

to induce lytic cycle of the virus (Yoo et al., 2010). Thus, although there is a conflict in KAPO SIN B function in the KSHV latency, a lot of transcripts including T0.7 polyA (-) RNA and k12 mRNA are generated in this region.

## 2.6 KSHV microRNAs

Importantly, the region between ori-LytR and v-flip ORF is the region for the KSHV microRNA cluster and supplies with 17 mature microRNAs that do something in the viral latency (Boss, Plaisance, and Renne, 2009). As the cellular genomes produce various kinds of microRNA, especially DNA viruses also do (Cullen, 2009). Among them, some of them are targeting cellular genes; miR-K12-11 to BACH1, miR-K12-6-3p to THBS1, miR-K12-4-5p to Rbl2 (Lu et al., 2010), miR-K12-6 and miR-K12-11 to MAF (Hansen et al., 2010) and miR-K9 to *rta* to tune lytic reactivation finely (Lin et al., 2011), though their accurate transcription units or mechanisms have not been cleared. From now on, micro deletion mutant viruses in which each microRNA is precisely deleted will be required to understand their real sufficiency and necessity for their function, because gross deletion might have an effect on gene expression program around it.

## 2.7 v-IRF3 (K10.5)

KSHV encodes four genes with homology to human interferon regulatory factors (IRFs) called vIRF-1, -2, -3, -4 whose genes are clustered totally different region far from a *lana* including locus. And interestingly, one of them, vIRF-3 is expressed in the KSHV latency (Fig. 2). vIRF-3 was reported to be required for the survival of KSHV infected PELs (Wies et al., 2008), suggesting that it is a growth promoting factor by disabling type I and II interferon responses (Schmidt, Wies, and Neipel, 2011), PML-mediated transcriptional repression of suvivin (Marcos-Villar et al., 2009), and inhibiting p53 function (Rivas et al., 2001) as well.

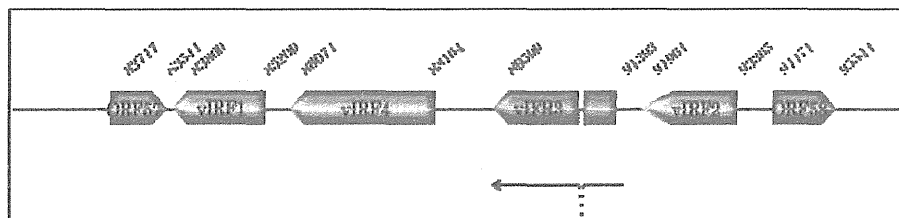


Fig. 2. vIRF region of the KSHV genome

## 2.8 Lytic viral genes and oncogenesis

As mentioned, viral latency genes seems to have pivotal roles for the viral oncogenesis partly because the KSHV related malignancies usually happen in cells with the viral latency. Such genes products, however, do not have immortalizing and/or transforming activity either *in vitro* or *in vivo* except *v-flip* (Ballon et al., 2011). Putative KSHV oncogenes are rather encoded in lytic viral genes. KSHV *k1* and *v-gpcr* (*orf72*) showed real oncogenic activities (Mutlu et al., 2007). Thus, lytic genes should not be forgot and rather KSHV oncogenic activities should be considered on the pathway of reactivation from latency.

### 3. KSHV-associated malignancies

Since KHSV was found, extensive studies were performed to prove the involvement of KSHV in many cancers. Related diseases, however, are confined to a few cancers or cancer-like diseases; KS, MCD, and PEL. The other diseases such as multiple myeloma, sarcoidosis and primary pulmonary hypertension could not be KSHV-associated diseases. The former three diseases are certainly related to KSHV, though not hundred percent. Here, we would like to discuss about two B lymphocyte-originated tumors associated with KSHV infection.

#### 3.1 Multicentric castlemans disease (MCD)

MCD is a disease in which KSHV is involved. But KSHV is not necessarily associated in MCD and KSHV associated MCD is usually seen in AIDS setting (Dupin et al., 1999). KSHV-associated MCD is not associated with Epstein-Barr virus (EBV) (Oksenhendler et al., 1996). In contrast, PEL is usually coinfecting with KSHV and EBV in vivo (Ansari et al., 1996). MCD is a B cell lymphoma morphologically resembling plasmablasts without undergoing a germinal center reaction (Parravicini et al., 2000). It is unclear how this disease is established but a KSHV viral load is a decisive factor for exacerbation of MCD (Grandadam et al., 1997) and thus KSHV should have a role in MCD pathogenesis.

High level interleukin 6 (IL-6) is a well-known fact in MCD and should do something in MCD pathogenesis (Oksenhendler et al., 1996). B cell markers, CD20 and the memory B cell marker CD27 are usually expressed, but B cell activation markers such as CD23, CD38 and CD30 are not. KSHV gene expression profiles are different from those in KS and PEL. It was reported that viral lytic genes; v-IRF-1 and v-IL-6 and ORF59 (a polymerase processivity factor, PF8) as well as a latent gene; LANA were expressed, suggesting that not a few cells in MCD are in the lytic phase.

#### 3.2 Primary effusion lymphoma (PEL)

PEL is a rare B-cell originated lymphoma, most of which are infected with KSHV and usually emerges in patients suffering from acquired immunodeficiency syndrome (Carbone and Gloghini, 2008) by human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. PEL, used to be called body cavity-based lymphoma (BCBL), has been differentiated from the other lymphomas based on a *sine qua non* etiologic agent, KSHV. This rare lymphoma does not form a solid mass and is spreading along the serous membrane as PEL initially rises in one serous cavity such as a pleural cavity and a peritoneal cavity.

Cytologically, it is supposed that the tumor cells are derived from postgerminal center B cells and show a large cell immunoblastic plasmacytoid lymphoma and anaplastic large cell lymphoma and display a non-B, non-T phenotype (Brimo et al., 2007).

70 percent of PEL cases were co-infected with Epstein-Barr virus (EBV) in vivo (Ascoli et al., 1998). However, tightness with KSHV/HHV-8 infection suggests that KSHV/HHV-8 should have an important role for PEL pathogenesis with no doubt, taking into consideration that PEL frequently loses EBV but not KSHV after in vitro establishment of PEL cell lines.

Analyses on gene expression profiles of this rare tumor would give us a lot of information on how PEL was formed (Naranatt et al., 2004; Uetz et al., 2006) and we also analyzed three types of typical lymphocyte-originated tumor cell lines-primary effusion lymphoma (PEL) cell lines, T cell leukemia cell lines (TCL), Burkitt lymphoma (BL) cell lines and two sets of normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)-in order to know how PEL was generated by searching characteristic gene expression profiles (Ueda et al., 2010). As a

result, 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, which could be consistent with the fact that each was originated from different B-cell stages. KSHV seemed to govern the gene expression profile of the co-infected cell line, even though PEL is often co-infected with EBV *in vivo* and there was only one line that was co-infected with both KSHV and EBV. This suggests that existence of KSHV promotes PEL formation but not BL. Gene expression profiles of PEL were also distinct from those of KS, suggesting that cell environment affects a gene expression pattern. These data suggested not only that established typical tumor cell lines showed a distinct gene expression profile but also that this profile may be governed by a certain virus.

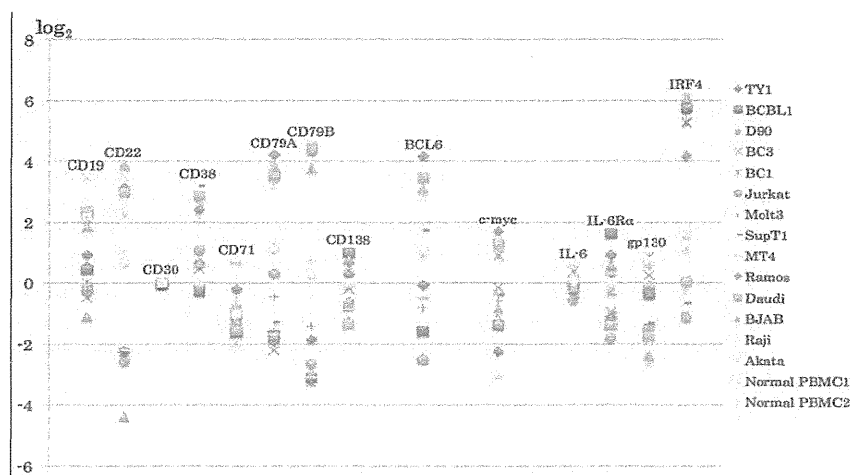


Fig. 3. Typical genes expression levels in PEL, BL and TCL

About sixty genes were prominently expressed in PEL cell lines, including Angiopoietin 1 (Ang-1, NM001146), methyl CpG binding protein 1 (MBD1, NM015845), interleukin 2 receptor  $\beta$  (IL2R $\beta$ , NM000878) and so on, compared with the other cell lines. The Ang-1 receptor, TIE-2 was not increased in PEL cell line, meaning that an autocrine loop could be unlikely but Ang-1 expression might take an effect in the AIDS environment. CD79A, B and BCL6 were remarkably reduced in PEL cell lines as reported (Du et al., 2002). CD138 (syndecan), CD22 and interferon regulatory factor 4 (IRF4) were relatively higher and CD38 and CD71 were lower in PEL cell lines and might reflect the difference between *in vitro* and *in vivo* (Fig. 3). c-myc was certainly higher in BL as BCL6, and IL-6 expression level was not so different but IL-6 receptor genes seemed to be more expressed in PEL and therefore, sensitivity to IL-6 could be higher in PEL.

