



トキソプラズマのタキゾイト型虫体の ヘキソキナーゼ組換え酵素の解析

野崎 智義¹⁾、浅井 隆志²⁾

¹⁾ 国立感染症研究所、寄生動物部

²⁾ 慶應義塾大学医学部、熱帯医学寄生虫学教室

研究要旨

急性トキソプラズマ症はエイズ患者に多発する日和見感染症である。我々はトキソプラズマ症の新規治療薬を開発することを目的として、トキソプラズマの解糖系の律速酵素のひとつであるヘキソキナーゼの組換えタンパク質の生化学的性質を調べたので報告する。クローニングされたヘキソキナーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列は同じコクシジウム科の原虫である *Plasmodium falciparum* と最も高い相同性を示した (44%)。トキソプラズマヘキソキナーゼの予想される分子量は 51.5 kDa で、等電点は 5.82 であった。活性のある組換えタンパク質を作製したところ、精製した酵素の非活性は 4.04 $\mu\text{mol/mg protein/min}$ であった。ヘキソキナーゼはグルコースを最適の基質とし、他にフルクトースとマンノースも基質となった。ATP をリン酸供与体とし、ピロリン酸は基質とならなかった。基質や反応産物によるアロステリックな酵素活性の調節は受けず、他の生物のヘキソキナーゼでは良く知られたグルコース 6-リン酸 (G6P) による活性阻害も観察されなかった。また他の糖リン酸やピロリン酸も全く活性に影響を与えなかった。トキソプラズマのヘキソキナーゼは膜分画にも一部その活性が回収されることから、膜あるいは細胞内小器官への弱い結合がある可能性が考えられた。

分担研究者 野崎智義

研究協力者 浅井隆志

Characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite

Tomoyoshi Nozaki¹⁾ and Takashi Asai²⁾

¹⁾ Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases and ²⁾ Department of Tropical Medicine and parasitology, School of Medicine, Keio University

研究目的

トキソプラズマ症はエイズを始めとする免疫不全状態の患者に多発する日和見原虫感染症である。現在利用可能な治療薬は治療効果が低く副作用も強いことから、新規薬剤の創出が求められている。

薬剤の標的として、我々はエネルギー代謝の中心的役割を担う糖代謝経路に注目して研究を行ってきた。改めて言うまでもなく糖代謝経路は様々な生物種において詳細に研究され、多くの知見が蓄積している。他種生物では初段を触媒するヘキソキナーゼ、経路のなかほどに位置するフォスホフルクトキナーゼ、経路の終盤のピルビン酸キナーゼが律速酵素であることが知られている。一方、トキソプラズマにおいては糖代謝経路のいずれの酵素の性質もほとんど解析されていない。

そこで本研究では、糖代謝経路を標的にしたトキソプラズマ症の新規治療薬の開発を長期的目標として糖代謝経路の律速酵素のひとつであるヘキソキナーゼの諸性質を明らかにすることとした。近年トキソプラズマのESTデータベースの利用が可能となり糖代謝関連酵素遺伝子の獲得及び組換えタンパク質合成が容易となったため、これら酵素の性質を分子レベルで明らかにすることができるようになった。

研究方法

1 ヘキソキナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

トキソプラズマRH株の急増虫体のcDNAライブラリーはケンブリッジ大学のJames Ajioka博士より供与された。ESTデータベースのヘキソキナーゼにヒットした情報(#466913, GenBank ID#N61188)をもとにプローブを作製した。このプローブを用いてヘキソキナーゼの全長をコードするDNAをクローニングした。塩基配列を決定した後、DNASISに付属するプログラムで解析を行った。

2 遺伝子組換え酵素の作製と精製

ヘキソキナーゼの全長をコードするDNA断片

をPCR法により作製し、発現用プラスミドpGEX5T-1(アマーシャム)にクローニングし、GST-融合タンパク質として大腸菌BL21株で発現させた。これをグルタチオンセファロース4Bに結合させた後、Factor Xaプロテアーゼで切断し、ヘキソキナーゼを精製した。更に、DEAE-Toyo pearl 650Sを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーとToyo pearl HW55sを用いたゲルろ過法により単一タンパク質に精製した。

3 酵素活性の測定

ヘキソキナーゼの活性はG6P脱水素酵素とカノブルさせた方法でNADPHの増加を分光計で測定することで行った。G6Pが産生物でない系では、ADPの産生をピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素とカノブルさせた方法でNADHの減少を分光計で測定した。

(倫理面への配慮) 該当せず。

研究結果

我々がクローニングしたヘキソキナーゼcDNAは全長2952bpで、1407bpのタンパク質コード領域(ORF)を含んでいた。予想されたヘキソキナーゼの分子量は約51.5kDa、等電点は5.82であった。サザンブロットにより、シングルコピーとしてゲノム中に存在していると考えられた。

トキソプラズマヘキソキナーゼのアミノ酸配列を6種類の他生物のヘキソキナーゼと比較した(図1)。*P. falciparum*酵素が最も高い相同性を示した(44%)。その他は35%以下と相同性は低かった。しかしながら、他種生物でも保存されているヘキソキナーゼのコンセンサス配列(基質、G6Pの結合部位)は存在していた。しかし他種由来のヘキソキナーゼで共通に見られたLGGTNの配列はFGGSTに置換されていた。一方、C-末端の疎水性アミノ酸のクラスターは*P. falciparum*のそれに酷似していた。この配列は膜への結合に関与すると予想された。

大腸菌に発現させ精製したトキソプラズマのヘキソキナーゼの電気泳動像を図2に示した。見かけの分子量は約51kDaで予想された分子量と一致

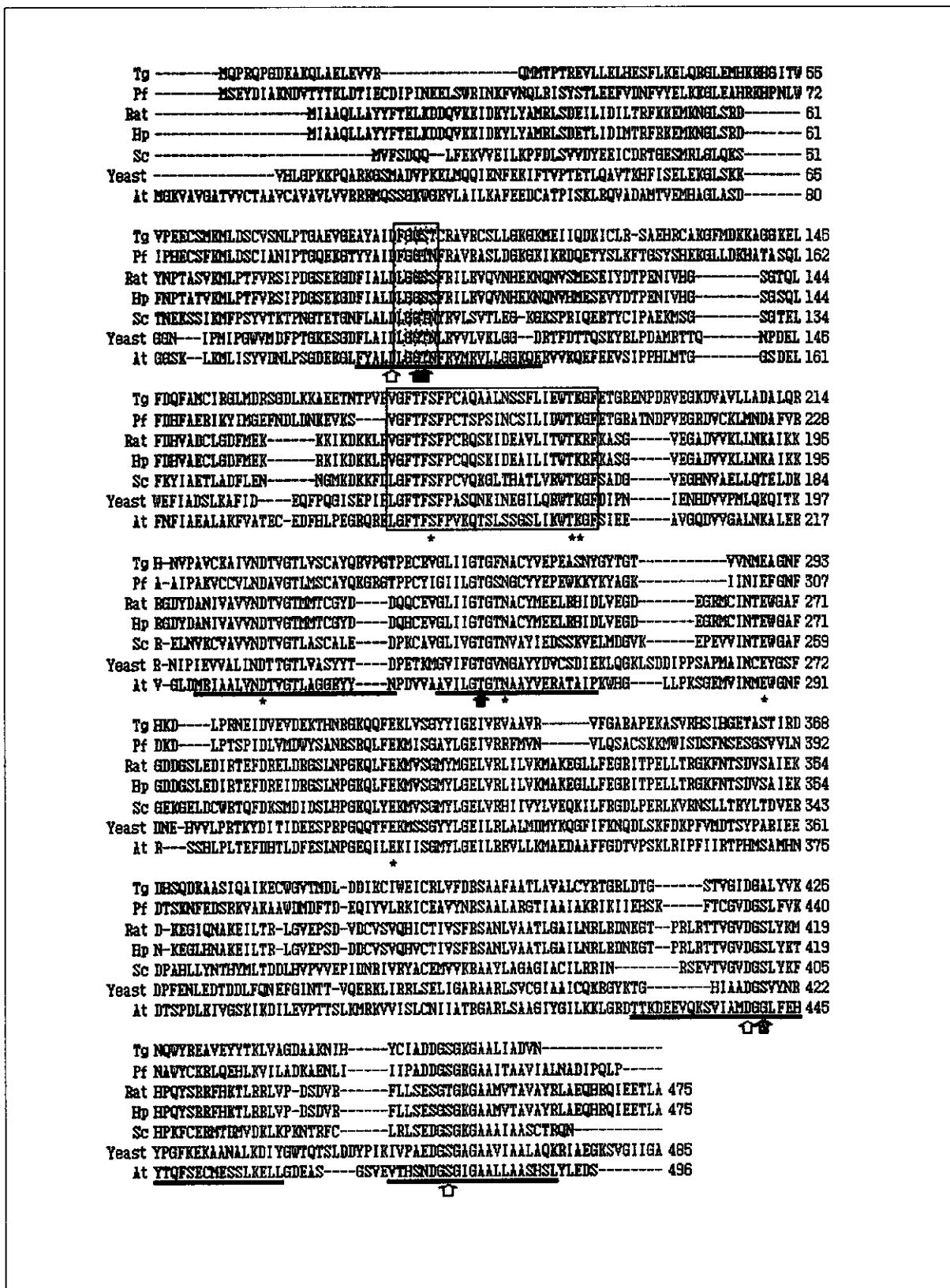


図1 トキソプラズマのヘキソキナーゼと他の生物の6種類のヘキソキナーゼのアミノ酸配列の比較

データベースの登録ナンバーは以下のとおりである Tg, *T. gondii* (BAB55664), Pf *Plasmodium falciparum* (Q02155), rat, *Rattus norvegicus* hexokinase-I N-terminal (P05708), Hp, *Homo sapiens* hexokinase-I N-terminal (P19367), Sc, *Schistosoma mansoni* (Q26609), yeast *Saccharomyces cerevisiae* hexokinase-II (P04806), At, *Arabidopsis thaliana* hexokinase-I (Q42525) 四角で囲んだ所はヘキソキナーゼの Signature 配列を示す。背景が点状で四角で囲んだ部分は他のヘキソキナーゼでは厳密に保存された領域だが トキソプラズマのヘキソキナーゼでは変化している部分。アスタリスクはグルコースの結合部位 黒矢印はG6Pのリン酸部分の結合部位、白矢印はG6Pのグルコース部分の結合部位をそれぞれ示す。下線部はATPの結合部位である。

