

2. Ghosh, S. & Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**, S81–S96.
3. Silverman, N. & Maniatis, T. (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**, 2321–2342.
4. Karin, M. & Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221–227.
5. Tak, P.P. & Firestein, G.S. (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**, 7–11.
6. Yoza, B.K., Hu, J.Y. & McCall, C.E. (1996) Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukin 1beta and NFkappaB activation, but not NFkappaB nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* **271**, 18306–18309.
7. Bergmann, M., Hart, L., Lindsay, M., Barnes, P.J. & Newton, R. (1998) IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 6607–6610.
8. Schmitz, M.L., Stelzer, G., Altmann, H., Meisterernst, M. & Baeuerle, P.A. (1995) Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators. *J. Biol. Chem.* **270**, 7219–7226.
9. Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H. & Nabel, G.J. (1997) Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* **275**, 523–527.
10. Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y. & Collins, T. (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 2927–2932.
11. Schmitz, M.L., dos Santos Silva, M.A. & Baeuerle, P.A. (1995) Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 15576–15584.
12. Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T. & Okamoto, T. (2003) The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J. Biol. Chem.* **278**, 919–926.
13. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. & Toriumi, W. (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 30353–30356.
14. Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T. & Saiki, I. (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 36916–36923.
15. Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Ghosh, S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* **89**, 413–424.
16. Zhong, H., May, M.J., Jimi, E. & Ghosh, S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* **9**, 625–636.
17. Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. & Collins, T. (1999) Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6367–6378.
18. Naar, A.M., Beaurang, P.A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W. & Tjian, R. (1999) Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* **398**, 828–832.
19. Xu, X., Prorock, C., Ishikawa, H., Maldonado, E., Ito, Y. & Gelinas, C. (1993) Functional interaction of the v-Rel and c-Rel oncoproteins with the TATA-binding protein and association with transcription factor IIB. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6733–6741.
20. Blair, W.S., Bogerd, H.P., Madore, S.J. & Cullen, B.R. (1994) Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA: identification of a highly synergistic minimal acidic activation module. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7226–7234.
21. Kerr, L.D., Ransone, L.J., Wamsley, P., Schmitt, M.J., Boyer, T.G., Zhou, Q., Berk, A.J. & Verma, I.M. (1993) Association between proto-oncoprotein Rel and TATA-binding protein mediates transcriptional activation by NF-kappa B. *Nature* **365**, 412–419.
22. Yamit-Hezi, A., Nir, S., Wolstein, O. & Dikstein, R. (2000) Interaction of TAFII105 with selected p65/RelA dimers is associated with activation of subset of NF-kappa B genes. *J. Biol. Chem.* **275**, 18180–18187.
23. Tetsuka, T., Uranishi, H., Imai, H., Ono, T., Sonta, S., Takahashi, N., Asamitsu, K. & Okamoto, T. (2000) Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J. Biol. Chem.* **275**, 4383–4390.
24. Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M. & Okamoto, T. (2001) Involvement of the oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. *J. Biol. Chem.* **276**, 13395–13401.
25. Takada, N., Sanda, T., Okamoto, H., Yang, J.P., Asamitsu, K., Sarol, L., Kimura, G., Uranishi, H., Tetsuka, T. & Okamoto, T. (2002) RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF-kappaB and Spl actions. *J. Virol.* **76**, 8019–8030.
26. Yang, J.P., Hori, M., Sanda, T. & Okamoto, T. (1999) Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**, 15662–15670.
27. Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.G., Hurwitz, J., Parvin, J.D. & Montminy, M. (1997) RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**, 1107–1112.
28. Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Nakajima, T., Wolpin, E.S. & Parvin, J.D. (1998) BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat. Genet.* **19**, 254–256.
29. Yang, J.P., Tang, H., Reddy, T.R. & Wong-Staal, F. (2001) Mapping the functional domains of HAP95, a protein that binds RNA helicase A and activates the constitutive transport element of type D retroviruses. *J. Biol. Chem.* **276**, 30694–30700.
30. Sato, T., Asamitsu, K., Yang, J.P., Takahashi, N., Tetsuka, T., Yoneyama, A., Kanagawa, A. & Okamoto, T. (1998) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by a bioavailable serine/threonine kinase inhibitor, fasudil hydrochloride. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 293–298.
31. Tanner, N.K. & Linder, P. (2001) DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* **8**, 251–262.
32. Tanner, N.K. (1999) Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 257–275.
33. Richardson, A., Landry, S.J. & Georgopoulos, C. (1998) The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 138–143.
34. Drapkin, R., Reardon, J.T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A. & Reinberg, D. (1994) Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **368**, 769–772.
35. Tirode, F., Busso, D., Coin, F. & Egly, J.M. (1999) Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol. Cell* **3**, 87–95.

36. Schnitzler, G., Sif, S. & Kingston, R.E. (1998) Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* **94**, 17–27.
37. Lee, C.G. & Hurwitz, J. (1993) Human RNA helicase A is homologous to the maleless protein of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **268**, 16822–16830.
38. Kuroda, M.I., Kernan, M.J., Kreber, R., Ganetzky, B. & Baker, B.S. (1991) The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in *Drosophila*. *Cell* **66**, 935–947.
39. Meller, V.H., Wu, K.H., Roman, G., Kuroda, M.I. & Davis, R.L. (1997) roX1 RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system. *Cell* **88**, 445–457.
40. Amrein, H. & Axel, R. (1997) Genes expressed in neurons of adult male *Drosophila*. *Cell* **88**, 459–469.
41. Lee, C.G., Chang, K.A., Kuroda, M.I. & Hurwitz, J. (1997) The NTPase/helicase activities of *Drosophila* maleless, an essential factor in dosage compensation. *EMBO J.* **16**, 2671–2681.
42. Bone, J.R., Lavender, J., Richman, R., Palmer, M.J., Turner, B.M. & Kuroda, M.I. (1994) Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. *Genes Dev.* **8**, 96–104.
43. Rastelli, L. & Kuroda, M.I. (1998) An analysis of maleless and histone H4 acetylation in *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Mech. Dev.* **71**, 107–117.
44. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S. & Kato, S. (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5363–5372.
45. Zhang, S. & Grosse, F. (1997) Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J. Biol. Chem.* **272**, 11487–11494.
46. Burd, C.G. & Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**, 615–621.
47. Yang, L., Embree, L.J. & Hickstein, D.D. (2000) TLS-ERG leukemia fusion protein inhibits RNA splicing mediated by serine-arginine proteins. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3345–3354.



## Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing

Naoko Takahashi, Shinya Kobayashi, Xu Jiang, Koji Kitagori, Kenichi Imai, Yurina Hibi, and Takashi Okamoto\*

Department of Molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

Received 19 December 2003

### Abstract

The p53 binding protein 2 (53BP2) has been initially identified as an interacting protein to p53 and subsequent studies have shown that it also interacts with Bcl-2 and NF- $\kappa$ B p65 subunit. We have previously found that the TP53BP2 gene encoding 53BP2 protein is a single copy gene and has been mapped to the long arm of chromosome 1 at q42.1. The subsequent studies revealed that TP53BP2 encodes two proteins, 53BP2 and ASPP2, of 1005 and 1128 amino acids, respectively. ASPP2 contains additional 123 amino acids to the N-terminus of 53BP2. In this study, we have examined the genomic organization of TP53BP2 transcripts and found that it encodes two mRNA species, either with (53BP2) or without exon 3 (ASPP2), by alternative splicing in various cell lines and tissues. Thus, we propose to call these proteins as 53BP2S (short) and 53BP2L (long), respectively.  
© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** TP53BP2; 53BP2; ASPP 2; Apoptosis; p53; Alternative splicing

The p53 binding protein 2 (53BP2) has been initially identified as the interacting protein to p53 [1]. The 53BP2 protein consists of an open reading frame (ORF) of 1005 amino acids (aa) with  $\alpha$ -helical region, proline-rich region, ankyrin repeats, and Src-homology 3 (SH3) domain [2]. The 53BP2 binding site on the p53 core domain consists of evolutionarily conserved regions that are frequently mutated in human cancer [1,3]. It has been demonstrated that overexpression of 53BP2 induced apoptosis [4–6] and that the level of 53BP2 mRNA expression in various human cancer cell lines was correlated with the sensitivity to DNA damaging agents such as UV irradiation, X-ray irradiation, and *cis*-diamine-dichloroplatinum (CDDP) [7]. 53BP2 has also been shown to interact with Bcl-2 [2] and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 subunit [6]. Because of its interaction with these proteins, 53BP2 is implicated in carcinogenesis. A recent report by Samuels-Lev et al. [10] has revealed the presence of longer ORF of 1128 aa

containing the additional 123 aa to the N-terminus of 53BP2 [thus, they renamed this protein as ASPP2 (apoptosis stimulating protein of p53 2)] and claimed that 53BP2 might be a partial clone of ASPP2 [8]. As we have previously reported that the TP53BP2 gene is a single copy gene and has been mapped on the long arm of chromosome 1 at q42.1 [9], the relationship between 53BP2 and ASPP2 has been elusive.

