

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Oshima K, Kanda Y, Kako S, Asano-Mori Y, Watanabe T, Motokura T, Chiba S, Shiraki K, Kurokawa M. 2008. Case report: persistent cytomegalovirus (CMV) infection after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab: emergence of resistant CMV due to mutations in the UL97 and UL54 genes. *J Med Virol* 80(10):1769-1775.
2. Akahori Y, Suzuki K, Daikoku T, Iwai M, Yoshida Y, Asano Y, Kurosawa Y, Shiraki K. 2008. Characterization of Neutralizing Epitopes of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein H. *J Virol* 83. 2020-2024, 2009
3. Shiraki K, Hama Y, Yoshida Y, Maruyama A, Yasuda M, Tsuda M, Honda M, Takahashi M, Higuchi H, Takasaki I, Daikoku T, Tsumoto T. Antibody to Varicella-Zoster Virus Immediate Early 62 Augments Allodynia in Zoster via Brain-Derived Neurotrophic Factor. Submitted for publication.

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

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

研究分担者 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)  
研究協力者 森 康子 (神戸大学大学院医学研究科・教授、独立行政法人医薬基盤研究所  
感染制御プロジェクト・チーフプロジェクトリーダー(併任))  
櫻井文教 ((独)医薬基盤研究所研究員)  
茂木優香里 (大阪大学大学院薬学研究科大学院生)

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。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。

本研究は、免疫低下状態で発生する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。昨年度においては、VZV orf68 に対する siRNA 発現 Ad ベクターを用いることによって VZV の増殖が抑制可能であることを示した。しかしながら、その増殖抑制の程度は低かったことから、さらに強力な siRNA 発現 Ad ベクターが必要と考え、本年度は複数の siRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターの開発を行った。

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ものと思われる。

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ことが期待される。

昨年度まで我々は、Ad ベクターの E1 欠損領域にヘルペスウイルスの遺伝子に対する shRNA 発現カセットを搭載し、その Ad ベクターを作用させることで、ヘルペスウイルスの感染・増殖抑制効果について検討してきた。その結果、VZV の ORF68 に対する shRNA を細胞にあらかじめ発現させることで、VZV

の増殖を抑制可能であることを明らかにした。しかし

ながら、Ad ベクターを高用量用いた場合には感染細胞に対し毒性が観察されたこと、VZV を細胞に感染させたのち、shRNA 発現 Ad ベクターを作用させても増殖抑制効果は観察されなかったことから、低容量においても強力な RNAi 効果を示す shRNA 発現 Ad ベクターの開発が必要であると考えた。そこで本年度は、ひとつの Ad ベクターに 4 種の shRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターの開発に取り組んだ。本ベクターの長所としては以下の点が挙げられる。①1 粒子の Ad ベクターあたり 4 倍量の shRNA を発現可能であることから、高い knockdown 効率が

期待されるとともに、Ad ベクターの用量を減らすことが可能になるため、細胞毒性を軽減できる。②4 種の異なる遺伝子の発現を同時に抑制可能であることから、より高い増殖抑制効果が期待できる。③ひとつの標的遺伝子に対し、4 種の shRNA を発現可能であることから、より強力な遺伝子発現抑制が期待できる (Fig.1)。以下に Ad ベクター構築方法ならびに遺伝子発現抑制効率の結果について報告する。

## B. 研究方法

### 1. 複数の siRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターの開発

#### (1) シャトルプラスミドの構築

Ad ゲノムの E1 欠損領域もしくは E3 欠損領域に挿入可能な shRNA 発現カセットは、pHM5-U6 および pHM5-H1 より回収した U6 プロモーターおよび H1 プロモーターを含むフラグメントを、pHM15 に挿入することにより作製した。なお、U6 プロモーターと H1 プロモーターの間には、Stuffer として SV40 poly A signal もしくは BGH poly A signal を挿入した (Fig.2)。shRNA をコードした合成オリゴ DNA の配列を以下に示す。H1-Lu-1, 5'-gat ccc cac gct gag tac ttc gaa att tca aga gaa ttt cga agt act cag cgt ttt ttg gaa aca g-3'; H1-Lu-2, 5'-ctg ttt cca aaa aac gct gag tac ttc gaa att ctc ttg aaa ttt cga agt act cag cgt ggg-3'; U6-Lu-1, 5'-cca cgc tga gta ctt cga aat ttc aag aga att tcg aag tac tca gcg ttt ttt gga aat-3'; U6-Lu-2, 5'-tcg aat ttc caa aaa acg ctg agt act tcg aaa ttc tct tga aat ttc gaa gta ctc agc gtg g-3'.

#### (2) Ad ベクタープラスミドの構築

Ad ゲノムの E1 および E3 欠損領域に、shRNA 発現カセットを挿入可能な Ad ベクタープラスミド pAdHM41-E3(+) を作製した。

#### (3) Ad ベクターの調製

ルシフェラーゼ遺伝子に対する shRNA 配列を有した Ad ベクタープラスミドを PacI で処理した後、293 細胞にトランスフェクションすることにより Ad ベクターを得た。精製およびタイターの測定に関しては、定法に従い行った。

### 2. 遺伝子導入実験

既に当プロジェクトにおいて作製済みであったホタルルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞 (A549-Luc) を  $1 \times 10^4$  cells/well で 96 well-plate に播種した。翌日、培地を取り除いたのち、ホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現カセットを搭載した各種 Ad ベクターを、300 vector particles (VP)/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。計 72 時間培養したのち、LT2.0 (Toyooki) を用いてホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

## C. 研究結果

### 1. shRNA 発現カセットを 4 種搭載した Ad ベクターの開発

本研究で作製した新規ベクタープラスミド pAdHM41-E3(+) は、E1 領域を欠損した全長の Ad ゲノムを有したベクタープラスミドであり、ゲノム両末端には PacI 部位を有している (Fig.3)。

