

201226010A

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成24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25(2013)年3月

国立感染症研究所感染病理部

平成 24 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 24 年度 総括・分担研究報告書－

研究代表者 片野 晴隆

平成 25(2013) 年 3 月

## 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

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、Zheng Xin

大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学

加藤博史

がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科

永田尚義

国立国際医療研究センター 消化器科

渡邊 大

国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部

矢嶋敬史郎

国立病院機構大阪医療センター 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.....	20
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.....	24
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.....	32
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 医長	
HHV-8 感染症の病態と治療.....	36
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) 病棟医長	
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 科長	
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

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) 関連疾患について、その発症機構の解明、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、さらには、KSHV 感染症の現状把握した上で、治療ガイドラインを作成することで、日本のカポジ肉腫減少を目的とし、研究を行った。今年度の成果として、1. KSHV 細胞間感染実験系を開発し、その感染機構の一部を明らかにするデータを得たこと、2. PEL 細胞の細胞死を誘導する薬剤を同定したこと、3. KSHV 関連疾患の臨床例の検討と症例における抗体検査を行ったこと、4. ドキシル、ART の使用を考慮した KSHV 関連疾患のための「診断と治療の手引き」を作成したことなどがあげられる。感染メカニズムに迫る基礎的研究の成果が得られ、「診断と治療の手引き」は広く患者の利益となることが期待される。

### A. 研究目的

カポジ肉腫はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV, または Human herpesvirus 8, HHV-8) が原因となる悪性腫瘍であり、エイズ患者では同性愛男性 (MSM) にほとんど限定して発症する。KSHV はカポジ肉腫以外にも多巣性キャッスルマン病 (multicentric Castleman's disease, MCD) や一部のリンパ腫にも関連する。日本の新規 HIV 感染者の 7 割が男性同性間の性的接触による感染 (men who sex with men, MSM) であり、この数年で KSHV 関連疾患は増加傾向にあることから、カポジ肉腫への対策は急務である。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る。カポジ肉腫に対する治療は抗レトロウイルス療法 (anti-retroviral therapy, ART) に化学療法 (ドキシル、一般名リポ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、KSHV には有効なワク

チンや確実な発症予測法は開発されていない。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 の開始時期とリポ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、KSHVの感染、発癌機構の解明ではウイルス発癌に共通する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。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た。

## 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結合領域と核マトリックスタンパクとのキメラタンパクを作成し、複製との関連を調査した。すなわち、Haloタグを付加した核マトリックスタンパクNuMAのN末、C末にLANAのori-P結合ドメインDBDを融合したキメラタンパクを作製した。その結果、本来、単独では核マトリックス上に局在しないLANAのori-P結合ドメインのori-Pの複製活性を検出した。このことはLANAが核マトリックスに局在することがKSHV ori-P複製に極めて重要であることを示す。一方、KSHV潜伏感染でAngiopoietin-1 (Ang-1)が高発現することを見出し、その発現制御と生理機能の解析を行った（上田）。

近年、microRNA (miRNA) が多くの発癌に関わっている証拠が示されているが、KSHVには17個のmiRNAがコードされている。そこで、KS, PEL, MCDの臨床検体における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、疾患ごとのウイルスmiRNAの発現を明らかにした。その結果、KSではPELやMCDと異なり、miRK3の発現が最も高いことが明らかになった（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にはヒトの感染を再現する適切な動物モデルが存在しない。そこで、ヒトで起こっているKSHV感染に近い*in vitro*のモデルの開発を模索した結果、昨年度に、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細胞との共培養することで、cell to cellの感染（細胞間感染）の効率のよい感染実験系を確立した。今年度は、この実験系を用い、KSHVのレセプターとして新たに報告のあったEphrinA2が細胞間感染にも関与することを示した。また未刺激のKSHV感染B細胞をHeLa細胞と共培養するとウイルス再活性化スイッチ蛋白RTAが誘導されることも明らかとなった（片野）。

また、PELを標的とした抗腫瘍化合物の探索と開発を昨年度に引き続き、実施した。その結果、核酸誘導体のサンギバマイシンがPEL細胞内のErkシグナル伝達を阻害し、PELにアポトーシスを誘導することを見いだした。また、各種官能基を導入した水溶性フラレン誘導体のPEL細胞株に対する抗腫瘍効果を解析した結果、一部のフラレン誘導体は、KSHV感染PEL細胞株群特異的にCaspase9依存的な細胞増殖抑制効果を示した（藤室）。

### （3）カポジ肉腫・KSHV感染症の現状把握：

ART併用を考慮した化学療法の適応について、ACTGによる病期分類を再検討した。その結果、顔面や四肢に浮腫を伴う集簇した皮膚病変、肺病変や気道病変、広範囲で進行が急速な消化器病変、鼠径部の集簇したリンパ節病変、そして喉頭部の病変などにおいて、化学療法の開始が必要となることがわかった。そして、化学療法の適応はACTGによる病期分類の「免疫機能 (Immune system: I)」や「全身性疾患 (Systemic illness: S)」とは関係なく、「腫瘍 (Tumor: T)」のみによって決定されていること、そのT1に分類される症例であっても、このような重症度の高い状況でなければ、ARTのみで経過観察できる例も多いというこ

とが示唆された。しかし、ART のみで治療を行っている経過中に、免疫再構築症候群として病変が増悪する例もあり、このような場合には化学療法の追加も考慮する必要があると考えられた（**今村**）。

全国の拠点病院を対象としたアンケート調査を実施し、1) KS 患者の 2 割および MCD 患者の 4 割が死亡していること、2) KS では皮膚病変のみならず予後に影響しうる深部臓器病変が多く見られ、特に消化管病変の合併率が 35.4% と高率であることが明らかとなった（**照屋、今村、上平**）。ART にリポゾーマルドキソルピシンを併用しても増悪する難治例においては、パクリタキセルによる治療効果が期待できることも示された（**今村、照屋**）。また、KS の消化管病変の病態に関する ACC の臨床例における解析を行った（**照屋**）。さらに、HIV 感染者における HHV-8 の抗体保有率に関する研究を行った。カポジ肉腫の既往のある 20 症例は全例で HHV-8 抗体を保有していた。カポジ肉腫の既往のない HIV 感染者 80 症例について、血友病 11 例はすべて陰性、残りの 69 例のうち HHV-8 抗体陽性は 18 例（26%）であった。MSM の HIV 感染者で HHV-8 抗体の保有率が決して少なくないことが示された（**上平**）。

