

平成18年度

# 若手研究者奨励研究報告書

## 目 次

### 政策創薬総合研究

#### 課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川 端 健 二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増 田 智 先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中 道 一 生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊 澤 晴 彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大 喜 多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中 野 由 美 子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋 本 亮 太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小 林 カ オ ル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田 辺 公 一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川 上 浩 司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊 豫 田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡 田 直 貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小 島 伸 介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅 山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌 宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村 上 恭 子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵 原 耕 一 郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥 平 桂 一 郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	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	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

## 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院 生化学講座

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重篤な日和見感染症を引き起こすカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス制圧のため、抗ウイルス薬の開発、臨床応用可能なウイルス感染診断システムの構築、ウイルスの潜伏感染維持と発がん機構の解明を行う。

### A. 研究目的

ヒトに感染するヘルペスウイルスとして、現在、8種類のヘルペスウイルスが確認されている。8番目に発見されたカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus: KSHV)は、 $\gamma$ 2-ヘルペスウイルス(rhadinovirus 属)に分類され、ヒトヘルペスウイルス8(human herpesvirus 8: HHV-8)とも呼ばれる。1994年に、Changらは、同一エイズ患者における正常皮膚組織とカポジ肉腫組織とを比較して、肉腫組織のみに特異的に存在する外来DNA断片を探索・単離した。同定された遺伝子断片のDNA配列は、がんウイルスであるEpstein-Barr virus(EBV)やHerpesvirus saimiri(HVS)と相同性を持つことから、KSHVは発がん性の新規ヒトヘルペスウイルスであると報告された。KSHVは、エイズ関連のカポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多発性キャッスルマン病において高頻度に検出され、現在、がんウイルスとして認められている。カポジ肉腫は、KSHV感染B細胞や血液中のウイルス粒子によって感染した血管内皮細胞から発生する。紡錘状細胞と脈管構造が混合しながら進行し、皮膚表面上において斑点状の青紫色の病変として現れる。その病変が内臓器官に生じた場合は死に至ることもある。カポジ肉腫は外見上顕著に

症状が表れることから、エイズ患者に更に心的なダメージを与えることが多い。日本において、エイズ患者の自殺者の多くがカポジ肉腫を発症している事がある特徴的な事実を証明している。

KSHVの潜伏感染者の割合は、アフリカでは50%以上で、イタリアと北米では10%程度、日本国内では4%以下と報告されている。KSHVの伝播経路は、唾液や粘膜分泌液を介した経口、性交渉、または母子間での感染が多い<sup>4)</sup>。KSHVは、健常者に感染しても重篤な疾患を伴わないままに潜伏感染すると考えられている。潜伏感染時に、KSHV遺伝子は、両側のターミナルリピートが繋がった環状2本鎖DNA(エピゾーム)として、宿主細胞核内に存在する。ウイルスの再活性化により、KSHVは溶解感染に移行し、ウイルスの複製を開始する。KSHVは潜伏感染時に、潜伏感染関連核抗原(LANA)を発現する。LANAはエピゾームの維持・複製と宿主細胞のがん化という二つの役割を果たすが、発がん機構については不明な点が多い。

KSHVは、ガンシクロビル等の既存の抗ウイルス薬に対して抵抗性を示す。一方、アントラサイクリン系の抗癌剤であるドキソルビシンはカポジ肉腫に対して有効だが、骨髄抑制や血液毒性等の重篤な副作用がある。また、世界各国の臓器移植の増加に伴い、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ビ



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数なため、KSHV感染症についての議論は少ないが、今後、これらが深刻に問題視されるのは明らかである。

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つの研究を実施した。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考えられる。

### ①抗ウイルス薬の開発

KSHVが潜伏感染時に発現するLANAは、ウイルスDNAの複製と発癌という二つの重要な役割を果たす。そこで、LANAの機能阻害を抗KSHV薬開発のシーズと考え、siRNAを用いたLANAの恒常的ノックダウンが新規抗ウイルス薬となりえるか否か検討した。一方で、我々はアシクロピルのリボースを改変しDNA切断基を導入した新規抗ウイルス薬(SAI-22-X)とその誘導體類を開発している。さらに高い選択性と抗ウイルス活性の薬物開発のため、それらの作用機序についても解析した。

