

厚生労働科学研究費補助金

平成18年度

新興・再興感染症研究事業

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の
予防と治療に関する研究（H18－新興－一般－013）

研究報告書

平成19年3月

主任研究者 森 康子

（独立行政法人 医薬基盤研究所）

目 次

I. 総括研究報告

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究 主任研究者：森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト）	1
--	---

II. 分担研究報告

CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索 分担研究者：井上直樹（国立感染症研究所・ウイルス第1部）	9
臓器移植後 HHV-6、HHV-7 感染症の病態解析 分担研究者：吉川哲史（藤田保健衛生大学・医学部）	13
免疫不全マウスモデルを用いたウイルス感染症の予防に関する研究 分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）	14
ウイルス感染症の発生機序の解明と、効果的な予防策に関する研究 「ヒトヘルペスウイルス 6、7 とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」 分担研究者：近藤一博（東京慈恵会医科大学・微生物学講座）	20
RNA 干渉を利用したヘルペスウイルスに対する新規治療法の開発 分担研究者：水口裕之（医薬基盤研究所・遺伝子導入制御プロジェクト）	25
EB ウイルス感染症の発生機序と治療法に関する研究 分担研究者：藤原成悦（国立成育医療センター研究所・母児感染研究部）	39
骨髄移植患者の難治性ヘルペスウイルス感染症に出現する薬剤耐性ウイルス 分担研究者：白木公康（富山大学・医薬学研究部）	44
免疫低下状態でのウイルス感染症治療応用のための人工リンパ組織ストローマ細胞の樹立 分担研究者：末松佐知子（医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト）	47
水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）特異的細胞性免疫能の評価法の検討 分担研究者：森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト）	48
HHV-6 の病態解明 ～HHV-6 と樹状細胞との相互作用解析～ 分担研究者：森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト）	53
<u>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</u>	55

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究

主任研究者：森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー）

研究要旨：近年では臓器移植後患者や悪性腫瘍患者の免疫低下状態において、健常人にはほとんど病原性を示さないヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) が再活性化し、網膜炎、肺炎、脳炎等を引き起こし、致命的な感染症となることが多い。また、免疫不全状態では単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化も頻繁に見られ、遷延性の重篤な感染症を引き起こす。さらに、免疫不全状態のリンパ増殖性疾患 (LPD) などの EB ウイルス (EBV) 感染症も問題となっている。本研究においては、免疫低下状態におけるヘルペスウイルス感染症の発症機序および病態解明、免疫低下状態におけるウイルス再活性化の早期診断法、薬剤耐性ウイルスの耐性機序解明とそれらに対する抗ウイルス剤検索、免疫低下状態におけるウイルス感染症の効果的な予防法の開発のための基盤を確立することを目的とする。本年度は、VZV 免疫応答の測定法の検討、HHV-6 感染によって誘導される因子の同定、移植患者におけるウイルス量のモニタリング、再活性化ウイルス DNA の定量化法の開発、新規抗ウイルス剤候補の検索、NOG マウスへの EBV の感染系の確立、薬剤耐性ウイルスの特性の解析、最適な遺伝子導入活性を示すアデノウイルスベクターの確立および ATLL モデルマウスの解析を行った。以上の研究によって、臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究における各研究項目について進展させた。

分担研究者

井上直樹 (国立感染症研究所・ウイルス第1部 室長)
吉川哲史 (藤田保健衛生大学医学部 助教授)
長谷川秀樹 (国立感染症研究所・感染病理部 室長)
近藤一博 (東京慈恵会医科大学・微生物学講座第1 教授)
藤原成悦 (国立成育医療センター研究所・母児感染研究部 部長)
白木公康 (富山大学医薬学研究部・ウイルス学 教授)
水口裕之 (医薬基盤研究所・遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー)
末松佐知子 (医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー)

A. 研究目的

近年、骨髄移植、臓器移植が頻繁に行われるようになり、原疾患に対する治療は進歩を

遂げているが、移植患者や悪性腫瘍患者に行われる免疫抑制剤投与や化学療法により、以前は日和見とされていたウイルスが活性化し、

それらのウイルス感染症によって致死的となる例が増加している。ヒトヘルペスウイルスは、幼少時期に初感染し、潜伏感染するが、免疫抑制状態となった宿主においてウイルスが再活性化し、宿主に様々な病気を引き起こす。近年では臓器移植後患者や悪性腫瘍患者の免疫低下状態において、健常人にはほとんど病原性を示さないヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) が再活性化し、網膜炎、肺炎、脳炎等を引き起こし、致死的な感染症となることが多い。また、免疫不全状態では単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化も頻繁に見られ、抗ウイルス剤の投与にもかかわらず、HSV、VZV による遷延性の重篤な感染症を引き起こす。実際、抗ウイルス剤の長期投与による薬剤耐性ウイルスの出現は避けられない事実である。さらに、免疫不全状態のリンパ増殖性疾患 (LPD) などの EB ウイルス (EBV) 感染症も問題となっている。即ち、移植、化学療法によって原疾患は改善しても、患者は難治性のウイルス感染症によって致死的となる。本研究では、免疫低下状態で発生する重篤なヘルペスウイルス感染症の病態解明を行い、ウイルス再活性化の早期診断、予防および治療法開発のための基盤を確立することを目的とする。よって本研究では、免疫低下状態で発生する重篤なヘルペスウイルス感染症の病態解明を行い、ウイルス再活性化の早期診断法、予防法および治療法開発のための基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、主任研究者森、分担研究者 8 名 (井上、吉川、長谷川、近藤、水口、藤原、

白木、末松) の計 9 名が遂行した。当該年度においては、大きく、免疫低下状態におけるウイルス感染症の発症機序および病態解明、免疫低下状態におけるウイルス再活性化の早期診断法および迅速検査法の確立、薬剤耐性ウイルスの耐性機序解明とそれらに対する抗ウイルス剤検索、免疫低下状態におけるウイルス感染症の効果的な予防法の開発のための基盤的研究にわけて遂行された。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の検体を用いる場合には、疫学研究および臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を行う。研究対象者に対して個人の不利益・危険性が伴わないように配慮し、また研究の目的、個人の不利益、危険性に対しては十分に説明し、各研究機関の倫理委員会により承認されたインフォームドコンセントにサインあるいは捺印を得た上で研究を行う。

動物実験の倫理面においては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮をする。国が定める各種の関連法律および各研究機関が制定する動物実験指針を遵守する。また個々の動物実験については各研究機関の動物実験委員会において審査し、承認を得た上で行う。