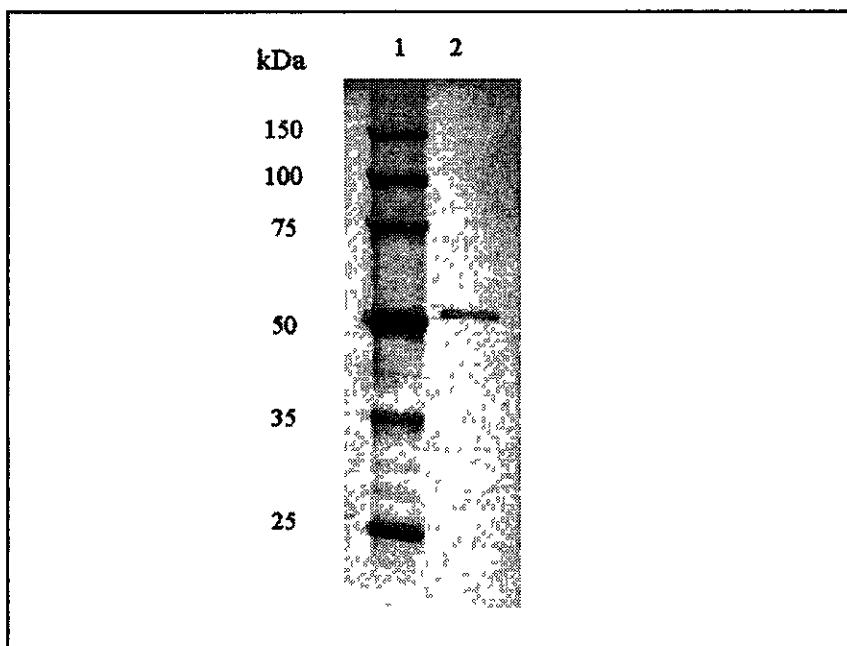


図2 精製されたトキノプラズマの遺伝子組換えヘキソキナーゼのSDS-電気泳動像
 レーン1 マーカータンパク。レーン2 3マイクログラムの精製されたトキノプラズマの遺伝子組換えヘキソキナーゼ。染色はクマン-フリリアントブルーによる。

表1 遺伝子組換えヘキソキナーゼの反応速度定数

基質	Km (mM)	Vmax*	Kcat (S ⁻¹)
D(+) グルコース	0.0080 ± 0.0008	4.04 ± 0.09	3.47 ± 0.09
ATP	1.05 ± 0.25	3.87 ± 0.09	3.32 ± 0.35

* μmol/mg protein/min

表2 トキノプラズマヘキソキナーゼの基質特異性

基質	活性 (%)
D(+) グルコース	100
D(+) フラクトース	79
D(+) マンノース	55
D(+) ガラクトース	<1
ATP	100
GTP	1.9
CTP	1.6
ITP	2.6
UTP	1.9
ADP	5.6
PPi	<0.5

した。

ヘキソキナーゼの各種の反応速度定数を表1に示した。トキソプラズマのヘキソキナーゼの最も特徴的な性質はグルコースに対するKm値が今まで知られたどのヘキソキナーゼよりも低いことである。この値はマラリア原虫のその約1/50であった。グルコースに対する親和性がこれほど高いにもかかわらず、最大反応速度(Vmax)及びKcat値は非常に低い値であった。これらの値は赤痢アメーバや酵母の値の約1/50であった。

ヘキソキナーゼの基質特異性を表2にまとめた。トキソプラズマのヘキソキナーゼはグルコースの他にフラクトースやマンノースも基質とした。しかしリン酸供与体はATPのみであった。産生物であるG6Pを含めた糖リン酸やADPは全く活性に影響を与えないが、AMPに多少の活性阻害効果(15%)があった。この効果は基質の親和性になんら影響を与えなかった。

トキソプラズマのヘキソキナーゼ活性は細胞質分画と不溶性分画の両分画に認められた(表3)。この活性はG6Pにより活性阻害がかからないことから宿主細胞のヘキソキナーゼの混入ではなかった。細胞質分画のマーカーであるピルビン酸キナーゼと不溶性分画のマーカーであるDHO-DHaseはほぼ全部の活性が分画ごとに分かれるので、トキソプラズマのヘキソキナーゼは一部不溶性分画に存在することが確認された。

考 察

トキソプラズマのヘキソキナーゼ活性は非常に低く虫体の破碎液を用いて測定することは困難であった。我々はそこで遺伝子組換え酵素を作製し

て詳細にその性質を調べることにした。

この研究により、トキソプラズマのヘキソキナーゼはグルコースに対して非常に高い親和性を有するが、触媒能力としての反応速度は非常に低いことが判明した。何らかのヘキソキナーゼの阻害剤が存在する可能性や虫体細胞内におけるヘキソキナーゼ量は明白ではないが、虫体の持つ低ヘキソキナーゼ活性の原因は、この低い反応速度に起因するものと思われる。驚くべきことに、ヘキソキナーゼ活性が低いにもかかわらず、トキソプラズマの他の糖代謝系酵素活性は非常に高い。たとえば、ピルビン酸キナーゼ活性は、糖代謝の非常に活発なマウス脳細胞の持つピルビン酸キナーゼ活性に等しいほどである。このことから、トキソプラズマの糖代謝全体の流量はグルコースを大量に消費する細胞のそれと同等ではないかと推測される。もしこの考えが正しければ、ヘキソキナーゼが流量全体の調節に非常に重要な役目を果たしていると考えられる。

脊椎動物のヘキソキナーゼ活性は産生物であるG6Pにより強力に阻害されるが、トキソプラズマのヘキソキナーゼはなんら影響も受けず、G6Pに代わる阻害剤も確認されなかった。しかし、予想アミノ酸配列(図1)ではG6Pの糖及びリン酸部分の結合部位が保存されている。これは上記の結果と矛盾するが、同しようなことが酵母のヘキソキナーゼでも報告されており、G6Pによる阻害が結合部位の有無だけでは決定されないことを示している。厳密には未知の要因の存在は否定できないが、トキソプラズマのヘキソキナーゼは基質や産生物による短期的な調節を受けないと考えられる。このことから流量全体を決定する要因はグルコースの供給量であると推測される。

表3 タキゾイト細胞分画におけるヘキソキナーゼの分布

分画	Pyruvate Kinase	DHO-DHase	Hexokinase
	%		
細胞全体	100	100	100
可溶性分画	94	0	66
不溶性分画	1	97	21

今回の研究でトキノプラズマのヘキソキナーゼ活性の一部が細胞の不溶性画分に存在する可能性が示唆された。ヒトのヘキソキナーゼI及びIIはミトコンドリアの外膜に結合しており、N-末端に15個の疎水性の高いアミノ酸配列が存在することが知られている。トキノプラズマのヘキソキナーゼのN-末端にはこのような配列は見られないが、C-末端のアミノ酸配列の疎水性プロフィールは*P. falciparum*のそれに酷似している。このC-末端が膜への結合に関与していると推測される。これらの実験結果から、トキノプラズマのヘキソキナーゼは翻訳された後、酵素分子の一部が何らかの修飾を受ける可能性が考えられる。その生理的機能としてはグルコーストランスポーターとの共役が考えられる。グルコースに対する親和性が非常に高いこともトランスポーターとの共役を示唆している。

結 論

トキノプラズマの糖代謝経路の初段を担うヘキソキナーゼの性質を遺伝子組換え酵素を用いて精査した。その結果宿主細胞のそれとは明らかに異なる幾つかの性質が明らかとなった。今後これらの性質を標的にした有効性の高い治療薬の開発が期待される。

健康危険情報

なし。

研究発表

1 論文発表

- 1) Saito T, Maeda T, Nakazawa M, Takeuchi T, Nozaki T, Asai T Characterisation of hexokinase in *Toxoplasma gondii* tachyzoite Int J Parasitol 2002, 32 (8) 961-967
- 2) Haghghi, A, Kobayashi, S, Takeuchi, T, Masuda, G, and Nozaki, T (2002) Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area J Clin Microbiol 40, 4081-90
- 3) Basombrio, M, Gomez, L, Padilla, A M, Ciaccio, M, Nozaki, T, and Cross, G A M (2002) Targeted

deletion of the Gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors J Parasitol 88, 489-493

- 4) Kabututu, Z, Martin, S K, Nozaki, T, Kawazu, S, Okada, T, Munday, C J, Duszenko, M, Lazarus, M, Urade, Y, and Kubata, B K (2002) Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 in *Leishmania* Int J Parasitol 32, 1693-1700
- 5) Kubata, B K, Munday, C J, Nozaki, T, Kabututu, Z, Fukuzumi S, Ohkubo K, Lazarus, M, Martin, S K, Duszenko, M, and Urade, Y (2002) A key role for *Trypanosoma cruzi* Old Yellow Enzyme in the metabolism of trypanocidal drugs J Exp Med 196, 1241-1251
- 6) 野崎智義、竹内勤 (2002) 寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生合成 分解経路-新しい抗原虫感染ステイン合成酵素方薬剤の開発 標的-蛋白質核酸酵素 共立出版 47(1) 21-29
- 7) 野崎智義 (2002) 医師か令頭におくへき輸入感染症の世界分布 今日の治療指針 医学書院 pp1010-1012
- 8) 野崎智義 (2002) アメーバ症 小児科診療 診断と治療社 第65巻, 12号, 2132-2135

