

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの複製機構と創薬研究

渡部 匡史,* 藤室 雅弘

Replication Machinery of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus and Drug Discovery Research

Tadashi Watanabe* and Masahiro Fujimuro

Department of Cell Biology, Kyoto Pharmaceutical University; 1 Misasagi-Shichono-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan.

(Received July 26, 2018)

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is the causative agent of Kaposi's sarcoma (KS), primary effusion lymphoma (PEL), and Castleman's disease. While liposomal doxorubicin has been used as an effective treatment for KS patients, the cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) regimen used for PEL patients was reported to have 1-year survival rates of less than 40%. Moreover, the development of anti-KSHV drugs inhibiting viral replication has been delayed. KSHV establishes a lifelong infection in its host and alternates between a "latent infection" and "lytic infection" state. Latent infection is associated with maintenance of the viral genome and transformation of the infected cells. Lytic infection is the process of producing infectious virus. Elucidating the KSHV life cycle and viral replication machinery is essential for developing novel therapeutic approaches and identifying potential drug targets. To tackle these issues, we have been screening for anti-PEL compounds using PEL-derived cell lines and utilizing recombinant KSHV for functional analysis of KSHV coding genes. In particular, we have focused on the "viral pre-initiation complex" of KSHV and determined its molecular mechanism. The coding proteins conserved among β - and γ -herpesviruses form a complex, which has functional homology with the pre-initiation complex of host cells. The complex is indispensable for the expression of viral proteins composing virus particles. This review summarizes the pathogenesis and therapies of KSHV-associated malignancies. Furthermore, we introduce our recent data on KSHV ORF34, which contributes to viral late gene expression *via* the formation of the viral pre-initiation complex.

Key words—herpesvirus; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; Kaposi's sarcoma; primary effusion lymphoma; viral pre-initiation complex

1. はじめに

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) は、最も近年に発見されたヘルペスウイルスである。そして、カポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma; KS), キャッスルマン病 (multicentric Castleman disease; MCD) や原発性滲出性リンパ腫 (primary effusion lymphoma; PEL) といったがんの原因ウイルスであることが明らかとなっている。

最初にその歴史を簡単に振り返りかえてみたい。まず、話は 1872 年にまで遡る。当時ウィーン

大学の医師・皮膚病学者であったモーリッツ・カポジ (Moritz Kaposi, 1837 – 1902) が "Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin" (原因不明の皮膚に生じる多発性色素斑性肉腫) について報告した。¹⁾ これがのちにカポジの名をとり、"カポジ肉腫" と命名されることとなる。この当時 KS は、中高年男性を中心にみとめられる稀な悪性皮膚腫瘍とされていた。それから約 100 年後に KS は再び注目を集めることとなった。その契機となったのが AIDS 患者の発見である。1981 年にアメリカにおいて、現在では men who have sex with men (MSM) と呼ばれている人々に、KS の発症さらには重篤化がみとめられた。²⁾ この報告では、通常 KS を発症しない比較的若い年代の発症者が多いこと、病状進行が早く重篤化することが特徴であるとし、また感染性病原体の介在を推定していた。以上のことから

京都薬科大学細胞生物学分野 (〒607-8412 京都市山科区御陵四丁野町 1)

*e-mail: twata@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 138 年会シンポジウム S53 で発表した内容を中心に記述したものである。

AIDS 患者発見当初は、HIV-1 感染が KS の病原因子であることも疑われた。しかしながら、HIV-1 非感染者においても KS 発症がみとめられること、かつ AIDS 並びに KS それぞれの感染性因子の伝播傾向が異なることから、HIV-1 感染と KS 発症との因果関係は疫学的に否定されつつあった。そして、1994 年に KS 病変より KSHV ゲノム DNA が同定され、³⁾ のちに KSHV が KS の原因ウイルスであることが明らかとなった。

2. KSHV のウイルス学

まず KSHV の基本的なウイルス学的知見を概説したい。⁴⁾ KSHV は、同じくがんウイルスとして知られている Epstein-Barr virus (EBV) とともに γ -ヘルペスウイルス亜科に分類される。さらには 8 番目に発見されたヒトヘルペスウイルスであることから、ヒトヘルペスウイルス 8 型 (human herpesvirus-8; HHV-8) とも呼ばれている。KSHV は自身のゲノムに約 90 種の open reading frame (ORF) や、マイクロ RNA (miRNA) さらに長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) をもコードすることが明らかになっている。

