

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

呼吸器ウイルスに対する生体防御に関する研究

研究代表者 木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター

研究分担者 岡山吉道 日本大学医学部生体機能医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野
(平成 24 年度)

研究協力者 岡山吉道 日本大学医学部生体機能医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野
(平成 23 年度)

研究要旨

呼吸器合胞体ウイルス(RSV)とライノウイルス(HRV)は気管支喘息の増悪と発症に深く関わっていることが分っているが、その詳細な機序は不明である。今回の我々の研究では、ヒトマスト細胞に RSV は、感染しないことがわかった。また、RSV および HRV がヒトマスト細胞を直接活性化することはなく、IgE 依存性の脱顆粒を増強しなかった。さらに RSV をヒト気管支上皮細胞に感染させ、感染したヒト気管支上皮細胞を介してヒトマスト細胞を活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかを検討したが、ヒト気管支上皮細胞は脱顆粒に何ら影響を及ぼさなかった。しかしながら、HRV 感染によってヒト気管支上皮細胞から産生される thymic stromal lymphopoietin (TSLP)をヒトマスト細胞に 5 日間添加するとマスト細胞の FcεRIβの発現が増強された。したがって TSLP に長期にマスト細胞が暴露されるとアレルギーによる FcεRI を介したマスト細胞の活性化が増強されることが示唆された。生まれて初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供では、86%の症例が RSV あるいは/および HRV に感染していた。喘鳴を繰り返した症例にトリプターゼ濃度が高い傾向があった。ウイルス感染と感作が同時に起こることが喘息の発症に極めて重要であることが示唆された。

A. 研究目的

第一の目的は呼吸器合胞体ウイルス(RSV)とライノウイルス(HRV)によるヒトマスト細胞活性化機構の解明である。ヒトマスト細胞に RSV と HRV が直接感染する、あるいは付着することにより脱顆粒がおこるのか、IgE 依存性の脱顆粒を増強するのか、マスト細胞周囲の組織に存在する細胞に RSV と HRV が感染するこ

とにより産生されるメディエーターが影響するのかその機序を解明する。第二の目的は、我々が最近、RSV 感染後に初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供の喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が存在することを見出したことから、これらトリプターゼ濃度が高い症例が喘息へ移行するのかを 3 年追跡調査をすることである。

B. 研究方法

1. RSV と HRV によるヒトマスト細胞活性化機構の解明

1) ヒトマスト細胞に RSV と HRV が直接感染するかあるいは付着するかをマスト細胞にウイルスを添加し real time RT-PCR 法でウイルス RNA の増幅、ウイルス蛋白の存在を免疫染色法にて調べる。ヒトマスト細胞は、末梢血由来培養マスト細胞 (12-15 週培養)、あるいは臍帯血由来培養マスト細胞 (12-15 週培養)を用いる[1]。RSV は long strain (ATCC・Number: VR-26TM)、HRV は strain HGP (ATCC・Number: VR-482TM) および strain 1059 (ATCC・Number: VR-284TM)を用いる。RSV 抗体は FITC 標識モノクローナル RSV 抗体 (IMAGENTM)を使用する。RSV RNA の定量解析は RSV F (fusion) 蛋白に対するプライマーを設計 (F;5'-GCCAGAAGAGAACTACCAAGGTTTAT-3', R; 5'-CTGGCGATTGCAGATCCAA-3', probe; 5'-ACCAAAAAACCAATGTAAC-3')し、ABI7000 システムにより解析する。

2) RSV あるいは HRV がヒトマスト細胞を直接活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかをウイルス添加による脱顆粒の程度をヒスタミン遊離量を指標に調べる。その分子機構を調べる。

3) RSV あるいは HRV 感染したヒト正常気道上皮細胞 (NHBE)のマスト細胞への影響を共培養の系と NHBE の細胞上清を用いる系を用いて検討する。

2. RSV あるいは HRV 感染後に初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供の喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が喘息へ移行するのかを 3 年追跡調査する。

