

を基に後方視的に調べた。全血 200 μ l から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて EBV、CMV、HHV-6 DNA 量を測定。HHV-6 についてはウイルス分離、抗体測定も行った。EBV は 1000 コピー/ μ g DNA、CMV は 100 コピー/ μ g DNA、HHV-6 は 10 コピー/ μ g DNA を感染ありと規定しウイルス再活性化状況を解析。サイトカインとの関連性解析の際には、HHV-6 のみウイルス分離と血清診断の成績も加味して判定した。血清中サイトカインについては 6 種類 (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 p70) を Cytometric Beads Array にて測定した。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

ウイルス DNA 量を基準として各ウイルス再活性化状況を解析した結果、HHV-6 についてはこれまで同様移植後 2 週から 3 週に再活性化のピークを認めたが (ウイルス DNA 量とウイルス感染頻度共に)、EBV、CMV については明らかなピークは認められなかった。3 種類のウイルスとも、移植後約 2 ヶ月間にほぼ半数の患児で再活性化が認められた。原疾患と再活性化の頻度について解析した結果、EBV は非悪性腫瘍群で

有意に再活性化の頻度が高く、HHV-6 については悪性腫瘍群で有意に高頻度だった。HLA タイピングについての解析では、EBV 感染がミスマッチ群で有意に高頻度、CMV と HHV-6 については有意な相関はなかった。さらに、ドナーグラフとの種類については、HHV-6 感染のみが臍帯血移植群、非血縁群、血縁群の順に高頻度であったが、他の 2 種類のウイルスではそのような傾向は認められなかった。サイトカインとの関連性については、EBV 感染群は移植後 4 週目の IL-12 p70 が非感染群に比べ高値を示した。CMV は TNF- α 、IL-8、IL-6、IL-12 p70 が移植後 3~5 週にかけて非感染群の方が感染群より高値を示した。HHV-6 は、移植後 2 週、4 週において感染群で TNF- α が高値を示した。

D. 考察

以上のような結果から、同じヘルペスウイルスでもそれぞれのウイルスで再活性化にかかわる因子が異なることが示唆された。さらに、これらウイルスとサイトカインとの関連性においてもかなり複雑な解析が必要となると思われる。今後さらに症例を増すとともに、他の宿主因子とのかかわりをどのように統計学的に解析してゆくか検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients.

Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y,

Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T.

Liver Transplant. 2008 14:100-9.

2. 学会発表

45th Annual Meeting of the IDSA, San Diego,

CAにて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 19 年度分担研究報告書

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

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究協力者：荒尾雄二郎（岡山大学）

相内 章（国立感染症研究所）

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。本研究では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。

A. 研究目的

マクロファージガラクトース型 C 型レクチン (MGL) は免疫応答において中心的な働きをする樹状細胞表面に発現していることからウイルス感染時の免疫応答に何らかの働きをしている事が考えられる。ウイルス感染に伴った MGL1 の機能を解明する事を目的とし悪性腫瘍に伴った免疫低下状態時の免疫増強法の基礎的研究を行う事を目的とした。

B. 研究方法

1. 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 (Charles River Japan)、および Mgl1 遺伝子欠損マウスを用いた。感染実験は国立感染症研究所動物管理区 biosafety level 2 (BSL2) 区域内で行われた。

2. ウイルスと細胞

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は Glasgow 17 Syn+ 及び Glasgow 17 Syn をブランク精製法にて精製した後用いた。ブランク精製法及びウイルス価測定はニトロセルロース含有メディアウム VeroE6 細胞をもちいた。MGL1/MGL2 遺伝子導入細胞は MGL1/2 の遺伝子配列を組み込んだ発現ベクターを Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に導入し作製し抗 MGL 1 抗

体、抗 MGL2 抗体で染色し発現細胞をクローニングした。

3. 抗体及びその他の材料

抗 HSV-1 抗体はウサギの HSV-1 に対するポリクローナル抗体を用いた。抗 HEV 抗体は MECA-79 (BD Bioscience)を用いた。

4. HSV-1 感染価の測定

MGL1/2 を発現する CHO 細胞に HSV-1 を感染させた後、(MOI=1.0, 0.1, 0.01) VeroE6 細胞を用いたブランクアッセイで測定した。

5. ウイルス感染

1 群 5 匹のマウスに HSV-1 Glasgow 17 Syn+を 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 PFU を経鼻または静脈注射で感染させた。

6. 免疫組織化学染色

マウスの鼻咽頭関連リンパ装置 (NALT) 及び脾臓、リンパ節を OCT コンパウンドで包埋し瀬ペンを作成した。アセトンで 30 秒処理し固定した。2%正常ヤギ血清 (Rockland immunochemicals, Gilbertsville, PA), 2%マウス血清 (Japan Bio-supply, Tokyo, Japan), 3%牛血清アルブミン (BSA, Seikagaku Corp, Tokyo, Japan) を含んだ PBS でブロッキング一次抗体を 4°C で 1 晩反応させた。2 次抗体にはビオチン標識した goat anti-rat IgG (H+L) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。反応後 Histomark Red (KPL Inc., Gaithersburg,

