

平成15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5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	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	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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

研究要旨

本研究では、可溶性ウイルス受容体及び受容体ペプチドによる抗ウイルス剤の開発に向けて、コロナウイルス、麻疹ウイルス及びレトロウイルスを用いて基礎的な研究を行って来た。可溶性ウイルス受容体の抗ウイルス剤としての可能性を調べる目的で、マウスコロナウイルス（マウス肝炎ウイルス、MHV）感染に対する可溶性 MHV 受容体（soMHVR）の抗 MHV 活性をマウスを用いて検討した。その結果、高濃度の soMHVR を MHV 感染後頻回マウスに投与することにより、抗 MHV 効果が観察された。このことは、今後多くのウイルス感染症において、可溶性受容体が抗ウイルス剤として開発される可能性を示している。

我々は、麻疹ウイルスの細胞受容体が SLAM であることを明らかにした。麻疹ウイルスと SLAM の結合を詳細に解析することにより、ヒト SLAM V ドメインの 60、61、63 番目のアミノ酸が受容体機能に重要であることを明らかにした。この結果を元に、麻疹ウイルスと SLAM の結合を阻害する物質の開発を進めている。

G タンパク質共役受容体である CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 に、ヒト或いはサル免疫不全ウイルス（HIV、SIV）のコレセプター活性を見出した。*in vivo* の感染動態における役割が注目される。

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

A. 研究目的

「MHV 研究」可溶性ウイルス受容体は、ウイルス変異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を利用した抗ウイルス剤の開発である。MHV 感染は、マウスを用いて可溶性受容体の抗ウイルス効果を検討することができる数少ない実験系の一

つである。本研究では、MHV によるマウス麻疹ウイルス感染症のモデルとして、soMHVR による感染防御方法の基盤確立を目的とする。本年度は、soMHVR の抗 MHV 活性をマウス個体を用いて検討する。

「麻疹研究」麻疹（はしか）は小児の代表的なウイルス疾患である。ワクチン接種により先進国では患者数は激減したが、今なお発展途上国を中心に毎年 3000 万人以上の患者と約100万人の死者を出している。わが国では、ワクチン接種率が他の先進国に比べて低いこともあり、まだ多くの患者が発生し、最近では成人麻疹も問題になっている。高熱、結膜炎、皮疹などの症状に加え、リンパ球の減少と免疫抑制を起こすことが麻疹の特徴である。このため、他の細菌やウイルスによる二次感染を併発し、そ

れが病気の重篤化の大きな要因になっている。また、数は多くないが、感染後脳炎や中枢神経系における持続感染である亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) を起こすことが知られている。このようなことから、ワクチンを補完する治療法の開発が望まれている。最近我々は、麻疹ウイルスが細胞に感染する時に、免疫系の細胞に発現している signaling lymphocyte activation molecule (SLAM; CD150) を受容体として使うことを明らかにした。SLAM は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白で、細胞外ドメインとして V、C2 の 2 つのドメインを持っている。リンパ球上の SLAM が、他の細胞上の SLAM と相互作用すると、細胞内にシグナルが送られ、細胞の増殖やサイトカイン分泌がおこる。SLAM は、未熟胸腺細胞、メモリー T 細胞、一部の B 細胞に発現しており、活性化により T 細胞、B 細胞、単球、樹状細胞で発現が誘導される。顆粒球、NK 細胞および免疫系以外の細胞には発現していない。われわれは麻疹ウイルスと SLAM の結合を詳細に解析することを通して、この結合を阻害する物質を開発し、麻疹ウイルス感染の治療に資することを目指している。

「レトロウイルス研究」ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)、同 2 型、及びサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus) の細胞への感染には、主レセプター (CD4) とコレセプター (coreceptor) が必要である。種々の 7 回膜貫通型 G 蛋白質共役レセプター (G protein-coupled receptor, GPCR) がコレセプターとして機能する。コレセプターの発現は細胞によって異なる。従って、HIV/SIV の細胞指向性はコレセプターの使用能で決まる。HIV-1 感染では、GPCR に属するケモカイン・レセプターである CCR5 と CXCR4 が主なコレセプターとされる。我々は、ケモカイン・レセプターである CCR8 及び CXCR5、更にオーファン GPCR である GPR1 及び RDC1 が、HIV-1、HIV-2、あるいは SIV のコレセプターとして機能することを見い出して報告した