また、E3 領域には外来遺伝子の挿入が容易なように I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位を有し、E1 領域への外来遺伝子の挿入も可能なように XbaI 部位を有している。さらに感染域の制御を目的に、ファイバー領域に自在に外来リガンドコード遺伝子を挿入できるようにファイバーノブの HI ループコード領域に Csp45I 部位を、C 末端領域に ClaI 部位を有している。これらは全てユニークな制限酵素部位である。なお、pAdHM41-E3(+) では、クローニング部位の I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位は Ad ゲノムの 28593bp 部位に挿入した。この部位に外来遺伝子を挿入しても、Adenovirus Death Protein (ADP)の発現には影響を与えないため、通常の E3 領域を欠損した Ad ベクターに比べ、ウイルス増幅が容易で高タイトターのベクターが得やすいという特徴を有する。

pAdHM41-E3(+)を用いることにより、下記に記載の shRNA 発現 Ad ベクターを *in vitro* ライゲーションを利用することで簡便に作製可能であった。

## 2. shRNA 発現カセットを 4 種搭載した Ad ベクターの遺伝子発現抑制効果に関する検討

次にモデル標的遺伝子として、ホタルルシフェラーゼを選択し、ホタルルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞 (A549-Luc) に対し、E1 欠損領域にホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現カセットを挿入した Ad ベクター (Ad-sh-Luc1)、E3 欠損領域に挿入した Ad ベクター (Ad-sh-Luc3)、今回作製した 4 つの

shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクター (Ad-4xsh-Luc) を 300 VP/cell で作用させた。その結果、Ad-4xsh-Luc を作用させた群においては、他群と比較し、有意に高い Knockdown 効率を示した (Fig.4)。この結果より、4 種の shRNA 発現カセットを搭載することにより、より高い Knockdown 効率を得られることが示唆された。現在、それぞれ異なる遺伝子に対する shRNA の発現カセットを搭載し、その Knockdown 効率について検討している。

## D. 考察

本研究では、より高い Knockdown 効率を示す shRNA 発現 Ad ベクターを開発することを目的として、4 つの shRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターを開発した。モデル標的遺伝子であるホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現カセットを 4 つ搭載した Ad ベクターを作製し、ホタルルシフェラーゼ安定発現株に作用させたところ、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し、有意に高い Knockdown 効率を示した。本 Ad ベクターは単純に計算すると、従来の Ad ベクターと比較し、4 倍量の shRNA が発現しているために、高い Knockdown 効率が得られたものと思われる。今回は 300 VP/cell の用量で細胞に作用させたが、3000 VP/cell で作用させた場合には、どのベクターにおいても Knockdown 効率は同程度であった (data not shown)。これは shRNA の転写以外のステップが飽和していることを示唆しており、今後は Ago2 や Exportin-5 など、RNAi 機構に関与するとされるたんぱく質を同時に発現させることにより、より高い Knockdown 効率が期待できるものと思われる。

る。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

櫻井 文教、中島 加珠子、吉井 洋紀、松浦 正明、  
川端 健二、森 康子、水口 裕之、siRNA 発現 Ad  
ベクターを用いた水痘・帯状疱疹ウイルスの増殖抑  
制。遺伝子・デリバリー研究会第 8 回シンポジウム  
2008 年 5 月 9 日

#### 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。

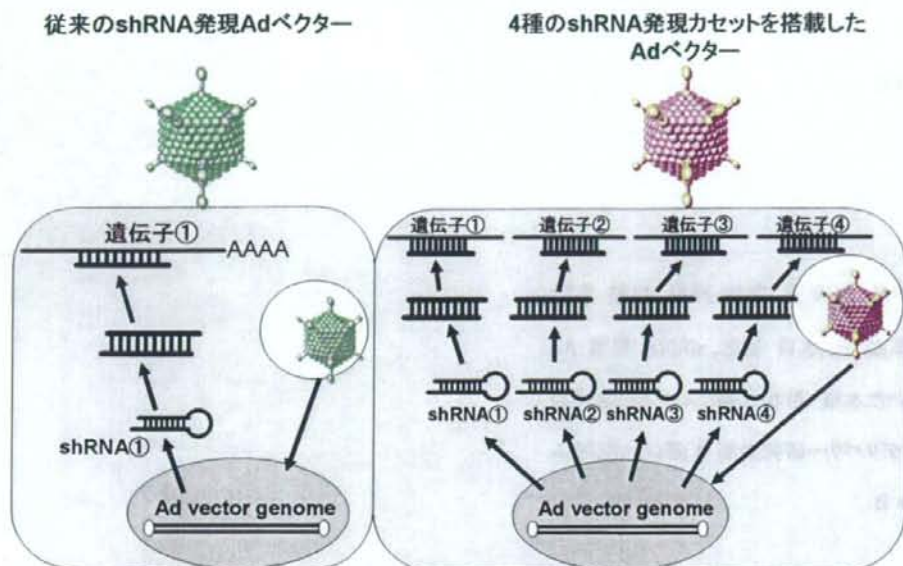


Fig.1 Efficient knock-down of target genes by Ad vectors carrying four different shRNA expression cassettes.

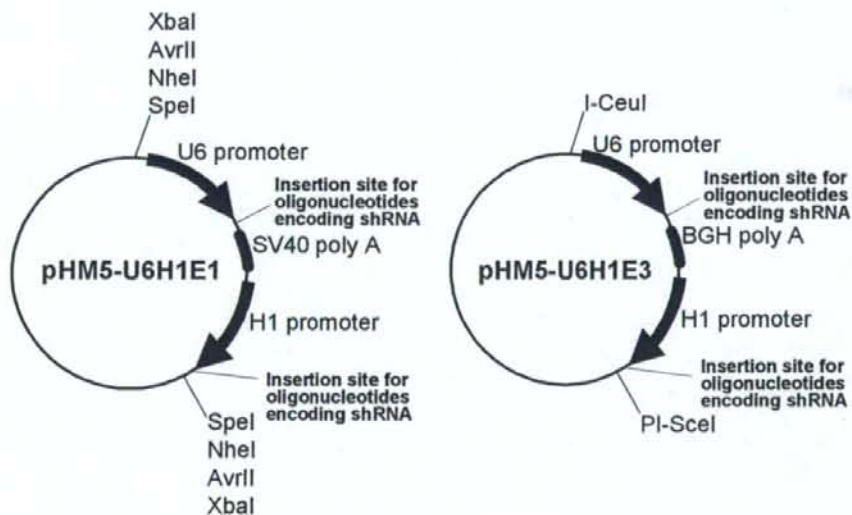


Fig.2 Shuttle vectors carrying shRNA-expression cassettes.