#### 4. Conclusion

It is very difficult to talking about viral oncogenesis, since we do not have a useful system for observation of the virus infection to pathogenesis, especially for high host-specific viruses. And our DNA array data suggest just that tumor cells show typical gene

expression profiles after establishment of PEL cell lines at an RNA level and it may be very difficult to account for viral pathogenesis only by gene expression profiles. Furthermore, lytic gene expression should be taken into consideration to understand how PEL is formed and thus, it would be meaningful to find what kinds of gene were typically induced in lytic induction and for much better understanding, convenient viral infection to oncogenesis models in which we can observe continuously.

## 5. Acknowledgement

We thank all Lab members to prepare this manuscript. We here apologize that we just list a very limited reference and could not take many references to show the facts obtained by researchers due to a limited space.

## 6. References

- Ansari, M. Q., Dawson, D. B., Nador, R., Rutherford, C., Schneider, N. R., Latimer, M. J., Picker, L., Knowles, D. M., and McKenna, R. W. (1996). Primary body cavity-based AIDS-related lymphomas. *Am J Clin Pathol* 105(2), 221-9.
- Ascoli, V., Mastroianni, C. M., Galati, V., Sirianni, M. C., Fruscalzo, A., Pistilli, A., and Lo Coco, F. (1998). Primary effusion lymphoma containing human herpesvirus 8 DNA in two AIDS patients with Kaposi's sarcoma. *Haematologica* 83(1), 8-12.
- Ballestas, M. E., Chatis, P. A., and Kaye, K. M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284(5414), 641-4.
- Ballon, G., Chen, K., Perez, R., Tam, W., and Cesarman, E. (2011). Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV) vFLIP oncoprotein induces B cell transdifferentiation and tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 121(3), 1141-53.
- Barbera, A. J., Chodaparambil, J. V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J. C., Luger, K., and Kaye, K. M. (2006). The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311(5762), 856-61.
- Boss, I. W., Plaisance, K. B., and Renne, R. (2009). Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* 17(12), 544-53.
- Brimo, F., Michel, R. P., Khetani, K., and Auger, M. (2007). Primary effusion lymphoma: a series of 4 cases and review of the literature with emphasis on cytomorphologic and immunocytochemical differential diagnosis. *Cancer* 111(4), 224-33.
- Carbone, A., and Ghossein, A. (2008). KSHV/HHV8-associated lymphomas. *Br J Haematol* 140(1), 13-24.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M., and Moore, P. S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266(5192), 1865-9.
- Chen, J., Ueda, K., Sakakibara, S., Okuno, T., Parravicini, C., Corbellino, M., and Yamanishi, K. (2001). Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7), 4119-24.
- Chen, L., and Lagunoff, M. (2005). Establishment and maintenance of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in B cells. *J Virol* 79(22), 14383-91.
- Cullen, B. R. (2009). Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* 457(7228), 421-5.

- de Oliveira, D. E., Ballon, G., and Cesarman, E. (2010). NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol* 18(6), 248-57.
- Du, M. Q., Diss, T. C., Liu, H., Ye, H., Hamoudi, R. A., Cabecadas, J., Dong, H. Y., Harris, N. L., Chan, J. K., Rees, J. W., Dogan, A., and Isaacson, P. G. (2002). KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder. *Blood* 100(9), 3415-8.
- Friborg, J., Jr., Kong, W., Hottiger, M. O., and Nabel, G. J. (1999). p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402(6764), 889-94.
- Garber, A. C., Hu, J., and Renne, R. (2002). 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(30), 27401-11.
- Garrigues, H. J., Rubinchikova, Y. E., Dipersio, C. M., and Rose, T. M. (2008). Integrin alphaVbeta3 Binds to the RGD motif of glycoprotein B of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and functions as an RGD-dependent entry receptor. *J Virol* 82(3), 1570-80.
- Godden-Kent, D., Talbot, S. J., Boshoff, C., Chang, Y., Moore, P., Weiss, R. A., and Mittnacht, S. (1997). The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol* 71(6), 4193-8.
- Grandadam, M., Dupin, N., Calvez, V., Gorin, I., Blum, L., Kernbaum, S., Sicard, D., Buisson, Y., Agut, H., Escande, J. P., and Huraux, J. M. (1997). Exacerbations of clinical symptoms in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with multicentric Castleman's disease are associated with a high increase in Kaposi's sarcoma herpesvirus DNA load in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 175(5), 1198-201.
- Guasparri, I., Keller, S. A., and Cesarman, E. (2004). KSHV vFLIP is essential for the survival of infected lymphoma cells. *J Exp Med* 199(7), 993-1003.
- Han, S. J., Hu, J., Pierce, B., Weng, Z., and Renne, R. (2010). Mutational analysis of the latency-associated nuclear antigen DNA-binding domain of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals structural conservation among gammaherpesvirus origin-binding proteins. *J Gen Virol* 91(Pt 9), 2203-15.
- Hansen, A., Henderson, S., Lagos, D., Nikitenko, L., Coulter, E., Roberts, S., Gratrix, F., Plaisance, K., Renne, R., Bower, M., Kellam, P., and Boshoff, C. (2010). KSHV-encoded miRNAs target MAF to induce endothelial cell reprogramming. *Genes Dev* 24(2), 195-205.
- Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tyring, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A., and Seeber, S. (2002a). Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2(5), 281-92.
- Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tyring, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A., and Seeber, S. (2002b). Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis* 2(6), 344-52.
- Hu, J., and Renne, R. (2005). Characterization of the minimal replicator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent origin. *J Virol* 79(4), 2637-42.
- Jarviluoma, A., Koopal, S., Rasanen, S., Makela, T. P., and Ojala, P. M. (2004). KSHV viral cyclin binds to p27KIP1 in primary effusion lymphomas. *Blood* 104(10), 3349-54.
- Keller, S. A., Schattner, E. J., and Cesarman, E. (2000). Inhibition of NF-kappaB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 96(7), 2537-42.

- Klein, U., Gloghini, A., Gaidano, G., Chadburn, A., Cesarman, E., Dalla-Favera, R., and Carbone, A. (2003). Gene expression profile analysis of AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL) suggests a plasmablastic derivation and identifies PEL-specific transcripts. *Blood* 101(10), 4115-21.
- Koopal, S., Furuholm, J. H., Jarviluoma, A., Jaamaa, S., Pyakurel, P., Pussinen, C., Wirzenius, M., Biberfeld, P., Alitalo, K., Laiho, M., and Ojala, P. M. (2007). Viral oncogene-induced DNA damage response is activated in Kaposi sarcoma tumorigenesis. *PLoS Pathog* 3(9), 1348-60.
- Lagunoff, M., Bechtel, J., Venetsanakos, E., Roy, A. M., Abbey, N., Herndier, B., McMahon, M., and Ganem, D. (2002). De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured endothelial cells. *J Virol* 76(5), 2440-8.
- Laman, H., Coverley, D., Krude, T., Laskey, R., and Jones, N. (2001). Viral cyclin-cyclin-dependent kinase 6 complexes initiate nuclear DNA replication. *Mol Cell Biol* 21(2), 624-35.
- Lee, J. S., Li, Q., Lee, J. Y., Lee, S. H., Jeong, J. H., Lee, H. R., Chang, H., Zhou, F. C., Gao, S. J., Liang, C., and Jung, J. U. (2009). FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 11(11), 1355-62.
- Li, H., Komatsu, T., Dezube, B. J., and Kaye, K. M. (2002). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K12 transcript from a primary effusion lymphoma contains complex repeat elements, is spliced, and initiates from a novel promoter. *J Virol* 76(23), 11880-8.
- Li, M., Lee, H., Yoon, D. W., Albrecht, J. C., Fleckenstein, B., Neipel, F., and Jung, J. U. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* 71(3), 1984-91.
- Lin, X., Liang, D., He, Z., Deng, Q., Robertson, E. S., and Lan, K. (2011). miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA. *PLoS One* 6(1), e16224.
- Liu, J., Martin, H., Shamay, M., Woodard, C., Tang, Q. Q., and Hayward, S. D. (2007). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA protein downregulates nuclear glycogen synthase kinase 3 activity and consequently blocks differentiation. *J Virol* 81(9), 4722-31.
- Lu, F., Stedman, W., Yousef, M., Renne, R., and Lieberman, P. M. (2010). Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency by virus-encoded microRNAs that target Rta and the cellular Rbl2-DNMT pathway. *J Virol* 84(6), 2697-706.
- Lukac, D. M., Renne, R., Kirshner, J. R., and Ganem, D. (1998). Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology* 252(2), 304-12.
- Mann, D. J., Child, E. S., Swanton, C., Laman, H., and Jones, N. (1999). Modulation of p27(Kip1) levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Embo J* 18(3), 654-63.
- Marcos-Villar, L., Lopitz-Otsoa, F., Gallego, P., Munoz-Fontela, C., Gonzalez-Santamaria, J., Campagna, M., Shou-Jiang, G., Rodriguez, M. S., and Rivas, C. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein LANA2 disrupts PML oncogenic domains and inhibits PML-mediated transcriptional repression of the survivin gene. *J Virol* 83(17), 8849-58.
- McCormick, C., and Ganem, D. (2005). The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* 307(5710), 739-41.

