

非について多くの情報、モデルを提供することが期待され、日本国民の健康・医療の向上のみならず、将来の国益を見据えた先端医療の臨床開発研究の推進にも寄与することを目指す。

## B. 研究方法

IL-25 と PE (ヒト正常細胞への結合部分を除去した緑膿菌外毒素をコードした DNA) を結合した IL25-PE を人工合成蛋白として大腸菌の系で発現・大量培養し、FPLCにて精製した。蛋白の identity をウェスタンブロット法にて確認した。

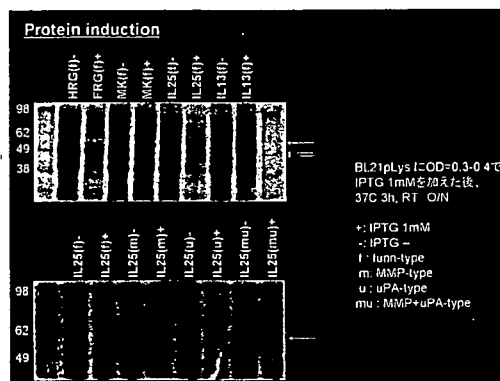
同製剤をモデルとして、日本における臨床試験の審査システムの現状および要求される CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)、薬物動態・毒性試験、臨床プロトコルについて、欧州における基準を調査し、また日米欧を比較検討しつつ各種規制も調査した。

### (倫理面への配慮)

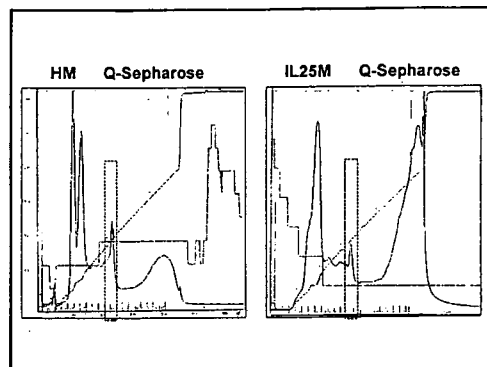
本研究は、京都大学における組換え DNA 実験計画書、動物実験計画書をそれぞれの専門委員会に提出、承認をうけた上で実施された。

## C. 研究結果

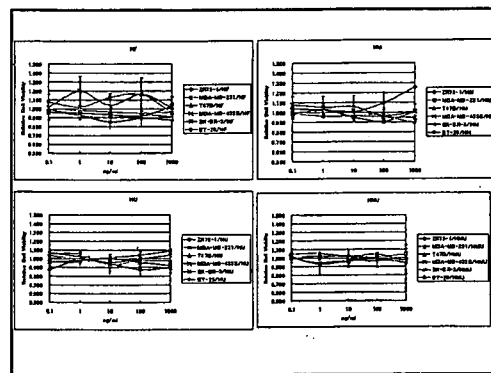
IL25-PE 蛋白の分子量を SDS-PAGE 法にて確認後、in vitro での各種腫瘍細胞に対する細胞殺傷効果を  $^3\text{H}$ -leucine uptake assay にて確認した。



(図：IL25PE の induction SDS-PAGE)



(図：IL25PE の FPLC による精製)



(図：IL25PE の各種癌細胞に対する細胞効果)

しかしながら、IL25-PE 蛋白は、IL-25 受容体が発現していると推定されているいずれの乳癌細胞株に対しても殺細胞効果を示すこと



## E. 結論

制癌分子標的療法の研究開発をモデルに、我が国の臨床試験認可制度と欧米の制度の差異を比較検討し、国内の先端医学の基礎研究から創薬・市場化への開発過程の環境と方法論を検討した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Koji Kawakami, Keynote presentation. Special report from the 3rd DIA multitrack workshop in Japan: Scientific review and clinical development of advanced therapeutics and biologics. *Global Outsourcing Review*, 9: 10-15, 2007.

Koji Kawakami and Hiroko Yamane. Clinical research in Japan: ways to alleviate unnecessary regulatory burdens. *RCEIIS-Electronic Journal in Communication, Information and Innovation in Health*, 1: 57-61, 2007.

Koji Kawakami and Raj K. Puri. IL-4/13 and cancer. In: *Cytokines in the Genesis and*

*Treatment of Cancer* Ed. by M.A. Caligiuri and M.T. Lotze, Humana Press, Totowa, NJ, pp135-153, 2007.

川上 浩司. 医薬品の研究開発と安全性評価の今後. *ファルマシア* (日本薬学会会誌), 43: 1195-1200, 2007.

川上 浩司. 先端医薬の開発に必要な基盤整備と人材養成 (わが国発の臨床研究推進に向けて). *医学のあゆみ*, 220: 860-866, 2007.

川上 浩司. 行政的観点からのインフラ整備 (臨床研究・大規模研究の進め方). *呼吸と循環*, 55: 255-260, 2007.

### 2. 学会発表

川上 浩司. 医薬品審査・認可体制と創薬力. 日本薬学会関西支部新春講演会 講演, 2007年1月12日, 京都.

ほか

## G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

## 病原真菌の薬剤排出ABCトランスポーターの基質特異性決定メカニズムの解明

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部  
研究者 田辺 公一

研究要旨 病原真菌の多剤耐性化は、抗真菌薬開発において克服しなければいけない重要な課題である。多剤耐性の原因となる薬剤排出トランスポーターの基質認識と輸送のメカニズムを明らかにする。

### A. 研究目的

本研究においては、病原真菌（*Candida*を中心として）の多剤耐性に関わるATP binding cassette (ABC) タンパク質の生化学的、酵素化学的性質を明らかにすることを目的とする。そのために、様々な病原真菌からABCタンパク質遺伝子を単離し、出芽酵母において大量発現させて機能解析を行う。

ABCタンパク質であるCdr1pとCdr2pの発現量が亢進していることが多い。Cdr1pとCdr2pはアミノ酸配列において高い相同性を有するが、排出する薬剤や阻害剤に対する応答が異なる(図2)。

	CaCdr1p	CaCdr2p
<b>基質</b>		
nigericin	+	-
monensin	+	-
cerulenin	+	+
H2O2	+	-
diamide	-	+

