

T-cell leukemia were described who had developed KS, from the Kyushu region and the southern island of Okinawa, but very few classic cases of KS were reported from other areas of Japan [Kamada et al., 1992]. After 1980, cases of AIDS-KS increased dramatically in Japan because of the rapid spread of AIDS. The introduction of highly active anti-retroviral therapy (HAART) reduced the number of KS cases in Western countries [Jones et al., 1999]. However, KS cases still increased in Japan after 2000 because of the dissemination of HIV infection within the homosexual male community. As well as AIDS-KS, other KSHV-associated diseases, such as AIDS-PEL and AIDS-MCD, also increased during the past 10 years in Japan [Katano et al., 1999a; Hasegawa et al., 2004; Abe et al., 2006]. Therefore, to prevent the spread of AIDS-KS, it is important to determine the clinicopathological features of KSHV-associated diseases in Japan. To date, reports describing the clinicopathological features of Japanese AIDS-KS have all involved only small sample sizes [Fujii et al., 1986; Kamada et al., 1992; Kondo et al., 2000; Yamada et al., 2000; Meng et al., 2001; Sato-Matsumura et al., 2001; Kamiyama et al., 2004; Minoda et al., 2006; Yoshii et al., 2006; Ueno et al., 2007].

The association of KSHV infection with KS pathogenesis has already been well investigated. A latency-associated nuclear antigen 1 (LANA-1) encoded by KSHV is detected in almost all KS cells, indicating that KS cells are infected with KSHV [Dupin et al., 1999; Katano et al., 1999b]. The genome of KSHV is a double-stranded linear DNA of about 170 kbp, flanked by GC-rich terminal repeats [Russo et al., 1996]. The *K1* gene in KSHV contains highly variable regions 1 and 2 (VR1, VR2) and phylogenetic analysis of the *K1* gene classified KSHV into genotypes A–F [Zong et al., 1997, 1999; Meng et al., 1999; Hayward and Zong, 2007]. These genotypes are differently distributed throughout the world: KSHV genotype A is predominant in North America, B in Africa, C in Eurasia and the Mediterranean, D in the Pacific islands, E in Brazilian Amerindians, and F in the Ugandan Bantu tribe [Zong et al., 1999; Biggar et al., 2000; Kajumbula et al., 2006]. Previous studies involving a small number of cases detected genotypes C and A in cases of KS, and genotype D in some cases of classic KS in Japan [Meng et al., 2001; Kamiyama et al., 2004]. However, it is unknown whether these genotypes are associated with any of the clinical features or pathogenesis of KS or other diseases.

In the present study, the clinicopathological features and genotypes of KSHV-associated diseases were investigated in 75 samples originating from all over Japan. The aim was to determine the characteristics of KSHV-associated diseases in Japan.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue Specimens

Studies using human tissue were performed with the approval of the Institutional Review Board of the

National Institute of Infectious Diseases (Approval No. 158). Seventy-five cases of KSHV-associated disease were filed in the Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Japan, from 1995 to April 2009 as consultation cases. They include 68 KS cases, 5 PEL cases, and 5 MCD cases. Two MCD patients and a PEL patient had KS lesions. Frozen tissue samples were available for 21 of these cases. For some other cases, only formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were available. The samples were sent from all over Japan, from the northern island of Hokkaido to Okinawa, the southern island of Japan.

### Histological Grading and Immunohistochemistry

Paraffin sections were hematoxylin and eosin stained and subjected to immunohistochemical staining to detect LANA-1, as described previously [Katano et al., 1999b]. Samples were categorized into three clinical stages of KS (patchy, plaque, or nodular stage) according to the clinical data and the histological findings.

### Preparation of DNA

Total DNA was extracted from fresh-frozen clinical materials or formalin-fixed paraffin-embedded sections as described previously [Asahi-Ozaki et al., 2006]. For the isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded biopsies, three or four 5  $\mu$ m-sections were placed into sterile eppendorf tubes, deparaffinized with xylene, digested with proteinase K, then extracted using the phenol/chloroform method. For fresh-frozen samples, DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

### PCR Amplification and DNA Sequencing

A 160 bp fragment containing VR1 of the *K1* gene was amplified by PCR from DNA samples as described previously [Dilnur et al., 2001]. The primer set used was as follows: forward primer 5'-TTG CCA ATA TCC TGG TAT TGC-3'; reverse primer 5'-CAA GGT TTG TAA GAC AGG TTG-3'. PCR amplification was carried out at 94°C for 2 min (one cycle); 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 2 min (35 cycles); and 72°C for 5 min (one cycle) using the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen), followed by direct sequencing with an ABI sequencer 3130 (Applied Biosystems) using a Big-Dye terminator ready reaction kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

### Phylogenetic Tree Analysis

Nucleotide sequences, excluding primer sequences, were multiple aligned with CLUSTAL W version 1.83 [Jeanmougin et al., 1998], and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining-plot method and Genetyx software (Genetyx, Tokyo, Japan). In addition

to our samples, 20 previously reported *K1* gene sequences were obtained from the GenBank database and used as reference sequences for comparison [Dilnur et al., 2001]. The genotypes of KSHV samples and the GenBank accession numbers of the reference strains are as follows: BCBL-R (genotype A, accession no. AF133038), BCBL-B (A, AF133039), 431KAP (B, AF133040), ASM72 (C, AF133041), BC2 (C, AF133042), TKS10 (D, AF133043), ZKS3 (D, AF133044), US3 (A, AF151688), Ug3 (A, AF151690), US6 (C, AF151686), Au1 (D, AF151687), Ug1 (B, AF151689), 78/48 (C, AF201851), 75/10T (A, AF201848), 80/56 (A, AF2-1853), KS-F (C, U93872), Tupi-1 (E, AF220292), Tupi-2 (AF220293), Wagu128 (E, AY940426), and BCBL-1 (A, U86667) [Meng et al., 1999; Zong et al., 1999; Lacoste et al., 2000; Kazanji et al., 2005]. BCBL-R was used as a consensus sequence.

#### GenBank Accession Numbers

GenBank accession numbers of Japanese KSHV sequences are AF278837 (J1), AF278842 (J2), AF278847–AF278849 (J3–J5), AF278850–AF278852 (J7–J9), AF278838 (J14), AF278839 (J16), AF278840 (J17), AF278841 (J19), AF278843 (J21), AF278844–AF278846 (J24–J26), and GQ848990–GQ849006 (J27–J43).

#### Statistical Analysis

Analysis of statistical significance was carried out using the Chi-squared test or Fisher's exact test for bivariate tabular analysis and the Mann–Whitney test for comparison of two independent groups of sampled data.

### RESULTS

#### Clinical and Pathological Characteristics of KS in Japan

Table I provides a summary of the clinical data. All of the cases were positive for LANA-1 by immunohistochemistry. The 68 pathological samples of KS were taken from various anatomical sites: the skin (84%), the gastrointestinal tract (7%), the lymph node (4%), the lungs (1%), the oral cavity (1%), and the conjunctive (1%) (Fig. 1A). Non-AIDS-KS cases were all presented in the

skin. Among the 68 KS cases, 52 were AIDS-KS (76.4%) and 13 were non-AIDS-KS (19.1%). HIV-1 seropositive data were not available for three KS cases (4.4%). AIDS-KS cases were all from male patients with a mean age of 45.8 years (range: 23–82). By contrast, only six non-AIDS-KS cases were male (46%) and the proportion of female in non-AIDS-KS cases was high (54%). The mean age of non-AIDS-KS cases was 71.8 years (range: 52–87), which was statistically higher than that of AIDS-KS cases (Mann–Whitney test,  $P < 0.01$ ). In addition, the mean age of non-AIDS-associated PEL cases was 97.5 years (range: 94–101), indicating occurrence of PEL in predominantly very elderly patients. Among the non-AIDS-KS cases, nine cases were regarded as classic KS and four cases were iatrogenic KS in immunosuppressed patients. Seven out of 13 non-AIDS-KS cases were in females, including 4 cases of iatrogenic KS. Histologically, the skin lesions of KS were categorized into stages: patchy (27%), plaque (36%), and nodular (34%) (Fig. 1B,C). Among the 13 non-AIDS-KS lesions, 6 lesions (46.2%) were at the plaque stage. However, AIDS-KS lesions represented all three stages, patchy, plaque, and nodular, almost equally. No histological difference was found between AIDS-KS and non-AIDS-KS.

#### Phylogenetic Tree Analysis of VR1 of the *K1* Gene From KSHV Genotypes

KSHV genotypes were determined in 33 cases based on the sequence of VR1 in the *K1* gene [Meng et al., 1999; Zong et al., 1999]. Thirty strains were obtained from KS samples, three from each of the PEL and MCD samples (Fig. 2A). Sixteen strains (J1–J5, J7–J9, J14, J16, J17, J19, J21, and J24–J26) have been described previously (14 KS, one PEL and one MCD case) [Meng et al., 2001]. Construction of a phylogenetic tree revealed that the Japanese cases were categorized into genotypes A, C, and D (Fig. 2B). Genotypes A and C were observed in the AIDS-KS subjects, whereas genotypes A, C, and D were observed in non-AIDS-KS subjects (Fig. 3A). Thus, genotype D was observed only in non-AIDS-KS subjects. All three cases of PEL, including one case of non-AIDS-PEL, were genotype C. Two genotype C and one genotype A sequences were detected in three cases of AIDS-MCD. Genotype A was detected more frequently

TABLE I. Summary of the Clinical Data of All Disease Cases Used in This Study

	n	Mean age	Age range	No. of males (%)	HIV(+)
<b>KS</b>	<b>68</b>	<b>50.7</b>	<b>23–87</b>	<b>61 (89.7%)</b>	<b>52/65 (80.0%)</b>
AIDS-KS	52	45.8	23–82	52 (100%)	—
Non-AIDS-KS	13	71.8	52–87	6 (46.1%)	—
Unknown	3	46.0	33–53	3 (100%)	—
<b>PEL</b>	<b>5*</b>	<b>64.0</b>	<b>42–101</b>	<b>5* (100%)</b>	<b>3*/5 (60%)</b>
AIDS-PEL	3*	45.5	42–49	3* (100%)	—
Non-AIDS-PEL	2	97.5	94–101	2 (100%)	—
<b>AIDS-MCD</b>	<b>5**</b>	<b>38.8</b>	<b>27–56</b>	<b>5** (100%)</b>	<b>5**/5 (100%)</b>
All	75	51.2	23–101	68 (90.7%)	57/72 (79.2%)

\*Including one case having KS. \*\*Including two cases having KS. Bold indicates large categories.

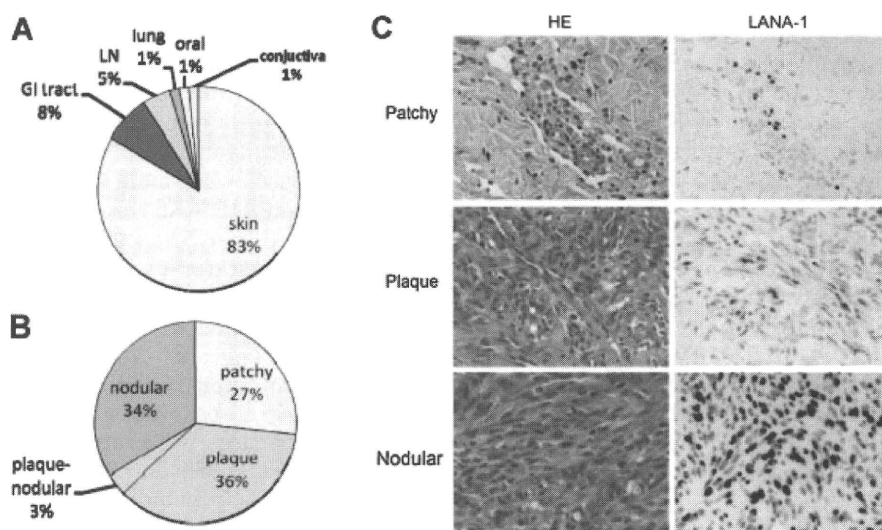


Fig. 1. Site and histology of Japanese Kaposi's sarcoma (KS) cases. Pie charts indicating (A) the site of KS and (B) the histological stage of KS in the skin, in the cases studied. GI: gastrointestinal, LN: lymph node. C: Hematoxylin and eosin (HE) staining (left) and latency-associated nuclear antigen 1 (LANA-1) immunohistochemistry (right) of patchy stage (upper), plaque (middle), and nodular stage (lower) of KS.

in AIDS-associated cases than non-AIDS-associated cases, but the difference was not statistically significant ( $P=0.28$ , Chi-square test with Yate's correction) (Fig. 3B). Genotype C was common in both groups. The mean ages associated with genotypes A, C, and D were 48, 56, and 77, respectively. Genotype D was detected in more elderly patients than genotypes A and C ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney test). These data indicated that genotype D was associated with non-AIDS-associated cases, not with AIDS-associated cases. The findings also suggest that genotype C is broadly distributed in Japan, and genotype A spreads among AIDS patients. There was no detectable histological difference among genotypes.

