 第 43 回日本免疫学会学術集会; 2014 Dec 10-12; 国内.
- 43) A monoclonal CCP-antibody derived from RA patients binds to several citrullinated antigens. ポスター発表. Tsuda R, Ozawa T, Taki H, Kishi H, Muraguchi A. 第 43 回日本免疫学会学術集会 ; 2014 Dec 10-12 ; 国内.
- 44) Establishment of West Nile virus-neutralizing human monoclonal antibodies derived from the individuals vaccinated with inactivated Japanese encephalitis virus by ISAAC technology. ポスター発表. Masaki H, Ozawa T, Takasaki T, Kishi H, Muraguchi A. 第 43 回日本免疫学会学術集会; 2014 Dec 10-12; 国内.
- 45) Distinct pattern of the binding of human monoclonal anti-cyclic citrullinated peptide antibody to joint synovium in between osteoarthritis and rheumatoid arthritis. ポスター発表. Iwamoto M, Honne K, Hanai S, Sekiya H, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A., Minota S. 2015 Henry Kunkel Meeting; 2015 Apr 14-16; 国外.
- 46) 悪性リンパ腫における腫瘍浸潤 CD8+T リンパ球の解析. ポスター発表. 岸裕幸, 村橋睦了, 浜名洋, 松本太一, 原周司, 猪狩洋介, 石塚賢治, 高松泰, 田村和夫, 谷憲三朗, 村口篤. 第 7 回血液疾患免疫療法研究会学術集会 ; 2015 Sep 26 ; 国内.
- 47) プライマリー腫瘍浸潤リンパ球を用いた腫瘍特異的 T 細胞受容体同定の試み. ポスター発表. 岸裕幸, 村口篤. 第 74 回日本癌学会学術総会 ; 2015 Oct 8-10 ; 国内.
- 48) 悪性リンパ腫における腫瘍浸潤 CD8+T リンパ球の解析. 口頭発表. 村橋睦了, 岸裕幸, 松本太一, 原周司, 村口篤, 田村和夫, 谷憲三朗. 第 74 回日本癌学会学術総会 ; 2015 Oct 8-10 ; 国内.
- 49) 乳がん細胞における ErbB2 Thr-677 リン酸化による Erb2/ErbB3 ヘテロダイマーのフィードバック阻害機構. ポスター発表. 河崎優希, 崎村綾香, パクチョルミン, 周越, 都丸里佳, 成田香織, 小澤龍彦, 村口篤, 櫻井宏明. 第 74 回日本癌学会学術総会 ; 2015 Oct 8-10 ; 国内.
- 50) Assessment of T cell receptor function. 口頭発表. Kishi H, Hamana H, Shitaoka K, Ozawa T, Muraguchi A. 第 44 回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 51) Reactivity of a monoclonal ACPA obtained from RA patient with numerous citrullinated antigens. ポスター発表. Ozawa T, Tsuda R, Hamana H, Taki H, Kishi H, Muraguchi A. 第 44 回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 52) Development of an NFAT-luciferase reporter system for screening of antigen-specific TCRs using non-T cells. ポスター発表. Hamana H, Kishi H, Shitaoka K, Piao X, Ozawa T, Muraguchi A. 第 44 回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 53) TRAIL receptor-1 IgM antibodies strongly induced apoptosis in cancer cells. 口頭発表. Piao X, Ozawa T, Kishi H, Shitaoka K, Hamana H, Muraguchi A. 第 44 回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 54) Identification of tumor-specific T cell receptors from primary tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) obtained from B16F10 melanoma-bearing mice. ポスター発表. Shitaoka K, Kishi H, Hamana H, Ozawa T, Muraguchi A. 第 44 回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 55) Isolation of monoclonal anti-TRIM21/Ro52 autoantibodies from collagen disease-patients with interstitial lung disease and their reactivity to the peptide library. ポスター発表. Obi M, Ozawa T, Taki H, Kishi H, Muraguchi A. 第 44 回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.

- 56) Identification of T-cell receptors of the CD8⁺ T cells in response to HLA-A24 restricted epitopes from hepatitis B virus. ポスター発表. Tamai T, Kishi H, Shitaoka K, Hamana H, Ozawa T, Muraguchi A. 第44回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 57) HLA-DP5 in complex with cedar pollen peptide including flanking region forms a homophilic assembly for T cell activation. 口頭発表. Kusano S, Ueda S, Kishi H, Hamana H, Muraguchi A, Niino M, Yoshikai Y, Yamada H, Satta Y, Nishimura Y, Shirouzu M, Sasazuki T, Yokoyama S. 第44回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 58) Establishment of West Nile virus-neutralizing human monoclonal antibodies derived from the individuals vaccinated with inactivated Japanese encephalitis virus by ISAAC technology. ポスター発表. Masaki H, Ozawa T, Takasaki T, Kishi H, Muraguchi A. 第44回日本免疫学会学術集会 ; 2015 Nov 18-20 ; 国内.
