

特集 潜伏感染と再活性化

序
— STEALTHING, PERSISTING ウイルスの謎 —

上田 啓次*

再生医療など最先端医療が実際に行われる時代に至って、我々人類は、感染症のコントロールにいまだに苦労している。特に感染後潜伏あるいは持続感染の状態、長く生体内に留まり種々の病態発症にかかわるウイルス、細菌の生態は不明な点が多い。生体との攻防の中で、ウイルスや細菌は子孫を残すためのひとつの戦略としてこのようなプロセスを進化させてきたと考えられるが、その精緻なメカニズムを完璧に理解しなければ、最先端医療が展開する中で感染症の制御はままならないであろう。本特集では、潜伏感染や持続感染を持続する代表的なウイルス、細菌に焦点を当て、感染症制御に向けた今後の展開の一助としたい。

Key Words : stealthing ウイルス / persisting ウイルス / 慢性感染症

I はじめに

多くのウイルスは生体に侵入後、ただちに爆発的に娘ウイルスを産生する過程に入る。このような過程は感染標的の集まる場所で一定の流行を生み、その流行が治まった後も、どこかで感染をくり返しながらいウイルスとしての種を維持し、より標的に適応した進化を遂げていつているものと考えられる。RNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼに比べ校正能力は低いとされ、それが逆に、標的に適応した子孫を残していくことに成功しているとも考えられる。

RNA は生命発生の起源的分子とされ、現存するウイルスを含めた生物もその姿に太古の営みを垣間見ることができる。つまり、大腸菌などの単細胞下等生命体では 1 本の RNA からいくつかのタンパクを翻訳したり、ポリプロテインとして翻訳後、プロセスする機能を備えているが、そういっ

た装備は多くの場合、RNA ウイルスにみられる戦略である。

II ウイルスの潜伏戦略

一方、DNA ウイルスや組み込み過程をその生活史にもつレトロウイルスは、その子孫残存をほぼ完全に宿主細胞の機能に依存する。すなわち、宿主と共存する戦略を進化させてきたと考えられる。もちろん、DNA ウイルスの中にも RNA ウイルスに似た溶解感染のみに生活史を営むウイルスも存在するが、ヘルペスウイルスは極端に宿主と共存する潜伏感染という戦略を獲得した。ヘルペスウイルス潜伏感染では、ウイルスゲノムは宿主ゲノムの一部のごとく存在するが、その遺伝子発現は厳密に制御されている。しかし、このまま潜伏し続けると、ウイルスの生活史は dead-end であり、ウイルスは絶滅の危惧にさらされかねない。つまりウイルスとしては、子孫残存のために

Mysteries of stealthing and persisting viruses

*大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学 教授 Keiji Ueda

溶解感染の機会を用意周到に待っている必要がある。一体、どのような機構で潜伏感染を樹立し、また、溶解感染への相転移（再活性化）の機会を伺っているのか？ 確かに多くの研究報告はあるが、きわめて謎の多いプロセスである。

8つのヘルペスウイルス、もしくは α 、 β 、 γ ヘルペスウイルスで多少戦略は異なるものと思われるが、ヘルペスウイルスの潜伏感染と溶解感染との相転移メカニズムと疾患との関連について最新の情報を得るべく、国内の代表的な研究者に執筆を依頼した。

ヒトに感染するレトロウイルスは、human T-lymphotropic (or T-cell leukemia) virus type 1 (HTLV-1) と human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) である。ウイルスの産生状態はヘルペスウイルスの潜伏感染とは少し異なり、完全にウイルスを産生しなくなる相はなく、また、HTLV-1 と HIV-1 でも違いがあるものと思われるが、これらのウイルスはヒトゲノムに入り込み、まさしくヒトのゲノムの一部となって感染細胞に留まり続け、多彩な病態発症にかかわっている。組み込み、ウイルス産生、ウイルス遺伝子発現と病態発症とがどのような関連にあるのか、きわめて興味深い問題であり、その最新事情の解説をこの分野の最先端で進む2人の代表的研究者にお願いした。

B型肝炎ウイルス (HBV) と C型肝炎ウイルス (HCV) の事情は、先のヘルペスウイルスやヒトレトロウイルスとはさらに異なる。両者はともに肝実質細胞をおもな標的とし、そこで持続感染状態を樹立する。すなわち、ウイルスは常時産生され続けながら、宿主個体の免疫監視機構をくぐり抜け、慢性肝炎や肝がんの発症に関与するとされる。肝実質細胞に感染する両者は、DNAウイルスとRNAウイルスというウイルス学的には決定的な違いがあるが、免疫監視機構を完全な排除に向かわさない程度にくすぶり続けさせるという点で、共通点があるものと思われる。この機構は宿主の影響か、ウイルスの影響か、あるいは両者の微妙な絡み合いによってもたらされるのか？ だとしたらどのような絡み合い、バランスがその方

向性を決定しているのか？ 難問であることは明らかだが、解決すべき非常に興味深い問題である。その解説を最新の研究成果を持ち合わせる代表的研究者にお願いした。

ポルナウイルスやヒトポリオーマウイルスはともに痴呆に関連するウイルスと考えられるが、その生態は不明な点が多い。ポルナウイルスはRNAウイルスであるが、最近、そのゲノムの痕跡が哺乳類ゲノムにみられることが報告された。また、特殊な状況を除いて、ヒトへの病原性とかかわりのないと考えられてきたヒトポリオーマウイルスと、ヒトがんとの関連が報告され、話題を呼んでいる。これまで述べたウイルスとは多少赴きは異なるが、重要な話題として本特集に組み込ませていただき、最先端の2人の研究者に解説を依頼した。

III 潜伏する細菌

忘れてならないのが、結核をはじめとする細菌の潜伏感染、持続感染である。抗生物質発見以来、我々人類は、細菌感染症を克服したかのように錯覚していた。今なお、最新医療の最大の課題は細菌による感染症の克服であり、結核に至っては患者数の増加が報告され、有効な抗生物質の開発はほとんど進展していない。本来、結核菌の生態はやはり謎が多く、どのような生活史をとるのかまったく分かっておらず、潜伏する細菌といった側面をもっていると言ってよいのではないかと思う。また、生ワクチン全般に言えることかもしれないが、BCG (Bacille de Calmette et Guerin) がどのように生体でワクチンとして機能するのか、まったく不明と言っていいだろう。結核菌を中心として最近の潜伏と病態発症との関連の解説を第一線の研究者のお願いした。

IV おわりに

特集タイトルである「潜伏感染と再活性化」からはやや逸脱した話題も取り上げたが、本特集で取り上げたテーマは、がん、慢性炎症、免疫不全等にかかわる現代感染症のもっとも重要な問題と考えている。少しでも、読者の今後の研究や医療の参考になれば幸いである。

特集 潜伏感染と再活性化

6. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の潜伏感染, 再活性化と病態

上田 啓次*

KSHV は、カポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma: KS), まれな B 細胞腫の一種である primary effusion lymphoma (PEL), 多中心性キャッスルマン病 (multicentric Castleman's disease: MCD) の発症に密接に関連する DNA 腫瘍ウイルスである。これらの病態における感染形態はいずれも潜伏感染であるが、KSHV のがん遺伝子が溶解感染遺伝子であることを考えると、この一面を単純に解釈し、潜伏感染→発がんとするには問題がある。潜伏感染から再活性化し、溶解感染へ相転移が完遂されない過程で発がんに傾くポイントがあると予測するが、本機構はまったく不明で、解明が望まれる。

Key Words : KSHV / γ ヘルペスウイルス / 潜伏感染 / 再活性化 / がん発生

I はじめに

KSHV (カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス) は元々何らかの感染症の結果として発症すると考えられていた KS (Kaposi's sarcoma) から、Moore, Chang らによって 1994 年によって発見された 8 番目のヒトヘルペスウイルスである¹⁾。塩基配列の解明の結果、Epstein-Barr virus (EBV) や herpesvirus saimiri (HVS) との相同性が高いことから、腫瘍発生と密接な関連をもつと考えられる γ ヘルペスウイルスの一種であると位置づけられた²⁾。関連する 3 つの腫瘍あるいは腫瘍様病態では KSHV は潜伏感染状態にある³⁾。

しかし、EBV のウイルス保有者が一般成人健康人の 80% に及び、KSHV のウイルス保有者はこれに比べるとかなり低く、2~3% にとどまるものの (地域差があることが報告されている)、これらすべてのウイルス保有者ががんが高率に発症するとは到底考えられないことを考慮すると、単純

に、潜伏感染→発がんの図式は成り立たないと思われる。では、一体どのような機構で KSHV 感染は発がんをもたらすのであろうか? この命題の解明は、潜伏感染、溶解感染および潜伏感染から溶解感染への相転移機構、すなわち再活性化の機構を詳細に解明することにほかならないと思う。もちろん、潜伏感染は発がんの発生母地を与えている重要な感染形態であることは言うまでもなく、潜伏感染で発現・機能しているウイルス遺伝子も一定の発がんポテンシャルをもっていると想定されている。本稿では、現在までに報告された潜伏感染や再活性化のメカニズム、KSHV がん遺伝子の機能について総説し、筆者の持論を交えながら、今後の研究展開を模索していきたいと思う。

