

図3 白血病発症マウスに見られる、免疫低下に伴うカリニ肺炎
(H&E 染色及びグロコット染色)

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: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第1教授)

研究協力者: 伊藤 寿記 (大阪大学大学院医学系研究科・補完代替医学講座)

研究要旨 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)、ヒトヘルペスウイルス 7 (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、i) 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。この結果、ii) 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。iii) 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ことを見出し、 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。

A. 研究目的

ヒトヘルペスウイルスはこれまでに 8 種類が同定され、感染細胞の種類がことなる α 、 β 、 γ の 3 種類に分類されている。 β -ヘルペスウイルスは、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)、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) からなり、マクロファージや T 細胞といった免疫細胞において増殖感染や潜伏感染することを特色とする。

β -ヘルペスウイルスの中でも HCMV の免疫低下状態の患者における再活性化は、重篤な間質性肺炎や網膜炎などを生じ、時には致死性である。また、3 種類の β -ヘルペスウイルスは、ほぼ同時期に再活性化を生じ、共通のメカニズムによって再活性化すると考えられている。

しかし、 β -ヘルペスウイルスのみならずヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化のメカニズムは未だ十分に明らかにされておらず、再

活性化を予防する手段も開発されていない。

本研究では、このような問題点を解決し、 β -ヘルペスウイルス再活性化を予防する方法を開発するために、i) 再活性化の新しい診断法を開発すること、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定を行うこと、及びこれらの成果をもとに、iii) 再活性化を予防する方法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の診断法の開発(唾液中におけるウイルス DNA の定量法の確立)

これらのウイルスの再活性化では、唾液中にウイルスが放出されることを利用し、臓器移植や悪性腫瘍の患者の唾液を用いた再活性化診断法の開発を行った。また、様々な負荷による患者および健常人における再活性化の検討を行い、再活性化を促進する宿主側の要因を解明

した。

方法としては、多数の唾液検体中の再活性化ウイルスの定量を行うために、自動 DNA 精製装置 EZ1(QIAGEN 社製)を用いた、唾液検体からのウイルス DNA 精製条件を調整し、多数の検体からのウイルス DNA 精製を可能とした。

再活性化ウイルスの定量のためには、各種 β -ヘルペスウイルスに対する Real-time PCR 法による測定を行った。このために、Real-time PCR 法のプライマー・プローブの改良を行なった。コントロール実験として、健常人における唾液中への HHV-6 と HHV-7 の放出量の測定を行ない、感度の確認を行なった。

我々は、これまでに疲労が HHV-6 や HHV-7 の再活性化の大きな要因となることを、半定量的な PCR 法によって見出している。Real-time PCR 法による定量的な測定により、疲労がどの程度 β -ヘルペスウイルス再活性化に寄与するかの検討も行った。また、悪性腫瘍患者などの検討を加えることにより、より詳細に患者側の因子の検討もおこなった。

2. ウイルスの潜伏感染・再活性化のモデル動物の作製

人の唾液検体を用いた研究で得られた、再活性化の誘導に関する因子の候補を検証するために、モデル動物での検証が必要となる。

HHV-6, HHV-7, HCMV の再活性化機序の解明と予防策の開発のために、 β -ヘルペスウイルスに適した潜伏感染・再活性化の SCID-hu マウスモデル動物の開発を行なった。このモデルでは、増殖感染によるノイズを排除した解析を行うために、増殖感染細胞であるヒト T 細胞をもたず、潜伏感染細胞であるヒト myeloid 系細胞を増殖・分化できる NOD-SCID-hu マウスを用いた。また、HHV-6 と HHV-7 に関しては、野生株ウイルスの他、通常ヒト T 細胞での増殖能が欠如した knocked out ウイルスを用いた潜伏感染系の作製も行なった。

3. 再活性化予防法の開発

近年、様々な疾患の予防や疾患治療時の QOL の改善のために、補完・代替医療薬が用いられている。本研究では、大阪大学医学系研究科・補完代替医学講座の伊藤寿記教授と共同で、抗癌剤の投与を受けている患者における β

-ヘルペスウイルス再活性化と、補完・代替医療薬の投与との関係について検討した。 β -ヘルペスウイルスの再活性化は、唾液中におけるウイルス DNA の Real-time PCR 法による定量的な測定によって行った。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを取るに当たり、厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書を作成し、これに患者またはこれに代わる親権者の同意を得た。全ての研究の過程は東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。SCID-hu マウス作成に使用する臍帯血は、東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得、提供者のインフォームドコンセントを得た上で採取した。また、遺伝子組換え実験は東京慈恵会医科大学・遺伝子組み換え委員会の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

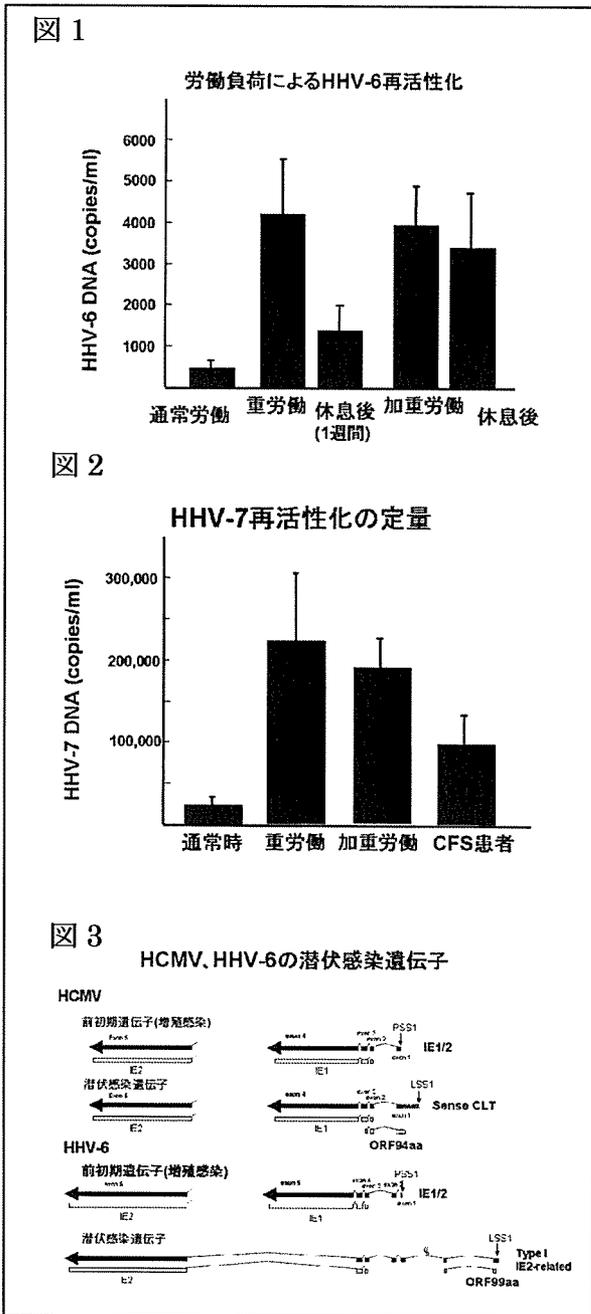
C. 研究結果

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の診断法の開発(唾液中におけるウイルス DNA の定量法の確立)

