

## 可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究

所 属 国立精神神経センター神経研究所  
モデル動物開発部  
研究者 田口 文広

### 分担研究者

(1)群馬大学医学部	星野 洪郎
(2)九州大学大学院医学研究院	柳 雄介
(3) (株) イムノヘルスジャパン	森山 雅美
(4)大鵬薬品工業 (株)	福島 正和

### 要 旨

ワクチンなどでの抗ウイルス戦略では、防御が難しいウイルス感染症に対して、可溶性ウイルス受容体や合成受容体ペプチドを用いた、新たな抗ウイルス剤の開発のための基礎的研究をおこなった。可溶性マウス肝炎ウイルス (MHV) 受容体 (soMHVR) は、培養細胞レベルで高い MHV 中和活性を示し、その活性部位は N ドメインに存在することが明らかにされた。また、soMHVR はマウスの MHV 肝炎に対して弱いながら抑制効果を示した。ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 粒子糖蛋白及び感受性細胞表面糖蛋白の糖鎖の感染への関与を検討し、HTLV-I 感染における糖鎖の重要性が明らかとなった。また、HTLV-I 感染者には、ウイルスの吸着後侵入を阻害する抗体があることも明らかにした。麻疹ウイルス受容体ヒト SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) の受容体機能部位は V 領域、特に 60 番目のアミノ酸の近傍に存在すること、ウイルスのエンベロープ蛋白 H が SLAM に結合すると、SLAM 分子の down-regulation が起こることが明らかになった。

### 1. 研究目的

一般に細菌感染症では、抗生物質等が有効な治療薬として利用されているが、ウイルス感染症では、数少ない抗ウイルス薬を除くと殆ど有効な治療薬は無い。現在、ワクチンが唯一の有効なウイルス防御方法であるが、感染ウイルスがワクチン株と抗原的に異なったり、ヒト後天性免疫不全ウイルス (HIV) のように頻繁に変異が起こる場合には、その効果は期待出来ない。また、ウイルス感染後の個体にワクチンを治療薬として用いることは不可能である。一方、可溶性ウイルス受容体或いは合成受容体ペプチドは、ウイルスの抗原性の違いに拘わらずウイルスを中和するため、様々なウイルス感染症における有望な治療薬と考えられる。本研究の目的は、可溶性ウイルス受容体等によるウイルス感染防御方法を検討し、治療薬として開発するための基盤を確立することである。そのための基礎的な研究として、ウイルス-受容体の相互作用に関する解析を行い、感染防御に重要な受容体領域を同定する必要がある。本研究では、ヒトのウイルス感染症のモデルとして、実験動物レベルで解析可能な MHV によるマウス肝炎の系を用いて、soMHVR による感染防御方法を確立したい。また、可溶性ウイルス受容体と他の抗ウイルス剤の併用によるより効果的なウイルス感染防御方法の確立を目指す。一方、HTLV-I、麻疹ウイルス等では、受容体とウイルス蛋白の結合の分子生物学的な解析から、受容体分子上の機能発現に必須な領域の同定が研究目的である。

### 2. 研究方法

#### 1) MHV を用いたモデル実験：

構造の異なる組み換え soMHVR は、組み換えバキュロウイルスにより、昆虫培養細胞を用いて発現し、histidine タグを利用して精製した。精製 soMHVR のウイルス結合活性は、96 穴に吸着した soMHVR と MHV の結合を抗 MHV 抗体を用いて調べた。ウイルス中和活性は DBT 細胞を用いた 50% プラーク減少法で行った。soMHVR のウイルス活性化能の測定は、MHV 感染 DBT 細胞による MHVR

非発現 BHK 細胞の細胞融合活性で行った。マウス生体内へは、2 $\mu$ M soMHVR 50 $\mu$ l を4週令雄 ICR マウスに尾静脈から投与し、血中の soMHVR 濃度の経時的変化は Western blot により決定した。soMHVR の肝炎防御効果は強毒株 MHV-2 を用いて調べた。マウスインターフェロンは、東レ株式会社で製造された組み換えマウスインターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (3 $\times$ 10<sup>6</sup> IU/ml)を用いた。IFN- $\beta$  の抗 MHV 活性は MHV-2 を用いて測定した。