KSHV の感染経路としては、唾液感染又は性的接触による感染が主たる経路だと考えられている。健常者へ初回感染した場合には、不顕性感染に終わり、そののち終生にわたり潜伏感染状態を維持する。また主な潜伏感染細胞は、B 細胞や血管内皮細胞であるとされている。KSHV は感染細胞内で、潜伏感染 (latent infection) と溶解感染 (lytic infection) の 2 つの感染様式で存在する。KSHV がコードする遺伝子はその発現時期により、潜伏感染遺伝子 (latent gene) と溶解感染遺伝子 (Lytic gene) に分類される。さらに溶解感染遺伝子は、前初期遺伝子 (immediate-early gene)、初期遺伝子 (Early gene)、後期遺伝子 (late gene) に大別される。KSHV は標的細胞への侵入そして脱核後に、自身のゲノムを環状二本鎖 DNA (エピゾーム) として、核内へと移行させる。この際に潜伏感染遺伝子と呼ばれる少数の遺伝子よりタンパク質や miRNA を発現することで、潜伏感染維持や感染細胞のがん化をはかる。これら潜伏感染遺伝子群は、巧みに感染細胞内のシグナル伝達機構などの分子機構を“のっとる”ことで、細胞増殖の亢進、抗アポトーシス状態への誘導、感染細胞の不死化、免疫回避を

成し遂げることが明らかとなっている。また、KSHV 感染者の極度な免疫低下により KSHV は再活性化し、ウイルス粒子産生を伴う溶解感染へと移行する。この際には、KSHV 溶解感染誘導のトリガー転写因子である RTA (KSHV ORF50) の発現を起点として、ウイルスゲノム複製や感染性ウイルス粒子形成に必須な前初期、初期、後期遺伝子群を段階的に発現する。これにより KSHV は、感染細胞からの効率的なウイルス産生を遂げる。

3. KSHV 関連疾患と治療の現状

健常者における KSHV 既感染率は、アフリカ諸国では約 40–50%、イタリアなどの地中海沿岸では約 10% 程度、北米や日本を含む他の地域では 5% 以下であるとされている。そして、日本国内で生じる KSHV 関連疾患は、ほとんど HIV-1 感染者で発症しているのが現状である。そのため本項では AIDS と合併する KSHV 関連疾患について、その臨床治療について概説したい。これらの詳細については、平成 25 年度厚生労働省科学研究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」班が示した「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：第 2 版」を参考にされたい。KSHV は他のヘルペスウイルスとは異なり、ウイルス複製そのものを阻害する薬剤は現在臨床応用されていない。そのため、現行の KSHV 関連疾患治療の基本戦略としては、抗レトロウイルス療法 (anti-retroviral therapy; ART) による HIV-1 ウイルス量のコントロールにより、AIDS 発症による免疫低下状態を防ぐことが重要であるとされる。そのうえで KSHV 関連腫瘍を発症した場合には全身状態も考慮し、化学療法を中心とした抗腫瘍療法を展開するというものである。

KS は、KSHV 感染血管内皮細胞による腫瘍である。皮膚に最も多く発症し、消化管、口腔内にも病変を形成する。国内では、PEG 修飾リポゾーム製剤リポゾーマルドキソルビシン (PEGylated liposomal doxorubicin; PLD, Doxil®) が標準的に用いられている。MCD は IL-6 過剰産生を伴うリンパ増殖性疾患であり、リンパ濾胞周縁部に KSHV 感染形質芽球 (B リンパ球系統) が存在する。これらを標的とする抗ヒト CD20 モノクローナル抗体リ

ツキシマブ (rituximab) の単独又は併用療法により、寛解状態を長期維持可能であるとの臨床成績が現在蓄積している。PEL は貯留体腔液中で B 細胞系のリンパ腫細胞が増殖する腫瘍である。これに対して、最もエビデンスが蓄積されているのは cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) 療法であり、ART と併用した場合、その有効率は 40-50% とされる。

4. 抗 KSHV 関連腫瘍効果を有する化合物

現時点で KSHV 関連腫瘍に対して特異的に効果を示す化合物は知られていない。前述の化学療法の問題点である種々の副作用や抗がん剤耐性獲得の危険性などを考慮すると、新規骨格や新規作用点を有した抗腫瘍化合物の探索は重要な命題であり、さらには PEL 根治へ向けた化学療法の確立へとつながると考えられる。そこでわれわれは、細胞内シグナル伝達阻害や活性酸素産生などの様々な薬理効果が報告されている水溶性フラーレンに着目した。水溶性フラーレンは、炭素原子 60 個で構成される球状分子フラーレン (C₆₀; fullerene) の分子表面を各種官能基で修飾した化合物である。水溶性フラーレンには、HIV-1 や HCV などのウイルス性酵素機能阻害などの抗ウイルス作用も報告されている。⁵⁾