HCMV, HHV-6, HHV-7 はいずれも β -ヘルペスウイルス亜科に属し、共通の潜伏感染・再活性化メカニズムをもつと考えられている。我々は、再活性化時に唾液中に放出されるウイルスを Real-time PCR 法によって測定し、これらのウイルスの再活性化に必要な現象を検討した。

この結果、1週間程度の労働(残業)によるストレス・疲労の蓄積によって、HHV-6 の再活性化が誘導され、休息によってこの再活性化が解消されることが判った。臓器移植では、通常再活性化までに 2~4 週間を要することより、ストレス・疲労は、より直積的な再活性化因子であると考えられた(図 1)。これに対し、HHV-7 では、疲労の他、慢性疲労症候群(CFS)患者の様な免疫異常を示す患者における再活性化に対する影響も見られた(図 2)。

また、これらのウイルスの再活性化機構の分子生物学的検討から、HHV-6 や HCMV の再活性化には、upper open reading frame



regulation (uORF regulation)が関係していることが示唆された。uORF regulationは、以前から酵母では、アミノ酸飢餓などのストレスに対する応答機構であることが知られていた機能であるが、最近、哺乳類などでもストレス応答との関係が指摘されている遺伝子発現機能である。このことから、β-ヘルペスウイルスの再活性化は、ストレスの蓄積した疲労状態によって、直接的に誘導されることが示唆された(図3)。

図1 労働負荷によるHHV-6の再活性化:

唾液中のHHV-6 DNA量をReal-time PCR法で測定することによって再活性化を定量化し、ストレスの蓄積状態(疲労)との関係を検討した。通常労働は、残業のない勤務を、重労働は、1日平均5時間程度の残業を伴う労働を、過重労働はこれにさらに当直勤務による慢性的睡眠不足が加わる勤務状態を示す。

図2 労働負荷によるHHV-7の再活性化:

唾液中のHHV-7 DNA量をReal-time PCR法で測定することによって再活性化を定量化し、ストレスの蓄積状態(疲労)との関係を検討した。通常労働は、残業のない勤務を、重労働は、1日平均5時間程度の残業を伴う労働を、過重労働はこれにさらに当直勤務による慢性的睡眠不足が加わる勤務状態を示す。HHV-7では、疲労の他、慢性疲労症候群(CFS)患者の様な免疫異常を示す患者における再活性化に対する影響も見られた。

図3 HCMVとHHV-6の潜伏感染遺伝子の構造:

HCMVとHHV-6の潜伏感染時に特異的に発現する遺伝子(潜伏感染遺伝子)の構造を示す。いずれも、前初期遺伝子と類似の構造をしており、前初期遺伝子蛋白(IE1/IE2)をコードしているが、上流のuORFによってIE1/IE2の発現が抑制され、潜伏感染が維持される。また、再活性化はこのuORF制御の解除によって開始される。

2. ウイルスの潜伏感染・再活性化のモデル動物の作製

HCMVやHHV-6は種特異性があり、ヒト細胞のみに感染するため良い小動物モデルがなく、HCMV、HHV-6の潜伏感染と再活性化の機構をin vivoで解明するための障害となっている。

我々はnon obese diabetic/shi-scid (NOD/SCID)-huマウス中に生着しているヒトmyeloid系細胞を標的として、HHV-6感染モデル動物の作製を試み、HHV-6の潜伏感染モデルマウスを作成できた。この感染モデルマウスにおけるHHV-6感染様式について、さらに解析を進め、骨髄中より分化の進んだヒトmyeloid系細胞が存在するマウス脾臓において、HHV-6初期遺伝子、後期遺伝子mRNA発現を確認できた。またこのマウス脾臓においてHHV-6 genome DNAの増幅もみられることより、マウス脾臓においてHHV-6は再活性化過程にあると考えられた。

一般にヘルペスウイルスは潜伏状態において感染細胞核内に環状のエピゾームとして存在し、ウイルス粒子中では直鎖状となる。HHV-6の潜伏感染状態を確認するために、HHV-6末端繰り返し配列にプライマーを設定し、real-

time PCR 法にて環状 HHV-6 genome DNA コピー数を測定した。その結果、細胞あたりの HHV-6 DNA コピー数の少ない感染モデルマウスでは骨髄と脾臓細胞中に環状の HHV-6 を検出できた。高コピー数の HHV-6 genome が検出されるマウスでは環状 HHV-6 genome は検出されず、再活性化による粒子形成と DNA の直鎖化が生じていると考えられた。

3. 再活性化予防法の開発

肺癌、膀胱癌、卵巣癌の治療のために抗癌剤の投与を受けている患者における HHV-6 の再活性化と、補完・代替医療薬 Active Hexose Correlated Compound (AHCC) による再活性化予防が可能かどうかを検討した。HHV-6 の再活性化は、唾液中への HHV-6 DNA の放出量を Real-time PCR 法で定量することによって行なった。この結果、AHCC を投与しない場合は、抗癌剤治療の回数が増えるに連れて、HHV-6 の再活性化量の増加が観察された。

これに対し、AHCC の投与を開始すると、再活性化を生じていた HHV-6 の放出量が次第に現象し、約 3 週間後には、抗癌剤の投与にも関わらず、HHV-6 の再活性化が検出されなくなる例も見られた(図 4)。また、この経過中に患者の免疫機能には特記すべき変化はなく、この HHV-6 再活性化が免疫抑制によるものではないことが判った。

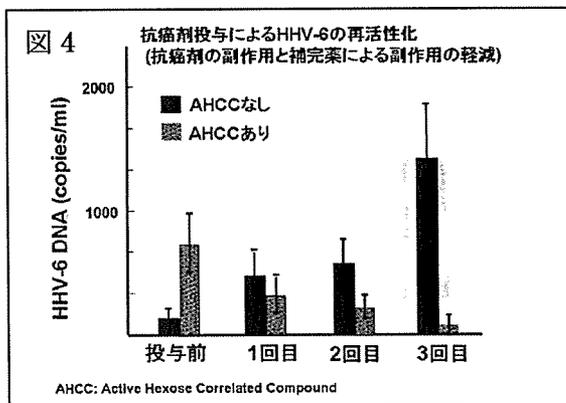


図 4 抗癌剤投与による HHV-6 の再活性化の誘導と補完・代替医療薬の投与による再活性化予防効果：抗癌剤治療は、1クール(1週間)の投与をもって、1回の治療とカウントしている。HHV-6 DNA 量は、7名の患者における平均値と標準偏差を示す。

D. 考察

我々が「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」という研究課題の解決のために設定した研究目標は、i) 再活性化の新しい診断法を開発すること、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定を行うこと、及びこれらの成果をもとに、iii) 再活性化を予防する方法を開発すること、であった。本年度の研究においては、このいずれにおいてもある程度の進展が見られた。

i) 再活性化の新しい診断法を開発においては、HHV-6 および HHV-7 の再活性化を、患者に対する侵襲性がない唾液サンプルを用いて、Real-time PCR 法で定量的に測定することに成功した。また、この侵襲性がないという長所を生かして、多くの健常成人ボランティアの唾液サンプルにおいて HHV-6 と HHV-7 の再活性化とサンプル提供者の生活状態を検討することができた。

