

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

## レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用

所属 旭川医科大学 医学部

研究者 若宮 伸隆

### 分担研究者

- (1) 大阪府立公衆衛生研究所病理課 鈴木 定彦
- (2) 帝京大学薬学部 板部 洋之
- (3) 国立感染症研究所エイズ第1グループ 本多 三男
- (4) 扶桑薬品工業(株) 研究開発センター 岸 雄一郎

### 要旨

血管は現代の生活習慣病において最も重要な臓器の一つである。本研究班は血管内皮に焦点をあて、レクチンによる生体防御システムを研究するものである。初年度は新規レクチンCL-P1の遺伝子クローニングとそれに伴う遺伝子解析実験がほぼ完成し、機能解析のための永久発現細胞の樹立、ノックアウトマウス用のマウスゲノム遺伝子解析が進んだ。また機能解析では、マラリアやエイズウイルスに関する感染防御作用も発見された。

### 1. 研究目的

マクロファージ上に変性LDLを取り込む受容体が存在し動脈硬化に重要な役割を担っている可能性を、BrownとGoldsteinが提唱し、その後スカベンジャー受容体遺伝子が児玉らによって発見され血管生物学の研究が始まった。血管は現代の高齢化社会において大きな問題となっている虚血性心疾患、脳血管障害、糖尿病などの生活習慣病において最も重要な臓器である。そして本受容体がこれらの成人病の発症原因と密接に関連していることが明らかになっている。主任研究者である若宮は、レクチン機能によって生体防御に関わっていると考えられているコレクチンの新規遺伝子の発見に成功し、その遺伝子が血管内皮に局在し、古典的スカベンジャー受容体(SR-A)に酷似しているという事実を見いだしている。このような状況下において、本遺伝子のスカベンジャー受容体としての生理的役割を明らかにし、血管炎における役割を解明する事が本研究の大きな目的である。また人口の急速な高齢化とともに、疾病全体に難治の血管炎に付随する血管障害の割合は著しく増加しており、これには血管内皮への微生物感染や微生物の結合がトリガーになっている可能性が示唆されている。我々が発見した血管内皮存在型のスカベンジャー受容体候補遺伝子の研究は、微生物が関与する血管炎の発症要因の解明に欠くべからざる方向性のひとつであり、待った無しに始めなければならない研究課題であると認識している。研究全体の大きな目標としては、個体レベルで(ノックアウト動物などを作成して)本遺伝子の役割を明らかにし、その制御因子や増悪因子を明らかにし、種々の血管病変の発症の機序解明や創薬の応用への道筋をつけることである。

### 2. 3. 研究方法、研究結果

(1) 血管内皮細胞存在型コレクチン遺伝子 CL-P1cDNA のクローニングとゲノム解析

当初我々は、組織からの新規コレクチン蛋白の精製を試み、種々の組織から抽出操作を行ったが、蛋白レベルからは精製は困難であった。ゲノムデータベースが充実してきた1996年に我々は、本遺伝子断片を発見し、その断片から全長遺伝子のクローニングに成功した。予想されるアミノ酸742残基をコードする遺伝子が同定された(図1)。

