

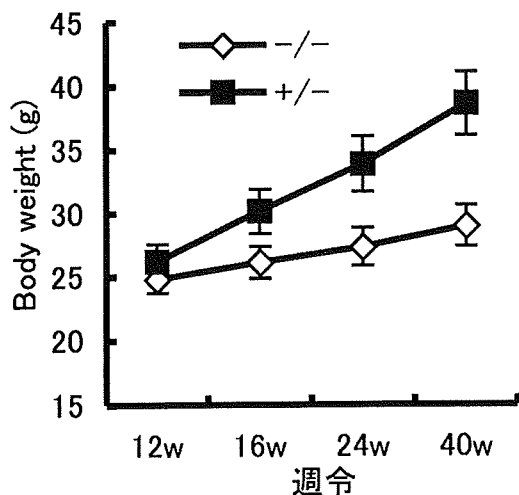
血、2、食欲不振、体重減少（成人）、失神低血糖症状、筋萎縮、易疲労、衰弱、耐寒性低下、低血圧、3、体重増加不良（小児）、4、貧血、5、月経異常、腋毛、恥毛脱落（女性）、6便秘、下痢、7、精神異常（抑うつ傾向）、不安感、8、色素沈着などの様々な症状が報告されている。本年度は、副腎皮質機能低下症モデルマウス、ACTH 受容体遺伝子改変マウス(MC2R KO)において、これらの症状が起こっているどうか検討し、これらの症状が観察されれば、グルココルチコイド、CRH antagonist によって、症状が回復するかどうか検討した。

MC2R KO マウスを B6 マウスに 8 回戻し交配した。MC2R KO (N8) では、離乳まで生き残ったホモマウスは、得られなかった。B6 背景の MC2R^{+/-} (N8) ヘテロを Balb/c マウスと交配し得られたヘテロマウス同士の掛け合わせを行ない B6/Balb 背景のマウスを実験群として解析を行った。B6/Balb 背景の MC2R^{+/-} マウスでは、約半分が離乳まで生き残り、解析に用いた。

C 研究結果

平成 21 年度には、副腎皮質機能低下症モデルマウス、ACTH 受容体遺伝子改変マウス (MC2R KO) において、体重増加不良、易疲労、哺育不良、貧血、尿量の減少などの副腎皮質機能低下症の症状を検討した。

体重増加不良



MC2R KO マウスでは、12週令までの体重に違いが見られないが、高齢で♂、♀共にコントロールと比べて、痩せていることが明らかになった。さらに、体重に違いが見られない12週令においても、脂肪重量が減少していることが明らかになった。

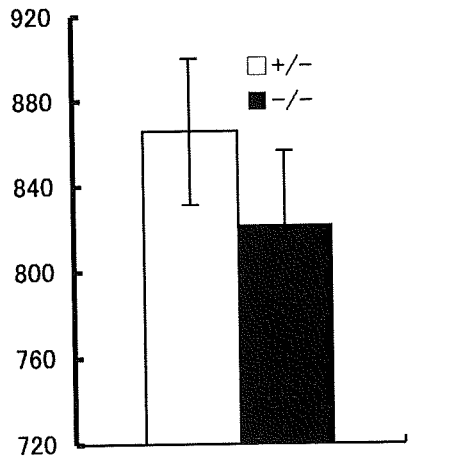
MC2R KO マウスの脂肪組織を組織学的に解析したところ、MC2R KO マウスでは、脂肪細胞の大きさには、違いがなかった。このことから、脂肪細胞の数が減少している可能性が推測された。

さらに、MC2R KO マウスに高脂肪食を与えて飼育しても、コントロールと比べて、体重の増加率、脂肪量の増加率が低下しており、高インスリン血漿になりにくい事が明らかになった。さらに、血清蛋白の網羅的な解析から、MC2R KO マウスでは、グルココルチコイドによって制御されている IGF-1 が低下している事を見いだした。

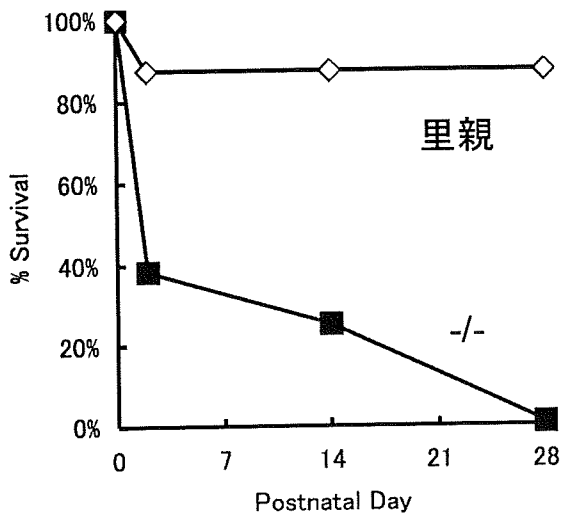
副腎皮質機能低下症で見られる易疲労に着目し、トレッドミル解析を行った。MC2R KO マウスをトレッドミルに慣らした後に、回転速度を徐々に増加させ、最高走行速度を検査した。また、一定の回転速度で、走れなくなるまでの時間、耐久時間を検査した。MC2R KO マウスは、最高速度、対九時間の両方で野生型よりも劣っている事を明らかにした。握力については、大きな違いがなかったことから、MC2R KO マウスは、筋萎縮ではなく易疲労であると考えられ、副腎皮質機能低下症の症状に合致した興味深い知見である。

睡眠異常の可能性について予備的な検討を行ったが、睡眠脳波に大きな違いが無かった。

末梢血の解析から、MC2R KO マウスでは、赤血球数がコントロールマウスと比べて、有意に低下していることを見いだした。約40%の副腎不全の患者において、貧血が起こっている事が報告されている。MC2R KO マウスの赤血球数が減少している事から、副腎不全に加えて、遺伝的背景の影響により、貧血が起こっていると考えられる。グルココルチコイドを補充すると、赤血球数はコントロールマウスのレベルまで回復した。



これまでの解析の結果から、♀のMC2R KO マウスは、妊娠可能で出産出来るが、MC2R KO マウスから生まれたヘテロマウスは、成体まで成長する事が出来なかった。MC2R KO マウスから生まれたヘテロマウスを里親に育てさせると正常に成体まで成長する事から、母親の哺育不全に伴う出生生存率低下である事が明らかになった。



便秘、下痢、筋萎縮は、このマウスの定常状態では、観察されなかった。

D 考察

平成22年度は、他の症状についても探索するとともに、グルココルチコイド補充によって、回復するかどうか検討する。さらに、グルココルチコイドの補充以外の治療法の開発を進める。

E 結論

MC2R KO マウスにおいて、副腎皮質機能低下症の症状に合致した症状が観察された。

F 研究発表

1、論文発表
なし

2、学会発表
なし

G 知的財産権の出願・登録状況

1、特許取得
なし

2、実用新案登録
なし

3、その他
なし

軸索保護に基づく神経変性疾患治療薬の開発

所 属 国立精神・神経センター 神経研究所
疾病研究第6部

研究者 若月 修二

研究要旨 本研究では多くの神経変性疾患に認められる軸索変性から「軸索を守る」という観点から、その分子メカニズムの詳細を理解することにより、軸索保護シグナルの分子基盤の整備を行い、難治性神経疾患に対する治療薬の開発に繋げることを目指す。