C. 研究結果

1. RSV および HRV によるヒトマスト細胞活性化機構の解明 (マスト細胞、ウイルス実験)

1) ヒトマスト細胞に RSV が直接感染するかをマスト細胞に RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) を添加し 24, 48, 72, および 96 時間後に real time RT-PCR 法でウイルス RNA の増幅、ウイルス蛋白の存在を免疫染色法にて調べたが、全く感染は認められなかった。Positive control としては Hep-2 細胞を用いた。

2) RSV がヒトマスト細胞を直接活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかを調べた。RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) をヒトマスト細胞に添加 3, 5, および 48 時間後のヒスタミン遊離量を調べたところ、RSV はヒトマスト細胞を直接活性化しなかった。RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) および IgE をヒトマスト細胞に添加 3, 5, および 48 時間後に anti-IgE を添加し、脱顆粒を検討したが、IgE 依存性の脱顆粒を RSV 添加は増強しなかった。

3) RSV をヒト気管支上皮細胞に感染させ、感染したヒト気管支上皮細胞を介してヒトマスト細胞を活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかを調べた。まず、RSV (MOI = 0.1)をヒト気管支上皮細胞に添加 3 時間後、IgE で感染したヒトマスト細胞と 48 時間共培養し、マスト細胞を回収して anti-IgE で刺激し、ヒスタミン遊離量を調べた。ヒト気管支上皮細胞は何ら脱顆粒に影響を及ぼさなかった。

4) HRV がヒトマスト細胞を直接活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかを調べた。HRV (MOI = 0.1, 1, および 10) はヒトマスト細胞を直接活性化しなかった。また、IgE 依存性の脱顆粒をウイルス添加は増強しなかった。

2. thymic stromal lymphopoietin (TSLP)によるヒトのマスト細胞の FcεRIβ鎖発現への影響

喘息患者の気道上皮細胞は HRV 感染によって産生されるインターフェロン (IFN) -βが健常者と比較して低下していること、また喘息患者の気道肺胞洗浄液中の細胞に HRV を感染させた際に産生される IFN-λ(IFN III 型)が健常者と比較して低下していることが報告されている[2-4]。これら抗ウイルス作用をもつサイトカインの産生低下は HRV の複製を促進し、感染の遷延化をおこすとされる。RV 感染によってヒト気管支上皮細胞から TSLP が産生されると報告され、感染の遷延化では、TSLP の長期産生が想定される[5]。一方、我々は、アレルギー性結膜炎と疾患コントロール患者の眼瞼結膜の FcεRIβ鎖の発現を免疫組織化学染色にて調べたところ、アレルギー患者ではマスト細胞数が有意に増加しているのみならず、FcεRIβ鎖の発現が有意に増加していた[6]。shRNA の技術を用いてヒトマスト細胞の FcεRIβ鎖の発現を抑制したところ IgE 依存性の活性化は有意に抑制され、FcεRI の架橋後の Lyn の細胞内局在が変化していた。したがって FcεRIβ鎖は IgE 依存性の活性化の増幅因子となることが明らかとなった[7]。そこで、TSLP がヒトのマスト細胞の FcεRIβ鎖発現を増強するかどうかを調べた。TSLP をマスト細胞に添加し、5 日間で FcεRIβ鎖 mRNA とタンパクの発現が増強された。

3. 生まれて初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供の喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が喘息へ移行するのかを 3 年追跡調査を開始した。(臨床研究)

菅井和子博士との共同研究で生まれて初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供の喀痰あるいは鼻汁を現在 133 例集めたので、随時、喀痰あるいは鼻汁中のウイルス RNA の検出、トリプタ

