

200726026A

厚生労働科学研究費補助金

平成19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）

総括研究報告書

平成20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	1
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）	

## 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	10
分担研究者：井上直樹（国立感染症研究所・ウイルス第1部）	
造血幹細胞移植後の CMV、EBV、HHV-6 再活性化メカニズム解析	18
分担研究者：吉川哲史（藤田保健衛生大学・医学部）	
HSV-1 感染におけるマクロファージ型 C 型レクチン（MGL）の関与	21
分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）	
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」	28
分担研究者：近藤一博（東京慈恵会医科大学・ウイルス学講座）	
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	36
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）	
EB ウイルス感染症の発生機序と治療法に関する研究	49
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）	
免疫抑制剤による CMV 感染症の回避に関する研究	54
分担研究者：白木公康（富山大学・医学薬学研究部ウイルス学）	
免疫不全マウスでの人工リンパ組織による効果的な T 細胞免疫の誘導に関する研究	59
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）	
水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫評価による予防接種時期の検討に関する研究	61
分担研究者：羽田敦子（財）田附興風会医学研究所・北野病院第1研究部）	
健常人および有病者における水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）特異的細胞性免疫能の測定	63
HHV-6 の感染機構の解析	67
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）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	70

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、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探索、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 特異的細胞性免疫能の評価法の確立、HHV-6 感染機構の解析、造血幹細胞移植、肝移植患者におけるHHV-6再活性化とサイトカインの関連性の解析、新規抗ウイルス剤候補の検索とその解析、NOGマウスへのEBVの感染系の確立、薬剤耐性ウイルス出現に関する解析および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作製と応用に関する解析を行った。本年度は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 准教授)  
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所・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)  
羽田敦子 ((財) 田附興風会医学研究所北野病院 第1研究部 主任研究員)

## 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。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。

## B. 研究方法

本研究は、主任研究者森、分担研究者 9 名 (井上、吉川、長谷川、近藤、水口、藤原、白木、末松、羽田) の計 10 名が遂行した。当該年度においては、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の同定およびその効果判定、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 特異的細胞性免疫能の評価法の確立

VZV 特異的な細胞性免疫応答の評価法を確立するために、同一健常人において水痘抗原による皮内テストおよび末梢血単核球の VZV 刺激による IFN- $\gamma$  ELISPOT 法を施行し、両者の相関性を検討した。その結果、皮内テストと IFN- $\gamma$  ELISPOT 法の結果には相関が見られ、どちらの結果も VZV 特異的細胞性免疫能が年齢に伴って低下する傾向が示された。また、有病者においては、健常人と比較して VZV 特異的細胞性免疫能が低下しており、この事が帯状疱疹を好発

する原因である可能性が示唆された。

## 2. HHV-6 感染症病態機構解明

単球由来樹状細胞 (MoDC) 内でのHHV-6の感染状態は、DNA合成と核内のカプシド形成は起きているが、細胞質で成熟ウイルス粒子がほとんど観察されないことが、明らかとなった。しかしながら感染MoDCとCD4<sup>+</sup>T細胞とを共培養するとウイルスは高率にT細胞へ感染し感染性ウイルス粒子を産生することから、MoDCはHHV-6のT細胞への伝播を担っていると考えられた。HHV-6の生体内伝播に主要な役割を果たしているのは樹状細胞であることが示唆された。

## 3. 造血幹細胞移植後の CMV、EBV、HHV-6 再活性化メカニズム解析

造血幹細胞移植患者での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。CMVやEBVの再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。三種類のヘルペスウイルス再活性化と、血清中サイトカイン濃度との関連性もウイルス毎で異なっていた。

## 4. HHV-6,7 と HCMV 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

HCMVとHHV-6の再活性化は、細胞のストレス応答機構を利用した、**upstream open reading frame regulation**によって生じること、抗癌剤を投与されている患者では、抗癌剤による酸化ストレスが再活性化の重要な要因となること、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、HCMVとHHV-6の再活性化予防法を具体的に示すことができた。また、HHV-6の再活性化による脳炎・脳症の原因となるウイルス遺伝子を見出し、動物実験によってその病原性を示すことができた。

## 5. 感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索

4000種類のランダム化合物ライブラリーからCMV及びVZVに効果のある化合物を、検索し、昨年度と合わせ目標とした9600化合物の検索を完了した。50%阻害濃度20μM以下で感染初期過程に阻害効果があり、かつ細胞毒性が見られない化合物として、VZV及びCMVに対しそれぞれ7種類を選定した。146F7, 133G4と名づけた2化合物の作用機序の解析を行い、前者がCMVの細胞への侵入後から前初期遺伝子の発現以前の過程を、後者がCMV IE2やVZV IE62による遺伝子活性化を阻害する化合物であることを明らかにした。

## 6. EBウイルス感染症の発症機序と治療法に関する研究

免疫不全状態で発生するEBV関連リンパ増殖性疾患の発症機序解明と治療法開発を目的として、ヒト化マウスを用いたEBV感染モデルの性状解析と応用を行った。このモデルマウスにおいて、EBVが複製されることが示唆され、EBV特異的IgM抗体が産生されることが示された。