A. 研究目的

パーキンソン病や筋委縮側索硬化症などの難治性神経疾患に関する治療研究では、これまで神経細胞死に焦点を当てた研究が精力的に行われ、現在もその主流であるが、多く場合、細胞死は病態後期に観察される不可逆なプロセスであることから、より有効性の高い治療方法の開発には細胞死とは別の、病態の発症、進行メカニズムを踏まえた新たなアプローチが必要である。軸索変性は神経変性疾患を含む脳神経疾患において神経細胞死の前段階として観察されるが、多くの脳神経疾患モデルにおいて神経細胞死を抑制しても軸索変性を抑制できないことから、その進行には細胞死とは独立した軸索自律的なメカニズムが存在すると考えられる(Annu. Rev. Neurosci. 2005, 28:127-156.)。また、パーキンソン病モデル、末梢神経障害モデルなどにおいては、軸索変性を抑制、あるいは大幅に遅延させることにより症状の軽減や寿命の延長が認められている(Nat. Rev. Neurosci. 2005, 6: 889-898.)。これらのことから、軸索変性過程を分子レベルで理解し、これを制御する方法を確立することは、神経変性疾患の治療に有効である可能性が高い。

一方、*wlds* (Wallerian degeneration slow) と呼ばれる自然発症マウスは物理的傷害、あるいは薬剤による化学的傷害が誘導する軸索のワラー変性が著しく遅延しており、脳虚血などの実

験モデルの適用、遺伝的な疾患モデルとの交配による検証から、さまざまな軸索変性に対して抵抗性を示す結果、疾患による症状の軽減、寿命の延長などを認める。同マウスにはユビキチン鎖伸長因子 Ufd2a とニコチンアミドモノヌクレオチドアデニル転移酵素 Nmnat1 のキメラタンパク質 Wld^s が発現する。前者はユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク質分解に関わり、後者はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の生合成に関わる酵素である。軸索変性を指標とした培養神経細胞を用いた解析から、Wld^s タンパク質あるいは Nmnat1 を導入することにより軸索変性が遅延するが、Ufd2a を導入し発現レベルの改変を行った場合には遅延効果が得られていない(Science 305, 1010-1013.)。したがって、Nmnat1 活性によって産生された NAD が軸索変性を遅延させると考えられるが、タンパク質分解系、特にユビキチン・プロテアソーム経路の阻害によりワラー変性が抑制されることが別の研究により明らかにされており、Ufd2a の関与を主張する研究者も少なくない(Neuron 39, 217-225.)。何れにしても、神経細胞、もしくは神経軸索に内在するシグナル伝達系を改変することで軸索変性を抑制できること、すなわち軸索保護活性を賦与できることは明らかではあるが、その分子メカニズムについては十分な理解が得られていない。

このような背景のもと、申請者は軸索変性の進

行を抑制,あるいは遅延させる低分子化合物のスクリーニングを行った。神経軸索変性は微小管の脱重合に帰結される現象であり,この過程にはリン酸化,および脱リン酸化酵素が複数関わることから,市販のリン酸化酵素阻害剤を材料に *in vitro* 軸索変性モデル(研究方法の欄を参照)を用いたスクリーニングを行った結果,タンパク質リン酸化酵素 GSK3 β の活性阻害剤が軸索変性を顕著に遅延させることを突き止めた。GSK3 β は微小管の脱重合を促進するリン酸化酵素である。解析の結果,定常状態にある軸索ではタンパク質リン酸化酵素 Akt/protein kinase Bによるリン酸化制御により不活性化状態にあるが,軸索変性開始後,GSK3 β は活性化し,驚いたことに,Aktの存在量が軸索変性の開始後の時間経過と共にGSK3 β の活性化と逆相関して減少した(図1)。Aktの減少はUPS依存的であり,今回,この過程に関わるE3ユビキチンリガーゼユビキチンリガーゼとしてzinc and ring finger(ZNRF)1を同定した。ZNRF1は坐骨神経傷害後の軸索変性過程において,神経節での発現が上昇する遺伝子として同定されたユビキチンリガーゼであり,軸索変性開始後のZNRF1遺伝子の発現変動パターンはユビキチン遺伝子とよく一致する(J. Biol. Chem. 276, 34141-34141.)。

本研究では,ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルを主軸に,神経変性疾患の進展と症状形成に重要な役割をもつ軸索変性の分子メカニズムを理解することにより,得られた知見を手がかりに,軸索変性を抑制する方法論を確立し,これまで有効な治療法のなかった神経変性疾患の治療に役立てることを目的とする。また,軸索保護の観点から,

1. 軸索変性の分子メカニズムに基づいた神経変性疾患の新しい治療法の開発
2. 軸索変性過程で活性化するシグナル伝達経路を調節,あるいは阻害する薬剤の同定

を目標とした解析を行い,神経変性疾患に対する最適な治療,および効果を得るための分子基盤を

整備することを目指す。

B. 研究方法

本年度は軸索変性過程におけるE3ユビキチンリガーゼZNRF1依存的なAkt-GSK3 β の活性制御機構を明らかにするため,

1. 軸索変性におけるAktおよびGSK3 β シグナルの生物学的意義付け
2. Aktをユビキチン化に導くユビキチンリガーゼの同定

に関する解析を行った。

上記1.に関しては,主として*in vitro*軸索変性モデルを用いた。同モデルでは,マウス胚より調製した後根神経節を培養し軸索を伸長させた後,神経節を除去することで軸索変性を経時的に観察し(Science 305, 1010-1013.),変性抑制効果の判定は画像解析ツールを用いて定量的な評価を行った。さらに,アデノウイルスベクターによる遺伝子導入により,AktならびにGSK3 β ,それぞれについて,構成的活性型,優性不活性型分子などの変異分子を作製し,抑制効果の有無についての評価を行った。

上記2.に関して,E3ユビキチンリガーゼZNRF1を候補分子として,Aktをユビキチン化し得る条件の検討を行った。双方のアミノ酸配列欠失変異分子を作製し,免疫沈降試験により,結合様式に関する検討を行った。また,E3ユビキチンリガーゼとしての機能不全分子C184A(184番目のシステインをアラニンに置換した変異分子)は軸索変性を抑制する可能性があるため,これを作製し,アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入により,*in vitro*軸索変性モデルにおける抑制効果の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はその成果を神経変性疾患治療薬開発に応用することを目的とするが,研究期間内にお

いては臨床応用の前段階までの解析につき実験動物を用いて行うため、人権保護に関する特記事項はない。また、実験動物の使用に際しては、動物愛護等の法令、および国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会の定める規則を遵守して行い、研究計画はすべて同委員会で審議され承認を受けた。

C. 研究結果

1. 軸索変性における Akt および GSK 3 β シグナルの生物学的意義付け

アデノウイルスなどのウィルスベクターを用いた遺伝子導入により培養後根神経節神経細胞に導入した後、*in vitro* 軸索変性モデルによりその効果を検討した結果、野生型、および構成的活性変異型 Akt を導入した場合には軸索変性の進行が抑制された。これとは反対に GSK 3 β に関しては優性不活性変異分子を導入した場合にのみ軸索変性の進行を抑制された (図 2)。

上記に加えて、複数の異なる GSK 3 β 阻害剤が軸索変性の進行を抑制することを明らかにした。

2. Akt をユビキチン化に導くユビキチンリガーゼの同定

HEK293 細胞などの株化細胞に対する強制発現系で検討した結果、シクロヘキシミド処理によるタンパク質合成阻害下における Akt の半減期は E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 の存在下において著しく低下した。MG132、およびラクタシスチン処理によるプロテアソーム阻害下において ZNRF1 の存在下において Akt は顕著にポリユビキチン化された。

一方、ユビキチンリガーゼとしての機能不全分子 ZNRF1 C184A を培養後根神経節神経細胞に導入した後、*in vitro* 軸索変性モデルによりその効果を検討した結果、軸索変性の進行を顕著に抑制された。

