

ウイルスも検出できる感度の高いRT-定量PCRを用いて、患者のアブミ骨（初代培養を含む）からのウイルス分離とウイルス遺伝子の検出を試みたが、25検体すべてでウイルスは検出できなかった。

#### D. 考察

麻疹ウイルスは、F 蛋白質が変異してその膜融合能を亢進させると、SLAM やnectin 4 のような受容体がない細胞でも感染や伝播が起こると考えられる。これは、受容体非依存的に F 蛋白質が活性化されることが原因だと考えられる。このような感染は、神経系での持続感染など、特別な条件下での麻疹ウイルスの病原性に関わっている可能性がある。

麻疹ウイルス感染は、NLRP3 インフラマゾーム依存的にIL-1 beta を誘導するが、麻疹ウイルス V 蛋白質は NLRP3 と相互作用することで、その活性化を抑制していた。V 蛋白質はいくつかのメカニズムでインターフェロン作用を抑制する働きがあるが、それに加えてインフラマゾームを介した自然免疫も抑制することができると考えられる。

従来の報告と異なり、耳硬化症の検体に麻疹ウイルス感染の証拠は得られなかった。日本の患者では、耳硬化症の発症に麻疹ウイルスは関与していないと考えられる。

#### E. 結論

麻疹ウイルスの病原性に関して、F 蛋白質の変異により受容体陰性細胞へのトロピズムを獲得しうること、麻疹ウイルスの産生する V 蛋白質は麻疹ウイルスに対する自然免疫である NLRP3 インフラマゾームを抑制する機能をもつこと、日本の患者における耳硬化症の発症に麻疹ウイルスは関与していないことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Komune N, Ohashi M, Matsumoto N, Kimitsuki T, Komune S, Yanagi Y. No evidence for an association between persistent measles virus infection and otosclerosis among patients with otosclerosis in Japan. *J Clin Microbiol.* (in press)

Hashiguchi T, Maenaka K, Yanagi Y. Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine. *Front Microbiol.* 2:247, 2011

Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 beta secretion. *J Virol.* 85:13019-13026, 2011

##### 2. 学会発表

Komune N, Ichinohe T and Yanagi Y. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 beta secretion. *15th International Congress of Virology*, September 2011, Sapporo, Japan

Watanabe S, Shirogane Y, Ikegame S, Koga R, Nakashima M, Yanagi Y. Novel mutations in the measles virus fusion protein that enhance its fusion activity. *15th International Congress of Virology*, September 2011, Sapporo, Japan

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

## 麻疹ウイルスの抗原エпитオプの構造解析と効果的なワクチン維持のための研究

研究分担者 前仲勝実 北海道大学大学院薬学研究院 教授

### 研究要旨

麻疹（はしか）ウイルスは2007年に日本で爆発的に流行し、その脅威が社会的に大きな問題となったが、弱毒生ワクチンは大変有効であり、ワクチン接種で十分に予防できると考えられている。しかし、何故ワクチンがこれほど効果的に働くのかは不明であった。我々は、主たる麻疹ウイルス抗原であるH蛋白質(measles virus hemagglutinin, MV-H)および、その受容体SLAM(CD150)との複合体の立体構造を決定した結果、H蛋白質表面の広い範囲が糖鎖に覆われ、露出している部分のほとんどがSLAM結合領域となっていることがわかった。これにより、糖鎖部分には抗体はできにくく、露出部位にのみ抗体が産生されるため、多くの抗体がSLAM結合を阻害するものと考えられた。この考察に基づき、効果的な中和抗体産生に糖鎖が重要であることを提唱した。そこで、このモデルの検証を進めるため、今年度は複数のH蛋白質特異的な中和抗体について、H蛋白質との結合解析と中和活性との関連を検討した。他方、麻疹ウイルスの近縁にあたるイヌジステンパーウイルス(CDV)が近年サルに感染することが報告され、感染宿主域の拡大に関する懸念が出てきている。そこで、CDVのH蛋白質に着目し、複数種のSLAM分子を作成し、その結合活性を評価し、感染宿主拡大の可能性について考察した。

#### A. 研究目的

麻疹（はしか）ウイルスには大変有効なワクチンが存在し、ワクチンの接種で予防できると考えられてきたが、そのメカニズムはわかっていなかった。本研究分担者は、同じく分担者である柳教授と研究代表者の竹田部長と共同で、麻疹ウイルスの表面抗原であるH蛋白質

(measles virus hemagglutinin, MV-H)と、その受容体SLAMとの複合体の両方についてX線結晶構造解析に成功した。その結果、MV-H蛋白質が糖鎖で表面の大部分が覆われていることにより、受容体の結合部位に集中的に抗体が産生され、ウイルス侵入を防ぐ中和抗体ができやすくなっていることがわかり、効果的な中和抗体産