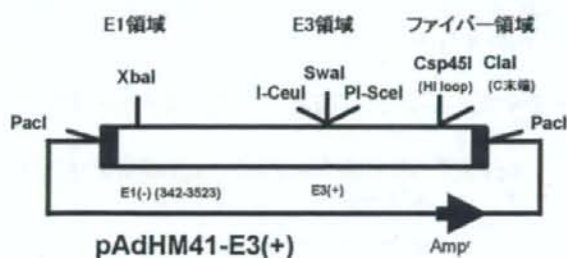


Fig.3 A vector vectors pAdHM41-E3(+)

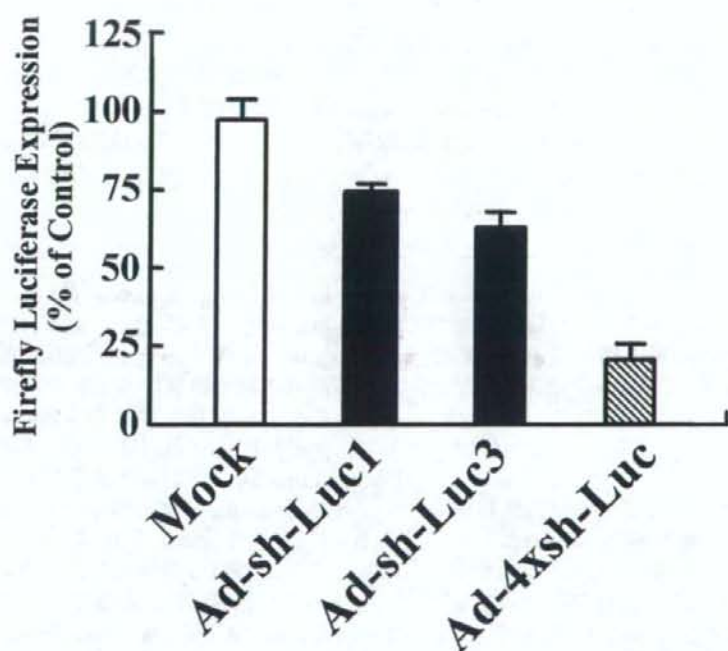


Fig.4 Knockdown efficiencies in A549 cells stably expressing firefly luciferase after transduction with Ad vectors expressing shRNA against firefly luciferase. A549-Luc cells were transduced with the Ad vectors at 300 VP/cell for 1.5 hr. After a 72 hr-incubation, luciferase activities were determined by chemiluminescence assay.

人工リンパ組織による免疫不全マウスへの効果的な適応免疫機能導入に関する研究

研究分担者 末松 佐知子 独立行政法人医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト  
プロジェクトリーダー

研究要旨： ウイルス感染の治癒にはウイルス感染細胞に特異的なリンパ球による適応免疫機能が重要な役割を果たす。我々の開発した人工リンパ組織には適応免疫反応の誘導に重要な役割を果たす細胞が集積して免疫機能を発揮することが分かっており、免疫不全状態におけるウイルス感染症に対する治療あるいは予防効果が期待できる。

今回、既知の抗原を発現させた細胞株に反応するリンパ球を組み込んだ人工リンパ組織を構築して重症複合性免疫不全 (SCID)マウスに導入しておき、当該細胞株を皮内移植すると移植した細胞に対して増殖抑制が起こり、効果的に排除されることが分かった。この細胞株に対する増殖抑制効果は、細胞株で免疫したマウスから調整したリンパ球を静脈経路で導入した場合に比べて、有意に優れていた。また、人工リンパ組織を導入して細胞株を皮内移植した SCID マウスの脾臓細胞中にはインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生細胞が多数存在し、さらに当該細胞株に対する細胞傷害活性を示すことが明らかになった。これらの結果から人工リンパ組織は免疫不全状態でのウイルス感染症の予防や治療法の開発に役立つ事が示唆された。

#### A. 研究目的

組織工学的に構築した人工リンパ組織を利用して、免疫不全個体においてウイルス特異的な適応免疫機能を賦活し、ウイルス感染症の予防や治療に応用すること。

#### B. 研究方法

1.人工リンパ組織導入免疫不全マウスに移植した細胞株に対する増殖抑制効果の検討。

既知の抗原を発現する細胞株(flex細胞)で予め一次免疫しておいた正常 BALB/c マウスを準備した。このマウスを二群に分けて、第一群には flex 細胞で刺激した骨髄由来樹状細胞 (flex-BMDC)と BALB/c 胸腺由来ストローマ細胞株 (TEL-2 細胞)をコラーゲンスポンジに滴下して腎皮膜下に移植し、flex 細胞を認識する免疫細胞が集積した「flex 細胞特異的人工リンパ組織 (flex-aLT)」を構築した。第二群のマウスには flex-BMDC を  $10^6$  個投与した。三週間後に第一群のマウスから flex-aLT を回収して SCID マウスの腎皮膜下に移植した (aLT-SCID)。もう一群のマウスからは脾臓細胞を調整し、SCID マウス一匹あたり  $4 \times 10^7$  個の脾臓細胞を静脈内投与した (spleen-SCID)。また未治療対象群として SCID マウスにコラーゲンスポンジのみを腎

皮膜下に移植した (sponge-SCID)。

aLT-, spleen-, および sponge-SCID に flex 細胞を一匹当たり  $4 \times 10^6$  個ずつ皮内投与し、皮内に形成される腫瘍の大きさを定期的に計測することにより flex 細胞の増殖抑制を検討した (一群あたりの SCID マウスの数は 5-7 匹)。sponge-SCID では 3 週間にはすべてのマウスで flex 細胞による腫瘍の大きさが最小のものでも  $1 \text{ cm}^3$  を超えた。一方、spleen-SCID では 3 週間後の腫瘍の大きさは sponge-SCID の腫瘍と比較して  $1/3 \sim 1/2$  以下であった。aLT-SCID ではさらに flex 細胞の増殖が遅く、一旦腫瘍ができたマウスでも最終的に flex 細胞が完全に排除されたマウスが半数程度存在した。spleen-SCID に追加の治療として flex-BMDC を 1 週おきに  $10^6$  個ずつ 3 回皮下投与すれば aLT-SCID での細胞増殖抑制効果と同程度であった。