	CaCdr1p	CaCdr2p
<b>阻害剤</b>		
ennistatin	+	-
FK506	+	-

基質: +...排出できる、-...排出できない 阻害剤: +...阻害する、-...阻害しない

図2 Cdr1pとCdr2pの基質と阻害剤

これらの二つのタンパク質のドメインを交換したキメラタンパク質を作製し、機能解析を行うことで、基質認識に関わるドメインを同定し、薬剤相互作用部位を決定する。

### B. 研究方法

*Candida albicans*のCdr1pとCdr2pはnucleotide binding domain (NBD)とtransmembrane domain (TMD)が2回繰り返される二次構造をとると考えられている(図3)。

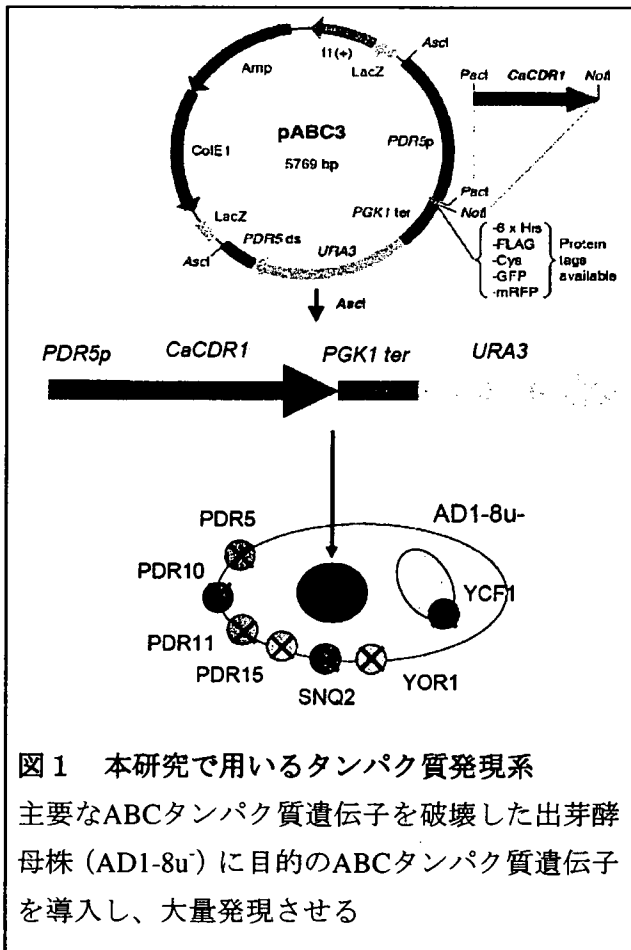


図1 本研究で用いるタンパク質発現系  
主要なABCタンパク質遺伝子を破壊した出芽酵母株 (AD1-8u) に目的のABCタンパク質遺伝子を導入し、大量発現させる

多剤耐性化した*Candida albicans*においては

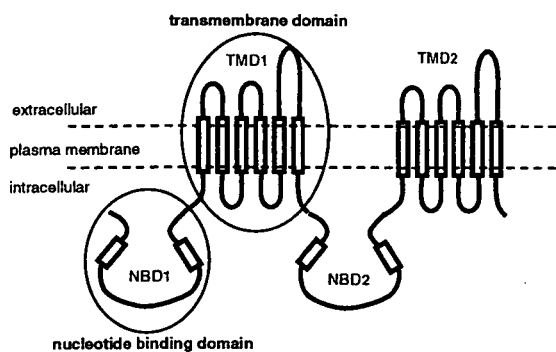


図3 *Candida albicans* ABCタンパク質の推定される二次構造

推定される二次構造から、NBDとTMDの間でペプチド鎖を4分割し、Cdr1pとCdr2pでドメインを互いに交換する。具体的には、まず各ドメインをコードするcDNA領域をPCRによって増幅する。続いて互いにオーバーラップした部分を用いて最も外側に位置するプライマーによるPCRで、全ての断片を連結させる(図4)。

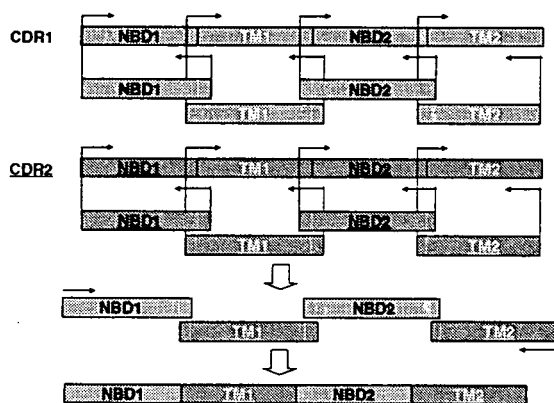


図4 キメラタンパク質発現のための遺伝子カセットの作製方法

このようにして作製した遺伝子カセットを主要なABCタンパク質遺伝子を破壊した株、AD-1-8u株に導入し発現させて、薬剤感受性試験および酵素化学的解析を行う。

(倫理面への配慮)

当研究においては、病原真菌と薬剤との相互作用に焦点をあてて研究を行っているために、現段階で動物実験を行う予定はない。また、病原真菌の薬剤排出ポンプ遺伝子を出芽酵母において発現させて機能解析を行っているために、実験材料をP1レベルで取り扱うことができる。環境への拡散も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のっとり、十分に配慮して研究を行っている。

### C. 研究結果

*Candida albicans*のCdr1pとCdr2pの各ドメインを交換したキメラタンパク質をAD1-8u株において大量発現させて機能解析を行った。まず、TMDを互いに置き換えたコンストラクトについて調べた。以後、キメラコンストラクトについてはN末端からC末端に向かって並ぶドメインの順番にしたがって1212(それぞれNBD1がCdr1、TMD1がCdr2、NBD2がCdr1、TMD2がCdr2)のように記述する。抗真菌薬や抗癌剤を含む27種類の化合物に対する薬剤感受性試験の結果、それぞれ2121はCdr1pと、1212はCdr2pと同様の薬剤耐性を示したことから、TMDによって基質特異性は決定されている、言い換えればNBDはCdr1p由来またはCdr2p由来であってもタンパク質は機能すると考えられた。各膜貫通ドメインの置換に関して様々な基質に対する感受性、および阻害剤に対する感受性を調べた結果、以下のような結果を得ることができた(図5)。

