



戦略的創造研究推進事業
研究領域「脳を守る」

研究課題

「ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

研究代表者

長嶋 和郎

北海道大学大学院医学研究科教授

1. 研究実施の概要

本研究は、ウイルスから”脳を守る”ことを主眼とする。ウイルスによる脳の障害は多くの場合致命的であるが、その大きな理由の1つは、脳血管疾患とは異なり、ウイルスによる障害ではその病変が脳の広範囲にわたることである。また、脳血管疾患では画像診断が発達しており、手術による治療も可能であるが、ウイルス性脳障害は有効な治療法がほとんど確立されていない。現在、神経科学の分野で多くの神経細胞特異的な栄養因子、受容体分子、転写因子をコードする遺伝子が単離されてきているが、損傷された複雑な生命現象を制御する中枢神経系を修復する方法は未だ確立されていない。

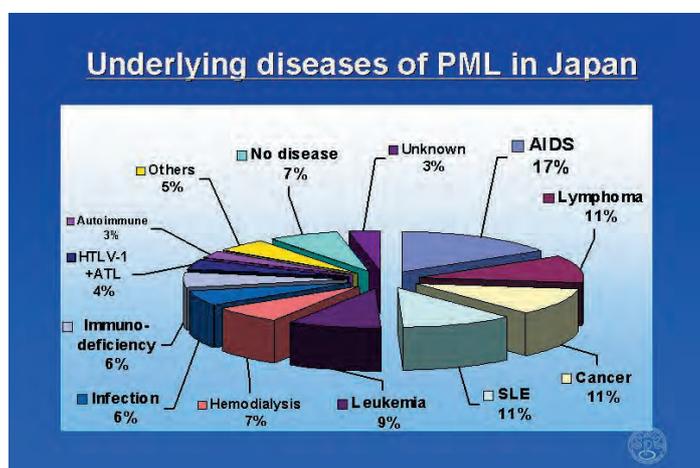
さらに、近年、ウイルス性脳障害は増加している。なぜならば、Human immunodeficiency virus type I (HIV-1)による感染症 (Acquired Immune Deficiency Syndrome)の増加、悪性腫瘍に対する化学療法の発達等による免疫不全状態における日和見感染症としての脳炎・脳症が増加しているためである。また、骨髄、腎臓、肝臓、心臓等の移植治療は日本でも積極的に実施されるようになり、移植後の免疫療法に伴うウイルスによる脳炎・脳症の頻度も増加しており、ウイルスに起因する脳障害を克服することが、ひいては移植医療の正否を決めることになる。

JC virus (JCV) はヒト中枢神経系に特異的に脱髄を起こす疾患である進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) の原因ウイルスである。PML は Åström 等により 1958 年に chronic lymphocytic leukemia (CLL)および Hodgkin's disease に関連した広汎な脳の脱髄病変に対して、名づけられた。PML がウイルス性疾患であるという事実は Zu Rhein および Silverman 等によって 1965 年に電子顕微鏡検索により証明された。1971 年に Padgett 等は PML 患者の脳からウイルスを単離することに成功し、患者の名前にちなんで、JC virus (JCV)と名付けた。

JCV は構造および抗原性の研究により、ポリオーマウイルス属に分類される二重鎖環状 DNA ウイルスである。ポリオーマウイルス属には他にヒトを宿主とする BK ウイルス (BKV)、サルを宿主とする Simian virus 40 (SV40)、mouse polyomavirus 等が属しており、JCV は BKV、SV40 と相同性が高い。

JCV 初感染は幼・少児期に起こり、1982 年の Taguchi 等の報告によると、JCV の有する赤血球凝集能の抑制作用 (HAI: hemagglutination inhibition) を測定することにより個人の血清中の JCV 抗体を測定した結果、成人の抗体保有率は全人口の 70-80% であり、また JCV の抗体保有率は 6 歳までに 50% に達していた。JCV の初感染は無症候性で、その後、腎・尿路系またはリンパ球に潜伏していると考えられているが、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた検索では尿路系、リンパ球等免疫系の組織のみならず肝臓、肺、大腸また PML を発症していない脳からも JCV DNA が検出されていることから、脳以外の諸臓器においても JCV は潜伏しており、免疫不全を契機に活性化して、中枢神経系に特異的に PML を発症する可能性が示唆されている。

我々が 1998 年までに本邦で報告された PML の症例 94 例をまとめた結果、発症年齢は 10 代から 90 代におよび、30-60 代が多く、基礎疾患としては AIDS が 17%、悪性リンパ腫、他の悪性腫瘍、および SLE (systemic lupus erythematosus) が 11% であ



った。また発症報告例数は年を追うに従って増加してきており、今後 AIDS や移植治療に伴う免疫抑制療法の普及とともに増加していくことが予想される (右上図)。

我々は 1981 年に JCV Tokyo-1 株を分離して以来、JCV の研究を行っている。本研究では、ウイルスによる脳の障害の機構を解明するために、JCV が中枢神経系でのみ増殖を行う機構を検索することを最初の目的とした。さらにこれらの研究により得られた基礎的事実に基づいて JCV を利用し、脳組織に種々の分子を発現させ得るウイルスベクターを作成することにより、ウイルス性脳障害の治療法を開発することを試みた。

JCV に加えて、AIDS の原因ウイルスであり、HIV 脳症の原因となる HIV の増殖の機構の解明、およびそれに基づく治療法の開発、インフルエンザウイルスに対する予防法を開発を行った。

さらにウイルス感染による細胞応答を解析する基礎として、神経系細胞の分化誘導時に重要な因子を単離し、ウイルス感染により生じる DNA 傷害時の機構を解析し、シグナル伝達物質の分子間相互作用の可視化を行った。また北海道大学実験生物センターとの共同研究により、当初ウイルス感染症の可能性も考えられていた外的刺激により異常行動を示すラットを単離し解析した。

これらの研究により以下の事実を明らかにした。

1) JCV の細胞接着から細胞膜を介しての細胞内侵入、細胞内移送、核でのウイルス増殖の機構、ウイルス粒子の細胞核から細胞質への移送、細胞質から細胞膜への移送経路のほぼ全容が明らかになった。

2) 外殻蛋白を試験管内で発現させる事により作製したウイルス偽粒子(ウイルスのゲノムは入っておらず、感染の危険性は無い)が外来遺伝子、蛍光物質等を細胞内に取り込み、細胞内に外来遺伝子を発現させることを確認し、遺伝子ベクターとしての作用を有する事を確認した。また糖脂質、さらに JCV の siRNA、中和抗体を作製して、JCV 感染を抑制する事に成功し、PML 治療への基礎的事実を確立した。

3) HIV 感染に関しては、細胞の topoisomerase I (DNA の複製関連因子)がウイルスの hair-pin 構造を示す RNA に結合後、RNA を切断、再結合し cDNA の合成を行っているという事実を明らかにして、その事実に基づき、無細胞系で HIV ゲノムの切断と再結合のアッセイを開発して、コンパウンドを用いたハイスループットスクリーニングを行い、ゲノム RNA の再結合を抑制する薬剤を同定することを計画した。

4) インフルエンザ感染に関しては、インフルエンザ感染モデルマウスを用いて、ワクチン療法の具体的な方法を考案し、その有用性を発表した。さらに自然免疫を利用した、新たな感染予防法を考案した。

5) 神経系細胞の分化誘導時に重要な Rap1 の抑制因子 Rap1-GapII を単離し、その機能を解明した。またウイルス感染等の刺激により生じる DNA 傷害時の p53 と Chk2 の機能を解析した。さらにシグナル伝達分子間の相互作用を可視化し、モニターすることに成功した。

6) 異常行動を示すラットを LEC (Long Evans Cinnamon) rat の中から見出し、遺伝学的解析によりその行動異常が Wilson 病とは異なった単一遺伝子に起因する病態であることを確認し、その遺伝子を有する(congenic) Wister rat を樹立した。このラットは行動学的解析から注意欠陥多動性障害モデルとなり得ることを明らかにした。

2. 研究構想

本研究では、ウイルスによる脳の障害から“脳を守る”ことを目的として、ウイルス性脳障害の発症機構を解明するために、ヒト中枢神経系に特異的に脱髄を起こす疾患である PML の原因ウイルスである JCV をその対象として以下の研究を行った。

- 1) JCV が中枢神経系でのみ増殖を行う機構を解明するために、
 - a) 細胞膜側のウイルス受容体の単離・同定。
 - b) 細胞内侵入後のウイルスの細胞内移送経路の解明。
 - c) ウイルスゲノムの複製の場である細胞核におけるウイルスゲノムの転写・複製調節の解明。
 - d) JCV 感染モデル動物の作製。

を目的とした。さらにこれらの研究により得られた基礎的事実に基づいて JCV を利用し、脳組織に種々の分子を発現させ得るウイルスベクターを作成することにより、ウイルス性脳障害の治療法を開発することを試みた。

2) JCV に加えて、AIDS の原因ウイルスであり、HIV 脳症の原因となる HIV の増殖の機構を細胞側の topoisomerase I (DNA の複製関連因子) に着眼して解明し、HIV に対する治療法の開発を行った。

3) 現在小児に脳症を発症させることで問題となっているインフルエンザウイルスに対してもモデル動物を作製して基礎的研究を行い、その予防法の開発を行った。

4) ウイルス感染による細胞応答を解析する基礎として、神経系細胞の分化誘導時に重要な因子を単離し、ウイルス感染により生じる DNA 傷害時の機構を解析し、シグナル伝達物質の分子間相互作用の可視化を行った。

5) 北海道大学実験生物センターとの共同研究により、当初ウイルス感染症によると考えられていた、外的刺激により異常行動を示すラットを、肝炎・肝癌を発症するヒト Wilson 病モデルである LEC (Long Evans Cinnamon) rat の中から見出し、これを単離・解析した。

JCV の中枢神経系での増殖機構の解明に関しては北海道大学大学院医学研究科グル

ープが中心となっており、その中で国立感染症研究所グループは *in vitro* mutagenesis を用いたウイルス変異体の作製等を行った。また HIV の増殖の機構を細胞側の topoisomerase I (DNA の複製関連因子) に着眼して解明する研究、インフルエンザウイルスに対してモデル動物を作製して予防法の開発を行う研究を担当した。国立循環器病センター研究所グループは JCV の感染抑制をするための JCV 蛋白である agnoprotein、VP1 に対する siRNA の発現ベクターの構築等を行った。また大阪大学微生物病研究所グループと共同で神経系細胞の分化誘導時に重要な因子を単離し、シグナル伝達物質の分子間相互作用の可視化を行った。大阪大学微生物病研究所グループは JCV の細胞内移送の解析等を行った。異常行動を示すラットの解析は北海道大学大学院医学研究科グループが北海道大学実験生物センターおよびつくば市産業技術総合研究所および国立環境研究所と共同で行っている。他に共同実験を行った施設としては、国内では九州大学生体防御研究所、国立長寿センター、理研、国立がんセンター、琉球大学、大阪大学、静岡県立大学、福島大学、北海道大学獣医学部、薬学部、理学部等があり、海外ではアメリカ Temple 大学、Brown 大学、Rockefeller 大学、アイルランドダブリン大学と協同研究を行った。

3. 研究成果

3.1 JCV の中枢神経系特異的増殖機構の解明 (北海道大学大学院医学研究科グループ)

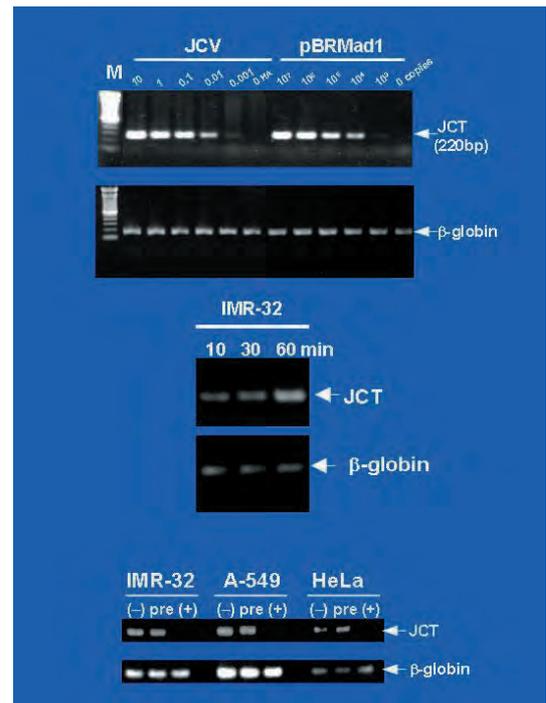
3.1.1 細胞膜側のウイルス受容体の単離・同定。(北海道大学大学院医学研究科グループ)

JCV 受容体を有する細胞を検索することを目的として、以下の実験を行った。JCV は細胞障害性 (cytopathic effect) が分かりにくく、また細胞での増殖が遅いため、JCV 感染の有無を確認することはヘルペスウイルス等の通常のウイルスに比べて困難であった。そこで我々は semi-quantitative PCR 法を用いた JCV entry assay を考案して、由来している種、組織が異なっている 15 種類の細胞株を用いて JCV の細胞への侵入さらに核への到達を検索した(右上図)。これらの cell line を用いて JCV の細胞内侵入の機構を解明した。

最初に本 assay 系の感度を調べるために、血球凝集活性(HA)で表した種々の量の JCV と JCV genome が入った plasmid とを同時に PCR を行って、感度を比較した。

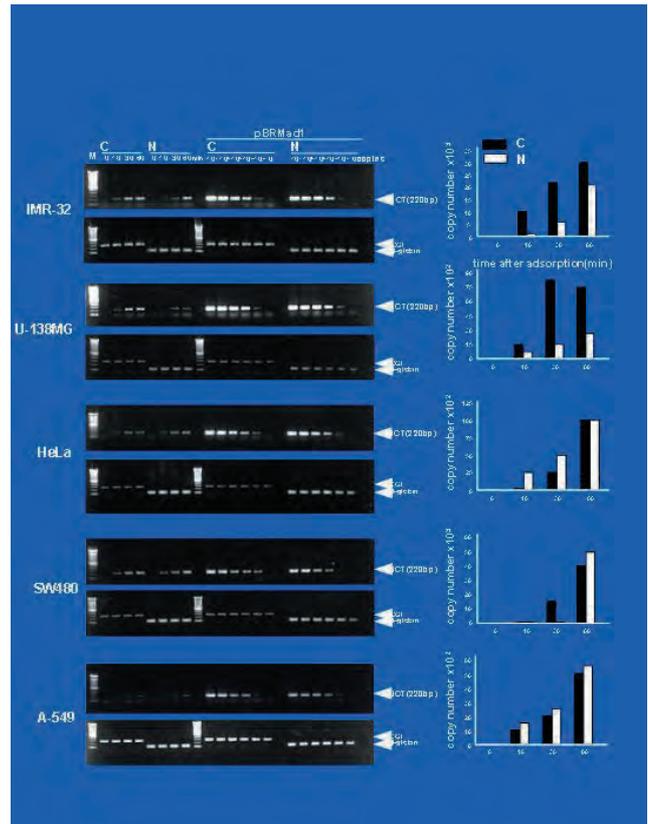
この結果、本 PCR の感度は JCV genome では 10^3 copy であり、また 0.001HA の JCV を認識できた (右下図上段)。この PCR を用いて、各細胞における JCV の細胞内移行を検索した。IMR-32 細胞に JCV を感染させ、経時的に細胞を回収し PCR を施行したところ、感染後 10 分から JCV の signal は認識できた。次に右下図下段に示すように JCV の細胞への吸

Analyzed cell lines	
Cell Type	Origin
IMR-32	neuroblastoma, human
SH-EP	neuroblastoma, human
293T	kidney cells, expressing SV40 large T antigen, human
HEK293	kidney cells, human
COS-7	SV40 transformed kidney cells, monkey
CV-1	kidney cells, monkey
U-138 MG	glioblastoma, human
U-87 MG	glioblastoma, human
OL	oligodendrocyte, human
Hep G2	hepatoblastoma, human
MeWo	melanoma, human
A-549	lung carcinoma, human
HeLa	cervix carcinoma, human
SW480	colon carcinoma, human
Neuro-2a	neuroblastoma, mouse
NIE-115	neuroblastoma, mouse

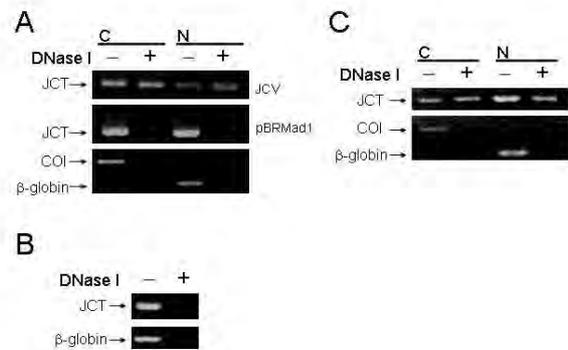
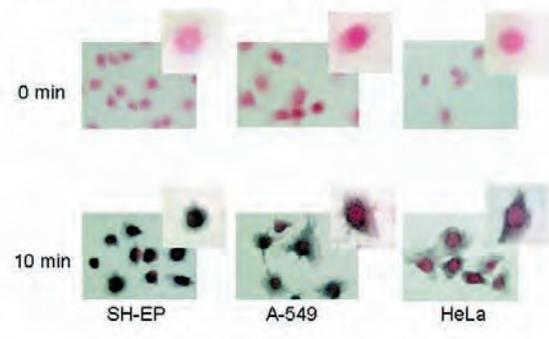


着は外殻蛋白 VP1 が関与していると考えられたので、VP1 の抗血清および免疫前の血清で細胞を処理した後に同様に JCV を感染させ、PCRを施行したところ、抗血清処理した細胞でのみ、JCV の signal を確認できた。

この条件で種々の細胞において JCV を感染させ、細胞質分画、核分画をそれぞれ抽出して PCR を施行し JCV DNA の確認を行った。それぞれの分画の internal control として cytochrome oxidase I および beta-globin を用いた。その結果右上図に示すように、JCV 感受性細胞である IMR-32 細胞、また非感受性神経系細胞である U-138MG 細胞、非感受性非神経細胞である HeLa、SW480、A549 細胞すべての細胞で同様に JCV の signal は検出された。他の 10 種類の細胞でも同様の結果が得られた。次に細胞に JCV を感染させた後に JCV の genome を *in situ* hybridization 法にて検索を行った。右中図に示すように感染後 10 分で JCV genome は核内で認識された。さらに細胞質および核分画中に得られた JCV signal が virion 内にあることを確認するために DNase 処理を施行した後に、PCR を行った (右下図)。その結果 DNase 処理後でも



***In situ* hybridization of JCV genome after inoculation**



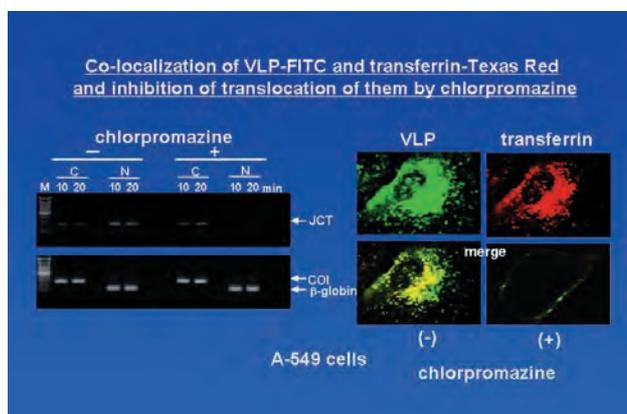
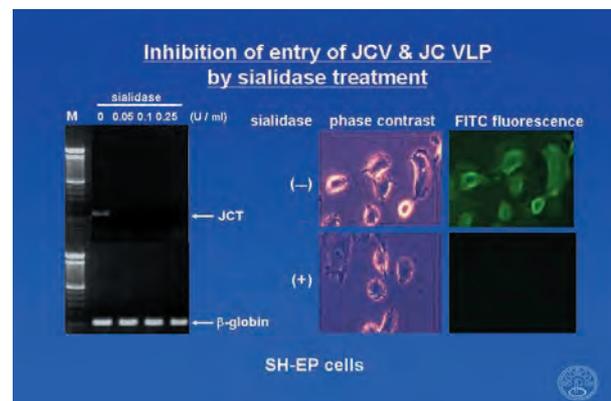
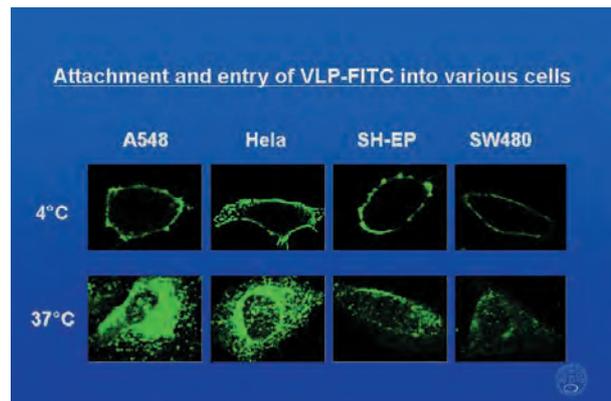
JCV genome の signal は確認できたので JCV は virion の状態で核内に移行していることが示唆された。また JCV 外殻蛋白 VP1 を用いて作製したウイルス様粒子 (virus-like particle (VLP)) を FITC で label して各細胞に inoculation して共焦点顕微鏡で観察を行った。その結果 JCV を感染させた時と同様に JCV 感受性細胞、非感受性細胞ともに核内に VLP が侵入する事が明らかになった(右上図)。JCV が細胞膜に接着する機構を明らかにするために、インフルエンザウイルスの受容体であるシアル酸

に着眼した。細胞に JCV また VLP を感染させる前に、細胞をシアル酸分解酵素(シアリダーゼ)で処理して JCV genome の存在および、FITC-VLP の局在を共焦点顕微鏡で観察した。

その結果シアリダーゼ処理により、JCV genome は認められず、また FITC の signal も観察されなかった。以前の結果と合わせて

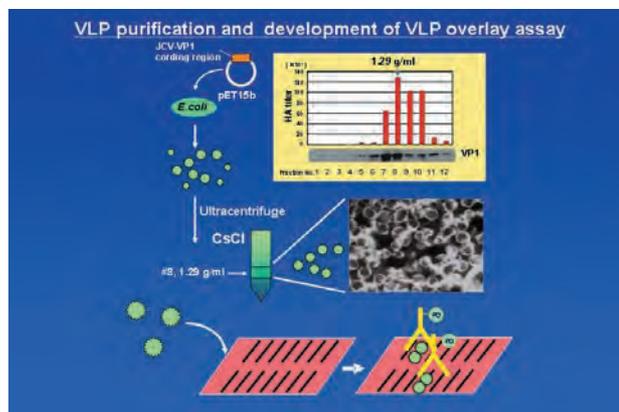
JCV は外殻蛋白 VP1 と細胞膜上のシアル酸の相互作用によって細胞と接着する事が示唆された(右中図)。次に細胞内への侵入経路を検索することを目的として clathrin 経路の inhibitor である chlorpromazine で細胞を処理して、同様の実験を行った(右下図)。その結果

chlorpromazine により JCV および VLP の細胞内への移送は抑制されることが判明し、JCV は clathrin 経路を通過して細胞内に侵入している事が分かった。これらの結果は *Virology* 286: 100-112, 2001 に報告した。



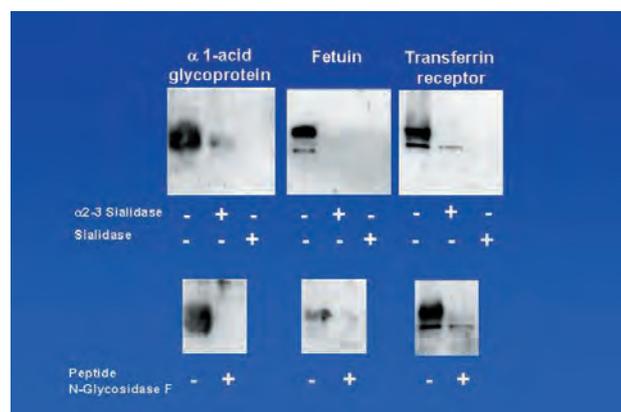
以上の結果から JCV の細胞膜から細胞質への侵入の過程における機構は JCV の神経特異性を規定しているものではなく、JCV 感受性または非感受性細胞で普遍的であることが判明した。次に細胞膜上のシアル酸が JCV の受容体で有る可能性について以下の方法を用いて検索した。

まず、前述したように大腸菌で JCV の外殻蛋白 VP1 を発現させて CsCl 存在下で超遠心を行い、各分画ごとに蛋白の発現、HA 活性を測定して、最も HA 活性の高い



分画を用いて、電子顕微鏡で粒子様構造をとることを確認し、VLP として以下の実験に用いた。細胞膜上の JCV 受容体を同定するために精製した VLP を用いて VLP overlay assay を開発した。この方法はシアル酸結合蛋白質に関しては抽出物を polyacrylamide gel を用いて

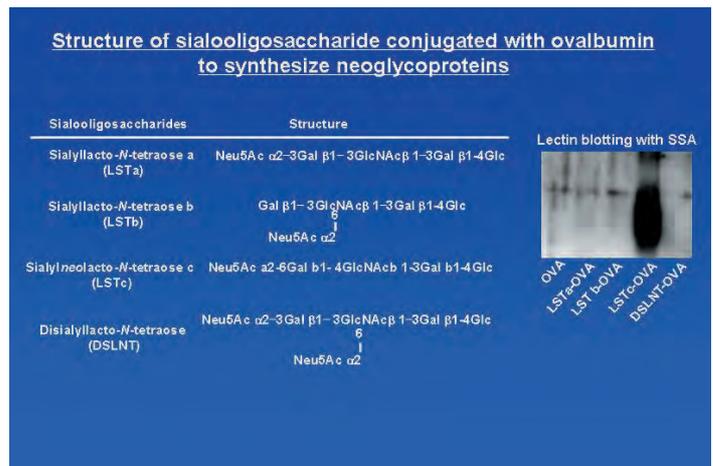
分離・泳動し(SDS-PAGE)、PVDF 膜に転写した後に VLP と incubate し、結合した VLP を抗 VP1 抗体で認識する。また糖鎖結合脂質の解析は糖脂質を thin-layer chromatography (TLC) plate で展開した後に、その plate と VLP を反応させ、その後抗



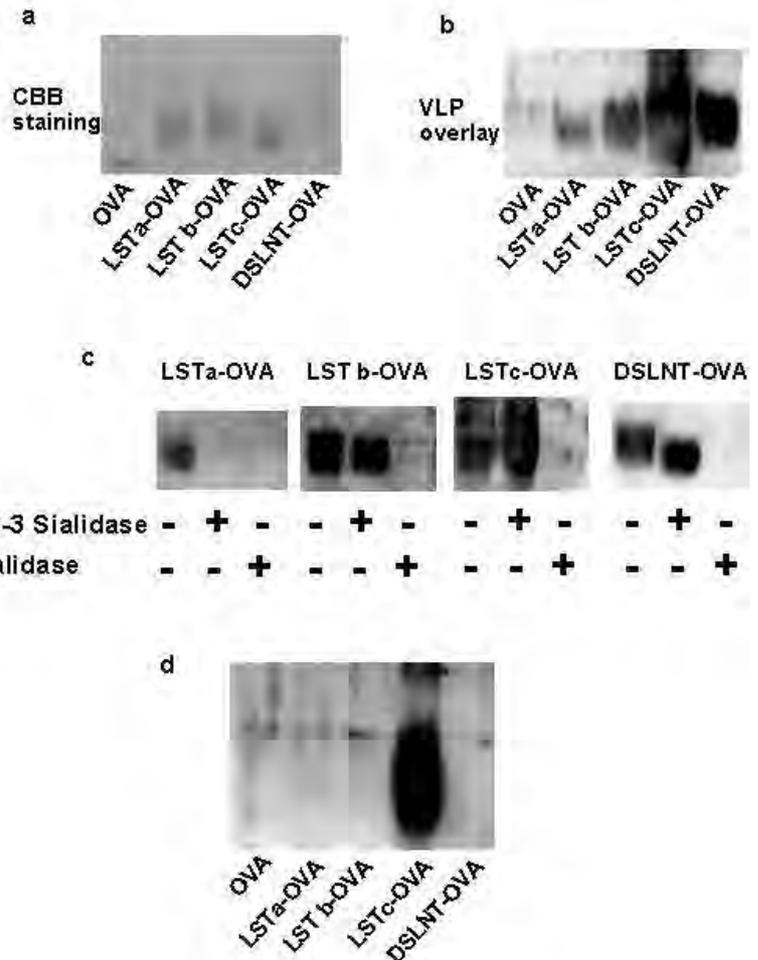
体で結合した VLP を確認する事により行った (右上図)。以下に *J Virol* 76: 12992-13000, 2002 に報告した結果を提示する。

