

のような機構で再活性化を誘導するかは明らかでない。このため、これまでは、 β -ヘルペスウイルスの再活性化の誘導因子に関する報告も混沌としており、再活性化予防法の開発の大きな障害となっていた。

我々の研究により、HHV-6 再活性化のトリガーが疲労であることや、この分子機構を担う疲労因子を同定できたことにより、抗癌剤投与や移植の拒絶反応など、疲労以外の再活性化因子による β -ヘルペスウイルス再活性化誘導と、疲労による再活性化誘導との関係を分子生物学的に明らかにする方法を得ることができた。今後は、疲労因子自体の機構解明に加えて、この様な他の因子との関連も明らかにできるものと考えている。

E. 結論

これまでの研究により、i) 再活性化の新しい診断法の開発、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定、iii) 再活性化を予防する方法の開発において、新たな知見を得ることによって、応用可能な研究結果を得ることができた。

また、HHV-6 の中枢神経病原性遺伝子 SITH-1 を発見したことにより、HHV-6 の病原性のさらなる解明にも寄与するものと考えられる。

さらに、疲労の分子機構の中核をなす疲労因子を同定できたことにより、ヘルペスウイルスの再活性化の問題に留まらない、様々な疾患や社会的問題に関する解決法の糸口を得ることができたと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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)

2. 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(2006年11月名古屋)

3. 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(2006年11月名古屋)

4. 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(2006年11月名古屋)

5. 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(2006年11月名古屋)

6. 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)

7. 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)

8. 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)

9. 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)

10. 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)
 11. K. Kondo, N. Kobayashi, K. Shimada, H. Kuratsune, H. Matsunaga.
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 22, Baltimore 2008)
 12. 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、2008年10月岡山)
 13. 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、2008年10月岡山)
 14. 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、2008年10月岡山)
 15. 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) ie1/ie2 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、2008年10月岡山)
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.
3. ガイドライン
渡辺恭良、平山佳伸、近藤一博、倉恒弘彦
日本疲労学会 抗疲労臨床評価ガイドライン (2008年2月16日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 近藤一博 (発明人)
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: 2008年11月21日 (特許第4218842号)

特許出願

1. 「HHV-6の潜伏感染特異的タンパク質、その検査法、それを用いた精神疾患マウスの作成、治療法開発への応用」
発明者: 近藤一博、小林伸行
2007年9月27日 特許出願 (2007-250461)
2. 近藤一博、小林伸行 (発明人)
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 出願日2008年10月3日
3. 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子 (発明人)
HHV-6 再活性化検出のためのウイルス濃縮法 特願 2008-092816
出願日 2008年3月31日
4. 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子 (発明人)
HHV-6 再活性化測定のためのウイルス定量法 特願 2008-093288
出願日 2008年3月31日

EB ウイルス感染症の発症機序と治療法に関する研究

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・部長

研究要旨 免疫不全状態で発生する日和見ウイルス感染症の代表的存在である EB ウイルス (EBV) 関連リンパ増殖性疾患について、ヒト化マウスを用いた疾患モデルの作製を通じて、その発症機序と治療法に関する研究を行った。通常のマウスに EBV は感染しないが、NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ ^{null} マウス (以下 NOG マウス) に臍帯血造血幹細胞を移植しヒト免疫系を再構築した後は感染が可能となり、感染モデルの作製に成功した。このモデルでは、EBV 関連リンパ増殖性疾患に酷似したリンパ腫、不顕性持続感染、細胞性および液性免疫応答など、ヒト EBV 感染の基本現象が再現された。本モデルは現時点でもっとも総合的な EBV 感染小動物モデルであり、これを用いてリンパ増殖性疾患発症機構の解析と治療薬の検討が進展している。

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宿主が増加しており、日和見感染症対策に関しては、医学・医療的な対応にとどまらず、政策医療のレベルにおける対応も求められている。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もっと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。不死化細胞は、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、免疫能が低下した場合は無制限に増殖し LPD を発症する。しかし、免疫不全と EBV 関連 LPD の関係については解明が不十分であり、どのような免疫担当細胞の機能不全が発症に結びつきやすいのか、また、免疫不全以外にも発症要因があるのか、など不明な点も多く残されている。このような問題を解明するためには、培養細胞を用いた *in vitro*

の研究のみでは不十分であり動物モデルを用いた *in vivo* の解析が必要である。また、新規治療法・治療薬の開発・評価のためにも動物モデルが必須である。EBV 関連疾患のモデル動物としては、これまでにコトントップタマリンなど霊長類を用いたものと *scid* マウスを用いたものが報告されてきた。しかし、前者は絶滅危惧種で高価かつ入手困難であるという点で、後者は直接の感染実験ができず免疫応答も誘導されない点で不十分であった。そこで本研究では、最近開発されたヒト化マウスのテクノロジーを用いて EBV 感染モデルを作製することを試みた。我が国で開発された NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ ^{null} (NOG) マウスは免疫不全マウスの一系統であり、ヒト造血幹細胞を移植すると、EBV の主な標的となる B 細胞の他、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞など免疫系の主要な細胞の発症が認められる。EBV の主要標的細胞となる B 細胞や、EBV に対する免疫応答の主役となる T 細胞が分化するため、感染の初