(Jinno, A., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **234**:497-502, 1998; Kanbe, K., Virology **265**, 264-273, 1999; Shimizu *et al.* J. Virol. **234**:234-234, 1999; Shimizu, N., J. Virol. **74**:619-626, 2000)。現在までに、約 16 種類の GPCR にコレセプター活性が検出されている。コレセプターとの特異的反応には HIV-1 の外被糖タンパク質 Env の第 3 可変領域 (V3) のアミノ酸配列が重要で、そこに変異が生じると使用できるコレセプターも変わる (Shimizu, N., *et al.* J. Virol. **73**:5231-5239, 1999)。HIV-1 はゲノムの変異が激しく、生体内では極めて不均一な集団であるため、現在までに確認されたもの以外にもコレセプター活性を有する GPCR の存在が示唆される。多くのコレセプターに共通する特徴として、アミノ末端領域にいくつかのチロシン残基が存在し、それらの硫酸化が活性に影響するとされる。この特徴を指標とし、HIV-1 のいわゆる代替コレセプター (alternative coreceptor) として機能する新たな GPCR を同定することを本研究の目的とした。代替コレセプターを利用できる HIV-1 は分離が困難なためにウイルス学的性質は不明だが、後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) の患者に見られる多様な病態やウイルスの潜伏感染と関係する可能性が考えられる。

B. 研究方法

「MHV 研究」本研究に使用した soMHVR は、N 及び A2 ドメインからなる soMHVR (soR1) の下流にマウス IgG-Fc ドメインを繋いだ組み換えキメラ蛋白 (soR1-Fc) であり、soR1 同様 HA、myc、6xHis の 3 種類のタグを持つ。この蛋白は、組み換えバキュロウイルスを用いて発現し、6xHis タグを利用して精製した。精製蛋白の定量は、抗 HA 抗体を用いた Western blot により解析した。また、この蛋白のウイルス中和活性は、24 穴プレートに準備した DBT 細胞を用いて、50% プラーク減少法により調べた。soR1-Fc を用いた動物実験には、5 週令 BALB/c マウス雄を用いた (日本 Charles River から購入し

た SPF マウス)。マウスへの投与は、5 μ M の soR1-Fc を 100 μ l 静脈内或は腹腔内經由で行った。感染実験に用いた MHV は、強毒株 MHV-2 で、100PFU を腹腔内に接種した。MHV-2 の 1LD50 は、2-3 PFU である。感染後、10 日間に渡り、マウスの生死を観察した。

「麻疹研究」ヒト SLAM、マウス SLAM、その両者の間のキメラ分子、部位特異的突然変異により特定のアミノ酸だけを置換したヒト SLAM やマウス SLAM をコードするプラスミドを作製した。これらのプラスミドを transfection により CHO(Chinese hamster ovary)細胞に導入し、SLAM あるいはその変異体を一時的に発現させた。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。麻疹ウイルスに対する受容体機能は、ウイルス感染による細胞融合の出現あるいは麻疹ウイルスエンベロープ蛋白を持つ水疱性口内炎ウイルス(VSV)のシュードタイプを用いた細胞侵入の測定により行なった。マウス ES 細胞の SLAM 遺伝子を、相同組換えによりヒト SLAM 遺伝子で置換え、それを用いてキメラマウスを作製した。キメラマウスを C57BL/6 マウスと交配することにより、ヒト SLAM 遺伝子を持つ遺伝子改変マウスを作製した。

「レトロウイルス研究」

(1) コレセプター候補 GPCR の割り出し

現在までに知られているコレセプターのほとんどは、ペプチドをリガンドとする GPCR である。GPCR のデータベース (GPCRDB: Information system for G protein-coupled receptors (GPCRs); <http://www.gpcr.org/>) に登録されているペプチドをリガンドとする GPCR の分子系統関係とアミノ酸配列を解析した。既知のコレセプターと近縁で、アミノ末端領域にチロシン残基を持つケモカイン・レセプター (CCR9B、D6、及び XCR1) と、フォルミルペプチド (formyl-Met-Leu-Phe) のレセプターである FML1 を、新しいコレセプター候補とした。