- TMD1をCdr2p由来の配列に置換するとnigericin、monensin、bafilomycin A1に対する薬剤感受性が大幅に低下する
- TMD1がCdr1p由来、TMD2がCdr2p由来であるキメラタンパク質発現株は蛍光基質であるローダミンの排出活性が特異的に低下する。
- TMD1がCdr1p由来の配列であるキメラタンパク質のATPase活性はoligomycin感受性を示す。
- TMD1とTMD2の両方がCdr1p由来の配列であるキメラタンパク質のみがCdr1pの特異的阻害剤FK506による阻害を受ける。

	1111	1211	1112	1212
nigericin monensin bafilomycin A1	耐性	感受性	耐性	感受性
ATPase活性の オリゴマイシン感受性	感受性	耐性	感受性	耐性
Rhodamineの 排出活性	ある	ある	ない	ある
FK506による阻害	される	されない	されない	されない

図5 キメラタンパク質発現株の薬剤感受性試験結果のまとめ

以上の結果より、基質特異性に変化が認められた薬剤の特性と構造を比較すると、いずれも疎水性が高く、環状のマクロライド様構造をとるといふ共通点が認められた。

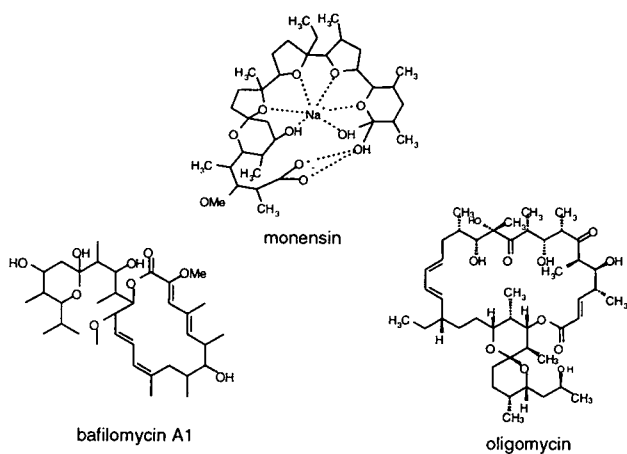


図6 基質特異性が変化した化合物

よって、上記のような特性をもつ化合物は Cdr1p の TMD1 に相互作用することで、輸送されるか、あるいは相互作用部位にとどまってタンパク質の立体構造変化を阻害することで酵素活性を阻害すると推測された。

また、ローダミンは Cdr1p、Cdr2p の共通の基質であるにもかかわらず、特異的な TMD の組み合わせにおいてのみ輸送活性が失われていたことから、Cdr1p と Cdr2p のローダミンの認識構造は互いに異なると考えられた。

以上の仮説を検証するために、さらに小さい領域におけるアミノ酸配列交換キメラタンパク質発現株を作製し、その薬剤感受性を調べた。その

結果、TMD1 におけるさらに小さい領域でのアミノ酸配列交換は、主要薬剤に対する耐性と酵素活性を失わせる例が多かったため、一部の機能的に発現したタンパク質だけでは、基質特異性とアミノ酸配列交換との規則性を見出すことはできなかった。

一方、TMD2 におけるアミノ酸配列交換はすべて酵素活性を保った状態で発現させることができた。その結果、図7に示すように9番目から11番目の膜貫通領域（三つに分割した中央）を含む領域を Cdr2p 由来配列に置き換えるとローダミン耐性が特異的に失われた。したがって、9番目から11番目の膜貫通領域のアミノ酸配列が Cdr1p のローダミン排出活性に必要であることが示唆された。

				MIC <sub>80</sub> (μg/ml)	
NBD1		TMD2		rhodamine6G	
■	■	■	■	■	32
■	■	■	■	■	1.25
■	■	■	■	■	1.25
■	■	■	■	■	8
■	■	■	■	■	64
■	■	■	■	■	64
■	■	■	■	■	64
■	■	■	■	■	64
AD/pABC3 (control)				1	

図7 TMD2キメラタンパク質発現株のローダミン感受性

#### D. 考察

ABC タンパク質の生理的な役割は、膜脂質のトランスポーターであると考えられている。ヒト MDR2 はリン脂質のトランスポーター、ABCA1 はコレステロールのトランスポーターであるという報告がある。病原真菌においても *Candida albicans* の Cdr1p がリン脂質を輸送するという報告がなされているが、大半の ABC タンパク質の生理的機能は未だに不明である。出芽酵母には約 20 種類の ABC タンパク質が存在することが報告されており、複数個存在するファ

ミリータンパク質が様々な基質を輸送することで、機能分担を行っていると考えられる。

*Candida albicans* の Cdr1p と Cdr2p は多剤耐性化の主要な原因となる薬剤排出ポンプとして精力的に研究が進められてきた。近年、プロモーター領域の同定、転写調節因子の解析が進み、様々な環境ストレスや宿主からもたらされる因子に応答して *CDR1* と *CDR2* の発現が亢進することが明らかとなってきた。したがって、病原真菌の薬剤耐性化を避けることは困難であり、耐性化した菌を効果的に駆逐する手法の開発が必要となってくる。Cdr1p や Cdr2p の基質認識機構を明らかにすることは効果的な薬剤の探索や、ポンプ機能を抑えるような特異的阻害剤の開発にも大きく貢献するものと考えられる。

本研究においては、きわめて相同性の高いアミノ酸配列をもつ Cdr1p と Cdr2p が異なる薬剤排出活性をもつという性質を利用し、それぞれのドメインを交換したキメラタンパク質を解析することで、基質特異性を決定する領域を調べることにした。キメラタンパク質発現遺伝子の作製は複数の PCR 断片を一本の DNA 鎖に連結させる cross over PCR によって行った。この方法はプラスミドを用いた従来の遺伝子組み換え実験手法と比較してはるかに効率がよく、容易にキメラタンパク質発現カセットを作製することができた。