2 学会発表

- 1) Masaharu Tokoro, Takashi Asai, Seiki Kobayashi, Masanobu Tanabe, Tsutomu Takeuchi, Tomoyoshi Nozaki Characterization of methionine γ -lyase from *Entamoeba histolytica* a key enzyme of sulfur-containing amino acid degradation, Conference of amebiasis and the biology of *Entamoeba histolytica*, 2002
- 2) 所正治, 浅井隆吉, 小林正規, 田邊将信, 竹内勤, 野崎智義 赤痢アメーバメチオニ γ リアーゼの生理機能, 阻害剤を用いた*in vitro*, *in vivo*解析 第71回日本寄生虫学会大会、2002 3
- 3) 河津信一郎、野崎智義、坪井敬文、中野陽子、畑生俊光、鳥居本美、狩野繁之 (2002) ネズミマラリア原虫ペルオキレドキシンの蚊体内発育ステージにおける発現 (Expression of 2-Cys peroxiredoxin in the insect stages of *Plasmodium yoelii*) 第71回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
- 4) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素遺伝子のクローニングと発現 (Cloning and expression of the gene encoding farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*) 第71回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
- 5) 野崎智義、今田美穂子、中野由美子 (2002) 赤痢アメーバのシグナル伝達経路の解析 プロテインフォスファターゼ2Cの解析 (Signal trans-

- duction of *Entamoeba histolytica* molecular characterization of protein phosphatase 2C from *E histolytica* 第71回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
- 6) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのRab変異発現株を用いたファゴサイトーシスの解析 (Mutant EhRab proteins as a tool to understand the mechanism of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*) 第71回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
 - 7) 所正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの生理機能 阻害剤を用いた *in vitro*, *in vivo* 解析 (Study of physiological function of methionine gamma-lyase in *Entamoeba histolytica* inhibition analysis *in vitro* and *in vivo*) 第71回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
 - 8) Haghghi, A, Zaki, M, Clark, G, Kobayashi, S, Takeuchi, T, Masuda, G, and Nozaki, T (2002) Highly-polymorphic DNA of the *Entamoeba histolytica* isolates from Japan 第71回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
 - 9) Nozaki, T (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* Mitochondriate Protozoan Genome Sequencing Projects *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Giardia lamblia* Cambridge, U K, hosted by The Wellcome Trust, May 20-21, 2002
 - 10) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、竹内勤、野崎智義 (2002) ファゴサイトーシス初期に形成されるEhRab5とEhRab7が局在する空胞は病原因子の輸送に関与する 第55回日本細胞生物学会大会 May 22, 2002
 - 11) 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバ貪食におけるRabエフェクター分子の解析 第10回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002
 - 12) 岡田麻美、野崎智義 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバ貪食機構の解析 第10回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002
 - 13) Nozaki, T, Saito-Nakano, Y, Okada, M, Nudeshima, M, Shigeta, Y, Hughes, M A, Huston, C D, Mann, B M, and Petri, Jr, W A (2002) Isolation and partial characterization of Rab-interacting proteins from *Entamoeba histolytica* toward the molecular understanding of Rab functions during phagocytosis Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002
 - 14) Haghghi, A, Kobayashi, S, Takeuchi, T, Thammapalerd, N, Masuda, G, and Nozaki, T (2002) DNA fingerprinting of *Entamoeba histolytica* isolates Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002
 - 15) Okada, M, Saito-Nakano, Y, Yasuda, T, and Nozaki, T (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* isolates Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002
 - 16) Nozaki, T and Ali, V (2002) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in parasitic protozoa The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002
 - 17) Kubata, B, Kabututu, Z, Nozaki, T, Lazarus, M, and Urade, Y (2002) A key role for *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme in the metabolism of trypanocidal drugs The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002
 - 18) 岡田麻美、中野由美子、保田友義、野崎智義 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバの貪食機構の解析 第75回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002 (口頭、ホスター)
 - 19) 所正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの解析 腸管内寄生原虫における含硫アミノ酸代謝 第75回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002 (ホスター)
 - 20) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのフェルニル転移酵素の解析 第75回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002 (ポスター)
 - 21) Nozaki, T (2002) Proteomic analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* Forum Cheju - 8, The 5th Korea-Japan Parasitologists Seminar, Oct 5-6, 2002
 - 22) 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバにおける鉄-硫黄クラスター生合成の特殊性 第1回分子寄生虫 マラリア研究フォーラム 松山、Oct 12-13, 2002
 - 23) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファゴサイトーシスにおけるRab機能の特殊性 第25回日本分子生物学会年会 シンポジウム 横浜、Dec 11-14, 2002
 - 24) 中野由美子、保田友義、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバに特異的なファゴサイトーシスを調節するRab GTPaseの解析 感染症若手研究者沖縄フォーラム 宜野湾、沖縄、Jan 22-23, 2003

知的財産権の出願・登録状況

なし。



悪性リンパ腫のマーカーとしてのEBV DNA定量、カポジ肉腫のマーカーとしてのHHV-8定量

吉田 敦¹⁾、中村 哲也²⁾、味澤 篤³⁾、岡 慎一⁴⁾、木村 哲^{1,4)}

¹⁾ 東京大学医学部附属病院感染制御部

²⁾ 東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科

³⁾ 東京都立駒込病院感染症科

⁴⁾ 国立国際医療センター、エイズ治療研究開発センター

研究要旨

HIV感染者において、real-time PCR法を用いて、血漿中EBウイルスDNA量と悪性リンパ腫との相関を、Human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA量とカポジ肉腫との相関をそれぞれ解析した。PCR反応の増幅領域は、EBウイルスDNA定量ではBNRF4領域に、HHV-8 DNA定量ではORF 26領域にそれぞれ設定した。

血漿中EBウイルスDNA量は100例において測定できたが、このうち悪性リンパ腫(AIDS関連非ホジキンリンパ腫)を認めたのは12例であった。12例のうち治療後である3例を除いた9例中、7例においてEBウイルスDNA量は定量感度(200 copies/mL)以上であった(200 - 8×10^4 copies/mL)。これに対し、悪性リンパ腫を認めない88例はすべて定量感度以下であった。悪性リンパ腫の臨床経過とDNA量との相関をみた2例では、DNA量は化学療法や放射線療法が奏功すると低下し、治療抵抗性になると再上昇した。また、同法を用いて髄液中のEBウイルスDNA量を測定したところ、中枢神経リンパ腫2例では 2×10^6 、 1×10^5 copies/mLであったのに対し、中枢神経浸潤のないリンパ腫例4例と、リンパ腫のないHIV感染者17例中16例では、定量感度以下であった。

血漿中HHV-8 DNA量は85例において測定できたが、このうちカポジ肉腫は18例に認められた。カポジ肉腫例のDNA量は $< 200 - 5 \times 10^4$ copies/mLであり、200 copies/mLを超えたのは7例であったが、カポジ肉腫のない66例では、2例を除きDNA量は200 copies/mL未満であった。

悪性リンパ腫の存在や臨床経過と、EBウイルスDNA量との間には比較的良い相関関係が認められた。カポジ肉腫とHHV-8 DNA量との相関関係は、EBウイルスほどではなかったが、HHV-8 DNA量が検出された場合の意義は高いと考えられた。

分担研究者 木村 哲、中村哲也、味澤 篤、岡 慎一

研究協力者 吉田 敦

Correlation of EB virus DNA load and malignant lymphoma, and relationship of HHV-8 virus load and Kaposi's sarcoma

Atsushi Yoshida¹⁾, Tetsuya Nakamura²⁾, Atsushi Ajsawa³⁾, Shinichi Oka⁴⁾, Satoshi Kimura^{1,4)}

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo Hospital, ²⁾ Division of Infectious Diseases and Applied Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ³⁾ Department of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, ⁴⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

研究目的

HIV感染者における悪性リンパ腫、およびカポジ肉腫の診断や病勢の判定に役立つ指標は少ない。両者はそれぞれヘルペスウイルス属に属するEBウイルス、HHV-8との関連が深く、これらにより惹起される場合が多いが、現在までこれらの遺伝子を検出しようとする試みが一部でなされてきたのみであった。我々は近年、ヘルペスウイルスの一つであるCMVについて、real-time PCR法を用いて血中のCMV DNA量を定量し、それがCMV感染症の診断、治療効果の判定のマーカーになりうることを明らかにしてきた¹⁾。このCMVでの定量法を応用し、EBウイルスDNA量とHHV-8 DNA量の定量系を構築し、血中のDNA量がそれぞれ悪性リンパ腫とカポジ肉腫の臨床的なマーカーになりうるかどうか検討した。

方法と結果

EBウイルスとHHV-8それぞれについて個別に述べる。

1 研究I：血漿中EBウイルスDNA量と悪性リンパ腫との相関

方法

1998年11月から2002年11月までに、東京大学医学部附属病院感染症内科、東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科、都立駒込病院感染症科、国立国際医療センターエイズ治療 研究開発センター（以下これらを4病院と略す）を受診したHIV感染者100例から血液を採取し、遠心分離後、血漿を得た。血漿200 μLからQiagen社のQIAamp® DNA Mini Kitを用いてDNAを抽出し（distilled water 44 μLに溶出）、抽出されたDNAについて、EBウイルスゲノムのBNRF1領域（gp 350/220とgp 140のmembrane proteinをコードする）をターゲットとして、PCR反応を行った（GenBank V01555、PCR primers, 5'-CCA GTG CTG TGA TCG AGC ATC T-3'、および5'-CTG CTG ACA AAC TGC TGC ATT C-3'、並びにfluorogenic probe, 5'-[FAM] TCT GCT GTT GTT TCT GTC TCA CCT ACC GG [TAMRA]-3'）。PCR反応はDNA 溶液22 μLと2x

TaqMan Universal PCR Master Mix (Perkin-Elmer Applied Biosystems) 25 μLと各 primer 15 pmol、fluorogenic probe 10 pmolを含む50 μLの反応系で行った。反応条件は50℃ 2分、95℃ 10分、95℃ 15秒と60℃ 1分を50サイクル、とした。Perkin-Elmer社のABI PRISM™ 7700 Systemを用い、PCR増幅産物中の蛍光色素FAMからの光量を測定することにより、EBウイルス(EBV) DNAコピー数を算出した。この際、EBVゲノム断片をcloning vector pCR 2.1 (Invitrogen)を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドの段階希釈系列を定量のスタンダードとして用いた。さらに200 copies/mL以下では定量したDNA量のばらつきが大きくなり、再現性が低くなることから、200 copies/mLを定量の限界（定量限界）として設定した。このようにして得られたDNA量と、悪性リンパ腫の有無との関係を検討した。

