

「特別推進研究」研究期間終了後の効果・効用、波及効果に関する自己評価書

- 研究代表者氏名 野本 明男（東京大学・大学院医学系研究科・教授）
- 研究課題名「神経細胞特異的ポリオウイルス感染機構と病原性」
- 課題番号 12002004
- 補助金交付額（直接経費のみ）

平成12年度	70,000 千円
平成13年度	49,000 千円
平成14年度	48,000 千円
平成15年度	48,000 千円
平成16年度	48,000 千円

【研究期間終了後の効果・効用、波及効果に関する内容】

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか。

特別推進研究によってなされた研究が、本書類作成時点までの間にどのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 概要

特別推進研究の遂行によって、大きく分けて3種類の研究課題が出現した。まず、神経細胞は本来ポリオウイルス（PV）に対する抵抗性を持つということの発見である。次に、血中から中枢神経系へのPVの透過機構研究のためにトランスウェルを使用した *in vitro* 実験系を確立したことである。さらに、骨格筋からの逆行性軸索輸送機構を研究する実験系が整ったことである。

神経細胞のPV抵抗性についての研究には、抗PV抗体や抗PV受容体（PVR）抗体を用いていたが、その後、抗体の影響を避けるためにPVの欠陥干渉（DI）粒子を用いた実験を行い、神経細胞のPV抵抗性を確認した。神経細胞は、PVの2Aタンパク質に対し、HeLa細胞などと比較して耐性を持つことが明らかとなった。

血中PVは、血液脳関門（BBB）を透過して中枢神経系に侵入する。このメカニズムには、鉄を運ぶタンパク質として知られるトランスフェリン（Tf）のトランスサイトシス機構が関わっていることを発見した。すなわち、PVは、Tf受容体を介し、血管内皮細胞により形成されるタイトジャンクション（BBB）を透過することを明らかにした。

逆行性軸索輸送機構を詳細に検討した結果、*in vivo* では、PVRを介さない輸送系が存在すること、PVRを介した輸送系にも、速度の速いものと遅いものなどがあり、複数のメカニズムが関与していることを明らかにした。これら速度の違いは、シナプスでのPVの取り込まれ方によると考えている。

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など

論文発表

- Prevalence and phylogeny of Kakugo virus, a novel insect picorna-like virus that infects the honeybee (*Apis mellifera* L.), under various colony conditions.
Tomoko Fujiyuki, Seii Ohka, Hideaki Takeuchi, Masato Ono, Akio Nomoto, & Takeo Kubo

J. Virol., 80(23):11528-11538, 2006

- Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor.

Seii Ohka, Hiroko Igarashi, Noriyo Nagata, Mai Sakai, Satoshi Koike, Tomonori Nochi, Hiroshi Kiyono, & Akio Nomoto

J. Virol., 81(15): 7902-7912, 2007

- Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein.

Tsubasa Munakata, Yuqiong Liang, Seungtaek Kim, David R. McGivern, John Huibregtse, Akio Nomoto, and Stanley M. Lemon

PLoS pathogens, 3(9): 1335-1347, 2007

- Molecular aspect of poliovirus pathogenesis.

Akio Nomoto

Proc. Jpn. Acad., Ser. B 83: 266-275, 2007

- Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and poliovirus RNAs.

T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, & K. Tsukiyama-Kohara

Comparat Immunol Microbiol Infect Dis., 31: 435-448, 2008

- Receptor-dependent and –independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons.

S. Ohka, M. Sakai, S. Bohnert, H. Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo, & A. Nomoto

J. Virol., 83(10): 4995-5004, 2009

- Translation initiation from the ribosomal A site or P site, depending on the conformation of RNA pseudoknot I in dicistrovirus RNAs.

N. Kamoshita, A. Nomoto, & UL. RajBhandary

Mol. Cell, 35 (2): 181-190, 2009

- Receptor-dependent and –independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons

Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G, Nomoto A.

J Virol. 2009 May;83(10):4995-5004. Epub 2009 Feb 25.