期過程から免疫応答まで、幅広い現象を再現できる総合的な感染モデルを作製しうると考えられた。

B. 研究方法

1. 臍帯血

東京臍帯血バンク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*/IL-2R γ ^{null} マウス

NOD/Shi-*scid*/IL-2R 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、骨髄、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. フローサイトメトリー

Beckman Coulter 社 Cytomics FC-500 を用いて解析した。

6. 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、また 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。

7. 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。

8. ELISPOT 法による EBV 特異的 T 細胞応答の解析

EBV 感染 NOG マウス末梢血より IMag anti-human CD8 Particles-DM (BD Biosciences) を用いて CD8 細胞を分離した。この CD8 細胞を autologous な (ヒト化に用いたのと同じ臍帯血由来の) リンパ芽球様細胞株 (LCL) とともに抗 IFN- γ 抗体を付着させたマイクロプレート上で混合培養し、IFN- γ 産生細胞数を MMUNOCYTO IFN- γ ELISPOT kit (MBL) を用いて定量した。

9. フローサイトメトリーによる EBV 特異的 T 細胞応答の検出

EBV 感染 NOG マウスの脾臓より IMag anti-human CD8 Particles-DM (BD Biosciences) を用いて CD8 細胞を分離した。これと autologous な LCL を Brefeldin A 存在下で混合培養したのち、paraformaldehyde により膜透過を誘導し、抗 IFN- γ により染色した。観察には EpicsXL (Beckman Coulter) を用いた。

10. MHC テトラマーによる EBV 特異的 T 細胞の定量

5 種類の EBV 蛋白質、LMP2、EBNA3A、EBNA3B、BRLF1、BMLF1 に由来するペプチドとヒトクラス I MHC (A*2402) の組み合わせによるテトラマーの混合物を用いて、EBV 感染マウスの T リンパ球を染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

11. EBV 感染細胞増殖阻止試験

EBV 未感染ヒト化 NOG マウスの脾臓よ

り分離した B リンパ球に EBV を感染させ、マイクロプレートに分注した。これらの細胞を 2 群に分け、1 群には EBV 感染マウス脾臓より分離した CD8 陽性 T 細胞を、他の群には未感染ヒト化マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を混合した。8 週間培養したのち増殖を示した well の数を両群の間で比較した。すべての実験を同一の造血幹細胞サンプルによりヒト化したマウスを用いて行った。

(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、国立感染症研究所、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. ヒト化マウスへの EBV 感染実験

NOG マウスに臍帯血造血幹細胞を移植し、ヒト B および T リンパ球の分化を確認したのち、 1×10^3 TD₅₀ の EBV を静脈内に接種した。感染後 3~4 週間で末梢血に高レ

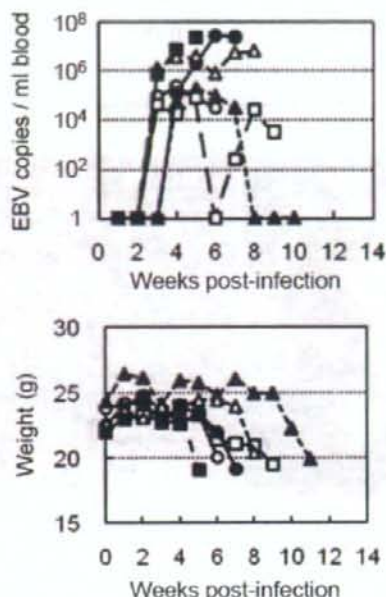


図1. EBV 感染後の末梢血 EBV DNA 量 (上) と体重の変化 (下). 6 頭のマウス (○, ●, □, ■, △, ▲) の結果を示す。

ベル ($10^5 \sim 10^7$ copies/ μ g DNA) の EBV DNA が出現し、感染が確認された。大部分のマウスは体重減少とともに一般状態の急速な悪化を示した (図 1)。

2. リンパ腫

これらのマウスを安楽死させ病理学的・ウイルス学的検索を行ったところ、脾臓の腫大が著名であり、その他リンパ節、肝臓、腎臓、副腎、肺などでリンパ球の増殖を認めた。組織学的には、びまん性大型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)) の像を呈し (図 2)、EBV がコードする小分子 RNA (EBER) を発現していた。免疫化学染色では EBV 蛋白質 EBNA2 と LMP1 の発現が認められた。また、リンパ球表面マーカーとしては、CD20, CD23, Mum-1 などを発現しており、活性化 B 細胞の形質を示していた。RT-PCR 法による解析

では、EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2 の発現が陽性となり、latency III 型に一致していた (図3)。以上の結果はこのモデルマウスのリンパ腫が、組織像、細胞表面マーカー