C. 研究結果

1. VZV 免疫応答の測定

VZV 特異的な細胞性免疫応答評価を確立するために、健常人における末梢血単核球の VZV 刺激に対する細胞性免疫応答を IFN- γ ELISPOT 法にて測定し、VZV 抗原濃度、検体の保存条件、細胞数を設定した。本システムによって健常人における VZV 特異的な細胞性免疫応答ならびに T 細胞活性化能を測定し、さら

に健常人における VZV 特異的な細胞性および体液性免疫応答の相関性についても検討した。

2. HHV-6 感染症病態機構解明

HHV-6 を単球由来樹状細胞 (MDDC) に感染させ、遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果 Integrin $\beta 5$ の発現低下を発見し、HHV-6 感染 MDDC の形態観察によって、確かに感染細胞の接着能が抑えられていることを明らかにした。HHV-6 の MDDC での感染効率は低い、感染 MDDC と T 細胞との共培養後に感染性ウイルス粒子の産生を示した。以上のことから、HHV-6 の T 細胞への伝播において樹状細胞が運搬体としての役割を担っている可能性が示唆された。

3. 移植後患者における HHV-6 感染の病態解明

造血幹細胞移植ならびに生体肝移植後の HHV-6 再活性化機序を明らかにするため、経時的に採取した患者末梢血をウイルス学的に解析すると共に、ELISA 法での血漿中サイトカイン濃度測定を行なった。造血幹細胞移植患者、肝移植患者共に HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。患者をそれぞれ HHV-6 感染群、非感染群に分け両群間でのサイトカイン濃度を比較した。その結果、2 週目から 4 週目にかけて、HHV-6 再活性化群において TNF- α 、IL-6 の濃度の上昇が認められた。よって、これら移植患者における HHV-6 再活性化に炎症性サイトカインが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、このようなサイトカイン合成の亢進が患者の臨床像の形成にも関連している可能性が考えられた。

4. HHV-6, HHV-7 再活性化の診断法、予防法の開発および疾患の機序解明

HCMV, HHV-6, HHV-7 からなる β -ヘルペスウイルスの再活性化を予防する方法を開発するために、再活性化によって唾液中に放出されるウイルス DNA を Real-time PCR 法で定量する方法を開発し、再活性化と生体の状態との関係を詳細に把握した。再活性化には、労働や抗癌剤の投与によるストレスとその蓄積が重要な因子であり、ストレス応答機構の一つである upper open reading frame regulation 機構が関与していることが示唆された。また、抗癌剤の投与による HHV-6 再活性化が、補完・代替医療薬である Active Hexose Correlated Compound (AHCC) によって予防できる可能性を見出し、 β -ヘルペスウイルス再活性化予防法の開発に向けての手掛かりを得た。

5. 新規抗ウイルス剤の検索

VZV、CMV の感染初期過程を阻害する新規抗ウイルス薬候補として、キナーゼ阻害剤を検討した。その結果、roscovitine は、5-10 μ M 程度の 50%阻害効果濃度 (EC50) で VZV 増殖の初期過程を阻害するのに対して、CMV の増殖阻害は細胞毒性が見られる 20 μ M 以上でないと見られず、逆に、別のキナーゼ阻害剤である olomoucine II が数 μ M 程度の EC50 で CMV 増殖を阻害することを見出した。また、5600 種類のランダム化合物ライブラリーから両ウイルスに対するレポーター細胞株を用いて検索し、20 μ M 以下の EC50 を有し細胞毒性が見られない化合物として VZV に対し 5 種類、CMV に対し 3 種類を同定した。VZV に対する 5 種類のうち 2 種類は異なる側鎖を有する thienyl carboxamide 系の化合物であり、特

に高い阻害効果があった。同定した 8 種類の化合物をリードとして各化合物に対し数種以上の類似化合物を評価して構造活性相関を検討した。

6. EBV 感染症発生機序の解明

臍帯血造血幹細胞を移植した NOG マウスに EBV を感染させることに成功した。胃がん由来ヒト上皮細胞では、EBV 感染後に CD40L の発現が誘導されることが示された。

7. 薬剤耐性機構の解析

骨髄移植患者の難治性 HSV 感染症と CMV 感染症患者から、それぞれアシクロビル (ACV) とガンシクロビル (GCV) 耐性ウイルスを得て、それらの抗ウイルス薬感受性、遺伝子変異の同定とウイルス学的検討を行った。ACV 耐性株はチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子に変異があり TK 活性を欠損するだけでなく、高温で増殖能を損なった温度感受性であった。

8. RNAi を利用した新規治療法の開発

ヘルペスウイルスの治療及び予防ツールとして、アデノウイルス (Ad) ベクターの利用の可能性を検討した。Ad ベクターは既存の遺伝子導入ベクターの中でも最も遺伝子導入効率が良く、容易に高タイトルのウイルスが得られる。そのため Ad ベクターに short interfering RNA (siRNA) 発現カセットを導入する事で、ターゲット遺伝子の効果的な発現抑制が期待される。本年度においてはまず VZV に焦点を絞り、検討を行った。

9. ATLL モデルマウスにおける HSV 感染

悪性腫瘍にともなう免疫低下を起こすマウスモデルを構築し、免疫低下時のウイルス感

染、及び潜伏ウイルスの再活性化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。成人 T 細胞白血病の発症原因となる HTLV-1 の発癌関連遺伝子である tax を発現するトランスジェニックマウスを作製し、発症に伴った免疫状態を解析した。本モデルマウスは白血病の発症に伴い免疫低下を起こしカリニ肺炎を発症した。

10. 人工リンパ組織を用いた免疫賦活療法

免疫不全状態においてもウイルスに対する免疫反応を効率よく誘導できる人工リンパ組織構築のためにストローマ細胞にいくつかの遺伝子を導入して安定発現細胞株を樹立した。樹立したストローマ細胞株を用いて人工リンパ組織を構築すると、導入遺伝子によって優位にリンパ球の集積が増加する組織が構築されることが分かった。

D. 考察

臓器移植後患者や悪性腫瘍患者の免疫低下状態において、健常人にはほとんど病原性を示さない HCMV、HHV-6 が再活性化し、致死的な感染症となることが多い。免疫不全状態では HSV、VZV の再活性化も頻繁に見られ、遷延性の重篤な感染症を引き起こし、リンパ増殖性疾患 (LPD) などの EBV 感染症も問題となっている。本研究においては、免疫低下状態におけるヘルペスウイルス感染症の発症機序および病態解明、免疫低下状態におけるウイルス再活性化の早期診断法、薬剤耐性ウイルスの耐性機序解明とそれらに対する抗ウイルス剤検索、免疫低下状態におけるウイルス感染症の効果的な予防法の開発のための基盤を確立することを目的とする。