生に糖鎖が重要であることを提唱した (Hashiguchi et al. PNAS 2007 および Nat. Struct. Mol. Biol. 2011)。これが、麻疹ワクチンが有効となる分子基盤の一端であると考えられた。

本研究では、ウイルス表面蛋白質(MV-H)と受容体あるいは中和抗体との相互作用解析を進め、ワクチンによる麻疹ウイルスに対する高い中和活性効果の分子基盤を明らかにする。研究代表者の竹田部長のグループと密に情報を共有しながら、抗原性変化に対するワクチン効果の予測を目指す。さらに最近サルに感染例が報告されてきたイヌジステンパーウイルス (マシクウイルスの近縁種) についても感染宿主拡大の可能性について知見を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

麻疹ウイルス MV-H 蛋白質、イヌジステンパーウイルス CDV-H 蛋白質および各動物種の受容体 SLAM 蛋白質については、ヒト培養細胞を用いた大量培養系を確立済みである。さらに、最近発見された上皮受容体 Nectin4(PVLR)については、発現系の構築を進める。これらを用いて、これまで相互作用解析に利用してきた表面プラズモン共鳴解析や滴定型カロリメーターにより結合能を検証する。

他方、MV-H に対する中和抗体については、代表者の竹田部長と分担者の柳教授らから複数の抗体が提供されている。これらを用いて MV-H と SLAM 結合を競争阻害するアッセイ系を確立する。具体的には、上述の表面プラズモン共鳴解析や滴定型カロリメーターによる MV-H 分子と SLAM 分子との相互作用解析を用いて、MV-H と SLAM 結合を抗体がどのように阻害するかを検証する。

(倫理面での配慮)

本研究にはヒトや動物を用いる実験が含まれず、倫理面の問題は特にないと考えられる。

## C. 研究結果

MV-H 蛋白質に対する複数種の中和抗体の有する SLAM 結合への競争阻害活性を検証できる実験条件を絞った。最終的には、MV-H を表面プラズモン共鳴解析装置のチップ表面に固定し、各種 SLAM と MV-H 中和抗体を複数の濃度比で混合したものをアプライすることで、抗体の有無でのレスポンスの差異を測定した。その結果、中和抗体の種類により、MV-H に対する親和性に大きな違いが出た。他方、中和抗体の SLAM 結合に対する阻害効果についてもそれぞれの抗体での活性差が見られた。

他方、複数の動物種の SLAM と CDV-H と MV-H との結合を調べることにより、MV-H がヒトだけでなくイヌ SLAM に結合すること、しかし、マウス SLAM に結合しないことがわかり、従来の感染実験等のデータと合致するものであった。詳細な結合能の違いが機能面にどのように影響を及ぼすのかについてはまだ明確な結論は出せていない。

## D. 考察

MV-H 蛋白質と複数種の中和抗体について、MV-H と SLAM との結合阻害能と中和活性については相関がある可能性が高いことを示唆するデータが得られたが、完全にこれで説明できるようではなかった。この例外についてはより詳細な検討が必要であるが、中和抗体から完全に逃避できる、あるいは中和抗体の効果を減弱

することのできる麻疹ウイルスができる可能性はかなり低いことが示唆された。

複数の動物種 SLAM とイヌジステンパーウイルス(CDV) のH 蛋白質の相互作用解析から、MV と CDV との交差反応性について考察できる段階にきた。麻疹ウイルス H 蛋白質が他の宿主由来の SLAM に結合する能力を持つことに対して、イヌジステンパーウイルス H 蛋白質はサル SLAM には結合しなかった。現時点ではサルでの大流行が起きた CDV についての情報は十分ではなく、これらの結果を受けて考える必要がある。さらに、MV-H 蛋白質と CDV-H との構造の類似性と差異とを組み合わせる分子メカニズムを正確に理解する方向に進める必要がある。

## E. 結論

(1)麻疹ウイルス受容体結合 H 蛋白質に対する複数種の中和抗体について、H 蛋白質に対する結合能を評価した。

(2) イヌジステンパーウイルス受容体結合 H 蛋白質と複数の動物種の SLAM との結合を評価した。その結果、感染宿主拡大の可能性はあるものの、麻疹ウイルスの方が広い宿主に感染する能力を有することがわかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

1.

Molecular basis for herpesvirus entry mediator recognition by the human

immune inhibitory receptor CD160 and its relationship to the cosignaling molecules BTLA and LIGHT.

Kojima R, Kajikawa M, Shiroishi M, Kuroki K, Maenaka K.

J Mol Biol. 2011 Nov 4;413(4):762-72.

2.

Crystallization Strategy for the Glycoprotein-receptor Complex Between Measles Virus Hemagglutinin and its Cellular Receptor SLAM.

Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y.

