

きた。アンピシリンについては陽性判定を得られた。また、MPO で代謝される医薬品への h-CLAT 試験の適用を目的に MPO 安定発現 THP-1 細胞株を樹立した。

・ GST M1/T1 KO マウスのみでは代謝の種差のため、ヒトに対するモデル動物としての適用が難しい場合があるが、ヒト精製酵素試験系を合わせて用いることで分子種選択的に解毒される活性代謝物を同定することができた。他の薬物にも適用することで、本試験系の有効性をさらに示す予定である。

・ GST M1 KO マウスでは、DCNB の単回投与でのメトヘモグロビン血症を強く示したと同時に、その連投により毒性への適応反応を示した。これらは、GST M1 欠損による DCNB の高い曝露によると考えられる。GST KO マウスを用いた研究が、薬物代謝を介する毒性解析研究に有用であることが明らかとなった。

・ ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化に関しては、形態的、遺伝子発現プロファイル上、および、薬物代謝酵素活性や酵素誘導に関して、肝細胞様の細胞に分化させることに成功した。また、評価手法に関しても有用であることが判明した。分化誘導された 3 株の肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性、遺伝子発現プロファイルおよび誘導剤に対する反応性は、3 株それぞれに異なった特徴を有していた。新規 iPS 細胞株に関しては、本年度は樹立までに至らなかった。医薬品候補化合物の評価に iPS 細胞を活用するための iPS 細胞特性解析の一環として、iPS 細胞株および iPS 細胞樹立予定株のゲノム DNA についてその遺伝的バックグラウンドの一部を検証し、各細胞株いずれも活性に影響を及ぼす可能性のある多型を有していることが判明した。

・ 薬剤誘発性ミオパチー発症に関連する遺伝子多型の迅速タイピング系開発に向け、遺伝子解析法の開発と症例集積体制の構築を行った。

・ 薬物性肝障害の起因に関し、多施設よりの症例集積を行い、薬物性肝障害の診断基準に基づくスコアリングを行った。また、動物実験にて Bsep の分解を抑制する作用機序をもつ 4PBA (4 フェニルブチレート) を用いて検討を行った。

・ 薬物トランスポーター *GST A1* 及び *GST A2* のハプロタイプタグ多型それぞれ、7 種につき、パイロシーケンシング法によりタイピング系を開発した。

・ 薬物相互作用に対する CYP3A4 の*16、及び*18 多型の影響を検討するため、ミダゾラム 1' 位水酸化活性に対する各種薬剤の阻害効果を解析した。CYP3A4*16 は野生型とは異なる薬物相互作用を引き起こす可能性を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Naito M, Hasegawa R, Okuda H, Sawada J, Niwa T, Saito Y.: CYP3A4*16 and CYP3A4*18 Alleles Found in East Asians Exhibit Differential Catalytic Activities for Seven CYP3A4 Substrate Drugs. *Drug Metab Dispos.* 2010, 38(12):2100-2104.

2) Takikawa H. Recent status of drug-induced liver injury and its problems in Japan. *JMAJ* 53, 243-247, 2010

3) Goto H, Takikawa H. Effect of genipin on cholestasis induced by estradiol-17 β -glucuronide and lithocholate-3-O-glucuronide in rats. *Hepato Res* 40, 524-529, 2010

4) Nagasaka H, Yorifuji T, Kobayashi K, Takikawa H, Komatsu H, Inui A, Fujisawa T, Miida T, Tsukahara H, Takatani T, Hayashi H. Favorable effect of 4-phenylacetate on liver functions attributable to enhanced bile salt export pump expression in ornithine transcarbamylase-deficient children. *Mol Gen Metab* 100, 123-128, 2010

5) 赤尾浩慶、河合康幸、梶波康二 スタチンのファーマコゲノミクス 臨床検査 2010 ; 54:1178-1182.

2. 学会発表

1) Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Okuda H, Sawada J, Niwa T and Saito Y, CYP3A4*16 and CYP3A4*18 alleles Found in East Asians Exhibit Differential Catalytic Activities for Seven CYP3A4 Substrate Drugs, 9th International meeting of International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) (2010.10, istanbul)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ノロウイルスおよびサポウイルス増殖阻害剤の評価システムの構築

所属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 片山 和彦
研究期間 平成 20 年 4 月～平成 23 年 3 月

研究要旨；ノロウイルス、サポウイルス、カリシウイルスの全長ゲノム配列情報を蓄積し、ポリメラーゼ、プロテアーゼの配列情報を比較検討した。リバースジェネティックスに利用可能な全長ゲノムクローンを構築した。プロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価を行い、ネコカリシウイルスを利用した薬剤評価システムを構築し、特許を申請した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所 ウイルス第 2 部 岡智一郎
- (2) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター 横山 勝
- (3) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター 本村 和嗣
- (4) 株式会社 中部衛生検査センター 小澤一弘

1. 研究目的

本研究の目標は、分子疫学調査、コンピュータ構造シミュレーション、分子生物学の融合により、ノロウイルス (NoV) を含むヒトカリシウイルスのウイルスプロテアーゼ、ポリメラーゼ (RdRp) の活性を阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供と、それらを実証するための評価システムの構築である。

具体的には、先ず分子疫学調査から得たヒトカリシウイルス (NoV を含む) 流行株の遺伝子配列を使用し、コンピュータシミュレーションで、ウイルスプロテアーゼ、RdRp ゼ分子構造および活性発揮に重要な構造を予測する。次に、これらの情報公開を行い、阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供すると同時に、既存の薬剤を評価するため、我々がサポウイルス (SaV) のプロテアーゼ活性発揮メカニズムを解析するために用いた *in vitro* 転写システムを利用した活性測定システムを構築する。このシステムに Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) を利用したシステムを導入する。BRET は、パーキンエルマー社によって提供されるレポーターシステムである。Green Fluorescence Protein (GFP) と Renilla luciferase (rLuc) 間にウイルスプロ

テアーゼの切断モチーフ配列を挿入した融合蛋白質をデザインする。これが、ウイルスプロテアーゼによって切断されない状態では、GFP と rLuc の融合蛋白質として発現し、rLuc の基質 (セレントラジン) を添加すると、rLuc の発光と BRET 現象により近接する GFP の蛍光が観察される。しかし、GFP と rLuc 間がウイルスプロテアーゼによって切断されると両者が離れるため、rLuc の発光 (410nm) のみが検出される。このような BRET 現象の有無を利用してカリシウイルスプロテアーゼの活性を検出するシステムを構築できれば、ハイスループットな *in vitro* 薬剤評価システムを構築できる。

しかし、薬剤の細胞に与える影響、薬剤投与時のウイルス複製の細胞内動態を評価するためには、BRET を、我々が本年新たに開発した NoV のリバースジェネティックスシステムに応用し、哺乳類細胞内でのウイルス複製阻害効果を検証しながら進める必要がある。特にポリメラーゼは、ウイルス複製時に単独ではなく、複数のウイルス蛋白質複合体として機能する可能性があり、リバースジェネティックスシステムを応用した細胞内機能評価システム構築が必須である。

NoV に代表されるヒトカリシウイルスの感染症は、毎年数百万人規模の冬季急性胃腸炎患者を出すため社会的問題となっており、早急にウイルス流行の予防、制御を行う必要がある。これらのウイルスは培養細胞を用いた増殖系、モデル動物が無く、抗ウイルス薬開発が難航している。さらには現在 35 種類以上あるどの遺伝子型が流行しても良いように対策を立てる必要がある。本研究は、*in vitro* でのハイスループットスクリーニング及び、リバースジェネティックスシステムを利用した細胞内動態の評価まで、分子疫学、構造シミュレーション、分子

生物学を有機的に結合した、新規抗ウイルス薬剤デザイン基盤の提供と、評価システム構築を目指す。

2. 研究方法および結果

ここ数年の主要流行株である HuNoV GII/4 株の配列情報を収集し、ゲノム情報の解析をもとに、2006-2010 秋冬期に全国各地で流行したノロウイルスの分子疫学および核酸及びアミノ酸配列解析を行なった。その結果、HuNoV は、ゲノム情報の総合的な変化により、免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスが主要流行株として感染拡大していることが明らかになった。日々蓄積する HuNoV のウイルス学情報と計算機を用いた蛋白質の構造・機能変化の解析を元として、塩基配列変異がウイルスの病原性変化に及ぼす影響を推測することが可能となるかもしれない。これらの結果は、ゲノム情報を基盤としプロテアーゼ、ポリメラーゼの活性を予測し、阻害剤の開発に利用する可能性を示唆した。

主要流行株の塩基配列解析により、HuNoV における高頻度なゲノムの組換えは、これまでの予想を遙かに上回る頻度（これまでに全長塩基配列が決定された genotype クラスターの内、約 40%）で起きており、ゲノム全長塩基配列の蓄積が ORF1 領域の多様性の解明に必須であることが明らかになった。また、組換え体のデータ蓄積は ORF1 と ORF2-3 の組み合わせのパターンを明らかにする可能性がある。組み合わせが明らかになれば、プロテアーゼ、ポリメラーゼの多様性に応じて、これらの配列のみをカセットのようにスワップし、活性阻害剤のスクリーニングに用いることができる。