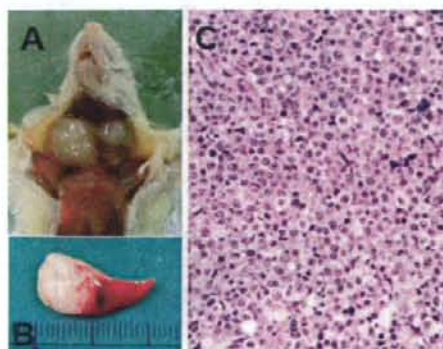


図2. EBV 感染マウスのリンパ腫。頸部リンパ節の腫脹 (A)、脾臓の腫脹 (B)、リンパ腫の HE 染色 (C) を示す。

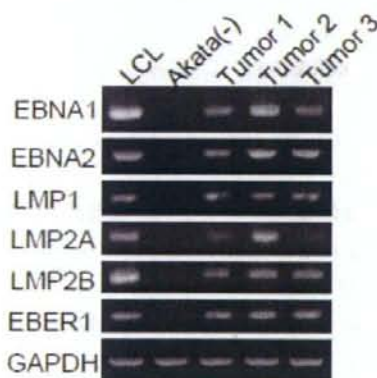


図3. マウスリンパ腫における EBV 遺伝子発現の RT-PCR による解析。

発現、EBV 遺伝子発現の全ての点で、ヒトの EBV 関連リンパ増殖性疾患と一致しており、モデルとしての有用性が示唆された。

3. 不顕性持続感染の誘導

EBV 感染の帰結と感染量との関係を知るために、 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 TD₅₀ (50% transforming dose) のウイルスを静脈内に接

種したところ、 10^1 TD₅₀ 以下のウイルス量では、約半数のマウスはリンパ腫を発症せず、一般状態に変化なく長期に渡って生存した。末梢血 EBV DNA 量は一過性に上昇 (10^2 ~ 10^4 copies/ μ g DNA) した後検出感度以下に低下した (図4)。感染後6ヶ月以上経った後、安楽死させ病理学的学的解析を

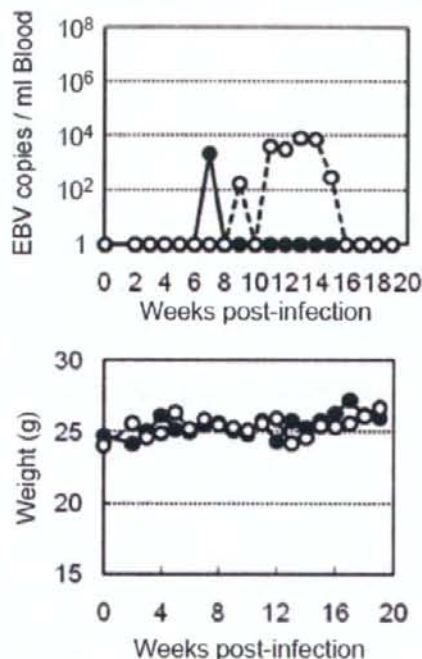


図4. 低ウイルス量 ($<10^1$ TD₅₀) の感染に引き続く不顕性持続感染。末梢血 EBV DNA 量と体重の変化を示す。2 頭のマウス (O, ●) の結果を示す。

加えたところ、一部のマウスに軽度の脾腫大が認められた以外は、異常を認めなかった。また、複数の臓器から比較的低レベル (10^0 ~ 10^3 copies/ μ g DNA) の EBV DNA が検出され、持続感染状態であったことが示された。マウスのこのような不顕性持続感染状態がヒトの EBV 潜伏感染を再現しているかどうかを現在解析中である。

4. EBV 特異的 T 細胞免疫応答

EBV 感染マウスでは、感染後数週で末梢血中 CD8 細胞数が感染量に応じて急激に増加した。このような T 細胞の応答が EBV 特異的であることを確かめるために、ELISPOT 法による検討を行った。まず、ヒト化に用いた造血幹細胞を分離した元の臍帯血より B 細胞を分離し、EBV を感染させることにより autologous なリンパ芽球様細胞株 (LCL) を樹立した。感染マウス末梢血より CD8 細胞を分離し、この LCL と共培養したところ、ELISPOT 法により IFN- γ 産生細胞が検出された (図 5-(3))。一方、

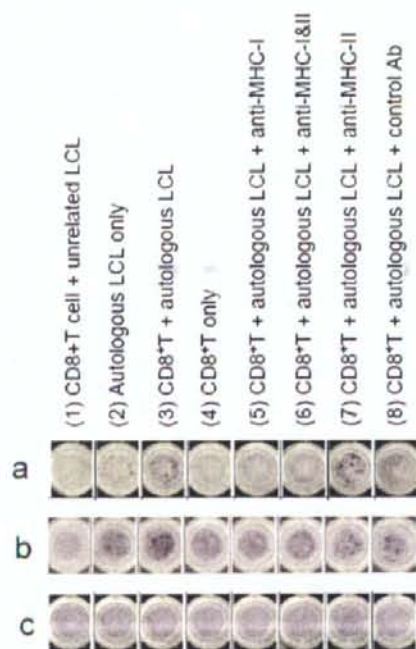


図 5. ELISPOT 法による EBV 特異的 T 細胞の検出。EBV 感染マウスから分離した CD8 細胞を autologous な LCL により刺激し、IFN- γ 産生細胞をスポットとして検出した。

CD8 細胞のみの培養では、IFN- γ 産生細胞は検出されず (図 5-(4))、また LCL のみの培養でもごくわずかであった (図 5-(2))。ま

た、IFN- γ 産生は CD8 細胞と他者 (allo) の LCL との共培養では認められず (図 5-(1))、ヒト MHC クラス I に対する抗体により阻害された (図 5-(5))。以上より、EBV 感染ヒト化 NOG マウスでは、ヒト MHC クラス I に拘束された EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることが強く示唆された。