II KSHV の潜伏感染機構

1. KSHV 潜伏感染における遺伝子発現動態

KSHV 潜伏感染状態においては、ウイルス遺伝子の発現は最小限に制御され、80 余あるウイル

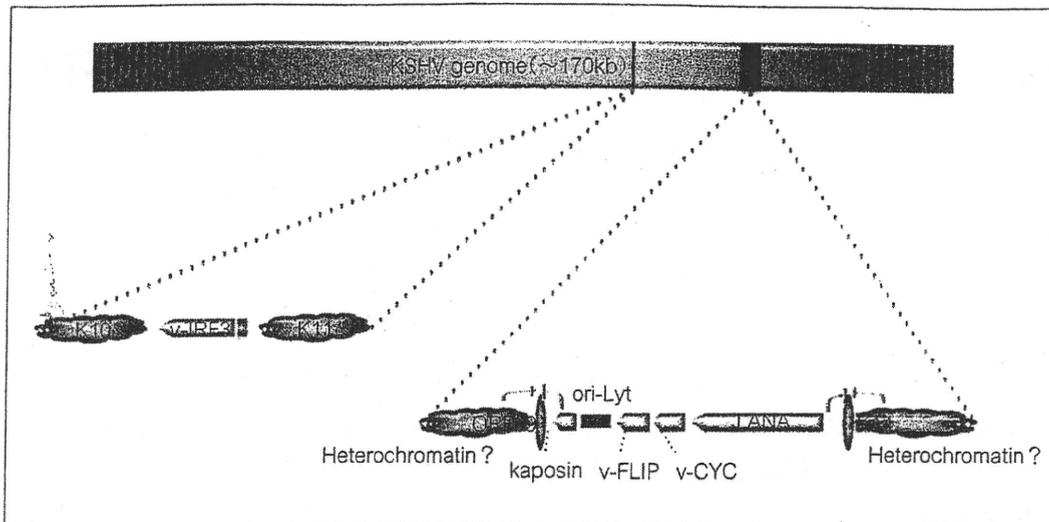


図1 KSHV 潜伏感染で活性化している遺伝子領域

KSHV 潜伏感染ではごく限られた遺伝子のみ (LANA, v-CYC, v-FLIP, kaposin, v-IRF3) が発現している。KSHV ゲノム内において発現しない遺伝子領域は、ヘテロクロマチンあるいはヘテロクロマチン様に修飾されていると考えられるが、発現する遺伝子と発現しない遺伝子を隔絶する精緻な機構が存在するものと思われる。

KSHV: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス, LANA: latency-associated nuclear antigen
(筆者作成)

ス遺伝子のうち、一領域4遺伝子 (LANA, v-CYC, v-FLIP, kaposin) とこれとはまったく違うところに位置する v-irf-3 のみが発現し、他は完全に不活化されている (図1)。比較的大型の DNA ウィルスとは言っても、たかだか 170kb の配列の中に 80 余の遺伝子がひしめいている高密度遺伝子の環境下でのこの現象は、ある意味で驚くべき現象で、きわめて厳密な制御機構がなければ達成されないと考えている。現在、その機構の詳細について解明中であるが、本機構の詳細が判明すれば、発現ベクターにこういったエレメントを導入し、発現維持ユニットを構築可能となり、長期間維持すると、発現量が低下するといった問題を解決できるものと考えている。将来的には、遺伝子治療用の発現ベクターの構築にも繋がるであろう。

また、KSHV 潜伏感染細胞では、宿主遺伝子発

現 KSHV に支配されていることも分かってきた。KSHV の遺伝子発現プロファイルの支配は、EBV よりも上位、すなわち、PEL (primary effusion lymphoma) において KSHV と EBV が共感染している場合には通常、KSHV の影響支配の方が強く出るものと思われる⁴⁾。この現象は、KSHV 感染のない PEL の遺伝子発現プロファイルとの比較検討を行うことにより、さらにその詳細が判明するものと思われる。

潜伏感染細胞におけるウィルス遺伝子は、前述のごとくきわめて限られていることから、これらのウィルス遺伝子産物による宿主遺伝子発現プロファイルの支配が想定される。LANA は DNA 結合タンパクで、ウィルスゲノム内では末端反復配列内の LANA-binding sites (LBS) に結合して⁵⁾、CBP (CREB [cAMP response element binding

KSHV (カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス)

EBV (Epstein-Barr virus)

PEL (primary effusion lymphoma)

CBP (CREB [cAMP response element binding protein]-binding protein)

KS (Kaposi's sarcoma)

HVS (herpesvirus saimiri)

LBS (LANA-binding sites)

protein]-binding protein), mSin3A や MeCP2 など、種々の転写修飾因子をウイルスゲノム上へリクルートしてウイルス遺伝子の発現も制御すると同時に、宿主染色体ゲノム内にも結合し、宿主遺伝子の発現制御にもかかわっていることが想定される。v-CYC は細胞周期の進行を促進し⁶⁾、v-FLIP は NF- κ B (nuclear factor kappa B) を活性化⁷⁾、kaposin は MAPK (mitogen-activated protein kinase) システムを活性化する⁸⁾ などして、多くの宿主遺伝子の発現プロファイル制御にかかわっていると思われる。KSHV 感染 PEL 細胞で、発現が亢進するものも低下するものもあるが、前者を中心に興味深い遺伝子を取り上げ、その発現亢進の機構とその遺伝子の機能について解析を進めている。

2. KSHV の潜伏感染維持機構

KSHV の潜伏感染維持に必須の因子は LANA (latency-associated nuclear antigen) である。LANA はさまざまな宿主因子と相互作用して多彩な機能を発揮していると考えられるが、もっとも重要な機能は、ウイルスゲノムの複製・分配・維持にある。LANA は宿主複製前複合体 (pre-replication complex : pre-RC) の構成因子である origin recognition complexes (ORCs) と相互作用し、ウイルスゲノム上の ori-P にリクルートすることで、ウイルスゲノムの潜伏感染における複製開始反応を担っていると報告されている。しかしながら、ori-P は LBS だけでなく、それに続く 32bp のきわめて GC に富んだ配列も必要で、この機構では、なぜ、どのようにこの GC rich segment が必要なのかを十分説明しきれていない。また我々の解析では、LANA と ORCs との相互作用は再現されていない。

我々は、潜伏感染における KSHV ゲノムの複製の場の重要性、すなわち、LANA が KSHV の ori-P を、核マトリックスという場に引き込むことが重要であるという仮説を唱えている⁹⁾。核マト

リックスには ORCs が細胞周期依存性に集積してくるので、LANA-ori-P 複合体がむしろその場に居合わせることも重要であり、pre-RC はその場で GC rich segment 上に形成されると考えている。本仮説は、GC rich segment 必要性に直接回答したのではなく、証明すべき疑問が残されているが、核内の場における複製理論には興味深いものがある (図 2)。

一般に、ヘルペスウイルスは *in vitro* 感染系においては溶解感染の感染様式をとるが、EBV や KSHV などの γ ヘルペスウイルスは *in vitro* 感染でも潜伏感染状態へ傾く、すなわち、増殖状態にある培養細胞系においても潜伏感染の形態をとる能力があると考えられている。KSHV の溶解感染開始因子である RTA (replication and transcription activator) は感染初期段階で発現し、一次的に溶解感染の様相を示すが、溶解感染を完遂できない abortive 感染で終結されると考えられている。このような状態にある理由のひとつが、潜伏感染遺伝子 LANA の機能によるものと想定されている¹⁰⁾。

LANA は本来、潜伏感染遺伝子で、宿主ヘテロクロマチン因子と相互作用してウイルスゲノムをヘテロクロマチン化、もしくはヘテロクロマチン様に変換し、ウイルス遺伝子発現を抑制する機能をもっている¹¹⁾。一方で RTA による活性化も受けて、*in vitro* 感染系において溶解感染を遂行しようとする機構が LANA の発現を誘導して、結果的に潜伏感染の方向に傾けると考えられる。実際、LANA のノックダウンや欠失変異ウイルスの作製実験では、*in vitro* 感染系で溶解感染の効率が上昇することが報告されている¹²⁾。

一方で、NF- κ B の活性化が潜伏感染の維持に働いているという報告がある。潜伏感染で発現している *v-flip* は、FADD/TRADD (Fas associated death domain/TNF [tumor necrosis-factor]-R1 associated death domain) /pro-caspase 8

NF- κ B (nuclear factor kappa B)

LANA (latency-associated nuclear antigen)

ORCs (origin recognition complexes)

MAPK (mitogen-activated protein kinase)

pre-RC (pre-replication complex ; 宿主複製前複合体)

RTA (replication and transcription activator)