**The Deduced Amino Acid Sequences of Human and Mouse CL-P1**

Human	MKDDFAEEEE	VQSFYKRFQ	IQEGTQCTKC	KNNWALKFSI	ILLYILCALL	TITVAILGYK	VVEKMDNVTG	GMETSROTYD	80
Mouse	MKDDFAEEEE	VQSFYKRFQ	IQEGTQCTKC	KNNWALKFSI	VLLYILCALL	TITVAILGYK	VVEKMDNVTD	GMETSHQTYD	80
<b>Transmembrane domain</b>									
	DKLTAVESDL	KKLGDQTKK	AISTNSELST	FRSDILDLRQ	QLREITEKTS	KNKDTLEKIQ	ASGDALVDRQ	SQLKETLENN	160
	NKLTAVESDL	KKLGDQAGKK	ALSTNSELST	FRSDILDLRQ	QLQEITEKTS	KNKDTLEKIQ	ANGDSLVRDQ	SQLKETLQNN	160
	SPLITTVNKT	LQAYNGYVTN	LQQDTSVLQG	NLQNMYSYSH	VVIMNLNLLN	LTQVQQRNLI	TNLQRSVDDT	SQAIQRIKND	240
	SPLITTVNKT	LQAYNGYVTN	LQQDTSVLQG	NLQSQMYSQS	VVIMNLNLLN	LTQVQQRNLI	SNLQOSVDDT	SLAIQRIKND	240
	FQNLQQVFLO	AKKTDWLKE	KVQSLQTLAA	NNSALAKANN	DTLEDMSQL	NSFTGQMNENI	TTISQANEQN	LKDLQDLHKD	320
	FQNLQQVFLO	AKKTDWLKE	KVQSLQTLAA	NNSALAKANN	DTLEDMSQL	SSFTGQMDNI	TTISQANEQS	LKDLQDLHKD	320
	AENRTAIFKN	QLEERFQLFE	TDIVNIISNI	SYTAHHLRLL	TSNLENEVRTT	CTDTLTKHTD	DLTSLNNTLA	NIRLDSVSLR	400
	TENRTAVKFS	QLEERFQVFE	TDIVNIISNI	SYTAHHLRLL	TSNLENEVRTT	CTDTLTKHTD	DLTSLNNTLV	NIRLDSISLR	400
	HQODLMRSL	DTEVANLSVI	MEEMKLVDSK	HGQLIKNFTI	LQGPFGPRGP	RGDRGSQGGP	GPTGNKGQKG	ERGEPGPPGP	480
	HQODMMRSL	DTEVANLSV	MEEMKLVDSK	HGQLIKNFTI	LQGPFGPRGP	KGDRGSQGGP	GPTGNKGQKG	ERGEPGPPGP	480
	AGERGPIGPA	GPPGERGGKG	SKGSQGPKGS	RGSPGKPGPQ	GPSGDPGPPG	PPGKEGLPGP	QGPPGFQGLQ	GTVGEFVPG	560
	AGERGTIGFV	GPPGERGSKG	SKGSQGPKGS	RGSPGKPGPQ	GPSGDPGPPG	PPGKDLPGP	QGPPGFQGLQ	GTVGEFVPG	560
<b>Collagen-like domain</b>									
	PRGLPGLPGV	PGMPGKGGP	GPPGSGAVV	PLALQNEPTP	APEDNGCPPH	WRNFTDKCY	FSVEKEIFED	AKLFCEDKSS	640
	PRGLPGLPGV	PGMPGKGGP	GPPGSGAME	PLALQNEPTP	ASEVNGCPPH	WKNFTDKCY	FSLEKEIFED	AKLFCEDKSS	640
	HLVFINTREE	QQWIKKQVVG	RESHWIGLTD	SERENEKWL	DGTSVDYKNW	KAGQPDNWS	GHGPGEDCAG	LIYAGQWDF	720
	HLVFINSREE	QQWIKKHTVG	RESHWIGLTD	SEQESEKWL	DGSPVDYKNW	KAGQPDNWS	GHGPGEDCAG	LIYAGQWDF	720
<b>Carbohydrate recognition domain (CRD)</b>									
	QCEDVNNFIC	EKDRETVLSS	AL*						742
	QCDEINNFIC	EKEREAVPSS	IL*						742

図1 ヒト、マウスのCL-P1 遺伝子から予想されるアミノ酸配列

本遺伝子の疎水性プロットから、本蛋白はタイプ2型に膜タンパク質であることが明らかになった(図2)。

**Hydrophobicity Blot Analysis of CL-P1**

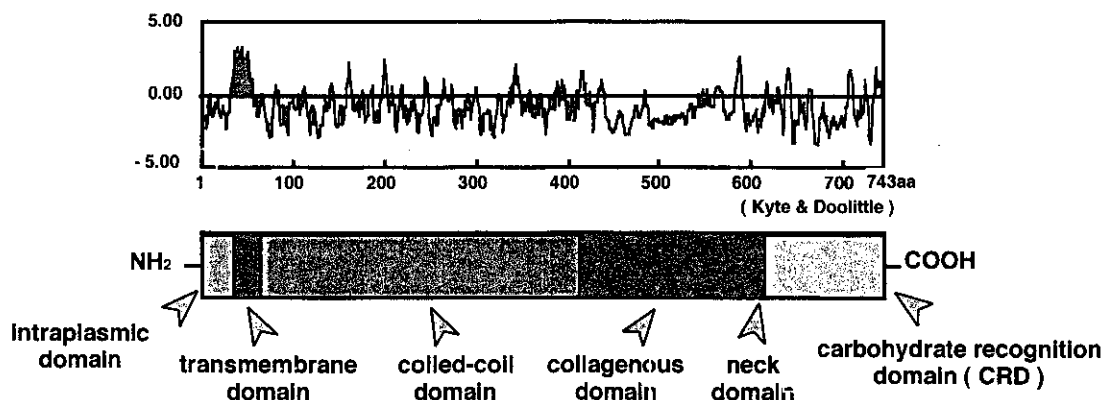


図2 CL-P1 タンパク質の予想される疎水性プロット

さらに従来のコレクチン同様に、本蛋白質もC末端にレクチン構造とその近傍にコラーゲン様構造を有することが明らかになった。次に、マウス及びラット遺伝子のクローニングを、現在データベースが充実している EST database から行った。両者とも欠損部分があったものの、それらの断片を利用して完全長の cDNA をクローニ

