

201124030A

厚生労働科学研究費補助金エイズ研究対策事業 平成23年度総括・分担研究報告書

エイズ患者における
カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスが原因となる疾患の
発症機構の解明と予防
および治療法に関する研究

研究代表者 片野 晴隆 平成24(2012)年3月

国立感染症研究所感染病理部

平成 23 年度
厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

エイズ患者における
カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスが原因となる疾患の
発症機構の解明と予防
および治療法に関する研究
—平成 23 年度 総括・分担研究報告書—

研究代表者 片野 晴隆

研究代表者

片野晴隆

国立感染症研究所感染病理部 室長

研究分担者

上田啓次

大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授

藤室雅弘

京都薬科大学薬学部細胞生物学分野 教授

今村顕史

がん・感染症センター東京都立駒込病院感染症科 医長

照屋勝治

国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 病棟医長

上平朝子

国立病院機構大阪医療センター感染症内科 科長

研究協力者

菅野隆行、坂本康太、福本 瞳、吉岡妙子

国立感染症研究所感染病理部

関塚剛史、黒田 誠

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

大崎恵理子

大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学

渡部匡史

京都薬科大学 細胞生物学分野

矢嶋敬史郎

大阪医療センター感染症内科

総括研究報告書.....	7
--------------	---

エイズ患者におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスが原因となる疾患の発症機構の解明と予防 および治療法に関する研究	8
---	---

研究代表者	片野 晴隆	国立感染症研究所感染病理部 室長
研究分担者	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授
	藤室 雅弘	京都薬科大学薬学部細胞生物学分野 教授
	今村 顕史	がん・感染症センター東京都立駒込病院感染症科 医長
	照屋 勝治	国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 病棟医長
	上平 朝子	国立病院機構大阪医療センター感染症内科 科長

分担研究報告書.....	13
--------------	----

新規予防薬の開発.....	14
---------------	----

研究分担者	片野 晴隆	国立感染症研究所感染病理部 室長
-------	-------	------------------

KSHV の潜伏感染、再活性化機構と KSHV に起因する病態発症機構の解明	18
--	----

研究分担者	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科 教授
-------	-------	------------------

新規治療薬の開発.....	20
---------------	----

研究分担者	藤室 雅弘	京都薬科大学 細胞生物学 教授
-------	-------	-----------------

HIV 関連カポジ肉腫の臨床像と治療方針に関する検討.....	28
---------------------------------	----

研究分担者	今村 顕史	がん・感染症センター 都立駒込病院 感染症科
-------	-------	------------------------

HHV-8 感染症の病態と治療.....	32
----------------------	----

研究分担者	照屋勝治	国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター (ACC)
-------	------	-----------------------------------

カポジ肉腫の現状把握および HHV-8 の抗体保有率の検討	40
-------------------------------------	----

研究分担者	上平 朝子	国立病院機構大阪医療センター 感染症内科
-------	-------	----------------------

刊行物一覧.....	45
------------	----

総括研究報告書

エイズ患者におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスが原因となる疾患の発症機構の解明と予防および治療法に関する研究

研究代表者	片野 晴隆	国立感染症研究所感染病理部 室長
研究分担者	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授
	藤室 雅弘	京都薬科大学薬学部細胞生物学分野 教授
	今村 顕史	がん・感染症センター東京都立駒込病院感染症科 医長
	照屋 勝治	国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 病棟医長
	上平 朝子	国立病院機構大阪医療センター感染症内科 科長

研究要旨

日本のエイズ患者におけるカポジ肉腫の発症数が増えており、カポジ肉腫への対策は急務である。本研究は日本のカポジ肉腫減少を目指し、カポジ肉腫の原因ウイルスであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV または HHV-8）関連疾患の発症機構の解明、ワクチンを含めたカポジ肉腫の新規予防・発症予知法の開発、カポジ肉腫・KSHV 感染症の現状把握、治療ガイドラインの作成を目標とする。今年度の基礎的な研究成果として、LANA によるウイルス複製機構の解析を行ったこと、ワクチン評価系としての細胞間感染実験系の開発に着手したこと、PEL 細胞の細胞死を誘導する薬剤をいくつか同定したことがあげられる。また、カポジ肉腫症例の臨床的解析を行い、治療指針の推奨案を示した。さらに、KSHV 関連疾患の全国調査を行い、化学療法を必要とする予後不良例が少なからず存在し、死亡率も高い現状が判明した。現在主に使用されている化学療法薬の代替薬の必要性も示された。これらの調査結果は治療ガイドライン作成のための重要な資料となる。

A. 研究目的

日本のエイズ患者におけるカポジ肉腫の発症数は 2001 年から 2010 年の間に 3 倍以上と、現在、急激に増加している。皮膚カポジ肉腫の予後は比較的よいが、肺や消化管などの深部臓器に発症した症例は治療困難であり、カポジ肉腫への対策は急務である。カポジ肉腫に対する治療は抗レトロウイルス療法（ART）に化学療法（ドキシル、一般名リボゾーマルドキソルビジン）を併用する方法が標準化されつつあるが、現在のところ、ART を考慮した病期分類や治療ガイドラインがない。また、現在、ドキシルの供給が停止している点も臨床的に大きな問題である。カポジ肉腫の原因ウイルスであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV または HHV-8）には有効なワクチンや発症予測法がないが、カポジ肉腫は危険因子（MSM）がはっきりしており、早期の治療が功を奏する疾患であるだけに、効果的な新規予防・治療法の開発

が望まれる。本研究では以下のアプローチにより日本のカポジ肉腫減少を目指す。

(1) KSHV 関連疾患の発症機構の解明：KSHV の潜伏感染機構の解析から分子標的を絞る（上田、片野）。

(2) ワクチンを含めたカポジ肉腫の新規予防・発症予知法の開発：粘膜ワクチン開発と分子標的を定めた新規治療薬、発症予測法を確立する（片野、藤室）。

(3) カポジ肉腫・KSHV 感染症の現状把握：年齢、性別、発症部位、同性愛行為との関連、治療法、他の日和見感染症の合併などを把握する（今村、照屋、上平）。

(4) 治療ガイドラインの作成：ART を考慮した臨床的病期分類、ART の開始時期とリボゾーマルドキソルビジン（ドキシル）の併用などを考慮に入れた治療ガイドラインの作成を行う（今村、照屋、上平）。

日本以外の先進国ではカポジ肉腫は減少傾向にあり、ARTを考慮した病期分類や治療ガイドラインは現在のところ存在しない。KSHVの感染、発癌機構はいまだに不明で、感染、発癌機構の解明ではウイルス発癌共通の知見が発見される可能性がある。

B. 研究方法

ウイルスはKSHV、GFP発現組換えKSHVを用いた。また、KSHV感染細胞として、TY-1, BCBL-1を用いた。感染細胞の同定はLANAに対する免疫染色、またはフローサイトメトリーを用いた。ウイルスタンパクの検出はウエスタンブロット、フローサイトメトリーなどの方法を各分担研究の中で目的に応じて使用した。カポジ肉腫症例の臨床的解析は、病変部位、検査所見、治療方針や経過などを、診療録を用いて後方視的に調査した。KSHV関連疾患の全国調査については、全国のエイズ拠点病院を対象に書面、またはインターネット(web)上でアンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え等の実験に関しては当該研究施設の遺伝子組換え実験倫理委員会の承認を得た上で実験を行った。蛍光色素を発現するウイルスはDNA組換えウイルスであり、使用に当たり、大臣承認を得た。ヒト検体を用いた研究は当該施設の研究倫理委員会の承認を得て行われる。