### ②ヘルペスウイルス定量システムの構築

我々は、エイズ患者や臓器移植のレシピエントにおいて重篤な日和見感染症を引き起こすKSHV、EBV、CMVの3つのヘルペスウイルスの感染診断法として、リアルタイムPCRを用いたウイルスDNA定量システムの開発を実施した。

### ③KSHV潜伏感染機構と発がん機構の解明

KSHVは1994年に全遺伝子が決定され、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エピソード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。

## B. 研究方法と研究結果

### ① 抗ウイルス薬の開発

#### (1) 抗LANA siRNAの開発

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明らかにしてきた。LANAは宿主細胞内でウイルスDNAの保持と複製を行なうと共に、細胞のβ-カテニンを安定化させ、β-カテニンの異常な蓄積による細胞癌化を誘導する。そこで、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、LANAのmRNAを不安定化させ、LANAの蛋白質発現抑制するanti-LANA siRNAを開発し

#### A. LANAの構造とsiRNAの標的部



#### B. anti-LANA siRNAのLANA発現阻害効果

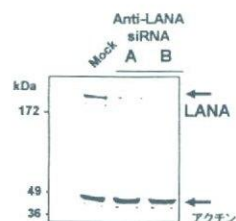
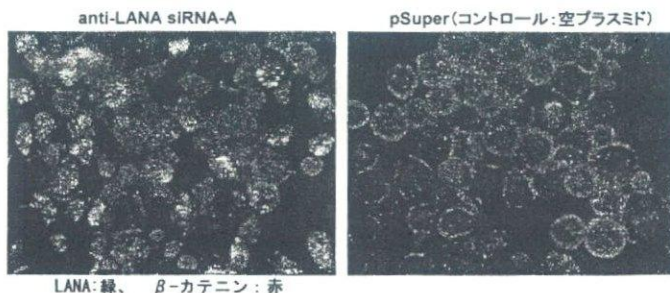


図1. 抗LANA siRNAの設計とLANA発現阻害効果

た(図1)。LANA遺伝子の5'側18塩基を標的とした、anti-LANA siRNA-A、または、LANA遺伝子の3'側18塩基を標的としたanti-LANA siRNA-Bの2種類のsiRNAを発現ベクターpSuperにクローニングし、これらは効率的にLANA蛋白質発現を阻害する(図1-B)。また、anti-LANA siRNAをKSHV感染PEL細胞に一過的に発現させると、



LANA: 緑、β-カテニン: 赤

図2. anti-LANA siRNA-Aによる癌遺伝子産物β-カテニンの発現抑制

siRNAはLANAの発現を抑制し、さらに、β-カテニンの蓄積も効率的に抑制する(図2)。次に、anti-LANA siRNA-A

(または B) を薬剤耐性遺伝子マーカーを含む発現プラスミドに組み込み、KSHV 感染 PEL 細胞にトランスフェクションし、恒常的 siRNA 発現細胞 (薬剤耐性株) をスクリーニング、クローン化して、その感染がん細胞の増殖活性を測定した。その結果、siRNA 発現細胞は非発現株に比べ PEL 細胞の増殖能を低下させた (図 3)。これらの結果は、siRNA により KSHV 感染がん化細胞が LANA を喪失した結果、細胞内  $\beta$ -カテニン量の低下し、 $\beta$ -カテニンが活性化する標的遺伝子 (サイクリン D や Myc 等の細胞増殖進行に関与する遺伝子) の転写抑制に起因すると考えられる。

一方で上記の結果は、LANA は KSHV エピゾームの複製や安定化も行なうため、anti-LANA siRNA により KSHV 感染がん化細胞中の LANA 蛋白質の発現が抑制された結果、KSHV 感染がん化細胞は KSHV エピゾームの複製や維持が障害を受け、KSHV 感染細胞が不死化能を喪失したことも原因の一つとして考えられる。しかし、PCR にてウイルス DNA を測定した結果においては有意な差は見られなかった。この結果については PCR 特異的な技術要因によりウイルス DNA 量の差を測定できていないことも考えられ、リアルタイム PCR やサザンプロット等、他の検出法において再解析中である。

