

平成17年度

# 若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## HS 研究

### 第1分野

#### 課題番号

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告） 西田基宏 …… 1

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告） 西田基宏 …… 6

KH13302 再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発 川端健二 …… 10

### 第2分野

KH23303 腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究 増田智先 …… 15

KH23304 Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用 中道一生 …… 22

KH23306 吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究 伊澤晴彦 …… 27

KH23307 アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発 大喜多 肇 …… 34

KH23331 寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究 中野由美子 …… 39

### 第3分野

KH33308 向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究 橋本亮太 …… 47

KH33309 ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測 小林カオル …… 55

KH33310 薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究 田辺公一 …… 60

KH33332 制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究 川上浩司 …… 65

### 第5分野

KH53312 LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究 伊豫田 淳 …… 69

KH53313 遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発 岡田直貴 …… 74

KH53314 PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究 小島伸介 …… 84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 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



## 治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第一部  
研究者 林 昌宏

研究要旨 世界的な流行地域の拡大が続く致死的な Dengue 出血熱の Fc $\gamma$  受容体を介する病態形成機序を宿主・ウイルス間の相互作用の見地から解明するため、Dengue ウイルス 2 型および 3 型を患者血清から分離するとともに Fc $\gamma$  IIA 受容体を Vero 細胞に導入した。

### A. 研究目的

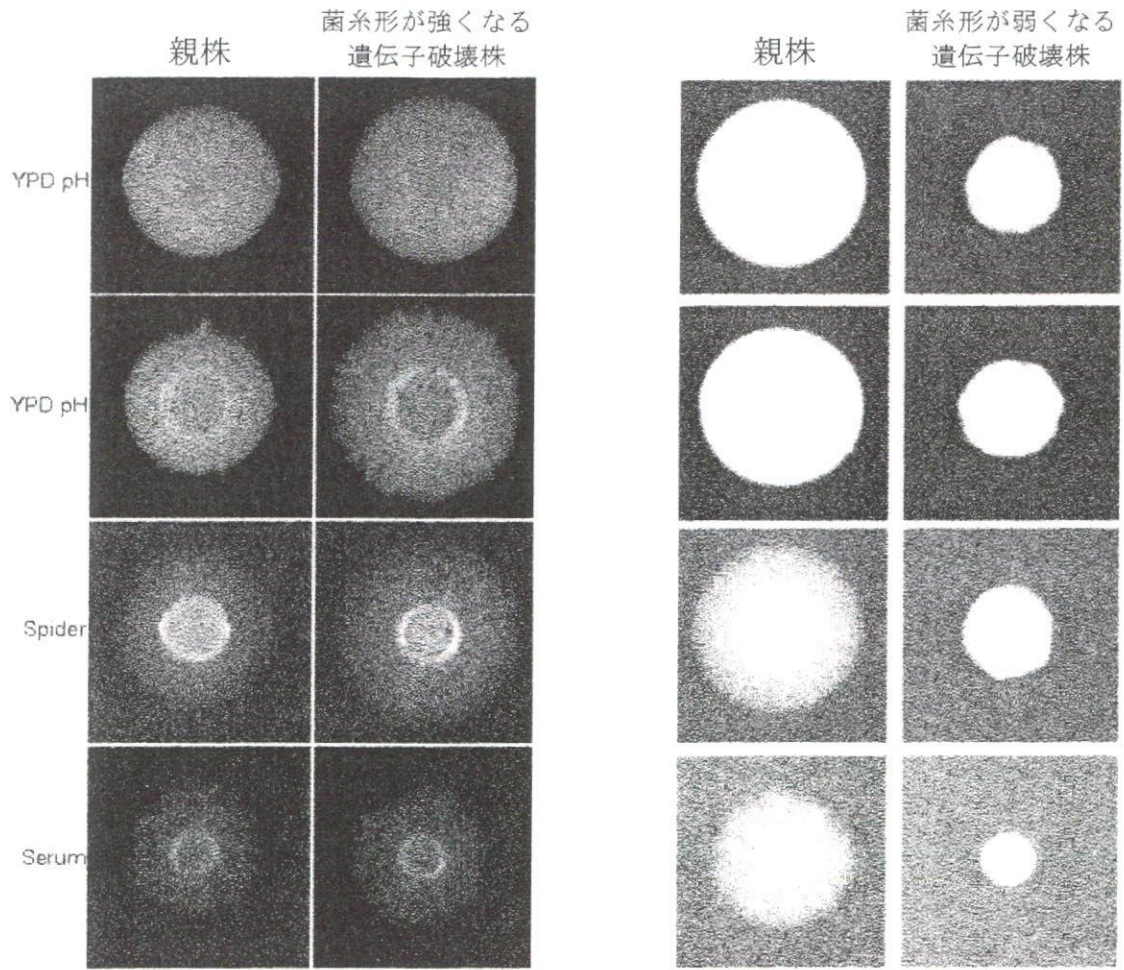
Dengue ウイルス (DENV) は蚊によって媒介されるアルボウイルスであり、熱帯アジア、中南米、アフリカ、オーストラリア、南太平洋諸島など世界の熱帯・亜熱帯の地域で発生している。世界保健機関 (WHO) の推計では全世界で 30 億人が DENV 流行地域で生活しており、年間約 1 億人の感染者が発生しさらに 2 万 4 千人が死亡していると見積もられている。本邦においては海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。

