

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	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－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－（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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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

所属 旭川医科大学 医学部
研究者 若宮 伸隆

研究要旨：肝臓分泌型 MBL と血管内皮膜型 CL-P1 の2つのコレクチンで、①MBL では、SCIDhu マウスを用いて HIV 感染阻止実験を行い MBL の中和効果を確認した。②CL-P1 では、細胞・個体レベルで生化学的・分子生物学的に、広範な機能解析を行い、基礎的知見を得た。

分担研究者

- (1)国立感染症研究所エイズ第1グループ 本多 三男
- (2)扶桑薬品工業(株)研究開発センター 岸 雄一郎
- (3)筑波大学大学院人間総合科学研究科
応用先端医学専攻臨床免疫学 堤 明人
- (4)昭和大学薬学部 板部 洋之

A. 研究目的

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。また人口の急速な高齢化とともに、疾病全体における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、その原因のひとつとして血管内皮への微生物感染や微生物の結合が加齢とともに蓄積され、そのことがトリガーになって血管内皮障害をおこす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遺伝子CL-P1の研究は、微生物や変性LDLなどが関与する血管炎の発症要因の解明には欠くべからざる方向性のひとつであり、また血管虚血・再灌流の際における血管損傷においてMBLを中心とするコレクチンの補体活性化や血管における微生物感染に対するMBLの役割を明らかにすることは非常に重要な研究課題であると認識している。本研究の結果として血管炎や異物の接着によっておこる血管の梗塞や損傷などの予防や新たな治療法・医薬品開発にユニークで大きな知的な貢献をもたらす可能性があり、ひいてはその

ことが生活習慣病の予防や治療に結びつき、社会に多大な貢献ができると考えている。

B. C. 研究方法と成果

若宮らは、ゲノムデータベースが充実してきた1996年に、新規コレクチン遺伝子断片を発見し、その断片から新規コレクチン遺伝子のクローニングに成功した(JBC1999, 2001)。それらのホモロジーから、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ CL-P1cDNA のクローニングを行い、その遺伝子ファミリーを明らかにしている。また、MBL は最初に発見されたコレクチンであるが、その生体での感染実験など、未だ明らかになっていない部分が多い。第2年度では、特に個体レベルの実験系では、MBLによるHIVの動物感染抑制の予備実験を、若宮・岸・本多の3つのグループで進めた。また、CL-P1の個体レベルの研究のために、ゼブラフィッシュ飼育と繁殖が順調に進行し、遺伝子ノックダウン実験が成功し、形態形成不全が認められ、その裏打ち実験を行い、その正当性を確認した。現在行っているそれぞれの研究について、以下に、方法とその成果をまとめる。

1. MBL 高発現株から得られる MBL の精製 (岸・本多・若宮・鈴木)

共同研究者である北海道大学鈴木定彦教授の協力により、新規 MBL 発現細胞株が樹立された。従来までの、MBL 高発現株も引き続き、培養を行い、細胞レベル、動物レベルの両 HIV ウイルス

感染阻止実験において、実験に供した。鈴木教授樹立による、新規 MBL 高発現株は、それぞれを市販培養液のいろいろな種類の CD (chemical defined) 培地で培養し、細胞密度を調節し、MBL サンプルを収集した。前年度行った、単純な比較では、ウェスタンブロット分析では、新規 MBL 高発現細胞株は、非常に高分子量型の MBL を産生する可能性のあることが推測された。さらに、得られた MBL 高発現株は、従来の発現株に比べて、発現量の多い点やより多量体形成が進んでいることが認められた。しかしながら、その検討をさらに押し進めた結果、培養条件によって、いろいろな多量体構造を形成することが、SDS-PAGE やゲルクロマトグラフィーから、明らかになった。現在、いろいろな培養条件を設定しながら、それぞれの条件での生化学的な解析を行い、さらにこの培養上清をあつめて、国立感染症研究所本多分担研究者に供与し、それぞれの MBL の *in vitro* 実験における抗ウイルス力価の定量を行っている。一方、MBL 自体の抗 HIV 作用の検討については、既存のリコンビナント MBL と現時点での新規 MBL 産生株からのいくつかのものをを用いて、実験室株とは異なる HIV 臨床分離株や多剤耐性 HIV に対して、抗ウイルス力価の比較定量をおこなうための、試料づくりをおこない、本多研究員に供与を行った。また、現在のところ、一次スクリーニングの段階での MBL 高発現細胞株の一次ストック後の、ストックからのもどし回復試験を行い、適正条件でストックがなされていることが確認できた。さらに、今後の実験には均一で、大量の MBL の産生が必要となることや、培養条件を常に同一条件に規定するためには、現在のフラスコ培養では、限界があり、ファーメンターを用いた、培養が重要な鍵になってくると考え、鈴木教授の協力を得て、培養条件のさらなる検討を共同で行っている。その後、これらの抗 HIV 作用の最も優れている MBL 発現細胞株の選別を行いつつ、2 次スクリーニングを並行して行い、株をプログラミングフリーズして、Master cell bank(MCB)とす