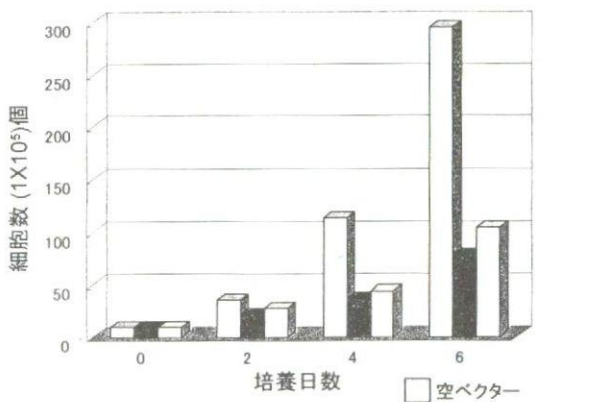


図3. anti-LANA siRNAによる KSHV感染癌細胞 (PEL) の増殖抑制

本研究については特許出願の関係上、薬物を予測できる名前を使用や、siRNA の標的配列等のデータの記載を控えさせて頂きました。

## (2) ヌクレオシド系薬物

我々は、アシクロビルのリボースを改変し DNA 切断基を導入した新規抗ウイルス薬 (SAI-22-X) とその誘導體類を開発している。SAI-22-X は、ウイルス非感染がん化 B 細胞には影響を与えず、KSHV 感染がん化 B 細胞にのみ特異的に細胞増殖抑制を示す (一部の EBV 感染パーキットリンフォーマ細胞に対しても細胞増殖抑制を示す)。ガンシクロビル、アシクロビルの KSHV や EBV 感染がん化 B 細胞に対する IC<sub>50</sub> は 100  $\mu$ M 以上であるが、SAI-22-X の IC<sub>50</sub> は約 0.05  $\mu$ M である。さらに、SAI-22-X のウイルス非感染細胞に対する IC<sub>50</sub> は 100  $\mu$ M 以上である。これら化合物のウイルス感染細胞特異的な細胞毒性は、薬物依存的に感染細胞が p53 とカスパーゼ 3/7 の活性化を介したアポトーシスにより誘導される。この 53 経路の活性化は感染細胞特異的に SAI-22-X の DNA 鎖切断反応、すなわち DNA 損傷が生じた結果、アポトーシスが引き起こされたと考えている。

選択性や非活性の高い抗ウイルス薬の開発には、ウイルスが発現する標的酵素への選択性や、細胞内での代謝や安定性の研究は必須である。そこで、我々は SAI-22-X とその誘導體類の作用機序や細胞内動態について、解析を行った。その結果、SAI-22-X のグアノシン塩基部にアミノ基を中心とした修飾基を導入した SAI-22-X の誘導體類は、細胞内のアデノシンデアミナーゼにより効率よくグアノシン塩基に変換されていることを明らかにした。SAI-22-X とその誘導體類の殺細胞活性は同程度であるが、SAI-22-X に比べて SAI-22-X 誘導體類では細胞内安定性と膜透過性が向上されているため、SAI-22-X 誘導體類の今後の展開が期待される。

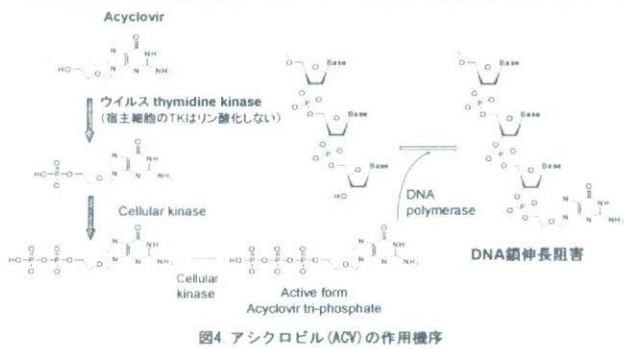
SAI-22-X の DNA、RNA、蛋白質合成の阻害効果について解析した結果、本薬物は DNA 合成阻害だけでなく、RNA と蛋白質合成も阻害していることが明らかになった (特に本薬物の RNA 合成阻害活性は非常に強い)。また、水溶液中では本化合物の異性体が RNA 類似構造をとり、RNA ポリメラーゼを阻害することが示唆されている。しかし、本薬物のウイルス感染特異的殺細胞活性は本薬物の DNA 合成阻害による DNA 損傷シグナルによる p53 依存的なアポトーシスに起因すると考えられる。