2. aLT-SCID 脾臓細胞による flex 細胞に対する細胞傷害性と IFN- $\gamma$  産生の検討。

flex 細胞を皮内投与した aLT-SCID から調整した脾臓細胞をエフェクター細胞、flex 細胞を標的細胞として試験管内で細胞傷害活性を検討したところ、aLT-SCID の脾臓細胞は flex 細胞に対して細胞傷害活性を示した。また、



ELISPOT 法によりこの脾臓細胞中には IFN- $\gamma$  産生細胞が多数存在する事がわかった。

#### (倫理面への配慮)

本研究の動物実験は医薬基盤研究所動物実験指針に基づいた研究計画に従って行われた。

### C. 研究結果

flex 細胞であらかじめ免疫した BALB/c マウスの腎皮膜下で免疫細胞を集積させて構築した flex-aLT を導入することにより、SCID マウスに flex 細胞を攻撃する免疫細胞が移入されて皮内に移植した flex 細胞を排除する事が証明された。flex-aLT の導入による SCID マウスへの flex 細胞攻撃細胞の移入と flex 細胞に対する増殖抑制効果は flex 細胞であらかじめ免疫してさらに flex-BMDC を投与した BALB/c マウスから調整した脾臓細胞の大量移入よりも効果的であった。また、flex 細胞の皮内投与を受けた aLT-SCID の脾臓細胞は試験管内でも flex 細胞に対して細胞傷害活性を示し、IFN- $\gamma$  産生細胞が多数存在する事が証明された。

### D. 考察

人工リンパ組織内に存在する免疫系細胞の数は比較的少なく人工リンパ組織の導入により一匹の SCID マウスに移入される免疫細胞の数は  $10^6$  個前後であることが分かっている。flex-aLT 導入によって移入される細胞が少数であるにも関わらず、flex 細胞であらかじめ免疫してさらに flex-BMDC を投与した BALB/c マウスの脾臓細胞を  $4 \times 10^7$  個導入した場合に比較して flex 細胞に対して強い傷害活性を示す。このことは人工リンパ組織の構築方法とその免疫組織としての特殊な組織構造によって(1)flex 細胞を認識する免疫細胞(メモリー細胞)が人工リンパ組織の中に選択的に集積した、あるいは(2)IFN- $\gamma$  以外にも免疫機能を活性化させるサイトカイン産生細胞が多数存在する可能性が考えられる。

### E. 結論

免疫不全個体では様々な理由で適応免疫が抑制されており、ウイルスに対するワクチン投与は必ずしも効果的ではない。今回の結果から、人工リンパ組織構築を応用すれば優れた免疫機能をもつ免疫細胞の濃縮、あるいは免疫細胞

を刺激して免疫機能を賦活する環境を体内に新たに構築する方法の開発につながり、免疫不全状態でのウイルス感染症予防あるいは治療につながる可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

(該当せず)

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

末松 佐知子, 人工リンパ組織構築とは何か, Organ Biology 15(1) 23-32, 2008

#### 2. 学会発表

1. SUEMATSU Sachiko, HATTORI Yuki. Characteristic vascular system induction is important for artificial lymphoid tissue construction and its immune function. 第 38 回日本免疫学会総会 学術集会 京都 2008 年 12 月

#### 2. 服部 祐紀, 末松 佐知子

腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果. 第 8 回再生医療学会総会 東京 2009 年 3 月

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

研究分担者 羽田敦子（財団法人田附興風会医学研究所・北野病院第 1 研究部）

研究要旨：水痘帯状疱疹ワクチン接種の必要性の根拠となる疾患別帯状疱疹発症頻度、発症リスクを検討した。

A. 研究目的

帯状疱疹発症のリスクが高い疾患を知り、安全に効率良く予防ができる疾患別帯状疱疹発症頻度、発症リスクを検討する。

B. 研究方法

2001 年 9 月～2007 年 12 月に北野病院を受診された入院、外来患者 59,294 名の患者記録をもとに、19 基礎疾患の帯状疱疹発症リスクを検討した。1 対象基礎疾患発症後に帯状疱疹を発症した患者が、対象以外の 16 基礎疾患の発症患者と比較した場合の帯状疱疹発症リスクをコックス比例ハザードモデルにより解析した。

（倫理面への配慮）後方視的研究のため不要。

C. 研究結果

うつ病、シェーグレン症候群、白内障、HIV 感染を除く、脳腫瘍、肺癌、乳癌、胃癌、直腸癌、婦人科癌、悪性リンパ種、SLE、RA、シェーグレン症候群、糖尿病、高血圧、腎不全、

骨折、椎間板ヘルニアに、おいて発症の危険度が上昇した。

D. 考察

免疫機能異常を来す基礎疾患は帯状疱疹発症のリスクとなる可能性が示唆された。

E. 結論

悪性腫瘍、自己免疫疾患、糖尿病と高血圧患者は帯状疱疹発症の危険度が高かった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Risk of herpes zoster in patients with underlying chronic diseases (submitting to Journal of Infection 2009)

2. 学会発表

1) Hata, A., Matsuda, M., Ohkusa, Y.

History of certain diseases poses higher risk for herpes zoster: a hospital-based study. 33<sup>rd</sup> International Herpesvirus Workshop, July 27- August 1, 2008, Estoril, Portugal.