国際会議等への招待講演における発表

- ポリオの基礎研究と根絶計画

国立国際医療センター・箱根山シンポジウム 2005年1月7日 (東京)

- ポリオウイルス複製と神経細胞

臨床研30周年記念シンポジウム 2005年1月21日 (東京・ガーデンパレス)

- ・ IRES 依存的翻訳開始とその制御
千里ライフサイエンスシンポジウム「RNA 機能研究の最先端」 2005 年 2 月 25 日 (大阪)
- ・ ポリオウイルス感染とその戦略的防御
シンポジウム「ウイルス感染と防御」 2005 年 2 月 28 日 (東京・ガーデンパレス)
- ・ Anti-poliovirus response of neural cells
Infection Symposium on emerging and reemerging infectious diseases, March 3-5, Institute of Medical Science, University of Tokyo
- ・ ワクチン開発
日本薬学会 第 125 年会シンポジウム 2005 年 3 月 29 - 31 日 (東京・有明)
- ・ Poliovirus in the context of polio eradication, possible risks of the virus return in nature, labs, humans, etc.
SEMINAR ON ERADICATION OF VACCINE PREVENTABLE DISEASES (II) 2005 July 13-25 (Kumamoto, Japan)
- ・ Poliovirus receptor and pathogenesis
International Symposium on “Molecular Bases Underlying Microbial Infections and the Host responses”. 2005 July 19-20 (Tokyo) (一ツ橋講堂)
- ・ ポリオウイルスの複製と病原性発現機構
Molecular Mechanism of Poliovirus Replication and Pathogenesis
日本薬学会 第 126 年会 特別講演 2006 年 3 月 28 - 30 日 (仙台)
- ・ Molecular pathogenesis of poliovirus infection
2nd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, 2007 Nov. 26-27 (Nagasaki)
- ・ The molecular basis of poliovirus neurovirulence
The International Symposium Hamamatsu University School of Medicine COE Program Medical Photonics Viruses Shed Light on Neuroscience, 2008 Feb. 9 (Hamamatsu)
- ・ ウイルスの病原性発現機構
第 82 回 日本感染症学会総会 2008 年 4 月 17 - 18 日 (島根)

(3) 研究費の取得状況 (研究代表者として取得しているもののみ)

基盤研究 (S)「ポリオウイルスの体内動態と宿主機能」2006-2010 87,200,000 円

特定領域研究 計画研究「プラス鎖 RNA ウイルスおよび二本鎖 RNA ウイルスの複製と病原性」2006-2010

191,944,000円

特定領域研究 総括班「感染現象のマトリックス」領域代表者 2006-2010 66,000,000円

特定領域研究 支援班「研究技術および研究資材の支援」2006-2010 209,000,000円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

血流中のPVがBBBを透過し、中枢神経系に侵入するメカニズムの詳細な解析を行った結果、Tf受容体とPVが結合し、PVが血管内皮細胞に取り込まれること、さらにPVは細胞を透過し、逆側に放出されることを見出した。この現象の解析を通し、結合に関与するTf受容体上のペプチドとPV粒子表面のペプチドを同定することに成功した。PVはPVRに結合すると、粒子構造が変化し脱殻が起こるが、Tf受容体に結合すると粒子構造変化は起きずにエンドサイトーシスされることが明らかとなった。これらの分子間相互作用の違いに着目した研究を展開中である。また、この研究は、中枢神経系へ薬剤などを運ぶための新手法へとつながりそうである。効率の良いDDSとなることが期待される。

PVの2Aプロテアーゼは、PVの細胞変性能力の中心的役割を持つと考えられていた。また2Aプロテアーゼは、PV複製能力に重要に関与していることが知られていた。しかしながら、神経細胞は2Aプロテアーゼに抵抗性があることが明らかになり、中枢の運動神経細胞を対象としたベクターとしてPVが使用出来る可能性が出てきた。この研究を進める内に、2AはPVの複製に必須のウイルスタンパク質ではないということを示した。2Aを発現しない組換えPVを用いた研究から、他のウイルスタンパク質の細胞への影響（アポトーシスなど）が明らかになりつつある。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者による活用された状況はどうか。

本書類作成時点までの間に、特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況

PVRの生体側分子としての本来の機能が明らかになりつつある。すなわち、PVR(CD155)が結合する分子としてCD226が明らかとなった。CD226はNK細胞の表面分子で、CD155と結合することにより、NK細胞が活性化する。サイトメガロウイルス感染細胞では、CD155分子が細胞表面から減少し、CD226を持つNK細胞から認識されにくくなっていることが見出された。ウイルスによる宿主免疫機構の回避の仕方の一つが明らかになった。

