

201319002B

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成23-25年度 総合研究報告書

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26(2014)年3月

国立感染症研究所感染病理部

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 23-25 年度 総合研究報告書—

研究代表者 片野 晴隆

平成 26(2014) 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、上原妙子、坂本康太、福本 瞳、佐藤由子、長谷川秀樹

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、鄭 鑫

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

柳川泰昭

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

永田尚義

国立国際医療研究センター消化器内科

渡邊 大

国立病院機構大阪医療センター臨床研究センター

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.....15

新規予防薬の開発.....16

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、上原妙子、坂本康太、福本 瞳、佐藤由子、長谷川秀樹
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

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22

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
研究協力者 大崎恵理子、鄭 鑫 大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学

新規治療薬の開発（抗 PEL 化合物および抗 KSHV 化合物の開発）28

研究分担者 藤室雅弘 京都薬科大学薬学部細胞生物学分野 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.....34

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
研究協力者 加藤博史 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38

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 病棟医長
研究協力者 柳川泰昭 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
永田尚義 国立国際医療研究センター消化器内科

カポジ肉腫の現状把握 HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率について44

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
研究協力者 渡邊 大 国立病院機構大阪医療センター・臨床研究センター
矢嶋敬史郎 国立病院機構大阪医療センター感染症内科

刊行物一覧.....51

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) が関連する疾患について、その発症機構の解明と治療、予防法の開発、KSHV 感染症の現状把握と適切な治療法の普及を目標とした。基礎的な研究の成果としては 1. KSHV の細胞間感染のメカニズムの解明を行ったこと、2. KSHV 関連疾患の miRNA の発現プロファイルを明らかにしたこと、3. PEL 細胞の細胞死を誘導する薬剤を同定したこと、4. LANA による KSHV 複製機構の解明を行ったこと、などがあげられる。また、臨床的な研究成果には 1. KSHV 関連疾患の臨床例の検討を行い、ガイドラインの根拠となる臨床的事実を挙げたこと、2. 血清中抗 KSHV 抗体の動態を検索したこと、3. 「診断と治療の手引き」を作成、配布し、適切な治療法の普及を図ったこと、などがあげられる。KSHV の感染、複製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」の普及は、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 sarcoma associated herpesvirus, KSHV, またはヒトヘルペスウイルス 8、Human herpesvirus 8, HHV-8) 感染により、おもに MSM (同性愛男性) のエイズ患者に発症する悪性腫瘍である。KSHV はカポジ肉腫のみならず、多巣性キャッスルマン病 (multicentric Castleman disease, MCD) や primary effusion lymphoma (PEL) などのリンパ増殖性疾患の発症と関連する。日本のカポジ肉腫患者数は増加傾向にあるが、これは新規 HIV 感染者の約 7 割が MSM であることに起因し、カポジ肉腫、および、KSHV 感染に対する対策は急務である。カポジ肉腫に対する治療は抗レトロウイルス療法 (anti-retroviral therapy, ART) に化学療法 (ドキシル) 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 による感染機構や発癌機構は不明な点が多く、KSHV が MSM の間で広がる理由も明らかにされていない。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り、確率の高い発症予知法と効果的な新規予防・治療法の開発が望まれる。本研究では基礎と臨床が連携し、下記のアプローチにより、日本のエイズ患者に急増しているカポジ肉腫・KSHV 感染症の減少を最終的な目標とし、研究を開始した。

(1) KSHV 関連疾患の発症機構の解明: KSHV 感染機構の解析から、標的分子を同定し、新規治療薬の開発を試みる。(上田、藤室、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: 粘膜ワクチン開発につながる

実験系の開発と、分子標的を定めた新規予防薬、発症予測法を確立する。(片野、藤室)

(3) 現在、増加しているカポジ肉腫・KSHV 感染症の現状把握：カポジ肉腫の治療の現状、他の日和見感染症との関連などの臨床的事項を調査し、現状を把握する。(今村、照屋、上平)

(4) 治療ガイドラインの作成：ART とリポゾーマルドキソルビジンの併用などを考慮に入れた診断、治療ガイドラインを作成し、適切な診断、治療法の普及を図る。(今村、照屋、上平、片野)

治療ガイドラインはエイズ診療に直接の効果が望まれ、治療方針が全国の診療機関で統一されることが期待される。有効な予防・治療法が開発されれば、MSM への啓蒙を行うことにより、大きな効果が期待できる。カポジ肉腫の減少はエイズ患者の QOL の改善と医療費の減少につながるばかりでなく、カポジ肉腫はエイズの代表的な疾患の一つであることから、エイズに対する社会不安を軽減させるものと期待される。