2) 羽田敦子、菅原民枝、大日康史 带状疱疹発症における基礎疾患のリスク 第12回

日本ワクチン学会学術集会 2008年11月  
8-9日 熊本県熊本市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

VZV 特異的細胞性免疫能の評価法の確立と疾患における免疫能の比較検討

研究分担者 森 康子

（神戸大学大学院医学研究科・教授、

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併任）

研究協力者 岡本成史（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・サブプロジェクトリーダー）

松浦正明（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・協力研究員）

羽田敦子（財団法人田附興風会医学研究所・第1研究部・主任研究員）

研究要旨：帯状疱疹の発症には、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）反応性ヘルパー1型T細胞による細胞性免疫応答の抑制との関連が指摘されている。疫学的に帯状疱疹を発症しやすいとされる疾患の有病者において、この細胞性免疫応答の抑制の可能性を検討するために、健康人および糖尿病患者において、IFN $\gamma$ -ELISPOT法を用いてVZV特異的細胞性免疫能を測定した。その結果、糖尿病患者においては、健康人と比べてVZV特異的細胞性免疫能が有意に低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

疫学的に帯状疱疹を好発しやすいとされる糖尿病患者におけるVZV細胞性免疫をIFN $\gamma$ -ELISPOT法で測定し、健康人と比較することで、VZV再活性化と細胞性免疫能の相関性を明らかにする。

B. 研究方法

1. 対象

田附興風会北野病院の糖尿病患者（男性65人、女性30人、平均年齢59.7歳）、および健康人（男性54人、女性47人、平均年齢53.5歳）から採血を行い、後述する各種測定に使用した。

（倫理面への配慮）

本研究は、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った。研究対象者に対しての個人の不利益・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、研究機関の倫理委員会によって承認されたインフォームドコンセントにサイン或いは捺印を得た上で研究を行った。本研究は田附興風会北野病院および医薬基盤研究所で行われたものである。

2. PBMCの分離とIFN $\gamma$ -ELISPOT法

採血した血液からFicollによる比重遠心

分離法により末梢血単核球(PBMC)を分離、採取した。IFN $\gamma$ -ELISPOT法は、以下に示す方法で行った。IFN $\gamma$ 抗体(clone2G1, Endogen)をコートした96穴メンブレンプレート(ミリポア)にPBMCを $4 \times 10^5$ 個加え、その上にVZVワクチン原液(阪大微研、 $9 \times 10^5$  pfu/ml)を感染力価 $3 \times 10^4$  pfuになるようにし、添加した。一方、PHAによる刺激も行った。37°C, 5% CO $_2$ 条件下で36時間培養した後、プレートを洗浄し、ビオチン標識抗IFN $\gamma$ 抗体(clone B133.5, Endogen)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(1:1000, BD)、TMB-H発色液(Moss)を反応させ、スポットを得た。スポット数の測定はKS-ELISPOT測定装置(Karl Zeiss)により行った。

### 3. 血清中の抗VZV抗体価の測定

抗体価の測定は、gpELISA法により行った。

## C. 研究結果

### 1) 糖尿病患者におけるVZV特異的細胞性免疫能

95人の糖尿病患者においてIFN $\gamma$ -ELISPOT法によりVZV特異的細胞性免疫を調べた(図1)。その結果、糖尿病患者の細胞性免疫応答が健常人(101人)と比べて有意に低下していることが明らかとなった。糖尿病患者のPHA刺激による反応性は健常人と同様に良好に保たれていた。また、男女毎の比較では有意な差は見られなかった。

一方、年齢別での比較では、40歳代、50歳代、60歳代のいずれにおいても糖尿病患者の方が健常人と比べて細胞性免疫応答の低い傾向がみられたが、検体数が少ないために有意

な差を認めることは出来なかった(図2)。

### 2) 糖尿病患者におけるVZV特異的体液性免疫能

次に体液性免疫応答の比較検討を行った。その結果、糖尿病患者群および健常人群間には抗体価に有意な差は見られなかった(図3)。また、年齢別での比較においても一方の群に偏向した形で抗体価の低下を認めることもできなかった(図4)。

## D. 考察

我々は、これまで帯状疱疹発症の危険性が高い人々をVZV特異的な細胞性免疫応答の低下によって検出することを目的とした検査方法を確立するための研究を行い、水痘抗原皮内試験およびIFN $\gamma$ -ELISPOT法がその検査方法として利用できる可能性を示してきた。しかし、これまでの測定は加齢による免疫応答の変化に限定して行ったデータに基づいて示唆したものであり、疫学的に帯状疱疹の発症の危険性が高いとされる疾患の患者においても同測定によって検出が可能であるかについては明らかでない。そこで、今回、疫学的に帯状疱疹の発症の危険性が健常人と比べて高いことが報告されている糖尿病患者群を用いて、IFN $\gamma$ -ELISPOT法による糖尿病患者と健常人とのVZV特異的な細胞性免疫応答の比較検討を行った。その結果、糖尿病患者が健常人より細胞性免疫応答が有意に低下していることを明らかにした。一方、体液性免疫応答の測定においては、両者間に有意な差が見られなかったことから、VZVに対する細胞性免

疫応答の測定が有病者における帯状疱疹発症の高リスク者の検出方法としても適当であることを示した。

また、有病者と健常人における比較の結果から、糖尿病患者では免疫状態が健常人に近いにもかかわらず、VZV 特異的な細胞性免疫のみが選択的に低下している傾向が見られた。

しかし、以上の結果を示したにもかかわらず、統計学的にこのデータは、糖尿病患者と健常人との年齢分布に有意な差が見られることや両群の男女比が著しく異なるなどの問題があるため、これらの問題を解消した信頼性の高いデータによる比較検討が必要である。

#### E. 結論

1. 糖尿病患者は健常人と比較して VZV 特異的細胞性免疫能が有意に低下している傾向が見られ、この事が帯状疱疹を好発する原因であることが予測された。またこの結果から、IFN $\gamma$ -ELISPOT 法が、加齢のみならず、疾患を原因とする糖尿病発症のハイリスクの検出にも利用できる可能性を示唆した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sadaoka, K., S. Okamoto, Y. Gomi, Y. T. Tanimoto, T. Yoshikawa, Y. Asano, K. Yamanishi, and Y. Mori. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity - Comparison of VZV-skin test and

interferon-gamma ELISPOT assay. *J Infect Dis* 198:1327-1333, 2008.

2) 岡本成史、森 康子. 帯状疱疹ワクチン開発に向けた取り組み. *臨床と微生物* 36(1):69-73, 2009.