## 7. 免疫抑制剤によるCMV感染症の回避に関する研究

腎移植患者において、免疫抑制剤ミゾリビン (MIZ) を使用した場合にはミコフェノール酸 (MMF) 使用例に比べ、有意に

CMV 感染症が少ないことが報告された。MIZ は、培養細胞では CMV の増殖を阻害し、抗CMV薬ガンシクロビル (GCV) と相乗効果を示した。さらに、MIZ 耐性ウイルスが分離され、ガンシクロビル耐性株にも有効であることから、MIZ は GCV と異なる部位で、直接 CMV に作用して、CMV の増殖を阻害していることが明らかになった。

#### 8. RNAiを利用した新規治療法の開発

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、ヘルペスウイルスの replication に関わる遺伝子をターゲットとすることで効果的な増殖抑制を期待する。本年度においてはまず VZV に焦点を絞り検討を行った。

#### 9. HSV-1 感染におけるマクロファージ型 C 型レクチン (MGL) の関与

病原体の感染に伴った免疫応答で中心的な役割を果たす樹状細胞の表面に発現するマクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL)に注目しその抗原提示細胞での働きを解析しヘルペスウイルス感染に与える影響を in vivo で解析を行った。その結果、MGL1/2 が単純ヘルペスウイルスの感染価を増強する事が明らかにされた。

#### 10. 免疫不全マウスでの人工リンパ組織による効果的な T 細胞免疫の誘導に関する研究

人工リンパ組織によって免疫不全マウスに抗原特異的な T 細胞免疫能を導入できる

か否かを、免疫不全マウスに移植した腫瘍に対する腫瘍免疫の実験系により検討し、人工リンパ組織による抗腫瘍効果は免疫不全状態の強いマウスにおいてより顕著であることが分かった。

#### 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) VZV 特異的細胞性免疫能を IFN- $\gamma$  ELISPOT 法と皮内テストにおいて比較検討した。結果、両者は相関性を示した。
- (2) 免疫抑制患者において VZV 特異的細胞性免疫能は健常人に比し、低い傾向を示した。
- (3) 造血幹細胞移植、肝移植患者におけるHHV-6再活性化とサイトカインの関連性を解析した。
- (4) 移植後HHV-6脳炎の発症メカニズムとして、CNSでのHHV-6増殖が重要な役割を演じていることを明らかにした。
- (5) VZVの後期遺伝子に対するshRNA発現Adベクターの構築と有意なVZV増殖抑制効果を示した。
- (6) ヒト化NOGマウスを用いてEBV感染モデルを作成することに成

功した。(7) 上記モデルを用いてEBV感染症発症機序の解明と治療法開発が開始された。(8) EBV蛋白質LMP1により、プロトオンコジーンBcl-3の発現が誘導されることが示された。(9)臓器移植患者に出現するCMV感染症の解析を行った。(10) ランダムな9600化合物を検索し、VZV及びCMVについて各々EC50が20 $\mu$ M以下の化合物数種を同定した。抗CMV化合物2種について、新規作用機序をもつことを明らかにした。(11) マウスの系で人工リンパ組織により効率のよい抗原特異的T細胞免疫能が誘導されること、また、この効果は免疫低下状態の個体において特に顕著であることが分かった。(12) HHV-6やCMVが抗癌剤などによる身体ストレスで再活性化することを見出し、AHCC等の補完医療薬によって再活性化を予防できることを示した。(13) HHV-6再活性化による脳炎・脳症の病原遺伝子を同定した。(14) 基礎疾患別帯状疱疹発症リスクを判定し、基礎疾患別帯状疱疹重症度を評価した。(15) 悪性腫瘍にともなう免疫低下を起こすマウスモデルとし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低下状態を解析した。(16) 抗原提示細胞表面に存在するマクロファージガラクトース型C型レクチン1(MGL1)/CD301aがHSV感染に関与する事を明らかにした。

本年度の成果は今後以下のように活用されることが期待される。

- (1) VZV再活性化の早期診断法の確立による帯状疱疹発症の予防。
- (2) 造血幹細胞移植後HHV-6脳炎の診断、治療ガイドライン作成。
- (3) 新規治療法の開発による保健医療向上

への貢献が期待できる。

- (4) 日和見EBウイルス感染症の予防・治療に関する指針の作成。
- (5) 免疫抑制療法中、特に、骨髄移植患者などの免疫不全患者の耐性CMV、HSV出現時に対する2剤目の薬剤の必要性和対処法。
- (6) 既存薬と異なる作用点をもつ新規抗ウイルス薬の開発により、耐性や副作用のために制約があった治療方法を改善できるようになる可能性がある。
- (7) 患者本人の免疫細胞を取り込んだ人工リンパ組織により臓器移植や悪性腫瘍が原因の一時的な免疫低下状態を賦活化し、ウイルス感染症を予防し治療することが可能になれば、他の感染症や悪性腫瘍の免疫細胞療法の開発にもつながる。
- (8) HHV-6やCMVの再活性化予防法の提供や、HHV-6脳症の診断に寄与できる。
- (9) 帯状疱疹が重症化あるいは遷延しやすい免疫不全患者のワクチン接種の効果を判定できる。
- (10) 悪性腫瘍に伴った免疫低下に伴うウイルス感染の対策をする上で動物モデルによる検証は必須でありヒトでの応用を踏まえ行政施策へ貢献するものとする。

