

(shRNA-Ad ベクター)の構築

(1)シャトルプラスミドの制限酵素消化

最もノックダウン効率の良かった配列を搭載したプラスミドを *I-CeuI*, *PI-SceI* で消化を行った。その後、同様に *I-CeuI*, *PI-SceI* で切断した 5 型 Ad ベクターのベクタープラスミド (pAdHM4) との組み換えを行った。Ligation の後、*SwaI* で処理する事により、self ligation 産物を除き、トランスフォーメーションを行った。コロニーをピックアップして得られたクローンは *HindIII* で消化して標的配列が導入されたかどうかの確認を行った。

(2)トランスフェクション

Ad プラスミド (pHM4-ihU6-VZVORF62-3T1, pHM4-ihU6-VZVORF68-1T1) を作成した後、*PacI* にて消化を行い、293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) にトランスフェクションを行った。翌日に培地を交換後は、細胞変性効果 (CPE) が起こるまで培養を続けた。その後、48 hr ごとに細胞変性効果 (CPE) が確認された細胞を回収し、凍結融解してその上清を新しい 293 細胞に作用させて徐々にスケールアップを行った。

(3) CsCl の濃度勾配超遠心による精製

Ad ベクター感染細胞を回収してソニケーションを実施した。マグネシウムを添加し、*Rnase*, *Dnase* 処理 (37°C, 30 min) を行った後、HITACHI 社製の超遠心機 (Himac CP-WS) にて濃度勾配超遠心を実施した。透析 buffer (10 % glycerol, 10mM Tris (pH 7.5), 1 mM MgCl₂) は 2 回交換し、透析を合計 24 hr 行ってウイルス粒子を精製した。

(4) ウイルス粒子数の測定

0.1 % SDS-TE で 10 倍希釈した後、激しく

震盪 (5 min) させてウイルス粒子を破壊した。15000 rpm 5 min 遠心させて上清を回収した。その後、先行する文献 [Maisel 他、Virology 36, pp115-125, 1968 年] に基づき分光光度計にて 260 nm の OD を測定 (GeneQuant pro, Amersham Biosciences) して、ウイルス粒子数を概算した。

B.3 shRNA-Ad ベクターの VZV の replication に与える効果

(1) Ad ベクターと VZV の共感染実験

(1)-1 プラーク形成能の評価

既に平成 18 年度において、VZV の replication に影響を与えない Ad ベクターの titer を検討し、決定した (300 VP/cell)。本年度はこの titer を採択して実験を実施した。使用したベクターは AdHM4-ihU6-VZVORF62-3T1 (ORF62 が標的、以下 ORF62-Ad)、AdHM4-ihU6-VZVORF68-1T1 (ORF68 が標的、以下 ORF68-Ad)、そしてコントロールとして、*Luciferase* に対する siRNA 配列が搭載されている AdHM4-ihU6-Lu5 (以下 control Ad) である。

まず、前日に MeWo 細胞を播種し、24 hr 後に shRNA-Ad ベクターをそれぞれ 300 VP/cell で感染させた。1.5 hr 感染の後、PBS(-) で 2 回洗い、2 mL の培養培地を添加してさらに 24 hr 培養した。その後 50 pfu/well で VZV を感染させ、3 日おきに培地を交換しながらプラークの形成を観察した。

プラークが肉眼でも観察できるレベルとなった 7 日目で固定と染色を同時に行った。固定染色液は 2% クリスタルバイオレットを含む 70% エタノール液を使用した。培養培地を除去した後、1 well 辺り染色固定液を 2 mL 添加して 24 hr 室温に放置した。24 hr 後、UV クロスリンカー (SPECTRO LINKER XL-1000UV,

SPECTRONICS CORPORATION) にて 5000J で 5 分間処理し、流水にて余分な染色液を除去した。キムタオル上にプレートを逆さまに置き、24 hr 風乾した。固定したサンプルは 1 well ずつ画像を取り込み、画像解析ソフト Image-J (NIH 提供のフリーソフト: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) にて解析し、プラーク形成能の差を検定した。

(1)-2 Northern blot

shRNA-Ad ベクターの MeWo 細胞における siRNA の発現期間を評価するために、Northern blot による siRNA の検出を試みた。Ad ベクター (24 hr) 及び VZV (48 hr) を作用させた細胞サンプルより RNA を抽出した。RNA は各群で濃度を合わせ、20 μ g/lane となるように調整し、ホルムアミド (Wako) を添加して変性させた後、7M の尿素 (Wako) を含む変性アクリルアミドゲルにアプライし、120 V で 2 時間、1x TBE Buffer で泳動した。エチジウムブロマイド (EtBr) 染色にて RNA が泳動されていることを確認した後、ナイロンメンブレン (Nylon Membranes positively charged 1-417-240, Roche) に 20 V で 90 分間転写し、UV クロスリンクを行った。その後 non RI であるジゴキシゲニン (DIG) で 5' 側をラベルした DNA プローブ (北海道システムサイエンス社にて合成、5'-GAC TCG TTA CAC GCA ACA TTC-3'、ORF68 上に設計) とハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションには DIG Easy Hyb (11-603-558-001, Roche) を使用した。そして抗 DIG 抗体 (DIG Luminescent Detection Kit 11-363-514-910, Roche) を用いて検出を行った。なお、検出系の条件検討は human GAPDH をターゲットとした 5' 側 DIG 化プローブ (5'-CTT CCA CTT

CCA GCC TCA G-3') を用いて実施した。

(1)-3 Western blot によるターゲットタンパク質の発現の評価

Ad ベクターを 300 VP/cell 感染させた 24hr 後に VZV を 10 pfu/well、50 pfu/well で作用させた細胞を 48 hr 後に回収し、Cell lysis buffer (20 mM HEPES (Dojindo)、2 mM EGTA (Dojindo)、10 % Glycerol (Wako)、1% Triton-X-100 (Sigma) を DW に溶解) を用いてタンパク質を抽出した。SDS page 後、独立行政法人医薬基盤研究所の感染制御プロジェクトにて作成した IE62 (ORF62、ORF71) に対するモノクローナル抗体を用い、Western blot を実施した。

また、同じ抗体を用い、IE62 を強制発現させた細胞において、IE62 に対する shRNA-Ad ベクターを作用させ、タンパク合成の抑制効果が見られるかどうかの検討を試みている。

