

200829012B

厚生労働科学研究費補助金

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)

平成18年度-平成20年度

総合研究報告書

平成21年3月

研究代表者 森 康子

(神戸大学大学院医学研究科)

# 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  
研究代表者：森 康子 神戸大学大学院・医学研究科(H20年)、医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト(H18,19年)

## 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・・・ 12  
研究分担者：井上直樹（国立感染症研究所ウイルス第1部）

- 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  
・・・ 21  
研究分担者：吉川哲史（藤田保健衛生大学・医学部）

- 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  
・・・ 26  
研究分担者：長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）

- 臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究：  
ウイルス感染症の発生機序の解明と、効果的な予防策に関する研究「ヒトヘルペスウイルス6、7  
とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」・・・ 32  
研究分担者：近藤一博（東京慈恵会医科大学・ウイルス学講座）

- EBウイルス感染症の発生機序と治療法に関する研究・・・ 41  
研究分担者：藤原成悦（国立成育医療センター研究所・母児感染研究部）

- 骨髄移植患者の難治性ヘルペスウイルス感染症に出現する薬剤耐性ウイルス・・・ 49  
研究分担者：白木公康（富山大学・医学薬学研究部ウイルス学）

- 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・・・ 55  
研究分担者：水口裕之（医薬基盤研究所・遺伝子導入制御プロジェクト）

- 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・・・ 72  
研究分担者：末松佐知子（医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト）

- 臓器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・・・ 76  
研究分担者：羽田敦子（(財)田附興風会医学研究所・北野病院第1研究部）

- 水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）特異的細胞性免疫応答を用いた帯状疱疹発症高リスク者の検出方法の検討・・・ 78  
研究分担者：森 康子（神戸大学大学院・医学研究科、医薬基盤研究所・感染制御プロジェクトリーダー併任）

- HHV-6の病態解明ーHHV-6と樹状細胞との相互作用解析ー・・・ 84  
研究分担者：森 康子（神戸大学大学院・医学研究科、医薬基盤研究所・感染制御プロジェクトリーダー併任）

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・ 89

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

研究代表者：森 康子（神戸大学大学院医学研究科・教授）

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、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。3年間で以下の成果を得た。(1) VZV 特異的細胞性免疫能の測定法として皮内テストの有用性が示された。(2) 糖尿病患者において健常者に比較し、VZV 特異的細胞性免疫能の低下が有意に認められた。(3) HHV-6 感染によって誘導されるサイトカイン、ケモカインを同定した。(4) HHV-6 の初感染における伝播機構を *in vitro* において明らかにした。(5) 全血から抽出した DNA をリアルタイム PCR 法でモニタリングすることにより、HHV-6 再活性化を確実に診断ができることが明らかとなった。(6) 移植後 HHV-6 脳炎患者髄液中のウイルス DNA 量は極めて高いことを明らかにした。(7) ランダムな 9600 化合物を検索し、CMV 及び VZV に対し EC50 が 20  $\mu$ M 以下の化合物を数種同定した。(8) 造血幹細胞移植後の免疫不全患者から CMV の薬剤耐性ウイルスを分離し、その性状解析を行った。(9) 腎移植で使用される免疫抑制剤が抗 CMV 効果を有し、ガンシクロビルと相乗効果を示すことを明らかにした。(10) ヒト化マウスを用いて EBV 感染症モデルを作成し、その病態と免疫応答を再現した。(11) 基礎疾患別帯状疱疹発症頻度を判定し、基礎疾患別帯状疱疹発症リスクを評価した。(12) HHV-6 再活性化が疲労によって誘導されることと、疲労の分子機構を明らかにした。(13) 簡便な shRNA 発現アデノウイルス (Ad) ベクター作製システムを構築した。(14) 悪性腫瘍に伴った免疫低下のモデル動物として成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) のモデル動物を用い白血病を発症する単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 潜伏感染モデルを作成した。

研究分担者

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、健康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。

本研究によって以下の成果が期待される。

- (1) VZV 特異的細胞性免疫能の評価系を確立することで、再活性化の早期診断、予防法の開発に繋がる。

- (2) 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、発症リスクを検討する。
- (3) リスク因子の同定、ウイルス感染モニタリング方法の確立および診断 (髄液 PCR や神経放射線など) 治療法の確立。
- (4) HHV-6 脳炎・脳症の発症機構や、再活性化機構を解明し、予防法を開発する。
- (5) CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する新規薬剤を検索し、リード化合物としての可能性を明らかにする。
- (6) EBV 感染モデルマウスを作成し、発症機序解明および治療法開発を促進する。
- (7) 免疫抑制患者から分離された耐性ウイルスの解析による希少抗ウイルス薬の有効性の検証と臨床的必要性と有用性の解明。
- (8) 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) のモデル動物を用いて悪性腫瘍に伴う免疫不全の発症機序を明らかにする事を目的とする。モデル動物を用いた *in vivo* での解析ができる事が期待される。

## B. 研究方法

本研究は、研究代表者森、研究分担者 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。本研究は、免疫低下状態におけるウイルス感染症の病態解明、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のための基盤研究、新規抗ウイルス剤候補の検索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

