

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

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

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析; 癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
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デリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
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デリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	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 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

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

可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第3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きた。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、SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 感染に対する可溶性受容体 (soACE2) の抗ウイルス活性について検討し、10-20nM で中和活性を示すことが明らかにされ、今後 SARS 治療薬としての開発が期待される。麻疹ウイルスの細胞受容体がヒト SLAM であり、その V ドメインが受容体機能に必要な十分であることは既を明らかにした。麻疹ウイルスと SLAM の結合を解明し、抗ウイルス剤の開発に資するために、可溶性の SLAM および麻疹ウイルス H 蛋白を大量の培養細胞から調整し、それらの結晶化を進めている。また、麻疹の病態解明や治療法開発のための動物モデルとして、ヒト型 SLAM を発現する遺伝子改変マウスを作成し、麻疹ウイルス感染後、全身のリンパ組織でウイルスが増殖することを確認した。Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) へのヒト細胞の感受性を決定する因子としてヘパラン硫酸プロテオグリカンと同定した。今後は、HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸の必要性や関与するヘパラン硫酸の特異的糖鎖構造についての検討が必要である。

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)慶応義塾大学医学部 森山雅美
- (4)大鵬薬品工業(株) 福島正和
- (5)東レ株式会社 曾根三郎

A. 研究目的

「コロナウイルス研究」ヒト重症急性呼吸器症候群 (SARS) の原因ウイルス (SARS-CoV) はコロナウイルスに属し、その受容体が **angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)** であることが報告された。このことから、SARS に対する治療薬として、マウス肝炎ウイルス (MHV) と同様可溶性受容体を利用できる可能性が考えられる。その可能性を検証するため、本年度は、可

溶性 ACE2 (soACE2) が抗 SARS 活性を示すか否かについて、感染性 SARS-CoV を用いて検討した。

「麻疹研究」小児の代表的なウイルス感染症である麻疹 (はしか) は、発展途上国を中心に毎年約 3000 万人の患者と約 100 万人の死者を出している。わが国では、ワクチン接種率が低いいため、まだ多くの患者 (年間推計 10-20 万人) が発生し、成人麻疹も問題になっている。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。我々は、ヒト SLAM の V ドメイン

が受容体機能に重要であることを明らかにした。これらの情報をもとに、麻疹ウイルスと SLAM 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。また、病態解明や治療法開発に役立てるために、麻疹ウイルス感染動物モデルを作成する。

「レトロウイルス研究」

これまでの HTLV-I の研究では、極端に低い安定性と感染性のために、他のウイルス研究で行われるような細胞を含まないウイルス材料、無細胞性ウイルスを用いた培養細胞感染実験が難しく、受容体などの感染性に重要な役割を果たす因子の研究も進んでいない。我々は HTLV-I の無細胞性ウイルス感染系として GFP 遺伝子組み換えウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV) とのシュードタイプウイルス (VSV Δ G*(HTLV-I)) を作製し、感染を定量できる系を確立した。VSV Δ G*(HTLV-I) を用いて、ヒト細胞では高感受性細胞と抵抗性細胞との間に約 10,000 倍の感受性の差が観察された。そこで高感受性由来 cDNA ライブラリーを低感受性細胞株に導入したところ、高い感受性を示す細胞クローンが得られた。この感受性には、細胞膜表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンの関与が示唆された。以上の結果をもとに HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの作用機序の解明とヘパラン硫酸プロテオグリカンに関連した抗 HTLV-I 剤の開発を目的とする。

B. 研究方法

SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の可溶性受容体 soACE2 を組換えバキュロウイルスを用いて発現し、タグを利用して精製後、中和試験に用いた。soACE2 遺伝子は、膜貫通領域、細胞質内領域を除き、更に ACE2 の酵素活性部位に変異を導入したものを作成し、精製と検出のために C 末端に His タグを付け加えた遺伝子を PCR 法で作成した。この遺伝子を持つ組換えバキュロウイルスを作成し、昆虫培養細胞 Tn5 に感染させ、培養上清中に含まれる soACE2 を精製した。ウイルスの中和活性