## DISCUSSION

In this study, the clinicopathological features and genotypes of Japanese cases of KSHV-associated diseases were demonstrated. These data confirmed that non-AIDS-KSHV-associated diseases occurred predominantly in elderly patients. Genotype analyses suggested the broad distribution of genotype C, association of genotype D with non-AIDS-KS and spread of genotype A among AIDS patients in Japan.

There were few reports describing KS in Japan before 1986, and only 14 cases of classic KS were reported between 1917 and 1982 [Fujii et al., 1986]. A group in Okinawa reported six KS cases, including one adult T-cell leukemia-associated and two AIDS-associated cases in 1992 [Kamada et al., 1992]. After the discovery of KSHV in 1994, the association of KSHV infection in Japanese KS cases was proposed [Tachikawa et al., 1996]. Serological assays revealed that the seroprevalence of KSHV was 1.4% among the general population in Japan [Katano et al., 2000]. Almost all patients with

AIDS-KS and non-AIDS-KS had serum antibody to KSHV, and 64% of Japanese AIDS patients, infected with HIV via sexual transmission were positive for anti-KSHV antibody [Katano et al., 2000]. KSHV was detected in all KS cases in Japan with positive immunohistochemical results for LANA-1 [Katano et al., 1999b]. Thus, the correlation between KSHV infection and KS pathogenesis has already been demonstrated in many Japanese cases. However, to date clinical information on Japanese KS cases was rarely reported [Fujii et al., 1986; Kamada et al., 1992; Kondo et al., 2000; Yamada et al., 2000; Kamiyama et al., 2004; Minoda et al., 2006; Yoshii et al., 2006; Ueno et al., 2007]. The difference in the mean age of patients affected by AIDS-KS and non-AIDS-KS was demonstrated in the present study. These results may reflect the population of origin for these patients. Several case studies reported that non-AIDS-KS in Japan is associated with immunosuppression, old age, or iatrogenic factors [Kondo et al., 2000; Yamada et al., 2000; Sato-Matsumura et al., 2001; Yoshii et al., 2006]. Regarding AIDS-KS, an epidemiological survey revealed that 70% of newly-HIV-infected individuals were infected via homosexual behavior (AIDS Surveillance Committee Japan, 2008). HAART decreased the incidence of KS in HIV-infected patients, but the increase of HIV-infection in homosexual men resulted in an increase of AIDS-KS cases in Japan. Although it is suggested that KSHV may be spread among homosexual men in Japan, further epidemiological studies on HIV-infected and uninfected males would be required to clarify the association of KSHV infection with the increase of KS in Japan.

KSHV genotypes are determined based on the sequence of VR1 in the *K1* gene sequence of KSHV [Meng et al., 1999; Zong et al., 1999]. Several variable regions were identified in the KSHV genome [Poole

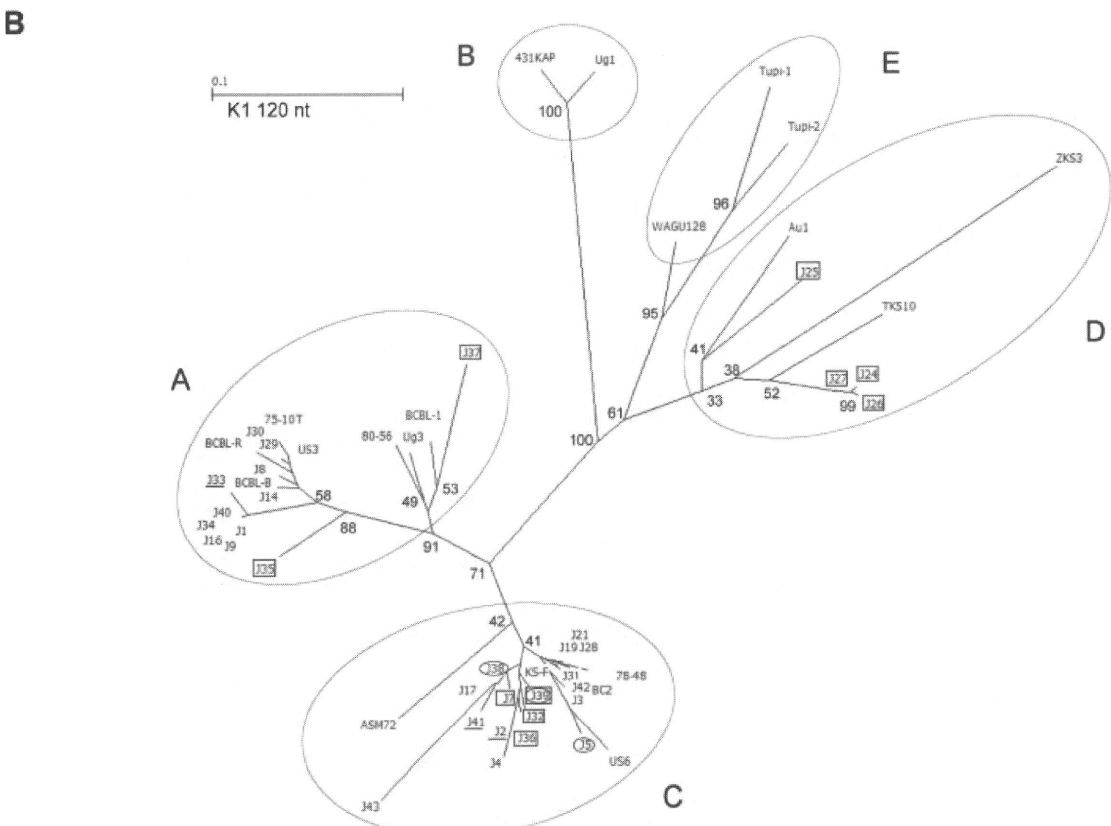
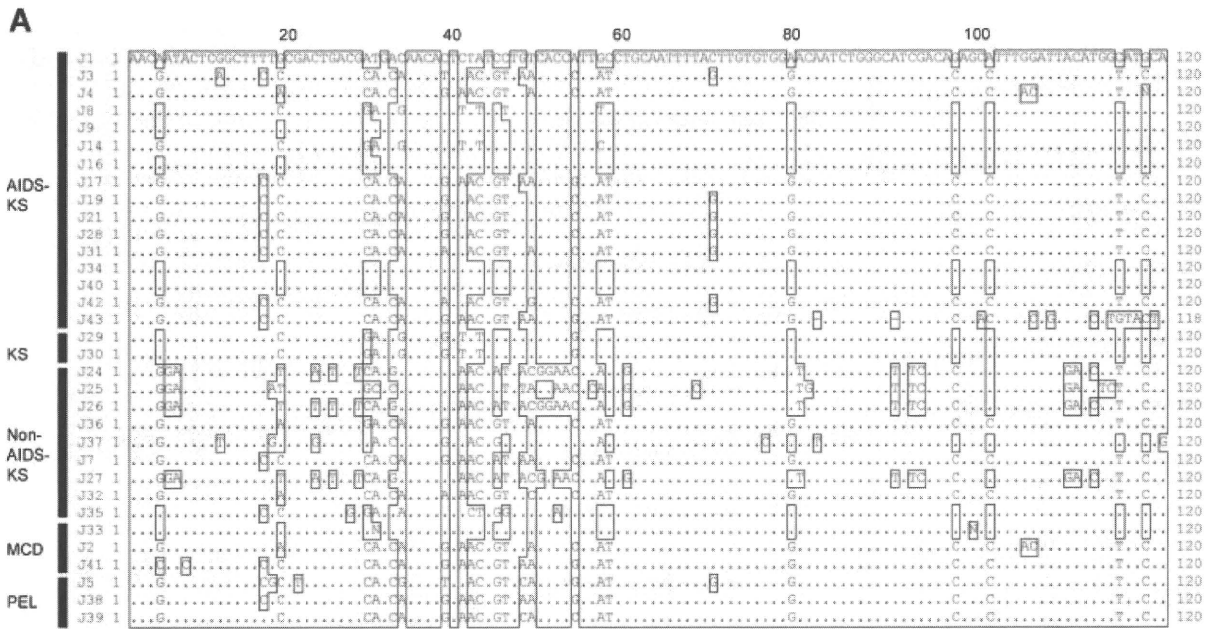


Fig. 2. K1 gene sequences in Japanese cases. **A:** Alignment of K1 gene sequences. One hundred twenty basepair fragments containing VR1 of the *K1* gene are shown. Case J33 had not only MCD, but also KS. HIV-1 seropositive data were not available for J29 and J30 cases. **B:** Radial unrooted phylogenetic tree generated by the NJ method on 120 bp segments of the *K1* gene. The numbers at some nodes (boot strap values) indicate frequencies of occurrence for 100 trees. Scale bar

represents 0.1 substitutions per site. Genotypes A–E are indicated by circles. Japanese cases are indicated by J-numbers. J-numbers with boxes are non-AIDS cases of KS or PEL. J5 and J38 are AIDS-PEL cases (circled). J39 is a non-AIDS-PEL case (circled and boxed). J2, J33, and J41 are AIDS-MCD cases (underlined). All other sequences are included for reference. See text.



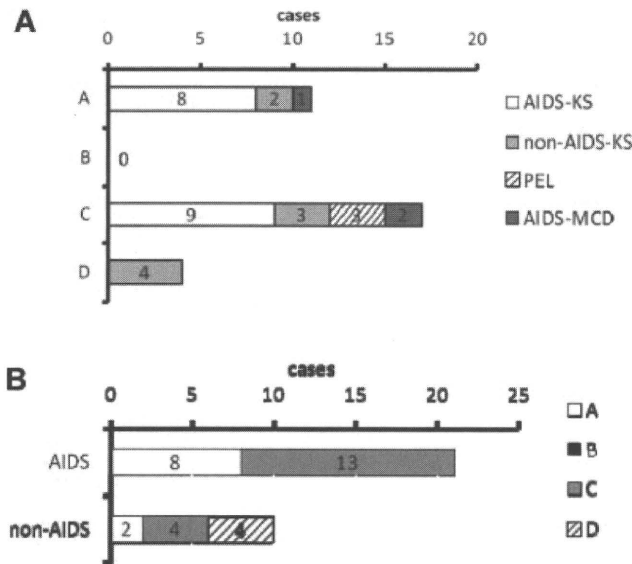


Fig. 3. Graphs indicating the association between: **A**: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) genotypes and diseases (each bar indicates the number of cases). **B**: Genotypes in AIDS-associated and non-AIDS-associated cases.

et al., 1999]. However, since frequent variations were detected in the *K1* gene among strains, the *K1* gene was well investigated and used as a standard for genotype determination [Meng et al., 1999; Zong et al., 1999; Hayward and Zong, 2007]. Genotypes A and C of KSHV are broadly distributed throughout the world. A previous study had already shown that genotype C was predominant not only in Japan, but also in Asian countries, such as Taiwan, Korea, and China [Zong et al., 2002]. Genotype C was detected in Uyghur people in Xinjiang, west of China, that was located at the middle point of the Silk Road from Rome to Xian, China [Dilnur et al., 2001]. The virus may therefore have been transmitted via the migration of people from Europe, and the genotype C virus spread in Asian countries. Genotype D, found in the Oceania region, had already been detected in three cases of non-AIDS-KS in Japan in a previous study [Meng et al., 2001]. One additional case of genotype D was found in a non-AIDS-KS case in the present study, supporting the association of genotype D with non-AIDS-KS. Genotype A was detected in both AIDS-KS and non-AIDS-KS cases in the present study. To date, there has been no report of genotype A in non-AIDS-KS cases in Japan. Genotype A was more frequently found in AIDS-KS cases, suggesting that genotype A came from the USA via homosexual activity. However, detection of genotype A in non-AIDS-KS cases at a low rate suggests that genotype A is also a common virus in the general population in Japan, along with genotype C.

