

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

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 …… 1
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 …… 12
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 …… 26
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 …… 37
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 …… 50
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 …… 60
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 …… 66
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 …… 79
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 …… 92
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ーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
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 …… 105
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 …… 116
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 …… 126
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 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

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 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング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 致死的なデング出血熱のFc γ 受容体を介する病態形成機序を宿主-ウイルス相互作用の見地から解明するため、Fc γ IIA受容体(CD32)を発現した細胞を用いてデングウイルスの感染増強モデルを作製した。またCD32の細胞内領域の欠損変異体を作成した。

A. 研究目的

デングウイルス(DV)はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される一本鎖(+)RNAウイルスであり、蚊によって媒介されるアルボウイルスである。フラビウイルスには黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルスなどが含まれる。DVには1-4型の4つの異なる型のウイルスが存在し、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。DV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デング熱(DF)、致死性疾患であるデング出血熱(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DV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DV型交差抗体が再感染時にDVとの免疫複合体を形成し、単球・マクロファージ等のFc γ 受容体(Fc γ 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 γ RはIgG免疫複合体を結合して細胞内にシグナルを導入しファゴサイトーシスを誘導するレセプター群であり、その構造は細胞外領域、膜領域、細胞内領域の3つの領域からなる。細胞内領域にはimmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)が存在する。これはFc γ Rに会合する分子の活性化モチーフであり、細胞機能の制御を行う際に重要なアミノ酸配列である。ヒトのFc γ Rには3つのクラス(I, II, III)が存在しそれぞれFc γ RI, Fc γ RIIでa, b, c, Fc γ RIIIでaとbのサブタイプがあるがDVの抗体依存性感染増強(ADE)に関わるFc γ Rは今だ同定されていない。本研究の目的はDVのADEに関わるFc γ R役割を解析し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。

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。

フローサイトメトリー：CD32 発現細胞を 4°C x20min 処理し PBS(-)で洗浄後、1 µg/ml のマウス IgG を用いて細胞表面に発現している CD32 を 15 分間室温にてブロックした。10 µl の CD32-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。DV 感染細胞の染色は抗 DV 抗体を用いて行った。CD32 変異体の作製：欠損変異体は PCR 法にて作製した。作製した変異体の遺伝子配列を 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 5x 10⁶ の Cos-7 細胞を播種し、3 µg の CD32 をクローニングした pcDNA3.1 プラスミドを Lipofectoamin LTX (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。発現した蛋白質はフローサイトメトリーおよび蛍光抗体染色法にて行った。

感染増強実験：抗 Dengue 抗体を有する Dengue 患者血清を 2000 倍に希釈し、Dengue ウイルス (1 型) と混合後 37°C 1 時間反応した。CD32 発現細胞に Dengue ウイルス-患者血清複合体を接種し 4 日間培養した。Dengue ウイルス感染細胞をフローサイトメトリー及蛍光抗体染色法にて観察した。

(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

CD32 発現 Cos7 細胞における Dengue ウイルスの感染増強の検討：CD32 を Cos7 細胞に導入し、CD32 を細胞表面に発現させた。CD32 の発現はフローサイトメトリーで行った。その結果約 20% の細胞に CD32 の発現が認められた (図 4)。抗 Dengue ウイルス抗体を有する患者血清と Dengue ウイルス (DV) を 37°C で 1 時間反応し、CD32 発現 Cos7 細胞に感染した。感染 4 日後に細胞を固定し蛍光抗体法およびフローサイトメトリーにより DV の感染を確認した。その結果 Dengue 患者血清と反応させた DV は Dengue 患者血清と反応させていない DV に比較して約 3 倍の ADE が観察された (図 1)。また抗 DV 抗体を用いた蛍光抗体法により DV 感染細胞を観察したところ、患者血清と反応させた DV において ADE が観察された (図 2)。以上のことから、DV は患者血清中に含まれる抗 DV 抗体と複合体を形成し、CD32 を介して Cos7 細胞に感染していることが示唆された。