(1)-4 Taqman Real time PCR による VZV 粒子数の測定

shRNA-Ad ベクターを 300 VP/cell 感染させた 24 hr 後に VZV を 10 pfu/well、50 pfu/well で作用させた MeWo 細胞を 48 hr 後に回収し、Dneasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。この DNA を用いて Taqman real time PCR (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System) にてウイルス粒子数を評価した。粒子数測定のために使用したプライマーは以下の通りである。Forward: 5'-TCT TGT CGA GGA GGC TTC TG-3'、Reverse: 5'-TGT GTG TCC ACC GGA TGA T-3'、Probe: 5'-TCT CGA CTC GCT GGG ACT TGC G-3'。サイクル数は 40 で実施した。

(1)-5 RT-PCR による VZV 遺伝子発現の評価

shRNA-Ad ベクターを 300 VP/cell で感染させた 24 hr 後に VZV を 10 pfu/well、50 pfu/well で作用させた細胞を 48 hr 後に回収し、ISOGEN (ニッポンジーン社)を用いてウイルスの RNA を含む total RNA を抽出した。1 sample 辺り 3 μ g の RNA から cDNA を合成した。cDNA の合成は Invitrogen 社の SuperScriptII を用いた。標的遺伝子は ORF62 そして ORF68 である。RT-PCR に使用したプライマーは、ORF62, Forward: 5'- AGG ACG TGG TAC AAT TGC TC-3', Reverse: 5'- AAC TCA GTC CAT CTC GGG TA-3'; ORF68, Forward: 5'- CGT GTT GCA AGC ACA GTG TA-3', Reverse: 5'- CAA CAG TGT ATG CTA CGG CT-3'を用いた。ExTaq HS を用いて増幅した後、2% TBE ゲルにアプライして電気泳動を行い、バンドを比較した。

B.4 HHV-6B 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

HHV-6B のターゲット遺伝子として、U38 及び gp82-105(U97-100)をターゲットとした。U38 は DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子であり、gp82-105 は糖タンパクをコードする遺伝子である。Gp82-150 はスプライシングが入っており、U97、U98、U99、HN、そして U100 の部分から成る。フルシーケンスを元に shRNA 標的配列を先に示したインビトロジェン社のアルゴリズムに基づいて設計したところ、U97、U99、U100 上に主に設計されたため、gp82-105 に関してはこの 3 カ所のクローニングを実施することとした。

(1)-2 標的配列のクローニング

HHV-6B の DNA をテンプレートとし、標的領域の両端に制限酵素配列を含む PCR 増幅用プライマーを設計し、標的領域の増幅を行った。U38 は増幅の後、0.7% TAE ゲルに泳動し、U97、U99、U100 は 2% TBE ゲルに泳動した。使用したプライマーは U97, Forward: 5'-GCC ATC TAG ATC AGG TTC TC -3', Reverse: 5'- GCT TAA GAT GAC TTT TCC CG -3', U99, Forward: 5'- GCC ATC TAG ATC ACC ATC GA -3', Reverse: 5'- CTG GCT TAA GAT GTT CGG AG -3', U100, Forward: 5'-GAC ATC TAG ATT ACC GTG CC-3', Reverse: 5'-CTA GGC TTA AGA TGA GAC CG-3'を用いた。ターゲットバンドはトランスイルミネーターで長波長 UV 照射下において切り出し、gene clean II でターゲットバンド DNA の抽出を行った。遺伝子導入後、mutation の有無を sequence にて確認した。標的配列を搭載したプラスミドは全て QIA Prep Spin Mini Prep Kit (Qiagen)を用いて抽出した (OD 比は 1.7-2.0)。

(1)-3 候補配列を搭載した shRNA-Ad ベクターの構築

(1)-4 標的配列スクリーニング

(1)-4-1 細胞の準備

本検討においては、トランスフェクションにおける作業効率を上げるため、手順がより簡単な FuGene (Roche 社)を使用した。A549 における FuGene による遺伝子導入効率は事前に検討を行い、問題のないことは確認済みである。VZV における検討と同様に細胞を播種した。FuGene は細胞密度が高くなると遺伝子導入効率が落ちることが知られているため、トランスフェクション実施時に 50-60%コンフルエントとなるように細胞を準備した。

(1)-4-2 Dual Luciferase assay

より効率的なスクリーニングを実施する為に、Promega社のDual Luciferase assay systemを採用した。このシステムは同一チューブ内で基質の異なる luciferase を使用する事により、バックグラウンド補正を可能としたものである。ターゲット配列: shRNA プラスミド: pRL-TK プラスミド=25: 50: 1 (重量比)となるように FuGene を用いてトランスフェクションを実施した。48hr 後に A549 細胞を細胞溶解試薬 Passive Lyses Buffer (PLB)で融解し、15000 rpm, 5 min 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 Dual luciferase assay system を使用した。PBS(-)による wash を 2 回行い、その後 5 倍に希釈した溶解した PLB を 24 well プレート 1well に対し、125 μ L 添加して細胞を溶解した。15000 rpm 4 $^{\circ}$ C 5 min で遠心を行って上清を回収した。上清 20 μ L に対してホタルルシフェラーゼ基質 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、その後ウミシイタケルシフェラーゼの基質 100 μ L と反応させ、再度 RLU を測定した。それぞれの測定値からバックグラウンドの値をひいた後、ホタルルシフェラーゼの RLU 値をウミシイタケルシフェラーゼの値で割り、relative ratio としてルシフェラーゼ活性を比較した。

B.5 Ad ベクターの構築

(1)シャトルプラスミドの制限酵素消化

B.2 (1)と同様に実施。

(2)トランスフェクション

B.2 (2)と同様に実施。

(3) CsCl の濃度勾配超遠心による精製

B.2 (3)と同様に実施。

(4) ウイルス粒子数の測定

B.2 (4)と同様に実施。

C. 研究結果

C.1 標的遺伝子に対するターゲット配列の選定

VZV の標的遺伝子である ORF62 及び ORF68 に対する標的配列の中から、効果的にその発現を抑制できると考えられる配列を選定した[Fig.1]。また、より高いノックダウン効率を目指してループ配列の検討を行い、ノックダウン効率を改善する事に成功した[Fig.2]。平成 18 年度に構築した Poly(II)系のプロモーターでドライブさせる場合と Poly(III)系のプロモーターでドライブさせる場合のノックダウン効果も比較したが、Poly(II)系プロモーターを搭載したプラスミドでは著明なノックダウン効果を得る事が出来なかった。従って以降の検討は Poly(III)系プロモーターでドライブさせるプラスミドを使用した。