PVR関連分子の研究も進み、癌抑制タンパク質TSLC1の研究が進んだ。細胞間の接着に重要な役割があることが明らかになった。

PVの組織特異性を決定しているのは、PV RNA上に存在する翻訳開始のシスエレメントであるIRESと考えられていた。このことを証明するために行った実験から、PVの複製サイトではない肝臓でPV IRESが働くことを見出した。この発見は、PVの組織特異性を決定しているのは、自然免疫機構であり、この機構が早く立ち上がる肝臓などの臓器では、PV複製は阻止されることが明らかになった。ウイルスの組織特異性決定に関する原理が明らかになった。インターフェロン産生機構はウイルス感染現象に深く関与している。

PVの研究は、ピコルナウイルス研究へ発展し、昆虫(ミツバチ)のピコルナウイルス研究にも結び付いた。さらにプラス鎖一本鎖RNAウイルス研究としてC型肝炎ウイルス IRESの研究に発展し、その翻訳開始がリボソームのAサイトまたはPサイトからの読み始めをコントロールする機構を明らかにした。

ウイルスタンパク質の細胞内での局在性や働きの研究には酵母遺伝学を使用した。酵母を

使用した遺伝学的研究が、別途進行した。

(2) 論文引用状況

研究期間中に発表された論文

- Regulation of the yeast Yap 1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. Shusuke Kuge, Minetaro Arita, Asako Murayama, Kazuhiro Maeta, Shingo Izawa, Yoshiharu Inoue & Akio Nomoto. *Mol. Cell. Biol.*, 21(18): 6139-6150, 2001 「酵母の Yap1 核外輸送シグナルはレドックスシグナル誘導による可逆的な S-S 結合形成によって調整されている。」 136 件
- The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. Mari Masuda, Mika Yageta, Hiroshi Fukuhara, Masami Kuramochi, Tomoko Maruyama, Akio Nomoto & Yoshinori Murakami. *J. Biol. Chem.*, 277(34): 31014-31019, 2002 「ガン抑制タンパク質 TSLC1 は細胞間結合に関与する。」 99 件
- Down-regulation of NK cell activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. Peter Tomasec, Eddie C.Y.Wang, Andrew J. Davidson, Borivoj Vojtesek, Melanie Armstrong, Cora Griffin, Brian P. McSharry, Rebecca J. Rickards, Akio Nomoto, Christian Sinzger, & Gavin W.G.Wilkinson. *Nature Immunol.*, 6(2): 181-188, 2005 「ヒトサイトメガロウイルスの UL141 はNK 細胞活性化リガンド CD155 を抑制的に制御する。」 90 件
- A novel insect picorna-like virus identified in the brain of aggressive worker honeybees. Tomoko Fujiyuki, Hideaki Takeuchi, Masato Ono, Seii Ohka, Tetsuhiko Sasaki, Akio Nomoto & Takeo Kubo. *J. Virol.* 78(3): 1093-1100, 2004 「攻撃的働きミツバチの脳からの新規ピコルナウイルス様ウイルスの同定。」 47 件
- Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. Seii Ohka, Norie Matsuda, Koujiro Tohyama, Takayuki Oda, Masato Morikawa, Susuke Kuge & Akio Nomoto. *J. Virol.*, 78(13): 7186-7198, 2004 「受容体依存的なポリオウイルスのエンドサイトーシスおよびエンドソームの逆行性輸送」 41 件
- Down regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. Kyoko Murakami, Michikazu Abe, Tsutomu Kageyama, Nobuhiko Kamoshita & Akio Nomoto. *Arch. Virol.* 146(4): 729-741, 2001 36 件
- Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. Takeshi Isoyama, Asako Murayama, Akio Nomoto & Shusuke Kuge *J. Biol. Chem.*, 276(24): 21863-21869, 2001 「酵母の Yap1 核輸送は輸送受容体 Pse1p によって調整されている。またその輸送段階は酸化ストレスに影響を受けない。」 35 件

- Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: implication for poliovirus infection. Akiko Iwasaki, Reinhold Welker, Steffen Mueller, Melissa Linehan, Akio Nomoto & Eckard Wimmer. *J. Inf. Dis.*, 186(5): 585-592, 2002 「蛍光抗体法によるポリオウイルス受容体のヒト、霊長類、CD155 トランスジェニックマウスのパイエル板での発現の解析。」 34 件
- Recent insights into poliovirus pathogenesis. Seii Ohka & Akio Nomoto. *Trends in Microbiology*, 9(10): 501-506, 2001 「ポリオウイルス病原性の最新知見。」 27 件
- Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C Virus capsid protein in insect cells. Tomoaki Ogino, Hiroyuki Fukuda, Shinobu Imajoh-Ohmi, Michinori Kohara, & Akio Nomoto. *J. Virol.*, 78(21):11766-11777, 2004 「昆虫細胞内での C 型肝炎ウイルスの成熟型キャプシドタンパク質の膜結合性と末端残基。」 23 件

研究期間終了後に発表された論文

- Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. Tsubasa Munakata, Yuqiong Liang, Seungtaek Kim, David R. McGivern, John Huibregtse, Akio Nomoto, and Stanley M. Lemon. *PLoS pathogens*, 3(9): 1335-1347, 2007 「C型肝炎ウイルスは、E6AP 依存的に網膜芽腫タンパク質分解を誘導する。」 17 件
- Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. Seii Ohka, Hiroko Igarashi, Noriyo Nagata, Mai Sakai, Satoshi Koike, Tomonori Nochi, Hiroshi Kiyono, & Akio Nomoto. *J. Virol.*, 81(15): 7902-7912, 2007 「 α/β インターフェロン受容体を欠損したヒトポリオウイルス受容体発現トランスジェニックマウスにおけるポリオウイルス経口感染システムの確立。」 13 件
- Prevalence and phylogeny of Kakugo virus, a novel insect picorna-like virus that infects the honeybee (*Apis mellifera* L.), under various colony conditions. Tomoko Fujiyuki, Seii Ohka, Hideaki Takeuchi, Masato Ono, Akio Nomoto, & Takeo Kubo. *J. Virol.*, 80(23):11528-11538, 2006 「各種コロニーコンディションにおけるカクゴウイルス（ミツバチに感染する新規ピコルナ様ウイルス）の罹患率および系統樹。」 6 件
- Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. S. Ohka, M. Sakai, S. Bohnert, H. Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo, & A. Nomoto. *J. Virol.*, 83(10): 4995-5004, 2009 「運動神経における受容体依存的および非依存的なポリオウイルスの逆行性輸送。」 2 件

- Translation initiation from the ribosomal A site or P site, depending on the conformation of RNA pseudoknot I in dicistrovirus RNAs. N. Kamoshita, A. Nomoto, & UL. RajBhandary. Mol. Cell, 35 (2): 181-190, 2009「dicistrovirus RNA の RNA pseudoknot I の形態に従う ribosomal A サイトまたは P サイトからの翻訳開始。」 2 件
- Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and poliovirus RNAs. T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, & K. Tsukiyama-Kohara. Comparat Immunol Microbiol Infect Dis., 31: 435-448, 2008 「PTBP の C 型肝炎ウイルスおよびポリオウイルス RNA internal initiation への相対的役割。」 1 件

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報。

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況

PV の研究が格段に進歩し、世界のポリオ根絶計画が進展した。今日、依然としてインド、パキスタン、アフガニスタン、ナイジェリアでの根絶は成功していない。ワクチンの効果にも地域によるバラツキがあるようである。このような現象の原因に PV と PVR の相互作用が考慮されている。すなわち、ヒトの PVR には polymorphism があることが知られているが、PVR の差による PV との親和性の差が、ワクチン効果に反映している可能性である。

上述したように、PV の BBB 透過機構の解明は、社会に新しい DDS 方式を提示しようとしている。高齢者社会に向けて、脳神経系の疾患の治療の進歩は非常に大きな貢献となると考えている。

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長状況

以下に、昇任した共同研究者および大学院生から社会に出た共同研究者の人数を記す。大学教授となった共同研究者は 4 名、講師となった共同研究者は 1 名、国内研究機関に職を得た共同研究者は 6 名、企業の研究所で働く者は 2 名、現在外国で活躍中の共同研究者は 2 名（内 1 人は assistant professor 応募中）。