#### (4) 治療ガイドラインの作成：

上記アンケート調査等の結果を参考に、感染症科、消化器科、皮膚科、病理などの専門家による、ART の開始時期とドキシルの併用などを考慮に入れた「AIDS に合併するカポジ肉腫等の HHV-8 関連疾患における診断と治療の手引き」の作成を行った（**今村、照屋、上平、片野**）。内容は、HHV-8 のウイルス学（**片野**）、カポジ肉腫の概論、診断、画像所見、治療など（**今村**）、病理所見（**片野**）、皮膚所見（大阪医療センター 皮膚科 小澤健太郎）、内視鏡所見（国立国際医療研究センター 永田尚義）、キャッスルマン病（**照屋**）、原発性滲出性リンパ腫（東京医大 四本美保子、熊本大学 岡田誠治）、HHV-8 関連情報（**上平**）、および、症例アトラスであり、H25 年 3 月に印刷予定である。

#### D. 考察

GFP を用いた KSHV cell to cell 実験系は、現在、適切な動物モデルがない中で、最もヒト感染に近い感染モデルであると考えられる。この系を用いた実験結果から、cell to cell 独自の感染機構があることが示唆された。KSHV 受容体はすでにいくつか同定されているが、さまざまな細胞種に発現し

ているタンパクであり、KSHV の感染細胞種のスペクトルと合致しない。Cell to cell 実験系は、これらの受容体の生体内での役割を明らかにする有力なツールとして期待され、これにより細胞間感染の感染メカニズムを解明する糸口がつかめる可能性がある。また、ワクチン候補である K8.1 分子の感染阻害作用も示され、この系は感染阻害薬のスクリーニングなどにも有効であることが期待される。今年度に新たに抗 PEL 腫瘍活性があると認められたフラレンは炭素原子 60 個がサッカーボール状に結合した分子で、その分子構造は非常に安定で、水や有機溶媒に溶けにくい。そのため、親水性官能基を付加した水溶性フラレンも多数開発され、それらはユニークな薬理活性を持つことから新しい薬物候補として期待されている。本研究により、ピロリジニウム型フラレンは PEL 細胞内のカスパーゼ 9 活性化を惹起することでアポトーシスを誘導することが判明したが、その分子機構は不明のままである。ピロリジニウム型フラレンは細胞内で活性酸素を増産するが、それが PEL 細胞のカスパーゼ活性化に関連している可能性も考えられる。さらに、これらの新規薬剤に関しては動物実験等により、特異性や安全性の評価が課題である。KSHV 感染症におけるウイルス miRNA の動態、Angiopoietin-1 発現との関連は新たな知見であり、潜伏感染維持の機構や発癌機構の解明につながる可能性を持つ。

臨床研究では、昨年度末に実施したアンケート調査から、日本における KSHV 関連疾患の現状が明らかにされた。AIDS に合併したカポジ肉腫においては、ART による改善も期待できることがわかっている。重症例においては化学療法が必要となり、現在は第一選択として pegylated liposomal doxorubicin (PLD) の投与が行われている。PLD が無効の難治例に対しての第二選択としては、パクリタキセル (paclitaxel : PTX) による化学療法が行われることが多い。このように、カポジ肉腫の治療は、ART の進歩と抗腫瘍薬の開発によって大きく変化してきた。化学療法による骨髄抑制は ART 後の免疫回復にも悪影響をもたらす可能性があるため、どの症例に化学療法を行うべきかという判断が重要となってくる。しかし、現時点において化学療法の適応について明確に示すガイドラインは存在しない。このため臨床現場では、しばしば化学療法を開始するかどうかが問題となっていた。また、ACTG による病期分類は、カポジ肉腫の病勢をある程度は示しているものの、今回の調査の結果から、治療方針を決定するのに利用す



るのは困難であることが示唆された。ARTのみで経過観察可能と判断された症例においても、その経過中に免疫再構築症候群として病変が増悪する可能性があるため注意観察が必要である。そして、カポジ肉腫の増悪状況によっては、化学療法の追加も考慮すべきであろう。これらの結果を基に、専門各科により「診断と治療の手引き」が作成された。この「手引き」では、ARTを考慮した化学療法の適応をまとめるとともに、化学療法終了の目安、pegylated liposomal doxorubicin (PLD)が無効の難治例に対しての第二選択として、パクリタキセル (paclitaxel : PTX) による化学療法についても記載した。さらに、診療経験の少ない医師にも参考となるような画像所見 (アトラス) を多く掲載するとともに、皮膚科、消化器科、病理などの観点からも診断のポイントを記載した。ARTを考慮した本手引きは、一定の診断、治療指針を示すものであり、とくに、症例数の少ない臨床医には有用な情報となることが期待される。一方で、アンケート結果や各院の実態調査では、ドキシル抵抗性の難治例が報告されており、これらの症例に関しては今後、詳細に解析をする必要がある。HHV-8の抗体検査、血中HHV-8核酸定量検査は、カポジ肉腫、MCDの発症予知法として、その有用性について、今後、検討を重ねる必要がある。

## E. 結論

KSHV細胞間感染実験系を開発し、細胞間感染のメカニズムに迫った。PEL細胞の細胞死を誘導する薬剤を同定した。KSHV感染疾患の全国調査を行い、実態を把握すると共に、「診断と治療の手引き」を作成した。

## 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) Shimodaira K, Okubo Y, Ochiai E, Nakayama H, Katano H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Nemoto T, Saji T, Kamei K, Shibuya K: Gene expression analysis of a murine model with pulmonary vascular remodeling compared to end-stage IPAH lungs. *Respir Res* 13:103, 2012.

- 2) Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y, Katano H: Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 84:479-486, 2012.
- 3) Nakano K, Katano H, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012.
- 4) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T: Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol* 25:1-13, 2012.
- 5) Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M: Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 5:814-823, 2012.
- 6) Kamiyama T, Ohshima N, Satoh H, Fukumoto H, Katano H, Imakado S: Metachronous merkel cell carcinoma on both cheeks. *Acta Derm Venereol* 92:54-56, 2012.
- 7) Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S: Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB pathway. *Cancer Sci* 103:775-781, 2012.
- 8) Ablordey A, Amisshah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H: Detection of Mycobacterium ulcerans by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1590, 2012.

研究分担者

上田啓次

- 1) Noma S, Ohya-Shimada W, Kanai M, Ueda K, Nakamura T, Funakoshi H. Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Neuroscience Res.* 73(2):115-21.
- 2) Nakano K, Katano H, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel

monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012.

- 3) Ueda K. For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012.
- 4) Ueda K. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded. *J. Blood and Lymph* 2:3, 2012.