C.2 shRNA-Ad ベクターの構築

当研究室で構築した方法に基づき、shRNA-Ad ベクターの構築を行った[Fig.3]。

C.3 shRNA-Ad ベクター前処理による VZV 粒子数増殖抑制効果

shRNA-Ad ベクターを MeWo 細胞に 300 VP/cell で作用させて 24 hr 培養した。その後 VZV を感染させた後、プラークの形成を観察した。VZV のみを感染させた群において明らかにプラークが確認された時点 (7 日目)で固定染色した図を示した。ORF68 に対する

shRNA-Ad ベクター作用群において、明らかなプラーク形成能の低下が観察された [Fig.4]。また、NIH の画像解析ソフトである Image-J にて解析した結果も同時に示した [Fig.5]。なお、Image-J においては VZV のみ感染させた群においてプラーク数が 50 となるように threshold の条件を決定して分析を行った。

C.5 shRNA-Ad ベクターによる VZV 粒子数の抑制効果

Taqman Real time PCR 法を用いて、VZV の増殖粒子数への shRNA-Ad ベクターの効果を判定した。ORF68 に対する shRNA-Ad ベクター処理において有意に増殖抑制効果がある事が確認された。しかしながら AdHM4-ihU6-Lu5 (control)、AdHM4-ihU6-VZVORF62-3T1 を処理した群が VZV のみを作用させた群よりも VZV 粒子数が高く検出されるという現象が確認された [Fig.6]。

C.6 shRNA-Ad ベクターによる標的遺伝子発現量の変化

RT-PCR 法を用い、標的遺伝子である ORF62 と ORF68 の発現を確認した。VZV の感染タイトルが低いとウイルス遺伝子の発現は全体的に低い事が判明した (lane 1-4 が 10 pfu/well、1-8 が 50 pfu/well)。ORF62 に対する shRNA-Ad ベクターは ORF62 の発現にも ORF68 に発現にも大きな影響は与えなかった。しかしながら ORF68 に対する shRNA-Ad ベクターは 50 pfu/well の条件において、ターゲットである ORF68 の発現を明らかに減弱させるだけでなく、ORF62 の発現にも弱い抑制がかかっていると考えられた [Fig.7]。

C.7 shRNA-Ad ベクターによる shRNA 及び siRNA の発現確認

DIG を用いた Non-RI の系での検出を試みた。しかしながら、効果の見られた shRNA-Ad ベクター感染後 48hr のサンプルにおいても shRNA 及び siRNA は検出することができなかった。このような結果となったのは、5'側 DIG ラベル DNA プローブによる検出感度が RI プローブに比べて低かったことが挙げられた。以上の事より、実験条件の検討と平行し、RI プローブによる検出も検討する必要があると考えられた。

C.8 標的遺伝子のノックダウンによるタンパク質の発現状況の検討

標的遺伝子である ORF62 に対する shRNA-Ad ベクターは VZV との共感染において著明な抑制効果を示さなかった。しかしながら ORF62 によってコードされる IE62 は VZV の外殻タンパクの構築以外にもウイルスの replication において重要な働きを示す事が知られつつある。本研究にて構築した shRNA-Ad ベクターによる mRNA レベルでのノックダウン効果は僅かであったが、タンパクレベルではどの程度効果を及ぼしているかは不明であったため、確認を試みた。しかしながら MeWo 細胞における IE62 の発現は低く、VZV 作用後 48 hr では Western blot にて検出することは出来なかった。MeWo 細胞において、VZV を長く作用させる事により、IE62 の発現が高くなることが知られているため、作用時間を長くしたサンプルを用いる検討及び、Western blot よりも高感度である蛍光抗体法 (Immunofluorescence Assays, IFA) を実施予定である。

C.9 標的遺伝子に対するターゲット配列の選定

HHV-6B の標的遺伝子である U38 及び gp82-105 に対する標的配列の中から、効果的にその発現を抑制できると考えられる配列を選定した [Fig.8]。ここで利用した Loop 配列は Loop2 の配列である。

gp82-105 に対して設計したプラスミドはいずれも高いノックダウン効率を示した。

D. 考察

VZV における検討では、初期遺伝子である ORF62 をターゲットとするよりも後期遺伝子である ORF68 に対する siRNA が増殖抑制に効果的に働いた。また、大きなプラーク形成は見られないものの、小さなプラークは出来ている為、感染を抑制するのではなく、感染後の増殖を抑制していると考えられた。今後処理順序を変える検討を行う事で、増殖抑制のメカニズムや、ターゲット遺伝子の選定に役立つ知見が得られると考えている。

E. 結論

本年度に得られた結果より、VZV 感染前に VZV の糖タンパク gE を標的とした shRNA-Adベクターを作用させる事によって、効果的に VZV の増殖を抑制できる事が判明した。抑制メカニズムは現時点では不明であるが、shRNA-Ad ベクターを感染症に対して予防的に利用する可能性及び VZV の遺伝子解析ツールとしての有用性が示唆されたと言えよう。また、ウイルス感染症の治療への利用を検討する為に、VZV 感染の後 shRNA-Adベクターで処理する条件を現在検討している。感染順序による抑制効果の違いを検討する事は、ひいては shRNA-Adベクターによる VZV