MD) にて可視化した。

7. RNA の単離、cDNA の合成, Real-time PCR による IFN- α 産生量は Real-Time PCR を用いて定量した。

8. 統計

有意差検定は Student の t 検定を用いて計算した。全ての結果は means \pm SEM で示した。

C. 研究結果

1. HSV-1 経鼻感染時における宿主側の免疫応答

HSV-1 を B6 マウスに 5×10^3 PFU/mouse (Low dose群) 5×10^5 PFU/mouse (High dose群) で経鼻接種し鼻腔洗浄液を経時的に採取しウイルス価を測定した。どちらの濃度の接種群でも後 1 から 3 日後をピークに 7 日目までにウイルスが測定感度以下に除去されている事がわかった。High dose群の方が一匹あたり観察されるウイルス価が高く解析が容易であるので以下遺伝子欠損マウスを用いた実験では High dose群である 1×10^5 PFU のウイルス価で感染実験を行う事とした。

2. MGL/1 遺伝子欠損マウスでの HSV-1 感染

MGL/1 遺伝子欠損マウスに HSV-1 を経鼻感染させ鼻腔洗浄液中のウイルス価を経時的に測定した。結果を図 1 に示す。接種後 1 日では野生型と Mgl/1 遺伝子欠損マウスで有意な差は認められなかったが、接種後 3 日では遺伝子欠損マウスのウイルス価は野生型の 1/10 程度であった。HSV-1 が野生型より遺伝

子欠損マウスで早期に除去された可能性が考えられる。また、野生型マウスでも Mgl1/1 遺伝子欠損マウスでも接種後 7 日目でウイルスが完全に排除されている事を確認している。

3. HSV-1 感染細胞の検出

Mgl1/1 遺伝子欠損マウスで HSV-1 が野生型より早く除去された原因を調べる目的で経時的に感染細胞を調べた。感染組織のうち鼻咽頭関連リンパ装置 (NALT) において MGL1 を発現している細胞の分布はこれまで検討されていない。そこで正常マウス NALT での各種免疫細胞の分布について検討した。NALT では B220 陽性の B 細胞が多数観察された。また高内皮静脈 (HEV) 近傍に MGL1 陽性細胞が観察された。しかし mPDC-1 で染色されるような pDC はほとんど観察されなかった。このことから正常状態で観察される MGL1 陽性細胞は pDC 以外の細胞であると考えられる。

HSV-1 の経鼻感染に関連し関連するリンパ装置での感染細胞を調べた。感染後 NALT、顎下リンパ節、脾臓を回収し抗 HSV-1 プリクローナル抗体を用いて検出した。NALT では予想に反し感染細胞はほとんど見られなかった。顎下リンパ節、脾臓では感染細胞が認められたがどちらも感染 1 日目より 3 日目のほうが感染細胞が多かった。興味深い事に脾臓、リンパ節どちらにおいても野生型マウスより Mgl1 遺伝子欠損マウスにおいて感染細胞数が少ない傾向がみられた。

4. NALT, 血清中における IFN- α の定量

ウイルス価の推移と宿主側の免疫応答の

推移を比較する目的で NALT と血清における IFN- α 産生量を比較した。NALT では組織中の mRNA 量を定量的 PCR で測定した (図 2)。HSV-1 感染 6 時間後に Mgl1 遺伝子欠損マウスにおいて野生型より高濃度の IFN- α が発現傾向がみられたものの、有意な差は認められなかった。一方感染後 1 日目と 3 日目では遺伝子欠損マウスより野生型の方で高濃度の IFN- α が観察された。一方血清中の IFN- α は ELISA を用いて測定した。野生型も Mgl1 遺伝子欠損マウスもいずれのタイムポイントにおいても観察されなかった。IFN- α の誘導は鼻咽頭関連リンパ装置 (NALT) に限局したものである事が示された。

5. HSV-1 の感染性に与える MGL1 の影響

これまでにエボラウイルスが Human MGL を介してモノサイト・マクロファージ系の細胞に感染する事が明らかになっている。これは MGL とエボラウイルス外郭糖タンパクが結合する事に起因すると考えられている。HSV-1 もガラクトースを末端に持つような糖鎖をもつ外郭タンパクを持つ事が知られている。そこで MGL1/2 を介してマクロファージ/DC 系の細胞に進入する可能性が考えられた。そこで MGL1/2 を遺伝子導入した CHO 細胞に対する HSV-1 の感受性を検討した。CHO 細胞に HSV-1 を感染させ経時的に培養上清を死守しそのウイルス価を測定した。結果を図 3 に示す。MOI=0.1 で感染させた時、MGL1/2 を両方導入した細胞で高い感染価が観察された。また、MGL1 導入細胞でもウイルス価がコントロールと比較し高かった。MGL2 単独導入細胞ではそ