アシクロビル (ACV) やガンシクロビル (GCV) はプロ



ドラッグと呼ばれ、そのものは抗ウイルス活性を有していない。ACVが薬理活性を持つにはACVの5' OHがモノ→ジ→トリリン酸化され、ウイルスDNAの伸長を停止させる。ウイルス感染細胞内において、ACVはウイルス由来のチミジンリン酸化酵素(TK)によりモノリン酸化を受け、その後細胞内のヒト由来のヌクレオチド・キナーゼによりジ・トリリン酸化される(図4)。しかし、基質特異性の高さからヒトTKはACVやGCVをモノリン酸化しない。このため非感染細胞に取り込まれたACVは薬効を持たず、感染細胞のみ選択毒性を示す。すなわち、核酸誘導体を骨格に持つ抗ヘルペスウイルス薬が選択的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(チミジンリン酸化酵素)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より高い選択性を有する化合物開発のため、開発した化合物の作用機序について、以下の解析を行った。

化合物のウイルス感染特異的な殺細胞の作用機序の解析のため、KSHVがコードするチミジンリン酸化酵素(TK)を一過的に発現させたウイルス非感染B細胞に対する薬物の殺細胞活性を解析した。その結果、KSHVのTKを発現したB細胞は1 $\mu$ Mの4日間の薬物添加によりそ



の70-90%が死滅した。一方、TK非発現細胞では薬物添加により有意な殺細胞活性は観察されなかった。この結果は、本薬物がKSHV感染が関与したB細胞内で、KSHVのTKにより選択的にモノリン酸化されDNA合成阻害を行ない、さらに、ヒトTKは本薬物をモノリン酸化しないことから、ウイルス非感染細胞内では毒性を発現しないことを示唆している。今後はKSHVのTKを恒常的に発現する安定発現B細胞株を確立し、親株と安定発現株で薬物によ

る殺細胞活性の比較を行なう。

※ 本研究で解析した化合物の特許出願(国内)は完了していますが、PCT出願中のため、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は控えさせていただきます

## ② ヘルペスウイルス定量システムの構築

我々は、KSHVのLANA遺伝子、EBVのEBNA1遺伝子、CMVのIE1/2遺伝子をリアルタイムPCRの標的遺伝子とし、KSHV、EBV、CMVの各ウイルス量測定システムを既に構築している。本ウイルス量測定システムは、モデル検体として、ウイルスDNAを含む精製DNAサンプルを用いた場合、10コピー以上のウイルスDNAが存在すれば、正確なウイルスDNAのコピー数を測定できるシステムである。本定量系を用いることにより、血清、唾液、尿、髄液等の生体検体中の正確なウイルスDNAのコピー数が算出できる(図5)。