右下の図はシアル酸を有する蛋白質を SDS-PAGE の後に膜に転写して VLP-overlay assay を行った図である。図に示すように α1-acid glycoprotein, Fetuin, transferrin receptor は VLP と結合し、かつ sialidase および N-glycosidase F で signal が消えている事から、これらの蛋白はシアル酸を介して VLP と結合している事が判明した。

次に VLP のシアル酸本体への結合を確認するため、オвалブミンに種々の構造を有するシアル酸を結合させた neoglycoprotein を作製して同様の assay を行った(右上図)。オвалブミンへの結合は CBB 染色で signal が shift したこと(右下図 a) また Lectin blotting を行い、結合した糖鎖が機能を有している事も確認した(右下図 d)。



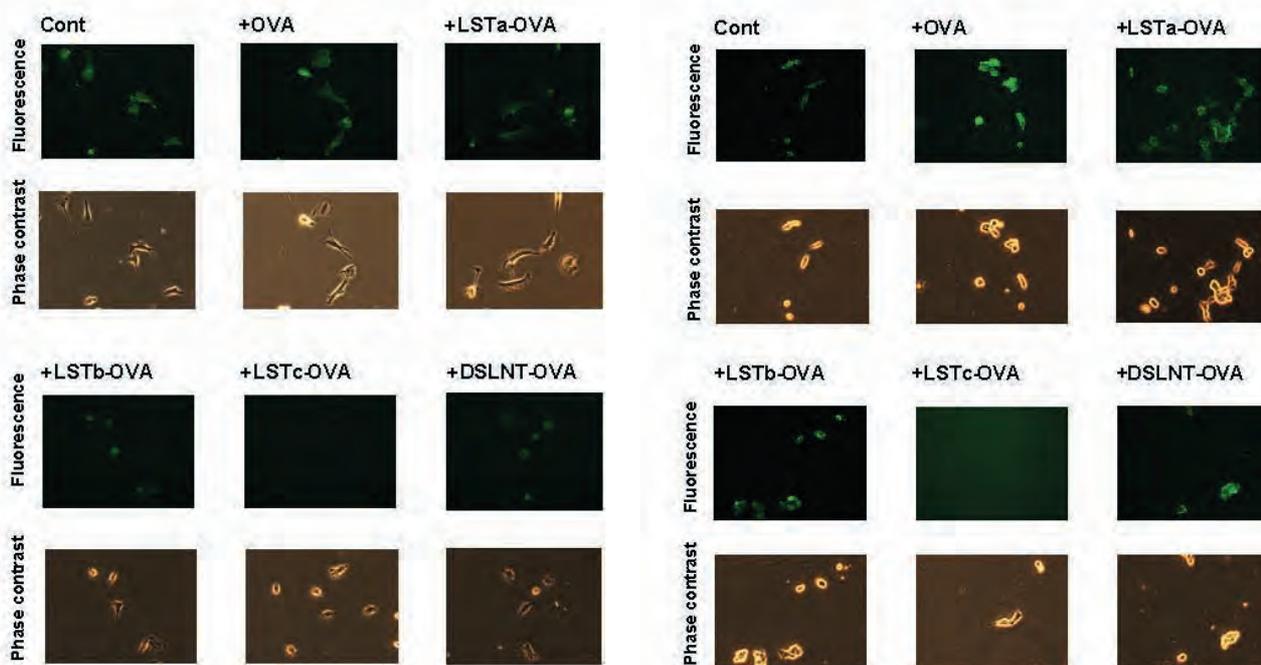
これらの neoglycoprotein を SDS-PAGE で泳動して、VLP overlay assay を行った。右下図 b に示すように VLP は全ての neoglycoprotein に結合した。さらに結合した糖鎖の構造に合致して α2-3 sialidase また sialidase で結合が抑制され、これらの結果から、

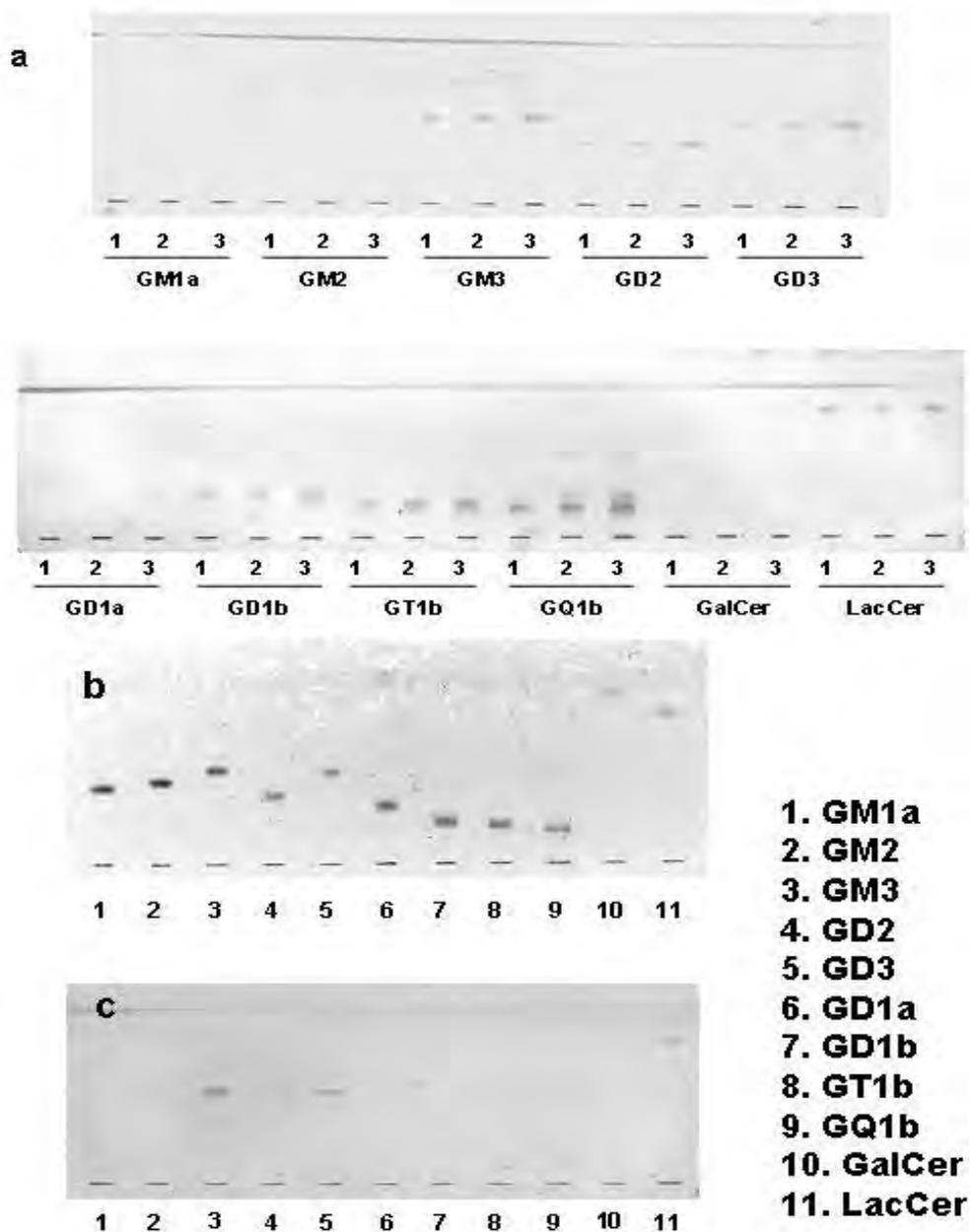


VLP は糖蛋白質の糖鎖を認識し結合する事が明らかになった。次にこれらの neoglycoprotein が細胞への VLP の接着を抑制するかどうかを FITC-VLP を用いて検索した。

下図はJCV許容細胞であるヒト神経芽細胞種由来IMR-32細胞(下図左)および同様に許容細胞であるヒトグリア細胞由来のSVG細胞(下図右)に各種の neoglycoprotein と incubate した後に細胞に感染させた、FITC-VLP の細胞への吸着を共焦点顕微鏡で観察した結果である。control 群、糖鎖と結合していない OVA 単独群、糖鎖とオвалブミンを結合させた LSTa-OVA 群、LSTb-OVA 群、DSLNT-OVA 群では両細胞ともに FITC-VLP の細胞への接着効率には変化は認められなかった。

しかしながら α 2-6 結合を有する糖鎖をオвалブミンに結合させた neoglycoprotein である LSTc-OVA で処理した群でのみ、両細胞ともに VLP の吸着が抑制されており、この結果から LSTc-OVA は VLP と細胞の結合を抑制する事実が明らかになった。さらに VLP の持つ赤血球凝集能に対する抑制効果を検討した。VLP による赤血球凝集は sialidase 処理で抑制される事から、赤血球表面のシアル酸を介している。この赤血球凝集能に対する neoglycoprotein の抑制効果を検索したところ、細胞への VLP の吸着の抑制効果と合致して OVA 単独、LSTa-OVA、LSTb-OVA、DSLNT-OVA では抑制効果は低かったが、LSTc-OVA 処理群では有意に抑制した。

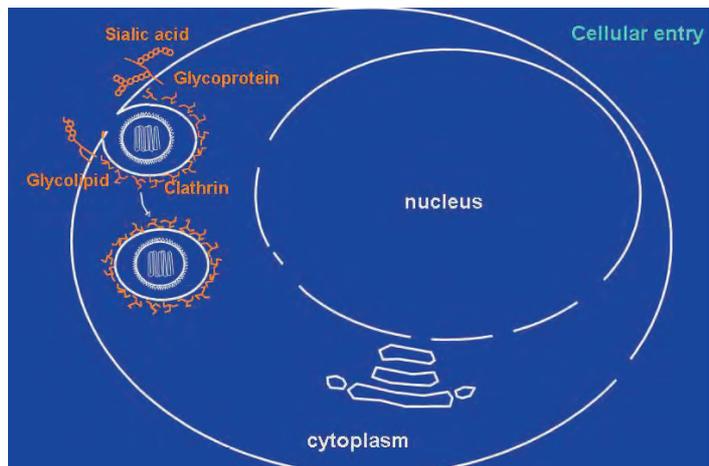
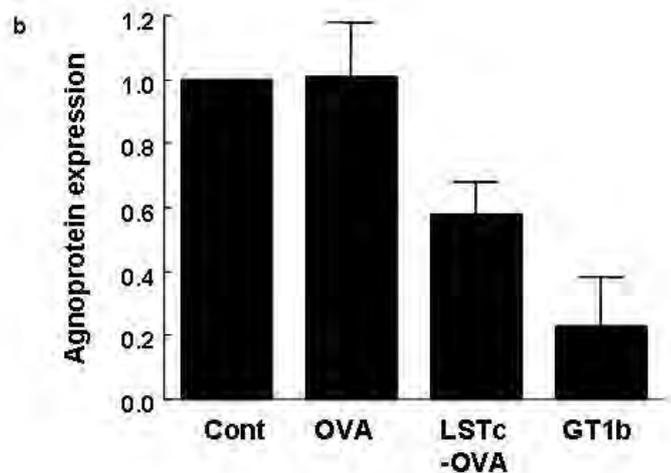
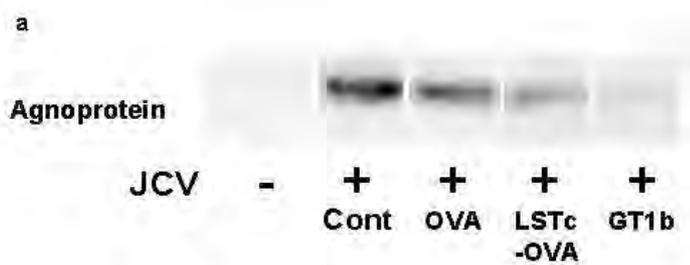




次に糖鎖を有する糖脂質について 1) GM1a, 2) GM2, 3) GM3, 4) GD2, 5) GD3, 6) GD1a, 7) GD1b, 8) GT1b, 9) GQ1b, 10) GalCer, 11) LacCer を用いて TLC で展開した後に VLP-overlay assay を行った。1, 2, 3 は異なる濃度の糖脂質を展開した。上図に示すように GM3, GD2, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, LacCer 等の糖脂質に VLP は結合すること、また Sialidase 処理により、GD2, GD1b, GD1a, GT1b, GQ1b の signal は消失し、脂質に結合している糖鎖の構造によって VLP の結合が規定されている事が示唆された。

最終的に JCV 感染に対する抑制効果を検討した。右図のように細胞に inoculation する前に OVA で処理した場合には抑制効果は全く認められなかったが、LSTc-OVA で処理した群では、感染後の JCV の蛋白発現は control の 50%以下になり、GT1b で処理した群では約 20%に減少した。

以上の結果から JCV は外殻蛋白 VP1 と、種々の細胞の細胞膜に普遍的に発現している糖蛋白質または糖脂質の糖鎖と結合して細胞内に侵入し、clathrin pathway を介して細胞膜から細胞質に移送することが判明した。また細胞質内を移送し、少なくとも一部のウイルスは核に感染後 10 分で到達することが明らかになった (右下図)。次の章では JCV の細胞内移送について述べる。

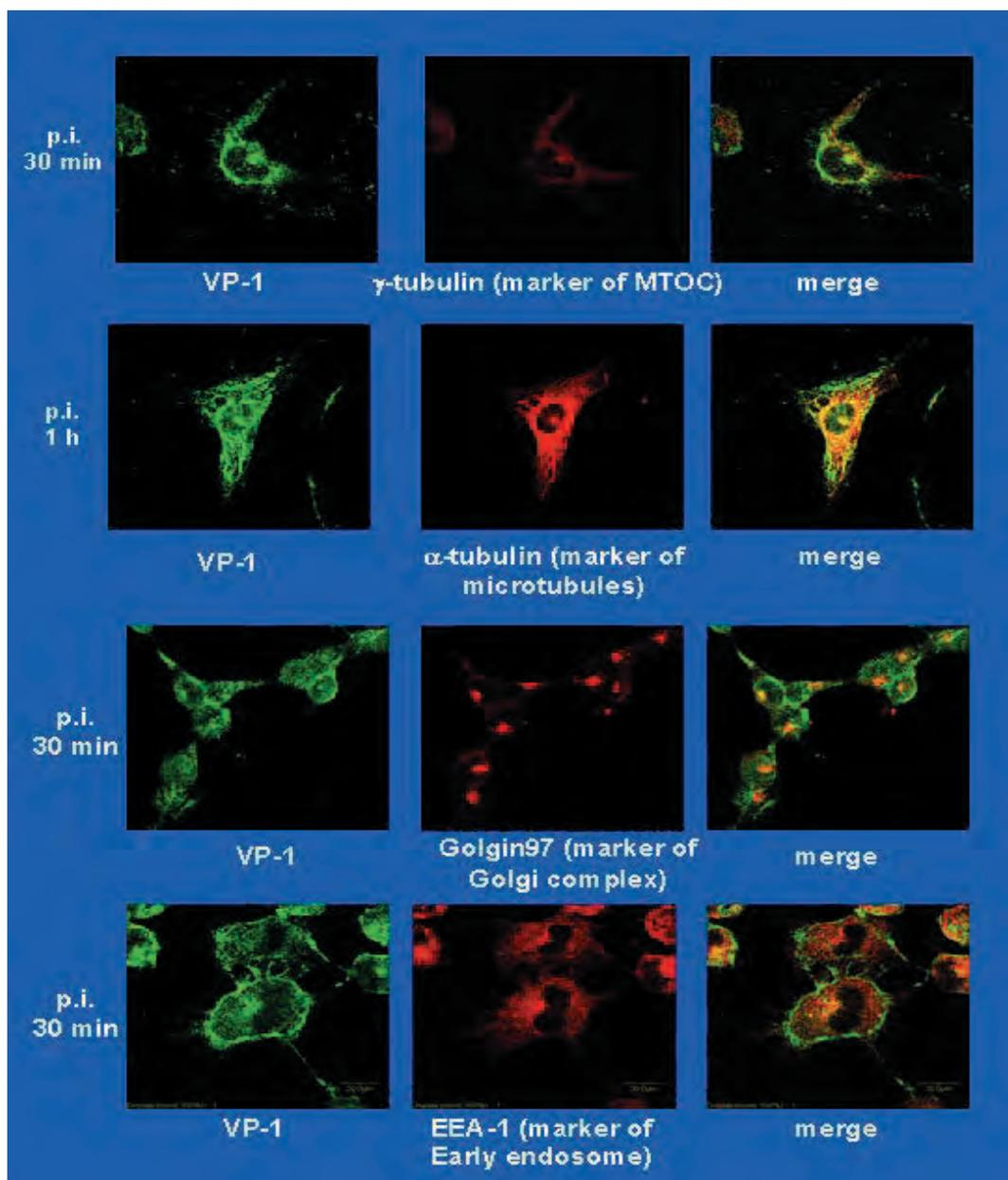


3. 1. 2 JCV の細胞内移送機構の解明ウイルス受容体の単離・同定。

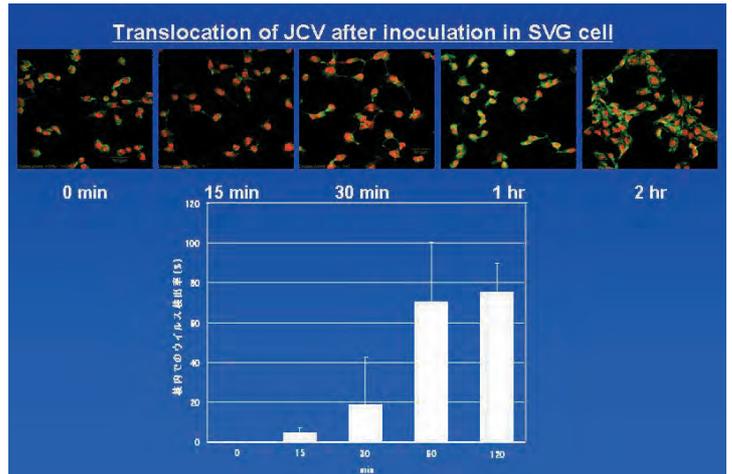
これまでの研究で JCV は種々の細胞に吸着して、宿主細胞の細胞質内に侵入することが明らかになった。本稿では、JCV の細胞内の移送について得られた知見をまとめる。

3. 1. 2. 1. JCV の細胞質内移送 (細胞内小器官との共局在) (北海道大学大学院医学研究科グループ)

JCV を許容細胞であるヒトグリア細胞由来の SVG 細胞に感染させた後に、細胞内小器官との局在を検索した。下図に示すように JCV は microtubules organizing center (MTOC) のマーカーである γ -tubulin、microtubules のマーカーである α -tubulin、Golgi complex の

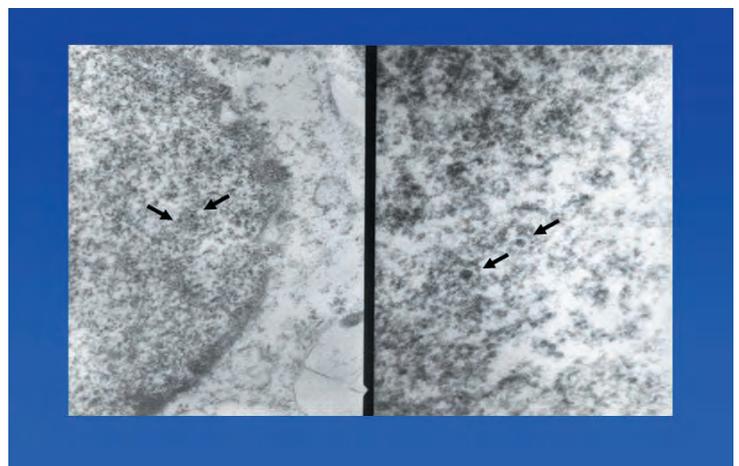


マーカーである Golgin97 また Early endosome のマーカーである EEA-1 と共局在を示した。この結果から JCV は感染の過程において宿主細胞の細胞内小器官を用いた輸送経路で細胞内を移送していることが示唆された。現在各種の薬剤を用いて細胞内輸送を各段階で阻害することによる解析を行っている。

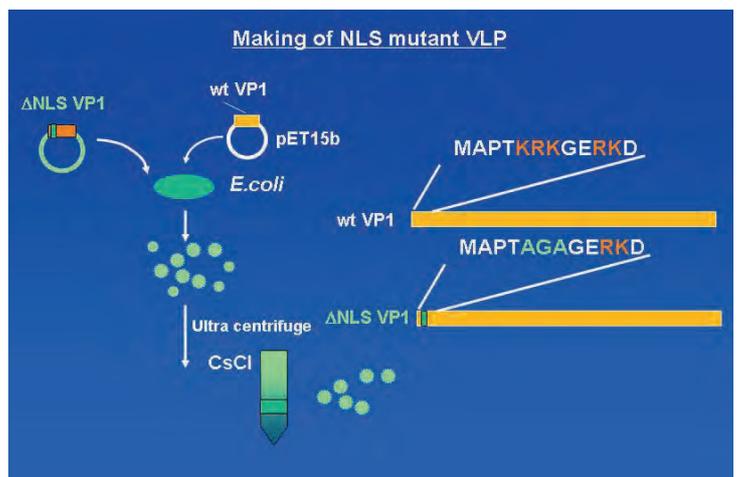


3. 1. 2. 2. JCV の核内移行機構の解析。 (北海道大学大学院医学研究科グループ、 大阪大学微生物病研究所グループ)

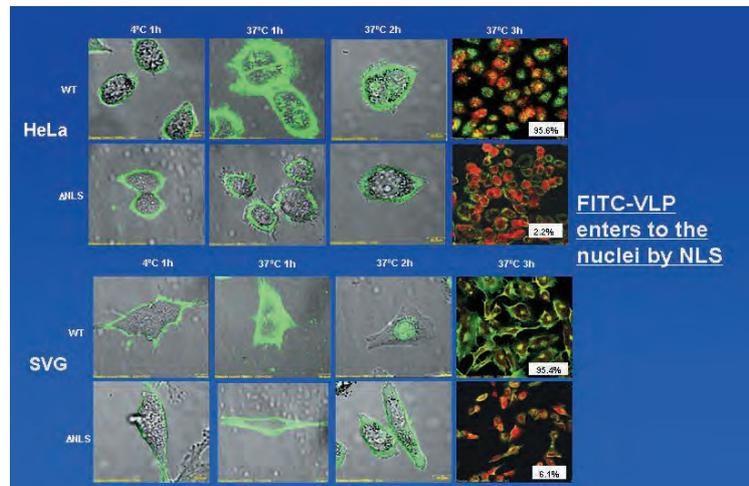
これまでの研究で JCV がシアル酸を介して細胞に接着し、clathrin pathway を介して細胞内に侵入し、細胞内小器官を用いて細胞内を移送していることが示唆された。次に、JCV の核内移行の機構を検索した。右上の図は JCV を SVG 細胞に感染させて経時的に核への移行の割合を共焦点顕微鏡で観察して、それを棒グラフで示した図である。図に示すように約1時間で7割ぐらいの細胞で核内に JCV の



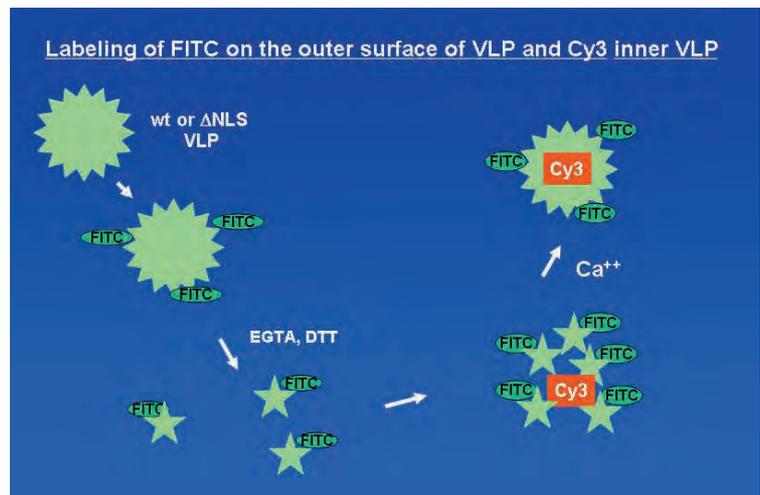
signal が認められている。またこの細胞を電子顕微鏡で観察したところ、核内に JCV の粒子を認めた(右中図)。JCV の外殻蛋白 VP1 は右下図に示したように Nuclear localization signal (NLS) 配列を有していると考えられたので、NLS の mutant である DNLS VP1 を *in vitro*



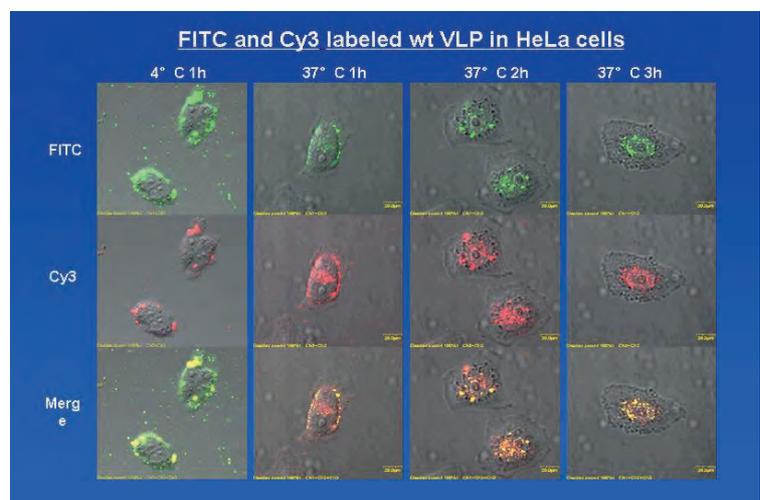
mutagenesis 法で作製してそれを用いて wild type (WT) VLP と Δ NLS VLP を作製し、核移行の効率を検索した。その結果右上の図のように、非許容細胞である HeLa 細胞、許容細胞である SVG 細胞共に FITC で標識した WT VLP は 90%以上の細胞の核内に移送されることが判明した。しかしながら、NLS に変異を有する Δ NLS VLP は 10%未満の細胞でしか核内に移送できず、VP1 の NLS が VLP の核移行にとって重要な役目を果たしている事が示唆された。次に VLP が virion の形をとったままで核移行を行っている事を証明するために外側を FITC で標識し、内側に Cy3 を package している VLP を用いて同様の実験を行った(右中図)。



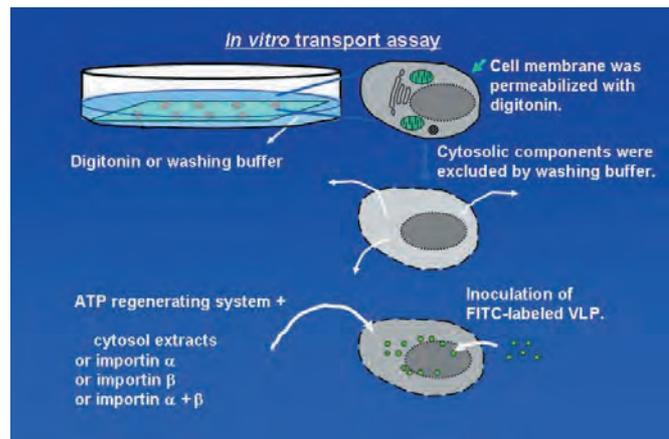
その結果右下図に示すように FITC, CY3 の signal は時間の経過と共に核内に移行していき、VLP は virion のままで核内に移行していることが明らかになった。しかしながら前述の結果と一致するように Δ NLS VLP は核内に移行しなかった。



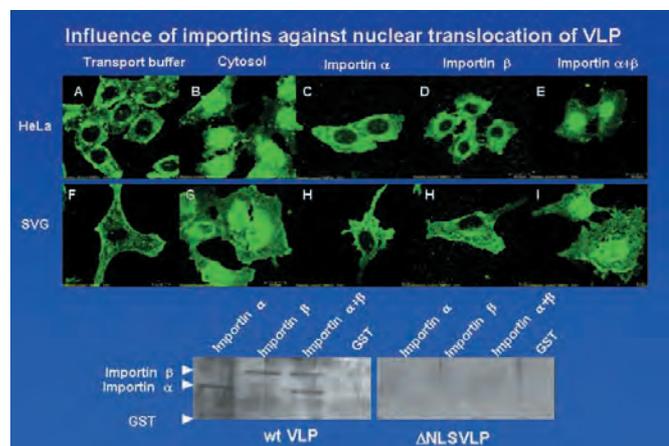
その結果右下図に示すように FITC, CY3 の signal は時間の経過と共に核内に移行していき、VLP は virion のままで核内に移行していることが明らかになった。しかしながら前述の結果と一致するように Δ NLS VLP は核内に移行しなかった。