ングした。予想されるアミノ酸シーケンスを比較すると両者は非常に高いホモロジーを有することが認められた。現在アフリカツメガエルとゼブラフィッシュの本遺伝子クローニングに取りかかっている。発見された遺伝子断片から、下等動物においても本遺伝子は保存されていることが明らかになっている。

一方マウスゲノム遺伝子は、マウス CL-P1cDNA のエクソンの一部を用いて、マウスゲノム遺伝子の BAC クローンをスクリーニングし、目的の遺伝子断片を含むゲノム BAC クローンを得た。本クローンをシーケンスして、エクソン、イントロン構造を明らかにした。現在 ATG を含む第 3 エクソン部分を用いた、コントロールベクター欠損させるターゲティングベクターの作成途中である。

CL-P1 抗体においては、従来若宮研究班が行ってきた、大腸菌の部分コレクチン発現システムの系を用いて行った。発現精製された CL-P1CRD 蛋白は、水溶性でウサギ、ニワトリに過免疫し、ポリクローナル抗体を得た。本抗体は今まで明らかになっている全てのコレクチン蛋白に交差性がなく、有望な抗体であることがわかった。本抗体を用いて、CL-P1 蛋白発現組織の検索を、マウスの種々の切片を用いて免疫組織染色を行った。何れの組織においても、血管内皮に強い染色が得られた。従来スカベンジャー受容体は、単球に存在されていることが報告されているが、本蛋白は血管内皮に主に存在していた。図 3 心臓垂直切断切片の染色像をしめす、右の H-E 染色図と比較すれば、血管内皮細胞にのみに陽性染色が認められた。

## Tissue Localization of CL-P1

### Immunohistochemistry

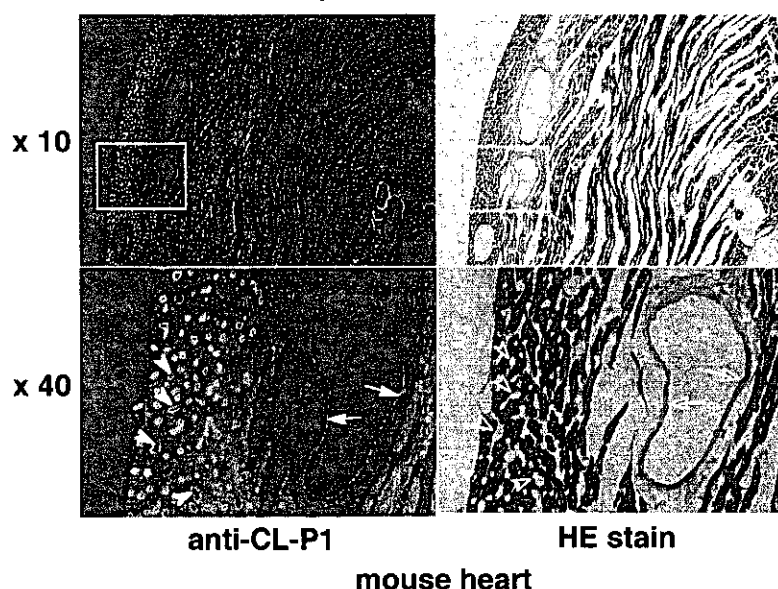


図3 マウス心臓におけるニワトリ CL-P1 抗体を用いた免疫組織染色

### (2) ヒト CL-P1 遺伝子永久発現細胞株の樹立

完全長ヒト CL-P1cDNA を発現ベクター-pcDNA3.1/Myc-His(+)に組み込み、チャイニーズハムスター細胞にトランスフェクションし、Neomycin で選択して、永久発現細胞株をフローサイトメトリーを用いて、single cell sorting により、樹立した。CL-P1 遺伝子発現株は、膜蛍光染色法で CL-P1 のレクチン部分に対する抗