のような変化はみられなかった。

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命的な感染症をもたらす事になる。ウイルス感染を排除する機構には自然免疫機構とそれに続いて働く獲得免疫機構がある。悪性腫瘍発症時これらのうち獲得免疫機構が機能低下する事は知られているが病原体認識機構や自然免疫機構の機能についてはいまだ明らかにされていない。今回我々は抗原提示細胞等で病原体認識に関わる分子である MGL1/2 の HSV-1 感染時に与える影響を *in vitro* と *in vivo* で調べた。HSV-1 の経鼻感染では Mgl1 遺伝子欠損マウスで野生型よりもすばやく HSV-1 が排除される事が示され、さらに MGL1/2 を発現する CHO 細胞を用いた実験から MGL1/2 が HSV-1 の細胞への進入に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

ウイルス感染に伴う自然免疫応答に重要な働きをする C 型レクチンの一つ MGL/1 の HSV-1 感染における関与を調べた。MGL/1 欠損マウスでは野生株と比較し HSV-1 早期に排除される事、細胞レベルでは MGL1/2 の発現が HSV-1 感染価を高める事が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Hasegawa H, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
- 2.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.* 2007 Jun;79(6):811-819
- 3.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 and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.

2. 学会発表

1. 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. 13th International Conference on Human Retrovirology 21st-25th May 2007 Hakone

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

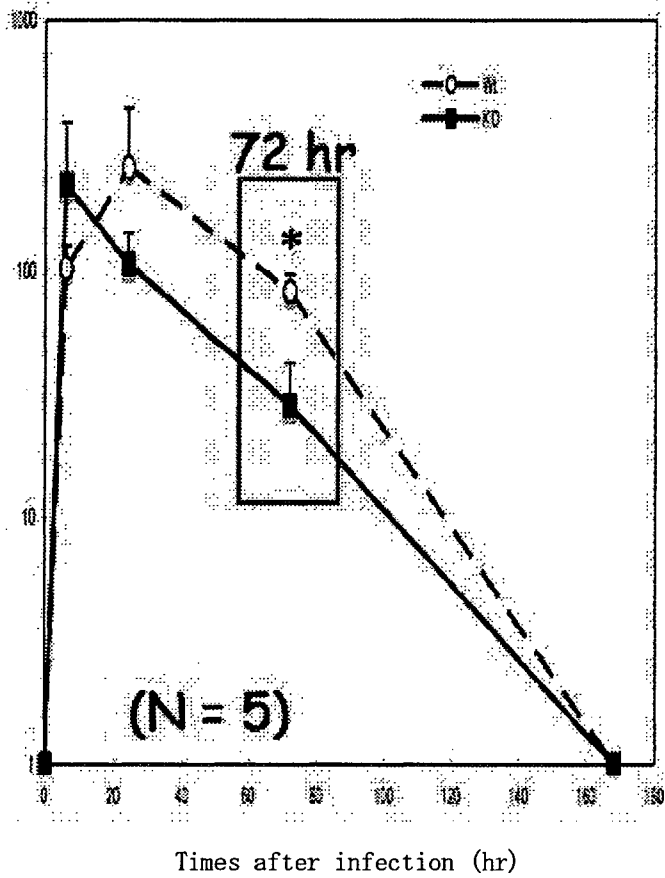


図1 Mg11 遺伝子欠損マウスにおける経鼻感染時の鼻腔洗浄液中のウイルス価の推移
 黒四角は野生型、白丸は Mg11 遺伝子欠損マウスのウイルス価(PFU/mouse)を示す。
 縦軸は対数表示