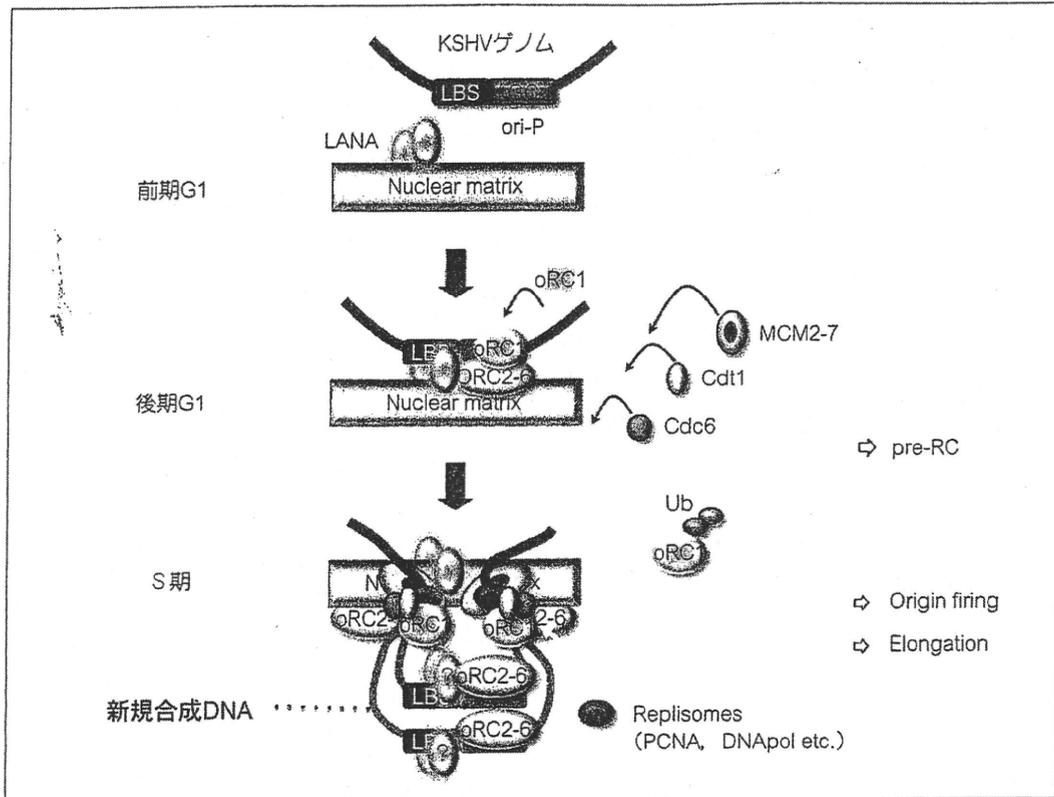


図2 KSHV 潜伏感染における複製モデル

KSHV 潜伏感染複製では、核マトリックスがきわめて重要な機能的な場を提供していると考えられている。LANA は細胞周期を通じて核マトリックスに存在し、初期 G1 期から後期 G1 期にかけて、その LBS への結合活性により ori-P をたぐり寄せ、核マトリックス上へ位置させる。ORC₂₋₆ は細胞周期非依存性に ori-P 上に集合していると考えられているが、ORC1 は細胞周期依存性に後期 G1 に ORC₂₋₆ に会合し、最終的に pre-RC を完成させ、核マトリックス上に複製因子である PCNA や DNA ポリメラーゼ (DNApol) を取込んでレプリゾームを形成し、複製を開始する。新規に合成された DNA はすみやかに核マトリックス上から離れる。すなわち、核マトリックス上では合成のみが進行するものと思われる。

KSHV: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス, LANA: latency-associated nuclear antigen

ORC: origin recognition complex, MCM: minichromosome maintenance

pre-RC: pre-replication complex, PCNA: proliferating cell nuclear antigen

(文献9より改変)

複合体がそのリガンドを受けて pro-caspase 8 から活性型の caspase 8 になり、アポトーシスを誘導するカスケードを妨害すると同時に、NF- κ B の活性化状態を保つことで潜伏感染を維持している¹³⁾。NF- κ B の機能阻害は、KSHV 感染 PEL 細胞にアポトーシスを誘導する¹⁴⁾。また、NF- κ B

の活性化状態は RTA の発現誘導を抑制する¹⁵⁾。さらに最近の報告では、潜伏感染で活性化している潜伏感染遺伝子領域 (LANA 等を含む一領域4遺伝子領域を指す) 内で発現している 17 個の KSHV micro RNA のうちの、miR-K1 が *I κ B α* の 3'UTR (untranslated region) を標的にしてその発現量

FADD (Fas associated death domain)

TRADD (TNF [tumor necrosis-factor]-R1 associated death domain)

特集● 潜伏感染と再活性化

を下げることで、NF- κ B の活性化に寄与しているとの報告があった¹⁶⁾。リンパ球系の腫瘍細胞では、HTLV-1 が関与する成人型 T 細胞白血病等で、NF- κ B の活性化状態がその腫瘍細胞の生存維持に重要であるとされ¹⁷⁾、同様に、KSHV 潜伏感染の維持に効いている。NF- κ B の活性化は通常、遺伝子発現の直接の標的遺伝子を正に制御することが通例で、負に制御する標的遺伝子があることは興味深い現象である。v-FLIP が NF- κ B を活性化することで、AP-1 (activating protein-1) 経路を逆に不活化するモデルが提唱されている¹⁸⁾。

III KSHV 潜伏感染からの再活性化機構

1. 前初期遺伝子の活性化と溶解感染誘導

KSHV が潜伏感染状態から再活性化する上で、RTA の発現が重要であることには異論はない。通常、KSHV 感染 PEL 細胞を用いた系では、TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate) や sodium butylate 等の薬剤を用いて再活性化を誘導しているが、感染個体においてどのようなシグナルが RTA の活性化にかかわっているのかはあまりよく分かっていない。つまり、生体内において効率よく RTA の活性化にかかわる因子はまだ同定されていない。その中で、Notch シグナリングの標的遺伝子制御領域に存在する RBP-J κ の結合配列と RBP-J κ がにかかわっていると報告がある¹⁹⁾。しかしながら、その報告では、通常のコンディションでは遺伝子発現を抑制する RBP-J κ が RTA と相互作用することによって、RTA そのものや RTA の標的遺伝子を活性化に導くこと、すなわち、RTA の自己活性化機構が示されているのみで、Notch リガンドで RTA が活性化するかどうかは示されていない。

RTA の自己活性化機構にはもうひとつあって、それには OCT-1 (octamer binding protein-1) が関与している¹⁹⁾。RTA の制御領域には OCT-1 が結合する、いわゆる octamer binding 配列があ

り、RBP-J κ と同様、本来、転写活性化領域をもち、直接的 / 単独には転写活性化を起こさない OCT-1 と RTA の相互作用により、あるいは RTA が transacting に働いて RTA を自己活性化することが想定される (図 3)。OCT-1 を介する系は、herpes simplex virus type 1 (HSV-1) の VP-16 と OCT-1 の相互作用による転写誘導に相似の機構で興味深い。

RTA は前述のごとく、KSHV 溶解感染の鍵因子で、この因子が発現するとその標的遺伝子がカスケード状に順次発現して、溶解感染を完遂させる方向へ動く。RTA の一次標的遺伝子は、*K-bZIP*、*ORF57 (K-MTA)*、*PAN*、*v-IRF* など、溶解感染で発現する機能性遺伝子が当然のことながら多く含まれる。基本的には、初期遺伝子のほとんどが RTA の標的遺伝子になっていると言っても過言ではない。これらの遺伝子制御領域には、RTA に直接結合する配列をもつもの、あるいは RBP-J κ 結合配列をもつもの、両者をもつものが存在する。RTA の転写誘導能は強力であるが、結合配列に結合して特異的に転写を活性化するというよりむしろ、promiscuous 的と筆者は考えている。こういった活性は、遺伝子発現制御領域に比較的頻繁にみられる RBP-J κ 結合配列に依存しているのかもしれない。

K-bZIP は EBV の *ZTA* に相当する遺伝子で、発現タンパクの構造上も塩基性アミノ酸配列-ロイシンジッパーの領域を有するため、溶解複製 origin (*ori-Lyt*) など、何らかの配列に特異的に結合し、転写活性を正に誘導するものと想定されたが、実際には、*ori-Lyt* に結合する活性は C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) を介した間接的なものであり、転写的にはまったく反対の方向へ誘導する。RTA の機能と *K-bZIP* の機能がどのように絡まって溶解感染を効率的に遂行するのか、*ori-Lyt* の認識機構も含めて、まだ解決すべき謎も多い。*K-bZIP* は転写的には負に制御し、

UTR (untranslated region)

TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate)

HSV-1 (herpes simplex virus type 1)

AP-1 (activating protein-1)

OCT-1 (octamer binding protein-1)

C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein)