体やC末に存在するはずの Myc-tag 抗体の両者によって膜蛍光が認められた (図4)。

## **Establishment of CL-P1 Cell Line**

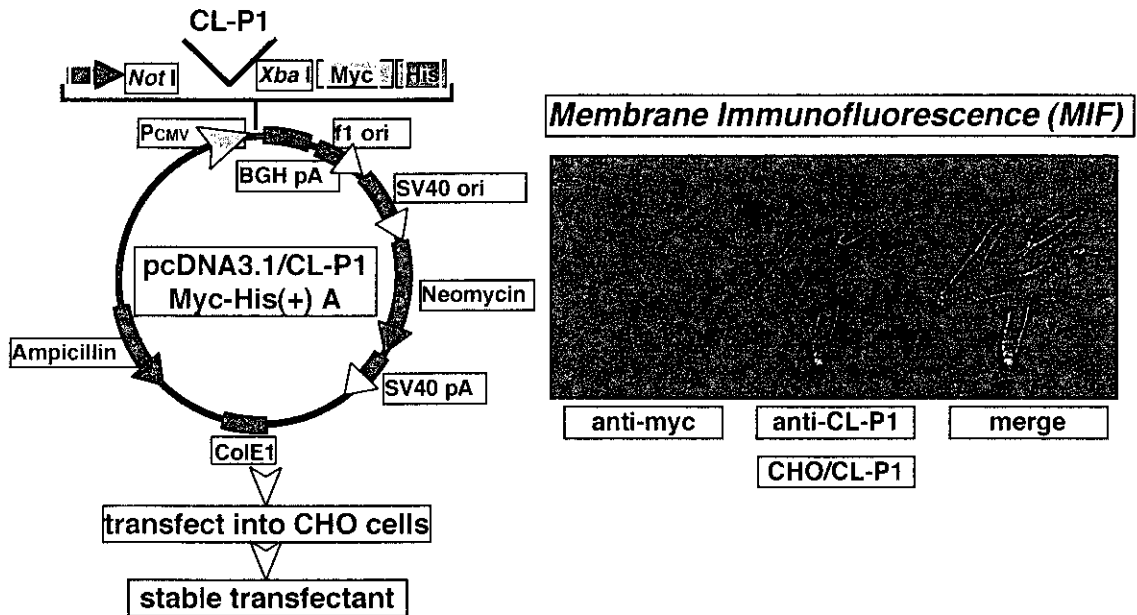


図4 CL-P1 遺伝子永久発現細胞株の樹立とその蛋白発現

### (3) 血管内異物である、変性 LDL (酸化 LDL) の検出系の作成

モノクローナル抗体 DLH3 を用いた測定系により、健康ヒト血漿中に微量の酸化 LDL (約 0.1ng/ $\mu$ g LDL protein) が存在することを明らかにした。さらに、急性心筋梗塞患者での血漿酸化 LDL レベルは対照の約 5 倍上昇していたことから、血漿酸化 LDL レベルは動脈硬化症に伴って変動するものと考えられた。ヒト動脈硬化病変部では、マクロファージ由来の泡沫細胞内が DLH3 および抗 apoB 抗体で免疫組織化学二重染色され、酸化 LDL が泡沫細胞に限局性に存在していることが示された。マクロファージは取り込んだ酸化 LDL を細胞内で分解することが知られている。実際、J774 マクロファージに取り込んだ酸化 LDL の細胞内残存量は速やかに減少していったが、その約 20% は 24 時間後でも消失せずに蓄積した。マクロファージ内の酸化 LDL はリソゾーム画分に回収され、部分分解物としてリソゾーム中に蓄積していることを確かめた。また、ヒト頸動脈病変部から抽出した LDL 画分中の酸化 LDL も J774 マクロファージに見られたのと類似した部分分解物になっていることが分かった (図 5)。