D. 考察

本研究により、軸索変性の進行には E3 ユビキ

チンリガーゼ ZNRF1 による Akt-GSK 3 β シグナルの活性制御が重要であることが示唆された。軸索においては CRMP-2, MAP1B, APC が GSK3 β のリン酸化標的と考えられる。これらの分子について、GSK3 β によるリン酸化部位を改変、例えば、CRMP-2 であれば 514 番目のスレオニンをアラニンに置換して GSK3 β の不活性状態を模倣する非リン酸化型分子を作製し、軸索変性に対する遅延効果を *in vitro* ワーラー変性モデルにより検証する必要があると考える。一方、未解明の重要な課題として ZNRF1 の活性制御がある。ZNRF1 は変性を開始していない定常状態の軸索にも存在することから、軸索変性に始まる何らかのメカニズムによって ZNRF1 自身の活性制御がなされると考えられる。軸索変性は細胞外からのイオンの流入やそれに伴う pH 環境の変化などによって開始されると考えられているが、これらと ZNRF1 の活性制御との関連については大変興味深いポイントであるとともに解明すべき課題のひとつである。今後は視神経変性モデルなどの動物モデルを用いて、軸索変性の進行における ZNRF1-Akt-GSK 3 β シグナルの生物学的意義を検証するとともに、野生型 ZNRF1、およびユビキチンリガーゼ機能不全型 ZNRF1 C184A を神経特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製することにより、軸索保護効果を個体レベルで検証を行う。さらに ZNRF1-Akt-GSK 3 β シグナルと並行する、あるいはこれを増強するシグナル伝達系を明らかにする既知小分子化合物のスクリーニングを行い、軸索変性の分子メカニズムの全貌を解明していきたい。

E. 結論

本研究は神経変性疾患の進展と症状形成に重要な役割をもつ軸索変性の分子メカニズムを理解することにより、得られた知見を手がかりに、軸索変性を抑制する方法論を確立し、これまで有効な治療法がなかった神経変性疾患の治療に役立てることを目的として開始された。本研究によ

り，軸索変性の進行には E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 による Akt-GSK 3 β シグナルの活性制御が重要であることが示唆された。この成果は，軸索保護シグナルを調節する薬物治療，遺伝子治療など，神経変性疾患に対する最適な治療法，および効果を得るための分子基盤を整備の端緒となると考える

F. 研究発表

原著論文：

Wakatsuki, S., Yumoto, N., Komatsu, K., Araki, T., Sehara-Fujisawa, A.
Roles of Meltrin β /ADAM19 in Progression of Schwann Cell Differentiation and Myelination during Sciatic Nerve Regeneration.
J. Biol. Chem. (2009) 284, 2957-2966.

総説：

若月修二，湯本法弘，瀬原淳子
神経系の細胞間シグナル伝達におけるメルトリ
ン β の多面的な役割
蛋白質核酸酵素 (2009) 54, 1735-1741.

学会発表：

若月修二，齋藤文典，荒木敏之
ユビキチンリガーゼ ZNRF1 はプロテアソームによる Akt の選択的分解を介して神経軸索変性の進行を制御する。
第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日
横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

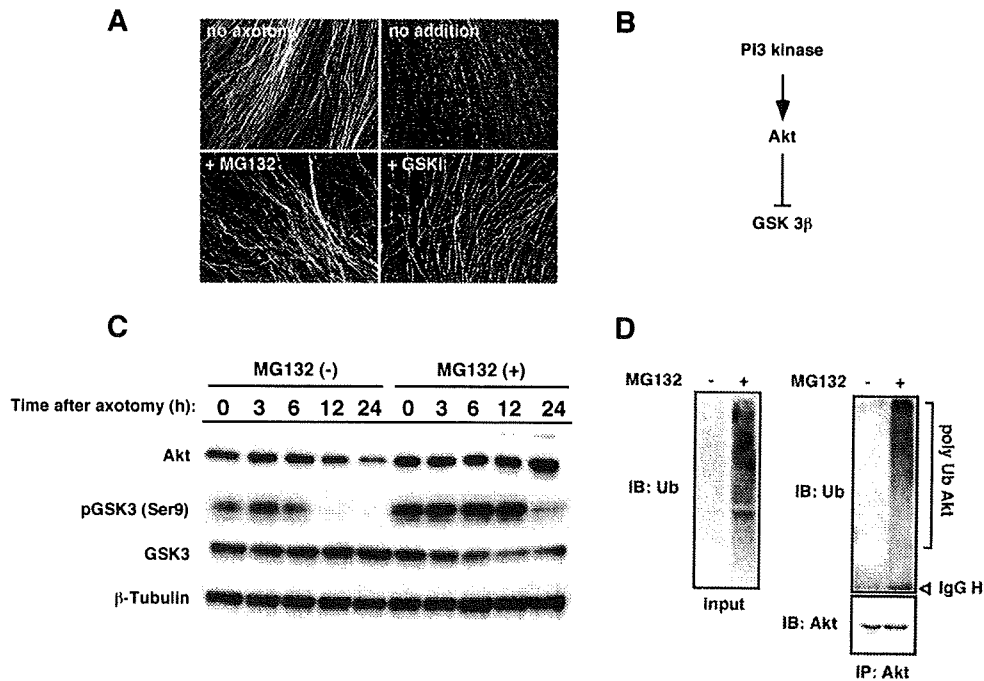


図1. 軸索変性過程において, AktはUPSにより選択的に分解される.

(A) *in vitro* ワーラー変性モデルにおける細胞骨格系の経時的変化を微小管に対する免疫染色により示した. 軸索変性開始前 (no axotomy) はチューブリンの免疫染色により精緻な軸索の構造を認めるが, 変性の進行に伴う細胞骨格の崩壊により, 微小管は単量体のチューブリンに脱重合するため, 軸索は点状の染色態度を呈する (no addition) が, UPS阻害剤MG132 (+ MG132), あるいはGSK阻害剤 (+ GSKi) の存在下では顕著に抑制される. (B) GSKはAktにより9番目のセリン残基がリン酸化され活性が抑制される. (C) 変性開始後の神経軸索の細胞抽出液に対するイムノブロット. Akt, GSK 3, リン酸化GSK 3 (Ser9, 不活性なGSK 3が検出される), チューブリンに対する抗体で検出した. (D) 変性開始24時間後の神経軸索の細胞抽出液から抗Akt抗体による免疫沈降を行い, 抗ユビキチン抗体によるイムノブロットを行った. UPS阻害剤MG132存在下ではポリユビキチン化Aktが検出された.

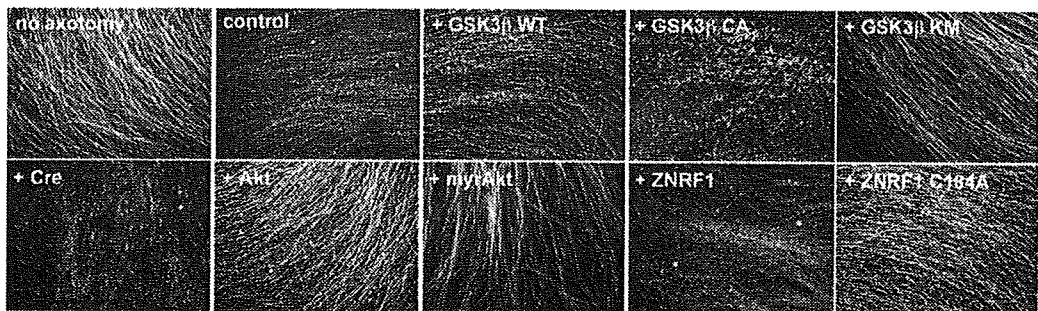


図2. ZNRF1-Akt-GSK3βシグナルが軸索変性に与える効果.

in vitro ワーラー変性モデルにおける細胞骨格系の経時的変化を微小管に対する免疫染色により示した. アデノウイルスベクターにより, 野生型ZNRF1, ZNRF1 C184A (優性不活性型変異体), 野生型Akt, myrAkt (構成的活性型変異体), 野生型GSK, GSK K85R (優性不活性型変異体), GSK S9A (構成的活性型変異体)などを導入し, 軸索変性に与える効果を調べた. ZNRF1-Akt-GSK3βシグナルを抑制する遺伝子, 例えば, myrAkt (構成的活性型Akt) をアデノウイルスベクターによって強制発現させると軸索変性が抑制された.