C. 研究結果

(1) KSHV 関連疾患の発症機構の解明:

KSHVの潜伏感染タンパクであるLANAのDNA結合領域のキメラタンパクを作成し、複製との関連を調査した。これまでにLANAが関わる潜伏感染複製において、核マトリックスが複製の場として重要な意義をもつことを示してきたが、LANAのC末側には二量体形成、DNA結合、および、潜伏感染時のゲノム複製に関わる領域がある。実験の結果、このC末側部分のみでは核マトリックスへの移行はみられず、複製効率が悪いことが示された。また、このC末側部分と宿主核マトリックス蛋白のハイブリッド蛋白を作成すると潜伏感染時のウイルスゲノム複製が十分に行われたことから、複製の場としての核マトリックスが重要である点が確認された(上田)。

また、KSHVには17個のmiRNAがコードされており、近年、多くの論文で、これらのmiRNAが

KSHVによる発癌、腫瘍化に重要な役割を果たすことが示されている。そこで、KSHVのmiRNAの発現を次世代シーケンサーにより詳細に解析したところ、ウイルスがコードする16 base程度の非常に短いmiRNAがKSHVの各miRNAをコードする遺伝子から発現していることが明らかになった。この、ごく短いmiRNAの発現はウイルスmiRNAに特異的な現象である可能性が示唆された(片野)。

(2) ワクチンを含めたカポジ肉腫の新規予防・発症予知法の開発:

KSHV感染はcell to cellの感染(細胞間感染)が重要である。細胞間感染の効率のよい感染実験系を確立する目的で、GFPを発現する組換えKSHVが持続感染したリンパ腫細胞と、接着細胞であるHeLaおよび293MSR細胞との共培養を試みた。その結果、共培養開始後5日目で、浮遊細胞を洗浄して除去しても、接着細胞側に多くのGFP陽性細胞が認められた。また、GFP発現する組換えKSHVを感染させた293T, Vero細胞をウイルス供給細胞とし、KSHV非感染ヒトリンパ腫細胞であるBjab細胞にcell to cellでKSHVを感染させる実験系を検討したところ、効率が悪いながらもBjab細胞への感染が見られた。今後、ワクチン、感染阻害薬開発のための細胞間感染効率を測定できる実験系の開発を目指し、感染効率を上げる方法を検討している(片野)。

また、primary effusion lymphoma (PEL)を標的とした抗腫瘍化合物とKSHVの複製阻害活性を有する抗KSHV化合物の探索を実施した。その結果、HSP90阻害剤、プロテアソーム阻害剤が、PEL細胞内のNF- κ Bシグナルを抑制し、アポトーシスを誘導すること、PEL細胞におけるKSHV複製阻害活性があること、その複製阻害活性はKSHV初期遺伝子の転写以降のウイルス複製過程を阻害するものであることを見いだした(藤室)。

(3) カポジ肉腫・KSHV感染症の現状把握:

駒込病院におけるカポジ肉腫症例について、臨床的な検討を行なった。カポジ肉腫の所見や進行は多彩であり、従来の病期分類ではART時代における治療方針を計画することは困難であることが明らかになった。この結果から、化学療法を必要とする基準、そして経過によって早期に化学療法を終了するための推奨案を示すことができた(今村)。

また、大阪医療センターにおけるHIV感染者のカポジ肉腫症例についても調査した。その結果、8割以上の症例が軽快していたが、治療抵抗例や

KSHV 関連の悪性リンパ腫を発症した症例もみられた。しかし、治療開始の基準、治療期間、治療抵抗例の治療薬の選択に関する指標がなく、カポジ肉腫の診療ガイドラインの作成が必要であると考えられた（上平）。

一方で、2011 年 12 月から、全国の拠点病院を対象としたアンケート調査を実施し、日本のカポジ肉腫の実態把握を行った。46 施設より 312 例の KS と 8 例のキャッスルマン病の症例情報を収集した。KS の 4 割程度は、致命的となりうる深部臓器病変を合併していた。HAART 開始後の免疫能改善に伴う発症あるいは病変の悪化がみられた症例が 8.7% ほどあり、免疫再構築症候群 (IRIS) の KS 発症と見られた。ドキシルによる治療は全体の 42.4% に実施されていた。2 例 (0.7%) は現在、日本で使用が認可されていないパクリタキセルによる治療が行われており、ドキシル不応などによる治療抵抗例が少なからず存在していることが示唆される（照屋）。

(4) 治療ガイドラインの作成

上記のアンケート調査等の結果から、ART を考慮した臨床的病期分類、ART の開始時期とドキシルの併用などを考慮に入れた治療ガイドラインの作成を行う予定である（今村、照屋、上平）。

D. 考察

KSHV のワクチン開発には感染防御を評価できる感染実験系の確立が必要であるが、現在のところ、ヒトで起きる感染を忠実に再現する、適切な動物実験系がない。B 細胞系への感染実験はこれまでも困難といわれているが、本研究で行ったヒト、またはサル細胞からヒトリンパ腫細胞への細胞間感染実験系は効率が悪いながらも、ヒトにおける感染に最も近い実験系であり、この系の感染効率の改善を目指すことが、ワクチン評価系の開発につながるものと考えられる。また、HSP90 阻害剤、プロテアソーム阻害剤が PEL 細胞の細胞死を誘導すること、さらに KSHV の複製も阻害していることが示された。その作用機構として、これらの薬剤により PEL 細胞内の NF- κ B 転写抑制、さらに、I κ B α のリン酸化阻害と I κ B α 安定化が誘導されることが確認された。今後、これら化合物のより詳細な作用機序解析を行うと共に、さらに特異性や安全性について、ヌードマウス、または SCID マウスを用いた In Vivo での評価を行うことを予定している。LANA は KSHV 感染症の病態を考える上でも最も重要な分子であり、その発現制

御機構と潜伏感染時におけるウイルス複製機構を明らかにすることは KSHV 感染症そのものの解明に他ならない。LANA による潜伏感染時のウイルス複製が核マトリックスで行われているという観察は重要であり、LANA の核マトリックス移行に必要な十分な領域はまだ明らかではないが、LANA の ori-P 結合領域が核マトリックス分画に移行すればウイルスゲノム複製を開始できるという観察は、核マトリックスにおける KSHV 複製機構の直接の解明につながる可能性を持ち、意義深い。