## 2) HTLV-I とその受容体結合に関する研究:

HTLV-I の感染における糖鎖の関与を明らかにする目的で各種糖鎖合成阻害剤のウイルス感染性への影響、感受性細胞への影響について検討した。細胞はネコ腎由来の 8C 細胞、HTLV-I 感染 8C 細胞、(8C/2M 細胞のクローン C77)、ヒト T 細胞株 Molt-4、HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 C91/PL を用いた。糖鎖合成阻害剤として、tunicamycin (TNM, 0.2  $\mu$ g/ml), 1-deoxynojirimycin (DNJ, 200  $\mu$ g/ml), N-butyl-deoxynojirimycin (B-DNJ, 20  $\mu$ g/ml), castanospermine (CST, 20  $\mu$ g/ml)および swainsonine (SWN, 10  $\mu$ g/ml)を用いた。HTLV-I 抗原の定量は、培養上清中の HTLV-I の gag 抗原 p19 の量を ELISA で測定した。合胞体形成は Molt-4 細胞と C91/PL 細胞を混合培養により測定した。HTLV-I pseudotype assay は HTLV-I 産生細胞に水泡性口内炎ウイルス (VSV) を感染させ、抗 VSV 抗体に中和されない力価を HTLV-I pseudotype による感染価とした。HTLV-I の Molt-4 細胞への結合は Western blotting と ELISA による p19 の測定で行った。HTLV-I DNA の合成を検出は pX 領域のプライマーを用いた PCR で行った。細胞表面の HTLV-I を検出には flow cytometry を用いた。HTLV-I の細胞侵入を阻害する抗体の検出は、無症候性キャリアー (AC)、ATL 患者、HAM 患者の熱非働化血清を用いた。HTLV-I の感染性の定量は、PCR 法、合胞体性 plaque 形成法、HTLV-I pseudotype assay で行った。HTLV-I 蛋白に対する抗体価は、HTLV-I 感染細胞のスミアを用い、間接蛍光抗体法で測定した。ヒト血清の HTLV-I 感染・侵入に対する影響は、通常の中和抗体価測定法とウイルスを 0 $^{\circ}$ C で吸着させ、吸着したウイルスの細胞への侵入を阻害する血清の活性を測定する侵入阻害活性測定法で行った。

## 3) 麻疹ウイルス受容体に関する研究:

ヒトとマウスの SLAM のキメラ分子、あるいは部位特異的突然変異を導入した SLAM 分子をコードするプラスミドを作成し、transfection により CHO(Chinese hamster ovary)細胞に発現させた。細胞上の発現はヒトあるいはマウスの SLAM に特異的なモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで確認した。一部の分子についてはインフルエンザウイルス HA 蛋白の tag で標識し、tag に対する抗体で発現の確認を行なった。可溶性の SLAM あるいはそのキメラ分子は、精製を容易にするために SLAM の細胞外ドメインと免疫グロブリン Fc 領域の融合蛋白として作製した。可溶性分子の産生は Western blot により確認した。レセプター機能は、麻疹ウイルスエンベロップ蛋白を持つ VSV のシュードタイプを用いた細胞侵入の測定およびウイルス感染による細胞融合の出現により行なった。可溶性 SLAM と麻疹ウイルスエンベロップ蛋白の結合は、エンベロップ蛋白を発現した 293T 細胞と可溶性 SLAM を混合し、よく洗浄した後、SLAM に対する抗体でフローサイトメトリーを行なうことにより測定した。SLAM の down-regulation は、麻疹ウイルス感染細胞、麻疹ウイルスエンベロップ蛋白をコードするプラスミドを transfect した細胞、麻疹ウイルスエンベロップ蛋白を発現する CHO 細胞と混合培養した細胞を SLAM に対する抗体でフローサイトメトリーを行なうことにより測定した。

## 3. 研究成果及び考察

### 1) MHV を用いたモデル実験:

本研究では、幾つかの splice variants の中で2個の ectodomain (N と A2) からなる MHVR [soR1(1,4)]を用いて解析を始めた。組み換えバキュロウイルスを用いて発現した soR1(1,4)を濃縮、精製し、分子量約 44,000 の精製蛋白を得た。精製 soR1(1,4)のウイルス中和活性の 50%中和価は約 1 nM を示した。受容体活性部位を同定するため、N 単ドメインからなる soMHVR [soR1(1)]を作成し、そのウイルス結合活性、中和活性、受容体活性を示すウイルス融合活性の活性化について、soR1(1,4)と比較した。その結果、両者間には、いずれの活性にも有為な差は認められなかった。今