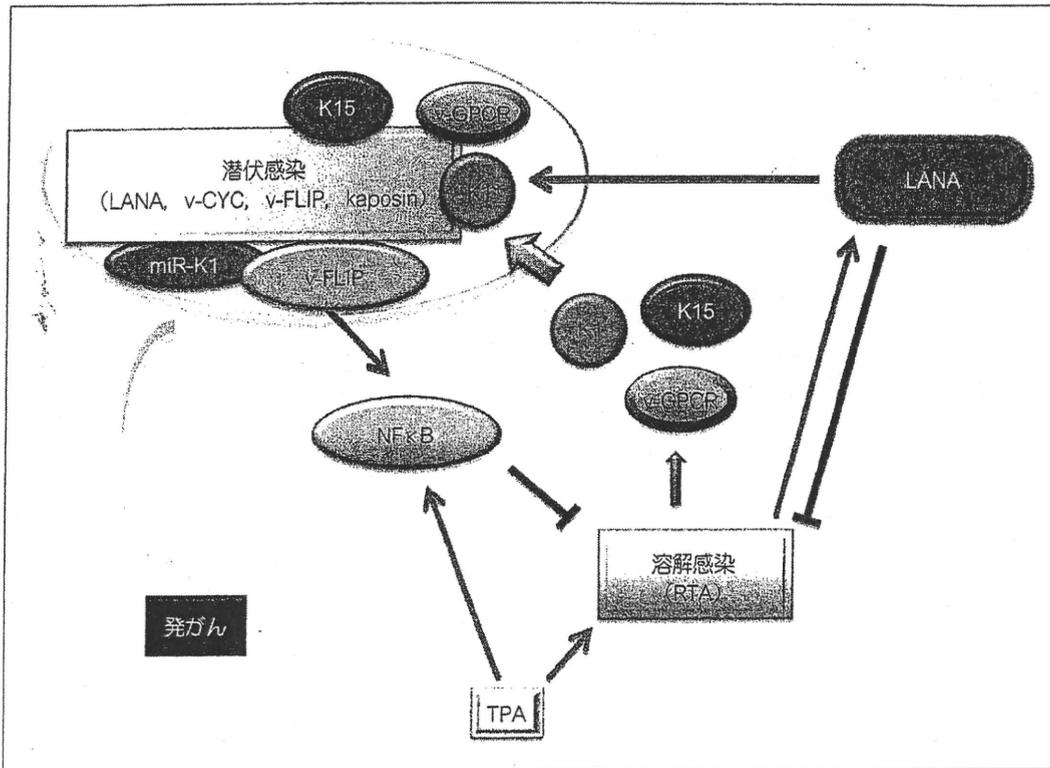


図3 KSHVの再活性化制御と病態発生

KSHVは基本的に潜伏感染を維持していくように仕組みられている。潜伏感染で発現している micro RNAのうち、miR-K1や発現遺伝子産物であるv-FLIP、LANAが潜伏感染を維持する方向で機能している。特に、miR-K1とv-FLIPはNF-κBを活性化することで再活性化因子RTAの発現を抑制して、再活性化を防いでいる。一旦、再活性化が起こると、K1、v-GPCR、K15などのKSHV発がん遺伝子が発現してくる。一方で、LANAも再活性化でさらに発現誘導されることから量的に維持され、逆に潜伏感染を誘導する方向で機能するものと考えられる。こういった潜伏感染誘導機構により溶解感染が完遂される効率は低くなり、abortive/nonpermissiveな状況が生じる中で、KSHV発がん遺伝子の発がん機能が潜伏感染遺伝子群とともに働いて、発がんに傾くと想定している。

KSHV : カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス, LANA : latency-associated nuclear antigen
 NF-κB : nuclear factor kappa B, RTA : replication and transcription activator
 TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate

(筆者作成)

細胞周期をG1-Sの境界領域で止めるという考え方が今のところ妥当であろう。K-bZIPにはSUMO配列があり、SUMO化を受けることでこれらの活性を出すものと考えられている。

一方で、RTAは潜伏感染を誘導する活性をもつLANAもこの標的に含める。溶解複製を効率よく遂行するには、潜伏感染を誘導する活性をもつウイルス遺伝子を活性化することは一見矛盾してい

るように思える。なぜ、KSHVはこのような機構をもっているのかその詳細な解明が待たれる。

IV 再活性化と病態発症

ヘルペスウイルスの再活性化はしばしば回帰感染としてヒトの疾患に関与している。αヘルペスウイルスに分類されるHSV-1の口唇ヘルペスや、水痘ウイルス (varicella zoster virus : VZV)

VZV (varicella zoster virus)

特集● 潜伏感染と再活性化

の帯状疱疹などはもっともよい例であるが、 β 系や γ 系ヘルペスウイルスの回帰感染は、一般には極端な免疫不全状態に陥らないと顕正化しない、逆に言えば、通常的环境下での再活性化によるウイルス産生もしくはウイルス遺伝子発現は、生体の免疫を中心とした監視機構により厳密に排除される仕組みになっているものと考えられる。KSHVの場合、れっきとした初期感染による病態発症や、再活性化に基づく病態との関連は報告されていない。

KSHVが関連する病態は、human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)によるAIDSという母体環境におけるKS, PEL, MCD (multicentric castleman's disease)などの腫瘍もしくは腫瘍様疾患である(ただし、いわゆるclassical KSの発症にAIDSは関与しない)。KSHVの本来の病原性ウイルスとしての活性は、このような環境におかれて初めて発揮されるものと思われる。また、これらの病態は基本的には潜伏感染の感染形態をとっているため、潜伏感染→発がんの構図が想定される。

しかし、冒頭に述べたように、KSHVにしてもEBVにしても、感染患者もしくはウイルス保有者全体で考えると発がん率が高い訳ではなく、ウイルスをもっていれば、がんができるということではない。たとえ潜伏感染から関連するがんが発症するにしても、発症に至る経緯はそう単純ではないと思われる。

潜伏感染関連遺伝子ではv-CYCは細胞周期(S期)を促進し、一方で、染色体不分離現象を誘発する活性がある。v-FLIPはDEATHシグナルを遮断してアポトーシスを抑制したり、NF- κ Bを活性化したりする。kaposinにはMAPKを活性化する機能があり、細胞を基本的には増殖に傾けているものと予測される。潜伏感染におけるウイルスゲノムの複製・分配・維持など、潜伏感染の維持にかかわる基本的なところで重要な働きをしているLANAを、293細胞等で単独発現させると

核の不分離現象などが比較的良好に観察されるようになる(私信)。

LANAはp53と相互作用する活性があるので²⁰⁾、このことは一見、LANAが発がんに関与しているような印象を与えるが、細胞増殖にとって本現象は不利な状態であり、LANAを発現して多核となった細胞増殖が効率よく増殖してくるわけではない(私信)。実際、293はKSHVに感染し潜伏感染様になるとされるが、その細胞がトランスフォームしてヌードマウス等で造腫瘍性をもつようになったという報告は見当たらない。我々が*in vitro*感染系において潜伏感染状態を再現したり、あるいは潜伏感染発現遺伝子を発現させて偽潜伏感染状態を作成したりしても、基本的にはKSHVの発がん能は観察されない(私信)。Trans-acting factorによる発がんのように、数十年といったオーダーを考慮した実験系のデザインが必要であるが、いずれにせよ $10^7 \sim 10^8$ に1個、がんが発生する確率であるとは考えにくい。

そもそもKSHVがもつ、KI, v-GPCR, K15など、発がんポテンシャル遺伝子はすべて溶解感染遺伝子である。これらの遺伝子産物のトランスフォーム能は抽出系では確認されている。したがって、KSHV発がん過程で一定の役割を担っていると想定され、この意味で、潜伏感染から再活性化し溶解感染遺伝子が発現することに、かなり重要な意味があるものと考えている。しかし、そのまま溶解感染を完遂すると細胞は破壊死滅してしまうので、発がんに傾ける、あるいはその効率を上昇させる溶解感染遮断ポイントがあるものと予測している。この考えは、SV40 (simian virus 40)などのポリオーマ系ウイルスやアデノウイルスによるトランスフォーミング能が、non-permissive細胞においてみられるという考えとまったく同じであるが、ヘルペスウイルスのように比較的大型のウイルスで、多くの遺伝子をもつウイルスにおいて、どのような機構が発がんに傾けているのか、今後の研究の発展が望まれる(図3)。

HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1)

MCD (multicentric castleman's disease)

SV40 (simian virus 40)

V おわりに

潜伏感染状態を維持し続けることは、ウイルスの種存続の観点で考えるとよいこととは言い難い。もちろん、溶解感染が効率よく進行するためには、適応した細胞内環境が必要であり、溶解感染の効率のよい細胞とそうでないものがあるものと思われ、潜伏感染はむしろ溶解感染の機会を待ち受ける状態と位置づけた方が考えやすい。しかしながら、KSHVでは再活性化が誘導されても、一方で潜伏感染を再度誘導する機構を働かせ、むしろ、溶解感染がある確率で進行しないようなabortiveな再活性化を行っている。この活性が母体にとっては、発がんという疾患で表出されるわけであるが、再活性化をdead-endで終わらせる戦略は、本当にKSHVが活用する存続戦略になりえるのであろうか？

文 献

- 1) Chang Y, et al: Identification of human herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266** : 1865-1869, 1994
- 2) Russo JJ, et al: Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Aca Sci USA* **93** : 14862-14867, 1996
- 3) Sarid R, et al: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. *Adv Virus Res* **52** : 139-232, 1999
- 4) Ueda K, et al: KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile. *Biochem Biophys Res Com* **394** : 482-487, 2010
- 5) Garber AC, et al: DNA binding and modulation of gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **75** : 7882-7892, 2001
- 6) Verschuren EW, et al: The oncogenic potential of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin is exposed by p53 loss *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Cell* **2** : 229-241, 2002
- 7) Ye F-C, et al: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent gene vFLIP inhibits viral lytic replication through NF- κ B-mediated suppression of the AP-1 pathway: a novel mechanism of virus control of latency. *J Virol* **82** : 4235-4249, 2008
- 8) McCormick C, Ganem, D: The Kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* **307** : 739-741, 2005
- 9) Ohsaki E, et al: Accumulation of LANA at nuclear matrix fraction is important for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication in latency. *Virus Res* **139** : 74-84, 2009
- 10) Garber AC, et al: Latency-associated Nuclear Antigen (LANA) Cooperatively Binds to Two Sites within the Terminal Repeat, and Both Sites Contribute to the Ability of LANA to Suppress Transcription and to Facilitate DNA Replication. *J Biol Chem* **277** : 27401-27411, 2002
- 11) Sakakibara S, et al: Accumulation of Heterochromatin Components on the Terminal Repeat Sequence of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Mediated by the Latency-Associated Nuclear Antigen. *J Virol* **78** : 7299-7310, 2004
- 12) Li Q, et al: Genetic disruption of KSHV major latent nuclear antigen LANA enhances viral lytic transcriptional program **379** : 234, 2008
- 13) Thureau M, et al: Viral Inhibitor of Apoptosis vFLIP/K13 Protects Endothelial Cells against Superoxide-Induced Cell Death. *J Virol* **83** : 598-611, 2009
- 14) Keller SA, et al: NF- κ B is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas *in vivo*. *Blood* **107** : 3295-3302, 2006
- 15) Brown HJ, et al: NF- κ B Inhibits Gammaherpesvirus Lytic Replication. *J Virol* **77** : 8532-8540, 2003
- 16) Lei X, et al: Regulation of NF- κ B inhibitor I κ B α and viral replication by a KSHV microRNA. *Nat Cell Biol* **12** : v193-199, 2010
- 17) Mori N, et al: Bay 11-7082 inhibits transcrip-