次に DV の ADE における CD32 の役割をさらに検討するため CD32 のシグナル伝達に参与する細胞内領域に各種の変異体を作製した。作成した変異体は CD32 の C 末端を欠損した P3、ITAM2 から C 末端まで欠損した P2、ITAM1 から C 末端まで欠損した P1、チロシンリン酸化部位 I から C 末端まで欠損した S、細胞内領域を完全に欠損した CT である (図 3)。これらの作製した変異体を Cos7 細胞に導入しそれらの細胞表面における発現をフローサイトメトリーで検討した。その結果 CT を含むすべての変異体が細胞表面に発現し、その発現は野生株 (WT) と同様 20%-40% であった (図 4)。

D. 考察

CD32 発現 Cos7 細胞を用いてデングウイルス (DV) の *in vitro* における ADE モデルを作製した。これまでに中和能を有しない DV 型交差抗体と DV の免疫複合体による各細胞への感染性増強において CD32 の関与が報告されている。本実験において、デング抗体を有する患者血清を用いて CD32 を発現した Cos7 細胞における DV の ADE を検討した。その結果患者血清と DV を反応させることにより DV の ADE が観察された。この現象は CD32 非発現 Cos7 細胞では観察されなかった(データ不掲載)。したがって DV の ADE は DV-抗 DV 抗体複合体による CD32 を介した感染であることが示唆された。

続いて ADE における CD32 のシグナル伝達の役割について検討するため CD32 の細胞内領域に各種の欠損変異体を作製した。これらの変異体を Cos7 細胞内にリポフェクション法により導入したところすべての変異体が Cos7 細胞の細胞表面に発現されていることがフローサイトメトリーにより確認された。発現量は 20-40% であり、野生型 (WT) と同様であった。今後これら変異体を用いて DV の ADE について検討が可能になった。

E. 結論

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。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。世界保健機関 (WHO) の推計では全世界で 30 億人が DV 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。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。

F. 研究発表

1. 論文

小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎真和, 小井戸則彦, 大曾根康夫, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎, 秋月哲史. 本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. *感染症学雑誌* 80(1):56-57 (2006)

林 昌宏, 倉根一郎. ウエストナイル熱・脳炎の流行状況. *臨床と微生物*, 33(4):393-398, 2006

林 昌宏, 倉根一郎. ウエストナイル熱・脳炎. *Pharma Medica*, 24(8):15-20, 2006

Hamano, M., Lim, C. K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I., Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection*, 12, 1-4, 2007

Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushi, S., Saijo, M., Sakai, K., Lim, C. K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., Nishimura, H. A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases*. (in press)

2. 学会発表

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

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 回日本獣医学会学術集会 (つくば市) 2006/3/18-20

原田文植, 高崎智彦, 高木弘隆, 林 昌宏, 伊藤美佳子, 倉根一郎: 日本人デング熱患者における抗ウエストナイルウイルス交差中和抗体に関する検討, 第80回日本感染症学会2006年4月

高崎智彦, 小滝 徹, 根路銘令子, 林 昌宏, 伊藤美佳子, 田島 茂, 倉根一郎: 本邦原因不明脳炎・無菌性髄膜炎における日本脳炎ウイルス関与に関する回顧的調査, 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会2006年5月

林 昌宏, 高崎 智彦, 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: 日本脳

炎ウイルス中和抗体保有マウスのウエストナイル不活化ワクチンによる免疫応答の検討, 第54回日本ウイルス学会2006年11月

井本淳一, 石川知弘, 村上賢二, 林 昌宏, 濱野正敬, 高崎智彦, 倉根一郎, 小西英二: プタにおける日本脳炎 DNA ワクチンおよびタンパクワクチンの混合投与による中和抗体の誘導, 第 54 回日本ウイルス学会 2006 年 11 月