回得られた実験結果に加え、N ドメインの糖鎖付加は受容体活性に影響しないという米国からの報告を考えあわせると、N ドメインの合成ペプチドが受容体活性及び中和活性を示す可能性が充分考えられる。今後、更に N ドメインにおける中和活性部位を限定し、合成ペプチドによる抗ウイルス活性を検討してゆきたい。soR1(1,4) のマウス体内における抗 MHV 活性を検討した。尾静脈から 2 $\mu$ M soR1(1,4) を 50 $\mu$ l 投与した場合、その半減期は約 15 分であった。soR1(1,4) 非投与群では MHV-2 接種後 2~6 日で全てのマウスが死亡したが、soR1(1,4) を MHV-2 感染前 3 時間、感染後 12、36、60 時間に投与した群では生残マウスが認められ、弱いながらもマウス体内でも抗 MHV 活性が認められた。soR1(1,4) の低い抗 MHV 活性は、体内での急速な消失によると考えられるので、生体内での半減期を長くするために、免疫グロブリンとの融合蛋白 soR1(1,4)-Fc を作成し、生体内で抗 MHV 活性を検討する予定である。また、soMHVR を投与するのではなくマウス自身の蛋白として発現することが、soMHVR の半減期を延長させる強い可能性が考えられるので、soMHVR を発現するトランスジェニックマウスを用いた解析も有用と考え、現在進行中である。

IFN- $\beta$  の抗 MHV-2 抑制効果に及ぼす投与経路の影響を知る目的で、MHV-2 感染マウスに感染前 1 日から、150,000 ~1,500 IU の IFN- $\beta$  を 1 日 1 回感染後 8 日間、静脈内、皮下、筋肉内投与し、各々のマウスの生死を調べた。いずれの濃度の IFN- $\beta$  を投与した場合も、投与経路による MHV-2 抑制効果に大きな差異は認められなかった。MHV-2 感染後 150000 IU 投与マウスの肝臓を感染 2 日及び 5 日後に採取して、ウイルス価を測定した。感染 2 日後では、どの経路から IFN- $\beta$  を投与した場合にも、対照群と比較して極めて低いウイルス価を示した。即ち、感染初期ではウイルス増殖の強い抑制が認められた。しかしながら、感染後 5 日ではウイルス価の上昇し、IFN- $\beta$  単独投与では、長期間に渡るウイルス増殖抑制の継続は困難であることが示唆された。今後、soMHVR との併用により、MHV 感染から完全に回復する治療方法を検討したい。

## 2) HTLV-I とその受容体結合に関する研究:

(1) 糖鎖合成阻害剤および neuraminidase (NA) の HTLV-I による合胞体形成への影響: HTLV-I 産生 C91/PL 細胞と Molt-4 細胞の混合培養による合胞体形成は、C91/PL を糖鎖合成阻害剤 (TNM、B-DNJ、DNJ) で処理すると合胞体形成の阻害が見られた。一方、Molt-4 を阻害剤で処理した場合には、抑制は認められなかった。NA 処理では、C91/PL あるいは Molt-4 のどちらを処理しても合胞体形成の増加が見られた。

(2) 糖鎖合成阻害剤の HTLV-I 産生への影響: HTLV-I 産生細胞 C91/PL および C77 をいずれの糖鎖合成阻害剤で処理しても、HTLV-I の産生に影響を与えなかった。

(3) 糖鎖合成阻害剤の HTLV-I pseudotype 形成への影響: HTLV-I 産生 C77 細胞を TNM、B-DNJ 又は DNJ で処理後、VSV を感染させ、形成された HTLV-I pseudotype の定量をすると、そのターゲットが低くなった。Pseudotype でない VSV 自体の産生は、TNM 処理で低下した。

(4) HTLV-I 感染標的細胞への糖鎖合成阻害剤処理による影響: 8C 細胞を阻害剤で処理後、HTLV-I pseudotype を感染させたが、その感染にほとんど影響を与えなかった。NA 処理は感染を促進した。NA 処理により pseudotype の感染が促進されたので、感染のどの段階で促進効果が認められるか検討した。Pseudotype の感染前に細胞を NA で処理すると感染効率は下ったが、吸着後に処理した場合には影響がなかった。