#### 2. 学会発表

1) 定岡 恵、岡本成史、五味康行、谷本武史、石川豊数、吉川哲史、浅野喜造、高橋理明、山西弘一、森 康子. 水痘帯状疱疹ウイルス特異的な細胞性免疫能測定における皮内試験と IFN-gamma ELISPOT 法との比較検討. 第23回ヘルペスウイルス研究会. 2008年6月5日~7日 鳥取県西伯郡伯耆町.

2) Sadaoka, K., Okamoto, S., Gomi, Y., Tanimoto, T., Ishikawa, T., Yoshikawa, T., Asano, Y., Yamanishi, K., Mori, Y. Comparison of skin test and interferon-gamma ELISPOT assay on measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity. 33<sup>rd</sup> International Herpesvirus Workshop, July 27-August 1, 2008, Estoril, Portugal.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

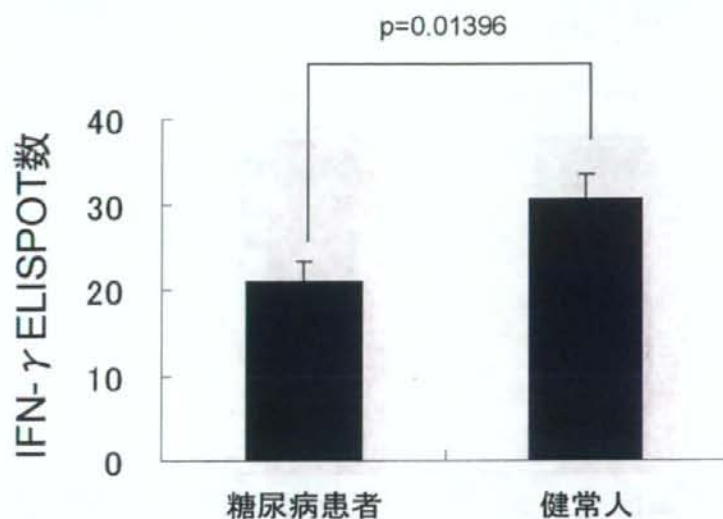


図1 糖尿病患者と健常人におけるVZVに対する細胞性免疫応答. IFN- $\gamma$  ELISPOT法により検討した.

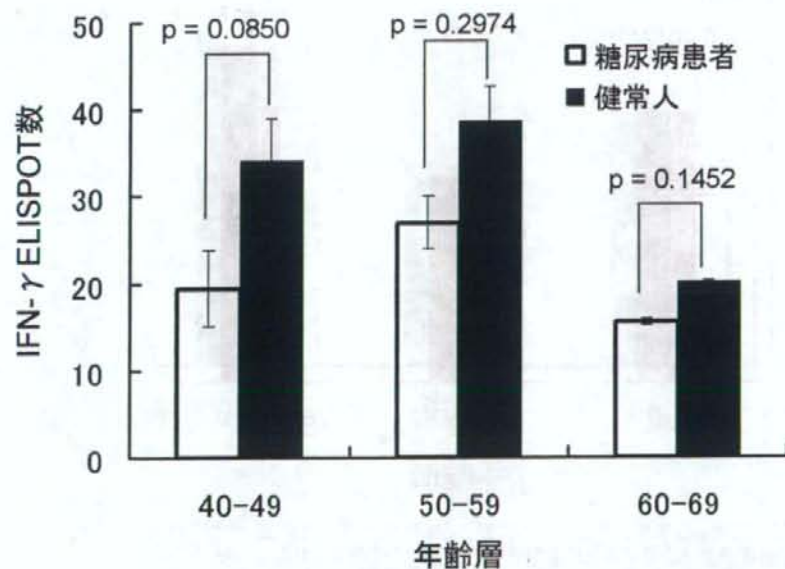


図2 年齢層別による糖尿病患者と健常人におけるVZVに対する細胞性免疫応答. それぞれの年齢層での糖尿病患者と健常人との有意差(5%危険率)は認められなかった.

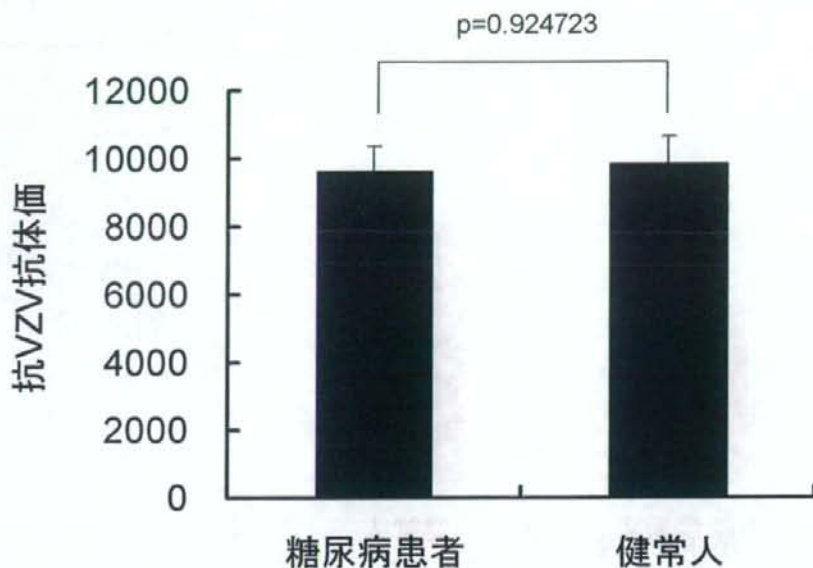


図3 糖尿病患者と健常人におけるVZVIに対する抗VZV抗体価.