In this study, we have examined the genomic organization of the TP53BP2 gene (human genome locus ID: 7159; Accession No. NT\_004559.11) encoding 53BP2 and ASPP2 proteins. The previously reported ORF of 53BP2 was derived from an actual cDNA clone isolated from a human cDNA library (Accession No. NM\_005426) [2,6] and that of ASPP2 (Accession No. AJ318888) was identified by genome database search [10]. Here we demonstrate the evidence that 53BP2 is not a partial and truncated form of ASPP2 and endogenous 53BP2, as well as ASPP2, is present in various cells and tissues. Thus, TP53BP2 encodes two mRNA species, either with (53BP2) or without exon 3 (ASPP2), by alternative splicing.

\* Corresponding author. Fax: +81-52-859-1235.

E-mail address: [tokamoto@med.nagoya-cu.ac.jp](mailto:tokamoto@med.nagoya-cu.ac.jp) (T. Okamoto).

**Materials and methods**

**Reagents and antibodies.** Rneasy (Qiagen), Titan One Tube RT-PCR System (Roche Molecular Biochemicals), and pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) were purchased from individual suppliers. ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready kit was obtained from Perkin–Elmer. Ponasterone A (Pon A) was purchased from Invitrogen. Anti-53BP2 mouse monoclonal (BD Transduction Laboratories) and anti-tubulin mouse monoclonal (Sigma) antibodies were purchased from individual suppliers. Human kidney Total RNA was purchased from BD Biosciences.

**Cell culture.** 293 cells were grown at 37 °C in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; CellGro) with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (IBL, Maebashi, Japan), 1 mM glutamate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The 293/53BP2 cell line (REF), inducibly expressing 53BP2, was kindly provided by Dr. Louie Naumovski. 293/53BP2 cells were grown in DMEM with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 290 µg L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 600 µg/ml G418, and 500 µg/ml zeocin. THP1 cells were maintained in RPMI 1640 (Sigma) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (IBL, Maebashi, Japan), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). These cells were maintained in logarithmic growth at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

**RT-PCR.** Total cellular RNA was prepared from each cell clone using RNeasy (Qiagen). Purification of polyadenylated mRNA was carried out using Oligotex-dT30 super RNA purification kit (Takara, Ohtsu, Japan) according to the manufacturer’s instructions. The mRNA samples were digested with RNase-free DNase, ethanol precipitated, and further purified through Microcon YM-100 columns (Amicon). The quantity and quality of mRNA was assessed by capillary electrophoresis using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies). Approximately 1 µg of purified mRNA was used for RT-PCR using Titan One Tube RT-PCR System (Company) in which the cDNA synthesis as well as PCR was performed with reverse transcriptase, AMV, and Expand High Fidelity enzyme mix in one tube. The primer sequences were as follows: exon 1-F, forward (5'-ATG CCG TTC GGG TCC AAG ATG-3'); exon 3-F, forward (GTA GAG ATA GAG TTT CAT C-3'); exon 3-R, reverse (5'-CAC TAG AGG CTG ATC GTG G-3'); exon 4-R, reverse (5'-AAT GTC CCT GCC

AGG GGG-3'); and exon 6-R, reverse (5'-GCC ATT TCC TGA AGT TCA GC-3'). The annealing temperature, 55 °C, was used for RT-PCR, except for the reaction with kidney RNA (50 °C). RT-PCR products were separated on 2.0% agarose gels and visualized by EtBr staining. All RT-PCR products were cloned to pGEM-T Easy Vector (Promega) and the nucleotide sequencing was performed with at least three individual clones by dideoxynucleotide sequencing using ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready kit (Perkin–Elmer Life Sciences) on an Applied Biosystems 313 automated DNA sequencer.

**Western blotting.** 293 and THP1 cells were harvested, washed with PBS, and lysed in 200 µl ice-cold lysis buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 2 mM dithiothreitol, 0.25% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml pepstatin A). The lysate was cleared by centrifugation and the protein concentration of the whole cell extract was measured using Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad). 293/53BP2 cells, in which 53BP2 is expressed under the ecdysone-inducible promoter, were grown to approximately 50% confluence and treated with Pon A (5 µM) for 48 h to induce 53BP2. Cells were then harvested and lysed in ice-cold lysis buffer. Supernatants (10 µg of the whole protein) were resolved by 5% SDS–PAGE and transferred on PVDF (Millipore) membrane followed by incubating with an anti-53BP2. The immunoreactive proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) (Super Signal; Pierce).

**Results**

*RT-PCR for TP53BP2 mRNA species*

We and others have previously demonstrated that both 53BP2 and ASPP2 are encoded by a single-copy gene, TP53BP2 [2,6,9]. As shown in Fig. 1, TP53BP2 gene appears to consist of 19 exons based on the sequence information of TP53BP2 genome (Accession No. NT\_004559.11) and 53BP2 cDNA (Accession No. NM\_005426). Although exon 1 contains the translation start site for

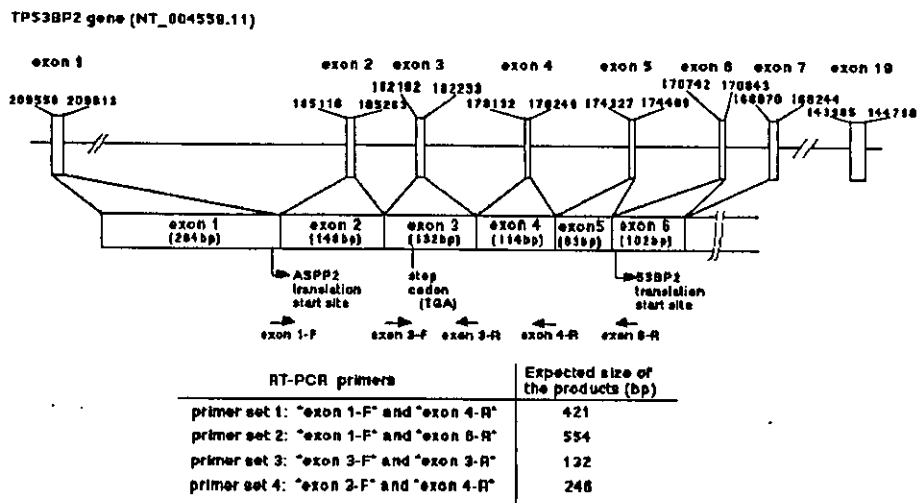


Fig. 1. The genomic organization of the TP53BP2 gene. TP53BP2 (human genome locus ID: 7159; Accession NT\_004559.11) gene, consisting of 19 exons, is found in the genomic region spanning 66,629 bp. The sequence numbers indicated for each exon are quoted from the minus strand of TP53BP2 genomic sequence (NT\_004559.11). 53BP2 and ASPP2, containing 1005 and 1128 amino acids (aa), respectively, are encoded by the same gene TP53BP2 using different initiation methionine codons in the same open reading frame. The size of each exon was described within the box. Positions of primer for RT-PCR are indicated with arrows. The primer sets for RT-PCR and expected size of the products are shown in the lower panel.