る予定となっている。これらの MBL 産生株実験の詳細な検討とともに、並行して、既存リコンビナント MBL と現時点での有力株からのリコンビナント MBL を用いて、SCIDhu マウスにおける、HIV 感染阻止実験を実験 2. の如く、小規模であるが開始したので、そのサンプル供与も同時に行った。

2. リコンビナント MBL 投与による HIV 感染阻止実験と予備動物実験での MBL monitoring システム構築 (岸・本多・若宮・鈴木)

リコンビナント MBL を用いて、個体レベルの両 HIV ウイルス感染阻止実験を行った。これらのすべての作業は、旭川医科大学、感染研、扶桑薬品工業の 3 機関と北大鈴木教授との協力で施行された。はじめに、NOD scid マウスへの正常ヒト PBMC の腹腔移植により、2 週間後にヒトリンパ組織の移植が成立したマウス (SCIDhu マウス) を作成し、このマウスの系に、HIV を接種し、抑制実験システムを作った。既存リコンビナント MBL (2-12 株) と現時点での有力株 (M01P05) よりリコンビナント MBL を精製して、上記 SCIDhu マウスを用いた HIV 感染阻止実験を、小規模ながら開始した。上記 2 種類のリコンビナント MBL を腹腔内に 45 mg/kg の濃度で投与し、その後 HIV 野生株 HIV-1 MNp を 200 TCID₅₀ にて腹腔接種した。2 週間後に血中ウイルスコピー数を測定することで 各 MBL の HIV-1 感染防御能を評価した。リコンビナント MBL では、抗 HIV-V3 モノクローナル抗体を高単位使った感染防御試験のような、完全な Protection はおこらなかったが、*in vitro* 同様に、明らかに 2-12 株はウイルスに対して増殖抑制活性を示した。また、Native MBL を接種したマウスは 2 匹中 1 匹が完全な防御能を示した。

さらに上記で、樹立された SCIDhu マウスにおいて、MBL 一回投与における実験系を組み立て 2 種類のリコンビナントヒト MBL のマウス血中でのモニターリングを行った。マウス血中では、投与された一日後にリコンビナントヒト MBL は、投与時の 5~10 % の血中濃度になることが明ら

かになり、その 2 日後においてはさらに、その 10 %前後に減衰し、10 日後にはすべての群においてまったくリコンビナントヒト MBL は、血中では認められなくなった。

3. CL-P1 の細胞レベルの発現調節の検討 (若宮)
CL-P1 を発現する細胞としては、すでにヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell = HUVEC) が明らかになっているが、それ以外にも肝癌細胞株である HepG2 細胞が、CL-P1 発現細胞株であることが明らかになった。はじめに、種々のストレスに対する発現誘導を mRNA レベルで探索した。昨年は、低酸素後再酸素化刺激と TNF や過酸化水素などの刺激を行ったが、本年度は、ニコチンを用いて、同様な処理を行い、real time PCR により CL-P1 の定量を行った。方法としては、培養細胞から、TRIzol Reagent を用いて、全 RNA を調整し、クロロホルム、2-プロパノールで RNA を分離した。75%エタノールで洗浄後、ペレットを乾燥し、DEPC 処理水にて溶解した。抽出した総 RNA は分光光度計を用いて濃度を測定した。cDNA の調製は TaqMan Reverse Transcription Reagent (アプライドバイオシステムズ社製) により行った。得られた total RNA 1 μ g に、5 μ l 10x RT Buffer, 11 μ l 25mM MgCl₂, 10 μ l dNTP Mixture, 2.5 μ l Oligo(dT)₁₈ primer, 1 μ l RNase Inhibitor, 1.25 μ l MultiScribe Reverse Transcriptase を添加し、DEPC 水で総量 50 μ l とした。25°C 10 分、48°C 30 分、95°C 5 分のプログラムで逆転写反応を行い、cDNA を調製した。相対定量は、7500 Real-Time PCR System (アプライドバイオシステムズ社製) を用いた方法で行った。リアルタイム PCR は TaqMan Universal PCR Master Mix およびプライマーとプローブのセットである TaqMan Gene Expression Assays (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行った。逆転写反応を行って得た cDNA 2.5 μ l に Universal Master Mix 12.5 μ l および TaqMan Gene Expression Assay 1.25 μ l を添加し、滅菌蒸留水で総量 25 μ l とした。ヒト CL-P1, LOX-1, MBL の Gene Expression Assay はアプライドバイオシステムズ社のウェブ

サイトの検索ツールを用いて選択、購入した。内部標準には GAPDH (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。Uracil N-glycosylase 活性化 50°C 2 分、プレヒート 95°C 10 分の後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 60 サイクル行う標準プログラムで PCR を行った。PCR 後 RQ ソフトウェア (アプライドバイオシステムズ社) を用い、比較 C_T 法 ($\Delta\Delta C_T$ 法) にて解析を行った。昨年に行った低酸素後再酸素化刺激においては、HUVEC は、遷延性 CL-P1 の発現誘導が見出された。さらに、TNF や過酸化水素などの刺激においても、低酸素化再酸素化と同様の遷延性亢進が見られたが、ニコチンを用いた反応では、非常に高濃度処理後においても、ほとんど CL-P1 の誘導は認められなかった。