この結果として、HHV-6 や HHV-7 の再活性化には、免疫抑制よりも連続的なストレスの蓄積、即ち「疲労」がより大きな再活性化誘導因子となっていることが判明した(図 1, 2)。これは、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定という目標にとっても大きなヒントとなる発見であった。また、HHV-6 や HCMV の再活性化には、upper open reading frame regulation (uORF regulation) が関係していることが示唆された。uORF regulation は、以前から酵母では、アミノ酸飢餓などのストレスに対する応答機構であることが知られていた機能であるが、最近、哺乳類などでもストレス応答との関係が指摘されている遺伝子発現機能である(図 3)。この結果より、β-ヘルペスウイルスの再活性化には、疲労の様なストレスの蓄積と、これに応答するウイルス遺伝子の制御機構 uORF regulation が関与していることが示唆された。

また、HHV-6 の再活性化は、癌患者に対する抗癌剤の投与によっても誘導されることが判明した(図 4)。また、この経過中に患者の免疫機能に変化がなかったことや、再活性化が抗癌剤の投与によって素早く誘導されていることより、HHV-6 の再活性化が、抗癌剤による何らかの生体への刺激によって誘導されることが示唆された。

抗癌剤の多くでは、酸化ストレスなどを生体

に与えるという副作用が知られており、上記の再活性化機構に関する研究と考え合わせると、抗癌剤によるストレスそのものが、 β -ヘルペスウイルスの再活性化因子となっている可能性が示唆された。

最近、抗癌剤の副作用による QOL の低下を予防する目的で、漢方薬成分などの補完・代替医療薬の投与が検討されている。そこで、補完・代替医療薬の1つである AHCC の投与と抗癌剤による HHV-6 の再活性化との関係を検討した所、AHCC が HHV-6 の再活性化を顕著に減少させることが判明した(図 4)。この発見は、iii) 再活性化を予防する方法を開発するという、本研究の最も重要な目的に回答を与えるものである。今後は、この成果を検証し、AHCC による β -ヘルペスウイルス再活性化予防効果を確認するとともに、さらに有用な再活性化予防物質の同定を行なおうと考えている。

E. 結論

今回の研究により、 β -ヘルペスウイルスの再活性化の測定に唾液中のウイルス DNA の定量が有用であることが判った。また、この方法を利用することと β -ヘルペスウイルス潜伏感染遺伝子の検討から、ウイルスの再活性化が、労働や抗癌剤の投与などによるストレスとその蓄積によって強く誘導されることが判明した。さらに、補完・代替医療薬の1つである AHCC が、HHV-6 の再活性化を抑制することが判り、 β -ヘルペスウイルス再活性化予防に利用できることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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(2006 年 7 月大阪)
2. 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(2006 年 11 月名古屋)
3. 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(2006 年 11 月名古屋)
4. 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(2006 年 11 月名古屋)
5. 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(2006 年 11 月名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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
(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予防と治療に関する研究)

分担研究者 水口 裕之
独立行政法人 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

研究要旨

臓器移植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ヘルペスウイルス(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、ヒトヘルペスウイルス 7; HHV-7、EB ウイルス; EBV、単純ヘルペスウイルス; HSV、水痘・帯状疱疹ウイルス; VZV)が再活性化し、様々な疾患を引き起こし、致命的な感染症となることが多い。即ち、移植や抗腫瘍療法によって原疾患は改善しても、患者はこれらのウイルスによる難治性の感染症によって致命的となる。従って、免疫不全状態におけるヘルペスウイルスの再活性化の早期診断法、予防法の早急な確立、さらに難治性感染症の対処が必要である。また、診断法、予防法の確立のために免疫不全状態でのヘルペスウイルスの再活性化およびその病態発生機序の解明が要求される。

本研究は、臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生する重篤なウイルス感染症、特にヘルペスウイルス感染症（水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、HHV-3）、ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6)等が原因)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探る。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。本研究では水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV または HHV-3)と HHV-6(A、B)をターゲットとして研究を行う。本年度においてはまず VZV に焦点を絞り、検討を行った。

本研究の研究成果は、我が国における臓器移植や悪性腫瘍に伴って発生する致命的なウイルス感染症の予防法や治療法の開発に繋がり、さらにウイルス感染症の遷延化、重篤化の抑制また発症の予防に繋がる。従って、本研究成果は国民の保健、医療の向上、および社会の安定維持に大きく貢献する。

研究協力者

森 康子 (独) 医薬基盤研究所

チーフプロジェクトリーダー

櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所

研究員

中島加珠子 (独) 医薬基盤研究所

リサーチレジデント

A. 研究目的

RNA 干渉(RNA interference; RNAi)と Ad ベクターを利用してヘルペスウイルスに対する新しい治療法の開発を行うことを目的とする。これらは、感染症の早期診断、予防、治療に広く応用可能な技術の開発に繋がることを期待される。

B. 研究方法

B.1 ヘルペスウイルスの標的細胞における高効率な Ad ベクターの遺伝子導入条件の検討

(1) Ad ベクター

プロモータは CA プロモータ (β -actin promoter/cytomegalovirus (CMV) enhancer with a β -actin intron) と CMV プロモータの二種類の検討を行った。また、従来の 5 型 Ad ベクター(Ad5)の他、35 型 Ad ベクター(Ad35)、Ad ゲノムのファイバータンパク質の C 末端をコードした領域にポリリジン(KKKKKKK)配列を挿入したベクター(AdK7)、Ad ゲノムのファイバータンパク質の HI Loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクター(AdRGD)、そしてファイバータンパク質を 35 型に置換したベクター(AdF35)を用いて、検討を行った[Table.1]。

(2) 細胞培養

VZV のターゲット細胞である MeWo 細胞(ヒト繊維芽細胞様悪性黒色腫細胞)と MRC5 細胞(ヒト肺繊維芽細胞)、そして HHV-6 のターゲット細胞である MT4 細胞(ヒト T 細胞)、Molt3 細胞(ヒト T 細胞)、HSB2 細胞(ヒト T 細胞)そして Jurkat 細胞(ヒト T 細胞)を用いた。

MeWo 細胞は 10% Fetal calf serum (FCS)、 $20 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ゲンタマイシンを含む DMEM 培地(SIGMA)で、MRC5 は 10% FCS、 $20 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ゲンタマイシンを含む EMEM 培地

(SIGMA)で、そして MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞、Jurkat 細胞は 10% FCS と $20 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培地(SIGMA)にて培養を行った。各細胞は 80-90% コンフルエントになったところで継代を行った。

