

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用

所属 国立感染症研究所 感染病理部
研究者 片野 晴隆

要旨 初代培養の血管内皮細胞と HHV-8 感染リンパ腫細胞を共培養することにより HHV-8 が効率よく感染することを発見した。また、感染細胞内で HHV-8 の初期蛋白 K8 が細胞側因子 PML とともに存在し、p53 と関連することを示した。

1. 研究目的

ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) は 1994 年にエイズに合併するカポジ肉腫から発見された新しいウイルスであり、カポジ肉腫や原発性体腔液性リンパ腫 primary effusion lymphoma から検出され、これらの疾患の原因ウイルスと考えられている。日本人健常人では約 1% 程度の抗体陽性者がいることがわかっているが、その感染経路や感染機構については明らかにされていない。HHV-8 は発見された当初より、エプスタインバーウイルス(EBV)と遺伝的な相同性があることがわかっており、HHV-8 も癌ウイルスの一種と考えられている。これまで、HHV-8 はカポジ肉腫のほぼ全例から PCR でウイルス DNA 断片が検出されることからカポジ肉腫と HHV-8 感染の関連は確実と考えられてきた。また、われわれの研究からカポジ肉腫の紡錘型の腫瘍細胞には HHV-8 の潜伏感染タンパクである ORF73 タンパク(LANA)が高発現していることが明らかになり、カポジ肉腫の腫瘍細胞には HHV-8 が潜伏感染していることが証明された。このことにより、カポジ肉腫発症と HHV-8 感染の関連は確定的となり、現在の研究は HHV-8 がどのようにしてカポジ肉腫を発症させるかという、腫瘍形成メカニズムの研究に移ってきている。

(1) HHV-8 の感染実験系の確立について

一般にウイルスが細胞内に進入する際には主に二つの機構が利用されていることが知られる。一つは裸のウイルスが細胞の表面に発現しているレセプターに結合し、侵入していく経路(ウイルス粒子感染、Cell-free transmission)と感染細胞と非感染細胞が直接接触し感染細胞から非感染細胞にウイルスが引き渡される経路(細胞接触感染、Cell-mediated transmission)の二つである。どちらの経路がよく利用されているかはウイルスや細胞により異なり、また、これまで、HHV-8 でこれら2つを比較したデータはない。HHV-8 のレセプターはまだ明らかになっていないが、HHV-8 の感染においてもこのうちのどちらかの経路、あるいは両方の経路が使われているものと考えられる。宿主生体内における HHV-8 の感染細胞はおもに B 細胞であり、一方で、カポジ肉腫の起源は血管内皮細胞と考えられている。血清中のウイルス量は PCR で検出することが可能であるが、その量は PCR の検出限界以下であることが多い。これまで報告されている HHV-8 を用いた感染実験ではその全てが濃縮したウイルス粒子を用いているが、血清中のウイルス量が多くない以上、これらの実験はきわめて人工的な系といわざるを得ない。そこで本研究では感染細胞との共培養により初代培養の血管内皮細胞が HHV-8 に感染するかどうかを検索することにより細胞接触感染の機構が HHV-8 にあるかを検討した。

(2) HHV-8 蛋白と細胞側因子の関連について

HHV-8 は他のヘルペスウイルスと異なり、感染後細胞内ですぐに潜伏感染に移行する。カポジ肉腫や HHV-8 のリンパ腫には HHV-8 が常に潜伏感染していることを考えると潜伏感染が持続することは HHV-8 関連悪性腫瘍の形成に必須と考えられる。他のヘルペスウイルスの場合、増殖感染になるか、潜伏感染に移行するかはウイルスの前初期蛋白、初期蛋白の役割が大きいことから、我々は HHV-8 の前初期蛋白、初期蛋白と細胞側の因子の関係を調べた。

2. 研究方法

HHV-8 の血管内皮細胞に対する感染実験においてはウイルスの供給源として HHV-8 感染リンパ腫細胞 BCBL-1 を用いた。標的細胞としてヒトの初代培養の臍帯血管内皮細胞を用い、BCBL-1 と共培養した。

BCBL-1 はあらかじめ 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)の刺激によりウイルス産生を促進したものをを用いた。ウイルス蛋白の発現は免疫蛍光染色で確認した。またウイルス感染の確認にウイルスゲノムの断片を増幅する PCR をを用いた。