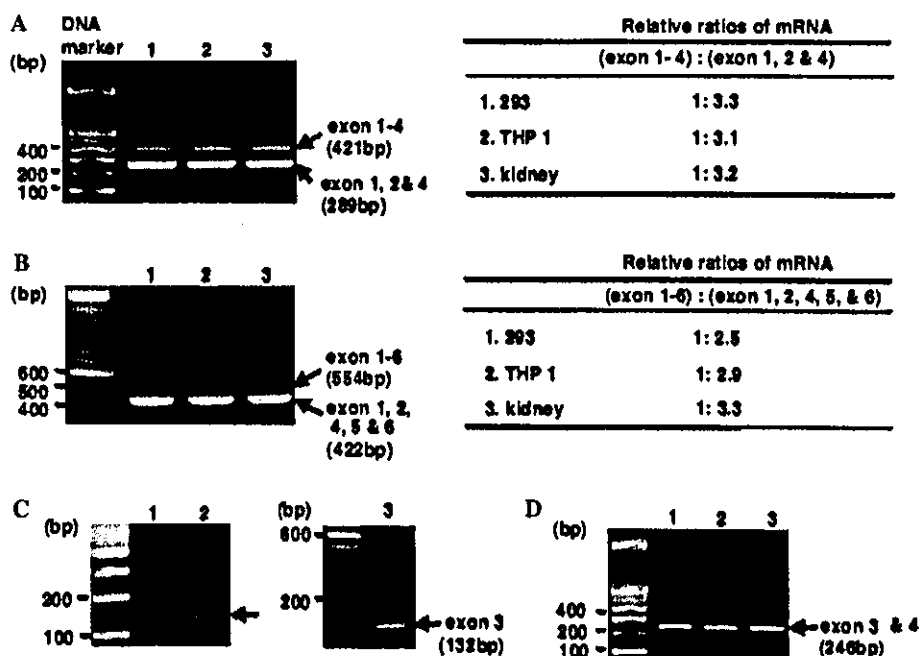


Fig. 2. The results of RT-PCR for TP53BP2 mRNA species. (A,B) RT-PCR using primer set 1 (exon 1-F and exon 4-R), and primer set 2 (exon 1-F and exon 6-R) (for locations of these primers see Fig. 1, lower panel). The right panels show the relative intensity of the products using NIH image (version 1.63) software. (C,D) RT-PCR using primer set 3 (exon 3-F and exon 3-R) and primer set 4 (exon 3-F and exon 4-R). The arrows indicate the products. The template RNAs are as follows: lane 1, mRNA from 293 cells; lane 2, mRNA from THP1 cells; and lane 3, human kidney total RNA. The 100 bp ladder DNA marker was loaded in the left lane. The size of each band of RT-PCR was confirmed by DNA sequence determination.

ASPP2, its ORF is interrupted by the stop codon located in exon 3. Whereas, the 53BP2 translation start site is located in exon 6. Thus, there are two possibilities: (i) 53BP2 and ASPP2 proteins are encoded by the same mRNA devoid of exon 3, in which two distinct translation start codons are utilized, and (ii) 53BP2 and ASPP2 proteins are encoded by distinct mRNA with or without exon 3, respectively. To address these two possibilities, we performed RT-PCR with mRNA samples prepared from 293 (human embryonal kidney) and THP1 (monocyte/macrophage) cell lines, and normal human kidney tissue using various primer sets described in Fig. 1.

We first examined if the exon 3 is transcribed into a mature mRNA. As demonstrated in Fig. 2A, RT-PCR using primer set 1 (exon 1-F and exon 4-R) yielded two bands. The intensity of each band was measured by NIH image (version 1.63) and the ratio (upper band containing exon 3: lower band not containing exon 3) was estimated to be 1:3.3, 1:3.1, and 1:3.2 in 293 cells, THP1 cells, and kidney, respectively (Fig. 2A).

To confirm the results in Fig. 2A, we performed RT-PCR using primer set 2 (exon 1-F and exon 6-R) and yielded two amplified bands (Fig. 2B). The intensity of each band was similarly measured with the ratio (the upper band:the lower band) of 1:2.5, 1:2.9, and 1:3.3 in 293 cells, THP1 cells, and kidney, respectively (Fig. 2B). Furthermore, when primer set 3 (exon 3-F and exon 3-R) and primer set 4 (exon 3-F and exon 4-R) were

used, only a single band was detected in each reaction (Figs. 2C and D).

#### DNA sequence analysis of RT-PCR products of TP53BP2 mRNA species

All DNA fragments of RT-PCR products have been isolated, cloned into pGEM-T Easy Vector, and the nucleotide sequences were determined. As shown in Fig. 3, the DNA sequence analysis clearly indicated that the upper band in Fig. 2A contained exons from 1 to 4 (421 bp) and the lower band contained exons from 1 to 4 but not exon 3 (289 bp). The upper band in Fig. 2B contained exons from 1 to 6 (554 bp), whereas the lower band contained exons from 1 to 6, but not exon 3 (422 bp) (data not shown). The single band seen in Figs. 2C and D contained exon 3 (data not shown). Thus, we concluded that exon 3 is actually transcribed in some, but not all, mRNA species encoded by TP53BP2 gene. These results indicated that TP53BP2 gene encodes two distinct mRNA species with or without exon 3 by alternate splicing in various cells and tissues.

#### Western blotting

To confirm the above results, we examined the expression of 53BP2 proteins by Western blotting. As demonstrated in Fig. 4, two proteins of 137 and 150 kDa



Fig. 3. DNA sequence of RT-PCR products of TB53BP2 mRNA splicing variants. The alignment of DNA sequences of the 421 and 289 bp RT-PCR products obtained with primer set 1 (exon 1-F and exon 4-R) (Fig. 2) is shown here. These splicing variants are named as 53BP2S (short) and 53BP2L (long). Whereas 53BP2S mRNA contains exons 1–4, 53BP2L (previously called ASPP2) contains exons 1–4, but not exon 3.

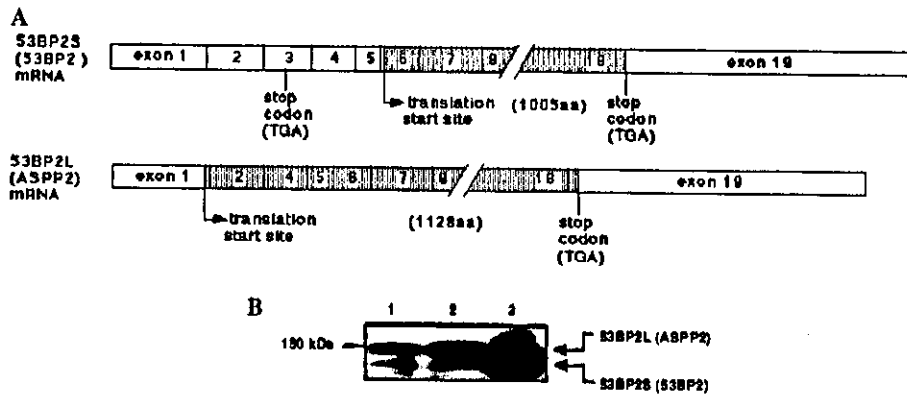


Fig. 4. Detection of two 53BP2 proteins by Western blotting. (A) Subgenomic organization of 53BP2 mRNA species. 53BP2S mRNA consists of exons 1–19, whereas 53BP2L (ASPP2) mRNA contains exons 1–19, but not exon 3. Open reading frames of these 53BP2 proteins are indicated by shadowed boxes. (B) Detection of 53BP2 proteins. The whole protein samples were prepared from 293 cells (lane 1), THP1 cells (lane 2), and 293/53BP2 cells (lane 3) expressing 53BP2 (1005 aa) [4] as a positive control. Each sample (10 µg of the whole protein) was resolved by 5% SDS-PAGE and transferred on PVDF membrane followed by incubating with an anti-53BP2 mouse monoclonal antibody followed by chemiluminescence detection. The protein marker was loaded in the left lane and the position of 150 kDa protein marker is indicated. The exposure of chemiluminescence for protein detection revealed the endogenous 53BP2S (formerly “53BP2”) (the lower band) and 53BP2L (formerly “ASPP2”) (the upper band) proteins in these cells. The similar results were obtained in the repeated experiments.

corresponding to formerly called 53BP2 and ASPP2 proteins, respectively, are detected in both 293 and THP1 cells. The relative amounts of 53BP2 versus ASPP2 proteins were approximately 1:3 consistent with the relative amounts of their mRNA species. As these

proteins are expressed from the same gene by alternative splicing, we propose to call these proteins as 53BP2S (short) and 53BP2L (long), containing 1005 aa (derived from all exons of TP53BP2) and 1128 aa (derived from TP53BP2 mRNA devoid of exon 3), respectively.