(2) コレセプター候補 GPCR 遺伝子のクローニング

CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 遺伝子のタンパク質コード領域の塩基配列を持つオリゴヌクレオチド・プライマーを合成した。PHA 刺激末梢血単核球 (PBMC)、あるいはヒト T 細胞株から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法で CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 のタンパク質コード領域を増幅した。抗生物質 blasticidin 耐性遺伝子を持つ発現ベクター-pCX-bsr (Akagi, T *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:7290-7295, 2000) にクローニングした。

(3) コレセプター活性検定細胞の作製

我々が樹立したヒトグリオーマ由来 NP-2/CD4 細胞株は、これまでに検定した HIV-1、HIV-2、及び SIV の全ての株に対してほぼ完全な感染抵抗性を示すが、コレセプター活性を持つ GPCR 遺伝子を導入して発現させると感受性となるため優れたコレセプター活性の評価系である (Soda, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun. 258:313-321, 1999)。CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 をクローニングした pCX-bsr プラスミドを NP-2/CD4 細胞にレトロウイルスベクターを用いて導入し、blasticidin 選択を行って安定発現細胞を樹立した。

(4) コレセプター活性の検出

CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 を導入した NP-2/CD4 細胞に、いくつかの HIV-1、HIV-2、及び SIV 株を感染させた。感染の成立は、間接蛍光抗体法によって検出した。

(5) コレセプター発現細胞の同定

様々な培養細胞株から cDNA を合成し、CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 の mRNA の発現を PCR 法で検出した。

C. 研究成果

「MHV 研究」これまで我々は、2 個の細胞外ドメインを持つ soR1 がマウスの MHV 感染を抑制するか否かについて検討した。強毒株 MHV-2 感染マウスに 2 μ M の soR1 を 50 μ l 投与することにより、抗 MHV 作用があるか否かについて、マウスの生死、生残時間で PBS 投与対照マウス

と比較した。その結果、soR1 投与では極めて低い抗 MHV 効果しかないことが判明した。マウスに投与した soR1 は、その半減期は約 15 分であり、血中から極めて速やかに消失することが明らかとなった。我々が構築した組み換え soR1 が異物とみなされ、宿主によって迅速に排除された可能性が考えられたので、本年度は半減期が長いと考えられている構築、即ちマウス IgG-Fc とのキメラ蛋白 (soR1-Fc) について検討することにした。本実験で作成したキメラ蛋白は、soR1 の下流にマウス IgG-Fc を持つ構造をした組み換え蛋白である。組み換えバキュロウイルスを用いて発現し、分子中程にある 6xhistidine タグで精製した。精製した soR1-Fc は分子量約 84kDa を示した。soR1-Fc の N 末端には S-S 結合により 2 量体を形成するシグナルが存在するため、発現した蛋白は native な状態での電気泳動では、分子量約 170kDa であった。この蛋白の MHV 中和活性を soR1 と比較すると、いずれも 1 中和価が約 1 nM で殆ど同程度の中和活性を示した。次ぎに、soR1-Fc のマウスにおける抗 MHV 作用を検討した。5 μ M の soR1-Fc を 100 μ l 静脈内に、感染前 3 時間、感染後 1 2 時間おきに 4 回投与した。その結果、soR1-Fc 投与群と PBS 投与の対照群との間には、死亡率および生残日数レベルでの差異は認められなかった。そこで、soR1-Fc を頻回投与による抗 MHV 効果を検討した。この系では、MHV 感染 20 分前に前投与し、感染後 12 時間から 24 時間にいたる時間帯に静脈内投与 4 回、腹腔内投与 2 回投与した。感染後 12 時間から 24 時間では、一次感染したウイルスが増殖して、そのウイルス血症が認められる時期である。このような条件で soR1-Fc を投与すると、対照群と比べて有意に生残時間が長かった ($P < 0.0001$)。各々の平均生残日数は、soR1-Fc 投与群で 8.4 日、対照群で 4.5 日であった。以上のように、本研究では、soR1-Fc を高濃度で頻回投与することにより、マウス体内でも抗