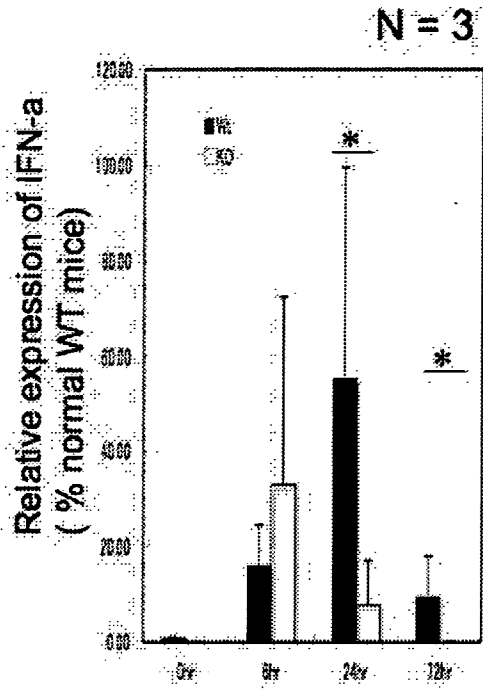


図2 Mg11 遺伝子欠損マウスに HSV-1 を経鼻感染させた際の NALT における IFN- α 産生量の経時的な変化。

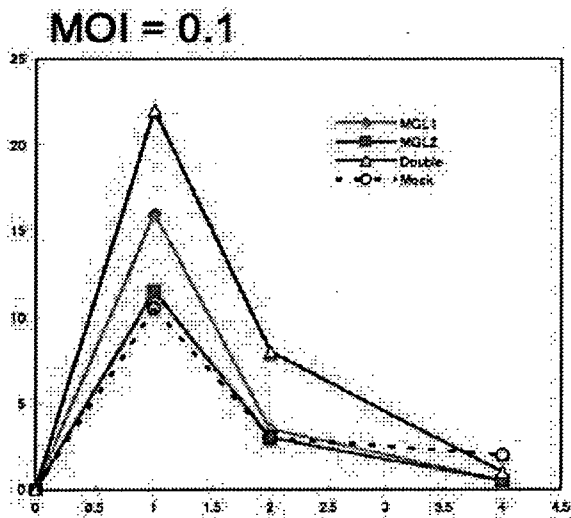


図3 MGL1/2 遺伝子導入 CHO 細胞に対する HSV-1 の感染価の比較

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

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ウイルス学講座 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:本年度は、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)とヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)の再活性化を予防する方法の開発と、疾患の発症機序の検討を行った。この結果、i) 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、ii) 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、iii) 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。

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。

特に、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、時には致死的である。また、HHV-6 の再活性化は、脳炎・脳症を生じ、精神疾患様

の重篤な後遺症を残すことが最近注目されている。

3 種類の β -ヘルペスウイルスは、ほぼ同時に再活性化を生じ、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。

また、今年度は、HHV-6 の脳炎・脳症の原因となる可能性のある遺伝子の同定も行った。

B. 研究方法

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の分子機構の解明

昨年までの研究により、HHV-6 の再活性化の診断には、唾液中の HHV-6 DNA 量を定量する方法が有効であることを示し、再活性化を強く誘導する因子として、疲労の蓄積と抗癌剤の投与が重要であることを見出した(図 1)。

この現象をヒントに HHV-6 や CMV の再活性化機構を検討した。我々はこれまでに、HHV-6 と CMV が潜伏感染時に発現する遺伝子(潜伏感染遺伝子)が、前初期遺伝子 IE1 と IE2 の open reading frame と、その前に存在する small upstream open reading frame (suORF)を持つことを見出した(図 2)。また、我々は HHV-6 の再活性化の初期には、前初期遺伝子 IE1/IE2 の mRNA が発現するのではなく、潜伏感染遺伝子の IE1/IE2 の ORF から IE1/IE2 のタンパクが合成され、ウイルス増殖が開始されることも見出した(図 3)。

この機構は、酵母などのストレス応答機構として知られている upstream open reading frame regulation 機構(uORF 制御)と類似の機構であると考えられる。哺乳類においては、uORF 制御は、タンパク合成時の折り畳みの不全を修正するための機構である小胞体ストレ

ス応答や、ウイルス感染時のアポトーシス誘導機構として見られる。

HCMV や HHV-6 が疲労やストレスに応答して再活性化する現象が、uORF 制御機構によるものかどうかを知るために、HCMV と HHV-6 の uORF のストレス応答能を検討した。

方法としては、HCMV と HHV-6 の uORF 構造を SV40 プロモーター下に発現する分泌性アルカリフォスファターゼ(SEAP)の ORF の直前に挿入したプラスミドを作成する。このプラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、小胞体ストレスを与える薬剤(ツニカマイシン、タプシガルギン)を添加し、ストレスに応答して SEAP の発現亢進が見られるかどうかを観察した。

2. HHV-6、HCMV 再活性化予防法の開発

HHV-6 が疲労によって再活性化するという現象と、uORF 制御機構に関する検討の結果から、HHV-6 や CMV は身体ストレスによって再活性化すると考えられた。癌患者や移植患者における最大の身体ストレスは、抗癌剤の投与であると考えられる。そこで肺癌、膵癌、卵巣癌の患者での抗癌剤による HHV-6 再活性化の誘導と、抗癌剤による身体ストレスを緩和すると考えられる補完医療薬 Active Hexose Correlated Compound (AHCC)の併用による HHV-6 再活性化の抑制を検討した。

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

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。

昨年までに、数名の患者において、抗癌剤治療による唾液中 HHV-6 再活性化量の増加と、AHCC による再活性化抑制を観察していた(図 5)。 本年は、さらに患者数を増やして、この現象に対する統計学的な検討を行った。

3. HHV-6 の中枢神経毒性遺伝子の同定

HHV-6 は、臓器移植患者での再活性化が生じた際に、重篤な脳炎を生じる。 さらに、脳炎が収束し、髄液中にウイルス産生が確認されなくなった後も、精神症状などの重篤な後遺症を残す。 我々は、この精神疾患様の後遺症が HHV-6 の増加した潜伏感染細胞によるのではないかと考え、中枢神経毒性をもつ潜伏感染遺伝子の検索を行った。

さらに、この潜伏感染遺伝子の機能を検討するために、HHV-6 の潜伏感染細胞であるグリア細胞で潜伏感染遺伝子を発現させ、細胞機能に対する影響を観察した。 さらに、この潜伏感染遺伝子を、アデノウイルスベクターを用いてマウスのグリア細胞に発現させ、マウスの行動異常を観察した。

(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分子機構の解明

HHV-6 と HCMV の潜伏感染遺伝子の uORF 構造のストレス応答機構を検討するために、この構造を SEAP 遺伝子と連結し、各種の小胞体ストレスによる遺伝子活性化を検討したところ、これらの uORF 構造がストレスによって下流の IE1/IE2 の位置にある ORF のタンパク発現を促進することが判った(図 4)。