#### 藤室雅弘

- 1) Yamanokuchi R, Imada K, Miyazaki M, Kato H, Watanabe T, Fujimuro M, Saeki Y, Yoshinaga S, Terasawa H, Iwasaki N, Rotinsulu H, Losung F, Mangindaan E. P. R, Namikoshi M, Voogd J de Nicole, Yokosawa H, Tsukamoto S. Hyrtioreticulins A-E, Indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme from the marine sponge *Hyrtios reticulatus*. *Bioorg Med Chem*, 20, 4437-4442, 2012
- 2) Nakazawa T, Ohmae T, Fujimuro M, Ito M, Nishinaga T, Iyoda M, Syntheses, molecular structures, and antiviral activities of 1- and 2-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[d][1,2,3]triazol-6(1H)-ones and 1-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[b]pyrrol-8(1H)-one. *Tetrahedron*, 68, 5368-5374, 2012
- 3) Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 725-730, 2012
- 4) Ashizawa A, Higashi C, Masuda K, Ohga R, Taira T and Fujimuro M. The ubiquitin system and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Frontiers in Virology* 3, 66, 2012

#### 今村顕史

- 1) 今村顕史 (HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究班) 抗 HIV 薬の副作用 . 抗 HIV 治療ガイドライン 2012; 68-74.
- 2) 加藤博史、柳沢如樹、菅沼明彦、今村顕史、味沢 篤：難治性エイズ関連カポジ肉腫に対してパクリタキセルが奏効した 1 例 , 感染症誌 86:287-290, 2012

#### 照屋勝治

- 1) Nagata N, Sekine K, Igari T, Hamada Y, Yazaki H, Ohmagari N, Akiyama J, Shimbo T, Teruya K, Oka S, and Uemura N. False-Negative Results of Endoscopic Biopsy in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma in HIV-Infected

Patients. *Pathol Res Int* 2012 (2012), Article ID 854146

- 2) Nagata N, Shimbo T, Yazaki H, Asayama N, Akiyama J, Teruya K, Igari T, Ohmagari N, Oka S, Uemura N. Predictive Clinical Factors in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma and Its Endoscopic Severity. *PLoS ONE* 2012 7(11): e46967.

#### 上平朝子

- 1) Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, Yajima K, Koizumi Y, Otera H, Tominari S, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, and Shirasaka T. Increase in Serum Mitochondrial Creatine Kinase Levels Induced by Tenofovir Administration. *J Infect Chemother* 2012, 18:675-82.
- 2) 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 tenofovir isoproxil fumarate discontinuation, *J Infect Chemother* 2012, 18:169-74.

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 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

GFP 発現組換え KSHV 感染 B 細胞株と HeLa 細胞を接触共培養することで細胞間感染実験系を確立した。この系により、KSHV のレセプターとして新たに報告のあった EphrinA2 が細胞間感染にも関与すること、KSHV 感染 B 細胞では非感染細胞との接触により、ウイルス再活性化が誘導されることを明らかにした。これらの結果は、生体内で KSHV 感染 B 細胞が腫瘍母地である血管内皮細胞に接触することで再活性化が誘導され、細胞間感染により伝播する可能性を示唆している。また、KSHV 関連疾患の病理組織における miRNA の発現を次世代シーケンサーにより検討し、カポジ肉腫と KSHV 関連リンパ増殖性疾患では KSHV がコードする miRNA の発現プロファイルが異なることを明らかにした。ウイルスがコードする miRNA と発癌との関連を考える上で、重要な知見が得られた。

#### A. 研究目的

カポジ肉腫の原因である KSHV は、B 細胞をリザーバーとし、カポジ肉腫以外にも primary effusion lymphoma や multicentric Castleman's disease などのリンパ増殖性疾患とも関与する。KSHV では、いまだに、ヒトにおける初感染時の感染経路、ウイルスの侵入経路が明らかでない。ウイルスのリザーバーが B 細胞であるのに対し、カポジ肉腫は血管内皮由来と考えられており、どのように B 細胞から血管内皮に感染するかなども不明である。KSHV の発癌機構に関しては、さらに謎が多い。Epstein-Barr virus (EBV) やヒトパピローマウイルス (HPV) などの他の発癌ウイルスは、明らかな発癌遺伝子、タンパクをコードしており、これらの遺伝子、タンパクが単独でも完全な形質転換能を持っていることで、その発癌機序の一部が説明されている。しかし、KSHV は、単独で完全な形質転換能を持っているタンパクを保持しておらず、これまで、形質転換能を持つと報告されている KSHV タンパクも、潜伏感染時にはほとんど発現していない。カポジ肉腫では KSHV は潜伏感染状態にあり、LANA などのごく一部のウイルスタンパクのみを発現する。ごくまれに見られる増殖関連タンパクと LANA の協調作用により発癌が促進されると考えられているが、その詳細はいまだに不明である。

本研究では KSHV の感染機構の解明と発癌機構の解明に取り組んだ。ヒトの KSHV 感染を再現する適切な動物疾患モデルは開発されていないことから、感染機構の解明ではワクチン開発を念頭に置き、ヒトにおける感染を mimic するような *in vitro* の実験系の開発を試みた。われわれは既に KSHV 感染 B 細胞株 BCBL-1 と HUVEC 細胞を共培養することで、KSHV の細胞間感染が起こることを示してきた (J Virol 2001, 75:7717-7722)。昨年度は GFP を発現する組換え KSHV 感染 BCBL-1 細胞である BCBL-1/rKSHV.152 (Washington Univ. Dr. Vieira より供与) を用い、細胞間感染を GFP により検出する実験系の開発に着手し、効率は低いながらも GFP で細胞間感染を検出することが可能であることを示した。本年度は、この実験系に改良を加え、細胞間感染メカニズム解明のため、細胞間感染阻害因子の探索のスクリーニングに応用可能なものに仕上げることを目的の一つとした。これまで報告のあった KSHV のレセプターについて無細胞ウイルス感染 (cell-free virus infection) と細胞間感染 (cell-to-cell infection あるいは cell-associated virus infection) の間で違いがあるのかどうか明らかにすることも目的とした。また、KSHV と同じ γ ヘルペス亜科に属する EBV は感染 B 細胞と接着細胞が接触することで再活性化が誘導されることが報告されているが (J Virol 2011, 86:9285)、KSHV

感染 B 細胞において同様の現象が観察されるかどうか検討した。

KSHV による発癌機構の解明では、ウイルスの miRNA に注目した。miRNA は近年、さまざまな癌において、その重要性が指摘されており、ウイルスがコードする miRNA に関しても、宿主側の mRNA の発現、または、タンパク翻訳を抑制することで、発癌に関与する証拠が積み上げられてきている。しかし、これらの研究は KSHV 感染リンパ腫細胞株を用いたものがほとんどで、ヒト検体でのウイルス miRNA の発現を見た研究はほとんどない。そこで、われわれは、次世代シーケンサーを用いて、KSHV 関連疾患の病理組織検体について、その miRNA の発現を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 組換えウイルスと感染細胞