蓄積されたゲノム情報を基に、ヒトノロウイルス、サポウイルス、FCV、MuNoV のプロテアーゼ、ポリメラーゼの立体構造をコンピュータで予測し、それぞれのモデルを作製した。本モデルを基に、基質とのドッキングシミュレーション、既存の薬剤（プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ活性阻害剤など）、新規にデザインされた薬剤とのドッキングシミュレーションを行い、活性阻害の予測を行った（in silico screening）。その結果、FCV や MuNoV と HuNoV のプロテアーゼ構造の比較を行い、FCV や MuNoV が HuNoV のモデルとなり得る事を見出した。

HuNoV, HuSaV 双方とも培養細胞での増殖が困難な状況が続いている。我々は、培養細胞での増殖が可能な FCV を対象に、ルシフェラーゼセンサー (GloSensor™)、もしくは BRET センサーなどのバイオセンサー発現細胞を用いたハイスループットウイルスプロテアーゼ活性検出系を構築した。また、日本で分離された MuNoV-S7 株を用いてウイルス学的解析、全長ゲノム塩基配列の解析、ゲノムの構造解析を行い、MuNoV のリバースジェネティックスシステム構築の可能性を探った。

本研究により、MuNoV タンパク質発現は自身のタンパク質により自己制御されている可能性を明らかにした。また、ポリプロテインの切断順序、実際に機能するウイルスタンパク質の性状が明らかにされた。MuNoV-S7 の細胞内挙動は、HuNoV のリバースジェネティックス、感染性 RNA のトランスフェクションなどによって得られた結果と類似しており、MuNoV のリバースジェネティックスシステムは HuNoV の良いモデルとなり得ることが示唆された。さらに、FCV のリバースジェネティックスシステム構築にも成功した。これにより、感染性 FCV の遺伝子操作が可能となった。本システムについて特許申請を行った。

受託研究として、複数のヒトノロウイルス株のゲノム全長 cDNA を哺乳類プロモーター下流にクローニングし、リバースジェネティックスに用いた。組換えバキュロウイルスで発現させて作製したウイルス様中空粒子 (VLPs) を用いて、株特異的抗血清を作製した。これらを用いて、免疫蛍光抗体法でシステムの評価を行ったところ、これまでに構築に成功した HuNoV U201 株以外に、TCH04-577 株でもリバースジェネティックスシステムが稼働していることが明らかとなった。また、SaV Mc10 株のリバースジェネティックスシステムも稼働している可能性が示唆された。

（倫理面への配慮）

組換え DNA 実験は全て組換え DNA 実験申請を行い、承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実行した。

3. 結論

HuNoV の全長ゲノム配列解析を行い、ポリメラーゼ、プロテアーゼの配列蓄積を行った。新たに HuNoV TCH04-577 株、SaV Mc10 株のリバースジェネティックスシステムを構築し

た。プロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価システムを構築した。MuNoV を HuNoV のモデルとして利用可能であることを示唆した。培養細胞での増殖が可能な FCV を対象に、バイオセンサー発現細胞を用いたハイスループットなウイルスプロテアーゼ活性検出系を構築した。FCV においては、ハイスループット *in silico* screening, *in vitro* screening、ウイルスライフサイクルの全ての行程をモニターできるリバースジェネティクスを用いた薬剤 screening の基盤構築が、完成した。

6. 研究発表

論文発表

1. Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., Estes, M. K. Norwalk Virus RNA is infectious in mammalian cells. *Journal of Virology* 81:12238-12248. 2007
2. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K., Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82: 11247-62. 2008.
3. Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 53 (1): 49-52., 2009
4. Oka T., Yokoyama M., Katayama K., Tsunemitsu H., Yamamoto M., Miyashita K., Ogawa S., Motomura K., Mori H., Nakamura H., Wakita T., Takeda N., Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology*. 2009; 394(1):119-129.
5. Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama H., Takeda N., Katayama K. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. *Microbiology and Immunology*. 2009; 53(9):531-534.
6. Oka T., Miyashita K., Katayama K., Wakita T., Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiology and Immunology*. 2009 53(7):417-420.
7. Shinkawa N., Noda M., Yoshizumi S., Tokutake Y., Shiraishi T., Arita-Nishida T., Nishio O., Oka T., Hansman GS., Takeda N., Kimura H. Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of gastroenteritis in Japan. *Intervirology*. 2008; 51(6):422-426. Epub 2009 Mar 4.
8. Harada S., Okada M., Yahiro S., Nishimura K., Matsuo S., Miyasaka J., Nakashima R., Shimada Y., Ueno T., Ikezawa S., Shinozaki K., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *Journal of Medical Virology*. 2009 ;81(6):1117-1127.
9. Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T., Kondo R., Oseto M., Katayama K., Takeda N., Oka T. Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2009; 62(3):246-248.
10. Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y., Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi T., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T. Characterization of sapoviruses detected in

- gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *Journal of Clinical Virology*. 2009; 45(1):67-71.
11. Iwakiri A., Ganmyo H., Yamamoto S., Otao K., Mikasa M., Kizoe S., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Archives of Virology*. 2009; 154(4):689-693.
 12. Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 76(8):2461-7.
 13. Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *Journal of Medical Virology*. 2010 82(7):1247-54.
 14. Yamashita Y., Ootsuka Y., Kondo R., Oseto M., Doi M., Miyamoto T., Ueda T., Kondo H., Tanaka T., Wakita T., Katayama K., Takeda N., Oka T. Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *Journal of Medical Virology*. 2010 82(4): 720-6
 15. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan *J. Virol.* 84(16): 8085-97, 2010
 16. Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5(10) e13130, 2010
 17. 片山和彦 ノロウイルス対策「高校保健ニュース」, 2009年11月18日号. 株式会社少年写真新聞社
 18. 片山和彦 ノロウイルスについて「健康教室」, 2010年1月号 通巻894号 東山書房 p74-79
 19. 片山和彦 ノロウイルス、ロタウイルス ザ特集 最新学校保健安全ハンドブック (書籍) p77-80, 2010
 20. 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆 「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルス」 *LABIO21* No. 39 p20~26, 2010
- 学会発表
1. Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 2. Kazuhiko Katayama. The newly identified human Norovirus strain HK299 may be recombinant between genogroups. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Centennial Hall, Hokkaido University, Sapporo Japan. June 28-30, 2010.
 3. Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, and Takeda N. Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on sapovirus ORF1 polyprotein processing 第14回国際ウイルス学会、トルコ、2008年8月10-15日.
 4. Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, and Takeda N. Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like

- proteases The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases、ベトナム、2008年10月6日
5. 岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光 裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村和嗣、守宏美、中村浩美、脇田隆字、佐藤裕徳、武田直和 カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
 6. 横山勝、岡智一郎、片山和彦、山本真民、宮下佳奈、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳 サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
 7. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和 リバースジェネティクスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
 8. 小澤一弘、岡智一郎、片山和彦、本村和嗣、中村浩美、守宏美、佐藤裕徳、武田直和 「調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査」 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
 9. 本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、Hansman Grant、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、蒔本恭、秋山美穂、木村博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳 「ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序」 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
 10. 岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光 裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村和嗣、脇田 隆字、佐藤 裕徳、武田 直和「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会神戸、2008年12月9-12日
 11. 横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、神田 忠仁、武田 直和、佐藤 裕徳「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日
 12. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和「ノロウイルスプロテアーゼを利用したノロウイルスリバースジェネティクスシステムの制御」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日
 13. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦 バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日。
 14. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳 ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日。
 15. 中西章、Benoit Chapellier、片山和彦、岡智一郎、武田直和 ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日。
 16. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字 ノロウイルスリバースジェネティクスシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日。
 17. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦 カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日。
 18. 北島正章、岡智一郎、遠矢幸伸、高木弘隆、片山浩之、武田直和、片山和彦 Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によるマウスノロウイルス核酸検出系の構築 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日。
 19. 北島正章、岡智一郎、原本英司、片山浩之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦 多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日。
 20. 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、脇田隆字 マウスノロウイルスの複製機構

の解析 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25～27 日。

21. 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良 マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響について検討 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25～27 日
22. 片山和彦 「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性」 第 147 回日本日本獣医学会学術集会、日本実験動物医学会シンポジウム、2009 年 4 月 2 日、栃木県宇都宮市
23. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group ノロウイルス GII/4 の変異 ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、東京、2009 年 10 月 24 日。
24. Kitajima M., Oka T., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S. Seasonal distribution and genetic diversity of noroviruses, sapoviruses, and Aichi viruses in river water in Japan. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.
25. Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago Y., Miura T., Omura T., Oka T., Katayama K., Takeda N., Noda M., Miyota Y. Prevalence and genotypes of

sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.