3年間で以下のことを明らかにした。

- (1) VZV 特異的細胞性免疫能をエリスポット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ことより、VZV 特異的細胞性免疫能の測定法として皮内テストの有用性が示された。
- (2) 糖尿病患者において健常者に比較し、VZV 特異的細胞性免疫能の低下が有意に認められた。
- (3) HHV-6 感染によって誘導されるサイトカイン、ケモカインを同定した。
- (4) HHV-6 の初感染における伝播機構を *in vitro* において明らかにした。HHV-6 は、先ず局所の樹状細胞に感染した後、T 細胞に伝播され、その後 T 細胞において爆発的に増殖することを証明した。
- (5) 全血から抽出した DNA をリアルタイム PCR 法でモニタリングすることにより、HHV-6 再活性化を確実に診断ができる。さらに、血清を用いた直接 LAMP 法 (より簡便且迅速な検査法) の結果も、先のリアルタイム PCR 法の結果と良く相関することが明らかとなった。
- (6) 移植後 HHV-6 脳炎患者髄液中のウイルス DNA 量は極めて高いことを明らかにした。初感

染時の脳炎とは病態が異なる。

- (7) ランダムな 9600 化合物を検索し、CMV 及び VZV に対し EC50 が 20  $\mu$ M 以下の化合物を数種同定した。
- (8) 146F7 (別名 DPPC) は、ヒト CMV の遺伝子発現前過程の阻害という新規機序を有し、動物 CMV にも効果を示した。
- (9) 3 化合物は、CMV 及び VZV の前初期蛋白による遺伝子活性化を阻害する新規性のあるものであった。
- (10) 造血幹細胞移植後の免疫不全患者から CMV の薬剤耐性ウイルスを分離し、その性状解析を行った。そして、薬剤耐性 CMV に関しては未承認薬による治療が奏功した。
- (11) 腎移植で使用される免疫抑制剤が抗 CMV 効果を有し、ガンシクロビルと相乗効果を示すことを明らかにした。腎移植患者での CMV 感染予防の一つの方法の確立につながる。
- (12) ヒト化マウスを用いて EBV 感染症モデルを作成し、その病態と免疫応答を再現した。
- (13) 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を示した。
- (14) 基礎疾患別帯状疱疹発症頻度を判定し、基礎疾患別帯状疱疹発症リスクを評価した。
- (15) HHV-6 の脳炎・脳症に関わる遺伝子を同定した。HHV-6 再活性化が疲労によって誘導されることと、疲労の分子機構を明らかにした。
- (16) 人工リンパ節には抗原特異的エフェクター T 細胞が高率に存在し、人工リンパ組織を移植することによって、免疫不全マウスにインターフェロン産生エフェクター T 細胞を効率よく供給できることを証明した。
- (17) 簡便な shRNA 発現アデノウイルス (Ad) ベクター作製システムを構築した。また VZV ORF68 に対する shRNA 発現 Ad ベクターにより、VZV の増殖を有意に抑制することに成功した。
- (18) 悪性腫瘍に伴った免疫低下のモデル動物として成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) のモデル動物 (HTLV-1 の tax 遺伝子が T 細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス) を用い白血病を発症する単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 潜伏感染モデルを作成した。

(19) HSV-1 の初感染におけるレクチン分子 MGL-1, MGL-2 の関与を調べたところ両分子が発現した細胞において HSV-1 の増殖が増強される事がわかった。

#### 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。本研究成果は、以下の点において行政施策への貢献の可能性が期待される。

- (1) VZV 再活性化の早期診断法の確立、帯状疱疹発症の予防および重症化の防止に繋がる。
- (2) 抗ウイルス薬は高価であり、帯状疱疹の予防は医療費削減に貢献できると予想される。
- (3) 造血幹細胞移植後 HHV-6 脳炎の診断・治療ガイドラインの整備。
- (4) 高度先進医療として、移植後に重要な 4 種類のヘルペスウイルス (EBV, CMV, HHV-6, VZV) のモニタリングシステムを提供する。
- (5) 既存薬と異なる作用点をもつ新規薬剤の開発により、治療法の改善に貢献できる。
- (6) 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。
- (7) 薬剤耐性ウイルスによる難治性感染症に標準的に使用できる抗ウイルス薬の導入により、難治性ヘルペスウイルス感染症を減らし、入院日数の減少などにも寄与できる。

(8) 移植後難治性 EBV 感染症の予防と治療に関する指針の作成。

#### E. 結論

本研究によって、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総合的科学基盤が進展した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wang GQ, Suzutani T, Yamamoto Y, Fukui Y, Nozawa N, Schmid DS, Kurane I, Inoue N. Generation of a reporter cell line for the detection of infectious varicella-zoster virus and its applications for antiviral studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3142-5, 2006.
- 2) Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N. Newly identified human herpesviruses. pp.197- 278. In: (Eds) IW Fong, K Alibek *Emerging Infectious Diseases of the 21st Century.* Springer, NY, 2006.
- 3) 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.* 45:60-7, 2007.
- 4) 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.* 79:52-9, 2007.
- 5) 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.
- 6) 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.
  - 7) Ohashi, M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa H. Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 14:100-9, 2008.
  - 8) 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.* 57:241-8, 2008.
  - 9) Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of thymus-derived T-cell leukemia/lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Nature Med.* 12:466-72, 2006.
  - 10) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Monkeypox highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein protects monkeys from monkeypox. *J Virol.* 80:5179-88, 2006.
  - 11) Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes Infect.* 8:2647-56, 2006.
  - 12) 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.
  - 13) 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.* 79:811-9, 2007.
  - 14) 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.* 9:1333-40, 2007.
  - 15) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 172:1625-37, 2008.
  - 16) Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of -galactosylceramide, which can induce