いずれのキメラコンストラクトも野生型と比較して遜色のないタンパク質発現量を示し、GFP を C 末端に融合させたタンパク質での細胞内局在も野生型の Cdr1p と類似したものであった。従来のドメイン交換解析においては、タンパク質のミスフォールドなどによる発現量の低下から、解析できないドメインの組み合わせがあるのが通常であったが、本実験においては、アミノ酸配列の相同性の高い分子を選択したことで、タンパク質の立体構造に大きなひずみが生じなかったために、全ての組み合わせを解析できたと考えられる。

調べたドメインの組み合わせのうち、TMD1

の交換は、nigericin、monensin、bafilomycin A1 に対する薬剤感受性を変化させ、酵素活性 (ATPase) の阻害剤 oligomycin に対する感受性に影響を及ぼすことを明らかにした。nigericin、monensin、bafilomycin A1、oligomycin は環状のマクロライド様の構造をとると考えられており、類似の立体構造をもつ基質あるいは阻害剤との相互作用が TMD1 の配列に依存すると推測される。また、ふたつの TMD が CaCdr1p 由来の配列でなければ阻害剤 FK506 が作用しなかったことや、TMD1 が Cdr1p、TMD2 が Cdr2p の組み合わせのタンパク質のローダミン排出活性が特異的に低下していたことから、ドメイン同士の相互作用も基質認識にとって重要であることが示唆された。

ドメインごとの置換解析結果をもとに、さらに小さい領域でのアミノ酸配列交換解析を行った結果、TMD1 内でのアミノ酸配列置換は酵素活性を失わせるケースが多くなった。この結果は、ドメイン内での配列置換がドメイン毎の交換よりもタンパク質全体の機能に及ぼす影響が大きいことを示している。膜貫通領域は疎水性  $\alpha$  ヘリックス以外にも両親媒性  $\alpha$  ヘリックスを含んでおり、両親媒性ヘリックスが脂質二重膜内で単独で存在することは困難である。したがって、タンパク質が一定のコンフォメーションをとるためには、ペプチド鎖が合成されると速やかに立体構造の形成 (フォールディング) も開始されるものと考えられる。よって、ドメイン内で予定されていないアミノ酸配列が出現した時点でタンパク質のミスフォールディングが起こっている可能性がある。原核生物の ABC タンパク質はドメインごとに別々のペプチド鎖としてコードされていることから、ペプチドのフォールディングの観点からすると、ドメイン間での交換のほうが、ドメイン内での配列交換よりも「安全」であると推測される。

TMD2 内でのアミノ酸配列置換に関しては、すべてのコンストラクトにおいて酵素活性が認められたことから、TMD1 おきたようなペプ

チド鎖フォールディングの問題は回避できたものと考えられる。その結果、9番目から11番目の膜貫通領域が Cdr1p によるローダミンの排出に必要であることは明らかにできたが、その役割については、実際の基質結合部位なのかあるいは間接的に基質特異性に影響を及ぼす領域なのかは明らかにできていない。結果は示していないが、同じ領域だけを Cdr1p に置換した Cdr2p は大半の薬剤に対する耐性を失っていたことから、この領域は特定の基質の認識だけでなく基質認識全体、あるいはタンパク質全体の構造の維持に必要な領域であるかもしれない。

TMD が基質特異性の決定に関与しているという結果は、これまでの他の ABC タンパク質での実験結果を支持するものである。また、Cdr1p と Cdr2p のアミノ酸配列において、TMD は保存性が比較的低いことから、TMD が基質特異性の決定において主要な役割を果たしている可能性は高い。

## E. 結論

病原真菌 *Candida albicans* の ABC トランスポーター Cdr1p と Cdr2p の間でドメイン交換解析を行い、基質認識および阻害剤に対する応答性を決定するドメインを決定した。また、複数のドメインの組み合わせ、相互作用によっても基質特異性が決定することを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, **Tanabe K**, Niimi M, Uehara Y, Cannon RD. Characterization of Three Classes of Membrane Proteins Involved in Fungal Azole Resistance by Functional Hyper-Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 6(7), 1150-65, **2007**
- 2) Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, **Tanabe K**, Niimi M, Monk BC. *Candida*

*albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology* 153(Pt 10), 3211-7, **2007 Review**

- 3) Nakayama H\*, **Tanabe K\***, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami NS, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60(6), 1264-72, **2007** \*These authors have contributed equally
  - 4) **Tanabe K**, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M, Uehara Y. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364(4), 990-5, **2007**
- ### 2. 学会発表
- 1) Koichi Tanabe, Susumu Tomiyama, Erwin Lamping, Yukie Takano, Yoshimasa Uehara and Masakazu Niimi: Novel mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* ABC protein, Pdr5p, result in insensitivity to the efflux pump inhibitor : FK506 2<sup>nd</sup> FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence 2007年5月
  - 2) 田辺公一、新見昌一：病原真菌ABCタンパク質と基質の相互作用 第四回 真菌分子細胞研究会 2007年8月
  - 3) 田辺公一、富山 進、上原至雅、新見昌一：出芽酵母ABCタンパク質Pdr5pの阻害剤FK506非感受性化変異第51回 日本医真菌学会総会 2007年11月
  - 4) 名木稔, 田辺公一, 臺由紀, 高野幸枝, 宮崎義継, 新見昌一：ドメイン置換解析による



*Candida albicans* ABC タンパク質の基質認識  
メカニズムの解明 第30回 日本分子生物学  
会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会  
2007年12月

- 5) 三好勲治, 田辺公一, 臺由紀, 高野幸枝, 宮  
崎義継, 新見昌一: 病原真菌 ABC タンパク

質の FK506 による阻害メカニズムの解明  
第 30 回 日本分子生物学会年会・第 80 回日  
本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月

- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 開発医薬品評価への応用を目標とした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

所属 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部  
研究者 大喜多 肇

研究要旨：アポトーシス関連分子 EAT を神経上皮で欠損するマウスを作製した。胎齢 12.5 日頃には未熟神経細胞で著明なアポトーシス増加が観察され、本分子が神経細胞の発生・分化に必須であることが示唆された。