- tion factor NF- κ B and induces apoptosis of HTLV-1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **100** : 1828-1834, 2002
- 18) Liang Y, et al: The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-J κ (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16** : 1977-1989, 2002
- 19) Sakakibara S, et al: Octamer-Binding Sequence Is a Key Element for the Autoregulation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF50/Lyta Gene Expression. *J Virol* **75** : 6894-6900, 2001
- 20) Chen W, et al: Distinct p53, p53 : LANA, and LANA Complexes in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lymphomas. *J Virol* **84** : 3898-3908, 2010



KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile

Keiji Ueda^{a,*}, Emi Ito^b, Masato Karayama^c, Eriko Ohsaki^a, Kazushi Nakano^a, Shinya Watanabe^b

^a Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Clinical Genomics, Translational Research Center, Fukushima Medical University, Hikarigaoka-1, Fukushima 960-1295, Japan

^c Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2010

Available online 20 February 2010

Keywords:

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
Primary effusion lymphoma
Epstein-Barr virus
Burkitt lymphoma
T-cell lymphoma
DNA chip

ABSTRACT

We analyzed the gene expression profiles of lymphocyte-originated tumor cell lines – primary effusion lymphoma (PEL) cell lines, T-cell leukemia (TCL) cell lines, Burkitt lymphoma (BL) cell lines – and two sets of normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) – in order to determine characteristic gene expression profiles for each of the former three groups. And we found that these cell lines showed respective typical gene expression profiles and classified into clear four groups, PEL, TCL, BL, and normal PBMCs. Two B lymphocyte-originated tumor cell lines, PEL and BL cell lines, clearly exhibited distinct gene expression profiles, respectively. Even though there was only one line that was co-infected with both Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and Epstein-Barr virus (EBV), KSHV seemed to govern the gene expression profile of the co-infected line. These data suggested not only that established typical tumor cell lines show a distinct gene expression profile but also that this profile may be governed by certain viruses.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) or human herpesvirus 8 (HHV-8) was discovered in AIDS-associated Kaposi's sarcoma [1] and established as an etiologic agent for all forms of this disease [2]. KSHV is also found in almost all of two B cell lymphomas, primary effusion lymphoma (PEL) [3], and plasmablastic lymphoma associated with multicentric Castleman's disease [4]. PEL typically presents as a lymphomatous effusion in the pleural/peritoneal cavity without forming a solid mass [5].

Epstein-Barr virus (EBV), another human gamma-herpesvirus, is well known as an etiological agent of many types of cancer originated from T and B cell lymphocytes as well as gastric cancer [6]. Typical EBV-associated tumors are Burkitt lymphomas and classical Hodgkin's lymphomas, both of which are originated from B lymphocytes [7]. Although PEL often co-infects both with KSHV and EBV, KSHV seems to be primarily responsible for the transformation [5,8].

The advent of DNA microarray technology has been very helpful for revealing the characteristic profiles of transcriptomes of tissues including cancers. There have been many reports showing how infections with various viruses, including KSHV and EBV, affect cellular gene expression profiles [9]. Here, we analyzed the gene expression profiles of cell lines established from human lymphocytic leukemia. These were KSHV-infected primary effusion lymphoma (PEL) cell lines, either EBV-infected and non-infected Burkitt lymphoma (B-L) cell lines and several T-cell lymphoma (TCL) cell lines, including two sets of normal human peripheral mononuclear cells (PBMCs). Each of these groups showed a clearly distinguishable gene expression profile. The results suggested not only that a typical tumor cell type shows a distinct gene expression pattern but also that the gene expression profile of a typical tumor cell line seems to be governed by some virus infection.

phoma (PEL) cell lines, either EBV-infected and non-infected Burkitt lymphoma (B-L) cell lines and several T-cell lymphoma (TCL) cell lines, including two sets of normal human peripheral mononuclear cells (PBMCs). Each of these groups showed a clearly distinguishable gene expression profile. The results suggested not only that a typical tumor cell type shows a distinct gene expression pattern but also that the gene expression profile of a typical tumor cell line seems to be governed by some virus infection.

2. Materials and methods

2.1. Cells and RNA

The PEL cell lines used were TY1 [10], BCBL1 [11], D90 which was a derivative of BCBL1 and not inducible for lytic replication by tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) [12], BC3 [13], and BC1 [14]. All these cell lines are latently infected with KSHV and only BC1 is co-infected with KSHV and EBV, and they were cultured in the RPMI1640 medium (Wako Chemicals, Osaka, Japan) containing 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 10 i.u. per ml penicillin G and 10 µg per ml streptomycin under a 5% CO₂ atmosphere. The BL cell lines used were Ramos, BJAB, Daudi, Akata which was the gift of Dr. Takada, Hokkaido University [15], and Raji. For the RT-PCR (see below), Namalwa, an EBV-positive Burkitt lymphoma cell line and MC116, which is an undifferentiated B cell lymphoma cell line, were also utilized. All these cell lines were infected with EBV except Ramos, BJAB and MC116, and the EBV genomes in Raji and in Daudi cells were found to be defective [16,17]. Several TCL

* Corresponding author. Fax: +81 6 6879 3789.

E-mail address: kueda@virus.med.osaka-u.ac.jp (K. Ueda).

cell lines were also analyzed: Jurkat (an acute T-cell leukemia), Molt-3 (an acute T lymphoblastic leukemia), SupT1 (a T lymphoblastic leukemia) and MT4 (an adult T-cell leukemia cell line). Among them, only MT4 contained integrated retroviral genomes of human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1). The BL and TCL cell lines were cultured under the same condition except 10% heat-inactivated FBS was used in place of 20% heat-inactivated FBS. Samples were prepared as either a TPA-induced or non-induced version for all cell lines. RNA was extracted from these cells three times, when the cells grew to 1×10^6 /ml in the 25 ml culture medium. When cells were induced by TPA, TPA was added into medium at 1×10^6 /ml cell density and left for 48 h. The cells under this condition were pelleted and lysed with 5 ml Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). The solution was stored at 4 °C refrigerator until the other preparation was completed. Finally, three lysed solutions were combined and the total RNA was extracted.

For RNA preparation of the healthy candidates peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of two healthy volunteers, 20 ml of venous blood was obtained in a 100 U heparin containing syringe and spun down at 1500g for 15 min at room temperature [18]. The plasma was discarded and an equal volume of 0.02% EDTA-phosphate buffered saline (-) (PBS [-]) was added. The mixed blood was layered on a 20 ml Ficoll-Paque (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and centrifuged at 1500g for 3 min at RT. Banded PBMCs were collected, suspended in three volumes of 0.02% EDTA-PBS (-) and pelleted at 1500g for 3 min at RT. The supernatant was carefully and completely discarded and 5 ml Trizol® (Invitrogen) was added. The samples were prepared three times and all preparations were combined finally.

Total RNA was extracted from the lysate according to the manufacturer's instructions. Poly(A)⁺ RNA was purified from the total RNA using a MicroPoly(A)Purist™ Kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. The purified poly(A)⁺ RNA was divided into aliquots of 2.0 µg, precipitated with ethanol, and stored at -20 °C.

2.2. Microarray hybridization and data analysis

Synthetic polynucleotides of 80 mer representing 30,913 species of human transcripts (MicroDiagnostic, Tokyo, Japan) were printed on a glass slide using a custom-made arrayer. The aliquots of 2.0-µg RNA were subjected to first-strand cDNA synthesis in the presence of Cyanine-5 dUTP (PerkinElmer, Boston, MA) for samples obtained from the cell lines or Cyanine-3 dUTP (PerkinElmer) for a human common reference RNA in a reaction mixture derived from a labeling and hybridization kit (MicroDiagnostic). The human common reference RNA was prepared by mixing equal amounts of poly(A)⁺ RNA extracted from 22 human cancer cell lines to reduce cell type-specific bias of expression. The red fluorescence-labeled cDNA of the samples and the green fluorescence-labeled common reference RNA were equally mixed and hybridized to a microarray. The hybridized microarray was washed with the labeling and hybridization kit and subsequently scanned by using a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments, Union City, CA). Fluorescence signals were detected and processed by GenePix Pro 3.0 software (Axon Instruments). The processed raw data (median of ratios) were normalized by multiplying with the normalization factors provided in the GenePix Pro 3.0 software package. The normalized data (expression ratios) were converted into \log_2 values (designated log ratios).