潜伏感染時に GFP を発現する組換え KSHV である rKSHV.152 が感染した BCBL-1 細胞 (BCBL-1/rKSHV.152) をワシントン大学 Dr. Jeffrey Vieira より供与を受け使用した。rKSHV.152 を保持する BCBL-1 細胞は RPMI、HeLa 細胞は DMEM にそれぞれ FBS 10% 添加し培養した。BCBL-1/rKSHV.152 は、G418 100  $\mu\text{g/ml}$  存在下で継代した。

### 2. 細胞間感染実験

細胞間感染実験は BCBL-1/rKSHV.152 を TPA 20  $\text{ng/ml}$  と sodium butyrate 0.3  $\text{mM}$  で 48 時間刺激した後、RPMI 10% FBS で 3 回 wash し、FBS 最終濃度 1% として HeLa 細胞と共培養した (図 1-1)。24 時間後、BCBL-1/rKSHV.152 を除去し、洗浄後、トリプシン処理して細胞を剥がし、コラーゲンコートした glass-bottom 24 well plate あるいは 8 チャンバースライドに播種し直した。48 時間後、パラホルムアルデヒド固定しサンプルとした。LANA (latency-associated nuclear antigen) 染色をするサンプルについては 0.1% Triton-X100 PBS (-) にて膜透過処理を行い、抗 LANA 抗体 (Advanced Biotechnologies 社) を 2000 倍希釈して室温で 1 時間反応させ洗浄後、抗 Rat alexa-568 抗体 (Invitrogen 社) を 2 次抗体として免疫組織化学を行った。核染色を DAPI にて行った後、共焦点顕微鏡 FV-1000 (オリンパス社) を用いて画像を取り込み、Image J ソフトウェアを用いて解析を行った。DAPI による核染色像より全細胞数を、GFP, LANA 陽性細胞は GFP, Alexa568 のそれぞれのシグナル陽性細胞をカウントし陽性細胞の割合を算出した。

### 3. 無細胞ウイルスの調整

BCBL-1/rKSHV.152 を  $5 \times 10^8$  /ml で準備し、TPA 20  $\text{ng/ml}$ , sodium butyrate 0.3  $\text{mM}$  を添加した。1 週間後に上清を回収し 25,000 回転 90 分  $4^\circ\text{C}$  で pellet down し、さらに RPMI 1% FBS を等量添加し、25,000 回転 90 分  $4^\circ\text{C}$  で遠心し、TPA, sodium butyrate を除いた。1/250 volume の RPMI 1% FBS に suspend した後、0.2  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターを用いて濾過し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存したものをウイルス液として用いた。感染実験に使用する際には細胞間感染実験系と同等の感染高率になるように希釈して感染実験を行った。

### 4. 細胞間感染、無細胞ウイルス感染の阻害実験

HeLa 細胞を  $2 \times 10^4$  /well in 24-well plate あるいは、 $1 \times 10^4$  /well in 8-chamber slide に播種した後、24 時間培養し、FBS free DMEM にて 1 回洗浄し、FBS free DMEM にメディアウム置換した。最終濃度が 20  $\mu\text{g/ml}$  になるように抗体、あるいは蛋白を加え  $37^\circ\text{C}$  1 時間インキュベートする。その後刺激した BCBL-1/rKSHV.152 を 10 倍量添加、あるいは無細胞ウイルスを同等の感染効率になるように添加し、抗体、蛋白濃度が 20  $\mu\text{g/ml}$ 、FBS 1% となるように調整し、24 時間共培養を行った (図 1-1)。

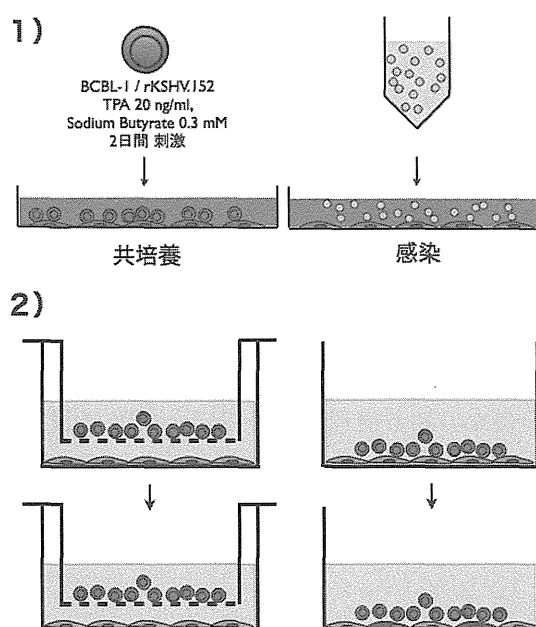


図 1 BCBL-1/rKSHV.152 細胞と HeLa 細胞を用いた細胞間感染実験方法

- 1) 細胞間感染 (左) と無細胞ウイルス感染 (cell-free virus infection) (右)
- 2) Transwell を用いて共培養を行う (左) と直接の接触が妨げられる

## 5. Transwell (Corning 社) を用いた感染阻害実験

底面が 0.2  $\mu\text{m}$  pore membrane のインサートに刺激した BCBL-1/rKSHV.152 を添加し HeLa 細胞と直接接触しない状態で共培養を行い、接触する状態の共培養と比較した (図 1-2)。

## 6. BCBL-1/rKSHV.152 と HeLa 細胞の共培養による RTA 蛋白の誘導

HeLa 細胞を  $1 \times 10^4$  /well in 24-well plate に播種し 24 時間後に  $5 \times 10^5$  /well の BCBL-1/rKSHV.152 を添加した。24, 48, 72 時間後にそれぞれ BCBL-1/rKSHV.152 を回収し 1 回 PBS (-) にて洗浄の後、MACS コートスライドガラスにスポットした。15 分後メタノール固定し抗 RTA 抗体 (大阪大 上田教授より供与) を 3000 倍希釈して室温にて 1 時間反応させた後、抗マウス Alexa-568 抗体を 2 次抗体として免疫組織化学を行った。

## 7. Small RNA の抽出

KSHV 関連疾患のパラフィン切片から、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。

## 8. 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。ヒト病理組織を用いた研究は国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得た (国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学倫理委員会 承認番号 272)。