PEL and MCD are very rare diseases associated with KSHV infection. A previous study demonstrated that only AIDS-MCD is associated with KSHV infection, not non-AIDS-MCD in Japan [Suda et al., 2001]. All three cases of PEL investigated in this study were genotype C

virus, while two genotype C and one genotype A were detected in three cases of MCD. There was no correlation between KSHV genotype and disease, suggesting that any genotype in Japan may induce any type of KSHV-associated disease. Considering 1.4% of KSHV seroprevalence in the general population in Japan, there may be many KSHV-infected individuals without symptoms [Katano et al., 2000]. Although genotype analysis suggests transmission routes of the virus from other countries, further studies using a large number of KSHV-infected patients are needed to clarify the route of KSHV infection among individuals.

## REFERENCES

- Abe Y, Matsubara D, Gatanaga H, Oka S, Kimura S, Sasao Y, Saitoh K, Fujii T, Sato Y, Sata T, Katano H. 2006. Distinct expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded proteins in Kaposi's sarcoma and multicentric Castlemann's disease. *Pathol Int* 56:617-624.
- Antman K, Chang Y. 2000. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 342:1027-1038.
- Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H. 2006. Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases. *J Infect Dis* 193:773-782.
- Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. 2000. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: A hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 181:1562-1568.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-1869.
- Dilnur P, Katano H, Wang ZH, Kudo M, Osakabe Y, Sata T, Ebihara Y. 2001. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 51:845-852.
- Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van ME, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C. 1999. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castlemann's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4546-4551.
- Fujii Y, Takayasu S, Yokoyama S, Ezizuro Y, Minamishima Y, Enjoji M. 1986. Kaposi's sarcoma in a Korean living in Japan. Review of cases reported in Japanese literature. *J Am Acad Dermatol* 15:76-82.
- Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. 2004. BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen as multiple nodular lesions. *Leuk Lymphoma* 45:2169-2172.
- Hayward GS, Zong JC. 2007. Modern evolutionary history of the human KSHV genome. *Curr Top Microbiol Immunol* 312:1-42.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23:403-405.
- Jones JL, Hanson DL, Dworkin MS, Ward JW, Jaffe HW. 1999. Effect of antiretroviral therapy on recent trends in selected cancers among HIV-infected persons. Adult/Adolescent Spectrum of HIV Disease Project Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 21:S11-S17.
- Kajumbula H, Wallace RG, Zong JC, Hokello J, Sussman N, Simms S, Rockwell RF, Pozos R, Hayward GS, Boto W. 2006. Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: Evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology* 49:133-143.
- Kamada Y, Iwamasa T, Miyazato M, Sunagawa K, Kunishima N. 1992. Kaposi sarcoma in Okinawa. *Cancer* 70:861-868.
- Kamiyama K, Kinjo T, Chinen K, Iwamasa T, Uezato H, Miyagi JI, Mori N, Yamane N. 2004. Human herpesvirus 8 (HHV8) sequence variations in HHV8 related tumours in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol* 57:529-535.
- Kaposi M. 1872. Idiopathiches multiples pigment sarcom der Haut. *Arch Dermatol Syphil* 4:265-272.
- Katano H, Hoshino Y, Morishita Y, Nakamura T, Satoh H, Iwamoto A, Herndier B, Mori S. 1999a. Establishing and characterizing a CD30-positive cell line harboring HHV-8 from a primary effusion lymphoma. *J Med Virol* 58:394-401.

- Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. 1999b. High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 155:47–52.
- Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T, Sata T. 2000. Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol* 74:3478–3485.
- Kazanji M, Dussart P, Duprez R, Tortevoe P, Pouliquen JF, Vandekerckhove J, Couppie P, Morvan J, Talarmin A, Gessain A. 2005. Serological and molecular evidence that human herpesvirus 8 is endemic among Amerindians in French Guiana. *J Infect Dis* 192:1525–1529.
- Kondo Y, Izumi T, Yanagawa T, Kanda H, Katano H, Sata T. 2000. Spontaneously regressed Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Pathol Int* 50:340–346.
- Lacoste V, Kadyrova E, Chistiakova I, Gurtsevitch V, Judde JG, Gessain A. 2000. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia. *J Gen Virol* 81:1217–1222.
- Meng YX, Spira TJ, Bhat GJ, Birch CJ, Druce JD, Edlin BR, Edwards R, Gunthel C, Newton R, Stamey FR, Wood C, Pellett PE. 1999. Individuals from North America, Australasia, and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology* 261:106–119.
- Meng YX, Sata T, Stamey FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, Deleon M, De Cristofano MA, Galimberti R, Pellett PE. 2001. Molecular characterization of strains of Human herpesvirus 8 from Japan, Argentina and Kuwait. *J Gen Virol* 82:499–506.
- Minoda H, Usui N, Sata T, Katano H, Serizawa H, Okada S. 2006. Human Herpesvirus-8 in Kaposi's Sarcoma of the Conjunctiva in a Patient with AIDS. *Jpn J Ophthalmol* 50:7–11.
- Moore PS, Chang Y. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 2803–2834.
- Poole LJ, Zong JC, Ciuffo DM, Alcendor DJ, Cannon JS, Ambinder R, Orenstein JM, Reitz MS, Hayward GS. 1999. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end. *J Virol* 73:6646–6660.
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14862–14867.
- Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Nabeshima M, Katano H, Sata T, Koizumi H. 2001. Serological and immunohistochemical detection of human herpesvirus 8 in Kaposi's sarcoma after immunosuppressive therapy for bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 145:633–637.
- Suda T, Katano H, Delsol G, Kakiuchi C, Nakamura T, Shiota M, Sata T, Higashihara M, Mori S. 2001. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castelman's disease. *Pathol Int* 51:671–679.
- Tachikawa N, Goto M, Gatanaga H, Katano H, Oka S, Wakabayashi T, Mori S, Iwamoto A. 1996. Herpesvirus-like DNA sequences in Japanese patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Infect Chemother* 1:190–192.
- Ueno T, Mitsuishi T, Kimura Y, Kato T, Hasegawa H, Katano H, Sata T, Kurane S, Kawana S. 2007. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: Successful treatment with interferon-alpha. *Eur J Dermatol* 17:539–540.
- Yamada Y, Funasaka Y, Nishioka E, Okuno T, Ichihashi M. 2000. A case of classic Kaposi's sarcoma in a Japanese man: Detection of human herpes virus 8 (HHV-8) infection by means of polymerase chain reaction and immunofluorescence assay. *J Dermatol* 27:391–396.
- Yoshii N, Kanekura T, Eizuru Y, Setoyama M, Kanzaki T, Yamanishi K. 2006. Transcripts of the human herpesvirus 8 genome in skin lesions and peripheral blood mononuclear cells of a patient with classic Kaposi's sarcoma. *Clin Exp Dermatol* 31:125–127.
- Zong JC, Metroka C, Reitz MS, Nicholas J, Hayward GS. 1997. Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: Evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate. *J Virol* 71:2505–2511.
- Zong JC, Ciuffo DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, Rady PL, Tyring SK, Orenstein JM, Rabkin CS, Su IJ, Powell KF, Croxson M, Foreman KE, Nickoloff BJ, Alkan S, Hayward GS. 1999. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol* 73:4156–4170.
- Zong J, Ciuffo DM, Viscidi R, Alagiozoglou L, Tyring S, Rady P, Orenstein J, Boto W, Kalumbuja H, Romano N, Melbye M, Kang GH, Boshoff C, Hayward GS. 2002. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: Clustering patterns, novel variants and chimerism. *J Clin Virol* 23:119–148.

## Short Communication

## Virus Detection Using Viro-Adembeads, a Rapid Capture System for Viruses, and Plaque Assay in Intentionally Virus-Contaminated Beverages

Ben Hatano<sup>1,2</sup>, Asato Kojima<sup>1</sup>, Tetsutaro Sata<sup>1</sup>, and Harutaka Katano<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640; and  
<sup>2</sup>Military Medicine Research Unit, Japan Ground Self Defense Force, Tokyo 158-0098, Japan

(Received July 28, 2009. Accepted November 12, 2009)

**SUMMARY:** Intentional contamination of beverages with microbes is one type of bioterrorist threat. While bacteria and fungus can be easily collected by a centrifuge, viruses are difficult to collect from virus-contaminated beverages. In this study, we demonstrated that Viro-Adembeads, a rapid-capture system for viruses using anionic polymer-coated magnetic beads, collected viruses from beverages contaminated intentionally with vaccinia virus and human herpesvirus 8. Real-time PCR showed that the recovery rates of the contaminated viruses in green tea and orange juice were lower than those in milk and water. Plaque assay showed that green tea and orange juice cut the efficiency of vaccinia virus infection in CV-1 cells. These results suggest that the efficiency of virus detection depends on the kind of beverage being tested. Viro-Adembeads would be a useful tool for detecting viruses rapidly in virus-contaminated beverages used in a bioterrorist attack.

Intentional contamination of beverages with microbes is a relatively easy way for terrorists to transmit microbes to anonymous persons and to induce a public panic. Although the few incidents of intentional viral contamination of drinks in Japan to date have not been real bioterrorist attacks, a similar act as a form of terrorism could be devastating. Therefore, an efficient and rapid detection system to detect microbes in contaminated drinks should be developed as an anti-bioterrorism tool. While bacteria and fungi can be easily collected by a centrifuge, viruses are difficult to collect from virus-contaminated beverages. An ultracentrifuge is a useful tool for virus collection in liquid samples, but not every laboratory is equipped with an ultracentrifuge. In addition, virus concentration with an ultracentrifuge usually takes more than 3 h.

Viro-Adembeads (Ademtech, Pessac, France) are recently developed magnetic beads intended for capturing viruses in liquid samples. They are specifically designed to function in virus-containing cell culture media (1,2). An anionic polymer coating on the magnetic beads binds to the surface of virus particles electrically; the complex of virus and beads can then be collected using a magnet. In the present study, we examined the capacity of Viro-Adembeads to collect viruses in virus-contaminated beverages. We also investigated whether the kind of beverage tested affected the efficiency of virus detection in this manner.