- cross-protection against influenza viruses  
*Mucosal Immunol.* 1:208-18, 2008.
- 17) Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 7:1435-45, 2008.
  - 18) Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Therapeutic and Clinical Risk Management.* in press.
  - 19) Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* in press.
  - 20) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis.* 198: 673-82, 2008.
  - 21) Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, 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: 170-9, 2008.
  - 22) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.
  - 23) 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: 13259-64, 2007.
  - 24) 藤原成悦. 動物モデル. 「EB ウイルス」(高田賢蔵 監修). 診断と治療社、東京、pp88-92、2008.
  - 25) 中村浩幸、藤原成悦.  $\gamma$ ヘルペスウイルスの病原性発現機構. 日本臨床増刊「ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩—」. 日本臨床社、東京、pp.580-3、2006.
  - 26) Phromjai J, et al., Infection and direct injury in human hepatocyte explants and a hepatoblastoma cell line due to hepatiticomimetic (non-hepatitis) viruses. *J Med Virol* 79:413-25, 2007.
  - 27) 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.* 79:1731-40, 2007.
  - 28) Oshima K, Kanda Y, Kako S, Asano-Mori Y, Watanabe T, Motokura T, Chiba S, Shiraki K, Kurokawa M. 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.* 80:1769-75, 2008.
  - 29) Akahori Y, Suzuki K, Daikoku T, Iwai M, Yoshida Y, Asano Y, Kurosawa Y, Shiraki K. Characterization of Neutralizing Epitopes of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein H. *J Virol.*



83:2020-4, 2009.

- 30) 末松 佐知子. 人工リンパ組織構築とは何か. *Organ Biology* 15: 23-32, 2008.
- 31) Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Yoshikawa T, Asano Y, Yamanishi K, Mori Y. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity - Comparison of VZV-skin test and interferon-gamma ELISPOT assay. *J Infect Dis.* 198:1327-33, 2008.
- 32) 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* 36:69-73, 2009.
- 33) 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*, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Wang GQ, 福井良子、鍋谷達夫、古谷野伸、山本由美子、柳舞美、野澤直樹、倉根一郎、井上直樹. ヒトサイトメガロウイルス及び水痘帯状疱疹ウイルス力価を迅速に測定できるレポーター細胞株の樹立及びその抗ウイルス剤評価への応用. 第16回抗ウイルス化学療法研究会. 2006年5月 福島.
- 2) 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 2007, France.
- 3) 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、札幌.
- 4) 福井良子、神道慶子、小杉伊三夫、山口十四文、倉根一郎、井上直樹. レポーター細胞株を用いた cell-based high-throughput screening により同定された新規抗サイトメガロウイルス (CMV) 化合物の作用機序の解析. 第18回抗ウイルス療法研究会 2008年5月 鹿児島.
- 5) 井上直樹、倉根一郎. 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) およびサイトメガロウイルス (CMV) の前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する新型抗ウイルス化合物の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月 岡山.
- 6) 山田壮一、野沢直樹、片野晴隆、倉根一郎、井上直樹. 個体での増殖にのみ必須なモルモットサイトメガロウイルス (CMV) 1.6kb ゲノム領域の遺伝子群は、ヒトCMVの弱毒化に関与する遺伝子群に相同性を有する. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年11月 岡山.
- 7) 長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、片野晴隆、佐多徹太郎、倉田毅、長嶋和郎. 成人T細胞白血病(ATL)モデルマウスの解析. 第95回日本病理学会学術集会. 2006年4月 東京.
- 8) 川口晶、一戸猛史、澤洋文、岡田義昭、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、William W. Hall、長谷川秀樹. 成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月 名古屋.
- 9) 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 2008, Hakone, Japan.
- 10) 長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎. キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻

- 粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月 岡山.
- 11) 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹. 経鼻ワクチンにおける Dectin-1 リガンドによるアジュバント効果の亢進. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月 岡山.
  - 12) 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月 岡山.
  - 13) 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎. 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討. 第12回日本ワクチン学会学術集会. 2008年11月 熊本.
  - 14) 近藤一博. 疲労のバイオマーカーとしてのヘルペスウイルス再活性化. 第2回日本疲労学会. 2006年7月 大阪.
  - 15) 鎌田 美乃里、近藤 一博. HHV-6 感染 SCID-hu マウスにおける HHV-6 感染様式の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月 名古屋.
  - 16) 嶋田和也、武本眞清、山西弘一、近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 初期遺伝子制御機構の解析 - 初期遺伝子プロモーター間の比較検討 -. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月 名古屋.
  - 17) 近藤一博、鎌田美乃里、小林伸行. ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 と HHV-7 の再活性化の誘導因子としての疲労. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月 名古屋.
  - 18) 清水 昭宏、近藤一博. ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月 名古屋.
  - 19) Sugino T, Kajimoto Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Kondo H. 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.
  - 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) Kondo K, Kobayashi N, Shimada K, Kuratsune H, Matsunaga H. Identification of novel HHV-6 latent protein associated with mood disorders in CFS, depressive disorder, bipolar disorder and HHV-6 encephalopathy. International Symposium on Viruses in Chronic Fatigue Syndrome. June 2008, Baltimore MD, USA.
  - 25) 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 潜伏感染中間状態特異的タンパクによる気分障害の発症機序. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月 岡山.
  - 26) 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 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 岡山.
- 27) 清水昭宏、小林伸行、近藤一博. 遺伝子治療を目的としたヒトヘルペスウイルス 6 ベクターの性状解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 岡山.
- 28) 嶋田和也、近藤一博. スプライシング関連因子 SART3 のアンチセンスによるヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) ic1/ic2 mRNA の選択的スプライシングに対する影響. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 岡山.
- 29) 藤原成悦. ヒト化マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製と応用—EBV の生活環・病原性発現機構の解明と新規治療(薬)法の開発を目指して—. 小児血液・腫瘍懇話会特別講演. 2008 年 11 月 東京.
- 30) 藤原成悦. ヒト化マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製と応用. 悪性リンパ腫研究会. 2009 年 3 月 東京.
- 31) 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.
- 32) 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 12 月 横浜.
- 33) 藤原成悦. EB ウイルスとリンパ球の増殖. 第 16 回 EB ウイルス感染症研究会. 2006 年 5 月 東京.
- 34) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、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 36 回日本免疫学会学術集会. 2006 年 12 月 大阪.
- 35) 矢島美彩子、今留謙一、中川温子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、伊藤守、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染. EB ウイルス研究会. 2008 年 7 月 米子.
- 36) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 岡山.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、清水則夫、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.
- 42) 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。
- 43) 今留謙一、清水則夫、藤原成悦. EB ウィルス感染上皮細胞における CD40 シグナルの働き. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回生化学学会合同大会. 2007 年 12 月 横浜.
- 44) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、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 ウィルス感染モデルの作製. 第 54 回日本ウィルス学会学術集会. 2006 年 11 月 名古屋.
- 45) 田口智子、宮川世志幸、今留謙一、堀内保臣、竹野内寿美、大河原明美、松井淳、北村紀子、佐藤伴、片桐洋子、大喜多肇、藤原成悦、藤本純一郎、清河信敬. EBV 感染によってヒト B 細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第 48 回日本小児血液学会 2006 年 11 月 大阪.
- 46) 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. EB ウィルスのがん遺伝子 LMP1 による bcl-3 発現誘導. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 2006 年 12 月 名古屋.
- 47) Shiraki K, et al. Genital herpes by acyclovir-sensitive herpes simplex virus caused secondary and recurrent herpetic whitlow by thymidine kinase-deficient/temperature-sensitive virus. 31st International Herpesvirus Workshop, July 2006, Seattle WA, USA.
- 48) Phromjai J, et al. Hepatocyte injury by non-hepatitis viruses in vitro. 第 47 回日本臨床ウィルス学会. 2006 年 6 月 東京.
- 49) Phromjai J, et al. Apoptosis in hep G2 infected by non-hepatitis viruses in vitro. 第 54 回日本ウィルス学会学術集会. 2006 年 11 月 名古屋.
- 50) 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 2007, Ashville NC, USA.
- 51) 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.
- 52) 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 2007, Orvieto Italy.
- 53) 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・帯状疱疹ウィルスの増殖抑制. 遺伝子・デリバリー研究会第 8 回シンポジウム 2008 年 5 月 豊中.
- 54) 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. 2009 年 3 月 東京.
- 55) Suematsu S, Hattori Y. 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. 2008 年 12 月 京都.
- 56) 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.
- 57) 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会. 2007 年 11 月 札幌.
- 58) 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学術集会. 2007 年 11 月 東京.
- 59) Hattori Y, Watanabe T, Suematsu S. Vascular Structure of Tissue-Engineered Secondary

- Lymphoid Tissue-like Organoid in mice. 第36回日本免疫学会総会学術集会. 2006年12月 大阪.
- 60) 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 2008, Estoril, Portugal.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) 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 鳥取県西伯郡伯耆町.
- 64) 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 2008, Estoril, Portugal.
- 65) 武本眞清、山西弘一、森 康子. ヒトヘルペスウイルス6は樹状細胞表面上の接着因子発現を抑制する. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月 名古屋.
- 66) 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総会学術集会. 2007年10月 札幌.
- 67) 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<sup>+</sup> T cells. 6<sup>th</sup> International Conference on HHV-6 & 7. 32<sup>nd</sup> International Herpesvirus Workshop, July 2007, Asheville, NC, USA.
- 68) Takemoto M, Imazawa T, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus-6 effectively transmits from dendritic cells to CD4<sup>+</sup> T cells. 6<sup>th</sup> International Conference on HHV-6 & 7. June 2008, Baltimore, MD, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 近藤一博. HHV-6再活性化を用いた疲労度評価方法およびその利用. 特許番号: 特許第4218842号, 2008年11月21日.
2. 特許出願
- 1) 近藤一博、小林伸行. 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. 特許出願 2007-250461, 2007年9月27日.
- 2) 近藤一博、小林伸行. HHV-6潜伏感染に関連する気分障害を治療又は予防する方法. 米国出願番号: No. 61/102, 441, 2008年10月3日
- 3) 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子. HHV-6再活性化検出のためのウイルス濃縮法. 特願 2008-092816, 2008年3月31日
- 4) 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子. HHV-6再活性化測定のためのウイルス定量法. 特願 2008-093288, 2008年3月31日