## 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、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. Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N, Yanagida T, Inoue N, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T. Association between outcomes of renal transplantation and antibody responses to cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes. *Clin. Infect. Dis.* 45:60-67, 2007.
2. Kumar N, McLean K, Inoue N, Moles DR, Scully C, Porter SR, Teo CG. Herpesvirus 8 geno- prevalence in people at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 79:52-59, 2007.
3. Fukui Y, Shindoh K, Yamamoto Y, Koyano S, Kosugi I, Yamaguchi T, Kurane I, Inoue N. A novel anti-cytomegalovirus (CMV) compound identified by a reporter cell-based assay inhibits a process after entry but before immediate-early gene expression of CMV infection. (投稿中)
4. Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T. Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 14:100-109, 2008.
5. Hasegawa H, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T. Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Rev. Vaccines*, 6:193-201, 2007.
6. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J. Med. Virol.* 79:811-819, 2007.
7. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 9:1333-1340, 2007
8. Nakamura H, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K-I, Yajima M, Fujiwara S. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Virus Res.* 131:170-179, 2008.
9. Watanabe, S., Ohta, S., Yajima, M., Terashima, K., Ito, M., Mugishima, H., Fujiwara, S., Shimizu, K., Honda, M., Shimizu, N., Yamamoto, N. Humanized NOD/SCID/IL2R $\gamma$  null Mice Transplanted with Hematopoietic Stem Cells under non-Myeloablative Condition Show Prolonged Lifespans and Allow Detailed Analysis of HIV-1 Pathogenesis. *J. Virol.* 81: 13259-13264, 2007.
10. Phromjai J, Aiba N, Suzuki M, Sato H, Takahara T, Kondo S, Shiraki K. Infection and direct injury in human hepatocyte explants and a hepatoblastoma cell line due to hepatiticomimetic (non-hepatitis) viruses. *J. Med. Virol.* 79:413-425, 2007
11. Shimada Y, Suzuki M, Shirasaki F, Saito E, Sogo K, Hasegawa M, Takehara K, Phromjai J, Chuhjo T, Shiraki K. Genital herpes due to acyclovir-sensitive herpes



- simplex virus caused secondary and recurrent herpetic whitlows due to thymidine kinase-deficient/temperature-sensitive virus. *J. Med. Virol.* 79:1731-1740, 2007
12. 末松 佐知子. 人工リンパ組織構築とは何か. *Organ Biology* (印刷中).
2. 学会発表
1. Inoue N, Nozawa N, Koyano S, Yamamoto Y, Kurane I. Development of a filter paper-based real-time PCR assay for newborn CMV screening programs. 11<sup>th</sup> International CMV & Betaherpes virus workshop, May 2007, Toulouse, France.
  2. 井上直樹、小杉伊三夫、倉根一郎. レポーター細胞株を用いたスクリーニングにより同定した新規抗サイトメガロウイルス薬候補化合物 146F7 は感染初期過程を阻害する. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
  3. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology, May 2007, Hakone, Japan.
  4. T. Sugino, Y. Kajimoto, H. Kuratsune, Y. Watanabe, K. Kondo. Enhancement of herpes virus 6 (HHV-6) and herpesvirus 7 (HHV-7) reactivation in saliva during the fatigue state. International Association of Chronic Fatigue Syndrome, 2007 Fort Lauderdale, FL, USA.
  5. 小林伸行、嶋田和也、清水昭宏、近藤一博. ヒトヘルペスウイルス (HHV)-6 潜伏感染特異的タンパクによるうつ症状の発症機序. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
  6. 鎌田美乃里、近藤一博. HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6 潜伏感染細胞の同定. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
  7. 清水昭宏、小林伸行、近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の細胞指向性に関与するウイルス遺伝子の同定と解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
  8. 近藤一博、清水昭宏、小林伸行.  $\beta$ -ヘルペスウイルスのストレス応答による再活性化機構の解明. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
  9. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス特異的免疫応答. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
  10. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス特異的免疫応答. 第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月、東京.
  11. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺 哲、中川 温子、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤守、清水則夫、本多三男、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 4 回 EB ウイルス研究会、2007 年 6 月、東京.

12. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺 哲、中川 温子、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤守、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦. ヒト化マウスモデルにおける EB ウイルス特異的免疫応答. 第 4 回 EB ウイルス研究会、2007 年 6 月、東京.
13. 中村浩幸、石井千尋、末廣正和、井口晃史、黒田和道、清水一史、今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、藤原成悦. EB ウイルス LMP1 による Bcl-3 発現誘導. 第 4 回 EB ウイルス研究会、2007 年 6 月、東京.
14. 中村浩幸、井口晃史、黒田和道、清水一史、今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、藤原成悦. EBV がコードする膜蛋白質 LMP1 による Bcl-3 発現誘導. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
15. 今留謙一、清水則夫、藤原成悦. EB ウイルス感染上皮細胞における CD40 シグナルの働き. 日本分子生物学会・生化学会合同大会、2007 年 12 月、横浜.
16. Shiraki K, Akahori Y, Suzuki K, Asano Y, Daikoku T, Kurosawa Y. Characterization of neutralizing epitopes of varicella-zoster virus glycoprotein gH. 32<sup>nd</sup> International Herpesvirus Workshop, July 2007, Ashville, NC, USA.
17. Shiraki K, Horiba K, Daikoku T, Kawana T. Clinical relevance of 21 amino acids deletion in glycoprotein G of herpes simplex virus II. International Herpesvirus Management Forum, October 2007, Dubrovnik, Croatia.
18. Shiraki K, Hama Y, Yoshida Y, Daikoku T. Immune response to varicella-zoster virus may cause neurological complication. 13<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. November 2007, Orvieto, Italy.
19. 末松 佐知子. ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築」日本組織培養学会第 80 回大会、2007 年 5 月、大阪.
20. 末松 佐知子. ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築. 第 34 回臓器保存生物医学学会、2007 年 11 月、札幌.
21. Hattori Y, Suematsu S. Functional Lymphatic Vessel Formation in Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-Like Organoids in Mice. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月、東京.
22. 定岡恵、岡本成史、羽田敦子、吉川哲史、浅野喜造、山西弘一、森康子. ELISPOT法による水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)特異的細胞性免疫能の評価. 第 22 回ヘルペスウイルス研究会、2007 年 6 月、福岡.
23. 定岡恵、岡本成史、羽田敦子、吉川哲史、浅野喜造、山西弘一、森康子. ELISPOT 法による水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)特異的細胞性免疫能の評価. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.
24. 武本眞清、今澤孝喜、山西弘一、森康子. ヒトヘルペスウイルス 6 は単球由来樹状細胞に感染し T 細胞へ伝播する. 第 22 回ヘルペスウイルス研究会、2007 年 6 月、福岡.
25. Takemoto M, Imazawa T, Yamanishi K, Mori Y. Monocyte-derived dendritic cells infected with human herpesvirus 6 have a role for virus transmission to CD4+

T cells. 32nd International Herpesvirus Workshop, July 2007, Asheville, NC, USA.

26. 武本眞清、山西弘一、森康子. ヒトヘルペスウイルス6は単球由来樹状細胞に感染しT細胞へ伝播する. 第55回日本ウイルス学会、2007年10月、札幌.

### 3. 書籍、その他

1. Kondo K, Yamanishi K. HHV-6A, 6B, and 7: molecular basis of latency and reactivation. In: Ann Arvin et.al. editors. Human Herpesviruses. Cambridge University Press, 2007. pp. 843-849.
2. Kondo K. Chronic Fatigue Syndrome and Herpesvirus Infection. In: Fatigue Science for Human Health. Springer Press, 2008. pp. 137-152.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得、出願

1. 特許「HHV-6の潜伏感染特異的タンパク質、その検査法、それを用いた精神疾患マウスの作成、治療法開発への応用」発明者: 近藤一博、小林伸行 2007年9月27日 特許出願 (2007-250461)

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

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:4000 種類のランダム化合物ライブラリーからサイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に効果のある化合物を、各ウイルス用レポーター細胞株を用いて検索し、昨年度と合わせ目標とした9600化合物の検索を完了した。50%阻害濃度(EC50)20 $\mu$ M以下で感染初期過程に阻害効果があり、かつ細胞毒性が見られない化合物として、VZV及びCMVに対しそれぞれ7種類を選定した。これらの阻害化合物について、約300万の化合物データベースより類似化合物を検索し、入手可能であった120種類の類似化合物及び化学合成した6種類の類似化合物を用いて構造活性相関を行なった。また、146F7、133G4と名づけた2化合物の作用機序の解析を行い、前者がCMVの細胞への侵入後から前初期遺伝子の発現以前の過程を、後者がCMV IE2やVZV IE62による遺伝子活性化を阻害するそれぞれユニークな化合物であることを明らかにした。146F7はマウス及びモルモットCMVの増殖も阻害したことから、感染動物モデルでの検討が可能であることが示された。そこで、モルモットで効果的にCMV増殖を評価できないか検討を開始し、10<sup>6</sup>PFUと大量に腹腔内接種しても接種2-6日の間でほとんどウイルス血漿が観察されないこと、リアルタイムPCRで測定可能なウイルスDNAを感染1週後に脾臓に検出できるが薬剤の評価に適するレベルではないこと、3週目では唾液腺に大量のウイルスが検出されることを明らかにした。

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薬は、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薬は有効であるが、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キリングに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薬の検索を行い、得られた化合物についてその作用機序を検討した。