To represent intentional contamination of beverages with viruses, we mixed a solution containing two viruses with beverages. Human herpesvirus 8 (HHV-8) and vaccinia virus (LC16m8) were collected as reported previously (3,4). Milk, green tea, water, orange juice, and barley tea were purchased from a convenience store in Tokyo. To create virus-contaminated beverages, we added 0.1 mL of virus solution containing  $1 \times 10^7$  copies of HHV-8 or vaccinia virus into 0.9 mL of beverages in 1.5-mL tubes. Each virus-contaminated beverage

was serially diluted  $\times 10$  with the beverage at each stage, to  $\times 10,000$ . If a terrorist was to contaminate beverages with viruses in a food store, the period of incubation would probably be from 5 min to several days; for our sample incubation time, we incubated the contaminated beverages for 1 h. To collect viruses from virus-contaminated beverage samples, we then used Viro-Adembeads according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25  $\mu$ L of washed Viro-Adembeads solution was added to each 1-mL aliquot of a virus-contaminated beverage sample. After 20 min of agitation at room temperature, the Viro-Adembeads were collected with a magnet. The beads were then washed with PBS twice. DNA was directly extracted from the beads with a DNA extraction kit (DNeasy; Qiagen, Hilden, Germany). The DNA was dissolved in 100  $\mu$ L of water. Virus copy numbers were measured with a TaqMan Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) as previously described (5). To detect HHV-8, we amplified ORF-26 using a previously reported probe and primer set (6). To detect vaccinia virus, we used a consensus probe and primer set targeting the F2R region of orthopoxvirus as follows: forward primer 5'-gatctagtgttcagcagcgggtgta-3', reverse primer 5'-cagatatatgattggatgtagaacacat-3', and probe 5'-FAM-agaggtggaggaatttatagatgatggaagacaagt-TAMRA-3'. The recovery rate was calculated by the retrieved virus copy number with Viro-Adembeads, divided by the input virus copy number in 1 mL of each sample. The results of real-time PCR showed that the amount of collected virus was proportionally reduced as the sample was diluted (Figure 1A and 1B). Copies of HHV-8 and vaccinia virus were reduced almost one-tenth per dilution. However, copies of HHV-8 in  $\times 100$ ,  $\times 1,000$ , and  $\times 10,000$  dilutions of green tea, and vaccinia virus in the  $\times 10$  dilution of green tea were extremely reduced. Although 34% of input HHV-8 was detected in the water sample, other beverages such as milk, orange juice, and green tea demonstrated lower recovery rates (Figure 1C). The recovery rate of HHV-8 with Viro-Adembeads was 39% in culture media (RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum) containing the same amount of HHV-8 to the  $\times 10$  dilution, suggesting similar efficacy of virus collection with Viro-Adembeads between water and culture

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81-3-5285-1111 ext. 2627, Fax: +81-3-5285-1189, E-mail: katano@nih.go.jp

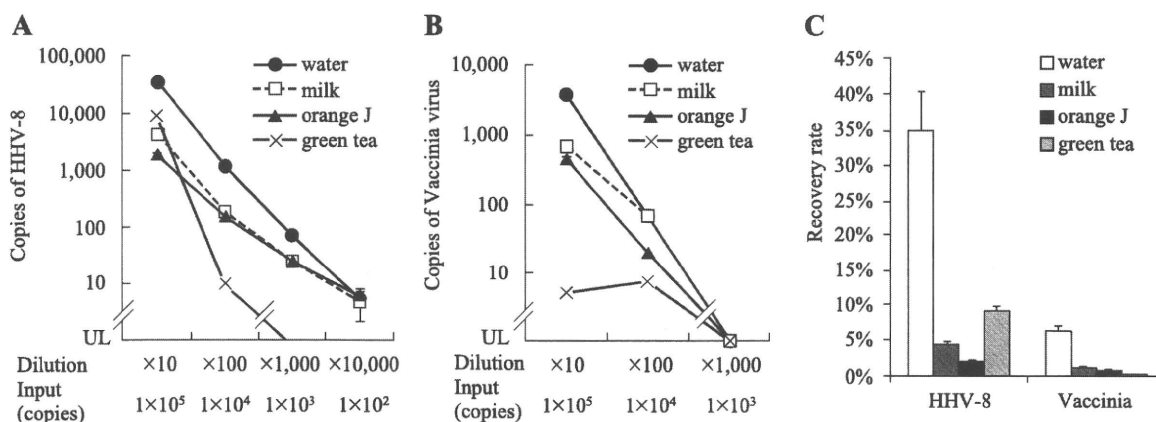


Fig. 1. HHV-8 and vaccinia virus detection using Viro-Adembeads. (A) Copies of HHV-8. (B) Copies of vaccinia virus. The y-axis indicates copy numbers of the virus in 1% of the extracted DNA. 'UL' indicates 'under limitation'. 'Dilution' and 'Input' under the x-axis indicate dilution factors and 1% of the virus copy numbers in 1 mL of each sample, respectively. (C) Recovery rates. Virus solutions were diluted  $\times 10$  with beverages; viruses were then recovered with Viro-Adembeads. Recovery rates were calculated based on the results of real-time PCR. Error bars indicate standard deviations.

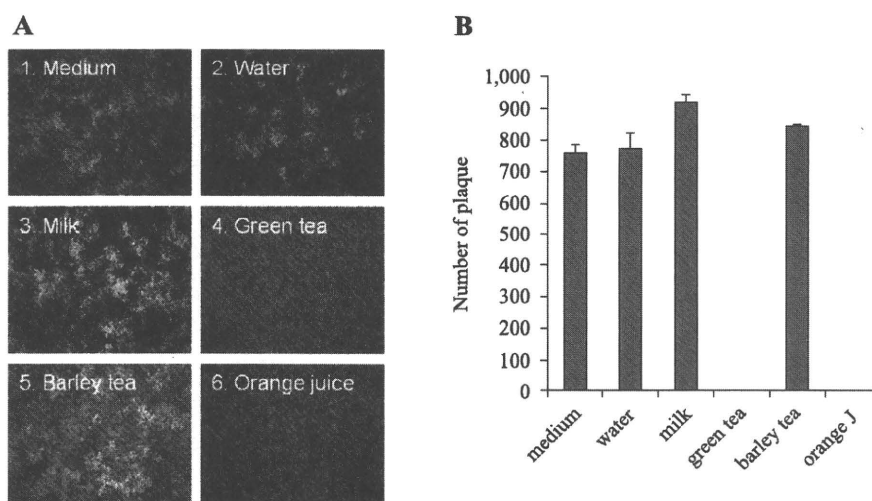


Fig. 2. Green tea and orange juice reduce the efficiency of vaccinia virus infection. (A) Microscopic view of plaques. (B) Numbers of plaque by vaccinia virus. Error bars indicate standard deviations.

media. Vaccinia virus was also recovered at low rates in all beverages. In both viruses, the recovery rates differed among beverages. For example, the recovery rates in milk, orange juice, and green tea were significantly lower than that in water. These results indicate that the efficiency of virus detection depends on the kind of beverage being tested.

To know whether the beverage type affects viral infectivity, we examined a plaque assay using vaccinia virus in the beverages, because it is difficult to perform a plaque assay in HHV-8 (7). Virus solution containing 10,000 plaque-forming units (pfu) was mixed with 1 mL of each beverage and incubated with rotation for 20 min. From these solutions, 100- $\mu$ L samples were added to CV-1 cells with 1 mL of serum-free medium per well in a 6-well plate. The plaque assay showed that the number of plaques was dramatically reduced in green tea and orange juice (Figure 2). The plaque number in barley tea did not change from that of water and milk. These results suggested that green tea and orange juice reduced the infectivity of vaccinia virus. The pH conditions of the water, milk, orange juice, and green tea used in this experiment were pH 7.2, 6.8, 4.0, and 6.2, respectively, suggesting that acidity is not the only factor in reducing virus infectivity.

The results in the present study suggest that the type of

beverage affects virus detection in virus-contaminated beverages and that Viro-Adembeads would be a useful tool for virus detection in virus-contaminated beverages. Our results clearly demonstrated that orange juice and green tea reduced virus infectivity of vaccinia virus. One of the reasons could be a low pH in orange juice, but other factors were unveiled. We checked pH conditions of several kinds of orange juice in a food store and found they ranged from pH 3.3 to pH 4.2, suggesting that the orange juice used in the present study was not special, at least with regard to its pH condition. Incubation of viruses with orange juice or green tea reduced not only the number of plaques in a plaque assay but also the copy numbers of the virus detected by a real-time PCR after virus collection, suggesting that orange juice and green tea affect the binding efficiency of viruses to Viro-Adembeads, in addition to reducing virus infectivity. No plaque was observed in any well of CV-1 cells with 10,000 pfu of vaccinia virus incubated with orange juice or green tea. On the other hand, we could detect the viruses from orange juice or green tea containing the same amount of viruses by Viro-adembeads and real-time PCR, although the recovery rate was low. These data indicated that Viro-adembeads and real-time PCR was more sensitive for detecting vaccinia virus in orange juice



and green tea than was the plaque assay.

The use of Viro-Adembeads is an easy method for collecting viruses from a virus-contaminated liquid. One of the merits of this method is its rapidity. In our experiment, it took about 30 min to collect viruses from virus-contaminated beverages, which is much quicker than the using the ultracentrifuge method. Another merit is that Viro-Adembeads can be used in liquid samples with some precipitation and turbidity, like milk and orange juice. Such precipitation and turbidity interfere with efficient isolation of viruses in any method using an ultracentrifuge. In addition, the use of Viro-Adembeads does not require any machine. Thus, although further studies are required to determine optimal techniques and conditions, Viro-Adembeads could be a useful tool for rapidly detecting viruses in virus-contaminated beverages.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Health and Labour Sciences Research Grants on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (to TS, No. H20-Shinko-Ippan-006) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; and a grant for Research on Publicly Essential Drugs and Medical

Devices from the Japan Health Sciences Foundation (to HK and TS, No. SAA4832).

#### REFERENCES

1. Sakudo, A., Baba, K., Tsukamoto, M., et al. (2009): Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 752-757.
2. Sakudo, A. and Ikuta, K. (2008): Efficient capture of infectious H5 avian influenza virus utilizing magnetic beads coated with anionic polymer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 85-88.
3. Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., et al. (2005): An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.*, 79, 11873-11891.
4. Renne, R., Zhong, W., Herndier, B., et al. (1996): Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat. Med.*, 2, 342-346.
5. Asahi-Ozaki, Y., Sato, Y., Kanno, T., et al. (2006): Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases. *J. Infect. Dis.*, 193, 773-782.
6. White, I.E. and Campbell, T.B. (2000): Quantitation of cell-free and cell-associated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1992-1995.
7. Fedorko, D.P., Preuss, J.C., Fahle, G.A., et al. (2005): Comparison of methods for detection of vaccinia virus in patient specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 4602-4606.