は、ドイツ Ziebuhr 博士から分与された SARS-CoV Frankfurt 株を用いた 50% ブラーク減少法により行った。SARS-CoV の感染性ウイルスは国立感染症研究所の BSL3 実験室で取り扱った。

麻疹の動物モデルとして、マウス SLAM の V ドメインをコードするエクソンをヒト SLAM の V ドメインで置換えた遺伝子改変マウスを作成した。まず、マウス ES 細胞の SLAM 遺伝子をヒト 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。キメラマウスと C56/BI6 との交配により、ヒト型 SLAM 遺伝子を持つ遺伝子改変マウスを作成した。GFP 発現組換え麻疹ウイルスによる細胞の感染は、フローサイトメトリーあるいは蛍光顕微鏡により検出した。ウイルスの増殖はブラーク法により測定した。可溶性ヒト SLAM、麻疹ウイルス H 蛋白をコードするプラスミドを培養細胞に transfect した後、培養液から目的とする蛋白を回収し、蛋白ゲルで解析した。様々な条件下で、精製蛋白の結晶化を行なった。

HTLV-I 産生細胞としては、HTLV-I 産生ネコ由来腎細胞 8C を用いた。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの ORF をレトロウイルスベクターにクローニングし、細胞に導入することでヘパラン硫酸発現細胞を作製した。感染性 HTLV-I は 8C 細胞の培養上清を回収し cell free HTLV-I とした。Cell-free HTLV-I は感染後 24-30 時間後の細胞 DNA を用いた PCR で検討した。VSV Δ G*(HTLV-I) は GFP 遺伝子組換え VSV である VSV Δ G*-G を HTLV-I (産生 8C 細胞に感染させ、感染後 15-20 時間の細胞培養上清を回収した。pseudotype の感染性は標的細胞に接種した 24 時間後の GFP 発現細胞数を計測することで算出した。プロテオグリカン発現は色々の細胞株より RNA を回収し、RT-PCR によりヘパラン硫酸プロテオグリカン mRNA の発現を検討した。また細胞表面の発現量抗体を用いて検討した。

C. 研究成果

「コロナウイルス研究」組換えパキウイルスにより発現された soACE2 は分子量約 100,000 を示し、アミノ酸配列から予測された分子量を示した。また、精製 soACE2 を濃縮することにより、100 μ M 以上の濃度の soACE2 を得ることができた。これまでの実験から、酵素活性を持つ soACE2 は精製することにより、活性部位に変異を導入し、酵素活性のない soACE2 と比べ、degradation と活性消失が高いことから、本実験では酵素活性を欠く変異 soACE2 を用いて解析した。soACE2 は 10–20nM の濃度でウイルス感染価を半減させた。即ち、soACE2 の 1 中和単位は 10–20nM であると判定された。

「麻疹ウイルス研究」麻疹ウイルス感染の動物モデルとして、マウス SLAM の V ドメインをコードするエクソンを、対応するヒト SLAM の V ドメインで置換えた遺伝子改変マウスを作成した。本マウスの胸腺および脾臓細胞は期待通りヒト型 SLAM を発現していた。脾臓細胞を *in vitro* で GFP 発現組換え麻疹ウイルスに感染させると、ヒト型 SLAM 発現マウスでは多くの細胞が GFP 陽性になった。また、本マウスの脾臓細胞に麻疹ウイルスを感染させると、ウイルスの増殖が観察されたが、正常マウスの脾臓細胞では全く増殖が見られなかった。In vivo の感染では、ヒト型 SLAM 発現マウスでウイルスの増殖は観察できなかったが、I 型インターフェロンレセプター・ノックアウトマウスと交配したマウスでは、ウイルスの脾臓や全身のリンパ節でウイルス感染を認めた。したがって、本マウスを麻疹ウイルス感染の動物モデルとして使えることが示された。

「レトロウイルス研究」VSV Δ G*(HTLV-I) ウイルス感染での高感受性細胞と低感受性細胞との間に約 10,000 倍の感受性の差が観察された。また HTLV-I 産生細胞株の VSV Δ G*(HTLV-I) 感染感受性は極端に低下していた。HTLV-I 高感受性ヒト細胞株の cDNA library を低感受性細胞