本年度は以下の成果を得ることができた。

(1) IFN- γ ELISPOT 法による VZV 抗原特異的な細胞性免疫能の測定方法を確立した。(2) HHV-6 感染によって誘導あるいは抑制される宿主因子の同定を行った。(3)①5600 種類のランダム化合物ライブラリーから、VZV 及び CMV の感染初期過程を阻害する新規抗ウイルス薬候補をそれぞれ5種類と3種類同定した。②キナーゼ阻害剤 roscovitine が VZV の感染初期過程を阻害するのに対して、CMV の増殖阻害には有効でなかった。一方、別のキナーゼ阻害剤である olomoucineII が CMV に有効であった。(4)疲労と抗癌剤の使用が、HHV-6 の再活性化を誘導する強い刺激となることを見出した。また、抗癌剤によるウイルス再活性化が、補完・代替医療薬である AHCC によって抑制されることを見出した。ちなみに、AHCC (Active Hexose Correlated Compound = 「活性化糖類関連化合物」) は、キノコの菌糸体(「根」に当たる部分)を大型タンクで長期間培養して抽出した物質である。(5)造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化に、TNF- α 、IL-6 といった炎症性サイトカインが重要な役割を演じていることが明らかとなった。(6)臍帯血造血幹細胞を移植しヒト免疫系を再構築したマウスに EBV 感染が成立し、EBV 関連リンパ増殖性疾患に類似したリンパ腫が生じることが示された。(7)2例の骨髄移植患者の難治性単純ヘルペスウイルス感染症とサイトメガロウイルス感染症患者から、それぞれアシクロビルとガンシクロビル耐性ウイルスを得て、それらの抗ウイルス薬感受性、遺伝子変異の同定とウイルス学的検討を行った。日本では使えないが、海外では使える抗ウイルス薬の治療上の有効性必要性が明らかになった。(8)抗 IE62 抗体と BDNF の免疫交差部位の同定、抗 IL62 抗体による BDNF 活性の上

昇、帯状疱疹、帯状疱疹後神経痛患者血清中の抗 IE62 抗体と抗 BDNF 抗体の存在の確認を行った。(9)悪性腫瘍に伴った免疫低下のモデル動物として成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATLL)のモデル動物 (HTLV-1 の tax 遺伝子が T 細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス)を感染実験用に増やした。(10)標的細胞に対する高感受性アデノウイルスベクターの確立および shRNA 発現カセットを組み込んだプラスミドの作製を行った。(11)ATLL モデルマウスにおける免疫状態を解析した。(12)免疫不全状態においてもウイルスに対する免疫反応を効率よく誘導できる人工リンパ組織構築のためにストローマ細胞にいくつかの遺伝子を導入して安定発現細胞株を樹立した。

本年度の成果は今後以下のように活用される。

- (1) 免疫抑制者における VZV 再活性化の早期診断による重篤な帯状疱疹発症の予防。
- (2) 感染性ウイルスの迅速検出系を用いた感染初期過程を阻害する新規薬剤の検索。
- (3) 潜伏感染機構の類似した HCMV や HHV-6 の潜伏感染・再活性化のメカニズムの解明およびこれらのウイルス再活性化の早期診断法や予防法の開発。
- (4) 造血幹細胞移植後の HHV-6、HHV-7 感染の病態解明による感染制御に向けた方策の確立。
- (5) ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルマウス作製。EBV 感染症発生機序の解明が進み、新規治療法評価の場としての応用が期待される。
- (6) 骨髄移植患者の難治性ヘルペスウイルス感染症に出現する薬剤耐性ウイルス治療薬と耐性ウイルスに対する治療薬のわが

国での導入。

- (7) 帯状疱疹後神経痛の病態の解明と予防治療法の開発。
 - (8) 成人T細胞白血病リンパ腫 (ATLL) のモデル動物を用いた悪性腫瘍に伴う免疫不全の発症モデル動物を用いた *in vivo* の解析。
 - (9) RNA 干渉と Ad ベクターを利用したヘルペスウイルスに対する新しい治療法の開発。
- 以上の成果は、免疫不全状態で発生するヘルペスウイルス感染症対策の基盤に繋がる可能性が期待できる。

E. 結論

本年度の研究によって臓器移植や悪性腫瘍に伴って発生する致死的なウイルス感染症の予防法や治療法の開発、さらにウイルス感染症の遷延化、重篤化の抑制また発症予防に繋げるための研究基盤は推進した。

F. 健康危機管理情報

特に問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. G. Q. Wang, T. Suzutani, Y. Yamamoto, Y. Fukui, N. Nozawa, D.S. Schmid, I. Kurane, N Inoue. Generation of a reporter cell line for the detection of infectious varicella-zoster virus and its applications for antiviral studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3142-3145, 2006.
2. L.T. Krug, C.G. Teo, K. Tanaka-Taya, N. Inoue. Newly identified human herpesviruses. pp.197-278. *In: (Eds) IW Fong, K*

Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21st Century. Springer, NY, 2006.

3. H. Hasegawa, H. Sawa, M. Lewis, Y. Orba, N. Sheehy, Y. Yamamoto, T. Ichinohe, Y. Tsunetsugu-Yokota, H. Katano, H. Takahashi, J. Matsuda, T. Sata, T. Kurata, K. Nagashima, WW. Hall. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Med.* 12:466-472, 2006.
 4. M. Saijo, Y. Ami, Y. Suzaki, N. Nagata, N. Iwata, H. Hasegawa, M. Ogata, S. Fukushi, T. Mizutani, T. Sata, T. Kurata, I. Kurane, S. Morikawa. Monkeypox Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of *B5R* membrane protein protects monkeys from monkeypox. *J. Virol.* 80:5179-5188, 2006.
 5. M. Maeda, H. Sawa, M. Tobiume, K. Tokunaga, H. Hasegawa, T. Ichinohe, T. Sata, M. Moriyama, WW. Hall, T. Kurata, H. Takahashi. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microb. Infect.* 8:2647-2656, 2006.
- ##### 2. 学会発表
1. G Q. Wang, 福井良子、錫谷達夫、古谷野伸、山本由美子、柳舞美、野澤直樹、倉根一郎、井上直樹. ヒトサイトメガロウイルス及び水痘帯状疱疹ウイルス力価を迅速に測定できるレポーター細胞株の樹立及びその抗ウイルス剤評価への応用.