HHV-8 の初期蛋白 K8 蛋白と細胞側因子 PML の関連を調べるために GST 融合蛋白システムを用いてリコンビナントの K8 蛋白を作製し、ウサギに免疫することにより、抗 K8 ウサギポリクローナル抗体を開発した。細胞内での局在を調べるため、抗 PML 抗体と上記抗 K8 抗体を用いて、蛍光免疫染色を施行した。細胞内での蛋白同士の相互関係は HHV-8 感染細胞の溶解液で上記抗体を用い免疫沈降により検索した。また、*in vitro* transcription で合成した p53 と大腸菌で作製したりコンビナントの K8 を反応させ、反応液をウエスタンブロットで解析し、p53 と K8 蛋白の相互関係を調べた。

実験に用いた臍帯血管内皮細胞はインフォームドコンセントを得て採取されている。また、遺伝子組換え実験は当該施設（国立感染症研究所）の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

3. 研究結果

1. HHV-8 の血管内皮細胞に対する効率的感染系の確立

カポジ肉腫の由来は血管内皮細胞と考えられているが、これまでのところ HHV-8 が血管内皮細胞に感染するためには、不活化させた血管内皮細胞に精製した多量のウイルス粒子を加える必要があった。こうした実験系は生体内ではあり得ないことで、人工的な実験系と言わざるを得ない。我々は初代培養の臍帯血管内皮細胞と HHV-8 感染リンパ腫細胞を共培養することにより、血管内皮細胞に効率よく HHV-8 が感染することを発見した（図 1）。

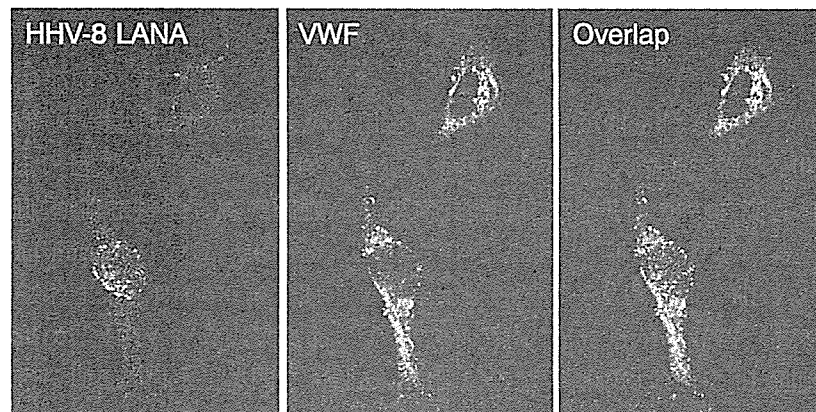


図 1 : Immunofluorescence assay of HHV-8 LANA and von Willebrand factor in the HUVEC co-cultured with TPA induced BCBL-1.

HHV-8 感染リンパ腫細胞 BCBL-1 と共培養した HUVEC における LANA（左）、von Willebrand factor (VWF, 中)、およびその二重露光（右）したもの。VWF 陽性細胞に LANA が発現していることがわかる。

HHV-8 感染リンパ腫細胞と共培養した HUVEC 細胞において HHV-8 の潜伏感染蛋白 LANA の発現と、血管内皮細胞のマーカである von Willebrand Factor の発現を免疫蛍光染色で確認すると、VWF 陽性細胞に LANA が発現していることがわかった（図 1）。

また、培養する方法と培養上清にウイルス粒子を加える方法と比較すると感染細胞と直接接触させたほうが感染効率がかなり高いことがわかった（図 2）。

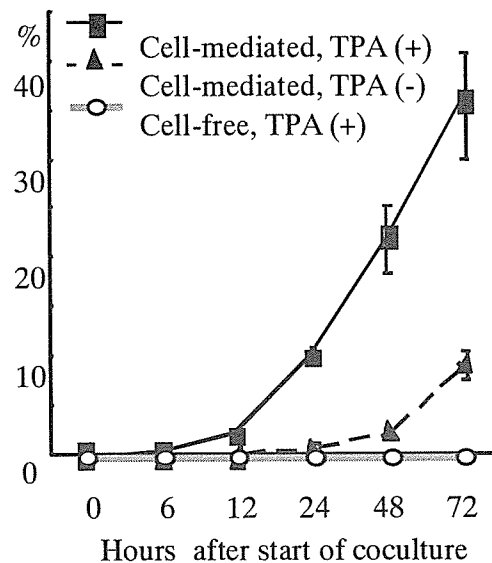


図 2 ; Coculture of HUVEC with TPA-stimulated BCBL-1.