DENV は黄熱ウイルスや日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスと同じフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるウイルスであり DENV 1-4 型の 4 つの異なる型のウイルスが存在する。いずれの型のウイルスによっても同様の病気が起こるが同じ型のウイルスに対しては終生免疫が成立するため再感染しない。しかし他の型のウイルスに対する防御免疫は短期間で消失するためその後他の型のウイルスに感染・発症しうる。DENV の感染により典型的な症状を示す場合一過性の熱性疾患である Dengue 熱 (DF)、致死性疾患である Dengue 出血熱 (DHF) という 2 つの異なる病態を示す。ところで DHF は疫学的

研究により DENV の再感染時に多く発症することが示されている。これは初感染時に誘導された中和能を有しない DENV 型交差抗体が再感染時に DENV との免疫複合体を形成し、単球・マクロファージ等の Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R) を有する細胞に特異的に吸着、その感染を増強させるためと考えられている。

Fc $\gamma$ R は IgG 免疫複合体を結合して細胞内にシグナルを導入するレセプター群であり、その構造は細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域の 3 つの領域からなる。ヒトの Fc $\gamma$ R には 3 つのクラス (I, II, III) が存在しそれぞれ、Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII で a, b, c, Fc $\gamma$ RIII で a と b のサブタイプがあるが DENV の抗体依存性感染増強 (ADE) に関わる Fc $\gamma$ R は今だ同定されていない。本研究の目的は DENV の ADE に関わる Fc $\gamma$ R を同定し ADE により誘導されるシグナル伝達経路および生理活性物質を解析することにより DHF の原因となる血管透過性を亢進させる生理活性物質の探索を行うことである。今回我々は Dengue 2 型および 3 型ウイルスを患者血清から分離するとともに Fc $\gamma$ R のクローニングを行い Fc $\gamma$ RII を Vero 細胞に導入することにより本研究の基盤を整えた。

図2 作製した遺伝子破壊株が示す形態の表現型





今だワクチンの開発されていない本感染症の病態形成機序を解明し、その治療法を開発することは本邦への防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に貢献する。

## B. 研究方法

**培養細胞：**サル腎由来 Vero 細胞, Cos-7 (American Type Culture Collection) はそれぞれ MEM, DMEM(SIGMA)に 10%の牛胎児血清を加えた培地にて維持した。蚊由来 C6/36 細胞 (American Type Culture Collection) は MEM(SIGMA)に 10%の牛胎児血清, 0.1mM MEM Non Essential Amino Acids Solution (Invitrogen) を加えた培地にて維持した。ヒト単球由来 U937 細胞 (American Type Culture Collection) は RPMI 1640(SIGMA)に 10%の牛胎児血清を加えた培地にて維持した。

**ウイルス分離：**デング熱・出血熱患者血清 33 サンプルを用いて DENV の分離を行った。ウイルス分離は Vero 細胞あるいは C6/36 細胞に患者血清を感染させ、37°C で 5 日間培養することにより行った。細胞変性 (CPE) が認められない場合は盲継代を繰り返し、CPE が観察されたサンプル中のウイルスは型特異的プライマーを用いてウイルス遺伝子を検出し、型別診断を行った。

**ウイルス力価測定：**DENV の力価を Vero 細胞を用いたプラーク法により測定した。6 穴プレートに Vero 細胞を 1 ウェルあたり  $4 \times 10^5$  個播種し、一晚培養後 10 倍階段希釈を行った各希釈ウイルス液を 100 $\mu$ l 接種した。37°C で 90 分吸着後 1% メチルセルロースを重層し、3 日間培養した。3.7%ホルマリンで固定後メチレンブルー染色液で染色しプラーク数からウイルス力価を算出した。