次に EBV 特異性を直接検討するためにヒト MHC クラス I テトラマーとの反応性を調べた。HLA A*2402 をもつ造血幹細胞によりヒト化したマウスに EBV を感染させ、末梢血単核細胞を分離した。EBV 蛋白質 LMP2, EBNA3A, EBNA3B, BRLF1, BMLF1 のそれぞれを提示する HLA A*2402 テトラマーの混合物とこの単核細胞の反応性を検討した結果、ヒト CD45 陽性リンパ球のうち 0.1~0.3% (CD8 細胞当たり 0.1~0.7%) が反応性をもつことが示された (図 6)。

また予備的実験において、感染マウス由来 CD8 細胞と混合培養することにより EBV 感染 B 細胞の増殖が阻害されることが示唆された。

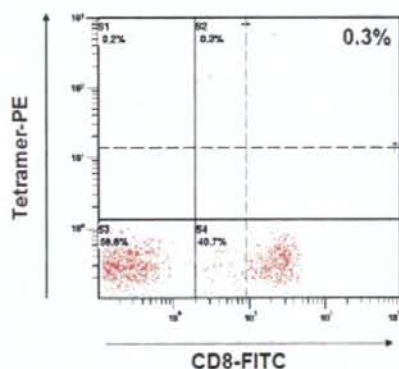


図 6. EBV 感染マウス末梢血中の EBV 特異的 T 細胞。EBV 蛋白質由来ペプチドを提示するヒト MHC クラス I テトラマーと抗 CD8 抗体による染色。

5. 抗 EBV 抗体の検出

EBV 感染マウス 28 頭の血清をウエスタ

ンプ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7)。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。

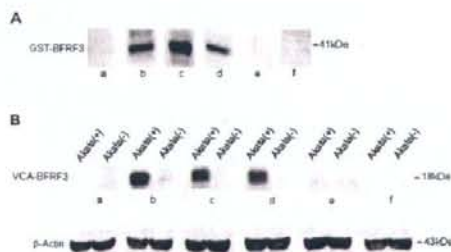


図7. EBV感染NOGマウス血清中の抗EBV IgM抗体 GST-BFRF3融合蛋白質(A)および抗IgG処理したAkata細胞(B)を抗原とするウェスタンブロット法により、p18^{BFRF3}に対するIgM抗体を検出した。3例(b, c, d)のマウス血清の結果を示す。

D. 考察

臍帯血造血幹細胞を移植しヒト化したNOGマウスにEBVを感染させ、感染モデルを作製した。このモデルでは、組織像、細胞表面マーカー発現、EBV遺伝子発現の全てにおいてヒトのEBV関連リンパ増殖性疾患と一致するリンパ腫が発生した。また、低ウイルス感染量の場合には不顕性持続感染となるマウスが認められた。さらに、ELISPOT法やテトラマー法などによりEBV特異的CD8細胞が検出され、予備的な実験ではこのCD8細胞がEBV感染細胞の増殖阻害作用をもつことが示唆された。EBV蛋白質p18^{BFRF3}に対するIgM抗体も検出されている。これらの結果から、本研究で作製されたEBV感染マウスは、現時点でヒトEBV感染に関わるもっとも多くの基

本現象を再現する包括的な小動物モデルであると考えられた。

マウスにおけるT細胞応答が、実際にEBV感染細胞に対する増殖阻害作用をもつため、このモデルを用いて免疫不全とLPD発症との関連を詳細に解析することが可能と考えられる。持続感染状態のマウスに免疫抑制薬を投与した後、免疫パラメーターの変動とリンパ腫発症を追跡することにより、リンパ腫発症と特に関連の深いパラメーターを見つけ出す実験を進めている。また、LPDには免疫不全以外にも発症要因が存在すると考えられており、そのような因子を探索する場としても本モデルは有効であると考えられる。治療法開発に関しては、抗ヘルペス薬acyclovirなどの効果を検討しているが、最終的な結果はまだ得られていない。

E. 結論

ヒト化NOGマウスを用いて、現時点でもっとも総合的なEBV感染小動物モデルの作製に成功した。本モデルを用いて、EBV関連疾患の発症機序、病態、治療法開発に関する研究が進展している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., and 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: 673-682, 2008.
- 2) Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi,

A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., 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.* 131: 170-179, 2008.

3) 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.* in press.

4) 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. 著書

1) 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.

2) 中村浩幸、藤原成悦. γ 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.580-583, 2006.

3. 学会発表

(特別講演・シンポジウム・ワークショップ)

1) 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— 2008.11.28. 小児血液・腫瘍懇話会特別講演、東京.

2) 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. 2009.3.14. 悪性リンパ腫研究会特別講演、東京.

3) 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—ウイルス病原性発現機構の解析 (DNA ウイルス)—. 2007 年 10 月、札幌.

4) 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—ヒト免疫—. 横浜. 2007 年 12 月.

5) 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特別講演. 2006 年 5 月 27 日、東京.

6) 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ワークショップ—ウイルス感染と宿主応答・ウイルス側の要因—. 大阪. 2006 年 12 月.

(一般発表)

1) 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 18 日、米子.

2) 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 26 日、岡山.