- Moore, P. S., Gao, S. J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D. M., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J., and Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 70(1), 549-58.
- Mutlu, A. D., Cavallin, L. E., Vincent, L., Chiozzini, C., Eroles, P., Duran, E. M., Asgari, Z., Hooper, A. T., La Perle, K. M., Hilsher, C., Gao, S. J., Dittmer, D. P., Raffii, S., and Mesri, E. A. (2007). In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. *Cancer Cell* 11(3), 245-58.
- Naranatt, P. P., Krishnan, H. H., Svojanovsky, S. R., Bloomer, C., Mathur, S., and Chandran, B. (2004). Host gene induction and transcriptional reprogramming in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8)-infected endothelial, fibroblast, and B cells: insights into modulation events early during infection. *Cancer Res* 64(1), 72-84.
- Oksenhendler, E., Duarte, M., Soulier, J., Cacoub, P., Welker, Y., Cadranet, J., Cazals-Hatem, D., Autran, B., Clauvel, J. P., and Raphael, M. (1996). Multicentric Castleman's disease in HIV infection: a clinical and pathological study of 20 patients. *AIDS* 10(1), 61-7.
- Parravicini, C., Chandran, B., Corbellino, M., Berti, E., Paulli, M., Moore, P. S., and Chang, Y. (2000). Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol* 156(3), 743-9.
- Paulose-Murphy, M., Ha, N. K., Xiang, C., Chen, Y., Gillim, L., Yarchoan, R., Meltzer, P., Bittner, M., Trent, J., and Zeichner, S. (2001). Transcription program of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J Virol* 75(10), 4843-53.
- Rivas, C., Thlick, A. E., Parravicini, C., Moore, P. S., and Chang, Y. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol* 75(1), 429-38.
- Russo, J. J., Bohenzky, R. A., Chien, M. C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J. P., Peruzzi, D., Edelman, I. S., Chang, Y., and Moore, P. S. (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25), 14862-7.
- Sadler, R., Wu, L., Forghani, B., Renne, R., Zhong, W., Herndier, B., and Ganem, D. (1999). A complex translational program generates multiple novel proteins from the latently expressed kaposin (K12) locus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 73(7), 5722-30.
- Sakakibara, S., Ueda, K., Chen, J., Okuno, T., and Yamanishi, K. (2001). Octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression. *J Virol* 75(15), 6894-900.
- Sakakibara, S., Ueda, K., Nishimura, K., Do, E., Ohsaki, E., Okuno, T., and Yamanishi, K. (2004). 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(14), 7299-310.
- Schmidt, K., Wies, E., and Neipel, F. (2011). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 3 Inhibits IFN $\gamma$  and MHC II Expression. *J Virol*.
- Stedman, W., Deng, Z., Lu, F., and Lieberman, P. M. (2004). ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. *J Virol* 78(22), 12566-75.
- Sun, R., Lin, S. F., Gradoville, L., Yuan, Y., Zhu, F., and Miller, G. (1998). A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18), 10866-71.

- Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. (2010). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53. *Biochem Biophys Res Commun* 403(2), 194-7.
- Swanton, C., Mann, D. J., Fleckenstein, B., Neipel, F., Peters, G., and Jones, N. (1997). Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* 390(6656), 184-7.
- Toth, Z., Maglinte, D. T., Lee, S. H., Lee, H. R., Wong, L. Y., Brulois, K. F., Lee, S., Buckley, J. D., Laird, P. W., Marquez, V. E., and Jung, J. U. (2010). Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes. *PLoS Pathog* 6(7), e1001013.
- Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. (2010). KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile. *Biochem Biophys Res Commun* 394(3), 482-7.
- Ueda, K., Sakakibara, S., Ohsaki, E., and Yada, K. (2006). Lack of a mechanism for faithful partition and maintenance of the KSHV genome. *Virus Res* 122(1-2), 85-94.
- Uetz, P., Dong, Y. A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., Rajagopala, S. V., Roupelieva, M., Rose, D., Fossum, E., and Haas, J. (2006). Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* 311(5758), 239-42.
- Verma, S. C., Choudhuri, T., Kaul, R., and Robertson, E. S. (2006). Latency-associated nuclear antigen (LANA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with origin recognition complexes at the LANA binding sequence within the terminal repeats. *J Virol* 80(5), 2243-56.
- Wies, E., Mori, Y., Hahn, A., Kremmer, E., Sturzl, M., Fleckenstein, B., and Neipel, F. (2008). The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 111(1), 320-7.
- Xiao, B., Verma, S. C., Cai, Q., Kaul, R., Lu, J., Saha, A., and Robertson, E. S. (2010). Bub1 and CENP-F can contribute to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome persistence by targeting LANA to kinetochores. *J Virol* 84(19), 9718-32.
- Ye, F. C., Zhou, F. C., Xie, J. P., Kang, T., Greene, W., Kuhne, K., Lei, X. F., Li, Q. H., and Gao, S. J. (2008). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent gene vFLIP inhibits viral lytic replication through NF-kappaB-mediated suppression of the AP-1 pathway: a novel mechanism of virus control of latency. *J Virol* 82(9), 4235-49.
- Yoo, J., Kang, J., Lee, H. N., Aguilar, B., Kafka, D., Lee, S., Choi, I., Lee, J., Ramu, S., Haas, J., Koh, C. J., and Hong, Y. K. (2010). Kaposin-B enhances the PROX1 mRNA stability during lymphatic reprogramming of vascular endothelial cells by Kaposi's sarcoma herpes virus. *PLoS Pathog* 6(8).



## ウイルス肝炎のすべて

### Ⅲ 血液感染するウイルス肝炎

#### 1. B型肝炎

##### (1) B型肝炎のウイルス学

上田 啓次\*

1960年代にBlumbergがオーストラリア抗原と肝炎との関連を示してから半世紀が迫ろうとしている。この抗原こそがB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)の遺伝子産物であった。分子生物学の発展とともに、HBVの塩基配列の決定、遺伝子同定、遺伝子機能の解析は進み、ワクチンの開発にも成功した。しかしながら、簡便な感染系が存在しないことからHBVのウイルス学はまったく進展しておらず、HBVの真のライフサイクルのみならず、急性あるいは慢性肝炎、肝硬変、肝がんといった深刻な病態の発症機構は不明な点が多い。問題解決にはHBV感染受容体を分離・同定し、確固とした、かつ簡便な感染系を樹立することが不可欠である。ウイルス学最大の難問を解決する糸口を模索する。

Key Words : hepatitis B virus, HBV, 逆転写, 感染受容体, 感染系

#### I はじめに

Blumbergが白血病患者血清中に新規の抗原(オーストラリア抗原)を発見し報告したのは1965年<sup>1)</sup>、その後、数年で輸血後の血清肝炎との関連が確立された<sup>2)</sup>。この感染性因子がB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)である。わが国では大河内らが最初に、日本人における本抗原の保有率を報告している<sup>3)</sup>。疾患概念の確立は、慢性B型肝炎から肝硬変、肝がんへの病態進行や母体からの垂

直感染の存在を明らかにした。

1970年代後半～80年代前半にかけて、分子生物学的研究手法の確立と相まって、次々とウイルスゲノムのクローニングと塩基配列が決定され、げっ歯類のウッドチャック(woodchuck hepatitis virus: WHV)や地リス(ground squirrel hepatitis virus: GSHV)、鳥類ではアヒル(duck hepatitis B virus: DHBV)や鷺(heron hepatitis B virus)にも同族のウイルスが存在することが明らかにされた。哺乳類では類人猿であるチ

#### Virology of the hepatitis B virus

\*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

## III 血液感染するウイルス肝炎

ンパンジー (chimpanzee hepatitis B virus) やオランウータン (orangutan hepatitis B virus) などにも同様のヘパドナウイルスが蔓延していることが知られている<sup>4) 5)</sup>。

また、HBV は従来、サブタイプとして adr, adw, ayw のように分類されていたが、最近ではゲノタイプ A ~ H として分類されている<sup>4)</sup>。