26. Kitajima M., Oka T., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. USA, May 17-21, 2009.
27. 片山和彦 日本獣医公衆衛生学会 シンポジウム 「今、問題の食中毒」平成 22 年 1 月 31 日 宮崎市 「ワールドコンベンションセンター・サミット」
28. 片山和彦 希少感染症研修会 下痢症ウイルス ノロウイルス 平成 22 年 2 月 25 日 感染研戸山庁舎共用第一会議室

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
特許申請

ネコカリシウイルス遺伝子の発現用ベクター及びこれを用いたウイルスの製造方法

(特 願 2010-188882)

ノロウイルスおよびサポウイルス増殖阻害剤の評価システムの構築

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 片山 和彦

研究要旨；ノロウイルスの全長ゲノム配列解析を継続し、ポリメラーゼ、プロテアーゼの配列蓄積を行った。リバーシジェネティクスに利用可能な全長ゲノムクローンを構築した。FCV プロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価を行い、薬剤評価システムを構築した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所 ウイルス第2部 岡智一郎
- (2) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター 横山 勝
- (3) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター 本村 和壽
- (4) 株式会社 中部衛生検査センター 小澤 一弘

(研究協力者)

中部衛生検査センター 天野 加奈子

1. 研究目的

本研究の目標は、分子疫学調査、*in silico* における構造解析（コンピュータシミュレーション）、分子生物学の融合により、ヒトノロウイルス（HuNoV）を含むヒトカリシウイルスのウイルスプロテアーゼ、ポリメラーゼの活性を阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供と、それらを実証するための評価システムの構築である。NoV のプロテアーゼ、ポリメラーゼ（RdRp）のデータ蓄積、新たな NoV 株のリバーシジェネティクスシステムの構築を行った。また、*in silico* 構造解析によって得られた情報を元に、ネコカリシウイルス（FCV）、マウスノロウイルス（MuNoV）など培養細胞で増殖可能なウイルスを用いた増殖阻害剤評価のモデルシステム構築を試みる。

2. 研究方法および結果

既存の薬剤（プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ活性阻害剤など）、新規にデザインされた薬剤とのドッキングモデル構築、活性阻害予測を行った。さらにインビトロでの活性測定システム構築に取り組んだ。また、データ

蓄積の不足している HuNoV open reading frame (ORF) 1 領域を含む全長ゲノム塩基配列データの取得を行った。プロテアーゼ、ポリメラーゼについては、*in silico* にて構築に成功した 3D モデルに対し、高速演算が可能なサーブシステムで分子構造の明らかな薬剤のドッキングモデルを検証し、活性阻害剤の *in silico* screening を施行した。また、MuNoV と HuNoV のプロテアーゼ構造の比較を行い、MuNoV が HuNoV のモデルとなり得る事を見出した。ORF1 領域の塩基配列が決定されていない HuNoV の遺伝子型に焦点を絞り、全長遺伝子配列解析を行った。本研究により、HuNoV における高頻度なゲノムの組換えは、これまでの予想を遙かに上回る頻度（これまでに全長塩基配列が決定された genotype クラスタの内、約 40%）で起きており、ゲノム全長塩基配列の蓄積が ORF1 領域の多様性の解明に必須であることが明らかになった。また、組換え体のデータ蓄積は ORF1 と ORF2-3 の組み合わせのパターンを明らかにする可能性がある。組み合わせが明らかになれば、プロテアーゼ、ポリメラーゼの多様性に応じて、これらの配列のみをカセットのようにスワップし、活性阻害剤のスクリーニングに用いることができる。

ここ数年の主要流行株である HuNoV GII/4 株の配列情報を収集し、ゲノム情報の解析をもとに、2006-2010 秋冬期に全国各地で流行したノロウイルスの分子疫学および核酸及びアミノ酸配列解析を行なった。その結果、HuNoV は、ゲノム情報の総合的な変化により、免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスが主要流行株として感染拡大していることが明らかになった。日々蓄積する HuNoV のウイルス学情報と計算

機を用いた蛋白質の構造・機能変化の解析を元として、塩基配列変異がウイルスの病原性変化に及ぼす影響を推測することが可能となるかもしれない。これらの結果は、ゲノム情報を基盤としプロテアーゼ、ポリメラーゼの活性を予測し、阻害剤の開発に利用する可能性を示唆した。

培養細胞で増殖が可能である MuNoV を抗ウイルス薬開発のモデルとして検討した。MuNoV のプロテアーゼ、ポリメラーゼの構造を解析し、HuNoV との比較を行った。主鎖の折り畳みと活性部位アミノ酸の立体配置は、MuNoV と HuNoV 間でよく保存されていた。保存部位と可変部位の位置もよく保存されていた。その後、*in silico* screening 専用サーバーの導入を行い、100 万種類の化合物ライブラリーに対する screening を開始したが、最終年度のサーバー導入時期が遅かったため、現在も screening が進行中である。

HuNoV, HuSaV 双方とも培養細胞での増殖が困難な状況が続いているため、培養細胞での増殖が可能な FCV を対象に、ルシフェラーゼセンサー (GloSensor™)、もしくは BRET センサーなどのバイオセンサー発現細胞を用いたハイスループットウイルスプロテアーゼ活性検出系を構築した。

日本で分離された MuNoV-S7 株を用いてウイルス学的解析、全長ゲノム塩基配列の解析、ゲノムの構造解析を行い、MuNoV のリバースジェネティックスシステム構築の可能性を探った。本研究により、MuNoV タンパク質発現は自身のタンパク質により自己制御されている可能性を明らかにした。また、ポリプロテインの切断順序、実際に機能するウイルスタンパク質の性状が明らかにされた。MuNoV-S7 の細胞内挙動は、HuNoV のリバースジェネティックス、感染性 RNA のトランスフェクションなどによって得られた結果と類似しており、MuNoV のリバースジェネティックスシステムは HuNoV の良いモデルとなり得ることが示唆された。さらに、FCV のリバースジェネティックスシステム構築にも成功した。これにより、感染性 FCV の遺伝子操作が可能となった。本システムについて特許申請を行った。

受託研究として、複数のヒトノロウイルス株のゲノム全長 cDNA を哺乳類プロモーター下流にクローニングし、リバースジェネティックスに用いた。組換えバキュロウイルスで発現させて作製したウイルス様中空粒子

(VLPs) を用いて、株特異的抗血清を作製した。これらを用いて、免疫蛍光抗体法でシステムの評価を行ったところ、これまでに構築に成功した HuNoV U201 株以外に、TCH04-577 株でもリバースジェネティックスシステムが稼働していることが明らかとなった。また、SaV Mc10 株のリバースジェネティックスシステムも稼働している可能性が示唆された。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験は全て組換え DNA 実験申請を行い、承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実行した。

3. 結論

HuNoV の全長ゲノム配列解析を行い、ポリメラーゼ、プロテアーゼの配列蓄積を行った。新たに HuNoV TCH04-577 株、SaV Mc10 株のリバースジェネティックスシステムを構築した。プロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価システムを構築した。MuNoV を HuNoV のモデルとして利用可能であることを示唆した。培養細胞での増殖が可能な FCV を対象に、バイオセンサー発現細胞を用いたハイスループットなウイルスプロテアーゼ活性検出系を構築した。FCV においては、ハイスループット *in silico* screening, *in vitro* screening、ウイルスライフサイクルの全ての行程をモニターできるリバースジェネティックスを用いた薬剤 screening の基盤構築が、完成した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 24+13+13=50 件

原著論文による発表 9+6+3=18 件

それ以外 (レビュー他) の発表 5+5+2=12 件

その主なもの

論文発表

片山和彦、岡智一郎、高木弘隆

ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルス研究の有用性. 日本実験動物協会「LAB1021」, No. 39, 20-26, 2010

学会発表

横山勝、岡智一郎、片山和彦、遠矢幸伸、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳「マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009.

片山和彦 第57回日本実験動物学会シンポジウム：感染症の動物モデルを考える「マウスノロウイルスとヒトノロウイルス」2010

2) 海外

口頭発表 4+4+8=20 件

原著論文による発表 12+15+3=30 件

それ以外（レビュー等）の発表 1 件

その主なもの

論文発表

Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan

Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan

J. Virol. 84(16): 8085-97, 2010

Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. PLoS ONE 5(10) e13130, 2010

Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4

epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. J Virol 82: 11247-62. 2008.

Guix, S., Asanaka, M., Katayama K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., Estes, M. K. Norwalk Virus RNA is infectious in mammalian cells. Journal of Virology 81:12238-12248. 2007

学会発表

Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.