MHV 効果を示すことが明かにされた。

「麻疹研究」ヒト SLAM とマウス SLAM のキメラ分子に VSV シュードタイプを感染させる実験から、ヒト SLAM の V ドメインが麻疹ウイルス受容体機能に必須であることが示された。次にマウス SLAM の V ドメインの一部をヒト SLAM で置換した種々のキメラ分子の受容体機能を調べたところ、アミノ酸 58 番目から 67 番目の領域をヒト型の配列で置換するとマウス SLAM は、ヒト SLAM と同程度の受容体機能を持つようになった。この領域でヒトとマウスの間で異なる 60 番目、61 番目、63 番目のアミノ酸を一つずつ置換した分子の受容体機能の解析から、61 番目のアミノ酸をヒト型のヒスチジンに置換すると、ヒト SLAM に近い受容体機能を示すようになった。さらに、60 番目、63 番目のアミノ酸のいずれかあるいは両方を同時に置換することで受容体機能はさらに高くなった。逆に、ヒト SLAM 分子で、60 番目、61 番目、63 番目のアミノ酸、特に 61 番目のアミノ酸をマウス型に置換すると受容体機能は失われた。SLAM 類似分子で、既に X 線解析が行なわれている CD2、CD48 の構造モデルから類推すると、61 番目のアミノ酸は分子から外に向いており、ウイルス蛋白と直接相互作用していることが予想された。

「レトロウイルス研究」

(1) CCR9B のコレセプター活性

CCR9B を導入した NP-2/CD4 細胞は、用いた全ての HIV-2 株、及び SIVmndGB-1 株に感受性を示したが、その程度はウイルス株依存的であった。用いた全ての HIV-1 株は、CCR9B を導入した NP-2/CD4 細胞に感染しなかった。

(2) D6 コレセプター活性

非典型型ケモカイン・レセプターとされる D6 を導入した NP-2/CD4 細胞は、CCR5 と CXCR4 をコレセプターとして用いる (R5-X4 型) 2 重指向性 HIV-1 株 (GUN-1WT、GUN-4WT、GUN-7WT) に感受性を示したが、その程度は株依存的であった。CCR5 とオーファン GPCR である GPR1 をコレセプターとして用いる

(R5-GPR1 型) HIV-1 株 (GUN-1V、GUN-4V、GUN-7V)、CCR5 のみをコレセプターとする (R5 型) HIV-1 株 (Ba-L、SF162)、及び CXCR4 のみを用いる (X4 型) HIV-1 株 (IIIB) は、D6 をほとんど利用しなかった。特に、R5-X4 型 HIV-1 株に高い感受性を示したことが注目される。HIV-2 株 (CBL23、ROD/B、SBL6669) および SIV 株 (mac251、mndGB-1) の D6 利用能は極めて低かった。

(3) FML1 のコレセプター活性

FML1 を導入した NP-2/CD4 細胞は、GUN-7WT 株と GUN-4V 株に感受性であった。また、用いた 4 種の HIV-2 株、及び SIVmndGB-1 株に高い感受性を示した。さらに、PMBC を用いて分離されたいくつかの初代臨床分離株にも高い感受性を示した。これらの感染は、リガンドであるフォルミルペプチドによっては、ほとんど阻害されなかった。

(4) XCR1 のコレセプター活性

XCR1 を導入した NP-2/CD4 細胞は、いくつかの HIV-1 株、用いた全ての HIV-2 株、及び SIVmndGB-1 株に感受性を示したが、その程度は CCR9B や D6 に較べてかなり低かった。

(5) コレセプター活性の CD4 依存性

D6、FML1、及び XCR1 を導入した NP-2/CD4 細胞の HIV-1 及び HIV-2 感染は、抗 CD4 モノクローナル抗体によって阻害された。

(6) コレセプター発現細胞

由来を異にする様々な培養細胞において CCR9B、D6、FML1、及び XCR1 の mRNA の発現が検出された。特に、FML1 及び D6 mRNA の発現がより多くの細胞で検出された。

D. 考察

「MHV 研究」これまで我々は soR1 のマウス体内での動態を解析した結果、投与後急速に血中から消失することを明らかにした。また、この系での soR1 の抗 MHV 効果は、培養細胞レベルと比較すると、極めて低いことも報告した。我々は、投与後マウス血中で長期間保持される soMHVR の作成するため、マウス IgG-Fc 部位とのキ