- 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会
2006 年 5 月 26-27 日、福島
2. 長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、片野晴隆、佐多徹太郎、倉田毅、長嶋和郎 成人 T 細胞白血病 (ATL) モデルマウスの解析 第 95 回日本病理学会学術集会 平成 18 年 4 月 30 日-5 月 2 日 東京
3. 川口晶、一戸猛史、澤洋文、岡田義昭、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、William W. Hall、長谷川秀樹. 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋
4. 近藤一博. 疲労のバイオマーカーとしてのヘルペスウイルス再活性化 第 2 回日本疲労学会 平成 18 年 7 月 大阪
5. 鎌田 美乃里、近藤 一博. HHV-6 感染 SCID-hu マウスにおける HHV-6 感染様式の解析 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋
6. 嶋田和也、武本眞清、山西弘一、近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) 初期遺伝子制御機構の解析 - 初期遺伝子プロモーター間の比較検討 - 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋
7. 近藤一博、鎌田美乃里、小林伸行. ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 と HHV-7 の再活性化の誘導因子としての疲労. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋
8. 清水 昭宏、近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋
9. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋
10. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製. 第 36 回日本免疫学会学術集会 平成 18 年 12 月 11-13 日 大阪
11. Shiraki K, et al.: Genital herpes by acyclovir-sensitive herpes simplex virus caused secondary and recurrent herpetic whitlow by thymidine kinase-deficient/temperature-sensitive virus. 31st International Herpesvirus Workshop, 2006, 7, Seattle, USA.
12. Phromjai J ら: Apoptosis in hep G2 infected by non-hepatitis viruses in vitro. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋

13. Hattori Y, Watanabe T, Suematsu S. Vascular Structure of Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-like Organoid in mice. 第 36 回日本免疫学会総会学術集会 平成 18 年 12 月 11-13 日 大阪

14. 武本眞清、山西弘一、森康子 ヒトヘルペスウイルス 6 は樹状細胞表面上の接着因子発現を抑制する. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19-21 日 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索

分担研究者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部

研究要旨 VZV 及び CMV の感染初期過程を阻害する新規抗ウイルス薬候補として、キナーゼ阻害剤を検討した。その結果、roscovitine は、5-10 μ M 程度の 50% 阻害効果濃度 (EC50) で VZV 増殖の初期過程を阻害するのに対して、CMV の増殖阻害は細胞毒性が見られる 20 μ M 以上でないと見られず、逆に、別のキナーゼ阻害剤である olomoucine II が数 μ M 程度の EC50 で CMV 増殖を阻害することを見出した。また、5600 種類のランダム化合物ライブラリーから両ウイルスに対するレポーター細胞株を用いて検索し、20 μ M 以下の EC50 を有し細胞毒性が見られない化合物として VZV に対し 5 種類、CMV に対し 3 種類を同定した。VZV に対する 5 種類のうち 2 種類は異なる側鎖を有する thienyl carboxamide 系の化合物であり、特に高い阻害効果があった。同定した 8 種類の化合物をリードとして各化合物に対し数種以上の類似化合物を評価して構造活性相関を検討した。

A. 研究目的

現在用いられている、ないしは FDA により認可されている抗ヘルペスウイルス剤は、サイトメガロウイルス (CMV) の前初期蛋白 IE2 に対するアンチセンス RNA であるフォミビルセンを除き、DNA 複製を阻害する核酸基質アナログである。これらの核酸基質アナログの抗ウイルス剤は有効であるが、耐性株の出現、副作用、投与方法などのため使用上の制約があり、作用機序の異なる新規薬剤の開発が求められている。特に、臓器移植においては CMV 感染症を防ぐために核酸基質アナログであるガンシクロビル (GCV) が用いられているが、骨髄機能抑制の副作用により好中球減少が生じ、結果として細菌・真菌などの日和見感染症を増悪化させるため、生存率など移植全体としてみた場合には、決して満足できる結果をもたらさない。さらに、欧米では移植時の CMV 感染症の予防の観点から、移植当初から GCV 投与を行なう方策がとられており、このことは耐性株の出現頻度を高める結果に繋がる可能性をもっている。新規薬剤の検索や耐性株の検出には、依然として感染性ウイルス力価を計測する生物学的方法が有効であるが、増殖の遅い CMV 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) では、時間と労力がかかりすぎ、迅速な対応が求められる耐性株検出やマススクリーニングが伴う新規薬剤の検索に困難が生じている。このため、耐性株の検出については、耐性が予想される変異を遺伝子レベルで同定する方法が普及しつつある。しかし、すべての耐性変異に対応することは現実的ではない。また、欧米で開発

が進められている新規薬剤は、キャプシド蛋白の成熟過程やゲノムのパッケージング過程に対する阻害剤などである。従って、感染性ウイルスの迅速検出系を用いて、HIV の T20 に相当するような薬剤など感染初期過程に対する阻害剤を検索することが本研究の目的である。我々は、ウイルス前初期蛋白により活性化される初期遺伝子プロモーターを利用し、酵素反応による化学発光を指標として容易に力価を測定できるレポーター細胞株をヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) について樹立し、抗ウイルス剤評価や臨床材料への応用などをすでに報告してきた。最近、HHV-8 と同様な原理に基づくレポーター細胞株を CMV 及び VZV についても樹立し、2 日以内に高感度で感染力価を求めることができることを示した。これらのレポーター細胞株を用いて、CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索を行った。

B. 研究方法

1) ウイルス株及び細胞株

MeWo 細胞 (ATCC より購入) 及びヒト 2 倍体細胞 HLF ((human lung fibroblast : CDC 組織培養施設より分与) は、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 Dulbecco's MEM (DMEM) 培地にて培養した。VZV P-0ka 株 (基盤研山西博士より分与) を MeWo 細胞ないしは HLF 細胞で培養した。テロメラゼ遺伝子により不死化されたヒト繊維芽細胞 hTERT-BJ1 (Invitrogen) は、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 DMEM:199 (4:1) 培地にて培養した。CMV Towne 株 (ATCC より購入) は、hTERT-BJ1 細胞

にて培養した。VZV レポーター細胞 MV9G 及び CMV レポーター細胞 U4C は、100µg/ml G418 添加 DMEM にて培養した。

2) レポーターアッセイによる薬剤効果の評価及び新規抗ウイルス薬の検索

MV9G 及び U4C は、ルシフェラーゼ遺伝子がそれぞれ VZV ORF9 及び CMV TRL4 プロモーター下流に挿入されたカセットが染色体に組込まれたレポーター細胞株である。ウイルス感染により発現される前初期蛋白 (IE 蛋白) によりプロモーターが活性化され、産生されたルシフェラーゼの酵素活性を化学発光反応をルミノメーターで測定することにより、ウイルス感染力価を迅速かつ容易に測定できる。