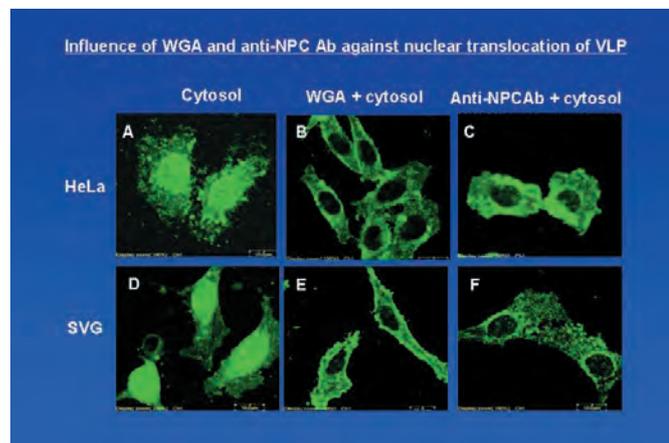
次に FITC で標識した VLP を digitonin で処理し、細胞膜を permeabilize した細胞に inoculation して importin との関係を検索した(右上図)。



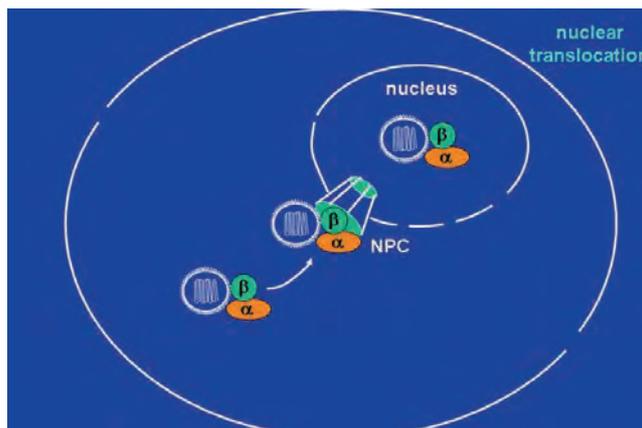
右中図は importin α および importin β (理研 今本尚子博士より供与) の存在下で FITC でラベルした VLP の核移行の程度を観察した。その結果 cytosol 分画が有る場合には VLP は核に移行するが、importin α もしくは importin β 単独では核に移行せず、両者の共存在下でのみ核に移行した。また NLS に変異を有する Δ NLS VLP では両者の存在下でも核移行は認められなかった。VLP と importin の結合を確認するために行った VLP overlay assay の結果 WT VLP は importin α および importin β と結合したが Δ NLS VLP は importin に結合しなかった。以上の結果から VLP は NLS を介して importin α および importin β と結合して、核に移行することが判明した。



次に核に移行する際に nuclear pore complex (NPC) を介するのかを調べるために NPC 経路を遮断する wheat germ agglutinin (WGA) もしくは抗 NPC 抗体の核移行への影響を検索した。右下図に示すように NPC 経路を抑制すると VLP の核移行は生じなくなり、従って VLP の核移行は NPC を介している事が明らかになった。以上の結果から JCV VLP

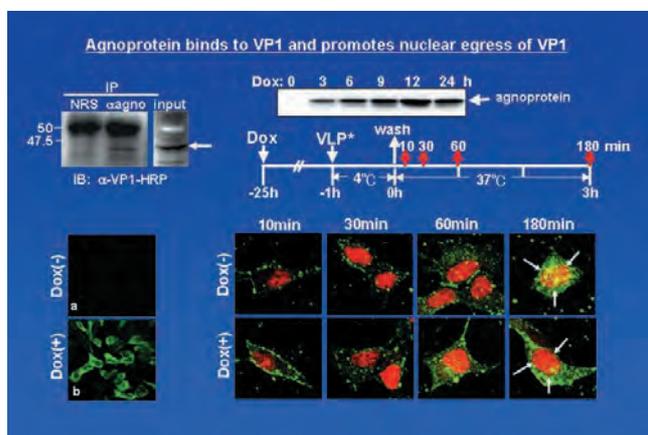
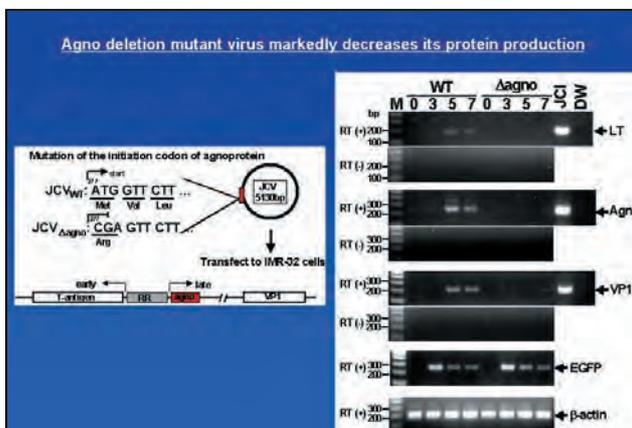


は NLS を介して importin α および importin β と結合し NPC を通って核内に移行することが判明した(右上図)。



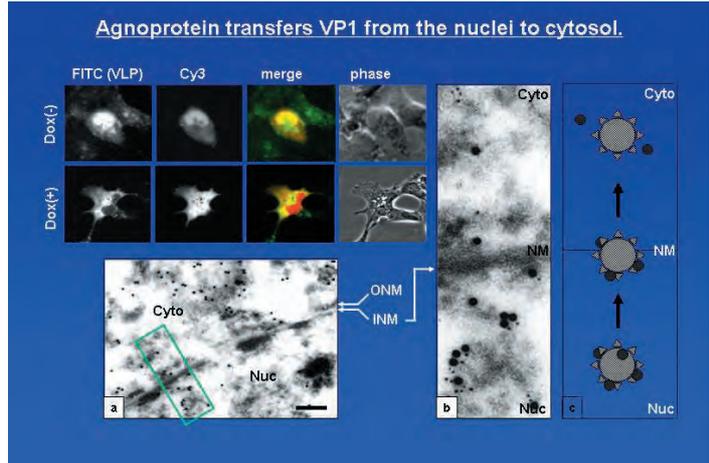
3. 1. 2. 3. agnoprotein による JCV の核外移行機構の解析 (北海道大学大学院医学研究科グループ、国立感染症研究所グループ)

以前我々は JCV の code する蛋白質である Agnoprotein を欠損させたウイルスではウイルス蛋白質を code している mRNA の発現が抑制される事を報告した(右中図)。同じ polyoma 属のウイルスである SV40 では agnoprotein は virion の assembly を制御しているという結果が報告されており、JCV での agnoprotein の機能を検索するために doxycycline による agnoprotein の inducible cell line を作製し、実験を行った。右下図に示すように agnoprotein は VP1 と結合することが判明

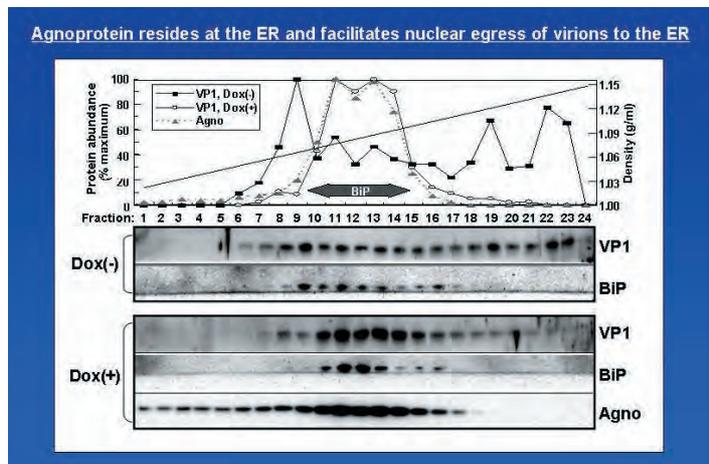


した。さらに agnoprotein 存在下では細胞に inoculation した VLP が核への集積が抑制されている事を見出した。この現象は 2 つの可能性を示唆している。一つは agnoprotein が存在すると JCV の核への移行を阻害する可能性、もう一つは agnoprotein を核から細胞質への移行を促進する可能性である。この可能性を確認するために以下の実験を行った。agnoprotein を誘導している cell line (Dox (+)) と誘導していない cell line (Dox (-)) を用いて核に FITC ラ

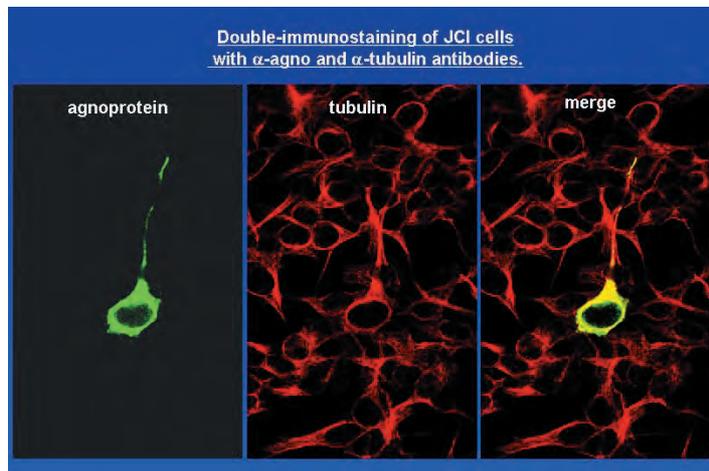
べルした VLP を injection して核に到達したマーカーとして Cy3 を用いた。右上図に示すように agnoprotein の存在下では FITC は核外に認められた。即ち、FITC でラベルしている VLP は agnoprotein 存在下では核外に放出される事がこの実験から証明された。



さらに iodexanol gradient を用いて各分画を抽出して agnoprotein の存在下、非存在下で VP1 および endoplasmic reticulum (ER) の発現を検索した。その結果、agnoprotein 存在下では VP1 は ER 分画に shift する事が判明した(右中図)。以上の

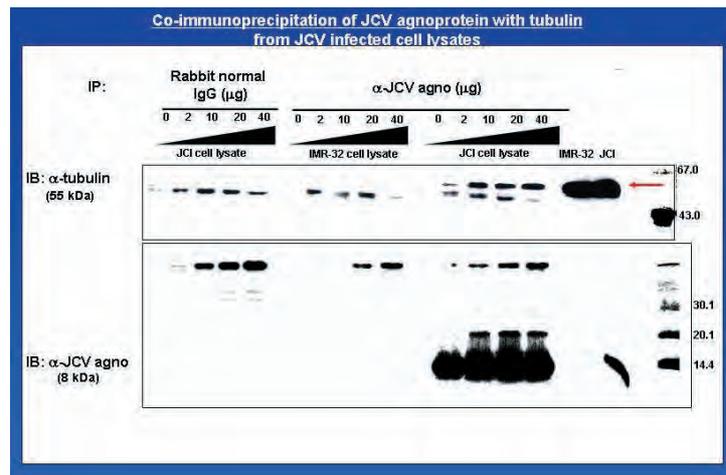


結果から agnoprotein は核内の JCV 粒子を核から細胞質に移送することが判明した。また右下図のように agnoprotein は tubulin と共局在していることが JCV 感染細胞を用いた免疫二重染色で示された。この結果を確認するために免疫沈降法を用いて

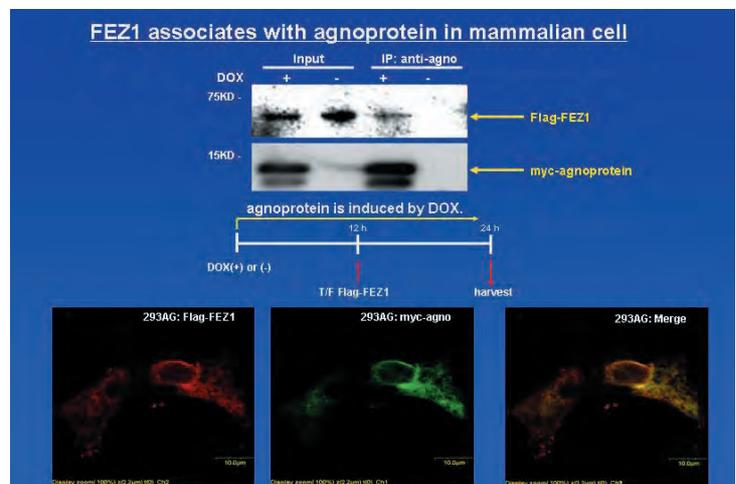


agnoprotein と tubulin の結合を確認した。

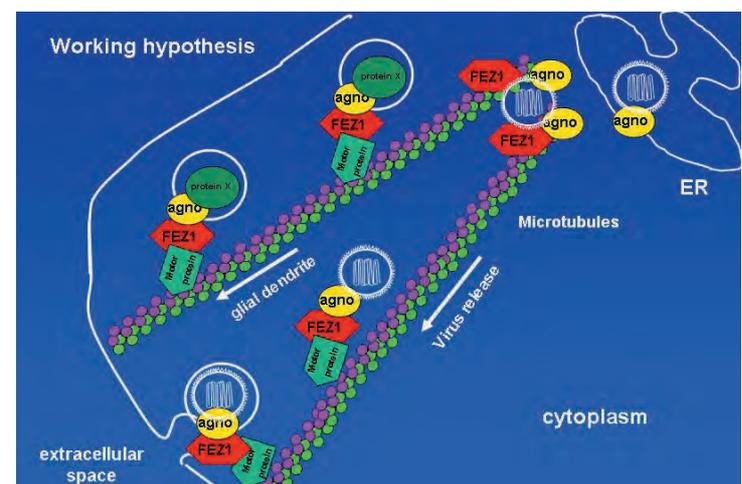
右上図に示すように JCV 感染細胞を用いた免疫沈降実験により agnoprotein は tubulin と結合する事が示された。



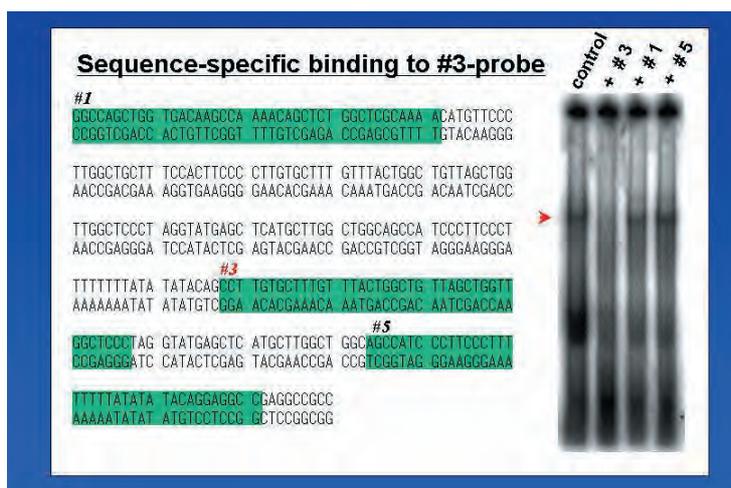
さらに agnoprotein を bait として取れてきた神経系細胞の突起伸張に関わっている FEZ1 (Fasciculation and elongation protein zeta 1 / Zygyn 1) という蛋白と agnoprotein が結合する事を確認し、さらに FEZ1 が motor protein と結合する事を見出した(右中図)。これらの事実から agnoprotein が VP1 と結合して virion を核から核外に移送し、その後 FEZ-1 と結合してさらに motor protein と complex を作り、tubulin の上を移動して細胞質から細胞膜に移動して最終的に細胞外に放出されるという仮説を提唱し、現在確認を行っている (右下図)。以上3. 1. 1から3. 1. 2までの研究において JCV の細胞接着から細胞質を移送し、NPC



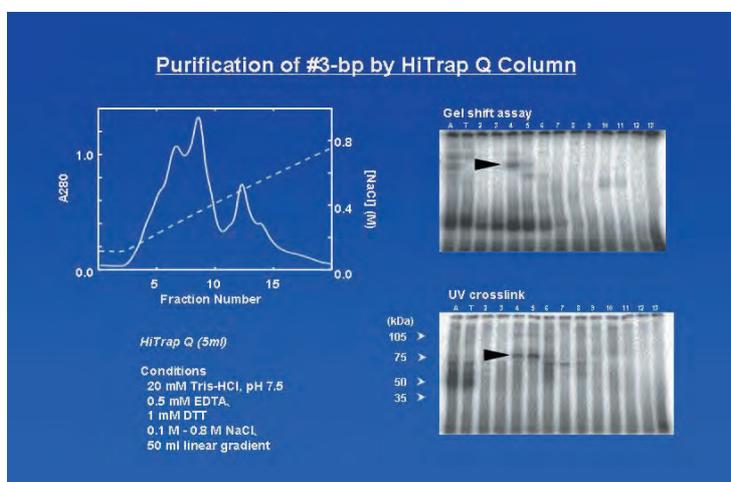
を介して細胞核に到達し、細胞核から細胞質に核外放出され、その後、細胞質を通過して細胞膜まで移送される機構について明らかにした。次の項では JCV の核内での増殖機構について述べる。



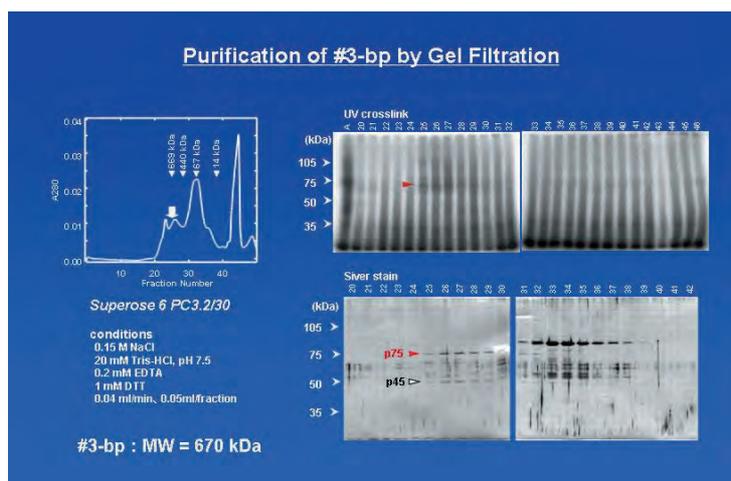
細胞の核分画を用いてEMSAを行いIMR-32 細胞と他の細胞で違いのあるバンドを検索した。その結果#3 の probe を用いた際に、IMR-32 にのみ出現しているDNA 結合蛋白のバンドを確認し、次にこの蛋白質が probe #3 に特異的に結合しているかどうかを確認した(右上図)。



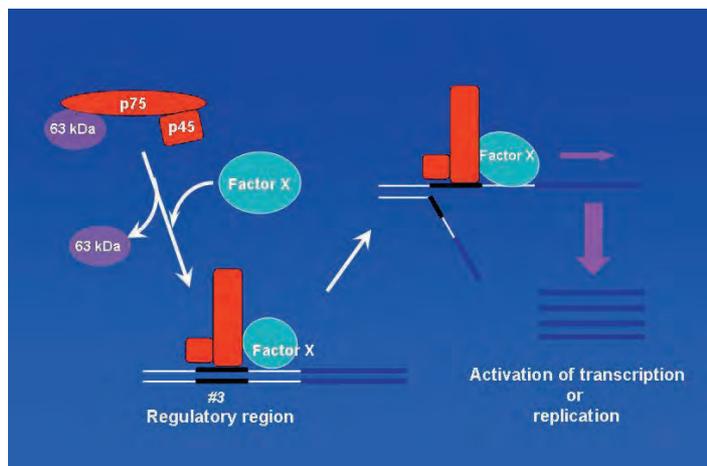
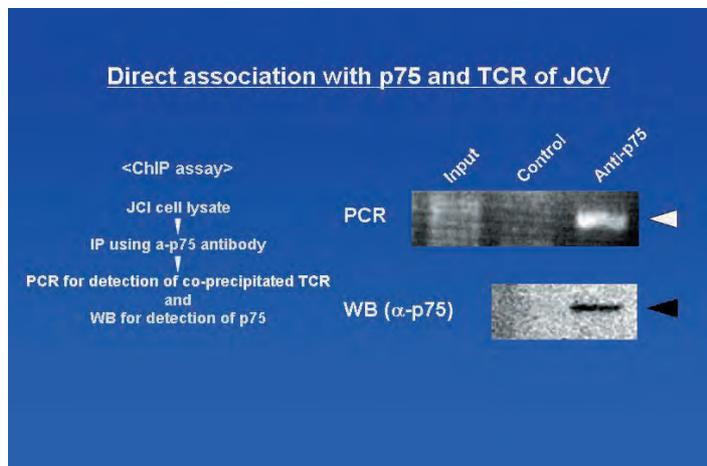
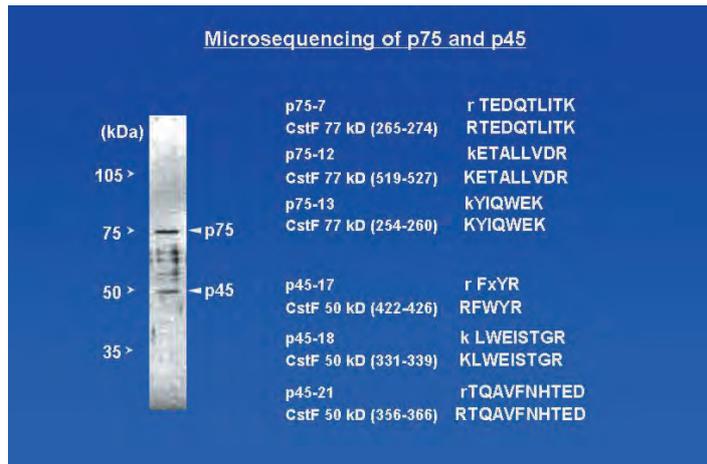
#3 を cold probe として用いた場合にのみバンドは消失する事からこの結合蛋白は#3 に特異的に結合している事が判明した。次に右中図、右下図に示すように HitrapQ column、Gel filtration 法を用いて単離を行った。右下の図に示すように#3 binding protein は分子量 670kDa であり、分子量約 75kDa および 45kDa の蛋白質を含んでいる事が判明した。



これらの結果から#3 binding protein は complex を形成し少なくとも 2 種類の蛋白質を含んでいることが判明した。そこでこの 2 種類のバンドを gel から切り出し、酵素で消化した後に、アミノ酸分析を行いこれらの蛋白を同定する事を試みた。



右上図にアミノ酸分析の結果を示す。アミノ酸分析の結果 75kDa、および 45kDa の蛋白は両方とも Cleavage stimulating factor (CstF) の subunit であることが判明した。この 75kDa の CstF (p75)が JCV regulatory region に結合していることを確認するために、この蛋白に対する特異抗体を作製し、次に JCV 感染細胞の抽出物をこの抗体で免疫沈降して JCV の DNA がその沈降物に含まれているかどうかを Chromatin immunoprecipitation (CHIP) assay を施行した。その結果右中図に示すように p75 は JCV regulatory region と結合している事が判明した。この蛋白 CstF は全ての細胞に普遍的に存在するものであり、JCV の regulatory region #3 に結合し、神経特異性を規定しているものは CstF と結合している Factor X である事が示唆された。また CstF は他の蛋白と共同して JCV の RNA の splicing を調節している可能性も考えられ、現在 Factor X の単離と、CstF の RNA splicing に与える影響を検索している。



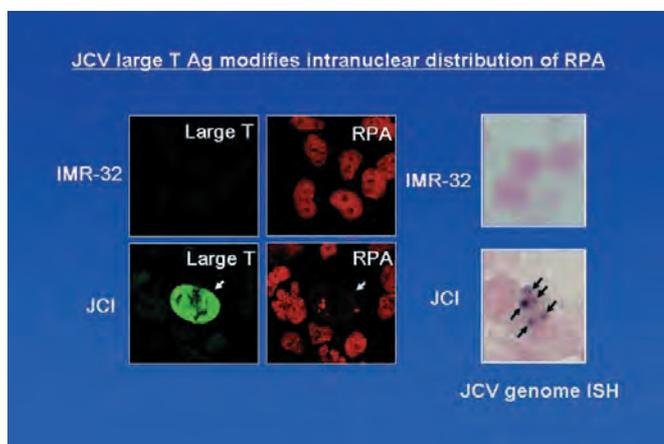
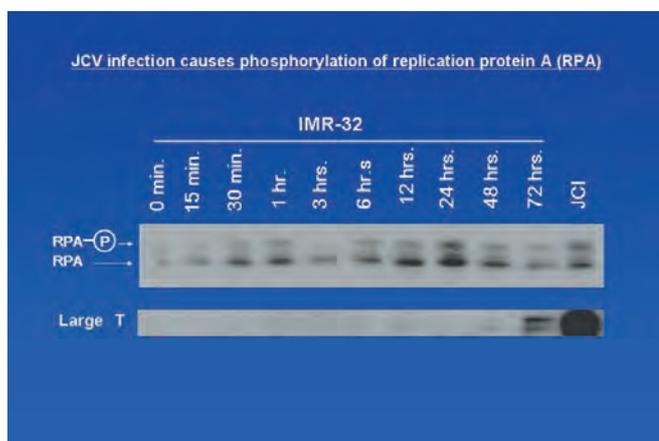
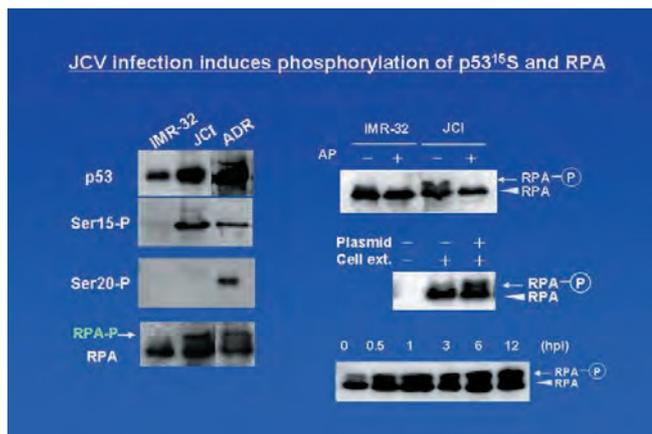
3. 1. 3. 2. 核内複製調節機構の解明。

(北海道大学大学院医学研究科グループ)

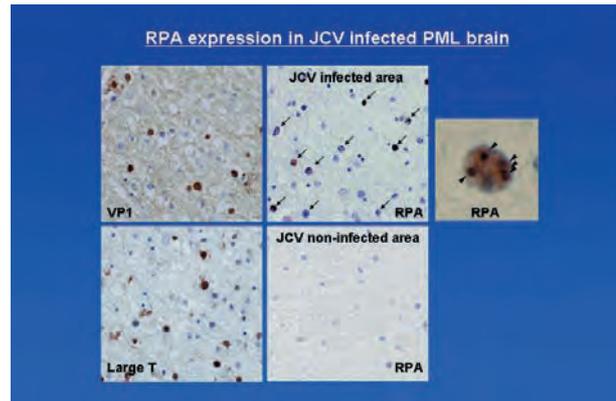
JCVの感染により核内で起こっている現象について以下の実験を行った。右上図に示すようにJCVの感染でp53のSer15のリン酸化が特異的に認められた。さらにp53の結合蛋白質であるreplication protein A (RPA)もリン酸化が亢進している事が判明した。これらはJCV DNA plasmidが存在する時に起こるDNA依存性の反応であり、感染後経時的に変化していく事が明らかになった。さらにJCV許容細胞であるIMR-32細胞にJCVを感染させRPAのリン酸化を経時的に観察した結果感染後15分からリン酸化は起こり、1時間でpeakとなり、徐々に減少し、その後24時間で再度peakをとることが判明した(右中図)。

次にRPAの局在がJCV感染によって変化するかどうかを検索するためにJCV感染細胞の免疫染色を行いRPAの局在の変化を

観察したところ、JCV感染によりRPAの局在は核内にびまん性な局在から斑状に集積を認めた。JCV感染細胞ではJCVのDNAも斑状に検出される事から、我々はJCVがRPAを利用して自己複製を行っており、感染初期のIMR-32細胞にJCVを感染させた際に生じるRPAのリン酸化は、感染初期にはDNA障害に類似した反応と考えられ、感染後期に見られるRPAのリン酸化は、JCVが細胞のRPAを利用して自己複製を開始すると考えられた。またJCV感染を起こ