先に述べたように、HHV-6 の再活性化の初期には、前初期遺伝子 IE1/IE2 の mRNA が発現するのではなく、潜伏感染遺伝子の IE1/IE2 の ORF から IE1/IE2 のタンパクが合成され、ウイルス増殖が開始される。 このことから HHV-6 と HCMV は、uORF のストレス応答機構を利用して、前初期遺伝子タンパク IE1/IE2 を翻訳し、再活性化を生じると考えられる。

また、この結果から、HHV-6 と HCMV の再活性化を予防または抑制するには、これらの潜伏感染細胞である血液細胞にストレスを与

えないことが重要であると考えられる。次に、HHV-6の再活性化が補完・代替医療薬であるAHCCによって抑制されることを示すが、この原理は細胞へのストレス抑制であると考えられる。

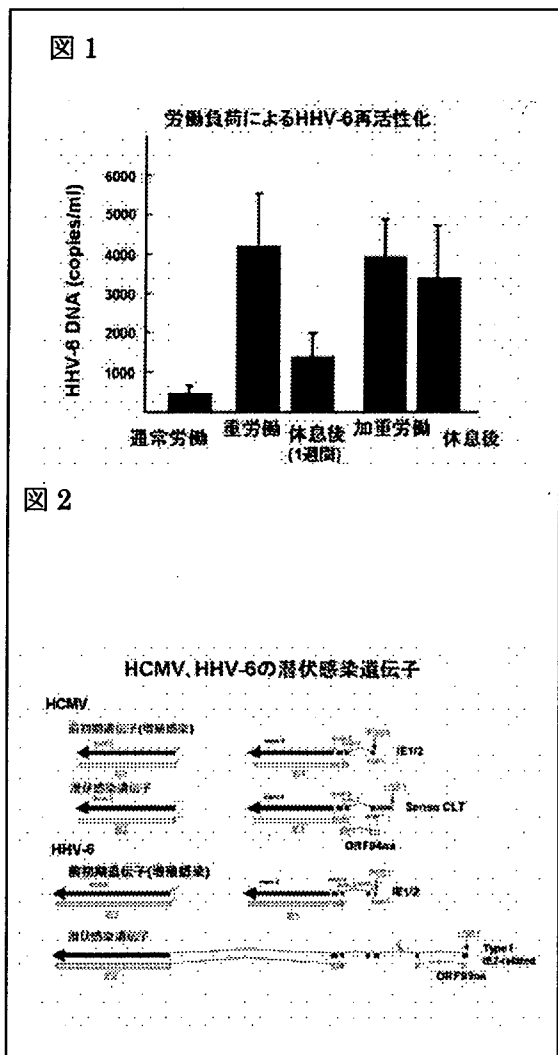


図 1 労働負荷による HHV-6 の再活性化: 唾液中の HHV-6 DNA 量を Real-time PCR 法で測定することによって再活性化を定量化し、ストレスの蓄積状態(疲労)との関係を検討した。通常労働は、残業のない勤務を、重労働は、1日平均 5 時間程度の残業を伴う労働を、過重労働はこれにさらに当直勤務による慢性的睡眠不足が加わる勤務状態を示す。
図 2 HCMV と HHV-6 の潜伏感染遺伝子の構造

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。

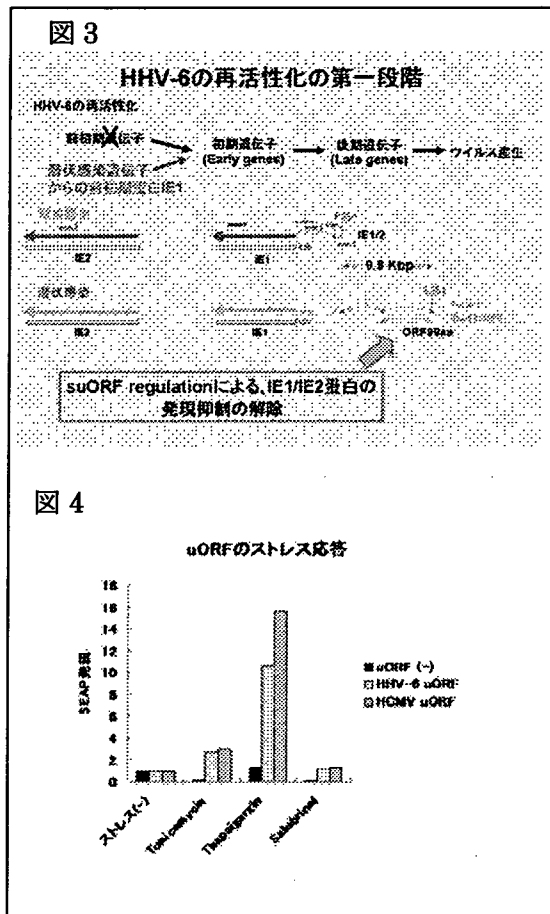


図 3 HHV-6 の再活性化機構: HHV-6 の再活性化の第 1 段階で生じる遺伝子発現を検討した結果、再活性化は、潜伏感染特異的遺伝子にコードされる IE1/IE2 この蛋白が、uORF 制御の解除によって開始されることが判った。
図 4 HHV-6 と HCMV の潜伏感染特異的遺伝子に存在する uORF のストレス応答: HHV-6 と HCMV の uORF を SEAP 遺伝子の上流に持つプラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、各種のストレスを与えた時の SEAP 遺伝子の翻訳を観察した。ストレスによって発現が促進することが、ストレスを抑制する物質であるサルプリナルでは、発現が促進しない。