IE 蛋白によるレポータープロモーター活性化までの感染初期過程に対する薬剤の阻害効果の検討には、後述する直接感染法を、DNA 複製やウイルス粒子形成など IE 蛋白によるレポータープロモーター活性化以降の後期過程を含めた感染過程全体に対する薬剤の阻害効果の評価には共培養法を用いた。

a) 直接感染法: 96 穴プレートに巻き込んだ未感染細胞 (VZV では MeWo 細胞、CMV では h TERT-BJ1 細胞) に、1 穴あたり 500-1000PFU の細胞フリーウイルス及び薬剤を加え、2 ないし 3 日間培養し、培地を除いた後、長時間発光タイプのルミノアッセイ (Dual-Glo Luminoassay Kit, Promega) 基質を加え 20 分—1 時間反応後、ルミノメーター (ATTO) を用いてルシフェラーゼの相対的活性を測定した。

b) 共培養法: 96 穴プレートに $2.5-4 \times 10^4$ 細胞/穴でまきこんだ未感染細胞に、VZV の場合 1 穴あたり 1000-3000 個の VZV 感染細胞及び薬剤を、CMV の場合、1 穴あたり 4000PFU の細胞フリーウイルスと薬剤を加えて 2 日間培養した。その後、 $2.5-4 \times 10^4$ のレポーター細胞を重層し、さらに 1 日培養後、ルミノアッセイを行った。

3) 細胞毒性アッセイ

生存細胞数を産生 ATP 量に基づいて生存細胞数を測定するアッセイ (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega) を用いて、薬剤の細胞毒性を測定した。

4) 免疫染色法

感染細胞を PBS にて洗浄後 3.7% フォルマリンにて 5 分間処理し、PBS にて 3 回洗浄後 0.5% TritonX を含む PBS で 10 分間処理した。PBS にて 3 回洗浄後、希釈した抗 VZV IE62 モノクロー

ナル抗体ないしは抗 CMV IE2 モノクローナル抗体 (ともに Chemicon 製) を 1 時間反応させ、PBS 洗浄後さらにペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と反応させ、DAB 基質を用いて発色反応させた。

5) 化合物

キナーゼ阻害剤 (Sigma) 及びランダムな 5600 化合物 (Maybridge) は DMSO に終濃度 10-100mM となるように溶解し、使用直前に培地で希釈して用いた。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を要する研究項目はなかった。

C. 研究結果

1. サイクリン依存性キナーゼ阻害剤の抗ヘルペスウイルス効果の検討

サイクリン依存性キナーゼ阻害剤として知られる roscovitine は、宿主キナーゼの阻害のみならず、HSV の ICP0 などによる転写活性も阻害する。VZV 感染を阻害することも最近報告された。まず、VZV レポーター-MV9G 細胞を用いて roscovitine の阻害効果を評価した。その結果、直接感染法でも阻害が見られることから、感染初期過程を阻害していること、EC50 が 10µM 程度であることを確認した。そこで、roscovitine を含め入手可能なキナーゼ阻害剤 7 種類について CMV 及び VZV 増殖阻害効果を検討した (図 1)。その結果、VZV に対しては、roscovitine が最も有効であった。一方、CMV に対しては、roscovitine の阻害効果が見られず、別のキナーゼ阻害剤である olomoucine II が EC50 が 2-4µM と比較的強い阻害を示し、50% 細胞毒性濃度 (CC50) も 100µM と高く選択 Index が 20 以上と抗ウイルス薬として特異性が高いことが示された。

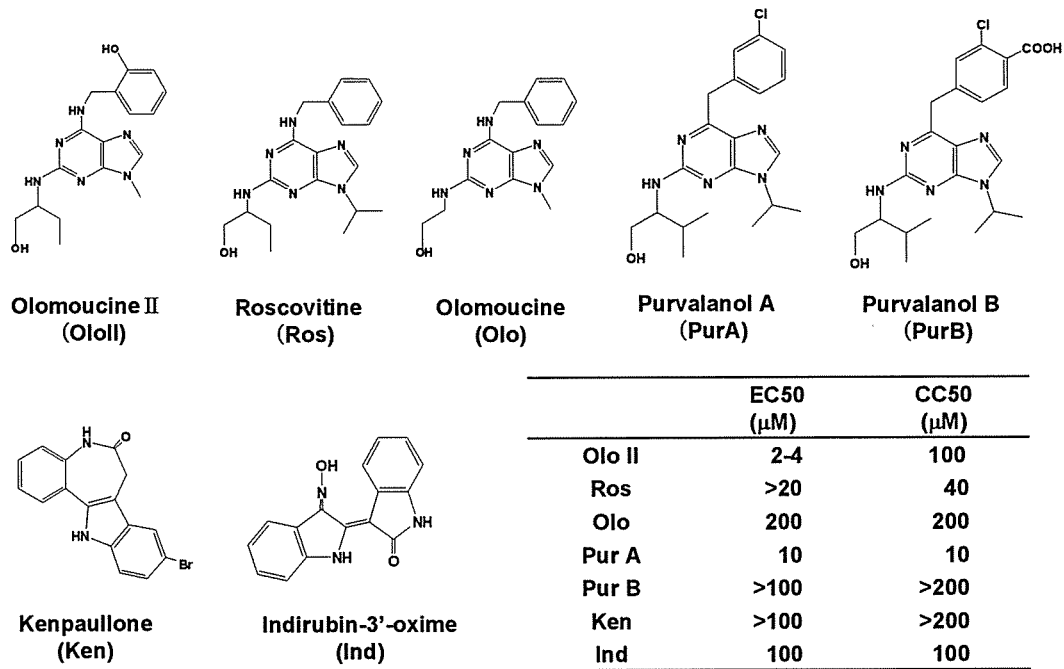
2. 感染受容体に対する阻害剤の検討

Gershon らは、マンノース 6 燐酸受容体 (M6P-R) を介したエンドサイトーシスにより VZV 感染が成立すると報告している。実際、MV9G 細胞感染において、40µM 程度の濃度で M6P が VZV の感染を阻害した。