Kazuhiko Katayama. The newly identified human Norovirus strain HK299 may be recombinant between genogroups. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Centennial Hall, Hokkaido University, Sapporo Japan. June 28-30, 2010.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
特許申請

ネコカリシウイルス遺伝子の発現用ベクター及びこれを用いたウイルスの製造方法
(特 願 2010-188882)

免疫調整作用に基づく医薬品探索とその安全性評価 技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所

研究者 手島 玲子

研究要旨 食品素材等から骨免疫、粘膜免疫、神経免疫系に有効な成分の探索と評価技術開発を行った。骨芽細胞分化促進及び破骨細胞分化抑制を促すもの、培養樹状細胞と培養腸管上皮細胞の機能に影響を及ぼすもの、神経変性疾患のための *in vitro* 評価法が見いだされた。

研究分担者

- | | |
|------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 穂山浩 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所 | 近藤一成 |
| (3) 千葉大学大学院薬学研究院 | 戸井田敏彦 |
| (4) 東京大学大学院農学研究科 | 戸塚護 |
| (5) 愛知学院大学薬学部 | 中西守 |
| (6) アサヒビール株式会社 | 舛田晋 |
| (7) カゴメ株式会社総合研究所 | 相澤宏一 |
| (8) アピ株式会社社長センター | 市原賢二 |
| (9) 三栄源エフ・エフ・アイ | 中川誠 |

A. 研究目的

近年、社会構造の高度化に伴い、食生活の欧米化が関連していると思われる食物アレルギーや炎症性腸疾患等の粘膜免疫異常疾病、過剰ストレスから起こる多発性硬化症、パーキンソン関連疾患、アルツハイマー等の神経免疫疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の骨免疫異常疾病等の現代社会に特徴的な疾病が増加傾向にあり、社会問題になりつつある。これら疾病の発症原因は、粘膜免疫系、神経免疫系、骨免疫系が複雑に関連している。本研究はそれらの疾病を予防・治療する医薬品の開発を目的とし、食品素材等から有用な成分の探索を行う。また、動物実験および細胞培養等によるそれらの有効性及び安全性を評価する技術を開発し、医薬品への開発を目指す。具体的には、食品成分中のアレルギー疾患、神経変性疾患、炎症性腸疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の予防・治療を対象とした有用な有効性活性をもつ素材について、活性成分の探索並びにその機構の解明を行い、併せて有効成分の安全性評価技術の開発を検討する。

本研究班の構成は、レギュラトリーサイエンスとしての食品、医薬品にかかる問題をよく知る国立研究機関の研究者（手島、穂山、近藤）と、品質が高い食品素材の供給ができる食品関連企業の研究者（舛田、相澤、市原、中川）と、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者（戸井田、戸塚、中西）からなり、共同研究の形で効率的な研究の遂行をめざしている。

B. 研究方法

[1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

(i) 試料:アピ株式会社にて調製したブラジル産グリーン及び赤プロポリス抽出物及び含有成分（ドルパニン及びバッカリン）精製品を用いた。動物の混餌資料の作成法は以下のとおりである。

プロポリスのエタノール抽出液（固形分 55.08%）をデキストリンパウダー（松谷化学工業（株）社製）と混合し（エタノール抽出液中の固形分重量：デキストリンパウダー重量＝2：3）、均一化した。室温で一夜風乾した後、さらに 50℃で 3 時間乾燥させた。この混合粉末に CRF-1 粉末飼料を加えて攪拌・均一化し、プロポリスエタノール抽出物（固形分）の最終濃度が 1%、3%、5%(w/w)のプロポリス混餌を調製した（プロポリス固形分とデキストリンパウダーの混合物の飼料全体に対する最終的割合は 12.5%(w/w)）。または、プロポリスエタノール抽出液と CRF-1 粉末飼料を直接混合し（エタノール抽出液中の固形分重量：CRF-1 重量＝1:6）、上記と同様に乾燥させた後、CRF-1 を加えて攪

拌・均一化し、プロポリスエタノール抽出物(固形分)の最終濃度が1%、3%のプロポリス混餌を調製した。

(ii) 活性の測定法: a) 抗アレルギー活性 - ラット培養マスト(RBL-2H3)細胞からの脱顆粒は β -hexosaminidaseの放出を指標とし、プロポリス成分共存による上記マスト細胞活性化への影響を評価した。

b) 骨免疫系への影響

① 骨芽細胞 - 96孔マイクロプレート(Corning社製)にマウス骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞を播種(3.8×10^4 cells/cm²)し、その3日後から分化誘導を開始した。プロポリス精製品は1-100 μ Mの濃度範囲で分化誘導培地(+5mM β -グリセロリン酸(β -GP)に添加して、培養した。その間、培地交換を週3回行った。分化誘導開始後14日目に、骨芽細胞の成熟期(培養10日~20日前後)に発現量が高くなるアルカリホスファターゼ(ALP)活性を、*p*-nitropheny phosphateの脱リン酸化を検出する比色法により測定し、骨芽細胞への分化の程度を検討した。また、同じ分化誘導後14日目の細胞のALP活性の細胞染色による確認及び、分化誘導後28日目の細胞の石灰化(カルシウム塩沈着)部位のアリザリンレッドSによる染色も行った。

次いで、分化に伴う遺伝子発現への影響を調べるために、培養開始後1、3、7、10および14日目の細胞からTRIzolを用いてtotal RNAを抽出した。SuperScript VILO cDNA Synthesis Kitを用いてcDNAを調製後、特異的なプライマー対&プローブ(TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems社製)を用いて、骨芽細胞分化マーカータンパク質(ALP、Runx2; runt-related transcription factor 2、Osx; オステリクス、Oc; オステオカルシン、Col 1a1; I型コラーゲン α 1鎖)のmRNA発現量を測定した。発現量は、リファレンス遺伝子GAPDH(グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素)のCt値を用いた $\Delta\Delta$ Ct法により比較定量した。0日目の $\Delta\Delta$ Ct値を1として、経時的な発現量変化を検討した。

次いで、網羅的遺伝子発現を調べるために、培養開始後7日目の細胞からtotal RNAを抽出した。遺伝子発現の解析は、Affimetrix社の方法に準じて行った。すなわち、total RNAをGeneChip One-Cycle Target Labeling and Control Reagents(Affimetrix社製)を用いて

ビオチン標識cRNAを調製した。断片化したcRNAをGene Chip プローブアレイ(Murine Genome Array U74Av2)にハイブリダイズし、蛍光色素によりcRNAを検出した。数値化された遺伝子発現量をanalysis of variance(ANOVA) F検定およびSheffe's F検定に供した後、クラスター解析を行った。

② In vivoでの骨代謝系への影響 -

(a) 正常マウスの骨代謝系に対するプロポリスの影響について、C57BL/6マウス(雌性、6週齢)に混餌飼料を10週間自由摂取させた(1群5匹、全5群(コントロール群: CRF-1飼料のみ、コントロール混餌群: 12.5%(w/w)デキストリンパウダー含有CRF-1、プロポリス1%群、3%群、5%群))。各個体の体重は週2回測定した。10週間後、大腿骨及び血清を採取した。大腿骨はエタノール固定した後、X線撮影、及びpQCT(peripheral Quantitative Computed Tomography: 末梢骨用定量的CT)法による骨密度測定を行った。皮質骨については骨幹部(骨長の約2分の1の部位)の骨密度、海綿骨については骨幹端部(近位成長軟骨より1.0mmの部位)の骨密度を測定した。血清については、骨形成マーカーであるPINP(Procollagen type I N-terminal propeptide)、骨吸収マーカーであるTRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase)の濃度測定を行った(それぞれImmunodiagnostic systems社のキット(Rat/Mouse PINP EIA, Mouse TRAP Assay)を用いた)。

(b) RANKL投与骨粗鬆症モデルマウスの骨代謝系に対するプロポリスの影響として、C57BL/6マウス(雌性、7週齢)に混餌を4週間自由摂取させた(1群6匹、全4群(コントロール群(\times 2群): CRF-1飼料のみ、プロポリス1%群、3%群、デキストリンパウダーは含まない))。4週間後、破骨細胞分化誘導サイトカインであるRANKL(receptor activator of NF- κ B ligand、オリエンタル酵母工業(株)社製)を、コントロール群の一方(CRF-1+RANKL群)、プロポリス1%群、3%群の3群に対して、1mg/kgにて24時間ごとに3回腹腔内投与し、骨密度の低下を誘導した(RANKL投与骨粗鬆症モデルマウス)。その後大腿骨及び血清を採取した。大腿骨はエタノール固定した後pQCTによる骨密度測定を行った。血清については、カルシウム濃度、骨形成マーカーであるALP濃度の測定(日立自動分析装置7180を使用)、骨

吸収マーカーである TRAP の濃度測定 (Mouse TRAP Assay, Immunodiagnostic systems 社製を使用) を行った。

【II】粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

(i) 試料: リンゴのポリフェノールであるリンゴ縮合型タンニン (ACT) については, アサヒビール株式会社より調製されたものを用い, 多糖類として, グアーガム由来ガラクトマンナン (GM)、カラギナンは三栄源より調整されたものを用い, その他, 多糖類の酵母細胞壁グルコマンナン (YGM)、タマリンド種子キシログルカン (XG)、コンドロイチン硫酸 (CS)、およびカラマツ由来アラビノガラクトタン (AG) も使用した。また, 上皮細胞への影響を調べる目的では, ジペプチドであるカルノシン (N-β-Ala-L-His) を用いた。