- 59) ISAAC 法による日本脳炎ワクチン被接種者末梢血単核球からのヒト抗ウエストナイルウイルス中和モノクローナル抗体の樹立 (第2報). 口頭発表. 正木秀幸, 小澤龍彦, 高崎智彦, 青山幾子, 弓指孝博, 小西英二, 岸裕幸, 村口篤. 第22回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 ; 2015 Nov 21 ; 国内.
- 60) ISAAC 法による日本脳炎ワクチン被接種者末梢血単核球からのヒト抗ウエストナイルウイルス中和モノクローナル抗体の樹立. ポスター発表. 正木秀幸, 小澤龍彦, 高崎智彦, 青山幾子, 弓指孝博, 小西英二, 岸裕幸, 村口篤. 第63回日本ウイルス学会学術集会 ; 2015 Nov 22-24 ; 国内.
- 61) ISAAC 法を用いた関節リウマチ患者由来自己抗体の単離とその自己抗体が認識する新しい自己抗原の同定. ポスター発表. 小澤龍彦, 津田玲奈, 浜名洋, 多喜博文, 戸邊一之, 杉山英二, 岩本雅弘, 井村穰二, 岸裕幸, 村口篤. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 ; 2015 Dec 1-4 ; 国内.
- 62) ERK を介した ErbB2 Thr-677 リン酸化による ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体のフィードバック阻害機構. ポスター発表. 河崎優希, 崎村綾香, Chulmin Park, 周越, 都丸里佳, 成田香織, 小澤龍彦, 村口篤, 櫻井宏明. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 ; 2015 Dec 1-4 ; 国内.
- 63) 抗膜タンパク質ウサギ高親和性モノクローナル抗体のエピトープ配列を由来とする新規アフィニティタグの開発. ポスター発表. 矢野智也, 竹田浩之, 小澤龍彦, 村口篤, 澤崎達也. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 ; 2015 Dec 1-4 ; 国内.
- 64) コムギ無細胞系を用いた膜タンパク質間トランス相互作用解析技術. ポスター発表. 栄谷紘一, 竹田浩之, 小澤龍彦, 村口篤, 澤崎達也. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 ; 2015 Dec 1-4 ; 国内.
- 65) *Cis*-interaction of TCRs and antigen/MHC class I complexes on CD8⁺ T cells causes their activation. ポスター発表 Kishi H, Jin A, Hamana H, Shitaoka K, Tajiri K, Kobayashi E, Kusano S, Yokoyama S, Ozawa T, Nagai T, Obata T, Hatakeyama S, Horii M, Hu Y, Zhang F, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology; 2016 Aug 21-26; 国外
- 66) A rapid and efficient single-cell manipulation method using microwell array chip (ISAAC) technology for screening antigen-specific cytokines-secreting T-cells. ポスター発表 Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Lyu F, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology; 2016 Aug 21-26; 国外

- 67) A rapid and easy system for screening of antigen-specific TCRs. ポスター発表 Hamana H, Kishi H, Shitaoka K, Piao X, Ozawa T, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology; 2016 Aug 21-26; 国外
- 68) Identification of tumor-specific T cell receptors of primary tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from B16F10 melanoma-bearing mice at single cell levels. ポスター発表 Shitaoka K, Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology; 2016 Aug 21-26; Melbourne.
- 69) Establishment of West Nile virus-neutralizing human monoclonal antibodies derived from the individuals vaccinated with inactivated Japanese encephalitis virus by ISAAC technology. ポスター発表. Masaki H., Ozawa T., Takasaki T., Aoyama I., Yumisashi T., Konishi E., Kishi H., and Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology; 2016 Aug 21-26; 国外.
- 70) The flanking region of cedar pollen peptide in complex with HLA-DP5 facilitates T-cell activation. ポスター発表. Kusano S., Ueda S., Hamana H., Kishi H., Ohsawa N., Wakiyama M., Muraguchi A., Yoshikai Y., Yamada H., Yamamoto K., Kukimoto-Niino M., Nishimura Y., Shirouzu M., Sasazuki T., and Yokoyama S. 2016 International Congress of Immunology; 2016 Aug 21-26; 国外.