HHV-8 感染細胞 BCBL-1 細胞と HUVEC とを共培養した。縦軸は HUVEC の HHV-8 の陽性率、横軸は共培養開始後の時間を示す。接触感染 (Cell-mediated, 実線) では 72 時間後に約 4 割の HUVEC が陽性であるのに対して、ウイルス粒子感染 (Cell-free, 灰色線) では感染細胞は認められない。

共培養した血管内皮細胞は BCBL-1 を取り除いてから 30 日間培養した後でも HHV-8 関連蛋白である LANA を発現し、HHV-8 の DNA を PCR で検出することができた。さらに、TPA の刺激で HHV-8 の増殖感染に移行することも確かめられた。

2. HHV-8 の初期蛋白 K8 蛋白と細胞側因子 PML の関連の発見

われわれは HHV-8 の数種類のウイルスタンパクにたいする抗体の開発を行い、これらを用いて、細胞側の因子である promyelocytic leukemia protein (PML) と局在が一致しているタンパクを調べた。その結果、抗 PML マウスモノクローナル抗体との免疫蛍光染色の結果、HHV-8 の初期蛋白である K8 蛋白が核内の構造物である nuclear domain 10 (ND10) とよばれる場所で promyelocytic leukemia protein (PML) とともに存在していることを見出した (図 3)。この局在の一致は 45°C 30 分の熱刺激により解離することもわかった。また、ND10 では SUMO-1 と呼ばれるユビキチン様タンパクも局在していた。これらの性質は他の DNA ウイルスの PML 関連タンパクと共通の現象である。われわれはこの局在が、K8 タンパクのどのドメインにより決定されているかを同定するため、ドメインを欠失させたタンパクを遺伝子導入し細胞に発現させたところ、K8 蛋白の C 末のロイシンジッパードメインを欠損させると PML への偏在は起きないことから、このドメインに依存していることがわかった。他のヘルペスウイルスでも PML と局在が一致する蛋白は知られており、これらは PML を ND10 から解離させる働きをもっている。我々は遺伝子導入の実験より K8 蛋白はそれらと異なり、そうした働きを持っていないことを明らかにした。また、K8 蛋白は ND10 で p53 と結合しており、この結合も K8 蛋白の C 末のロイシンジッパードメインに依存していることを明らかにした (図 4)。この p53 と K8 の結合は *in vitro* transcription した p53 と recombinant K8 の間でも確認された。さらに、遺伝子導入の実験から K8 蛋白には p53 を ND10 に運び込む機能があることもわかった。

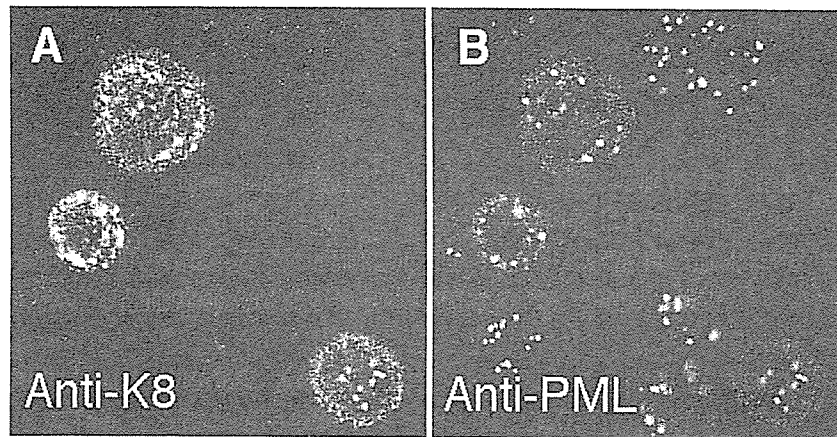


図3 ; Colocalization of HHV-8 K8 protein and PML in cells of a PEL cell line.
 HHV-8 感染リンパ腫細胞 TY-1 における K8 蛋白(A)と PML(B)の発現 (免疫蛍光染色)。
 2つの染色は点状の染まりではほぼ一致する。