(ii) 活性の測定法: a) 樹状細胞へ分化させた THP-1 細胞への影響 -- ヒト単球系細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/ml) および interleukin-4 (IL-4, 5, 10, 20 ng/ml) を添加し 4 日間培養することによって, 樹状細胞 (DC) 様 THP-1 細胞への分化誘導を行った。THP-1 細胞の DC 様への分化は形態変化、およびフローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析によって確認した。得られた DC 様 THP-1 細胞をさらに LPS、鶏卵の主要アレルゲンである Ovalbumin (OVA) またはソバの主要アレルゲンである Fag e1 を用いて 3 日間抗原刺激を行った。DC 様 THP-1 細胞の抗原提示能の指標として、抗原提示分子 MHC クラス II の構成分子である HLA-DR および共刺激分子である CD86 分子の発現量の変化を測定した。被検試料にはリンゴポリフェノール、酵母細胞壁グルコマンナン (YGM)、タマリンド種子キシログルカン (XG)、コンドロイチン硫酸 (CS)、グアーガム由来ガラクトマンナン (GM) およびカラマツ由来アラビノガラクトタン (AG) を使用した。

アレルギーモデルマウスを用いた実験では、BALB/c 由来の OVA 感作マウスから採取した腸管パイエル板および脾臓細胞に被検物質を添加し、3-5 日間培養したのち、培養上清中のサイトカイン量および免疫グロブリン量を ELISA 法によって測定した

b) マウス小腸由来上皮細胞株への影響 -- マウス小腸由来上皮細胞株 MoS13 の培養には 10% ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を用い、60 mm ディッシュを用いて、37°C、10% CO₂ を含むインキュベーター内で行った。2

〜3 日間培養し、細胞がコンフルエントに達ししだい継代操作を行った。また、実験に使用する際には、MoS13 細胞を 4×10⁴ 個/ml になるように希釈し、各 well に 1 ml (24 well プレート) あるいは 0.5 ml (48well プレート) ずつ播種し、24 時間後に使用した。

カルノシンが MoS13 細胞のサイトカイン産生に与える影響を解析するため、MoS13 細胞をカルノシンとともに 24 時間培養した後、TLR の各種リガンドを添加してさらに 24 時間培養し、培養上清中のサイトカイン産生量 (IL-6 産生量) を ELISA 法により調べた。TLR リガンドとして、TLR1/2 の合成リガンドである Pam3CSK4、TLR3 のリガンドである Poly (I:C)、TLR4 のリガンドであるリポ多糖 (LPS) を用いた。また、上記のような培養を行った細胞から RNA 抽出を行い、これを鋳型として cDNA を合成した後、定量的 PCR 法を用いて、サイトカインの mRNA 発現量を調べた。

マウス IL-6 プロモーター下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を結合したプラスミドを作製し、リポフェクション法により MoS13 細胞に導入した。この細胞にカルノシンを添加して 24 時間培養した後、Pam3CSK4 を加えてさらに 5 時間培養し、発現したルシフェラーゼの活性を測定した。

次いで、MoS13 細胞培養上清がマウス腸管粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生に与える影響の解析のために、BALB/c マウス小腸からパイエル板を除去し、2 mm 角に切断したものをコラゲナーゼ処理することで細胞懸濁液を得た。これをパーコール密度勾配遠心により粘膜固有層細胞を得た。さらに磁気ビーズ法で IgA⁺B220 細胞を調製した。これに MoS13 細胞培養上清を加えて 4 日間培養後、培養上清中の総 IgA 量を ELISA 法にて測定した。

【III】神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

(i) 試料: カロテノイド類として、α-カロテン、リコペンを用いた。ロイヤルゼリー由来の中鎖脂肪酸として、10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-hydroxy decanoic acid, 2-decenoic acid, decanoic acid を用いた。培地中での溶解性が極めて悪いカロテノイド類はあらかじめ大豆由来のフォスファチジルコリン (soybean PC) を用いてリポソームとする方法を検討した。

(ii) 活性の測定法: 培養神経細胞として、ラット副腎髄質由来 PC12 細胞 (JCRR,

JCRB0266), ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (ATCC, CRL-2266) を通常の培養条件で増殖させ、必要に応じて NGF, レチノイン酸で分化誘導して実験に用いた。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞として、FBD-102b 細胞を用いた。

EGFP- α -syn (α -synuclein) cDNA は Dr. Sang Myun Park (Ajou University School of Medicine, Korea), LRRK2(leucine-rich repeat kinase 2) cDNA は Dr. Mark Cookson (NIH, Bethesda)より供与頂いた。

SH-SY5Y および PC12 細胞は、10% FBS 存在下 DMEM/F-12 または 10%馬血清+5%FBS 存在下 DMEM 培養した。また、分化は SH-SY5Y 細胞は 2.5%FBS+レチノイン酸 (RA, 10 μ M) で、PC12 は 0.5%FBS+NGF の条件で 3-7 日誘導した。

トランスフェクションは、SH-SY5Y (1X10⁶ cells/cuvette) は、エレクトロポレーション法 (amaxa) により、PC12 (1x10⁵ cells/well) は、リポフェクション法 (lipofectamin 2000) によりプロトコールに従って行った。

EGFP- α -syn の凝集や局在は蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) を用いて解析した。必要に応じてミトコンドリア標識に TOM20 抗体を用いた。また、 α -syn, リン酸化 α -syn, LRRK2 の発現は, anti- α -syn (BD), anti-phospho- α -syn (和光純薬), anti-LRRK2 (Sigma) を用いてウェスタンブローディングで解析した。

C. 研究結果及び考察

[1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

(i) 抗アレルギー作用

今年度は、ブラジル産赤プロポリスエタノール抽出物及び、逆相クロマトグラフィーでの分画後の画分につき、抗アレルギー活性の測定を行った。細胞活性の指標には、抗原暴露に伴いマスト細胞からヒスタミンと同様に脱顆粒により放出される β -hexosaminidase の放出量を用いた。プロポリス抽出物の前処理時間は、0.5 時間に設定した。

ブラジル産赤プロポリス抽出物は 0.1%濃度で脱顆粒抑制活性を示したが、ブラジル産緑プロポリスより低濃度で細胞毒性を示した。

赤プロポリスエタノール抽出液の逆相クロマトグラフィーにより分画した 2 つの画分 (フラ

ボノイドを多く含む画分 A と疎水性の高い成分を含む画分 B) の抗アレルギー活性評価を行ったところ、画分 A が分画前の赤プロポリス抽出液と同程度の脱顆粒抑制活性を示したのに対し、画分 B では高濃度 (0.1%) のみで弱い脱顆粒抑制活性を示した。画分 A に強いアレルギー抑制活性のある成分が含まれているものと考えられた。

(ii) 骨免疫系への影響

(a) in vitro 骨芽細胞の分化への影響

1-100 μ M の濃度範囲でプロポリス成分であるバッカリンまたはドルパニンを添加して 14 日間培養した MC3T3-E1 細胞において、有意な ALP 活性増大が認められ細胞の ALP 活性染色でも陽性の結果が得られた。また、28 日 10-100 μ M バッカリンを添加して培養後の細胞において、アリザリンレッド S による石灰化結節染色で陽性結果が得られ、カルシウムの沈着が観察された (図 1)。1-14 日間 100 μ M バッカリンと共に分化誘導した MC3T3-E1 細胞で、骨芽細胞分化の指標となる特異的のマーカータンパク質として、ALP (石灰化阻害作用を有するピロリン酸を分解する酵素)、Oc (骨基質中に存在する非コラーゲン性タンパク質) の遺伝子の mRNA 発現量が経時的に顕著に増加した (図 2)。また、バッカリン添加に伴い、最大発現量となる日数が早まる傾向が観察された。すなわち、ALP、Oc いずれにおいても、バッカリン無添加では 14 日目が最も高い $\Delta\Delta$ Ct 値(相対値)を示したのに対して、バッカリン添加では発現のピークはそれぞれ 10 日目および 7 日目となった。Runx2 においてはバッカリン添加に伴う発現量の増加が認められたが、Osx および Col 1a1 では明白な差は観察されなかった。

次に、5 mM β -GP 及び 100 μ M バッカリンを添加し 7 日間培養した細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。コントロールとして、未分化の細胞 (0 日間培養) を用いた。また、5 mM β -GP のみ、もしくは 100 μ M バッカリンのみを添加した細胞 (いずれも 7 日間培養) についても同様に解析を行った。骨芽細胞分化に関与していると考えられる遺伝子を 39 個ピックアップし、クラスター解析を行った。これらの遺伝子の中で、特に BMP (Bone Morphogenetic protein) または Wnt シグナル伝達経路に関わる遺伝子、ならびに石灰化に関する遺伝子が目立った。BMP シグナル伝達経路に関わる遺伝子では、BMP-5 や、BMP アンタゴニストである

Gremlin の発現量が、バックリン処理後の細胞で有意に増大していた。また、これらの細胞では、Wnt シグナル伝達経路に関わる WISP2 (Wnt-1 誘導分泌ペプチド) や Frizzled 4 (Wnt 受容体) の発現量も増大していた。また、石灰化に関わる非コラーゲン性タンパク質であるオステオカルシンやミノポンチン (オステオポンチン様タンパク質) の発現量の増大も見られた。