HTLV-I の感染における糖鎖の役割は、cell free HTLV-I を用いて定量的に解析することが困難なため、十分な解析がなされていなかった。我々は、cell free HTLV-I の感染系を用いて解析した結果、ウイルス粒子の糖鎖はその感染性に重要であるが、標的細胞の糖鎖は、HTLV-I 感染には余り重要でないことが明らかとなった。Cell free の HIV-1 の感染についての報告と比較すると、TNM、B-DNJ および DNJ は、HTLV-I および HIV-1 のいずれの感染を阻害する。CST および SWN は、HIV-1 の感染を阻害すると報告されているが、HTLV-I では影響がなかった。NA 処理はいずれのウイルスの感染性も亢進させた。HIV-1 の感染性には、ウイルス粒子上に成熟した糖鎖が必要であるが、HTLV-I ではある程度未成熟なものでもよいと考えられる。またいずれのウイルスでも末端のシアル酸が感染性を負に制御していることが明らかになった。

(5) 抗 HTLV-I 抗体陽性血清は、すべて通常の中和抗体価測定法で HTLV-I への中和活性が認められた。また、侵入阻害活性は、PCR 法、合胞体性 plaque 形成法、VSV pseudotype assay のいずれの方法で判定しても、ほとんどの血清が活性を示した。抗 HTLV-I 活性としては、中和活性が

侵入阻止活性より、数倍高かった。また、どちらの活性も HAM 患者群血清が ATL 患者群血清より高い値を示した。また、HTLV-I に対する血清中の中和活性（中和抗体/IFA による抗体価）は HAM 患者血清が ATL 患者、AC 血清より高かった。

HTLV-I 感染者には、HTLV-I の吸着以降の段階を阻害する新しいタイプの抗体活性が存在することが明らかとなった。HTLV-I の gp21 ペプチドがウイルス吸着後の感染過程を阻害することと合わせて考えると、細胞には SU 蛋白と反応するレセプターの他に、TM 蛋白と反応する因子がある可能性が考えられる。このような細胞性因子の同定は、抗ウイルス剤の開発に結びつくことが期待される。

### 3) 麻疹ウイルス受容体に関する研究：

マウス SLAM は麻疹ウイルスレセプターとしてほとんど機能しない。そこで、ヒトとマウスの SLAM のキメラ分子、あるいは SLAM とヒト CD4 のキメラ分子を作成することにより、麻疹ウイルスレセプターとしての機能に重要な領域を同定することを試みた。その結果、ヒト SLAM の V ドメインを持つキメラ分子はレセプターとして機能するが、それを欠く分子はレセプターの機能を失うことが示された。さらに、C2 ドメインを欠き、ヒト SLAM の V ドメインと膜貫通領域だけからなる分子も効率はやや低下するもののレセプターとして機能した。これらのことから、ヒト SLAM の V ドメインが麻疹ウイルスレセプターの機能に必要十分であることが明らかになった。

SLAM の受容体機能に重要な領域をさらに詳細に調べるために、SLAM V ドメイン内のキメラ分子の作製および部位特異的突然変異導入を行なった。その結果、61 番目のヒスチジンおよびその前後の数アミノ酸残基がレセプターの機能に重要であることが明らかになった。これらのアミノ酸をヒト型に変えるとマウス SLAM は麻疹ウイルスレセプターとして機能するようになった。逆に、これらのアミノ酸をマウス型に置換するとヒト SLAM はもはや麻疹ウイルスレセプターとして働かなくなった。現在、この部位が直接麻疹ウイルスとの結合に関与しているか検討を進めている。

種々のキメラ分子と抗体の反応性の検討から、ヒト及びマウスの抗 SLAM モノクローナル抗体は V ドメインと反応していることが結論された。可溶性のヒト SLAM は麻疹ウイルスの H 蛋白を発現している細胞には結合するが、F 蛋白や別のウイルスのエンベロープ蛋白を発現している細胞とは結合しなかった。したがって、SLAM は H 蛋白と相互作用していることが明らかになった。麻疹ウイルス感染は種々の SLAM 陽性細胞で SLAM の down-regulation を起こした。SLAM の down-regulation は麻疹ウイルス H 蛋白の transfection あるいは麻疹ウイルス H 蛋白を発現している CHO 細胞と混合培養するだけでも起こった。この現象は、麻疹ウイルスによる免疫抑制のメカニズムを考える上で非常に興味深い。

