

ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明

所属 北海道大学大学院薬学研究科 生化学分野

研究者 藤室 雅弘

研究要旨 エイズ発症者や臓器移植者において日和見感染症を引き起こすヘルペスウイルス制圧のため、抗ヘルペスウイルス薬の開発、マルチプレックス PCR を用いた感染診断システムの構築と臨床応用、 γ -ヘルペスウイルスの潜伏感染機構の解明を行う。

A. 研究目的

アフリカ等の第三国を中心に世界中のエイズによる年間死者は三百万人に達し、収束する気配はない。その死因の多くはカリニ肺炎やカポジ肉腫等の日和見感染症である。カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の感染により引き起こされるカポジ肉腫は内臓器官に生じた場合、死に至る悪性腫瘍である。また、先進各国における臓器移植の急激な増加に伴い、KSHV 感染ドナーによって提供されるウイルス汚染臓器を介したレシピエントの新興感染とカポジ肉腫発症という新たな問題が生じている。現在、日本においては HIV 感染者や臓器移植者が少ないため、KSHV 感染症についての議論は少数なため、今後、これらが深刻に問題視されるのは明らかである。日和見感染症に対する有効な化学療法と安全性の確立された臓器移植は世界規模の社会的要請である。

KSHV はヒトに感染すると深刻な疾患を起こさずにそのまま潜伏感染する。潜伏感染中、KSHV はエピゾームとして宿主核内で保持される。しかし、潜伏感染者の免疫低下時、例えばエイズ発症や免疫抑制剤の投薬時において、KSHV はカポジ肉腫やB細胞性リンパ腫を引き起こす。KSHV は感染後、潜伏感染関連核抗原 (LANA) を発現する。LANA はエピゾームの保持と宿主細胞のがん化という二つの

役割を果たすと考えられているが、発がん機構については不明な点が多い。

これらの背景と社会的要請により、本申請研究では以下の3つの研究を遂行する。

①ヘルペスウイルス (KSHV、EBV) 感染がん細胞に対する新規抗ウイルス薬の開発。また、LANA の機能阻害を抗 KSHV 薬開発のためのシーズと考え、干渉性 RNA を用いた LANA の恒常的ノックダウンの臨床応用へ向けた研究開発についても行なう。

②ヘルペスウイルス感染診断システムの構築とその応用。すなわち、エイズや臓器移植患者において日和見感染症を引き起こす KSHV、EBV、HCMV 感染を網羅的に診断する DAN アレイとマルチプレックス PCR 法を我々はほぼ確立しているため、その臨床応用開発と疫学的調査を行なう。

③KSHV 潜伏感染機構と発がん機構の解明。KSHV は1994年に同定された最も新しいタイプの γ -ヘルペスウイルスであり、潜伏感染や発がん機構について不明な点が多いウイルスである。KSHV の発現する潜伏期関連核抗原 (LANA) は KSHV エピゾームの複製と宿主細胞がん化を行なう最も重要なウイルス蛋白質と考えられている。そこで我々は、潜伏感染や発がんに関わる LANA の機能解析のため、細胞性の LANA 結合タンパク質の探索を行なった。

本研究により得られる成果は、KSHV 感染症の

治療法や日和見感染症の予測と予防、また、臓器移植時のウイルス被曝リスク低減を実現することとなり、多くのエイズ患者や臓器移植者に対する医療行為に貢献できるものと確信する。

B. 研究方法と研究結果

① 新規抗ウイルス薬の開発(ヌクレオシド系薬物と siRNA)