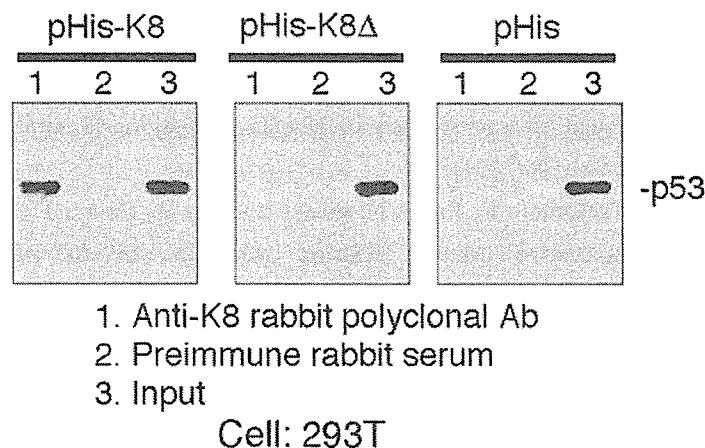


図4 ; Immunoprecipitation of HHV-8 K8 protein and p53 in transfectants.
 K8 を発現させた 293T 細胞における p53 の免疫沈降。抗 K8 抗体を用いた免疫沈降物を SDS-PAGE, ウ
 エスタンプロット後、p53 を検出した。中図は K8 のロイシンジッパードメインを欠損させた遺伝子を
 導入した。Wild type の K8 を導入すると p53 が沈降していることがわかる。(図左、レーン 1)

4. 考察

HHV-8 の腫瘍化においてその感染機構と潜伏感染が維持される機構を解明することは極めて重要である。今回の我々の研究成果から、HHV-8 は感染細胞と標的細胞が直接接触することにより効率よく感染が起こることが明らかになった。感染個体内の血清中のウイルス量はそれほど高くないことから、これまでの濃縮ウイルスを振りかけての感染実験は極めて人工的な実験系であったといわざるを得ない。今回の実験系の開発で、生体内ではむしろウイルス粒子単独で標的細胞に感染することよりも細胞接触による感染が主であることが予想される。今後、この HHV-8 感染血管内皮細胞を検索することはカポジ肉腫の発症機構の解明に役立つであろう。

K8 蛋白と PML の関連は HHV-8 の潜伏感染維持の機構を考える上で重要な所見である。K8 は EBV の転写活性化因子 Zta とホモログがあり、当初、前初期蛋白と考えられていた。しかし、その後の解析により、K8 は初期蛋白で転写活性がないことがわかった。このような蛋白がどのような機能を持っているか不明であったが、今回、PML との関連が明らかになったことにより、HHV-8 が複製する際の最初の部分に関わり、PML 解離の機能を持っていないことから、むしろ HHV-8 の増殖感染に抑制的に働いていることが考えられ

る。K8 によるこの機能は HHV-8 の潜伏感染維持に本質的なものかも知れない。そうした意味で、K8 蛋白と PML の関連は HHV-8 の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与える知見であり、今後の研究の成果が期待される。

5. まとめ

HHV-8 の血管内皮細胞に対する効率的な感染実験系を確立できた。また、HHV-8 の初期蛋白である K8 蛋白と PML の関連を明らかにした。これらの結果は HHV-8 の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与える知見である。

6. 研究発表

Katano H & Sata T. Human herpesvirus 8 -virology, epidemiology and related diseases-. *Jpn J Infect Dis* **53**, 137-155(2000).

Kondo Y, Izumi T, Yanagawa T, Kanda H, Katano H, & Sata T. Spontaneously regressed Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Pathol Int* **50**, 340-346(2000).

Katano H, Sata T, & Mori S. AIDS lymphoma: Its virological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* (in press) (2001).

Meng YX, Sata T, Stamey FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, Deleon M, De Cristofano MA, Galimberti R, & Pellett PE. Molecular Characterization of Human Herpesvirus 8 Strains from Japan, Argentina, and Kuwait. *J Gen Virol* **82**, 499-506(2001).

Tanaka S, Katano H, Tsukamoto K, Jin M, Nishihara H, Sawa H, Tarumi T, Sawada K, Sata T, Fujioka Y, & Nagashima K. HHV8-negative primary effusion lymphoma in the peritoneal cavity with distinct immunohistochemical phenotype. *Pathol Int*, (in press) (2001).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社