## Discussion

53BP2 has been identified initially as one of the interacting proteins of p53 and has been implicated in carcinogenesis. The 53BP2 binding site on the p53 core domain consists of evolutionarily conserved regions that are frequently mutated in human cancer [3,11] and the level of TP53BP2 mRNA expression in various human cancer cell lines was correlated with the sensitivity to DNA damaging agents [7], indicating that this protein may play an important role in carcinogenesis and its progression. However, no TP53BP2 mutation was detected in various cancer cell lines [7]. With regard to the structural property of the p53–53BP2 complex, Gorina and Pavletich [3] reported the crystal structure of the p53 core domain bound to the 53BP2 protein, which revealed that (i) the SH3 domain located in the C-terminus of 53BP2 binds the L3 loop of p53 which is responsible for the sequence-specific DNA binding activity of p53, and (ii) the ankyrin repeat of 53BP2 binds the H1 helix of p53 which is required for the p53 homodimerization. Thus, when p53–53BP2 complex forms *in vivo*, p53 is not able to bind to DNA.

The proapoptotic action of 53BP2 proteins has been well established [4–6,10]. Two possibilities are entertained to explain this action of 53BP2 proteins. First, Samuels-Lev et al. [10] reported that 53BP2L (ASPP2) specifically enhance p53-induced apoptosis by enhancing the DNA binding and transactivation function of p53 on the promoters of proapoptotic genes, such as Bax *in vivo*, although the nuclear localization of this protein was not clearly demonstrated. However, as mentioned above, the crystal structure studies of p53–53BP2 complex did not support this possibility since p53, once bound to 53BP2, is no longer able to form p53 homodimer but also to bind to DNA. Second, Yang et al. [6] showed that 53BP2 is predominantly located in cytoplasm and transiently in mitochondria. In addition, we have recently confirmed the mitochondrial translocation of 53BP2 concomitantly with its proapoptotic action and the specific activation of caspase-9 but not caspase-8 (Kobayashi, Takahashi, and Okamoto, submitted). Interestingly, Mihara et al. [12] demonstrated using cell fractionation and electromicroscopic examinations that p53 is located in mitochondria during p53-induced apoptosis upon DNA damage. Therefore, it is interesting to examine if 53BP2 interacts with p53, locates to mitochondria, and induces apoptosis through mitochondrial death pathway. Since there is no characteristic protein motif in the N-terminal 123 aa region

of 53BP2L (ASPP2) as far as we searched, these proteins seem to have a similar biological action although we do not currently know the reason for such redundancy.

In addition to the 53BP2 involvement in carcinogenesis, it may also be involved in autoimmunity. Tsao et al. [13] demonstrated a number of genetic loci associated with the familial incidence of systemic lupus erythematosus including one corresponding to 1q42.1, which is the same chromosomal locus assigned to TP53BP2 [9]. We have also shown that overexpression of p65 subunit of NF- $\kappa$ B prevents the cell death induced by 53BP2 [6] by binding to 53BP2. Therefore, in the sporadic cases of systemic lupus erythematosus, aberrant activation of NF- $\kappa$ B such as in the developing thymus may perturb the 53BP2-mediated apoptosis of the self-reactive lymphocyte clones.

## Acknowledgments

This work was supported by Grants-in-Aid from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Grant No.14028052), and Japan Human Sciences Foundation (Grant No. SA14721).

## References

- [1] K. Iwabuchi, P.L. Bartel, B. Li, R. Marraccino, S. Fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 6098–6102.
- [2] L. Naumovski, L.M. Cleary, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 3884–3892.
- [3] S. Gorina, P.N. Pavletich, *Science* 274 (1996) 1001–1005.
- [4] Y. Ao, H.L. Rochde, L. Naumovski, *Oncogene* 20 (2001) 2720–2725.
- [5] D.C. Lopez, Y. Ao, H.L. Rohde, D.T. Perez, J.D. O'Connor, X. Lu, M.J. Fors, L. Naumovski, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 8018–8025.
- [6] P.J. Yang, M. Hori, N. Takahashi, T. Kawabe, H. Kato, T. Okamoto, *Oncogene* 18 (1999) 5177–5186.
- [7] T. Mori, H. Okamoto, N. Takahashi, R. Ueda, T. Okamoto, *FEBS Lett.* 465 (2000) 124–128.
- [8] A.E. Slee, X. Lu, *Toxicol. Lett.* 139 (2003) 81–87.
- [9] P.J. Yang, T. Ono, S. Sonta, T. Kawabe, T. Okamoto, *Cytochem. Cell Genet.* 78 (1997) 61–62.
- [10] Y. Samuels-Lev, J.D. O'Connor, D. Bergamaschi, G. Trigiante, K.J. Hsieh, S. Zhong, I. Campargue, L. Naumovski, T. Crook, X. Lu, *Mol. Cell* 8 (2001) 781–794.
- [11] K. Iwabuchi, B. Li, F.H. Massa, J.B. Trask, T. Date, S. Field, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26061–26068.
- [12] M. Mihara, A. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, U. Moll, *Mol. Cell* 11 (2003) 577–590.
- [13] T.B. Tsao, M.R. Cantor, C.K. Kalunian, C.-J. Chen, H. Badsha, R. Singh, J.D. Wallace, C.R. Kitridou, S.-I. Chen, N. Shen, W.Y. Song, A.D. Senberg, C.-L. Yu, H.B. Hahn, I.J. Rotter, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 275–731.

S  
DY  
4

針  
いる

# TODAY'S THERAPY 2004

## 今日の治療指針

私はこう治療している



医学書院



## 感染症法の概要について

感染症

那須 勝 大分大学教授・内科

平成11年(1999年)4月1日から、「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(通称:「感染症法」)が施行されたことは記憶に新しいが、その後SARSを初めとする海外における感染症の発生の状況、国際交流の進展、保健医療を取り巻く環境の変化等を踏まえ、一部改正された感染症法が平成15年11月から施行されている。

なお、平成11年の感染症法の成立時点で、これまでの伝染病予防法(1897年制定)、性病予防法(1890年制定)、後天性免疫不全症候群の予防に関する法律(1989年制定)は廃止され、検疫法、狂犬病予防法の一部もこれに関連して改正されている。結核予防法(1951年制定)は存続している。

感染症法では、患者の人権を守り、入院はあくまでも個人の意志を尊重し、入院させるのではなく、入院の勧告を行うこととし、隔離病舎または隔離病棟(床)という「隔離」の言葉は廃止されている。

### A. 感染症法における感染症の類型化と対応・措置

1. 1類感染症(エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、ペスト、マールブルグ病、ラッサ熱、SARS、天然痘) 感染力などの危険性がきわめて高い感染症。原則入院。消毒などの対物措置、通行制限などの措置も行う。平成15年11月から施行されている改正感染症法において、SARSと天然痘が加えられている。

2. 2類感染症(ポリオ、コレラ、細菌性赤痢、ジフテリア、腸チフス、パラチフス) 感染力などの危険性が高い感染症。状況に応じて入院。消毒などの対物措置を行う。

3. 3類感染症(腸管出血性大腸菌感染症) 感染力、病状などの総合的な観点からは危険性は高くはないが、集団発生を起こし得る感染症。特定職種への就業制限。消

### 表 改正感染症法における新4類感染症

ウエストナイル熱(ウエストナイル脳炎を含む)、エキノコックス症、黄熱、オウム病、回帰熱、Q熱、狂犬病、コクシジオイデス症、腎症候性出血熱、炭疽、ツツガムシ病、デング熱、日本紅斑熱、日本脳炎、ハンタウイルス肺症候群、Bウイルス病、ブルセラ症、発疹チフス、マラリア、ライム病、レジオネラ症  
(追加) 急性A型ウイルス肝炎、急性E型ウイルス肝炎、高病原性トリ型インフルエンザ、サル痘、ニパウイルス感染症、野兔病、リッサウイルス感染症、レプトスピラ症  
(変更) ボツリヌス症(「乳児ボツリヌス症(旧4類全数)」を変更)