## C. 研究結果

### 1. 細胞間感染系を用いた KSHV 感染機構の解明

#### (1) Cell free (無細胞) と cell to cell (細胞間) 感染の比較

GFP 発現 KSHV 感染細胞である BCBL-1/

rKSHV.152 と KSHV 非感染 HeLa 細胞を共培養した。Cell free (無細胞) 感染実験系では Transwell を介して、cell to cell (細胞間) 感染では細胞を接触させた状態で感染実験を行った。その結果、0.2  $\mu\text{m}$  pore を介して反応系に拡散すると考えられる無細胞ウイルスの感染に比べて、細胞が直接接触する細胞間感染の効率が非常に高いことが示された (図 2)。また、LANA の免疫染色の結果と GFP の発現結果は、同じ傾向を示し、GFP の発現により、KSHV 感染を検出できることを確認した。

#### (2) 細胞間感染阻害実験

ヘパリンを 166 IU/ml の濃度で反応系に添加すると無細胞ウイルス感染はほとんど阻害されるのに対し、細胞間感染への影響は少なかった。また、最近、新たに報告された KSHV のレセプター EphrinA2 についてポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え蛋白を用いて感染阻害実験を行った。モノクローナル抗体については無細胞ウイルス感染より細胞間感染の阻害効果が強く、EphrinA2 が細胞間感染にも関与していることが示唆された (図 3)。

#### (3) 共培養による RTA 誘導

未刺激の BCBL-1/rKSHV.152 と HeLa 細胞を接触する状態で共培養し 24, 48, 72 時間後にそれぞれ細胞を回収し、再活性化スイッチ蛋白 RTA の発現を免疫組織化学により検討した。その結果、48 時

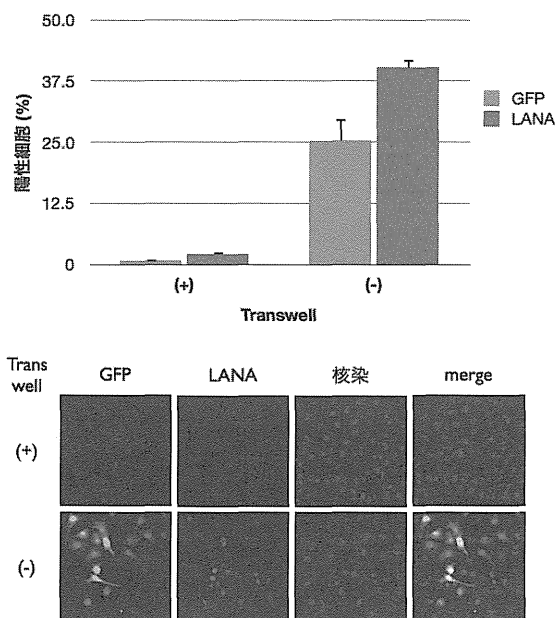


図 2 Cell free (無細胞) と cell to cell (細胞間) 感染の比較  
Transwell に刺激した BCBL-1/rKSHV.152 細胞を入れると HeLa 細胞との直接の接触が阻害され GFP、LANA どちらを指標にしても感染は阻害される

間以降で HeLa 細胞と接触のない群と比較して RTA 陽性細胞の割合が 5 倍程度増加している様子が観察された (図 4)。EBV と同様、KSHV 感染 B 細胞は接着細胞との接触により再活性化している可能性が示唆された。

## 2. KSHV 関連疾患の病理組織における miRNA の発現

カポジ肉腫 8 例、PEL3 例、MCD3 例の病理組織検体につき、miRNA の全シーケンスを解析した。コントロールとして、PEL の細胞株 2 株を用いた。カポジ肉腫と MCD では miRNA 全体の約 6%、PEL では 14% を KSHV の miRNA が占めており、各病変部では KSHV の miRNA が大量に発現していることが分かった。ウイルス miRNA 別の発現を見ると、PEL および MCD の発現プロファイルは近似しており、miRK8 の発現が高いが、カポジ肉腫では miRK3 が最も発現量の多い KSHV miRNA

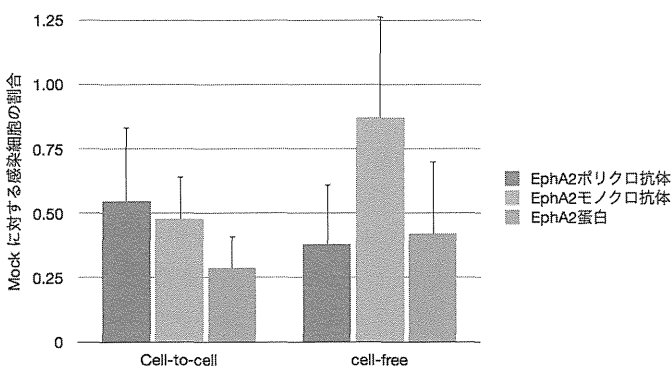


図 3 エフリン A2 抗体、蛋白による感染阻害

新たに報告された KSHV のレセプター エフリン A2 に対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え蛋白を添加したところ、細胞間感染、無細胞ウイルス感染のどちらも阻害された。モノクローナル抗体については細胞間感染の方が強い感染阻害が認められた

であり、miRNA 発現プロファイルは異なっていた (図 5)。これらの miRNA の発現プロファイルをクラスター分析してみると、大まかには疾患ごとに分かれるものの、カポジ肉腫のクラスターに PEL 例が混入するなど、明確なカテゴリー分類はできなかった。しかし、主成分分析ではカポジ肉腫で miRK12-3 が高発現すること、miRK12-8 の発現が抑制されることが示された。

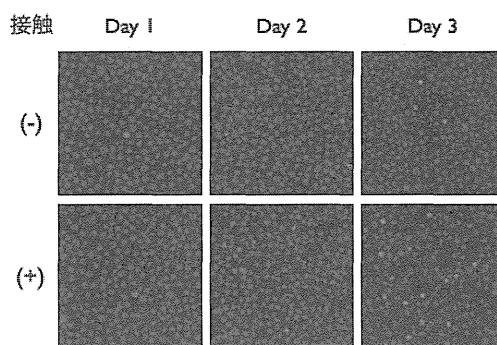
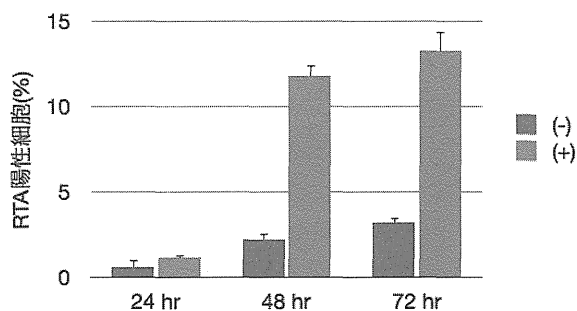