臨床研究では、今年度の研究期間中に、ドキシルの供給停止という、予期せぬ事態が発生したことから、KSHV 疾患の発生、治療状況に加え、急遽、ドキシルの使用状況、代替薬としてのパクリタキセルの有効性などにつき、合わせてアンケート調査を行った。これは日本におけるはじめての KSHV 関連疾患に関する本格的な診断と治療の全国調査である。4 割の症例でドキシル投与がなされていたが、その効果については 9 割が良好である一方、1 割では不変～無効であり、ドキシル単剤のみで全 KS 症例を完全寛解とすることが困難である現状が明らかになった。駒込病院、大阪医療センターの症例の検討結果は、アンケート調査の結果とほぼ一致しており、今後は、浮腫を伴い急速に進行する皮膚病変、肺病変、喉頭部病変など、カポジ肉腫の重症度を適切に評価して、ART 開始を前提とした化学療法の開始基準を示す指針の作成の必要性が改めて認識された。また、本結果を踏まえ、すでに欧米では KS の治療薬として認可されているパクリタキセルを、早期に日本でも使用できるようにする必要性を提言する。

E. 結論

ワクチン評価系としての細胞間感染実験系の開発に着手した。PEL 細胞の細胞死を誘導する薬剤をいくつか同定した。カポジ肉腫の臨床的解析を行い、治療の指針の推奨案を示した。また、KSHV 感染疾患の全国調査を行い、ドキシルなどの化学療法を必要とする予後不良例が少なからず存在し、死亡率も高い現状が判明した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

研究代表者

片野晴隆

- 1) Yamamoto K, Ishikawa C, Katano H, Yasumoto T, Mori N: Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas, *Cancer Lett* 2011, 300:225-234
- 2) Nakai H, Sugata K, Usui C, Asano Y, Yamakita T, Matsunaga K, Mizokuchi Y, Katano H, Iwatsuki K, Yoshikawa T: A case of erythema multiforme associated with primary epstein-barr virus infection, *Pediatr Dermatol* 2011, 28:23-25
- 3) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, *J Med Virol* 2011, 83:322-330
- 4) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H: Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection, *Front Microbiol* 2011, 2:175
- 5) 大田泰徳、比島恒和、望月 眞、児玉良典、片野晴隆: カレントトピックス エイズ関連リンパ腫の病理診断. *病理と臨床* 2012, 30: 195-203

研究分担者

上田啓次

- 1) Ueda K, Ito E, Karayama M, Ohsaki E, Nakano K, and Watanabe S. Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation. In-Tech Herpesviruses, Magel, D. G. ed., (In press).
- 2) Ueda K, Ohsaki E, Nakano K, and Zheng X. Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis. *Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD)*. (In press).
- 3) Ohsaki E and Ueda K. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency. *Frontiers in Virology*. (In press).
- 4) Nakano K, Katano H, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, and Ueda K. Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* (In press).
- 5) 上田啓次. HHV-8「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集集中）.

藤室雅弘

- 1) Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, Fujimuro M. Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415, 573-578, 2011
- 2) Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S. Regulation of Inducible Nitric-oxide Synthase by the SPRY Domain- and SOCS Box-containing Proteins. *J Biol. Chem.*, 286, 9009-9019, 2011
- 3) Ashizawa A, Higashi C, Masuda k, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The ubiquitin system and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Front. Microbiol.*, In press
- 4) Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The effects of HSP90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, In press

今村顕史

- 1) 今村顕史、柳澤如樹、菅沼明彦、味澤 篤. 「HIV 関連カポジ肉腫の臨床像と治療方針に関する検討」 第 25 回 日本エイズ学会学術集会・総会 東京 2011.11

照屋勝治

なし

上平朝子

- 1) Watanabe D, Taniguchi T, Otani N, Tominari S, Nishida N, Uehira T, Shirasaka T: Immune reconstitution to parvovirus B19 and resolution of anemia in a patient treated with highly active antiretroviral therapy: A case report, *J Infect Chemother* 2011, 17:283-287.
- 2) Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T: Cellulr HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration, *BMC Infect Dis* 2011, 11:146
- 3) Yoshino M, Yagura H, Kushida H, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Taniguchi T, Watanabe D, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T: Assessing recovery of renal function after tenofovird isoproxil fumarate discontinuation, *J Infect Chemother* 2011, in press.
- 4) Watanabe D, Koizumi Y, Yajima K, Uehira T,

Shirasaka T: Diagnosis and Treatment of AIDS-Related Primary Central Nervous Lymphoma, J Blood Disord Transfus 2011, in press.

学会発表は各研究分担者の報告書を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

新規予防薬の開発

研究分担者 片野 晴隆 国立感染症研究所感染病理部 室長
 研究協力者 菅野 隆行、坂本 康太 国立感染症研究所感染病理部
 関塚 剛史、黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

カポジ肉腫の原因ウイルスであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV または HHV-8) 感染症には現在のところ、有効なワクチンは開発されておらず、効率的な感染予防薬も存在しない。KSHV 感染では感染細胞と非感染細胞の細胞同士の接触が重要とされていることから、今年度は KSHV ワクチン評価系としての細胞間感染実験系の開発に着手した。GFP を発現する組換 KSHV 感染細胞と KSHV 非感染細胞と共培養することにより、非感染細胞への感染を確認した。しかし、リンパ球系の細胞への感染効率はきわめて低く、今後の改良が必要である。さらに、近年、KSHV の発癌に重要とされるウイルスがコードする microRNA (miRNA) の発現を次世代シーケンサーにより詳細に解析し、ウイルスがコードする 16 base 程度の非常に短い miRNA が KSHV の各 miRNA 遺伝子から発現していることを明らかにした。今後、この短い miRNA の病因的意義を検討し、治療、感染予防薬の標的となり得るかを検討する。

A. 研究目的

カポジ肉腫の原因ウイルスである human herpesvirus 8 (HHV-8, または Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) はヒトヘルペスウイルスの中でも Epstein-Barr virus (EBV) とともに γ -ヘルペスウイルスに属し、ヒトの発癌に関連するウイルスとして知られる。EBV は成人の 95% 以上が既感染であり、きわめて広範に感染が認められるウイルスであるのに対し、KSHV は日本人健常者における抗体保有率が 1-5% 程度であり、他のヒトヘルペスウイルスと比べると既感染率はきわめて低い。さらに、海外の報告では KSHV の感染率は同性愛男性 (MSM) の間で高いなど、特定の集団に感染者が集中する傾向が見られる。エイズ関連カポジ肉腫が同性愛男性にほぼ限定して発症することから、疾患の発症とウイルスの疫学はある程度相関する。KSHV に対する有効なワクチンや予防薬などが開発されれば、これらの特定の集団に対して予防措置を講じることにより、効率的に予防効果を上げることが可能と考えられるが、残念ながら、現在までに KSHV に対する有効なワクチンや予防薬の開発はなされていない。そればかりか、これまでのところ、動物実験を含めて、具体的なワクチン候補を提示する論文は、われわれが 2010 年に発表した一報しかなく (Sakamoto K,

[Katano H. et al. Vaccine 2010, 28:3325-3332](#))、KSHV ワクチン開発研究は必ずしも盛んな状況とはいえない。その理由として、(1) 欧米では MSM の多くがすでに KSHV に感染しており、カポジ肉腫発症の高いリスクを負っているヒトはすでに KSHV に既感染で、ワクチンは効かないのではないかとの疑問があること、(2) カポジ肉腫ではウイルスの再活性化が起こらず、治療法としてのワクチンの有効性が疑問視されていること、の 2 点がある。しかし、(1) に関しては KSHV の MSM における感染率は欧米でも 25% 程度までであり、残りの 75% 以上の非感染者にはワクチンの有効性を検討する余地がある。(2) に関しては、既感染者に対する治療ワクチンとしてではなく感染予防ワクチンとして KSHV ワクチンを開発する意義はあるものと思われる。