(b) In vivo での骨代謝系への影響

(i) 正常マウス骨代謝系に対する影響

まず、正常マウスにプロポリスエタノール抽出物を含む混餌を 10 週間自由摂取させ、大腿骨の骨密度、及び血清中骨代謝マーカーに対する影響を検討した。使用したデキストリンパウダー含有プロポリス抽出物 5%混餌を摂取した群では、他の群と比較してやや体重が少ない傾向が見られたが、最終的に有意差はなかった。10 週間後に採取したマウス大腿骨の X 線照射による解析で、プロポリス摂取による骨の形状、皮質骨、海綿骨に変化は見られなかった。次に、pQCT による骨密度測定を行った。骨幹部の皮質骨密度については、プロポリス 0%、1%、3%群ではコントロール群との差は見られなかった。5%混餌群で有意に低下したが、低下の程度は 5%程度であった。骨幹部部の海綿骨密度については、コントロール群と比較してプロポリス 0%群 (デキストリンパウダーのみ含むコントロール混餌群) でやや低下し、プロポリス 1-5%群では 0%よりも高い値を示した。

さらに、血清中の骨代謝マーカー濃度を測定した。骨形成マーカーとしては、骨基質タンパク質であるタイプ I コラーゲンの前駆体の断片である PINP (Procollagen type I N-terminal propeptide) の濃度を測定した。プロポリス 0% (コントロール混餌) 群では、コントロール群と比較してやや低下し、プロポリス 1-5%群では 0%よりも高い値を示した。また、骨吸収マーカーとしては、破骨細胞分化マーカーである TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) の濃度を測定した。コントロール群と比較して、プロポリス 0%群ではやや増大し、プロポリス 1、3%群では 0%よりも高い値を示したが、5%群ではコントロール群と同程度の値であった。

(ii) 骨粗鬆症モデルマウスの骨代謝系に対するプロポリスの影響

本研究では骨粗鬆症モデルマウスとしてこの RANKL 投与モデルを使用することとした。CRF-1 飼料あるいはプロポリス混餌をマウス

に 4 週間自由摂取させた後、RANKL を投与した。その後、大腿骨及び血液を採取し、骨密度及び血清中の骨代謝マーカーの測定を行った。

プロポリス混餌摂取前後のマウスの体重変化を示す。4 週間後、プロポリス 3%混餌摂取群のみ、他の 3 群に比べ有意に体重が小さかった。

次に、pQCT による骨密度測定を行った。骨幹部の皮質骨密度については、RANKL 投与群、プロポリス 1%+RANKL 投与群ではコントロール群との差は見られなかった。プロポリス 3%+RANKL 投与群で有意に低下したが、低下の程度は 3.5%程度であった。骨幹部部の海綿骨密度については、RANKL 投与群ではコントロール群の 79.6%まで有意に低下しており、この骨粗鬆症モデルマウスの実験系が機能していることが示された。これに対し、プロポリス 1%+RANKL 投与群、プロポリス 3%+RANKL 投与群では、海綿骨密度はコントロール群のそれぞれ 94.3%、93.2%であり、コントロール群との有意差は見られなかった。これらの結果より、予めプロポリス抽出物を摂取することにより、RANKL 投与による骨密度の低下が抑制されることが示された。

さらに、血清中の骨代謝マーカー濃度を測定した。血中カルシウム濃度については、RANKL 投与によりコントロール群と比較してカルシウム濃度が 8.5%程度増大し、プロポリス摂取によりこの増大の割合が小さくなったが、いずれも有意な変化ではなかった。骨形成マーカーとしては、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) の濃度を測定した。RANKL 投与群では ALP 濃度はコントロール群の 1.08 倍に増大した。また、プロポリス 1%+RANKL 投与群、プロポリス 3%+RANKL 投与群では、コントロール群よりも低い濃度であったが、有意な変化は見られなかった。また、骨吸収マーカーとして TRAP の濃度を測定した。RANKL 投与群ではコントロール群の 2.23 倍に増大した。一方、プロポリス 1%+RANKL 投与群、プロポリス 3%+RANKL 投与群でも、それぞれコントロール群の 2.47 倍、2.41 倍と、RANKL 投与群と同程度であった。

【II】粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

a) 樹状細胞へ分化後の THP-1 細胞への影響

THP-1 細胞は 20 ng/ml PMA および 20 ng/ml IL-4 を添加し培養することで培養フラスコに接

着し、DC 様の形態を示した。また、DC 様の表現型 (CD11c⁺、CD86⁺、HLA-DR⁺) が発現誘導することがフローサイトメトリーによって確認した。得られた DC 様 THP-1 細胞を LPS、OVA および Fag e 1 で刺激することによって HLA-DR の発現量が上昇した。Fag e 1 と同時に XG および YGM を添加したところ、DC 様 THP-1 細胞上の HLA-DR および CD86 の発現量が抑制された。一方、OVA と同時に YGM を添加したところ、HLA-DR のみ発現量が抑制され、CD86 には影響はみられなかった。さらに、OVA と同時に CS、GM、または AG を添加したところ、HLA-DR の発現量は抑制されたが、CD86 発現量には影響はみられなかった。以上の結果から、抗原提示能抑制物質のスクリーニング系として DC 様 THP-1 細胞が利用可能であることが示された。また、多糖類を添加した DC 様 THP-1 細胞において HLA-DR と CD86 の発現量変化は必ずしも同調しないことも示され、多糖類の抗原提示抑制作用が抗原提示分子と共刺激分子の発現調節機構とが独立して発揮されることが示唆された。

BALB/c 由来の OVA 感作マウスから採取したパイエル板細胞にリンゴポリフェノール、 κ -カラギーナン、グァーガムを添加し培養したところ、いずれの試料においても特異 IgE 産生量の顕著な低下が認められた。また、添加量 10 および 100 $\mu\text{g/ml}$ では、典型的な Th2 型サイトカインである IL-4 が減少していることが示された。また、脾臓細胞で同様の実験を行ったところ、リンゴポリフェノール群で IL-4 の低下、IFN- γ (Th1 型サイトカイン) および IL-10 (Treg 産生サイトカイン) の増加がみられた。以上の結果から、リンゴポリフェノールが Th1/Th2 バランス改善や Treg 誘導において優れた免疫調節作用を有することが示された。そこで、DC 様 THP-1 細胞を用いた *in vitro* 試験系にリンゴポリフェノールを供したところ、OVA 添加によって上昇した HLA-DR の発現レベルは、リンゴポリフェノール (100 $\mu\text{g/ml}$) の添加により顕著に低下することが明らかになった。一方、CD86 の発現には影響を及ぼさなかった。すなわち、リンゴポリフェノールの免疫調節作用には樹状細胞の抗原提示抑制と深く関与することが示唆された。

b) マウス小腸由来上皮細胞株への影響 —

カルノシンは 50 mM の濃度までは MoS13 細胞に対する細胞毒性が認められなかったが、100

mM では放出 LDH の割合が増加したことから、何らかの細胞毒性があることが示された。次に、カルノシンが TLR リガンド刺激を受けた MoS13 細胞の IL-6 産生に与える影響を調べた。MoS13 細胞を TLR1/2 リガンドである Pam3CSK4 および TLR3 リガンドである Poly (I:C) で刺激した場合に、IL-6 の産生が認められた。一方、TLR4 リガンドである LPS で刺激した際には IL-6 の産生誘導は認められなかった。50 mM のカルノシンとともに 24 時間培養した後、同様の TLR 刺激を加えた場合、いずれの刺激の場合にも IL-6 産生量の増加が認められた (図 3)。特に PamCSK4 および Poly(I:C) による刺激で誘導された IL-6 産生に対する増強効果は顕著であった。一方、TLR 刺激を加えていない場合にはカルノシンを添加しても IL-6 産生は検出されなかった。TLR 刺激共存時のカルノシンの IL-6 産生増強効果は、mRNA 発現のレベルでも確認された。さらに、Pam3CSK4 で刺激した場合には、カルノシンの添加濃度依存的に IL-6 プロモーター活性の増強が認められた。

次いで、TLR 刺激を受けた MoS13 細胞培養上清によるマウス腸管粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生増強について検討した。腸管上皮細胞の免疫調節機能として、液性因子を介した腸管粘膜固有層における IgA 産生への関与を検討する目的で、MoS13 細胞の培養上清を腸管固有層由来 B 細胞に添加し、IgA 産生量に与える影響を検討した。その結果、Pam3CSK4 および Poly(I:C) で刺激した MoS13 細胞の培養上清を添加した場合、無刺激の MoS13 細胞培養上清と比較して、IgA 産生の促進が観察された。

次いで、カルノシンの MoS13 細胞への作用を介した IgA 産生増強効果を調べたところ、カルノシンの存在下で TLR 刺激を受けた MoS13 細胞培養上清の、IgA 産生に与える影響を検討したところ、Pam3CSK4 で刺激した場合にのみ、カルノシンの IgA 産生増強効果が認められた。

【III】 神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

エレクトロポレーション法により SH-SY5Y 細胞に EGFP- α -syn を過剰発現させたところ細胞質全体に分布して、その後 5 日以上分化条件で培養を続けても大きな凝集体は形成されなかった。一方、LRRK2 とともに EGFP- α -syn を過剰発現させたところ一部に凝集体を形成した細胞