図 4 KSHV の感染 B 細胞と接着細胞の接触による再活性化スイッチ蛋白の誘導

BCBL-1/rKSHV.152 の HeLa との接触による RTA 誘導。1 日目では RTA の発現に差が認められないが、2 日目、3 日目で接触のないサンプルに比べて 5 倍程度の RTA 誘導細胞が認められる

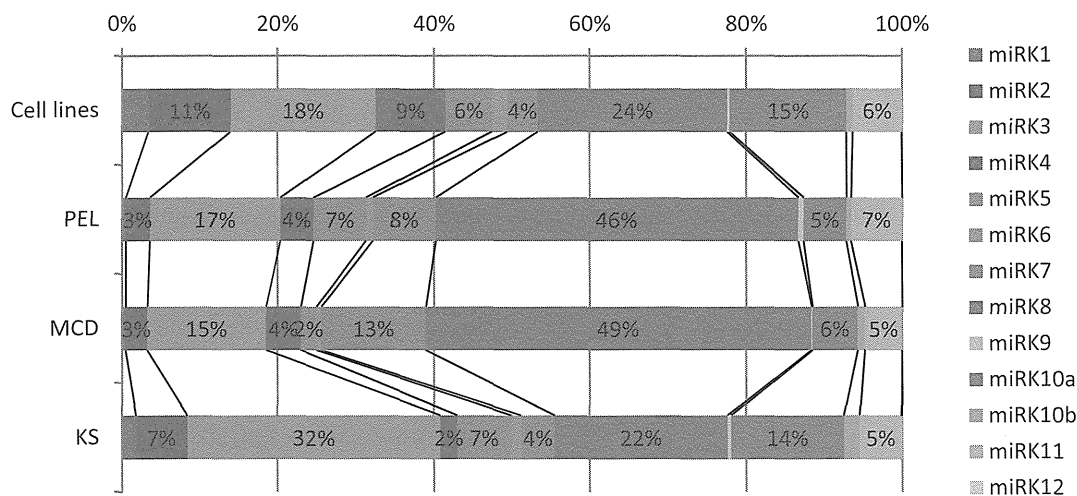


図 5 KSHV 関連疾患におけるウイルス miRNA の発現プロファイル

ウイルス miRNA の発現を次世代シーケンサーのリード数から算出し、全ウイルス miRNA のリード数からその比率を求めた。PEL と MCD は近似した発現プロファイルを示しているが、カポジ肉腫はそれらとは異なる発現プロファイルを示している。いずれも mature な miRNA のみをカウントした

## D. 考察

生体内における感染様式を反映する細胞間感染実験系を確立することを目的とし GFP によって簡便に検出できる実験系を確立することができた。昨年度からの大きな改善点として、細胞間感染の標的細胞を 293MSR 細胞から HeLa 細胞に変更した点が挙げられる。接着能を増強した 293MSR 細胞は 293 細胞と同様、感染効率は高いものの、一度感染すると接着能が弱くなり剥がれやすいという欠点があった。HeLa 細胞は、感染効率は 293 細胞には劣るもののコラーゲンコートした plate を用いれば、接着能がそれほど落ちることなく、感染成立後も張り付いた状態で培養を続けることが可能であった。Transwell を用いた cell to cell と cell free 感染の比較実験は 2001 年に報告した内容と同様の実験であり、GFP 発現 KSHV を用いた実験でも同様の結論を得た。BCBL-1/rKSHV.152 はクローン化したウイルスを保持している訳ではなく、wild type の KSHV も存在するが、LANA の蛍光免疫染色と GFP 発現の結果から、GFP の発現を KSHV 感染の指標として考えてよい。簡便で、迅速に評価が可能な感染実験系が確立できたものと考えられる。

ヘパリンによる感染阻害実験では、無細胞ウイルス感染と細胞間感染の間で明確な違いが存在することを示すことができた。無細胞ウイルス (cell-free virus) は感染の初期段階でウイルス粒子表面の糖タンパクを用いてヘパリン硫酸に接着すると考えられているが細胞間感染の際にはヘパリン硫酸への接着が必要ないと考えられる。また、新しいレセプターとして報告された EphrinA2 が無細胞ウイルス感染と同様に、細胞間感染においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。EphrinA2 に対するモノクローナル抗体により、細胞間感染がより強く阻害されることから KSHV の感染成立の本質的な部分に関与していると考えられ、今後の検討が必要である。

EBV と同様、接着細胞との接触のみで KSHV 再活性化蛋白が誘導されることから、生体内で腫瘍発生母地である血管内皮細胞への感染は、KSHV リザーバー潜伏感染 B 細胞が毛細血管などで血管内皮細胞に接触、再活性化し、細胞間感染が成立している可能性が考えられる。潜伏感染 B 細胞と接着細胞の接触のみで EBV と同様のシグナル活性化が引き起こされるのかどうか、接触に必要な細胞表面分子の探索などが今後の検討課題である。

本年度の細胞間感染実験系の確立、無細胞ウイルス感染との明確な違いの確認、接触による

KSHV 感染 B 細胞の再活性化蛋白の誘導の発見等は、生体内をより再現している細胞間感染のメカニズム解明に大きく寄与するものであり、ワクチン、予防薬開発にも大変有用であると考えられる。

miRNA の研究では、KSHV 感染細胞ではきわめて大量のウイルス miRNA が発現しており、カポジ肉腫ではウイルス miRNA が宿主因子を抑えることでウイルスの潜伏感染に寄与していることが明らかになった。主成分分析によりキーとなる miRNA として明らかになった miRK3 については、これまでのわれわれの研究で、宿主の RapGef2 の発現を抑え、下流の NF- $\kappa$ B 活性化の抑制に関与していることが明らかにされている。カポジ肉腫と KSHV 関連リンパ増殖性疾患ではウイルス miRNA の発現プロファイルが異なることから、両者ではウイルス miRNA の働きが異なることが示唆される。ウイルス miRNA と発癌との直接の関連は今後の研究で解明されることが期待される。

## E. 結論

GFP 組換え KSHV ウイルス感染 B 細胞株を用いた細胞間感染実験系を確立した。ヘパリンによる感染阻害を受けないことから無細胞ウイルス感染と様式が異なることが示された。また最近報告された KSHV レセプター分子 EphrinA2 が細胞間感染にも関与していることが明らかとなった。さらに KSHV 感染 B 細胞と接着細胞とが直接接触することで再活性化スイッチ蛋白である RTA 分子が誘導されることを示した。カポジ肉腫を含む KSHV 関連疾患におけるウイルス miRNA の発現プロファイルを明らかにし、そのキーとなる miRNA を同定した。

## F. 研究発表

### 論文発表

- 1) Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y, Katano H: Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 84:479-486, 2012.
- 2) Nakano K, Katano H, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-



associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012.