細胞外ステロール取り込みによる抗真菌薬耐性機構の 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 ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、抗真菌薬に対する薬剤耐性化の主要な原因となっている。申請者は、新規 ABC タンパク質が細胞外からコレステロールを取り込んで、病原真菌をステロール合成阻害剤に耐性化することを見出した。この新規薬剤耐性化メカニズムを解明し、効率がよく耐性化を引き起こさない新規抗真菌薬の開発に応用する。

A. 研究目的

真菌症は、現代社会において Immunocompromised host の増加とともに増加傾向にある感染症の1つであるが、国内で認可されている抗真菌薬は少なく、予防投与に伴う菌の薬剤耐性化が臨床において問題となっている。現在使用されている抗真菌薬の多くは、真菌の細胞膜を構成するエルゴステロール合成経路を標的としているため、真菌のステロール代謝の研究は、耐性化を引き起こしにくく、さらに効果の高い抗真菌薬開発のための重要な研究領域である。

病原真菌 *Candida glabrata* は、好気条件でエルゴステロールを合成する一方で、血清などの生体成分からステロールを大量に取り込む (Antimicrob Agents Chemother 44:2411-8, 2000; Antimicrob Agents Chemother 45:3037-45, 2001)。また、*C. glabrata* は血清存在下でステロール合成を阻害する抗真菌薬アゾールに高度耐性化することから (Antimicrob Agents Chemother 45:3037-45, 2001)、真菌のステロール取り込み機構とアゾール耐性には何らかの相関があることが推測された。我々は 2007 年に、ATP-binding cassette タンパク質遺伝子 *CgAUS1* が血清添加で発現が誘導され、コレステロールの取り込みを担うこと、さらに *CgAUS1* 遺伝子を破壊すると血清によるアゾール系抗真菌薬耐性化が起こらなくなることを明らかにした (J Antimicrob Chemother 60:1264-72, 2007)

(図1、2)。

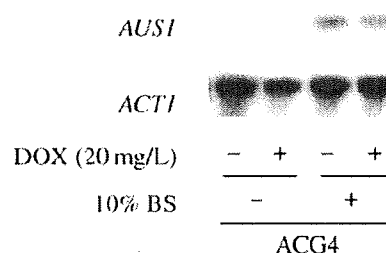


図1 ノザンプロットによる遺伝子発現解析 *C. glabrata* ACG4株において血清の添加は *CgAUS1* 遺伝子の発現を強く誘導する

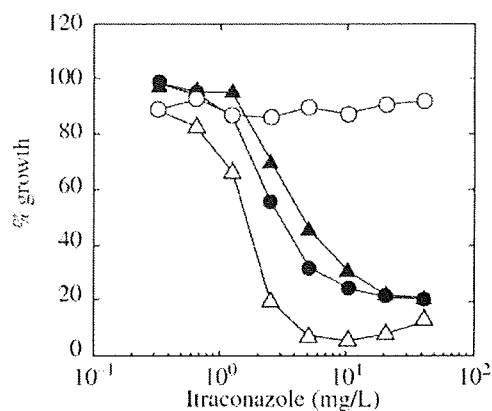


図2 血清添加によるアゾール非感受性化 *tet-AUS1* (ドキシサイクリン添加で *CgAUS1* の発現を選択的に抑制できる株)において血清を添加するとイトラコナゾールによる生育阻害が減弱するが (O)、ドキシサイクリンによって *CgAUS1* の発現を抑制すると血清の効果が失われる (Δ)。

本研究では、ステロールトランスポーター CgAus1p の細胞内局在と基質特異性を明らかにする。また、*C. glabrata* に取り込まれたステロールの細胞内代謝と細胞内分布を、従来の脂質分析手法と質量顕微鏡を用いて分析する。以上の結果から、血清添加によるアゾール剤耐性化メカニズムを解明する。

B. 研究方法

C. glabrata は血清や胆汁の添加によってアゾール系抗真菌薬耐性になるが、コレステロール単独では血清と同程度の薬剤耐性化は認められなかった。血清をゲルろ過カラムで分画して培地に添加することで、アゾール系抗真菌薬耐性に必要な要素の同定を試みる。また、上記培養条件における細胞内ステロールを薄層クロマトグラフィーおよび HPLC によって分析した。また、質量顕微鏡に関する、情報収集を行い、研究計画をたてた。

(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

血清を陰イオン交換カラムによって分画し、アゾール非感受性化を引き起こす画分の特定を試みた。40mg/L FLC を含む合成最小培地に、血清を DEAE 陰イオン交換カラムによって分画したフラクションを添加し *C. glabrata* の生育を調べた。血清によるアゾール非感受性化活性はフラクション#1-3 (50mM-300mM NaCl 溶出) に、それぞれ同程度認められた。フラクション#1-3 にどのようなタンパク質が含まれるのかを明らかにするた

めに、SDS-PAGE を行った。その結果、フラクション#1-3 には血清に含まれるほとんどのタンパク質が含まれていた。そのため、どのようなタンパク質にアゾール非感受性化活性があるのかを特定することはできなかった。

次に血清添加時の細胞内ステロールの定量を行った。野生型と *aus1Δ* 変異株を血清やアゾールを含む培養条件において細胞から Bligh Dyer 法によって総脂質を抽出し HPLC によってステロールを検出定量した。またフリーとエステル化されたステロールを別個に検出するためにケン化したサンプルと非ケン化サンプルを別々に解析した。コレステロールエステルは野生型と *aus1Δ* 変異株のいずれの細胞からも大量に検出された (図 3、4)。また、アゾール系抗真菌薬の標的分子 CYP51A の機能障害の指標であるラノステロールの蓄積は野生型、*aus1Δ* 株のいずれにも同程度認められた (図 4)。以上の結果はアゾールが野生型、*aus1Δ* 株のいずれにおいても標的分子である CYP51A を同様に阻害していることが明らかになった。

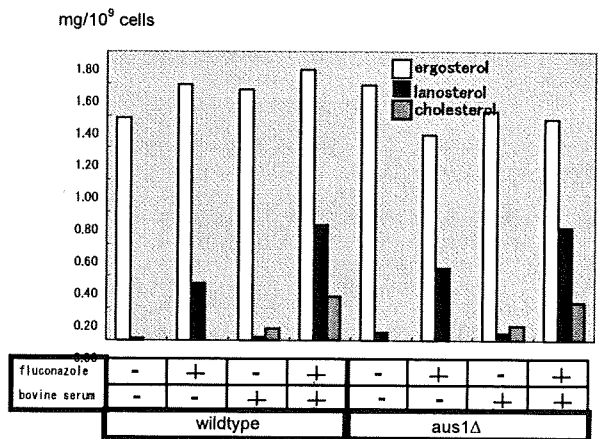


図 3 *C. glabrata* 内ステロールの定量

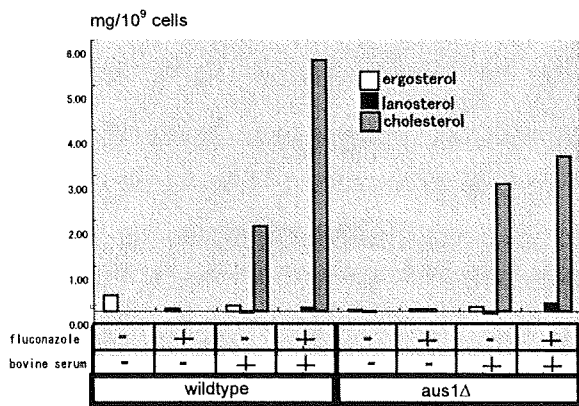


図4 *C. glabrata* 内ステロールエステルの定量

D. 考察

本研究では、血清によるアゾール系抗真菌薬非感受性化機構を明らかにすることを目的とした。

血清を陰イオン交換カラムで分画し、活性画分を分離しようと試みたが、活性はタンパク質を含む画分に広範囲に分布し、どのようなタンパク質が活性を担っているのかを明らかにすることはできなかった。その理由として大量のBSAがカラムの分離能を低下させていることが考えられるため、BSAの除去をまず試みるのが先決かもしれない。