ーゼ、IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN-γ, IL-29 (IFN-λ), VEGF, PDGF, G-CSF, GM-CSF, FGF, TNF-α, TGF-β, eotaxin, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, IP-10 測定を行った。測定の終わった 55 例では、RSV 単独感染、RSV+HRV 複合感染、HRV 単独感染を合わせると 86%に達した。喀痰の細胞分画結果では、好酸球数の増加を認めた。現時点では喘鳴を繰り返した症例にトリプターゼ濃度が高い傾向はあるものの、有意な差はなかった。2 回目の喘鳴が出現した症例と喘鳴が出現していない症例の喀痰中サイトカイン濃度に関して、喘息の家族歴のある群とない群に分け、有意差検定をしたところ喘息の家族歴のない群においては、2 回目の喘鳴が出現した症例で喀痰中 RANTES と TGF-βが有意に高いことが分かった。今後症例数をさらに増やし統計処理を行う。

D. 考察

RSV や HRV が直接ヒトマスト細胞セルラインを活性化させ、脱顆粒を起こすという報告があるが[8, 9]、我々の研究結果では、ヒトマスト細胞では再現性は取れなかった。RSV が気道上皮細胞に感染すると、様々なサイトカインが気道上皮細胞から産生されるが、直接、脱顆粒を惹起することはできなかった。HRV 感染によってヒト気管支上皮細胞から産生される TSLP をヒトマスト細胞に 5 日間添加するとマスト細胞の FcεRIβ鎖の発現が増強された。したがって TSLP に長期にマスト細胞が暴露されるとアレルギーによる FcεRI を介したマスト細胞の活性化が増強されることが示唆された。生まれて初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供では、86%の症例が RSV あるいは/および HRV に感染していた。喘鳴を繰り返した症例において喀痰中トリプターゼ濃度が高い傾向があったので、今後症例数をさらに増やし統計処理を行う予定であ

る。

E. 結論

RSV と HRV は気管支喘息の増悪と発症に深く関わっていることが分っているが、これらウイルスは直接マスト細胞を刺激して脱顆粒を起こさせることはなかった。RSV や HRV の感染によって産生される気道上皮細胞からのサイトカインはマスト細胞の機能を制御する可能性がある。生まれて初めて喘鳴を起こした3歳未満の子供では、86%の症例が RSV あるいは/および HRV に感染しており、喘鳴を繰り返した症例において喀痰中トリプターゼ濃度が高い傾向があったことより、ウイルス感染と感作が同時に起こることが喘息の発症に極めて重要であることが示唆された。

F. 参考文献

1. Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y: Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 2006; 1: 2178-2183.
2. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PA, Bartlett NW, Kebabze T, Mallia P, Stanciu LA, Parker HL, Slater L, Lewis-Antes A, Kon OM, Holgate ST, Davies DE, Kotenko SV, Papi A, Johnston SL: Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* 2006; 12: 1023-1026.
3. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE: Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; 201: 937-947.
4. Bullens DM, Decraene A, Dilissen E, Meyts I, De Boeck K, Dupont LJ, Ceuppens JL: Type III

IFN-lambda mRNA expression in sputum of adult and school-aged asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1459-1467.

5. Kato A, Favoreto S, Jr., Avila PC, Schleimer RP: TLR3- and Th2 Cytokine-Dependent Production of Thymic Stromal Lymphopietin in Human Airway Epithelial Cells. *J Immunol* 2007; 179: 1080-1087.
6. Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Walls AF, Ra C, Hopkin JM, Kinoshita S: Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-beta chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2871-2877.
7. Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C: The interaction between Lyn and FcepsilonRIbeta is indispensable for FcepsilonRI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 2012; 67(10):1241-1249.
8. Hosoda M, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N, Kamanaka M, Sekizawa K, Butterfield JH, Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H: Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J Immunol* 2002; 169: 1482-1491.
9. Shirato K, Taguchi F: Mast cell degranulation is induced by A549 airway epithelial cell infected with respiratory syncytial virus. *Virology* 2009; 386: 88-93.