の増殖抑制メカニズムの解明に役立つと考えられる。本年度に構築した材料を元にした HHV-6B に関する検討は来年度に報告予定である。

G. 研究発表

該当事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし。

1. 特許取得

該当事項なし。

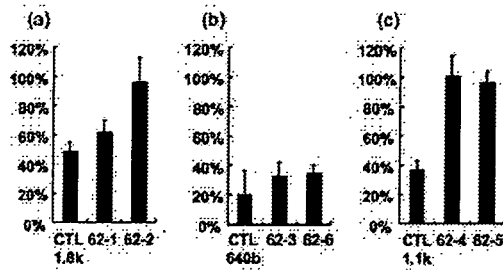
2. 実用新案登録

該当事項なし。

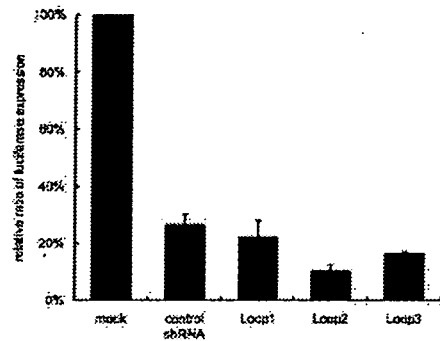
3. その他

該当事項なし。

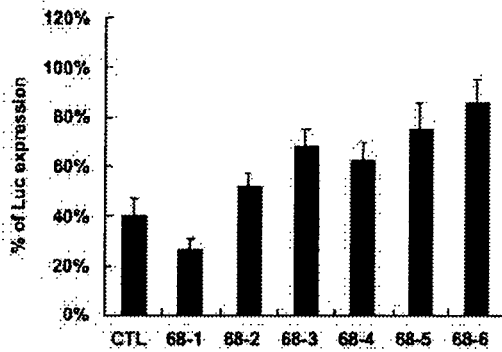
(A) ORF62



(A) ORF62



(B) ORF68



(B) ORF68

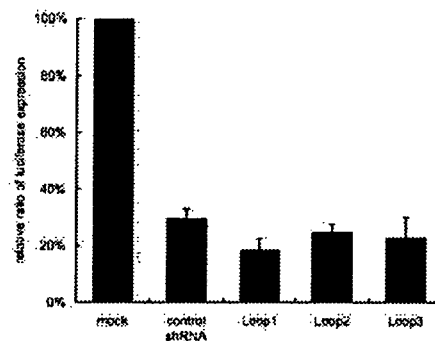


Fig.2. shRNA のループ配列の検討

A549細胞を用いて3種類のループ配列の検討を行った。(A)に ORF62 における検討、(B)に ORF68 における検討を示した。

Fig.1 VZV に対する shRNA 標的配列のスクリーニング

標的配列を組み込んだプラスミドによるノックダウン効率を、A549細胞を用いてスクリーニングした。(A)は ORF62、(B)は ORF68 に対する検討である。(A)の ORF62 は全長が 2kb を超えているので、(a) 1.8kb、(b) 640b、(c) 1.1kb の3つに分割した領域において検討した。各標的領域に対して shRNA カセットのないプラスミド(pHM5-ihU6-2)を co-transfection した Luciferase (Luc)の値を 100%とした計算値を示した。

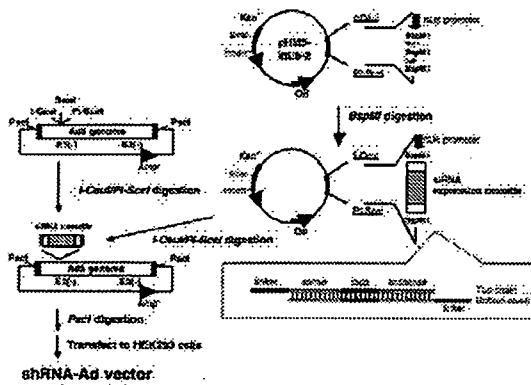


Fig.3 shRNA-Ad ベクター構築の概略

スクリーニング終了後から Ad ベクター構築までの概略図を示した。

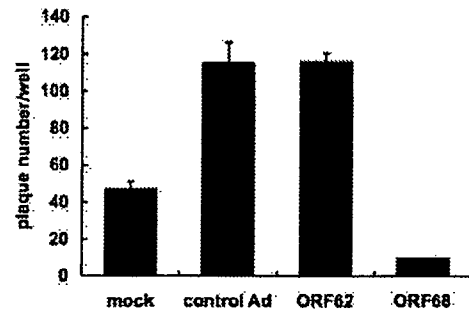


Fig.5 Image-J を用いたプラーク数の比較

Fig.4 において、画像解析にてプラーク数を測定した結果を示す。プラーク形成数には有意な差が見られた。

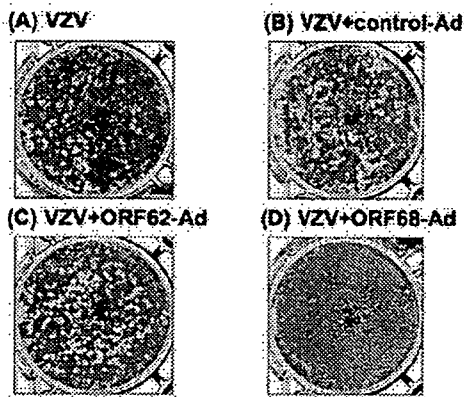


Fig.4 VZV プラーク形成に対する shRNA-Ad ベクターの抑制効果

shRNA-Ad ベクターを作用させた MeWo 細胞に VZV を 50 pfu/well となるように作用させ、プラーク形成能を比較した。(A)には VZV のみを作用させた negative control を、(B)-(D)にはそれぞれ shRNA-Ad を 300 VP/cell で作用させた。(A)の条件においてプラークが確認された 7 日目に 2%クリスタルバイオレットと EtOH による固定と染色を行ったものを示す。

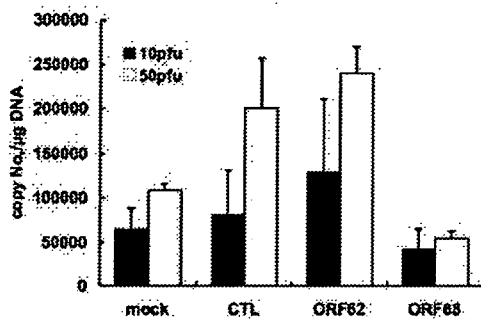
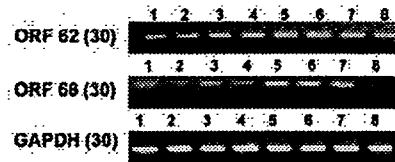


Fig.6 Taqman Real time PCR による VZV 粒子数の測定

shRNA-Ad ベクター処理による VZV 粒子数への影響を測定した。MeWo 細胞に shRNA-Ad ベクター 300 VP/cell、VZV 50 pfu/well で処理を行った。ORF62-Ad 処理群を ORF62、ORF68-Ad 処理群を ORF68 と示した。



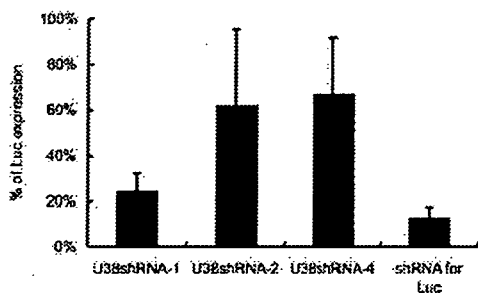
1. VZV (10pfu)
2. VZV (10pfu)+AdHM4-hU6-Lu5 (control)
3. VZV (10pfu)+AdHM4-hU6-VZVORF62-3T1
4. VZV (10pfu)+AdHM4-hU6-VZVORF68-1T1
5. VZV (50pfu)
6. VZV (50pfu)+AdHM4-hU6-Lu5 (control)
7. VZV (50pfu)+AdHM4-hU6-VZVORF62-3T1
8. VZV (50pfu)+AdHM4-hU6-VZVORF68-1T1