株 K4R に導入し、VSV Δ G*(HTLV-I) 感染に必要な細胞性因子をコードしていると思われる cDNA を 2 クローンを得、cDNA がコードしていた蛋白は、細胞膜表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白であることが解った。この結果からヘパラン硫酸プロテオグリカンを低感受性ヒト細胞株で発現させたところ、VSV Δ G*(HTLV-I) と cell-free HTLV-I に対する感染感受性が亢進した。この感染感受性の亢進は HTLV-I 感染で特異的に観察され、VSV Δ G*(BLV) や VSV Δ G*-G 感染に対する感受性の亢進は観察されず、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの効果は HTLV-I 特異的であった。しかしこれらの遺伝子をマウス細胞株に導入しても HTLV-I 感染感受性の獲得、感染感受性の亢進は観察されなかった。細胞膜表面のヘパラン硫酸が多いが HTLV-I の感染の感受性が低い細胞や、ヘパラン硫酸の検出が少ないながらも、感染の感受性が高い細胞が存在し、細胞の細胞表面のヘパラン硫酸の発現量と HTLV-I の感染の感受性との間には、必ずしも相関が認められないことが明らかとなった。VSV Δ G*(HTLV-I) の感染性は感受性細胞をヘパリチナーゼ I で前処理した場合、未処理の時と比べ、30% にまで減少した。また、ヘパラン硫酸やヘパリンと結合活性のある bFGF では HTLV-I 感染の阻害効果があるが、同様の活性を持つ aFGF にはないことが明らかになった。

D. 考察

「コロナウイルス研究」これまで可溶性 MHV 受容体による 1 中和活性は約 1 nM であると報告されており、soACE2 による SARS-CoV の中和は MHV と比べ約 10 倍感度が低いことが示された。しかしながら、本研究により、soACE2 が SARS の抗ウイルス剤として利用できる可能性が強く示唆された。このことは、同じコロナウイルスで容易に動物実験ができる MHV の可溶性受容体を用いた基礎的研究の重要性が再認識され、期待されるところが大きい。

い。

「麻疹研究」ヒトとマウスで SLAM の発現や機能はほとんど同じと考えられるので、ヒト型 SLAM 発現遺伝子改変マウスは、麻疹の良い動物モデルになると考えられる。今後、このマウスに、野生株、ワクチン株の麻疹ウイルスを感染させて、麻疹ウイルス感染の病態を解析するとともに抗ウイルス活性物質のスクリーニングに使用する予定である。

「レトロウイルス研究」今回行った実験から、HTLV-I 感染には細胞表面のヘパラン硫酸の発現量に加えて発現している HS 鎖の糖鎖構造が深く関与している可能性が考えられる。ヘパラン硫酸の糖骨格は、GlcA/IdoA-GlcNAc の繰り返しであるが、結合する硫酸基の位置、数によって、理論上は 1036 通りの分子があると計算されている。今回の研究においてもヘパラン硫酸結合性線維芽細胞成長因子の bFGF では HTLV-I 感染への阻害効果が認められるが aFGF にはないことから HTLV-I 感染に関与する特異的糖鎖構造が存在する可能性が考えられる。

E. 結論

SARS-CoV の可溶性受容体 soACE 2 のウイルス中和活性を検討し、10—20nM が 1 中和活性であることが明らかにされた。このことにより、soACE2 を利用した抗 SARS 剤開発の可能性が示唆された。麻疹ウイルス感染動物モデルとして、ヒト型 SLAM を発現する遺伝子改変マウスを作成した。本マウスは抗ウイルス活性物質のスクリーニングにも有用だと考えられる。また、有効な抗ウイルス活性物質を設計するために、麻疹ウイルス H 蛋白と SLAM の構造解析を進めている。ヘパラン硫酸プロテオグリカンが HTLV-1 の細胞吸着に重要な役割を果たしている可能性が示唆されたが、全てのヘパラン硫酸が受容体機能を持っている訳ではなかった。今後は HTLV-I 感染に関与するヘパラン硫酸の特異的糖鎖構造についての検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuyama S, Ujike M, Ishii I, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. (2006) Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. **Adv. Exp. Med. Biol.** In press.

Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi E. (2006) Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation **Adv. Exp. Med. Biol.** In press.

Nakagaki K, Nakagaki K and Taguchi E. (2006) Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture. **Adv. Exp. Med. Biol.** In press

Ishii K, Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi F. Miyamura T. (2006) Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. **Adv. Exp. Med. Biol.** In press

Zamoto A, Taguchi F. Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. (2006) Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. **Adv. Exp. Med. Biol.** in press.

Watanabe R and Taguchi F. (2006) Receptor-independent infection of murine coronavirus: analysis by spinoculation. **J. Virol.** 80 (in press)

Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. (2005) Protease-mediated enhancement of SARS coronavirus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.** 102: 12543-12547

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. (2005) Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. **J Gen Virol** 86:2269-2274.

Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. **J. Virol. Methods**. 125, 181-186

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi F (2005) Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. **J. Virol.** 79, 6102-6110.

田口文広：SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005

田口文広：SARS「ネオエスカ感染症・アレルギーと生体防御」同文書院 27-31、2005

田口文広：SARS コロナウイルス：特集「動物由来ウイルス感染症」日本臨床 63 巻 12 号 2113-2120 2005

田口文広：マウス肝炎ウイルスおよび SARS コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現への関与 実験医学 第 23 巻 No. 17 28-33 (増刊) 2005

Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, Yanagi Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster

ovary cells. **Virus Res** 108:161-5, 2005

Takeda M, Ohno S, Seki F, Nakatsu Y, Tahara M, Yanagi Y. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. **J Virol** 79:14346-54, 2005

Tahara M, Takeda M, Yanagi Y. Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. **J Virol** 79:15218-25, 2005

Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Seki F. Measles virus receptors and tropism. **Jpn J Infect Dis** 59:1-5, 2006

Takeda M, Nakatsu Y, Ohno S, Seki F, Tahara M, Hashiguchi T, Yanagi Y. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. **J Virol** (in press)

Seki F, Takeda M, Minagawa H, Yanagi Y. The recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its haemagglutinin cannot use receptor CD46 as efficiently as that having the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. **J Gen Virol** (in press)

Roy BB, Jinno-Oue A, Shinagawa M, Shimizu A, Tamura K, Shimizu N, Tanaka A, and Hoshino H. Isolation of the feline alpha1,3-galactosyltransferase gene, expression in transfected human cells and its phylogenetic analysis. **J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.** 2005, 306B, 59-69.

Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Hoshino, H. and Haga T. Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and

human immunodeficiency virus with the RANTES gene. **Microbes Infect.** (in press)

Saha, M. N., Tanaka, A., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Tamura, K., Shinagawa, M., Chiba, J., and Hoshino H. Formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing surface proteins of hepatitis B virus. **J. Virol.** 2005, 79, 12566-12574.

Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, Suzuki Y, and Hoshino H. The synthetic peptide derived from the NH2-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1, preferentially inhibits infection of X4 human immunodeficiency virus type 1. **J. Biol. Chem.** 2005, 280, 30924-30934.

Tamura K, Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Takagi H, Kato N, Morikawa A, and Hoshino H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. **Microbes Infect.** 2005, 7: 29-40

2. 学会発表

Taguchi F. Cell entry mechanism of SARS and murine coronaviruses; implication in pathogenesis. German-Japanese Symposium on Emerging and Reemerging Viruses. May 17, 2005, Toyama, Japan

Taguchi F. and Matsuyama S. Protease-mediated enhancement of ARS-CoV infection. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Watanabe R. and Taguchi F. Receptor-independent infection of mouse hepatitis virus; analysis by spinoculation. Xth International Nidovirus symposium. June 25-