2.3. Reverse transcription followed by PCR (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (q-PCR)

Cells were cultured and the total RNA was extracted under the same conditions described above for the RNA preparation as mentioned. Ten micrograms total RNA was subjected to cDNA synthesis with a first-strand synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany). The one-twentieth (~0.5 µg RNA equivalent) was used for RT-PCR and q-PCR. In this report, we focused on the angiotensin-1 (*ang-1*) gene and prepared the following primers to detect its expression:

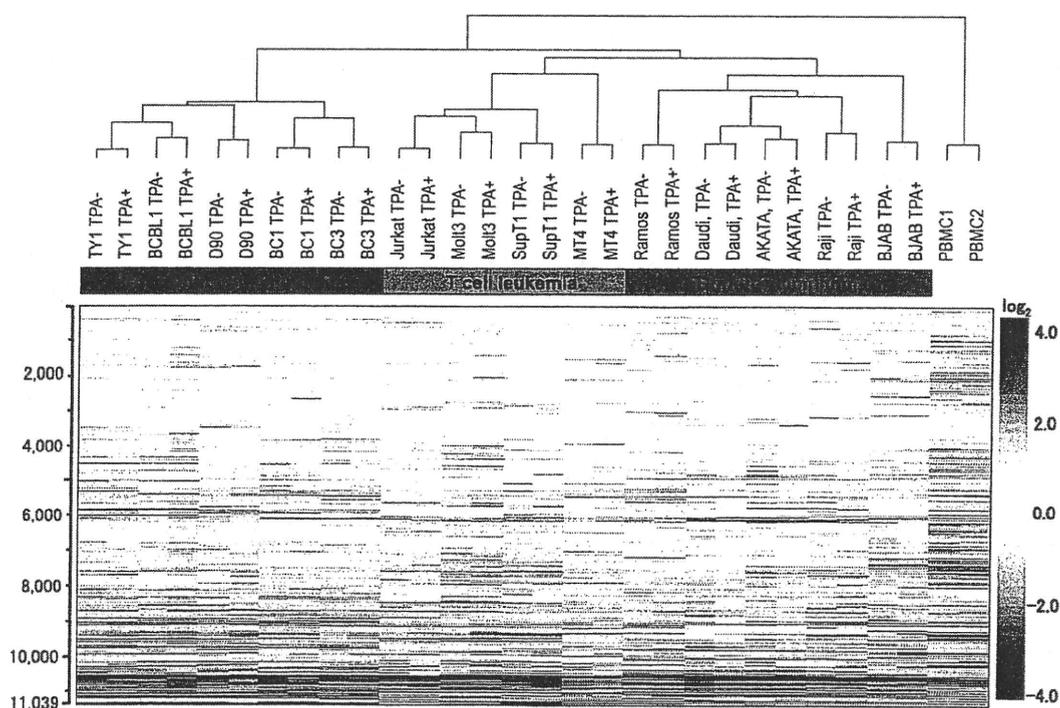


Fig. 1. Cluster analysis of the PEL, TCL, and BL cell lines. The expression levels of about 30,000 genes in each of the cell lines were analyzed with a DNA chip. The cluster analysis revealed that each category of tumor cell lines showed a distinct expression profile, and in most of cases TPA induction did not grossly change the expression profile.

In another report [19], vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃) receptor (VDR) (NM_01466), caspase 3 (NM_004346), activating transcription factor 6 (ATF6) (NM_005171) and presenilin 1 (Alzheimer disease 3) (PSEN1) (NM_007319) were expressed in the PEL cells more highly than in pre-B cells, GC B cells mostly including BL cell lines, and post-GC B cells. Our results, however, do not necessarily prove that the expression of these four genes expression was the higher in the PEL cells; i.e., VDR and caspase 3 were indeed expressed more highly in the PEL cells but ATF6 was expressed at lower levels and PSEN1 were equivalent (Fig. 3A).

Another report [29] has shown that the expression of angiopoietin 2 (*ang-2*) (NM_001147), chemokine (C–C motif) ligand 5 (CCL5) (NM_002985), chemokine (C–C motif) receptor 5 (CCR5) (NM_000579) and so on were up-regulated in the Kaposi's sarcoma (KS) [4], but such genes were not characteristically expressed in the KSHV-infected PEL cell lines in our analysis (data not shown), suggesting that the difference in cell origin affected the gene expression profile, even though both KS and PEL were usually infected with KSHV.

3.3. Angiopoietin 1 (*Ang-1*) (NM_001146) is expressed more highly in the PEL cell lines

Ang-1, which is an angiogenic secretory protein and has about 60% amino acid sequence similarity to Ang-2 (NM_001147) [18,30,31], appeared to be expressed more highly in the PEL cell lines than in the TCL or BL cell lines (Figs. 2A and 3B). The level of Ang-2 expression in the PEL cell lines was almost the same as in the normal PBMCs (Fig. 3B). Ang-1 shares a receptor, Tie2 (also called Tek1) (NM_005424) with Ang-2 [30,32]. Ang-1 acts as a paracrine agonist inducing Tie-2 phosphorylation and subsequent vessel stabilization. On the other hand, Ang-2 acts as an autocrine antagonist of Ang-1-mediated Tie-2 activation [33]. The outcome via the ligand-receptor mediated signaling is different, the reason for which remains unclear. It is still unclear how each factor signals to target cells. It has been reported that Ang-2 was expressed well in the KS, in which KSHV-mediated activation of AP-1 and Ets-1 responsive elements seemed to have the functional roles [29,34]. Another report showed that Tie1 as well as Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 were expressed highly in the KS lesions [35]. Furthermore, it has been reported that KSHV reprogrammed the gene expression profile of blood vascular endothelial cells upon infecting them [29,36,37]. Thus, *ang-1* could be more favorable for expression in the PEL cell environment, though there has been no report investigating their expression in PELs. We confirmed that *ang-1* was surely expressed at higher levels in the PEL cell lines than in the T-cell lymphoma or BL cell lines by RT-PCR (Fig. 3C). On the other hand, expression of the receptor, Tie2 expression was higher rather in the BL cell lines (Fig. 3B), suggesting that an autocrine mechanism should not be effective for PEL cells as noted for the role of Ang-2 [33], even if Ang-1 may function as a real positive growth factor for endothelial cells.

3.4. Genes expressed either lower or higher in the all tumor cell lines except normal PBMC

We mined our data to find genes expressed either at lower or higher levels in all the tumor cell lines examined in this analysis, since genes expressed in common in various kinds of cell lines might reflect general tumor or immortalized phenotype. We found that there were many repressed genes (data not shown) and a limited number of activated genes compared with normal PBMCs (data not shown). The information was indeed informative in terms of characteristic features of these kinds of blood cell cancers, but we are currently unable to specify the function of these genes

or the meanings of each gene to form tumor phenotype and further investigation will be needed to answer these questions.

In conclusion, three types of cell lines showed distinct gene expression profiles. The function and significance of higher or lower expressing genes in typical cell lines should be clarified to understand mechanism of cancer formation and effect of viral infection.

References

- [1] Y. Chang, E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, P.S. Moore, Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma, *Science* 266 (1994) 1865–1869.
- [2] C. Boshoff, R.A. Weiss, Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356 (2001) 517–534.
- [3] E. Cesarman, Y. Chang, P.S. Moore, J.W. Said, D.M. Knowles, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1186–1191.
- [4] J. Soulier, L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, M.F. d'Agay, J.P. Clauvel, M. Raphael, L. Degos, et al., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease, *Blood* 86 (1995) 1276–1280.
- [5] E. Cesarman, D.M. Knowles, The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases, *Semin. Cancer Biol.* 9 (1999) 165–174.
- [6] D. Shibata, L.M. Weiss, Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma, *Am. J. Pathol.* 140 (1992) 769–774.
- [7] E.D. Kieff, A.B. Rickinson, Epstein-Barr Virus and its Replication, Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, 2007.
- [8] R.G. Jenner, C. Boshoff, The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, *Biochim. Biophys. Acta* 1602 (2002) 1–22.
- [9] J. Yuan, E. Cahir-McFarland, B. Zhao, E. Kieff, Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication, *J. Virol.* 80 (2006) 2548–2565.
- [10] H. Katano, Y. Hoshino, Y. Morishita, T. Nakamura, H. Satoh, A. Iwamoto, B. Herndier, S. Mori, Establishing and characterizing a CD30-positive cell line harboring HHV-8 from a primary effusion lymphoma, *J. Med. Virol.* 58 (1999) 394–401.
- [11] R. Renne, W. Zhong, B. Herndier, M. McGrath, N. Abbey, D. Kedes, D. Ganem, Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture, *Nat. Med.* 2 (1996) 342–346.
- [12] K. Nishimura, K. Ueda, S. Sakakibara, K. Ishikawa, J. Chen, T. Okuno, K. Yamanishi, Functional analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA in an RTA-depressed cell line, *J. Hum. Virol.* 4 (2001) 296–305.
- [13] L. Arvanitakis, E.A. Mesri, R.G. Nador, J.W. Said, A.S. Asch, D.M. Knowles, E. Cesarman, Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus, *Blood* 88 (1996) 2648–2654.
- [14] E. Cesarman, P.S. Moore, P.H. Rao, G. Inghirami, D.M. Knowles, Y. Chang, In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences, *Blood* 86 (1995) 2708–2714.
- [15] K. Takada, K. Horinouchi, Y. Ono, T. Aya, T. Osato, M. Takahashi, S. Hayasaka, An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA, *Virus Genes* 5 (1991) 147–156.
- [16] G.W. Bornkamm, J. Hudewentz, U.K. Freese, U. Zimmer, Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region, *J. Virol.* 43 (1982) 952–968.
- [17] G. Hatfull, A.T. Bankier, B.G. Barrell, P.J. Farrell, Sequence analysis of Raji Epstein-Barr virus DNA, *Virology* 164 (1988) 334–340.
- [18] C. Suri, P.F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P.C. Maisonpierre, S. Davis, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos, Requirement of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis, *Cell* 87 (1996) 1171–1180.
- [19] R.G. Jenner, K. Maillard, N. Cattini, R.A. Weiss, C. Boshoff, R. Wooster, P. Kellam, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 10399–10404.
- [20] C. Boshoff, S.J. Gao, L.E. Healy, S. Matthews, A.J. Thomas, L. Coignet, R.A. Warnke, J.A. Strauchen, E. Matutes, O.W. Kamel, P.S. Moore, R.A. Weiss, Y. Chang, Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice, *Blood* 91 (1998) 1671–1679.
- [21] A. Carbone, A.M. Cilia, A. Gloghini, D. Capello, M. Todesco, S. Quattrone, R. Volpe, G. Gaidano, Establishment and characterization of EBV-positive and EBV-negative primary effusion lymphoma cell lines harbouring human herpesvirus type-8, *Br. J. Haematol.* 102 (1998) 1081–1089.
- [22] G. Gaidano, D. Capello, A.M. Cilia, A. Gloghini, T. Perin, S. Quattrone, A. Migliozza, F. Lo Coco, G. Saglio, V. Ascoli, A. Carbone, Genetic characterization of HHV-8/KSHV-positive primary effusion lymphoma reveals frequent mutations of BCL6: implications for disease pathogenesis and histogenesis, *Genes Chromosomes Cancer* 24 (1999) 16–23.