ヘパドナウイルスの特徴は、ゲノムサイズがきわめて小さく、およそ 3.2kb 前後の部分的 2 本鎖の環状 DNA ウイルスであること、遺伝子は大まかに言って、コア遺伝子、pol 遺伝子、S 遺伝子と X 遺伝子のたった 4 つである (鳥類のヘパドナウイルスには X 遺伝子は存在しないとされている) ことや、DNA ウイルスでありながら複製に逆転写過程が存在することである<sup>4) 5)</sup>。

分子生物学的手法により各遺伝子の機能や複製機構、組み込み体の解析から肝がん発生との関連が研究されてきた。しかしながら、ヘパドナウイルス学を論じる上で解決されていない決定的な問題が 2 つあり、その問題が解決されない限り、ヘパドナウイルスの真のウイルス学、病態論やウイルスの本質に則した治療法の開発はないものと考えている。その問題点とは、有用かつ簡便な感染系が存在しないこと、ヘパドナウイルス複製酵素 pol の *in vitro* アッセイ系が存在しないことである。

本稿では HBV を概説した後、前述の解決されない主要 2 問題について概説したい。

## II HBV 粒子構造, ゲノム, 遺伝子, 転写産物

HBV の感染性粒子は Dane 粒子と呼ばれる膜粒子とその内部のコア粒子 (キャプシド) で構成され、キャプシド内にウイルスゲノムを内在する (図 1 A)。前述のごとく、HBV のゲノムはきわめてコンパクトに組織されてい

る。また、単純な 2 本鎖 DNA ゲノムではなく、部分的に 2 本鎖の環状 DNA である。さらに、 $\ominus$ 鎖 DNA の 5' 端に末端タンパクが付着し、 $\oplus$ 鎖 DNA の 5' にはプライマー RNA がついているという独特の構造をしている (図 1 B)。また、レトロウイルスゲノム末端の非翻訳領域 (untranslated region : UTR) に機能的に相同と考えられる direct repeat 1 および 2 (DR1, DR2) 配列がある。DR1 はプレゲノム RNA の 5' に、3' には DR2 および DR1 が存在している<sup>4)</sup>。

このきわめてコンパクトなゲノムにウイルスとしての営みに必要な最小限の遺伝子がコードされている。それらの遺伝子は、コア (C)、pol、S と X 遺伝子の 4 つである。コア遺伝子と S 遺伝子は読み取り枠の違いにより、コア遺伝子は preC-C と C の 2 つに、また、S 遺伝子は large S (LS)、middle S (MS)、small S (SS) の 3 つに分けられる (図 1)。

## III preC-C (プレコア-コア) 遺伝子

ウイルスのキャプシド形成にかかわる構造遺伝子産物を供給する。2 つの in-frame 翻訳コドンにより、preC (29 アミノ酸 (aa))-C (185aa) の読み取り枠となるか、C のみの読み取り枠となるかが決定される。PreC-C あるいは C 遺伝子に固有の転写産物はないが、preC-C の読み取り枠になるには preC-C 翻訳開始コドン ATG より上流から転写が開始される必要がある。また、C の翻訳にかかわる転写産物は、いわゆるプレゲノム RNA と考えられる (図 2 A)。

PreC-C 産物は N 末に疎水性アミノ酸配列からなる分泌シグナルがあり、また、C 末のアルギニンに富む領域の前で切断されて HBe 抗原として分泌される<sup>4)</sup>。HBe 抗原産生のウイルスにとっての生理的な意義はよくわからないが、C 遺伝子産物とほとんどオー

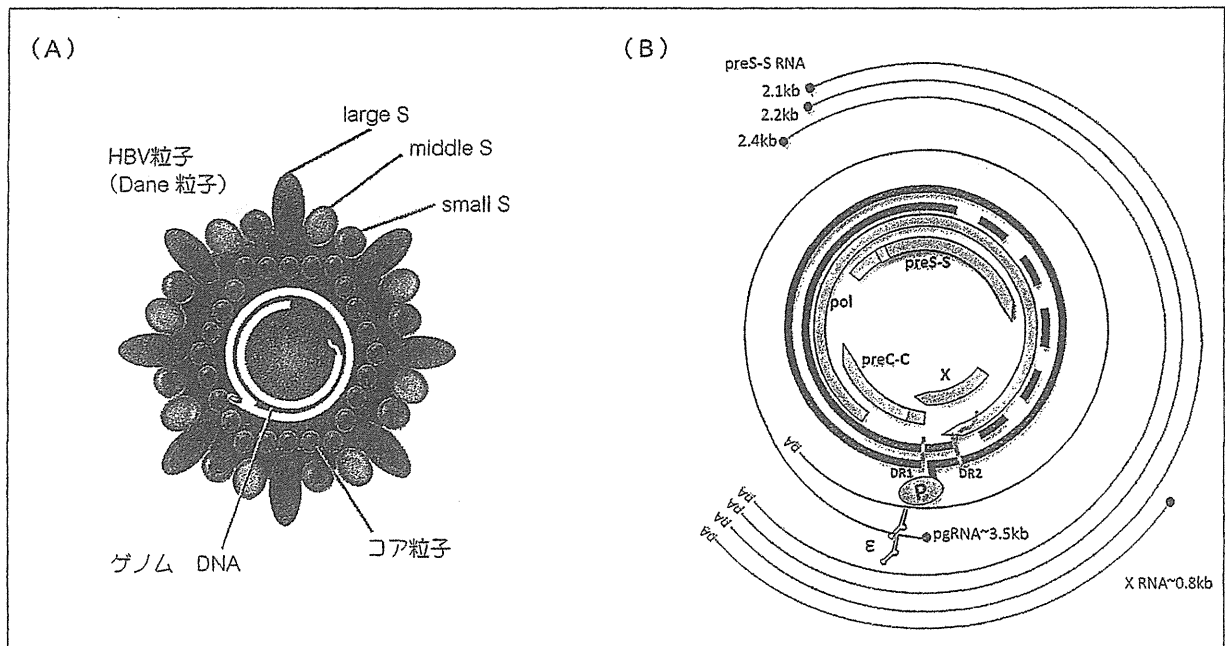


図1 HBV粒子とゲノム構造

(A) HBVの感染性粒子構造。HBVは部分2重鎖DNA環状構造をもつゲノムを内在するコア粒子(キャプシド)と、それを被う外膜構造をもつ。外膜は、LS, MS, SSで構成される。(B) HBVゲノム(太い実線、部分2重鎖は破線)の構造、関連転写産物(外枠: 細い実線)、遺伝子(タンパク読み取り枠)(内側: ブロック矢印)を示す。ゲノムは⊖鎖5'に末端タンパク(P)(HBV pol)が付着している。複製に重要なDR(direct repeat) I, DR2の位置が示されている。転写産物の5'はcap構造を取り(●)ポリAで終わる。3.5kb mRNAは正確にはpreC-C産生にかかわるpreC ATGを含むものと、含まないプレゲノムRNA(pgRNA)に分けられる。pgRNAについてのみ、εの位置、構造を示してある。preS-S産生にかかわるmRNAは、2.4kb(LS), 2.2kb(MS), 2.1kb(SS)である。また、0.8kb mRNAはX遺伝子固有のmRNAである。

HBV: B型肝炎ウイルス

(文献4より)

オーバーラップしていることから、キャリア化や慢性肝炎化などの持続性HBV感染に起因している可能性があると思われる。

血中HBe抗原の量はHBV慢性肝炎の活動性ともよく関連し、HBV増殖状況をよく反映している。HBe抗原陰性化とHBe抗体の陽性化というseroconversionにpreC領域内の終始コドンへの変異をともなうことが知られており、これにともない、肝炎も鎮静化することが多い<sup>6)</sup>。

C遺伝子産物はHBVのコア粒子形成に不可欠なタンパク因子である。2量体が集合して最終的なコア粒子を形成すると考えられている。単一構成因子であるため、T(T; triangulation number) = 1のもっとも単純な正二十面体キャプシドを形成すると予測され

るが、cryoelectronmicroscopyによる粒子結晶構造解析ではT = 3~4で、約180~240分子からなる正二十面体構造をとっていることがわかっている<sup>7)</sup>。

コア粒子の形成過程でパッケージングシグナルεを介してプレゲノムRNAが粒子に取り込まれ、あるいはコアタンパクの分子集合に付随しつつ、プレゲノムRNAから逆転写により⊖鎖DNA合成、そして⊕鎖DNA合成が進行するものと考えられる<sup>8)</sup>。コアタンパクが核内に存在することは報告されているが、コア粒子そのものがどこで形成され、どのような過程で膜粒子に取込まれるかなど、ウイルス粒子形成のダイナミックな分子集合プロセスには不明な点が多い。