All Ad vectors are transduced in MeWo cells in 300VP/cell

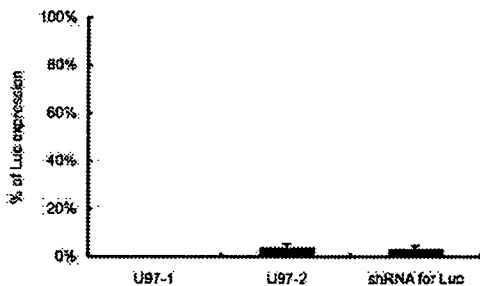
Fig.7 RT-PCR によるターゲット遺伝子の発現解析

shRNA-Ad ベクターの標的遺伝子である ORF62 と ORF68 に対する RT-PCR を実施した。サンプルは MeWo 細胞に 10pfu/well 及び 50 pfu/well で 48 hr 作用させたサンプルを用いている。

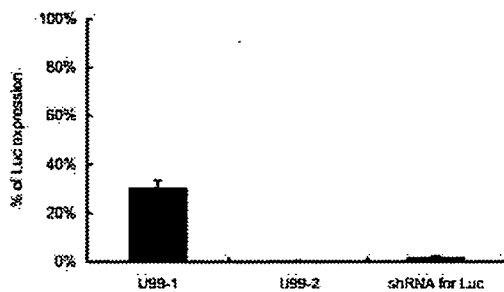
(A) HHV-6B U38



(B) HHV-6B gp82-105 (U97)



(C) HHV-6B gp82-105 (U99)



(D) HHV-6B gp82-105 (U100)

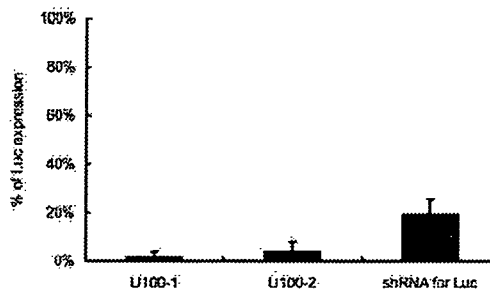


Fig.8 HHV-6B に対する shRNA 標的配列のスクリーニング結果

A549 細胞を用いた HHV6B に対する shRNA の標的配列のスクリーニング結果を示した。(A) U38、(B) gp82-105 (U97)、(C) gp82-105 (U99)、(D) gp82-105 (U100)に対する配列における検討結果を示した。shRNA の標的配列の入っていないプラスミド (pHMS-ihU6-2)を co-transfection した時の Luciferase (Luc)活性を 100%とした時の割合を示している。

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

EBウイルス感染症の発症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・部長

研究要旨：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。また、抗ヘルペスウイルス薬acyclovirの効果について検討した。さらに、EBVがコードする発がん蛋白質の一つLMP1の機能解析を行い、同蛋白質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。

A. 研究目的

移植治療の普及、エイズの流行、悪性腫瘍患者の増加などに伴い免疫不全者が増加しているため、日和見感染の増加に対する行政的対応が求められる。EBウイルス（EBV）を原因とするリンパ増殖性疾患（LPD）はこのような日和見感染症として最も重要なものの一つである。EBVはBリンパ球を不死化し、無制限に増殖するリンパ芽球様細胞へとトランスフォームするという、極めて特徴的な能力をもつ。このようなEBV感染細胞は、生体内においては通常免疫監視機構により速やかに除去されるが、移植治療などにおいて免疫能が低下した場合は無制限に増殖しLPDを発症する。このようにLPDの病態および発症機構の根底にはEBVによる細胞増殖の誘発があるため、治療法開発においてはEBVによる細胞増殖誘発メカニズムを解明し、治療の標的となる分子を探索することがオーソドックスなアプローチとなる。本年度は、昨年度作製に成功した

NOD/Shi-*scid*/IL2R γ ^{null}（NOG）マウスを用いたEBV感染モデルの解析を継続し、このモデルにおけるEBV複製、EBV特異的抗体産生、抗ヘルペスウイルス薬acyclovirの効果について検討した。また、EBV感染リンパ球の増殖機構解明の一環として、EBV蛋白質LMP1の機能を解析し、同蛋白質によるプロトオンコジーン*Bcl-3*の発現誘導を見出した。

B. 研究方法

1. 臍帯血

東京臍帯血バンク分離保存施設（日本大学医学部）に提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できないものを利用した。

2. NOD/Shi-*scid*/IL2R γ ^{null}（NOG）マウス

NOD/Shi-*scid*/IL2R γ ^{null}マウス（以下NOGマウス）は、6～8週齢の雌マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育・実験を行った。

3. 臍帯血造血幹細胞の分離と移植

臍帯血からFicoll比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) あるいはStemsepキット (ステムセルテクノロジー社) を用いてCD34 陽性造血幹細胞を分離した。1×10⁴~1.2×10⁵個のCD34 陽性細胞を尾静脈より移植した。その後、フローサイトメトリーにより末梢血、骨髓、脾臓、胸腺などからヒトCD45、CD19、CD3 陽性細胞を検出し、それぞれヒトリンパ球、ヒトB細胞、ヒトT細胞分化の指標とした。

4. EBV 感染実験

Akata 細胞の培養上清を 0.45 μm フィルターを通過させたのち尾静脈内に接種した。

5. EBV 遺伝子発現の解析

組織内の EBV 蛋白質 EBNA2 および LMP1 は免疫化学染色により、EBV がコードする小分子 RNA である EBER は in situ hybridization により検出した。また、RT-PCR により末梢血細胞および各臓器における EBV 遺伝子発現を解析した。

6. EBV 特異的抗体産生の検討

EBV キャプシド抗原 (VCA) 主要成分の一つ BFRF3 と Glutathione-s-transferase (GST)の融合蛋白質を用いて、ウエスタンブロット法によりマウス血清をスクリーニングした。陽性となった血清については、EBV 産生 Akata 細胞の可溶化物を抗原としたウエスタンブロット法により、IgM 抗体の存在を確認した。

7. 抗ヘルペスウイルス薬 acyclovir の効果の検討

Acyclovir は 5 mg/ml の濃度で給水中に加え経口投与した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由により移植に用いられないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験については、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得た。また、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. ヒト化 NOG マウスにおける EBV 複製の検討