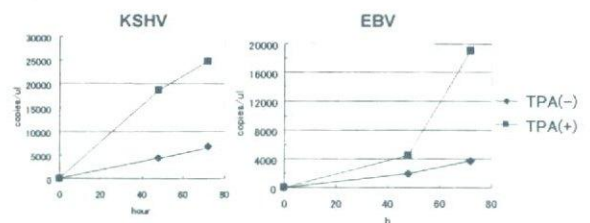


図5. KSHV、EBV感染細胞培養液中のウイルスDNAコピー数の定量

TPA添加によりKSHVは潜伏感染から溶解感染(ウイルス複製)へと移行する。

しかし、検体の調製技術に克服すべき課題が幾つか残っている。我々は、本システムを薬物スクリーニング系へ用いることを考えているため、薬物スクリーニングでの検体、すなわち、培地中に含まれる死細胞や死ウイルス由来のウイルスDNA残骸の混入が、正確なウイルス量の測定を阻害する。TPA処理によりKSHV潜伏感染細胞は溶解感染サイクルに移行し、ウイルス産生を開始する。図5に示したが、本システムは培地中に生産されたウイルスの正確なDNAコピー数を算出する。しかし、TPA無処理のサンプルにおいても、長期間の培養やTPAの溶媒により死滅した細胞からウイルスDNA断片が培地中に拡散するので、正確な生ウイルス由来のDNA測定には、検体の調製法に改善が必要とされる。

現在、この問題点を克服するために、ウイルスレセ

プターのリガンドである化合物Aや抗ウイルス膜蛋白抗体を96穴プレートに吸着させ、培地中の生ウイルスのみを調製する方法等を検討中である。また、多検体サンプルにも対応出来るように、可能な限り簡便・単純なサンプル調整法の開発を試みている。

本研究成果の説明において、特許出願の関係上、遺伝子配列の記述や化合物の名前の使用を控えさせて頂きました。

### ③ KSHV 潜伏感染機構と発がん機構の解明

#### (1) 新規 LANA 結合蛋白質の同定

LANA は、その一次構造上の特徴から、N 末端側領域、中央部の酸性アミノ酸リピート領域、C 末端側領域の3つに区分される。これらのうちでもC末端側領域は、KSHV エピゾームとの結合やGSK3の核内拘束による $\beta$ -catenin 依存性転写活性化の亢進のほか、癌抑制遺伝子産物である p53 や pRb をはじめとする様々な細胞性蛋白質との結合により、細胞内シグナル伝達の脱制御にかかわることが報告され、LANA の機能発現において特に重要な役割を担うことが明らかにされている。そこで、LANA のC末端側領域に焦点を当て、細胞性の結合蛋白質の探索と同定を行なった。LANA C末端結合蛋白質をGST融合蛋白質として大腸菌で発現させ、これをB細胞由来細胞株 DG75 の細胞抽出液と混合して複合体を形成させることで GST-pulldown assay を行なった。ここで得られた複合体を SDS-PAGE で分離した後バンドを切り出し、トリプシンによるゲル内消化、さらに MALDI-TOF/MS 解析を行うことで LANA のC末端と特異的に相互作用する細胞性蛋白質として HAUSP、PARP、Ku80、Ku70 を同定した。我々は HSV-1 と EBV のウイルス蛋白質との相互作用が既に報告されている HAUSP に焦点を当て、その後の解析を行なった。脱ユビキチン化酵素 HAUSP は、ポリユビキチン化修飾され分解される蛋白質からポリユビキチン分子を解離させ、蛋白質の安定化を行なう酵素である。

#### (2) LANA/UAUSP の相互作用による KSHV の潜伏感染維持と発がんへの関与

HAUSP は、Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) の溶解感染を促進するウイルス性蛋白質 ICPO と相互作用する細胞性核蛋白質として同定されたものであり、ICPO の脱ユビキチン化および安定化を促進するとされている。また、KSHV と同じ $\gamma$ -ヘルペスウイルスの EBV が発現する核蛋白質 EBNA1 は KSHV 由来核蛋白質 LANA と一次構造上の相同性は認められないにもかかわらず、ウイルスゲノムエピゾームの複製・保持、また宿主細胞の形質転換に重要な働きを持つなど機能的な相同性を示すことが知られている。興味深いことに、今回 LANA と相互作用する分子として同定した HAUSP は EBNA1 とも相互作用することが報告されている。このことは LANA および EBNA1 がもつ共通の機能がこれらの分子との相互作用に起因する可能性を強く示唆するものである。