毒などの対物措置を行う。

4. (新)4類感染症 平成15年11月から施行の改正感染症法において、旧4類感染症は、媒介動物の輸入規制、消毒、ねずみなどの駆除、物件にかかわる措置を講ずることができる新4類感染症と、従来どおり発生动向調査のみを行う5類感染症に分けられることになった。また、動物由来の新興感染症などいくつかの対象疾患が加えられている(表)。

5. 5類感染症 国が発生动向を調査し、その情報を提供・公開し、発生拡大を防止すべき感染症。旧4類感染症と同様に、全数把握および定点把握の感染症に分けられる。対象疾患としては、旧4類感染症から新4類感染症に分類された疾患を除き、新たにバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症(全数)、RSウイルス感染症(定点)が追加された。

6. 指定感染症 1-3類感染症以外の感染症であって、入院、消毒などの対物措置が緊急に必要な感染症。1年間に限定して指定する。

7. 新感染症 いまだ知られていない感染症であって、感染力など危険性がきわめて高い感染症。

8. 特定感染症(インフルエンザ、後天性免疫不全症候群、性感染症) 感染症のなかで特に総合的に発生予防と蔓延の防止などが必要な感染症として感染症法第11条第1項に基づき、特定感染症予防指針が作成されている。

9. 医師の届出義務 感染症の蔓延を防止するために、1-4類感染症患者(疑似症患者、無症状病原体保有者を含む)、新感染症の疑い患者は直ちに、5類感染症で全数把握の感染症は7日以内に、医師が保健所長を経由して都道府県知事へ届け出る。5類感染症の定点把握の感染症は、指定届出機関の管理者が届け出る。

### ■1類感染症

#### ウイルス性出血熱

Viral Hemorrhagic Fever

岡本 尚 名古屋市立大学大学院教授・医学研究科細胞分子生物学

### 病態と診断

1類感染症は国内にはなく、外国からの輸入感染症である。その病原体の感染力と罹患した場合の重篤性などに基づく総合的な観点からみてきわめて危険性が高い、ということから「1類」感染症に分類されている。患者および疑い例を診た場合には、直ちに最寄りの保健所に届け出ることが義務づけられており、1類感染症の患者の入院治療は各県に1か所2床指定設置されている一種感染症指定医療機関にて行うことになっている。1類感染症には、エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、ペスト、マールブルグ病、ラッサ熱、SARS、天然痘の7つがあるが、細菌感染症であるペスト以外はすべてウイル

ス感染症である。そのなかから、SARS、天然痘を除いた残り4つを一括してウイルス性出血熱とよぶ。エボラ出血熱とマールブルグ病はほぼ類似のウイルス（フィロウイルス属）で起こるので、ここでは一括して説明する。

#### A. エボラ出血熱 (Ebola Hemorrhagic Fever) とマールブルグ病 (Marburg Virus Disease)

2-21日(多くは7-10日)の潜伏期の後、突然の発熱、頭痛、下痢、嘔吐、著しい全身衰弱などで発病する。典型的な出血症状は合併しないこともしばしばあるので注意が必要。患者およびその体液との「接触」の有無が重要な鑑別のポイントとなる。診察上、右季肋部の圧痛、循環虚脱、四肢の浮腫、出血症状などを認める。いずれもフィロウイルスに属すウイルスによって発症するが、自然宿主については不明である。医療行為に伴って感染する場合も多いので、完全な防御が必要。診断はウイルス抗原、血清抗体価の上昇。しばしば発症後8-10日の時点が生死を分け、循環虚脱やARDSなどで死亡する。マールブルグ病の致命率は25%、エボラ出血熱のアフリカにおける致命率は50-90%。

#### B. クリミア・コンゴ出血熱 (Crimean-Congo Hemorrhagic Fever)

3-12日の潜伏期の後、突然の発熱、頭痛、下肢筋肉関節痛、食思不振、下痢などで発病する。発熱はしばしば40°Cを超える。顔や胸部の紅潮、結膜充血、軟口蓋の点状出血・紫斑、全身の出血斑が特徴的。肝・腎障害を伴うことが多く、内臓出血をきたすこともある。流行地は、主に西部クリミア半島、カザフスタン、ウズベキスタン、ロシア南部、ボスニア・ヘルツェゴビナ、ブルガリア、イラク、アラビア半島、中国西部、熱帯アフリカ、南アフリカとされる。温血動物寄生性のダニが感染を仲介するため、現地での発病はほとんど畜産関係者に限られている。人から人への感染は、血液・組織との直接接触や血液からの飛沫による。検査所見では、リンパ球減少、血小板減少、DICを認める。そのほか、肝・腎障害を示す異常検査所見を認める。致命率は15-30%。診断はウイルス抗原の検出、血清抗体価の上昇。

#### C. ラッサ熱 (Lassa fever)

5-21日の潜伏期の後、発熱および倦怠感から徐々に始まり、高熱、筋肉痛、嘔吐、下痢、腹痛、喉頭炎などがやがて起こる。咽頭炎、咳、粘膜出血、結膜炎、顔や首に圧痕を残さない浮腫が出現する。脳炎も合併する。血小板減少は軽度だが、血小板機能異常を伴う。無症状感染者も多く、自然軽快もみられる。胸水貯留やGOT (AST) の10倍以

上の上昇は予後不良の兆候とされる。入院患者の15-20%が死亡する。また、妊婦、産褥婦の死亡率は50%。診断は血清抗体による。シエラレオネ、リベリア、ギニア、ナイジェリアで常に流行。感染ネズミ(マストミスとよばれる小型のもの)の尿尿糞便の直接接触またはその飛沫から感染する。患者からは血液との直接接触、性行為などで感染する。院内感染、特に検査室内感染がみられる。

#### 治療方針

いずれの疾患も感染予防ワクチンは、まだないか開発中。

#### A. エボラ出血熱とマールブルグ病

現時点では、対症療法のみ。下痢に対しては止痢薬や補液療法を行う。ただし、著しい低K血症が起こるので補液治療に際してはモニターが必要である。

#### B. クリミア・コンゴ出血熱

治療は対症療法が主体だが、リバビリン(Ribavirin)も有効とされる。

#### C. ラッサ熱

治療はリバビリン静注。発症直後の6日以内に投与すれば、死亡率を有効に下げられる。予防投与は肉服による。

**処方例** リバビリン投与は下記のいずれかの方法による

- 1) 静脈内投与：リバビリンを初回2g、その後1g/6時間ごとを4日間(静注用リバビリンは実際にICN Pharmaceuticals (Tel: 03-3808-2102, Fax: 03-3808-2401)より入手可能。ただし現状では個人輸入になるので約10日ほどかかる)を投与する。
- 2) 経口投与：レボトルカプセル200mgを初回2gを内服。その後1g/8時間ごと、19日間。

#### ■1類感染症

#### ペスト

#### Plague

余 明順 大阪大学微生物病研究所・エマージング感染症研究センター

#### 病態と診断

ペスト(plague)はペスト菌(*Yersinia pestis*)によって引き起こされる感染症である。ペスト菌は本来ネズミなど齧歯類に急性疾患を起こす菌で、敗血症状態のネズミの血液を吸ったノミの前胃部で増殖し、ノミがヒトを刺すときにヒトに注入される。

流行感染症の脅威：最新情報とその対策  
－ エイズ, 肝炎, ATL, 梅毒・クラミジア,  
SARS, インフルエンザ, 結核 －

---

## 第 1 章 感染症における問題とその対策

### 4. 新興・再興感染症の現状と今後

岡 本 尚

### 4. 新興・再興感染症の現状と今後

岡 本 尚\*

#### 要 旨

感染症は人類にとっての絶えざる挑戦である。抗菌剤などの化学療法の開発により人類は感染症を克服したかにみえたが、今また新興感染症の脅威にさらされている。また医療技術の進歩によって再興感染症の問題が新たに生じている。さらに、バイオテロによる感染症蔓延も危惧される状況となった。ヒトと微生物のあり方に立ち戻って感染症の問題点を考え直すとともに、ヒトおよび微生物ゲノムの解明によっていかなる分子生物学的アプローチが可能となったかについても概説した。

#### Summary

Conquering infectious diseases has always been a challenging proposition for humans. Although it once appeared that we had attained this goal by the development of antibiotics, new infectious diseases continue to emerge. We are also facing the massive threat of re-emerging infectious diseases and even bioterrorism. In this article, I have attempted to critically review the relationship between microbes and humans. Practical application of genome information, both of humans and of microbes, in investigation of treatment or symbiosis of species is also discussed.