胞が見られた(図4)。これまで、*in vitro*培養系での凝集体の形成には、外部から種(seed)となる凝集体を導入することが必要であったが、今回LRRK2存在下では細胞内で自然に一部の細胞であるがEGFP- α -syn凝集体が生成されることが新たに判明した。また、観察された凝集体はいずれもリン酸化されており、パーキンソン病で観察されるLewy小体中のリン酸化された α -syn凝集体と類似した特徴を備えていると考えられた。さらに、リン酸化された α -syn凝集体はミトコンドリア外膜マーカーであるTOM20との共局在の結果から、主にミトコンドリアに局在することが分かった。

次に、EGFP- α -syn発現細胞からEGFP- α -synタンパクが非発現細胞に取り込まれるかを検討した。その結果、EGFP- α -syn発現細胞の培養上清をあらかじめMitotrackerRed標識した非発現細胞に添加したところ、非発現細胞内部にEGFP- α -synが存在していることが確認され、細胞間で移動したことが強く示唆された。

最後に、 α -syn単独、LRRK2共発現時における細胞生存率をWSTアッセイで行った結果、LRRK2の野生型WTおよびG2019S変異体のいずれかが共発現していると細胞生存率が若干低下することが明らかになり、すでに述べたLRRK2存在時の凝集体生成促進や細胞間移動の促進効果とよく相関している。今後は、この*in vitro*培養系で生成する凝集体形成を抑制または分解を誘導するような成分を検索していきたい。

E. 結論

[1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

抗アレルギー活性に関しては、赤プロポリス抽出液のフラボノイドを多く含む画分中に、脱顆粒抑制作用をもつ成分が含まれていることが明らかとなった。

骨芽細胞に関しては、21年度に引き続き解析を進め、骨芽細胞分化マーカー及び石灰化についての促進作用を活性染色により確認した。また、リアルタイムPCRやDNAマイクロアレイ解析により遺伝子発現に与えるプロポリス成分の影響について検討し、バックリンが骨芽細胞分化マーカーの発現を増大させること、また、BMPシグナル伝達経路だけでなく、Wntシグナル伝達経路にも影響を及ぼしているという興味深い結果を示した。

また、*in vivo*における骨代謝系に与える影響に関しては、正常マウスにプロポリス混餌を摂取させた実験系では、海綿骨密度や骨形成マーカーが増大する傾向は見られたが、有意な効果は見られなかった。RANKL投与骨粗鬆症モデルマウスに予めプロポリス混餌を摂取させた実験系では、海綿骨密度低下に対するプロポリスの阻害効果が見られた。

[II] 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

樹状細胞様分化THP-1細胞を用いたインビトロ評価系を確立し、これを用いて抗原提示抑制物質の探索が可能となった。リンゴポリフェノール、グルコマンナン、キシログルカン、ガラクトマンナンおよびアラビノガラクトタンはOVA刺激下において抗原提示を抑制することができることを明らかにした。

マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞を用いて、腸管上皮細胞の液性因子を介した粘膜固有層B細胞のIgA産生調節機能をターゲットとした有用成分探索のための評価系の構築を行った。また、TLR1/2リガンドであるPam3CSK4刺激を受けたMoS13細胞の培養上清中にIgA産生を促進する因子の存在が認められた。これまでにCaco2細胞においてTLR刺激に対する応答を増強する効果が知られているカルノシンは、本実験系において上記のIgA産生促進因子の発現を増強する効果が示された。本研究の成果は、アレルギー疾患の予防・治療、粘膜感染の予防に役立つ医薬品の探索系の構築を目指す上で有用な知見が得られたと考えられる。

[III] 神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

神経変性疾患の病理学的特徴である凝集体形成を*in vitro*培養系で再現するアッセイ系について検討した。その結果、パーキンソン病関連分子でLewy小体中のシヌクレイン凝集体形成がSH-SY5Y細胞中でLRRK2存在下では促進されること、またシヌクレインタンパクの発現細胞から非発現細胞への移動を促進することが明らかになった。こうした簡便な*in vitro*培養系で凝集体形成の分解を促進するような成分を検索できれば、凝集体タンパクの蓄積が原因と考えられる神経変性疾患の予防や治療に結びつく可能性があり有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R.Nakamura, R.Nakamura, K.Watanabe, K.Oka, S.Ohta, S.Mishima, R.Teshima : Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis; *Int, Immunopharmacol.*, 10(9), 1107-1112 (2010)
- 2) 安達玲子、中村厚: in vitro における骨代謝系細胞の分化・機能解析法, *ぶんせき* 11、591-595 (2010)
- 3) A.Nakamura, R. Adachi, S. Ohta, K. Ichihara, S. Mishima, R. Teshima: Effect of propolis components in propolis on differentiation of osteoblastic cell, submitted
- 4) Sato Y., Akiyama H., Matsuoka H., Sakata K., Nakamura R., Ishikawa S., Inakuma T., Totsuka M., Sugita-Konishi Y., Ebisawa M., Teshima R., Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy, *J Agric Food Chem.*, 58, 7180-7186 (2010)
- 5) K. Kondo, S. Obitsu, R. Teshima: α -Synuclein transmission is enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Pharm.Bull.* (in press)
- 6) Furuno, T., Nakanishi, M.: Analysis of neuro-immune interactions by an in vitro co-culture approach. In "Neuropeptide: Methods and Protocol" (Ed. Walker, J.) in "Methods in Molecular Biology" series, Springer, in press.
- 7) T. Iwamoto, K. Yamada, M. Shimizu, and M. Totsuka, Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press.
- 8) Burana-Osot J, Soonthornchareonnon N, Hosoyama S, Linhardt RJ, Toida T.: Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction. *Carbohydr. Res.*, 345(9):1205-1210. (2010).
- 9) Burana-Osot J., Soonthornchareonnon N., Chaidedgumjorn A., Hosoyama S, Toida T., Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection. *Carbohydr. Polym.*, 81, 461-465 (2010).

2. 学会発表

- 1) 中村厚、安達玲子、太田象三、市原賢二、三島敏、手島玲子「プロポリスは骨芽細胞分化を促進する」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010. 12)
- 2) 松岡英樹、中村厚、安達玲子、穂山浩、太田象

三、市原賢二、手島玲子「プロポリス抽出物摂取による免疫系への影響について」日本薬学会第 131 年会 (2011.3)

- 3) 石川えり、片山茂、穂山浩、手島玲子、中村宗一郎、マンナン多糖修飾 ovalbumin の抗原提示能抑制効果, 日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011,3)
- 4) 石川えり、片山茂、穂山浩、手島玲子、中村宗一郎、酵母細胞壁由来グルコマンナン修飾はソバ主要アレルゲン Fag e 1 の抗原提示を抑制する, 日本農芸化学中部支部例会, (2010,10)
- 5) Yamauchi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Katayama, S., Nakamura, S., Attenuated allergenic symptoms by novel phenolic compounds prepared by enzymatic glycosylation with rutinase, *Pacificchem 2010* (2010,12)
- 6) Kukita, T., Akiyama, H., Teshima, R., Katayama, S., Nakamura, S., Immunomodulatory effect of yeast glucomannan on pollen allergy, *Pacificchem 2010* (2010,12)
- 7) Nakamura, S., Suzuki, Y., Kassai, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Katayama, S. Immunomodulatory effect of a hypoallergenic buckwheat Fagel1 prepared by Maillard-type glycosylation with yeast glucomannan, *Pacificchem 2010* (2010,12)
- 8) 小櫃冨未、近藤一成、手島玲子「PARP-1 やカスパーゼを経由しないエレクトロステアリン酸刺激による細胞死における AIF の解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010, 12)
- 9) 近藤一成、小櫃冨未、太田小夜香、手島玲子「培養神経細胞を用いた HDAC 阻害剤によるエレクトロステアリン酸刺激による細胞死の抑制効果と解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010, 12)
- 10) 古野忠秀、柴田麻希、嵩田有希、伊納義和、中西 守「神経刺激に伴うマスト細胞の脱顆粒に及ぼすプロポリスの影響」日本薬学会第 131 年会. (2011, 3)
- 11) 津田悠一、岩本 拓、戸塚 護、清水 誠: マウス腸管上皮細胞の Toll 様受容体リガンド刺激で誘導されるサイトカイン産生に対する食品因子の増強作用. 第 6 回日本食品免疫学会学術大会 (JAFI2010) (2010,6)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許
なし
2. 実用新案登録
なし

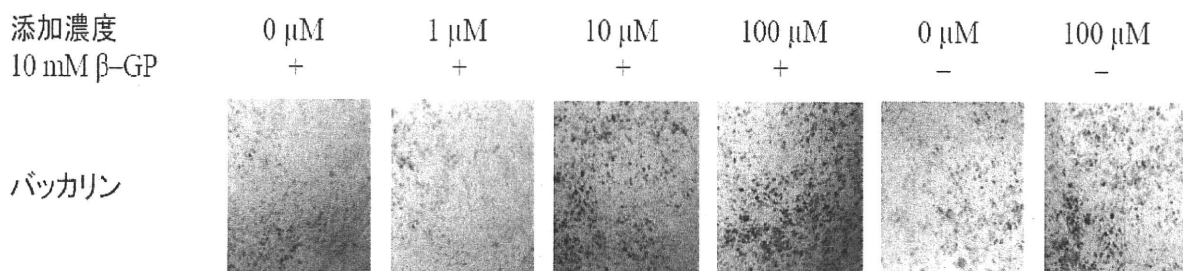


図 1. 28 日間培養した MC3T3-E1 細胞を用いた石灰化結節部位の検出 (アリザリンレッド S 染色)