3. ランダム化合物ライブラリーの検索

CMV 及び VZV レポーター細胞を利用し、ランダムな 5600 化合物について感染初期過程を阻害する可能性のある新規抗ウイルス剤を検索した。

図1 キナーゼ阻害剤の抗CMV効果



VZV の場合は、高力価の細胞フリーVZV を大量に調製することが困難であったため、 $20\mu\text{M}$ 化合物存在下で共培養法により 1 次スクリーニングを行い、約 200 化合物に候補を絞り込んだ。次に、候補化合物の細胞毒性を検討するとともに、各化合物 $20\mu\text{M}$ ないしは $4\mu\text{M}$ 存在下で直接感染法 (3 日培養) により、細胞毒性がなく ($>20\mu\text{M}$)、VZV 感染阻害がある 7 化合物を同定した。CMV については、直接感染法 (2 日培養) により 1 次スクリーニングを行い、10 化合物を選定後、細胞毒性を検討し、最終的に 4 種類の候補を得た。VZV と CMV に共通の化合物は 1 種類のみであった。

VZV 及び CMV 免疫染色法を用いて CMV に対する阻害効果を確認する実験を行ったところ、この化合物については阻害効果が見られなかったことから、ルシフェラーゼに対する阻害剤と判断し以後の検討から除いた。確認の結果、VZV に対する阻害化合物の 1 つは、核酸アナログで VZV に対する効果がよく知られる araC であることが判明した。VZV の場合 3 日培養したために、DNA 複製阻害剤までも選択してきた可能性があるものの、スクリーニング系が期待通り働いていることが結果的には裏付けられた。VZV に対する残りの 5 化合物のうち 2 つ (179H7 及び 133G4) は異なる側鎖を有する thienyl carboxamide 系の化合物であり、特に EC50 が $1.25\mu\text{M}$ 以下と比較的強い阻害効果があった。また、CMV に対しても弱い阻害効果があった。文

献的に、構造の一部が似ている化合物 PNU-183792 が DNA ポリラーゼ阻害剤として最近報告されている。同定した抗 VZV 効果のある化合物 141B3 及び抗 CMV 化合物 146F7 の EC50 も $1\mu\text{M}$ 以下であった。残りの抗 VZV 化合物 187C2, 192C8 及び抗 CMV 化合物 152E4 の EC50 は、 $2.5\text{--}5\mu\text{M}$ 程度であった。なお、これらの化合物については、VZV や CMV 感染に対する阻害効果がある類似化合物は報告されていない。次に、各阻害化合物について、様々な合成メーカーの化合物データベースから側鎖の一部などが異なり入手可能な周辺化合物を検索し、総計 43 化合物を購入した。これらのうち、7 化合物において抗 VZV もしくは抗 CMV 効果が見られた。興味深いことに、抗 CMV 阻害剤として同定した 146F7 には抗 VZV 活性がなかったものの、その周辺化合物のひとつが抗 CMV 活性ではなく抗 VZV 活性を示した。また、thienyl carboxamide 系の抗 VZV 阻害剤 133G4 の周辺化合物の一部で抗 CMV 活性が VZV に比して高くなったものがあった。

4. 感染においてウイルス・細胞間の膜融合に関与する gE・gI と gH・gL 複合体形成に関与すると予想される gE 及び gH のドメインをカバーするオリゴペプチドを多数合成し、レポーター細胞に細胞フリーウイルスとして感染させる際に阻害効果を示すかを検討したが、明確な結論は得られなかった。

D. 考察

本研究により、レポーター細胞が多数の化合物を含むライブラリーから新規抗ウイルス薬候補を検索するために有効であることが実証された。ランダム化合物ライブラリーから同定した抗 VZV もしくは抗 CMV 活性を有した化合物については、現在特許申請の準備を行っている。これらの阻害化合物をリードとして構造類似化合物の阻害活性を比較する構造活性相関解析を開始し、今後のより詳細な構造活性相関解析において、どの側鎖を代えた化合物の合成を依頼しその評価を行うのかについてある程度明らかになった。来年度以降、同定した阻害化合物の感染阻害の作用点を、粒子の吸着・侵入過程やウイルス前初期及び初期蛋白の発現など感染ステージごとに検討する。また、リードそのものではなく周辺化合物において、VZV 及び CMV の両者に共通の作用点があることが示唆された化合物については、他のヘルペスウイルスについても阻害効果を今後検討する。

CMV 阻害化合物については、細胞培養系でマウスやモルモット CMV の増殖を阻害するかを明らかにする。阻害する場合には、感染動物モデルにより個体レベルでの阻害を検討する。

特定のキナーゼ阻害剤のみに抗ウイルス効果が見られたことから、作用点が宿主キナーゼではなくウイルスがコードするキナーゼの可能性もあると考えられ、キナーゼ阻害剤により磷酸化状態が変化するウイルス蛋白がないかを今後検討する。また、ベンゼン環の修飾により特異性が変化していると思われるので、キナーゼ阻害活性を前提にすることなく、この周辺構造を置換した化合物を入手し検討を今後行う。

E. 結論

1) 本研究により、レポーター細胞が新規抗ウイルス薬の検索にとって有効であることが実証された。

2) キナーゼ阻害剤 roscovitine 及び olomoucine II にそれぞれ抗 VZV 及び抗 CMV 効果があった。

3) 5600 のランダム化合物より感染初期過程を阻害する化合物を VZV について 5 種類、CMV について 3 種類同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) G. Q. Wang, T. Suzutani, Y. Yamamoto, Y. Fukui, N. Nozawa, D.S. Schmid, I. Kurane, N. Inoue. Generation of a reporter cell line for the detection of infectious varicella-zoster virus and its applications for antiviral studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3142-3145, 2006.
- 2) L.T. Krug, C.G. Teo, K. Tanaka-Taya, N. Inoue. Newly identified human herpesviruses. pp.197-278. *In: (Eds) IW Fong, K Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21st Century.* Springer, NY, 2006.

2. 学会発表

G. Q. Wang, 福井良子、錫谷達夫、古谷野伸、山本由美子、柳舞美、野澤直樹、倉根一郎、井上直樹. ヒトサイトメガロウイルス及び水痘帯状疱疹ウイルス力価を迅速に測定できるレポーター細胞株の樹立及びその抗ウイルス剤評価への応用. 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会 2006 年 5 月 26-27 日、福島

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請準備中

新規抗サイトメガロウイルス薬 3 化合物
新規抗水痘帯状疱疹ウイルス薬 5 化合物

研究要旨

造血幹細胞移植ならびに生体肝移植後の HHV-6 再活性化機序を明らかにするため、経時的に採取した患者末梢血をウイルス学的に解析すると共に、ELISA 法での血漿中サイトカイン濃度測定を行なった。造血幹細胞移植患者、肝移植患者共に HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。患者をそれぞれ HHV-6 感染群、非感染群に分け両群間でのサイトカイン濃度を比較した。その結果、2 週目から 4 週目にかけて、HHV-6 再活性化群において TNF- α 、IL-6 の濃度が高かった。よって、これら移植患者における HHV-6 再活性化に炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆された。また、このようなサイトカイン合成の亢進が患者の臨床像の形成にも関連している可能性が考えられる。

