

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JAG1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 of 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 | 網脇祥子 …… 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（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

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

所属：国立感染症研究所ウイルス第1部

研究者：森川 茂

研究要旨：siRNA library を用いて新興・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を行うことを目的とした。昨年度のプラスミドベースの siRNA library では、ウイルス感染後に生存した細胞からの siRNA 発現プラスミド DNA 回収量が極端に少なく次のスクリーニングに用いることができなかった。この問題点を克服するために、レンチウイルスベースの siRNA library を構築した。Vero E6 細胞に効率良く感染するレンチウイルスベクターが無い場合、SARS ウイルスのレセプター ACE2 発現 HeLa-A3 細胞に siRNA library レンチウイルスを感染させ、siRNA library 発現細胞のストックを作製した。この細胞にワクチニアウイルスを感染させると、コントロールに比べてウイルス感染による細胞死を免れた細胞が多数観察された。これらの生存細胞で発現している siRNA の配列を決定すると、アポトーシス関連等種々の遺伝子が検出された。一方、SARS ウイルスや西ナイルウイルスを感染させた場合には、生き残った細胞のコロニーはコントロールと比較しても有意な差はなかった。本研究では、最終的には Vero E6 細胞で候補 siRNA による遺伝子ノックダウンを行い siRNA の有効性を確認するため、GSK-3 β 遺伝子の合成 siRNA を用いて Vero E6 細胞で GSK-3 β 遺伝子発現を効率良く抑制する条件検討を行った。また、ヒトスジシマカの一齢幼虫に JNK の siRNA を効率良く導入する方法を開発し、脱皮時のアポトーシスを阻害することに成功した。

分担研究者：

- (1) (株) ジェノファンクション・研究部長
鈴木要介
- (2) 国立感染症研究所ウイルス第1部室長
高崎智彦
- (3) 国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官
水谷哲也
- (4) 国立感染症研究所ウイルス第1部長
倉根一郎

研究協力者：

- (1) 江下優樹 (大分大学)
- (2) 佐藤朝光 (福岡大学)
- (3) 福士秀悦、緒方もも子、西條政幸 (国立感染症研究所)

A. 研究目的

2002年 SARS ウイルスは種の壁を越え、国境を越えて世界中に大きな脅威を与えた。他にも西ナイルウイルスはアメリカ合衆国の土着のウイルス性疾患になり、サル痘ウイルスによるヒト患者も発生した。これら

の新興・再興感染症に立ち向かうためには、迅速な診断法の確立とともにウイルスが出現する背景や病原性を理解する必要がある。一方、siRNA の技術により遺伝子の発現・翻訳を効率良く阻害することが可能になった。さらに、siRNA 発現ライブラリーの作製技術により、標的とするウイルス遺伝子や細胞で発現する個々の遺伝子を網羅的に阻害する実験系が確立された。ウイルスは増殖の場として細胞を必要とし、細胞の蛋白質を利用して複製を行っている。細胞の遺伝子を元に作製した siRNA 発現ライブラリーを細胞に導入すると、個々の遺伝子がノックダウンした細胞の集合体を得られる。この細胞群にウイルスを感染させると、ウイルスの増殖に必須の蛋白質がノックダウンされた細胞はウイルスによる細胞障害から免れて生き残ることが期待される。siRNA 技術は近い将来の臨床応用に向けて研究が進んでいる。本研究は、ウイルスの複製に必須の遺伝子をノックダウンできる siRNA を新しい抗ウイルス薬として開発することを最終目的とする。

B. 研究方法

1. ジェノファンクション社製 siRNA library の作製：

ジェノファンクション社が確立した 2 本鎖 DNA を原料とした siRNA 発現ベクターライブラリーの作製方法を応用して、レンチベクターベースの siRNA library を構築した。

2. B-Bridge 社製 siRNA library の作製：

B-Bridge 社の GeneNet siRNA ライブラリー (Human 8.5K siRNA Library) を用いた。

この siRNA library は、ヒトの既知の遺伝子 8,500 をターゲットにしており、遺伝子導入細胞を puromycin で選択できる。また、細胞への導入効率を検討するために、GFP を発現するレンチベクターを用いた。

3. siRNA library を発現する細胞の作製：
ワクチニアウイルスと西ナイルウイルスは HeLa 細胞に感染して細胞障害を起こすが、SARS ウイルスは HeLa 細胞に感染できない。そこで、HeLa 細胞に SARS ウイルスのレセプター ACE2 を安定に発現する細胞 (HeLa-A3) を作製し、レンチウイルス siRNA library (B-Bridge 社製) を感染させた。