Protein Pept Lett. 2011 in press.

3.

Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHC I) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells.

Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T.

J Biol Chem. 2011 Jul 22;286(29):25739-47.

4.

Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKRP1A/KLRB1).

Kamishikiryo J, Fukuhara H, Okabe Y, Kuroki K, Maenaka K.

J Biol Chem. 2011 Jul 8;286(27):23823-30.

パク質と受容体 SLAM との分子認識、日本分子生物学会年会、横浜 2011.12

A fluorescent single domain antibody against plumbagin expressed in silkworm larvae for fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA).

Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Sasaki-Tabata K, Putalun W, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S.

Analyst. 2011 May 21;136(10):2056-63.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他

#### 2. 学会発表

1. 前仲勝実 表面タンパク質の不安定な複合体の分子解析、日本蛋白質科学会・ワークショップ、招待講演 大阪 2011.6
2. Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Sako M, Kajikawa M, Ito Y, Fukuhara H, Kuroki K, Maita N, Kamishikiryo J, Yanagi Y, Maenaka K. **Structural basis for receptor recognition and entry of measles virus**、MEASLES VIRUS MINI-SYMPOSIUM 口頭発表 Rochester 米国 2011.7
3. 尾瀬農之・橋口隆生・久保田万理恵・真板宣夫・柳雄介・前仲勝実 麻疹ウイルス H 蛋白質と受容体の複合体構造 日本結晶学会年会 ポスター発表 札幌 2011.11
4. 伊藤由梨・福原秀雄・酒匂幸・橋口隆生・梶川瑞穂・竹田誠・柳雄介・尾瀬農之・前仲勝実 CDV-H の結晶構造解析と機能解析 日本結晶学会年会 2011.11
5. 伊藤由梨・福原秀雄・酒匂幸・橋口隆生・梶川瑞穂・竹田誠・柳雄介・尾瀬農之・前仲勝実 犬ジステンパーウイルス H タン

### III. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号頁	出版年
青木洋子, 池田辰也, 安孫子千恵子, 水田克己	麻疹を疑う患者検体から検出された風疹ウイルス(輸入事例)	山形県衛生研究所所報	44: 6-8	2011
庵原俊昭	ウイルス感染症と疫学・臨床像::麻疹	小児科臨床ピクシス	25: 76-81	2011
庵原俊昭	成人の麻疹対策	感染炎症免疫	41: 143-145	2011
庵原俊昭	麻疹、風疹、水痘、ムンプスの患者に接触したときの感染予防措置はどうすればよいですか	小児内科	43: s559-601	2011
岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、小渕正次、木村博一、滝澤剛則	輸送培地中の麻疹ウイルスへの凍結融解及び保存温度の影響	富山県衛生研究所年報	34:88-93	2011
小川知子 堀田千恵美 小倉 惇 福嶋得忍、平野憲朗、小山早苗、駒瀬勝啓、中山哲夫、和山行正	MR ワクチン接種後、約4カ月を経て麻疹ワクチン株遺伝子が検出された症例—千葉県	病原微生物検出情報	32:299-300	2011
加瀬哲男	VPD(vaccine preventable diseases)のサーベイランス	総合臨牀	61(11):2198-2203	2011
倉田貴子、井澤恭子、西村公志、加瀬哲男、高橋和郎、大平文人、松井陽子、梯和代、熊井優子、久保英幸、改田厚、後藤薫、長谷篤、内野清子、三好龍也、田中智之、森嘉生、大槻紀之、坂田真史、駒瀬勝啓、竹田誠	大阪府内における2011年の風疹患者発生状況	病原微生物検出情報	32:255-257	2011
駒瀬勝啓、竹田誠	ヨーロッパの麻疹の状況と今後の日本の課題	病原微生物検出情報	33(2):29-30	2012
駒瀬勝啓	麻疹排除の進捗と麻疹輸入例の増加 -麻疹排除に向けた今後の課題-	小児科	53(1): 105-112	2012
駒瀬勝啓	麻疹検査診断法とその問題点	小児科	52(9): 1273-1280	2011
三好正浩, 駒込理佳, 長野秀樹, 高橋健一, 岡野素彦 (他9名)	北海道内の事業所で発生した風疹の集団感染事例	病原微生物検出情報	31(9):5-6	2011
竹田誠、駒瀬勝啓	社会情勢の中で変わりゆく麻疹という感染症	BIO Clinica	26:1198-1202	2011