## 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 pOkla 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。テロメラー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%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、100 $\mu$ g/ml G418 及び 10%FBS 添加 DMEM にて培養した。モルモット CMV (GPCMV) (ATCC より購入)は、10%FBS 添加 F12 培地を用いてモルモット繊維芽細胞 GPL (ATCC より購入)で、マウス CMV (MCMV) (浜松医大筒井博士より分与)は、10%FBS 添加 DMEM を用いて NIH3T3 細胞で増殖させた。

### 2) 化合物

ランダム化合物(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。構造活性相関のための化合物の合成は、山口十四文先生(帝京科学大学)の協力を得て行われた。

### 3) 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

感染初期過程に対する薬剤の阻害効果の検討には直接感染法を、DNA 複製や粒子形成など 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 穴プレートにまき込んだ未感染細胞 (VZV では MeWo 細胞、CMV では hTERT- BJ1 細胞)に、1 穴当り 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

イブのルミノアッセイ基質 (Dual-Glo Luminoassay Kit, Promega)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。

#### 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% Triton X 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)プラーク形成阻害アッセイ

12 穴プレートにまき込んだ繊維芽細胞に 50-100PFU/穴でウイルスを接種 1-2 時間培養後、接種液を除き、2 倍階段希釈した薬剤、1%メチルセルロース、4%FBS を含む MEM 培地で培養した (HCMV 10-12 日、GPCMV 6-7 日、MCMV 4-5 日)。2% crystal violet を含む 10%フォルマリンで固定染色後プラーク数を実体顕微鏡下で測定し、薬剤によるプラーク形成阻害率を薬剤濃度を Linear regression 法にて解析し EC50 を求めた。

#### 6)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。

#### 7)リアルタイム PCR 及び RT-PCR

感染細胞からの DNA 及び RNA サンプルの精製は、市販キット(キアゲン QIAamp DNA minikit, RNeasy Plus mini kit)をそれぞれ用いた。

リアルタイム PCR には、市販キット(Applied Biosciences, TaqMan Universal PCR Master Mix)を用いた。HCMV ゲノムコピー数の測定は、UL83 遺伝子を標的とし、プライマー 5' CGCAACCTGG TGCCCATGG, 5' CGTTTGGGTTGCGCAGC GGG, TaqMan プロブ 5' TTCGGCGAAGATGCを用いた。スタンダードには、UL83 遺伝子をクローニングしたプラスミド DNAを用いた。細胞当たりのコピー数を求めるために、ヒトアルブミン遺伝子のコピー数を測定した(Gault ら, 2001)。スタンダードには、ヒト B 細胞株から抽出した DNA を用いた。

リアルタイム RT-PCR には、市販キット(Applied Biosciences, One-step RT-PCR Master Mix)を用いた。スプライシングを伴う IE1 及び IE2(前初期)、UL112/113(初期)、UL89(後期)の各 CMV 転写物及び細胞 RNA のコントロールとして G6PD を RT-PCR し、エキソンジャンクションをプローブの標的とした。用いたプライマーとプローブは以下の通り。 IE1: 5' CAAGTGACCGAGGATTGCAA, 5' CAC CATGTCCACTCGAACCTT, プローブ 5' TCCTGGCAGAACTCGTCAAACAGA, IE2: 5' TGACCGAGGATTGCAACGA, 5' CGGCATGATTGACAGCCTG, プローブ

5' TGGCAGAACTCGGTGACATCCTCGC C,  
UL112/113: 5' TGACGGACGTGGCCG, 5' CAA  
TCATTGAGCATTGTTGGTCAA, プローブ  
5' CCGA CGGAATCCGCGGCGCCTCAG, UL89:  
5' GGCGCTTTTTGCCAGTTG,  
5' ACCAGCAGCAAGTGAAGTTTT, プローブ  
5' TACAACACCAACAGCATCCGAGGAC,  
G6PD: 5' TCTACCGCATCGACCACTACC,  
5' GCGATGTTGTCCCGGTTT, プローブ  
5' ATGGTGCTGAGATTTGCCAACAGGA.

(倫理面への配慮)

実験動物の使用は、実験動物委員会の承認のもと動物愛護の精神に基づき行われた。

## C. 研究結果

### 1. 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 4000 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薬剤を検索し、昨年度と合わせ目標とした 9600 化合物の検索を完了した。

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 $\mu$ 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、直接感染法(3 日培養)において 20 $\mu$ M 存在下で効果があり、細胞毒性がない(>20 $\mu$ M)化合物を 20 種類同定した。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、選定した化合物の胞毒性を検討し、最終的に 10 種類の候補を得た。

VZV 及び CMV 免疫染色法を用いて阻害効果を確認する実験を行い、特に阻害効果が著しい

化合物をいくつか選定した。その結果昨年度に選定した化合物と併せ、VZV 及び CMV に対しそれぞれ 7 種類の強い阻害効果を示す化合物が選定された。また、抗 VZV 化合物として同定した 133G4 及び 179H6、抗 CMV 化合物として同定した 15E8 は、両ウイルスともに効果があることを明らかにした。