慶應義塾大学薬学部 増野匡彦先生らとの共同研究により、水溶性フラーレン化合物群について PEL 臨床分離細胞株に対する殺細胞活性を評価した。その結果、ピロリジニウム型フラーレン誘導体 (C₆₀ Pyr) が PEL 細胞株に対して Caspase-9 及び Caspase-7 の活性化を介したアポトーシスを誘導することを見出した。⁶⁾ さらに詳細な作用機序について検討するため、KSHV 感染 PEL 細胞 (BC3) と KSHV 非感染 B 細胞 (DG75) を C₆₀ Pyr で処理し、影響を受ける細胞内シグナル伝達経路を比較したところ、C₆₀ Pyr は BC3 細胞内の Akt の Ser473 リン酸化、並びに Erk1/2 の Tyr202/204 リン酸化を阻害した。Akt の Ser473 リン酸化及び Erk1/2 の Tyr202/204 リン酸化は、それぞれ Akt 及び Erk1/2 の活性化を誘導するリン酸化であることから、C₆₀ Pyr は BC3 細胞の Akt 及び Erk シグナルを抑制することが明らかとなった。さらに、C₆₀ Pyr は、Caspase-9 の Ser196 リン酸化も阻害した。この Caspase-9 の Ser196 リン酸化は、Caspase-9 の切断 (活性化) を抑制する。Ser473 がリン酸化された活

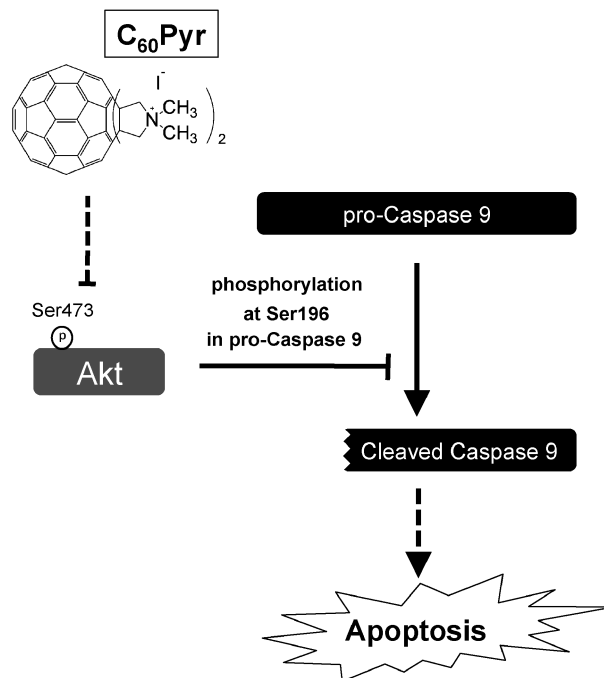


Fig. 1. C₆₀Pyr Suppresses Akt to Activate Pro-Caspase 9 and Induce Apoptosis in PEL

Abbreviations used: Circled p, phospho.

性型 Akt は、Caspase-9 の Ser196 をリン酸化し、Caspase-9 抑制 (切断阻害) を介して、抗アポトーシス作用を発揮することが知られている。⁷⁾ これらの結果や知見を総合すると、C₆₀ Pyr は PEL 細胞内の Akt のリン酸化 (活性化) を阻害することで、Akt による Caspase-9 の Ser196 のリン酸化 (Caspase-9 の不活性化) を抑制して PEL 細胞にアポトーシスを惹起することが考察された (Fig. 1)。一方で、われわれは C₆₀ Pyr による PEL 細胞株からのウイルス産生抑制効果を見出すことはできなかった。今後仮に、KSHV 関連腫瘍増殖並びにウイルス複製を同時に抑制できる化合物を発見できたとしたら、極めて有用な KSHV 治療の創薬標的となるであろう。