ヒトのEBV初感染では感染直後にB細胞、上皮細胞、或いはその両者においてウイルスが複製され、それに引き続きB細胞の潜伏感染が成立すると考えられている。このような初期ウイルス複製により感染を受けるB細胞が増加し、個体としての潜伏感染成立の効率が上昇すると考えられる。ヒト化NOGマウスにおいてこのようなEBV複製が再現されるか否かを検討した。10³ TD₅₀のEBVを感染させて生じたリンパ腫からRNAを抽出しRT-PCRを行ったところ、EBV複製サイクルの遺伝子、BZLF1、

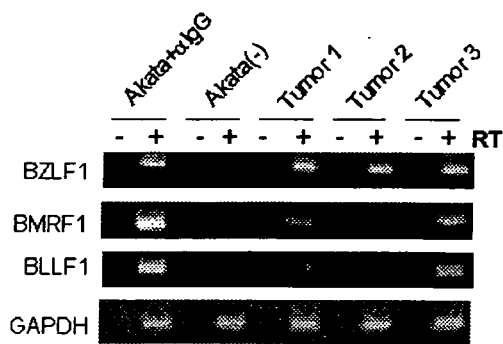


図 1. ヒト化 NOG マウスに生じたリンパ腫における EBV 遺伝子発現 抗 IgG 抗体で処理した Akata 細胞を陽性対照、EBV 陰性 Akata 細胞を陰性対照とし、3 頭の脾臓腫瘍を RT-PCR により調べた。

BMRF1, BLLF1 (gp350/220 をコード)の発現が認められた (図 1)。また、感染後経時的に観察した例では、感染後 17 日のマウスでは複製サイクルの遺伝子発現が認められず、26 日で初めて脾臓において BMRF1 および BLLF1 の発現が認められた。後期遺伝子発現が認められたことからウイルスが複製されている可能性が高いと考えられ、感染後比較的早い時期に EBV が複製される可能性が示された。

2. ヒト化マウスの LPD 発症におけるウイルス複製の役割について

臓器移植により EBV が初感染しそれに引き続き LPD を発症する場合は、感染直後のウイルス複製が発症に重要な役割を果たす可能性があり、その場合 EBV の複製を阻害する抗ヘルペスウイルス薬が治療あるいは予防効果を持つことが期待される。NOG マウスの LPD 発症における EBV 複製の重要性を探る目的で、感染と同時に acyclovir を投与し LPD に対する影響を調べた。ヒト化マウス 14 頭を 2 群に分け一群 (7 頭) には acyclovir を継続投与し、

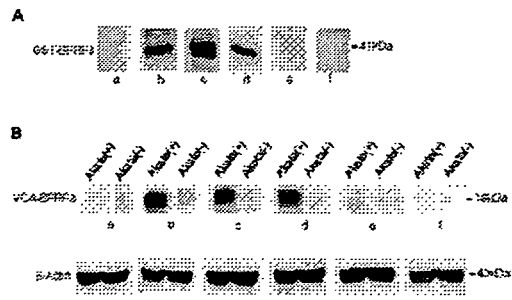


図 2. EBV感染NOGマウス血清中の抗EBV IgM抗体 GST-BFRF3 融合蛋白質 (A) および抗IgG処理した Akata細胞 (B) を抗原とするウエスタンブロット法により、p18^{BFRF3}に対するIgM抗体を検出した。3 例 (b, c, d) のマウス血清の結果を示す。

他群 (7 頭) には緩衝液を同様に投与した。投与開始後 3 日目に 10^8 TD₅₀のEBVを感染させ観察した。両群マウスの生存率、末梢血EBV DNA量に現在までのところ差は認められない。

3. EBV 感染マウスにおけるウイルス特異的抗体産生

EBV感染マウス 28頭の血清をウエスタンブロット法により調べたところ、4 頭の血清がEBV VCA主要成分であるBFRF3 蛋白質に対するIgM抗体を含むことが示された (図 2)。これらの血清は、p18^{BFRF3}以外にも数本のウイルス蛋白質と考えられるバンドを認識するため、現在これらの蛋白質の同定を進めている。

4. EBV 発がん蛋白質 LMP1 によるプロトオンコジーン *Bcl-3* の発現誘導

EBV がコードするがん遺伝子 LMP1 を Flp-In/TREx 発現システムによりヒト T 細胞株 Jurkat に導入し、LMP1 発現を誘導したところ、プロトオンコジーン *Bcl-3* の発現が LMP1 により誘導された。この *Bcl-3* 誘導は、

I κ B のドミナントネガティブ変異体により阻害されること、*Bcl-3* 遺伝子プロモーターの二つの NF- κ B 結合部位を欠損させると消滅することから、転写因子 NF- κ B の活性化を介して起きると考えられた。EBV 感染 T 細胞株 (7 株) および B 細胞株 (6 株) を調べところ、これらの細胞株すべてで *Bcl-3* 発現が認められた。EBV 陰性 T 細胞株はほとんど (7 株中 6 株) が *Bcl-3* 陰性であり、EBV 感染との強い相関が認められた。

D. 考察

EBV感染NOGマウスでは、感染後早い時期にEBVが複製されることが示唆された。EBVの複製を阻害するacyclovirを投与してもLPDの発症と進行に変化が認められなかったことから、このEBV複製がLPD発症に対して積極的な役割を果たす可能性については、現時点では否定的であるが、今後実験の規模を拡大してさらに検討する必要があると考えられる。EBV感染NOGマウスではEBV VCA主成分のBFRF3 蛋白質に対するIgM抗体が産生されることが示された。すでに明らかにされているEBV特異的T細胞応答と合わせて、ヒト化NOGマウスでは、EBVに対する細胞性および液性免疫の両者が誘導されることが立証された。これまでに報告があるヒト化マウスとしては、Rag2^{null}IL-2R γ ^{null}マウスおよびヒト胎児肝臓・胸腺・造血幹細胞移植NOD/*scid*マウスがあり、前者においてはEBV陽性リンパ芽球細胞株による刺激に対するT細胞増殖、後者ではELISPOT法によるEBV感染細胞に対するIFN- γ 産生が示されているが、EBVに対する抗体応答は報告されていない。また、EBV感染

NOGマウスでは低濃度ウイルスの感染後に不顕性持続感染状態となることが分かっている。このように、EBV感染NOGマウスでは、リンパ増殖性疾患、細胞性および液性免疫、不顕性持続感染、などヒトのEBV感染の重要な局面が再現されており、これまで報告されたなかで、最も総合的なモデルであると考えられる。治療法やワクチンの評価など多方面への応用が期待される。

次年度はこのモデルを応用し、LPD 発症に対する抗ヘルペスウイルス薬および CD40 シグナル阻害物質の効果を検討する計画である。またこのモデルにおける EBV 特異的免疫応答のエピトープ解析をテトラマーを用いて解析する。

E. 結論

EBV 感染 NOG マウスにおいてウイルス複製を示唆する結果を得、また EBV VCA 主要成分に対する IgM 抗体を検出した。前年度までの結果と合わせ、NOG マウスはヒト EBV 感染の主要局面を再現する優れたモデル実験系であることが示された。このマウスにおける LPD に対して acyclovir の予防・治療効果は現時点では認められなかった。EBV 発がん蛋白質 LMP1 はプロトオンコジーン *Bcl-3* の発現を誘導することが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura H, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K-I, Yajima M, and 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- κ B. *Virus Res.* 2007 Oct. 24 [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.virusres.2007.09.003.