**Key words** 新興感染症 (emerging infectious diseases), 再興感染症 (re-emerging infectious diseases), バイオテロリズム (bioterrorism), ヒトゲノム (human genome), 微生物ゲノム (microbial genomes)

#### Emerging and re-emerging infectious diseases: Present and future

\* Takashi OKAMOTO, MD, PhD

Department of Molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御・総合医学専攻 細胞分子生物学

(〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1番地)

## はじめに

感染症は、病原微生物が本来それが存在しない個体の部位に侵入し、増殖することにより発症する疾病である。人類の歴史において長い間、感染症は人類の健康と生存に対する脅威であった。しかし、半世紀以上前にさかのぼる抗生物質の発見とその後の更なる開発により、感染症の状況は一転したように見えた。細菌だけでなく、真菌、原虫、寄生虫、そしてウイルスに対する有効で安全な化合物が次々と見いだされていった。多くの医師および医学研究者は、感染症が克服されるのは時間の問題であり、感染症研究はやがてごく一部の研究者の興味の対象として残るに過ぎないと考えた。

しかしながら、自然はしばしば人類の期待や予測をはるかに超えた現象を我々にもたらしてきた。感染症もその例外ではない。人類が抗菌剤などを開発していったとほぼ同じ速度で、微生物もそれに対抗して新たな生き残り戦略を獲得していった。今日、ヒトを含む多くの哺乳類に病原性を持つ微生物の中には驚くべき早さで薬剤耐性化を起こしているものも多数見いだされる。かつて先進国ではほとんど根絶されたかに見えた感染症が新たな脅威(再興感染症, re-emerging infectious diseases)となって蘇ってきた。他方、新たな病原体が、地球環境や生活環境および人々や動物のかつてない頻繁で広範囲な移動に伴って、新興感染症(emerging infectious diseases)として姿を現してきた。さらに、追い打ちをかけるように、致死性感染症がバイオテロの手段として重要な問題となっている。個々の感染症については本特集号のそれぞれの担当者に任せることとし、この稿では共通の問題点として新興・再興感染症を中心に述べ、感染症の将来への展望について論じる。

### I. 新興感染症

この数十年の間にも、ヒトに対する多くの病原微生物が発見された(表1)。新興感染症とは、「1970年以降、それまでに明らかにされてい

かった病原微生物に起因し、公衆衛生上問題となっている感染症」と定義され、これに属するものにはウイルスが圧倒的に多い。例えば、エボラウイルス(マールブルグウイルスを含む)、ラッサウイルス、ロタウイルス、HIVやHTLVなどのレトロウイルス、ハンタウイルス、一連の肝炎ウイルス、ヒトヘルペスウイルス(HHV-6, HHV-8, など)、SARS コロナウイルス、など枚挙にいとまがないほどである。しかし、ウイルスにとどまらず、レジオネラ感染症、ヘリコバクター・ピロリ感染症、腸管出血性大腸菌感染症(O157)、などの細菌感染症や、ライム病(ボレリア感染症)、クラミジア肺炎、バルトネラ(ネコひっかき病)などのリケッチア感染症、クリプトスポリジウム(腸炎下痢症)やサイクロスポラ(下痢症)などの原虫感染症なども含まれる。さらに、核酸をもたないプリオン(脳症)も病原性のメカニズムが全く未知であるために、必要以上の脅威をもたらしている。

なお、新興感染症の内でもヒトレトロウイルスは、分子レベルにまで病原性が明らかにされているにも関わらず、依然として決定的な治療薬を欠いている。とりわけHIVは感染者数の拡大率からも他の新興感染症を遙かに凌ぐ重大な脅威となっているため、2001年には国連が“Declaration of Commitment on HIV/AIDS”と銘打った緊急宣言を発し、“Global Crisis-Global Action”の必要性を全ての参加国を代表して訴えたことは記憶にまだ新しい(全文を<http://www.un.org/ga/aids/coverage/FinalDeclarationHIVAIDS.html>で閲覧することができる)(資料1にはこの国連宣言を受けて発足したUNAIDSのPeter Piot博士のGenevaでの演説の一部を転載した。AIDSが人類の健康に対する脅威であるばかりでなく、人権に対する重大な侵害でもあることを強調している)。

### II. 新興感染症の原因

これらの新興感染症は、地球規模の環境変化や人々や動物の移動の拡大(社会環境の変化)などに伴って起こってきたと考えられている。す

表1 新興感染症とその病原体

<p><b>【細菌】</b>                  レジオネラ感染症; <i>Legionellaceae</i> (肺炎, Pontiac fever)                  カンピロバクター感染症; <i>Campylobacter jejuni</i> (急性腸炎)                  トキシックショックシンドローム; <i>Staphylococcus aureus</i> (膿炎, 敗血症, 下痢)                  腸管出血性大腸菌感染症; <i>Escherichia coli</i> (O157:H7) (出血性大腸炎, 溶血性尿毒症性症候群)                  ヘリコバクター・ピロリ感染症; <i>Helicobacter pylori</i> (胃潰瘍, 胃癌?)                  新型コレラ; <i>Vibrio cholerae</i> O139 (下痢性腸炎)</p> <p><b>【ウイルス】</b>                  ロタウイルス感染症; <i>Rotavirus</i> (下痢性腸炎)                  エボラウイルス感染症; <i>Ebola virus</i> (ウイルス性出血熱)                  ハンタウイルス感染症; <i>Hantavirus</i> (腎症候性出血熱)                  ヒトTリンパ球好性ウイルス1型感染症; Human T-cell lymphotropic virus type 1                  (成人T細胞性白血病(ATL), HTLV-1関連ミエロパチー(HAM), など)                  肝炎ウイルス感染症; Hepatitis C, D, E, F, G virus (肝炎)                  ヒトヘルペスウイルス6型感染症; Human <i>Herpesvirus</i> 6 (突発性発疹)                  ヒトヘルペスウイルス8型感染症; Human <i>Herpesvirus</i> 8 (Kaposi肉腫, Castleman病, primary effusion lymphoma)                  ヒト免疫不全ウイルス感染症; Human Immunodeficiency Virus (後天性免疫不全症候群(AIDS))                  ガナリトウイルス感染症; <i>Guanarito virus</i> (ベネズエラ出血熱)                  サビアウイルス感染症; <i>Sabia virus</i> (ブラジル出血熱)</p> <p><b>【リケッチア】</b>                  ボレリア感染症; <i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme病)                  日本紅斑熱リケッチア感染症; <i>Rickettsia japonica</i> (日本紅斑熱)                  エーリッキア感染症; <i>Ehrlichia chafeensis</i> (エーリッキア症)                  バルトネラ感染症; <i>Bartonella henselae</i> (ネコひっかき病)                  クラミジア感染症; <i>Chlamydia pneumoniae</i> (肺炎, 卵管炎)</p> <p><b>【原虫】</b>                  クリプトスポリジア感染症; <i>Cryptosporidium</i> (腸炎, 下痢症)                  シクロスポラ感染症; <i>Cyclospora cayetanensis</i> (下痢症, インフルエンザ様症状)</p> <p><b>【その他】</b>                  プリオン病; prion (Creutzfeld-Jacob病, Gerstmann-Straussler-Scheinker病, 家族性致死性不眠症, クールー)</p>
---

資料1 UNAIDS 代表 Peter Piot 博士の記者会見より抜粋

In today's world, AIDS constitutes one of the most pervasive threats to the right to health. And for the millions of people affected by AIDS around the world — those living with HIV but also their families and communities — AIDS is one of the most pressing causes of stigma and discrimination.

The HIV epidemic now ranks as the most devastating humanity has ever faced. Globally, more than 60 million people world wide have been infected. Twenty million have died. At its most fundamental level, human progress is measured in life-expectancy, and here, AIDS has wiped out fifty years of progress. Life expectancy in sub-Saharan Africa is now 47 years, when it would have been 62 years without AIDS.