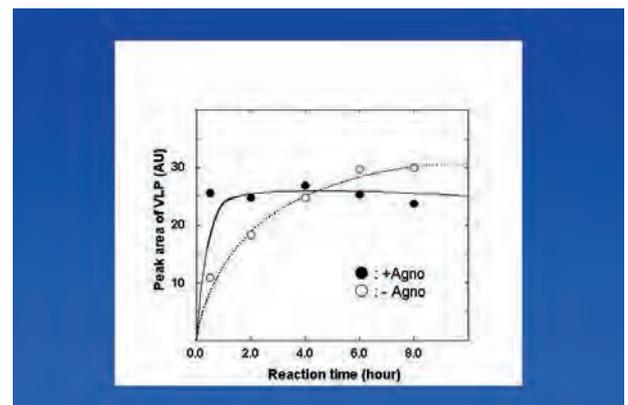
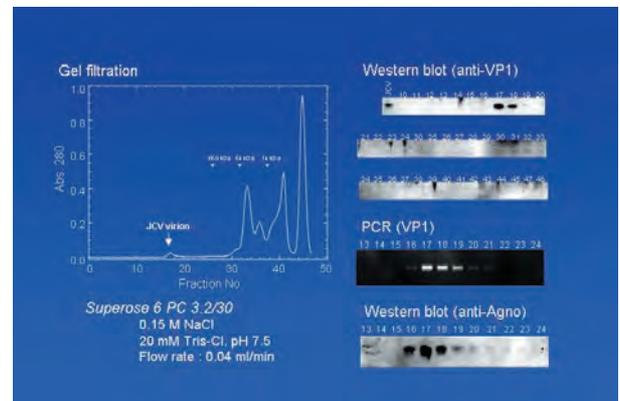


しているhuman brainでもRPAは核に斑状に染まっており、JCV感染でin vivoでもRPAの局在が変化を起こしている事が判明した(右上図)。以上の結果からJCVは自己複製を細胞内因子であるリン酸化RPAによって行っており、かつJCV感染により、RPA結合因子であるp53のSer15のリン酸化も生じることが判明した。



3. 1. 3. 3. virion assembly 機構の解明 (北海道大学大学院医学研究科グループ)

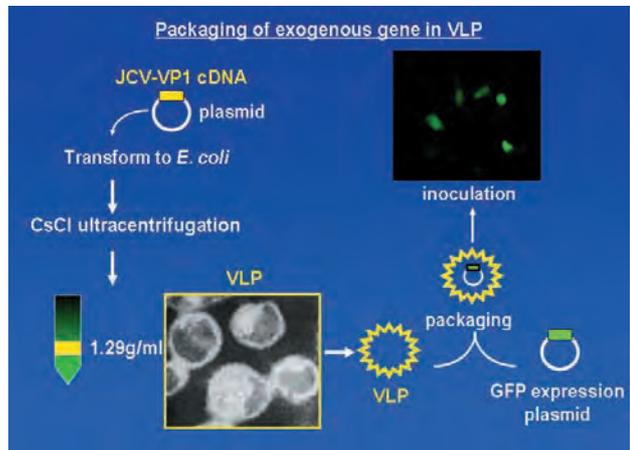
我々はJCV virionのassemblyについても研究を行った。右中図に示すようにJCV感染細胞から抽出した粗抽出物質をgel filtrationで分画して、各分画をVP1の抗体でimmunoblotting、JCV genomeのPCR、抗agnoprotein抗体を用いたimmunoblottingを行った結果(右中図)、図に示すようにVP1(即ちJCV virion)、JCV genome、agnoproteinは同一の分画に存在しており、agnoproteinはJCV virion内に存在している事が明らかになった。そこでJCV virion形成の速度を調べた結果右下図に示すようにagnoproteinの存在下ではvirion assemblyの速度が亢進する事が判明した。以上の結果からagnoproteinはvirion内に存在して、assemblyを制御している事が明らかになった。



3. 1. 4. JCV 感染に対する治療法の開発

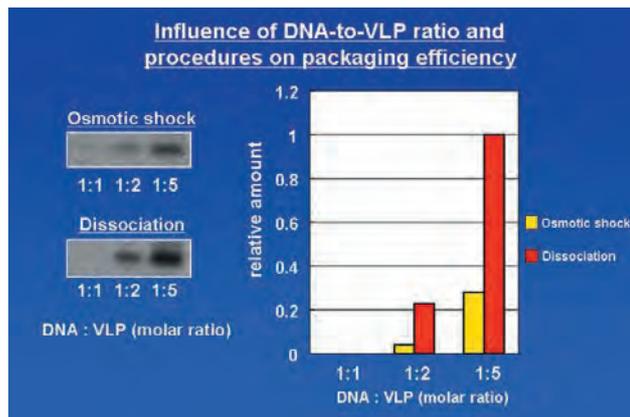
3. 1. 4. 1. JCV を利用したベクターの開発。(北海道大学大学院医学研究科グループ)

前述したようにJCVの外殻蛋白VP1を大腸菌で発現させ、CsCl存在下で超遠心を行い、精製したvirus-like particle (VLP)がvectorとしての役割を有する事を検索した。右上図に示すようにVLPをassemblyする際に蛍光物質GFPをcodeしているplasmidをpackagingしてその後細胞にinoculationし、細胞にGFPが発現することを確認した。

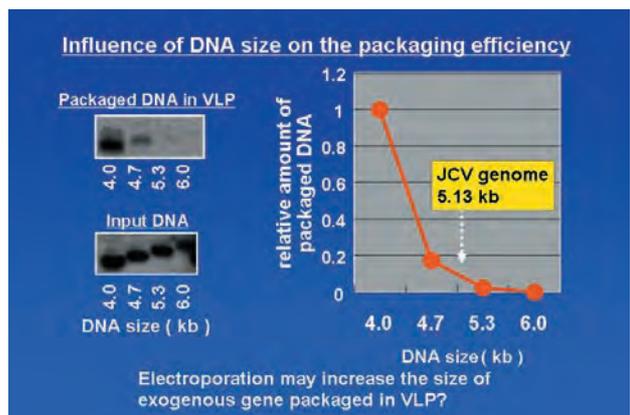


即ちVLPがplasmidを細胞内に導入するベクターとして機能することを明らかにした。

次に従来用いられていたtransfection試薬とVLPの細胞導入効率の比較したところ、VLPの細胞導入効率はlipofection法と比較して同等の効率を有していた。

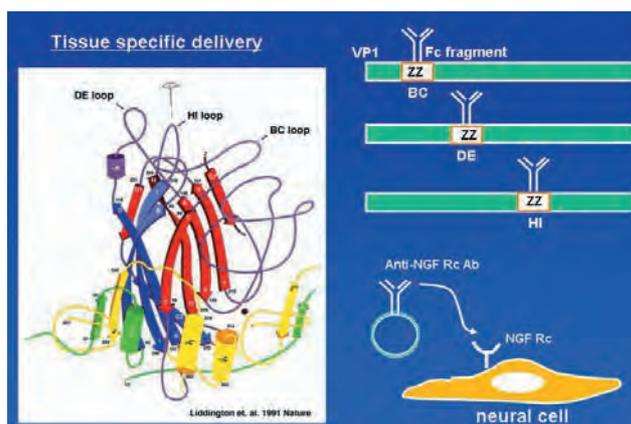


次に plasmid の packaging 効率について Southern blottingを用いて検索を行った。右下図に示すようにpackagingをosmotic shock法、dissociation法でそれぞれ plasmidとVLPの比を1:1, 1:2, 1:3の各比の値でpackagingの効率を比較したところ、



右中図のようにplasmid: VLPが1:5の比でかつdissociation法を用いた際に効率が良いことが判明した。次にこの比の条件でplasmidの長さによるpackagingの効率を比較したところ

plasmid長とpackagingの効率は逆相関していることが明らかになった(右下図)。現在他のpackaging方法等も試みている。当初の計画段階ではJCVの神経親和性を利用して、神経特異的に物質を運ぶベクターを作製する予定であったが、細胞膜のJCV受容体には神経特異

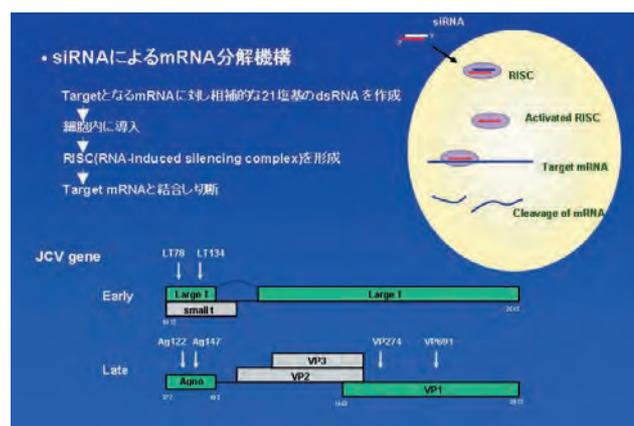


性は無く、細胞に普遍的に存在するシアル酸を有する糖蛋白および糖脂質が受容体であることが判明し、またVLPは種々の細胞に侵入できることが明らかになった。そこで我々は神経特異性を有するベクターを開発するために右上図のような方法を考案し試みている。本法はイムノグロブリンのFc fragmentに結合する配列であるZZ domainをcodeする塩基配列をVP1のcDNAの中に組み込み、それらを発現するVLPを作製し、ZZ domainに組織特異的に発現している因子(例えば神経系細胞であればNGF受容体等)に対する抗体を結合させて、細胞特異性を有したVLPベクターを作製するものである。現在VP1の種々の部分にZZ domainをcodeする配列を挿入したVP1変異体を作製している。

3. 1. 4. 2. JCV 感染抑制法の開発。

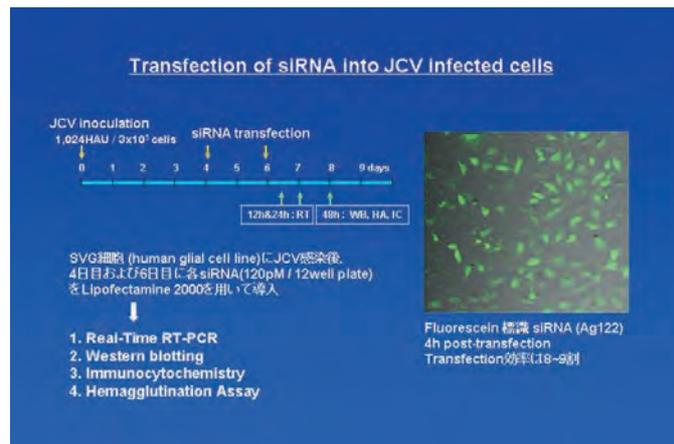
3. 1. 4. 2. 1. siRNA を用いた JCV 感染抑制法の開発。(北海道大学大学院医学研究科グループ、大阪国立循環器病センター研究所グループ)

最近遺伝子工学的に蛋白質の発現を抑制

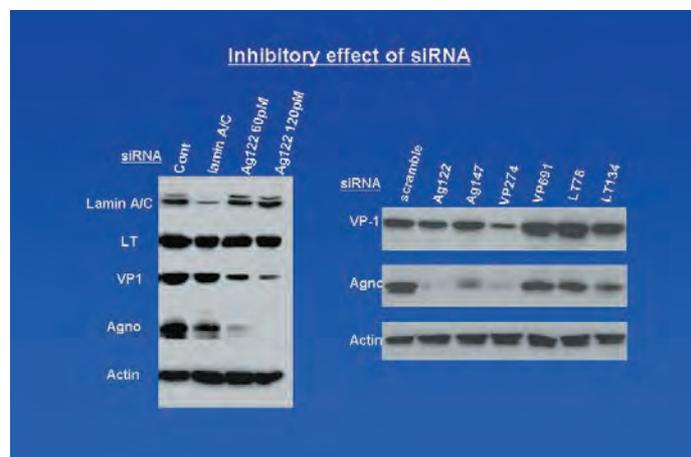


するために種々の方法が開発されている。本項ではJCV感染の抑制について我々が開発した方法について述べる。右下図のように現在 siRNA は遺伝子発現を抑制するのに最も効果的な方法の一つである。我々は JCV の早期蛋白質である large T 抗原に関して 2 箇所。後

期蛋白質の VP1、agnoprotein に関してそれぞれ 2 箇所ずつ siRNA を作製して JCV の code している蛋白発現の抑制を試みた。その結果以下の事実を確認した。右上図のように JCV を感染許容細胞である SVG 細胞に感染させ、その後 4 日目に各蛋白質に対する siRNA を細胞に導入し、48 時間後にウイルス蛋白の遺伝子発現、蛋白発現に対する抑制効果を検討し、さらに感染価の指標である赤血球凝集能 (hemagglutination activity: HA) を測定した。まず fluorescein 標識した siRNA を細胞に導入し、導入効率を共



焦点顕微鏡で観察した。その結果約 8-9 割の細胞に siRNA が導入される事を明らかにした。この条件下で siRNA の効果を immunoblotting で検索した (右中図)。siRNA の陽性 control として細胞内に発現している lamin A/C に対する siRNA を用いた。図に示すように control の lamin A/C の蛋白発現は著明に低下していたことから、細胞への siRNA の導入は問題が無いと判断した。JCV 後期蛋白質である agnoprotein に対する siRNA を用いた群では agnoprotein の発現は著明に抑制されていた。negative control として用いた scramble siRNA また早期蛋白質である large T 抗原に対する siRNA では効果は認められなかったこと、また細胞骨格蛋白質で内部 control として用いた actin の発現は全く変化を認めなかったことから agnoprotein に対する siRNA の効果は特異的なものであると判断した。さらに同じ後期蛋白質である VP1 に対する siRNA で処理した場合にも agnoprotein の発現は抑制された。この結果は JCV の後期蛋白は polycystronic で splicing を経た後に蛋白として発現することが関与し



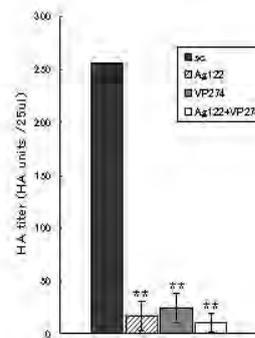
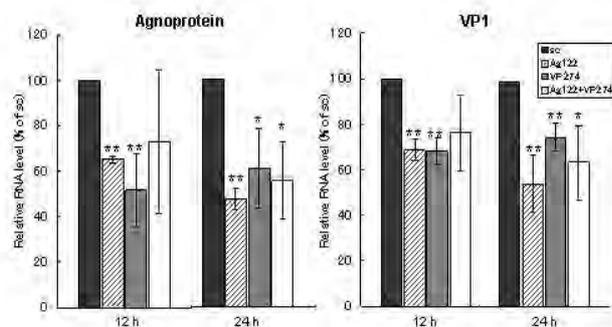
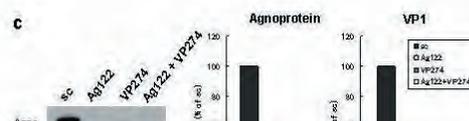
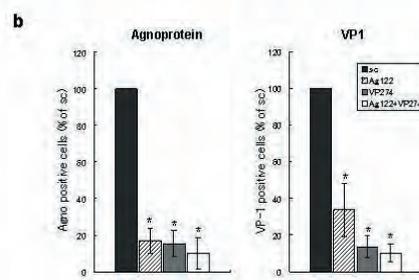
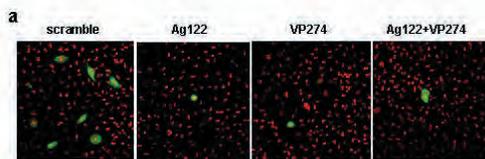
ていると思われる。

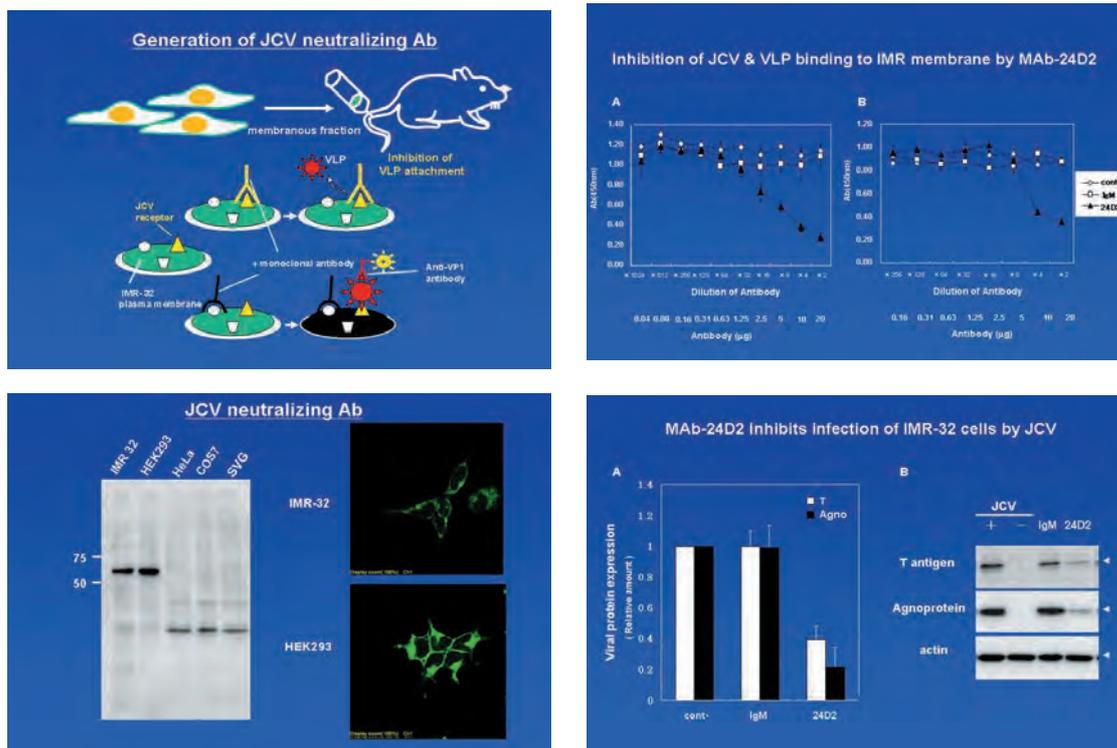
右上図はagnoproteinおよびVP1に対するsiRNA処理後のimmunocytochemical stainingの結果を棒グラフで表した図である。agnoproteinおよびVP1の発現は著明に低下している。

immunoblottingでも同様の結果が得られた。次にsiRNA処理によるagnoprotein, VP1のmRNAの発現量の変化をRT-PCR法にて定量した。その結果右下図のようにsiRNA処理後12および24時間後にRNAの発現量は約50%程度に低下した。また感染価の指標である赤血球凝集能(HA)価を測定したところHA価はsiRNA処理群で有意に低下していた。

以上の結果からJCVのcodeする後期蛋白であるagnoproteinおよびVP1に対するsiRNAは、JCVの後期蛋白の発現を抑制する事により、JCV感染を抑制する事を明らかにした。

これまでにsiRNAを用いてウイルス感染を抑制した報告は全て、siRNAを感染前もしくは感染と同時に用いていた。しかしながら本実験では感染4日後にsiRNAを用いており、実際のJCV感染の治療を考えた際に、より臨床的に有意義な結果であると考えられた。



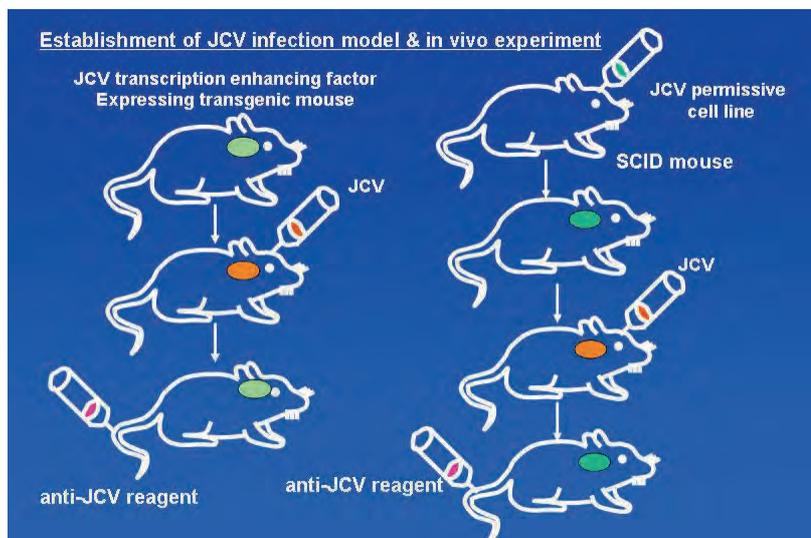


3. 1. 4. 2. 2. JCV 中和抗体を用いた JCV 感染抑制法の開発。(北海道大学大学院医学研究科グループ)

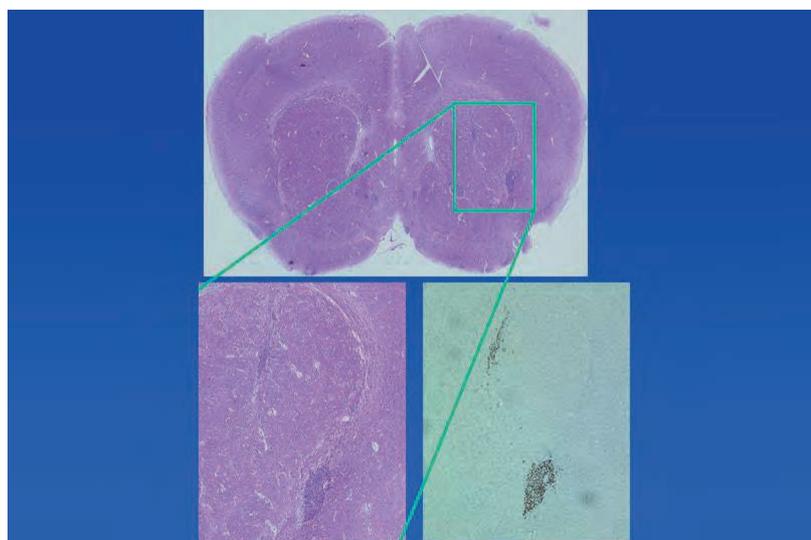
これまでに我々は JCV の受容体がシアル酸を含む糖蛋白質および糖脂質である事を明らかにしてきた。我々は JCV に対する中和抗体を作製し、さらに糖蛋白質を同定することを目的として感染許容細胞である IMR-32 細胞の膜分画を抗原としてマウスに免疫して monoclonal 抗体を作製した。monoclonal 抗体の screening は抗 VP1 抗体 VLP を用いた immunoscreening 法を開発して行った(左上図)。このようにして単離した抗体で immunoblotting を行ったところ、IMR-32 細胞および HEK293 細胞で分子量約 60kDa の蛋白質を認識している事が判明した(左下図)。この抗体は右上図のように JCV また VLP の IMR-32 膜蛋白への結合を抑制し(右上図)、また JCV 感染後の蛋白発現を抑制したことから(右下図)、JCV 感染に対して抑制効果を有している事が明らかになった。現在この抗体の認識する蛋白質の同定を試みている。

3. 1. 4. 2. 3. JCV 感染モデル動物の開発。(北海道大学大学院医学研究科グループ)

これまでにJCVの種特異性の為に、JCV感染モデルが存在しない事がJCV感染症であるPMLの治療法を確立できない原因の一つであった。我々は以下の2つの方法でPMLのモデルマウスを作製する事を試みている(右上図)。



第一にJCVの転写活性を亢進する因子を中枢神経系に発現するtransgenic mouseを作製し、そのマウスにJCVをinoculationしてモデルを作製して前述したsiRNA等を投与する事により、感染を抑制する。第二にはJCV感染許容細胞を

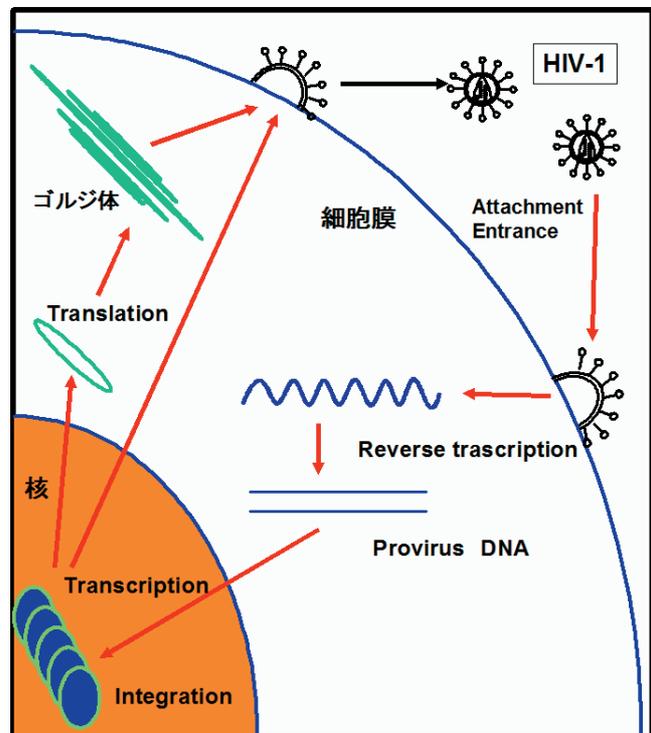


マウスの脳内に移植して、脳内の許容細胞にJCVを感染させて、脳内でJCVを増殖させる方法である。右下図は実際にJCV感染許容細胞をマウス脳に移植して5日後の脳のHE染色像と、移植した細胞のマーカで染色した免疫染色の写真である。図に示すように移植後5日においても免疫反応は生じておらず、細胞はマウス脳で生着していることが分かる。現在移植後長期の時期で、細胞の状態を観察する事、および脳内の許容細胞にJCVをinoculationし、マウス脳内でのJCVの感染を誘発する事を試みている。

3. 2. HIV-1複製におけるtopoisomerase Iの役割 (国立感染症研究所グループ)

後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであるhuman immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)に対する治療は、複製機構中ではたらくウイルスの酵素を標的として現在行われている。すなわち、HIV-1 ゲノム RNA を DNA に変換する逆転写酵素と、ウイルス粒子の発芽後、ウイルスのポリペプチドを切断し機能タンパクを作成するタンパク分解酵素の二つである。他方、HIV-1 はミューテーションや組換えを起こしやすいウイルスであることも知られており、治療薬(酵素阻害剤)に対するエスケープミュータントの出現が常に問題になっている。HIV-1の複製サイクルに関する新しい知見は抗ウイルス剤開発の新しい標的となり、現在でも転写、組み込み、発芽、エントリーにかかわるウイルス及び、宿主因子に対する抗ウイルス剤が開発途中にある。本項ではゲノム RNA と宿主 topoisomerase I の関係について新たに見出された機構を紹介する。耐性株の出現しにくい抗 HIV-1 剤開発の基礎となることを目的とした。

HIV-1 の複製過程ではウイルスのレセプターへの結合(attachment)から侵入(entrance)と進み粒子内のゲノム RNA の逆転写(reverse transcription)に至り、ウイルス DNA が標的細胞内にできあがる(右図)。その後、ウイルス DNA は核内へ侵入し、染色体 DNA へ integration する。そこから自らのプロモーターを使用し、RNA が転写(transcription)され翻訳(translation)される。ゲノム RNA の特異的な2次構造はウイルスポリペプチドの zinc finger に認識され共に発芽し粒子を形成する。

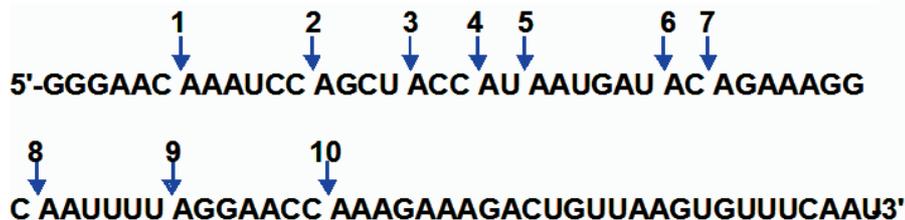
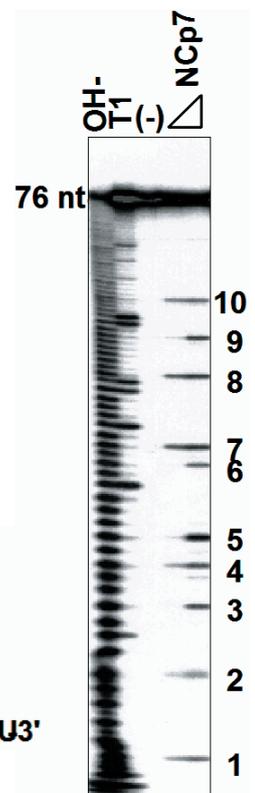
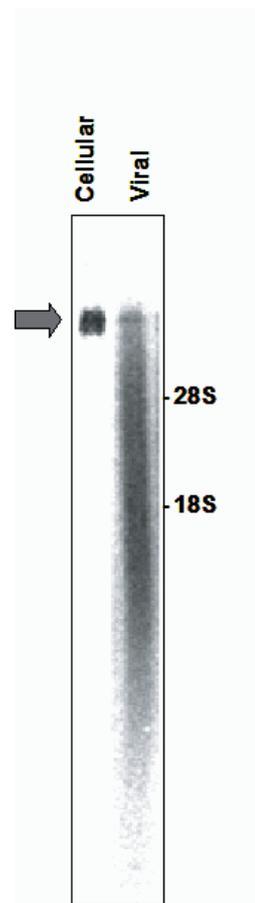