結果

100中12例で悪性リンパ腫（AIDS関連非ホジキンリンパ腫）を認めた。病理学的分類の内訳は、diffuse large B lymphoma (DLBL) 3例、Burkitt lymphoma 2例、DLBL-like lymphoma 2例（うち1例は免疫染色でEBV positive、他の1例はEBV negative）、diffuse large lymphoma immunoblastic type 1例、anaplastic large cell lymphoma-like 1例、不明3例であり、Stage分類の内訳は、Iが1例、IIIが3例、IVが4例、不明1例、中枢神経3例であった。12例のうち3例ではすでに治療（外科的手術や化学療法）が行われており、寛解状態にあった。12例のEBV DNA量は、<200 - 8×10^4 copies/mLであったが、治療後の3例はいずれも200 copies/mL未満であり、残りの9例中7例のDNA量は、200 - 8×10^4 copies/mLであった（図1）。さらにstageとDNA量との相関をみると、最もDNA量の多かった2例（それぞれ 7×10^4 、 8×10^4 copies/mL）はいずれもstage IVであった。これに対し、悪性リンパ腫を認めない88例ではすべて、DNA量は200 copies/mL以下であった。

一方、100例中33例ではCD4陽性リンパ球数とDNA量との関係を確認することができた（図2）。CD4陽性リンパ球数が少なくなるとEBV DNA量は多くなる傾向にあり、悪性リンパ腫の発症も増加してはいたが、これらの相関は直線的ではなかつ

た。

さらに悪性リンパ腫2例の臨床経過において、DNA量を経時的に追跡しえた。図3は43歳男性stage IVの経過を示しているが、化学療法が奏功するとDNA量は一旦定量感度以下になった。しかしながら7月になりリンパ腫の増悪がみられるとともに、DNA量は再増加した。コントロール不良となり不帰の転帰をたどったが、この時のDNA量は 5×10^4 copies/mLであった。

一方、図4は38歳女性stage IIIの経過を示している。リンパ腫に対し当初化学療法は行わず、HAART療法のみを行っていたが、リンパ腫の増大を認め、この時同時にDNA量の直線的な増加を認めた。このため全身的な化学療法を追加したと

ころ、リンパ腫の縮小とDNA量の減少が認められたが、強い骨髄抑制が生じ、化学療法の中止を余儀なくされた。3月以降再びリンパ腫の増悪を認め、最終的に7月末に死亡したが、DNA量もそれと経過を同じくして増加し、死亡直前には 10^6 copies/mLを超えるようになっていた。

また、血漿の場合と同様の方法で、検体として髄液を用い、髄液中のEBV DNA量を定量した(23例)。中枢神経原発リンパ腫2例ではDNA量は 2×10^6 、 1×10^5 copies/mLと高値であったのに対し、中枢神経浸潤のないリンパ腫例4例と、リンパ腫のないHIV感染者17例中16例では200 copies/mL以下と低値であった(図5)。

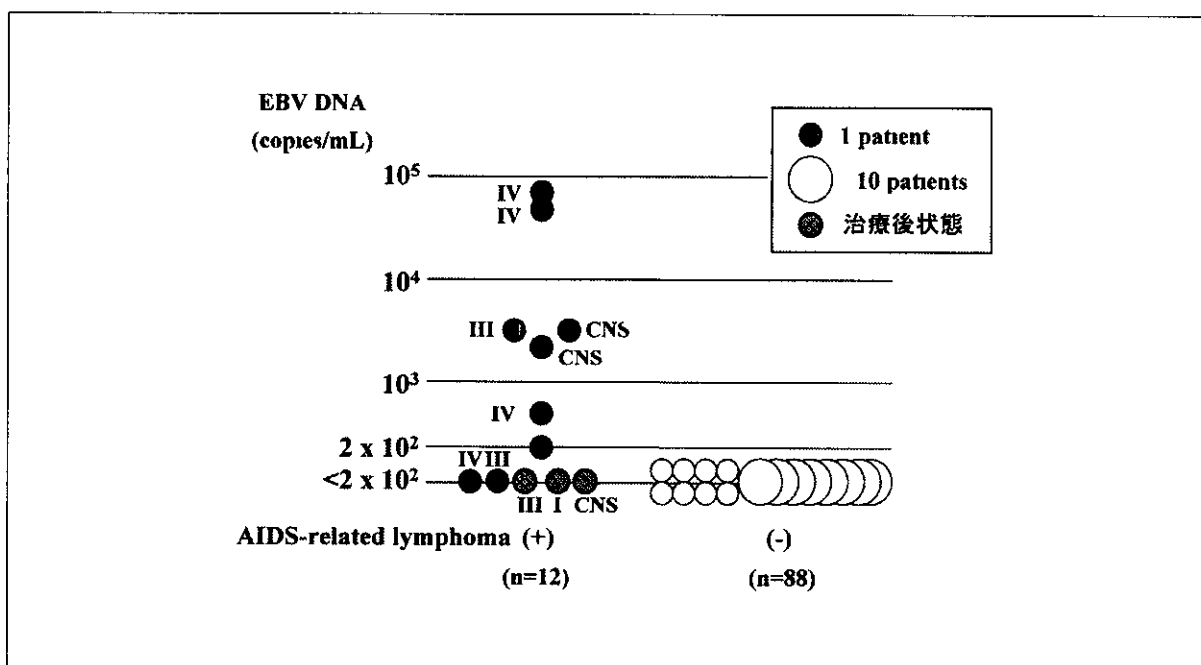


図1 血漿中EBV DNA量とAIDS関連リンパ腫の有無 (n=100)
 黒丸はAIDS関連非ホジキンリンパ腫例 (n=12) を、白抜き丸はリンパ腫のない例 (n=88) を示す。
 丸印のそばのローマ数字はstageを示す。CNS 中枢神経リンパ腫。

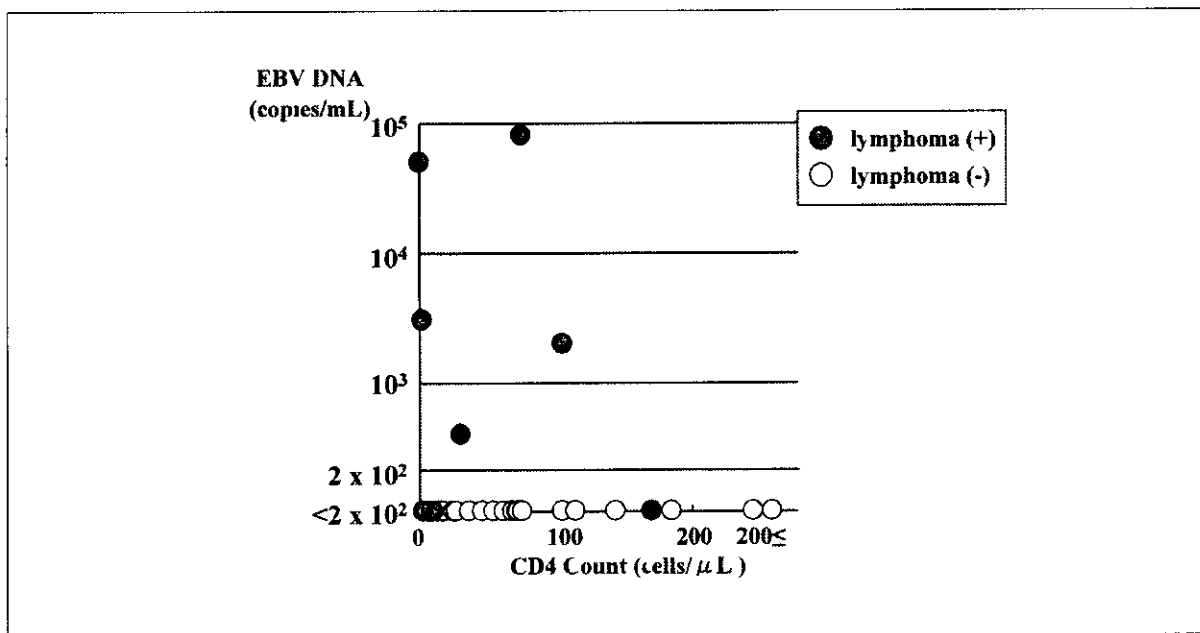


図2 血漿中EBV DNA量とCD4陽性リンパ球数との関係 (n=33)
 黒丸は AIDS 関連非ホジキンリンパ腫例 (n=8) を 白抜き丸はリンパ腫のない例 (n=25) を示す