B. 研究方法

ウイルスは KSHV、green fluorescence protein (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 などを用いた。感染細胞の同定は latency-associated nuclear antigen 1 (LANA-1) 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。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。次世代シーケンサーによる small RNA の網羅的解読は、イルミナ社の TruSeq small RNA kit により、small RNA 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 Miseq を用いた。データ解析には CLC Genomics Workbench (CLC bio 社) を用いた。HIV 感染者の血清中の抗 KSHV 抗体価は抗 KSHV 抗体検出用 ELISA kit (Advanced Biotechnologies Inc) を用いて測定した。カポジ肉腫などの KSHV 関連疾患の臨床的解析は、病変部位、検査所見、治療方針や経過などを、診療録から後方視的に調査した。

(倫理面への配慮)

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。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 関連疾患の発症機構の解明

潜伏感染ウイルスゲノム複製・分配・維持機構、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 関連腫瘍を中心とした病態発症機構の解明から新たなウイルス制御のための標的探索を目指している。KSHV 潜伏感染ウイルスゲノム複製では、複製の場の重要性に着目し、KSHV ゲノム複製・分配・維持機構に中心的な役割を演ずるウイルス潜伏感染因子 LANA が核内の核マトリックスに集積することが KSHV ゲノムの複製効率を著しく上昇させることを示した。また、KSHV 潜伏感染 PEL 細胞株の遺伝子発現プロファイルの解析により、angiopoietin-1 (Angpt-1) が PEL 細胞株で発現亢進していることを見出し、Angpt-1 の発現制御機構に関わる約 30bp の責任領域を同定した。また本領域に PEL 細胞株特異的な宿主因子が結合することを見出した。(上田)

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、KSHV のレセプターとして報告されている分子のうち EphrinA2 が細胞間感染にも関与すること、KSHV 感染 B 細胞が非感染細胞と接触することでウイルス再活性化が誘導されることを明らかにした。また、次世代シーケンサーにより KSHV 関連疾患の病理組織における miRNA の発現プロファイル明らかにし、ウイルスの miRNA では miRK4 が、宿主の miRNA では miR-143 が KSHV 関連疾患で高発現していることを示した。さらに、日本のエイズ剖検例とエイズ関連リンパ腫における KSHV が関与する症例を調査し、その実数を明らかにした。(片野)

(2) 新規予防・発症予知法の開発

PEL を標的とした抗腫瘍化合物、および、KSHV 複製阻害活性を持つ化合物の探索と開発を実施した。その結果、プロテアソーム阻害化合物 (MG132、Lactacystin、PSI)、HSP90 阻害化合物 (GA、17AAG、Radicicol)、Erk 阻害化合物 (Sangivamycin)、caspase9 活性化剤 (ピロリジニウム型フラレン)、NF-κB 阻害化合物 (Diallyl trisulfide) は PEL 細胞特異的な殺細胞活性を有することを明らかにし、プロテアソーム阻害剤、HSP90 阻害剤、Sangivamycin、フラレン誘導体が PEL 治療薬のリード化合物となりえる可能性を見出した。(藤室)

(3) カポジ肉腫・KSHV 感染症の現状把握

臨床的にカポジ肉腫と診断された症例 102 例 (すべて男性) の解析を行い、診断時における CD4 陽

性リンパ球数、病変部位、ART 導入などの検討とともに、ART のみで治療、ART に加えて pegylated liposomal doxorubicin (PLD) による化学療法などの検討を行った。現在、エイズ合併のカポジ肉腫には、エイズ臨床試験研究グループ (AIDS Clinical Trials Group : ACTG) 腫瘍学委員会による病期分類がある。我々の調査では、カポジ肉腫に対する化学療法の適応は「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た。カポジ肉腫は ART による改善も期待できることから、T1 病変の中にも化学療法を必要としない例が多く含まれていた。化学療法が必要とされた例は、顔面や四肢に集簇して浮腫を伴う場合、咽頭・喉頭部の病変、肺病変、消化器病変でも広範囲にわたる場合、鼠径部に集簇したリンパ節病変などであった。PLD を投与した 1 例においては、PLD の継続にても寛解増悪を繰り返したため paclitaxel (PTX) へと変更し治療されていた。喉頭蓋病変があった 3 例のうち、2 例においては緊急の気道切開が必要となっていた。また、喉頭蓋病変が、免疫再構築症候群と喉頭蓋浮腫に対するステロイド投与によって増悪したと考えられた例も経験されていた。(今村)