次に HIV-1 ゲノム RNA の細胞内と粒子内における性状の違いについて説明を加える。複製サイクルのうち、HIV-1 のゲノム RNA を細胞とウイルス粒子に分けて調べた。

細胞由来のゲノム RNA からは 9.7 kbp の全長の mRNA を抽出することができた(右図)。しかしながら、ウイルス粒子を遠心分画から得たゲノム RNA はホルムアルデヒドゲル中でスメアとしてしか検出することができなかった。このようにレトロウイルスのウイルス粒子中 RNA に安定性がないことは以前から報告されている。しかしゲノム RNA の崩壊は感染性に影響を及ぼさないことも報告されており、ゲノムの崩壊とその後の複製機構の関係は謎とされていた。

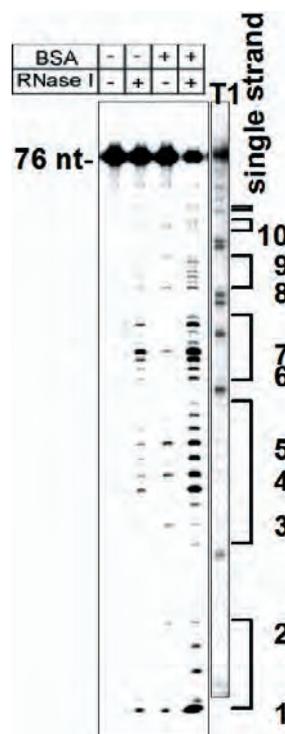
この粒子中のゲノム崩壊を説明するために、HIV-1 のゲノム RNA のうち 2 次構造をとりやすいところを選び、T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成し解析した。その結果、少なくとも、gag の 5' 側にある dimer initiation site や gag の C 末に近い p7 の領域を合成した RNA は NCp7 というウイルスの RNA 結合タンパクや、デタージェントの存在下に 10ヶ所で著名に切断されることが判明した(右下図)。

同じ合成 RNA をアルカリ処理したラダー (OH⁻) や RNase T1(T1) で処理したサンプルと比較して得た、P7 領域の切断部位を下図に示す。どれも CA または UA 間を切断していることが判明した。



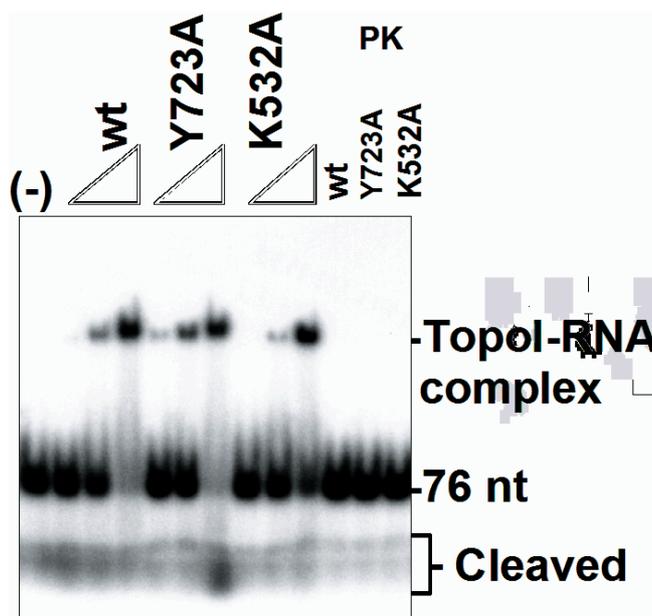
この切断は高濃度の tRNA の影響を受けず、RNaseT1 の切断によって切断が阻害を受け、タンパク濃度、RNA 量に対して切断効果がベルシェイプを示すなど RNase の作用によって切断されたとすると辻褃が合わないことがわかった。また切断端は 2',3'-cyclic phosphate でこれは後に述べるように topoisomerase I の再結合活性の基質となりうる構造である。

この切断と構造の関係を一本鎖 RNA を非特異的に切断する RNase I を使用して調べた(右上図)。RNase I の切断に対し、感度が高いところと、低いところがあり、ステムループ構造を形成していることが示唆された。BSA を用いて切断を再現させた前頁で示した10ヶ所の切断はステムループ構造のループ上で生じていることがわかった。



宿主 topoisomerase I は HIV-1 粒子へ取り込まれることが知られている。

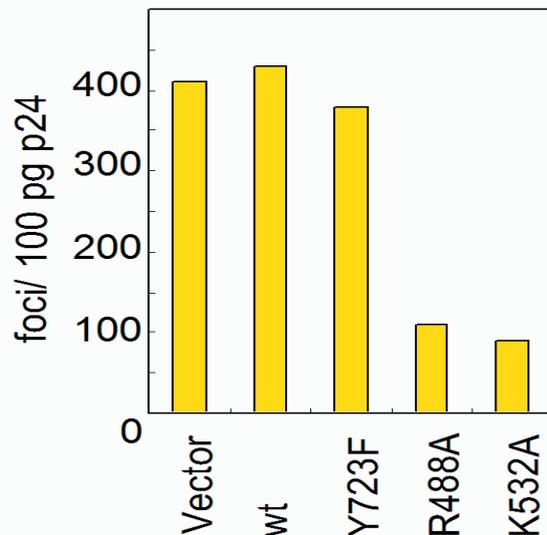
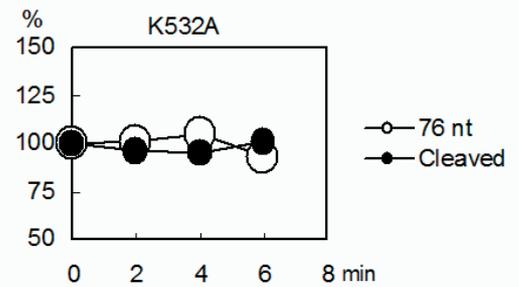
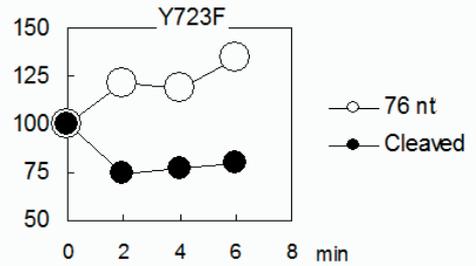
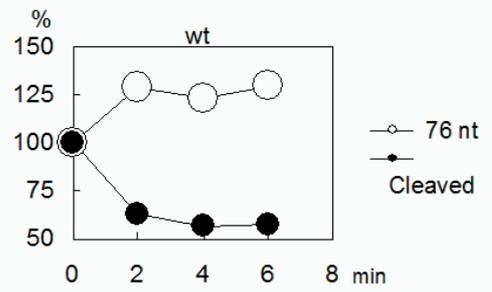
そこで、topoisomerase I はどのような機構で粒子中へ取り込まれていくのか調べた。一本鎖 RNA 及び、二本鎖 RNA には結合しなかったため、RNA の 2 次構造を直接認識するのではないかと考え、p7 RNA と topoisomerase I をインキュベートし、アクリルアミドゲル中での移動度を調べた(右下図)。その結果、topoisomerase I の野生株、ミュータント(Y723F, K532A) (5) は同様に結合することが判明した。これらの結合は SDS 処理やタンパク分解酵素(PK)で消失したため結合には共有結合を含まないことが分かり、またステムループ状のより短い RNA(21nt)に対しても同様に結合することができた。



この RNA と topoisomerase I の結合は ATP により解離することも判明した。そのとき同時に、topoisomerase I は切断されている RNA を再結合することも判明した。右図では p7 RNA (76 nt) をアルブミンと topoisomerase I の存在下に切断させ、ATP を加えて再結合した RNA (76 nt) と切断されたままの RNA (Cleaved) を 2 分おきに調べた結果を示す。再結合活性を有するミュータント (Y723F) は野生株と同様に再結合を行い、消失したミュータント (K532A) は再結合させることができなかった。

topoisomerase I はウイルスに取り込まれ、cDNA 合成を上昇させることも判明している。そこで HIV-1 ウイルス産生細胞において topoisomerase I またはそのミュータントを発現させ、同量のウイルスを別の細胞へ感染させ感染価を測定した (右下図)。

RNA の再結合能を有する野生株、Y723F を含むウイルスの感染価は再結合能を失ったミュータント R488A および、K532A を発現させた細胞由来のウイルス感染価の 4 倍程度を示した(7)。このことはウイルスへ取り込まれた topoisomerase I の再結合活性が HIV-1 の切断したゲノム RNA の修復に必要であったことを示唆した。



一方、ATP または非加水分解性アナログ AMP-PNP は topoisomerase I の活性を増強することが知られており、ウイルスを RNA template とした cDNA 合成系における影響を調べた (右上図)。

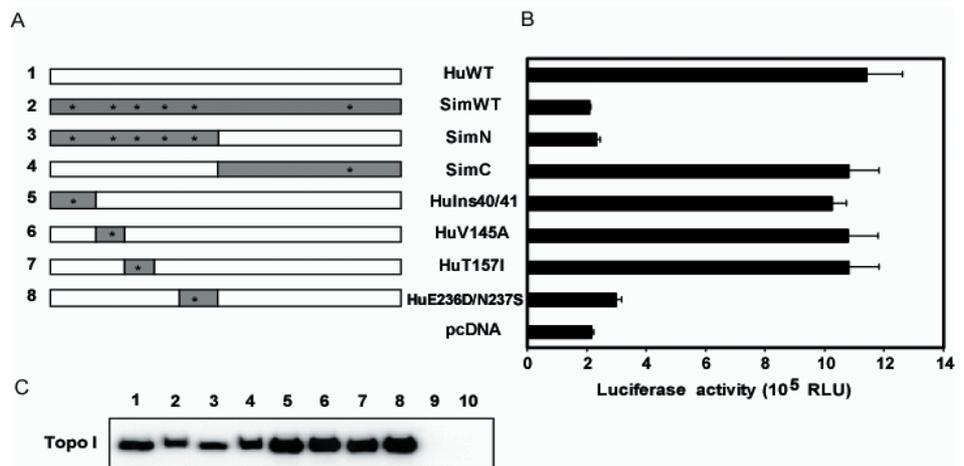
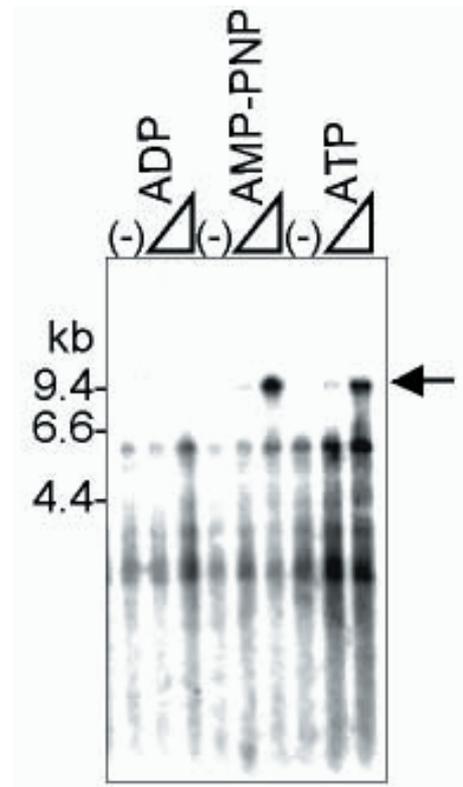
ATP および AMP-PNP は cDNA 合成を濃度依存的に上昇させたが、ADP 存在下における cDNA 合成は変化しなかった。

HIV-1 は宿主域が狭いウイルスであることも知られており、サル細胞においても全く複製しないことも知られている。われわれはウイルス産生細胞をサル細胞としたとき著明に HIV-1 の感染価が低下することを見出したため、サル topoisomerase I の HIV-1 複製に与える影響を調べるためにサル topoisomerase I を

クローニングした。その結果、8 つのアミノ酸がヒトと異なることがわかった。そこで、ヒト topoisomerase I のア

ミノ酸を一ヶ所ずつ、サル型へ変更させていき HIV-1 産生サル細胞にて発現させ、感染価を比較した (右下図)。ポイントミューテーションをヒト

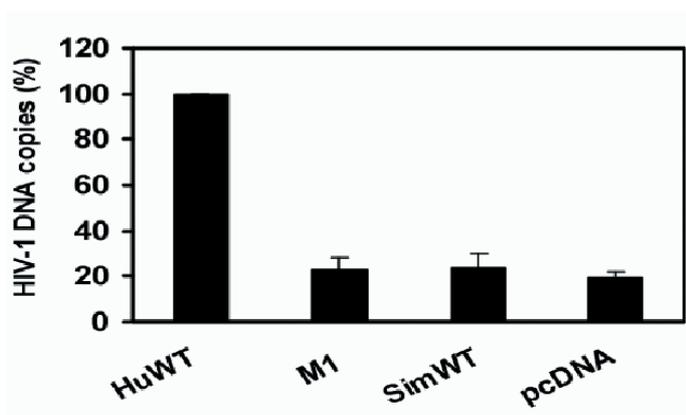
Topo I へ導入しウイルス産生細胞で発現させ (右下図 C) ウイルスの複製を調べたところ (右下図 A)、236 と 237 番のアミノ酸をサル型に変更したとき (E236D/N237D) に複製能が低下することが判明した (右下図 B)。



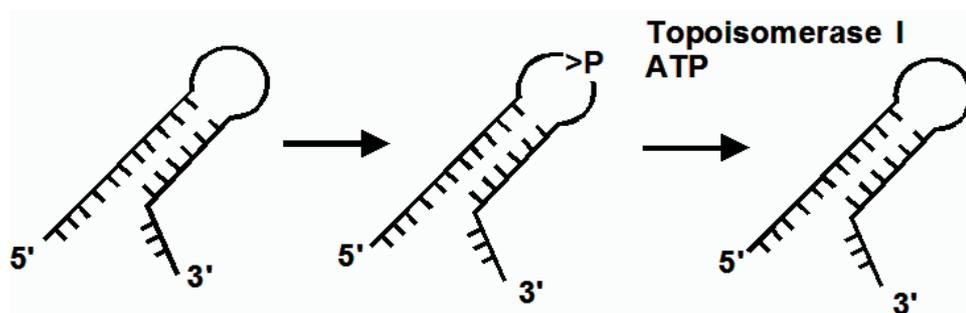
またヒト topoisomerase I の発現による cDNA 合成とサル型の topoisomerase I (M1、SimWT) 発現による cDNA 合成を比較したところ、サル型では、cDNA 合成を回復させることができなかつたため、逆転写における阻害であることが判明した (右図)。

サル細胞で HIV-1 が複製しない理由の一つにサル topoisomerase I が HIV-1 の cDNA 複製を阻害することがあると考えた。

以上をまとめると RNA のステムループは topoisomerase I の認識する構造であり HIV-1 の RNA ゲノムもその例外ではない (下図)。



ステムループ RNA のループ部分の CA または UA は切断しやすい。しかし ATP の存在下に topoisomerase I は再結合させ修復させることができると考えられた。この機構は標的細胞での cDNA 合成時に必要となる。本機構を標的とした阻害剤の選択はウイルス因子と宿主因子の相互作用を標的とする、耐性株の出現しにくい抗 HIV-1 剤開発へつながっていくと考える。



3. 3. C3d 融合ヘマグルチニンの経鼻接種によるインフルエンザウイルス感染防御の研究 (国立感染症研究所感染病理部グループ)

経鼻ワクチンによる粘膜免疫応答を増強するためにコレラトキシン B サブユニット(CTB*)や大腸菌の易熱性毒素(LT)などが粘膜アジュバントとして使われてきた。しかしこれらの毒素は同時に下痢を起こす原因となる等問題点がある。粘膜免疫応答を惹起するために CTB や LT 等の毒素を用いない方法が望まれている。鼻腔でのインフルエンザに対する防御粘膜免疫を誘導するために補体分子である C3d とインフルエンザウイルスの分泌型ヘマグルチニンを融合させたタンパクを作成しマウスインフルエンザモデルを用いて有効性を調べた。C3d 融合分泌型ヘマグルチニン、分泌型ヘマグルチニン及び膜貫通型ヘマグルチニンをアジュバントとして CTB*を用いた群と用いない群とに分けマウスに経鼻接種を行った。CTB*をアジュバントとして用いた群では全てのマウスにおいてウイルスヘマグルチニン特異的な鼻腔の分泌型 IgA と血中の IgG を誘導が確認された。さらにウイルスのチャレンジ感染に対し完全な防御が可能であった。一方 CTB*を用いない群においては C3d 融合 HA 接種群でのみ鼻腔での HA 特異的な分泌型 IgA 及び血中 IgG の誘導が認められウイルス感染を完全に防御した。このように C3d 融合インフルエンザヘマグルチニン抗原は安全で効果的な粘膜ワクチンの有効な方法で有ることが示された。

ワクチン開発においては有効性と安全性が重要な考慮すべき点である。粘膜免疫機構はインフルエンザウイルス感染における最初の免疫防御機構である。呼吸器粘膜はインフルエンザウイルス感染と宿主の免疫がインフルエンザを攻撃する最初の間である。分泌型 IgA 抗体はこの機構では主な効果分子でありインフルエンザウイルスに対する上気道での最初の防御ラインとしての働きは研究されてきた。インフルエンザはその表面抗原であるヘマグルチニン分子の抗原性を変えて毎年世界的流行を繰り返す呼吸器疾患で特に小児における脳症と老人の肺炎が致死的であり対策が必須である。脳症の予防にはインフルエンザ感染の予防が重要でありウイルスを感染前に粘膜で防御する分泌型 IgA の誘導は効果を発揮する。不活化ワクチンの皮下接種により血中 IgG 抗体の誘導が可能であるが血中の IgG は同型の

ウイルスに対する防御は行う事が可能であるが亜型の違うウイルスに対して防御効果が低い。一方粘膜に分泌される IgA 抗体は交叉防御能を有し亜型の異なるウイルスに対して防御可能である。よって型の予測が不可能なウイルスの防御には分泌型 IgA が大変有利である。

我々は不活化インフルエンザウイルスワクチンを CTB*と共に経鼻接種することにより交叉防御能の強い分泌型 IgA の誘導による

インフルエンザ感染防御の研究を行っ

てきた。経鼻接種において CTB*は有

効なアジュバントではあるが鼻汁分泌

等の副作用があるためトキシンを用い

ないアジュバント、もしくはアジュバント

を必要としないワクチンの開発が必要

である。補体分子である C3d を用いた

DNA ワクチンにおいて免疫が増強される事

が報告されている。C3d は補体受容体である

CD21 に結合し B 細胞を活性化する。我々は

HA と C3d の融合タンパクが B 細胞上の

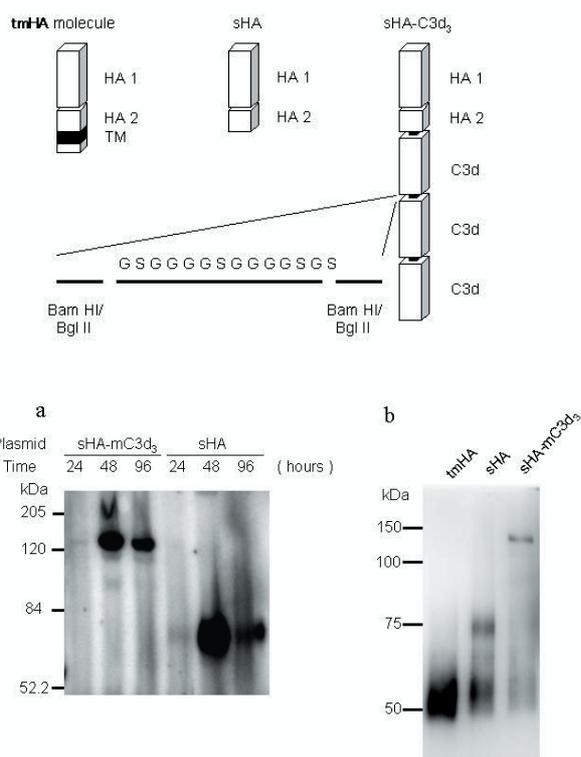
anti-HA レセプターと CD21 に結合し情報伝

達により活性化する事を仮定し、HA-C3d を抗原とした経鼻ワクチン接種を行った。本研究に

おいてアジュバントを用いない sHA-mC3d₃ を経鼻接種する事によるインフルエンザウイルスの感染防御を試みた。

・ リコンビナントワクチンの発現と精製

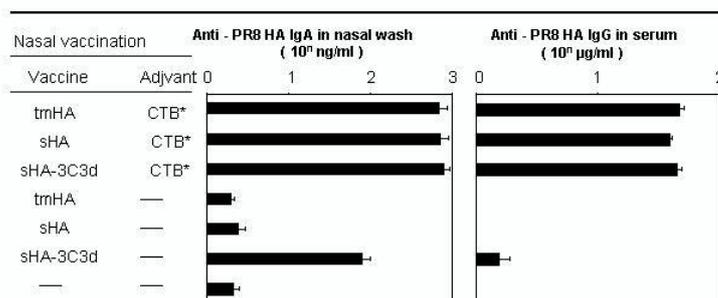
sHA 及び C3d 融合分泌型ヘマグルチニン sHA-mC3d₃ 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし培養上清よりリコンビナントタンパクを回収した。それぞれのリコンビナントタンパクの構造を右上図に示す。発現ベクターをトランスフェクションした培養上清中のリコンビナントタンパクの発現量をウエスタンブロッティング法で確認を行った。右下図に示すごとく



sHA は 65 kDa 付近に sHA-mC3d₃ は約 120 kD 付近にトランスフェクション後 48 時間で認められた。sHA 及び sHA-mC3d₃ タンパクは抗 HA アフィニティーカラムで精製した。tmHA はインフルエンザウイルス A/PR/8/34 (PR8, H1N1)粒子より抗 HA アフィニティーカラムを用いて精製された。精製された tmHA, sHA そして sHA-mC3d₃ はウエスタンブロッティングで確認してワクチンとして用いた。

・ HA の経鼻接種による抗体応答

tmHA, sHA, sHA-mC3d₃ などいろいろな形のインフルエンザウイルス HA 分子で経鼻免疫後の鼻腔洗浄液中の抗 PR-8HA 特異的 IgA 及び血中の IgG を ELISA 法を用い測定した。右図に示すごとく CTB* をアジュバントとして用いた場合 tmHA,



sHA, sHA-mC3d₃ 共に高いレベルの HA 特異的 血中 IgG 抗体、鼻腔洗浄液 IgA 抗体の応答が得られた。しかし CTB* をアジュバントとして用いない場合には sHA 及び tmHA のみでは抗体応答はえられなかった。一方 sHA-mC3d₃ を接種した群では CTB* を用いなくても HA 特異的 血中 IgG および鼻腔洗浄液中の IgA が認められた。アジュバント無しでも sHA-mC3d₃ のみでも特異的抗体誘導が可能であり C3d 融合タンパクは抗原としてのみでなく抗体誘導能も持ち合わせるワクチン分子であることが示された。

・ インフルエンザウイルス感染の防御

次に sHA-mC3d₃ の経鼻接種によるインフルエンザウイルス感染防御能を調べた。免疫をしていない対象群においては 100pfu, 1000pfu のチャレンジ感染に対し 3 日後の鼻腔洗浄液中のウイルス価はそれぞれ 10^{3.2} PFU/ml , 10^{4.3} PFU/ml となった。又、アジュバントを用いず sHA 及び tmHA 単独で免疫した群においてはまったく防御効果が認められなかった。ところがアジュバントを用いず sHA-mC3d₃ 単独での免疫群では低ウイルス価の感染に対しては

完全防御、高ウイルス価の感染に対しては部分防御が認められた。CTB*をアジュバントとして用いた群は全て完全防御が得られた。

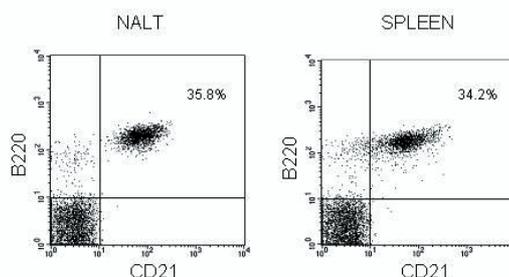
・ NALT の B 細胞における CD21 の発現

鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) と脾臓における B 細胞上での C3d のレセプターである CD21 の発現を解析した。Balb/c マウスより得られた NALT 及び脾臓の細胞を FITC ラベルの抗 CD21 抗体及び APC ラベルの抗 B220 抗体で染め、フローサイトメトリーを用いて解析した。右下図に示すごとく NALT では 35.8% の細胞が B220⁺/CD21⁺ であり脾臓細胞においては 34.2% の細胞が B220⁺/CD21⁺ であった。

今回の研究により単独の経鼻接種ではではそれ自身に抗体誘導能を持たないインフルエンザウイルスの sHA に補体分子である C3d を融合する事によりコレラ毒素 (CTB*) 等のアジュバントを用いずに粘膜での分泌型 IgA, 及び血中の IgG を誘導する事ができた。ここで誘導される分泌型 IgA は交叉防御能をもち亜型の異なるウイルスに対しても防御が可能であり優れた防御効果を示す。また本来生体の持つ補体成分である C3d を用いる事により抗体誘導能を高める事ができワクチン開発において最も重要な安全性と予防効果の両方兼ね備えたワクチンモデルを示す事ができた。

C3d のレセプター分子である CR1 (CD35) 及び CR2 (CD21) は B 細胞や濾法樹状細胞 (FDC) に発現していることが知られている。今回我々は CD21 が NALT での B 細胞上に発

Nasal vaccination		Challenge virus titer (PFU)	Nasal virus titer (PFU / ml ; 10 ⁿ)
Vaccine (1µg)	Adjuvant (1µg)		
tmHA	-	100	3.1 ± 0.2
sHA	-	100	3.2 ± 0.1
sHA - mC3d ₃	-	100	< 1*
-	-	100	3.2 ± 0.2
tmHA	-	1000	4.3 ± 0.1
sHA	-	1000	4.6 ± 0.2
sHA - mC3d ₃	-	1000	2.8 ± 0.3*
-	-	1000	4.3 ± 0.2
tmHA	CTB*	1000	< 1*
sHA	CTB*	1000	< 1*
sHA - mC3d ₃	CTB*	1000	< 1*



現し C3d 融合経鼻ワクチンの効果増強に働いている事が示唆された。C3d 融合タンパクによる経鼻ワクチンは抗原分子を変えることにより他のウイルスへの応用も可能であり、特に気道を主な感染部位とする呼吸器感染症に対しては有効な手法である。

3. 4. 細胞内シグナル伝達の解析(大阪大学微生物病研究所グループ)

3. 4. 1. FRET を利用した Rho ファミリーG 蛋白質モニターの開発

低分子量 GTP 結合蛋白質は細胞の増殖、分化、形態形成、輸送を初めとする、多様な細胞内のイベントを制御する分子スイッチである。中でも Rac、Cdc42、Rho を主たるメンバーとする Rho ファミリーG 蛋白質は、アクチン細胞骨格の再構成を介して、細胞の形態や運動性などを制御する。脳の発生過程における軸索やシナプスの形成に、またウイルス感染の過程における Rho の役割は重要で、特にアデノウイルス等がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれるためには、Rac/Cdc42 依存性の細胞骨格再構成が必須である。本研究では、ウイルス感染による神経細胞の応答を解析するにあたり、細胞内情報伝達の活性化とそれに伴う形態変化を同時に検出する実験系の確立を目的に、その基礎として蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) を用いたプローブ分子の開発を行った。