脱ユビキチン化酵素 HAUSP によって触媒される脱ユビキチン化反応はユビキチン-プロテアソームシステムによる蛋白質分解に拮抗する機構として、蛋白質の安定化に重要な役割を果たしている。ユビキチン-プロテアソームシステムとは、分解すべき基質蛋白質の翻訳後修飾(ユビキチン化)と 26S プロテアソームによる分解の2つの系から構成される。E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) からなるユビキチン化酵素群の作用により、多数のユビキチン分子が分解される標的蛋白質の Lys 残基に鎖状に結合し、ポリユビキチン鎖が形成される。次に、26S プロテアソームが、形成されたポリユビキチン鎖を分解のシグナルとして認識し、基質蛋白質部分を分解する。

我々は LANA を培養細胞に一過性に発現させることにより、これらの分子と LANA が実際に細胞内で相互作用していることを明らかにした。また、LANA のC末端側に存在する UAUSP 結合領域と結合共通配列を同定した。また、UAUSP 分子内の LANA 結合領域も同定した。HSV-1 の ICPO が UAUSP により脱ユビキチン化され、ICPO が安定化するのと同様に、LANA と UAUSP の結合は LANA の脱ユビキチン化と安定化に関与していた。UAUSP による LANA の安定化は、感染細胞内で LANA がユビキチン-プロテアソームシステムにより分解され、MHC-クラス I 分子により抗原提示されるのを防ぐと考えられる。さらに、



UAUSP による LANA の安定化は、LANA 自身が有するウイルス DNA の複製・維持や宿主細胞のがん化の機構亢進に直接的に関与していると考えられる。

癌抑制遺伝子産物である p53 は細胞周期の停止やアポトーシスを促進することで細胞の癌化を抑制するが、HAUSP は p53 の脱ユビキチン化を行い p53 の安定化および転写活性化を促進する。さらに p53 および p53 と同様に細胞増殖を抑制する pRB の両者のユビキチン化酵素である MDM2 もまた HAUSP によって脱ユビキチン化され安定化することが報告されている。驚くべき事に、ウイルス非感染細胞と比較して KSHV 感染 PEL 細胞において、MDM2 が有意に安定化され、さらに、この MDM2 の安定化は LANA が直接的に関与していることも我々は明らかにしている。この LANA による MDM2 の安定化と、MDM2 の脱ユビキチン化活性による p53 と pRB の安定化は KSHV の発がん機構の中心を形成しているかもしれない。

本研究成果報告書には特許出願・学術論文未発表の関係上、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実施された。

### C. 考察

我々は、臨床で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 KSHV 感染特異的な新規抗がん化合物類を開発しており、今後は化合物の作用機序と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）を恒常的に発現する複数の安定発現細胞株を確立している。なお、親株として、HeLa、MCF7、ME180 を用いた。本リン酸化酵素安定発現細胞と親株細胞に対する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。

LANA は KSHV が潜伏感染時に発現する主要なウイルス抗原であり、ウイルスエピソードの維持と細胞がん化に必須なウイルス蛋白質である。この LANA を創薬のための標的分子とし、我々は、新規 LANA 結合蛋白質として、HAUSP、PARP、Ku80、Ku70 を同定した。本研究により得られたこれら LANA 結合蛋白質と LANA の分子間相互作用や機能的相互作用の生理的意義が今後の薬物設計や、既存医薬品を seeds とする創薬開発への展開につながると考えられる。

### D. 結論

1. SAI-22-X とその誘導体類が有する KSHV 感染特異的殺細胞活性の作用機序の主要な機構を明らかにした。
2. リアルタイム PCR を用いたヘルペスウイルス定量システムを構築した。
3. 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 HAUSP を含む細胞性の LANA 結合蛋白質を同定した。また、HAUSP の LANA 安定化による KSHV の潜伏感染維持と発がん機構の一端を明らかにした。

### E. 研究発表

#### 論文発表

- (1) Fujimuro M., Inoue H, Teishikata Y. and Yokosawa H. Apoptotic Effect of Ganciclovir on Primary Effusion Lymphoma Cells Infected with Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25, 635-645, 2006

(2) Hayward SD., Liu J., Fujimuro M. Notch and Wnt Signaling: Mimicry and manipulation by gamma herpesviruses.