- 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、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。
- 8) 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。

9) 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。

10) 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 54 回日本ウイルス学会学術集会。2006 年 11 月、名古屋。

11) 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 2006.11.25-26、大阪府、大阪市、大阪国際会議場

12) 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 ウイルスのがん遺伝子 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」。名古屋。2006 年 12 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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

研究分担者 白木公康 富山大学医薬学研究部ウイルス学教授

研究要旨：2例の骨髄移植患者の難治性単純ヘルペスウイルス（HSV）感染症とサイトメガロウイルス（CMV）感染症患者から、それぞれアシクロビル（ACV）とガンシクロビル（GCV）耐性ウイルスを得て、それらの抗ウイルス薬感受性、遺伝子変異の同定とウイルス学的検討を行った。ACV 耐性株はチミジンキナーゼ（TK）遺伝子に変異があり TK 活性を欠損するだけでなく、指で増殖したためか、高温で増殖能を損なった温度感受性であった。この温度感受性はマウスの側腹部と耳介（低温部）での病原性の差違からも確認できた。また、わが国で開発された核酸系免疫抑制剤ミゾリピン（MIZ）を免疫抑制剤として使用した腎移植患者では、CMV 感染症が有意に低いので、MIZ の抗 CMV 活性を解析しその抗 CMV 活性の特徴を明らかにした。

A. 研究目的

骨髄移植患者などの免疫不全患者においては、難治性 HSV 感染症と CMV 感染症が認められ、その予防と早期診断と早期治療が行われている。これらのウイルス性疾患では、免疫不全患者においては、自己の免疫低下のため、回復過程が障害されているため、抗ウイルス薬が有効であるにもかかわらず、臨床的に抗ウイルス薬が奏功しない臨床的耐性ウイルス感染症と実際にウイルスが薬剤耐性で有効でないことの区別は容易ではない。免疫不全患者からのウイルス分離を行ってきたが多くの感受性ウイルスであった。本研究では、骨髄移植患者の難治性 HSV 感染症と CMV 感染症患者から、それぞれ ACV 耐性、GCV 耐性ウイルスを分離した。それらのウイルスの遺伝子変異と分離ウイルスの性状解析を行い、適切な治療法を検討する基礎とすることを目的とした。

さらに、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、腎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/サイクロスポリンとプレドニンに加える第 3 の免疫抑制剤として、ミゾリピン（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 高用量ミゾリピン群と MMF 群の成績 ②
(岡本)

	高用量 ミゾリピン群 (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。

以上のように、本分担研究では、臓器移植患者での免疫抑制剤によるヘルペス感染症の予防と難治性ウイルス感染症の病原薬剤耐性ウイルスの解析を行った。

B. 研究方法

HSV については、図 1 のような臨床経過のなかで、患者の病変部位(外陰部病変、親

指瘻疽)の塗抹標本から分離した。CMV は尿、血液から分離した。分離されたウイルスは、各抗ウイルス薬に対するブラック減少法による IC₅₀ により感受性を算出した。HSV の温度感受性は 33 度と 39 度で 39 度でのブラック形成率(悪さ)で示した。

HSV の動物での病原性は、側腹部と耳介部(低温部位 27 度)での皮膚病原性により検討した。

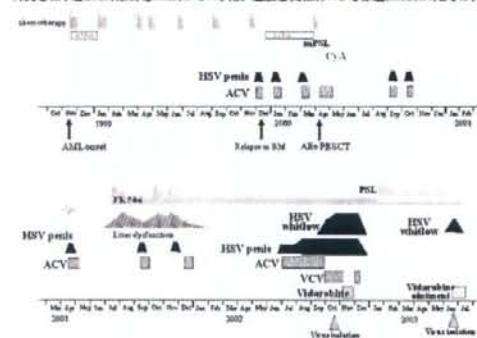
塩基配列は、ダイデオキシ法により決定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、富山大学動物実験委員会にて、実験の承認を得ている。

C. 研究結果

図1 骨髄移植患者に生じた慢性単純ヘルペスウイルス感染(1)再発を繰り返した外陰部(genital)からTK欠損・温度感受性株による瘻疽(whitlow 1)とその再発



骨髄移植患者に発生した性器ヘルペスと瘻疽から分離した HSV 株 (Genital, whitlow 1 と 2) の感受性(表 1)のように、whitlow 株はアシクロビル耐性で TK 欠損株であった。そして、TK 欠損株は、4 個のシトシンの連続する部分でシトシンの欠損があり、フレームシフトが起こり、TK 活性を失っていた。登録された配列

は、AB178228, AB178229, AB178230 である。

表 1 分離ウイルスの薬剤感受性 (IC₅₀)

μg/ml	Acyclovir	IDU	Vidarabine	Foscarnet
Whitlow 1	19.4 ± 2.2	29.3 ± 7.5	7.6 ± 1.4	23.3 ± 1.7
Whitlow 2	21.0 ± 2.7	36.7 ± 3.8	7.4 ± 1.2	43.3 ± 1.5
野生株	0.85 ± 0.25	3.3 ± 0.35	7.6 ± 0.2	35.9 ± 0.5