カポジ肉腫の深部臓器病変として最も頻度の高い消化管カポジ肉腫に関して臨床的解析を行い、消化管カポジ肉腫の 8 割で消化器症状がなく、3 分の 1 で皮膚カポジ肉腫を認めないことを明らかにした。この結果に基づき、消化管内視鏡検査の適応の判断は、CD4 数や感染経路に基づいて行うべきであることを提言した。予後不良の MCD の診断治療については、現在までの知見を踏まえた上で、リツキシマブを主体とした治療を提言した。

カポジ肉腫症例について、死亡を primary outcome とした最適な PLD の投与回数についての臨床的検討を行った。108 例のカポジ肉腫症例の臨床的検討を行った結果、カポジ肉腫症例の多くが診断時にはすでに重度の免疫不全状態であり、その後に発症した日和見疾患の数が有意に予後と関連し、PLD 治療と予後との関連は見られなかった。これは、現在の標準治療と考えられている PLD の一律投与 (4-6 回) が免疫不全を助長することで逆に予後を悪化させている可能性を示唆していた。KSHV 関連疾患として最も予後不良かつ稀な疾患である PEL について、自施設の症例についての臨床的解析を行った。4 例の HIV 合併 PEL 中の 3 例で腫瘤形成が見られ、1 例の CR 例が確認された。(照屋)

カポジ肉腫患者において、血中の KSHV DNA 量の検討を行い、KSHV DNA が検出された例のなかには血球貪食症候群 (VAHS) や悪性リンパ腫を合併した例があり、病勢との関連が示唆された。カポジ肉腫症例で高度の血球減少を呈する場合は、血中の KSHV DNA の定量を行うことが推奨される。

また、HIV 感染者における抗 KSHV 抗体の変化について検討し、推定感染経路が同性間性的接触であった症例で高い抗体陽転化率を認めた。さらに、KSHV 関連疾患について、多施設調査を行い、PEL 5 例、KSHV 関連悪性リンパ腫 3 例、KSHV 関連血球貪食症候群 3 例、KSHV 関連腹水貯留が 1 例の計 11 例を解析した。(上平)

(4) 治療ガイドラインの改訂および普及

「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」を作成し、その普及を図るとともに、3 年目には改訂も行なった(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) である。第 2 版では全国アンケート調査の結果を加えるとともに、カポジ肉腫の難症例集を追加し、難症例に対する具体的な治療例を提示した。また、本書に掲載された治療法の要点をまとめたものが、日本エイズ学会へ掲載された。

D. 考察

KSHV による発症機構の解明と治療、予防法の開発、KSHV 感染症の現状把握と適切な治療法の普及を目標とし、基礎研究、臨床研究とも、KSHV 感染の解明、カポジ肉腫治療を考慮するうえで、有用な知見を得ることができた。

KSHV の感染実験系は *in vitro*, *in vivo* とも容易ではなく、とくに、動物実験ではサルを使ったモデルはあるものの、ヒトの感染病態とは多くの点で異なり、ヒトでの感染モデルとしては十分ではない。そうした中で、GFP を用いた KSHV cell to cell 実験系は、ヒト感染に近い感染モデルであると思われる。実験結果からは、Ephrin A2 を介した cell to cell 独自の感染機構があることが示唆された。ヒ

ト体内では B 細胞に存在している KSHV が、血管内皮細胞などに感染する際には細胞間感染が最も効率が良いと考えられることから、Cell to cell 実験系による解析は、KSHV 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るばかりか、ヒト体内における KSHV 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。われわれは 2011 年にワクチン候補分子として、K8.1 を挙げたが、Cell to cell 実験系はワクチンの作用の確認や、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。

3 年間で、いくつかの PEL 増殖阻害薬を同定することができた。いずれも特徴的な分子であるが、そのなかでもピロリジニウム型フラレーンは PEL 細胞内の caspase9 活性化を惹起することでアポトーシスを誘導することを見出した。また、Sangivamycin は Erk の系路を阻害する化合物である。これらの物質はそれぞれの標的分子が分かっており、PEL の発症機構として、いずれも、重要な経路を阻害することで、増殖阻害を誘導している。薬剤の開発から、発症機構の分子メカニズムに迫る成果であり、意義深い。LANA-1 はカポジ肉腫、PEL などの KSHV 感染症では常に発現している分子であり、その潜伏感染時の KSHV 複製機構の解明は極めて重要である。本研究成果から、LANA-1 による核マトリックスでの KSHV 複製機構の一部が明らかにされたが、KSHV の病態の解明の端緒として、今後の研究成果に期待される。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、KSHV 感染症の実態調査が進み、さらに、1 年目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。病期分類として、T (Tumor: 腫瘍) が重要であること、ドキシルが無効である症例が少なからず存在すること、カポジ肉腫以外の KSHV 関連疾患の検討、カポジ肉腫の消化管病変の特徴など、臨床的な evidence が積み上げられた。さらに、治療法については、PLD の投与回数、第 2 選択としてのパクリタクセル (PTX) の必要性などが検討され、手引きの作成の元となるデータが集められた。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示すとともに、化学療法終了の目安を示した。PLD が無効の難治例に対しての第二選択として、PTX による