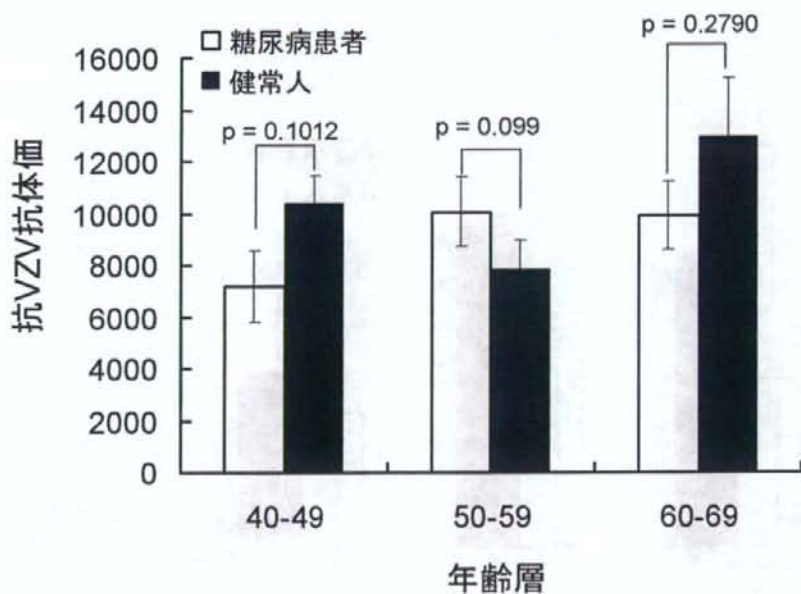


図4 年齢層別による糖尿病患者と健常人におけるVZVIに対する抗体価. それぞれの年齢層での糖尿病患者と健常人との有意差(5%危険率)は認められなかった.



HHV-6 の病態解明 ～HHV-6 と樹状細胞との相互作用解析～

研究分担者 森 康子

（神戸大学大学院医学研究科・教授、

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併任）

研究協力者 武本 眞清（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・研究員）

研究要旨：ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 感染が、樹状細胞の機能、とりわけサイトカイン・ケモカイン等の産生能にどのような影響を及ぼすかを検討した。前回までの報告通り、単球由来樹状細胞 (MoDC) は HHV-6 感染に対して、活発にインターロイキン等のサイトカインを産生するような応答はみせない。ところが、MCP-1, MCP-2, IP-10 等一部のケモカインは HHV-6 感染によって顕著に上昇した。同様の上昇傾向は、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) でも確認され、βヘルペスウイルスに共通の現象であることが判明した。UV で不活化したウイルスでも同程度の上昇を引き起こすことから、ケモカイン産生にはウイルス遺伝子発現は不要であり、ウイルス粒子の付着もしくは侵入がトリガーとなっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

DC は多彩なサイトカイン・ケモカインを産生して局所の炎症と免疫反応とをリンクさせ、また自身もケモカインレセプターを介して組織間をダイナミックに移動する。HHV-6 による感染はこのような DC の機能を修飾するのか、可溶性因子の側面から明らかにすることを目的として検討した。

B. 研究方法

末梢血由来単核球 (PBMC) より CD14 マイクロブーズ (Miltenyi) を用いて単球を分離し、GM-CSF および IL-4 存在下に未熟 MoDC を得た。HHV-6B HST 株、HHV-6A U1102 株、HHV-7 KHR 株をそれぞれ MoDC に遠心法 (2,000xg, 1 h, 37°C) で感染させた後、経時的に培養上清を回収した。

Human chemokine 10-plex kit (Eotaxin, GRO- $\alpha$ ,

IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES) (Biosource) を用いて、感染 DC 培養上清を Bio-Plex system (BioRad) に供し、サンプル中のケモカインの濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

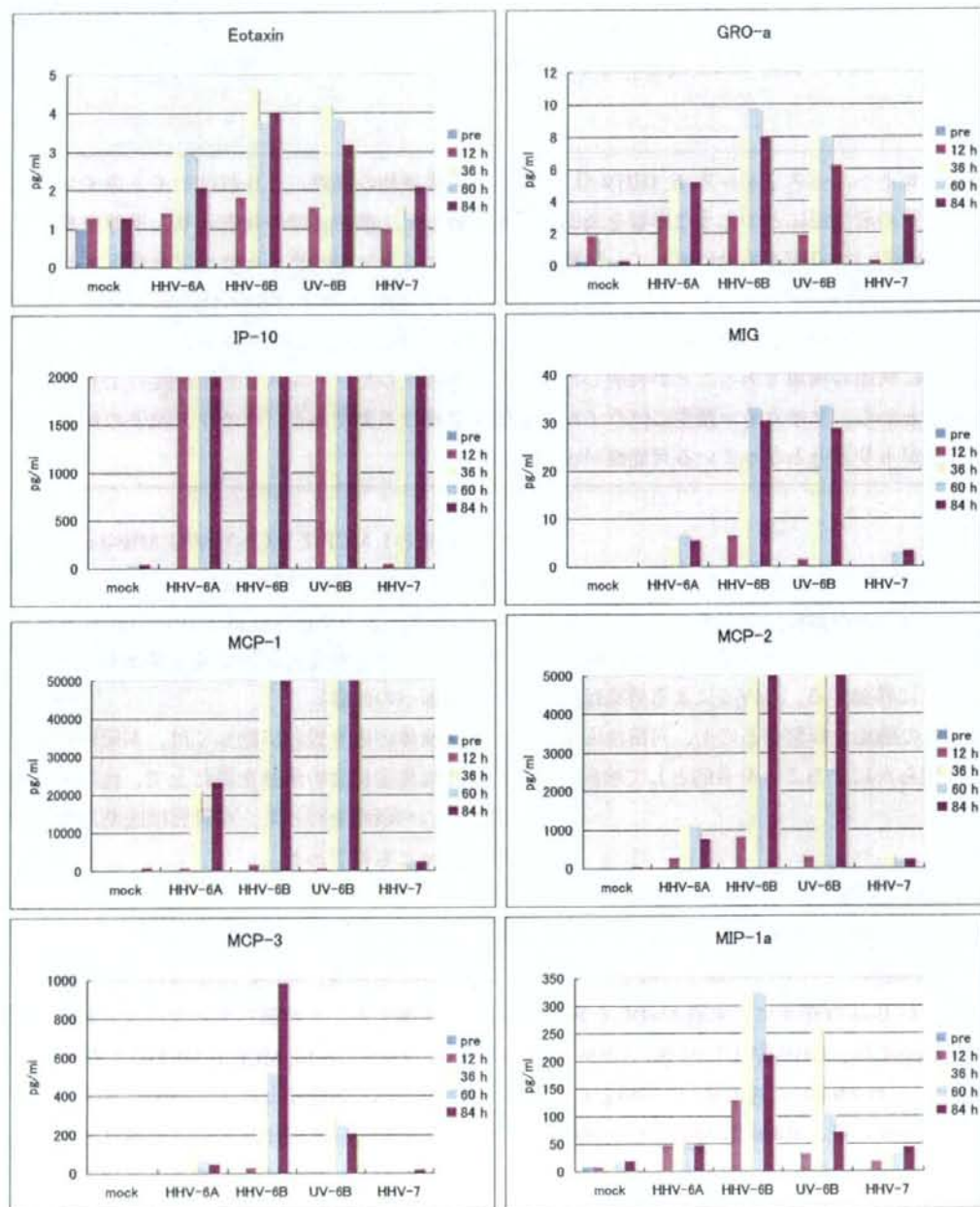
ヒト検体の取り扱いに際しては、本研究機関における倫理委員会の承認を得た上で、倫理指針を遵守しつつ研究を行った。本研究は医薬基盤研究所で行ったものである。