A. 研究目的

移植後の HHV-6 感染について、これまでの研究成績から移植後 2 週間から 4 週間に約半数の患者でウイルスの再活性化が認められ、発熱、発疹、肝機能障害、骨髄抑制、脳炎など様々な臨床像への関与が示唆されている。特に最近、臓器移植患者における HHV-6 脳炎が辺縁系脳炎の臨床経過を示す場合が多く注目されている。しかしながら、このような患者における HHV-6 再活性化のメカニズムは不明であり、本研究では特にサイトカインとの関連性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

小児造血幹細胞移植（名古屋大学小児科）、成人肝移植（京都大学移植外科）患者から、移植後 1 週間間隔で末梢血を採取。ウイルス分離、抗体測定、リアルタイム PCR 法による血漿中ウイルス DNA 検索を実施。HHV-6 再活性化の頻度、時期を決定した。さらに経時的（造血幹細胞移植は移植後 1 週、2 週、3 週、4 週；肝移植は移植後 2 週、4 週、8 週）に採取した血漿を用いて、血漿中サイトカイン（IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ ）濃度を ELISA 法により測定した。尚、保護者あるいは患者に対するインフォームドコンセントの後、これらの検体採取を実施した。

C. 研究結果

1) 造血幹細胞移植：24 例の造血幹細胞移植患者中 14 例で HHV-6 の再活性化が確認された。再活性化例の中で 9 例では、移植後 2~3 週間頃に血中から HHV-6 が分離された。移植後 1 週、2 週、4 週の 3 つの時期において、HHV-6 再活性化群の血漿中 IL-6 濃度が有意に高かった。また、移植後 2 週間後において、HHV-6 再活性化群の TNF- α 値が有意に高値を示した。IL-1 β 、IFN- γ は検出

例が少なく有意差は認められなかった。

2) 生体肝移植：67 例中 HHV-6 分離例は 4 例、血漿中 HHV-6 DNA 陽性例は 15 例、有意な抗体上昇が確認された症例が 19 例で、いずれか一項目が陽性で HHV-6 再活性化と認められたのは 26 例だった。HHV-6 再活性化のリスクファクターとしては、HBV あるいは HCV キャリアーであることが挙げられた。基礎疾患、血液型適合性については関連がなかった。さらに、HHV-6 再活性化群と非再活性化群間で生存曲線を比較すると、HHV-6 再活性化群で有意に生存率が低かった。血漿中サイトカイン濃度を解析した結果、HHV-6 ウイルス血症を認めた症例（ウイルス分離陽性例）において、移植後 4 週間目の IL-6、TNF- α 濃度が有意に高かった。また、HHV-6 再活性化群と非再活性化群との比較では、移植後 4 週目の TNF- α 濃度が有意に高値を示した。

D. 考察

HHV-6 の再活性化時期、あるいはその前の血漿中炎症性サイトカイン濃度がウイルス再活性化群で有意に高かったことから、これらサイトカインが臓器移植患者における HHV-6 再活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

5th International Conference on HHV-6 and 7 (Barcelona, Spain)ならびに 31st International Herpesvirus Workshopにて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

「臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究」

「免疫不全マウスモデルを用いたウイルス感染症の予防に関する研究」

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究要旨

臓器移植や悪性腫瘍に伴った免疫低下状態においては健常な状態では問題にならない病原微生物により重篤な感染症を発症する事がある。特に健常な宿主に感染し潜伏するウイルスは悪性腫瘍による免疫低下に伴って再活性化し致死的な感染症を起こすことがある。本研究において悪性腫瘍にともなう免疫低下を起こすマウスモデルを構築し、免疫低下時のウイルス感染、及び潜伏ウイルスの再活性化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。成人 T 細胞白血病の発症原因となる HTLV-1 の発癌関連遺伝子である *tax* を発現するトランスジェニックマウスを作製し発症に伴った免疫状態を解析した。本モデルマウスは白血病の発症に伴い免疫低下を起こしカリニ肺炎を発症した。

A. 研究目的

悪性腫瘍に伴った免疫低下状態におけるウイルス感染症の発症メカニズム及び研究する為には動物を用いた *in vivo* での実験が必須である。本実験においてヒトでの病態を反映したモデル動物の作製とそのウイルス感染実験への応用を目的とし免疫低下を伴う事が広く知られている成人 T 細胞白血病のモデル動物の作製を行った。

B. 研究方法

動物実験

すべての動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。C57BL/6 マウス（オリエンタル酵母）を用いてトランスジェニックマウスを作製した。

プラスミドとトランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスは C57BL/6 を用い標準の方法に従い作製した。挿入遺伝子である *plck-Tax* は HTLV-I *Tax* の配列を PCR 法により増幅し *lck* 近位プロモーターにより挿入遺伝子を発現するベクター *p1017* の制限酵素 *Bam*H I サイトに挿入した。 *plck-Tax* プラスミドを *Not* I で直鎖化し 6.3 kb の遺伝子断片を挿入した。遺伝子挿入の前には Qiaex gel extraction kit (Qiagen, CA) を用いて精製した。生まれたマウスの尻尾よりゲノム DNA を採材しサザンブロット法にて遺伝子挿入を確認した。

挿入遺伝子の染色体マッピング

挿入遺伝子の染色体遺伝子内での挿入部位

を調べるためにゲノムウォーキング法を用いた。Universal Genome Walker kit (BD Bioscience Clontech) を用い説明書に従い行った。簡潔に述べるとトランスジェニックマウスの染色体 DNA を4つの異なる制限酵素 *Dra* I, *Pvu* II, *Eco*R V, *Stu* I でそれぞれ切断しライブラリーを作製しアダプター結合させ PCR 法を用いて挿入部位の DNA 配列を特異的に増殖させ遺伝子配列を決定した。決定した遺伝子配列を Ensemble genome BLAST サーチにより染色体内での位置を決定した。

病理組織学的解析と免疫組織染色

遺伝子挿入が確認されたマウスを経時的に病理組織学的に解析した。検体は緩衝ホルマリンで固定後パラフィンで包埋し薄切後、H&E 染色及グルコット染色を行った。また、抗 CD3 抗体を用いて免疫組織染色を行った。末梢血の塗抹標本はギムザ染色を行った。