### 4. まとめ

可溶性ウイルス受容体等による抗ウイルス剤開発を目指し、以下のことを明らかにした。組み換え soR1(1,4)は、培養細胞レベルでは高い MHV 中和活性を示し、その活性は N ドメインのみで充分であることが判明した。今後、N ドメインの様々な合成ペプチドの中和活性の有無について検討したい。一方、soR1(1,4)のマウスの MHV 感染抑制活性は低かった。これは soMHVR のマウス体内での急速な消失によると考えられるので、吸収され難い soMHVR の開発と高濃度を維持出来る soMHVR 産生トランスジェニックマウスの樹立を目指す。HTLV-I の Env 蛋白の糖鎖は、その感染性維持に重要であるが、細胞表面の糖鎖は、HTLV-I 感染に影響を与えなかった。これらの糖鎖末端のシアール酸は、HTLV-I の感染を負に制御していた。この結果は、糖鎖のない単純蛋白が HTLV-I のレセプターとして機能しうることを示唆している。また、HTLV-I 感染者には、ウイルスの吸着後侵入を阻害する抗体の存在が明らかになり、この抗体を用いたウイルスの細胞内侵入機構の解明が期待される。麻疹ウイルスレセプターヒト SLAM のウイルス結合部位は V 領域にあることを明らかにした。更に V ドメイン内に部位特異的変異を導入することにより 60 番目のアミノ酸近傍の重要性を明らかにした。これらの情報を基に合成ペプチドを用いた抗麻疹ウイルス剤の開発を目指したい。麻疹ウイルスの H 蛋白がヒト SLAM に結合することにより、SLAM の down-regulation が引き起こされた。この事実は、麻疹ウイルスによる免疫抑制の解明の端緒となることが期待される。

## 5. 研究発表 (原著論文)

1. Matsuyama S, Watanabe R, Taguchi F. (2001) Neurovirulence in mice of soluble receptor-resistant (srr) mutants of mouse hepatitis virus: intensive apoptosis caused by less virulent srr mutant. *Arch Virol.* 146, 1643-1654
2. Taguchi F., Shimazaki YK. (2001) Involvement in fusion activity of an epitope in the S2 subunit of murine coronavirus spike protein. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494, 213-218
3. Matsuyama S, Taguchi F. (2001) Inefficient infection of soluble receptor-resistant mutants of murine coronavirus in cells expressing MHVR2 receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494, 233-236
4. Matsuyama S, Watanabe R, Taguchi F. (2001) Neurovirulence for mice of soluble receptor-resistant variants of murine coronavirus JHMV. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494, 145-148
5. Ohtsuka N, Tsuchiya K, Honda E, Taguchi F. (2001) A study on mouse hepatitis virus receptor genotype in the wild mouse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494, 237-240
6. Taguchi F., Matsuyama S. (2002) Soluble receptor potentiates receptor-independent infection by murine coronavirus. *J. Virol.* 76, 950-958
7. Matsuyama S, Taguchi F. (2002) Communication between SIN330 and a region in S2 of murine coronavirus spike protein is important for virus entry into cells expressing CEACAM1b receptor. *Virology* 295, 160-171
8. Matsuyama S, Taguchi F. (2002) Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 76, 11819-11826
9. Ikeda K, Konishi K, Sato M, Hoshino H., Tanaka K. (2001) Inhibition of HIV-1 infection by synthetic peptide analogues derived from the NH(2)-terminal extracellular region of GPR1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2607-2609
10. Feng R, Kobayashi A, Uchida K, Hoshino H., Miwa M. (2001) Cell-free entry of human T-cell leukemia virus type 1. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 410-416
11. Takeuchi H, Suzuki Y, Tatsumi M, Hoshino H., Daar ES, Koyanagi Y. (2002) Isolation and characterization of an infectious HIV type 1 molecular clone from a patient with primary infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 18, 1127-33.
12. Sun B, Nitta T, Shoda M, Tanaka M, Hanai S, Hoshino H., Miwa M. (2002) Cell-free human T-cell leukemia virus type 1 binds to, and efficiently enters mouse cells. *Jpn J Cancer Res.* 93, 760-6.
13. Hoshino H. (2002) [Coreceptors of HIV infection and the development of HIV entry inhibitors: overview and targets] *Nippon Rinsho.* 60:81-7.
14. Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y. (2001) V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J. Virol.* 75, 1594-1600.
15. Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. (2001) Measles viruses on throat swabs from measles patients use SLAM (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* 75, 4399-4401
16. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. (2001) Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J. Virol.* 75, 5842-5850
17. Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. (2001) Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J. Gen. Virol.* 82, 2913-2917.
18. Yanagi Y. (2001) The cellular receptor for measles virus - elusive no more. *Rev. Med. Virol.* 11, 149-156
19. Tanaka K, Minagawa H, Xie M-F, Yanagi Y. (2002) The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch. Virol.* 147, 195-203
20. Tatsuo H, & Yanagi Y. (2002) The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol. Immunol.* 46, 135-142.