(3) フローサイトメトリー

(3)-1 coxsackie and adenovirus receptor (CAR) の発現

血球系細胞においては Ad ベクターの遺伝子導入効率が低い事が知られている。これは Ad ベクターのレセプターである CAR の発現が低い事による。本研究に用いる細胞の中で、Jurkat 細胞においては CAR が発現している事を既に確認している。しかしながら、MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞では未確認であった。そこで、MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞において Ad5 のレセプターである CAR の発現を確認した。細胞を PBS(-)で wash した後、anti-human CAR monoclonal antibody(mAb) [clone、Rmcb 05-644]を 1:100 量で添加して on ice で 30 分間反応させた。その後、PBS(-)で wash を行い、余分な抗体を除去した。二次抗体として FITC ラベルの goat-anti mouse IgG polyclonal Ab (BD Pharmingen, 555988)を 1:100 で添加して on ice で 30 分間反応させた。その後、PBS(-)で wash を行い、余分な抗体を除去し、FACS Calibur (BD Bioscience)にて解析し、FL1 で FITC の蛍光を検出した。なお、Ad35 のレセプターである CD46 はヒト細胞においてはユビキタスに発現している事が知られているため、検討は行わなかった。

(3)-2 HHV-6 標的細胞への高効率遺伝子導入

HHV-6 の標的細胞である血球系細胞株の MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞、Jurkat 細胞を

回収してカウントし、 1×10^7 cells/mL の密度に調整し、無血清培地に懸濁した。この細胞液に GFP 遺伝子搭載の各種 Ad ベクターが 3000 virus particles(vp)/cell(細胞辺りのウイルス粒子数)の濃度となるように感染させた。20-30 分ごとに混ぜながら、1.5 時間感染させた後、回収して PBS(-)で wash を行って余分な Ad ベクターを除去した。Wash の後、培養培地を 4×10^5 cells/mL となるように添加した。そのまま 37°C で培養を行い、48 時間後に回収して PBS(-)で wash を行い、FACS Calibur にて解析し、FL1 で GFP 遺伝子の発現を検出した。

(3)-3 VZV 標的細胞への高効率遺伝子導入

VZV 標的細胞である繊維芽細胞の MeWo 細胞、MRC5 細胞を 6well プレートに 2×10^6 cells/well となるように播種し、翌日培地を取り除いて PBS(-)で wash した。その後 GFP 遺伝子搭載の各種 Ad ベクターを 3000vp/cell の濃度となるように少量の無血清培地に懸濁して感染させた。時々攪拌しながら 1.5 時間感染させ、その後 PBS(-)で wash を行い、余分な Ad ベクターを除去して、培養培地を添加した。24 時間後に回収して、FACS Calibur にて解析し、FL1 で GFP の発現を検出した。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

GFP 遺伝子搭載のヘルペスウイルスを Ad ベクターとの二重感染に用いる際の検討として、ルシフェラーゼ遺伝子搭載 Ad ベクターを用いて、一部の細胞(Molt3 細胞、HSB2 細胞、MRC 細胞)において GFP 遺伝子搭載 Ad ベクターと同様に導入効率の解析を行った。

(4)-1 HHV-6 標的細胞への遺伝子導入

HHV-6 の標的細胞である血球系細胞株の

Molt3 細胞、HSB2 細胞を回収してカウントし、 1×10^7 cells/mL の密度に調整し、無血清培地に懸濁した。この細胞液にルシフェラーゼ遺伝子搭載 Ad ベクターが 3000vp/cell の濃度となるように感染させた。20-30 分ごとに混ぜながら、1.5 時間感染させた後、回収して PBS(-)で wash を行って余分な Ad ベクターを除去した。Wash の後、培養培地を 4×10^5 cells/mL となるように添加した。そのまま 37°C で培養を行い、24、48 時間後に回収して PBS(-)で wash を行い、細胞溶解剤 LC β (TOYO B-Net Co.Ltd.) にて懸濁し、遠心した上清とピッカジーン発光試薬 5500 (TOYO B-Net Co.Ltd.) を 1:10 の割合で混合した。ルミノメーター(Lumat LB9507, Berthold)で発光量を測定し、ルシフェラーゼの発現量を定量した。

(4)-2 VZV 標的細胞への遺伝子導入

VZV 標的細胞である繊維芽細胞の MRC5 細胞を 6well プレートに 2×10^6 cells/well となるように播種し、翌日培地を取り除いて PBS(-)で wash した。その後ルシフェラーゼ遺伝子搭載 Ad ベクターを 3000vp/cell の濃度となるよう少量の無血清培地に懸濁して感染させた。時々攪拌しながら 1.5 時間感染させ、その後 PBS(-)で wash を行い、培養培地を添加した。24 時間後に回収して、細胞溶解剤 LC β (TOYO B-Net Co.Ltd.) にて懸濁し、遠心した上清とピッカジーン発光試薬 5500 (TOYO B-Net Co.Ltd.) を 1:10 の割合で混合した。ルミノメーターで発光量を測定し、ルシフェラーゼの発現量を定量した。

B.2 ヘルペスウイルス感染を阻害しない細胞毒性の低い Ad ベクターの感染条件の検討

(1) ヘルペスウイルスへの感染阻害の検討

Ad ベクターを感染させた細胞にヘルペスウイルス(VZV、HHV-6)を感染させ、まず細胞変性効果 (cytopathic effect、CPE) を指標として Ad ベクター未処理の細胞に比べて感染阻害の有無を検討した。

(2) 二重感染による細胞毒性の検討

本研究で用いている Ad ベクターは Ad の全ゲノムを保有しているため、未知の障害が予想される。そのため、Ad ベクターを感染させた細胞にヘルペスウイルスを感染させた後、Ad ベクター未処理の細胞と共に継時的に観察を行い、細胞の増殖速度や形態変化のような影響を与えていないかどうかを検討した。

B.3 small interfering RNA (siRNA) 発現ベクターの構築

Poly(III)系プロモータでドライブのかかる short hairpin RNA(shRNA)搭載プラスミドと Poly(II)プロモータでドライブのかかる micro RNA(miRNA)を搭載できるプラスミドの遺伝子発現抑制効率を比較するためそれぞれの siRNA を載せるためのプラスミドの構築を計画した。

B.3.1 miRNA 搭載プラスミド

(1) miRNA 発現カセット搭載プラスミドの構築

miRNA のベクターシステムは David Turner の研究室において構築されたものをベースとしており (U.S.Patent Publication No.2004/0053876)、5' と 3' の flanking region は Lagos-Quintana らによって見いだされたマウス由来(miR-155)の構造である。インビトロジェン社はこれらを modify し、CMV プロモータや Gateway system を含み、ほ乳類全般を対照としたシステムを構築した[Lagos-Quintana

M.,et al. Curr Biol.2002. 12(9):735-739]。本研究に使用したプラスミドはこの Invitrogen 社の miRNA の発現カセットを、Ad ベクターのシャトルプラスミドに組み込む事で構築した。インビトロジェン社から発売されている miRNA 発現ベクターのカセットを元にインサートを設計した。設計した合成オリゴをアニーリングし、本研究室で用いている Ad ベクターのシャトルベクターのマルチクローニングサイトにこの合成オリゴ DNA を導入した。出来上がったプラスミドは制限酵素 BspMI サイトを利用して標的遺伝子に対応する miRNA 配列(合成オリゴ DNA)を挿入できるように設計した[Fig.1]。