我々は既に新規作用機序で強力な DNA 切断活性と DNA 鎖合成阻害活性を有するシチジンヌクレオシド誘導体、シアノダックを開発している。核酸誘導体が抗ウイルス活性を発現するためには、ウイルスが発現するヌクレオシドリン酸化酵素により選択的かつ効率的にリン酸化される必要がある。そこで、我々はウイルスリン酸化酵素に高い選択性を有するアシクロビル(広く臨床で用いられている主要な抗ヘルペス薬)のプリン塩基部と薬理活性を有するシアノダックの糖部のハイブリッド化合物である SAI-22-6-1 と SAI-22-10-1 を設計し、その合成を行なった。KSHV、EBV 感染細胞に対するアッセイの結果、SAI-22-6-1 と SAI-22-10-1 はウイルス非感染がん化 B 細胞には影響を与えず、KSHV と EBV 感染がん化 B 細胞にのみ特異的に細胞増殖抑制を示した(HCMV に対する作用は未解析)。ガンシクロビル、アシクロビル(ヘルペスウイルス感染症に対して広く臨床で用いられている)の KSHV や EBV 感染がん化 B 細胞に対する IC₅₀ (50%生存率を示す薬物濃度)は 100 μM 以上であったが、SAI-22-6-1、SAI-22-10-1 の IC₅₀ は約 0.1 μM であり、非常に強いウイルス感染特異的な細胞毒性を有している。現在、これらハイブリッド化合物の作用機序を解析している。すなわち、KSHV や EBV 由来のウイルスチミジンキナーゼによるモノリン酸化反応の効率や DNA 鎖切断活性等の比較や作用機序の解析を続けている。

我々は、KSHV が発現する LANA が β-カテニンの異常な蓄積を誘導し、感染細胞をがん化に導くことを既に明らかにしてきた。ウイルス蛋白 LANA は宿主細胞内でウイルス DNA の保持と複製を行なう重要なウイルス蛋白質である。我々は LANA の機能

阻害をカポジ肉腫治療薬開発のためのシーズと考え、干渉性 RNA を用いた LANA の恒常的ノックダウンを検討した。本年度において、効果的な LANA ノックダウンのための新しい siRNA のデザインと合成を行い、抗 LANA-siRNA によるウイルス DNA 除去活性と感染細胞増殖阻害活性の測定を行なったが有意な結果は得られていない。今後、テトラサイクリンの培地添加により siRNA の発現の ON/OFF が可能で、抗生物質によりプラスミド保持細胞のクローニングが可能なプラスミドを構築する。この抗 LANA-SiRNA 保持細胞を用いることで、より有意な抗ウイルス活性を検出できると考えられる。

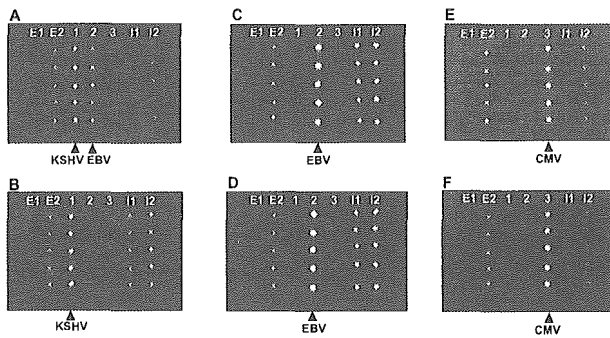
本研究については特許出願の関係上、薬物の構造式や構造を予測できる名前の使用や、データの記載を控えさせて頂きました。

② ヘルペスウイルス感染を網羅的に解析できる診断システムの構築

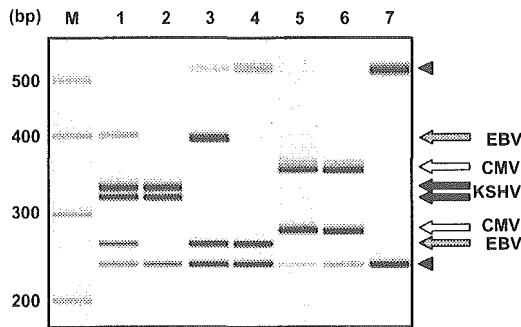
我々は KSHV、EBV、HCMV 遺伝子をメンブレン上に固定化した DAN アレイの作製を行ない、これらのウイルス感染の有無を同時に、しかも網羅的に診断できる DNA アレイ法を構築した。また、KSHV、EBV、HCMV 感染を同時に解析できるマルチプレックス PCR 法も確立した。マルチプレックス PCR 法はアレイ法に比べ、安価で多検体の解析に優れているのが特徴であり、検出感度は一サンプル当たり 20 コピーのウイルス DNA を必要とする。一方、DNA アレイ法は検出感度において優れているがコストはマルチプレックス PCR の 10 倍高い。DNA アレイ法の検出感度は一サンプル当たり 10 コピーのウイルス DNA を必要とする。また、これら 2 つの診断法については、すでに大学知的財産部を介して特許出願済みである。