**TaqManPCR, RT-PCR：**患者血清中の DENV RNA を High Pure Viral RNA kit (ロシュ)を用いて抽出した。TaqMan RT-PCR 反応を DENV 型別プライマーを用いて行い DENV 特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。

**フローサイトメトリー：**U937 細胞を PBS(-)で洗浄後、1 $\mu$ g/ml のマウス IgG を用いて U937 細胞表面に発現している Fc $\gamma$ R を 15 分間室温にてブロックした。10 $\mu$ l の CD32-PE 抗体あるいは CD64-PE 抗体で 4°C, 45 分間反応した。PBS(-)で 2 回洗浄後 0.4ml の PBS(-)に再浮遊し、フローサイトメトリー (Becton Dickinson) にて解析した。コントロールとしてマウス-PE 抗体を用意した。

**遺伝子配列解析：**遺伝子配列解析は 3100-Avant ジェネティック・アナライザー (ABI PRISM) を用いて行った。

### 遺伝子導入：

10cm デッシュュに  $5 \times 10^6$  の Vero 細胞, Cos-7 細胞をそれぞれ播種し、3 $\mu$ g の Fc $\gamma$ RIIA をクローニングした pCEXV3 プラスミドを Lipofectoamin 2000 (Invitrogen) を用いて導入した。導入 2 日後にこれを観察し実験に用いた。

### (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験を行うにあたり「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき実施した。これに伴い、国立感染症研究所での当該実験申請手続きを行った。国立感染症研究所での実験は、特に研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令 (平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号。) の定めによるほか、「国立感染症研究所組換え DNA 実験実施規則に定めるところによるものである。

上記の定めるところにより遺伝子の改変、使用された技術およびこれらの結果改変された生物に生じた特性に関する情報を明らかにするとともにその移動を制限し実験に供した。また適切に包装、ラベルし保存した。

## C. 研究結果

**ウイルス分離：**2005 年に得られた患者血清 33 サンプルを用いて DENV の分離を行った。DENV の分離、力価測定にはサル腎由来の Vero 細胞および C6/36 細胞を用いた。その結果患者血清 33

サンプル中 11 サンプルから DENV の遺伝子が TaqMan RT-PCR により検出され、そのうち 1 サンプルが DEN-2, 10 サンプルが DEN-3 であった。またこのうち 2 サンプルよりそれぞれ DEN-2 (TL-30) および DEN-3 (TL-18) の DENV が分離された (図 1)。TL-18 および TL-30 においては Vero 細胞において共に激しい CPE を呈し、また TL-30 のプラーク性状は TL-18 より小さく異なっていた。

Fc $\gamma$ R 遺伝子導入 : U937 細胞表面に発現している Fc $\gamma$ R をフローサイトメトリーにて解析した。その結果高い Fc $\gamma$ RI の発現が観察された。また Vero 細胞および Cos-7 細胞をもちいて Fc $\gamma$ RIIA の導入を行った。その結果導入 2 日後にこれらの発現が観察された。

#### D. 考察

デングウイルス (DENV) の *in vitro* における抗体依存性感染増強 (ADE) モデル系の開発のため患者血清よりデングウイルスの分離を行った。分離されたウイルスは激しい CPE を呈しプラークを形成する。今後 DENV の *in vitro* ADE モデルに用いるとともにマウスを用いた感染実験等を行い、その病原性を検討する。

また Vero 細胞に Fc $\gamma$ RIIA の強発現を行った。これまでの報告により中和能を有しない DENV 型交差抗体と DENV の免疫複合体による各細胞への感染性増強に Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa が ADE に重要な役割を果たすことが示唆されている。

今後患者由来 DENV の *in vitro* ADE モデルを用いて、ADE により誘導される宿主のシグナル伝達経路および生理活性物質を解析する。

#### E. 結論

デングウイルス感染に対してヒト用のワクチンはまだ開発段階であり、デングウイルス感染に対する特異的治療法はない。また世界の熱帯・亜熱帯地域においてデング熱・デング出血熱の流行は今後も続くことが予想され、デングウイルスの動向にはヒト、蚊、気候、環境等の多くの要因が複雑

に関わり、その流行状況の予測は困難である。デング出血熱やデングショック症候群はひとたび発症するとその致死率は高い重篤な疾患であり、今だワクチンの開発されていない本感染症の病態形成機序を解明し、その治療法を開発することは本邦への防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に貢献する。本研究においては DENV の ADE に関わる Fc $\gamma$ R を同定し ADE により誘導されるシグナル伝達経路および生理活性物質を解析することにより DHF の原因となる血管透過性を亢進させる生理活性物質の探索を行うことを目的とし、デングウイルス免疫複合体と Fc $\gamma$ R の相互作用を解析するにあたりデングウイルス患者血清よりデングウイルスを分離した。また Fc $\gamma$ R 発現細胞を作成することによりその基盤を整えた。今後これらを用いてさらに解析を行い ADE 発生のメカニズムの解明を進める。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