III 血液感染するウイルス肝炎

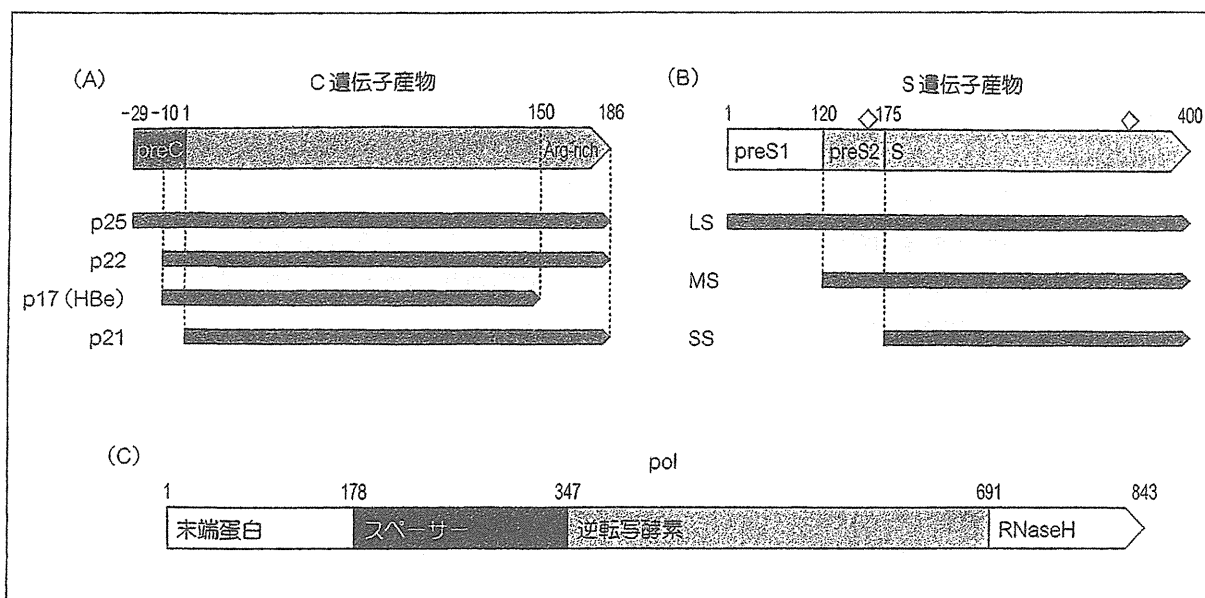


図2 コア(C), S, polの産物と機能領域

(A) C遺伝子産物。読み取り枠は preC-C と C の2つであるが、実際発現されるタンパクは最低4種類あると考えられている。p25 は preC-C の前駆体として発現し、N 端の分泌シグナル (-29 ~ -9aa) (p22) と 150aa 以降のアルギニンに富む領域がプロセスされて p17 として分泌される。コア粒子の産生には p21 がかわると考えられる。(B) S 遺伝子産物。SS 部分を共通として preS2 が加わった MS, さらに preS1 が加わった LS が産生される。preS2 と SS の C 端の◇は糖鎖付加部分を示す。(C) HBV pol タンパクの機能構造。N 端からタンパクプライミング逆転写にかかわる末端タンパク, 機能領域を連結させるスペーサー, 酵素活性を担う逆転写酵素領域, RNA 分解反応にかかわる RNaseH 領域からなる。

(文献5より)

IV pol

HBVゲノム複製の根幹的役割を果たす因子である。845aa 前後からなり、末端タンパク領域, tethering 領域 (もしくは spacer 領域), 逆転写酵素活性領域, RNaseH 領域という各ドメインから構成されると考えられる (図2B)。前述のコアタンパクにはレトロウイルスの gag-pol 融合タンパクのようにプロテアーゼの活性を担う領域はなく、HBV pol がプロセスを受けて各ドメインに分解され、機能を発揮する可能性はないと考えられる<sup>5) 9)</sup>。

HBVは逆転写過程をもつDNAウイルスであり、逆転写過程をもつRNAウイルスであるレトロウイルスの生活環と根本的な違いが

ある。すなわち、レトロウイルスは感染後、細胞内侵入後に逆転写過程が始まり、最終的には2本鎖DNAとなり宿主染色体に組み込まれ、遺伝子発現、複製過程が進行する。

一方、HBVでは感染後、転写産物として合成されたプレゲノムRNAを鋳型に粒子形成過程で逆転写が進行する。また、HBVの生活環には宿主染色体に組み込まれる過程は本質的にはない (感染肝細胞の増殖過程で非特異的に組み込みが起こることは知られており、初期段階ではレトロウイルスゲノムの末端部位のLTR [long terminal region] に相当するDR [direct repeat] が5', 3'の両端に位置するほぼ完全な形で頻りに組み込みが起こることが知られている)<sup>10)</sup>。

LTR (long terminal region) DR (direct repeat)

### V preS-S 遺伝子産物

HBV 粒子外殻を構成する膜タンパクである。Small S (SS もしくは HBs) を共通部分として、preS1 (108 ~ 120aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると large S (LS, 389 ~ 401aa), preS2 (55aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると middle S (MS), SS (226aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると SS が産生される (図 2C)。これらの違いは転写の開始がどこから始まるかで決定されたと考えられているが、SS をコードする転写産物が圧倒的に多い。SS にはそれ自体で粒子形成・分泌能があり、感染能をもつ Dane 粒子に比し約 1,000 倍の量で SS 粒子 (もしくは HBs 粒子) として大量に分泌される。

Dane 粒子の形成には SS に加え、LS が必要であり、コア粒子を内包する過程で粒子サイズや機能の点からも重要な役割を担っていると思われる。MS は Dane 粒子形成に必ずしも必要ではないと思われるが、分泌を促進する過程で機能していると考えられ、やはり、LS, MS, SS の量比は Dane 粒子形成を促進するか、subviral 粒子としてのみ分泌されるかの点で鍵になっているものと考えられる<sup>11) 12)</sup>。

### VI X 遺伝子産物

HBV ゲノムの塩基配列が決定されたとき、機能未知の翻訳読み取り枠 (ORF: open reading frame) として同定された。約 0.8kb の固有の転写産物から翻訳されると考えられる (図 1B) 細胞内シグナル伝達や、ウイルス宿主遺伝子の転写活性を修飾する機能が数々報告されている。こういった機能面での重要ポイントは、DHBV には X 遺伝子が存在せず、DHBV 感染アヒルでは肝がんが発症しない点に着目した X 遺伝子機能と肝がんとの関連である。実際、HBV X トランスジェニッ

クマウスで肝発がんが促進される<sup>13)</sup>。哺乳類へパドナウイルスでは感染能に影響を与えるとの報告もあるが、感染そのものに影響があるのか、転写活性化に原因があるのかなど不明な点も多い。

X タンパクはさまざまな機能をもつが、培養細胞を用いた大量かつ一過性発現系から得られたものである<sup>14)</sup>。X タンパクは哺乳類細胞系でも難溶性であり、実際の生活環の中でどの程度発現し、その発現程度に見合った機能は何なのか、また、大量に発現される事態があるとする、それは一体どういう局面なのか、実際何が起こるのか、疑問は尽きない。

### VII HBV の生活環 (図 3) と複製 (図 4)

HBV の生活環はおもに、DHBV の初代培養肝細胞感染系や個体レベルでの感染系を用いた解析で一般的には次のように考えられている<sup>5)</sup>。

まず、細胞表面の特異的感染受容体を介して付着・侵入し、感染を成立させる。HBV のゲノムは前述のごとく、⊖鎖 DNA の 5' に末端タンパク (pol) が共有結合しているが、これが取り除かれ、また、末端タンパク付着部位近傍の重複配列部分もトリミングされる。⊕鎖 DNA の RNA プライマーも取り除かれ、完全長が複製される。最終的にはギャップはすべて埋め尽くされ結合されて、プラスミド型の環状 2 本鎖 DNA (covalently closed circular DNA: cccDNA) となる。この過程に HBV pol が必要かどうかはまだ議論のあるところである。

cccDNA はエピゲノムとなり、HBV 関連 mRNA (3.5kb mRNA: プレゲノム RNA [C, pol], preC- プレゲノム RNA [preC-C, pol?], 2.4kb mRNA [LS], 2.2kb mRNA [MS], 2.1kb mRNA [SS], 0.8kb mRNA [X]) が転写される (図 1B, 3)。この他にも、