DNAアレイとマルチプレックスPCR 診断法の比較

	検出感度(検出に必要なウイルスDNA量)	費用(1検体)
DNAアレイ法	10コピー以上	約5万円
マルチプレックスPCR法	20コピー以上	約5千円



Detection of each virus DNA in the virus-infected cell lines, KSHV, EBV double-positive BC2 (A), KSHV-positive BC3 (B), EBV-positive Raji (C), EBV-positive Akata (D) and CMV-positive HEL#1, #2 (E, F). Columns were the same as shown in FIG.1. Arrow-head indicate the virus signal.



Electrophoretic patterns showing PCR-amplified products from the virus-infected cell lines in multiplex PCR for the virus genes, KSHV, EBV double-positive BC2 (Lane1), KSHV-positive BC3 (Lane2), EBV-positive Raji (Lane3), EBV-positive Akata (Lane4), CMV-positive HEL#1, #2 (Lane5, 6) and SiHa (negative control) (Lane7). Arrow-head indicate the external control (upper) and the human genomic internal control (lower).

次に、検出感度は劣るがコスト的に安価なマルチプレックス PCR を用いて、多検体のヒト末梢血 DNA サンプル中のウイルス感染の疫学的調査を行った。1000 検体以上の健常人末梢血 DNA サンプル中に含まれるウイルス DNA の有無を解析した。その結果、KSHV は 18.5% の検体に感染し、HCMV は 0.9%、EBV は 53.3% の割合で存在していた (投稿準備中)。

③ KSHV 潜伏感染機構の解明

ヒトに潜伏感染した KSHV はウイルス蛋白質 LANA を発現する。LANA はウイルスエピゾームの複製と宿主細胞がん化を行なう最も重要なウイルス蛋白質と考えられている。そこで我々は、潜伏感染や発がんに関わる LANA の機能解析のため、細胞性の LANA 結合タンパク質の探索を行なった。LANA の N 末端側領域を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ精製し、これを用いた GST-pulldown による LANA 結合タンパク質を解析した。LANA 結合タンパク質を SDS-PAGE にて分離し、トリプシンによる

ゲル内消化の後、MALDI-TOF/MS によるタンパク質の同定を行った。その結果、LANA の N 末端側領域に対する結合タンパク質として HistoneH3A、HistoneH3B および HistoneH2A を同定した。これらは新規 LANA 結合タンパク質ではあるが、LANA-N 末端側領域結合タンパク質として HistoneH1 がすでに報告されている。また、LANA の C 末端側領域に対する結合タンパク質の探索は、S-tag 融合 LANA-C 末端側領域の哺乳動物発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、S-protein agarose を用いて S-tag 融合 LANA とともに精製されるタンパク質を解析した。その結果、既に LANA 結合タンパク質として報告されている RING3 のほか、AF-X、IQGAP、PARP 等の新規結合タンパク質をこれまでに同定した。

我々によって LANA 結合蛋白質として同定された IQGAP は、細胞膜局在タンパク質であり、N 末端側領域にカルモジュリン結合モチーフ、C 末端側領域に RasGAP ドメインを有する。高転移能、高浸潤能を呈する悪性度の高いがんでは、高頻度に IQGAP の発現増強が認められる。現在までに明らかにされた作用として、IQGAP は、細胞接着因子である E-cadherin の機能を、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーや Ras などの細胞増殖シグナルの下流で抑制することが報告されている。一方、AF-X は、活性型 Ras の下流で細胞接着の減弱に関わることが明らかにされている。これらの機能により、AF-X も IQGAP 同様、細胞の癌化にかかわる。今後は LANA とこれら細胞性蛋白質の結合がいかんしてウイルスの潜伏感染と発がんに関与するのかを解析する。