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

研究分担者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部

**研究要旨** サイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染初期過程を阻害する新規抗ウイルス薬を同定することを目的として、感染初期過程を阻害することが予想されるキナーゼ阻害剤の評価、ランダム化合物ライブラリーのスクリーニング、スクリーニングで同定された化合物の作用機序の解析を行った。各種サイクリン依存性キナーゼ阻害剤の評価を行った結果、VZV と CMV で効果のある阻害剤が異なることを見出した。9600 種類のランダム化合物から CMV 及び 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、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 に対しそれぞれ数種類を選定した。約 300 万の化合物データベースより類似化合物を検索し、入手可能な 120 類似化合物及び化学合成した 6 化合物を用いて構造活性相関を行なった。133G4、179H7、15E8 と名づけた化合物は、CMV IE2 や VZV IE62 による遺伝子活性化を阻害し、TBP のリクルートメント以降の過程、おそらく Mediator の機能を阻害するユニークな化合物であった。一方、146F7 は 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阻害し、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。効率的に CMV の増殖阻害を動物モデルで評価する方法の検討を開始し、その過程で、ATCC より購入したモルモット CMV には、2 種類のウイルスが存在し、その差はゲノム 240kb 中の 1.6kb の有無であることを明らかにした。そして、この 1.6kb 領域が細胞培養での増殖には不要であるが、動物個体での増殖に必須であることを見出した。

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化させるため、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 投与を行なう方針がとられており、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ングが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 CMV 及び VZV について樹立し、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。本研究では、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。また、ウイルス感染の極めて初期の過程に関与することが知られるキナーゼに対する阻害剤の効果もあわせて検討した。

## 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 P-Oka 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%牛胎児血清(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 µg/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

キナーゼ阻害剤(Sigma)及びランダムな 9600 化合物(Maybridge)は DMSO に終濃度 10-100mM とするように溶解し、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化合物検索・評価

MV9G 及び U4C は、ルシフェラーゼ遺伝子がそれぞれ VZV ORF9 及び CMV TRL4 プロモーター下流に挿入されたカセットが染色体に組み込まれたレポーター細胞株である。ウイルス感染により発現される前初期蛋白(IE 蛋白)によりプロモーターが活性化され、産生されたルシフェラーゼの酵素活性を化学発光反応をルミノメーターで測定することにより、ウイルス感染力価を迅速かつ容易に測定できる。

IE 蛋白によるレポータープロモーター活性化までの感染初期過程に対する薬剤の阻害効果の検討には、後述の直接感染法を、IE 蛋白によるレポータープロモーター活性化以降の DNA 複製やウイルス粒子形成などの後期過程を含めた感染過程全体に対する薬剤の効果評価には共培養法を用いた。

a) 直接感染法: 96 穴プレートに巻き込んだ未感染細胞(VZV では MeWo 細胞、CMV では hTERT-BJ1 細胞)に、1 穴あたり 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、長時間発光タイプのルミノアッセイ(Dual-Glo Luminoassay Kit, Promega)基質を加え 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ねし、さらに 1 日培養後、ルミノアッセイを行った。

### 4) 細胞毒性アッセイ

生存細胞が産生する 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。

### 5) 免疫染色法及び蛍光抗体法

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% TritonX 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後 DAB 基質による発色反応、ないしは、FITC 標識抗マウス抗体と反応後蛍光反応の観察を行った。

### 6) 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し 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。

### 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 及び VZV のゲノムコピー数の測定は、UL83 遺伝子及び IE62 遺伝子をそれぞれ標的とした。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 et al., 2001)。

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。用いたプライマー及び TaqMan プローブは、表1にまとめた。

#### 8) ChIP アッセイ

133G4などの阻害化合物存在下でCMVをU4Cレポーター細胞に感染させ、定法に従い、formalinでDNA-蛋白のクロスリンクを行い glycine で中和後、核画分を調製した。予備実験で決定した超音波処理条件で平均長が0.5-1kbのクロマチン断片を調製した。ポリメラーゼII (Pol II)に対する抗体、TBPに対する抗体、コントロールの無関係な抗体を加え、市販のキットを用いて免疫沈降されたDNA断片を得た。このDNA断片中の標的DNA量をリアルタイムPCRで測定し、免疫沈降前の量と比較した。

#### 9) モルモット感染実験

ATCCより購入し数代 GPL 細胞で継代したGPCMV ストック(ATCC-P5)から独立なウイルスクローンを得た(CA-P2 から CJ-P2)。 $1 \times 10^6$  PFUのGPCMVを腹腔内に接種し、6-7日ないしは20-21日後に、各臓器を採取し、リアルタイムPCR法で、GPCMVのDNA量を測定した。その際、1.6kb欠損の有無を同定できるプライマー・プローブを用いた。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに適切に行った。組換えDNA実験は、大臣確認申請に対する承認を得ることを含め、法に基づき適切に行った。

### C. 研究結果

#### 1. キナーゼ阻害剤の抗ウイルス効果の検討

サイクリン依存性キナーゼ阻害剤として知られる roscovitine は、宿主キナーゼの阻害のみならず、HSV の ICP0 などによる転写活性も阻害する。VZV 感染を阻害することも最近報告された。まず、VZV レポーター細胞 MV9G を用いて roscovitine の阻害効果を評価した。その結果、直接感染法でも阻害が見られることから、感染初期過程を阻害していること、EC50 が  $10 \mu\text{M}$  程度であることを確認した。そこで、roscovitine を含め入手可能なキナーゼ阻害剤 7 種類について CMV 及び VZV 増殖阻害効果を検討した。その結果、VZV に対しては、roscovitine が最も有効であった。一方、CMV に対しては、roscovitine の阻害効果が見られず、別のキナーゼ阻害剤である olomoucine II が EC50 が  $2-4 \mu\text{M}$  と比較的強い阻害を示し、50%細胞毒性濃度(CC50)も  $100 \mu\text{M}$  と高く選択 Index が 20 以上と抗ウイルス薬として特異性が高いことが示された(図1)。