研究発表

1. 論文発表

- 1 Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of FcεRI-mediated

- responsiveness of immature human mast cells by IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 108(3): 188-194.
- 2 Kashiwakura J, Okayama Y, Furue M, Kabashima K, Shimada S, Ra C, Shiraganian RP, Kawakami Y, Kawakami T. Most highly cytokinergic IgEs have polyreactivity to autoantigens. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 2012; 4(6):332-340.
 - 3 Okayama Y, Kashiwakura J, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and FcεRIβ is indispensable for FcεRI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 2012; 67(10): 1241-1249.
 - 4 Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum* 2013; 65 (1):109-119.
 - 5 Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Okabe-Kado J, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signaling pathways, and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. *Cell Biology International* 2013 In press.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究年度終了報告書

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

～新規ワクチン開発と感染細胞モデル系の構築

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学

研究協力者 川上志保 横浜市立大学医学部微生物学

研究要旨

ヒトパラインフルエンザウイルス3型(parainfluenza virus type 3, hPIV3)は小児や乳幼児の急性呼吸器感染症の主要な原因ウイルスであり、感染喘息の原因因子となることが知られている。しかしながら、hPIV3 感染症に対する有効な感染阻止法や治療法は確立されていない。我々は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた hPIV3 外被タンパク質 hemagglutinin-neuraminidase (PIV3-HN) を合成し、マンノース被覆リポソームと組み合わせた新しいワクチンの開発を行った。また、HN 全長タンパク質を抗原としたモノクローナル抗体を新たに作製した。本年度は昨年を引き続き、新規ワクチンの評価およびモノクローナル抗体の特性確認を実施した。

A. 研究目的

ヒトパラインフルエンザウイルス(hPIV)は、パラミクソウイルス科、パラミクソ亜科に属する一本鎖負センス RNA ウイルスである。hPIV は 1950 年代後半に発見されたウイルスであり、1、2、3、4A、4B 型の 4 つの異なるタイプが同定されている。そのうち 3 型(hPIV3)は 83%の小児が 1-2 歳までに感染し、その感染が下気道まで至る場合は気管支炎、細気管支炎、肺炎を起こすことが知られており、2009 年 1 月～2012 年 7 月までに小児の呼吸器系疾患患者から採取した咽頭ぬぐい液、気管吸引液等 503 検体中 24 例 (4%) から PIV3 が分離・検出されている。現在までに不活化ワクチン、キメラウイルスワクチン、弱毒生ワクチン等の様々な開発が行われているが、防御的な免疫応答が得られないか、または安全性に懸念があり頻繁な有害事象が問題となっており、実用化に至るような成果は得られていない。

今回、我々は、昨年度を引き続き PIV-3 ワクチン開発に向け、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたりコンビナントウイルス外被タンパク質

(PIV-3-HN) の大量精製を行い、それをマンノース被覆リポソームに封入することで、新規ワクチン抗原・アジュバント複合体ワクチン開発を行う。また、DNA ワクチンを開発する目的で、哺乳動物コドン最適化 PIV-3-HN 発現ベクターの構築を行った。また、hPIV3 の感染を阻止する中和抗体を作製することを目的とし、ウイルス膜上に存在するスパイクタンパク質である hemagglutinin-neuraminidase (HN)の全長タンパク質を抗原としたモノクローナル抗体の作製を試みた。さらには、ウイルス感染に感受性を有する不死化ヒト細胞にレポーター遺伝子を導入することで簡易にウイルス感染を定量・モニタリングできる細胞系を構築する。

B. 研究方法

1. コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた PIV-3-HN 合成

コムギ無細胞系発現ベクター pEU-E01-GST-PIV3HN および pEU-E01-His-PIV3HN を構築し、コムギ無細胞タンパク質合成

系を用い、PIV-3-HN タンパク質全長タンパク質の合成を行った。精製はグルタチオンセファロースビーズまたはニッケルアガロースビーズによるカラム法を用いた。GST-PIV3HN 間の切断は TEV プロテアーゼを用いて行った。

2. ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 細胞不死化およびレポーター細胞の構築

正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクターとして pLenti6_TERT, pLenti6_HPV16-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したベクターを用い、MRC-5/TERT 細胞に不死化誘導因子を導入した。次にこれらの細胞株に pNifty-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP 遺伝子または pIRES-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-GFP 遺伝子を導入し、抗生物質である Zeocin または Puromycin を用いて安定発現系細胞株を樹立した。

C. 研究結果

1. マンノース被覆リポソーム型を hPIV3 ワクチンの開発

昨年度より引き続き、新規 hPIV3 経鼻ワクチンの開発のための基盤研究を実施した。本法は、樹上細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に直接的かつ効率的に抗原を運ぶことが可能であり、従来と比較して少量の抗原タンパク質で免疫誘導が可能である。我々はマンノース被覆リポソーム (Mannose coated liposome: MCL) を用いたワクチンデバイスを開発するため、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した hPIV3-HN 全長タンパクを MCL 内に封入した。タンパク質封入後の HN-MCL を 1 μ m フィルターに通過させ、タンパク凝集物を除去した。続いて、リポソーム内に封入されているタンパク質の定量を行ったところ、1 mg chol.あたりの HN タンパク封入量が 32 μ g にまで増加した。これらの HN-MCL を 5 μ g タンパク/15 μ L (マウス 1 匹分) になるよう調製し、polyIC アジュバント存在下または非存在下にて Balb/C マウスに経鼻投与した。また、コントロールとして、polyIC のみおよび MCL のみの

投与も行った。結果として、HN-MCL と polyIC と共投与した群では、抗原特異的な血中 IgG および鼻洗浄液中の IgA 抗体が認められた。しかしながら、他の群では顕著な特異的抗体の誘導は認められなかった。また、HN-MCL+polyIC 群で誘導された血中 IgG の hPIV3 感染中和活性を測定したところ、3 匹中 1 匹のマウス血清において有意な中和活性が認められた。今後は、抗原量や投与方法を最適化することで、より効果的なプロトコルを作製する予定である。

2. PIV3 外被タンパク質 HN を標的としたモノクローナル抗体の開発

PIV3 感染症を阻止できるモノクローナル抗体を作製するため、コムギ無細胞系を用いて作製した PIV3-HN 全長タンパク質を BALB/c マウスにアジュバントとともに足底に免疫し、4 週間後に脾細胞を分離し、マウスミエローマー細胞を用いたハイブリドーマを作製した。これらのうち、HN に特異的なクローンが、48 種類樹立出来た。このうち、ELISA にて活性の高い 13 種類のハイブリドーマ上清がウェスタンブロット解析に使用できるか否かについて検討した。方法として、まず、抗原に用いたリコンビナント hPIV3-HN タンパク質を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果 13 種類のハイブリドーマ上清全てがリコンビナント hPIV3-HN タンパク質を認識できることが確認された。次に hPIV3 感染あるいは非感染 HeLa 細胞の細胞可溶化液を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、13 種類のハイブリドーマ上清全てが hPIV3 感染 HeLa 細胞中の HN を認識できることが確認された。続いて、13 種類のハイブリドーマ上清が免疫染色に使用できるか否かについて検討した。方法として、HeLa 細胞を hPIV3 感染させ HN の細胞内局在を観察した。その結果、13 種類のうち 5 種類の抗体が、hPIV3 感染 HeLa 細胞の細胞質中に HN が顆粒状に分布していることを確認することができた。また、代表的な 2 種類のモノクローナル抗体について中和活性を調べたが、ともに感染を阻止する