本研究成果報告書には特許出願の関係上、遺伝子の正確な名前の使用を控えさせて頂きました。

(倫理面への配慮)

本研究は「組換え DNA 実験を含む研究計画」、「病原性微生物等を取り扱う研究計画」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する研究計画」に該当する。文部科学省・厚生労働省・経済産業省と北海道大学の倫理委員会の定めた省令と規程 (組換え DNA 実験安全管理規程、病原性微生物等安全管理規

程、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する規程)に基づき、適正で安全な実施の下で本研究は行なわれた。また、疫学調査で扱ったヒトゲノムサンプルに関しては、個人情報等が完全に暗号化されインフォームドコンセントの得られたサンプルのみ研究に用いた。

C. 考察

臓器移植時に使用される免疫抑制剤やエイズの発症による免疫不全は、KSHV感染症だけでなく、しばしば他のヘルペスウイルスの日和見感染も引き起こす。特にEBV(エプステイン・バーウイルス)やHCMV(サイトメガロウイルス)はKSHVと同頻度で重篤な感染症を引き起こす。そこで、本研究計画ではKSHVだけではなくEBV、HCMVも研究対象とし、抗ウイルス薬の開発と網羅的感染診断法の確立を行なった。抗ウイルス薬に関しては現在、臨床で広く用いられているガンシクロビル、アシクロビルのIC50より約1000倍高い新規抗KSHV、EBV薬を本研究で同定した。今後は非感染通常細胞等での毒性試験が必要と考えられる。そこで、我々はKSHVとEBV、HCMVがコードするヌクレオシドリン酸化酵素(チミジンリン酸化酵素)やリン酸基転移酵素を恒常的に発現する安定発現HeLa細胞株を確立した。本リン酸化酵素安定発現HeLa細胞と親株HeLa細胞に対する候補薬物の増殖抑制活性を比較することで、簡単に、しかも通常の培養設備で、非感染細胞に対する細胞毒性の解析と、標的酵素(ウイルス由来のヌクレオシドリン酸化酵素)によるモノリン酸化効率を解析することが可能となると考えられる。一方、本研究で開発した化合物の作用機序の解析が今後必要であると考えられる。すなわち、KSHVやEBV由来のウイルスチミジンキナーゼによるモノリン酸化反応の効率やDNA鎖切断活性等の比較や作用機序の解析結果により、さらに薬理活性の高い化合物の開発が可能になると考えられる。

KSHV、EBV、HCMVの網羅的感染診断法について、DNAアレイ法とマルチプレックスPCR法の2種類の診断法を確立した。この二つの解析法には、検出感

度に優れているがコスト面での負担が大きいDNAアレイ法、反対に検出感度に劣るが安価なマルチプレックスPCR法というように、それぞれ特徴があり、その特徴を生かして用いられることが望ましい。さらに、研究計画には含まれていないが、我々は今回確立したマルチプレックスPCR法に関する技術と情報を転用して、リアルタイムPCRを用いたウイルス量測定システムも開発中である。本定量システムを用いることにより、血球や培地等の検体からDNAを精製したサンプルでは、検体中の正確なウイルスDNAのコピー数が算出できる。本システムとDNAアレイ法やマルチプレックスPCR法と組み合わせることにより、ウイルス感染の有無(定性的結果)と正確なウイルス量(定量的結果)の情報が得られることになる。また、本リアルタイムPCR定量系は、1つ目のサブテーマ「新規抗ウイルス薬の開発」において抗ウイルス薬の評価系にも利用することも考えている。