C. 研究結果

1) HHV-6 感染後、MoDC は多種類のケモカイン産生を亢進することが明らかとなった。特に顕著に上昇したのは IP-10, MCP-1, MCP-2 であり、検出限界を上回る値を示した。βヘルペスウイルス (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) 間で比較すると、上昇するケモカインはいずれのウイルスでも同様の傾向であったが、上昇幅は HHV-6B が最も大き

く、次いで HHV-6A、HHV-7 の順であった。経時的には、ほとんどのケモカインが 36 時間以降に最大値を示したが、IP-10 のみ 12 時間で早くも検出限界を超えた。UV で不活化した HHV-6B でも、ほとんどのケモカインは同レベルの上昇幅であったことから、これらケモカインの産生にウイルス遺伝子発現は不要であり、ウイルス粒子を構成

するタンパクもしくはゲノム DNA が引き起こしているものと考えられた。唯一 MCP-3 は、生ウイルス感染で右肩上がり、不活化ウイルス感染で 36 時間をピークとして右肩下がりとなっていることから、ウイルス粒子による産生誘導後に、改めてウイルス遺伝子発現によっても産生誘導されていることが示唆された。



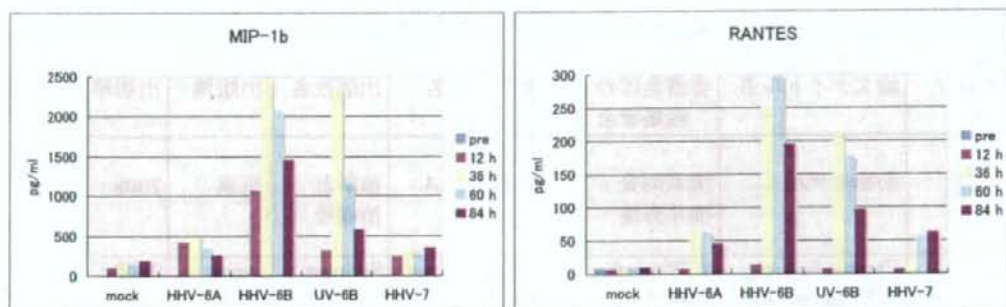


図1. MoDCのケモカイン産生

HHV-6A U1102株、HHV-6B HST株、HHV-7 KHR株をそれぞれMoDCに感染させ、12h、36h、60h、84h後に上清を回収し、一旦-80°Cに保存した後、ケモカイン濃度を測定した。UV不活化ウイルスとして、2,500 J/m<sup>2</sup>のUVを照射したHHV-6B(UV-6B)を用いた。

#### D. 考察

今回発見した、HHV-6感染DCからの多量のケモカイン産生は、DC周囲へのリンパ球の遊走を促すのではないかと予想される。前回の報告で我々は、HHV-6感染DCではCCR7の発現が起きない等、DC自身のリンパ節への遊走の可能性は低いと結論づけたが、今回ケモカイン産生によってそれを補完している可能性が新たに考えられた。

#### E. 結論

HHV-6感染によって、DCが様々なケモカインを産生することが確認された。これはβヘルペスウイルス感染に対するDCの共通した応答である可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takemoto M, Imasawa T, Yamanishi K, and Mori Y. Role of dendritic cells infected with human herpesvirus 6 in virus transmission to CD4<sup>+</sup> T cells. *Virology* [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

1. Masaya Takemoto, Takayoshi Imazawa, Koichi

Yamanishi, and Yasuko Mori. 6<sup>th</sup> International Conference on HHV-6 & 7 (2008年6月19日-22日, Baltimore, Maryland, USA) Human herpesvirus-6 effectively transmits from dendritic cells to CD4<sup>+</sup> T cells.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤原成悦	動物モデル	清水則夫 柳井秀雄	EB ウイルス	診断と治療社	東京	2008	88-92
K. Kondo	Chronic Fatigue Syndrome and Herpesvirus Infection.	Y. Watanabe et.al.	Fatigue Science for Human Health.	Springer Press	Japan	2008	137-152
K. Kondo and Yamanishi K.	HHV-6A, 6B, and 7: molecular basis of latency and reactivation.	Ann Arvin et.al.	Human Herpesviruses.	Cambridge University Press	U.K.	2007	843-849

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukui Y, Shindoh K, Yamamoto Y, Koyano S, Kosugi I, Yamaguchi T, Kurane I, Inoue N.	Establishment of a cell-based assay for screening of compounds inhibiting very early events in cytomegalovirus replication cycle and characterization of a compound identified using the assay.	Antimicrob Agents Chemother.	52	2420-7	2008
Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H, Tsutsui Y, Sato Y, Yamada S, Inami Y, Nakamura K, Yokoi M, Kurane I, Inoue N.	Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture.	Virology	379	45-54	2008
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
Fujita A, Ihira M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Suga S, Asano Y, Yagasaki H, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T.	Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients.	J Infect	57	241-248	2008
Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and Fujiwara S.	CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells.	Microbes Infect.			印刷中