図 2 瘻疽由来株の温度感受性

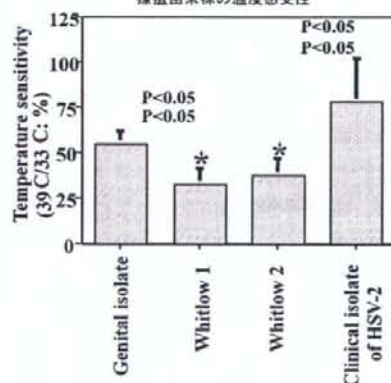
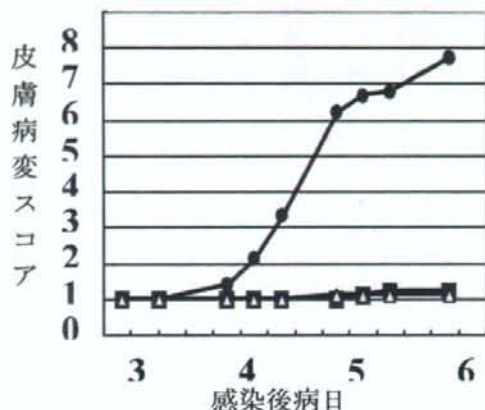


図 2 に示すように、瘻疽からの分離株は、TK 欠損株というだけでなく、性器からの分離株に比べ温度感受性であった。すなわち、genital に比べ、whitlow からのウイルスは、外陰部と指の温度差のように高温では増殖しにくいことを意味する。

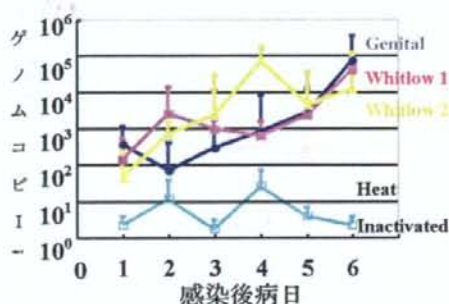
側腹部では、図 3 のように genital (●) は病変を形成するが、whitlow からのウイルス (■, △) は、病変を形成しなかった。

図3 genitalと whitlow からのウイルスのマウス側腹部病変の形成能



一方、側腹部に比べ低温である耳介感染においては、3株とも同様な病変を形成して、側腹部と耳介での病原性の違いが、温度に依存することがわかった。

図4 耳介皮膚でのウイルス量の増加

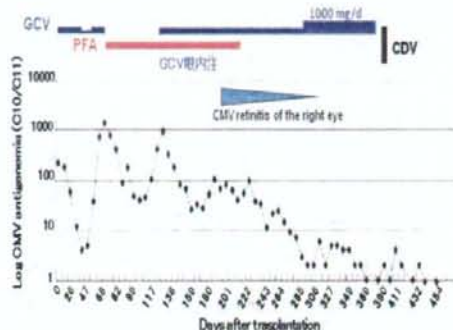


以上のことから、骨髄移植患者で認められた薬剤耐性 HSV ウイルスは、再発を繰り返す慢性性器ヘルペスから、アシクロビル治療中にアシクロビル耐性ウイルスが生じ、そのウイルスによる瘰癧として HSV 病変を発症し、いったん回復した半年後に再発した。指の温度が 33 度以下とされ、指に感染し増殖する際に、温度依存性病原性を獲得したと考えられる。

このように、ACV 感受性と非感受性ウイルスが同時に病変を形成したのは世界で初

めての症例で、温度感受性下部による病変形成に関しても初めての報告であった。

図5 骨髄移植患者で慢性 CMV 感染症中に分離された薬剤耐性ウイルスの分離とシドフォビル治療による CMV 感染症の終息



第2例目の図5の骨髄移植患者で分離されたガンシクロビル耐性 CMV は、治療がガンシクロビルだけでなく、フォスカビルによる治療も行われていた。そのため、分離されたウイルスの感受性(表2)から、両者に耐性であることが判明した。そして、遺伝子変異を決定した。その結果、UL97(リン酸化酵素)と UL54(DNA 合成酵素)の両者に変異が認められた。UL54の変異は、フォスカビルに高い耐性を有するが、ガンシクロビルに対しては、2倍程度と軽い耐性であったので、最終的に、高濃度のガンシクロビル治療に反応していたようであった。その後、薬剤感受性測定結果からシドフォビルが使われ、患者は CMV 感染症から離脱して、再発さえ認めなかった。

表2 分離ウイルスの薬剤感受性

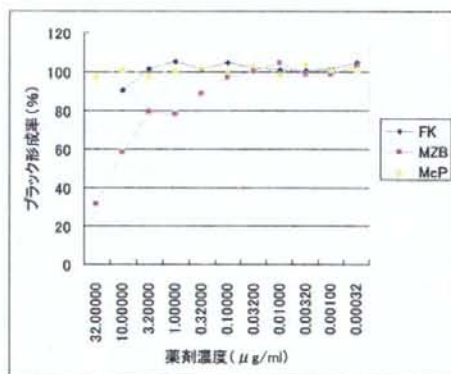
($\mu\text{g/ml}$)	Towne	分離株
GCV	0.66±0.05	4.54±1.03
CDV	0.11±0.05	0.20±0.05