III 血液感染するウイルス肝炎

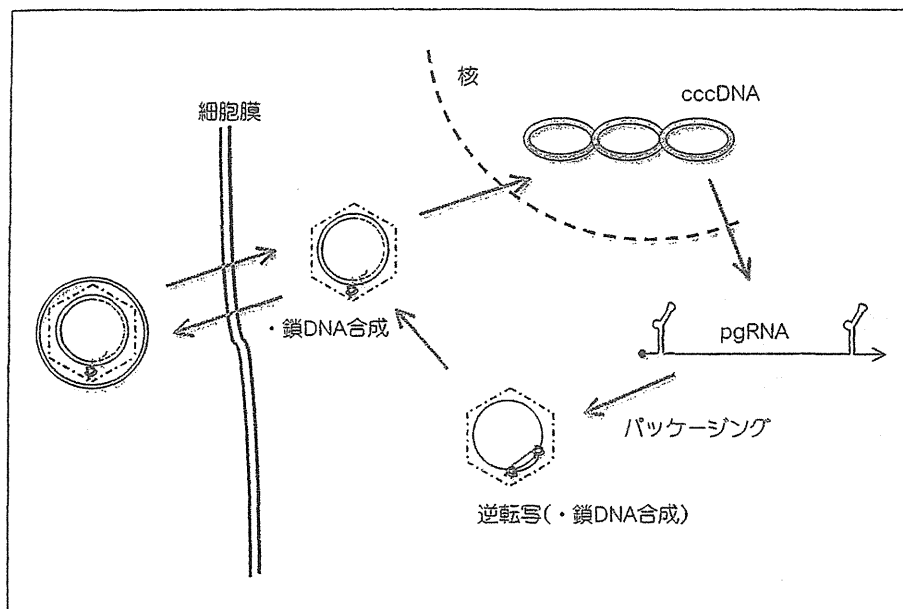


図3 HBVの生活環

HBVの生活環の概略を示した。HBV感染粒子は想定される受容体に結合後、細胞膜上もしくはエンドゾームで膜融合を起こし、コア粒子が細胞質へ取り込まれる。コア粒子は核へ移送されると仮定されているが、このプロセスでゲノムDNAのギャップは埋められ、末端タンパクは取り外されて、核内ではプラスミド型の閉環状cccDNAとなる。このエピゾームは被転写競合型であり、HBV関連転写物が発現される。ゲノム合成に供与されるRNAはpgRNAであり、コア粒子のアセンブリーと共役して、パッケージング、逆転写反応が進行する。分泌された感染性HBV粒子のゲノムは完全なHBVゲノム構造をとっており、⊕鎖DNA合成は膜粒子に取り込まれるまでに完了していると考えられている。

HBV：B型肝炎ウイルス

(文献9より改変)

C遺伝子の後半からpreSにかけてスプライスされた2.3kb前後のmRNA(機能不明)も産生される<sup>15)</sup>。これらのmRNAはすべて⊕鎖極性をもつもので、⊖鎖極性をもつ転写産物は基本的には知られていない。プレゲノムRNAはゲノムサイズより長く、5'と3'が重複配列になっていることが特徴であり、また、逆転写複製に不可欠である。

プレゲノムRNAから翻訳されたpolはプレゲノムRNAのパッケージングシグナルεに結合し、タンパクプライミングによって⊖鎖DNAの合成を開始する(HBVの場合は63番目のチロシンからチミンが合成開始の発端になる)(図4A)。εからDR1、5'の配列はプレゲノムRNAの3'にも存在するため、こ

こまで合成された⊖鎖DNAはプレゲノムRNA3'と同様の相補的な配列に転座して、さらに、5'までの両端の重複した完全長の⊖鎖DNAを完成する。プレゲノムRNA自体は⊖鎖DNA合成が進むに連れてpol自身のRNaseH活性により分解されるが、5'のDR1を含む短い配列部分が最終的に⊖鎖DNAのDR2に相補的に結合することが⊕鎖DNAのプライミングになる。⊖鎖DNAの5'のDR1辺りまで合成された⊕鎖DNAは3'のDR1に転座して、さらに⊕鎖DNA合成を進める。この⊕鎖DNA合成はS遺伝子ORFとX遺伝子のORF辺りで停止している。粒子内での基質が枯渇してくることが理由のひとつかもしれない<sup>9)</sup>(図4B)。

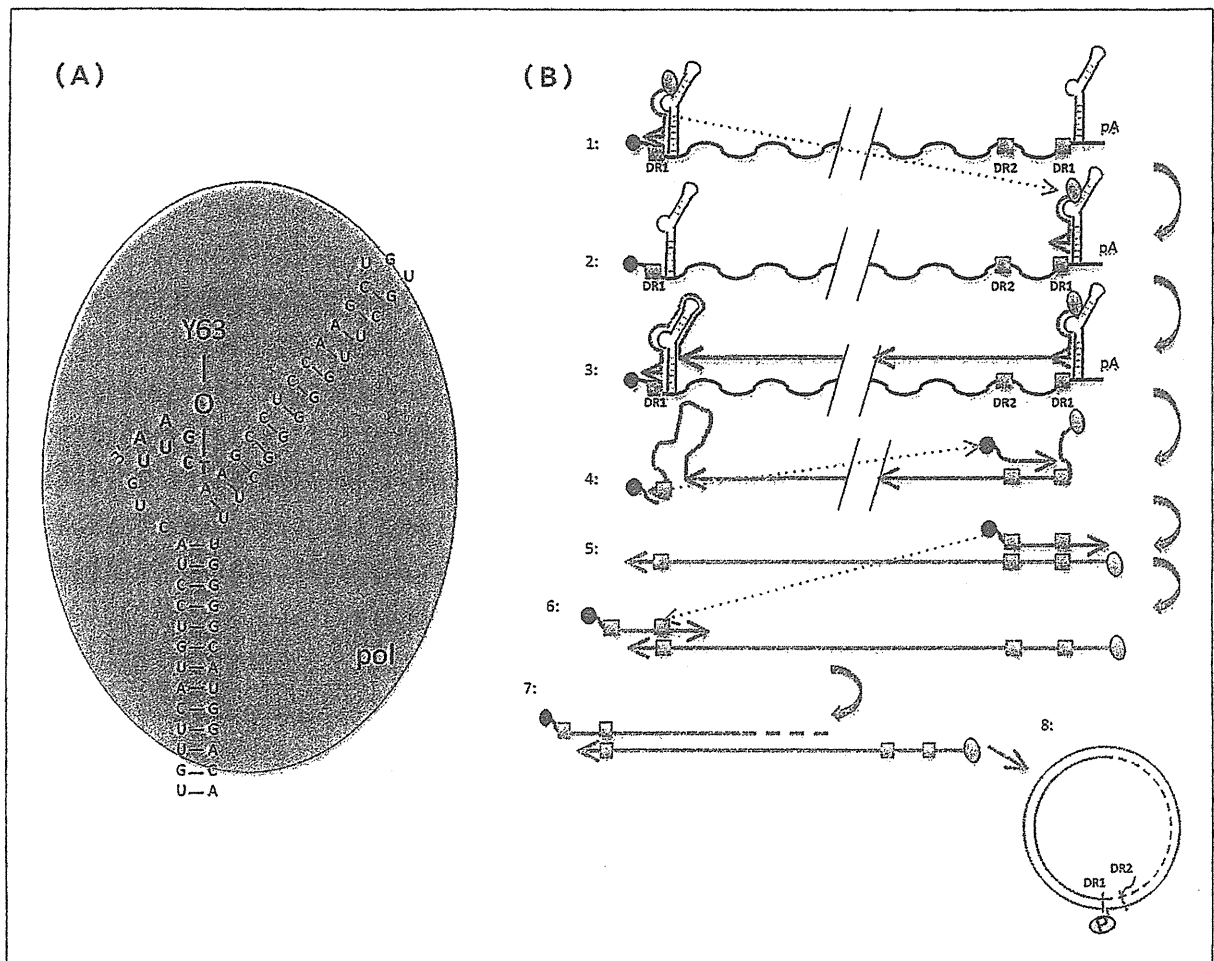


図4 HBV パッケージングシグナル(ε)と逆転写複製メカニズム

(A) HBV HBV パッケージングシグナル(ε)。RNA によくみられる pseudo-not 構造をとると考えられている。HBV pol 末端タンパク領域で認識され则认为られていて、部分的に1本鎖となる膨らみ(bulge)の根元のアデニンと相補的にHBV polの63番目のチロシンからプライミングされる。(B) HBV複製メカニズム。①εから開始した逆転写産物は5' DR1まで合成されると、②3' DR1に転座することで全長⊖鎖DNA合成が可能となる。③5' DR1まで⊖鎖DNA合成が進行するにともない、④鋳型pgRNAはHBV polのRNaseH活性により順次分解される。キャップ構造～DR1をもつ5'の短いpgRNA部分は完全なDNA-RNAハイブリッドにならないため分解を免れ、この部分のRNAが3'に近いDR2領域に相補的に転座することで⊕鎖DNA合成のプライマーとして機能する(レトロウイルスの⊕鎖DNA合成のプライマーとなる polypurine tract [ppt]に相当する)。⑤⊕鎖DNA合成は⊖鎖DNA5'まで進み、⑥その後、3' DR1に転座することで、⑦さらに⊕鎖DNA合成が進む。この反応過程で、③DR領域の相補的な配列をもとに環状化構造をとる。⊕鎖DNA合成は確固とした理由は定かではないが、50～80%くらいのところで合成が停止している。本図では末端タンパクを独立した因子として描いているが、HBV polは機能構造に分解されないため、末端タンパク～合成酵素活性はひとつのタンパクとして機能している。