- 71) Development of novel human anti-HLA-monoclonal antibodies for clinical applications using peripheral blood B cells derived from anti-HLA antibody-positive donors. ポスター発表. Takamatsu H, Zaimoku Y, Ozawa T, Kawai S, Tanaka H, Kishi H, Muraguchi A, Nakao S. 58th ASH Annual Meeting & Exposition; 2016 Dec 3-6; 国外.
- 72) B16F10 メラノーマ浸潤リンパ球の単一細胞解析による、がん特異的 T 細胞の同定および TCR 遺伝子治療の試み. 口頭発表. 下岡清美, 浜名洋, 呂福蓮, 小澤龍彦, 早川芳弘, 岸裕幸, 村口篤. 第 20 回日本がん免疫学会総会 ; 2016 Jul 27-29 ; 国内.
- 73) 次世代シーケンサーと single cell sorting を用いた同種抗原反応性 T 細胞の網羅的解析. 口頭発表. 川瀬孝和, 坂本 葵, 樗木 錬, 美山貴彦, 柴田真志, 田中清人, 北浦一孝, 大島久美, 浜名洋, 岸裕幸, 葛島清隆, 佐治博夫, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 第 20 回日本がん免疫学会総会 ; 2016 Jul 27-29 ; 国内
- 74) Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip. 口頭発表 (招待講演) . Ozawa T, Kishi H., and Muraguchi A. 第 68 回日本生物工学会大会国際シンポジウム ; 2016 Sep 28-30 ; 国内.
- 75) 関節リウマチ患者由来モノクローナル抗 CCP 抗体の取得と抗原の解析. 口頭発表 (招待講演) . 岸裕幸, 津田玲奈, 小澤龍彦, 村口篤. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会 ; 2016 Sep 29-30 ; 国内.
- 76) 腫瘍浸潤リンパ球の単一細胞解析による腫瘍特異的 TCR の同定および治療への応用 (担癌マウスモデル). 口頭発表. 岸裕幸, 村口篤. 第 75 回日本癌学会学術総会 ; 2016 Oct 6-8 ; 国内.
- 77) ISAAC 法を用いた抗原特異的 T 細胞検出法の開発. ポスター発表. 小澤龍彦, 岸裕幸, 浜名洋, 田尻和人, 呂福蓮, 村口篤. 第 39 回日本分子生物学会年会 ; 2016 Nov 30- Dec 2 ; 国内.
- 78) ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体における ERK を介した ErbB2 Thr-677 リン酸化によるフィードバック制御. ポスター発表. 河崎優希, 崎村綾香, パクチョルミン, 都丸里佳, 小澤龍彦, 周越, 成田香織, 村口篤, 櫻井宏明. 第 39 回日本分子生物学会年会 ; 2016 Nov 30- Dec 2 ; 国内.

- 79) TCR repertoire of CD4+CD25+CD137+Foxp3+ tumor infiltrating lymphocytes in mice. 口頭発表. Kishi H, Hamana H, Shitaoka K, Lyu F, Ozawa T, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.
- 80) Single-T-cell manipulation method using microwell array chip (T-ISAAC) allows rapid and efficient cloning of antigen-specific TCRs. ポスター発表. Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.
- 81) A rapid and easy system for cDNAs cloning of antigen specific TCRs from single human and mouse T-cells within 4 days. ポスター発表. Hamana H, Kishi H, Shitaoka K, Ozawa T, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.
- 82) T cell receptor obtained from tumor-infiltrating lymphocytes without using tumor-specific antigens exhibits cytotoxicity to tumors in vitro and in vivo. ポスター発表. Shitaoka K, Kishi H, Hamana H, Hayakawa Y, Ozawa T, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.
- 83) TCR repertoire analysis of OVA-specific T-cells infiltrating into OVA-expressing-melanoma during tumor progression. ポスター発表. Lyu F, Shitaoka K, Hamana H, Hayakawa Y, Kishi H, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.
- 84) Epitopes and tissue reactivity of monoclonal anti-TRIM21/Ro52 autoantibodies isolated from collagen disease-patients with interstitial lung disease. ポスター発表. Okumura M, Ozawa T, Taki H, Kishi H, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.
- 85) Peripheral myeloid dendritic cells may predict the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. 口頭発表. Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会学術集会 ; 2016 Dec 5-7 ; 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
特許出願番号の公開を希望しない