結果

1、HTLV-1 tax 遺伝子トランスジェニックマウス

HTLV-1Tax 遺伝子を発達中の胸腺細胞及び T 細胞で発現させる目的で 1ck 近位プロモーターにより発現する発現ベクター p1017 を用いた。マウスへの遺伝子の挿入は尻尾から得られたゲノム DNA を用いたサザンブロットにより確認された (図 1)。1 個体あたりの挿入遺伝子の数は数十コピーと考えられ、同一部位へ直列に挿入されていると考えられた。挿入遺伝子の組み込まれた位置はゲノムウォーキ

ングにより同定された。それによると遺伝子は 4 番染色体の A2 領域に組み込まれた事が確認された (図 2)。マウスゲノムのデータベース解析によりこの領域には既知の遺伝子は存在しなかった。得られた tax トランスジェニックマウスは生後 10 ヶ月～23 ヶ月経過した後肝脾腫、リンパ節腫脹、腸間膜腫瘍を発症し、更には白血病を発症した。組織学的には盛んな分裂像を伴う diffuse large-cell lymphoma の像を呈し腫瘍細胞は肝臓、脾臓、肺、腎臓、皮膚への浸潤がみられた。白血化した個体の末梢血中に見られる白血病細胞は核に深い切り込みのくびれを持つ ATLL に特徴的ないわゆる” flower cell” 様の細胞であった。

2、白血病発症に伴う免疫低下

HTLV-1 tax トランスジェニックマウスのうち白血病を発症した個体では肺に泡沫状の物質を入れる像が H&E 染色でみられた。本病態はグルコット染色により免疫能の低下により肺に発症した *P. jiroveci* (カリニ) による日和見感染であることが判明した (図 3)。マウスにおける本病態はヒトでの ATLL 発症時の免疫不全状態を反映している。このように tax トランスジェニックマウスに発症する白血病リンパ腫は臨床症状、及び病理学的に非常にヒトの ATLL に類似する疾患であった。白血病発症に伴う免疫低下のメカニズムを理解する為に tax の遺伝子導入で発症する白血病の細胞学的特長を各種細胞表面マーカーを使ってフローサイトメトリーで解析を行った。その

結果トランスジェニックマウスに発症した白血病リンパ腫細胞は細胞質内 CD3 陽性(図 2)、CD4, CD8 共に陰性の Pre-T 細胞由来の腫瘍であった。その他、ATLL で強発現している IL-2 receptor α 鎖 (CD25) や活性化マーカーの CD69 も陽性である。

D. 考察

臓器移植及び悪性腫瘍に伴う免疫低下状態になる患者の数は移植医療および悪性腫瘍に対する医療の発達と共に今後ますます増える事が予想される。それらの状態では健常状態では問題にならない病原微生物による感染症が時として致死的な感染症をもたらす事になる。白血病に伴う免疫低下は白血病自身の一つの症状の表れであると同時に治療としての骨髄移植を行う際、放射線照射や免疫抑制剤による治療でも起こり、日和見感染症、潜伏ウイルスの再活性化のコントロールが予後を大きく左右する。今回 HTLV-1 の tax 遺伝子を T 細胞特異的に発現させる事によりヒトでの成人 T 細胞性白血病 (ATL) の病態を反映したモデル動物の作製に成功した。成人 T 細胞性白血病 (ATL) においては多くの場合発症と共に免疫低下をきたし、致死的な日和見感染症を起こすことが知らせている。これら患者の生死を分ける日和見感染症に対し、まずは悪性腫瘍に伴う免疫低下のメカニズムを解明する事が必須である。メカニズムを踏まえその予防法の確立が急務である。本研究においては HTLV-1 tax トランスジェニックマウスでの病態を調べ、悪性腫瘍に伴った免疫低下状態の良いモデル動物であることを明らかにした。

さらに移植治療等の In vivo での実験系のモデルにも利用できる事が期待される。

E. 結論

HTLV-1 がコードする発癌に関与する tax 遺伝子をマウスの T 細胞のみで発現するプロモーター下に挿入し、トランスジェニックマウスを作製する事でヒトの病態を反映した成人 T 細胞性白血病のマウスモデルを作製し、白血病発症に伴った免疫低下状態について解析を行った。本モデルマウスの白血病発症に伴った免疫低下状態はモデル動物として悪性腫瘍発症時のウイルス感染症の予防法開発のためモデル動物となると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. [Hasegawa H](#), Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine* 2006 Apr;12(4):466-472.
2. Saijo M., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N.,

- Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Sata T, Kurata T., Kurane I, Morikawa S. Monkeypox Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of *B5R* membrane protein protects monkeys from monkeypox *J. Virol.* 2006 Jun;80(11):5179-88.
3. Maeda M, Sawa H, Tobiome M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes and Infection.* 2006 Sep;8(11):2647-56.
- 学会発表
1. 長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、片野晴隆、佐多徹太郎、倉田毅、長嶋和郎 成人 T細胞白血病(ATL)モデルマウスの解析 第 95 回日本病理学会学術集会 平成 18 年 4 月 30 日 -5 月 2 日 東京
 2. 川口晶、一戸猛史、澤洋文、岡田義昭、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、William W.Hall、長谷川 秀樹成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATLL)モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
- H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

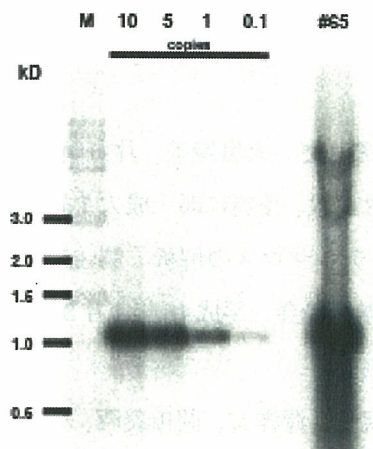


図1 Tax トランスジェニックマウスの挿入遺伝子コピー数は数十コピーである事がサザンブロットティング法により明らかにされた。

3'-flanking sequence
 TTTGGAGCATAGGTATT GCTGCAGGTCGAGGAATTC
 transgene
 AACAGGCATCTACTGAGTGGACCCAACGCATGAGAA

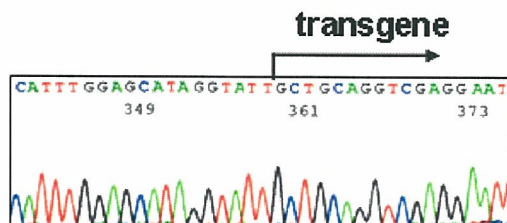


図2 HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスにおける遺伝子挿入部位、第4染色体のA2領域である。