- [23] J.W. Said, T. Tasaka, S. Takeuchi, H. Asou, S. de Vos, E. Cesarman, D.M. Knowles, H.P. Koeffler, Primary effusion lymphoma in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women, *Blood* 88 (1996) 3124–3128.
- [24] R. Sarid, O. Flore, R.A. Bohenzky, Y. Chang, P.S. Moore, Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1), *J. Virol.* 72 (1998) 1005–1012.
- [25] R.G. Jenner, M.M. Alba, C. Boshoff, P. Kellam, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays, *J. Virol.* 75 (2001) 891–902.
- [26] M. Paulose-Murphy, N.K. Ha, C. Xiang, Y. Chen, L. Gillim, R. Yarchoan, P. Meltzer, M. Bittner, J. Trent, S. Zeichner, Transcription program of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), *J. Virol.* 75 (2001) 4843–4853.
- [27] R. Hamoudi, T.C. Diss, E. Oksenhendler, L. Pan, A. Carbone, V. Ascoli, C. Boshoff, P. Isaacson, M.Q. Du, Distinct cellular origins of primary effusion lymphoma with and without EBV infection, *Leuk. Res.* 28 (2004) 333–338.
- [28] A. Matolcsy, R.G. Nador, E. Cesarman, D.M. Knowles, Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1609–1614.
- [29] Y.F. Wang, Y.F. Hsieh, C.L. Lin, J.L. Lin, C.Y. Chen, Y.H. Chiou, M.C. Chou, Staurosporine-induced G2/M arrest in primary effusion lymphoma BCBL-1 cells, *Ann. Hematol.* 83 (2004) 739–744.
- [30] L. Eklund, B.R. Olsen, Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 630–641.
- [31] S. Davis, T.H. Aldrich, P.F. Jones, A. Acheson, D.L. Compton, V. Jain, T.E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P.C. Maisonpierre, G.D. Yancopoulos, Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning, *Cell* 87 (1996) 1161–1169.
- [32] K.T. Kim, H.H. Choi, M.O. Steinmetz, B. Maco, R.A. Kammerer, S.Y. Ahn, H.Z. Kim, G.M. Lee, G.Y. Koh, Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20126–20131.
- [33] M. Thomas, H.G. Augustin, The role of the angiopoietins in vascular morphogenesis, *Angiogenesis* 12 (2009) 125–137.
- [34] F.C. Ye, D.J. Blackbourn, M. Mengel, J.P. Xie, L.W. Qian, W. Greene, I.T. Yeh, D. Graham, S.J. Gao, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus promotes angiogenesis by inducing angiopoietin-2 expression via AP-1 and Ets1, *J. Virol.* 81 (2007) 3980–3991.
- [35] L.F. Brown, B.J. Dezube, K. Tognazzi, H.F. Dvorak, G.D. Yancopoulos, Expression of Tie1, Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 2179–2183.
- [36] Y.K. Hong, K. Foreman, J.W. Shin, S. Hirakawa, C.L. Curry, D.R. Sage, T. Libermann, B.J. Dezube, J.D. Fingerth, M. Detmar, Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, *Nat. Genet.* 36 (2004) 683–685.
- [37] H.W. Wang, M.W. Trotter, D. Lagos, D. Bourboulia, S. Henderson, T. Makinen, S. Elliman, A.M. Flanagan, K. Alicata, C. Boshoff, Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma, *Nat. Genet.* 36 (2004) 687–693.

Patients with Chronic Hepatitis C May be More Sensitive to Iron Hepatotoxicity than Patients with HFE-Hemochromatosis

Hisao Hayashi¹, Alberto Piperno², Naohisa Tomosugi³, Kazuhiko Hayashi⁴,
Fumiaki Kimura⁵, Shinya Wakusawa⁶, Motoyoshi Yano⁷, Yasuaki Tatsumi¹, Ai Hattori¹,
Sara Pelucchi², Yoshiaki Katano⁴ and Hidemi Goto⁴

Abstract

Aim In chronic hepatitis C, iron might play an important role as a hepatotoxic co-factor. Therefore, venesection, a standard treatment for hemochromatosis, has been proposed as an alternative for patients who respond poorly to anti-viral therapy. To improve our understanding of iron-induced hepatotoxicity, we compared the responses to venesection between patients with chronic hepatitis C and those with HFE-hemochromatosis.

Methods Fourteen Japanese patients with chronic hepatitis C and eight Italian patients with HFE-hemochromatosis underwent repeated venesection with a serum ferritin endpoint of 20 and 50 ng/mL, respectively. Serum iron indices and liver function tests were measured in pre- and post treatment blood samples from each patient. Body iron stores were calculated using the removed blood volume.

Results In both patients with hepatitis and hemochromatosis, serum ferritin, aminotransferase and hepcidin 25 were reduced after venesection. The serum aminotransferase activity, but not the serum ferritin level, was predictive of effective iron removal treatment. Hepcidin regulation was set at an inappropriately low level in hemochromatosis patients (11.1 ± 9.2 ng/mL), but not so in hepatitis patients (30.7 ± 14.5 ng/mL). Inversely, the estimated body iron stores of hemochromatosis patients were $5,960 \pm 2,750$ mg, while those of hepatitis patients were 730 ± 560 mg. Judging from the liver enzyme reduction ratio, patients with hepatitis seemed to be more sensitive to iron hepatotoxicity than hemochromatosis patients.

Conclusion Even though the threshold of iron hepatotoxicity and benefit of its removal differ between patients with chronic hepatitis C and those with HFE-hemochromatosis, venesection is a valid choice of treatment to reduce liver disease activity in both diseases.

Key words: body iron store, hemochromatosis, HFE, hepatitis C, hepcidin, venesection

(Intern Med 49: 2371-2377, 2010)

(DOI: 10.2169/internalmedicine.49.4088)

Introduction

A door to genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis

was opened in 1996 by Feder et al; C282Y homozygosity in *HFE* gene was found in 85% patients with hemochromatosis (1). Marked iron overload can induce organ and tissue damage by producing oxidative stress related to the presence

¹Department of Medicine, Aichi Gakuin University School of Pharmacy, Nagoya, ²Department of Clinical Medicine and Prevention, University of Milano-Bicocca, Italy, ³Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Kanazawa Medical University, Ishikawa, ⁴Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, ⁵Department of Internal Medicine, Tamano Municipal Hospital, Okayama, ⁶Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Sciences, Nagoya and ⁷Department of Medicine, Yokkaichi City Hospital, Yokkaichi

Received for publication June 14, 2010; Accepted for publication August 20, 2010

Correspondence to Dr. Hisao Hayashi, hhayashi@dpc.agu.ac.jp

of "free iron" or "labile iron". Accordingly, iron depletion by venesection is the standard treatment for patients with HFE-hemochromatosis. Treatment at the pre-fibrosis stage is essential because hepatocellular carcinoma can develop in patients with advanced liver fibrosis even after iron removal (2). Iron-induced oxidative stress in the liver can also be induced by chronic infection with hepatitis C virus (HCV) and some studies suggest that in patients with chronic hepatitis C (CHC), the coexistence of even a slight amount of excess iron in the liver may exacerbate this oxidative stress and promote liver injury and fibrosis, and in some cases, promote carcinogenesis (3, 4). Over the last 20 years, the treatment of choice for CHC has been interferon (IFN) therapy (5). Even though the clinical administration of pegylated IFN and combination therapy with ribavirin have improved the viral clearance rate, these antiviral therapies are effective in eradicating the virus in only approximately 50% of patients (6). Therefore, venesection has been proposed as an alternative in CHC patients who either were contraindicated or responded poorly to IFN therapy, but the routine application of venesection for the treatment of CHC patients remains limited worldwide.