30, 2005, Colorado Springs, USA

Nakagaki K., Nakagaki K. and Taguchi F. Receptor-independent spread of a murine coronavirus JHMV in mixed neural cell culture. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Zamoto A, Taguchi F. Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-CoV. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Fukushi S, Mizutani T., Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F. Kurane I, and Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Ishii K., Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi F. and Miyamura T. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Taguchi F. Protease-mediated enhancement of SARS-CoV infection. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 5-8, 2005, Awaji Japan

Watanabe R., Taguchi F. Receptor-independent infection of JHMV: analysis by spinoculation. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 5-8, 2005, Awaji Japan

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイルス（MHV-JHM）のマウスとラット大脳分離細胞での感染様式の比較 第9回日本神経ウイルス研究会、浜松 2005. 6.9-6.11

渡辺理恵、田口文広：マウス肝炎ウイルスの受容体非依存性感染に関する研究：spinoculation法を用いた解析 第53回日本ウイルス学会総会、横浜 2005.11.21-23

松山州徳、氏家誠、森川茂、田代真人、田口文広：プロテアーゼによる SARS コロナウイルスの感染増強 第53回日本ウイルス学会総会、横浜 2005.11.21-23

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイルス変異株(JHM-srr7)のマウス大脳分離培養細胞への感染に関する研究 第53回日本ウイルス学会総会、横浜 2005.11.21-23

石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクシニアウイルス株DIsの組換えSARSワクチンとしての検討 第53回日本ウイルス学会総会、横浜 2005.11.21-23

Yanagi Y. Measles virus receptor. International Symposium on Molecular Bases Underlying Microbial Infections and the Host Responses, July 19-20, 2005, Tokyo, Japan

Yanagi Y. Measles virus receptors: their roles in tropism and signal transduction. Keystone Symposium "Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis" February 25, 2006, Santa Fe, NM, USA

柳 雄介『麻疹ウイルスレセプター：トロピズムと病原性』、第53回日本ウイルス学会総会シンポジウム「ウイルス感染の宿主原理」、平成17年11月21日、横浜市

竹田 誠、大野真治、関 文緒、田原舞乃、中津祐一郎、柳 雄介『麻疹ウイルスゲノムの長い非翻訳領域の機能』、第53回日本ウイルス学会総会、平成17年11月20日、

横浜市

関 文緒、竹田 誠、皆川洋子、柳 雄介『麻疹ウイルスH蛋白481Y変異を導入した組み換えウイルスにおけるレセプターCD46利用の解析』、第53回日本ウイルス学会総会、平成17年11月20日、横浜市

田原舞乃、竹田 誠、柳 雄介『培養細胞におけるウイルス増殖への麻疹ウイルスEdmonstonワクチン株各遺伝子の寄与』、第53回日本ウイルス学会総会、平成17年11月22日、横浜市

竹田 誠、大野真治、関 文緒、田原舞乃、中津祐一郎、橋口隆生、柳 雄介『文節ゲノム型モノネガウイルスの作製と応用』、第53回日本ウイルス学会総会、平成17年11月22日、横浜市

清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、武部豊、草川茂、森隆久、山口華代、中谷陽子、星野洪郎。アミノ末端領域にチロシンを持つ様々なGPCRのHIV/SIVコレセプター活性の解析。第19回日本エイズ学会学術集会(熊本)2005年12月1-3日

清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、和田成一、森隆久、山口華代、星野洪郎。HIV-1感染感受性に及ぼす重粒子線の効果の解析。第53回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2005年11月20-22日

田中淳、清水宣明、大上厚志、品川雅彦、星野洪郎 ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)感染を促進する細胞膜蛋白について 第53回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2005年11月21-22日

清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、和田成一、森隆久、山口華代、星野洪郎。HIV-1感染感受性に及ぼす重粒子線の効果の解析。21st Century COE program. The 2nd International Symposium on Biological Research using Accelerator Technology(前橋)2005年11月10-11日

大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎：ヒト脳微小血管に由来する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 19 回日本エイズ学会 学術集会 (熊本). 2005 年 12 月 1-3 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

「B 型肝炎ウイルスの **pseudotype** ウイルスを作成し、その感染性を定量的に検出する方法」 (特願 2005-263575)

印刷 株式会社 ソーランド

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

平成18年7月31日発行

創業等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成17年度