4. CL-P1 の機能ドメインの検討 (若宮)

CL-P1 発現 CHO 細胞 (CL-P1/CHO) を用いた、CL-P1 分子の機能ドメインの役割を明らかにするために、CL-P1 の機能ドメイン欠損発現 CHO 細胞の single cell sorting を行い、発現細胞株を新たに樹立した。新たな細胞株は、レクチン部分欠損株 CL-P1/CHO Δ CRD とコラーゲン領域欠損株 CL-P1/CHO Δ collagen と名づけ、親株である CHO 細胞と CL-P1/CHO を用いて、各種リガンドに対する、ドメインの結合機能解析を行った。はじめに糖鎖プローブを用いた解析では、初期ロットでは、陽性荷電を有する酸性糖について、その荷電による結合が見られたが、2 回目のロットの糖鎖プローブでは、微量な結合は見られるが、前回ほど顕著な結合は見られなかった。糖特異性に関しては、GalNAc, Gal, Lex, Glu, Man6P, NeuAc の結合を検討し、GalNAc, Gal, Lex, Glu に特異的な結合が認められた。また、酸化変性コレステロールである OxLDL の結合においては、その特異性では、AcLDL の結合に比べて、CL-P1/CHO では、優位に結合することが認められた。しかし、AcLDL については、CL-P1 の高発現株クローン (高 CL-P1/CHO) では弱い結合が認められ、CL-P1/CHO Δ collagen ではまったく結合が認められなかった。OxLDL の CL-P1 に対する強い結合特異性には劣るが、AcLDL に対しても、弱い結合活性があることが確認でき

た。また、糖鎖プローブや変性 LDL に対する結合が、生細胞での結合と固定した死細胞での結合活性を比較検討した。その結果、糖結合活性は、死細胞でも生細胞と同様に保存されることが認められた。しかし、変性 LDL との結合においては、生細胞でのみ結合が認められ、死細胞では表面における結合はほとんど認められなかった。

5. ヒト臍帯静脈細胞株 (HUVEC) における CL-P1 の貪食における役割検討 (若宮)

ヒト臍帯静脈細胞株 (HUVEC) において、CL-P1 の細胞レベルでの機能をあきらかにする目的で、CL-P1 の siRNA を行い、一分子抑制による、機能動態を観察した。CL-P1 遺伝子強制発現細胞 CL-P1/CHO を用いて、NucleofectorII を用いて、CL-P1 の siRNA の検討を行った。siRNA としては、4 種類の mixture を用いて、初期実験を行い、条件検討を行った。さらに、CL-P1 の発現抑制は、real time PCR にて、mRNA の定量を行い、比較検討した。CL-P1 の siRNA に先んじて、HUVEC におけるファゴサイトーシスに関わる因子を、real time PCR を用いて mRNA の定量を行い、内部標準との比較により関連因子間の mRNA 発現量の比較を行った。HUVEC を CL-P1 siRNA を行ってから、2 日後 35mm ガラスボトムディッシュに培養し、zymosan A を培地に添加し、4°C、30 分間インキュベートし、洗浄後、さらに 2 時間 37°C にて培養した。4°C 下、抗 zymosan A ポリクローナル抗体および Alexa488 標識抗ウサギ IgG でラベルした。細胞を固定後、浸透化し、細胞内に取り込まれた zymosan A および細胞外に結合した zymosan A を抗 zymosan A ポリクローナル抗体および Alexa594 標識抗ウサギ IgG でラベルした。Alexa594 および Alexa488 で検出される粒子は細胞外に結合したもの、Alexa594 のみで検出される粒子は細胞内に取り込まれたものであると見なし、両者を判別して、ファゴサイトーシスされた zymosan A を測定した。HUVEC におけるスカベンジャー受容体の mRNA 発現では CL-P1 は、測定したなかではもっとも多量に存在していた。また、通常状態では LOX-1, SR-A, MARCO, Stabilin2 などのスカベンジャー受容体は

検出限界値以下のレベルであった。そのなかで CL-P1 の siRNA を行ったが、CL-P1 の mRNA と蛋白の抑制のみで、他のスカベンジャー受容体の mRNA レベルでの抑制・亢進に影響を及ぼさなかった。また、血管増殖因子やその受容体群への影響も認めなかった。HUVEC におけるファゴサイトーシスを zymosan A の取り込みを、予備実験であるが、1 株の HUVEC で比較検討した。その結果、siRNA による CL-P1 発現抑制に依存して、zymosan A の取り込みが低下する結果を得た。