ことは出来なかった。今後は各抗体の認識エピトープを確認するとともに、簡易ウイルス検査キットの作製等に活用する予定である。

3. 呼吸器ウイルス感染感受感受性レポーター細胞の構築と阻害剤スクリーニング

ヒト胎児肺由来線維芽細胞 MRC-5 細胞に hTERT および p16INK4 に対する shRNA を定常的に導入し、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも 120 回以上の継代が可能な不死化 MRC-5/hTERT_shp16 細胞を樹立した。また、これらの細胞株にウイルス感染時に上清中に分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を分泌するレポーター遺伝子 pIRES-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP を導入し、ウイルス感染を定量的に検出できる細胞系を構築した。本細胞は TNF α や LPS 刺激においても細胞上清中に SEAP を分泌することから、ウイルス感染にともなう pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を検出する新たなアッセイ系としても活用可能である。我々は本レポーター細胞を用いていくつかの天然化合物の抗ウイルス活性を確認している。今後はさらに大規模な阻害剤のアッセイを実施することで新たな抗ウイルス薬の開発に結びつくことが期待される。

D. 考察

今回我々は、hPIV3-HN に対するモノクローナル抗体を作製した。コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した全長 HN タンパク質をマウスに免疫し、ハイブリドーマを 13 種類樹立することができた。まず、ウェスタンブロット解析にて、13 種類の抗体全てがリコンビナント HN および hPIV3 感染 HeLa 細胞内の HN を認識することを確認した。一方、13 種類の中でウェスタンブロット解析のみに使用できる抗体と、ウェスタンブロット解析と免疫染色両方に使用できる抗体が存在したが、この違いの原因として抗体の抗原認識部位が異なる可能性があることが考えられた。また、作製したマウス抗 HN モノクローナル抗体に

は確認した限りにおいて hPIV3 に対する中和活性が認められなかった。中和活性が得られなかった原因としてまず hPIV3-HN 抗原合成後の精製時に尿素で可溶化したため、HN タンパク質が変性しその構造を保持できなかったことが考えられる。次に、糖修飾された抗原を免疫すると hPIV3 感染を防御できたという報告があることから、本研究で用いた HN 抗原が糖修飾されていないことが原因と考えられる。以上より hPIV3 に対して中和活性をもつ抗体を作製するためには二次構造を維持し、かつ糖修飾されている抗原を用いることが重要であると考えられる。今後は今回作製したモノクローナル抗体の抗原エピトープを決定するとともに、本抗体を用いた HN 結合タンパク質の探索やプロテオミクス解析を実施する予定である。

E. 結論

本研究課題では、最先端のタンパク質合成技術を駆使して、hPIV3 に対するモノクローナル抗体を新たに作製した。また、糖鎖被覆リポソームを活用した新規ワクチンの開発を目指した研究を実施した。本研究成果はヒト呼吸器感染症の新たな予防法や診断法の開発に役立つものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*. 2013.
- 2) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein

Vpu. *Sci Signal*. 245(5): ra73, 2012.

3) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics*. 75(15): 4863-73, 2012.

2. 学会発表等

(1) 鈴木智恵、川上志保、松永智子、松尾 泉、梁明秀：ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (hPIV3-HN) 全長タンパク質を抗原としたモノク

ローナル抗体作製の試み. 日本プロテオーム学会 2012 年大会. 2012 年 7 月 26-27 日 (木-金)、東京.