HBV: B型肝炎ウイルス

(文献9より)

HBVの逆転写(⊖鎖DNA合成)から⊕鎖DNA合成といった一連のHBVゲノム複製がコア粒子内で行われると考えられており、ゲ

ノムを含むコア粒子はERに分子集合している膜タンパクに内包されてERを經由して細胞外に分泌されると考えられる。コア粒子の

### Ⅲ 血液感染するウイルス肝炎

ERでの内包から分泌の過程にどのような宿主因子がかわり、ウイルス因子がどのように機能しているのか、受動的なものなのか、能動的な移送・分子集合なのか、いまだ謎だらけである。

#### VIII HBV 研究の将来

HBV感染者は世界に2~3億人、わが国でもいまだ150万人存在すると考えられている。このような巨大感染症はワクチン回避変異体を生み、慢性化率の高いゲノタイプが蔓延しつつある。HBV慢性肝炎の治療はインターフェロンによるseroconversionを目指した治療が最良であるが、効果は限定的である。したがって、HBV増殖を抑えることに主眼がおかれるが、抗HBV剤は抗HIV剤のたらい回しの利用で変異株とのいたちごっこである。

HBVの研究は分子生物学的手法を主体になされ、各遺伝子の機能が明らかにされて来た。しかし、これまでの報告がHBVの本質的なウイルス学をどこまで正確に記述しているのかを検討する必要がある。すなわち、少なくとも培養細胞を利用した*in vitro*感染系で、可能であればマウス等を利用した個体感染モデルでの実証が必要である。これらの感染系の樹立はHBVのウイルス学を発展させるに留まらず、病態発症機構の解明や、その事実に基づく治療法の開発へと発展することを約束する。

そこで、今後のHBV研究を進める上でもっとも大きな問題点を2つあげておきたい。①HBV感染受容体を分離・同定し、その性質を明らかにしつつ、有用かつ簡便な*in vitro*, *in vivo*感染系を樹立すること、②HBV polの簡便なアッセイ系によるhigh-throughput抗HBV剤スクリーニングシステムを確立することの2点である。これらの問題はウイルス学に託された最難問である。

#### IX HBV 感染受容体の分離・同定と感染系の確立

ウイルスの発見からすでに半世紀足らず、HBVの感染受容体はそのかけらもわかっていないに等しい。本来の感染宿主実質肝細胞に感染増殖するが、肝実質細胞由来の培養肝がん細胞にはほとんど感染しない。もちろん、培養肝がん細胞が元々の正常の肝実質細胞の性質を維持していないことは想定される。初代培養ヒト肝実質細胞の系では確かにHBV感染が確認されるが、倫理的な側面、調達の煩雑さを考えると、研究室での使用にはまったく耐えない。

C型肝炎ウイルスに起因すると思われる肝がんから樹立されたHepaRGという培養肝がん細胞がHBVにも感染感受性を示すことが示された<sup>16)</sup>。しかし、感受性を得るために2~3週間程度の分化誘導が必要なこと、感染効率は最大で30%程度で、しかもディッシュ1枚当たり10万円以上する高価な細胞株であることなどから汎用性に耐えない(増殖維持は特許の関連で制限されている)。iPSから分化させた肝細胞の利用もひとつのアイデアではあるかもしれないが、その誘導から維持の手間を考えると、HBV研究者が低コストで簡便・自由に使用できる状況にはない。

そこでやはり、HBV感染受容体の分離・同定とその応用としての感染系の樹立が必要不可欠と考えている。とは言っても、半世紀近い研究でまったく成果が出なかった対象である。ウイルス感染機構の概念を根本から変える非常識的なアイデアが必要となると、かえってかなり厄介であるが、斬新なスクリーニング方法を考案しつつ、ウイルス感染の基本に立って地道な同定作業を続けている。

#### X HBV pol アッセイシステム

タンパクプライミング逆転写が、パッケージングシグナル $\varepsilon$ 、コア粒子のアセンブリー



と共役して活性化するなどの特殊性や、発現タンパクの可溶化が困難であるなど、試験管内反応系を拒む問題点が立ち上がる。High-throughput/mass screening システムの構築、立体構造から *in silico* 解析を行うにしても純度の高い評品が大量に必要である。いかに活性を維持した状態でこういった評品を得るか、種々のアイデアをもとに試行錯誤を続けている。

## XI おわりに

抗HBVワクチンが開発されて、わが国では特段HBV感染症に対する意識が下がったのか、わが国におけるHBVの基礎研究者はほとんど影を潜めてしまった。わが国の150万人強の患者、世界に数億人の感染者をもってして、容易に減少していく感染症ではないと考える。HBVウイルス学もHBV肝炎、肝がんもよくわからないことだらけである。一見きわめて単純なウイルスのようにみえるが、逆に抗ウイルス標的材料が少なく、種々の側面からの治療薬の開発も難しい。本ウイルスの基本的な問題を解決することが、いろいろな意味で新たな展開を生むかもしれない。

## 文 献

- 1) Blumberg BS, et al : A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191 : 541-546, 1965.
- 2) Blumberg BS, et al : A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann Intern Med 66 : 924-931, 1967.
- 3) Okochi K., Murakami S : Observation on Australia antigen in Japanese. Vox Sang 15 : 374-385, 1968.
- 4) Schaefer S : Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotype. World J Gastroenterol 13 : 14-21, 2007.
- 5) Seeger C, et al : Hepadnaviruses. "Fields Virology" Knipe DM and Howley PM ed. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. p2977-3029, 2007.
- 6) Liang TK : Hepatitis B : The Virus and Disease. Hepatol 49 : S13-S21, 2009.
- 7) Wynne SA, et al : The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol Cell 3 : 771-780, 1999.
- 8) Watts NR, et al : The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. EMBO J 21 : 876-884, 2002.
- 9) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. World J Gastroenterol 13 : 48-64, 2007.
- 10) Yang W, Summers J : Integration of Hepadnavirus DNA in infected liver : evidence for a linear precursor. J Virol 73 : 9710-9717, 1999.
- 11) Bruss V, Ganem D : The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 1069-1063, 1991.
- 12) Ueda K, et al : Three envelope proteins of hepatitis B virus : large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. J Virol 65 : 3521-3529, 1991.
- 13) Kim CM, et al : HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature 351 : 317-320, 1991.
- 14) Wei Y, et al : Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathologie Biologie 58 : 267-272, 2010.
- 15) Suzuki T, et al : Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 8422-8426, 1989.
- 16) Gripon P, et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002.

## 遺伝子挿入HBVを用いた感染レセプターの探索

上田 啓次\*

索引用語：HBVベクター，HBV psuedotype，HBVレセプター，HBV感染系

要旨：B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) が同定されてから、約半世紀が過ぎようとしている。日本には今なお130万人前後、世界的には3.6億人の感染患者が存在するが、本感染症の抜本的な克服手段は今もって存在しないといっても過言ではない。その根本的な理由のひとつが、本ウイルスには簡便な *in vitro* あるいは *in vivo* 感染系が存在しないことによると思われる。このことは逆にHBV感染レセプターの同定を阻んでいると思われるが、世界中で展開されている多くのデータの積み重ねにも関わらず謎は深まるばかりである。ウイルス学的にもまたその感染による病態発症機構の解明、治療法やその評価系の考案には、*in vitro* あるいは *in vivo* 感染系の構築が必須であると考えられる。しかしながら、このような経緯を克服し、HBV感染レセプターを同定、感染系を樹立するにはかなりの創意工夫が必要と思われる。本稿では、これまで進展してきたHBV *in vitro* 感染系、HBV感染レセプターに関する研究を総括し、今後のHBV感染レセプター同定と感染系樹立へ向けた遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を概説する。

## 1 はじめに

1964年にBlumbergがオーストラリア抗原として、世界で初めてHBVの存在を示してから<sup>1)</sup>、約半世紀が迫ろうとしている。HBVは肝炎、肝硬変、肝癌の発症に関わる社会的にも重要視されるウイルスであり、その克服のため、さまざまな観点からウイルス学的、臨床医学的研究が展開されてきた。

HBVは、複製に逆転写過程をもち、3.2 kb

の部分二重鎖DNAにコードされたたった4つの遺伝子で、ほぼ特異的に肝実質細胞において生活環を全うするウイルス学的にも特異的なウイルスである<sup>2)</sup>。分子生物学的手法の開眼と相まって、ゲノムクローニング、塩基配列解析、HBV関連遺伝子解析、組込みと病態解析などが展開され、ワクチンの開発やインターフェロン、抗HIV剤の流用による治療法の進展もあったことも事実である。こういった経緯を背景にし、基礎ウイルス学的に

Keiji UEDA : Separation and identification of the hepatitis B virus receptors with recombinant HBV technology

\*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 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]