6. CL-P1 のヒトにおける組織発現解析 (若宮)

ヒト CL-P1 に対するマウスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を用いて、ヒト正常組織における CL-P1 発現を組織免疫染色法にて、検討した。組織は市販サンプル、旭川医科大学医学部内科学第 3 講座や外科学第 2 講座にて、インフォームドコンセントの得られたヒト組織を用いて行った。本組織は即時に 4%パラホルムアルデハイドで 4°C 0/N で固定した。その後パラフィンブロックを作成し、超薄切片を作成し、上記 2 種類の抗体を用いて、2 次抗体としてそれぞれの ABC 法を用いて、染色を行った。今回は、ヒト全身組織における種々の血管部位に、普遍的に CL-P1 の発現が観察された。しかも血管では、すべての血管に均一に発現するのではなく、組織のいろんな部位や血管の大きさで差があることが明らかになった。

7. 個体レベルでの CL-P1 発現意義の解析 (若宮)

CL-P1 の個体レベルの研究のために、ゼブラフィッシュ CL-P1 (zCL-P1) 遺伝子のノックダウン解析を行った。まず、初年度に zCL-P1 の受精後の embryo 発育早期 (受精後 9 時間) に mRNA が発現し、血管内皮に局在していることを認めていたが、さらに今年度は、zCL-P1 とその発現に関連すると考えられる CL-P1 関連遺伝子を相対的に定量した。方法は、研究 3. で行った、アプライドバイオシステムズ社による real time PCR 法により、mRNA の定量を行った。その結果、受精直後に VEGF と VEGF receptor 群の一過性の発現亢進があり、その後 24 時間後から持続する発現亢進が認められ

た。CL-P1 は 24 時間をピークとする発現亢進が認められ、その発現様式は Tie-2 と類似していた。モルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた、zCL-P1 遺伝子のノックダウン解析では、3 種類のモルフォリノオリゴにすべて、形態形成の不全が認められた。遺伝子ノックダウン実験では、モルフォリノオリゴの量依存性に形質変化が見られること、zCL-P1 mRNA の同時添加により形質が正常に回復すること、5 base-mismatch モルフォリノオリゴ投与では形質変化が見られないこと、などの確認ができた。これらの実験結果から、zCL-P1 遺伝子モルフォリノオリゴヌクレオチド依存性に zCL-P1 蛋白がノックダウンされることによって、特異的に形態形成不全のおこることがあきらかになった。

8. HIV における *in vitro* MBL 感染阻止実験 (本多・岸・若宮・鈴木)

末梢血単球 (PBMC) を用いたウイルス抑制効果の測定を行った。PBMC assay では 100TCID₅₀ になるようにウイルスを希釈した。予め MBL と PBMC、MBL とウイルスをそれぞれ 37°C 1 時間反応させた後これらを mix した。コントロールには MBL の代わりに medium を用いた。翌日洗浄し新たに MBL を加え感染後 1 週間後の p24 を測定した。感染抑制率はコントロールの p24 に比較し、何%抑制したかをそれぞれの MBL 濃度から計算した。また、これらよりウイルスを 50% 阻止する MBL の濃度 (IC₅₀) を求めた。IC₅₀ を解析した所、サブタイプ、トロピズム、PI/TCLA を越えて、MBL が HIV の感染抑制をおこすことが明らかになり MBL の有用性が示唆された。さらに種々のサブタイプの薬剤耐性株においては MBL で効率的に抑制されるウイルスや高濃度で抑制されるウイルスなどさまざまだったが、薬剤耐性株においても MBL で有為に中和されることが確認され、これらの事により MBL は薬剤耐性株においてもその有用性が明らかとなった。

9. マウスにおける OxLDL の測定系の構築と質量分析による OxLDL の解析 (板部)

昨年度の研究で、apoE ノックアウトマウス LDL 画分より抽出した apoB-48 をウサギに免疫し、抗マ

ウス apoB ポリクローナル抗体 (ウサギ抗血清硫酸沈殿画分) を作成した。この抗体を用いて、マウス酸化 LDL への反応性が得られることが確かめられている。本年度は、用いる抗体の濃度、ブロッキングの条件、インキュベーション温度など、個々の測定操作の条件を詳しく検討し、測定条件の最適化を図った。その結果、0.01ng 程度の酸化 LDL でも検出可能な測定条件を確立することができた。従来、ヒト酸化 LDL の測定系では、0.5~10ng 程度の範囲で直線的な検量線が得られ 0.1ng を確実に測定するのはかなり困難であった。今回の検討により、数 10 倍以上感度を向上させることができ、これにより収量が制限されるマウスでの測定の実用化に大きく貢献した。