### A. 研究目的

Bcl-2 関連分子でありアポトーシス抑制作用を有する EAT は、ヒト胎児性癌細胞やマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) では、高発現しており、本分子が初期発生段階でのアポトーシス制御の中心的な分子である可能性がある。さらに、申請者らは、マウスのモデル系により本分子が膵ラ氏細胞の発生・分化や維持にも重要であることを示してきた。膵ラ氏島の細胞移植は将来的な糖尿病の再生医療の候補の一つであるが、 $\beta$ 細胞は、元来、ストレスに弱く破壊されやすいことが知られ、移植した $\beta$ 細胞も患者 $\beta$ 細胞と同様の機序によって破壊される可能性が高い。従って、これらの細胞の維持に関して細胞死 (アポトーシス) の観点からも研究することが必須である。

本研究では、申請者らがこれまでに明らかにしてきた基礎成果をさらに発展させ、本分子の胎仔発生過程での機能を解明し、EAT 分子の機能制御による ES 細胞の増殖・分化培養法、膵 $\beta$ 細胞分化培養法開発の基盤情報を整備することを目指した。このことは、ES 細胞を用いた新たな細胞遺伝子治療の確立へつながるものである。得られた成果は、ヒト ES 細胞の新たな培養技術の革新、工業化へ応用することが可能であり、再生医療を直接推進し、あらたな創薬総合研究へ発展するものと考えられる。

### B. 研究方法

#### 1. EAT コンディショナル・ノックアウトマウスの作製と解析

マウス作製：既に作製した、EAT 遺伝子の遺伝子座に EAT の exon 1 を loxP で挟むような変異を導入したマウス (EAT<sup>flox/flox</sup> マウス)、EAT の一方の対立遺伝子を欠失したマウス (EAT<sup>null/wt</sup> マウス) を用いた。上記マウスと Nestin プロモーターによって Cre recombinase を発現するマウス (Nestin-Cre マウス) と交配させることにより、脳の発生・発達における EAT の機能を解析した。具体的には、EAT<sup>null/wt</sup> マウスと Nestin-Cre マウスを交配することにより EAT<sup>null/wt</sup>/Nestin-Cre マウスを得た。同マウスを EAT<sup>flox/flox</sup> マウスと交配した。得られる胎仔のうち EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre(+) が、神経系特異的に EAT がノックアウトされたマウスとなる。同腹の EAT<sup>flox/wt</sup>/Nestin-Cre(+), EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre(-), EAT<sup>flox/wt</sup>/Nestin-Cre(-) の genotype を示すマウスをコントロールとして使用した。

胎仔の解析：胎齢 12.5 日、14.5 日、18.5 日の胎仔を子宮より摘出し、実体顕微鏡下で形態を観察した。4%PFA 固定し、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施し、組織像を解析した。常

法に従って cleaved Caspase3 抗体 (Cell signaling 社)、phospho Histone H3 抗体 (Cell signaling 社)、Nestin 抗体 (chemicon 社)、BLBP 抗体 (Abcam 社)、OLIG2 抗体 (IBL) 等を用い、免疫染色を行った。対比染色はヘマトキシリン染色を行った。

**β ガラクトシダーゼ染色:** Nestin-Cre マウスと ROSA26 マウスを交配させ、胎齢 12.5 日の胚を子宮から摘出し、0.4%パラホルムアルデヒドで固定した。洗浄後、染色液 (5mM フェリシアン化カリウム、5mM フェロシアン化カリウムと 20mM の X-gal を含む上記洗浄液) にて 3 時間染色した。染色後、70%エタノールで保存した後、常法に従ってパラフィンに包埋し切片を作製した。ケルンエヒロートにて対比染色を行った。

## 2. EAT ノックアウト ES 細胞の作製

**EAT ノックアウト ES 細胞の樹立:** 過排卵した EAT<sup>flox/flox</sup> マウス雌を EAT<sup>flox/flox</sup> マウス雄と交配、3.5 日胚 (胚盤胞) を培養することにより EAT<sup>flox/flox</sup> ES 細胞を得た。

EAT ノックアウト ES 細胞 (EAT<sup>-/-</sup> ES 細胞) を作製することを目的として EAT<sup>flox/flox</sup> ES 細胞に pMC1 プロモーターあるいは PGK プロモーター制御下に Cre recombinase を発現するベクターを、エレクトロポレーション法によって導入した。薬剤選択後のクローンを選択し、遺伝子型を PCR 法にて検討した。

### (倫理面への配慮)

動物実験に際しては、動物愛護の観点にたつて、麻酔等により動物への苦痛を最小限に留める。また、不必要な飼育はないか、求める成果を出すために必要最小限の匹数を使用しているか等を常に確認しながら実験を行った。本研究課題において行う動物実験に関しては、国立成育医療センター研究所の動物実験委員会の承認を得た。

遺伝子組換え実験にあたっては、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、国立成育医療センター研究所遺伝子組換え実験安全規程を遵守して行った。本研究課題において行う遺伝子組

換え実験に関しては、国立成育医療センター研究所遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

本研究においてはヒト胚性幹細胞あるいはヒト試料を用いた研究は行っていない。

## C. 研究結果

Nestin-Cre マウスによる、コンディショナル・ノックアウト効率を確認するために、ROSA26Cre レポーターマウスと Nestin-Cre マウスを交配し、胎齢 12.5 日の胎仔を β ガラクトシダーゼ染色にて染色した。その結果、図 1 のごとく、中枢神経系、後根神経節のほぼ全ての細胞において Cre recombinase により loxP の組換えが生じていることが確認された。

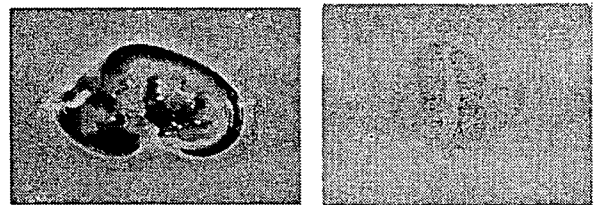


図 1 12.5 日胚の β ガラクトシダーゼ染色

EAT<sup>flox/flox</sup> マウスと EAT<sup>null/nt</sup>/Nestin-Cre マウスを交配することによって、中枢神経、後根神経節特異的に EAT をノックアウトした。その結果、出生後の子マウスには、コンディショナル・ノックアウトマウスは、確認されず、胚性致死あるいは生後早期に死に至ると考えられた (表 1)。そこで胎齢 12.5 日、14.5 日、18.5 日の胎仔を解析したところ、表 1 のごとく、ほぼ予想される割合で、EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウスの存在が確認された。