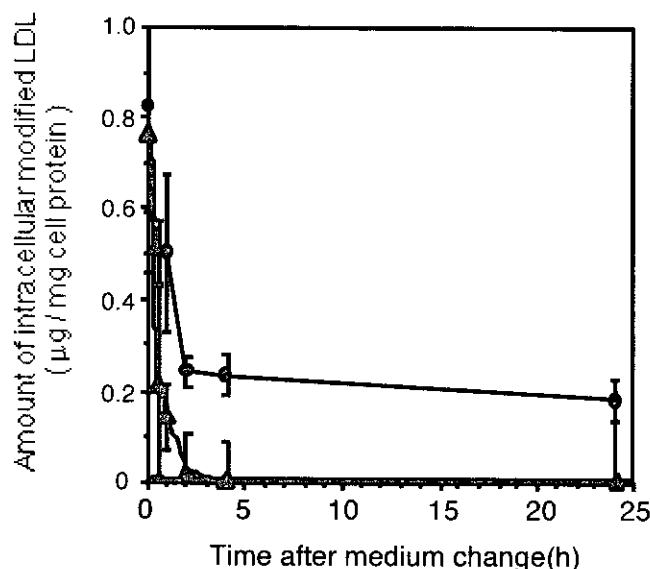


図5 J774 マクロファージ内での酸化 LDL 代謝と細胞内蓄積

(4) 細胞内寄生体であるマラリア原虫におけるコレクチンの感染阻害作用についての解析

マラリアは蚊によって媒介される疾患で主に熱帯、亜熱帯地方で蔓延している。WHOによると全人類の半数以上がマラリア汚染地域に住んでおり、現在でもなお全世界で年間1億人以上の患者と100万人以上の死者を出している。マラリアを引き起こす病原体である原虫は蚊によって媒介される。この原虫は蚊の体内で有性生殖、ヒトの体内で無性生殖を行っている。マラリアに感染している蚊の中腸にはオーシストが形成され、そこから出てきたスポロゾイトが、唾液腺に集まって、蚊がヒトを刺した時に侵入してくる。これはすぐに赤血球に入るのではなく、まず肝細胞へ侵入して分裂体を形成する。分裂体からは多数のメロゾイトが放出され、これが赤血球に侵入し無性生殖をくり返す。一方、動物血清レクチンであるマンナン結合レクチン (MBL) とマラリア感染あるいはマラリア重症化の関係については数本の報告があるのみである。それらのうち Migot-Nabias ら (Genes Immun 2000 Oct;1(7):435-41) は MBL 遺伝子の変異とマラリア感染の間には何の関係もないものとしているが、Luty らの報告 (J Infect Dis 1998 Oct;178(4):1221-4) では後天免疫の発達していない子供においては重篤となった者において MBL 遺伝子に変異があり血中濃度が低い傾向があることを報告している。本研究では後者のデータに着目して、MBL の熱帯熱マラリア原虫に対する感染防御効果について検討した。今年度はその第一段階として熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入に対するコレクチンの阻害効果に関する実験を行った。フィコールグラジエント法により分画し感染赤血球およびマラリア原虫に飛んだ画分をスライドガラス上に固定し、MBL で染色した。その結果を図6に示した。カルシウムイオン免疫染色法を用いて熱帯熱マラリア原虫に対する MBL の結合活性について検討した実験では MBL がメロゾイトだけでなく、輪状体や分裂体にも結合しうることが観察された。また、これらの結合がマンノースあるいは EDTA の存在下では著しく阻害されることが観察されることからこの結合は MBL の糖鎖認識領域を介したカルシウムイオン依存的なものであるものと考えられた (図6)。

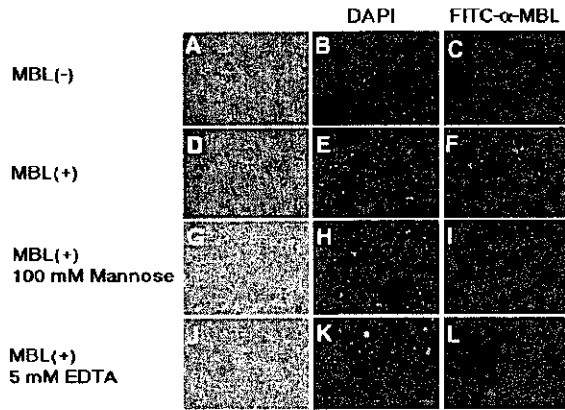
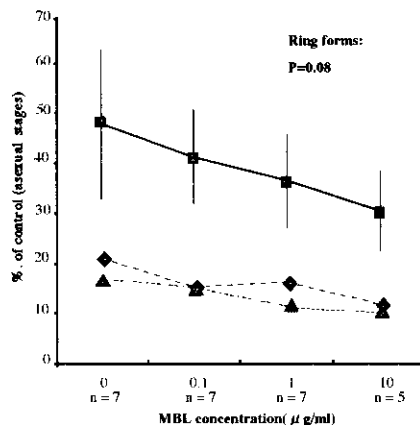


図2 熱帯熱マラリア原虫のMBL染色  
 フィコールラジエント法により分離し感染赤血球およびマラリア原虫に飛んだ画分を得た。このサンプルをスライドグラス上に塗布し、よく乾燥させた後50%エタノールにて固定を行いMBLを反応させた。また、マンノース、EDTA存在下にも同様の実験を行った。A, D, G, J: 位相差顕微鏡像、B, E, H, K: DAPI染色像、C, F, I, L: MBL染色像、C: MBL非存在、F: MBL染色、I: マンノースによる阻害、L: EDTAによる阻害