血清添加が細胞内ステロール含量におよぼす影響を明らかにするために、血清添加時の野生型、*aus1Δ*株の細胞内ステロールの定量を行った。血清中のリポタンパク質由来のコレステロールエステルがどの細胞からも大量に検出されたことから、リポタンパク質は *C. glabrata* に *AUS1* に関係なく取り込まれているあるいは、酵母細胞表面に非特異的に吸着することが示唆された。アゾールが細胞内で機能していることを示すラノステロールが野生型、*aus1Δ*株のいずれからも同程度検出されたことから、フルコナゾールの効果を減弱させることが血清によるアゾール系抗真菌薬非感受性化を引き起こしているのではないことが示唆された。以上の結果は、血清によるアゾール系抗真菌薬非感受性化は、これまでの薬剤排

出や CYP51A の変異などのような既知の薬剤耐性機構とは全く異なる薬剤耐性化機構であることが推測される。少なくとも細胞外ステロールトランスporterである *AUS1* がこの耐性化に関係することは明らかであるので、今後詳細なステロール分析を行う予定である。

E. 結論

病原真菌 *C. glabrata* は血清添加によって抗真菌薬アゾールに低感受性になる。脂質分析の結果、アゾールによる静菌効果の指標であるラノステロールは、血清の有無にかかわらず検出された。この結果は、血清存在下でもアゾールが効果的に細胞内の標的分子を阻害しており、*C. glabrata* が既知の薬剤耐性メカニズムとは異なる機構で薬剤耐性を獲得していることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 22(2), 291-321, 2009
- 2) Nagi M, Tanabe K, Takano Y, Kikuchi K, Miyazaki Y, Niimi M. Serum or bile affects the in vitro azole susceptibilities of *Candida* spp. Jpn J Infect Dis 62(4), 306-308, 2009

2. 学会発表

- 1) Koichi Tanabe, Minoru Nagi, Erwin Lamping, Brian C Monk, Richard D Cannon, Yoshitsugu Miyazaki and Masakazu Niimi : Domain-shuffled chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal structural determinants affecting substrate and inhibitor specificities International Society of Animal and Human Mycosis (ISHAM) 2009 2009年5月

- 2) 田辺公一：病原真菌のアゾール系抗真菌薬耐性機構 第177回 酵母細胞研究会 2009年7月
- 3) 田辺公一、名木 稔、新見昌一、山越 智、梅山 隆、大野秀明、宮崎義継：血清による *Candida albicans* のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討 第56回日本化学療法学会東日本支部総会／第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会合同学会学術講演会 2009年10月
- 4) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、大野秀明、宮崎義継：真菌AUS1トランスポーターの比較解析 日本農芸化学会 2010年度大会 2010年3月

ウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることによる安全性の高い遺伝子治療法の革新的技術開発

所 属 国立国際医療センター研究所
難治性疾患研究部

研究者 小山 貴芳

研究要旨 本研究課題は、iPS 細胞樹立や遺伝子治療に用いられるウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることで、その安全性を高める技術の確立を目的としている。我々はこれまでに、HIV-1 の研究を行う過程において、HIV-1 ゲノムが宿主 DNA の二重鎖切断部位に挿入されることを見出した。そこで本研究課題では、(1) レアカッター制限酵素を使ってヒトゲノムの特定部位に DSB を引き起こし、(2) ウイルスベクターを感染させることで、(3) DSB 部位にウイルスベクターを挿入できるのではないか、という作業仮説を立て研究を行った。部位特異的 DSB 部位の候補として rDNA 上の I-PpoI サイトを用いて実験を行った。その結果、レンチウイルスベクターを I-PpoI サイトに挿入させることに成功し、同サイトへの挿入頻度は約 30%であった。さらに、I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入された細胞のクローニングにも成功した。このクローニングした細胞について、ウイルスベクター上にコードされている EGFP 遺伝子の発現を 2 ヶ月間に渡って調べたところ、薬剤非選択条件下でも安定して発現していた。今後は、人工的に設計した制限酵素 (Zinc-Finger Nuclease, ZFN) を用いて、ヒトゲノムの様々な場所にウイルスベクターを挿入させる試みを行う予定である。本研究によって得られる成果は、再生医療や遺伝子治療の発展に多いに貢献できるものと期待される。

A. 研究目的

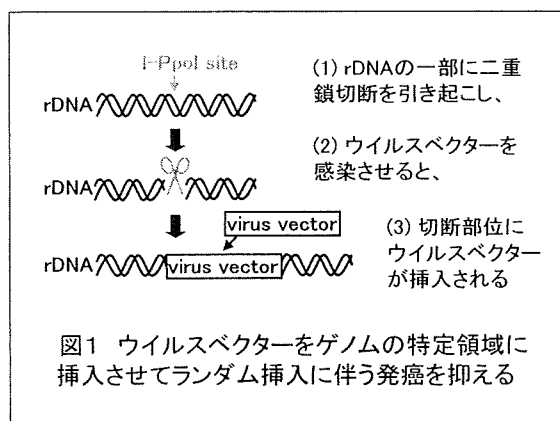
遺伝子治療では、ウイルスベクターが宿主ゲノムへランダムに挿入することによる、高頻度な発癌が大きな問題となっており (*Science*, **302**, 415 (2003)), そのために研究を中断することが多い。また最近、ヒト iPS 細胞の樹立が報告され (*Cell*, **131**, 1 (2007)), 臨床応用が現実味を帯びてきたように思え

るが、外来 DNA 導入に用いられるウイルスベクターの安全性を高めない限り、臨床応用は難しい。ウイルスベクターの安全性を高める研究は従来から進められているが、従来法の改良では不十分であり、新たな方法開発による技術的ブレイクスルーが求められている。

主任研究者らのグループはこれまでに、HIV-1 が感染の際、宿主ゲノムに二重鎖切

断 (double-strand break, DSB) を引き起こすという現象を発見し、報告した(*Cancer Res.*, **66**, 627 (2006), *Oncogene*, **26**, 477 (2007))。この HIV-1 感染による DSB 誘導の意義と機序を解明する過程で、ウイルス DNA が宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されるということを発見した。同様の現象は B 型肝炎ウイルスやウイルスのコア部位を欠如させたアデノ随伴ウイルスベクターでも報告されていることから(*PNAS USA*, **101**, 11135 (2004), *Nat. Genet.*, **36**, 767 (2004))、DSB 部位へのウイルス DNA 挿入は外来 DNA に普遍的な現象である可能性が出てきた。

そこで本研究課題では、(1) レアカッター制限酵素を使ってヒトゲノムの特定部位に DSB を引き起こし、(2) ウイルスベクターを感染させることで、(3) DSB 部位にウイルスベクターを挿入できるのではないかと、という作業仮説を立て研究を行った [図 1]。



既述した HIV-1、B 型肝炎ウイルスあるいはアデノ随伴ウイルスベクターの研究では 18bp 認識制限酵素 I-SceI による人工的な DSB 誘発の系が用いられるが、本来ヒトゲノム中には I-SceI の認識配列が存在しない。近年、ヒトゲノム中に 200~300 コピー存在する rDNA 内の配列を特異的に切断する 15bp 認識制限酵素 I-PpoI が単離された。そこで本研究課題ではこの I-PpoI を用いてヒトゲノムの rDNA を一部切断し、切断部位への HIV-1 ベースのレンチウ

イルスベクター挿入を試みた。

B. 研究方法

I-PpoI 発現アデノウイルスベクターの作製

I-PpoI を発現させるアデノウイルスベクターを作製し、様々な細胞株への DSB 誘導に用いた。

レンチウイルスベクターの作成

レンチウイルスベクターは invitrogen 社の pLenti6-V5-DEST に EGFP 遺伝子を導入し (pLenti6-EGFP)、同社 ViraPower Lentiviral Packaging Mix を用いて作製した。また、インテグラーゼ活性欠損ウイルスの作成はインテグラーゼ遺伝子に点変異を導入したプラスミド pLP1-D64V を用いて作成した。