(2) miRNA 発現プラスミドの作製

インビトロジェン社の miRNA 設計アルゴリズムに基づいて設計した miRNA 配列の中からスコアリングを元に一つの遺伝子に対して 3 つずつ配列を選定してプラスミドの構築を行った。なお、本年度はヘルペスウイルスの中でも VZV に着目した。VZV の RNAi 標的遺伝子として tegment タンパク質をコードする Open Reading Frame (ORF)62 と糖タンパク gE をコードする ORF68 を選定し、miRNA 搭載プラスミドの構築を計画した。

B.3.2 shRNA 搭載プラスミド

(1) shRNA 発現カセット搭載プラスミドの構築

株式会社 iGENE の構築した効率性の高い siRNA 発現ベクタープラスミドの発現カセット配列を元に構築した。この siRNA 発現カセットを当研究室で用いている Ad ベクターのシャトルプラスミドに搭載させ、Ad ベクターへと容易に置換できるプラスミドの構築を行った [Mizuguchi H, et al. Hum.Gene.Ther.,18,

74-80(2007)]。

(2) shRNA 発現プラスミドの作製

インビトロジェン社およびアルファジェン社の shRNA 設計アルゴリズムに基づいて設計した。shRNA 配列の中から、スコアリングを元に一つの遺伝子に対して 3 つずつ配列を選定してプラスミドの構築を行った。VZV の ORF62 と ORF68 に対する shRNA 搭載プラスミドを構築した。

(倫理面への配慮) 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本研究機関が制定する動物実験指針を遵守する。個々の動物実験については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

C. 1. Ad ベクター認識レセプターの確認

MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞において CAR の発現を検討した。いずれの細胞においても CAR が発現している事が確認された[Fig.2]。

C. 2 HHV-6 の標的細胞である血球系細胞 (MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞、Jurkat 細胞) における最適な Ad ベクターの導入条件の決定

MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞、Jurkat 細胞において Ad ベクター3000vp/cell の条件で 1.5hr の感染を行い、48hr 培養を行うと、FACS 解析においていずれの Ad ベクターでも 90%前後の遺伝子導入効率を確認された[Table. 2]。特に AdK7 と Ad35、そして AdF35 に強い遺伝子発現が確認された(95%以上)[Fig.3]。しかしながら AdK7 はヘパラン硫酸、Ad35、AdF35 は CD46

を認識しており、ヘルペスウイルスの用いるレセプターと同一のものを用いている可能性があり、二重感染においてヘルペスウイルスの感染阻害を起こす可能性が考えられた。そこで本研究では Ad5 を用いる事とした。なお、Ad5 でも高い遺伝子導入効率(90%以上)が確認されている。血球系細胞株の中では MT4 細胞と Jurkat 細胞への遺伝子導入が容易であり、細胞障害性も顕著ではなかった。HSB2 細胞と Molt3 細胞は MT4 細胞や Jurkat 細胞と比べると遺伝子導入効率が若干低く、また、細胞毒性も出やすいという現象が観察された。ルシフェラーゼ遺伝子搭載 Ad ベクターにおいても同様の結果が得られている[Fig.4]。

C. 3 VZV の標的細胞である繊維芽細胞 (MeWo 細胞、MRC5 細胞) における最適な Ad ベクターの導入条件の決定

MeWo 細胞、MRC5 細胞においては、3000vp/cell の感染条件まで Ad ベクター感染による細胞障害性は観察されず、高い遺伝子導入効率を確認された [Fig.3]。それ以上のタイターだと、細胞障害性が観察された。ルシフェラーゼ遺伝子搭載 Ad ベクターを用いた検討においても、血球系細胞における検討と同様に AdK7 による高い遺伝子導入効率を確認された[Fig.5]。また、300vp/cell、1.5hr の感染、24hr の培養の条件まで低いタイターに下げても、90%以上の遺伝子導入効率を確認することができた [Fig.6]。MRC5 細胞と MeWo 細胞は接着細胞であるため、血球系細胞より容易に低タイターで高効率の遺伝子導入を行う事ができるのだろう。なお、血球系細胞と同様の理由から、以降の検討で使用する Ad ベクターは Ad5 とした。

C.4 Ad ベクターとの二重感染におけるヘルペスウイルス感染効率への影響の検討

Ad ベクター感染がヘルペスウイルス感染に与える影響を評価するため、Ad ベクター感染後のヘルペスウイルス感染効率について検討した。Ad ベクター3000vp/cell の条件では VZV、HHV-6 のいずれの感染にも阻害がかかる上、細胞毒性が観察されたため、Ad ベクターのタイターを出来る限り低く抑える事が必要となった。血球系細胞においては、Ad ベクターを 1000vp/cell の条件まで抑えると、HHV-6 によって感染の指標である CPE が確認された。しかしながら、Ad ベクター未処理の細胞に比べて明らかに HHV-6 感染に抑制がかかっていることが観察されたため、現在 1000vp/cell より低いタイターでの検討を行っている[Fig.7]。一方、MeWo 細胞においては、Ad ベクター1000vp/cell の条件下でようやく VZV による CPE が起こり始め、300vp/cell の条件では Ad ベクター未処理の細胞に近い結果が得られた。以上のことより 300vp/cell 以下の条件検討を行う。MeWo 細胞では今回の検討において Ad ベクター30vp/cell まで低いタイターに下げても 60-70%の遺伝子導入が可能である事が明らかとなった [Fig.6]。今後 Ad ベクターをより低タイターで作用させた場合の遺伝子発現効率と、ヘルペスウイルス(VZV、HHV-6)の感染効率への影響を検討することで、最適な遺伝子導入条件の決定を行う。

本検討で検討した Ad ベクターは CMV プロモータを持つベクターであるが、CA promoter を持つ Ad ベクターとの遺伝子導入効率の比較も行った。その結果、CA プロモータを持つ Ad ベクターの遺伝子導入効率が CMV プロモータを持つ Ad ベクターに比べて若干高くなることを確認した。

C.5 siRNA 搭載プラスミドの構築

C.5.1 poly(II) プロモータでドライブのかかる miRNA 発現カセットプラスミドの構築

まず VZV の ORF62 および ORF68 をターゲットとした shRNA 搭載プラスミドを構築した。まず ORF62、ORF68 それぞれの遺伝子に対して RNAi の標的配列を 3 カ所ずつ選んで shRNA 搭載プラスミドを作製した。現在、これらの中で最も遺伝子の発現抑制効率の高い配列の選定を計画している。

C.5.2 Poly(III)系でドライブのかかる shRNA 搭載プラスミドの作製

次に miRNA 搭載用プラスミドの構築を実施した。Ad ベクター用シャトルプラスミドを元に、miRNA 発現カセットを合成して導入した。このようにして構築した miRNA 搭載用プラスミドプラスミドを用いて、RNAi の標的配列の導入を試みたところ、合成オリゴを導入した miRNA 発現プラスミドの作製が可能なることを確認した。