D. 結論

1. 新規抗ウイルス薬の開発

核酸誘導体ライブラリーからKSHV感染がん細胞における増殖抑制活性の解析を行なった。複数の増殖阻害活性を有するヌクレオシド誘導体を同定し、これらがKSHV由来のウイルスチミジンキナーゼで効率的にモノリン酸化されることを確認した。

2. ヘルペスウイルス感染を網羅的に解析できる診断システムの構築

KSHV、EBV、CMVについて感染の有無を同時に診断できる2種類の診断システム(DNAアレイ法とマルチプレックスPCR法)を構築した。また、マルチプレックスPCR法を用いて1000検体のヒト・末梢血DNAについて疫学的調査を実施した。

3. KSHV潜伏感染機構の解明

MALDI-TOF/MSを用いた、ペプチドMSフィンガープリント法により細胞性のLANA結合タンパク質としてRING3、AF-X、IQGAP、PARP、HistoneH3A、HistoneH3BおよびHistoneH2Aを同定した。LANAとこれら結合蛋白質の機能的な相互作用の解析が今後の課題である。

E. 研究発表

論文発表

1. Fujimuro M. & Yokosawa H. Production of anti-polyubiquitin monoclonal antibodies and their use for characterization and isolation of polyubiquitinated proteins.
Methods in Enzymol. 2005 in press
2. Tsukamoto S., Hirota H., Imachi M., Fujimuro M., Onuki H., Ohta T. & Yokosawa H. Himeic acid A: a new ubiquitin-activating enzyme inhibitor isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 191-194 (2005)
3. Fujimuro M.
The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in oncogenesis.
生化学 76, 140-143, 2004.
4. Fujimuro M. & Hayward S. D. Manipulation of glycogen-synthase kinase-3 activity in KSHV-associated cancers.
J. Mol. Med. 82, 223-231, 2004

その他

藤室雅弘「臓器移植後のカポジ肉腫は臓器に含まれるウイルス感染細胞が原因」*ファルマシア* (日本薬学会) Vol. 40 No. 1 p63, 2004

学会発表

1. 藤室雅弘、横沢英良、S. Diane Hayward「A novel viral mechanism for dysregulation of Wnt signaling in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency」
The Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji (2004年8月)
2. 藤室雅弘「カポジ肉腫ウイルスによる発がん機構」第1回 EB ウイルスシンポジウム 札幌 (2004年7月2日)
3. Magdalena Weidner、藤室雅弘、Meir Shamay、S. Diane Hayward「LANA transfers KSHV genomes

to PODS upon lytic reactivation」 Fourth International Workshop on Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Related Agents, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, California (2004年8月)

4. 藤室雅弘、横沢英良「GSK-3 β によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス LANA のリン酸化修飾」第52回日本ウイルス学会一般口演 横浜 (2004年11月)
5. 中村哲也、笹島仁、藤室雅弘、横沢英良「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス核抗原 (LANA) の機能解析」第52回日本ウイルス学会一般口演 横浜 (2004年11月)
6. 笹島仁、中村哲也、横沢英良、藤室雅弘「プロテオーム解析によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス核抗原 (LANA) 結合タンパク質の探索」第52回日本ウイルス学会ポスター発表 横浜 (2004年11月)
7. 藤室雅弘、S. Diane Hayward、横沢英良「GSK-3 β によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス LANA のリン酸化修飾」第27回日本分子生物学会ポスター発表 神戸 (2004年12月)
8. 笹島仁、中村哲也、横沢英良、藤室雅弘「KSHV由来 LANA タンパク質の新規 C 末端プロセシング体とがん化における役割」第27回日本分子生物学会ポスター発表 神戸 (2004年12月)

F. 知的財産権の出願・登録情報

1. 取得特許

【発明の名称】マルチプレックスPCRを用いたヘルペスウイルス遺伝子検出法

【出願番号】2005-40607

【発明者】藤室雅弘、西脇森衛、尾川直樹、横沢英良

【特許出願人】国立大学法人北海道大学、株式会社ジェネティックラボ