化学療法についても明記した。改訂版では難症例に対する具体的な経過、治療法を記載している。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。この手引きは、ART を考慮した現在のカポジ肉腫に対する一定の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。

E. 結論

基礎的研究の成果としては、LANA による KSHV 複製機構の解明をおこなったこと、miRNA の発現プロファイルから KSHV 関連疾患に高発現する miRNA を同定したこと、PEL 細胞の細胞死を誘導する薬剤を同定したことが挙げられる。臨床面では、KSHV 関連疾患の臨床例の検討を行ない、「治療の手引き」の記載を確認するデータを得た。さらに、血清中抗 KSHV 抗体の検索を行った。「診断と治療の手引き」第 2 版を作成し、普及につとめた。

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) Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. *Cancer Med* 3: 143-153, 2014
- 2) Kariya R, Taura M, Suzu S, Kai H, Katano H, Okada S. HIV protease inhibitor Lopinavir induces apoptosis of primary effusion lymphoma cells via suppression of NF-kappaB pathway. *Cancer Lett* 342: 52-59, 2014
- 3) Katano H, Yokomaku Y, Fukumoto H, Kanno T, Nakayama T, Shingae A, Sugiura W, Ichikawa S, Yasuoka A. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-

associated herpesvirus among men who have sex with men in Japan. *J Med Virol* 85: 1046-1052, 2013

- 4) Ishikawa C, Tanaka J, Katano H, Senba M, Mori N. Hippuristanol reduces the viability of primary effusion lymphoma cells both *in vitro* and *in vivo*. *Mar Drugs* 11: 3410-3424, 2013
- 5) Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, Okada S. Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced Vgamma9Vdelta2 T cells against primary effusion lymphoma. *Cancer Lett* 331: 174-182, 2013
- 6) Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Katano H. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus DNA in sera of HIV-1-positive patients. *Virol J* 10: 84, 2013
- 7) 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. (*equal contribution)
- 8) 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
- 9) Yamamoto K, Ishikawa C, Katano H, Yasumoto T, Mori N. Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Lett* 300: 225-234, 2011
- 10) 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* 83: 322-330, 2011
- 11) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol* 2: 175, 2011

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 *Herpesviruses*, Magel DG and Tyring S, ed., In-Tech pp93-104, 2012.
- 2) 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.
- 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. (*equal contribution)

- 4) Ueda K. For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012.
- 5) Ueda K. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded. *J. Blood and Lymph* 2:3, 2012.
- 6) 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

藤室雅弘

- 1) Wakao K, Watanabe T, Takadama T, Uia S, Shigemi Z, Kagawa H, Higashi C, Ohga R, Taira T, and Fujimuro M. Sangivamycin induces apoptosis by suppressing Erk signaling in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 444:135-140
- 2) Wakabayashi N, Skoko JJ, Chartoumpakis DV, Kimura S, Slocum SL, Noda K, Palliyaguru DL, Fujimuro M, Boley PA, Tanaka Y, Shigemura N, Biswal S, Yamamoto M, and Kensler TW. Notch-Nrf2 axis: Regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by Notch signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2014, 34:653-663
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
 - 7) Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, and Fujimuro M. Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 573-578, 2011.
 - 8) Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, and Miwa S. Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J Biol Chem* 286:9009-9019, 2011.

今村顕史

- 1) 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* 2012:854146, 2012.
- 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* 7:e46967, 2012.

上平朝子

- 1) Watanabe D, Otani N, Suzuki S, Dohi H, Hirota K, Yonemoto H, Koizumi Y, Otera H, Yajima K, Nishida Y, Uehira T, Shima M, Shirasaka T, Okuno T. Evaluation of VZV-specific cell-mediated immunity in adults infected with HIV-1 by using a simple IFN- γ release assay. *J Med Virol.* 2013;85:1313-20.
- 2) Watanabe D, Koizumi Y, Yajima K, Uehira T, Shirasaka T. Diagnosis and Treatment of AIDS-Related Primary Central Nervous Lymphoma. *J Blood Disord Transfus.* 2012;S1-001.
- 3) 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.