#### 2. 感染受容体に対する阻害剤の検討

Gershon らは、マンノース6リン酸受容体(M6P-R)を介したエンドサイトーシスにより VZV 感染が成立すると報告している。実際、MV9G 細胞感染において、 $40\text{mM}$  程度の濃度で M6P が VZV の感染を阻害した。

#### 3. 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 9600 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抗ウイルス化合物を検索した。

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、 $20 \mu\text{M}$  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 300 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  $20 \mu\text{M}$  存在下で効果があり、細胞毒性がない( $>20 \mu\text{M}$ )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、選定した化合物の細胞毒性を検討し、最終的に 10 種類の候補を得た。確認の結果、VZV に対する阻害化合物の1つは、核酸アナログで VZV に対する効果がよく知られる araC であることが判明した。VZV の場合3日培養したために、DNA複製阻害剤までも選択してきた可能性があるものの、スクリーニング系が期待通り働いていることが結果的には裏付けられた。

免疫染色法を用いて阻害効果を確認する実験を行い、VZV 及び CMV に対しそれぞれ数種類の強い阻害効果を示す化合物を最終的に選定した。これらの化合物については、VZV や CMV 感染に対する阻害効果がある類似化合物は報告されていない。なお、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。

#### 4. 選定化合物の阻害効果と構造活性相関

GCV をコントロールとして標準的なブランク形成阻害アッセイ及びレポーター細胞アッセイで EC50 を求めた(表2)。その結果、146F7 の EC50 は  $2.5 \mu\text{M}$  であり GCV の  $1.4 \mu\text{M}$  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  $100 \mu\text{M}$  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  $8 \mu\text{M}$  であった。133G4 に加えて 179H7、15E8 が、CMV 及び VZV を阻害することから、正確な阻害効果及び細胞毒性濃度を求めた。CMV に対する結果は、133G4 は GCV より若干 EC50 は高いものの十分な阻害を示し毒性も問題とならないものであった。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。133G4 については 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た。

146F7 については、予備実験から MCMV、GPCMV に効果があることがわかったので、これらに対する EC50 も求めた。なお、抗 CMV 阻害剤として同定した 146F7 には抗 VZV や抗 HHV6 活性はなかった。

#### 5. 抗 CMV 及び抗 VZV 化合物の作用機序の解析

- 1) リアルタイム PCR により、各化合物により CMV もしくは VZV の DNA 複製量が低下する事を示した(図2A)。さらに、感染後日数や MOI を変えた確認実験も行った。例として、146F7 と GCV の比較結果を図2B に示す。
- 2) 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(図3)。いずれも DNA 複製阻害剤 GCV よりも早期に効果を示した。
- 3) 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。
- 4) CMV でスプライシングが知られる IE1, IE2, UL112/113, UL89 の各 RNA 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4)。146F7 に加え、抗 CMV 活性を有する 167F6 がウイルス感染後前初期遺伝子発現以前の過程を阻害した。同様な解析を図 2 に示した抗 VZV 化合物について行い、5 化合物で顕著に初期遺伝子 ORF21 の発現が阻害され、さらに、そのうちの 4 化合物では、前初期遺伝子 ORF62 の発現も阻害した。また、抗 VZV IE62 抗体を用いた蛍光抗体法の結果、141B3 は IE62 蛋白の発現がみられるものの、そのパターンは、diffuse で蛍光強度も弱く、IE62 蛋白の翻訳後修飾などを阻害している可能性が示された。
- 5) 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 や 167F6 は吸着侵入過程を阻害しないことがわかった。
- 6) 133G4, 179H7, 15E8 の 3 化合物による CMV IE2 及び VZV IE62 依存性の遺伝子活性化機能の阻害機序を検討した。
  - a) GAL4 配列結合ドメイン(GAL4DB)と IE62 の N

端の遺伝子活性化ドメインの融合蛋白(GAL4-IE62N)を発現するプラスミドを薬剤存在下で遺伝子導入したところ、依然として阻害効果があったことから、IE62 特異的 DNA 結合が作用標的ではないことが示された(図5)。

- b) GAL4-USF1, GAL4-TBP の両融合蛋白を作成し、IE2, IE62 との相互作用の阻害の可能性を検討したが、依然として 133G4 の阻害効果が認められた。従って、USF1 蛋白や TBP 蛋白の DNA との結合を阻害しているわけではないことがわかった。
- c) ChIP アッセイを行い PolII のプロモーターへの結合量を測定したところ、これら化合物により Pol II の減少が見られたことから、TBP の TATA 配列への recruitment 以降の過程を阻害すると考えられる。(図6)

図7に以上の結果をまとめ、同定した化合物の作用点の概略を示した。

#### 6. 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、感染動物モデルの検討を開始した。GPCMV の感染経路として、腹腔内及び皮下接種を比較した。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。

そこで、緑色蛍光蛋白を発現する GPCMV を作成し、皮膚での GPCMV の増殖を簡便に観察できるようにすることで、抗 CMV 化合物の動物個体での簡便な評価を行えるようにしようと考えた。組換え GPCMV は培養細胞内では親株と同程度に増殖することを示した。しかしながら、モルモット個体に接種したところ、増殖がほとんど起こらないことがわかり、その原因を検討したところ、ATCC より購入した GPCMV のストックには 2 種類、すなわち、図8A に示す 1.6kb 領域が欠けたウイルス(GPCMV/del)と正常なウイルス(GPCMV/full)、が混じっていることが明らかとなった。ATCC からのストックから独立なクローンを分離したところ、約半分が 1.6kb 領域が欠けた GPCMV/del、残りが正常な GPCMV/full であった。当初作成した緑色蛍光蛋白を発現する GPCMV も 1.6kb 領域が欠損していた。培養細胞では両株間の増殖性に差は見られなかったが(図8B)、両株が 3:2