- 3) Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M: Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 5:814-823, 2012.
- 4) Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S: Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB pathway. *Cancer Sci* 103:775-781, 2012.
- 5) Ablordey A, Amissah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H: Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1590, 2012.
- 6) 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.
- 7) 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹：病原体の同定．病理解剖マニュアル 病理と臨床 2012, 30: 269-277.
- 8) 片野晴隆：ヒトヘルペスウイルス 8 とカポジ肉腫 感染症 2012, 42: 38-43.

#### 学会発表

- 1) 片野晴隆、比島恒和、佐藤由子、長谷川秀樹：EBV 関連腫瘍における EBV がコードする miRNA の発現 第 101 回日本病理学会総会．東京．2012.4.
- 2) 片野晴隆、坂本康太、関塚 剛、佐藤由子、長谷川秀樹、黒田 誠：KSHV 関連疾患におけるウイルス miRNA の発現 第 9 回 EB ウイルス研究会．鳥取(2012.7)
- 3) Katano H, Sakamoto K, Sekizuka T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M: Expression profiles of KSHV-encoded miRNAs in KSHV-associated diseases 2012 International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, July, 2012
- 4) Sakamoto K, Hishima T, Sato Y, Hasegawa H, Katano H: Expression profiles of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded miRNAs in EBV-associated lymphomas. International Herpesvirus Workshop 2012, August 2012.
- 5) 菅野隆行、長谷川秀樹、片野晴隆：KSHV 細胞間感染のメカニズムの探索 第 60 回日本ウイルス学会学術集会．2012.11.
- 6) 片野晴隆：エイズ剖検例における日和見感染症

と腫瘍の実態 第 26 回日本エイズ学会学術集会総会 横浜 2012.11.

#### 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

研究協力者 大崎恵理子、Zheng Xin 大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学

## 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、その維持機構の詳細を解明することは、関連疾患の発症機構の解明やそれに基づく治療法の開発につながる。本研究では、潜伏感染ウイルスゲノム複製機構、宿主・ウイルス遺伝子発現制御機構などの解明を通して、KSHV 関連癌を中心とした病態発症機構の解明を目指している。平成 24 年度は、I) KSHV 潜伏感染ウイルスゲノム複製におけるウイルス潜伏感染遺伝子 LANA の機能解析—特に LANA の核内における局在の場と複製能との関連、II) KSHV 潜伏感染 primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株で発現亢進する宿主遺伝子、angiopoietin-1 (Angpt-1) の発現制御機構の解明を中心に研究を進めた。

### 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、その維持機構の詳細を解明することは、関連疾患の発症機構の解明やそれに基づく治療法の開発につながる。本研究では、潜伏感染ウイルスゲノム複製機構、宿主・ウイルス遺伝子発現制御機構などの解明を通して、KSHV 関連癌を中心とした病態発症機構の解明を目指す。本年度は、KSHV 潜伏感染複製における複製の問題と複製機構の解明、KSHV 感染 PEL 細胞で発現亢進する Angiopoietin-1 (Ang-1) の発現制御機構の解明に取り組んだ。

### B. 研究方法

#### I) KSHV 潜伏感染ウイルスゲノム複製における

##### ウイルス潜伏感染遺伝子 LANA の機能解析

- 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 の種々の欠失体発現ベクターを作製した（全長 [vFL; 1-1162aa]、 $\Delta$  CBS [108-1162]、 $\Delta$  N [275-1162]、DBD [922-1162]、DE/QE [275-981]、DE [275-463]、 $\Delta$  C1 [1-1074]、 $\Delta$  C2 [1-981]、 $\Delta$  C3 [1-464]、 $\Delta$  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ブリ

- ッド蛋白 (Halo-tag NuMA-DBD、Halo-tag DBD-NuMA、Halo-tag DBD、Halo-tag NuMA) を作製した。
- 3) LANA に存在すると想定される核マトリックス局在シグナル配列を同定する目的で、 $\Delta$  N [275-1162] を核内へ移行させることを意図し、イースト GAL4DNA 結合ドメイン (DBD) との融合体発現ベクター (GAL4DBD・LANA-C) を構築した。
- 4) これらの欠失体、融合体の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。
- 5) また複製能を KSHV 潜伏感染 origin (ori-P) プラスミドとの co-transfection により検討した。

#### II) KSHV 潜伏感染 primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株で発現亢進する宿主遺伝子、angiopoietin-1 (Angpt-1) の発現制御機構の解明

- 1) DNA アレイ解析により KSHV 感染 PEL 細胞株で Angpt-1 遺伝子が発現上昇していることを既に報告しているが、今回は PEL 細胞株培養上清中における Angpt-1 の分泌量を ELISA により測定した。バーキットリンパ腫培養細胞株を中心とした KSHV 非感染細胞株培養上清中の Angpt-1 と比較した。
- 2) Angpt-1cDNA をクローニングし、陽性及び陰性コントロールとして HEK293 と BJAB 細胞株で LacZ・V5・His<sub>6</sub>、Angpt-1・V5・His<sub>6</sub> を発現する細胞株を樹立した。

- 3) Angpt-1 発現制御機構を解明する目的で、Angpt-1 遺伝子発現制御領域約 1kb をクローニングし、luciferase レポーターアッセイ系を構築した。
- 4) 5' から種々の欠失体を作製し、レポーターアッセイにより責任領域の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

現時点では、遺伝子組み換え実験に関する指針に合致した申請・許可のもとに実験を遂行する以外に該当する研究内容はないものと思われる。

C. 研究結果

I) KSHV 潜伏感染ウイルスゲノム複製におけるウイルス潜伏感染遺伝子 LANA の機能解析

- 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) 複製能に関しては、DNA 結合領域が残存していることは不可欠であるが、DNA 結合領域を保持した上で核マトリックスへの局在することが複製活性に重要であることが解った。
- 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。本結果からも、LANA の核マトリックスへの局在が ori-P 複製活性に重要であると思われた (図 1)。
- 4) LANA に存在すると想定される核マトリックス局在シグナル配列を同定する目的で構築した GAL4DBD・LANA-C は核内へは移行しなかった。

II) KSHV 潜伏感染 primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株で発現亢進する宿主遺伝子、angiopoietin-1 (Angpt-1) の発現制御機構の解明

- 1) KSHV 潜伏感染 PEL 細胞株培養上清中には、パーキットリンパ腫培養細胞株の培養上清中に比し、有意に Angpt-1 が上昇していた。
- 2) Angpt-1 発現制御責任領域の同定実験では、転写開始部位から -143 ~ -84bp に重要な cis エlement が存在していると思われた。