われわれはこれまでに KSHV の粘膜ワクチンの開発を目指し、マウスモデルを用いて、KSHV 接種による宿主の免疫反応を検討し、KSHV の免疫抗原を同定した。KSHV を接種したマウスの血清、あるいは IgA を含む唾液、鼻洗浄液は、少なくとも、*in vitro* における KSHV 感染を抑えることが分かった (上記、Vaccine 2010)。KSHV 感染は主に粘膜感染であることを考えると、粘膜ワクチンは感染防御に有効であると推察される。粘膜を介して感

染した KSHV は主に B 細胞に潜伏感染し、B 細胞から血管内皮細胞へ KSHV が感染することで、カポジ肉腫が発症する。つまり、B 細胞から血管内皮細胞へ KSHV が感染することが必要で、cell to cell の感染が KSHV 感染では重要であることを、われわれは以前から示してきた (Sakurada S, [Katano H](#) et al. J Virol. 2001)。KSHV の体内感染の主体が Cell to cell (細胞間) である以上、cell to cell の感染を抑えるようなワクチン、予防薬の開発が重要となる。しかし、cell to cell の KSHV 感染はその分子メカニズムなどはほとんど解明されておらず、これまでのところ、適切な実験系もない。そこで、ワクチンや予防薬の開発、評価に使えるような KSHV の細胞間感染の実験系を立ち上げることを本年度の研究目的の一つとした。

もう一つの研究目的は KSHV がコードする microRNA(miRNA) の解析である。KSHV には 17 個の miRNA がコードされており、近年、多くの論文で、これらの miRNA が KSHV による発癌、腫瘍化に重要な役割を果たすことが示されている。miRNA は 20mer 程度の短い RNA であり、宿主の mRNA に結合し、転写や翻訳の制御に関わる。われわれは昨年度までに KSHV の miRNA の発現について、KSHV がコードする 17 種類の miRNA のうち、miRK12-3 といわれる miRNA がカポジ肉腫、primary effusion lymphoma などの KSHV 関連疾患で発現が高いことを見だし、その機能解析を行った (投稿準備中)。本年度は次世代シーケンサーを用い、KSHV の miRNA を網羅的に解析し、KSHV 感染における miRNA のプロファイルを明らかにすると共に、感染、発癌に重要な miRNA、miRNA プロファイルの同定を試み、新規治療、感染予防薬の標的となり得るかを検討した。

B. 研究方法

1. 組換えウイルスと感染実験

潜伏感染時に GFP を発現する組換え KSHV をワシントン大学 Dr. Jeffrey Vieira より供与を受け、使用した。組換え KSHV が持続感染した 293 細胞、Vero 細胞は、組換え KSHV を感染させた後に puromycin で選択し、GFP 陽性細胞の比率を高めたもので、90%以上の細胞が GFP 陽性となる。

2. 感染実験

ウイルス感染実験は非感染細胞と上記、組換え KSHV 感染 GFP 陽性細胞を共培養することにより行った。非感染細胞は B 細胞性リンパ腫株 Bjab などを用いた。感染細胞の同定には GFP の発現、お

よび表面抗原の発現をフローサイトメトリー、蛍光顕微鏡などで観察した。

3. Small RNA の抽出

KSHV 持続感染細胞株 TY-1 を TPA で刺激したものと未刺激のものから、High Pure miRNA extraction kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて miRNA を抽出した。

4. 次世代シーケンサーによる small RNA の網羅的解読

イルミナ社の TruSeq small RNA kit により、smallRNA のライブラリー調整を行った後に、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いて miRNA の網羅的解析を行った。解析には CLC Genomics Workbench (CLC bio 社) を用いた。

(倫理面に対する配慮)

遺伝子組換え等の実験に関しては当該研究施設の遺伝子組換え実験倫理委員会の承認を得た上で実験を行った。蛍光色素を発現するウイルスは DNA 組換えウイルスであり、使用に当たり、大臣確認を得た。

C. 研究結果

1. KSHV ワクチン評価系としての細胞間感染実験系の開発

ヒトにおいては KSHV の潜伏感染は主に B 細胞で起きていることから、KS 発症までには、KSHV 感染リンパ球から血管内皮細胞への感染が起こっているものと推察される。その一方で、カポジ肉腫は血管内皮細胞を起源とする KSHV 感染細胞であり、カポジ肉腫細胞から非感染リンパ球への感染が起こることも考えられる。まず、前者について、GFP を発現する組換え KSHV が持続感染したリンパ腫細胞と、接着細胞である HeLa および 293 細胞との共培養を試みた。なお、293 細胞は接着能を高めた 293MSR 細胞を用いた。その結果、共培養開始後 5 日目で、浮遊細胞を洗浄して除去しても、接着細胞側に多くの GFP 陽性細胞が認められた (図 1)。接着細胞から浮遊細胞に KSHV が感染するモデルとして、組換え KSHV が持続感染した 293 細胞、Vero 細胞をウイルス供給細胞とし、パーキットリンパ腫細胞株 Bjab を非感染細胞として共培養した。浮遊細胞を回収し、フローサイトメトリーにより CD45 と GFP が陽性の細胞をカウントしたところ、わずか 0.5% 程度が陽性であった。これらの実験から、Cell to cell の *in vitro* での感染は成立したもの

と考えられるが、ワクチンや感染予防薬の評価系とするにはさらに感染効率の改善が必要と思われる。

2. KSHV の miRNA の解析

KSHV 持続感染細胞 TY-1 から抽出した small RNA の配列を次世代シーケンサーにより解読した。解読した配列を KSHV の遺伝子配列にマッピングしたところ、解読配列は、K12 領域のウイルス miRNA に 100% の相同性をもってマッピングされた。マッピングされた miRNA の配列を詳細に解析したところ、通常の 24 base 程度の miRNA に加えて、通常よりも短い 16 base 程度の長さの miRNA (unusual small RNA, usRNA) が KSHV のほぼすべての miRNA に発現していた。usRNA の発現は miRNA ごとに異なる。例えば、miRK12-3 では usRNA は TPA の刺激により誘導されるが、通常の長さの miRK12-3 は潜伏感染時に多く誘導

され、24 base の miRNA と usRNA で発現が異なった (図 2)。同時に解読したヒトの miRNA には usRNA の産生は見られなかったことから、usRNA の発現はウイルス miRNA に特異的な現象である可能性が示唆された。

D. 考察

ワクチンや新規予防薬の開発には適切な評価系の開発が必須である。KSHV はほとんどヒトにのみ感染するウイルスであり、現在までに、KSHV の動物実験でヒトの疾患、病態を忠実に再現する実験系は存在しない。マーマセットなどでは感染が成立するが、腫瘍形成性など多くの点で、ヒトと異なる。したがって、現時点では、効率のよい *in vitro* の実験系を確立することが、ワクチンなどの評価系開発には最もゴールに近い方法と言える。しかし、これまで行われている *in vitro* の KSHV 感