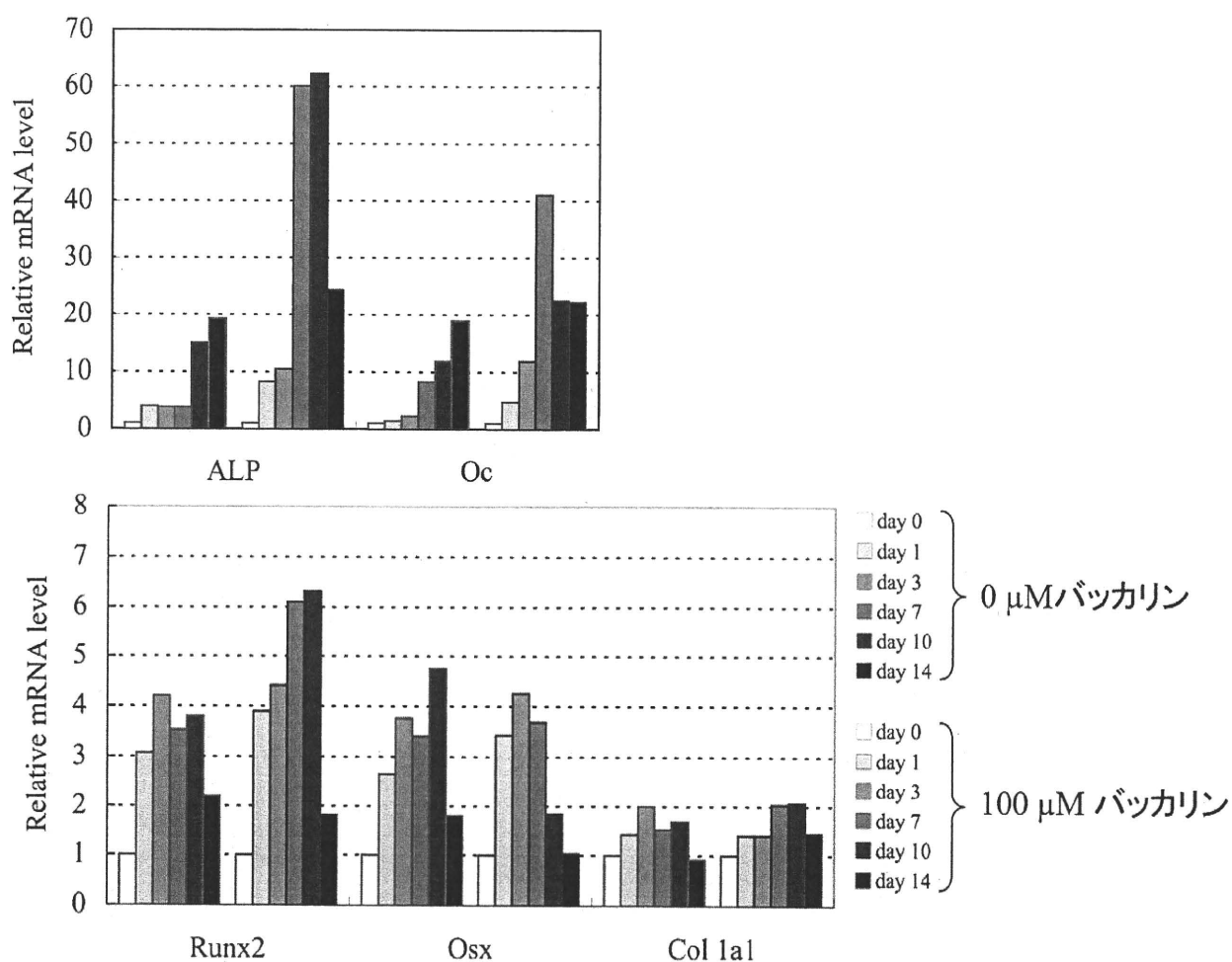


図 2. 骨芽細胞特異的の分化マーカーの mRNA 発現量変化

5 mM β -GP 存在下で MC3T3-E1 細胞を培養し、骨芽細胞様に分化誘導した。

ALP : Alkaline phosphatase、Oc : Osteocalcin、Osx : Osterix、Col 1a1 : Type I Collagen α 1

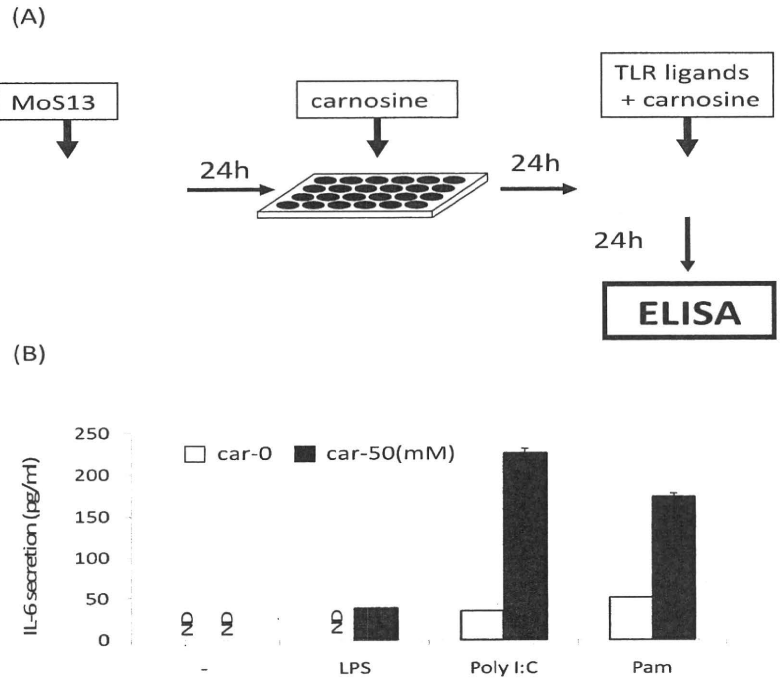


図 3. カルノシンが 各種 TLR リガンド刺激を受けた MoS13 細胞の IL-6 産生に与える影響

(A) 実験方法の概略図。(B) MoS13 細胞をカルノシン (50 mM) の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養した後、LPS (1 mg/ml) , PolyI:C (20 mg/ml) , あるいは Pam3CSK4 (0.5 mg/ml) を加えてさらに 24 時間培養し、培養上清中の IL-6 量を ELISA 法により測定した。各値は平均値 \pm SD (n=3) で示した。ND= not detected.

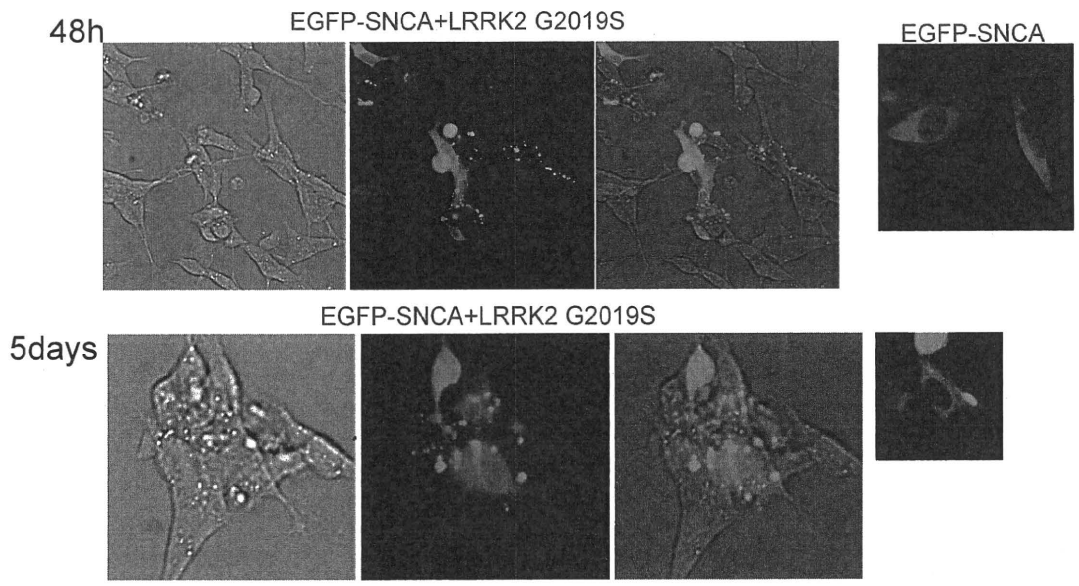


図 4 EGFP- α Syn の LRRK2 WT または G2019S 共発現下での局在, 凝集体形成.