メラ蛋白を用いることを考え、本研究でその可能性を検討した。作成したキメラ soMHVR は、Fc を持たない soR1 と同程度の中和活性を培養細胞系で示した。また、その構造は、S-S 結合による 2 量体になっていることが判明した。soR1-Fc の動物での抗 MHV 作用を検討したところ、これまでの soR1 を用いて行った濃度、投与スケジュールでは、soR1 と同様抗 MHV 効果は認められなかったが、高濃度の soR1-Fc を感染後 12 時間から 24 時間に渡って頻りに投与することにより、対照群と比べ MHV 感染後のマウス生残時間が長くなった。このことは、soR1-Fc はマウス体内で抗 MHV 活性を持つことを示しているが、その活性発現のためには高い血中濃度が必要とされることが推測される。現在、soR1-Fc 投与後のマウス血中での動態について検討中である。今回示された soR1-Fc のマウス体内での抗 MHV 活性は、可溶性ウイルス受容体が抗ウイルス剤として機能することを示す結果であり、今後の抗ウイルス剤の開発への基盤研究となることが期待される。昨年中国、香港等世界 30 以上の国で 8000 人以上の感染者と約 800 人の死者を出した SARS コロナウイルスの受容体は angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) であることが明かにされた。更に、可溶性 ACE2 が SARS コロナウイルス中和活性を示すことも報告されている。可溶性 ACE2 が抗 SARS ウイルス剤として開発されることが期待されるが、そのための基盤研究として MHV-soR1 実験系の進展が極めて重要であると考えられる。

「麻疹研究」われわれの実験結果から、ヒト SLAM の 61 番目のヒスチジンおよびその近傍の 60 番目、63 番目のアミノ酸が受容体機能を発揮する上で重要な役割を果たしていることが示された。構造モデルからも 61 番目のヒスチジンは麻疹ウイルスと相互作用していることが予想された。現在、これらのアミノ酸を含むペプチドを合成して、麻疹ウイルスの H 蛋白との結合

の有無、麻疹ウイルス感染阻止の有無を検討している。

「レトロウイルス研究」CCR9B、D6、及びXCR1は、CD4依存的にHIV-1、HIV-2、あるいはSIVのコレセプターとして機能することが明らかになった。特に、様々な組織や細胞において発現が検出されたD6とFML1にHIV-1のコレセプター活性が検出されたことが注目される。D6は、R5-X4型HIV-1に対する高いコレセプター活性を示した。また、FML1をコレセプターとして利用する初代臨床分離株がいくつかみとめられた。従って、*in vivo*でのHIV-1感染動態において、これらのGPCRが何らかの役割を果たす可能性が示唆された。今後、D6やFML1をコレセプターとして使用するHIV-1の臨床材料からの分離と、そのウイルス学的解析を試みる必要がある。

E. 結論

「MHV研究」soMHVRのマウスにおける抗MHV活性を検討した。NとA2ドメインからなるsoR1の下流にマウスIgG-Fc部位を繋いだキメラ蛋白、soR1-Fc、をバキュロウイルスで発現し、その中和活性を培養細胞レベルで検討したところ、中和活性はFcを持たないsoR1とほぼ同程度であった。その抗MHV活性をマウスで検討したところ、高濃度のsoR1-Fcを頻回投与することにより、抗MHV活性が認められた。このことは、可溶性ウイルス受容体を用いた抗ウイルス剤の開発が期待できることを示唆している。今後、有効なワクチンや治療薬のないSARSコロナウイルス感染等への応用が期待される。

「麻疹研究」われわれは麻疹ウイルス受容体が免疫系細胞に発現しているSLAMであること、SLAMのVドメイン、中でも60、61、63番目のアミノ酸が受容体機能に重要であることを明らかにした。

HIV-1のコレセプター利用性の違いは、標的細胞の違いでもあるために、体内感染動態やAIDSの病態とも密接に関連すると

思われる。ケモカイン・レセプターのCCR5とCXCR4以外で、HIV-1の有力なコレセプターとして働くGPCRは知られていない。また、CCR5とCXCR4以外で現在までに同定されたコレセプターについて、*in vivo*のHIV-1感染とAIDS病態における役割は解明されていない。本研究でHIV-1の高いコレセプター活性を同定したD6とFML1は、様々な組織や細胞で発現が検出されている。従って、これらをコレセプターとするHIV-1株を感染者から分離し、ウイルス学的性質を明らかにすれば、複雑なエイズ病態の解明に貢献できる可能性があると考えられる。また、現在、大きな問題となっている、東、及び東南アジアにおけるサブタイプAE、B、及びCに属するHIV-1感染の拡大と、D6やML1をコレセプターとした感染との関連も明らかにする必要がある。一方、コレセプターとして働くGPCRのリガンドのあるものは、HIV-1感染阻止効果を有する。特に、フォルミルペプチドは単純な3アミノ酸構造で合成も容易なため、HIV-1感染阻止剤開発の基盤材料となる可能性が考えられる。我々は、レトロウイルス・ベクターを用いてコレセプター遺伝子を導入して発現させることで、高感度にコレセプター活性を評価できる実験系(NP-2/CD4細胞)を確立し、一連のコレセプター研究に用いている。今後、この系に改良を加えて用いることで、HIV-1感染における代替コレセプターの同定とその役割を明らかにするとともに、HIV-1感染阻止剤の開発につながる方向性を持った研究を推進していきたいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miura SH, Nakagaki K, and Taguchi E. N terminal domain of murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the