## 第23回日本エイズ学会シンポジウム記録

第23回日本エイズ学会基礎シンポジウム「エイズ発症の  
危険因子としての微生物間相互作用」Microbial Interactions as Risk Factors for  
the Clinical Development of AIDS

岡本 尚 (名古屋市立大学医学研究科細胞分子生物学)

木村 宏 (名古屋大学医学研究科ウイルス学)

片野 晴隆 (国立感染症研究所感染病理部)

塚田 訓久 (国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター)

今井 健一 (名古屋市立大学医学研究科細胞分子生物学)

高折 晃史 (京都大学血液腫瘍内科学)

Takashi OKAMOTO, Hiroshi KIMURA, Harutaka KATANO, Norihisa TSUKADA,  
Kenichi IMAI and Akifumi TAKAORI-KONDO1. はじめに：エイズの病態を形成する他の微生物  
による感染症候

HIV 感染症では、宿主の免疫不全と全身性のサイトカイン不全・過剰を背景に HIV 感染者の体を場として様々な微生物の感染が起こり、その結果様々な形で日和見感染症や特別な形で日和見腫瘍が合併してくる。この現象こそは医学に新しい研究のフィールドを提供するものにも見える。

例えば、Pneumocystis carinii 肺炎、種々の真菌症や結核などの日和見感染、HPV 感染による子宮がんや肛門癌およびヘルペスウイルスの感染症と Kaposi 肉腫や extranodal B cell lymphoma 等がこのような範疇に属す病態である。この他にも、例えば結核菌の感染が単球・マクロファージに潜伏感染する HIV の複製を促すことによってエイズへの進行を促進することなどが明らかにされている<sup>1)</sup>。これらの  $\gamma$  ヘルペスウイルス群による発がん作用には宿主転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が密接に関わっている<sup>2)</sup>。さらに、歯周病は HIV 感染者で免疫不全に伴ってほぼ必発であるが、歯周病菌が嫌気性代謝をする際に代謝産物として排出される mM 単位の酪酸が HDAC 阻害剤として働き、潜伏感染する HIV を転写レベルで活性化することが判明した<sup>3)</sup>。このことは HIV 感染と他の病原体が互いに相手の複製を促

進し、宿主にとって負のスパイラルを構成し、エイズの病態が進行することを示唆している。

まさに異種微生物感染によるこれらの病態こそが「エイズ」の診断基準の主要な部分を構成するわけである。従って、この HIV 感染を背景にした「微生物間相互作用」を解明する事がエイズの病態解明と新しい治療と予防につながるものである。このような個別の研究の中から、より普遍的な新しい医学概念が得られることが期待される。

以下では個々の感染症もしくは病原体ごとにエイズ病態との関連について現時点での考察を試みる。

## 2. 免疫不全宿主における EB ウイルス関連悪性リンパ腫

HAART が導入され、エイズは慢性疾患化し、悪性リンパ腫がエイズの長期予後を決定する重要な因子となった。エイズに伴う悪性リンパ腫は多彩であるが、わが国では Diffuse large B cell lymphoma が多くを占め、時に Burkitt lymphoma や Hodgkin lymphoma, Primary effusion lymphoma が見られる。エイズ関連悪性リンパ腫は節外性、ことに CNS 原発であることが多いのが特徴とされてきたが、近年 CNS 原発のものは減少している。また、HAART 導入以前の悪性リンパ腫の約 9 割が Epstein-Barr (EB) ウイルス関連であったが、現在では 6 割に減少しているという<sup>4)</sup>。それでも、エイズ関連悪性リンパ腫の中で EB ウイルス関連のものの割合が最も高く、重要な位置を占めていることには変わりない。

EB ウイルスは普遍的なウイルスであり、初感染後 B 細

著者連絡先：岡本 尚 (〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学)

2010年3月10日受付

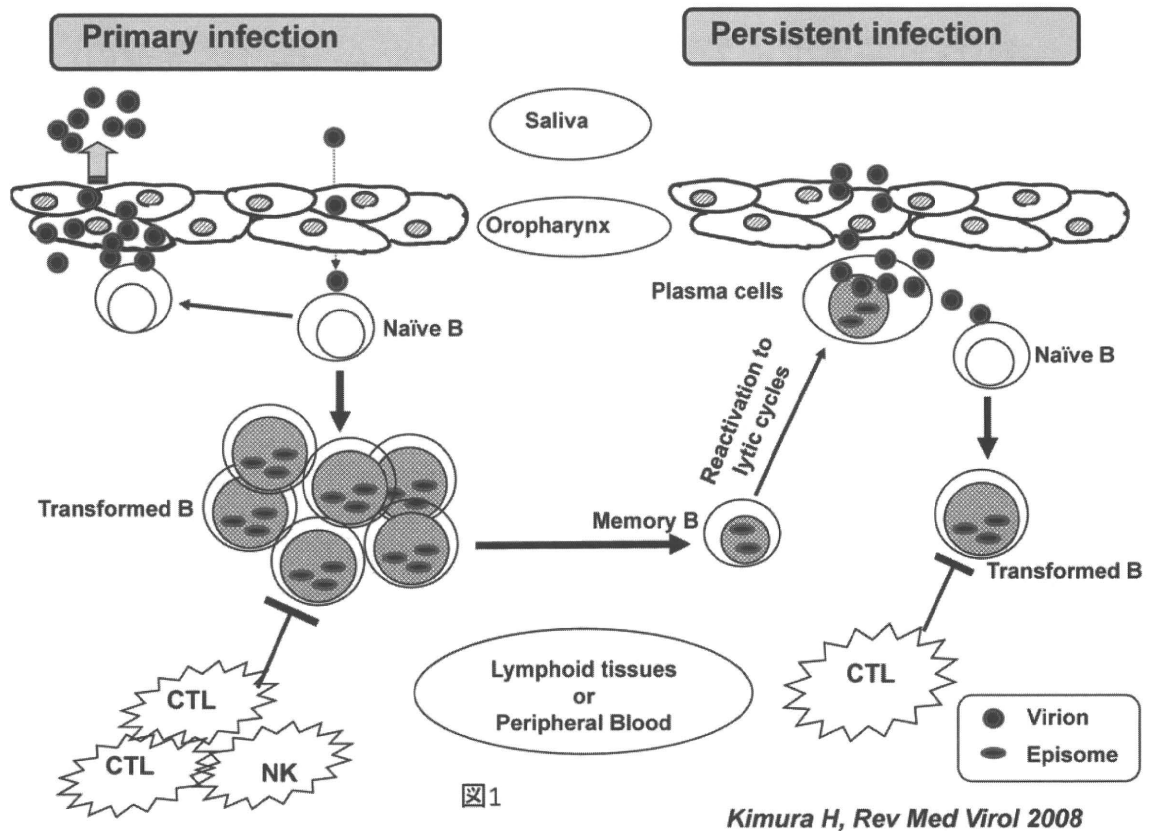


図1 EBウイルス感染におけるリンパ組織における悪性腫瘍の成り立ち  
(Kimura *et al.*, Rev. Med. Virol. 2008 より)。

胞に潜伏感染し、宿主の細胞性免疫抑制により活性化する(図1)<sup>5)</sup>。エイズのみならず、臓器・造血幹細胞移植患者など、様々な免疫不全宿主にEBウイルス関連リンパ腫が発生する。EBウイルスがコードする癌遺伝子としてTNFレセプターファミリーに属する膜タンパクLMP1が知られていた。近年、感染細胞内で多量に発現されているEBV encoded small RNA (EBER)も発癌において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。EBERは、RNA-activated protein kinaseであるPKR (protein kinase R)のリン酸化を阻害するためにEBER発現細胞はIFN $\alpha$ を経由するアポトーシスに対して抵抗性となる。その一方で、RIG-I経路を通してtype 1 IFNやIFN関連遺伝子・IL-10の誘導を行うことで、細胞の不死化に寄与している<sup>6)</sup>。さらに、EBウイルスは様々な機構を介して宿主免疫を抑制し免疫から回避している。HIVとの微生物間相互作用としては、EBNA2がHIV LTRを活性化するという報告もある。逆にHIV感染によりT細胞免疫が抑制されることによりEBウイルスは活性化する。このように、二つのウイルスが同一個体で感染した場合には、共に有利な環境を構築していることになる。

これらEBウイルス関連リンパ腫は難治性・治療抵抗性であり長らく標準的治療は確立していなかった。近年、EBウイルス関連リンパ腫の多くがCD20陽性のB細胞起源であることから、ヒト型CD20モノクローナル抗体であるRituximabを用いた分子標的治療がなされるようになった。しかし、CD20陰性B細胞リンパ腫の選択・出現や、エイズ患者にしばしば見られるPrimary central nervous system lymphomaではRituximabのCNSへの到達性の問題がある。近年、プロテアソーム阻害剤であるBortezomibがEBV関連Bリンパ腫に効果があることがマウスモデルにて示され、ヒトでの有効性が期待されている。一方、EBウイルスはB細胞のみならずT細胞・NK細胞にも感染し、T/NKリンパ腫を起こす。我々は、EBウイルス感染T/NK細胞株にBortezomibを投与し以下の結果を得ている。1) EBV陽性および陰性のT/NK細胞株において、Bortezomib投与群では48時間以降の生細胞率が10%未満まで低下した。2) FlowcytometryでAnnexin Vの増加を認め、早期アポトーシスの誘導を確認した。3) Western blottingで、Bortezomib投与群において、caspase 3, 9, PARPの切断とリン酸化I $\kappa$ Bの増加を認めた。4) Bortezomibによる生細胞

胞率の低下は、caspase 阻害剤の投与で回復した。これらの結果より、Bortezomib はリン酸化 I $\kappa$ B の分解の抑制によって NF- $\kappa$ B の活性化を阻害し、caspase 経路を経てアポトーシスを誘導していると考えられた。さらに正常ヒトリンパ球に Bortezomib を投与した時の生細胞率は 80% 以上であったが、EB ウイルス関連 T/NK 細胞リンパ腫患者の末梢血リンパ球に *ex vivo* に Bortezomib を投与したところ、EB ウイルス陽性細胞にアポトーシスが誘導された。以上より、EB ウイルス関連 T/NK リンパ腫を初めとする悪性リンパ腫に対して Bortezomib が有効な治療法となり得る可能性が示唆された。

### 3. エイズ患者における HHV-8 感染とカポジ肉腫

ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8/KSHV) は 1994 年にエイズ関連カポジ肉腫から発見されたもっとも新しいヒトヘルペスウイルスである<sup>7)</sup>。日本人の健常者の約 1% が HHV-8 に既感染であるが、エイズ関連カポジ肉腫の患者では全員が感染しており、カポジ肉腫のすべての症例から HHV-8 は検出される。したがって、HHV-8 がカポジ肉腫の原因ウイルスであることについては異論がない。また、HHV-8 はカポジ肉腫のみならず、primary effusion lymphoma (PEL) や multicentric Castleman's disease (MCD) のようなリンパ増殖性疾患からも検出される。カポジ肉腫や PEL では HHV-8 は潜伏感染しており、潜伏感染タンパクである latency-associated nuclear antigen (LANA) が常に発現している。LANA は細胞内で p53 と結合し p53 依存性のアポトーシスを阻害するなど、HHV-8 発癌の中心的な役割を果たすだけでなく、潜伏感染の維持、娘細胞へのゲノムの保持などにも関わる。一方で、HHV-8 の感染機構や発癌に至るまでの機序はいまだに不明な点が多い。このあたりの分子機構について、以下に順を追って説明を試みる。

#### 3-1. 炎症と HHV-8 感染

HHV-8 は唾液などの体液から粘膜を經由して感染し、B 細胞に潜伏感染する。B 細胞から HHV-8 が活性化する仕組みはよく知られていないが、我々はエイズ患者では感染症などにより頻繁に炎症が起きていることに注目し、炎症と HHV-8 感染の関連を検索した。ヒトの末梢血単核球に LPS を加え、HHV-8 持続感染細胞 TY-1 を共培養すると、HHV-8 は前初期遺伝子である RTA や viral IL-6 などのウイルス遺伝子を発現する。炎症性サイトカインの刺激により HHV-8 が活性化されたことは明らかで、片野ら<sup>7)</sup>は、なかでも IFN- $\gamma$  が vIL-6 や RTA を発現誘導することを示した。肺結核などの慢性炎症では、炎症の刺激により HIV の複製が起これ、局所における HIV および HIV-Tat の濃度が上昇する。HHV-8 感染細胞と血管内皮細胞を共培養し、培養上清に HIV-Tat を加え、cell to cell の感染効率を観察

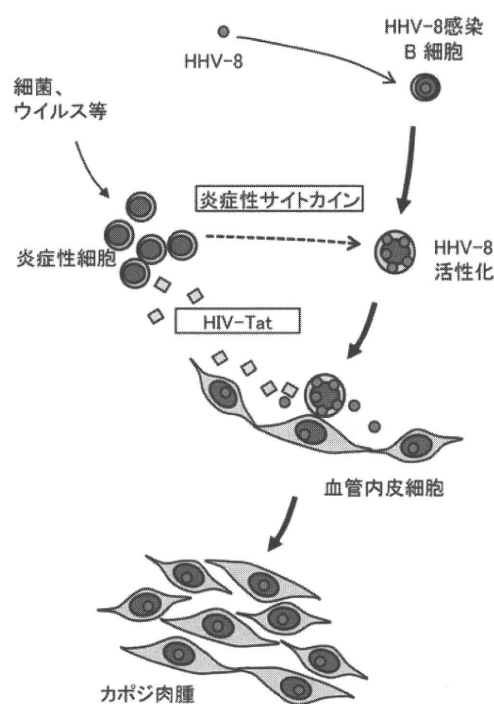


図 2 HHV-8 感染によるカポジ肉腫の発生と HIV-1 Tat の関与

したところ、HIV の産生する Tat の添加により HHV-8 の血管内皮細胞への感染効率は有意に上昇した。つまり、Tat は HHV-8 の cell to cell で血管内皮細胞への感染効率を高めることが明らかになった。これらの結果は、他の病原微生物による局所の炎症がカポジ肉腫発症に関与する可能性を示唆している (図 2)。