2. HHV-6、HCMV 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。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5)。

患者数を14名に増やして行った検討の結果、抗癌剤の投与によって、HHV-6は著しく再活性化することが判った。また、AHCCを抗癌剤と同時に投与すると、3~4週間後には、HHV-6再活性化が著しく減少することが判明した(図6)。また、この結果は統計的にも有意であった。上述したように、HCMVもHHV-6と同様の再活性化機構を有するので、HHV-6と同様にAHCCによる再活性化予防が可能であると考えられる。

さらに、この経過中に患者の免疫学的な検査結果に変動はなく、この再活性化抑制効果は免疫以外の機構で生じていると考えられた。前述の様に、HHV-6とHCMVの再活性化は、細胞へのストレスで生じる。抗癌剤は、強い酸化ストレスを生じることが知られており、AHCCは抗酸化作用を持つことが知られている。これらのことから、HHV-6の抗癌剤による再活性化の促進とAHCCの再活性化抑制は、

酸化ストレスと抗酸化作用によって生じていることが示唆された。

AHCCなどの補完医療薬は、抗癌剤の副作用の軽減などを目的に癌患者への投薬が前向きに検討されている。補完医療薬を選択する際に、抗酸化作用の高いことを選択基準に含めることで、抗癌剤の副作用軽減と同時に、ウイルス再活性化の予防も行えると考えられる。

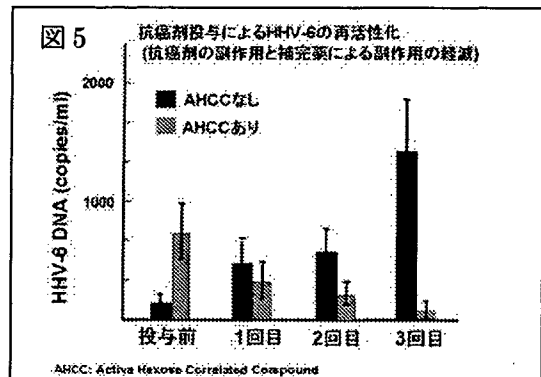


図5

抗癌剤によるHHV-6の再活性化とAHCCによる抑制

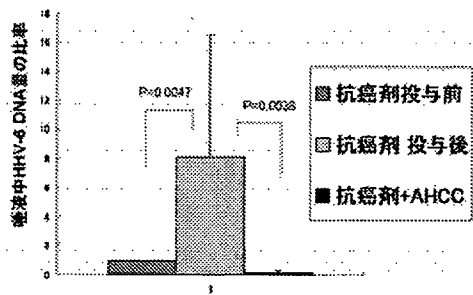


図5 抗癌剤投与によるHHV-6の再活性化の誘導と補完・代替医療薬の投与による再活性化予防効果:

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。

図6 抗癌剤投与によるHHV-6の再活性化の誘導とAHCCによる再活性化予防

3. HHV-6 の中枢神経毒性遺伝子の同定

HHV-6 脳炎・脳症の発症と関係する新規潜伏感染遺伝子タンパクを同定した。

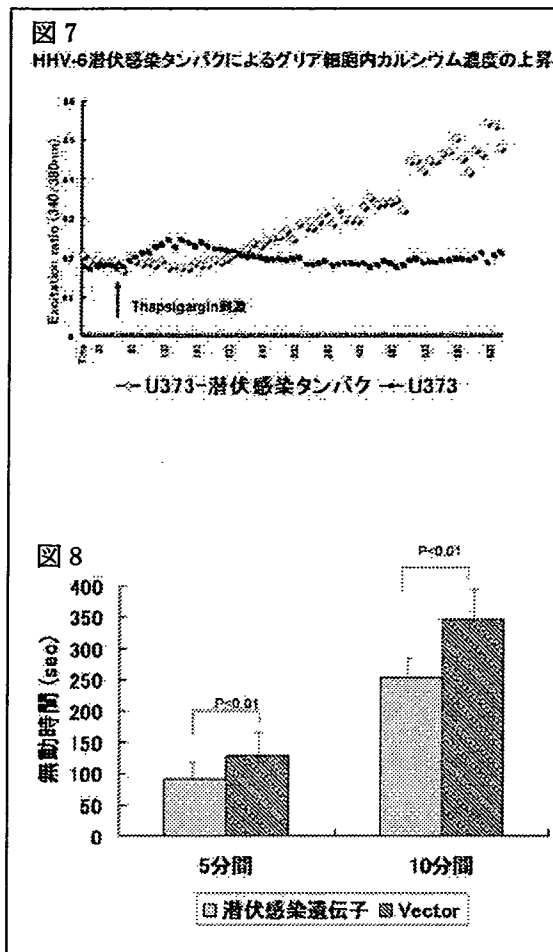
この潜伏感染タンパクは、HHV-6 の潜伏感染部位であるグリア細胞に導入すると、刺激に過敏に反応し、細胞内カルシウム濃度が異常に上昇した(図 7)。グリア細胞内カルシウム濃度の異常は、様々な中枢神経疾患の原因と考えられており、この遺伝子が HHV-6 脳炎・脳症の病原遺伝子である可能性が示唆された。