(From Joint UNAIDS/UNICEF/WHO press release, Geneva, New York, April 3, 2002)

なわち、産業の地球レベルでの展開に伴って熱帯雨林にまで至る森林開発が進められた結果、本来ならば生態系の交わらない動物・昆虫・植物・微生物などがヒトとの間で接点を持ち、または生態系そのものが予期せぬ変貌をとげたためにそのような状況が引き起こされ、さらに人々の交流が以前にもまして進められるようになったために、原因不明の地方病として一部の地域に封じ込められていた感染症が交通機関の発達により他の地域にまで拡大侵入を果たしたものが多数あると考えられる。

例えば、エジプトでアスワン・ハイ・ダムが建設された時には、ダムで蓄えられた水で蚊が繁殖し、その蚊によって運ばれるウイルスやマラリアなどが住民の新たな脅威となった。また、ソウルで市街地が郊外へと拡大され、野ネズミが何百年の間保持していたハンタウイルスに韓国の都会に住む人々が曝露されるようになった。HIV は霊長類の SIV がおそらく 60~70 年前にヒトに感染するようになって生じた、と考えられる。しかし HIV はその後も長い間アフリカの奥地の地方病としてとどまっていたが、1960 年前後に相前後して多くのアフリカ諸国が旧宗主国より独立を達成した頃に最初の感染拡大が起こったと推定されている。独立とともに古い伝統的価値観は捨て去られ、人々は大都市に大移動を開始した。都市人口の急激な膨張とともにモラルの低下が引き起こされ、衛生状態の悪化、性行動の変化と売春の拡大、麻薬などが人々の周囲に到来した。このような中で地方からやってきた HIV 感染者からウイルスの蔓延が急速に起こっていったと考えられている。

多くの研究は、微生物が新たな病原性を獲得するのは必ずしも突然変異のみによるものではないことを示唆している。人間の作り出した条件により、すでに存在していた微生物が、地理的または生物種間の境界を越えることによって新たな感染症として出現するのであろう。1989 年に新興ウイルス感染症が問題となってきた時期に米国でその対策会議を主催した Stephan S. Morse は、「我々が新しく出現したウイルスと

思っているものの多くは本来人間のウイルスではない。ヒトとの関係が生じたのは偶然であり、むしろヒトが本来の宿主に接近しすぎただけの理由で宿主になったのかも知れない。」「人間に病原性のあるウイルスの多くは他の哺乳類をはじめとする本来の宿主の中ではほとんど害をなさない。」と語っている。また、すでに 1974 年に Lewis Thomas は彼の著書の中でこのような状況を「ウイルスは生物から生物へ、植物から昆虫・哺乳類、そこからヒトへと、またその逆にも、あたかもダンスパーティーの会場のように次々とパートナーを替えて動き回っている」「私たちは、広大な大地の中で活発に動き回っているウイルスのことを普段は気にかけていない。しかし、両者がともに生きていく上での話し合いがまとまらないとき、両者の間の国境線をどちらかが越えたとき、新たな病気が起こる」と表現している。もちろん、これはウイルスに限らないことである。

すなわち、新興感染症出現の要因としては、自然界の力(大きくは地球環境の変化から、より小さくはしばしば起こる干ばつや地震などによる動物・昆虫などの移動)や人間の力(海外旅行の大衆化、森林伐採、大気汚染、ダム建設による自然環境の大きな変化に伴う動物・昆虫・植物などの生態系の擾乱)などが考えられる。しかしながら、科学とくに医学の進歩に伴う先進医療自体も新たな感染症の出現の誘因となる場合もあり得ることは十分に認識しなければならないであろう。例えば、輸血(肝炎ウイルス、HIV など)や臓器移植(脳硬膜移植によるクロイツフェルド・ヤコブ、など)などに伴う新興感染症がすでに起こっている。今後警戒を要するであろうものとして、種間臓器移植(ブタからヒトなど)に伴う感染症(ヒトに感染性を持つブタ内在性レトロウイルスなど)や遺伝子治療(ウイルス由来のベクターを用いる場合)などが上げられる。これらの先進医療については十分な対策がとられてはいるが、ヒトゲノムの中に潜む極めて多数のレトロウイルス関連配列などへの影響も含めて十分に慎重な配慮がなされるべ

きであろう。

### III. 再興感染症

かつてより存在していた感染症で、公衆衛生上すでに重大な問題ではなくなっていたが、近年になって再び増加、もしくは将来的に再び問題となる可能性があるものを再興感染症として定義づけている。表2にそのリストを掲載した。この中でも注目される感染症のひとつは結核である。結核による死亡者は全世界で年間 300 万人と推定され、AIDS による死亡数に相当する。アフリカやインド・カンボジアなどのアジア諸国で大きな問題となっているが、細胞性免疫を低下させる AIDS の蔓延とともにこれらの地域での結核患者数のさらなる増加が危惧される。また、先進諸国でも米国や日本で結核患者数の増加が認められる。とくに我が国は先進国の中でも結核罹患率が高い。マラリアの死亡者数も

相変わらず高く、旅行ブームとともに日本人の感染者が増加している。さらに、地球の温暖化とともにマラリア圏が徐々に北上してきていることも懸念される。

しかしながら、我が国で最も注意すべきであるのは何と言っても耐性菌感染症であろう。これは、先に述べた抗生物質による輝かしい化学療法の発展の歴史が引き起こした「蔭」の部分でもある。医師のみならず患者までもが、細菌感染症が与しやすい疾患であるとの過信と誤解を持ってしまった。さらに、この過信は、感染症に関する専門家を著しく減少させ、にもかかわらず抗生物質の盲目的な使用を許してしまった。今ではペニシリン耐性の肺炎球菌やバンコマイシン耐性の腸球菌は臨床の場では当たり前のようになった。数年前までは容易に治療できていた細菌感染症が、このような耐性菌の出現により、しばしば臨床上で問題となるように

表2 再興感染症とその病原体

<p><b>【細菌】</b>                  ペスト感染症; <i>Yersinia pestis</i> (腺ペスト, 肺ペスト, 敗血症ペスト)                  ジフテリア感染症; <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (呼吸器ジフテリア, 皮膚ジフテリア, 気道炎, 心筋炎, 多発性神経炎)                  コレラ感染症; <i>Vibrio cholerae</i> (下痢症, 敗血症)                  劇症型 A 群連鎖球菌; <i>Streptococcus pyogenes</i> (咽頭炎, 化膿性炎症, リウマチ熱)                  百日咳菌感染症; <i>Bordetella pertussis</i> (呼吸器感染症)                  サルモネラ感染症; <i>Salmonella</i> (胃腸炎, 腸チフス, 髄膜炎)                  炭疽; <i>Bacillus anthracis</i> (皮膚炭疽, 出血性縦隔炎, Woolsorter's disease)                  結核感染症; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (肺結核, 結核性リンパ節炎, 胸膜炎, 結核性脊椎炎, 心膜炎, 粟粒結核, など)                  耐性菌感染症*</p> <p><b>【ウイルス】</b>                  フラビウイルス感染症; <i>Flavivirus</i> (デング熱, 黄熱)                  狂犬病ウイルス感染症; <i>Lyssavirus</i> (狂犬病)</p> <p><b>【その他】</b>                  真菌感染症                  マラリア</p>
---

\*耐性菌感染症を引き起こすものとして次のものがよく知られている。

methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*, vancomycin resistant *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, extended spectrum beta-lactamase producing Gram negative bacilli



なってきた。また、より深刻なものとしては、MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) による院内感染や腸管出血性大腸菌 (O157:H7) 感染症の勃発が上げられるが、しばしば社会問題として報道されている。

抗生物質は感受性のある病原菌に対しては速やかに殺菌・静菌作用を発揮するが、低い頻度ではあるものの自然耐性菌の出現は必発であるために、その連続使用により耐性菌への菌交代がしばしば起こってしまう。また、抗癌剤投与や高齢者および免疫不全患者などでは、抗菌剤使用は長期多剤併用になることが多く、このことは常在細菌叢に対する無視できない影響を与え、その結果、比較的容易に自然耐性菌の選択による菌交代現象が起こり、感染症は重篤かつ難治性のものへと移行することになる。したがって、このような immuno-compromised hosts における感染症の治療では、初期治療の時点から注意深い薬剤選択が必要であることは言うまでもない。