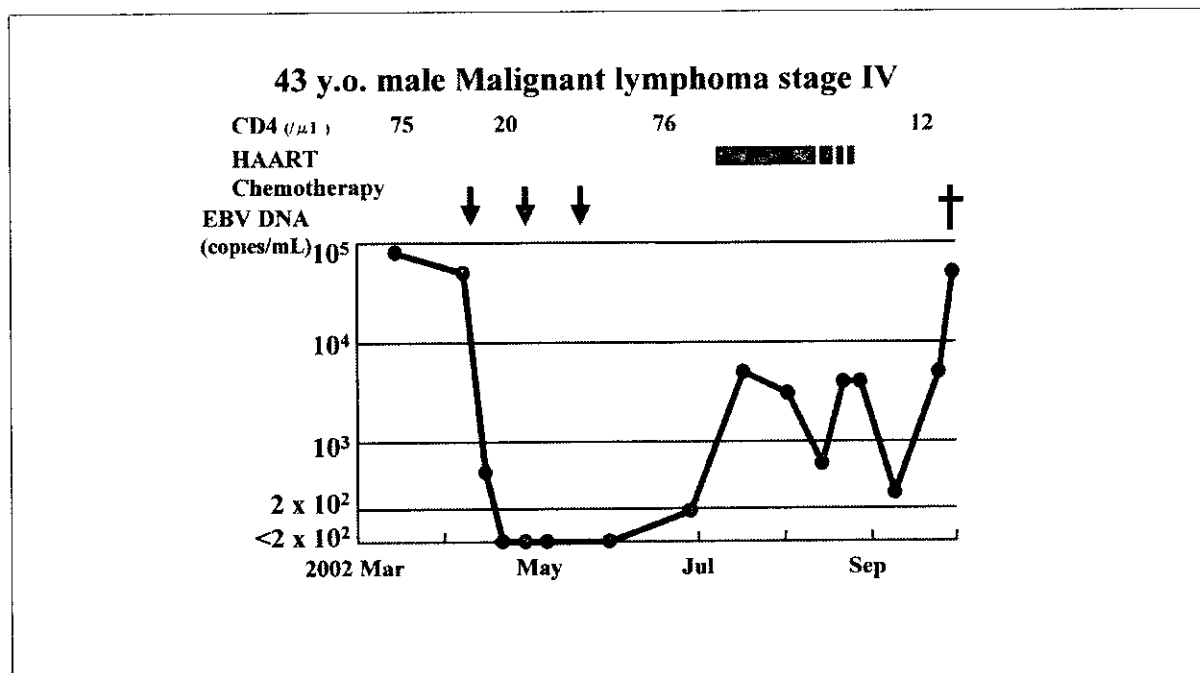


図3 43歳男性、非ホジキンリンパ腫 stage IV

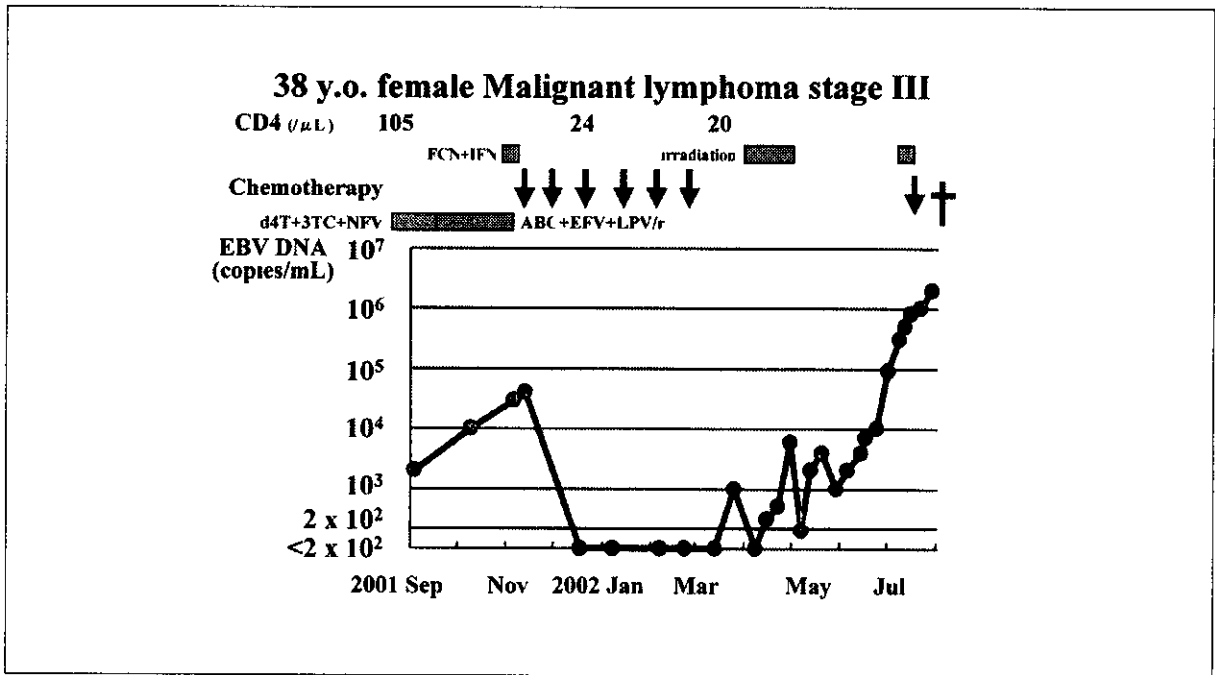


図4 38歳女性、非ホジキンリンパ腫 stage III

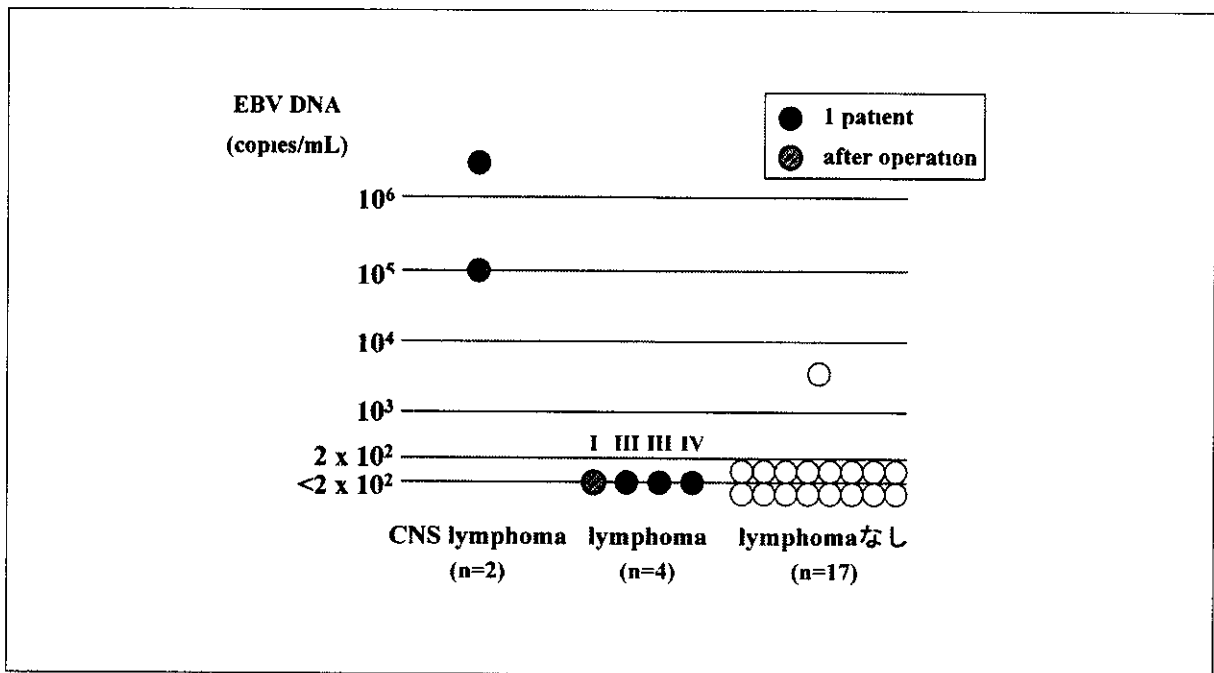


図5 髄液中EBV DNA量と悪性リンパ腫の有無
黒丸は無治療の非ホジキン悪性リンパ腫例を示す。丸印の上のローマ数字はstageを示す。
白抜き丸は悪性リンパ腫のない者。CNS lymphoma 中枢神経原発リンパ腫。

2 研究II 血漿中HHV-8 DNA量とカポジ肉腫との相関

方法

EBVの場合と同様に、real-time PCR法を用いたHHV-8ゲノムの定量系を作成した。PCR反応の増幅領域は、Open reading frame 26 (minor capsid protein homolog)に設定した (GenBank U75698、PCR primers, 5'-GAT TCC ACC ATT GTG CTC GAA T-3'、および5'-TAC ACC AAC AGC TGC TGC AGA A-3'、並びにfluorogenic probe, 5'-ACG GAT TTG ACC TCG TGT TCC CCA TG-3')。さらにEBVの場合と同様に、定量のスタンダードとしての段階希釈系列の作成を行った。図6は、このHHV-8ゲノム定量系の特異性を示しているが、この定量法では、HHV-8ゲノムではPCR反応が起こったものの、CMVを初めとするHHV-8以外のヘルペスウイルスでは増幅反応が起こらなかった。また、各段階希釈 ($10^1 - 10^7$ copies/mL)の増幅曲線は、図7上のごとくに立ち上がり、DNAコピー数と増幅曲線立ち上がりのサイクル数(Ct値)との間には、良好な相関が得られた (相関係数0.997)。なおEBVの場合と同様、200 copies/mL以下では再現性が低くなることから、200 copies/mLを定量限界として設定した。

この基礎検討の後、患者サンプル中のDNA量を測定した。2000年3月から2002年11月までに、4病院を受診したHIV感染者85例から血液を採取し、遠心分離後に得た血漿からDNAを抽出した。抽出方法は研究Iと同一である。得られたDNA量と、カポジ肉腫の有無との関係を検討した。

結果

血漿中HHV-8 DNA量は85例において測定できたが、このうちカポジ肉腫を18例に認めた。カポジ肉腫例でのDNA量は $< 200 - 5 \times 10^4$ copies/mLであり、200 copies/mLを超えたのは7例であった。カポジ肉腫のない66例では、2例 (4×10^3 、 4×10^2 copies/mL)を除きDNA量は200 copies/mL未満であった (Castlemans' s diseaseの症例でも200 copies/mL未満であった) (図8)。なおカポジ肉腫例で、DNA量が最も高値を示した例 (図8の*印の例)は、米国出身の白人の症例で、HHV-8に対するIgM抗体陽性であり、かつ悪性リンパ腫を合併していた。

EBV DNAの場合と同様に、HHV-8 DNA量とCD4陽性リンパ球数との相関をみたが、CD4陽性リンパ球数の低下と、DNA量との間には、はっきりした関連を見出せなかった (図9)。