近年、質量分析計が高分子物質を含めた様々な生体成分の解析に応用され、大きな成果を生み出している。そこで、酸化的修飾を受けた他の朴氏角修飾構造を LC/MS/MS で解析することを試みた。本年度は、モデル蛋白としてインスリンを用い、あるいは LDL の apoB をいくつかの脂質過酸化産物で修飾した際の、変性ペプチドを分析することに成功した。インスリンを代表的な脂質過酸化生成物であるアクロレイン、4-HNE、または 9CHO-PC で前処理した。これらのトリプシン消化物を LC/MS/MS 装置にて分析した。アクロレインは、リシン残基のアミノ基に結合して消化ペプチドの分子量を 76.0 マス増加させる。このような変化を示した同様に、HNE によりヒスチジン残基あるいはリシン残基への付加物が生じ 156.1 マスの増加として検出された。9CHO-PC 処理により修飾されたペプチドからは、二次分解フラグメントイオンとして m/z=184 を生じる性質を利用して検出できることがわかった。修飾した LDL から得た、apoB のトリプシン消化物からも、アクロレイン修飾、および 4-HNE 修飾されたペプチドフラグメントが検出できた。これらのフラグメントは、さらに MS/MS 解析により、これらのアミノ酸配列も同定し、apoB 上での複数の修飾部位を同定することができた。

10. SLE 患者と慢性歯周病患者の MBL 遺伝子解析と MBL と SP-D に対する自己抗体検出 (堤・若宮)

SLE もしくは慢性歯周病患者および健常人の末梢

血よりゲノム遺伝子を調整し、MBL コドン 54 遺伝子多型 (アリアル A/B) を PCR-RFLP 法により判定した。血中の MBL 濃度は ELISA により測定した。また抗 MBL 自己抗体は MBL と IgG の糖鎖との結合を阻害するため EDTA を加えた ELISA にて測定した。

抗 SP-D 抗体の検出には液相で蛋白同士の結合を検出可能とされるオリンパス社製一分子蛍光分析システムを用いた。その結果、抗 MBL 抗体は検索の終了した SLE 患者 132 名中 12 名で健常人の平均+2SD より高値であり、健常人の 113 名中 2 名より有意に高頻度であった。さらにヨーロッパ人 SLE 患者 149 名で同様に抗体を測定したところ 24 名で抗体価が高値であった。慢性歯周病患者 98 名の MBL 遺伝子解析を行ったところ、AA58 名、AB36 名、BB4 名であり、歯周病を有さない健常人 67 名中 AA45 名、AB18 名、BB4 名に比し、B アリアルを持つ頻度がやや高い傾向であったが有意差は認められなかった。さらに、慢性歯周病の重症度との関連を検討したところ、軽症 4 名は全員 AA、中等症 43 名は AA29 名、AB14 名、重症 51 名は AA25 名、AB22 名、BB4 名であり、保持する B アリアルの数と慢性歯周病の重症度の間に関連が見られた。抗 SP-D 自己抗体は ELISA 法では陽性例を発見できなかった。一方一分子蛍光分析システムを用いた検討では SLE 患者 20 名の精製 IgG のうち 3 名分について diffusion time の延長と非標識 SP-D 添加による延長の阻害が見られ、抗 SP-D 抗体存在の可能性が考えられた。

(倫理面での配慮) ヒトゲノム検査や組織採取は、旭川医科大学・筑波大学の倫理委員会の承認を得て、その規定に基づき、各位に書面によるインフォームドコンセントをとり、了解の得られた人のみに採血や組織採取を行い、実験材料として用いた。歯周病患者および対象健常人についても新潟大学で同様の手続きを経て採取されたものを使用した。ヨーロッパの共同研究施設より得た SLE 患者血清も同様の手続きを経た後採取されたものである。また、動物実験においては、動物愛護の精神にのっとり、旭川医科大学実験動物取り扱い規定に従い、国立感染症研究所では、所内の規定に

のっとり、行った。HIV を用いた病原性ウイルス検討のための動物モデルの検体はすべて P3 レベルの病原体として扱い、個々の研究所、大学、病院のバイオハザード関連委員会において承認を得ている。組換え DNA 実験に関しては、組換え DNA 実験指針に従い、各機関の委員会の許可を得ている。

D. 考察

コレクチン分子については、約 100 年前から、その存在は明らかになっていたが、川崎らの発表が生化学的な最初の同定であった。その後、肺に存在するサーファクタントからの 2 種のアポリポプロテインの存在が明らかになり、古典的には 3 つのコレクチンファミリー (MBL, SP-A, SP-D) が報告されてきた。主任研究者である若宮は reverse genetic の手法を用いて新たに 3 つのコレクチン遺伝子群 (CL-L1=COLEC10, CL-P1=COLEC12, CL-K1=COLEC11) を同定した。その中で CL-P1 は、組織における免疫染色で、血管内皮細胞に存在する膜型のコレクチンであった。本研究では、特に MBL と CL-P1 の 2 つのコレクチンに焦点をあてて、その血管における生体防御への応用を目指している。特に、MBL においては、前年度までの 3 ヶ年において、in vitro で抗 HIV 効果を広範に検討してきた。MBL 研究は、レクチンプロジェクト班のメンテナーマと捉えており、若宮、本多、岸 (大学、国立研究所、会社) による産官学 3 者と共同研究者である北大鈴木教授とで取り組んでいる。昨年度からの 3 ヶ年で、動物での抗 HIV 効果を検討し、医療応用への第一歩を進ませたいと考えている。第 2 年度は、ヒトリンパ組織の移植が成立したマウス (SCIDhu マウス) に、HIV を接種し、腹腔内に 45 mg/kg の濃度でのリコンビナント MBL の投与で、HIV-1 感染防御能を見出した。効果としては、抗 HIV-V3 モノクローナル抗体の高単位投与に比べると、完全な Protection はおこらなかったが、in vitro と同様、明らかに 2-12 株は増殖抑制活性を示した。また、Native MBL を接種したマウスは 2 匹中 1 匹が完全な防御能を示した。並