2) Watanabe, S., Ohta, S., Yajima, M., Terashima, K., Ito, M., Mugishima, H., Fujiwara, S., Shimizu, K., Honda, M., Shimizu, N., and Yamamoto, N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ 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.

2. 学会発表

1) 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ワークショップーウイルス病原性発現機構の解析 (DNA ウイルス) ー. 2007 年 10 月、札幌.

2) 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ワークショップーヒト免疫ー. 東京. 2007 年 11 月.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

免疫抑制剤による CMV 感染症の回避に関する研究

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教授

研究要旨：臓器移植患者は免疫不全状況にあり、サイトメガロウイルス（CMV）感染症は日和見感染として、患者あるいは移植臓器の機能に関わる重要な感染症である。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。以上のように、移植における免疫抑制状態では CMV 感染症は避けがたいが、抗 CMV 活性を有する MIZ のような薬剤を用いることによって、免疫抑制だけでなく CMV 感染症を同時に予防でき、CMV 感染症の際には GCV と相乗作用を示し、治療に貢献できることが示唆された。

A. 研究目的

腎移植患者などの免疫不全患者においては、CMV 感染症は患者あるいは移植腎の予後を左右する重要な感染症である。そのため、臨床においては、その予防と早期診断と早期治療が行われている。しかし、今回報告するように、骨髄移植患者の免疫抑制に使用される薬剤に免疫抑制作用に加えて、抗 CMV 効果を示す薬剤であれば、腎移植患者の CMV 感染症を予防することが可能となる。腎移植患者において、FK506 とプレドニンに加える第 3 の免疫抑制剤として、ミゾリビン（MIZ）またはミコフェノール酸（MMF）を用いた場合に、

免疫抑制効果は同等であるが、CMV 感染症の頻度は、MIZ で有意に低い。

表 10 高用量ミゾリビン群と MMF 群の成績 ②
(両本)

	高用量 ミゾリビン群 (19例)	MMF 群 (26例)
CMV 感染症	0(0%)	7(27%)
CMV-Ag 陽性	5(26%)	15(58%)
ガンシクロビル使用	1(5%)	10(38%)
Ag 出現時期(日)	34 ± 7	41 ± 35

(今日の移植 19:567-582, 2006)

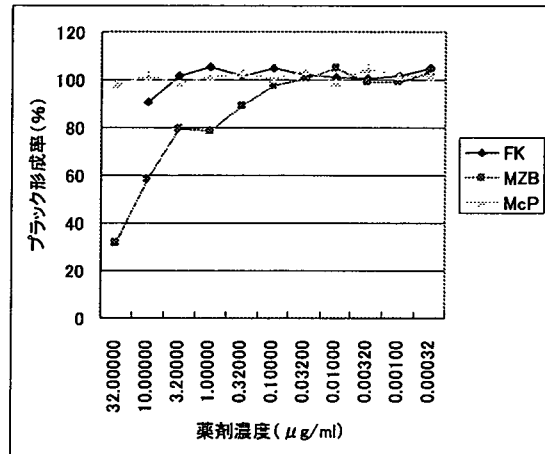
この背景のもと、MIZ の抗 CMV 効果の有無とその作用について解析を行った。そして、MIZ の抗 CMV 作用を明らかにした。

B. 研究方法

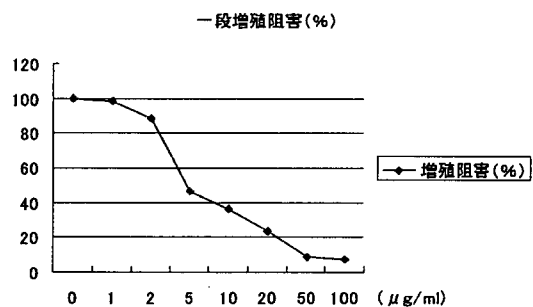
用いた細胞とウイルスは、ヒト肺繊維芽細胞と CMV Towne 株を用いた。昨年報告したガンシクロビル (GCV) とフォスカビル (PFA) 治療に反応しなかった骨髄移植患者から分離された GCV 耐性・臨床分離株を用い、GCV 耐性株に対する MIZ の効果を検討した。MIZ の抗 CMV 効果については、ブラック減少法と CMV の一段増殖の阻害を用いて検討した。ブラック減少法は、6 センチシャーレに約 100 ブラック形成単位 (PFU) のウイルスを感染後、メチルセルロース重層にて、ブラック形成後に固定染色しブラック数を測定した。そして、濃度依存的なブラック減少を定量化して、感受性を決定した。一段増殖法は、T-25 フラスコに単層培養した細胞に、1 PFU/細胞のウイルスを感染させ、薬剤の存在下と非存在下で 72 時間培養し、3 回凍結融解後、その遠心上清のウイルス量をブラック形成によって測定した。また、MIZ と抗 CMV 薬 GCV との抗 CMV 活性に関する相互作用は、2 種の薬剤の様々な濃度の組み合わせの基で形成されるブラック数よりそれぞれの条件で形成されたブラック形成率を算出し、50% に抑制する両薬剤の濃度の組み合わせより、薬剤官の相互作用を評価する isobologram によって、解析を行った。さらに、MIZ 耐性株は、CMV を 100 $\mu\text{g/ml}$ の MIZ の存在下で 3 ヶ月間培養して、100 $\mu\text{g/ml}$ の MIZ の存在下で、57 クロンの候補株を分離し、MIZ に対する感受性より、耐性株を確認した。