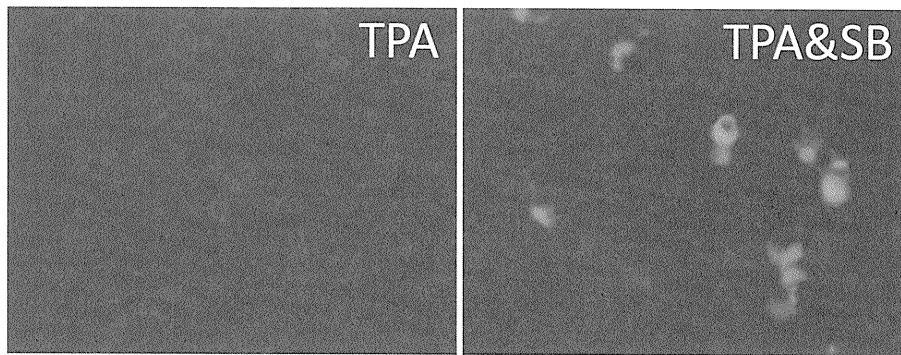


図 1 GFP 発現 KSHV 感染リンパ腫細胞株と 293MSR 細胞との共培養

TPA のみ、または、TPA + sodium Butyrate で刺激した GFP 発現 KSHV 感染リンパ腫細胞株を 293MSR 細胞と共培養し、5 日後に上清を除き、接着細胞を洗浄した。TPA + sodium Butyrate で刺激した GFP 発現 KSHV 感染リンパ腫細胞株と共培養した 293MSR 細胞では細胞質に GFP の発現が認められた (右)。TPA のみの刺激では GFP 陽性細胞は見られない (左)。

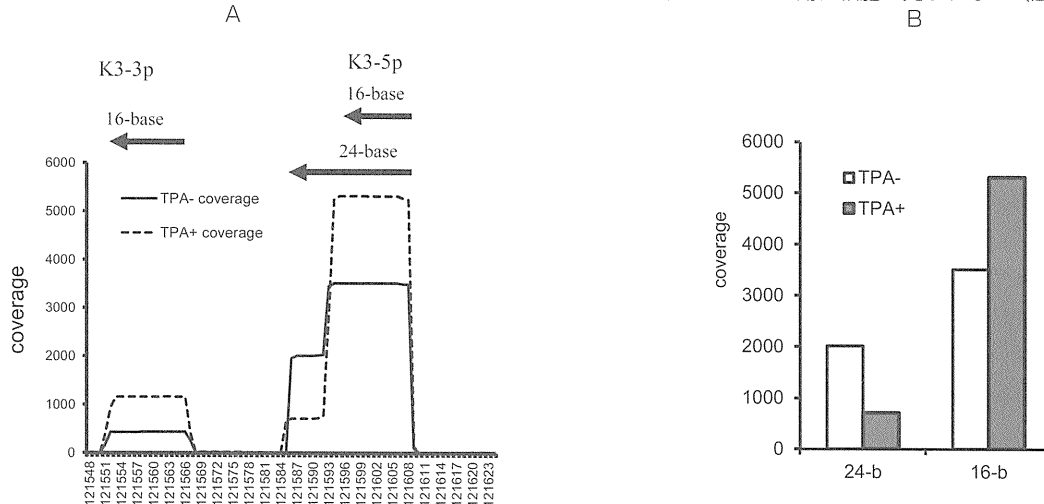


図 2 次世代シーケンサーによる miRK12-3 における 16base の unusually small RNA (usRNA) の発現の解析

(A) miRK12-3 遺伝子領域における coverage. 横軸は miRK12-3 遺伝子領域における KSHV の遺伝子配列上の番号 (NC_003409) を、縦軸に次世代シーケンサーによる解読数 (read 数、coverage) を示す。K3-5p 領域では上矢印に示すとおり、24 base の通常の miRNA に加え、16 base の短い usRNA の発現が見られる。(B) K3-5p 領域における usRNA と 24 base miRNA の発現の比較。usRNA の発現は TPA の刺激により誘導されるが、24 base miRNA は TPA (-) の状態、つまり潜伏感染状態で高い発現が認められる。

染実験は大量のウイルスを cell free で細胞に振りかけ、感染させるものであり、*in vivo* での感染を反映しているものとは言いがたい。KSHV がヒト血液で高コピー数となるのは multicentric Castleman disease などのごく一部の疾患に限られるからである。むしろ、cell free の系よりも、本実験で行った cell to cell の感染実験系がヒトで起こっている感染に近いと推察される。GFP を発現する KSHV の開発により、こうした感染実験における感染細胞の同定が容易になった。293 細胞などへの感染実験は他のグループにより報告があるが、cell to cell での結果はまだ、ほとんど報告がなく、今後、感染効率を上げる条件検討を重ねることで、ワクチンなどの評価に耐えうる実験系の構築を目指したい。

miRNA に関しては、16 base 程度の短い usRNA が、KSHV の多くの miRNA から検出された。usRNA は miR-K1 のみについて、米国のグループから報告があるが、KSHV の他の miRNA が、非常にたくさんの usRNA を発現している点については報告がない。KSHV がコードする miRNA はこれまで、様々な標的分子が同定され、腫瘍発生やウイルス潜伏感染維持に関与するとされてきた。これらの結果は 24 base 程度の完全長の miRNA の作用として解析されたものである。今回の検索結果では KSHV の miRNA は usRNA を含み、miRNA によっては usRNA の発現量が多いことから、これまでの知見も miRNA の作用か、usRNA の作用かを見直す必要がある。また、usRNA の発現はヒト miRNA には見られなかったことから、ウイルス miRNA に特徴的な現象である可能性がある。

E. 結論

KSHV ワクチン評価系としての細胞間感染実験系の開発に着手し、GFP 発現組換 KSHV 産生細胞と非感染細胞との共培養により、効率はよくないものの非感染細胞への感染を確認した。今後効率の改善を行い、ワクチンなどの評価系の確立を目指す。さらに、KSHV の small RNA の解析を行い、16 base 程度の非常に短い miRNA (usRNA) の発現を明らかにした。usRNA の病因的意義が今後の検討課題である。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Yamamoto K, Ishikawa C, Katano H, Yasumoto T, Mori N: Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion

lymphomas, *Cancer Lett* 2011, 300:225-234

- 2) Nakai H, Sugata K, Usui C, Asano Y, Yamakita T, Matsunaga K, Mizokuchi Y, Katano H, Iwatsuki K, Yoshikawa T: A case of erythema multiforme associated with primary epstein-barr virus infection, *Pediatr Dermatol* 2011, 28:23-25
- 3) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, *J Med Virol* 2011, 83:322-330
- 4) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H: Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection, *Front Microbiol* 2011, 2:175
- 5) 大田泰徳、比島恒和、望月 眞、児玉良典、片野晴隆: カレントトピックス エイズ関連リンパ腫の病理診断. *病理と臨床* 2012, 30: 195-203