21. Okuma K, Matsuura Y, Tatsuo H, Inagaki Y, Nakamura M, Yamamoto N, Yanagi Y. (2001) Analysis of the molecules involved in human T-cell leukaemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 82, 821-830
22. Vincent S, Tigaud I, Schneider H, Buccholz C, Yanagi Y., Gerlier D. (2002) Restriction of measles virus RNA synthesis by a mouse host cell line: *trans*-complementation by polymerase components or a human cellular factor(s). *J. Virol.* 76, 6121-6130
23. Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. (2002) SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* 76, 6743-6749
24. Yanagi Y., Ono N, Tatsuo H, Hashimoto K, Minagawa H. (2002) Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* 299, 155-161
25. Miyamoto S, Ochiai A, Boku N, Ohtsu A, Fukushima M et al. (2001) Discrepancies between the gene expression, protein expression, and enzyme activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa. *Int. J. Oncol.*, 18, 705-713
26. Koizumi K, Shimamoto Y, Azuma A, Fukushima M et al. (2001) Cloning and expression of uridine/cytidine kinase cDNA from human fibrosarcoma cells. *Int. J. Mol. Med.*, 8, 273-278
27. Kato T, Shimamoto Y, Uchida U, Ohshimo H, Fukushima M et al. (2001) Possible regulation of 5-fluorouracil-induced neuro- and oral toxicities by two biochemical modulators consisting of S-1, a new oral formulation of 5-fluorouracil. *Anticancer Res.*, 21, 1705-1712
28. Haraguchi H, Tsujimoto H, Fukushima M. Higuchi I et al. (2002) Targeted deletion of both thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase and consequent disorders in mice. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 5212-5221
29. Saga Y, Suzuki M, Mizukami H, Urabe M, Fukushima M et al. (2002). Enhanced Expression of thymidylate synthase mediates resistance of uterine cervical cancer cells to radiation. *Oncology*, 63, 185-191
30. Fukushima M. Okabe H, Takechi T, et al. (2002) Induction of thymidine phosphorylase by interferon and taxanes occurs only in human cancer cells with low thymidine phosphorylase activity. *Cancer Lett*, 187, 103-110
31. Honda T, Inagawa H, Fukushima M et al. (2002) Development and characterization of a monoclonal antibody with cross-reactivity towards uracil and thymine, and its potential use in screening patients with 5-fluorouracil for possible risks. *Clin. Chim. Acta.*, 322, 59-66
32. Kubota T, Watanabe M, Otani Y, Kitazima M, Fukushima M. (2002) Different pathways of 5-fluorouracil metabolism after continuous venous or bolus injection in patients with colon carcinoma: possible predictive value of thymidylate synthase mRNA and ribonucleotide reductase for 5-fluorouracil sensitivity. *Anticancer Res.*, 22, 3537-3540
33. Fujiwara H, Terashima M, Irinoda T, Fukushima M et al. (2002) Quantitative measurement of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA level in gastric cancer by real-time RT-PCR. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 1342-1350
34. Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Morivama M. et al. (2003) Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett* 189, 221-230