竹田誠、駒瀬勝啓、森嘉生	世界麻疹排除計画の現状と世界麻疹風疹実験室ネットワークの役割	病原微生物検出情報	32(2):3-4	2011
多屋馨子、佐藤弘、新井智、北本理恵、岡部信彦、森嘉生、竹田誠	2010年度感染症流行予測調査事業風疹感受性調査担当 2010年度風疹血清疫学調査ならびに予防接種率調査-2010年度感染症流行予測調査中間報告(2010年8月現在速報)	病原微生物検出情報	32(9):14-17	2011
皆川洋子	2012年麻疹排除に向かつて—現状と未来—	愛知県小児科医会会報	94:3-11	2011
安井善宏、伊藤雅、安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子、高木崇光、池田晃一、多和田光紀、加藤勝子、竹内清美	<速報> 渡航歴の無い小児および家族内感染者からの D8 型麻疹ウイルス検出—愛知県	病原微生物検出情報		2012
森嘉生、大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史、駒瀬勝啓、竹田誠	風疹ウイルスの遺伝子解析	病原微生物検出情報	32(9):11-13	2011
Abernathy ES, Hübschen JM, Muller CP, Jin L, Brown D, Komase K, Mori Y, Xu W, Zhu Z, Siqueira MM, Shulga S, Tikhonova N, Pattamadilok S, Incomserb P, Smit SB, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Lim WW, Woo GK, Triki H, Jee Y, Mulders MN, de Filippis AM, Ahmed H, Ramamurty N, Featherstone D, Icenogle JP.	Status of global virologic surveillance for rubella viruses.	J Infect Dis.	204:S524-532	2011
Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota PA.	Genetic characterization of measles vaccine strains.	J Infect Dis.	204:S533-548	2011
Featherstone DA, Rota PA, Icenogle J, Mulders MN, Jee Y, Ahmed H, de Filippis AM, Ramamurty N, Gavrilin E, Byabamazima C, Dosseh A, Xu W, Komase K, Tashiro M, Brown D, Bellini WJ,	Expansion of the global measles and rubella laboratory network 2005-09.	J Infect Dis.	204:S491-498	2011



Strebel P.				
Hashiguchi T, Maenaka K, Yanagi Y.	Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine.	Front Microbiol.	2:247	2011
Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y.	Crystallization Strategy for the Glycoprotein-receptor Complex Between Measles Virus Hemagglutinin and its Cellular Receptor SLAM.	Protein Pept Lett.		2011
Kamishikiryo J, Fukuhara H, Okabe Y, Kuroki K, Maenaka K.	Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKR1A/KLRB1).	J Biol Chem.	286:2382-30	2011
Kojima R, Kajikawa M, Shiroishi M, Kuroki K, Maenaka K.	Molecular basis for herpesvirus entry mediator recognition by the human immune inhibitory receptor CD160 and its relationship to the cosignaling molecules BTLA and LIGHT.	J Mol Biol.	413:762-72	2011
Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y.	Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 beta secretion.	J Virol.	85:13019-26	2011
Komune N, Ohashi M, Matsumoto N, Kimitsuki T, Komune S, Yanagi Y.	No evidence for an association between persistent measles virus infection and otosclerosis among patients with otosclerosis in Japan.	J Clin Microbiol.		(in press)
Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T.	Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHCI) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells.	J Biol Chem.	286:2573-47	2011
Nagano H, Jinushi M, Komagome R, Miyoshi M, Kikuchi M, Muratsubaki E, Ito H, Inoue M, Okano M.	Progress towards Measles Elimination between 2008 and 2010 in Hokkaido District, Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	64(5):445-447	2011
Miyoshi M, Yoshizumi S, Ishida S, Komagome R, Nagano H, Kudo S, Okano M.	Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens.	J. Virol. Methods	179:256-260	2012
Miyoshi M, Komagome R, Nagano H, (他 12 名), Okano M.	An isolated incidence of rubella outbreak at a workplace in Hokkaido	Jpn. J. Infect. Dis.	65(1):94-97	2012
Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S,	Global distribution of measles genotypes and measles molecular	J Infect Dis.	204:S514-523	2011

Shulga S, Muller CP, Hübschen JM, Siqueira M, Beirnes J, Ahmed H, Triki H, Al-Busaidy S, Dosseh A, Byabamazima C, Smit S, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Bukenya H, Wairagkar N, Ramamurty N, Incomserb P, Pattamadilok S, Jee Y, Lim W, Xu W, Komase K, Takeda M, Tran T, Castillo-Solorzano C, Chenoweth P, Brown D, Mulders MN, Bellini WJ, Featherstone D.	epidemiology.			
Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Sasaki-Tabata K, Putalun W, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S.	A fluorescent single domain antibody against plumbagin expressed in silkworm larvae for fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA).	Analyst.	136(10):2 056-63	2011
Tanaka T, Yokoi H, Kobayashi K, Iwanade H, Noguchi Y, Mitsui Y, Okamoto A, Saitoh M, Noda M, Takeda M, Okabe N, Kimura H	First detection of measles virus genotype G3 in a Japanese woman: an imported case.	Jpn J Infect Dis	64:262-2 63	2011