spike protein. *J. Virol.* 78, 216-223 (2004)

田口文広 SARS コロナウイルス、ウイルス 53, 201-209 (2003)

田口文広 コロナウイルス、臨床医 29, 1947-1950 (2003)

田口文広 SARS ウイルスの起源とコロナウイルス、化学療法の領域、20, 24-32 (2004)

田口文広 SARS コロナウイルスの基礎ウイルス学、インフルエンザ、5、21-27 (2004)

Bouche FB, Marquet-Blouin E, Yanagi Y, Steinmetz A, Muller CP. Neutralising immunogenicity of a polypeptide antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine* 21:2074-2081(2003)

Shingai M, Ayata M, Ishida H, Matsunaga I, Katayama Y, Seya T, Tatsuo H, Yanagi Y, Ogura H. Receptor use by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Gen. Virol.* 84:2133-2143 (2003)

Ohno S, Seki F, Ono N, Yanagi Y. Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *J. Gen. Virol.* 84:2381-2388 (2003)

Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and

their adaptability to marmoset B95a cells. *J. Virol.* 77:9943-9950 (2003)

Bai Y, Soda Y, Izawa K, Tanabe T, Kang X, Tojo A, Hoshino H, Miyoshi H, Asano S, Tani K. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Ther.* 10, 1446-1457 (2003)

Kusagawa S, Imamura Y, Yasuoka A, Hoshino H, Oka S, Takebe Y.

Identification of H1N1 type 2 subtype B transmission in East Africa.. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19, 1045-1049. (2003)

2. 学会発表

Taguchi F, Matsuyama S, and Miura-Suzuki H. Fusogenic activation and conformational changes of murine corona virus spike protein by soluble receptor. Ixth International Symposium on Nidoviruses, May 24-29, 2003 The Netherlands.

Miura-Suzuki H, and Taguchi F. N terminal domain of murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation of spike protein. Ixth International Symposium on Nidoviruses, May 24-29, 2003 The Netherlands.

Taguchi F, Matsuyama S. Cell entry mechanism of murine coronavirus: Fusogenic activation and conformational changes of the spike protein by soluble receptor. Second Japan-China symposium on infectious diseases 2. 18. 2004. Hong Kong

Taguchi F. Entry mechanism of murine coronavirus. Minophagen symposium on " The present and future

of the SARS research". Dec. 8, 2003

Tokyo, Japan

田口文広：マウスコロナウイルスと受容体の相互認識機構、第 15 回獣免疫研究会 2003.8.9 東京大学医科学研究所

田口文広：SARS（重症急性呼吸器症候群）の対策—動物感染症の研究の経験から 第 136 回日本獣医学会 2003.10.3 北里大学獣医畜産学部、青森市

田口文広：コロナウイルス 第 4 1 回日本細菌学会中部支部総会 2003.10.3 新潟

田口文広：ウイルス学的に見た SARS ウイルス 第 5 1 回日本ウイルス学会総会、トピックス「SARS Outbreak」2003.10.29、京都

田口文広：重症急性呼吸器症候群（SARS）発生とその経過 2003.11.8. 高崎、群馬獣医師会会館、群馬獣医師会主催セミナー

田口文広：SARS ウイルスの正体—診断法はどこまで進化したか 2004. 3. 6 第 8 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、東京都目黒区芝公園 共立薬科大学講堂

中垣慶子、中垣和英、田口文広：マウス肝炎ウイルス神経病原性的大脑由来の培養細胞を用いた解析：第一標的細胞と受容体発現細胞 第 5 1 回日本ウイルス学会総会 2003.10.27-10.29 京都、