Hepcidin, a peptide synthesized in the liver, is the main regulator of iron homeostasis by inhibiting intestinal iron absorption and iron release by macrophages (7, 8). Functionally, hepcidin secreted into the circulation binds to ferroportin, the only known cellular iron exporter, inducing its internalization and degradation (9). Thus, the down-regulation of ferroportin controls iron efflux from enterocytes and reticuloendothelial cells into the circulation. Hemochromatosis proteins act as positive regulators of hepcidin. Thus, hepcidin synthesis is at a low level in patients with HFE-hemochromatosis, which is the primary explanation for the development of iron overload in these patients (10). Venesection further decreases serum and urinary hepcidin to very low levels in patients with HFE-hemochromatosis, indicating that they are still able to modulate, although inappropriately, hepcidin production in response to iron stores (11, 12). Investigation of hepcidin regulation has been limited due to the lack of reliable methods. Recently serum hepcidin levels of CHC patients were measured in 2 studies using different methods (13, 14). Both studies indicated that hepcidin regulation by iron stores is maintained in CHC and suggested that HCV infection can impair hepcidin production, which may be an important factor in hepatic iron accumulation.

Based on previous data on the possible beneficial effect of venesection in HFE-hemochromatosis and CHC (2-4), we investigated iron-induced hepatotoxicity and hepcidin regulation under these iron overload conditions.

Subjects and Methods

Fourteen Japanese patients with CHC (8 males and 6 females; aged 57 ± 8 years) and eight Italians with HFE-hemochromatosis (6 males and 2 females; aged 49 ± 17

years) were treated by venesection. Age-matched controls were selected from a database of healthy Japanese volunteers (8 males and 6 females; aged 56 ± 7). Inclusion criteria for CHC patients were: HCV-positive chronic hepatitis, alcohol intake <25 g/day, absence of coexisting hepatitis B virus (HBV) infections; absence of decompensated cirrhosis; absence of coexisting conditions that could influence iron parameters, such as acute and chronic inflammatory diseases and hematological disorders, venesection, iron supplementation or repeated transfusions. All CHC patients were either non-responders to IFN or had refused IFN therapy. Most patients were under long-term ursodeoxycholic acid treatment without interruption during venesection. Demographic information showing that the HFE mutant has an almost zero incidence among Japanese (15) permitted omission of HFE analysis in this population. Inclusion criteria for HFE-hemochromatosis were increased transferrin saturation and serum ferritin, and homozygosity for C282Y mutation in *HFE* (1). HBV, HCV or human immunodeficiency virus infections and high alcoholic intake were exclusion criteria for the hemochromatosis group. Patients with CHC received venesection with modified endpoints of serum ferritin of 20 ng/mL or hemoglobin of 12.0 g/dL based on a previous report (3) because iron deficiency anemia might decrease hepcidin production. A volume of 200 mL for female patients and 400 mL for male patients was removed every two weeks. Italian patients with HFE-hemochromatosis were treated by standard venesection with an endpoint of serum ferritin levels of less than 50 ng/mL. A volume of 350 mL for female patients and 400 mL for male patients was drawn each week.

Routine laboratory tests included hemoglobin, serum alanine aminotransferase (ALT) activities, serum iron, total iron binding capacity and ferritin concentration. Transferrin saturation (TS) was calculated according to the standard method. Serum hepcidin 25 was quantified by liquid chromatography tandem mass spectrometry in the laboratory of Kanazawa Medical University, and expressed as ng/mL as reported previously (16).

Because Hb did not change in venesection for hemochromatosis, body iron stores were simply estimated from the total iron removed using a modified version of the following formula reported previously (17) [mean Hb (g/dL) $\times 0.034 \times$ total blood volume (mL)]. Body iron stores of hepatitis with post treatment anemia were adjusted by reduced hemoglobin (Hb) concentration during venesection: body iron stores (mg) = total iron removed (mg) - reduced blood iron (mg) [Δ Hb (g/dL) $\times 0.034 \times 1/15 \times$ body weight (g)]. Δ Hb (g/dL) was defined as the change in the concentration after venesection.

Reduction of ALT activity was calculated as [pre-treatment activity - post treatment activity]. Based on a hypothesis that sensitivity to iron-induced hepatotoxicity might be represented by a ratio of ALT reduction during venesection to body iron stores, the iron hepatotoxicity index (IHI) was calculated by [dividing reduction in ALT activity by body iron stores estimated from total volume of removed

Table 1. Laboratory Data of Controls and Patients Receiving Venesection

Subjects	Hb (g/dL)	Hepcidin (ng/mL)	Ferritin (ng/mL)	H/F ratio	TS (%)	ALT (U/L)
Japanese Control (n=14)						
Base line	14.0±1.4	33.7±17.9	110±81	0.48±0.47	35.8±9.3	20±7
Japanese CHC (n=14)						
Pre Treatment	14.6±1.1	30.7±14.5	250±132	0.14±0.07	45.3±12.9	90±27
Post Treatment	13.1±1.3	2.0±1.4	15±4	0.15±0.12	17.2±5.7	41±16
<i>p</i> 1 (Pre vs. Cont)	ns	ns	<0.01	0.018	0.034	<0.01
<i>p</i> 4 (Pre vs. Post)	<0.01	<0.01	<0.01	ns	<0.01	<0.01
Italian Hemochromatosis (n=8)						
Pre Treatment	14.6±0.8	11.1±9.2	1347±620	0.01±0.01	83±14	40±21
Post Treatment	14.8±0.5	2.1±2.3	49±16	0.05±0.05	41±13	18±5
<i>p</i> 1 (Pre vs. Control)	ns	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ns
<i>p</i> 2 (Pre vs. Pre CHC)	ns	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>p</i> 3 (Post vs. Post CHC)	<0.01	ns	<0.01	0.012	<0.01	<0.01
<i>p</i> 4 (Pre vs. Post)	ns	0.014	<0.01	ns	<0.01	0.016

H/F; hepcidin/ferritin, ALT; alanine aminotransferase, TS; transferrin saturation, CHC; chronic hepatitis C, *p*1; statistical analysis of pre-treatment values compared to control baseline, *p*2; statistical analysis of pre-treatment values compared to those of CHC, *p*3; statistical analysis of post treatment values compared to those of CHC, *p*4; statistical analysis of pre-treatment and post-treatment values.

There were sex differences in Hb and serum ferritin concentration, but not in serum levels of hepcidin and ALT in controls.

Pre-treatment patients with hemochromatosis were characterized by remarkably high levels of ferritin and transferrin saturation, and low levels of hepcidin and ALT compared to those with CHC. Baseline levels of hepcidin did not differ between controls and CHC, but the hepcidin/ferritin ratio, an iron regulatory hormone index adjusted by representative values of body iron stores, were low in CHC. Regardless of the different endpoints, both patients with CHC and those with hemochromatosis responded similarly to venesection treatment. Post treatment levels of hepcidin were quite low in all patients regardless of CHC or hemochromatosis.

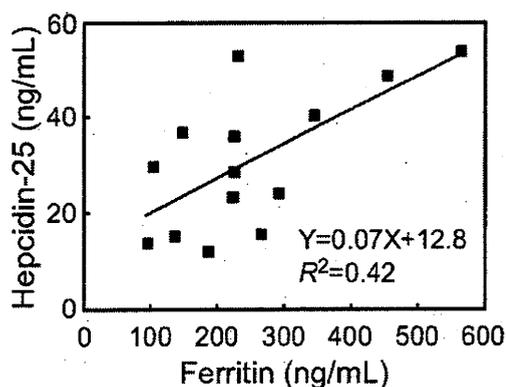


Figure 1. A correlation between serum levels of ferritin and hepcidin 25 in pre-treatment patients with chronic hepatitis C. Hepcidin might regulate iron homeostasis in chronic hepatitis C patients.

blood].

These procedures including venesection were performed in accordance with guidelines for Human Research at Nagoya University Hospital and Milano-Bicocca University. For statistical analysis, biochemical indices were expressed as mean ± SD, and differences between pre- and post-treatment values, and those among patient groups were analyzed using Student's *t* test. Gender differences were not

considered in the study because of the small number of patients.

Results

Laboratory data of subjects at entry and post-venesection are summarized in Table 1. Pre-treatment levels of serum ferritin, transferrin saturation and ALT differed among groups. Serum ferritin levels and TS were markedly elevated in hemochromatosis, and slightly increased in CHC compared to those in controls. ALT levels were three times higher than the upper normal value in patients with CHC and only slightly increased in hemochromatosis patients. Pre-treatment hepcidin levels of hepatitis patients did not significantly differ compared with those of controls (33.7 ± 17.9 vs. 30.7 ± 14.5 ng/mL, $p=0.64$), but the hepcidin/ferritin ratio in hepatitis patients was significantly lower than that in controls (0.14 ± 0.07 vs. 0.48 ± 0.47 , $p=0.018$). Serum hepcidin levels were significantly lower in patients with hemochromatosis. Markedly low levels of hepcidin and high levels of ferritin induced quite low values for the hepcidin index in hemochromatosis patients. A significant correlation was observed in the pre-treatment levels between serum hepcidin and ferritin in CHC patients ($r=0.65$, $p=0.012$) (Fig. 1), but not in controls and hemochromatosis patients (data not shown). The small number of controls and patients