特記事項無し

##### 2. 学会発表

伊藤美佳子, 高崎智彦, 田島 茂, 林 昌宏, 根路銘令子, 倉根一郎. 東ティモールにおけるデング熱/出血熱流行に関する系統学および血清学的解析. 第 53 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/20-22

林 昌宏, 高崎智彦, 小滝 徹, 根路銘令子, 伊藤美佳子, 田島 茂, 森田公一, 石川豊数, 倉根一郎. ウェストナイル不活化ワクチンの日本脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の検討. 第 53 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/20-22

濱野正敬, 林 昌宏, 高木弘隆, 澤邊京子, 桑山 勝, 岸 昇, 高崎智彦, 倉根一郎. 広島県内の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況. 第141回日本獣医学学会学術集会 (つくば市) 2006/3/18-20

C. Lim, T. Takasaki, A. Kotaki, R. Nerome, M. Ito, S. Tajima, K. Morita, T. Ishikawa, I.

Kurane. Mouse Antibody Response to Inactivated West Nile and Inactivated Japanese Encephalitis Vaccines for Immunization against West Nile virus and other Flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States (San Francisco) 2006/2/23-24

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特記事項無し
2. 実用新案登録  
特記事項無し
3. その他  
特記事項無し



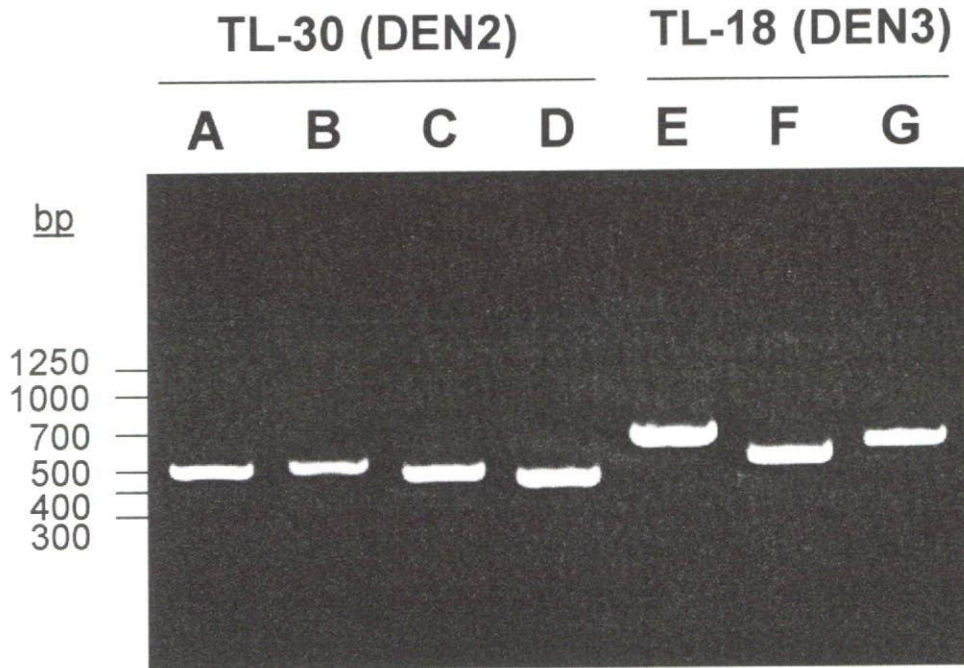


図1：東ティモール患者血清からのウイルス分離. Vero 細胞で3継代し，CPE の認められたサンプル TL-30 (DEN2) と C6/36 細胞で2継代 Vero で1継代し，CPE の認められたサンプル TL-18 (DEN3) 中のウイルスを確認するためにそれぞれ次の型特異プライマーセットで RT-PCR を行い，2%アガロースゲルにて目的遺伝子の増幅を確認した. A: DEN-2 2045-2529 (484bp), B: DEN-2 1589-2116 (527bp), C: DEN-2 1219-1760 (541bp), D: DEN-2 826-1296 (470), E: DEN-3 1725-2422 (697bp), F: DEN-3 1381-1927 (546bp), G: DEN-3 846-1459 (613bp). その結果すべてのプライマーセットにおいて目的のバンドを確認した.

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

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