- 4) 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、上原妙子、坂本康太、福本 瞳、佐藤由子、長谷川秀樹
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) について、ワクチンを含めた感染予防薬の開発に必要な基礎研究を行った。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、KSHV のレセプターとして報告されている分子のうち EphrinA2 が細胞間感染にも関与すること、KSHV 感染 B 細胞が非感染細胞と接触することでウイルス再活性化が誘導されることを明らかにした。また、次世代シーケンサーにより KSHV 関連疾患の病理組織における miRNA の発現プロファイル明らかにし、ウイルスの miRNA では miRK4 が、宿主の miRNA では miR-143 が KSHV 関連疾患で高発現していることを示した。さらに、日本のエイズ剖検例とエイズ関連リンパ腫における KSHV が関与する症例を調査し、その実数を明らかにした。KSHV 関連疾患の病態、発症予知、予防を考える上で、重要な知見が得られた。

A. 研究目的

カポジ肉腫の原因ウイルスである human herpesvirus 8 (HHV-8, または Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) は Epstein-Barr virus (EBV) とともに γ -ヒト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。エイズ関連カポジ肉腫が同性愛男性にほぼ限定する。KSHV の感染率は同性愛男性 (MSM) の間で高く、日本の MSM における KSHV 抗体陽性率は 12% であり、一般男性よりも有意に高い (Katano et al. J Med Virol 2013)。KSHV に対する有効なワクチンや予防薬が開発されれば、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。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 感染を抑制する (Sakamoto et al. 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。ワクチン開発には適切な動物モデルが必要であるが、マウスは KSHV の持続感染を起こさず、ヒヒなどで動物モデルの報告はあるものの、ヒトでの感染を mimic した動物モデルは存在しない。

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 (細胞間感染) 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, et al. J Virol. 2001)。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研究目的の一つとした。

もう一つの研究目的は、近年、宿主、あるいは、ウイルスがコードする microRNA (miRNA) が発癌に重要とされることから、KSHV 関連疾患において、ヒト、および、KSHV がコードする miRNA の発現を明らかにし、その病因的な役割を明らかにすることを目的とし、KSHV 関連疾患の病理組織を用い、ヒト miRNA を含めた全 miRNA の発現を次世代シーケンサーにより解析した。これにより、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 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。

さらに、KSHV 関連疾患の日本における現状把握の一環として、エイズ剖検例とエイズ関連リンパ腫において、KSHV が関与する疾患の数を調査した。

B. 研究方法

1. KSHV 細胞間感染実験系の開発

潜伏感染時に green fluorescence protein (GFP) を発現する組換え KSHV をワシントン大学 Dr. Jeffrey Vieira より供与を受けた。組換え KSHV 持続感染 293 細胞、および、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 陽性である。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。

2. KSHV 関連疾患における miRNA 発現

Small RNA の抽出は High Pure miRNA extraction kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた。次世代シーケンサーによる small RNA の網羅的解読は、イルミナ社の TruSeq small RNA kit により、small RNA 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。

3. 日本における KSHV 関連疾患の頻度

厚労科研エイズ対策研究事業「ART 早期化と長期化に伴う日和見感染症への対処に関する研究」

(班長 安岡彰 市立大村市民病院)、および、「HIV 感染者の長期予後を規定するエイズリンパ腫の全国規模多施設共同臨床試験の展開と包括的医療体制の確立」(班長 岡田誠治 熊本大学) の分担研究と共同し、剖検例の解析、および、エイズ関連リンパ腫の解析を行った。詳細はそれぞれの班の報告書を参照されたい。

(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国立感染症研究所、および、試料を提供した各施設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, 355, 356)。

C. 研究結果

1. KSHV 細胞間感染実験系の開発

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結果、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。最近、新たに報告された KSHV のレセプター EphrinA2 の抗体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。未刺激の BCBL-1 / rKSHV.152 と HeLa 細胞を接触する状態で共培養したところ、HeLa 細胞と接触のない群と比較して RTA 陽性細胞の割合が増加している様子が観察され、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 関連疾患における miRNA 発現

カポジ肉腫 8 例、primary effusion lymphoma (PEL) 3 例、multicentric Castleman disease (MCD) 3 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。ヒト miRNA を含めたすべての miRNA の発現を元に、heat map を作製し、症例をクラスター分類した結果、カポジ肉腫、PEL、MCD がそれぞれ、近いクラスターに含まれるもの、同一のクラスターに異なる分類の症例が混ざるこ