D. 考察

Ad ベクター単独、またはヘルペスウイルス単独では影響のない条件でも、Ad ベクターと VZV、HHV6 の二重感染によって毒性が確認された。これはターゲット細胞が二重感染によって未知の影響も受けているためであると思われる。本研究で使用した Ad ベクターは Ad 遺伝子全長の入ったベクターであるため、ウイルス遺伝子による毒性が現れている可能性もある。また、二重感染による相乗効果である可能性もある。このような影響を防ぐため、将来的にはウイルス遺伝子を可能な限り削った第三世代の Ad ベクター(gutted Ad ベクター)の利用も試みる必要があると考え

られる。

次年度は更に VZV 増殖に関する遺伝子 (ORF62、 ORF68) の発現を抑制する最適な siRNA 発現プラスミドの作製を行い、遺伝子の発現抑制効率の評価を行う。まず luciferase と RNAi の標的遺伝子 (ORF62、ORF68) を含むプラスミドを作製し、inner control として LacZ を組み込んだプラスミドと siRNA 搭載プラスミドとを co-transfection する。標的遺伝子の mRNA が RNAi 効果により分解されると、続いて Luciferase 遺伝子の発現も低下する事を利用することで最適な RNAi 配列の候補を選定する。

最適 siRNA 配列が選択できれば、その配列に基づいた siRNA 発現 Ad ベクターの作製に移行する。それと共に、Ad ベクターによる遺伝子発現抑制効率の評価のために、Taqman probe を用いたウイルス粒子の定量系の構築が必要となる。Ad ベクターを作用させた結果、VZV 感染へ与える影響をより感度良く定量するために、サンプルから抽出した DNA 中の VZV の粒子数を Real time PCR 法で測定する。ウイルス取り込み粒子数の定量の標的遺伝子は VZV ORF62 (先行論文より、この遺伝子を target とするものが多く報告されているため) とする予定である。平行して、ORF62、68 以外の VZV の増殖に関わる ORF 領域の他、HHV-6 に関しても平成 18 年度同様の検討の実施し、効果的な感染抑制系を探索する。効果的にヘルペスウイルスの増殖を抑え、細胞障害性のない系が確立できれば、これからの新しい治療へ向けて大きな一歩となると考えられよう。

E. 結論

・VZV の標的細胞 (MeWo 細胞、MRC5 細胞)、

HHV-6 の標的細胞 (MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞、Jurkat 細胞) に対する最適な遺伝子導入効率を示す Ad ベクターを確立した。現在、VZV、HHV-6 の感染への影響を検討中である。

・遺伝子発現抑制系としての miRNA 発現プラスミドベクターの構築を行った。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当事項なし。

2. 学会発表

該当事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

Table.1 Adenovirus vectors used in the present study

Name	Fiber type	Promoter
Ad5-CMV-GFP	Type 5 fiber	CMV promoter
Ad35-CMV-GFP	Type 35 fiber	CMV promoter
AdK7-CMV-GFP	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CMV promoter
AdRGD-CMV-GFP	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CMV promoter
AdF35-CMV-GFP	Type 35 fiber	CMV promoter
Ad5-CA-GFP	Type 5 fiber	CA promoter
AdF35-CA-GFP	Type 35 fiber	CA promoter
Ad5-CMV-Luc	Type 5 fiber	CMV promoter
AdK7-CMV-Luc	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CMV promoter
AdRGD-CMV-Luc	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CMV promoter
AdF35-CMV-Luc	Type 35 fiber	CMV promoter

CA promoter: β -actin promoter/CMV enhancer with β -actin intron

Table.2 Efficiency of GFP expression in cell line

Cell name	MT4	Molt3	HSB2	Jurkat	MRC5	MeWo
Ad5(CA)	92.90%	81.22%	37.32%	96.34%	77.39%	N.D.
Ad5(CMV)	87.17%*	92.46%**	84.99%**	94.89%	97.78%	99.67%
Ad35(CMV)	N.D.	N.D.	N.D.	98.95%	99.99%*	99.25%
AdRGD(CMV)	47.66%	3.74%	7.82%	86.82%	98.59%	98.40%
AdK7(CMV)	99.93%*	89.03%*	81.47%*	96.90 %	99.97%	82.88%
AdF35(CA)	99.98%	98.68%*	78.88%*	99.60%	99.87%	N.D.
AdF35(CMV)	100.00%	83.06%	72.47%	99.05%	98.29%	99.48%

*48hr incubation, **72hr incubation, N.D.; non data

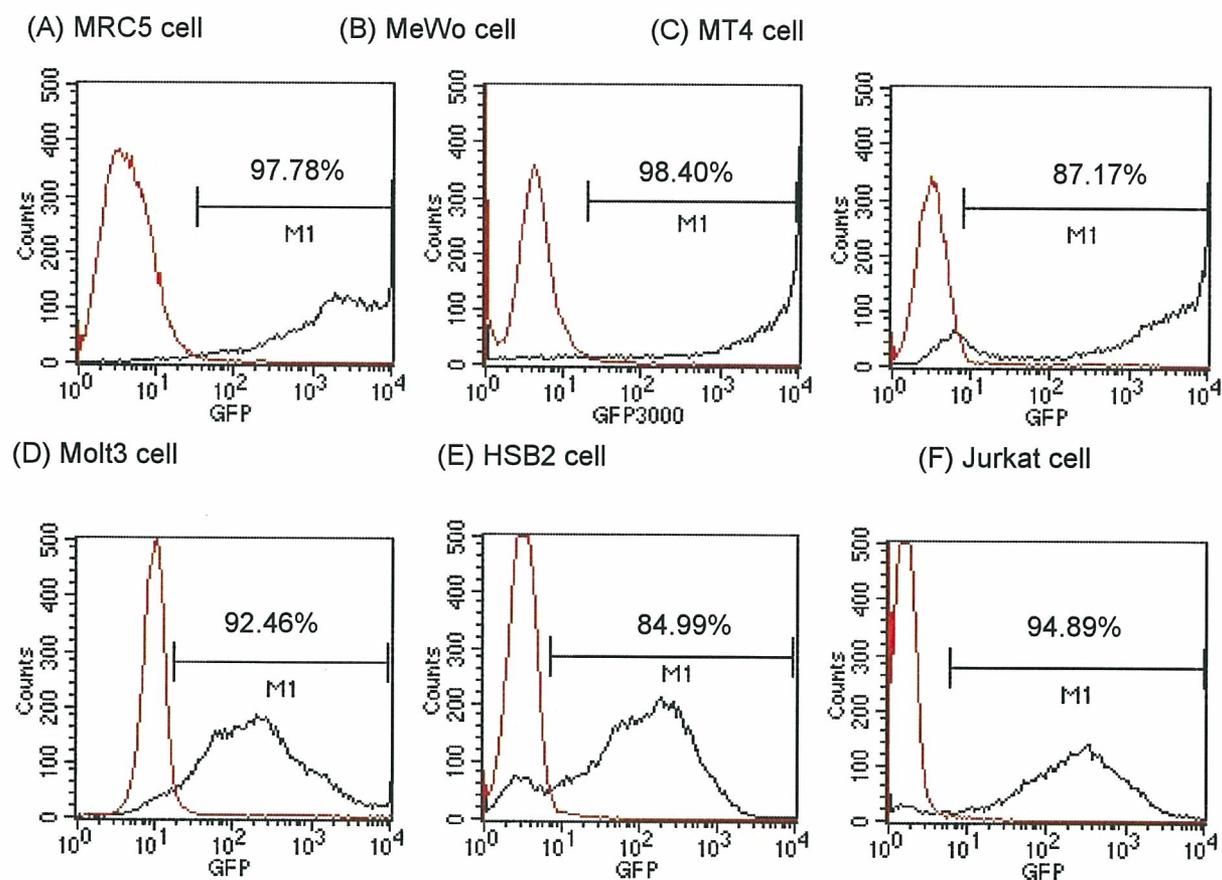
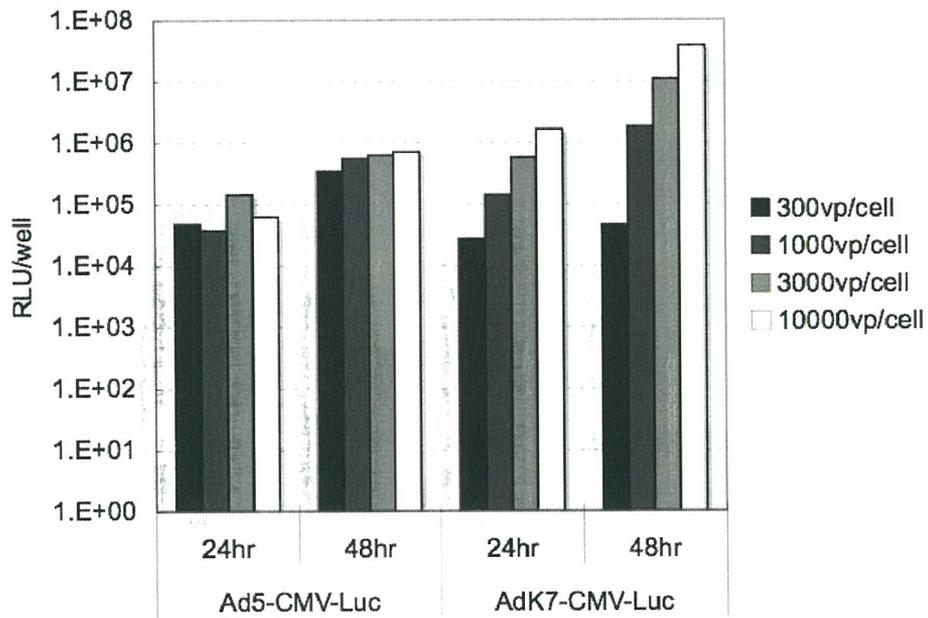