C. 研究結果

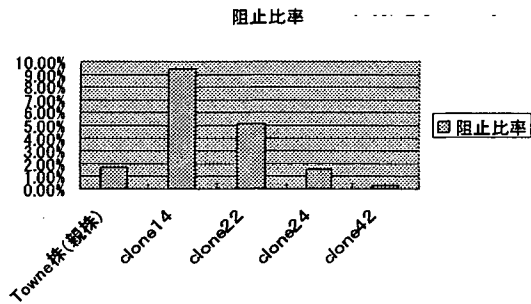
MIZ と MMF と FK506 の CMV 感受性をブラック減少法により比較した (図 1)。



MIZ は、FK506 や MMF と異なり、CMV の増殖を濃度依存的にブラック形成を阻害した。さらに、CMV の一段増殖に対しても、同様に濃度依存的に増殖を阻害した。



MIZ 耐性株を分離することによって、MIZ が直接 CMV に作用していることが確認できる。そして、57 クロンのうち 4 株について、増殖阻害効果で確認した。



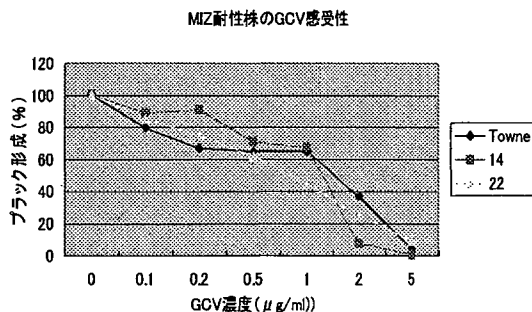
Towne 株に比べ、分離した 4 株のうちの clone24 と 42 は、同等に阻害されウイルス増殖が限られている。一方、clone14 と 22 は、Towne 株に比べ、増殖阻害の程度が低いことから、この 2 株を耐性株とした。

ミソリピン100 μ g/mlでのブラック形成率 (%)

Towne株	Clone 14	Clone 22
100	177 + 47.4	222.7 + 159

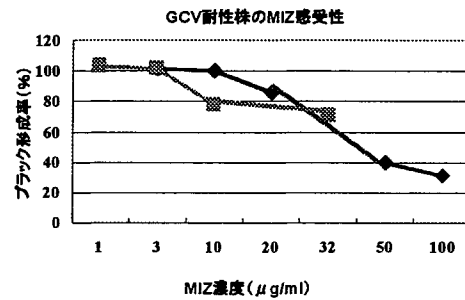
100 μ g/ml の MIZ の存在下での Clone 14 と 22 のブラック形成率が、Towne 株より高いことから、MIZ 耐性株と同定された。

Clone14 と 22 と Towne 株の GCV 感受性をブラック形成の阻害効果について検討した。



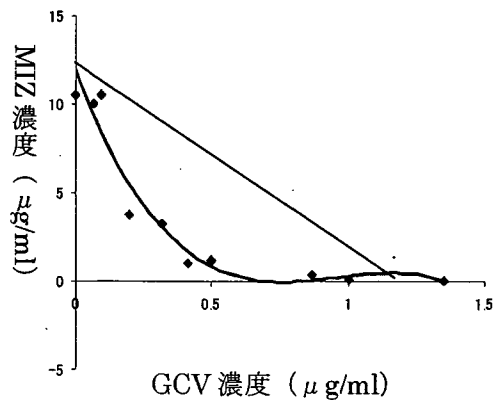
両 MIZ 耐性株は、Towne 株と同等に GCV 感受性であり、MIZ の作用部位と GCV の作用部位が異なることが明らかになった。

MIZ が直接ウイルスを標的しているので、耐性が生じたと考えられる。そのため、逆に、GCV 耐性株に対する MIZ 感受性を検討した。昨年分離された GCV 耐性 CMV 株は、MIZ 感受性であることが明らかになった。



以上のように、MIZ と GCV のそれぞれの耐性株が、それぞれの薬剤に感受性であることから、それぞれの薬剤の作用部位が異なることが確認できた。

上記のように、抗 CMV 作用は有するが、作用部位の異なる MIZ と GCV との抗 CMV 作用を明らかにすることを目的として、以下のように isobologram 解析により、両薬剤の相互作用を明らかにした。



上図のように、両薬剤によるブラック形

成率は、直線の実線は、両薬剤の単純な相加作用を示し、実際の薬剤の効果はその下方にあることから、相乗作用を示すことが確認された。このことは、低濃度の MIZ が存在する時に、GCV を使用すると低濃度でも強い抗 CMV 作用を示す、通常濃度では、上図から数倍の抗 CMV 作用を示すことがわかる。

このように MIZ 耐性株の分離と GCV と MIZ が抗 CMV 効果では相乗作用を示すことから、GCV とは異なった部位で抗 CMV 効果を示すことが裏付けられ、確認できた。

D. 考察

腎移植患者では、免疫抑制剤の血中濃度管理や予防的処置や早期診断早期治療によって、難治性ヘルペスウイルス感染症は減少している。しかし、免疫抑制が強く、免疫不全状態においては、CMV 感染症が発症し、患者や移植腎の予後に大きな影響を耐える。免疫抑制薬に免疫抑制作用以外に、抗 CMV 活性を有して、移植患者の CMV 感染症を減少できれば理想的である。今回、このような薬剤として、MIZ に関する臨床効果が確認できた。そこで、MIZ の抗 CMV 活性に関して検討した。そして、MIZ に、抗 CMV 活性を認め、その作用は、GCV と異なる。さらに、MIZ は GCV との併用により、抗 CMV 活性に相乗効果を示すことを明らかにした。

このことは、腎移植患者の CMV 感染症を免疫抑制剤によって、減少させている臨床的な観察を裏付けるものであった。さら

に、臨床的観察を確認する必要があるが、このことは、免疫抑制薬による免疫抑制を実施ながら、CMV 感染症を軽減できるという新しいコンセプトであると思われる。

E. 結論

腎移植患者の免疫抑制剤により、免疫抑制だけでなく、CMV 感染症の予防の可能性が示唆された。MIZ は、抗 CMV 活性を有し、GCV との作用部位が異なり、GCV と相乗的に抗 CMV 活性を示し、CMV 感染症に対して GCV の有効性を高めることが可能と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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

2. 学会発表

1. Shiraki K, Akahori Y, Suzuki K, Asano Y, Daikoku T, Kurosawa Y. Characterization of

neutralizing epitopes of varicella-zoster virus glycoprotein gH. International Herpesvirus Workshop. July 7-12, Ashville, USA

2. 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. Oct 10-11, 2007

Dubrovnik, Croatia

3. Shiraki K, Hama Y, Yoshida Y, Daikoku T.. Immune response to varicella-zoster virus may cause neurological complication. 13th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. November 5-7, 2007, Orvieto Italy.