とから、miRNA の発現から症例を分類することは不可能であった。miRNA ごと検討では、カポジ肉腫、PEL、MCD のそれぞれの疾患で最も発現の多い miRNA はヒト miRNA である miR-143 であり、全 miRNA の 14-18% 程度がこの miRNA であった。他の疾患、例えば、Epstein-Barr virus (EBV) 関連リンパ腫や EBV で形質転換した lymphoblastoid cell line などでは miR-143 の発現レベルは低く、miR-143 の高発現は KSHV 関連疾患に特異的な現象と思われた。KSHV がコードする miRNA の中では miRK4, miR-K8, miR-K3 などの発現が高かったが、疾患ごとにウイルス miRNA の種類に違いがあった。

3. 日本における KSHV 関連疾患の頻度

エイズ剖検例 225 例中、カポジ肉腫を合併していた症例は 38 例 (17%) であった。日本のエイズ関連リンパ腫症例 207 例では、KSHV は全リンパ腫の 5% に検出され、primary effusion lymphoma (PEL) が 9 例、Large B-cell lymphoma arising in HHV-8 associated multicentric Castleman disease (LBL-HHV8 MCD) が 2 例であった。予後調査では KSHV 関連リンパ腫の予後が悪いことが明らかになった。

D. 考察

GFP によって簡便に検出できる細胞間感染実験系を確立することができた。これは生体内における感染様式を反映する実験系と考えられる。細胞間感染のほうが cell free 感染よりも感染効率がよいという結果は、2001 年の報告 (Sakurada S, et al. J Virol. 2001) と同様の結論である。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ラ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ラン硫酸への接着が必要ないと考えられる。新しいレセプターとして報告された 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、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。また、本研究では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が示された。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。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。

KSHV 関連疾患の miRNA の解析では、KSHV 感染細胞にヒト miRNA である miR-143 が高発現していることが明らかになった。カポジ肉腫で miR-143 が高発現しているとの報告はすでにあるものの (Blood. 2009 113:5938-41)、KSHV 感染細胞に有意に高発現するヒト miRNA の発見は意義深い。しかも、miR-143 は血管平滑筋細胞の分化誘導に関与することがこれまでの研究から示されており (Nature 2009 460: 705-10)、カポジ肉腫や PEL 細胞が、VEGF などの血管新生を誘導するサイトカインを産生する事実を勘案すると、miR-143 がこれらサイトカインの発現誘導と関連している可能性が示唆される。*in vitro* の感染実験などでの実証が必要であるが、今後、KSHV 感染における、この miRNA の病因的意義を検討する必要がある。

剖検例、リンパ腫の検索において、KSHV 関連疾患の頻度が明らかになった。剖検でのカポジ肉腫の合併率 17% は、臨床でエイズ患者に見られるカポジ肉腫の頻度 (5% 程度) よりも遙かに高い。KSHV 関連リンパ増殖性疾患は、近年増加する傾向にある。KSHV 関連リンパ増殖性疾患は、他の組織型のリンパ腫と比べると予後が悪く、今後、MSM の HIV 感染者が増加していることを考慮すると、KSHV 関連疾患の発症には十分な注意が払われるべきである。

E. 結論

KSHV の cell to cell 感染系を確立し、KSHV の細胞間感染のメカニズムに迫る成果を得た。また、KSHV 感染症の病理検体を解析し、その miRNA 発現を明らかにするとともに、KSHV 感染に特異的に高発現するヒト miRNA を同定した。さらに、日本のエイズ剖検症例、および、エイズ関連リンパ腫の調査を行い、KSHV 感染症の実数を明らかにした。これらの成果は KSHV 関連疾患の病態、発症予知、予防を考える上で、重要な知見と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H: Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. *Cancer Med* 2014. 3:143-153.
- 2) Kariya R, Taura M, Suzu S, Kai H, Katano H, Okada S: HIV protease inhibitor Lopinavir induces apoptosis of primary effusion lymphoma cells via suppression of NF-kappaB pathway. *Cancer Lett* 2014. 342:52-59.
- 3) Katano H, Yokomaku Y, Fukumoto H, Kanno T, Nakayama T, Shingae A, Sugiura W, Ichikawa S, Yasuoka A: Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus among men who have sex with men in Japan. *J Med Virol* 2013. 85:1046-1052.
- 4) Ishikawa C, Tanaka J, Katano H, Senba M, Mori N: Hippuristanol reduces the viability of primary effusion lymphoma cells both in vitro and in vivo. *Mar Drugs* 2013. 11:3410-3424.
- 5) Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, Okada S: Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced Vgamma9Vdelta2 T cells against primary effusion lymphoma. *Cancer Lett* 2013. 331:174-182.
- 6) Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Katano H: Frequent detection of Merkel cell polyomavirus DNA in sera of HIV-1-positive patients. *Virology* 2013. 10:84.
- 7) 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* 2012. 425:95-102.
- 8) 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* 2012. 103:775-781.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H: Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol* 2011. 2:175.
- 12) 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 エイズ関連リンパ腫の病理診断 病理と臨床 2012 30:195-203.