FRET は、ドナーとアクセプターの 2 つの蛍光分子間で起こるエネルギー授受の現象で、FRET 効率を指標に蛋白質相互作用を測定する技術が注目を集めている。具体的にはドナーに緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) のシアン色変異体 (cyan-emitting mutant of GFP, CFP) 、アクセプターに GFP の黄色変異体 (YFP) を用いる。CFP の吸収スペクトルが YFP の励起スペクトルと重複するため (図 1A)、CFP と YFP が 10 nm 以下というごく近傍に存在する時のみ、CFP の吸収エネルギーが YFP に遷移して、YFP の蛍光が検出される。我々は、細胞が生きたまま蛋白質の活性化を観察すべく、FRET の原理を用いたプローブ分子の開発とそれを用いた解析を進めてきた。これまでに Ras ファミリー分子の活性化を可視化するプローブ分子、Raichu (Ras and the interacting protein chimeric unit) と、チロシンリン酸化を可視化するプローブ分子 Picchu (Phosphorylation indicator of Crk chimeric

unit) を開発し、増殖因子依存性の細胞内情報伝達機構を時空間的に解析した。これらの開発によって得られた知見を元に、生きた細胞で Rho ファミリー G 蛋白質の活性化を検出するプローブ分子を開発した。

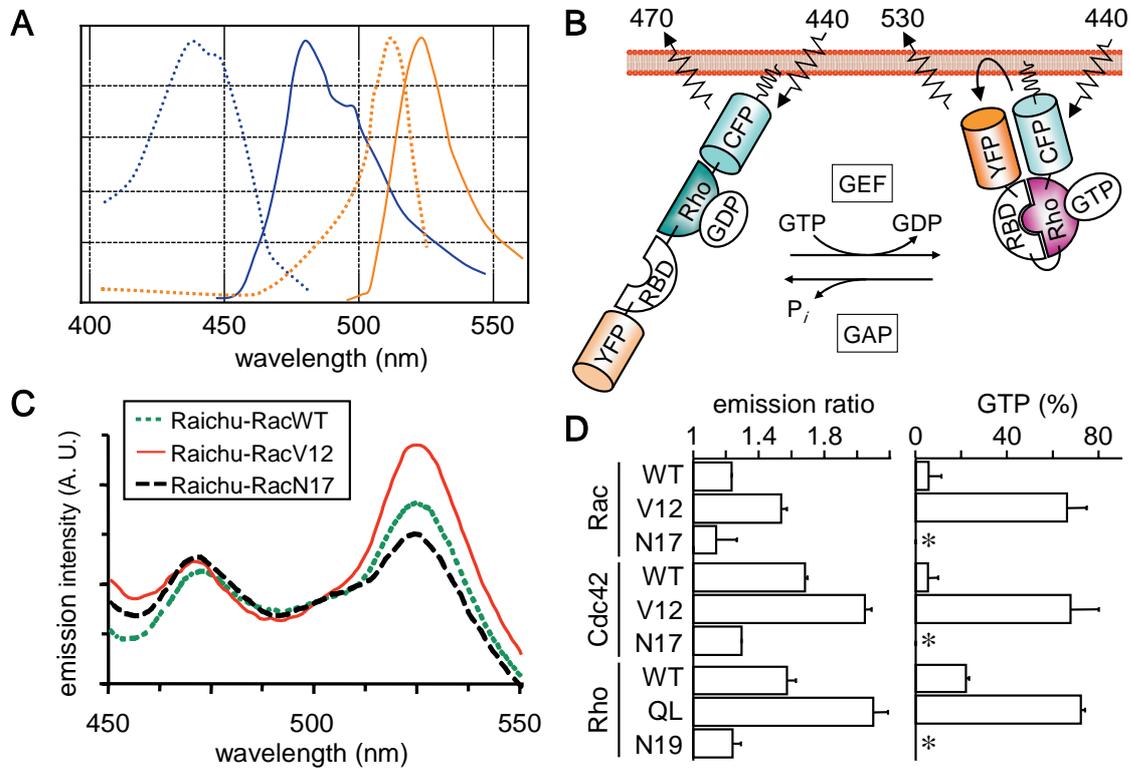


図1 Raichu の概要 (A) CFP(青線)とYFP(黄線)の励起・吸収スペクトル。励起スペクトルを破線、吸収スペクトルを実線で表す。(B) Raichu-Rho の構造。RBD, Rho/Rac/Cdc42 binding domain。(C) Raichu の吸収スペクトル。各 Raichu プローブを発現した 293T 細胞を可溶化し、440 nm で励起したときの吸収スペクトルを蛍光分光光度計で測定した。(D) FRET 効率と GTP 結合率との相関。各プローブを発現する 293T 細胞を 2 組用意し、1 組は (C)の方法で得られたスペクトルから YFP/CFP の比を算出した。他の 1 組は正リン酸ラベルした後、結合したグアニンヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーで分離、定量した。
*N17/N19 変異体は核酸と結合しない。

プローブ分子の構造は N 末端側から、YFP、標的蛋白質の Rho ファミリー結合配列、G 蛋白質、CFP、膜局在シグナルである脂質修飾配列からなり、Raichu-Rac、Raichu-Cdc42、Raichu-RhoA と命名した (図 1B)。Rac と Cdc42 の標的分子には PAK1 を、Rho には PKN を用いた。Rho ファミリー蛋白質は活性化状態の時のみ標的分子に結合するので、Rho の活性

化に伴いプローブ分子の構造変化が起こり、CFPとYFPが近接する。すなわちRhoの活性化状態によってFRET効率が変化することが期待される。実際に野生型、恒常活性化型、優勢劣性型のRaichu-Racを作製しFRET効率を測定すると、活性化型>野生型>劣性型の順にFRET効率が高かった(図1C)。Raichu-Cdc42/Rhoについても同様の結果が得られた。この時プローブ分子に結合するGTPとGDPの比を測定したところ、GTP結合率とFRET効率は正の相関を示した(図1D)。したがって、Raichuは細胞内の局所において、活性化因子(グアニンヌクレオチド交換因子、guanine nucleotide exchange factor, GEF)と不活性化因子(GTP水解促進因子、GTPase activating protein, GAP)の活性のバランスをモニターすることが出来ることが解った。そこで、このモニター分子を使用し、生きた細胞におけるRhoファミリー蛋白質の活性化を観察した。

3. 4. 2. 細胞運動時におけるRac1、Cdc42の活性化

完成したプローブ分子を用いて、細胞運動におけるRacとCdc42の時空間的活性制御機構を解析した。ヒト繊維肉腫由来のHT1080細胞に、Raichu-RacとRaichu-Cdc42を発現させ、微速度多重蛍光観察装置と冷却CCDカメラを装着した落射式蛍光顕微鏡で画像を撮影した。その画像ファイルを元に、画像解析装置を用いてFRET効率を擬似カラーで表示した。細胞がランダムに移動する時、進行方向の先端端において、RacとCdc42の高い活性が観察された(図2A)。細胞が進行方向を変える際には、RacとCdc42はともに速やかに不活性化し、新たに生じたラメリポディアで活性化した。細胞の後方ではRacとCdc42の活性は低かった。強拡大で観察すると、図2Bに示すようにRacは先端端全体で活性が高いのに対し、Cdc42は先端端の最先端で限局して活性化していた。RacとCdc42は局所でのアクチン再構成を介して、細胞運動を制御していることが示唆された。

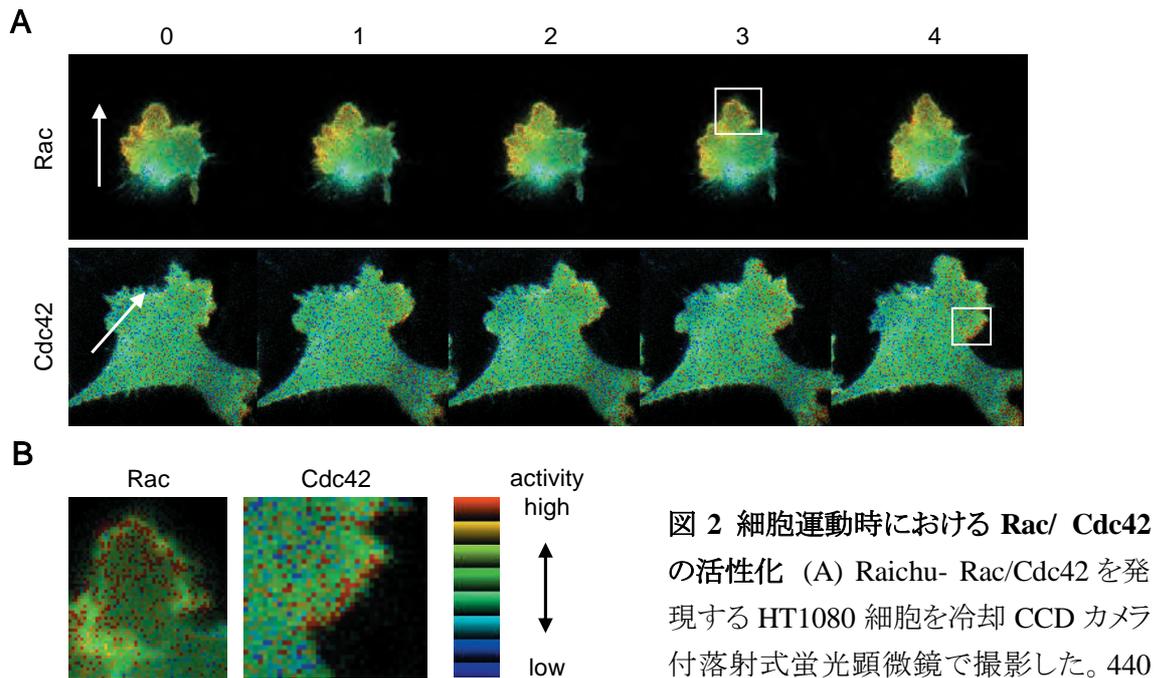


図 2 細胞運動時における Rac/ Cdc42 の活性化 (A) Raichu- Rac/Cdc42 を発現する HT1080 細胞を冷却 CCD カメラ付落射式蛍光顕微鏡で撮影した。440 nm の励起光で得られた CFP と YFP の

画像を取得し、画像解析ソフトで両者の比を算出し、図に示すように赤から青の擬似カラーで FRET 効率を表示した。画像の上に撮影時刻 (単位:分) を、1 枚目の写真に細胞の進行方向を矢印で記す。(B) 局所での Rac/Cdc42 の活性化。(A)で白い四角で囲んだ部分の拡大像。

3. 4. 3. 細胞分裂時の Rho 活性化の時空間的制御

Raichu-RhoA、Raichu-Rac、Raichu-Cdc42 を HeLa 細胞に導入し、細胞分裂時の Rho ファミリー蛋白質の活性化を観察した (図 3)。間期にはいずれの活性も細胞膜で高く、M 期に入ると速やかに不活性化した。分裂後期には RhoA のみが分裂溝を含む細胞膜で活性化した。Rac の活性は紡錘体中間部で低く、分裂終期に両極の細胞膜で活性化した。Cdc42 は分裂中の細胞膜での活性は低く、細胞質分裂中は細胞内の膜分画で活性が高かった。これらの結果は、アクチオシンの収縮に対し正に働く Rho と、負に働く Rac/Cdc42 が協調して分裂溝で機能することにより、結果として収縮環の速やかな収縮を促し、細胞質分裂を正に制御することを示している。

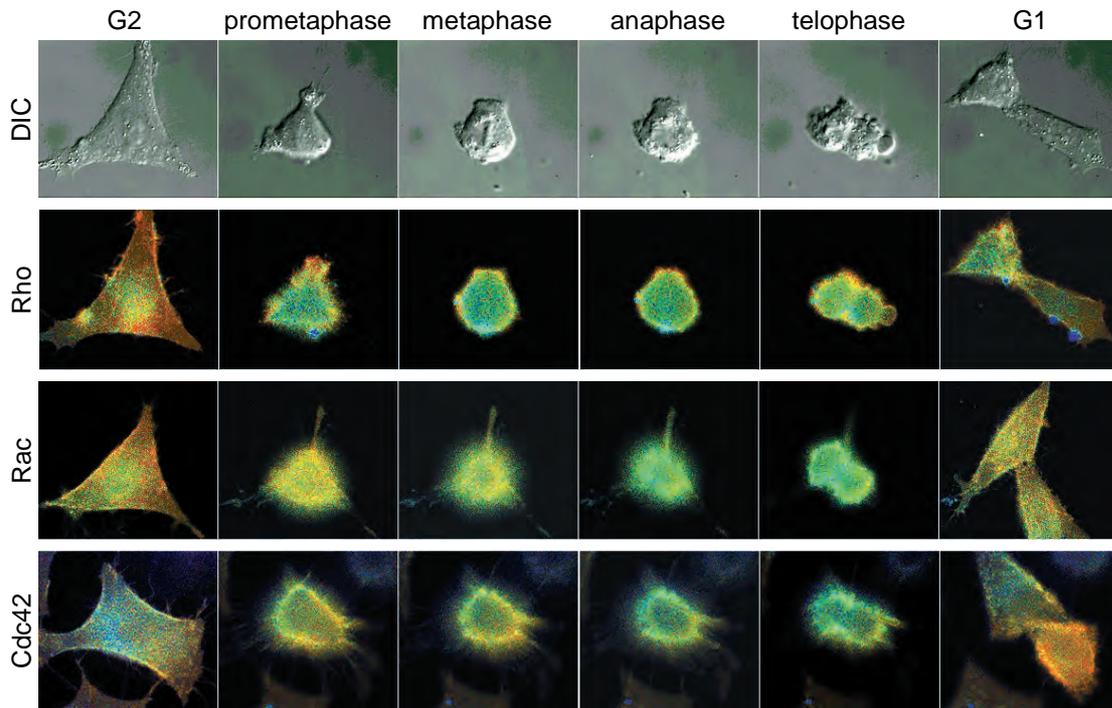


図3 細胞分裂時の Rho ファミリー蛋白質の活性 左に示す各 Raichu プローブ分子を発現する HeLa 細胞を、図2と同様の方法で画像化した。細胞分裂の時期は微分干渉像を指標に決定し、図の上に記した。

このように Raichu を用いることで、局所での Rho ファミリー蛋白質の活性変化と細胞の形態変化とを同時に検出できた。これは細胞を可溶化して行う研究では得られない知見を可視化できる画期的なテクノロジーである。また、Raichu は生きた細胞を用いた高速かつ簡便な GEF と GAP のスクリーニングにも応用可能であり、Rho ファミリーに対する新規活性化因子 2 分子と新規不活性化因子 2 分子を同定した。今後はこれらのプローブ分子を活用し、実際にウイルス感染により惹起される神経細胞の情報伝達経路を可視化し、時空間的に解析したい。

3. 5. 三量体 GTP 結合蛋白質 $G_{\alpha i}$ に結合する rap1GAP の新しい isoform (国立循環器病センターグループ)

Adenovirus 等のウイルス感染症において重要な役割を有する低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap1 は Ki-Ras の transform 能を抑制する機能を有する蛋白質として発見された。Rap1 は Ras の effector 分子 Raf, RalGDS, PI3-kinase, AF-6 とその effector domain を介して結合することにより Ras の作用に拮抗すると考えられている。つまり、Ras/Raf/Erk の活性化系に対して Rap1 は抑制的に働くと考えられる。一方、Rap1 は Ras とは違った系でそれぞれの effector 分子を活性化すとも報告されている。低分子量 GTP 結合蛋白質は GDP/GTPexchange factor (GEF)により活性化され、GTPase 活性化因子(GAP)により抑制される。これまで、細胞外刺激によりどのように GEF が調節されているのかは Ras に関しては EGF 受容体・adaptor 分子 Shc/Grb2・GEF(Sos)により、また Rap1 に関しては Crk・C3G 系により明らかにされた。しかし、Rap1 の負の制御を行う rap1GAP がどのように制御されているのかは明らかになっていなかった。

7 回膜貫通型受容体は三量体 GTP 結合蛋白質を介して細胞外刺激を細胞内情報伝達系に伝える。三量体 GTP 結合蛋白質はこれまで β γ subunit から Src を介して EGF 受容体のトランス活性化とそれに引き続く Ras の活性化、或いは Ca^{2+} により活性化される Pyk2 分子による Ras の活性化などにより Erk/MAPK 系が活性化されると考えられてきた。

今回我々は、Rap1 の水解促進因子 rap1GAP の新たな isoform である rap1GAPII が G_i の α サブユニットに結合すること、つまり 7 回膜貫通型受容体刺激により Rap1 の水解が促進され、その結果として Rap1 の非活性化により相対的に Ras/Erk/MAPK が活性化されることを見出した。

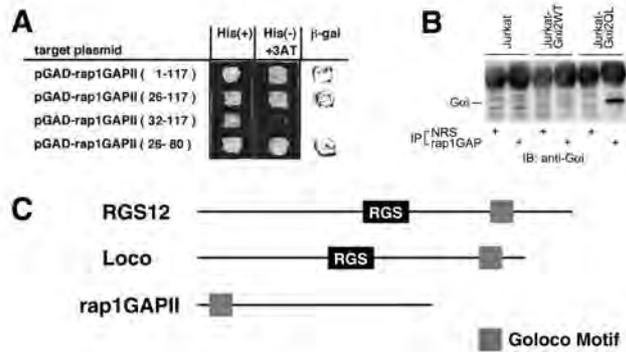
• $G_{\alpha i}$ に結合する rap1GAP のアイソフォーム rap1GAPII

$G_{\alpha i1}$ を bait にして two-hybrid assay を行ったところ、これまで報告されている rap1GAP より 5'側が 31 アミノ酸長い蛋白質をコードする cDNA がクローニングされ、rap1GAPII と命名した。結合ドメインを同定するために種々の長さの rap1GAPII の prey を構築し結合を調べた

ところアミノ末端が Gαi との結合に重要であることが示された(右上図 A)。

Gαi の水解促進因子 RGS(regulator of G-protein signaling)や *Drosophila* の RGS ホモログ Loco、Gαi と結合すると報告されている蛋白質 LGN, Pcp2 に保存されている GoLoco モチーフが

rap1GAP においては不完全だが 5'側に伸びた rap1GAP アイソフォーム rap1GAPII には存在することが明らかになった(右上図 B)。rap1GAPII が細胞に蛋白質として存在することと GTP-Gαi が結合することは、恒常的に GαiQL(優生活活性化型 Gαi)を発現する Jurakt 細胞を用いて解析した。抗 rap1GAP 抗体で免疫沈降した後、抗 Gαi 抗体でイムノブロットを行うと GαiQL 細胞でより強く Gαi が検出されることから rap1GAPII が存在し、かつ Gαi に結合していることが証明された(右上図 C)。



- rap1GAPII は GTP-Gαi により細胞膜へ translocate する

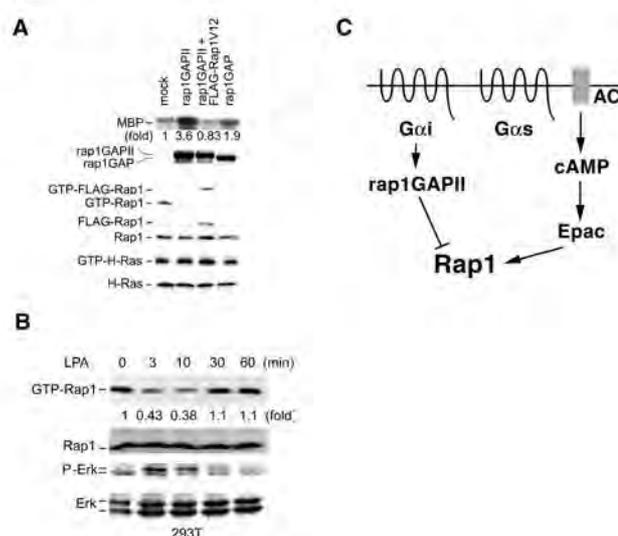
rap1GAPII が Gαi によって活性化される機序として膜への移行をモデルとして考えた。Ras の GEF である Sos、Rap1 の GEF の C3G は膜移行により(Ras の CAAX を C 末端に付加することにより)GEF 活性が顕著となる。同様に GTP-Gαi(Gαi の N 末端がミスチル化・パルミチル化されていることにより膜に存在している)と結合した rap1GAPII が膜に移行するかを調べたところ GTP-Gαi 結合 rap1GAPII は膜に移行していることが明らかになった。これは、LPA(リゾフォスファチジン酸)受容体刺激による rap1GAPII の刺激依存性膜移行を調べる実験および GαiQL の強制発現系での膜分画での rap1GAPII の検出の両方の実験により示された。

- rap1GAPII の活性化による Erk/MAPK 活性化機構

次に、GTP-Rap1 が減少することによる Erk/MAPK 活性化の機序を調べた。HEK293T 細胞に rap1GAPII を強制発現させると Erk2 の活性化が生じること、この Erk2 の活

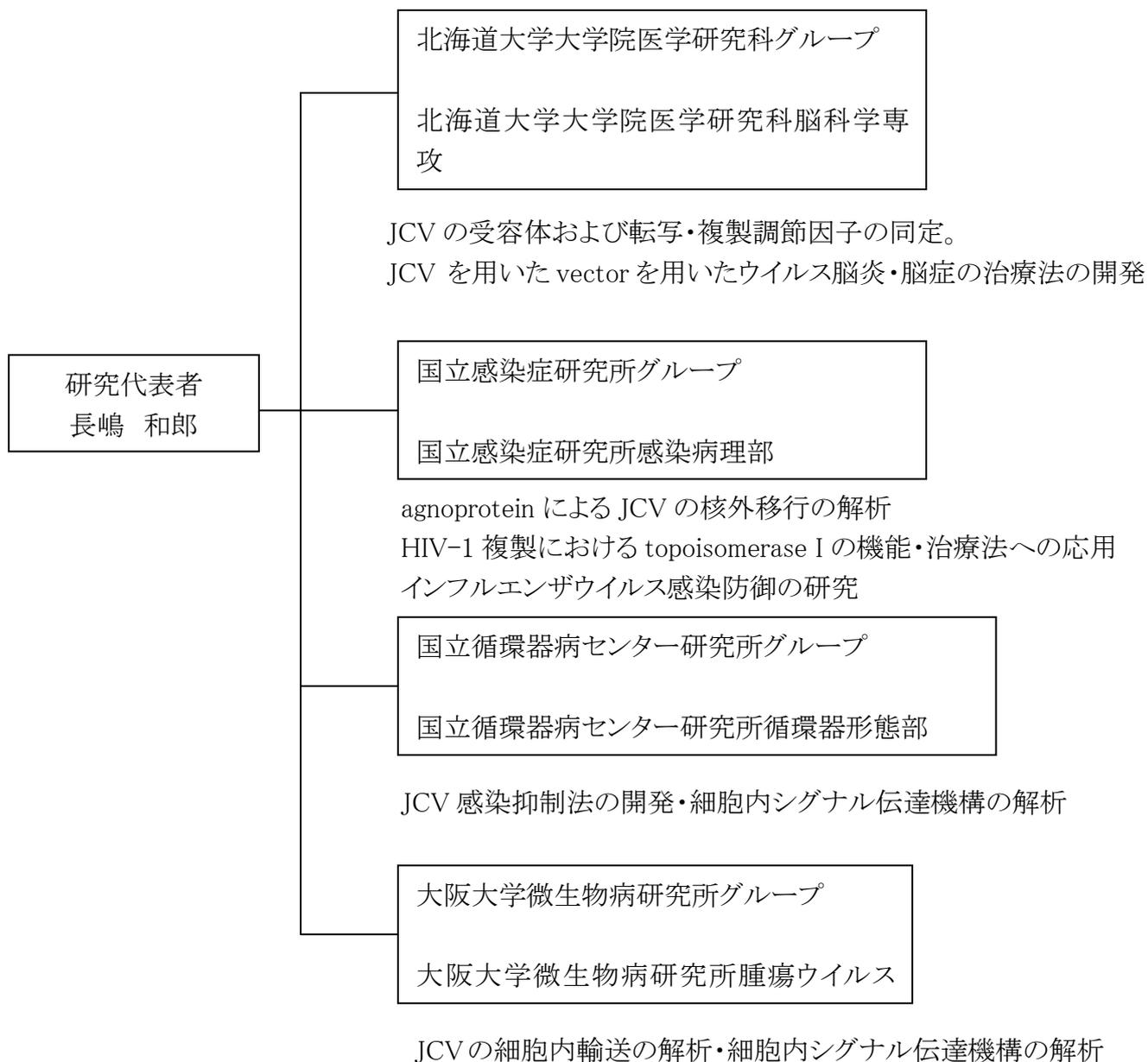
活性化が Rap1 の優生活性型 Rap1V12 を発現させることで抑制されることより Rap1 によって抑制されていた Ras/Raf/Erk 系が、GTP-Rap1 が減少することにより活性化されたと考えられた(右図 A)。生理的条件下で 293T 細胞を LPA 刺激し、GTP-Rap1 と活性化 Erk を調べたところ GTP-Rap1 の減少に反して Erk の活性化が認められた(右図 B)。

以上の研究により Rap1 の GEF として cyclic AMP 依存性に GEF 活性を調節する Epac (cAMP-GEF)が同定された(8)9)。このことは Epac が $G\alpha_s$ /AC(adenylate cyclase)の下流の情報伝達系に位置していることを示唆している。また、AC の抑制作用を有する $G\alpha_i$ が rap1GAPII を活性化することから Rap1 が 7 回膜貫通型受容体からのシグナルにより制御されていることが明らかになった(右図 C)。Rap1 が生体内で Erk/MAPK 系、RalGDS などに対して Ras と拮抗しているのかどうかは依然未解決であるが、この問題を解決するために conditional に rap1GAPII を発現するマウスを用いての研究を現在行っている。



4. 研究実施体制

(1) 体制



(2)メンバー表

研究グループ名:北海道大学大学院医学研究科(研究グループ代表:長嶋和郎)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
澤 洋文	北海道大学大学院 医学研究科	助教授	神経組織特異的転写因子の同定・神経特異的 vectorを用いた脳炎・脳症の治療法の開発	H10,12
田中 伸哉	北海道大学大学院 医学研究科	助教授	神経組織特異的転写因子の同定・シグナル伝 達機構の解析	H10,12
佐藤 真実	北海道大学大学院 医学研究科	技術員	JC VLP および JCV 構成蛋白の電子顕微鏡的 解析	H10,12
渡辺 麻那美	北海道大学大学院 医学研究科	技術員	JCV 感染細胞の免疫染色	H13,9
石田 雄介	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 蛋白の plasmid 作製	H10,12-H14.8
大場 靖子	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 構成蛋白・遺伝子の局在の検討	H10,12
山本 晋	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 遺伝子発現の解析	H13,4
瀧山 晃弘	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 蛋白の plasmid 作製	H13,4
逸見 千寿香	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	神経特異的 vector の開発	H13,4
近井 佳奈子	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	神経系特異的 JCV 複製因子の単離・同定	H13,4
中川 智子	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 感染モデルの作製	H13,4
鈴木 忠樹	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 感染における細胞内輸送の解析	H12,4
牧野 吉倫	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H15,4
遠藤 秀一	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	agnoprotein の解析・JCV 蛋白の抗体の作成	H11,2
仙葉 慎吾	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	神経組織特異的転写因子の同定	H12,4
津田 真寿美	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H11,4
笹田 万友美	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	事務処理・実験室の整備・物品の管理等	H11,1
樋口 美保	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H14,4
山内 聡子	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	JCV 感染における細胞内輸送の解析	H13,8~H14,11 H15,4

山崎 綾子	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H15,7
渡辺 環	北海道大学大学院 医学研究科	研究員	神経特異的プロモーター領域の解析	H10,12~H11,3
尾崎 義丸	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 感染細胞における遺伝子発現の検索	H10,12~H11,3
林 宏恵	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	JCV 感染における T 抗原の機能	H11,4~H13,3
川瀬 義明	北海道大学大学院 医学研究科	医学部学生	agnoprotein の機能の解析	H11,3~H12,3
長井 真人	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H12,4~H13,3
伊藤 智雄	北海道大学大学院 医学研究科	助手	JCV 感染細胞の組織学的解析	H10,12~H13,3
西原 広史	北海道大学大学院 医学研究科	助手	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H10,12~H14,3
寺井 健太	北海道大学大学院 医学研究科	医学部学生	agnoprotein の機能の解析	H12,4~H13,3
大西 英理子	北海道大学大学院 医学研究科	学振特別 研究員	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H10,12~H14,3
岩田 博司	北海道大学大学院 医学研究科	学振特別 研究員	神経系特異的 JCV 複製因子の単離・同定	H13,4~H14,11
木村 太一	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H13,4~H14,12
大西 晶子	北海道大学大学院 医学研究科	大学院生	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H14,4~H15,3
山田 雅巳	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	JC ウイルス受容体の単離	H11,4~H11,12
山田 美里	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	JC ウイルス受容体の単離	H11,4~H13,5
駒込 理佳	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	JC ウイルス受容体の単離・神経特異的 vector の 開発	H11,4~H14,3
岡田 由紀	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 員	神経組織特異的転写因子の同定・agnoprotein の解析	H10,12~H15,3
鈴木 聡子	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 技術 員	JC ウイルス受容体の単離	H11,4~H13,3
大町 啓子	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H11,2~H12,6
政本千絵子	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H11,2~H12,6
高久 可愛	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H12,5~H13,7