4. 細胞へのウイルス感染：

上記細胞にワクチニアウイルス、西ナイルウイルス、SARS ウイルスを 0.05-0.1 m.o.i. で感染させて細胞の生死を観察した。

5. siRNA の遺伝子配列：

ウイルス感染後、生き残った細胞から RNA を抽出した。この RNA から RT-PCR により siRNA を増幅して塩基配列を決定した。

6. siRNA のトランスフェクション：

合成 GSK-3 β を PolyMag と Fugene6 を組み合わせで Vero E6 細胞にトランスフェクションした。

7. Western blot 法：

細胞の蛋白質を 10% もしくは 10-20% のグラジエントゲルを用いて、SDS-PAGE を行った。メンブタンに転写後、ブロッキングを行い、各種一次抗体を反応させた。約

18 時間後にメンブタンを洗浄後、二次抗体を 30 分反応させた。抗原抗体反応の検出は発光法を用いて行った。

8. JNK siRNA の作製 :

JNK の siRNA は塩基配列から siRNA の標的になると予測される部位を決定して合成した。

9. ヒトスジシマカ幼虫への siRNA の導入 :

96 穴プレートに 1 μ g/100 μ L になるように JNK の siRNA を調整し、1 穴に 1 匹の (*Aedes Albopictus*) 1 齢幼虫を入れて飼育し、幼虫の生死を観察した。これらの実験は大分大学・江下博士および福岡大学・佐藤博士の協力による。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト検体を用いず、また実験動物も使用していない。遺伝子組換え実験は、文部科学省の遺伝子組換え実験の承認を得て行っている。

C. 研究成果

1. siRNA library の構築 :

本システムでは、VSV-G シュードタイプのレンチウイルス感染により siRNA 発現遺伝子が染色体に組み込まれて発現するシステムになっている。ジェノファンクション社の library は、細胞で発現する全ての遺伝子を網羅的にノックダウンするように設計されており、B-Bridge 社製では 8,500 の遺伝子を標的にしている。これらを HeLa-A3 細胞に感染させると、ウイルス発現ベクターがゲノム配列に組み込まれ、挿入した siRNA 配列を発現す

る。本年度は B-Bridge 社製の siRNA library について検討した。GFP 発現ウイルスを用いて細胞への感染効率を調べると、Vero E6 細胞では極めて低頻度であったが、HeLa 細胞では効率良く細胞がベクターを取り込んでいたことが確認された。そこで、昨年度作製した SARS ウイルスレセプターである ACE2 を恒常的に発現する HeLa-A3 細胞を用いて、siRNA library を発現する細胞のストックを作製し、以後、実験毎にこの細胞ストックを使用することにした。

2. ワクチニアウイルスの感染実験 :

siRNA library を安定に発現する細胞では、コントロールの細胞と比較して、ワクチニアウイルス感染後の細胞死を免れた細胞群が観察された。これらの細胞はコロニーを形成したので、ひとつの細胞由来である可能性が高い。感染 7 日後に生存細胞群の RNA から RT-PCR により siRNA の cDNA を増幅して塩基配列を決定すると、アポトーシス関連等種々の遺伝子が検出された。しかし、この 20 塩基の対になる配列に若干の変異がみられた。また、生存細胞について更に観察を続けると、最終的には全て死滅した。

3. 西ナイルウイルスと SARS ウイルスの感染実験 :

ワクチニアウイルスでは siRNA の効果が観察されたのに対して、西ナイルウイルスや SARS ウイルスでは効果が見られなかった。

4. 合成 siRNA の効果 :

Vero E6 細胞はトランスフェクション効率が極めて悪い細胞であり、通常の方法では 1% 以下の導入効率である。そこで、磁気を利用

したトランスフェクション試薬 (PolyMag) と Fugene6 を組み合わせることにより、導入効率を上げる検討を行った。蛍光ラベルした合成 siRNA を用いて効率を判断したところ、100% の細胞にトランスフェクションできる条件を見出した。SantaCruz 社の GSK-3 β に対する siRNA を Vero E6 細胞にトランスフェクションしたところ、GSK-3 β の蛋白質は siRNA の効果により減少した。

5. 蚊の JNK siRNA の効率的な導入方法の確立と幼虫の脱皮障害:

昨年度の我々の研究成果から蚊における JNK の働きは細胞をアポトーシスによる死から回避する役割を果たしていることが明らかとなっている。そこで、ヒトスジシマカの 1 齢幼虫を JNK の siRNA 存在下で飼育すると、正常な脱皮が障害され発育不全により死亡することが明らかとなった。JNK-siRNA の曝露によるヒトスジシマカの一齢幼虫の死亡率は、 38.3 ± 20.4 %で、Scramble-siRNA の曝露による死亡率は、 15.0 ± 10.5 %であり、合成 JNK-siRNA との比較において、有意な差が観察された。