表 1 EAT<sup>flox/flox</sup> と EAT<sup>null/wt</sup>/Nestin-Cre(+) 交配による仔マウスの遺伝子型

Stage	No. with genotype				合計
	EAT <sup>fl<sup>o</sup></sup> / <sub>x/null</sub> /Nestin-Cre	EAT <sup>fl<sup>o</sup></sup> / <sub>x/wt</sub> /Nestin-Cre	EAT <sup>fl<sup>o</sup></sup> / <sub>x/null</sub> /N	EAT <sup>fl<sup>o</sup></sup> / <sub>x/wt</sub> /N	
E12.5	3	5	3	3	14
E14.5	2	0	2	2	6
E18.5	7	5	2	4	18
生後	0	8	6	9	23

組織学的な解析を行ったところ、胎齢 12.5 日の EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウスでは、同腹仔と比較して、脳及び脊髄において、細胞死の増加が認められ、14.5 日、18.5 日では、12.5 日と比較すると細胞死は目立たないが、脳が小型で脊髄の幅が細くなっていた。出生直前の胎齢 18.5 日までには生きていた胎仔が確認されることから、出生後、早期に致死となる可能性が考えられた。

胎齢 12.5 日の胎仔では、外観上、EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウスは、コントロールマウスと外観上、区別することができなかった。水平断の標本を作製して検討したところ、脳から脊髄にいたるほぼすべての領域で、ventricular zone の上部を中心に神経細胞に顕著なアポトーシス小体の増加を認めた (図 2)。



図 2 胸部脊髄 (HE 染色、左 : EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウス、右 : コントロールマウス)

Ventricular zone の下部や将来の前角に相当する分化神経細胞が出現しはじめている領域でも、アポトーシス小体の増加が認められたが、軽度であった。免疫組織化学の結果、cleaved Caspase 3 陽性細胞が著明に増加しており、アポトーシスによる細胞死と考えられた。(図 3)。核分裂像や phospho Histone

H3 陽性の増殖細胞数には大きな変化はなかった。免疫組織学的に Nestin 陽性細胞数は減少傾向にあると考えられた (図 4)。また、BLBP 陽性の radial glia の数には、顕著な異常は認めなかった。

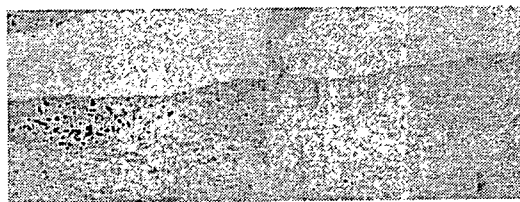


図 3 12.5 日胚の神経上皮の cleaved Caspase 3 染色 (左 : EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウス、右 : コントロールマウス)



図 4 12.5 日胚の脊髄の Nestin 染色 (左 : EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウス、右 : コントロールマウス)

胎齢 18.5 日の胎仔においても、外観上、ノックアウトマウスとコントロールマウスを判別することはできなかった。しかしながら、組織学的には、脊髄は細く、神経細胞全体の数は減少していた (図 5)。一方で分化した神経細胞は存在し、また、Radial glia や oligodendroglia に分化した細胞の存在も確認された。アポトーシスにより死滅する細胞はコントロールに比しやや増加していたが、胎齢 12.5 日と比較すると顕著に減少していた。

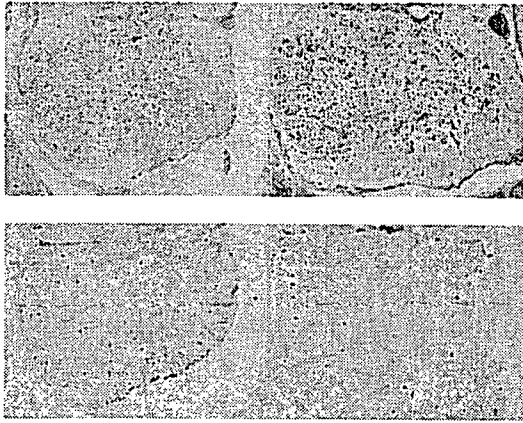


図5 胎齢 18.5 日の胎仔の脊髄 (上、HE 染色、下 BLBP 染色、左：EAT<sup>flox/null</sup>/Nestin-Cre マウス、右：コントロールマウス)

胎齢 14.5 日胚においても胎齢 18.5 日と同様に、脳、脊髄の容積低下と神経細胞全体の減少が認められたが、細胞死は 12.5 日胚と比較すると著明に減少していた。したがって、EAT 欠損による神経細胞死は、12.5 日胚前後の未熟神経細胞に多いものと考えられた。

また、EAT<sup>flox/flox</sup> マウス同士との交配により 3 ラインの ES 細胞を樹立した。同細胞に、pMC1 プロモーターで Cre を発現するベクターを一過性に導入し、160 クローンの ES 細胞を得たが、EAT<sup>-/-</sup>のクローンは得られなかった。そこで PGK プロモーター制御下に Cre を発現するベクターを導入し 80 クローンの ES 細胞をクローニングしたが、こちらも EAT<sup>-/-</sup>の ES 細胞は、得られなかった。これらの結果より、EAT<sup>-/-</sup>の ES 細胞は、生存しえない、あるいは増殖が著しく遅くなるなどの可能性が考えられた。

#### D. 考察

神経組織特異的に EAT を欠損させたコンディショナル・ノックアウト・マウスを作製した。その結果、EAT が神経細胞の生存に必須であることが明らかとなった。胎齢 12.5 日から 18.5 日では、ほぼ期待される割合で神経上皮特異的 EAT ノックアウトマウスは存在したが、現時点まで生後のマウスでは確認することができていない。このことから神経上皮における EAT の機能は、マウスの生後の発