#### 3-2. PEL の発症機構

PEL は HHV-8 が関連し、胸水や腹水などの体腔液中に浮遊する形で増殖する B 細胞性の液性リンパ腫であり、通常、腫瘍塊を形成しない。しかし、まれに液性リンパ腫の形をとらず、HHV-8 関連固形リンパ腫として現れることがあり、これは extra-cavity PEL (体腔外 PEL) と呼ばれている。PEL 細胞株を免疫不全マウスに移植すると、移植した腹腔内に液性リンパ腫と固形リンパ腫が観察され、PEL と extra-cavity PEL が再現できる。DNA マイクロアレイとプロテオミクスにより、これら液性リンパ腫成分と固形リンパ腫成分の間で発現の異なる遺伝子、タンパクを解析したところ、2 者の遺伝子発現プロファイルはきわめて近似しており、遺伝子発現の異なる分子はわずかであった<sup>8)</sup>。その中で、LFA-1 のような接着因子の他に SPARC, Coronin のようなマトリックス構造タンパクなどが固形リンパ腫に高発現している分子として同定された。vIL-6 などのウイルス遺伝子の発現は液性リンパ腫の方が高いが、固形リン



パ腫のみの継代を繰り返しても、HHV-8が脱落することはない。これらの結果はひとつの細胞株から液性リンパ腫と固形リンパ腫の2つの病態が発生することを示しており、臨床的な extra-cavity PEL は PEL と同じ細胞由来である可能性が示唆される。

### 3-3. HHV-8 関連疾患の疾患スペクトル (図3)

HHV-8 に感染した B 細胞は健常者では増殖することなく、ウイルスの産生も起こらない。しかし、ひとたび免疫不全状態に陥ると局所に発生した炎症などの刺激により、B 細胞に潜伏感染していた HHV-8 は再活性化し、血管内皮細胞へ cell to cell の感染を起こす。HIV-Tat はこの場面で、感染性を高める役割を担っている。一方、HHV-8 感染 B 細胞がそのまま腫瘍化した疾患が PEL または extra-cavity PEL であり、両者の差は接着因子等の発現しかない。また、何らかの契機により HHV-8 の異常な増殖が起こり、HHV-8 の急性感染症の様な病態になったのが、MCD であると考えられる。現在、日本ではカポジ肉腫の増加が著しいが、同時に PEL や MCD の報告も増えてきている<sup>9)</sup>。HHV-8 関連疾患全体を把握し、HHV-8 に対する対策を講じる必要がある。

## 4. HCV と HIV との混合感染の臨床的特徴

HCV と HIV は感染経路を共有するため、しばしば重複感染する。HIV の重複感染により C 型肝炎に伴う肝線維化の進行は加速され、また C 型肝炎に対する唯一の根治治療であるベグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果は減弱する。HCV の重複感染は HIV 感染症それ自体には影響を及ぼさないとされるが、HCV 重複感染例では抗 HIV 薬による肝機能障害がより高頻度にみられ、特に非代償期の肝硬変例においては抗 HIV 薬の選択が高度に制限

される場合もある。ACC に通院中の血友病事例の HAART 時代の死因として C 型肝炎関連疾患 (肝硬変・肝細胞癌) は重要な位置を占めており、また D : A : D Study でも肝臓関連死が非エイズ死因として最多であることが示された<sup>10)</sup>。

近年になり、HCV 感染の全身性疾患としての側面が注目を集めている<sup>11,12)</sup>。C 型肝炎に合併する病態として古くから混合型クリオグロブリン血症やその結果としての膜性増殖性糸球体腎炎が知られているが、さらに HCV 感染とリンパ増殖性疾患 (B 細胞性非ホジキンリンパ腫)、耐糖能障害 (インスリン抵抗性)、脂質代謝異常症、自己免疫性甲状腺炎など様々な疾患との関連が示されるようになり、糸球体腎炎とは異なる機序で腎機能障害をもたらす可能性も示唆されている。

強力な抗 HIV 療法が可能となり、エイズ発症例であっても初期治療が奏功し抗 HIV 療法を導入できた場合には長期生存が期待できるようになった。抗 HIV 療法へのアクセスが良いいわゆる先進国においては、HIV 感染者における最大の問題はもはやエイズ指標疾患ではなく、ウイルス性肝炎や動脈硬化性疾患・耐糖能障害・脂質代謝異常症・慢性腎疾患・悪性腫瘍などの慢性合併症、あるいは抗 HIV 療法の有害事象である。抗 HIV 療法未導入例における非エイズ合併症増加の知見を重視して、世界的により早期の抗 HIV 療法導入が推奨される流れとなっているが、先に列挙した HIV 感染症の慢性合併症の多くは HCV 感染がもたらす病態と重複する。実際に HIV・HCV 重複感染者における糖尿病発症リスク増加や糸球体濾過量減少の報告もみられ、今後知見の集積にともない HCV 重複感染の意味合いがますます大きくなることが予想される。

本シンポジウムの主題は「エイズ発症の危険因子として

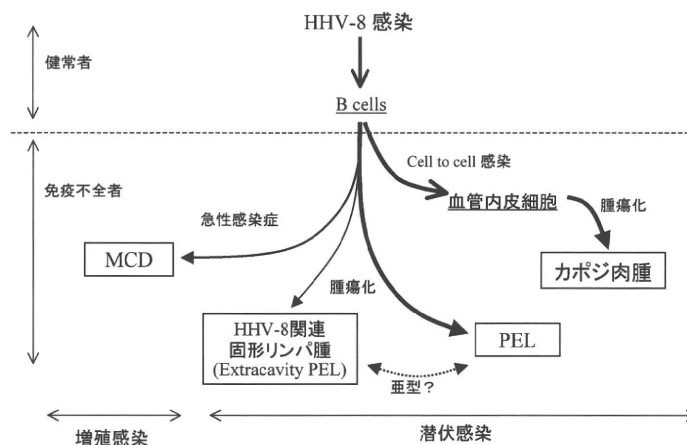


図3 HHV-8 感染とカポジ肉腫, primary effusion lymphoma (PEL) および multicentric Castleman's disease の成り立ち

の微生物間相互作用」であるが、HCV・HIV重複感染に関しては、少なくとも微生物間相互作用を介してエイズ発症の危険を増加させるという知見はない。しかし、古典的日和見疾患のみならず現代のHIV感染者の予後を規定する様々な慢性合併症も含め「エイズ」を広い意味で捉え直すとするれば、HCV重複感染は間違いなくエイズ発症の危険因子であるといえる。

このところMSMにおける性行為感染症としての急性C型肝炎に関する報告が世界的に相次いでいる。ACCにおいて初診時のHCV抗体陽性率は非常に低いが、この4年間に少なくとも8例の急性C型肝炎例が同定されており、C型肝炎は決して過去の病気とはいえない。急性C型肝炎に対するインターフェロン療法の成績は極めて良好であることが知られており、HIV重複感染者においてもこれは同様であることが最近報告された<sup>13)</sup>。既知のHIV感染者は定期的に肝逸脱酵素のモニタリングを受けている場合が多く、C型肝炎を急性期に発見できる可能性はむしろ非HIV感染者より高い。HIV感染者におけるHCV感染後のウイルス自然排除率の低さ<sup>14)</sup>、慢性化した際の治療の困難さ、HCV重複感染がHIV感染症治療にもたらす負の影響を考えれば、HIV感染者においては急性期のインターフェロン療法導入をより積極的に検討すべきであろう。

## 5. 歯周病感染によるHIVウイルス複製の亢進とエイズ発症

AIDSの治療を困難としている大きな理由にHIVの潜伏感染がある。HIV感染初期におけるウイルスの複製は激烈を極めるが、その後約数年から20年にもおよぶ潜伏期間に入る。この慢性かつ持続性感染の成立がHIV感染症の最も大きな特徴ともいえ、感染個体内からウイルスを完全に除去することは不可能である。また、現行の抗HIV化学療法は潜伏感染しているHIVには無効であるため、潜伏感染期のHIV複製をコントロールできるか否かが感染者の予後を作用するといっても過言ではない。我々の研究<sup>15)</sup>を含む最近の研究結果により、クロマチンレベルにおけるHIVの潜伏感染様式が次第に明らかになってきた。AP-4などの転写抑制因子によってHIVプロモーターに呼び込まれたヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は近傍のヒストンを脱アセチル化することにより、HIVの転写を積極的に抑制して潜伏感染を維持する。HDACによりヒストンが脱アセチル化されると、ヒストンとHIVプロモーターの緊密性が増し抑制性のクロマチンが形成される。しかし、HIVの潜伏感染の破綻がいつまたはどのような状況で起こるかに至っては明確な見解がない。

AIDS患者において「免疫不全」を背景として様々な日和見感染が合併することが知られているが、我々は、逆に

他の感染症がHIVの複製に影響を及ぼしているのではないかと推察した。そこで、ある種の嫌気性菌がHDAC阻害作用を有するbutyric acid(酪酸)を大量に産生する事実に着目し研究を行った。HIV潜伏感染細胞株ACH2(T細胞)とU1細胞(単球系細胞)に、歯周病の起原菌である*Porphyromonas gingivalis*と呼ばれるグラム陰性の嫌気性桿菌の菌体やLPS、線毛などを作用させてもHIVの活性化は認められなかったが、本菌の培養上清を作用させると、添加量依存的にHIVの複製が強く誘導された(図4)<sup>3)</sup>。この培養上清によるHIV活性化には、炎症性サイトカインやプロテアーゼも関与していなかったこと、また上清のカラム処理により、HIVの活性化を担っている物質が3,000 Dalton未満という非常に小さな分子であったため、*P. gingivalis*の特徴的代謝産物である短鎖脂肪酸に着目した。ガスクロマトグラフィーにて培養上清中の短鎖脂肪酸を測定した結果、酢酸やプロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸を検出した。そこで、それぞれの短鎖脂肪酸を潜伏感染細胞に個別に添加した結果、酪酸のみに著しいHIV活性化作用が認められた。詳細な解析により、酪酸産生菌の培養上清のみが潜伏感染細胞のHIVを活性化し、その活性化レベルと培養上清中の酪酸濃度はほぼ相関していた(図5A, B)。さらに、培養上清の加熱脱気処理により酪酸を除去するとHIV活性化作用も同時に消失した。これらの結果から、*P. gingivalis*によるHIV再活性化作用は培養上清中の酪酸が担っていることが明らかとなった。

酪酸が強力なHDAC阻害作用を有することがすでに知られていたため、転写レベルでの分子機構を検討した。その結果、*P. gingivalis*上清はヒストンのアセチル化を促進することによりHIVを転写レベルで活性化した。実際にクロマチン免疫沈降実験の結果、*P. gingivalis*上清処理によりHDACと転写抑制因子のHIVプロモーターからの遊離が促進された一方、アセチル化ヒストンやRNA合成酵素のリクルートが認められた。また、変異LTRを用いた実験からこの活性化にはLTR中のSp1結合サイトが必須であること、酪酸がSp1領域のHDACを阻害した後、CBPがLTRに誘導されてくる可能性が示唆された。以上の結果から、*P. gingivalis*はHIVプロモーターのクロマチン構造を変換することができ、その結果として潜伏感染HIVを再活性化していることが明らかとなった(図5C)。