#### IV. 既知の病原体による新たな感染症

このような新興・再興感染症とは別に、従来は感染症と捉えられていなかった疾患のうち、微生物が原因の一部を担っていることが改めて確認された疾患もある。よく知られたものでは、消化性潰瘍やおそらくは胃癌の誘因となっているヘリコバクター・ピロリが上げられる。また、ヒトパピローマウイルスは子宮頸癌の原因と考えられるようになった。EB ウイルスもある種のリンパ腫やホジキン病の病因の重要な過程に関与していると考えられるようになった。その他の原因不明の疾患、例えば関節リウマチ (RA) やサルコイドーシス、炎症性腸疾患、および動脈硬化などでも、感染症が基盤となっていることが様々な事実から示唆されている。これらの疾患では、古典的なコッホの 3 原則 (4 原則) が適用できない場合が多い。すなわち、病原体論は新しい局面を迎えている、と言えるのかも知れない。

#### V. バイオテロリズム

近年、特定の排他的で攻撃的な一部の国家あるいはテロリスト集団による生物兵器使用の可能性が指摘され、公衆の安全の見地から重要な問題となってきた。致死性病原体を用いる生物兵器は、安価なコストで広範囲に影響を及ぼし、しかも社会に大きな混乱を引き起こすので、「貧者の核兵器」とも形容される。これまでに、これらの兵器が効果的に使用された事実はないが、例えば米国における郵便物による炭疽菌の不特定多数への配布、など懸念される状況は依然として存在する。炭疽菌は人畜共通病原体であり、その胞子は安定であるため、散布手段を選ばない。炭疽菌感染による肺炭疽は重篤であり、未治療の場合にはその死亡率は 90% に達する。米国ですでに兵士に対する炭疽菌ワクチン接種が行われていることはよく知られている。

生物兵器の深刻なことは、多くの感染者が発生しなければその攻撃そのものがなされたことにすら気がつかないことである。炭疽菌以外に病原性と安定性を兼ね備えていて生物兵器の手段になりうるものとしては、天然痘ウイルスやペストおよびボツリヌスなどがある。また、エボラウイルスも 90% 近い致死率を持ち治療手段がないことなどから、兵器もしくは自ら感染者となって相手国の大衆に感染を蔓延させる一種の自爆テロの手段として警戒が必要である。さらに、遺伝子操作技術を用いてこれらの微生物の病原性を高めたり、薬剤耐性を賦与することなどにより治療困難な生物兵器に作り替えることが可能である。実際の話として、1925 年にジュネーブ協定 (日本は批准せず) で禁止されていたにもかかわらず、旧日本軍がペストや炭疽菌を用いた生物兵器を開発していたこと (ただし実際に有効に使用されたかは疑問視されている)、またソ連では 1979 年に秘密裏に開発されていた炭疽菌が軍細菌兵器工場から事故により漏れだし、施設の風下に居た人々の内 66 人が死亡したこと、ずっと以前に遡って、かつて英国がアメリカ先住民に天然痘ウイルスを塗布し

た毛布を配布していたということ、などがあることを忘れてはならない。このような負の歴史のひとつの帰結として、撲滅したはずの天然痘ウイルスなどをいまだに保持し続けなければならないこのような状況は、自らの尊厳に関わる意識と実質的利害との間に横たわる行動倫理的課題がまだ未解決であることを示している。感染症に関して人類が克服しなければならない課題は、このように自らの中にも存在するのである。

## VI. 感染症における分子生物学的研究

ヒトゲノム計画が進行するのと並行して、多数の病原微生物のゲノム配列決定のプロジェクトが進められた。多くのウイルスゲノムの配列決定のみならず、インフルエンザ菌、肺炎球菌、肺炎マイコプラズマ、結核菌、癩菌、など細菌のゲノムも決定され、多くの新しい知見が急速に蓄積されつつある。これまでは表現型から病原性を規定する微生物遺伝子の同定に至るまで長い時間と膨大な努力を要していたのが、ゲノムレベルからのアプローチが可能になったことで研究の進め方がまったくと違っていいほど様変わりをした。例えば、病原性の異なる近縁微生物の遺伝子レベルでの比較から、候補となる遺伝子を選択し、これらの遺伝子に人為的に変異を加えて、病原性を規定する遺伝子を見つける、という reverse genetics の手法はもはや微生物研究の定法のひとつとなった。また、抗生物質の作用機序の究明にも遺伝子発現プロファイル解析などが威力を発揮している。さらに、構造生物学的解析や Bioinformatics による構造・活性予測などが精度を徐々に高めてきており、病原性遺伝子の同定からこれを分子標的とした新たな治療薬やワクチンの開発に進むための方法論も確立されつつある。

今後の感染症研究の方向性のひとつとして、ヒトゲノムと微生物ゲノムの相互作用として「疾病」が成立する、という視点も重要である。とりわけ、細胞内でのみ増殖できるウイルスなどの感染症においては、宿主因子との相互作用

がその存続のために必須であることから、ゲノムレベルおよびプロテオームレベルでの両者の相互作用を明らかにすることが病態理解に有力な手段となるであろう。のみならず、これらの相互作用を阻止する化合物をスクリーニングしてゆく過程で治療法の開発にもつながってゆくのである。

他方、集団レベルでの感染防御を考える上で、効率の良いワクチン開発の方法論が進められるべきであろう。微生物抗原に対する効率的な免疫応答を引き起こすための免疫応答制御におけるサイトカイン・ネットワークの解明とその人為的制御は、遺伝子組み換え技術を駆使したワクチン開発そのものにもまして、重要である。

## おわりに

感染症は人類にとって決して最後まで克服できないものであるかも知れない。また、微生物の存在は必ずしも常に人類の脅威であるばかりではない。微生物と平和的共存を踏る方法論を探ることも考えてみる必要がある。果たしてヒトと微生物との安定な関係とは何なのか、あるいは特定の微生物に対しては断固殲滅の覚悟で臨むべきなのか、ゲノムレベルで考えさらに地球レベルで考えてみる必要がある。しかしながら、より緊急の課題としては感染症教育が上げられる。感染症に対する専門家育成は臨床のみにとどまらない。かつて感染症は「病氣」という不可思議な現象を前にして唯一因果律が適応できる課題として、コッホやパスツールらの時代には文字通り科学の最前線を走っていた。基礎医学および生物学の先端的テーマとしてこれからは感染症は様々な驚きと新たな発見をもたらし続けるであろう。ゲノム決定は新たな感染症パラダイムのまだほんの出発点に過ぎない。想像力にあふれた若き野心的な基礎研究者の育成こそが感染症の解決にとっても不可欠である。

## 文 献

- 1) 特集. 内科-100年のあゆみ(感染症). 日本内科学会雑誌 創立 100周年記念号 91巻 10号, 2002

- 2) Harrison's Principles of Internal Medicine 15th edition (Eds: Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson), McGraw Hill, 2001.
  - 3) Lewis Thomas. The lives of a cell. Bantam New Age Books, 1974
  - 4) Daniel Barenblatt. A Plague Upon Humanity: The Secret Genocide of Axis Japan's Germ Warfare Operation. HarperCollins, 2004
  - 5) Robin M. Henig. A dancing Matrix. Lowenstein Associates, Inc., 1993 (邦訳「ウイルスの反乱」長野 敬, 訳. 青土社, 1996.)
-

## 11

---

## Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis

TAKASHI OKAMOTO

Department of Molecular and Cellular Biology,  
Nagoya City University, Nagoya, Japan

### I. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are produced in the cells by various environmental stimuli such as infection of microbes (viruses, bacteria, etc.), ionizing and UV irradiation, and pollutants (i.e., oxidants), which are collectively called "oxidative stress." These environmental challenges elicit inflammatory and immune responses (1). Interestingly, these factors are also regarded as risk factors and disease-accelerating factors for autoimmune diseases including rheumatoid arthritis (RA) (Fig. 1). In addition, inflammatory responses in mammals are often associated with ROS production from neutrophils and macrophages. Therefore, this natural

F1

245