学会発表

- 1) 片野晴隆、坂本康太、関塚剛史、黒田 誠: KSHV がコードしている 16 base の unusual small RNA の発現 第 8 回 EB ウイルス研究会、大阪 (2011.7)
- 2) 片野晴隆. KSHV 関連疾患の病理とウイルスがコードする miRNA. 第 100 回日本病理学会総会 横浜 (2011.4)
- 3) 片野晴隆、横幕能行、菅野隆行、福本 瞳、中山智之、新ヶ江 章友、杉浦 互、市川誠一、安岡 彰: 日本人 MSM におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8) 抗体保有率について 第 25 回 日本エイズ学会学術集会・総会 東京 (2011.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

KSHV の潜伏感染、再活性化機構と KSHV に起因する病態発症機構の解明

研究分担者 上田 啓次
大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

KSHV の潜伏感染は KSHV 関連疾患の基礎を形作っていると考えられ、その維持機構；潜伏感染複製機構、遺伝子発現制御機構などを解明することは重要である。本機構の解明は溶解複製への相転移機構の解明にも繋がり、癌を中心とした病態発症機構の解明、治療法の開発の基礎となる。我々は、潜伏感染機構の詳細を知るべく、1) 潜伏感染ウイルスゲノム複製における LANA と ori-P の機能関連、2) 潜伏感染におけるウイルス遺伝子発現制御機構、3) KSHV 感染 primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株で発現亢進がみられる宿主遺伝子の発現制御機構、機能について解析を進めている。本年度、特に 1) について成果が得られた。潜伏感染ウイルス因子 LANA が関わる潜伏感染複製において、核マトリックスが複製の場として重要な意義をもつことを示してきた。LANA の C 末側には二量体形成、DNA 結合を介して、潜伏感染複製に関わる領域がある。この部分のみでは核マトリックスへの移行はみられず、複製効率は悪い。本領域と宿主核マトリックス蛋白のハイブリッド蛋白が潜伏感染ウイルスゲノム複製に十分機能することを明らかにし、複製の場としての核マトリックスの重要性を更に示した。

A. 研究目的

KSHV の潜伏感染は KSHV 関連疾患の基礎を形作っていると考えられ、その詳細な機構解明は、溶解複製への相転移機構の解明にも繋がり、癌を中心とした病態発症機構の解明、治療法の開発の基礎となる。

ブリッド蛋白 (Halo-tag NuMA-DBD、Halo-tag DBD-NuMA、Halo-tagDBD、Halo-tag NuMA) を作製した。

- 3) これらの欠失体と細胞内局在を免疫蛍光染色法及び生化学的細胞分画法で検討した。
- 4) また複製能を ori-P プラスミドとの co-transfection により検討した。

B. 研究方法

本年度は、LANA が支配する潜伏感染 KSHV ゲノム複製について、複製の場に関する研究を進めた。

- 1) LANA の細胞内 (特に核内) における局在場所とその決定に関わる機能領域を明らかにするため、LANA の種々の欠失体を作製した (全長 [vFL ; 1-1162aa]、 Δ CBS [108-1162]、 Δ N [275-1162]、DBD [922-1162]、DE/QE [275-981]、DE [275-463]、 Δ C1 [1-1074]、 Δ C2 [1-981]、 Δ C3 [1-464]、 Δ Pst [1-464/498-1162]、N-DBD [1-274/922-1162]) など。
- 2) LANA 欠失体を核マトリックス分画へ移行させるために、宿主核マトリックス因子とのハイ

(倫理面への配慮)

本年度で該当する実験等はないと思われる。

C. 研究結果

- 1) 全長 LANA、 Δ Pst を除いて、核マトリックス分画に局在した変異体はなかった。
- 2) DNA 結合領域が残存していることは不可欠であるが、全体として核マトリックスへの局在と複製能とは強い関連がみられた。
- 3) 宿主核マトリックス因子 NuMA とのハイブリッド LANA (Halo-tag NuMA-DBD、Halo-tag DBD-NuMA) は核マトリックス分画へ移行し、複製能を発揮した。

D. 考察

LANA の核マトリックス移行に必要な十分な領域は明らかではなく、全長として決定される立体構造的なものが関与していると思われる。

LANA の ori-P 結合領域があれば、核マトリックス分画へ移行することで ori-P 依存性の複製能は発揮される。(図参照)

E. 結論

核マトリックスへの局在は LANA が関与する複製機能に必要な十分である。

F. 研究発表

論文発表

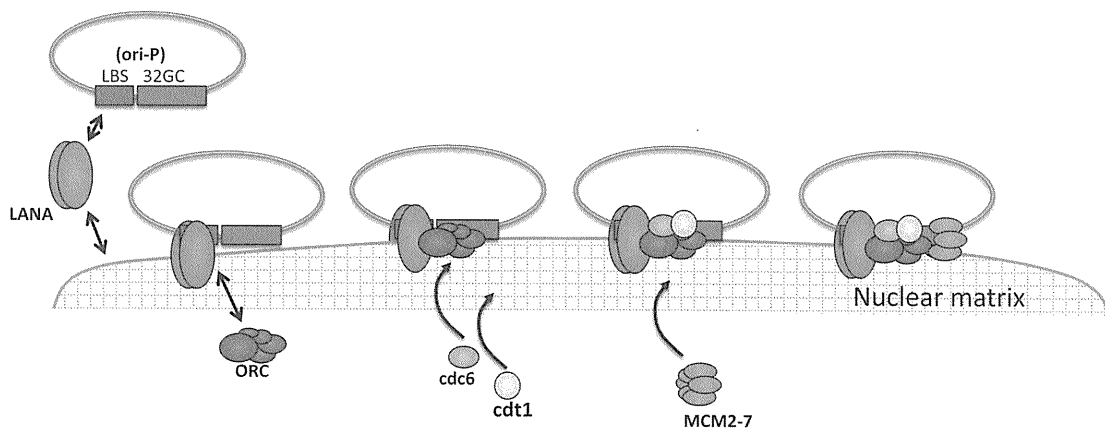
- 1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In-Tech "Herpesviruses", Magel, D. G. ed., in press.
- 2) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). in press.
- 3) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." Frontiers

in Virology. in press.