5. 遺伝子改変ウイルスをもちいた KSHV 複製機構の解明

KSHV の基礎ウイルス学的研究を進めるうえで、長年技術的な問題となっていたのが感染性ウイルスを得難いことであつた。高い感染力を有し、かつ感染細胞内で強力に複製するウイルス粒子を得られる単純ヘルペスウイルスなどでは、リバースジェネティクス法による bacterial artificial chromosome (BAC) 改変系をもちいた遺伝子組換えウイルスの

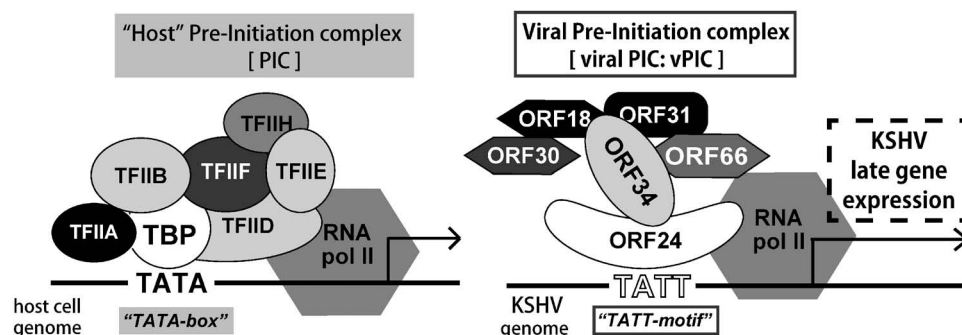


Fig. 2. KSHV ORF34 and Viral Pre-initiation Complex

Schematic representation of the host cell pre-initiation complex and viral pre-initiation complex. Abbreviations used: TFII, Transcription factor II; TBP, TATA-box binding protein; RNA pol II, RNA polymerase II; ORF, Open reading frame.

作製が比較的容易であり、個々の遺伝子の機能解析が進展してきた経緯がある。その一方で、KSHV そのものの感染能力は低く、かつ感染が成立してもほぼ潜伏感染状態へと移行する。そのためウイルス感染などを評価することは困難であった。しかしながら、2014年に南カルフォルニア大学のJungらにより、BAC改変系による高力価の遺伝子組換えKSHVの構築・作出系が確立された。⁸⁾これにより、種々の塩基配列挿入変異や1塩基レベルでの変異導入した組換えKSHVの作出が可能となった。以後この構築系は広くKSHV基礎研究者にもちいられ、飛躍的にウイルス性遺伝子の機能解析が進んでいる。われわれもこの構築系を国内で先駆けて導入し、現在運用している。これら遺伝子組換えウイルスを用いることの利点は、個々のウイルス性遺伝子単独での解析ではなし得ない、ウイルス感染・複製現象全体のなかでのウイルス性遺伝子の役割を明らかにすることが可能な点である。

すべてのウイルスの中でもヘルペスウイルス属は比較的大きなゲノムを保持しており、タンパク質をコードする既知の遺伝子だけでも約90前後存在している。このなかにはヒトヘルペスウイルス属が共通してコードしている遺伝子もあれば、一部にのみ保存されているものもある。 β 及び γ ヘルペスウイルス亜科にのみ保存されている数種の遺伝子群が存在しており、これらは個別に解析が進んでいた。それらの知見をふまえてAubryらはEBVにおいて、これらの遺伝子群が複合体を形成し、ウイルス性転写開始前複合体として機能することで、ヘルペスウイルスの後期遺伝子発現に寄与していることを提示した。⁹⁾ウイルス性転写開始前複合体とは、転写開

始領域への結合能を有するTATA-binding protein (TBP) ホモログであるウイルス性因子とその他の構成因子とが形成する複合体であると考えられている。この複合体は、宿主の転写開始前複合体と機能的相同性を有し、ウイルス後期遺伝子発現に不可欠であるとされる。また、相違点としてはTBPが“TATA”配列を認識するのに対して、ウイルス性TBPホモログは後期遺伝子転写開始領域に存在する“TATT”配列を認識し結合するとされている (Fig. 2)。