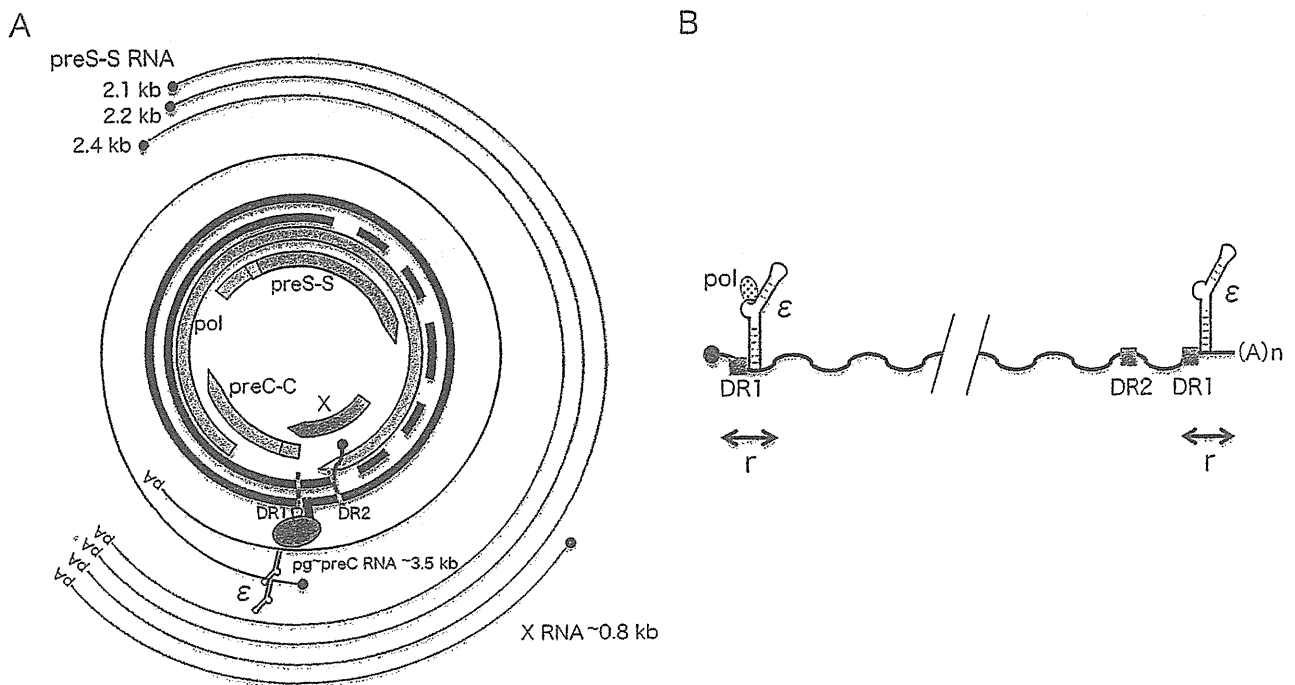


図1 HBVゲノム構造と遺伝子転写産物

- A: HBVのゲノム構造を太線, 太破線で示す。⊖鎖DNA末端にpolが付着する。DR1およびDR2の位置を示した。その内側にHBV関連遺伝子産物の読取り枠を示している。遺伝子は基本的にpreCore-Core (preC-C), preS-S, pol, Xの4つである。3.5 kb mRNAがpreCのATGを含む場合, preCore-Coreとして翻訳され, 分泌過程でN末の分泌シグナルおよびC末が切断されてHBe抗原(p17)となる。preCのATGを含まない場合がpregenome RNA (pgRNA)である。pgRNAは逆転写の鋳型となる重要な機能をもつと同時にcore蛋白, polの翻訳に利用される。preS-S遺伝子はmRNAの開始部位の違いにより, 2.4 kb mRNAからlarge S (preS1-preS2-small S [SS]) (LS), 2.2 kb mRNAからmiddle S (preS2-SS) (MS), 2.1 kb mRNAからSSが翻訳される。この内最も産生量として多いのはSSである。X遺伝子は固有のmRNA (0.8 kb)から翻訳される。●はキャップ構造を示す。
- B: pgRNAの構造。両端は重複した配列(r)となる。DR配列, パッケージングシグナル(ε), polのプライミングする位置を示す。

はもはややり尽された感があったのか, ここ10年間, 日本のHBVの基礎研究は暗黒の時代であった。しかし, 現在なお日本国内に約130万人, 世界的には3.6億人の巨大感染症を形成する人類史上最も危惧すべき感染症のひとつであり, その克服にはHBVの本質を詳細に解析できる *in vitro* あるいは *in vivo* 感染系が何としても必要であり, 感染系を土台とした病態発症機構の解明とそれらに基づくウイルス排除へ向けた抜本的な治療法の開発が重要であると考えている。

HBVは本来の宿主であるヒト若しくはチンパンジーなどのヒト近縁類人猿にしか感染

しない。これらの初代培養肝細胞はHBV感染系としての効率は高いが, その調達は倫理的にも不可能に近く, できたとしてもその手間を考えると, とても日々の実験に容易に用いられる感染系とはいえない。

類人猿に感染するHBVを除いた animal hepadnaviruses (アヒルB型肝炎ウイルス [duck hepatitis B virus = DHBV]<sup>3)</sup>, ウッドチャック肝炎ウイルス [woodchuck hepatitis virus = WHV]<sup>4)</sup>, 地リス肝炎ウイルス [ground squirrel hepatitis virus = GSHV])を用いた分子ウイルス学的アプローチは, 確かに多くの事実を明らかにしてきたと思うが, それに

しても、感染レセプター、感染系、cccDNA (covalently closed circular DNA) 生合成とその維持機構、動態、病態との関連、HBV ポリメラーゼのアッセイ系、詳細な複製メカニズムなど、多くの謎が残されたままである。

HBV感染レセプターの分離・同定は、初代培養アヒル肝細胞(primary duck hepatocyte = PDH)を用いたDHBVを中心に進められた。HBV吸着因子を含め、候補にあげられた因子は、重合アルブミンレセプター<sup>5)</sup>から始まって、gp120<sup>6)</sup>、gp180<sup>7)</sup>などいくつかあるが、繰り返し述べたように感染系の構築には至っていない。これ程までに困難なHBV感染レセプターの分離・同定に向けてどのようなアプローチが必要なのか、遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を考案した。

## 2 *In vitro* HBV感染系

前述のごとく、簡便な特に*in vitro*感染系が存在しないことが、HBV感染レセプターの分離・同定にとって決定的な障壁となっていることはいうまでもないが、*in vitro* HBV感染系(初代培養肝細胞を除く)構築の努力は続けられている。当然のことながら、HBVは正常肝実質細胞へ高親和性を示し、増殖能を発揮することから、肝実質細胞由来と考えられるHepG2、HuH7などのヒト肝癌培養細胞株が感染系として試されてきた。これらの細胞はHBVの複製サイクルと考慮して構築したHBV発現ベクターをトランスフェクションすることにより、感染性粒子を産生することがわかっている<sup>8,9)</sup>。生体においてどのような形質をもつ肝実質細胞に感染するのか全く検討もつかないが、一般的に正常肝細胞は高分化状態にあると考えられるため、これらの細胞をステロイド、インスリ

ン、dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて分化誘導し、感染実験を試みたという報告がある<sup>10)</sup>。またこれらの細胞を用いて、肝臓という臓器状態をできるだけ再現する目的で高密度三次元培養によるHBV感染系の構築の試みもあるが、感染効率、コストパフォーマンスを考えるとHBV感染系としての価値は評価するレベルにないといわざるを得ない。

一般培養細胞系感染系としては、最近(といっても、すでに10年も経過する)樹立されたHCV感染肝癌から樹立されたHepaRGを用いたHBV感染系が唯一であると思われる<sup>11)</sup>。この細胞を2~4% DMSOで数週間分化誘導すると20%程度のHBV感染効率を得られるとされる。しかしながら、一般的な培養肝癌細胞ながら商業用で直径約10 cmのディッシュで10万円強もする高価な細胞であり、とても日常的に使用できる細胞ではない。cccDNA形成など、本来の感染サイクルが進行していると思われるが、Dane様粒子の存在が示されている一方、感染性粒子を排出できないなどの問題点もある<sup>12)</sup>。

HBV感染レセプターの分離・同定から、感染系の構築を目指す場合にこのHepaRGの有用性が議論されている<sup>13)</sup>。最近の報告<sup>14)</sup>では、小管構造の形成に関わる肝細胞の側底側細胞膜(basolateral membrane)側からHBVは感染する。初代培養ヒト肝細胞(primary human hepatocyte = PHH)では接着細胞の表面側一面に小管構造マーカーであるmultidrug resistance protein 2 (MRP2)の発現がみられ、8000 multiplicity of genome equivalent (mge)以上でほぼ100%のHBV感染性がみられるのに対し、DMSO分化誘導HepaRGでは、限られた集属する領域にMRP2の発現がみられ、同じmgeを用いた感染実験でその集団の周辺部にHBV感染が観