*Science STKE*, 335, re4, 2006

(3) Nishiwaki M., Fujimuro M., Teishikata Y., Inoue H., Sasajima H., Nakaso K., Nakashima K., Sadanari H., Yamamoto T., Fujiwara Y., Ogawa N., Yokosawa H. Epidemiology of Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus and Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infections in Peripheral Blood Leukocytes Revealed by a Multiplex PCR Assay.

*J. Med. Virol.* 78, 1635-1642, 2006

\*Corresponding author

(4) 藤室雅弘, KSHV と発がん ウイルス (日本ウイルス学会) 56, 209-218, 2006

(5) 藤室雅弘 横沢英. KSHV 潜伏感染における遺伝子発現制御 *蛋白質核酸酵素* (ウイルス研究の現在と展望) 2007 印刷中

#### その他の発表

(1) 藤室雅弘, 中村哲也, 横沢英良 癌ウイルスの生き残り戦略: 宿主の蛋白質修飾をウイルスが乗っ取る. 日本薬学会第127年会 講演ハイライト集(報道機関用) p29, 2007

(2) 藤室雅弘 横沢英良 プロテアソームと蛋白質分解 *生物薬科学実験講座* 2007 印刷中

#### 学会発表

1) 大多和正樹, 市川聡, 手石方康弘, 藤室雅弘, 横沢英良, 松田彰 「抗 kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) 活性を有するヌクレオシドアナログの合成及び生物活性」第15回抗ウイルス化学療法研究会学術集会, 2006年5月, 福島, 口頭

2) 大多和正樹, 市川聡, 手石方康弘, 藤室雅弘, 横沢英良, 松田彰 「抗カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) 活性を有するヌクレオシドの合成」

日本薬学会北海道支部第126回例会, 2006年5月, 札幌, 口頭

3) 藤室雅弘, 中村哲也, 横沢英良 「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス核抗原による宿主シグナル伝達の制御」第21回ヘルペスウイルス研究会 口頭発表 岐阜県白川村 (2006年6月8日-10日)

4) Masahiro Fujimuro, S. Diane Hayward, Tetsuya Nakamura, Hideyoshi Yokosawa 「A viral mechanism for dysregulation of beta-catenin/GSK-3 signaling in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency」20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (第20回国際生化学・分子生物学会議) ポスター発表 京都 (2006年6月22日)

5) 藤室雅弘 「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスによる宿主シグナル伝達の制御」第11回ファーマサイエンスフォーラム 口頭発表 札幌 (2006年6月24日)

6) 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による GSK3 と ELL の制御」第3回 EB ウイルス研究会 EB ウイルスシンポジウム 愛知県名古屋大学 (2006年6月30日)

7) 藤室雅弘, 横沢英良 「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスによるシグナル伝達の制御と発がんへの関与」第17回日本生体防御学会学術総会 口頭発表 札幌 (2006年7月27日)

8) 藤室雅弘, 中村哲也, 横沢英良 「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス核抗原による GSK3/ELL の制御」第54回日本ウイルス学会 一般口演 名古屋国際会議場 (2006年11月)

9) 大多和正樹, 市川聡, 手石方康弘, 藤室雅弘, 横沢英良, 松田彰 「KSHV 感染癌化細胞特異的な細胞増殖抑制活性を有する CNDAG 並びに誘導体の合成及びその生物



活性」第 25 回メディシナルケミストリーシンポジウム  
ポスター発表 名古屋国際会議場 (2006 年 11 月 29 日)

10) 藤室雅弘, 中村哲也, 横沢英良 「癌ウイルスによる癌遺伝子産物の翻訳後修飾と安定化の制御」 日本薬学会第 127 年会 口頭発表 富山国際会議場 (2007 年 3 月 30 日)

#### F. 知的財産権の出願・登録情報

【出願番号】特願 2006-111397

【発明の名称】抗ヘルペスウイルス活性を有するヌクレオシド誘導体

【発明者】市川聡 藤室雅弘 松田彰

【出願人】北海道大学長、

【出願日】2006 年 4 月 13 日

---

平成18年度

政策創薬総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31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