2. 学会発表

- 1) 片野晴隆、坂本康太、吉岡妙子、関塚剛史、福本 瞳、佐藤由子、長谷川秀樹、黒田 誠：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8) 関連疾患におけるウイルス miRNA の発現 第102回日本病理学会総会 札幌 2013年4月
- 2) 片野晴隆、味澤 篤、田沼順子、萩原将太郎、岡慎一、矢嶋敬史郎、小泉祐介、上平朝子、鯉渕智彦、岩本愛吉、横幕能行、小島勇貴、永井宏和、岡田誠治：日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理組織分類 第27回日本エイズ学会学術集会総会 熊本 2013年11月
- 3) 片野晴隆、坂本康太、関塚剛史、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年7月
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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年11月
- 7) 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年11月
- 8) 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年7月
- 9) 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年4月

- 10) 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 年 11 月

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ウイルス学 教授

研究協力者 大崎恵理子、鄭 鑫 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、カポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma; KS)、原発性滲出性リンパ腫 (primary effusion lymphoma; PEL) 及び多中心性キャスルマン病 (multicentric Castleman's disease; MCD) などの KSHV 関連腫瘍若しくは腫瘍様疾患の発症母地を形成していると考えられる。従って、その維持機構の詳細を解明することは、これら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。本分担研究では、潜伏感染ウイルスゲノム複製・分配・維持機構、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から新たなウイルス制御のための標的探索を目指している。KSHV 潜伏感染ウイルスゲノム複製では、複製の場の重要性に着目し、KSHV ゲノム複製・分配・維持機構に中心的な役割を演ずるウイルス潜伏感染因子 LANA が核内の核マトリックスに集積することが KSHV ゲノムの複製効率を著しく上昇させることを示した。また、KSHV 潜伏感染 PEL 細胞株の遺伝子発現プロファイルの解析により、angiopoietin-1 (Angpt-1) が PEL 細胞株で発現亢進していることを見出し、Angpt-1 の発現制御機構に関わる約 30bp の責任領域を同定した。また本領域に PEL 細胞株特異的な宿主因子が結合することを見出した。

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の一つとして知られる。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。

KSHV は、KS、PEL、MCD などの腫瘍或は腫瘍様疾患の発症に関わっていると考えられ、KSHV の潜伏感染はそれら KSHV 関連疾患の基礎を形作っていると考えられる。従って、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と考えられる。本研究では、潜伏感染ウイルスゲノム複製・分配・維持機構、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ものである。

DNA ウイルスの潜伏感染の維持は、細胞周期に呼応し、ウイルスゲノム複製・維持・分配を如何に宿主複製機構に依存させるかによって達成される。KSHV ではウイルスゲノム複製・分配・維持に関わる因子として LANA が重要な役割を果たしているが、その機能の詳細は不明な点が多い。LANA はウイルスゲノム末端の反復配列 (terminal repeat; TR) に結合配列 (LANA binding sites; LBS) をもち、宿主複製開始前複合体 (pre-replication complex; pre-RC) をリクルートすることで潜伏感染におけるウイルスゲノムを達成すると説明されているが、それ以上のことはわかっていない。我々はこれまで LANA が核内の核マトリックスに局在することを示し、pre-RC の豊富な核マトリックスへウイルスゲノムを集積させることが重要な複製機構の一つになっていることを示してきた。本年度は、宿主核マトリックス因子 NuMA と LANA の LBS 結合ドメイン LANA-DBD とのキメラ蛋白の

機能を検討することでウイルスゲノム複製の場としての核マトリックスの意義を追求した。

ウイルス潜伏感染細胞では恒常的なウイルス遺伝子の発現によりその遺伝子発現プロファイルが大きく変化することが起こりうる。我々は KSHV 潜伏感染 PEL 細胞株が独特の遺伝子発現プロファイルを示すこと、発現亢進する宿主遺伝子として angiopoietin-1 (Angpt-1) があることを示してきた。血管構築に関わる Angpt-1 の発現亢進は KSHV 感染個体における病態形成に関し、その影響が予測される。そこで PEL 細胞株における Angpt-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