- 4) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." Virology in press.
- 5) 上田啓次：HHV-8「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編 北海道大学出版会（編集中）

学会発表

- 1) 中野和司、大崎恵理子、上田啓次：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3/LANA2 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が抑制する 第 26 回ヘルペスウイルス研究会 6 月 2 日～4 日 大阪アカデミア 大阪
- 2) 大崎恵理子、中野和司、XinZheng、ZunlinYang、上田啓次：KSHV ゲノム複製における LANA の機能的役割と書く内骨格構造の重要性 第 26 回ヘルペスウイルス研究会 6 月 2 日～4 日 大阪アカデミア 大阪
- 3) 中野和司、大崎恵理子、上田啓次：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が直接結合し抑制する 第 8 回 EBV 研究会 7 月 8 日 大阪大学大学院銀杏会館
- 4) 大崎恵理子、中野和司、XinZheng、ZunlinYang、上田啓次：KSHV LANA と核マトリックス因子 NuMA のキメラ蛋白による ori-P 複製能の検討 第 8 回 EBV 研究会 7 月 8 日 大阪大学大学院銀杏会館



図

新規治療薬の開発

研究分担者 藤室 雅弘
京都薬科大学 細胞生物学 教授

研究要旨

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus:KSHV) は健常者に感染すると深刻な疾患を起こさずに潜伏感染する。しかし、感染者のエイズや免疫抑制剤投薬などの免疫不全時に、KSHV はカポジ肉腫 (KS) や原発性体腔液性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma: PEL) を起こすと考えられている。日本においては、HIV 感染者数や臓器移植件数の増加にともない KSHV 感染症は深刻な問題となると考えられる。そこで、我々は PEL を標的とした抗腫瘍化合物と KSHV の複製阻害活性を有する抗 KSHV 化合物の探索と開発を実施した。その結果、核酸誘導体と PEL 細胞内の NF- κ B シグナル伝達を標的にしたシグナル伝達の阻害化合物は、PEL にアポトーシスを誘導し、さらに、KSHV 複製阻害活性を有することを見いだした。

A. 研究目的

KSHV は、1994 年に Chang らのグループによりエイズに合併したカポジ肉腫より病原因子の本体、すなわち、KSHV が特定された。KSHV は γ -2 ヘルペスウイルス亜科 (rhadinovirus 属) に分類され、8 番目に発見されたヒト・ヘルペスウイルスであることからヒト・ヘルペスウイルス 8 型 (HHV-8) とも呼ばれる。

ヒト体内において、KSHV は B 細胞と血管内皮細胞に潜伏感染することが明らかにされている。しかし、KSHV のヒト初感染時の標的器官や細胞、さらに初感染成立後、どのような機構で B 細胞に再感染するのかが不明である。また、KSHV のトロピズム (細胞指向性) を決定する細胞のウイルスレセプターは明確ではない。しかし、KSHV は他のヘルペスウイルス同様、細胞膜のヘパラン硫酸に親和性を有している。また、KSHV は細胞のインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ や xCT と結合するという報告もある。

KSHV の潜伏感染者の割合は、アフリカでは 50% 以上で、イタリアと北米では 10% 程度、日本国内では 4% 以下と報告されている。KSHV の伝播経路は、唾液や粘膜分泌液を介した経口感染、性交渉等による接触感染、または母子感染が多い。他のヘルペスウイルス同様に、KSHV は健常者に感染しても重篤な疾患を伴わないまま潜伏感染する。KSHV は標的細胞に吸着・侵入後、脱核して

2 本鎖 DNA として感染細胞核内で維持される。KSHV 潜伏感染時、KSHV 遺伝子は両側のターミナルリピートが繋がった環状 2 本鎖 DNA (エピゾーム) として存在し、ウイルスの再活性化により溶解感染 (lytic infection) に移行し、ウイルスの複製を開始する。なお、KSHV のエピゾーム維持にはウイルス蛋白質 LANA (ORF73) が、KSHV の再活性化には転写スイッチ分子である RTA (ORF50) が必須である。

KSHV の潜伏感染は、エイズ関連型の PEL や多発性キャッスルマン病 (Multicentric castleman's disease: MCD) において、極めて高い確率で検出され、それらの発症に深く関与していると考えられている。また、KSHV はエイズ関連、非関連のどちらの KS でも、ほぼ 100% の確率で潜伏感染している。エイズ関連非ホジキンリンパ腫の一つである PEL と、EBV 関連のバーキットリンパ腫や他のエイズ関連非ホジキンリンパ腫とでは、発現する遺伝子パターンが異なる。一方、カポジ肉腫や PEL と比べ、MCD での KSHV 陽性率は低い、エイズ関連型 MCD 発症者では、KSHV が高頻度に検出される。

KSHV の DNA 配列は、発がんウイルスの EBV や herpesvirus saimiri (HVS) と相同性を持っている。KSHV ゲノムは、約 170kbp の遺伝子配列をもち、両側を繰り返し配列 (terminal repeat) に挟まれた約 90 個の ORF (open reading frame) を有している²⁾。

KSHV の ORF は、HVS の ORF との相同性に対応させて ORF4-75 と分類され、また、KSHV に特徴的な ORF は K1-K15 と名付けられている。KSHV は、宿主細胞内で、潜伏感染 (latent infection) と溶解感染 (lytic infection) の 2 種類の感染様式で存在する。KSHV がコードする ORF も、latent 期と lytic 期の発現時期で区別され、潜伏感染期遺伝子 (latent gene) と溶解感染期遺伝子 (lytic gene) に分類されている。他のヘルペスウイルスと同様に、KSHV の lytic gene は、その発現時期によって、前初期 (immediate early: IE)、初期 (early)、後期 (late) 遺伝子に分類されている。また、KSHV ゲノムがコードする遺伝子産物には、細胞増殖亢進、抗アポトーシス、トランスフォーム、免疫回避に関連するものが多数含まれている。また、KSHV は、宿主のシグナル伝達を巧みに利用しウイルスと細胞ゲノムの転写制御を行ない、感染維持や感染細胞の発がん、さらに、ウイルス複製を行なう。

KSHV 関連疾患における化学療法に関しては、KS に対してはドキシソルピシンのリポソーム封入剤 (ドキシル) が用いられ、PEL に対しては CHOP 療法 (アドリマイシン+シクロホスファミド+ビンクリスチン+プレドニゾロン) による化学療法が用いられる。現在における KSHV 関連腫瘍に対する化学療法の問題点として、その副作用や抗がん剤排出ポンプを発現した多剤耐性がん細胞が指摘されている。

これらの現状をふまえ、本研究で KSHV 感染 PEL 細胞に対する抗腫瘍化合物と、KSHV 複製を標的とした抗 KSHV 化合物の探索と作用機序の解析を行った。PEL 細胞に対する抗腫瘍化合物については、PEL 細胞内において NF- κ B シグナル伝達の恒常的活性化が細胞の生存に必要なことから、NF- κ B シグナルを正に制御するプロテアソームと HSP90 (Heat shock protein 90) に着目し、プロテアソーム阻害剤と HSP90 阻害剤、さらに核酸誘導体の PEL 細胞に対する殺細胞活性について検討した。次に抗 KSHV 化合物アッセイのための、リアルタイム PCR を用いた KSHV 定量法を確立し、それを用いて核酸アナログとプロテアソーム阻害剤、HSP90 阻害剤の抗 KSHV 活性を評価した。

- 1) Chang Y, et al., Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi sarcoma. *Science* 266:1865-1869, 1994
- 2) Russo JJ, et al., Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14862-14867, 1996

B. 研究方法

B-1. 細胞培養と生細胞の測定

実験に用いた PEL 細胞株

BC3 : KSHV (+) /EBV(-)

BCBL1 : KSHV (+) /EBV(-)

HBL6 : KSHV (+) /EBV(+)

BC2 : KSHV (+) /EBV(+)

Raji : KSHV (-) /EBV(+)

DG75 : KSHV (-) /EBV(-)

Ramos: KSHV (-) /EBV(-)