### 2. 阻害化合物の構造活性相関

各阻害化合物について、様々な合成メーカーの総計 300 万種類の化合物の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 120 化合物を購入した。さらに、133G4 について 6 種類の類似化合物を合成した。この結果、133G4 のニトロ基など重要な側鎖が同定され、現在さらに詳細な検討を準備している。

### 3. 化合物 146F7 及び 133G4 の作用機序の解析

- 1) GCV をコントロールとして標準的なブランク形成阻害法で HCMV、MCMV、GPCMV に対する 146F7 の EC50 を求めた(表1)。この際、現在臨床で用いられている GCV をコントロールとした。その結果、146F7 の EC50 は 2.5 $\mu$ M であり GCV の 1.4 $\mu$ M にほぼ匹敵する阻害効果があることが明らかになった。50% 細胞増殖阻害濃度(CC50)が 100 $\mu$ M であったことから選択係数は 20 以上であった。一方、133G4 の HCMV に対する EC50 はおよそ 8 $\mu$ M であった。
- 2) CMV 及びヒトアルブミン遺伝子をそれぞれ標的とするリアルタイム PCR を用いて、CMV の DNA 複製が感染後 24-48 時間にお

ること、両化合物添加により DNA 複製が 10%以下になることを確認した。146F7 と GCV を低 MOI 及び高 MOI で感染させた場合の結果を図1に示した。

- 3) レポーター細胞を用いた感染実験において薬剤の添加や除去のタイミングを変えることで、146F7 が感染後 5-12 時間辺りで、133G4 がその少し後で効果があることを見出した。いずれも DNA 複製阻害剤 GCV よりも早期に効果を示した。146F7 の結果を図2に示した。
  - 4) モノクローナル抗体を用いた解析から、146F7 では、前初期蛋白 IE1/IE2 をはじめ初期蛋白 US22 等が減少すること、133G4 では IE1/IE2 に変化はないが、初期蛋白の減少が見られた。
  - 5) スプライシングが知られる IE1, IE2, UL112/113, UL89 の各 mRNA の産生をリアルタイム RT-PCR により解析した結果、146F7 ではすべての転写物の産生が抑制されること、133G4 では UL112/113, UL89 と初期以降の過程が阻害された(図 3)。
  - 6) CMV 感染 2 時間後に培地を除き、Mg 存在緩衝液下で、プロテアーゼと DNase を処理し細胞表面に残っているウイルス粒子を除去し、細胞内の CMV DNA だけをリアルタイム PCR により測定した。この際、吸着阻害が知られるヘパラン硫酸(HS)をコントロールに用いた。146F7 は吸着侵入過程を阻害しないことがわかった。(図 4)
  - 7) 一過性の遺伝子導入系において IE2 による初期遺伝子 UL112/113 や TRL4 プロモーターの活性化を 133G4 は阻害した(図 5)。
- 以上から、146F7 はウイルスの細胞への侵入

後前初期遺伝子の発現以前の過程を、133G4 は IE2 による遺伝子活性化の過程を阻害するそれぞれユニークな化合物であることが示された。

#### 4. 感染動物モデルを利用するための基礎検討

146F7 は小動物のCMV増殖も阻害したことから、感染動物モデルでの有効性を示すために、まずGPCMVを用いて予備実験を開始した。GPCMVの感染経路として、腹腔内及び皮下接種を検討した。10<sup>6</sup>PFUと大量に腹腔内接種しても接種 2-6 日の間でほとんどウイルス血漿が観察されないこと、1 週目で脾臓にリアルタイム PCRで測定可能なウイルスDNAを検出できるが薬剤の評価に適するレベルではないこと、3 週目では唾液腺に大量のウイルスが検出されることを明らかにした。一方、皮下接種では数日でウイルス増殖を免疫組織染色法で観察できたが、リアルタイムPCRによる測定では、接種に用いたウイルスの残存かどうかの区別ができなかった。

#### D. 考察

細胞ベースの high-throughput アッセイを用いてスクリーニングすることにより、ユニークな新規抗ヘルペスウイルス薬のリード候補化合物を同定できることを証明したことは、今後の新規薬剤開発の方向性を示すものとして重要である。今回のスクリーニングに用いた化合物ライブラリーは約 1 万種類と決して大きなものではないが、それでも各ウイルスに対して数種以上のヒットを得ており、製薬メーカーなどが保有するライブラリーを利用できればさらに大規模な検索が可能となると思われる。



作用機序の検討を行った2化合物は、今まで研究レベルで検討されてきた阻害剤ともまったく異なるものであり、さらに詳細に阻害機構を解析していく価値がある。特に、146F7は、選択係数が20以上と高いこと、動物のCMVで効果を評価できること、Actelion Property Explorerを用いた予想でも安全性に問題がないこと、cLogP値が1.03と低く水溶性であることなど様々な点で優れており、実用化を視野に入れ動物レベルでの検討をより推進したい。さらに、耐性株を意図的に分離し、耐性に関与する遺伝子を同定することで、標的となっているCMV蛋白を同定したい。