表3 ガンシクロビル耐性遺伝子変異

A. UL97 (リン酸化酵素)	
A594V	アラニンからパリン (ガンシクロビル耐性)
その他、A140V	
B. UL54 (DNA合成酵素)	
Q578H	グルタミンがヒスチジン (フォスカビル耐性)
その他、V11L、S655L、G874R	

平成19年度に報告したが、わが国で開発された免疫抑制剤ミソリピン (MIZ) は、サイクロスポリン/FK506 とプレドニンに加わる免疫抑制剤ミコフェノール酸 (MMF) とともに、第3の免疫抑制剤として使用されている。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6)。

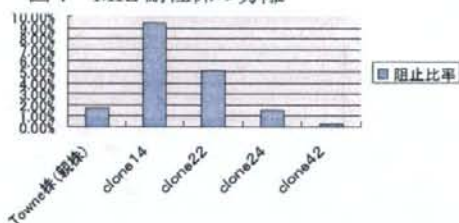
図6 FK506、MIZ、MMF (McP) の CMV ブラック形成に対する影響



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。

図7は、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 クローン中4株について、増殖阻害効果で確認した。

図7 MIZ 耐性株の分離



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、増殖阻害の程度が軽いことから、この2株を耐性株とした。

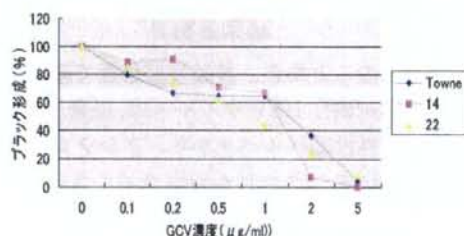
表4 ミソリピン100μg/mlでのブラック形成率(%)

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

100 μg/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阻害効果を検討した (表4)。

図8 MIZ耐性株のGCV感受性



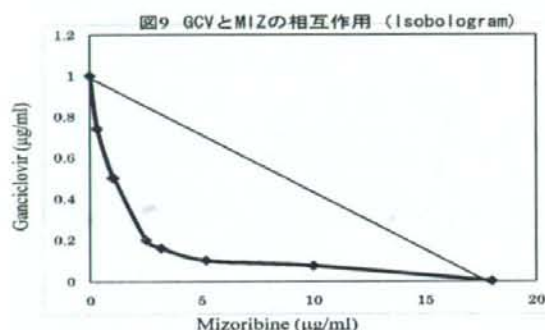
両MIZ耐性株は、Towne株と同等にGCV感受性であり、MIZの作用部位とGCVの作用部位が異なることが明らかになった (図8)。

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。



MIZ と GCV は、強力な相乗作用が確認できた。このことはその作用機序が異なることから予想されたが、MIZ はグアノシンの代謝酵素 inosine monophosphate dehydrogenase を阻害し、グアノシンを減少させることが、グアノシン誘導体 GCV の抗 CMV 活性を非常に高めていたと考えられる。

D. 考察と E. 結論

骨髄移植患者では、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、適合性のため強い免疫抑制が必要なため、免疫不全状態において今回報告したような難治性感染症、耐性ウイルス感染症は避けられない。ACV 耐性 HSV には海外ではフォスカビルが標準的であり、ガンシクロビル耐性 CMV にはフォスカビルとシドフォビルが標準的である。しかし、わが国では、適応症となっておらず使用できない。第 2 例目のように、シドフォビルが奏効していることから、わが国でもこれらの抗ウイルス薬が使用できることが望ましい。

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はあるが、このことは、免疫抑制薬による免疫抑制を実施しながら、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
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
 3. 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(10):1769-1775, 2008.
 4. 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. 2020-2024,2009
 5. 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, 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, 演題番号 3.35, 2006, 7, Seattle.
 2. Phromjai J 他: Hepatocyte injury by non-hepatitis viruses in vitro. 第47回日本臨床ウイルス学会, 演題番号 1B-07, 2006, 6, 東京.
 3. Phromjai J 他:Apoptosis in hep G2 infected by non-hepatitis viruses in vitro. 日本ウイルス学会第54回学術集会, 演題番号 2P-105、2006, 11, 名古屋.
 4. 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
 5. 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
 6. 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

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

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およ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（水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)等が原因)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った。Ad ベクターは既存の遺伝子導入ベクターの中でも最も遺伝子導入効率が良く、容易に高タイトルのウイルスが得られる。そのため Ad ベクターに short interfering RNA (siRNA)発現カセットを導入する事で、ターゲット遺伝子の効果的な発現抑制が期待される。本研究では水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)と HHV-6 をターゲットとして研究を行うとともに、高いノックダウン効率を示す siRNA 発現 Ad ベクターの作製を試みた。

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、および社会の安定維持に大きく貢献する。

A. 研究目的

RNA 干渉(RNA interference; RNAi)と 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を期待される。

B. 研究方法

1. 標的細胞における Ad ベクター遺伝子導入効率の検討

(1) Ad ベクター

プロモータは CA プロモーター (β -actin promoter/cytomegalovirus (CMV) enhancer with a β -actin intron) と CMV プロモータの二種類の検討を行った。また、従来の 5 型 Ad ベクター(Ad5)