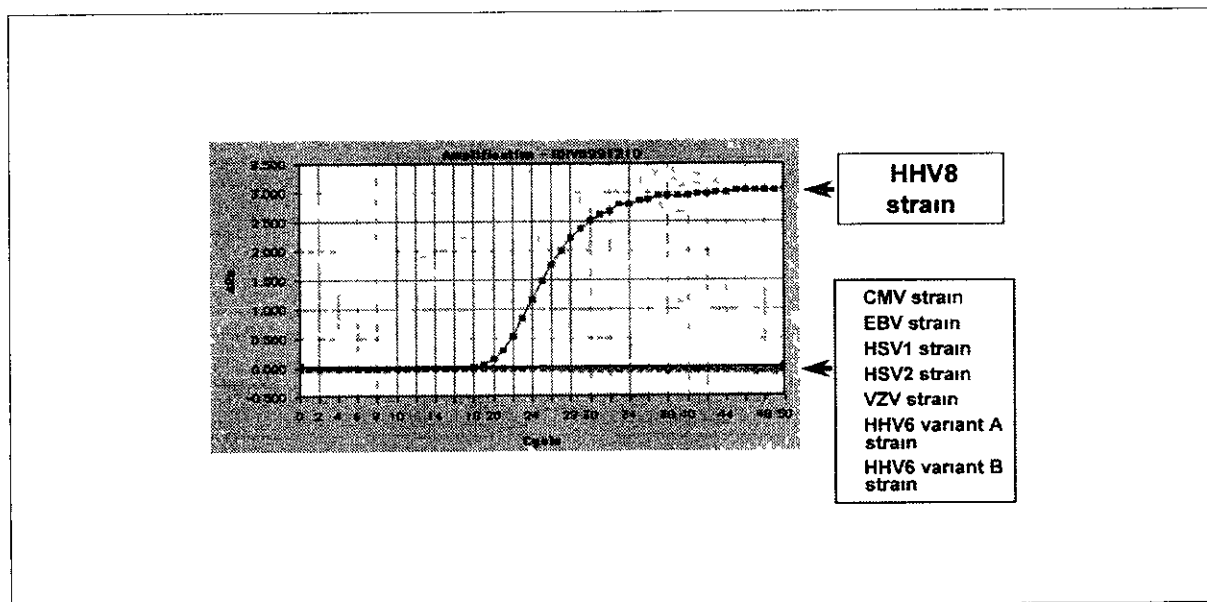


図6 HHV-8 real time PCRの特異性
他のヘルペスウイルス (CMV EBV HSV、VZV HHV6) ゲノムについてHHV-8 real-time PCRを行ったが増幅されるものはなく 交差反応は生じなかった

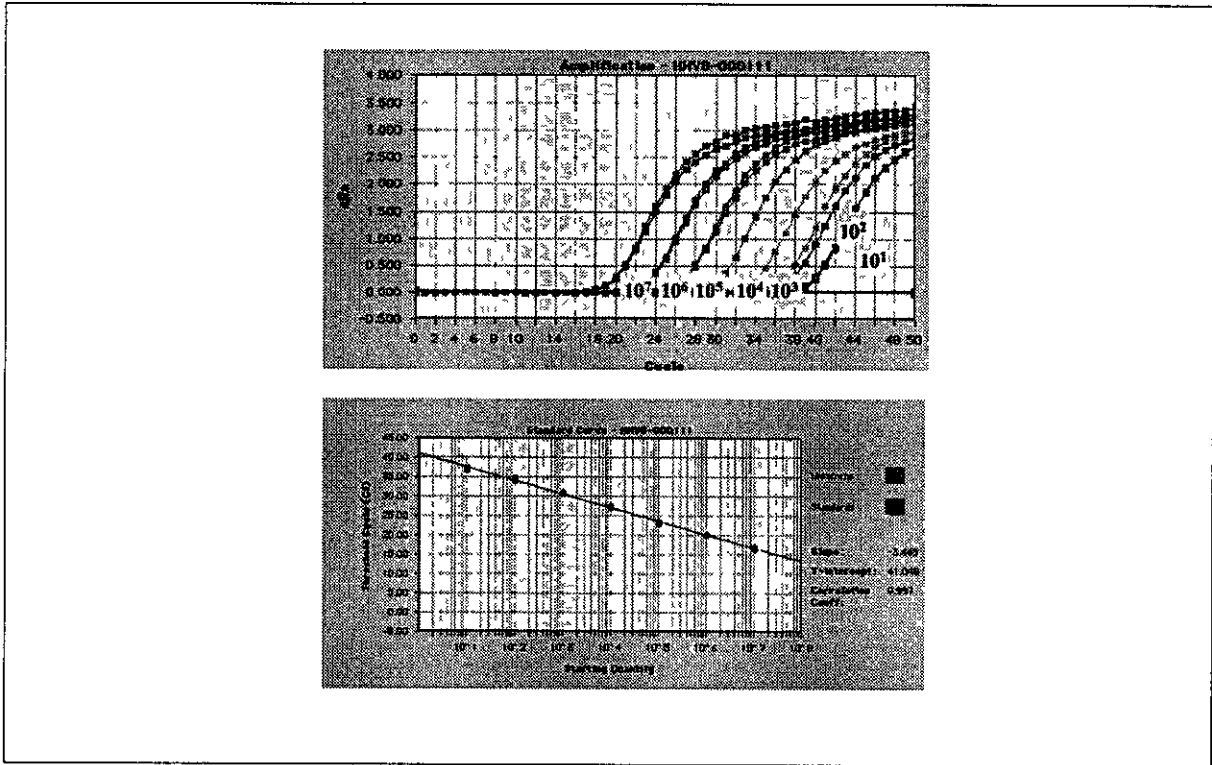


図7 HHV-8 DNA 段階希釈系列 (スタンダード) の増幅
 上は、各濃度でのそれぞれの増幅曲線を示す (10^1 - 10^7 copies/mL)。下は、各濃度の増幅曲線より作成した DNA 量と Ct 値との相関直線。相関係数は 0.997 と良好である。
 この直線を用いて未知の濃度のサンプルの定量を行う。

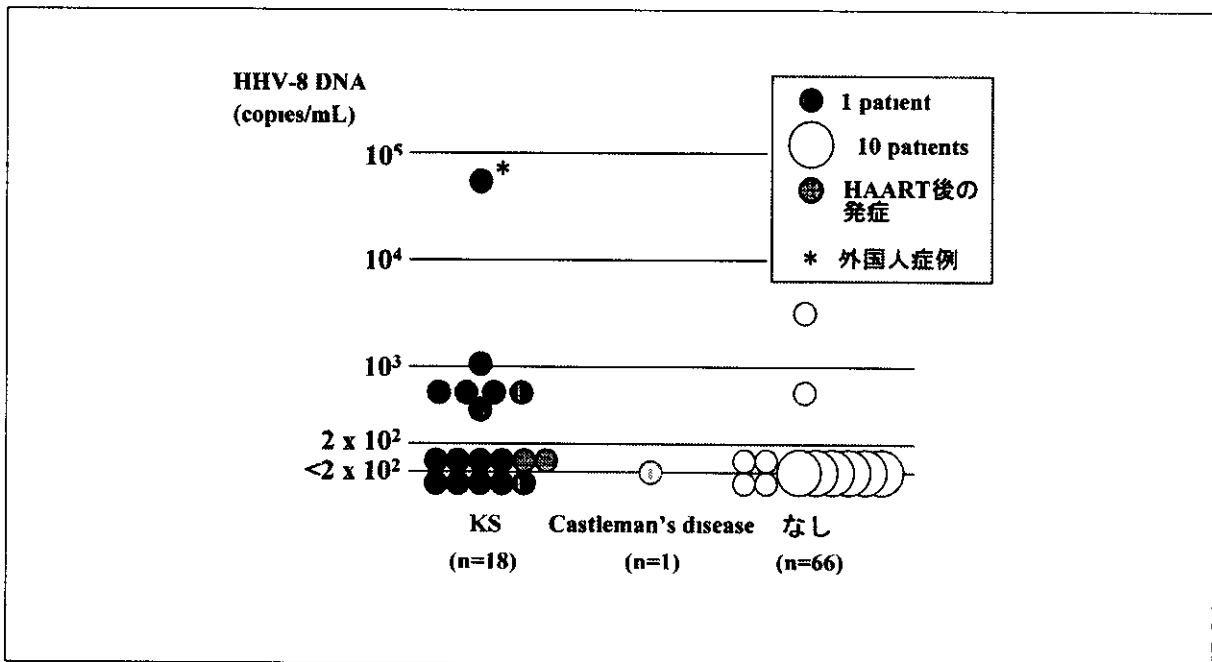


図8 血漿中 HHV-8 DNA 量とカポジ肉腫の有無 (n=85)
 黒塗り丸はカポジ肉腫例 (HAART 開始前に発症) (n=16) を、白抜き丸はカポジ肉腫のない例 (n=66) を示す。
 * 印の例は、外国人 (木国人) 例で、HHV-8 の初感染が疑われた例である。

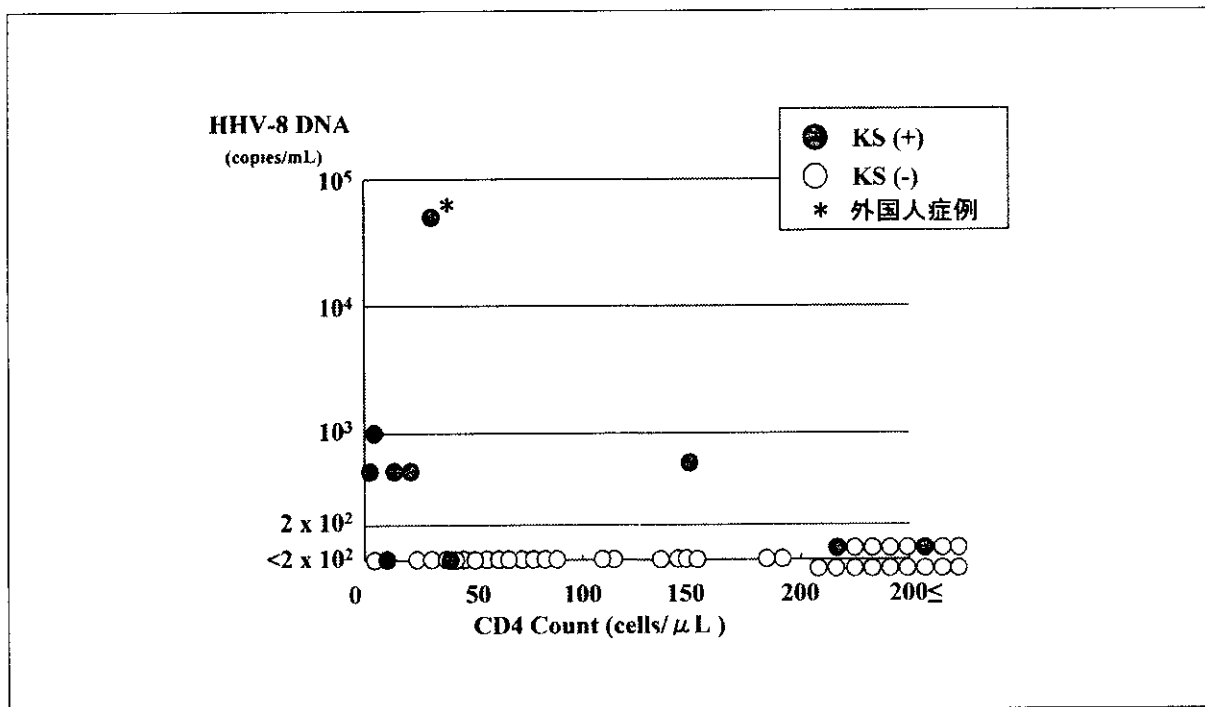


図9 血漿中HHV-8 DNA量とCD4陽性リンパ球数との関係 (n=47)
 黒丸はカポジ肉腫例 (n=10) を、白抜き丸はカポジ肉腫のない例 (n=37) を示す。
 CD4陽性リンパ球数とDNA量との間の逆相関の関係ははっきりしない。