行して行った、MBLの血中での動態を見た実験では、投与されたリコンビナントヒトMBLは、1日で元の血中濃度の5~10%になることが明らかになり、この早い血中リコンビナントヒトMBL減少に興味ぶかい。今後どのような投与方法が適しているのか？また、天然型がより血中で安定なのか？臨床応用前にどの動物に対する投与実験が必要なのか、部外者の専門家に相談する予定である。

一方、HIVのワクチン開発を考える上で重要なポイントとしては、broadな中和効果を示される点にある。ウイルスの感染抑制は本年度の研究で、MBLがより多くのウイルスにおいて*in vitro*で、サブタイプ、ケモカインレセプターの親和性を超え、さらにPI/TCLAも超え、機能する事が明らかになった。MBLはモノクローナル抗体と異なり、特定のアミノ酸を認識するのではなく糖鎖を認識するために、さまざまなサブタイプ、トロピズムに対応して結合でき、中和することができるのではないかと推測している。また、多剤耐性ウイルス株でもウイルスの感染を抑制できた事により、MBLは*in vitro*において非常に有用であると考えられた。生体に内因性に存在する事実より、安全なワクチン候補をして考えられ、現在、いろんな条件でMBL効果の再検討を行い、高額の予算が必要になると考えられるが、サルエイズでの動物実験モデルでの評価を行うことを検討している。

また、リコンビナントMBL発現細胞株においても、多くの基礎的な知見が集まりつつある。リコンビナント蛋白質では、高い産生量と安定が、もっとも重要なポイントであると通常は考えられてきたが、本実験系では、遺伝子発現細胞株ごとにおいて生物学的活性が異なっていることが明らかになり、セレクションの新基準の必要性を感じている。

CL-P1の検討では、まず細胞レベルでは、ヒト血管内皮細胞HUVECでは、SiRNA実験によりファゴサイトーシス機能において、おもにCL-P1が関与することが明らかになった。昨年明らかにしたCL-P1細胞内領域に結合する分子であるadaptor複合体の $\mu 2$ サブユニットとCL-P1の関わりを突

破口にさらに一步進んだ検討が期待できる。HUVECは、正常なヒト由来細胞であり、つぎにそれらの個体差やまたSNPsのことも含めたデータを集めながら、食食やエンドサイトーシスに関わるCL-P1の役割について研究を展開することを考えている。さらに、CL-P1の欠損ミュータントを用いた、細胞レベルの検討から、細胞表面のCL-P1のレクチン活性そのものは、パラホルムアルデハイドによる固定で、結合活性は保存されるが、OxLDLに対する結合活性は、レクチン活性に依存せず電荷依存性であるために本固定で、結合活性が損なわれることが明らかになった。

CL-P1発現の広範な免疫組織染色の検討から、血管部位以外にもCL-P1が認められたことは、われわれにとって大きな驚きであった。コントロール血清では同一部位に染色されないことより、CL-P1蛋白質の可能性が高いことが示された。現在までにCL-P1では、細胞質発現を推測させるspliced variantsについての報告もなく、組織免疫染色における抗原添加による抑制試験や*in situ hybridization*によるmRNAレベルでの確認などの、さらなる検討とその本体の同定が次の課題である。現在までは、新規蛋白質は、その生化学的なアプローチで、酵素活性測定などで臓器におけるその分子の発現量を計量してきた歴史がある。しかしCL-P1のような、reverse geneticからのアプローチで発見された新規分子の局在とその量の証明は難しさが伴う。申請者らのアプローチは、リコンビナント部分蛋白作成からの、良質な抗体の作成とそれを用いた免疫組織染色と今回用いたreal time PCRによるmRNAの定量である。しかしながら、これらも一長一短があり、相互の組み合わせによる総合的な解析が重要であることが理解できた。また、下等な脊椎動物である魚類においても、同様のアプローチで、ゼブラフィッシュCL-P1のリコンビナント部分蛋白を発現させ、その特異抗体作成を行い、免疫組織染色により、魚類の血管に存在するCL-P1を証明した。げっし類以下の下等動物である魚類における初めてのスカベンジャー受容体の発見であった。さらに、その生理的役