Fig. 3 Gene expression analysis in target cells infected Ad5-CMV-GFP vector.

Human cells (MRC5, MeWo, MT4, Molt3, HSB2, and Jurkat cells) were infected with Ad5-CMV-GFP vectors at 3000vp/cell. After incubation (A,B: 24hr, C,F: 48hr, D,E: 72hr), the expression of GFP was assessed by flow cytometry analysis. The percent values in the lower panel express the percentage of M1-gated cells.

(A) Molt3 cells



(B) HSB2 cells

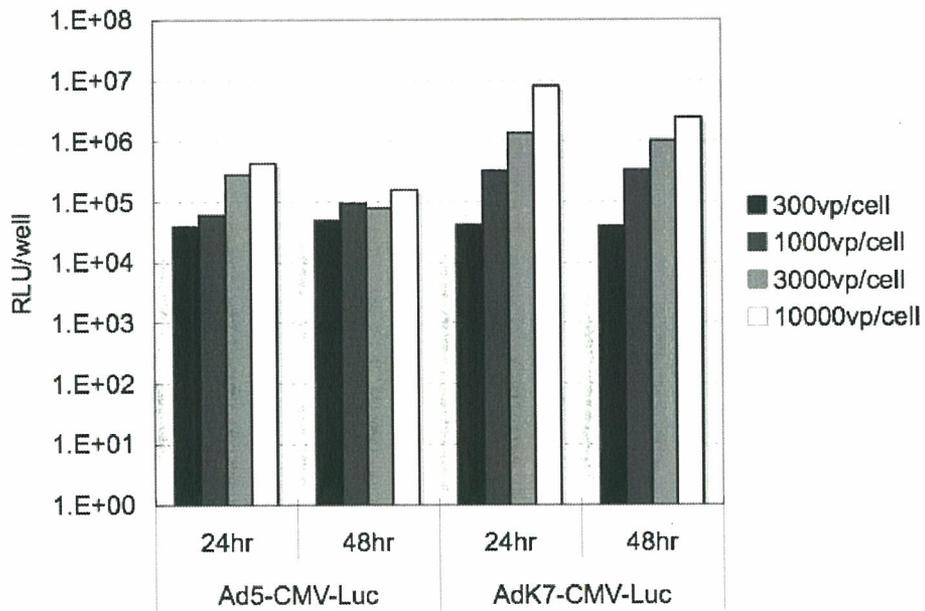


Fig.4 Luciferase assay in Molt3 and HSB2 cells infected Ad vector. (A) Molt3, and (B) HSB2 cells were transduced with Ad5-CMV-Luc or AdK7-CMV-Luc at 300, 1000, 3000 and 10000vp/cell. After 24 or 48 hr incubation, luciferase activity was measured.

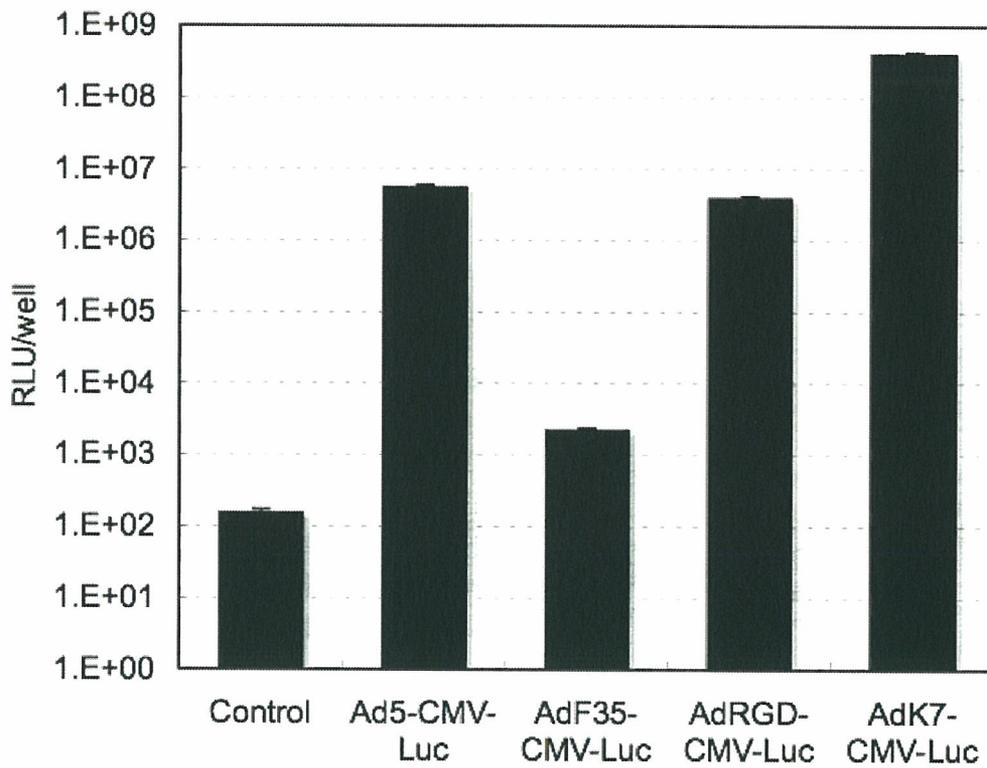


Fig.5 Transduction efficiency of Ad vector in MRC5 cells. MRC5 cells were transduced with Ad5-CMV-Luc, AdF35-CMV-Luc, AdRGD-CMV-Luc, or AdK7-CMV-Luc at 3000vp/cell. After 24 hr-cultivation, luciferase activities was measured. Data represent the mean ± SD of results from duplicate culture.