育に必須であると考えられた。

胎齢 12.5 日マウスの解析では、神経上皮の ventricular zone 上部の神経細胞のアポトーシスの顕著な増加を認めた。このアポトーシスの増加は、主に未熟神経細胞が旺盛に増殖する部に認められ、本分子が未熟神経細胞の生存に必要であることが示唆された。一方、Nestin 陽性細胞は、減少傾向にあるものの存在し、EAT をノックアウトされた細胞全てがアポトーシスによって死滅するわけではないことが示唆された。ごく少数と思われる Cre recombinase による組換えを逃れた細胞が、代償的に増加している可能性も否定できない。

胎齢 18.5 日では、神経細胞や Radial glia や Oligodendroglia へ分化が決定した細胞は、認められ、その分布に顕著な差はみられないようである。このことから現時点では、特定の細胞系譜への分化が決定した、あるいは分化した細胞特異的に EAT が生存を支持しているというよりは、より未熟な段階での生存を支持していることが、考えられるが、さらに特定の系譜に分化した細胞が欠損していないかどうか、検討が必要である。

また、β細胞特異的な EAT の機能を解析するために ES 細胞を利用した *in vitro* の系の構築を目指し、EAT<sup>flox/flox</sup> ES 細胞を作製した。

本 ES 細胞に、pMC1 プロモーターや PGK プロモーター制御下に Cre を発現するベクターを導入することにより、EAT<sup>-/-</sup>ES 細胞の作製を試みた。しかしながら、両 allele を欠損した ES 細胞を得ることができなかった。このことから EAT が ES 細胞の生存にも必須である可能性もあると考えられ、今後の解析のためには、EAT をコンディショナルに強制発現する状態でのノックアウトする、あるいは *in vitro* の分化培養系を用いて ES 細胞をラ氏島細胞など、特定の系譜へ分化させた後にアデノウイルスベクター等を用いてノックアウトするなどの方法が必要と考えられた。

今後、EAT ノックアウト ES 細胞を作製することにより、初期胚レベルのみならず、膝ラ氏島、血球系細胞、神経系細胞を含む多数の組織への分化誘導系を用いることにより、そ

それぞれの組織における EAT の機能メカニズムが解明されることが期待される。

## E. 結論

胎児性癌分化関連分子 EAT を神経上皮特異的に欠失するマウスは、胎生期は外観上、大きな異常は認めないが、胎齢 12.5 日頃に未熟神経細胞に多数の細胞死を生じることが明らかとなった。その結果、胎齢 14.5 日～18.5 日頃では、細胞死は目立たないが、脳、脊髄の容積の低下が認められ、何らかの機能欠損により、生後、致死となること考えられた。また、胎齢 12.5 日の神経上皮の細胞死は、Caspase3 の切断を伴うアポトーシスであると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu K, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos., *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364(4): 838-843.

### 2. 学会発表

EAT/mcl1, a gene related to embryonal carcinoma cells, is crucial for embryonic development and cell survival: 大喜多肇、梅澤明弘、宮川世志幸、片桐洋子、藤本純一郎、秦順一、竹田直樹、千葉英樹、清河信敬、第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月、2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当無し

### 2. 実用新案登録

該当無し

### 3. その他

該当無し

## 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  
研究期間 平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月

Dengue 出血熱の Fc $\gamma$  受容体 (R) を介する病態 (ADE) 形成機序を患者より分離した Dengue ウイルス (DENV) を用いて解析した結果 Fc $\gamma$ R の DENV-型交差抗体複合体との結合, raft との会合, シグナル伝達が重要であることが示唆された。

### A. 研究目的

急性熱性疾患である Dengue 熱 (DF), 致死性疾患である Dengue 出血熱 (DHF) の治療法は今だ確立されておらず, 交通網の発達, 気候の温暖化等により Dengue ウイルス (DENV) 感染症の世界的な流行地域の拡大, 本邦への侵入が危惧されている現在, DENV の感染機構および病態解明とその治療法の確立が早急に求められている。DENV 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。DENV 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。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 DF, 致死性疾患である 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, 膜貫通領域, 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 $\gamma$ 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。そこで本研究の目的は DENV の抗体依存性感染増強による DENV 感染症の病態形成機序を解析することである。IgG と Fc $\gamma$ R の相互作用機序による抗体依存性感染増強をターゲットとする薬物は DHF の予防・治療薬としての効果が期待される。

### B. 研究方法

#### DENV の分離

DF 患者血清よりサル腎由来 Vero 細胞を用いて DENV を分離し実験に供しする。

#### DENV の *In vitro* 抗体依存性感染増強モデルの開発

各種 Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R) を強発現させたサル腎由来細胞 Vero 細胞, Cos7 細胞等確立し, 中和能を有しない型交差抗体と DENV の免疫複合体による各細胞への感染性増強 (ADE) を観察す

ることにより抗体依存性感染増強に重要な役割を果たすFcγRを同定した。ADEの観察はフローサイトメトリー法を用いた。

#### CD32のADE発生機序における機能解析

CD32の細胞膜上に存在するraftと会合する上で重要である膜貫通領域およびCD32のシグナル伝達において重要な細胞内領域に点変異体および欠損変異体を導入しCos-7細胞に強発現させ、ADEモデルを用いてCD32のADEにおける役割を検討した。

#### (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

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。

CD32発現Cos7細胞におけるDENV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50%以

上の細胞にCD32の発現が認められた。抗DENV抗体を有する患者血清とDENVを37℃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DENVの感染を確認した。その結果DEN患者血清と反応させたDENVはDEN患者血清と反応させていないDENVに比較して約3倍のADEが観察された。したがってDENVのADEはDENV-抗DENV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。また抗DENV抗体を用いた蛍光抗体法によりDENV感染細胞を観察したところ、患者血清と反応させたDENVにおいてADEが観察された。以上のことから、DENVは患者血清中に含まれる抗DENV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DENVのADEにおけるCD32の役割をさらに検討し、CD32のシグナル伝達の役割について検討するためCD32のraftとの会合に関与する細胞膜領域およびCD32のシグナル伝達に関与する細胞内領域に各種の変異体を作製した。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作製した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50%以上であった。ADEモデルを用いてこれらの変異体のADE活性を検討したところADE発生においてCD32とraftとの会合およびCD32のシグナル伝達がADE発生機序において重要であることが示唆された。以上より今後ADEモデルを用いてADE発生機序をターゲットとする薬剤あるいは抗体の開発が可能になった。