レンチウイルスベクター感染実験

上述のレンチウイルスベクターを HT1080 細胞へ 2h 感染させた。感染の 24h 前には I-PpoI 発現アデノウイルスベクターを用いて rDNA 上の I-PpoI サイト特異的に DSB を誘導した。感染 48h 後に blasticidin を用いてレンチウイルスベクターが感染した細胞を選択した。

PCR 解析

感染 2~3 週間後に blasticidin 耐性を示す細胞をプールの状態で回収し、ゲノム DNA を調製した。I-PpoI サイトにレンチウイルスベクターが挿入されたかを調べるため、rDNA とレンチウイルスベクターにそれぞれアニールするよう設計したプライマーペアを用いて PCR を行った。

シーケンス解析

PCR 産物をプラスミドにクローニング後、あるいは直接鋳型としてシーケンス解析を行った。

定量 PCR 解析

I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクターの頻度を定量するため、rDNA とレンチウイルスベクターにそれぞれアニールするよう設計したプライマーペアを用いて、定量 PCR 解析を行った。

FISH 解析

クローニングした細胞について、I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入されていることを調べるために、rDNA とレンチウイルスベクターに対するプローブを用いて、2-color FISH 解析を行った。

I-PpoI サイトに挿入された外来遺伝子の発現安定性解析

I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクター上の EGFP 遺伝子の発現安定性を調べるため、2 ヶ月間に渡って EGFP の発現を解析した。解析には、I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入されたクローン#1885 を用いた。EGFP の発現は FACS を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

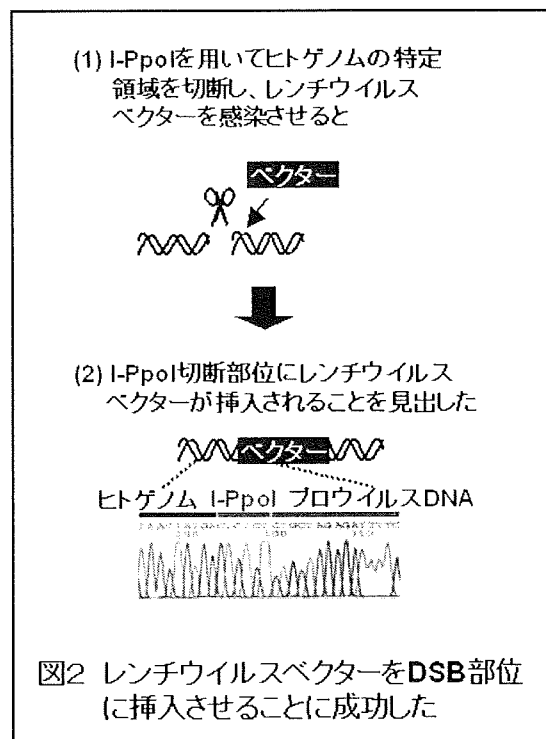
本研究は培養細胞株を用いて行うことから、動物実験、ヒト幹細胞を用いる研究、臨床研究、あるいは個人情報保護法に抵触する研究内容などの倫理面へ配慮すべき内容は含まれない。なお、本研究で行う遺伝子組換え実験に関しては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守して行う。

C. 研究結果

レンチウイルスベクターを I-PpoI サイトに挿入させることに成功した

研究方法で述べたようにレンチウイルスベクターを感染させる際に、あらかじめア

デノウイルスベクターを用いて I-PpoI サイト特異的に DSB を誘導させた。感染 48h 後に薬剤選択を開始してレンチウイルスベクターが感染した細胞を選択し、感染 2~3 週間後に細胞を回収した。この細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクターの検出を試みた。その結果、I-PpoI サイトを切断したときのみ目的の大きさにバンドが検出された（データは示していない）。さらに、この増幅した DNA をクローニングし、シーケンス解析を行ったところ、I-PpoI サイトにレンチウイルスベクターが挿入されていた [図 2]。



インテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを用いることにより、I-PpoI サイトへの挿入頻度を約 30% に高めることができる

我々はこれまでに HIV-1 の DSB 部位への挿入はインテグラーゼ活性非依存的であることを明らかにしてきた。そこで、レンチウイルスベクターについても調べたとこ

ろ、HIV-1と同様、DSB部位への挿入はインテグラーゼ活性非依存的であった（データは示していない）。また、インテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを用いることによって、ランダム挿入の頻度が減り、相対的にDSB部位への挿入割合が増えた（データは示していない）。このインテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを用いて、I-PpoIサイトへの挿入頻度を調べたところ、約30%のウイルスベクターがI-PpoIサイトに挿入されていることが明らかとなった [図3]。

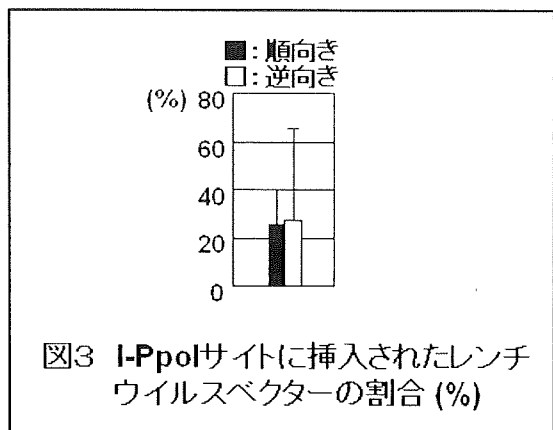


図3 I-PpoIサイトに挿入されたレンチウイルスベクターの割合 (%)

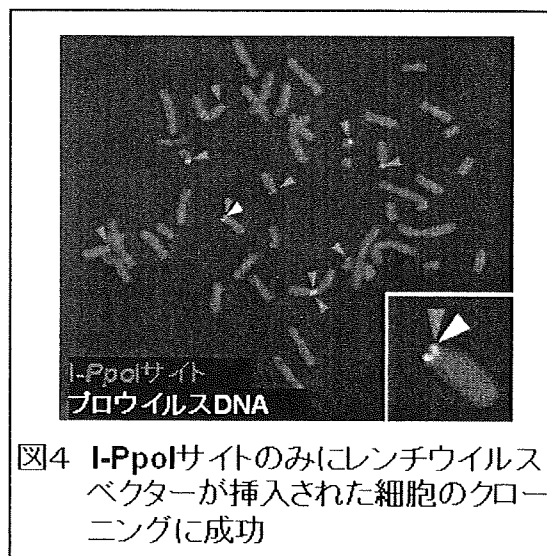
I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入された細胞のクローニング

現状では、最適な条件でレンチウイルスベクターを感染させた場合でも、約70%はランダムに挿入されることから、次にI-PpoIサイトのみにレンチウイルスベクターが挿入された細胞のクローニングを試みた。レンチウイルスベクターを感染させた細胞を薬剤選択し、コロニーを作ることでクローニングを行った。74クローン解析したところ、I-PpoIサイトがあるrDNAに対して順向きにウイルスベクターが挿入されたクローンが10クローン(13.5%)、逆向きが5クローン(6.8%)、順向きと逆向き両方入ったクローンが5クローン(6.8%)であった（データは示していない）。

これら20クローン中5クローン(6.8%)

はEGFP陽性であり、サザンブロット解析の結果、3クローン(4.1%)はレンチウイルスベクターがI-PpoIサイトのみに挿入されていた（データは示していない）。

これら3クローンの中でクローン#1885について2-color FISH解析を行い、rDNAとレンチウイルスベクターを染色した。その結果、確かにrDNAにレンチウイルスベクターが挿入されていた [図4]。



I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクター上のEGFP遺伝子は長期に渡って安定的に発現する