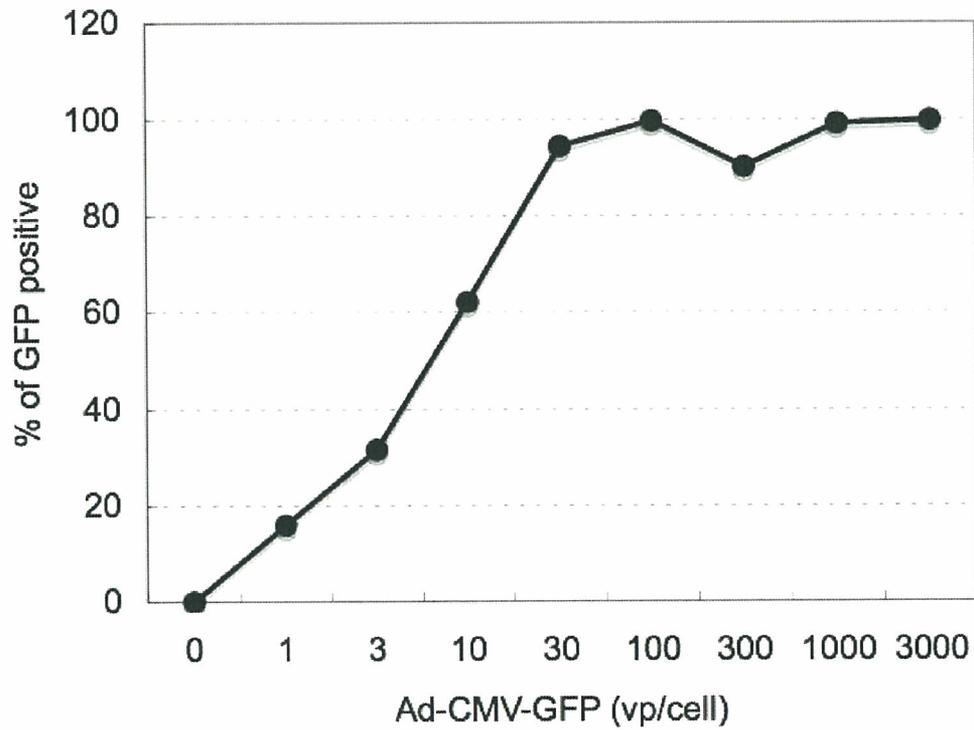


Fig. 6 Ad5 vector-mediated GFP expression in MeWo cells.

MeWo cells were transduced with Ad5-CMV-GFP at the indicated concentration (vp/cell) for 1.5hr. After a total of 24 hr incubation, GFP expression in the cells was evaluated by flowcytometric analysis.

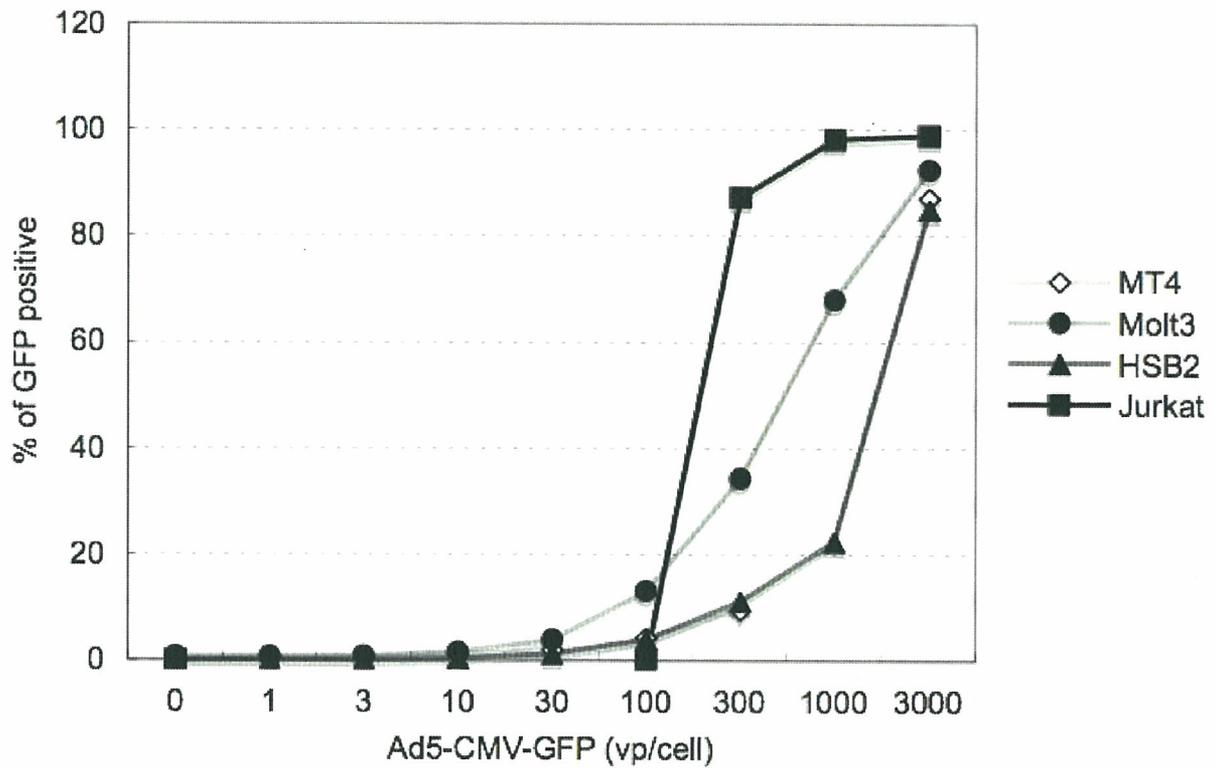


Fig. 7 Ad vector-mediated GFP expression in MT4, Molt3, HSB2, and Jurkat cells.

MT4, Molt3, HSB2 and Jurkat cells were transduced with Ad5-CMV-GFP at the indicated concentration (vp/cell) for 1.5hr. After a total of 48hr incubation, GFP expression in the cells was evaluated by flowcytometric analysis.