の他、35 型 Ad ベクター(Ad35)、Ad ゲノムのファイバータンパク質の C 末端をコードした領域にポリリジン(KKKKKKK)配列を挿入したベクター(AdK7)、Ad ゲノムのファイバー部の HI Loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクター(AdRGD)、そしてファイバータンパク質を 35 型に置換したベクター(AdF35)を用いて、検討を行った[Table.1]。

(2) 細胞培養

VZV 感染実験では、MeWo 細胞(ヒト繊維芽細胞様悪性黒色腫細胞)および MRC5 細胞(ヒト肺繊維芽細胞)を、HHV-6 感染実験では MT4 細胞(ヒト T 細胞)、Molt3 細胞(ヒト T 細胞)、HSB2 細胞(ヒト T 細胞)、Jurkat 細胞(ヒト T 細胞)を用いた。

(3) coxsackie and adenovirus receptor(CAR)の発現

各種培養細胞に anti-human CAR monoclonal antibody(mAb) [clone, Rmcb 05-644]を 1:100 量で添加して on ice で 30 分間反応させた。PBS(-)で wash 後、二次抗体 (FITC 標識 goat-anti mouse IgG polyclonal Ab (BD Pharmingen)) を 1:100 で添加して on ice で 30 分間反応させた。Wash 後、FACS Calibur (BD Bioscience)にて測定・解析した。

(4) HHV-6 標的細胞への遺伝子導入

MT4、Molt3、HSB2、Jurkat 細胞を 1×10^7 cells/mL の濃度で無血清培地に懸濁した。この細胞液にルシフェラーゼもしくは GFP 発現 Ad ベクターを 3000 virus particles (VP)/cell となるように 1.5 時間感染させた。その後、細胞を回収、wash 後、培養培地を 4×10^5 cells/ml となるように添加した。そのまま 37°C で培養を行い、24 もしくは 48 時間後に回収して遺伝子発現効率を測定・解析した。

(5) VZV 標的細胞への高効率遺伝子導入

MeWo 細胞、MRC5 細胞を 6well プレートに 2×10^6 cells/well となるように播種し、翌日ルシフェラーゼもしくは GFP 発現 Ad ベクターを 3000 VP/cell で 1.5 時間感染させた。その後 PBS(-)で wash し、余分な Ad ベクターを除去したのち、培養培地を添加した。24 時間後、GFP の発現を測定・解析した。

2. small interfering RNA (siRNA)発現ベクターの構築

(1) miRNA 発現プラスミドの作製

インビトロジェン社の miRNA 設計アルゴリズムにより選定した配列を用いてプラスミドの構築を行った。miRNA 発現カセットは Invitrogen 社のものを利用した。VZV の標的遺伝子としては、tegument タンパク質をコードする Open Reading Frame (ORF)62 と糖タンパク gE をコードする ORF68 を選定した。

(2) shRNA 発現プラスミドの作製

siRNA の標的配列は、アルファジェン社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は pHM5-ihU6-2 を用いた。導入するための linker を含むオリゴをアニーリングの後、ligation して導入した。

(3) 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。ターゲット領域の増幅に使用し

たプライマーを以下に示す。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'。増幅したフラグメントは、当研究室で構築した Luciferase 発現ベクター(pCMVL1 または pHCMV5-Luc)の luciferase 遺伝子と poly(A)の間に導入した。標的配列が 2kb を超える ORF62 は、分割して導入した。

(4) 標的配列スクリーニング

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した。計 48 時間培養後、ルシフェラーゼ発現量を測定した。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。

(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'。

(6) shRNA 発現カセット搭載 Ad ベクター (shRNA-Ad ベクター)の構築

最もノックダウン効率の良かった配列を搭載した siRNA 発現カセットを Ad ベクタープラスミド pAdHM4 に挿入した。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。精製およびタイターの測定は定法に従って行った。

3. ヘルペスウイルス感染を阻害しない Ad ベクター感染条件の検討

Ad ベクター感染細胞に VZV、HHV-6 を感染させ、細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) を指標として Ad ベクター未処理の細胞に比べて感染阻害の有無を検討した。

4. 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

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。MeWo 細胞に shRNA-Ad ベクターをそれぞれ 300 VP/cell で 1.5 時間感染させた。計 24 時間培養後 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。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。

(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) を作用させた細胞より RNA を抽出した。RNA は 20 μ g/lane となるように調整し、ホルムアミドを添加後、7M の尿素を含む変性アクリルアミドゲルで泳動した。ナイロンメンブレンに転写後、ジゴキシゲニン(DIG)標識 DNA プローブ (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。その後、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。

(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 で 24 時間感染後、VZV を 10, 50 pfu/well で作用させ、48 hr 後に回収した。Cell lysis buffer (20 mM HEPES, 2 mM EGTA, 10 % Glycerol, 1% Triton-X-100)に溶解後、抗 IE62 (ORF62, ORF71)抗体を用い、Western blot を実施した。

(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 で 24 時間感染後、VZV を 10, 50 pfu/well で MeWo 細胞に作用させた。計 48 時間培養後、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。

(5) RT-PCR による VZV 遺伝子発現の評価

上記と同様に処理した Mewo 細胞より、total RNA を抽出した。逆転写後、ORF62 および ORF68 の発現を RT-PCR により検討した。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。

5 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.14)。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 cgc ttt ttt gga aat-3'; U6-Lu-2, 5'- tgc aat ttc