図6 コレクチンによるマラリア原虫結合阻止実験

次に原虫発育阻止試験を、上記のマラリアの系で行った(図7)。通常の培養液にMBLを0.1、1、10 $\mu$ g/mlになるように添加した後48時間培養を行い、培養液中の原虫の数を数えた。MBL10 $\mu$ g/mlと高濃度ではあるがメロゾイトが赤血球に侵入した直後のステージである輪上体の割合がMBL非存在下に培養したものに比べて有為に低下していた。このことはMBLが熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入に対する阻害効果を有している可能性を示唆するものである。マラリア原虫の赤血球侵入に対する阻害に高濃度のMBLが必要な理由の一つの可能性として赤血球の老化によるMBLのリガンドの赤血球表面への発現(糖鎖のトリミングによるマンノースの露出等)され、この老化赤血球がMBLの効果을阻害していることも考えられた。



熱帯熱マラリア原虫発育阻止試験  
 通常の培養液にMBLを0.1、1、10 $\mu$ g/mlになるように添加した後48時間培養を行った。それぞれのステージのマラリア原虫の数を測定してプロットした。■: 輪上体、◆: 栄養体、▲: 分裂体

図7 熱帯熱マラリア原虫発育阻止試験

#### (5) 細胞内寄生体であるエイズウイルスのコレクチンによる増殖阻止作用の解析

MBPの抗HIV活性をin vitroの系で検討するために、実験株のHIV-NDK株(サブタイプB)及び臨床分

分離株のサブタイプ E 型 HIV (仮称 LP 65) を PHA で blast 化したヒト PBMC 及び T cell 系の株化細胞 M8166 に感染させ、洗浄後、1~30 $\mu$ g/ml の濃度で native 及び recombinant MBP (rMBP) を添加し、ヒト血清添加培地で培養した。培養後のウイルス量の変化の指標として培養上清中の HIV p24 抗原量を ELISA にて測定し、MBP 非添加群と比較検討した。HIV-NDK 感染 M8166 細胞に関しては、rMBP 濃度が 10 及び 30  $\mu$ g/mL では、培養上清中の p24 抗原量が、培養後、速やかに rMBP 非添加群のおよそ 50%にまで抑制された (図 8 A)。一方、native MBP 群においてもウイルス量の抑制が認められたが、その効果は rMBP よりは低いものであった。モル数の違いが理由の 1 つであると考えられる。サブタイプ E 型臨床分離株 (LP65) についても rMBP 添加による抗ウイルス効果が認められたが、サブタイプ間での感染抑制効果の差については明確な結果は得られなかった (図 8 B)。また、この濃度では細胞に対する顕著な増殖抑制や細胞毒性は認められなかった。以上より、rMBP の抗 HIV 活性が示唆された。

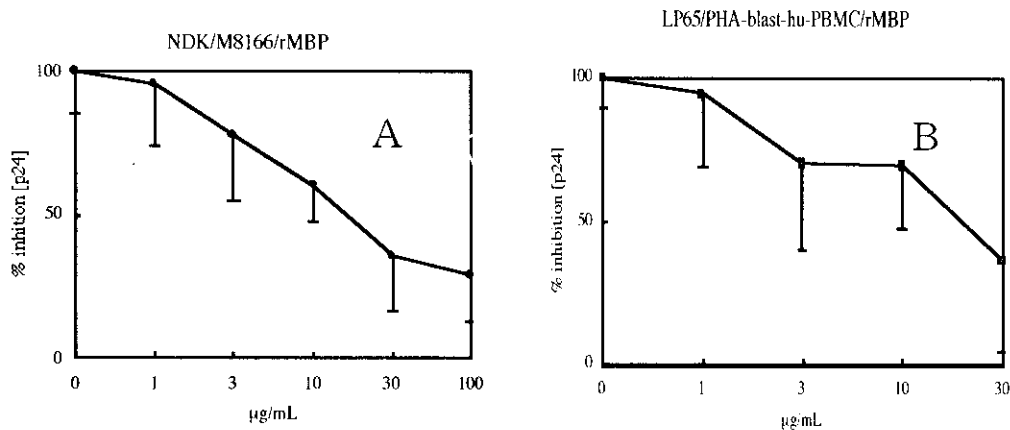


図 8. A,B. コレクチンによるエイズウイルス増殖阻止作用

#### 4. 考察

コレクチンの発見は、初めにウシ血清からコングルチニンが約100年前に発見され、その後血清MBLの発見、肺胞分泌液中に存在するSP-A, SP-Dの発見が続ぎ、CL-43が1993年に最後に同定された。これらの全アミノ酸配列、塩基配列の比較から、古典的なコレクチンはMBL群, SP-A群, SP-D群の3つのコレクチングループに分類されることが明らかになった。その後新しいコレクチンは、主任研究員である若宮らは、ESTデータベースのスクリーニングから (その当時あまりデータベース上に情報は少なかったが) 新規コレクチンを発見した。CL-P1cDNA は742個のアミノ酸をコードする約2.2kbの塩基を有する遺伝子であり、予想されるアミノ酸配列より、この新規コレクチンをコレクチンのファミリーであると考えた。CL-P1は、cDNAから予想されるアミノ酸配列より、細胞内領域、膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域、ネック領域、糖認識領域(CRD)という構造をとることが推測された。これらの構造は、コラーゲンを有するスカベンジャー受容体 (SR-Aタイプ) と構造上類似性がみとめられた。特にSR-AIと共通するのは、N末端から、短い細胞内領域、ロイシンジッパー構造を含む膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域とC末端に続く球状蛋白質という全体の配列で