D. 考察

I) KSHV 潜伏感染ウイルスゲノム複製におけるウイルス潜伏感染遺伝子 LANA の機能解析

LANA の核マトリックスへの局在が、ori-P 複製能に極めて重要であると思われた。ori-P は LANA の結合領域 (LANA binding sites、LBS) とそれに続く 32bp の GC に富んだ配列 (32GC) からなり、LANA が核マトリックスに局在することで、ori-P を含む KSHV ゲノムも核マトリックスへリクルートされると考えられる。潜伏感染における KSHV ゲノム複製は宿主細胞周期や複製因子に依存しているが、核マトリックスには origin recognition complex (ORC) や Cdt-1、CDC-6、MCM2-7 などの宿主複製因子も局在し、pre-replication complex (pre-RC) を形成し易い場になっているものと想定される。KSHVori-P が LANA の作用でその場にリクルートされ、pre-RC が形成されることで KSHV の潜伏感染複製が遂行されているものと考えられた。

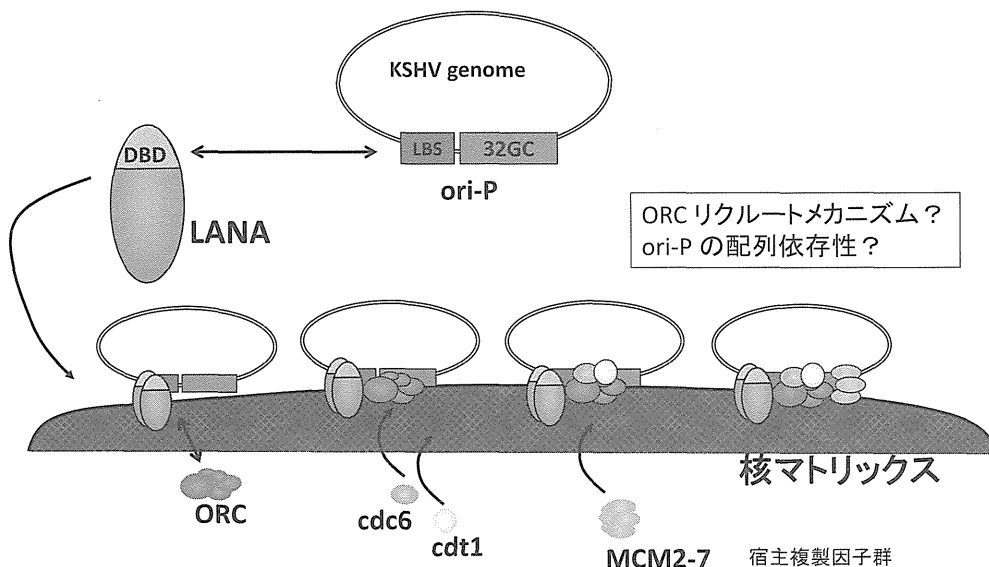


図 1 LANA による ori-P 複製 - 核マトリックス複製場モデル

LANA が核マトリックスへ局在する機構に関しては、本年度の解析では明らかにならなかった。LANA の核移行シグナル (nuclear localization signal、NLS) には一次的に支配している N 末 NLS (N-NLS) と潜在的な DBD 領域に存在している NLS (DBD-NLS) があるが、N-NLS だけでは核マトリックスへは局在しない。結果的にはほぼ全長を保持した構造でないと核マトリックスへの局在はみられないことから、全長 LANA 自体の 3D 構造が核マトリックスへの局在にはたらいっていると考えられた (図 1)。

## II) KSHV 潜伏感染 primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株で発現亢進する宿主遺伝子、angiopoietin-1 (Angpt-1) の発現制御機構の解明

今回の結果から、KSHV 感染 B 細胞から大量の Angpt-1 が分泌されると想定される。Angpt-1 は Tie-2 を受容体としてシグナル伝達依存性に血管新形成や血管リモデリングに寄与している因子であり、AIDS 病態下の多彩な病態形成；サイトカインの分泌、浮腫、CD4T 細胞減少以外の理由による易感染性、カポジ肉腫の発症とその複雑な病態形成などに関与しているものと考えられる。

Angpt-1 の発現制御は転写開始部位から -143 ~ -84bp の領域に重要な制御機構がはたらいしているものと想定され、宿主転写因子やその機能に KSHV の潜伏感染 (KSHV 潜伏感染遺伝子産物を含む) が多大な影響を及ぼしているものと考えられた。

## E. 結論

KSHV 潜伏感染における複製は核マトリックスという場で進行する。

KSHV 潜伏感染で発現亢進する Ang-1 は感染細胞において特殊な制御を受けている (図 2)。

## 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 "Herpesviruses", Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.
- 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). Leukemia Research and Treatment. doi: 10.4061/2011/726964.
- 3) Ohsaki, E. and Ueda, K: Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency. *Frontiers in Virology*. 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007.
- 4) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K: Novel Monoclonal Antibodies for Identification of

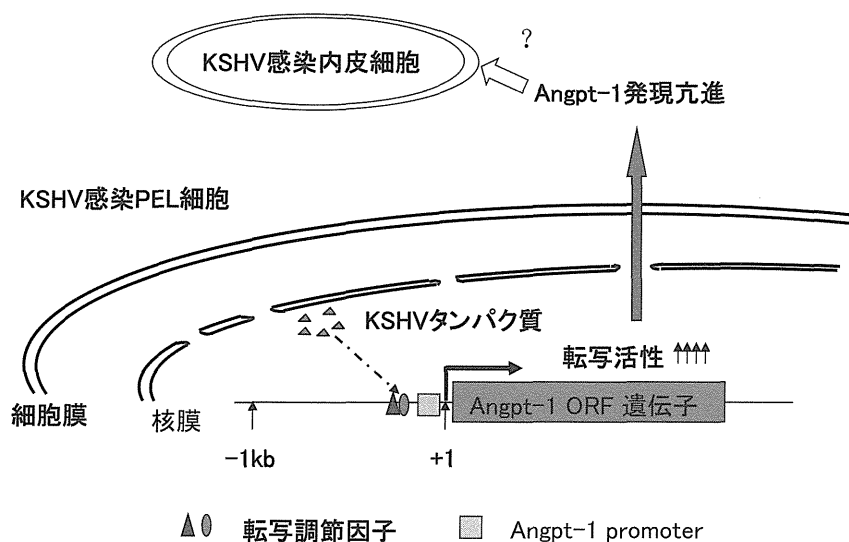


図 2 KSHV 感染 PEL 細胞で発現亢進する Ang-1 とその病態形成における役割