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

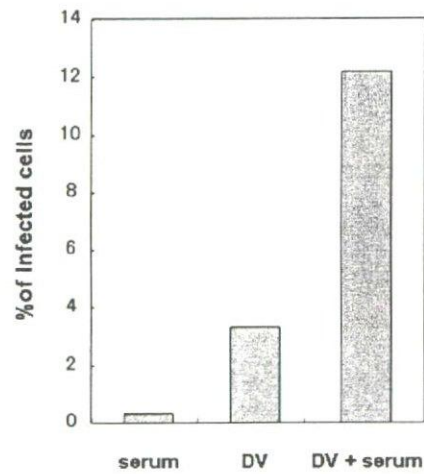


図1. 野生型 CD32 発現 Cos7 細胞におけるデングウイルス (DV) の感染増強の検討: フローサイトメトリーにより野生型 CD32 発現 Cos7 細胞におけるデングウイルス (DV) の感染増強を観察したところ約 3 倍の感染増強が観察された.

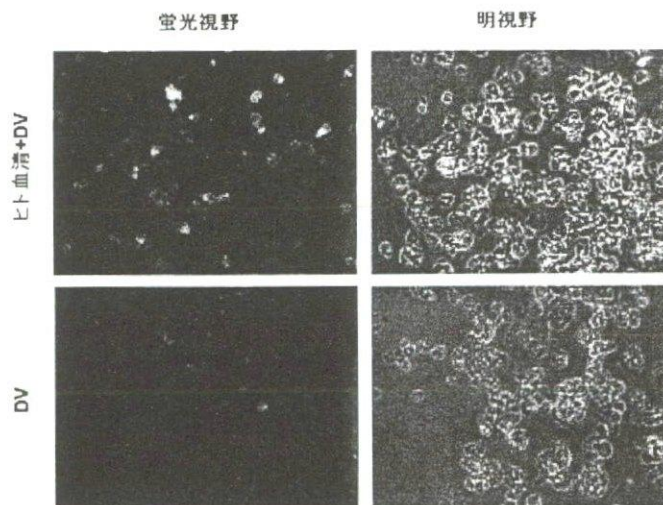


図2. 野生型 CD32 発現 Cos7 細胞におけるデングウイルス (DV) の感染増強の検討: 抗 DV 抗体を用いて DV 感染細胞を比較した. その結果抗 DV 抗体を有するデング患者血清により DV の感染増強が観察された.

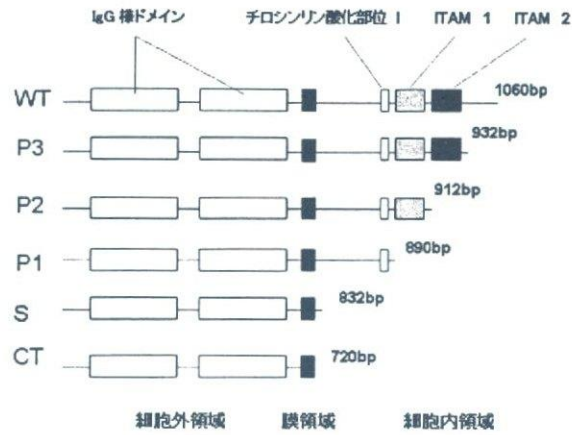


図 3. CD32 細胞内領域における変異体の作製:CD32 の細胞内領域に各種の変異体を作製した.
(ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

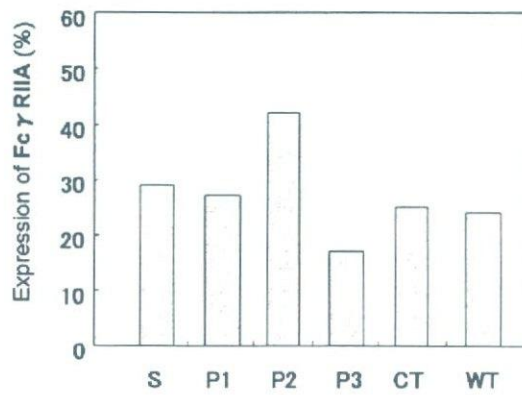


図 4. CD32 変異体の Cos7 細胞の細胞表面における発現: 作製した各変異体を Cos7 細胞に導入し, フローサイトメトリーにて観察した. その結果細胞表面に各変異体の発現を確認した.

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19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