上記の細胞は、10% FBS を含む RPMI-1640 で培養した。細胞増殖アッセイには、96-well plat に細胞数 5×10^4 cells/well となるよう細胞を加え、さらに各種化合物をフェノールレッド非含有の RPMI 1640 で希釈し、細胞培養液 100 μ l/well で 24 時間培養を行った。培養後、生存細胞数を測定するため、CCK-8 を添加し呈色反応後に 450 nm における吸光度を測定した。なお、薬物無添加の細胞数を 100% として各濃度の薬物添加 24 時間後の生存腫瘍細胞数の割合を算出した。

B-2. リアルタイム PCR による KSHV の測定

KSHV のゲノム DNA 量は、リアルタイム PCR を用いて測定した。細胞培養用マルチウェルプレート (24 well) に 4×10^5 cells/well の濃度で調製した BC3 細胞培養液 (2 ml) から、培養液の上清 300 μ l を 1.5ml エッペンチューブに回収した。培養液上清を 5 units の DNase I (反応バッファーとして 30 μ l の 10 \times H Buffer を用いた) で 37 $^{\circ}$ C 40 分間処理し、死滅した細胞由来のウイルス DNA を除去した。次に、98 $^{\circ}$ C で 7 分間処理し DNase I を失活させ、8000 rpm で 5 分間遠心した後、さらにその上清 200 μ l を回収した。QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit を用いて、その添付プロトコールに従い上清から KSHV ウイルス DNA を精製し、50 μ l の精製水で溶出した。その後、下記の組成で反応液を調整し、KSHV の ORF50 増幅用のプライマー (H002, H004) を用いてリアルタイム PCR を行った。95 $^{\circ}$ C で 1 分間変性させた後、95 $^{\circ}$ C で 5 秒、62 $^{\circ}$ C で 20 秒の反応を 50 サイクル行い、4 $^{\circ}$ C に冷却した。62 $^{\circ}$ C から 95 $^{\circ}$ C の Melting Curve より、KSHV ウイルス量を算出した。

H002 (ORF50-52-F) : 5'-TTC GTC GGC CTC TCG GAC GAA CTG A-3'

H004 (ORF50-182-R) : 5'-ATA ATC CGA ATG CAC ACA TCT TCC ACC AC-3'

B-3. カスパーゼ活性の測定

細胞数 2×10^5 cells/well の BC3 を各種阻害剤とと

もに 6-well plate を用い 10 % FBS を含む RPMI-1640 で培養した。約 50 % confluent でスタートして 3 時間後と 6 時間後に回収し、カスパーゼ活性測定用 Lysis Buffer に溶解させた。細胞溶解液 13 μ l に Glocaspase3/7substrate (DEVD-luciferin) を等量添加し、37°C で 10 分反応させ発光を測定することで caspase-3/7 のプロテアーゼ活性を解析した。

B-4. ウェスタンブロッティング

15ml 遠心管に BC3 細胞培養液 (4×10^5 cells/ml) を 2ml 加え、約 2 時間培養後、各種薬物を添加した。細胞培養液 2ml を回収し、1200 rpm で 5 分間遠心し PBS で洗浄した。細胞液を 1000rpm で 5 分間遠心した後、PBS を除きその細胞ペレットを回収した。サンプルバッファーを細胞ペレットに添加し細胞サンプルを調製した。SDS-PAGE は Laemmli 法に従って行った。ゲル内のタンパク質をニトロセルロース膜へ転写後、Can Get Signal 中で各種 1 次抗体と 2 次抗体とを反応させた。シグナルの検出は、ECL プライムを用いてルミノ・イメージアナライザー ImageQuant LAS4000 を用いて発光を検出した。

B-5. RT-リアルタイム PCR

2×10^5 cells/ml の濃度で調製した BC3 細胞培養液を 10 ml を回収し、1200 rpm で 5 分間遠心後、PBS で洗浄した。洗浄後の細胞から、illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit を用いて、その添付プロトコールに従い mRNA を回収した。その後 ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いてその添付プロトコールに従い下記の組成で逆転写反応を行った。反応後の cDNA 溶液を精製水で 10 倍希釈し、KSHV の orf50 増幅用のプライマー (Y015、Y016)、orf26 増幅用のプライマー (Y017、Y018) を用いてリアルタイム PCR を行い、発現量を測定した。得られた数値は、 β -actin の発現量 (MR1、MR2 を用いて測定) で補正した。

Y017 (orf26-379-F) 5'- CTC GAA TCC AAC GGA TTT GAC -3'

Y018 (orf26-452-R) 5'- TGC TGC AGA ATA GCG TGC C -3'

MR1 (β -actin-700-F) 5'- TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA -3'

MR2 (β -actin-860-R) 5'- ACG TCA CAC TTC ATG ATG GA -3'

(倫理面への配慮)

今回実施した研究内容は倫理規定に関連するものは含まれていない。

C. 研究結果

C-1. PEL を標的とした抗腫瘍化合物

PEL を含む各 B リンパ腫細胞に対してプロテアソーム阻害剤、HSP90 阻害剤、核酸誘導体の殺細胞活性を測定した。用いた化合物を下記に示した (図 1)。

[プロテアソーム阻害剤]

- 1) MG132 (Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl -L-Leucyl-L-Leucinal)
- 2) PSI (Benzyloxycarbonyl-L-Isoleucyl- γ - τ -Butyl-L-Glutamyl-L-Alanyl-L-Leucinal)
- 3) Lactacystin(N-Acetyl-L-Cysteine,R, 3S,4R)-3-Hydroxy-2-[(1S)-1-Hydroxy-2-Methylpropyl]-4-Methyl-5-Oxo-2-Pyrrolidinecarbonyl]

[HSP90 阻害剤]

- 1) Geldanamycin (GA)
- 2) Tanespimycin (17AAG)
- 3) Radicicol

[核酸誘導体]

- 1) 244-2 2) 189-2 3) 186-a
- 4) 200bc 5) So-01

プロテアソーム阻害剤 MG132、Lactacystin、PSI、さらに、Hsp90 阻害剤 GA、17-AAG、Radicicol はウイルス非感染 B 細胞に比べ PEL 細胞

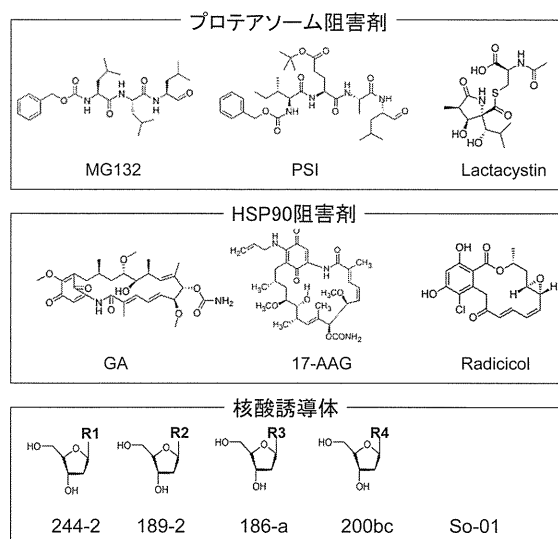


図 1 評価した化合物の構造