ある。CL-P1では、C末端の球状蛋白質であるスカベンジャー受容体システインリッチ領域 (SR-CR=scavenger receptor cysteine rich domain) が、Cレクチンに置き換わっている。中央部のコイルドコイル領域、コラーゲン様領域とにより3量体を形成し、タイプII型の膜一回貫通型の膜蛋白質として存在していると予想された。

次にCL-P1遺伝子のどの部分がこれらの異物に結合するために重要かを検討するためには、その機能ドメインの欠失株を樹立し、それらにおいて結合を検討する事が必要である。コラーゲン様領域欠失株やレクチンドメインの欠損株での結合実験により、コラーゲン様領域の前半のポリチャージ領域が微生物の結合に重要なのか、肝レクチンのようにレクチンドメインの糖結合領域で結合しているのか決定することが、次の課題である。

またCL-P1におきてヒトと動物のアミノ酸構造を比較すると、C末部分のレクチンドメインのホモロジーが低い事実が明らかになり、本レクチンにおいても、若宮らが行ってきた方法に準拠して、抗体作成を行った。抗体の解析としては、組織中や細胞に存在する内因性のCL-P1が検出可能であり、さらにSDS-PAGEを経て行われるウェスタンブロットの反応系においても、非常に良好なデータを示した。本抗体は、CL-P1研究の非常に有用なスタンダードになりうる事が明らかになった。現在すでに諸外国の研究者から、本抗体を用いた共同研究の連絡がきている事実でも分かるように国際的にも抗体は非常に高く評価されている。現時点での、本抗体の優性は疑いようがないが、単クローン抗体はさらに高い有用性が考えられ、現在作成を行っているが、CL-P1の生化学的精製が難しく、新たな免疫材料の制作を始めている。

一方コレクチンの生物学的な検討では、細胞内寄生体であるマラリアとエイズウイルスに焦点を当てて、研究を行っている。両者とも、コレクチンによるin vitroのアッセイ系では有意の感染防御能が認められた。両者とも、現段階では感染を防御する中和抗体のようなイメージをいだかせる結果である。実際エイズウイルスでは、従来中和抗体がほとんど無効と考えられる臨床分離株への効果が認められたことから、治療薬としての期待がもてる可能性がでてきている。しかし結核菌に関しては、施設や実験が複雑で、まだ準備段階のため研究成果としては、上がっていない。また血管内腔での異物である変性コレステロールである酸化LDL (悪玉コレステロール) に対する実験系では、そのin vitroにおける作成と測定系が確立し、準備段階は整った。特に単クローン抗体とラベルした酸化LDLは、実際の血管内皮細胞における結合や代謝系に運ばれることを観察している。

## 5. まとめ

血管生物学は、循環器領域で近年もっともホットな領域である。特に血管内皮細胞は動脈硬化のみならず、血圧調整や癌細胞の転移、炎症を中心とする免疫系などを含めた生体防御に重要な役割をすることが予想されている。若宮主任研究員らは、新規コレクチン遺伝子 (collectin = collagen+ lectin, コラーゲンを有するレクチン) の探索過程で、スカベンジャー受容体に酷似した構造を有する新規膜型コレクチン遺伝子 CL-P1 のクローニングに成功した。それらを中心にして血管におけるレクチンによる生体防御を多方面からの探索を初年度は行った。当初の予定どおり遺伝子研究を中心とする研究は順調に進み、生物学的検討の準備段階は整ったと考える。以下に成果のまとめをあげる。

- (1) 血管内皮細胞存在型コレクチン遺伝子 CL-P1 のクローニングと遺伝子解析
- (2) マウスにおける遺伝子ノックアウトマウス作成の準備
- (3) ヒト CL-P1 遺伝子永久発現細胞株の樹立とその解析

(4) コレクチンの抗微生物作用の検討

(5) 血管内異物である酸化 LDL の in vitro における作成とその測定系の確立

## 6. 研究発表

(1) Tsutsumi, A., Sasaki, K., Wakamiya, N., Ichikawa, K., Atsumi, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., N., Koike, T., Sumida, T. : Mannose binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogrens syndrome *Genes Immun* 2: 99-104, 2001.