割としては、ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子ノックダウンによる形態形成不全という形質変化から、CL-P1 が魚類の初期形態形成に深く関わるということが推測されている。いままで、スカベンジャー受容体が初期形態形成に関わる報告はなく、驚くべき結果が得られている。従来、スカベンジャー受容体はマウスのノックアウト実験から、自然免疫の面に焦点が当てられており、類似の機能を持つと予想されてきた本遺伝子であるが、この初期形態形成の関与や高度に動物間で遺伝子が保存されている事実などから、その新たな生理的な重要な役割が期待される。

MBL の遺伝子多型と SLE 発症との関連はメタアナリシスでも示されており、SLE の病態を考える上でも興味深い。今回供与されたヨーロッパ人 SLE 患者は疾患活動性の高い患者、内頸動脈内膜中膜肥厚の程度を判定してある患者が多数含まれており、これらの患者の血中 MBL 濃度および抗 MBL 自己抗体濃度とこれらの所見との関連を検討する予定である。慢性歯周病は世界で罹患者が最も多い感染症の一つであり、その進行は高齢者の生活の質に大きな影響を与える。今回の結果が確認できれば、歯周病発症早期に重症化するリスクの高い患者群を明らかにして、適切な患者教育などにより予後を改善させることが期待できる。

E. 結論

前回3カ年でのHS総合事業では、遺伝子クローニングとその細胞レベルでの解析が進み、その後の研究のための材料作りに集中したが、本3カ年の取組では、より個体レベルでの機能解析に焦点をおいている。第2年度の成果の総括としては、MBL では、個体レベルでの、HIV を用いた P3 感染実験がようやく進展した。岸・本多分担研究員と共同で、国立感染症研究所 P3 実験室において、SCIDhu マウスでの感染抑制実験が始まり、MBL の抑制効果の一端が明らかになっている。同時に、実験に使用する MBL の大量作成システムの遂行とマウスで投与された MBL 測定も行われた。また、CL-P1 の動物レベルの実験では、相変わらずマウ

スのノックアウト実験では、難渋しているが、ゼブラフィッシュの RNAi 実験で、受精後初期の分化発生や形態形成に CL-P1 が深く関わっていることが認められた。げっし類以下の下等動物での初めてのスカベンジャー受容体の発見とその分子が発生早期の血管形成に重要な役割をもつことが初めて明らかになった。

これらの CL-P1 研究においても、数種の抗体が作成され、ヒトやラットやゼブラフィッシュに対する免疫組織染色系が確立され、その成果として、ヒト血管において、正常状態で CL-P1 が発現していることが確認できた。CL-P1、MBL とともに、リコンビナント蛋白発現系や抗体作成による測定系も、すべて自前で作成しているので、研究成果がでるのに時間はかかっているが、動物モデルやヒトでの個体レベルでのコレクチンの機能が明らかになり、着実に進展した2年度であったと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takahashi, R. Tsutsumi, A. Ohtani, K. Mukai, Y. Goto, D. Matsumoto, I. Wakamiya, N Sumida, T.: Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64: 311-314, 2005.
- Kitamoto, N., Kobayashi, T., Kato, Y., Wakamiya, N., Ikuta, K., Tanaka, T., Ueda, S., Miyamoto, H., Kato, S.: Preparation of monoclonal antibodies cross-reactive with Orthopoxviruses and their application for direct immunofluorescence test. *Microbiol. Immunol.* 49(3): 219-225. 2005.
- Takahashi R, Tsutsumi A. Ohtani K, Wakamiya N. Sumida T.:Lack of relationship between mannose-binding lectin variant alleles and risk of arterial thrombosis in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Mod. Rheumatol.* 15: 459-460, 2005.
- Koide T, Nishikawa Y, Asada S, Yamazaki CM,

- Takahara Y, Homma DL, Otaka A, Ohtani K, Wakamiya N, Nagata K, Kitagawa K.: Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem*. In press.
- Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus *gag/pol*. *J. Immunol.* 179: 1784-1795, 2006.
 - Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N, Honda M. Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J. Immunol. Methods* in press
 - Eda Y, Takizawa M, Murakami T, Maeda H, Kimachi K, Yonemura H, Koyanagi S, Shiosaki K, Higuchi H, Makizumi K, Nakashima T, Osatomi K, Tokiyoshi S, Matsushita S, Zolla-Pazner S, Yamamoto N, Honda M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J. Virol.* in press
 - Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses *ex vivo* generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* in press,
 - Kiguchi H, Ito K, Itabe H, Ishii T.: Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development. *Mod. Pathol.*, 18 (2005) 365-373.
 - Kawamura, K., Ishikawa, K., Wada, Y., Matsumoto, H., Itabe, H., Kodama, T. and Maruyama, Y.: Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction against pro-inflammatory stresses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25 (2005) 155-160.
 - Uno M., Harada, M., Takimoto, O., Kitasato, K., Suzue, A., Yoneda, K., Morita, N., Itabe, H. and Nagahiro, S.: Elevation of plasma oxidized LDL in acute stroke patients is associated with ischemic lesions depicted by DWI and predictive of infarct enlargement. *Neurol. Res.* 27 (2005) 94-102.
 - Yoshimi, N., Ikura, Y., Sugama, Y., Ohsawa, M., Hai, E., Kayo, S., Shirai, N., Yamamoto, S., Inoue, Y., Itabe, H., Yoshikawa, J. and Ueda, M.: Oxidized phosphatidylcholine in alveolar macrophages in idiopathic interstitial pneumonias. *Lung*, 183 (2005) 109-121.
 - Higashi, Y., Pen, T., Du, J., Suhkanov, S., Li, Y., Itabe, H., Parthasarathy, S. and Delafontaine, P.: A redox-sensitive pathway is involved in oxidized LDL- induced downregulation of insulin-like growth factor-1 receptor. *J. Lipid Res.* 46, (2005) 1266-1277.
 - Masuda, Y., Itabe, H., Odaki, M., Hama, K., Fujimoto, Y., Mori, M, Sasabe, N., Aoki, J., Arai, H. and Takano, T.: ADRP/adipophilin is degraded through proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J. Lipid Res.* 48 (2006) 87-98
 - 大谷克城、若宮伸隆: 補体系異常と感染 臨床と微生物 32(3): 261-267, 2005.