笹森 真奈美	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H12,5～H13,7
小林 希	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H13,1～H13,3
及川 純江	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	感染細胞内シグナル伝達機構の解析	H11,2～H14,3
南坂 雅美	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H13,8～H14,
渡辺 智美	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H15,2～H15,5
王 磊	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	実験器具の洗浄	H14,8～H15,9
屈 秋民	北海道大学大学院 医学研究科	CREST 研究 補助員	JCV 細胞内移送の解析・研究データの収集、解析	H14,12～H15,10

研究グループ名:国立感染症研究所(研究グループ代表:高橋秀宗)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
倉田 毅	国立感染症研究所	副所長	HIV-1 複製における topoisomerase I の機能・治療法への応用・インフルエンザウイルス感染防御の研究	H10,12
高橋 秀宗	国立感染症研究所	室長	JCV 核外移行の解析・HIV-1 複製における topoisomerase I の機能・治療法への応用・	H10,12
長谷川秀樹	国立感染症研究所	室長	JCV 核外移行の解析・インフルエンザウイルス感染防御の研究	H10,12
前田 才恵	国立感染症研究所	CREST 技術員	JCV 核外移行の解析・HIV-1 複製における topoisomerase I の機能・治療法への応用・	H13,9
高橋 礼典	国立感染症研究所	研究員	JCV 核外移行の解析・HTLV-II の細胞特異性の解明	H10,12～H11,3

研究グループ名:国立循環器病センター研究所(研究グループ代表:望月直樹)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
望月 直樹	国立循環器病センター	部長	JCV 感染抑制法の開発・細胞内シグナル伝達機構の解析	H10,12

研究グループ名:大阪大学微生物病研究所(研究グループ代表:大場雄介)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
大場 雄介	大阪大学微生物病研究所	助手	JCV の細胞内輸送の解析・細胞内シグナル伝達機構の解析	H10,12
大場 文誉	国立国際医療センター研究所	技術員	JCV の細胞内輸送の解析・細胞内シグナル伝達機構の解析	H10,12～H13,1
吉崎 尚良	大阪大学微生物病研究所	CREST 技術員	JCV の細胞内輸送の解析・細胞内シグナル伝達機構の解析	H13,4～H14,10

研究グループ名:国立国際医療センター研究所

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
木村 香織	国立国際医療センター研究所	CREST 技術員	モデル動物の飼育	H10,12~H11,12
鷹架 美賀子	国立国際医療センター研究所	CREST 技術員	モデル動物の飼育	H12,6~H13,1

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H12/2/22 ~ H12/2/23	Winter Workshop 「Virus Infection & Signal Transduction」	北海道大学医学部分子細胞病理	50 名	1)HTLV- II ウイルス受容体の characterization 2)HTLV- II tax の転写活性の解析 3)HTLV- I taxによるJCウイルスの転写調節 4)JC ウイルス受容体の characterization 5)HTLV- I の神経親和性の検討

(2) 招聘した研究者等

氏名 (所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
William W. Hall (Department of Medical Microbiology University College Dublin、教授)	研究打ち合わせ	札幌	H12/2/18 ~ H12/2/23
	Winter Workshop 「Virus Infection & Signal Transduction」	東京・札幌	
WONG KUM TMONG (DEPT OF PATHOLOGY, FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF MALAYA、教授)	Nipah virus脳症についての講演	札幌	H11/10/18 ~ H11/10/19

6. 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表 (国内 7 件、海外 107 件)

1. Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K, Matsuda M: Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with α_1 . **Nature** 400: 891-894, 1999
2. Takahashi RH, Nagashima K, Kurata T, Takahashi H: Analysis of human lymphotropic T-Cell virus type II - like particle production by recombinant baculovirus-infected insect cells. **Virology** 256: 371-380, 1999
3. Takahashi H, Takahashi R H, Hasegawa H, Horiuchi M, Shinagawa M, Yokoyama T, Kimura K, Haritani M, Kurata T, Nagashima K: Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. **J Neurovirol** 5: 300-307, 1999
4. Nagashima T, Okawa M, Kitamoto T, Takahashi H, Ishihara Y, Ozaki Y, Nagashima K: Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic alcoholic. **J Neurol Sci** 163: 192-198, 1999.
5. Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K, Tamura M, Yasui K, Nishihira J: A method for detection of a cytokine and its mRNA in the central nervous system of the developing rat. **Brain Res Protoc** 4: 271-279, 1999
6. Murata J, Tada M, Sawamura Y, Mitsumori K, Abe H, Nagashima K: Dysplastic gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease) associated with Cowden disease: report of a case and review of the literature for the genetic relationship between the two diseases. **J Neurooncol** 41: 129-136, 1999
7. Miyazaki H, Okuma Y, Fujii Y, Nagashima K, Nomura Y: Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in rats. **Neuroscience** 89: 643-647, 1999
8. Egan JF, O'Leary B, Lewis MJ, Mulcahy F, Sheehy N, Hasegawa H, Fitzpatrick F, O'Connor JJ, O'Riordan J, Hall WW: High rate of human T lymphotropic virus type Ia infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. **AIDS Res Hum Retroviol** 15: 699-705, 1999
9. Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Takahashi RH, Sato Y, Wakabayashi H, Takashima M, Kido H, Nagashima K, Kenney K, Gibbs CJ, JR, Kurata T: Increased Levels of ϵ and γ Isoforms of 14-3-3 Proteins in Cerebrospinal Fluid in Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease. **Clin Diagn Lab Immunol** 6 : 983-985, 1999
10. Ohba Y, Suzuki H, Hiraga H, Ito T, Sawa H, Nagai M, Satoh S, Iwaki H, Nagashima K: Melanotic peritoneal sarcomatosis originating from clear cell sarcoma. **Pathol Int** 49: 653-657, 1999
11. Miyazaki H, Tanaka S, Fujii Y, Shimizu K, Nagashima K, Kamibayashi M, Uehara T, Okuma Y, Nomura Y: Neuroprotective effects of a dihydropyridine derivative, 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid methyl 6-(5-phenyl-3-pyrazolyloxy) hexyl ester (CV-159), on rat ischemic brain injury. **Life Sci** 64: 869-78, 1999
12. Nishihara H, Kobayashi S, Hashimoto Y, Ohba F, Mochizuki N, Kurata T, Nagashima K, Matsuda M: Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins. **Biochim Biophys Acta** 1452: 179-187, 1999
13. Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K, Tamura M, Nishihira J: Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the telencephalon of the developing rat brain. **Brain Res** 816: 457-462, 1999

14. Nagashima T, Mori M, Katayama K, Nunomura M, Nishihara H, Hiraga H, Tanaka S, Goto Y, Nagashima K: Adult Leigh syndrome with mitochondrial DNA mutation at 8993. **Acta Neuropathol** 97: 416-422, 1999
15. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Koizumi H, Sato H, Nagashima K, Ohkawara A: Analysis of c-kit exon 11 and exon 17 of urticaria pigmentosa that occurred in monozygotic twin sisters. **Br J Dermatol** 140: 1130-1132, 1999
16. Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, William W. Hall, Nagashima K: Transcriptional activation of JC Virus by human T-lymphotropic virus type I tax protein in human neuronal cell lines. **J Biol Chem** 275: 17016-17023, 2000
17. Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, Nagashima K, Matsuda M: Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. **Mol Cell Biol** 20: 6074-6083, 2000
18. Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, Nagashima K: Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. **J Neuropathol Exp Neurol** 59: 921-929, 2000
19. Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M: CalDAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1. **J Biol Chem** 275: 25488-25493, 2000
20. Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Andrew M. Chan, Joho W. Schrader, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M: Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. **J Biol Chem** 275: 20020-20026, 2000
21. Nagashima T, Kato H, Kase M, Maguchi S, Mizutani Y, Matsuda K, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Minami N, Nonaka I, Nagashima K: Oculopharyngeal muscular dystrophy in a Japanese family with a short GCG expansion (GCG)(11) in PABP2 gene. **Neuromuscul Disord** 10: 173-177, 2000
22. Nagashima T, Miyanoshita A, Sakiyama Y, Ozaki Y, Stan AC, Nagashima K: Cerebral vasculitis in chronic mucocutaneous candidiasis: autopsy case report. **Neuropathology** 20: 309-314, 2000
23. Nakamura N, Iwasaki Y, Hida K, Abe H, Fujioka Y, Nagashima K: Dural band pathology in syringomyelia with Chiari type I malformation. **Neuropathology** 20: 38-43, 2000
24. Yokota R, Fukai M, Shimamura T, Suzuki T, Watanabe Y, Nagashima K, Kishida A, Furukawa H, Hayashi T, Todo S: A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. **Surgery** 127: 661-669, 2000
25. Nakazato Y, Nagashima K: Encephalomyelitis, brain tumors, neuromuscular diseases and miscellaneous disorders. **Neuropathology** 20 Suppl: S8-S13, 2000
26. Kawano N, Ohba Y, Nagashima K: Eosinophilic inclusions in ependymoma represent microlumina: a light and electron microscopic study. **Acta Neuropathol** 99: 214-218, 2000
27. Miyazaki H, Ono T, Okuma Y, Nagashima K, Nomura Y: Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates ischemia-induced tyrosine hydroxylase expression in rat hippocampus. **Eur J Neurosci** 12: 2032-2038, 2000
28. Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K, Tamura M, Yasui K, Nishihira J: Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain. **Biochim Biophys Acta** 1517: 100-106, 2000
29. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Nakamura H, Sawa H, Nagashima K, Koizumi H: Membrane expression of annexin I is enhanced by calcium and TPA in cultured human keratinocytes. **Arch Dermatol Res** 292: 496-499, 2000

30. Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Shoya Y, Takahashi HR, Nagashima K, Kurata T: Monoclonal antibodies against topoisomerase I suppressed DNA relaxation and HIV-1 cDNA synthesis. **Hybridoma** 19: 331-334, 2000
31. Nagashima T, Maguchi S, Terayama Y, Horimoto M, Nemoto M, Nunomura M, Mori M, Seki T, Matsukawa S, Itoh T, Nagashima K: P-ANCA-positive Wegener's granulomatosis presenting with hypertrophic pachymeningitis and multiple cranial neuropathies: Case report and review of literature. **Neuropathology** 1: 23-30, 2000
32. Furukawa H, Suzuki T, Maeng Bong Jin, Yamashita k, Taniguchi M, Magata S, Ishikawa H, Ogata K, Masuko H, Shimamura T, Fukai M, Hayashi T, Fujita M, Nagashima k, Omura T, Kishida A, Todo S: Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY20. **Transplantation** 69: 235-241, 2000
33. Furuta Y, Fumio O, Fukuda S, Inuyama, Nagashima K: Reactivation for Varicella-Zoster virus in delayed facial palsy after dental treatment and oro-facial surgery. **J Med Virol** 62: 42-45, 2000
34. Fujita M, Furukawa H, Hattori M, Todo S, Ishida Y, Nagashima K: Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT). **Mod Pathol** 13: 152-157, 2000
35. Liu E, Thant AA, Kikkawa F, Kurata H, Tanaka S, Nawa A, Mizutani S, Matsuda S, Hanafusa H, Hamaguchi M: The Ras-mitogen-activated protein kinase pathway is critical for the activation of matrix metalloproteinase secretion and the invasiveness in v-crk-transformed 3Y1. **Cancer Res** 60: 2361-2364, 2000
36. Oda A, Wakao H, Fujihara M, Ozaki K, Komatsu N, Tanaka S, Ikeda H, Miyajima A, Ikebuchi K: Thrombopoietin and interleukin-2 induce association of CRK with STAT5. **Biochem Biophys Res Commun** 278: 299-305, 2000
37. Xie Z, Koyama T, Abe K, Fuji Y, Sawa H, Nagashima K: Upregulation of P53 protein in rat heart subjected to a transient occlusion of the coronary artery followed by reperfusion. **Jpn J Physiol** 50: 159-162, 2000
38. Suzuki S, Tobiume M, Kameoka M, Sato K, Takahashi TA, Mukai T and Ikuta K : Exposeue of Normal Monocyte-Derived Dendritic Cells to Human Immunodeficiency Virus Type-1 Particles Leads to the Induction of Apoptosis in Co-Cultured CD4+ as Well as CD8+ T Cells. **Microbiol Immunol** 44:111-121, 2000.
39. Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, Nagashima K, Stoner GL: Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 Strain) by a eukaryotic expression system: Splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. **J Virol** 74: 1840-1853, 2000
40. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M: Spatio-temporal images of growth-factor induced activation of Ras and Rap1. **Nature** 411: 1065-1068, 2001
41. Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K: Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. **Virology** 286: 100-112, 2001
42. Safak M, Baruco R, Darbinyan A, Okada Y, Nagashima K, Khalili K: Interaction of JC virus agnoprotein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. **J Virol** 75: 1476-1486, 2001
43. Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K: Distribution and function of JCV agnoprotein. **J Neurovirol** 7: 302-306, 2001

44. Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M: Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. **EMBO J** 20: 3333-3341, 2001
45. Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Kato H, Sonobe H, Minami A, Hiraga H, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K: Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. **Proc Natl Acad Sci USA** 98 : 3843-3848, 2001
46. Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Kitajima K, Shinkai Y, Nagashima K, Negishi I: Deficiency of phospholipase C- γ 1 impairs renal development and hematopoiesis. **Development** 128, 5173-5180, 2001
47. Kurokawa K, Mochizuki N, Ohba Y, Mizuno H, Miyawaki A, Matsuda M: A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. **J Biol Chem** 276: 31305-31310, 2001
48. Ohnishi J, Ohnishi E, Jin M, Hirano W, Nakane D, Matsui H, Kimura A, Sawa H, Nakayama K, Shibuya H, Nagashima K, Takahashi T: Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development. **Mol Endocrinol** 15: 747-764, 2001
49. Fujioka Y, Taira T, Maeda Y, Tanaka S, Nishihara H, Iguchi-Ariga SM, Nagashima K, Ariga H: MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/lymphoma and tongue cancer. **J Biol Chem** 276: 45137-45144, 2001
50. Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC, Nagashima K, Ihara Y: Molecular analysis of mutant and wild-type tau deposited in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation. **Am J Pathol** 158:373-379, 2001
51. Nakamura K, Jeong S, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I: SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. **Hum Mol Genet** 10: 1441-1448, 2001
52. Zaman AK, Fujii S, Sawa H, Goto D, Ishimori N, Watano K, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Sakuma I, Kitabatake A, Sobel BE: Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrosis in genetically obese diabetic mice. **Circulation** 103: 3123-3128, 2001
53. Nagashima T, Kato H, Maguchi S, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Nonaka I, Nagashima K: A mitochondrial encephalo-myo-neuropathy with a nucleotide position 3271 (T-C) point mutation in the mitochondrial DNA. **Neuromuscul Disord** 11: 470-476, 2001
54. Nagashima T, Mori M, Fujimoto M, Nunomura M, Sakurai Y, Okada Y, Itoh T, Sawa H, Stan AC, Nagashima K: Adult T-cell lymphoma involving the leptomeninges associated with a spinal cord schwannoma. **Neuropathology** 22: 229-235, 2001
55. Ishii N, Hiraga H, Sawamura Y, Shinohe Y, Nagashima K: Alternative EWS-FLI1 fusion gene and MIC2 expression in peripheral and central primitive neuroectodermal tumors. **Neuropathology** 21: 40-44, 2001
56. Iwasaki Y, Hida K, Nagashima K: Cauda equina xanthogranulomatosis. **Br J Neurosurgery** 15: 72-73, 2001
57. Xie Z, Koyama T, Suzuki J, Fujii Y, Togashi H, Sawa H, Nagashima K: Coronary reperfusion following ischemia. Different expression of Bcl-2 and Bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis. **Jpn Heart J** 42: 759-770, 2001

58. Tanaka S, Katano H, Tsukamoto K, Jin M, Oikawa S, Nishihara H, Sawa H, Sawada K, Shimizu M, Sata T, Fujioka Y, Nagashima K: HHV8-negative primary effusion lymphoma of the peritoneal cavity presenting with a distinct immunohistochemical phenotype. **Pathol Int** 51: 293-300, 2001
59. Watanabe Y, Shimizu M, Itoh T, Nagashima K: Intraglandular necrotic debris in gastric biopsy and surgical specimens. **Ann Diagn Pathol**: 141-147, 2001
60. Hayashi H, Endo S, Suzuki S, Tanaka S, Sawa H, Ozaki Y, Sawamura Y, Nagashima K: JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma. **Neuropathology** 21: 129-137, 2001
61. Ishimori N, Iwabuchi K, Fujii S, Watano K, Iwabuchi C, Ato M, Chiba H, Tanaka S, Kitabatake A, Onoe K: Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Leukoc Biol** 69: 732-40, 2001
62. Kamimura E, Ueno Y, Tanaka S, Sawa H, Yoshioka M, Ueno K, Inoue T, Xiaobai L, Koyama T, Ishikawa R, Nagashima K: New Rat Model for Attention Deficit Hyperactive Disorder (ADHD). **Comp Med** 51: 245-251, 2001
63. Masuko H, Jin MB, Horiuchi H, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, Fukai M, Magata S, Ogata K, Ishikawa H, Fujita M, Nagashima K, Furukawa H, Todo S: Protective effect of angiotensin II type I receptor antagonist, CV-11974, on ischemia and reperfusion injury of the liver. **Transplantation** 71: 1034-1039, 2001
64. Furuta Y, Ohtani F, Sawa H, Fukuda S, Inuyama Y: Quantitation of varicella-zoster virus DNA in patients with Ramsay Hunt syndrome and zoster sine herpete. **J Clin Microbiol** 39: 2856-2859, 2001
65. Nakakubo Y, Okushiba S, Ohno K, Ito K, Sato K, Morikawa T, Kondo S, Kato H, Ito T, Nagashima K: True carcinosarcoma of the esophagus with osteosarcoma. **Hepatogastroenterology** 48: 137-139, 2001
66. Tobiume M, Tokunaga K, Kiyokawa E, Takahoko M, Mochizuki N, Tatsumi M, Matsuda M: Requirement of nef for HIV-1 infectivity is biased by the expression levels of Env in the virus-producing cells and CD4 in the target cells. **Arch Virol** 146: 1739-1751, 2001
67. Katano H, Ogawa-Goto K, Hasegawa H, Kurata T, Sata T: Human-herpesvirus-8-encoded K8 protein colocalizes with the promyelocytic leukemia protein (PML) bodies and recruits p53 to the PML bodies. **Virology** 286: 446-455, 2001 Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K: Oligosaccharides as Receptors for JC Virus. **J Virol** 76: 12992-13000, 2002
68. Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N: Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. **EMBO J** 21: 5195-5205, 2002
69. Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Nagashima K: Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. **Acta Neuropathol (Berl)** 104: 130-136, 2002
70. Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, *situs inversus*, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase I-deficient mice: Possible implications for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. **Mol Cell Biol** 22: 2769-2776, 2002
71. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, William W, Nagashima K, Kurata T: Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1(HIV-1) RNAs. **Biochem Biophys Res Commun** 293: 1084-109, 2002

72. Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N: Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X(L) in the regulation of programmed cell death during development. **Cell Death Differ** 9:1273-1276, 2002
73. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, William W, Nagashima K, Kurata T: Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. **Biochem Biophys Res Commun** 294: 509-517, 2002
74. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall W, Kurata T: Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. **Biochem Biophys Res Commun** 297: 593-599, 2002
75. Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K, Hall WW: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. **AIDS Res Hum Retroviol** 18: 1253-1260, 2002
76. Makita N, Horie M, Nakamura T, Ai T, Sasaki K, Yokoi H, Sakurai M, Sakuma I, Otani H, Sawa H, Kitabatake A: Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. **Circulation** 106: 1269-1274, 2002
77. Tsuda M, Tanaka S, Sawa H, Hanafusa H, Nagashima K: Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. **Cell Growth Diff** 13: 131-139, 2002
78. Lyons M, Nagashima K, Zabriskie JB: Animal models of postinfectious obesity: Hypothesis and review. **J Neurovirol** 8: 1-5, 2002
79. Nishihara H, Maeda M, Oda A, Tsuda M, Sawa H, Tanaka S, and Nagashima K: DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines. **Blood** 100: 3968-3974, 2002
80. Arai Y, Tsutsui Y, Nagashima K, Shinmura Y, Yamamoto J: Autopsy case of the cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy without immunodeficiency. **Neuropathology** 22: 48-56, 2002
81. Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M., Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shimoyama H, Tanigami A, Sawa H, Nagashima K: Molecular and immunohistochemical analysis of adaptor protein Crk in human cancers. **Cancer Lett** 180: 55-61, 2002
82. Nishihara H, Maeda M, Tsuda M, Makiko Y, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S: DOCK2 mediates T cell receptor-induced activation of Rac2 and IL-2 transcription. **Biochem Biophys Res Commun** 296: 716-720, 2002
83. Okamoto T, Tanaka S, Alex C. Stan, Koike T, Kase M, Makita Z, Sawa H, Nagashima K: Advanced glycation end products induce angiogenesis *in vivo*. **Microvasc Res** 63, 186-195, 2002
84. Itoh T, Orba Y, Takei H, Ishida Y, Nagashima K: Immunohistochemical detection of hepatocellular carcinoma in the setting of ongoing necrosis after radio frequency ablation. **Mod Pathol** 15: 110-115, 2002
85. Higuchi E, Oridate N, Furuta Y, Suzuki S, Hatakeyama H, Sawa H, Sunayashiki-Kusuzaki K, Yamazaki K, Inuyama Y, Fukuda S. Differentially expressed genes associated with cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance in head and neck cancer using differential display and cDNA microarray. **Head Neck** 187-193, 2002
86. Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T: Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. **Vaccine** 20: 1050-1057, 2002
87. Ogawa-Goto K, Irie S, Omori A, Miura Y, Katano H, Hasegawa H, Kurata T, Sata T, Arai Y: An endoplasmic reticulum protein, p180, is highly expressed in human cytomegalovirus-permissive cells and interacts with the tegument protein encoded by UL48. **J Virol** 76: 2350-2362, 2002

88. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S: Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. **J Immunol** 168: 2930-2938, 2002
89. Nagashima K, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N: Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. **Mol Biol Cell** 13: 4231-4242, 2002
90. Koide Y, Hasegawa T, Takahashi A, Endo A, Mochizuki N, Nakagawa M, Nishida A: Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. **J Med Chem** 45: 4629-4638, 2002
91. Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, Nomura Y: Expression of Ret receptor tyrosine kinase after transient forebrain ischemia is modulated by glial cell line-derived neurotrophic factor in rat hippocampus. **Neurosci Lett** 318: 1-4, 2002
92. Post GR, Swiderski C, Waldrop BA, Salty L, Glembotski CC, Wolthuis RM, Mochizuki N: Guanine nucleotide exchange factor-like factor (Rlf) induces gene expression and potentiates alpha 1-adrenergic receptor-induced transcriptional responses in neonatal rat ventricular myocytes. **J Biol Chem** 277: 15286-15292, 2002
93. Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H, Fukui Y, Jessberger R: SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. **Nature** 416: 759-763, 2002
94. Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N: Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. **J Biol Chem** 277: 23747-23754, 2002
95. Endo S, Okada Y, Orba Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H: JC virus (JCV) agnoprotein colocalizes with tubulin. **J Neurovirol** 9: 10-14, 2003
96. Yamamoto S, Furukawa H, Kitamoto T, Takamaru Y, Morita N, Yasuda M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K: An atypical form of sporadic panencephalopathic Cleutzfeldt-Jakob disease in Japan. **Neuropath Appl Neurobiol** 29: 77-80, 2003
97. Shoya Y, Tokunaga T, Sawa H, Maeda M, Ueno T, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T, Hall WW, Cullen BR, Takahashi H: Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity and cellular tropism of HIV-1 infection. **Proc Natl Acad Sci USA** 100: 8442-8447, 2003
98. Semba S, Sawa H, Nagashima K: Advances in Brain Research Cerebrovascular Disorders and Neurodegeneration. **International Congress Series** 1251, 139-147, 2003
99. Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M: Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. **J Cell Biol** 162, 223-232, 2003
100. Orba Y, Tanaka S, Nishihara H, Kawamura N, Itoh T, Shimizu M, Sawa H, Nagashima K: Application of laser capture microdissection to cytologic specimens for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in patients with malignant lymphoma. **Cancer** 99, 198-204, 2003
101. Ohnishi A, Sawa H, Tsuda M, Sawamura Y, Itoh T, Iwasaki Y, Nagashima K: Expression of the oligodendroglial lineage-associated markers Olig1 and Olig2 in different types of human gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 62, 1052-1059, 2003
102. Ishikawa R, Kikuchi H, Jin M, Fujita M, Itoh T, Sawa H, Nagashima K: Desmoplastic malignant mesothelioma of the pleura: Autopsy reveals asbestos exposure. **Pathol Int** 53: 401-406, 2003

103. Nagashima T, Mizutani Y, Kawahara H, Maguchi S, Terayama Y, Shinohara T, Orba Y, Chuma T, Mano Y, Itoh T, Sawa H, Sakai K, Motomura M, Nagashima K. Anti-Hu paraneoplastic syndrome presenting with brainstem-cerebellar symptoms and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. **Neuropathology** 23: 230-238, 2003
104. Watanabe I, Ross TM, Tamura Si, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H: Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. **Vaccine** 21: 4532-4538, 2003
105. Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini C, Pariali M, Cenacchi G, Ripalti A, Landini MP, Sawa H, Nagashima K, Frisque RJ, Goel A, Boland CR, Tognon M, Roda E, Bazzoli F: Induction of Chromosomal Instability in Colonic Cells by the Human Polyomavirus JC Virus. **Cancer Res** 63:7256-62, 2003
106. Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Matsuda M, Mochizuki N: EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. **Circ Res** 93: 23-31, 2003
107. Higuchi E, Oridate N, Furuta Y, Suzuki S, Hatakeyama H, Sawa H, Sunayashiki-Kusazaki K, Yamazaki-k, Inuyama-Y, Fukuda S: Differentially expressed genes associated with cis-diammine-dichloroplatinum (II) resistance in head and neck cancer using differential display and cDNA microarray. **Head Neck** 25:187-93, 2003
108. 長嶋和郎：進行性多巣性白質脳症とJC ウイルス。CLINICAL NEUROSCIENCE 17: 856-857,1999
109. 田中伸哉、長井真人、平賀博明、長嶋和郎：滑膜肉腫関連キメラ遺伝子 SYT-SSX の癌化機構。病理と臨床・別冊 Vol.19 No.7, 2001
110. 仙葉慎吾、澤洋文、長嶋和郎：JC ウイルスからみたグリアの生物科学。神経研究の進歩、46: 557-565, 2002
111. 大場靖子、澤洋文、長嶋和郎：JC virus の分子神経病理学。脳と神経、54(2), 101-109, 2002
112. 田中伸哉、津田真寿美、平賀博明、三浪明男、長嶋和郎：Transforming mechanism of synovial sarcoma oncogene SYT-SSX1 病理と臨床・別冊 2003 vol.21 no.6
113. 中川智子、大場靖子、長嶋和郎：JC ウイルス感染症(進行性多巣性白質脳症)。日本臨牀 61: 122-127, 2003
115. 近井佳奈子、長井英明、長嶋和郎：進行性多巣性白質脳症。脳の科学 25:967-972, 2003

(2)口頭発表 (国内 91 件、海外 27 件)