(60%:40%)の比で混じった ATCC 由来の GPCMV ストックを動物に接種して一定期間後各臓器における両者の比を解析したところ、唾液腺の 200 倍を筆頭に GPCMV/full が GPCMV/del に比べ増殖性が高いことが示された(図8C)。独立のクローンをを用いた場合にも同様の結果を得た。以上の結果より、1.6kb 領域が動物個体での増殖には必須であり、今後、簡便に化合物の評価を動物で行うための組換え GPCMV の作成には、この領域が存在することが必要要件であることが明確になった。

#### D. 考察

##### 1. キナーゼ阻害剤について

特定のキナーゼ阻害剤のみに抗ウイルス効果が見られたことから、作用点が宿主キナーゼではなくウイルスがコードするキナーゼの可能性もあると考えられ、キナーゼ阻害剤により燐酸化状態が変化するウイルス蛋白がないかを今後検討したい。また、ベンゼン環の修飾により特異性が変化していると思われるので、キナーゼ阻害活性を前提にすることなく、この周辺構造を置換した化合物を入手し今後さらに検討したい。

##### 2. ランダム化合物スクリーニング

本研究により、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し得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、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用いることが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化合物は、今まで研究レベルで検討が加えられてきた阻害剤とは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。

##### 3. 146F7 について

146F7 は、選択係数が 20 以上と高いこと、小動物の CMV で効果を評価できること、Actelion Property Explorer を用いた細胞毒性予想でも問題がないこと、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、今後実用化を視野に入れ動物レベルでの検討を推進したい。さらに、耐性株を細胞培養レベルで分離する作業が進行中であり、早急にこの作業を完成させ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。

##### 4. 133G4 について

ランダムに検索して得られた 133G4、179H7、15E8 の 3 化合物に構造的類似性があり、約 20 種の類似化合物の構造活性相関解析から、共通するニトロ基が阻害活性に重要であるとの知見を得た。さらに、いくつかの誘導体では著しい細胞毒性が生じることから、これらの化合物の標的が細胞側因子である可能性が示唆された。作用機序の検討から、IE2 や IE62 といった前初期蛋白のプロモーターでの転写活性化が阻害されており、転写に関わる細胞因子を標的としていると推測される。Mediator と呼ばれる一連の蛋白群は、転写活性化因子と共同して作用し、TBP を含むプレコンプレックスへのポリメラーゼ結合を促進する。ChIP アッセイなどから得られた知見から、133G4 は Mediator の機能を阻害するのではないかと考えられる。アデノウイルスの転写活性化因子 E1A は、Mediator のひとつ Med23 と、ヒトヘルペスウイルス 8 の Rta は Med12 と結合することが知られている。また、最近 VZV IE62 が Med25 と相互作用することが報告されている。従って、個々の Med 蛋白とウイルス特異性との関連、ウイルスによる転写活性化機構における Med 蛋白の役割、そして細胞因子として抗ウイルス薬の主要な標的となり得る可能性などについて、今後さらに解析が必要と思われる。

##### 5. 動物個体における抗 CMV 化合物評価

動物個体での抗ウイルス化合物の評価は必須であるにもかかわらず、CMV の場合、動物匹数を制限して抗ウイルス効果を定量的にかつ簡便に測定する方法は確立されていない。免疫抑制条件や脳内接種といった方法では、果たして何をみているのかが明確ではなく、健常な動物で抗 CMV 効果を測定する方法として皮下接種後のウイルスの広がりを観察することが有効ではないと思われる。動物における評価法の検討過程で、GPCMV の個体での増殖に必要な遺伝子領域を見出すことができた。この遺伝子領域がコードする蛋白群は、新たな抗ウイルス薬の標的やサブユニットワクチン候補となる可能性が大きい。

#### E. 結論

- 1) キナーゼ阻害剤にウイルス特異性があった。
- 2) 9600 種類のランダム化合物ライブラリーから、VZV 及び CMV の感染を阻害する新規抗ウイルス薬候補を検索した。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。
- 3) 選定した化合物の一部について作用機序を明らかにした。146F7 はウイルス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、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) 感染動物モデルで化合物の有効性を示すための実験過程において、モルモット CMV の細胞培養では不要であるが、動物個体では必要な 1.6kb 領域を見いだした。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Wang GQ, Suzutani T, Yamamoto Y, Fukui Y, Nozawa N, Schmid DS, Kurane I, Inoue N. Generation of a reporter cell line for the detection of infectious varicella-zoster virus and its applications for antiviral studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3142-3145, 2006.
- 2) Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N. Newly identified human herpesviruses. pp.197-278. In: (Eds) IW Fong, K Alibek *Emerging Infectious Diseases of the 21st Century.* Springer, NY, 2006.
- 3) 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.
- 4) 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* 79:52-9, 2007.
- 5) 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.
- 6) 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.