これらの結果は、これまで解明されていなかったHIV潜伏感染の破綻が細菌感染症で起こりうることを分子レベルで初めて明らかにしたものである。また、HIV潜伏感染の破綻がある種の日和見感染の合併で起こりうることを示した新たな例である。歯周病原菌が放出する酪酸が直接HIVゲノムに作用している点が微生物間相互作用とエピジェネティック制御機構の観点からも興味深い。

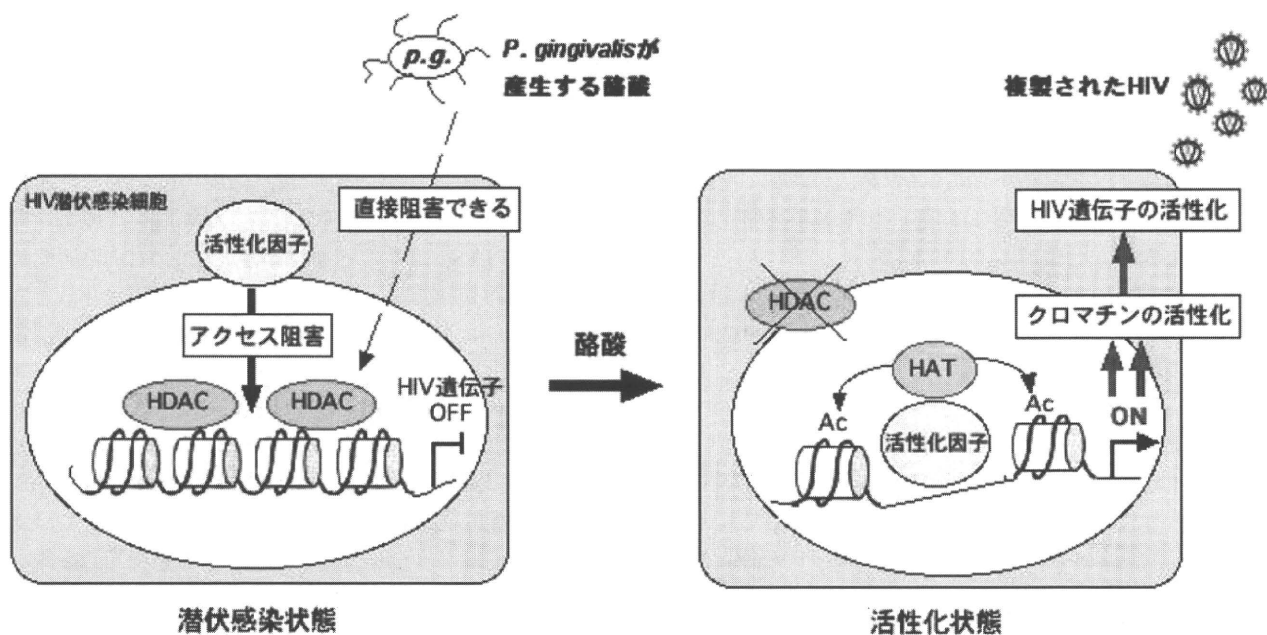


図 4 HIV-1 潜伏感染を支えるエピゲネティック環境と酪酸によるその破綻

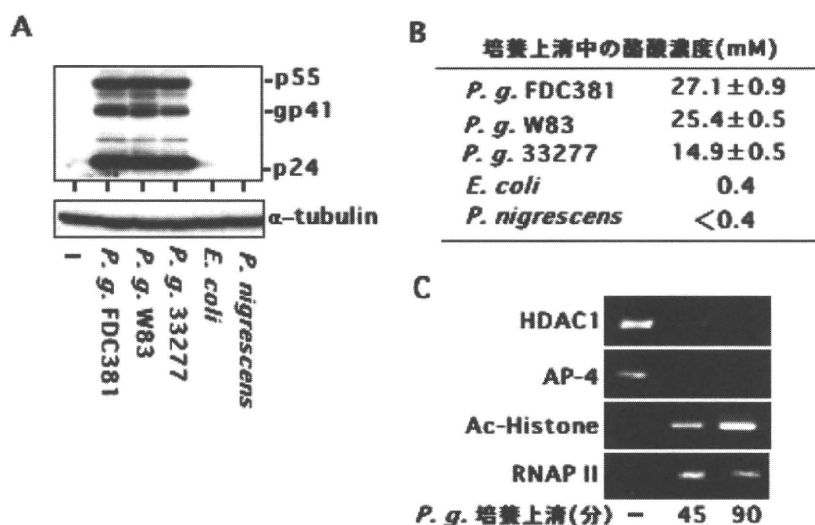


図 5 歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の培養上清による HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルスの再活性化と酪酸：(A, B) 種々の歯周病起因菌の培養上清による効果とこれらの上清中に存在する酪酸，(C) クロマチン免疫沈降法 (ChIP) による歯周病菌培養上清投与前後で HIV プロウイルス DNA に結合している転写関連因子の同定 (文献 3) より一部改変)

すでに、歯周病の進行度と歯周ポケット内の HIV-RNA 量が相関すること、歯周病患者の歯垢や歯周ポケット内には潜伏 HIV を再活性化するのに十分な酪酸が存在することが報告されている<sup>16)</sup>。他方、歯周病により血液中の TNF- $\alpha$  濃度が持続的に増加し、糖尿病や早産などの全身疾患に関

与していることも示されている<sup>17)</sup>。以上の事実は、歯周病により増加する歯周局所の酪酸と全身的な TNF- $\alpha$  が潜伏感染状態にある HIV 相乗的に作用し、AIDS 進展に深く関与している可能性を示唆する。今後、疫学調査等により両疾患の因果関係が明らかになることが期待される。

上で述べた微生物間の同様な相互作用は HIV 感染の別の局面でも考えられる。初期段階におけるウイルスの爆発的な増殖には、腸管粘膜内の細胞に感染した HIV が腸内細菌によって活性化されることが重要であることが示されている<sup>17)</sup>。実は、腸管には *Clostridium* 属や *Fusobacterium* 属など多くの酪酸産生菌が常在しているので、我々の研究成果と考え合わせると非常に興味深い。また、膣にも *Peptostreptococcus vaginalis* などの酪酸産生菌が存在することが報告されている。HIV の感染経路を考えると、これらの菌が HIV 伝播と感染定着に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。我々の最近の研究でもこれらの菌が酪酸を産生し、さらに潜伏感染 HIV を再活性化することを認めている。

HIV 感染者では免疫不全を背景にさまざまな微生物の感染が起こり、その結果多様な日和見感染症の合併が起こる。これを別の立場から見ると、HIV 以外の微生物感染が HIV 感染者に起こると、日和見感染の病因になると同時に HIV の増殖を促し、その結果免疫不全が進んで他の微生物の感染と増殖を促すという負の連鎖をつくり、AIDS の病態を更に徐々に悪化させていく。その分子機構を解明し、律即段階となる現象を見つけ、これを制御することは、新しい治療法と予防法の開発に直接つながるものと考えられ、このような微生物間相互作用の中に更なる研究の芽が潜んでいる。

## 6. ま と め

本シンポジウムでは、「エイズ発症の危険因子としての微生物間相互作用」に関して、シンポジストの発表および議論を通じ理解を深めた。本シンポジウムを通じて、エイズの病態は、単に HIV-1 ウイルスによる病原性に加えて、これら異種微生物の感染による相互作用が「エイズ」という病気の病態形成に大きく関与していることが明らかになり、非常に有意義なものであった。さらに、本シンポジウムで取り上げたこれらの話題は、HAART などの治療法の開発により HIV-1 ウイルス複製の制御も不可能ではなくなった現在も、臨床的に大きな問題、あるいは課題となっている事象であり、逆にいえば、これらの課題の克服なしには、病気としての「エイズ」制御は達成されないと言える。今後は、本シンポジウムで提唱した概念のさらなる理解とその解明により、疾患としての「エイズ」のさらなる理解と新たな制御法の開発に結び付くことを希求して本稿を締めくくりたい。

## 文 献

- 1) Hoshino Y, Hoshino S, Gold JA, Raju B, Prabhakar S, Pine R, Rom WN, Nakata K, Weiden M : Mechanisms of polymorphonuclear neutrophil-mediated induction of HIV-1 replication in macrophages during pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 195 : 1303, 2007.
- 2) Lei X, Bai Z, Ye F, Xie J, Kim C-G, Huang Y, Gao S-J : Regulation of NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  and viral replication by a KSHV microRNA. *Nature Cell Biol* 12 : 193-201, 2010.
- 3) Imai K, Ochiai K, Okamoto T : Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. *J Immunol* 182 : 3688-3695, 2009.
- 4) Hishima T, Oyaizu N, Fujii T, Tachikawa N, Ajisawa A, Negishi M, Nakamura T, Iwamoto A, Hayashi Y, Matsubara D, Sasao Y, Kimura S, Kikuchi Y, Teruya K, Yasuoka A, Oka S, Saito K, Mori S, Funata N, Sata T, Katano H : Decrease in Epstein-Barr virus-positive AIDS-related lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Microbes Infect* 8 (5) : 1301-1307, 2006.
- 5) Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y : Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load : the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 18 : 305-319, 2008.
- 6) Samanta M, Iwakiri D, Takada K : Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 10 ; 27 (30) : 4150-4156, 2008.
- 7) 片野晴隆 : ヒトヘルペスウイルス 8 のウイルス学. *日本エイズ学会誌* 11 : 171-178, 2008.
- 8) Yanagisawa Y, Sato Y, Asahi-Ozaki Y, Ito E, Honma R, Imai J, Kanno T, Kano M, Akiyama H, Sata T, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Watanabe S, Katano H : Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma. *J Pathol* 209 : 464-473, 2006.
- 9) Kanno T, Sato Y, Nakamura T, Sakamoto K, Sata T, Katano H : Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *J Med Virol* 82 : 400-406, 2010.
- 10) The D : A : D Study. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus. *Arch Intern Med* 166 : 1632-1641, 2006.
- 11) Koike K : Hepatitis C as a metabolic disease : Implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 33 : 145-150, 2005.
- 12) Zignego AL et al : Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders : An overview. *World J Gastroenterol*



- 13 : 2467–2478, 2007.
- 13) Dominguez S *et al* : Efficacy of treatment of acute hepatitis C infection with pegylated interferon and ribavirin in HIV-infected patients. *AIDS* 20 : 1157–1161, 2006.
- 14) Schnuriger A *et al* : Acute hepatitis C in HIV-infected patients : rare spontaneous clearance correlates with weak memory CD4 T-cell responses to hepatitis C virus. *AIDS* 23 : 2079–2089, 2009.
- 15) Imai K, Okamoto T : Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J Biol Chem* 281, 12495–12505, 2006.
- 16) Niederrman R, Buyle-bodin Y, Lu BY, Robinson P, Naleway C : Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res* 76, 575–579, 1997.
- 17) Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodrig UEZ-B, Teixeira-johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC : Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12, 1365–1371, 2006.