(2) 泉地 恭輔、松永 智子、松尾 泉、梁 明秀：パラインフルエンザウイルス 3 型全長 HN タンパク質を封入した新規経鼻投与型 OML ワクチンの開発. 日本プロテオーム学会 2012 年大会. 2012 年 7 月 26-27 日 (木-金)、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections based on virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 2) Kiyota N, Kushibuchi I, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Nishimura K, Hirata-Saito A, Harada S, Arakawa M, Kozawa K, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C detected from the patients with acute respiratory infection in Japan. *J Med Microbiol.* In press.
- 3) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signaling pathways, and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* in press.
- 4) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene* 2013 : 1-10.
- 5) Abiko C, Mizuta K, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Noda M, Kimura H, Ahiko T. An outbreak of parainfluenza virus type 4 infections among children with acute respiratory infections, in the 2011-12 winter season in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 6) Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogasawara Y, Nishina A, Shimoda M, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan. *J Clin Microbiol.* 51(1):328-330, 2013.
- 7) Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tanaka R, Tsukagoshi H, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 66(1): 56-59, 2013.
- 8) Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. Seroepidemiology of scaffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 in Japan. *J Infect.* 66(2):191-193, 2013.
- 9) Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. *PLOS ONE.* 7(11):e50660, 2012.
- 10) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemiology of parainfluenza virus types 1, 2 and 3 infections based on virus isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. *Microbiol Immunol.* 56(12):855-858, 2012.
- 11) Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Noda M, Kimura H, Mizutani T, Kato T, Kawanami T, Ahiko T. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. *Emerg Infect Dis.* 18(11):1787-1793, 2012.
- 12) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-Induced SCYL2 Limits Release of HIV-1 by Triggering PP2A-Mediated Dephosphorylation of the Viral Protein Vpu. *Sci Signal.* 5(245):ra73, 2012.

- 13) Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M. Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated with fatal infection cases in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave. *Jpn J Infect Dis.* 65(4):363-367, 2012.
- 14) Nidaira M, Taira K, Hamabata H, Kawaki T, Gushi K, Mahoe Y, Maeshiro N, Azama Y, Okano S, Kyan H, Kudaka J, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus (HMPV) from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 65(4):337-340, 2012.
- 15) Kato M, Ishioka T, Kita H, Kozawa K, Hayashi Y, Kimura H. Eosinophil granular proteins damage bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol.* 158(1):11-18, 2012.
- 16) Kon M, Watanabe K, Tazawa T, Watanabe K, Tamura T, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H, Mizuta K. Detection of human coronavirus NL63 and OC43 from children with acute respiratory infections in Niigata, Japan, between 2010 and 2011. *Jpn J Infect Dis.* 65(3):270-272, 2012.
- 17) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *J Med Microbiol.* 61:820-829, 2012.
- 18) Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Fuji N, Imamura T, Oshitani H, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol Immunol.* 56(2):139-143, 2012.
- 19) Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 61(Pt 3):410-419, 2012.
- 20) Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M. Canine Distemper Virus with the Intact C Protein Has the Potential to Replicate in Human Epithelial Cells by Using Human Nectin4 as a Receptor. *Virology.* (in press)
- 21) Pratakipiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. (2012) Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in the neurovirulence. *J Virol.* 86. 10207-10.
- 22) Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol.* 2012 Jun; 86(12):6537-45.
- 23) Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of FcεRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol* 108(3): 188-194, 2012.
- 24) Kashiwakura J, Okayama Y, Furue M, Kabashima K, Shimada S, Ra C, Shiraganian RP, Kawakami Y, Kawakami T. Most highly cytokinergic IgEs have polyreactivity to autoantigens. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 4(6):332-340, 2012.