## E. 結論

- 1) VZV及びCMVの感染を阻害する新規抗ウイルス剤候補を9600種類のランダム化合物ライブラリーから検索する作業を完了した。選定した阻害化合物10種類以上について、約300万の化合物データベースより類似化合物を検索し、入手可能であった類似化合物を用いて構造活性相関を行なった。
- 2) 146F7はウイルスの細胞への侵入後前初期遺伝子の発現以前の過程を、133G4はIE2による遺伝子活性化の過程を阻害するそれぞれユニークな化合物であることが示された。
- 3) 146F7はマウス及びモルモットのCMV増殖も阻害した。感染動物モデルでの有効性を示すための予備実験を開始した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N, Yanagida T, Inoue N,

Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T. Association between outcomes of renal transplantation and antibody responses to cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes. *Clin Infect Dis* 45:60-67, 2007.

- 2) Kumar N, McLean K, Inoue N, Moles DR, Scully C, Porter SR, Teo CG. Herpesvirus 8 genotype prevalence in people at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 79:52-9, 2007.
- 3) Fukui Y, Shindoh K, Yamamoto Y, Koyano S, Kosugi I, Yamaguchi T, Kurane I, Inoue N. A novel anti-cytomegalovirus (CMV) compound identified by a reporter cell-based assay inhibits a process after entry but before immediate-early gene expression of CMV infection. (投稿中)

### 2. 学会発表

- 1) Inoue N, Nozawa N, Koyano S, Yamamoto Y, Kurane I. Development of a filter paper-based real-time PCR assay for newborn CMV screening programs. 11th International CMV & Betaherpes virus workshop. May, France
- 2) 井上直樹、小杉伊三夫、倉根一郎「レポーター細胞株を用いたスクリーニングにより同定した新規抗サイトメガロウイルス薬候補化合物146F7は感染初期過程を阻害する」第55回日本ウイルス学会学術集会11月、札幌

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 プラーク形成阻害アッセイに基づくEC50

	EC50 ( $\mu\text{M}$ ) obtained by plaque reduction assay		
	HCW	GPCW	MCW
146F7	25 $\pm$ 0.2	62 $\pm$ 1.7	30 $\pm$ 1.6
GCV	14 $\pm$ 0.2	259 $\pm$ 7.7	57 $\pm$ 0.5