(2) Vorup-Jensen, T., Sorensen, E.S., Jensen, U.B., Schwaeble, W., Kawasaki, T., Ma Y, Uemura K, Wakamiya, N., Jensen, T.G., Takahashi, K., Ezekowitz, A.B., Thiel, S., Jensenius, J.C.: Recombinant expression of human mannan-binding lectin. *Int. J. Immunopharmacol.* 1(4):677-87, 2001.

(3) Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Wakamiya, N.: The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(47): 44222-44228, 2001.

(4) Hokozaki, Y., Yoshida, M., Sekiyama, K., Seike, E., Iwamoto, J., Mitani, K., Masafumi, M., Morizone, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N.: Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. *Liver* 22(1): 29-34, 2002.

(5) Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otuska, M., Komatsu, R., Matsuo, T., Itabe, H., Takano, T., Tsukamoto, Y., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J. and Becker, A. E.: Oxidized low density lipoprotein relates to plaque destabilization in human coronary atherosclerotic lesions. *Circulation*, 103, 1955-1960. 2001.

(6) Mori, M., Itabe, H., Higashi, Y., Fujimoto, Y., Shiomi, M., Yoshizumi, M., Ouchi, Y. and Takano, T.: Foam cells containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hyperlipidemic serum. *J. Lipid Res.* 42, 1771-1781. 2001.

(7) Chujoh Y, Matsuo K, Yoshizaki H, Nakasatomi T, Someya K, Okamoto Y, Naganawa S, Haga S, Yoshikura H, Yamazaki A, Yamazaki S, Honda M. Cross-clade neutralizing antibody production against human immunodeficiency virus type 1 clade E and B' strains by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG-based candidate vaccine. *Vaccine*. 20(5-6):797-804. 2001.

(8) Hiroi T, Goto H, Someya K, Yanagita M, Honda M, Yamanaka N, Kiyono H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1- and Th2-deficient conditions. *J Immunol.* 167(10):5862-7. 2001.

(9) Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, Shimamura T. effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Res.* 53(1): 19-34. 2002.

(10) Ryu T, Ikeda M, Okazaki Y, Tokuda H, Yoshino N, Honda M, Kimura S, Miura Y. Myelodysplasia associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Intern Med.* 40(8): 795-801. 2001.

(11) Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Mulundu G, Deng X, Ichiyama K, Mitarai S, Honda M, Yamamoto N, Ito M. Emergence of new HIV-1 subtypes other than Subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 17(8): 759-63. 2001.

(12) Hara T, Yoshino N, Takayama N, Minamitani M, Naganawa S, Ohkubo H, Takizawa M, Izumi Y, Kantake M, Suzuki S, Takano M, Kita T, Totani R, Nagai Y, Honda M, Nakasone T. Presence of multiple HIV type 1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 17(6): 569-75. 2001.

(13) Ruhul, A., Suzuki, Y., Takatorige, T., Tatara, K., Shirakura, R. Comparison of self-

ligation mediated polymerase chain reaction and mixed-linker polymerase chain reaction in molecular epidemiology of tuberculosis. *Kekkaku* 76: 9-18, 2001

(14) Suzuki, Y., Yoda, T., Ruhul, A., Sugiura, W. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *J. Biol. Chem.* 276:9059-65, 2001

(15) Nakamura, T., Iwanari, H., Suzuki, Y. Expression of glycosylated human interferon-beta in high levels in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. *J. Biol. Macromolec.* 1:12-18, 2001

(16) Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsuhisa A, Toyoshima K, Seya T. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell-wall. *J. Biol. Chem.* 276:23456-23463, 2001

(17) Yoda T., Terano Y., Suzuki Y., Yamazaki K., Oishi I., Kuzuguchi T., Kawamoto H., Utagawa E., Takino K., Oda H., Shibata T. Characterization of Norwalk virus GI specific monoclonal antibodies generated against *Escherichia coli* expressed capsid protein and reactivity of two broadly reactive monoclonal antibodies generated against GII capsid toward GI recombinant fragments. *BMC Microbiol.* 1: 24, 2001

(18) 若宮伸隆、鈴木定彦：新規血管内皮細胞型スカベンジャー受容体 CL-P1。生化学 73(3):205-208, 2001.

(19) 鈴木定彦、若宮伸隆：感染防御とコレクチンファミリー。Annual Review 免疫 2002 217-225, 2002.

(20) 大谷克城、若宮伸隆：Collectin family. *Surgery Frontier* 8(3): 301-305, 2001.

## 7. 知的所有権の取得状況

特になし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野  
創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社