### 2. 学会発表

- 1) Wang GQ, 福井良子, 錫谷達夫, 古谷野伸, 山本由美子, 柳舞美, 野澤直樹, 倉根一郎, 井上直樹. ヒトサイトメガロウイルス及び水痘帯状疱疹ウイルスカバを迅速に測定できるレポーター細胞株の樹立及びその抗ウイルス剤評価への応用. 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会 2006 年 5 月 26-27 日, 福島
- 2) 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. 2007 May, France
- 3) 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 11 月, 札幌
- 4) 福井良子, 神道慶子, 小杉伊三夫, 山口十四文, 倉根一郎, 井上直樹 「レポーター細胞株を用いた cell-based high-throughput screening により同定された新規抗サイトメガロウイルス (CMV) 化合物の作用機序の解析」 第 18 回抗ウイルス療法研究会 2008 年 5 月, 鹿児島
- 5) 井上直樹, 倉根一郎 「水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) およびサイトメガロウイルス (CMV) の前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する新型抗ウイルス化合物の解析」 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月, 岡山
- 6) 山田壮一, 野澤直樹, 片野晴隆, 倉根一郎, 井上直樹 「個体での増殖にのみ必要なモルモットサイトメガロウイルス (CMV) 1.6kb ゲノム領域の遺伝子群は、ヒト CMV の弱毒化に関与する遺伝子群に相同性を有する」 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月, 岡山

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 本研究に用いたプライマー及びプローブ

	target	forward primer (5'→3')	reverse primer (5'→3')	probe (5'FAM→3'MGB/BHQ)
DNA	HCMV UL83	CGCAACCTGGTGCATGG	CGTTTGGGTTGCGCAGCGGG	TTCCGGGAAGATGC
	VZV IE62 237T	CCTCCGTATCGGACTTCAA	TGACCGTCTCGCATACGTA	TTGGCGAAGAGCTAAC
	ヒトアルブミン	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT	CCTGTCAATGCCACACAAATCTCTCC
RNA	HCMV IE1*	CAAGTGACCGAGGATTGCAA	CACCATGTCCACTCGAACCTT	TCTGGCAGAAGCTGTC AACAGA
	HCMV IE2*	TGACCGAGGATTGCAACGA	CGGCATGATTGACAGCCTG	TGGCAGAACTCGGTGACATCCTCGC
	HCMV UL112/113*	TGACCGACGTTGGCCG	CAATCATTGAGCATTTTGGTCAA	CCGACGGAATCCGGCGGCGCTCAG
	HCMV UL89*	GGCGCTTTTGGCCAGTTG	ACCAGCAGCAAGTGAAGTTTT	TACAACACCAACAGCATCCGAGGAC
	VZV ORF21	TGTTGGCATTGCCGTTGA	ATAGAAGGACGGTCAGGAACCA	CTGCTTCCCCAGCAGCTCCGTC
	VZV ORF29	GGCGGAACCTTCGTAACCAA	CCCCATTAACAGGTCAACAAAA	TCCAACCTGTTTTGCGGCGGC
	VZV IE62	CCTTGGAAACCATGATCGT	AGCAGAAGCCTCTCGACAA	TGCAACCCGGGCGCTCCG
ヒトG6PD*	TCTACCGCATCGACCACTACC	GCATGTTGTCCCGGTTT	ATGGTGTGAGATTTGCCAACAGGA	

\* splicing junctionを標的とする

表2 プラーク形成阻害アッセイに基づく EC50

化合物名	骨格	側基R	50%効果濃度 (μM)			50%細胞増殖阻害濃度(μM)	
			HCMV/HFL	HCMV/U4C	GPCMV/GPL		MCMV/NH3T3
133G4	NO <sub>2</sub> -X-R	—Cl	4.5±1.0	8.9±1.8		>160	
179H7	NO <sub>2</sub> -X-R		33.8±6.3	4.7±1.4		>160	
133G4#1	X-R	—Cl	>32	>40		>160	
15E8	NO <sub>2</sub> -X'-R		8.4±3.2	15.2±3.6		22.7±3.1	
146F7			2.5±0.2	~5	6.2±1.7	3.0±1.6	>80
GCV			1.4±0.2	NA	25.9±7.7	5.7±0.25	>100

図1 キナーゼ阻害剤の抗CMV効果

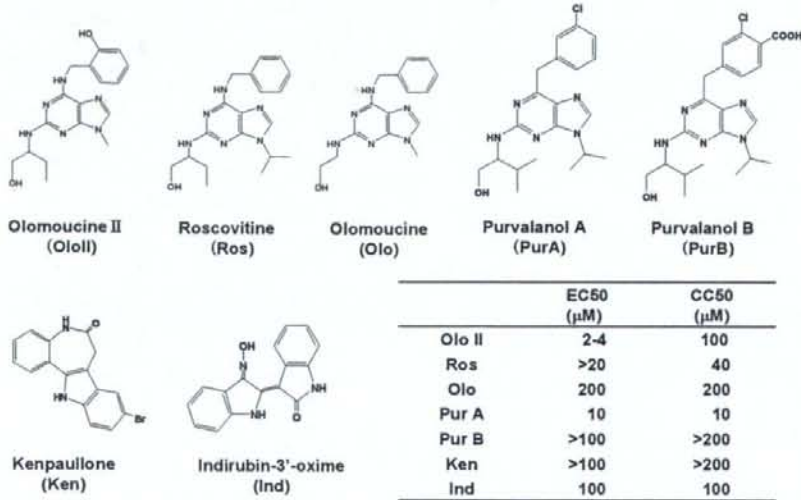


図2 抗CMV及び抗VZV化合物のDNA複製能