図1 146F7 処理によって生じたDNA複製阻害

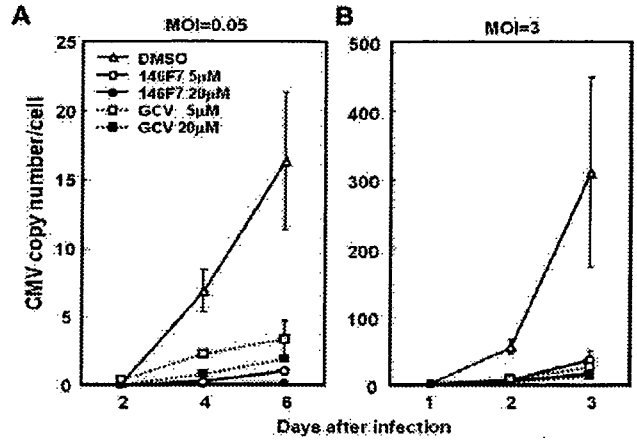


図2 薬剤添加・除去のタイミングの検討による146F7の作用点の検討

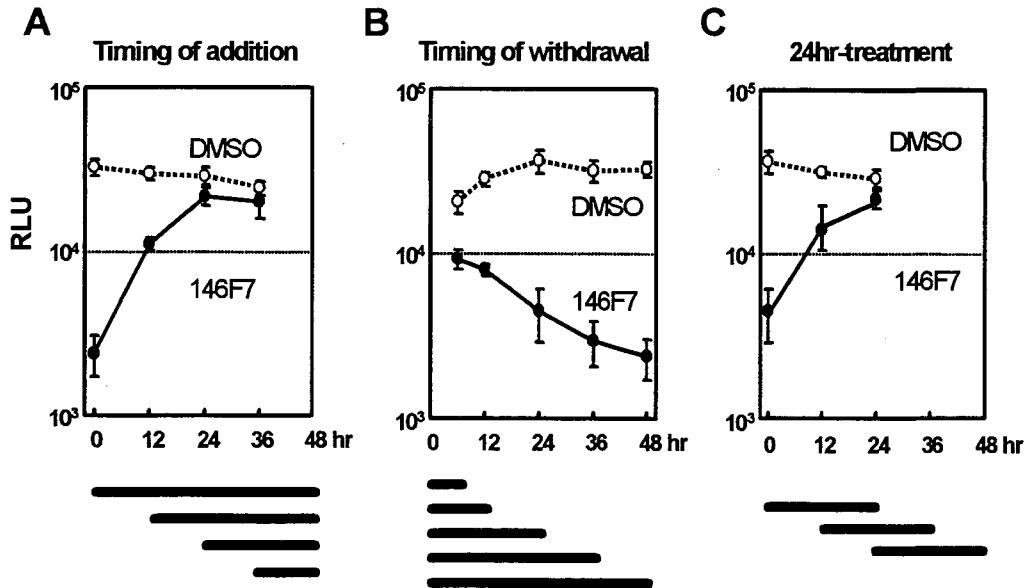


図3 化合物による遺伝子発現阻害のリアルタイム RT-PCR を用いた解析

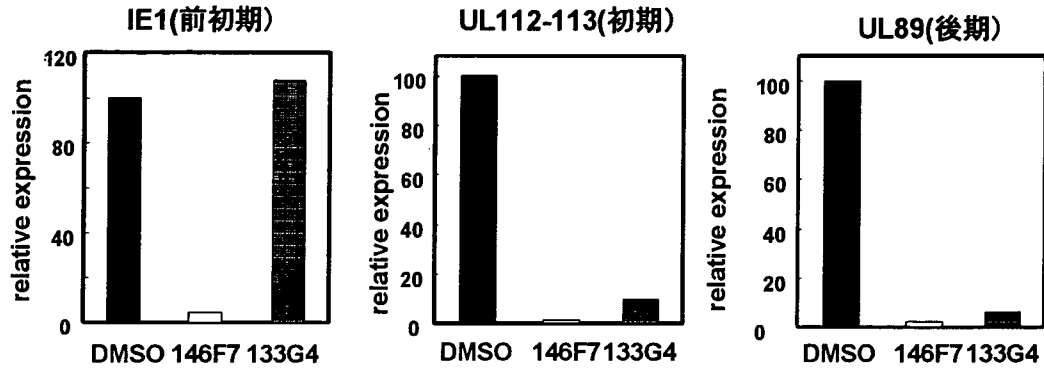


図4 エントリ過程の阻害の解析

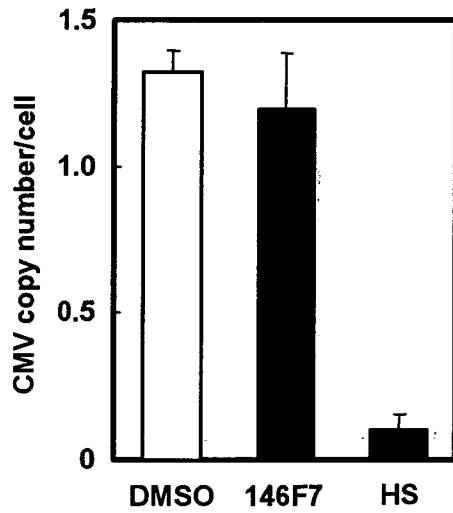
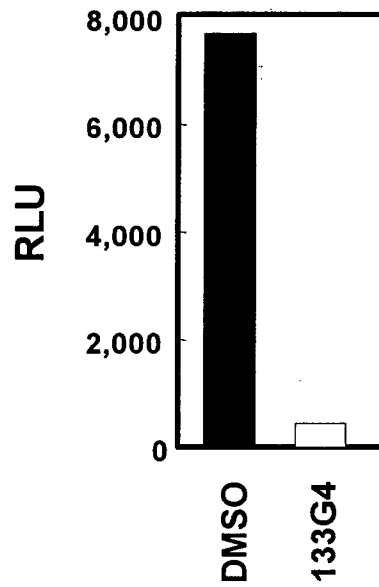


図5 IE2 転写活性化機能の阻害



分担研究報告書

造血幹細胞移植後の CMV、EBV、HHV-6 再活性化メカニズム解析

分担研究者 吉川哲史 藤田保健衛生大学医学部、准教授

**研究要旨：**造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化機序を明らかにするとともに、移植後ヘルペスウイルス感染症の中で重要性の高い CMV、EBV 感染との関連性も明らかにするため、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、CBA 法での血清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での 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。CMV や EBV の再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。三種類のヘルペスウイルス再活性化と、血清中サイトカイン濃度との関連性もウイルス毎で異なっており、今後症例数を増して多角的な解析を行う必要があると考えられた。

**A. 研究目的**

昨年度までの研究で、造血幹細胞移植や肝移植患者における移植後 HHV-6 再活性化に TNF- $\alpha$  や IL-6 といった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。一方で、このような患者においては拒絶反応、GVHD、他の感染症など様々なファクターがサイトカイン合成に関与すると考えられ、HHV-6 再活性化のメカニズム解明においても総合的な解析が必要と思われる。そこで今年度の研究では、移植後に重要な HHV-6 以外のへ

ルペスウイルスとして EBV、CMV が挙げられるため、これら 3 種類のウイルスについて包括的にウイルス再活性化状況ならびにサイトカインとの関連性を解析した。

**B. 研究方法**

対象は名古屋大学小児科、名古屋第一赤十字病院小児科にて造血幹細胞移植を受けた小児 51 名（男児：28 例、女児：23 例、平均年齢：8 $\pm$ 5.4 歳）。患児の背景（原疾患、ドナーグラフト種類、HLA タイピング）についてはカルテ