D. 考察

本年度は、3 年計画の 2 年次に相当する。昨年度はプラスミドベースの siRNA library を細胞にトランスフェクション後、ワクチニアウイルスを感染させても生存する細胞から siRNA プラスミドを抽出し、再度トランスフェクションとウイルス感染を繰り返したが、細胞障害やウイルスの増殖を抑制する効果のある siRNA を得ることはできなかった。その理由として、プラスミドをトランスフェクションすると細胞表面に非特異的にプラスミド

が結合することや、細胞を培養しているプレート表面に大量のプラスミドが付着していることにより、目的とするプラスミドの回収効率が低いと考えられた。そこで本年度は、細胞内で安定に siRNA を発現するシステムとして、レンチウイルスベースの siRNA library 発現細胞を作製し、効率よくウイルスの増殖を抑制する siRNA の同定を試みた。その結果、ワクチニアウイルスを感染後、一定期間、細胞死から逃れて生存する細胞群が観察されたことは、これらの細胞内でウイルスの増殖や細胞死に関連する遺伝子を標的とする siRNA が発現していることを示唆している。生存細胞群の siRNA は、アポトーシス関連遺伝子等種々の遺伝子に対するものであった。しかし、ウイルスの増殖を許しながら増える細胞では徐々に siRNA に変異が入ることにより細胞死が誘導された。一方、SARS ウイルスや西ナイルウイルスを感染させた場合には、生き残った細胞のコロニーはコントロールと比較しても有意な差はなかった。このことは、ウイルスによりアポトーシス関連遺伝子の誘導が異なることを示唆しているのかもしれない。また、siRNA による細胞遺伝子発現のノックダウンは 100%ではないため、ウイルスによっては感染障害や細胞死の抑制効果が見られなかった可能性がある。これらのウイルスに関しては、導入 siRNA に対するプローブを用いた DNA microarray により、感染後細胞死が生じる時期に特定の siRNA 発現細胞頻度が上昇するか否かを解析する必要がある。

本研究では蚊に効率よく siRNA を導入する方法も確立することができた。蚊における JNK の役割が明らかになるとともに、標的を西ナイルウイルスにすることによって、ウイルスに感染しない蚊を作出できる可能性があ

る。

E. 結論

レンチウイルスベースの siRNA library を構築した。Vero E6 細胞に効率良く感染するレンチウイルスベクターが無い場合、SARS ウイルスのレセプター ACE2 発現 HeLa-A3 細胞に siRNA library レンチウイルスを感染させ、siRNA library 発現細胞のストックを作製した。この細胞にワクチニアウイルスを感染させると、コントロールに比べてウイルス感染による細胞死を免れた細胞が多数観察された。これらの生存細胞で発現している siRNA の配列を決定すると、アポトーシス関連等種々の遺伝子が検出された。一方、SARS ウイルスや西ナイルウイルスを感染させた場合には、有意に生存細胞が多くはなかった。本研究では、最終的には Vero E6 細胞で候補 siRNA による遺伝子ノックダウンを行い siRNA の有効性を確認するため、GSK-3 β 遺伝子の合成 siRNA を用いて Vero E6 細胞で GSK-3 β 遺伝子発現を効率良く抑制する条件検討を行った。また、ヒトスジシマカの一齢幼虫に JNK の siRNA を効率良く導入する方法を開発し、脱皮時のアポトーシスを阻害することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of Cell Proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2006. 46: 236-243
 2. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006. 580: 1417-1424
 3. Tajima, S., Nukui, Y., Ito, M., Takasaki, M., Kurane, I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro *Virus Research* 116:38-44, 2006.
- ##### 2. 学会発表
1. 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS コロナウイルス感染細胞における Akt リン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
 2. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSV シュードタイプを用いた SARS-CoV 感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
 3. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV スパイクタンパク質と ACE2 の相互作用の VSV シュードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多
 4. Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 5. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M,

Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Synposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA

6. Tajima Sigeru, Yoko Nukui, Takasaki Tomohiko, Ichiro Kurane. Identification and characterization of deletion in the variable region located in 3' non-translated region of dengue type 1 virus. 2nd Asian regional dengue research network meeting. (Singapore) 2005 / September 28-30.
7. 田島茂、高崎智彦、倉根一郎. デング1型ウイルス3'非翻訳領域内variable領域の機能解析. 第53回日本ウイルス学会(横浜) 2005年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

平成17年度

創業等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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