## 5. Epstein-Barr ウイルス (EBV) と カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV, HHV-8)

片野 晴隆

国立感染症研究所感染病理部

エプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) とカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV, human herpesvirus 8, HHV-8) はガンマヘルペスウイルスのメンバーであり、ともにリンパ球に感染し、リンパ腫などの悪性腫瘍の原因となる。8つのヒトヘルペスウイルスの中で発癌と関連する唯2つのウイルスであり、長らく発癌との関連を中心に研究が進んできた点は、他のヒトヘルペスウイルスと大きく異なる。EBVが発見されたのが1964年、KSHVは1994年に発見されたが、KSHVの解析がEBVを参考に急速に進んだ結果、現在、この2つのウイルスに関する知見を比べても30年の差は感じない。近年の2つのウイルスの研究に共通する大きな進歩は、ウイルスの発現するsmall RNAに関する知見が広がったことであろう。EBVとKSHVは他のウイルスに先駆けて、その遺伝子上にマイクロRNAをコードされていることが明らかになった。一方で、腫瘍化との関連についてはいまだに明らかでない部分が多い。本稿ではこれらのウイルスの基本的な知識を要約した上で、近年に明らかになった主なウイルス学的知見を概観する。

### A. エプスタイン・バーウイルス Epstein-Barr virus (EBV)

#### 1. 疫学と関連疾患

もともとはバーキットリンパ腫から発見されたが、現在ではほぼすべてのヒトが保持しているウイルスであり、多彩な疾患から検出されることが明らかになっている<sup>1,3)</sup>。青年期での初感染は伝染性単核症の原因になるが、ほとんどの人は小児期に初感染を経験し、その際には無症状であることが多い。7歳頃までに初感染を経験するが多いが、近年の日本人では、初感染の時期が遅くなっているようだ。日本人血清を用いた研究によると、1980年代までは5-7歳児の約9割がEBVに既感染であったのに対し、1990年代後半では同年代の子供の既感染率は約7割まで落ち込んで

いた<sup>4)</sup>。成人における感染率は変化がないことから、これらの統計はEBV初感染の高年齢化が起きていることを示している。小児期の衛生状態の改善が原因であろう。小児期に感染した後、EBVの再活性化による伝染性単核症様の症状を繰り返す病態が慢性活動性EBV感染症である。慢性活動性EBV感染症ではT細胞またはNK細胞にEBVが感染し、激しい免疫応答により宿主側の細胞が傷害される<sup>5)</sup>。再発を繰り返すうちにT細胞がクローナルな増殖を示すこともある。近年ではマウスを用いた慢性活動性EBV感染症の動物モデルが開発され、病態の解明が期待されている<sup>6)</sup>。

発見以来、EBVは悪性腫瘍との関連が注目されているが、2008年に改訂された血液リンパ系腫瘍のWHO分類では従来EBV関連腫瘍として知られるバーキットリンパ腫、日和見リンパ腫、ホジキンリンパ腫、鼻型節外性NK/T細胞リンパ腫、lymphomatoid granulomatosisなどに加え、慢性活動性EBV感染症、老人性EBウイルス陽性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、膿胸後リンパ腫などの疾患が新たにEBV関連として加えられた<sup>7)</sup>。その多くは日本における研究成果が認められた結果である点は特筆に値する。血液リンパ系以外にも胃癌をはじめ、鼻咽頭癌、平滑筋肉腫などいくつかの悪性腫瘍からEBVが高頻度に検出されている。

連絡先

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所 感染病理部

TEL: 03-5285-1111 内線 2627

FAX: 03-5285-1189

E-mail: katano@nih.go.jp

表1 EBV関連悪性腫瘍におけるEBV潜伏感染遺伝子の発現様式

	Latency I	Latency II	Latency III
EBER	+	+	+
EBNA1	+	+	+
EBNA2	-	-	+
EBNA3s	-	-	+
LMP1	-	+	+
LMP2A	+/-	+	+
疾患	バーキットリンパ腫, 胃癌	ホジキンリンパ腫 鼻咽頭癌	日和見リンパ腫

表2 EBVの潜伏感染タンパク

遺伝子名	機能
EBNA-1	宿主DNAに結合し、細胞分裂の際のウイルスゲノムの保持と複製に必要。Cpプロモーターの活性化。
EBNA-2	不死化に主要な働き。Notch1ICやRBP-J $\epsilon$ を介してCp (LMPs), CD21, CD23, c-mycのプロモーター活性の亢進。
EBNA-3A	RBP-J $\epsilon$ に結合し、転写活性に関与。LMP-1の転写活性化。Chk2/cds1に結合。
EBNA-3B	RBP-J $\epsilon$ に結合し、転写活性に関与。
EBNA-LP	MDM2と結合し、p53の安定化と不活化。
EBNA-3C	RBP-J $\epsilon$ に結合し、転写活性に関与。HDAC1などと結合し、染色体のremodelingに関与。pRb, p27の発現抑制。
LMP-1	CD40シグナルの活性化を引き起こし、NF- $\kappa$ Bの恒常的活性化、抗アポトーシス作用などにより、EBVによる細胞増殖、不死化に主要な働き。
LMP-2	ERK, Junの活性化、PI3K/AKTの活性化による細胞増殖、NF- $\kappa$ Bの活性化、Stat3を介したDNMT1の発現亢進。

## 2. EBV関連悪性腫瘍における潜伏感染タンパク発現

ヒトB細胞に *in vitro* でEBVを感染させるとB細胞が不死化し、それを免疫不全マウスに移植すると腫瘍を形成することから、EBVの造腫瘍性は明らかである<sup>8)</sup>。しかし、実際のヒト体内での造腫瘍性に関しては、疾患ごとに発現するウイルスタンパクが異なり、EBVの関わり方もさまざままで、単純ではない。EBVが関連する悪性腫瘍ではEBVは潜伏感染しており、EBVがコードするタンパクのうち、ごく限られた遺伝子のみが発現している。EBV関連腫瘍はEBV遺伝子の発現様式により、古くから3つのパターン(latency I-III)に分類されている(表1)<sup>9)</sup>。それぞれのEBV潜伏感染タンパクの現在分かっている代表的な機能を表2に示す。

Latency Iのバーキットリンパ腫ではEBNA1とEBERしか発現しない。バーキットリンパ腫での主要な病因はc-mycの転座に伴う細胞周期の制御不全であり、腫瘍細胞の増殖そのものにEBVは必要ない。しかし、EBVが脱落したバーキットリンパ腫細胞株にEBVを再感染させると増殖能が亢進することから、EBVはバーキットリンパ腫細胞

の増殖を促進する働きがある<sup>10)</sup>。この際に重要な役割を果たすのが後述のEBERとEBNA1と考えられる。EBNA1はウイルスDNAを感染細胞の染色体に結合させ、分裂時には娘細胞にウイルスDNAを引き継ぐ際に重要な働きを示す<sup>11)</sup>。しかし、近年、dominant negative EBNA1を導入するとアポトーシスを誘導できることが示され、EBNA1そのものが腫瘍形成と関連する可能性が指摘されている<sup>12)</sup>。Latency IIIの日和見リンパ腫ではすべてのEBV潜伏感染遺伝子の発現が認められる。そのなかでも、腫瘍化に重要なのはLMP-1とEBNA2である。LMP1は哺乳類細胞を単独で形質転換する機能を持つ、明らかな癌タンパクである<sup>13)</sup>。転写活性化因子であるEBNA2はLMP-1の発現を促進する<sup>14, 15)</sup>。Latency IIのホジキンリンパ腫や鼻咽頭癌ではLMP-1とEBERは発現しているものの、他の潜伏感染タンパクの発現は抑えられていることから、LMP-1とEBERによる作用により細胞増殖が継続されているようだ。

## 3. EBER

EBV-encoded small RNA (EBER) はタンパクをコード

表3 KSHVが検出された疾患

KSHVが常に検出され原因ウイルスと考えられている疾患	カポジ肉腫（すべての病型）、primary effusion lymphoma (KSHV関連固形リンパ腫を含む)
KSHVが一部の症例で検出され、KSHV陽性例ではKSHVが疾患の原因に関連すると考えられている疾患	Multicentric Castlemans disease (POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, skin changes) syndromeを含む)、初感染時の熱性斑丘疹 febrile maculopapular skin rash, hemophagocytic syndrome
KSHVが検出された報告はあるが、現在では関連が否定的である疾患	多発性骨髄腫、原発性肺高血圧症、ボーンエン病、扁平上皮癌、Paget病、actinic keratosis など。

しない170b程度のEBVの小転写物で、EBER1とEBER2の2つがある<sup>16-18)</sup>。すべてのEBV感染細胞の核に豊富に発現しており、EBERを検出するin situ hybridizationは、病理組織におけるEBV感染細胞を同定する最も感度のよい方法である<sup>19)</sup>。EBERはこの数年、北大高田グループにより精力的に解析され、その役割が明らかにされつつある。EBERの役割の一つは造腫瘍性に関するものであり、EBER欠損ウイルスではB細胞を不死化させる効率が低下すること、EBV陰性Akata細胞にEBERを高発現させるとソフトアガーでの増殖能を獲得し、SCIDマウスでの造腫瘍性が促進されることなどが示されている<sup>20-22)</sup>。EBERの発現とIL-10の発現はパラレルに動き、IL-10はバーキットリンパ腫細胞の増殖にオートクラインに働く<sup>23)</sup>。EBERによるIL-10誘導の機構は、EBERがRIG-Iに認識され、IRF-3の活性化を誘導することと関連しているようだ<sup>24, 25)</sup>。EBERはRIG-Iとの結合を通して、同時にNF- $\kappa$ Bも活性化し、I型IFNの発現を誘導するが、一方でEBERはIFNシグナルの下流であるPKRに結合し、その活性を阻害することでIFNに対する抵抗性を獲得する。これらの結果はEBERがEBV関連悪性腫瘍の病態において、きわめて重要な役割を担っていることを示している。さらに、EBVの急性感染症においてもEBERは重要である。EBERは伝染性単核球症や慢性活動性EBV感染症などの患者血清中に検出され、TLR3により認識されることで、様々なサイトカインを誘導する<sup>26)</sup>。つまり、これらの患者における異常なサイトカイン誘導の原因がEBERである可能性が示されている。

#### 4. マイクロRNA

マイクロRNA (micro RNA, miRNA)は約20merの小さなRNA断片で、60mer程度の未成熟miRNAからdicerで切り出され、20merの成熟型miRNAとなる<sup>27-29)</sup>。miRNAの働きはmRNAの翻訳阻害や標的mRNAの分解を通して、転写後調節を行うとされる。mRNAの3'側の非転写領域を標的とすることが多く、標的遺伝子配列が短いことから、一つのmiRNAには複数の標的mRNAが存在する。EBVは

BamHI A断片のBARTといわれる領域にmir-BART1からmir-BART22の約20のmiRNAをコードするクラスター領域を持っており、さらにBHRF1領域にも3個のmiRNAをコードする<sup>30)</sup>。変異体まで含めると、約40個の成熟miRNAをコードしていることになる。Lymphoblastoid cell line (LCL)やバーキットリンパ腫の細胞株ではすべてのmiRNAが発現しているが、その発現量は細胞株ごとに大きく異なり、一方で、鼻咽頭癌のサンプルではmir-BHRF1のクラスターのmiRNAは全く発現していない<sup>31, 32)</sup>。それぞれのmiRNAの機能については余りまだ解析が進んでいないが、mir-BART2がEBVのDNA polymeraseであるBALF5を標的とし、EBVの潜伏感染維持に寄与していること、mir-BARTのいくつかはLMP-1の発現を抑制していることなどが示されている<sup>33, 34)</sup>。Latencyと絡んで、miRNAがどのような働きをしているかが、今後の研究課題であろう。

#### 5. エピジェネティック異常と疾患

EBV関連腫瘍のうち、胃癌、鼻咽頭癌、ホジキンリンパ腫などでは、p14<sup>ARF</sup>、p16<sup>INK4A</sup>、E-cadherin、p73のような癌抑制遺伝子のプロモーター領域に多くのメチル化が検出されている<sup>35-38)</sup>。これにより、癌抑制遺伝子の発現が抑制されることがこれらの腫瘍の発症メカニズムに重要と考えられる。EBV陽性胃癌では、EBV陰性の胃癌や周辺組織と比べるとメチル化の頻度が有意に高く、メチル化がEBV感染により誘発されているのは明らかである<sup>35, 38, 39)</sup>。癌におけるde novoのDNAメチル化には宿主のDNMT1が重要な役割を果たしていることが知られているが、EBV関連の鼻咽頭癌ではLMP-1が胃癌ではLMP-2Aがそれぞれ、DNMT1の発現を亢進し、DNAのメチル化を誘導している点が見られている<sup>40, 41)</sup>。

#### B. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス

##### Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)

#### 1. 疫学と関連疾患

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-