考 察

初感染の後、B細胞に潜伏・持続感染しているEBウイルスは、免疫不全状態において再活性化し、リンパ球の増殖を引き起こす。AIDS関連リンパ腫はEBウイルスとの関連が深く、その50-75%はEBウイルスによるものといわれ、Tリンパ球によるEBV特異的な免疫反応の欠如がその成因にかかわっているとされている²⁾。一方、リンパ球の増加にはEBウイルス量の増加が予知因子になる可能性が指摘され、EBVゲノムを検出・定量しようとする試みもなされてきた。しかしながら、B細胞に潜伏・持続感染の状態しているために、末梢血単核球や全血中のEBV DNAを検出・定量すると、正常人でも検出・定量される³⁾。病変の有無によりDNA量の閾値を設定する必要があるといった問題が生じていた。また、現在までの検討の多くはAIDSに関連のない、臓器移植に伴って生じたリンパ腫を対象としており⁴⁾、AIDS関連リンパ腫での報告はわずかであった。

一方、定量的PCR法の一方で、簡便性・迅速性

に優れたreal-time PCR法が開発され、微生物の遺伝子定量に応用されるようになった^{2,5,6)}。特にvan Baarleらはreal-time PCR法を用いて、AIDS関連リンパ腫患者の末梢血単核球中・血清中のEBV DNA定量を行った⁶⁾。しかしながらDNA量とリンパ腫との間の相関は(特に発症の予知において)満足できるものではなかった。

今回我々は血漿から抽出したDNAについて、同法を用いてEBV DNA量を定量したか、リンパ腫発症例(未治療)とそれらのDNA量との間には比較的良好な関連があった。さらにリンパ腫のない例ではDNA量の増加がほとんどなかったことも判明した。van Baarleらの報告では、発症がなくとも(特に末梢血単核球中で)DNAが増加していた例が指摘されているが、検体として血漿のみを用いた本検討ではこれに比べ、特異度が高い可能性があった。また本検討では、CD4陽性リンパ球数が減少しても、EBV DNA量の増加は比較的少ない傾向があった。この特徴は前出の報告では指摘されていないものであった。

一方、中枢神経原発の悪性リンパ腫において

も、EBVが発症に大きく関与することが指摘され、PCR法による髄液中のEBV DNAの検出が、高い感度と特異度を有することが(立川らにより)既に報告されている⁷⁾。本検討で定量できたのはわずか2例であったが、いずれもDNA量は非常に高値であり、また、中枢神経リンパ腫のない他のHIV感染者においては、DNA量はほとんど増加していなかった。この結果は立川らの報告に合致するものと思われた。

カポジ肉腫についても、EBVと同様、臨床的なマーカーが求められてきた。HHV-8に対する抗体の陽転と、カポジ肉腫の発症との相関が明らかにされた⁸⁾一方、簡便なHHV-8ゲノムの検出法が模索されるようになった。Campbellらのグループはreal-time PCR法によるHHV-8 DNA定量系を開発し、末梢血単核球と血漿それぞれについて定量を行って、末梢血単核球中のDNA量とカポジ肉腫の臨床病期とが相関することを明らかにした^{9,10)}。しかしながらこの検討においては、血漿中DNA量はカポジ肉腫のない例においても比較的高かった(有る例、ない例ともに中央値が 3×10^3 copies/mL程度。最高値は $10^4 - 10^5$ copies/mL)。本検討においては、血漿中DNA量は、カポジ肉腫のない例においてはほとんど増加していなかったが、一方で、有る例でも(米国人の1例を除き)、 10^3 copies/mL以下と比較的低い値であった。Campbellらの検討と、本検討との間でみられたこの違いか、という理由によるものかについては、今後検討が必要であると思われる(定量系の検出力の違いのみではない可能性もある)。また、今回の検討では、HARRT療法開始後にカポジ肉腫を発症した例も含まれていたが、HAART療法に伴うHHV-8 DNA量の変化についても今後検討する必要があると思われる(一部ではHAART療法開始後でもHHV-8 DNA量が減少せず、増加に転じた例かあるとの報告¹¹⁾がある)。

結 論

real-time PCR法により測定した血漿中のEBV DNA量は、悪性リンパ腫の存在や臨床経過と、比較的良好な相関関係にある。一方、カポジ肉腫とHHV-8 DNA量との相関関係は、EBウイルスほど

ではないが、HHV-8 DNA量が検出された場合の意義は高いと考えられる。

健康危険情報

特記すべきこと無し

参考文献

- 1) Yoshida, A, Hitomi, S, Fukui, T, et al Diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay *Clin Infect Dis* 33 1756-1761, 2001
- 2) van Baarle, D, Hovenkamp, E, Callan, MFC, et al Dysfunctional Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T lymphocytes and increased EBV load in HIV-1 infected individuals progressing to AIDS-related non-Hodgkin lymphoma *Blood* 98 146-155, 2001
- 3) Wagner, HJ, Bein, G, Bitsch, A, et al Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus-seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction *J Clin Microbiol* 30 2826-2829, 1992
- 4) Rowe, DT, Qu, L, Reyes, J, et al Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders *J Clin Microbiol* 35 1612-1615, 1997
- 5) Niesters, HGM, van Esser, J, Fries E, et al Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus *J Clin Microbiol* 38 712-715, 2000
- 6) van Baarle, D, Wolthers, KC, Hovenkamp, E, et al Absolute level of Epstein-Barr virus DNA in human immunodeficiency virus type 1 infection is not predictive of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma *J Infect Dis* 186 405-409, 2002
- 7) Tachikawa, N, Goto, M, Hoshino, Y, et al PCR detects *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus DNAs in the cerebrospinal fluid in AIDS patients with focal CNS complications *Intern Med* 38 556-562, 1999
- 8) Renwick, N, Halaby, T, Weverling, GJ, et al Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma *AIDS* 12 2481-2488, 1998
- 9) White, IE, Campbell, TB Quantitation of cell-free and cell-associated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA by real-time PCR *J Clin Microbiol* 38 1992-1995, 2000
- 10) Campbell, TB, Borok, M, Gwanzura L, et al Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood

virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage AIDS
14 2109-2116 2000

- 11) Tedeschi, R, Enbom, M, Bidoli, E, et al Viral load of human herpesvirus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma J Clin Microbiol 39 4269-4273, 2001

研究発表

1 論文発表

- 1) Yoshida, A Hitomi, S, Fukui, T, et al Diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay Clin Infect Dis 33 1756-1761, 2001

知的財産権の出願・登録状況

なし



BCBL-1を用いたIL-6及びIL-1 β による HHV-8早期増殖期遺伝子(ORF50) 発現機序の解析

宋 健¹⁾、吉崎 和幸^{1,2)}

¹⁾ 大阪大学健康体育部健康医学第一部門

²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学

研究要旨

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 (KSHV/HHV-8)は、宿主細胞内で通常では潜伏状態にあり、ウイルスの遺伝子発現は抑制されている。ウイルスの増殖期にはウイルスの様々なlytic geneの活性化が生じ、宿主細胞が破壊され感染が拡大する。HHV-8の早期増殖期遺伝子ORF50は、潜伏感染期から増殖期への“スイッチ遺伝子”(switch gene)として知られている、ORF50遺伝子の発現抑制はHHV-8における関連疾患の発症を予防することにつながると考えられる。昨年度我々は、HHV-8が感染状態にあるBCBL-1細胞を使い、リアルタイムRT-PCRを用いて、IL-6によるORF50の発現を促すことから、HHV-8複製においてORF50がIL-6の作用点であることを決定するとともにIL-6阻害によるウイルス複製の制御の可能性のあることを報告した。ところで、HHV-8のORF50のpromoter領域にはOctamer, Ap-1とNF- κ Bの結合配列が存在することが報告されている。我々はPromoter領域SequenceをHomology Searchした結果、NF-IL6結合様配列が存在することが分かった。従ってこのような多様な転写因子の結合配列がどのような機序でORF50の転写に関与するかを検討するため、また、HIV/HHV-8が感染した患者血清中ではIL-6のほかにIL-1 β やTNF α も増加することが報告されているため、今年度の研究はIL-6に加えて他のサイトカインIL-1 β とTNF α によるORF50の発現を検討した。

ORF50 mRNAの発現検索にHHV-8が潜伏感染するBCBL-1細胞を用いた。2 \times 10⁶個の細胞をIL-6(100 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、TNF α (20 ng/ml)の存在下で3日間培養し、Qiagen Rneasy mini-kitでRNAを抽出した。早期増殖期遺伝子としてORF50に対する特異的プライマーとTaqmanプローブを使い、PE Biosystem 5700を用いて定量的RT-PCRを行った。ヒト β_2 MをInternal Controlとした。

HHV-8が潜伏感染状態にあるBCBL-1細胞においてORF50 mRNAはIL-6、又はIL-1 β を3日間刺激により無刺激の細胞に比べ4倍と2倍に増加したが、TNF α の刺激では誘導しなかった。しかし、IL-6とIL-1 β あるいはIL-6とTNF α の組み合わせの刺激の場合、ORF50発現誘導の相乗効果は認められず、むしろIL-6単独刺激に比べ減少傾向を示した。