- 大谷克城、鈴木定彦、若宮伸隆:コレクチンとその免疫応答における役割 臨床免疫 印刷中
 - 高橋令子、堤明人、住田孝之: Systemic lupus erythematosus (SLE)における抗 Mannose binding lectin (MBL)抗体, 臨床免疫, 43:318-321,2005.
2. 学会発表
- 若宮伸隆:コレクチンに関する臨床応用開発研究と基礎機能解析:第3回糖鎖コンソーシアム 2005.12.東京
 - 福澤純、小山聡、長谷部直幸、菊池健次郎、大谷克城、若宮伸隆:新規スカベンジャー受容体発見に関わるバイオインフォマティクスの応用, 第53回日本心臓病学会学術集会(2005年9月,大阪)
 - 大谷克城、小山聡、福田光子、福澤純、若宮伸隆:膜結合型コレクチン CL-P1 の個体における機能解析.第25回日本糖質学会(2005年7月、大津)
 - 小山聡、大谷克城、張成宰、福應温、小笠原正洋、福澤純、若宮伸隆:膜結合型レクチン CL-P1 の一過性虚血・再灌流負荷における発現動態. 第78回日本生化学会大会(2005年10月、神戸)
 - 福田光子、伊藤愛子、吉崎隆之、佐藤秀憲、本村亘、大谷克城、吉田逸朗、若宮伸隆:ゼブラフィッシュ CL-P1 の機能解析. 第78回日本生化学会大会(2005年10月、神戸)
 - 滝澤万理、大谷克城、岸雄一郎、坂本隆志、鈴木定彦、若宮伸隆、本多三男: Mannose binding lectin による HIV-1 複製の非特異的抑制効果. 第35回日本免疫学会(2005年12月、横浜)
 - Fukuzawa J, Sakuragi H, Koyama S, Yao N, Fujino T, Haneda T, Nishira J, Wakamiya N, Hasebe N, Kikuchi K. Macrophage migration inhibitory factor stimulates ischemia-induced neovascularization by increased VEGF and MMP-9 expression mediated through macrophage accumulation. 78th Scientific sessions, American Heart Association (November 2005, Dallas, TX, USA)
 - Fukuda, M. Ohtani, K. Ito, A. Motomura, W. Suzuki, Y. Wakamiya, N. Molecular cloning and characterization of zebrafish CL-P1 gene. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy), 2005.
 - Jang, S-J, Fukuoh, A, Ohtani, K, Ogasawara, M, Suzuki, Y, Wakamiya, N. Adaptin Medium Chain 2 is involved in Scavenger Receptor CL-P1-Mediated Phagocytosis. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy), 2005.
 - Suzuki, Y, Takizawa, M, Sakamoto, T, Kishi, Y, Ohtani, K, Honda, M, Wakamiya, N. Mannose Binding Lectin (MBL) Broadly Neutralizes HIV-1 clade B, B', E, D, 18th International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy), 2005.
 - Koyama, S, Ohtani, K, Jang, S-J, Itabe, H, Fukuzawa, J, Suzuki, Wakamiya, N. The membrane type collectin CL-P1 is up-regulated in ischemia/reperfusion condition. 18th. International Symposium on Glycoconjugates, Firenze (Italy), 2005.
 - 板部洋之:動脈硬化発症に影響する種々のリポタンパク質 第18回糖尿病フォーラム・イン・広島 2005、広島、シンポジウム
 - 板部洋之:細胞内脂質蓄積と動脈硬化 第2回若手脂質研究者の集い、2005、東京、シンポジウム
 - 堤明人、杉原誠人、鈴木豪、林太智、千野裕介、後藤大輔、松本功、伊藤聡、住田孝之:全身性エリテマトーデス患者におけるマンノース結合レクチン (MBL) および抗 MBL 抗体. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2005.4.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
特記なし

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