### D. 考察

我々はこれまでにDHF患者血清よりDENV2型および3型ウイルスを分離し、さらに培養細胞にCD32を導入することによってADEモデルの確立に成功した。さらにCD32のraftとの会合領域およびCD32のシグナル伝達に関与する領域に点変異体あるいは欠損変異体を作製し、我々の確立したADEモデルを用いることによって各領域のADEにおける役割を解析することに成功した。その結果ADEの誘導にはDENV-DENV型交差抗体複合体のCD32への結合だけでは十分ではなく、CD32のraftとの



会合, CD32 のシグナル伝達が ADE の誘導に重要であることを明らかとした。従って CD32 が DHF の治療法の確立において薬剤開発のターゲットとなることが示唆された。

## E. 結論

本研究により我々は ADE の発生機序に Fc $\gamma$ R の raft への会合とシグナル伝達機構が重要であることを明らかとし, これが治療法確立のターゲットとなることが示唆された。現在 DENV 感染に対する特異的治療法はなく, 世界の熱帯・亜熱帯地域において DF, DHF の流行は今後も続くことが予想され, 本邦においても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。DHF 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発症メカニズムを明らかとし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大きく貢献する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I. Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology* 2008 Jan 21; [Epub ahead of print]

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*. 2007. 13(2):322-4.

Nerome, R., Tajima, S., Takasaki, T., Yoshida, T., Kotaki, A., Lim, C.K., Ito, M., Sugiyama, A., Yamauchi, A., Yano, T., Kameyama, T., Morishita, I., Kuwayama, M., Ogawa, T., Sahara, K., Ikegaya, A., Kanda, M., Hosoya, Y., Itokazu, K., Onishi, H., Chiya, S., Yoshida, Y., Tabei, Y., Katsuki, K., Tabata, K., Harada, S., Kurane, I. Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. *J. Gen. Virol.* 2007. 88(Pt 10):2762-8.

Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., Santos, F.D., De Jesus, M.D., Lina, B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Dragaer, R.D., Japaridze, A., Kurane, I. Dengue outbreak in East Timor In 2005: Emergence of Dengue virus type 3. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (in press)

Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., Kurane, I. Dengue Virus Type 2 Isolated From an Imported Dengue Patient in Japan: First Isolation of Dengue Virus From Nepal. *J Travel Med.* (in press)

林 昌宏, 倉根一郎. デング熱・デング出血熱. 化学療法の領域. 2005. 21(10):1433-1440.

林 昌宏, 倉根一郎. ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策. 山口獣医学雑誌. 2005. 32:1-12.

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)

### 2. 学会発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Role of Fc-gamma II receptor in antibody dependant enhancement of dengue viral infection. 第3回デングウイルス研究

ネットワーク会議 2007年8月

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Nerome, R., Ito, M., Tajima, K., Morita, T., Ishikawa, T., Kurane, I. Mouse Antibody Response to Inactivated West Nile and Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine for Immunization against West Nile virus and other Flaviviruses. 2006年アメリカウエストナイルウイルス会議2006年2月

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Ishikawa, T., Kurane, I. Mouse Antibody Response to novel Vero-Cell-derived Inactivated Human West Nile Vaccine for Immunization against West Nile virus. 第41回日米医学ウイルス性疾患専門部会 2007年7月

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/デング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2005年11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: ウエ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2005年11月

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

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

モイ メンリン, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎: デング出血熱におけるFc  $\gamma$  IIA (CD32) 受容体を介した抗体依存性感染増強 (ADE) メカニズムの解析, 第55回日本ウイルス学会2007年10月

#### G. 知的所有権の出願・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

## 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

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第一部  
研究者 林 昌宏

デング出血熱のFc $\gamma$ 受容体(R)を介する病態(ADE)形成機序を解析した結果Fc $\gamma$ Rのデングウイルス-型交差抗体複合体との結合, raftとの会合, シグナル伝達がADE発生機序において重要であることが示唆された。

### A. 研究目的

現在世界保健機関(WHO)により全世界で約30億人の人々がデングウイルス(DENV)の流行地域に居住しており,年間約1億人のDENV感染者が発生しさらに2万4千人がDENVにより死亡していると推計されている。DENV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。DENVには1-4型の4つの異なるウイルスが存在し,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DENV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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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におけるFc $\gamma$ R役割を解析しDHFにおけるADEの発生機序を解明することである。

### 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℃ 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℃, 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。DENV 感染細胞の染色は抗 DENV 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 10<sup>6</sup>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DEN抗体を有するDEN患者血清を2000倍に希釈し、DENV(1型)と混合後37℃1時間反応した。CD32発現細胞にDENV-患者血清複合体を接種し4日間培養した。DENV 感染細胞をフローサイトメトリー及び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 DENV 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 50%の細胞に CD32 の発現が認められた。抗 DENV 抗体を有する患者血清と DENV を 37℃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 DENV の感染を確認した(図 1)。その結果デング患者血清と反応させた DENV はデング患者血清と反応させていない DENV に比較して約 7 倍の ADE が観察された(図 2)。また抗 DENV 抗体を用いた蛍光抗体法により DENV 感染細胞を観察したところ、患者血清と反応させた DENV において ADE が観察された。以上のことから、DENV は患者血清中に含まれる抗 DENV 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 DENV の ADE における CD32 の役割をさらに検討するため CD32 のシグナル伝達に関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 dT, dP3, ITAM1 を欠損した dP1P2, ITAM2 から C 末端まで欠損した dP2, ITAM1 から C 末端まで欠損した dP1, チロシンリン酸化部位 I から C 末端まで欠損した dP3P2P1, 細胞内領域を完全に欠損した CT, ITAM1, 2 を欠損した dP3P2, raft との結合部位を欠損した CA, チロシンリン酸化部位をすべて欠損した Y3F である。これらの作成した変異体を Cos7 細胞に導入しそれらの ADE 活性を検討した結果 raft