- 25) Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum* Oct 10. doi: 10.1002/art.37741, 2012
- 26) Okayama Y, Kashiwakura J, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and FcεRIβ is indispensable for FcεRI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 67(10):1241-9, 2012.
- 27) Ohtsubo-Yoshioka M, Nunomura S, Kataoka TR, Okayama Y, Ra C. Fc receptor beta chain deficiency exacerbates murine arthritis in the anti-type II collagen antibody-induced experimental model. *Mod Rheumatol* Oct 6. [Epub ahead of print] 2012.
- 28) Kataoka TR, Fujimoto M, Moriyoshi K, Koyanagi I, Ueshima C, Kono F, Tsuruyama T, Okayama Y, Ra C, Haga H. PD-1 regulates the growth of human mastocytosis cells. *Allergol Int* in press.
- 29) Ra C, Nunomura S, Okayama Y: Fine-tuning of mast cell activation by FcεRIβ chain. *Frontiers Immunol* doi: 10:3389/fimmu.2012.00112
- 30) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics*. 2012 Aug 3;75(3):4863-73.
- 31) 松田俊二, 小村珠喜, 塚越博之, 野田雅博, 木村博一. 重症心身障害児(者)病棟におけるヒトメタニューモウイルス感染症の流行. *感染症学雑誌*. 86(2):109-114, 2012.
- 32) 松田俊二, 小村珠喜, 塚越博之, 野田雅博, 木村博一: 重症心身障害児(者)病棟におけるヒトメタニューモウイルス感染症の流行. *感染症学雑誌*, 86(2), 109-114, 2012
- 33) 水田克巳: 呼吸器感染症の病原診断、エンテロウイルス・ライノウイルス. *臨床とウイルス* 40, 134-141, 2012
- 34) 横井一, 田中俊光, 水村綾乃, 北橋智子: Real-time RT-PCR 法による RS ウイルス遺伝子の検出とサブグループ型別. *感染症学雑誌*, 86(5), 569-576, 2012
- 35) 吉岡政純, 石川和弘, 池田雄史, 清水恒広, 野田雅博, 木村博一: 小児における呼吸器感染症から検出されたヒトメタニューモウイルスに関する分子疫学および臨床医学的検討. *感染症学雑誌*, 86, 2012 (印刷中)
- 36) Okayama Y, Matsuda A, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Ohmori K, Gon Y, Asano M, Akihisa T, Terui T, Saito H, Ra C. Distribution and localization of FcεRIβ subunit in human mast cells. In: Marone G, Triggiani M and Genovese A (eds). *Translational Science: from Basic to Clinical Immunology and Allergy*. pp. 105-108. Pacini Editore, Pisa, Italy, 2012.
- 37) 松田俊二, 小村珠喜, 塚越博之, 野田雅博, 木村博一: 重症心身障害児(者)病棟におけるヒト・メタニューモウイルス感染症の流行. *感染症学雑誌*, 86(2), 109-114, 2012
- 38) 木村博一, 塚越博之, 石井晴之, 吉田綾子, 野田雅博, 小澤邦壽. 呼吸器関連ウイルス(RSV)の基礎と分子疫学. *臨床免疫・アレルギー科*, 58(4): 414-418, 2012.
- 39) 木村博一, 梁明秀, 岡山吉道. 急性呼吸器ウイルス感染と喘息. *感染・炎症・免疫*, 42(2)59-63, 2012.
- 40) 岡山吉道, 柏倉淳一, 羅智靖: ヒトマスト細胞のサブセットとその性状. *臨床免疫・アレルギー科* 57(6):597-600, 2012

- 41) 柏倉淳一, 岡山吉道, 羅智靖: 神経ペプチドによるマスト細胞の活性化 臨床免疫・アレルギー科 57(6):634-638, 2012
- 42) 岡山吉道, 柏倉淳一, 大森一光, 羅智靖: アナフィラキシーショックの病態生理 臨床免疫・アレルギー科 58(5): 571-574, 2012.
- 43) 岡山吉道: マスト細胞とアレルギー 日大医学雑誌 71 (3):203-206, 2012.
- 44) 柏倉淳一, 岡山吉道, 羅智靖: ヒトマスト細胞活性化における PAF および神経ペプチドの役割 臨床免疫・アレルギー科 58(5): 565-570, 2012.
- 45) 岡山吉道, 柏倉淳一, 大森一光, 羅智靖: アナフィラキシーショックの病態生理 臨床免疫・アレルギー科 58(5): 571-574, 2012.
- 46) 岡山吉道, 片岡竜貴: Systemic mastocytosis 日本臨床 別冊 2012 in press
- 47) 木村博一, ウイルスと細菌の滅菌・消毒法. 木村博一編集, 食の安全に関する必要知識と実践, 大阪: メディカルレビュー社, 2012:49-57.