クローン#1885について、薬剤非選択条件下において2ヶ月間培養を行ったところ、80%の細胞がEGFP陽性であった [図5]。

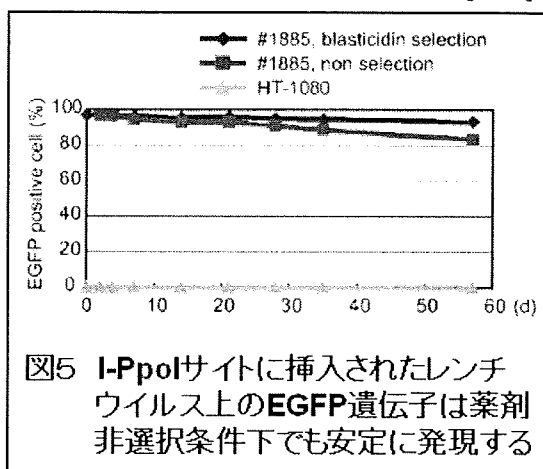


図5 I-PpoIサイトに挿入されたレンチウイルス上のEGFP遺伝子は薬剤非選択条件下でも安定に発現する

D. 考察

近年、遺伝子治療がヒトに応用されつつあるが、治療に用いられるレトロウイルスベクターやレンチウイルスは宿主ゲノムへランダムに挿入されるため、それが原因となって白血病などを引き起こすことが大きな問題となっている。また最近、ヒト iPS 細胞の樹立成功が報告され、臨床応用が現実味を帯びてきたように思えるが、外来 DNA 導入に用いられるウイルスベクターの安全性を高めない限り、臨床応用は難しい。iPS 細胞の応用は再生医療のみならずドラッグスクリーニングや特定疾患の病因解明への利用も期待されているが、通常のレトロ/レンチウイルスベクターを用いた方法ではウイルス DNA が染色体にランダムに挿入されるため、樹立した iPS 細胞株間の質のバラツキが生じてしまい、解析が困難となる。従ってウイルスベクターを染色体の特定領域に挿入させる技術開発が必要であるが、従来法の改良では不十分であり、新たな方法開発による技術的ブレイクスルーが求められている。

主任研究者らはこれまでに行ってきた研究により、HIV-1 は宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されることを明らかにした。この現象を応用し、遺伝子治療に使用されるウイルスベクターを感染させる際に、染色体の特定領域に DSB を誘導することで、その場所にウイルス DNA を挿入させることが出来るのではないかと作業仮説を立てて本研究を行った。

ヒト染色体の特定部位に DSB を誘導するレアカッター制限酵素として、真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) 由来の制限酵素 I-PpoI を用いた。I-PpoI が認識、切断する配列はヒトを含む真核生物の rDNA 28S 上に高度に保存されている。ヒトの場合、rDNA はゲノム中に 200~300 コピー存在することから、I-PpoI が認識する配列も 200~300 コピー存在する。本研究では 200

~300 コピー存在する I-PpoI のターゲット配列中の 1~数コピーに DSB を誘導し、ウイルス DNA の挿入を試みた。

実験には HEK293T 細胞と HT1080 細胞を用いた。両細胞株ともにレンチウイルスベクターを I-PpoI サイトに挿入させることに成功したことから、DSB サイトへのウイルスベクター挿入は他の様々な細胞種でも可能であることが示唆された。

インテグラーゼ活性欠失型レンチウイルスベクターを用いた場合、I-PpoI サイトに挿入させる頻度は約 30%であり、残りの 70%はランダムに挿入されている。ランダム挿入が起こる一つの原因としては、自然発生的に生じた DSB 部位にウイルスベクターが挿入されているという可能性が挙げられる。このランダム挿入のメカニズムを調べることは目的部位への挿入頻度を 100%に近づけるために重要である。

本研究では、レンチウイルスベクターが I-PpoI サイトのみに挿入された細胞のクローニングに成功した。クローニングを行う場合には現状の約 30%というターゲティング効率で十分である。例えば、遺伝子に疾患のある患者から iPS 細胞を作成し、正常型の原因遺伝子をレンチウイルスベクターを用いてゲノムの安全な場所に挿入させて患者に戻すような場合には、クローニングを介したターゲティング法の応用が期待される。

本研究では、ウイルスを挿入させるターゲット配列として、rDNA 上に存在する I-PpoI サイトを標的としている。しかし、rDNA に DSB を誘導することや外来遺伝子を挿入させることによって細胞に毒性を示す可能性がある。本年度の研究ではレンチウイルスを rDNA 上の I-PpoI サイトに挿入させることに成功したが、遺伝子をコードする配列や調節配列以外の安全と考えられる配列に挿入させることが望ましい。ヒトゲノム中に存在する塩基配列を認識、切

断するレアカッター制限酵素はI-PpoI以外にもI-CreI、I-MsoIあるいはI-Vdi14IIなどが存在するが、いずれの認識配列もI-PpoIと同様にrDNA上に存在する。これら以外の制限酵素の候補としてはSangamo BioSciences社が開発しているZFN (Zink Finger Nuclease) が挙げられる。ZFNはオーダーメイド型のレアカッター制限酵素であり、目的のターゲット配列を認識するジンクフィンガーモチーフをスクリーニングあるいは組み合わせて作られる。将来的には、I-PpoIの代わりとしてZFNを用い、ヒト染色体の安全と思われる領域にウイルスベクターを挿入させることが出来れば、遺伝子治療におけるより安全性の高いウイルスベクター導入システムが構築できるものと期待される。

E. 結論

・レンチウイルスベクターをヒトゲノムのrDNA上に存在するI-PpoIサイトに挿入させることに成功した。

・感染の条件等を検討したところ、I-PpoIサイトへのレンチウイルスベクター挿入頻度を約30%にまで高めることに成功した。

・I-PpoIサイトのみでレンチウイルスベクターが挿入された細胞のクローニングに成功し、ベクター上の外来遺伝子は2ヶ月間に渡って安定的に発現した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小山貴芳、矢代寿子、奥平准之、石坂幸人： レンチウイルスベクターをヒトゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発 ～ site specific integration of exogenous DNA; SPIED システムの開

発～。第31回 日本分子生物学学会年会

- 2) Takayoshi Koyama, Binlian Sun, Chikako Nakai-Murakami, Yuzuru Minemoto, Shigeki Hoshino, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka : Facilitated integration of HIV-1 DNA into sites of DNA double-strand breaks; application for improved gene therapy by site-specific integration of exogenous DNA. 4th German-Japanese HIV-Symposium
- 3) 小山貴芳： HIV-1はマクロファージへの感染効率を高めるために宿主DNA二重鎖切断を誘導する。第12回日本レトロウイルス研究会
- 4) Takayoshi Koyama, Binlian Sun, Yuzuru Minemoto, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka : HIV-1-induced DNA double-strand breaks enhance the infectivity into resting macrophage. The 10th Kumamoto AIDS Seminar
- 5) 小山貴芳、孫賓蓮、峯本讓、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人： HIV-1が誘導する宿主DNA二重鎖切断はマクロファージへの感染効率を上昇させる。第57回日本ウイルス学会学術集会
- 6) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka : Development of a novel system to integrate the lentiviral vector into human genome in a site-specific, designated SPIED (site-specific integration of exogenous DNA) system 第32回日本分子生物学学会年会

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fc γ 受容体を介した Deng 出血熱病態形成機序をターゲットとした治療法の開発

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究者 林 昌宏

Deng 出血熱の CD32 を介する病態形成機序解析のため CD32 恒常発現 BHK-21 細胞を用いた Deng ウイルス (DENV) の抗体依存性感染増強モデルを作成した。血清中の DENV を迅速に検出するフラビウイルス特異的診断法を開発した。

A. 研究目的

急性熱性疾患である Deng 熱、致死性疾患である Deng 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 Deng ウイルス感染症の世界的な流行地域の拡大、日本への侵入が危惧されている現在、Deng ウイルス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。