1. 松山州徳、田口文広：マウス肝炎ウイルス変異株を用いたスパイク蛋白の細胞融合活性に関与する部位の解析 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
2. 田口文広、松山州徳：可溶性受容体によるマウス肝炎ウイルス感染の活性化 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
3. 清水晶、清水宣明、田中淳、大上厚志、石川治、星野洪郎：水泡性口内炎ウイルスのDNA合成 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
4. 清水宣明、田中淳、曾田泰、北村俊雄、星野洪郎：コレセプター RDC1 発現細胞の HIV/SIV 感受性を増強する因子の解析 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
5. 品川雅彦、大上厚志、星野洪郎：ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 及びウシ白血病ウイルスの熱安定性 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
6. 清水晶、清水宣明、田中淳、大上厚志、石川治、星野洪郎：紫外線(UV-C)照射による HTLV-1、BLV の不活化 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
7. 孫賓蓮、正田桃子、新田孝幸、花井修次、内田和彦、星野洪郎、三輪正直：第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
8. 柳雄介：麻疹ウイルスの細胞侵入機構 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
9. 皆川洋子、田中耕太郎、小野伸之、龍尾浩信、柳雄介：単球および樹状細胞における麻疹ウイルスレセプター SLAM(CD150)発現の検討 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
10. 龍尾浩信、小野伸之、柳雄介：モルビリウイルスは SLAM (CD150) をレセプターとして使用する 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
11. 石田博、綾田稔、新開大史、松永勇、片山友子、江村麻子、Deng Yongou、瀬谷司、柳雄介、小倉寿：SSPE ウイルスは麻疹ウイルス受容体を利用するか。 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
12. 新開大史、綾田稔、石田博、松永勇、江村麻子、Deng Yongou、片山友子、瀬谷司、柳雄介、小倉寿：VSV シュードタイプシステムを用いた SSPE ウイルスの SLAM 及び CD4 6 利用について 第49回日本ウイルス学会、H13年11月18~20日、大阪
13. Yanagi Y. "SLAM, the cellular receptor for measles virus" Gordon Research Conference "Viruses & Cells" June 24-29, 2001, Tilton, NH, USA.
14. Yanagi Y., Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Minagawa, H. "Measles virus: Cellular receptors and pathogenesis" Awaji International Forum on Infection and Immunity, August 19-21, 2001, Hyogo, Japan.
1. 松山州徳、田口文広：マウス肝炎ウイルススパイク蛋白のレセプターが誘導する構造変化 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月16~18日、札幌
16. 三浦秀佳、松山州徳、田口文広：可溶性受容体によるマウス肝炎ウイルス S 蛋白の活性化 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月16~18日、札幌
17. Matsuyama S, Taguchi F. Receptor-induced conformational change of mouse hepatitis virus S protein. Third Frederick workshop on the cell biology of viral entry. Frederick, May 5-8, 2002.5.20
18. Taguchi F., Matsuyama S. Activation of receptor-independent infection of mouse hepatitis virus by soluble receptor. XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27 to August 1 2002.
19. Kyuwa S, Matsuyama S, Taguchi F., Kubota H, Saegusa J et. Al. Characterization of murine coronavirus persisted in IFN-G-deficient C57BL/6 mice. XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27 to August 1. 2002.
20. 清水宣明、田中淳、大上厚志、星野洪郎：既知のコレセプターと近縁な GPCR 遺伝子を導入した CD4 陽性ヒトグリオーマ細胞株 NP-2/CD4 の HIV/SIV 感受性 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月16~18日、札幌
21. 田中淳、清水宣明、品川雅彦、大上厚志、星野洪郎：色々な細胞の HTLV-1 感受性の検討と HTLV-1 感染を促進する細胞因子の同定 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月

16～18日、札幌

22. 孫賓蓮、新田孝幸、花井修次、内田和彦、星野洪郎、三輪正直：Cell-free HTLV-1 感染における糖鎖の役割 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月16～18日、札幌
23. 品川雅彦、大上厚志、田中淳、Roy Bihhuti Bhusan、星野洪郎：ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)の不安定性の検定 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月16～18日、札幌
24. Shimizu N, Tanaka A, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Oue A, Maruyama Y, Kitamura T, Hoshino H. Identification of the functional domains in an orphan G protein-coupled receptor, GPR1, which acts as a coreceptor for the brain-derived cell tropism of HIV-1, HIV-2 and SIV. XIIIth International Congress of Virology, Paris, July 27 to August 1, 2002.
25. 大野真治、小野伸之、柳雄介：アミノ酸3残基の変異を導入することにより、マウス SLAM は麻疹ウイルスレセプターとして機能する 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月16～18日、札幌
26. Yanagi Y. “Measles virus: Its cellular receptors and tropism” Thirty-sixth US-Japan joint working conference on viral diseases, July 16-18, 2002, Matsumoto, Japan.
27. Yanagi Y. “Measles virus exploits SLAM (CD150) to enter cells and cause the disease” US-Japan Immunology Board joint meeting, Dec. 7, 2002, Tokyo, Japan.
28. Yanagi Y. “Measles virus: entry and pathogenesis” US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute respiratory infections panel, 7<sup>th</sup> annual meeting, Jan 8-10, 2003, Yokohama, Japan.

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし。
- 2) 実用新案登録 なし。
- 3) その他 なし。