また、この遺伝子を、アデノウイルスベクターを利用してマウス脳内グリア細胞で発現させると、尾懸垂テスト時の無動時間が短縮し、興奮状態になっていることが判った(図 8)。尾懸垂テストは、マウスを尾で 10 分間つるした時にマウスの動作が停止する時間を計るもので、マウスの気分障害(うつ病、躁鬱病)の実験に使用される。

さらに、この遺伝子の mRNA は、HHV-6 脳炎で死亡した患者(2 例中 2 例)の側頭葉から検出され、HHV-6 脳炎・脳症に特徴的な情動障害や記憶障害と関係することが示唆された。

D. 考察

「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の本年度の研究目標は、i) 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、ii) 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。さらに、潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明の研究として、iii) HHV-6 脳症の原因と考えられるウイルス遺伝子を同定することが出来た。

再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定においては、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を示した。また、HHV-6 と HCMV の uORF が実際にストレス応答機構を持つことを示すことが出来た。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判った。

また今回、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を検体数と増やすことによって統計学的にも有為であることが判明した。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、さらに上記の再活性化機構の研究より、HHV-6 の再活性化が、抗癌剤による細胞へのストレスによっていることが示唆された。

これは、抗癌剤が、酸化ストレスを生体に与えることと、再活性化を抑制した AHCC が抗酸化作用を持つことより、HHV-6 が抗癌剤によって再活性化を誘導されることと AHCC の抗酸化作用によって再活性化が抑制されることが示唆された。

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前向きに検討されている。AHCC もその一つである。補完医療薬を選択する際に、抗酸化作用の高いことを選択基準に含めることで、抗癌剤の副作用軽減と同時に、ウイルス再活性化の予防も行えると考えられる。

最近、HHV-6 の再活性化による脳炎・脳症の報告例が増加し、その重要性が再認識されている。今回、疾患の発症機序の解明につながる、HHV-6 脳症の原因と考えられるウイルス遺伝子を同定することが出来た。

この遺伝子は、実際に脳症を生じた患者から検出されたことと、マウスの脳内に導入することで、HHV-6 脳症に特徴的な精神症状を生じ

させることが出来たことから、病原遺伝子の有力な候補であると考えられる。今後は、症例を増やして検討することや、疾患の発症機構をさらに検討することによって、HHV-6 脳炎・脳症の診断や治療に応用したいと考えている。

E. 結論

今回の研究により、HHV-6 と HCMV の再活性化に酸化ストレスなどの細胞へのストレスが重要な誘導因子となることが判った。また、AHCC の様な抗酸化作用を持つ補完・代替医療薬で再活性化を抑制出来ることも判明した。

また、HHV-6 脳炎・脳症の発症に関係すると考えられるウイルス遺伝子も同定でき、診断や治療に有用であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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 (Fort Lauderdale 2007)

2. 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、2007 年 10 月 札幌)

3. 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、2007 年 10 月
札幌)
4. 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、2007 年 10 月
札幌)
5. 近藤一博、清水昭宏、小林伸行
 β -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、2007 年 10 月 札
幌)

3. 書籍等

1. K. Kondo and 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. K. Kondo. 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

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)

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、致死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死的となる。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及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、容易に高タイトー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、次にHHV-6Bに関して検討を行った。

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死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、及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) とアデノウイルス (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事が期待される。

B. 研究方法

B.1 VZV の標的遺伝子における siRNA 配列のスクリーニング

(1) プラスミドの構築

(1)-1 標的遺伝子の選定

VZV の増殖抑制への効果を期待するターゲット領域として、Open Reading Frame (ORF) 62 及び ORF68 を選定した。前者は ORF71 と共に外殻タンパク IE62 をコードする初期遺伝子であり、後者は糖タンパク gE をコードする後期遺伝子である。

(1)-2 標的配列のクローニング

VZV Oka 親株 (parent Oka, pOka) の DNA をテンプレートとした。標的遺伝子の両端に制限酵素配列を含む増幅用プライマーを設計し、標的領域の増幅を行った。PCR 酵素は東洋紡ライフサイエンス社の KOD plus を用いた。PCR 反応による増幅 (ABI Gene Amp PCR system 9700 使用) の後、0.7% TAE ゲルに泳動し、トランスイルミネーターによる長波長 UV 照射下において切り出した。その後、gene clean II (フナコシ社) を用いて、ターゲットバンドの切り出し及びゲルからの DNA の抽出を行った。ターゲット領域の増幅に使用したプライマーは ORF62: Forward; 5'-CGT GAT ACT GAG ACA AAG CG-3', Reverse; 5'-GTG GTG GTG TAT ACG CTT GT-3', ORF68:

Forward; 5'- CGC TTA AGA TGG GGA CAG TTA-3', Reverse; 5'- TAC CCG GGT CAC CGG GTC TTA-3' であり、合成は greiner bio-one 社に依頼した (以降通常の脱塩グレードのオリゴは greiner bio-one 社にて合成している)。標的配列を抽出した後、制限酵素で末端処理を行い、当研究室で構築した Luciferase 遺伝子を搭載したシャトルベクター (pCMVL1 または pHMCMV5-Luc) の luciferase と poly(A) の間に導入した。標的配列が 2kb を超えると、Luciferase 遺伝子の発現が落ちる事が既に明らかであるため、標的配列が 2kb を超える ORF62 は、分割して導入した。ターゲットが正しく導入されているかどうかは、制限酵素による消化後に電気泳動してサイズを確認した上で、3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて sequence を行って最終確認を行った。目的プラスミドは全て QIA Prep Spin Mini Prep Kit (Qiagen) を用いて抽出し、分光光度計を用いて濃度を測定した。

(1)-3 候補配列を搭載した siRNA 発現ベクターの構築

siRNA の標的配列は、アルファジェン社のアルゴリズム及びインビトロジェン社のアルゴリズムである BLOCK-iT RNAi Designer (URL: <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) に基づいて設計を行った。siRNA 発現ベクターのシャトルプラスミドとして、当研究室にて構築した pHM5-ihU6-2 を用いた。このプラスミドは制限酵素 *BspMI* で切断する事により、特定の linker を含む配列を導入する事が可能である。導入するための linker を含むオリゴを各々のターゲット配列について合成した (greiner bio-one 社)。95°C 10 min のアニーリングの後、ligation して導入した。ベクタープラ

スミドの切れ残りを除去するために、ligation産物を再度Sallで切断し、形質転換を行った。コロニーをプレップし、制限酵素で切断してインサートの有無を確認した後、sequenceを行ってmutationの有無を調べた。

(1)-4 標的配列スクリーニング

(1)-4-1 Luciferase assay

ターゲット配列: shRNA プラスミド: β gal プラスミド=6: 3: 1 (モル比)となるように SuperFect (Qiagen 社)を用いて、トランスフェクションを実施した。3 hr 後に培地を交換した後、48 hr 後に細胞を細胞溶解試薬 Lc β で融解し、15000rpm、5min で遠心した。その後、上清を分析に利用するために回収した。発光の測定にはピッカジーン 5500 (TOYO B-net)を使用した。PBS(-)による wash を 2 回行い、その後 5 倍に希釈した溶解液 Lc β を 24well プレート 1well に対し、100 μ L 添加して細胞を溶解した。15000 rpm 4°C 5 min で遠心を行って上清を回収した。上清 10 μ L に対して基質 100 μ L を反応させ、ルミノメーター Lumat LB9507 (Berthold 社)を用いて発光を RLU で測定した。

(1)-4-2 β -gal assay

トランスフェクション効率は同時にトランスフェクションをした pCMV β の β -galactosidase 活性で補正を行った。活性は (1)-4-1 で回収した上清から Luminescent beta-galactosidase Detection kit II (BD Bioscience)を用いてルミノメーターで測定した。

(1)-5 ループ配列の検討

最もノックダウンの効率が高いと思われる

配列に対し、更なるノックダウン効率の上昇を目的として、ループ配列の検討を行った。検討したループ配列は次の 3 種類である。ループ配列 1(最初のスクリーニングに用いたループ配列): 5'-ACG TGT GCT GTC CGT-3'、ループ配列 2: 5'-CAC AGG GAA GCG AGT CTG-3'、ループ配列 3: 5'-TAG TGC TCC TGG TTG-3'。ベクターの構築及びスクリーニング方法は 1-(3)及び 1-(4)に従った。

(1)-6 プロモーター配列の検討

平成 18 年度において、poly(II)系プロモーターでドライブする siRNA 発現ベクターと poly(III)系プロモーターでドライブするシャトルプラスミドを構築した。ループ配列と同様に更なるノックダウン効率の上昇を期待した。ベクターの構築及びスクリーニング方法は 1-(3)及び 1-(4)に従った。

(2) 細胞培養

VZVの感染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)及び HHV-6B のターゲット細胞の一つである MT4 細胞 (ヒト T 細胞株)、また標的配列のスクリーニング用細胞として SuperFect (Qiagen)によるトランスフェクション効率の高い A549 細胞 (ヒト肺繊維芽細胞株)を用いた。MeWo 細胞及び A549 細胞は 10% Fatal calf serum (FCS)、20 μ g/mL 硫酸ゲンタマイシンを含む D-MEM 培地 (Sigma)で、MT4 細胞は 10 % Fatal calf serum (FCS)、20 μ 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実施した。

B.2 shRNA 発現カセット搭載 Ad ベクター