Deng 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。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。Deng ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるエンベロープを有する (+) 一本鎖 RNA ウイルスである。また Deng ウイルスには 1-4 型の 4 つの異なる血清型が存在する。Deng 出血熱は疫学的研究により Deng ウイル

スの再感染時に多く発症することが示され、これは初感染時に誘導された中和能を有しない交差抗体に起因する抗体依存性感染増強 (ADE) によると考えられている。我々はこれまでに *in vitro* 抗体依存性感染増強 (ADE) モデルとして Fc γ IIA 受容体 (CD32) を強発現させたサル腎由来細胞 Cos-7 細胞等確立し、ADE の発生機序において DENV-DENV 型交差抗体複合体と Fc γ 受容体の結合に続く raft との会合及びシグナル伝達が ADE の誘導に重要であることを示した。(モイ他, JGV, 2010) そこで DHF の治療ターゲットとして Fc γ IIA 受容体に注目し、DENV 治療法における基盤的研究として ADE を阻害する物質の探索を行うにあたり Fc γ IIA 受容体を恒常発現するハムスター由来 BHK-21 細胞を確立した。

本研究の目的は我々の確立した Fc γ IIA 受容体恒常発現 BHK-21 細胞を用いた ADE アッセイ系を確立し Fc γ IIA 受容体を介するウイルスの細胞内侵入機序をターゲットとしたデ

ング出血熱の治療法を開発することである。

B. 研究方法

培養細胞：ハムスター由来BHK-21細胞 (American Type Culture Collection) はEMEM(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BHK-21細胞(BHK-CD32細胞)を4°Cx20min処理しPBS(-)で洗浄後、1 μ g/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 μ l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。DENV感染細胞の染色は抗DENV抗体を用いて行った。

感染増強実験：デング患者血清を10倍階段希釈し、DENV(1型)と混合後37°C1時間反応した。BHK-CD32細胞および野生型BHK-21細胞にDENV-患者血清複合体を接種し4日間培養した。DENV感染力価をVero細胞を用いたプラーク法にて算出した。

BHK-CD32細胞を用いたDENV中和試験：患者血清を5倍から2560倍まで2倍階段希釈し2x10³ PFU/ml DENV(1型と2型)と混合後37°C1時間反応した。BHK-CD32細胞および野生型BHK-21細胞にDENV-患者血清複合体を接種し1%メチルセルロースを重層し4日間培養した。ホルマリンにて固定しメチルブルーにて染色後プラークを観察した。

RT-PCR:RT-PCRのプライマー設計はフラビウイルス非構造蛋白質NS5領域の塩基配列相同性の高い配列をターゲットとした。

(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恒常発現BHK-21細胞の作製：CD32をBHK-21細胞に導入し、ネオマイシンによってCD32発現細胞を選択したところCD32を恒常発現する2つのクローンBHK-CD32-2とBHK-CD32-4を得た。フローサイトメトリーによりCD32の発現を確認したところ約80%の細胞にCD32の発現が認められた。それぞれのクローンを18継代したところCD32の発現に差が認められなかった。

CD32発現BHK-21細胞におけるDENVのADEの検討：抗DENV抗体を有する患者血清とDENVを37°Cで1時間反応し、CD32発現BHK-21細胞および野生型BHK-21細胞に感染した。プラーク法によりDENVの感染価を確認した結果デング患者血清と反応させたDENVはCD32発現BHK-21細胞に対して野生型BHK-21細胞に比較して約10倍のADE効果が観察された。この効果は患者血清を希釈することによって消失した(図1)。したがって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BHK-21細胞に感染していることが示唆された。次に様々なDEN患者血清を用いてADEアッセイを行った。その結果DENV中和抗体価上昇が認められない急性期患者血清ではADEは観察されなかったが、中和抗体の上昇した回復期血清ではADEが観察された。

CD32がADEにおいて重要な役割を担うと示唆されたため次にBHK-CD32細胞と野生株BHK-

21細胞を用いたDENV患者血清のDENVに対する中和抗体価を比較検討した。中和抗体価は抗DENV免疫応答を最も反映する値の1つである。その結果BHK-CD32細胞と野生株BHK-21細胞を用いたDENV患者血清のDENVに対する中和抗体価は一致しなかった。様々な患者血清を用いて検討した結果多くの患者血清で、BHK-CD32細胞を用いた場合と比較して野生株BHK-21細胞を用いた場合、高い中和抗体価が示された。DENVの主なターゲット細胞はCD32陽性であるため、BHK-CD32細胞を用いた方がより患者血清のDENVに対する防御能を反映していると考えられた (Moiら, CVI, 2010)。

フラビウイルス特異的迅速診断法の確立：様々なDENV株を患者血清より検出し、サンプルとして供試するためにDENVを含むフラビウイルス迅速診断法をRT-PCR法にて確立した。フラビウイルスのNS5領域に存在する共通配列をもとにforward primer を14種reverse primer を12種設計し、すべての組み合わせを検討したところDENV, 日本脳炎ウイルス, 黄熱ウイルス, ウエストナイルウイルス等の蚊媒介性ウイルス等の蚊媒介性ウイルスのみならず, ロシア春夏ウイルス, ランガットウイルス, ポワッサンウイルス, ネギシウイルス等のダニ媒介性脳炎ウイルス, 媒介昆虫の不明なヨコセウイルスも検出可能であるprimer pair FVX5f/FVX12rの組み合わせを発見した (図2)。さらにこのprimer pair についてDENVの鑑別疾患として重要なチクングニヤウイルスを含むアルファウイルス (東部馬脳炎ウイルス, シンドビスウイルス, セムリキ森林ウイルス, ゲタウイルス) に対する反応性を検討したところ非特異反応は認められなかった (図2)。またDENVの媒介蚊の一種であるヒトスジシマカ由来細胞C6/36細胞およびヒト血液細胞由来核酸に対して非特異反応は認められず (図2), 本プライマーは急性期患者血清において有用な実験室診断法の1つと成り得ることが示唆された。

D. 考察

これまでにFc γ Rを恒常発現したBHK-21細胞であるBHK-CD32細胞を作製し, 簡便なADEモデルアッセイ系を確立した (Moi他, JVM, 2010)。本アッセイ系を用いて患者血清中のDENV-DENV型交差抗体複合体が血清中の中和抗体能に影響することを示した (Moi他, CVI, 2010)。よって本アッセイ系によりADEを阻害する抗体および薬剤の探索が可能となる。また様々なDENVを含むフラビウイルスを迅速に検出・分離するために迅速診断法を確立した (論文準備中)。近年チクングニヤ熱疑い患者の中にはデング熱患者も多く含まれていることが報告されていることから, 我々の開発したフラビウイルス共通プライマーはデングウイルスとチクングニヤウイルスの鑑別に寄与する。

BHK-CD32細胞においては18継代までCD32の安定発現が確認されたため, BHK-CD32細胞作製によりADEアッセイに安定的にCD32発現細胞を供給することが可能となった。これまでに中和能を有しないDENV型交差抗体とDENVの免疫複合体による各細胞へのADEにおいてCD32の関与が報告されている。本実験において, DEN抗体を有する患者血清を用いてCD32を発現したBHK-21細胞におけるDENVのADEを検討した。その結果患者血清とDENVを反応させることによりDENVのADEが観察され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。これはこれまでに我々がCos-7細胞およびVero細胞を用いて得た結果と一致した。また様々なDEN患者血清を用いた検討の結果, ADEは回復期の患者血清においてのみ観察された。次にBHK-CD32細胞と野生株BHK-21細胞を用いたDENV患者血清のDENVに対する中和抗体価を比較検討したところ多くの患者血清においてBHK-CD32細胞を用いた場合野生株BHK-21細胞と比較して低い中和抗体価を示した。DENVの主なターゲット細胞はCD32陽性であるため, BHK-CD32細胞を用いた方がより患者血清のDENVに対する防御