- 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]、 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。
- 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、 Δ 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。
- 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。
- 単独では核質〜クロマチン分画に局在する LANA-DBD を核マトリックス分画へ移行させるために、蛍光蛋白 Halo と宿主核マトリックス因子 NuMA とのキメラ蛋白を構築した。(Halo、Halo-LANA、Halo-NuMA-DBD、Halo-DBD-NuMA、Halo-DBD、Halo-NuMA) を作製した。
- 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。
- 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。
- 複製効率評価には ori-P 結合能を ChIP により標準化して検討した。

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

- 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。
- Angpt-1 cDNA 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・His₆、Angpt-1・V5・His₆ を発現する細胞株を樹立した。
- 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。
- 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。
- 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。
- Angpt-1 cDNA 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・His₆、Angpt-1・V5・His₆ を発現する細胞株を樹立した。
- 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。
- 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。
- 責任領域に結合する宿主因子を electrophoresis mobility shift assay (EMSA) により検討した。

(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

- 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。
- 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 とキメラ蛋白 (Halo、Halo-LANA、Halo-NuMA-DBD、Halo-DBD-NuMA、Halo-DBD、Halo- NuMA) うち、Halo-NuMA-DBD、Halo-DBD-NuMA、Halo-NuMA は核マトリックス分画へ移行した。Halo-DBD は核内に局在するが、核質〜クロマチン分画への局在であると考えられた。
- 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。
- 5) Halo-DBD の発現量は他の構築に比し、著しく高く、また LBS への結合能も相対的に著しく高いものであった。
- 6) 一方、ori-P 依存性複製能は、LBS 結合能で標準化すると、Halo-LANA、Halo-NuMA-DBD、Halo-DBD、Halo-DBD-NuMA の順に相対評価された。

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、バ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 エレメントが存在していると思われた。
- 3) KSHV 潜伏感染 PEL 細胞株培養上清中には、バ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。
- 4) 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 ~ -109nt に重要な cis エレメントが存在していると思われた。
- 5) 本エレメントには KSHV 潜伏感染遺伝子産物である LANA、vCYC、vFLIP、vIRF3 は作用しなかった。
- 6) EMSA により -143 ~ -109nt 領域には PEL 細胞特異的な宿主因子が結合していることが示された。

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

GAL4DBD-LANA-C が少なくとも核移行することを期待していたが、LANA-C の細胞質移行活性が GAL4-DBD の核移行活性を抑えた。従って、

LANA の核マトリックス局在活性が特定の領域の機能によるという結論には至らなかった。LANA 全体の構造的な影響が考えられるが、中心部領域の詳細な変異体の作製が必要と思われた。

LANA-DBD はウイルスゲノム ori-P に結合し、潜伏感染におけるウイルスゲノム複製の中心的な役割を担っていると思われるが、核マトリックス局在活性をもたない。強い ori-P 結合活性を示すが、それに比し複製効率は高くはない。LANA-DBD を宿主核マトリックス因子 NuMA とキメラにし核マトリックスへの局在させることにより複製効率の上昇がみられた。このことは核マトリックスという場が ori-P 複製能に極めて重要であることを示唆している。核マトリックスには宿主複製装置を構成する pre-RC などの豊富な核内領域と考えられ、LANA がその ori-P は結合能でウイルスゲノムを核マトリックスへ引寄せ、複製し易い状況を整えていると考えられる。しかしながら、ori-P は LBS とそれに続く 32bp の GC に富んだ配列 (32GC) からなり、本結果からは 32GC の必要性は説明できない。また、Halo-NuMA-DBD と Halo-DBD-NuMA とでは異なった複製能を示すことから、DBD が C 末に位置することが、複製効率を上げる一つの因子になっていると思われる。

LANA がどのような機構で核マトリックスへ局在するのかについては、より微細な欠失変異体の作製等で詳細に解析する必要がある。

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

KSHV 感染 B 細胞から大量の Angpt-1 が分泌されると想定された。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と考えられる因子であり、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が示唆された。

また、KSHV が潜伏感染している PEL 細胞環境で特異的に発現している宿主因子が、-143 ~ -109nt 領域に作用して Angpt-1 の発現を亢進させていることが示唆された。今回、Kaposin や KSHV microRNA の影響は検討できなかったが、KSHV の潜伏感染蛋白因子群 (LANA、vCYC、vFLIP) が直接作用している可能性は低いものと思われた。