三浦秀佳、中垣慶子、田口文広：マウスコロナウイルス受容体の活性中心に関する研究 第 5 1 回日本ウイルス学会総会、2003.10.27-10.29、京都

柳 雄介『感染症の解明 4. ウイルスレセプター』、第 26 回日本医学会総会、平成 15 年 4 月 5 日、福岡市

柳 雄介『麻疹ウイルスの受容体とトロピズム』、衛生微生物技術協議会 第 24 回研究会、平成 15 年 7 月 10 日、福岡市

Seki, F., Ohno, S., Yanagi, Y. Morbillivirus receptor SLAM (CD150), Awaji International Forum on Infection and Immunity, August 25-28, 2003, Hyogo, Japan

関 文緒、小野伸之、山口良二、柳 雄介『イヌ SLAM 発現 Vero 細胞によるイヌジステンパーウイルス野外株の分離と分離ウイルスの性状』、第 51 回日本ウイルス学会総会、平成 15 年 10 月 28 日、京都市

大野真治、小野伸之、柳 雄介『麻疹ウイルス株間のインターフェロン _ 抵抗性の違い』、第 51 回日本ウイルス学会総会、平成 15 年 10 月 29 日、京都市

大野真治、柳 雄介『麻疹ウイルスのインターフェロン _ 抵抗性』、第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 15 年 12 月 10 日、福岡市

N. Shimizu, A. Tanaka, A. Oue, K. Kanbe, H. Hoshino ; G protein-coupled receptors having DY-sequence in the amino-terminal region act as coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses: Identification of the functional domain of the coreceptor activity of GPR1 ; The 6th international Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides ; 2003 年 11 月 1 日~11 月 4 日、(箱根)

大上厚志、黒崎 大、田中 淳、清水宣明、星野洪郎；ヒト脳微小血管由来内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感染試験；2003 年 第 17 回日本エイズ学会学術集会；2003 年 11 月 27 日~11 月 29 日（神戸）

大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽、星野洪郎；GFP 発現を指標として HIV-1 感染を検出する細胞株の作製；2003 年 第 17 回日本エイズ学会学術集会；2003 年 11

月 27 日～11 月 29 日（神戸）

清水宣明、田中淳、大上厚志、星野洪郎；
HIV-1 のコレセプターとして機能するケ
モカイン・レセプター-D6、及びフォルミ
ルペプチド・レセプター-FML1 の解析；
2003 年 第 17 回日本エイズ学会学術集
会；2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日（神
戸）

大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽、星野
洪郎；GFP 発現を指標として HIV-1 感染
を検出する細胞株の作製；2003 年 10 月 27
日～11 月 29 日（京都）

黒崎大、清水宣明、大上厚志、星野洪郎；
HIV-1 感染細胞がもたらす神経障害機構
の解析；第 51 回日本ウイルス学会学術集
会 2003 年 10 月 27 日～11 月 29 日（京
都）

品川雅彦、大上厚志、清水宣明、田中淳、
星野洪郎；GFP 発現遺伝子組換えウシ水
疱性口内炎ウイルスとの pseudotype
virus を用いたヒト T 細胞白血病ウイルス
外被タンパク質の熱不安定性の検定；第 51
回日本ウイルス学会学術集会；2003 年 10
月 27 日～10 月 29 日（京都）

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
51 回日本ウイルス学会学術集会；2003 年
10 月 27 日～10 月 29 日（京都）

田中 淳、清水宣明、品川雅彦、大上厚志、
星野洪郎；硫酸化多糖の HTLV-I 感染に
対する多様な影響；第 51 回日本ウイルス
学会学術集会；2003 年 10 月 27 日～10
月 29 日（京都）

大上厚志、黒崎 大、田中淳、清水宣明、
星野洪郎；ヒト脳微小血管由来内皮細胞と
周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感
染試験第 7 回日本神経ウイルス研究会；
2003 年 9 月 4 日～9 月 6 日（帯広）

田中淳、Roy Bibhuti Bhusan、田村一志、
Saha Manujendra Narayan、大槻貴博、
品川雅彦、大上厚志、清水宣明、星野洪郎；
感染性のアッセイが困難なウイルスの
VSV pseudotype の作成とその有用性；
第 7 回日本神経ウイルス研究会；2003 年
9 月 4 日～9 月 6 日（帯広）

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成15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5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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