われわれは、EBVにおけるウイルス性転写開始前複合体構成因子のKSHVホモログであるORF34に着目しウイルス複製における機能を解析した。¹⁰⁾ORF34は複合体構成因子ホモログORF31、ウイルス性TBPホモログORF24と複合体を形成する可能性が示唆されていた。しかしながらウイルス複製における直接的な役割は不明であった。そこで、BAC改変系をもちいて、ORF34欠損KSHV株を作製し、ORF34遺伝子そのものの生理的意義を解析した。KSHV-BACクローンから、Two-step red recombination法を用いてストップコドン挿入によるORF34欠損BAC、さらには欠損復帰BACを作製した。これらをRTA/ORF50誘導性Vero細胞へ導入し、各種ウイルス産生細胞株を樹立した。そして、培養上清中ウイルス量並びに細胞中ウイルスゲノム量を評価した。細胞中KSHVゲノム量は野生株、ORF34欠損株、欠損復帰株で差はみとめなかったが、ORF34欠損株におけるウイルス産生量は野生株・欠損復帰株に比して、顕著に減少していた。また、ORF34欠損によるウイルス遺伝子発現への影響を評価したところ、ORF34欠損株にて後

期遺伝子の発現量の顕著な低下が観察された。以上より、ORF34 はウイルス産生に必須な遺伝子であり、後期遺伝子の発現制御に関与することが明らかとなった。さらに種々の複合構成因子 KSHV ホモログと ORF34 との結合様式について解析したところ、ORF34 C 末端領域は ORF24 との会合に、中央領域は ORF31, ORF18, ORF66 との会合に寄与していることが明らかとなった。また、ORF34 野生型並びに ORF34 欠失変異体を用いての ORF34 欠損ウイルス産生細胞への *trans-complementation assay* において、ORF34 全長を発現する ORF34 野生型によりウイルス産生の回復が観察される一方で、ORF34 欠失変異体発現によるウイルス産生量の変動は観察されなかった。これらより ORF34C 末端領域と ORF24 との会合がウイルス産生に重要であることが考察される。以上より ORF34 は、ウイルス性前開始複合体の形成を介した後期遺伝子発現に必須であり、かつウイルス性 TBP ホモログ ORF24 へと他の構成因子をつなぎとめる“ハブ”として機能することが示唆された (Fig. 2)。

6. 最後に

KSHV は、AIDS 発症などの免疫低下時にがんを引き起こすヘルペスウイルスである。KSHV 関連腫瘍に対する治療戦略は発展途上であり、根治療法は存在しない。そのため、新規骨格構造を有する抗腫瘍化合物や抗ウイルス化合物の発見は待望されている。

また KSHV は多種多様な遺伝子群を駆使して、宿主細胞の分子機構を支配下におき、感染細胞の“のっとり”をはかる。その一方で、ウイルス性転写開始前複合体のような宿主分子機構にとってかわる独自の分子機構も保持することも明らかになってきた。これら KSHV 複製機構に関する基礎研究の進展は、今後の有用な創薬標的の発見につながるものと考えられる。

謝辞 ともに研究を遂行してくれた京都薬科大学 西村麻佑さん、並びにウイルス BAC 改変につ

いて技術支援を頂きました岐阜薬科大学 腰塚哲郎先生に深く感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Kaposi M., *Arch. Dermatol. Syph.*, **4**, 265–273 (1872).
- 2) Centers for Disease Control (CDC), *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **30**, 305–308 (1981).
- 3) Chang Y., Cesarman E., Pessin M. S., Lee F., Culpepper J., Knowles D. M., Moore P. S., *Science*, **266**, 1865–1869 (1994).
- 4) Damania B. A., Cesarman E., “Fields Virology, Kaposi’s sarcoma-associated virus,” 6th ed., Vol. 2, ed. by Knipe D. M., Howley P. M., Wolters Kluwer Health-Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, pp. 2080–2128.
- 5) Mashino T., Shimotohno K., Ikegami N., Nishikawa D., Okuda K., Takahashi K., Nakamura S., Mochizuki M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1107–1109 (2005).
- 6) Watanabe T., Nakamura S., Ono T., Ui S., Yagi S., Kagawa H., Watanabe H., Ohe T., Mashino T., Fujimuro M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **451**, 93–100 (2014).
- 7) Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J. C., *Science*, **282**, 1318–1321 (1998).
- 8) Brulois K., Wong L. Y., Lee H. R., Sivadas P., Ensser A., Feng P., Gao S. J., Toth Z., Jung J. U., *J. Virol.*, **89**, 6148–6154 (2015).
- 9) Aubry V., Mure F., Mariamé B., Deschamps T., Wyrwicz L. S., Manet E., Gruffat H., *J. Virol.*, **88**, 12825–12838 (2014).
- 10) Nishimura M., Watanabe T., Yagi S., Yamanaka T., Fujimuro M., *Sci. Rep.*, **7**, 329 (2017).