分担研究者 吉崎和幸

研究協力者 宋 健

Induction of HHV-8 ORF50 mRNA by Interleukin-6 (IL-6) and/or Interleukin-1 β (IL-1 β) in BCBL-1 cells

Jian Song¹⁾ and Kazuyuki Yoshizaki^{1, 2)}

¹⁾Department of Medical Science I School of Health and Sport Sciences Osaka University and ²⁾Department of Clinical Immunology, Graduate School of Medicine Osaka University

研究目的

HHV-8は、AIDSに合併するカポジ肉腫、悪性リンパ腫あるいはある種のCastleman病の原因ウイルスである。HHV-8は細胞に感染すると、通常では潜伏状態になり、ウイルスの遺伝子発現は制限される。一方、ウイルスの増殖期には様々なlytic geneが活性化され、ウイルス複製の増加により宿主細胞が破壊され、さらに感染が拡大する。従って、潜伏期からlytic増殖期に移行することはHHV-8における関連疾患の発症においてもっとも重要である。HHV-8のlytic増殖活性化においては早期増殖期遺伝子であるORF50か、すべての増殖期遺伝子を発現させることから、潜伏期からlytic増殖期に移行させるスイッチ遺伝子(switch gene)と同一化されている。したがってORF50遺伝子の発現抑制はウイルス増殖の制御、感染拡大の予防に重要であると考えられている。昨年、我々は、リアルタイムRT-PCR方法を用い、IL-6によるORF50 mRNAの発現誘導を検討した。その結果、HIV感染により産生されるヒトIL-6がORF50の活性化によりHHV-8の増殖を促すことを認めた。我々の研究によって、IL-6が単にHHV-8感染細胞の増殖因子として働くばかりでなく、感染細胞内で潜伏状態であるHHV-8を再活性化し、複製され、そのために上記の疾患が悪化すると考えられている。これらの結果は従来我々が掲げているAIDS病態におけるHIVとHHV-8がIL-6を介し相互に病態を悪化させるというクロストーク仮説を支持するものであった。

HHV-8はヒトに感染すると、IL-6以外にIL-1 β やTNF α などサイトカインも感染後の反応として感染細胞から産生され、疾患の発症に関わっていることが報告されている。しかしIL-6をはじめとするサイトカインかどのようなメカニズムでORF50のmRNAを発現誘導させるかは明らかではない。ところで、HHV-8 ORF50のプロモーター上にはOct-1、NF- κ B、AP-1とNF-IL6の結合部位が存在することか報告されている。本年度、我々はIL-1 β とTNF α がIL-6と同様にORF50の発現を誘導することか出来るかどうか、さらにはこれらのサイトカインがORF50発現誘導に相乗効果があるかどうかを検討し、ORF50の発現調節機構を解析する。

研究方法

1 Real-time PCRシステム

Total RNAをBCBL-1細胞からRNeasy mini-kit (Qiagen)を用いて単離した。3 μ gのtotal RNAよりoligo-dT primer, M-MLV逆転写酵素を用いて37 $^{\circ}$ C 1時間でcDNAを合成した。早期増殖期遺伝子としてORF50に対する特異的プライマーとTaqmanプローブを作製し、PE Biosystem 5700を用いて定量的RT-PCRを行った。ORF50スタンダードはPCR産物をTAクローニング法でクローニングを行ったプラスミドDNAを用いた。一定の蛍光閾値に到達したPCRのサイクル数(Ct値)はPCRに加えたORF50 DNA量の対数値と10 7 から10 2 μ g/mlの範囲で直線的に相関した。段階希釈を行ったORF50 DNAを用いて作製した標準曲線からサンプル中のORF50 mRNA濃度を測定した。ヒト β_2 MをInternal ControlとしてORF50発現量を補正した。

2 HHV-8 ORF50の発現とその抑制試験

ORF50 mRNA発現の検討にはHHV-8が潜伏感染したBCBL-1細胞株を用いた。2 \times 10 6 個の細胞をIL-6(100 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、TNF α (20 ng/ml)の存在下で3日間培養し、ORF50のcDNAをリアルタイムPCRで定量した。またこれらサイトカインの組み合わせによる相乗効果を検討した。

次にIL-6, IL-1 β あるいはTNF α 阻害によるORF50発現抑制を調べるため、抗IL-6R抗体(25 μ g/ml)、IL-1R antagonist(IL-1Ra, 10 μ g/ml)と抗TNF α 抗体(10 μ g/ml)の存在下でそれぞれにサイトカイン刺激を行い、3日間培養した後BCBL-1細胞からRNAを抽出し、ORF50 cDNAをリアルタイムPCRで定量した。

研究結果

1 IL-6, IL-1 β とTNF α によるHHV-8のORF50の発現

ORF50発現の誘導がmRNAレベルで生じていることを確認するために、BCBL-1細胞をIL-6、IL-1 β 、TNF α の存在下で3日間培養した。リアルタイムPCRで調べた結果は、BCBL-1細胞においてORF50 mRNAはIL-6、IL-1 β 刺激により無刺激の

細胞に比べ4と2倍に増加したが、TNF α の刺激では誘導しなかった。(図1参照)。

2 IL-6, IL-1 β とTNF α の組み合わせによるORF50の発現

IL-6、IL-1 β 、TNF α の組み合わせで相乗効果の有無を検討した。BCBL-1細胞においてORF50 mRNAはIL-6+IL-1 β 、IL-6+TNF α とIL-1 β +TNF α の組み合わせではIL-6単独あるいはIL-1 β 単独刺激に比べ増加がむしろ少なく、相乗効果を認めなかった(図2参照)。

3 サイトカイン阻害によるORF50発現の抑制

IL-6 (100 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml) およびIL-6+IL-1 β の刺激によるBCBL-1細胞からのORF50 mRNA発現の誘導に対する抗IL-6R抗体(25 μ g/ml)の抑制効果、IL-1Ra(10 μ g/ml)の抑制または増強効果を検討した(図3参照)。抗IL-6R抗体がIL-6およびIL-6+IL-1 β によるORF50発現の誘導を阻害した。IL-1RaはIL-1 β によるORF50発現の誘導を阻害したが、IL-6+IL-1 β によるORF50発現の抑制阻害は認められなかった。

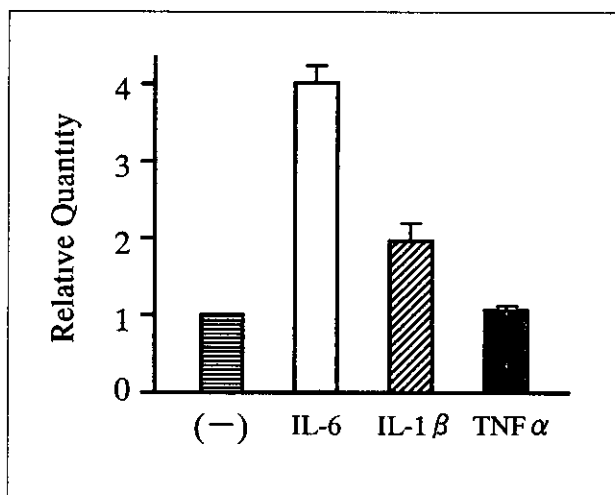


図1 BCBL-1細胞のIL-6, IL-1 β and TNF α 刺激によるHHV-8 ORF50mRNAの発現

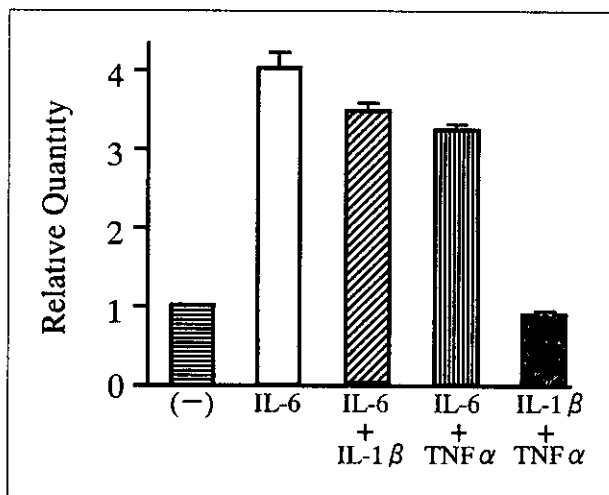


図2 BCBL-1細胞のIL-6, IL-1 β and TNF α Combination刺激によるHHV-8 ORF50mRNAの発現

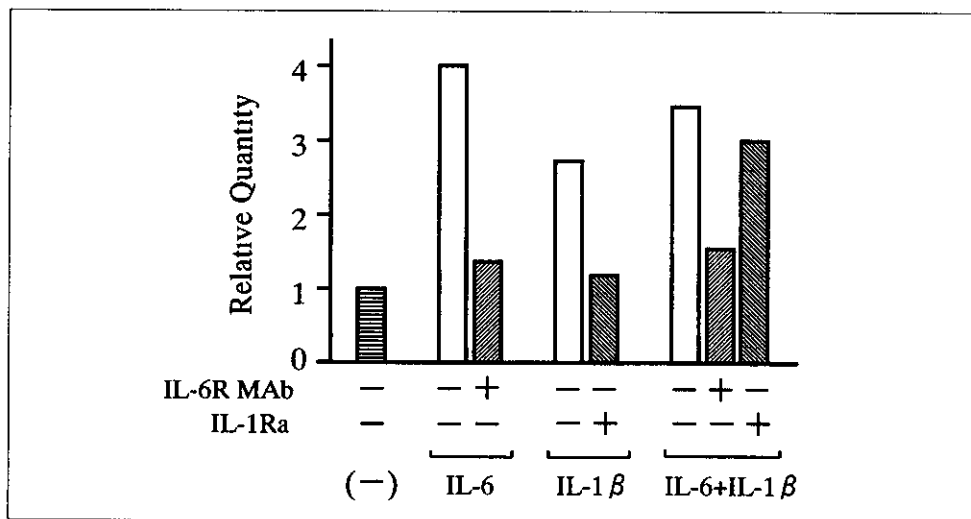


図3 Cytokine InhibitorによるIL-6, IL-1 β とIL-6+IL-1 β で誘導されたORF50mRNAの抑制