1. 長嶋和郎：宿題報告「ウイルス性脳症の発生機序」。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
2. 渡邊環、田中伸哉、大場靖子、川瀬義明、岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎：ヒト JC ウイルス agnoprotein 結合蛋白質の検索。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
3. 伊藤智雄、岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、長嶋和郎：尿路系における JC ウイルス感染細胞の組織学的局在およびウイルス株の検討。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
4. 岡田由紀、澤洋文、長谷川秀樹、田中伸哉、長嶋和郎：HTLV- I Tax による JC ウイルス (JCV) 転写活性の亢進。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
5. 篠原敏也、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：腎由来 archetype 型 JC ウイルスの調節領域の解析。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
6. 西原広史、田中伸哉、塚本健一、平賀博明、松田道行、長嶋和郎：軟部腫瘍外科材料を用いた CRK 前癌遺伝子変異の解析。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
7. 西原広史、小林希、佐藤真実、宍戸由紀子、岡田由紀、田中伸哉、澤洋文、古林与志安、長嶋和郎：JC ウイルス capsid protein の機能的領域に対する抗体を用いた免疫組織学的検索と感染抑制実験。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
8. 長井真人、田中伸哉、澤洋文、平賀博明、長嶋和郎：抗 SSX 抗体の作成および滑膜肉腫細胞株内 SYT-SSX 蛋白の検出。第 88 回日本病理学会総会 東京 1999, 4
9. Nagashima K, Okada Y, Tanaka S, Sawa H, Nagashima T: Correlation of clinicopathological features of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with molecular findings of JC virus regulatory region. 6th European Congress of Neuropathology, Barcelona, Spain, 1999, 5
10. 岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、長谷川秀樹、William W.Hall、長嶋和郎：HTLV- I Tax による JC virus の活性化に関する研究。第 40 回日本神経病理学会総会学術研究会 横浜 1999, 6
11. Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Hasegawa H, Hall WW, Nagashima K: Transcriptional activation of JC virus by HTLV-I Tax protein in human cell lines. Gordon Research Conference on Neurovirology Colby-Sawyer College New London, Hampshire USA 1999, 6
12. 長嶋和郎：特別講演「帯状疱疹の病理」第 33 回日本ペインクリニック学会 高崎 1999, 7
13. 岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、長谷川秀樹、William W.Hall、長嶋和郎：HTLV- I Tax による JC virus (JCV) の活性化に関する研究。第 3 回神経ウイルス研究会・第 4 回神経感染症研究会 合同学術集会 仙台 1999, 7
14. 長嶋和郎：教育講演「水俣病動物モデルとしての methylmercury chloride による rat 小脳顆粒細胞 apoptosis の解析」。第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会 札幌 1999, 7
15. 岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、長谷川秀樹、William W. Hall、長嶋和郎：HTLV- I Tax による JC virus (JCV) 活性化に関する研究。第 47 回日本ウイルス学会総会 横浜 1999, 11
16. 駒込理佳、山田美里、岡田由紀、佐藤真実、大場靖子、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：JC virus 外殻蛋白 VP1 の粒子形成に関する研究。第 89 回日本病理学会総会 東京 2000, 4
17. 岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、鈴木聡子、長嶋和郎：HTLV- I Tax 蛋白による JC virus(JCV)promoter の神経/グリア細胞特異的な活性化。第 89 回日本病理学会総会 東京 2000,

18. 西原広史、田中伸哉、松田道行、清水道生、長嶋和郎：ヒト腫瘍組織における前癌遺伝子産物 Crk の発現解析：免疫組織学的検討及び PCR-SSCP 法を用いた遺伝子変異の解析。第 89 回日本病理学会総会 東京 2000, 4
19. 大西英理子、大西淳之、金木欄、澤洋文、長嶋和郎：女性生殖器官に局在する新しいマトリックスポロテアーゼ Femalysin の発現および機能解析。第 89 回日本病理学会総会 東京 2000, 4
20. 長井真人、田中伸哉、平賀博明、津田真寿美、遠藤秀一、澤洋文、長嶋和郎：滑膜肉腫におけるキメラ蛋白 SYT-SSX の形質転換能の解析。第 89 回日本病理学会総会 東京 2000, 4
21. 原 由紀子、長嶋 和郎、原 嘉信：進行性多巣性白質脳症(PML)における JCV のウイルス学的背景。第 89 回日本病理学会総会 東京 2000, 4
22. Ozaki Y, Sawa H, Okada Y, Tanaka S, Sawamura Y, Nakamura H, Nagashima K: Investigation of JCV the genome and protein in human medulloblastomas. 2nd International Symposium of Brain Tumor Pathology, Nagoya 2000, 5
23. 岡田由紀、遠藤秀一、原由紀子、大場靖子、駒込理佳、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：JCvirus 構成蛋白の発現と機能に関する研究。第 41 回日本神経病理学会総会学術研究会 米子 2000,6
24. 原由紀子、長嶋和郎、原嘉信：進行性多巣性白質脳症をきたす JC ウイルス粒子の細胞核内における分布。第 41 回日本神経病理学会総会学術研究会 米子 2000,6
25. Nagashima K, Sawa H, Ohba Y, Endo S, Okada Y, Tanaka S: Dendritic Distribution of JC virus Agnoprotein in PML Brain. The Annual meeting of American Association of Neuropathologists Atlanta, GA, USA, 2000, 6
26. Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Katoh H, kaneda k, Minami A, Hiraga H, Sawa H, Nagashima K: Human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 transforms rat fibroblast 3Y1 cells. 16th Annual Meeting on Oncogenes and Tumor Suppressors: The Evolution of the Cancer Cell. CA, USA, 2000, 6
27. 澤洋文、神村栄吉、長嶋和郎、井上猛、吉岡充弘：多動性行動異常を示すラット (wiggling rat) の樹立とその解析。第 6 回日本行動薬理研究会 2000, 8
28. 鈴木聡子、駒込理佳、山田美里、岡田由紀、田中伸哉、西原広史、澤洋文、長嶋和郎：JC virus の細胞への吸着及び侵入に関する検討。第 80 回北海道医学大会病理分科会 札幌 2000, 9
29. Yamamoto S, Takamaru Y, Morita N, Yasuda M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K: A Case of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease with Prion Deposition of Both Synaptic and Plaque Types : A New Variant In Japan?. 14th International Congress of Neuropathology. Birmingham, UK. 2000, 9
30. Nagashima T, Kato H, Maguchi S, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Nonaka I, Nagashima K: A novel mitochondrial encephalo-myo-neuropathy with a np3271 (T-C)mutation. 14th International Congress of Neuropathology. Birmingham, UK. 2000, 9
31. Sawa H, Okada Y, Tanaka S, Orba Y, Endo S, Sasada M, Hara Y, Shintaku M, Nagashima K: Expression of JC virus early and late proteins in various cell lines and PML brains. 14th International Congress of Neuropathology. Birmingham, UK. 2000, 9
32. Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Hall W.W, Nagashima K: Glial/neuronal specific activation of the JC virus(JCV)promoter in the presence of HTLV- I Tax. 3rd International Symposium on Neuro Virology San Francisco, CA, USA, 2000, 9

33. Sawa H, Endo S, Okada Y, Orba Y, Komagome R, Tanaka S, Nagashima K: Analysis of the function and subcellular localization of JC virus(JCV)agnoprotein(Agno). 3rd International Symposium on Neuro Virology San Francisco, CA, USA, 2000, 9
34. 西原広史、田中伸哉、清水道生、澤洋文、松田道行、長嶋和郎：腫瘍組織における前癌遺伝子産物 CRK の発現と細胞増殖能に関する分子病理学的解析。第 59 回日本癌学会総会 横浜 2000, 10
35. 長井真人、田中伸哉、澤洋文、西原広史、津田真寿美：ヒト滑膜肉腫関連 SYT-SSX1 遺伝子の形質転換機構。第 59 回日本癌学会総会 横浜 2000, 10
36. 駒込理佳、山田美里、鈴木聡子、岡田由紀、佐藤真実、西原広史、田中伸哉、鈴木康夫、澤洋文、長嶋和郎：pseudovirus を用いた JC virus (JCV) の細胞接着に関する研究。第 48 回日本ウイルス学会学術集会 津 2000, 12
37. 岡田由紀、遠藤秀一、大場靖子、川瀬義明、西原広史、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：JC virus agnoprotein に関する研究。第 48 回日本ウイルス学会学術集会 津 2000, 12
38. 長井真人、田中伸哉、津田真寿美、園部宏、加藤宏幸、平賀博明、西原広史、澤洋文、長嶋和郎：ヒト滑膜肉腫関連蛋白 SYT-SSX1 とクロマチンリモデリング因子 hBRM の結合の機能解析。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
39. 前田才恵、西原宏史、田中伸哉、松田道行、澤洋文、長嶋和郎：浮遊細胞特異的に発現する CDM-family 蛋白；DOCK2 の機能の解析。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
40. 津田真寿美、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：ラット線維芽細胞におけるアダプター分子 v-Crk のアクチンストレスファイバー形成能の解析。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
41. 吉田聖美、岡田由紀、澤洋文、池田恭治、本山昇：daf-16 の哺乳類ホモログ AFX、FKHR、FKHRL1 の機能解析。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
42. 高井裕之、渡辺美穂、原田直樹、岡田由紀、澤洋文、鈴木宏志、中西真、池田恭治、本山昇：放射線誘導アポトーシスと p53 の機能制御における Cds1/Chk2 の役割。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
43. 小林洋介、渡辺美穂、高井裕之、岡田由紀、澤洋文、鈴木宏志、中西真、池田恭治、本山昇：DNA polymerase β (λ) 欠損マウスは出生後の発育遅延および水頭症を呈する。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
44. 藤岡優子、平敬宏、佐藤亜希子、田中伸哉、西原広史、有賀（井口）早苗、長嶋和郎、有賀寛芳：新規 tumor suppressor としての c-Myc 結合タンパク質 MM-1 の同定と作用機序。第 23 回日本分子生物学会年会 神戸 2000, 12
45. 佐藤真実、駒込理佳、山田美里、岡田由紀、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：JC virus(JCV)VP1 偽ウイルス粒子の免疫ネガティブ染色法による証明。日本電子顕微鏡学会 北海道支部学術講演会 札幌 2000, 2
46. Nagashima K, Sawa H, Tanaka S, Matsuda M, Mochizuki N: Signal transduction in the understanding of neuroglial proliferation and transformation. Leipzig 2000 International Symposium and 45. Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy Germany, 2000, 3
47. 渡辺佳明、西原広史、田中伸哉、澤洋文、清水道生、長嶋和郎：膵癌における Syk の発現の検討：浸潤・転移への関与について。第 90 回日本病理学会総会 東京 2001, 4

48. 岡田由紀、澤洋文、遠藤秀一、大場靖子、西原広史、田中伸哉、長嶋和郎:JC virus (JCV) agnoprotein の発現と機能に関する研究。第 90 回日本病理学会総会 東京 2001, 4
49. 金木欄、大西英理子、大西淳之、澤洋文、長嶋和郎:卵巣における MMP-23 の局在と発現調節の解析。第 90 回日本病理学会総会 東京 2001, 4
50. 長井真人、田中伸哉、平賀博明、津田真寿美、遠藤秀一、澤洋文、西原広史、長嶋和郎:滑膜肉腫の癌化機構における SYT-SSX1 キメラ蛋白の役割。第 90 回日本病理学会総会 東京 2001, 4
51. 津田真寿美、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎:アダプター分子 v-Crk のアクチンストレスファイバー形成能の解析。第 90 回日本病理学会総会 東京 2001, 4
52. 岡田由紀、澤洋文、遠藤秀一、田中伸哉、梅村孝司、長嶋和郎:JC virus(JCV) agnoprotein の核外移行シグナルとリン酸化部位の同定。第 37 回日本ウイルス学会支部総会 札幌 2001, 10
53. Okada Y, Endo S, Sawa H, Nagashima K: Distribution and function of JCV agnoprotein: The Biology of JC Virus and PML workshop, 2001, Chicago, IL, USA
54. Nagashima T, Shinmyo N, Chuma T, Mano I, Okada Y, Sawa H, Nagashima K: Familial HTLV-I Associated Polyneuropathy. 10th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses, Dublin, Ireland, 2001, 7
55. Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Suzuki S, Hasegawa H, William W Hall, Nagashima K: Neural cell specific activation of the JC virus promoter in the presence of HTLV-I Tax. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Dublin, Ireland, 2001, 7
56. Nishihara H, Maeda M, Oda A, Sawa H, Tanaka S, Nagashima K: The regulation of Rac1 by Dock2 in hematopoietic cells 1st Oncogenes & Growth Control Meeting, San Diego, CA, USA, 2001, 8
57. 長嶋 和郎. JC ウイルスとPML: 第6回日本神経感染症研究会学術集会 札幌 2001, 7
58. 岡田由紀、澤洋文、遠藤秀一、大場靖子、田中伸哉、長嶋和郎:JC virus(JCV) agnoprotein の機能に関する検討。第 34 回北海道病理談話会 札幌 2001, 9
59. 澤洋文、鈴木聡子、駒込理佳、岡田由紀、田中伸哉、長嶋和郎:JC virus の細胞への吸着及び侵入に関する検討。第 49 回日本ウイルス学会学術集会・総会 大阪 2001, 11
60. 遠藤秀一、岡田由紀、澤洋文、大場靖子、田中伸哉、長嶋和郎:JC virus (JCV) agnoprotein の細胞内局在。第 49 回日本ウイルス学会学術集会・総会 大阪 2001, 11
61. 駒込理佳、西原広史、田中伸哉、鈴木康夫、鈴木隆、澤洋文、長嶋和郎:JC virus capsid protein VP1 の糖脂質、糖蛋白質への結合。第 24 回分子生物学会 横浜 2001, 12
62. 西原広史、前田才恵、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎:DOCK2 は CrkL と結合し、Rac1 の活性化を制御している。第 24 回分子生物学会 横浜 2001, 12
63. 逸見千寿香、岩田博司、駒込理佳、佐藤真実、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎:JC virus (JCV) VP1 による外来遺伝子 packaging 効率の検討。第 24 回分子生物学会 横浜 2001, 12
64. 津田真寿美、田中伸哉、西原広史、澤洋文、長嶋和郎:アダプター分子 v-Crk によるアクチン細胞

骨格制御と細胞運動能の解析。第 24 回分子生物学会 横浜 2001, 12

65. 遠藤秀一、岡田由紀、澤洋文、大場靖子、田中伸哉、長嶋和郎:JC ウイルス(JCV) agnoprotein は tubulin 結合蛋白質である。第 24 回分子生物学会 横浜 2001, 12
66. 岡田由紀、澤洋文、遠藤秀一、田中伸哉、梅村孝司、長嶋和郎:JC virus(JCV)agnoprotein の核移行の検討。第 24 回分子生物学会 横浜 2001, 12
67. 吉崎尚良、伊藤玲奈、黒川量雄、大場雄介、堀口安彦、宮脇敦司、松田道行:Rho の活性化モニター分子。第 24 回日本分子生物学会 横浜 2001, 12 岩田博司、澤洋文、長嶋和郎:神経系特異的な増殖を示す JC ウイルスゲノム自己修復機構の解析。「脳を守る」シンポジウム 東京 2002, 4
68. 仙葉慎吾、岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎:JC ウイルス転写調節領域に結合する神経系細胞特異的蛋白質の同定。「脳を守る」シンポジウム 東京 2002, 4
69. 遠藤秀一、岡田由紀、澤洋文、仙葉慎吾、大場靖子、田中伸哉、長嶋和郎:JC ウイルス(JCV)agnoprotein(agno)は tubulin 結合蛋白質である。「脳を守る」シンポジウム 東京 2002, 4
70. 岡田由紀、澤洋文、遠藤秀一、田中伸哉、長嶋和郎:JC ウイルス:ウイルス蛋白の核内外移行シグナルと増殖制御。「脳を守る」シンポジウム 東京 2002, 4
71. 逸見千寿香、岩田博司、佐藤真実、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎:JC virus(JCV)組換え VP1 蛋白を用いた外来遺伝子導入法の検討。「脳を守る」シンポジウム 東京 2002, 4
72. 岡田由紀、澤洋文、大場靖子、遠藤秀一、田中伸哉、長嶋和郎:JC ウイルス agnoprotein の局在とウイルス粒子の細胞内輸送に関する検討 第 6 回研究集会日本神経ウイルス研究会 静岡 2002, 7
73. 逸見千寿香、岩田博司、駒込理佳、佐藤真実、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎:遺伝子導入ベクターとしての JC virus (JCV)VP1 の有用性。第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 東京 2002, 5
74. 大場靖子、岡田由紀、遠藤秀一、澤洋文、長嶋和郎:進行性多巣性白質脳症 (PML) における JC virus Agnoprotein の発現と局在。第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 東京 2002, 5
75. 田中伸哉: Activation of Rho and regulation of actin cytoskeleton by-v-Crk in rat fibroblast 3Y1 cells. 第 2 回ロックフェラーシンポジウム 大阪 2002, 5
76. Tsuda M, Tanaka S, Ohnishi A, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K: Signalling Adaptor Protein v-Crk Activates Rho and Regulates Cell Motility in 3Y1 Rat Fibroblast Cell Line 18th Annual Meeting on Oncogenes, SanDiego, CA, USA, 2002, 6
77. Iwata H, Henmi C, Sato M, Tanaka S, Sawa H, Nagashima K: Application of JC virus(JCV)VP1 as a tool for gene transfer and characterization of neutral antibodies against JCV infection 4th International Symposium on NeuroVirology 2002, Germany, 2002, 6
78. Endo S, Okada Y, Semba S, Orba Y, Tanaka S, Sawa H, Nagashima K: Intracellular localization and its function of JC virus agnoprotein. 4th International Symposium on NeuroVirology 2002, Germany, 2002, 6
79. Okada Y, Nagashima K: Role of JC agnoprotein in neuropathogenesis : Biochemical and Immunohistochemical findings.National Institute of Mental Health Basic, Clinical and Epidemiologic, Studies of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy : Implications for Therapy, Maine, MA, USA 2002, 7

80. 津田真寿美、田中伸哉、西原広史、澤洋文、長嶋和郎:シグナル伝達アダプター分子 v-Crk による Rho 依存的細胞骨格制御と細胞運動能の解析。第 12 回 日本サイトメトリー学会 愛知 2002, 8
81. 津田真寿美、牧野吉倫、澤洋文、田中伸哉、長嶋和郎:アダプター分子 v-Crk による Rho 依存的細胞骨格制御と細胞運動能との関連。病理分科会(第 35 回 北海道病理談話会) 旭川 2002, 8
82. 山本晋、岩田博司、澤洋文、長嶋和郎:定量的 real time RT-PCR 法を用いた JC ウイルスタンパク mRNA の発現量の経時的検討。第 38 回 日本ウイルス学会支部総会 札幌 2002, 10
83. 津田真寿美、田中伸哉、牧野吉倫、西原広史、澤洋文、長嶋和郎:シグナル伝達アダプター分子 Crk による ERM の局在変化と細胞運動能及び接着能の解析。第 61 回 日本癌学会総会 東京 2002, 10
84. 岡田由紀、澤洋文、高井裕之、原田直樹、門内有美、渡部美穂、長嶋和郎、池田恭治、本山昇: Chk2 ノックアウトマウスにおける自然発癌の解析。第 61 回 日本癌学会総会 東京 2002, 10
85. 岩田博司、大場靖子、澤洋文、長嶋和郎:神経系特異的な複製活性を示す JC ウイルス DNA 増幅機構の解明。第 75 回 日本生化学会大会 京都 2002, 10
86. 仙葉慎吾、逸見千寿香、岡田由紀、遠藤秀一、佐藤真実、澤洋文、長嶋和郎:JC ウイルス virion 形成における Agnoprotein の機能の解析。第 75 回 日本生化学会大会 京都 2002, 10
87. 岡田由紀、澤洋文、大場靖子、遠藤秀一、田中伸哉、長嶋和郎:JC ウイルス agnoprotein の局在とウイルス粒子の細胞内輸送に関する検討。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 札幌 2002, 10
88. 仙葉慎吾、岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎:JC ウイルス転写調節領域に結合する神経系細胞特異的蛋白質の同定。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 札幌 2002, 10
89. 澤洋文、駒込理佳、田中伸哉、長嶋和郎:JC virus receptor は細胞膜に存在する oligosaccharides。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
90. 逸見千寿香、岩田博司、駒込理佳、佐藤真実、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎:吸着阻害活性を指標とした JC virus 認識膜タンパクの同定。第 25 回 日本分子生物学会年会 横浜 2002, 12 近井佳奈子、岩田博司、大場靖子、澤洋文、長嶋和郎:神経系特異的な複製活性を示す JC virus DNA 増幅機構。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
91. 岡田由紀、澤洋文、逸見千寿香、遠藤秀一、長嶋和郎:JC virus agnoprotein による成熟ウイルス粒子の核外輸送の促進。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
92. 仙葉慎吾、岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎:JC virus 転写調節因子としての CstF の機能。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
93. 岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎:JC ウイルス agno を対象とした PML の治療。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
94. 高橋秀宗、庄谷裕子、澤洋文、長嶋和郎:ヒト Topoisomerase I の 236,237 番目のグルタミン酸、アスパラギン(²³⁶Glu, ²³⁷Asn)を標的とした AIDS 治療。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
95. 高橋秀宗、前田才恵、澤洋文、長嶋和郎:AIDS 治療薬スクリーニング法。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4
96. 田中伸哉、長嶋和郎:ヒト滑膜肉腫の治療薬剤。「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京 2003, 4

97. 津田 真寿美、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎:ヒト滑膜肉腫関連蛋白 SYT-SSX1 による癌化および老化のシグナル伝達調節機構。第 92 回 日本病理学会総会 福岡 2003, 4
98. 近井 佳奈子、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎:JC virus と初期細胞応答。第 92 回 日本病理学会総会 福岡 2003, 4
99. 澤 洋文、駒込 理佳、田中 伸哉、長嶋 和郎:JC ウイルス受容体の同定。第 92 回 日本病理学会総会 福岡 2003, 4
100. 澤 洋文、駒込理佳、田中伸哉、長嶋 和郎:JC ウイルス外殻蛋白質 VP1 は糖脂質と糖蛋白質の糖鎖に結合する。第 44 回 日本神経病理学会総会学術研究会 名古屋 2003, 5
101. 山本晋、澤 洋文、岩田博司、岡田由紀、長嶋 和郎:リアルタイム RT-PCR 法を用いた JC ウイルスの動態解析。第 44 回 日本神経病理学会総会学術研究会 名古屋 2003, 5
102. 仙葉慎吾、長嶋 和郎、大場靖子、澤洋文:JC virus の神経親和性を規定する転写因子。第 44 回 日本神経病理学会総会学術研究会 名古屋 2003, 5
103. 大場 靖子、澤 洋文、長嶋 和郎:siRNA を用いた JC virus 関連蛋白質の発現抑制。第 44 回 日本神経病理学会総会学術研究会 名古屋 2003, 5
104. Nagashima K: Molecular Biology & Pathogenesis (I). First International Symposium. Polyomaviruses and Human diseases: First International Symposium. Polyomaviruses and Human diseases: basic and clinical perspectives basic and clinical perspectives 2003, 5 Italy
105. Sawa H, Nagashima K: Cellular response on JC virus infection and nuclear factors for JC virus replication. First International Symposium. Polyomaviruses and Human diseases: basic and clinical perspectives Italy 2003, 5
106. Semba S, Sawa H, Okada Y, Nagashima K: Investigation of neural-specific protein that binds to JC virus (JCV) regulatory region. First International Symposium. Polyomaviruses and Human diseases: basic and clinical perspectives Italy 2003, 5
107. Suzuki T, Sawa H, Okada Y, Orba Y, Semba S, Nagashima K: JC virus agnoprotein binds to FEZ1. Polyomaviruses and Human diseases: basic and clinical perspectives Italy 2003, 5
108. 仙葉 慎吾、澤 洋文、岡田 由紀、長嶋 和郎:JC virus 特異的転写因子の解析。日本ウイルス学会北海道支部第37回夏期シンポジウム 美瑛 2003, 7
109. Tanaka S, Tsuda M, Watanabe T, Kimura T, Obata K, Sawa H, Isobe K, Akagi T, Matsuda M, Nagashima K: Analysis of human synovial sarcoma oncogene SYT-SSX induced cellular senescence. Salk/EMBL Oncogenes and Growth Control meeting San Diego, CA, USA, 2003, 8
110. Sawa H, Qu Q, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Henmi C, Tsuda M, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K: The translocation of JC virus-like particle (VLP) into the nucleus is governed by interaction between importins and nuclear pore complexes. HIV Molecular and Clinical NeuroScience Workshop.5th International Symposium on NeuroVirology, Baltimore, MA, USA, 2003, 9
111. Orba Y, Sawa H, Nagashima K: Suppression of JC virus infection by small interfering RNA(siRNA). HIV Molecular and Clinical NeuroScience Workshop.5th International Symposium on NeuroVirology Baltimore MA, USA, 2003, 9
112. Nagashima K, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Minami H, Takahashi T, Aoki M, Nagashima T: Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. XVth International congress of neuropathology. Italy 2003, 9

113. 津田 真寿美、田中 伸哉、渡辺 琢哉、小畑 慶子、澤 洋文、長嶋 和郎: ヒト滑膜肉腫キメラ蛋白 SYT-SSX1 による癌化および p21 依存的細胞増殖制御機構の解明。第 62 回 日本癌学会総会 名古屋 2003, 9
114. Sawa H, Okada Y, Semba S, Kose S, Imamoto N, Tanaka S, Nagashima k: JC virus agnoprotein facilitates the nuclear egress of JC virus. 第 76 回 日本生化学会大会 横浜 2003, 10
115. Semba S, Sawa H, Okada Y, Nagashima k: Investigation of neural-specific protein that binds to JC virus (JCV) transcriptional control region. 第 76 回 日本生化学会大会 横浜 2003, 10
116. Suzuki T, Sawa H, Okada Y, Orba Y, Semba S, Fujita T, Kuroda S, Nagashima K: JCV agnoprotein binding protein, FEZ1. 第 76 回 日本生化学会大会 横浜 2003, 10
117. 澤 洋文、屈 秋民、仙葉 慎吾、鈴木 忠樹、長嶋 和郎: Virus-like particle(VLP)を用いた JC ウィルス粒子核内移行の解析。第 51 回 日本ウイルス学会 学術集会・総会 京都 2003, 10
118. 大場 靖子、澤 洋文、長嶋 和郎: siRNA を用いた JC virus の感染抑制効果。第 51 回 日本ウイルス学会 学術集会・総会 京都 2003, 10

(3) 特許出願(国内 5件、国外0件)

①国内

発明者 : 長嶋和郎

発明の名称 : 多動性障害モデルラット

出願人 : 科学技術振興事業団

出願日 : 1999年12月28日(国内出願)

特願 : 平11-375380

発明者 : 岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎

発明の名称 : JCウイルス agno を対象としたPMLの治療

出願人 : 科学技術振興事業団

出願日 : 2001年11月22日(国内出願)

特願 : 2001-356836

発明者 : 長嶋和郎、田中伸哉

発明の名称 : ヒト滑膜肉腫の遺伝子治療法の開発

出願人 : 科学技術振興事業団

出願日 : 2002年2月27日(国内出願)

特願 : 2002-050894

発明者 : 高橋秀宗、澤洋文、前田才恵、長嶋和郎

発明の名称 : AIDS 治療薬のスクリーニング方法

出願人 : 科学技術振興事業団

出願日 : 2002年7月12日(国内出願)

特願 : 2002-204273

発明者 : 高橋秀宗、澤洋文、庄谷 裕子、長嶋和郎

発明の名称 : ヒト topoisomerase I の 236, 237 番目のグルタミン酸、アスパラギン酸 (236Glu, 237Asn) を標的とした AIDS 治療

出願人 : 科学技術振興事業団

出願日 : 2002年8月30日(国内出願)

特願 : 2002-253768

(4)新聞報道等

特に無し

(5)その他特記事項

特に無し

7. 結び

我々の研究のテーマは“ウイルス性脳障害から脳を守る”ことだった。その対象として、以前から研究を継続していたJCウイルスを中心に5年間研究を精力的に行った。この間にJCウイルスの感染経路(細胞膜吸着、細胞侵入、細胞質内移送、細胞核内侵入、細胞核外移送、細胞膜への移送)について、受容体がシアル酸を含む糖蛋白質、糖脂質である事、細胞内小器官を介して細胞質を移送していること、核内へ侵入する機構、ERを介して核外に移送していること、ER-Golgi輸送経路を用いて細胞膜に移送していること等の知見を得た。また核内でのウイルスの転写調節、複製機構、virionのassemblyについても機構を解明しつつある。さらにこれらの基礎的事実を基に、ウイルス脳症のモデルおよび治療法の開発についても現在研究を進行させている。

CRESTを契機として研究室のsoft、hard面での発展は目覚ましいものがあり、また色々な研究者の方々と共同研究を行なう機会、また知り合える機会を得た。我々は今後CRESTで得られた多くの事実に基づいて、さらにウイルス感染に対する細胞応答の分子機構について研究を発展させるよう努力を継続していく考えである。

5年間お世話になりました、脳を守るのチームの皆様方をはじめとしたCRESTの関係者の皆様方、共同研究を行なっていただいた研究者の方々、そして日夜休日を問わず黙々と研究を行なって頂いた長嶋チームのメンバーの方々に深く感謝致します。



平成15年度site visit時撮影
(於 北海道大学)