

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590068

研究課題名（和文）カポシ肉腫関連ウイルスに対する分子標的治療法の開発研究

研究課題名（英文）Molecular target study for Kaposi sarcoma-associated virus-associated diseases

研究代表者

野口 耕司 (NOGUCHI KOHJI)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：80291136

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、カポシ肉腫関連ウイルスの遺伝子発現による薬剤感受性の変化を検討した。その結果、ウイルス遺伝子発現細胞株では、抗がん剤感受性に感受性、特に、vFLIP 発現でブレオマイシンに対して顕著な高感受性が認められた。その原因について検討したところ、NF-kappaB 経路の阻害蛋白質の IkBalpha のノックダウンで同様のブレオマイシン高感受性が認められた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the effects of KSHV-associated viral gene expressions on cellular chemosensitivity to various drugs. Our results showed that vFLIP expression apparently conferred bleomycin sensitivity in HEK293 cells. Moreover, knockdown experiment for Ikappa-Balpha showed similar results, suggesting that an activation of NF-kappaB pathway contributes to the belomycin chemosensitization induced by vFLIP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：がんウイルス、分子標的、遺伝子、抗ウイルス薬

## 1. 研究開始当初の背景

カポシ肉腫関連ウイルス (Kaposi's sarcoma-associated virus/KSHV、またはヒトヘルペスウイルス-8/HHV-8) は、1994年に同定された比較的新しいガンマヘルペスウイルスである。このカポシ肉腫関連ウイルスは、東ヨーロッパや地中海沿岸部の高齢男性にみられる古典的良性のカポシ肉腫、臓器移植時に感染して起こる医原性のカポシ肉腫、後天性免疫不全症候群 AIDS の患者で頻

発する日和見感染症のうちのエイズ関連のカポシ肉腫やBリンパ球増殖性疾患である原発性体腔液性リンパ腫、あるいは慢性炎症性で全身にリンパ節膨張がみられる多発性キャスルマン病などに関連している。これらの疾患のうち、特にエイズ関連の疾患では悪性度が高いと言われているが、我が国においても、人口の高齢化、エイズ患者や臓器移植件数の増加が見込まれており、このカポシ肉腫関連ウイルスによる疾患は今後増加する

ものと危惧される。ところが、カポシ肉腫関連ウイルスが含まれるガンマヘルペスに有効な抗ウイルス薬は無い。また、日和見感染症のカポシ肉腫やリンパ腫の治療においては、アントラサイクリン系薬物やビンクリスチンといった細胞毒性の高い抗がん剤が使用されており、患者の免疫力、抵抗力を損なうような抗がん治療が選択されている。このような現状から、免疫低下時に再活性化して長期的には発がんに関与する生活環をもつ悪質なガンマヘルペスウイルスに対しては、免疫低下状態でも有効な新しい分子標的治療戦略が必要になっている。

## 2. 研究の目的

潜伏感染時に発現する少数のウイルス由来蛋白質による宿主細胞の制御メカニズムは、ウイルス疾患での特異性が高いと考えられ、新しい分子標的治療戦略の良いターゲットになると思われるため、カポシ肉腫関連ウイルス由来の遺伝子発現が、既存の薬物治療方法の有効性、あるいは他の薬剤に対する有効性に関わるのかどうか解析し、既存の薬物の組合せでの新しい抗カポシ肉腫関連ウイルス治療法の開発できないか、あるいは薬学的に期待出来る新たな分子標的を探索する。

## 3. 研究の方法

(1) 一般にカポシ肉腫関連ウイルス感染細胞では潜伏感染時には、LANA を中心として幾つかの遺伝子が共発現しているため、カポシ肉腫関連ウイルスのゲノム DNA から、病原性に関わる因子、LANA、v-cyclin、vFLIP、vGPCR の遺伝子に人工的に FLAG タグを付加して PCR クローニングし、それを G418、puromycin、DHFR、Zeocin など異なる選択マーカーとのデュアル発現プラスミドにそれぞれサブクローニングした。この発現プラスミドをヒト細胞株にトランスフェクションして安定導入発現細胞株を樹立した。

(2) 樹立された細胞株に対しては、様々な薬剤に対する感受性を、96 ウェルプレートと MTT アッセイを用いた簡易アッセイ系で順次試験していき、各遺伝子導入細胞株での薬剤感受性のデータを収集した。

(3) データ解析において、ウイルス遺伝子発現細胞で薬剤感受性の変動がみられた化合物に対しては、再現性を確認するとともに実際のカポシ肉腫関連ウイルス感染 B 細胞 (BC-3 や JSC-1 細胞) と対照となる B 細胞との間での薬剤感受性についての違いを検討した。

(4) 薬剤感受性に変動がみられた化合物、特にブレオマイシンの分子薬理メカニズムに対し、ウイルス遺伝子発現がどのような影響を与えているのか、例えば化合物の標的分子やその代謝酵素、あるいは多剤耐性遺伝子

などの発現変動を分子レベルで検討した。その後、薬剤感受性プロファイルと遺伝子発現によるシグナル伝達機構の変動から、その薬剤感受性変動の分子メカニズムについて検討した。

## 4. 研究成果

(1) カポシ肉腫関連ウイルス遺伝子として、LANA、k-cyclin、vFLIP を安定発現する細胞株の樹立に成功した。これらのウイルス遺伝子発現細胞株に対して種々の抗がん剤の感受性を調べたところ、いくつかの抗がん剤に対する感受性が変動していることが明らかになった。LANA 発現細胞では、ビンカルカロイドに対して高感受性を示した。K-cyclin 発現細胞では、ゲムシタピンに若干の高感受性を認めた。一方、vFLIP 発現細胞では、特にブレオマイシン系抗がん剤に顕著な高感受性を見出した。

(2) この原因については検討したところ、NF- $\kappa$ B 経路の阻害蛋白質の I $\kappa$ B $\alpha$  のノックダウンで同様のブレオマイシン高感受性が認められた。従って、NF- $\kappa$ B の活性化がブレオマイシンの感受性に重要であることが明らかになった。一方、ブレオマイシン処理による DNA 損傷について検討したところ、Rad51 の foci 形成、Chk2 のリン酸化など親株と vFLIP 発現細胞の間で明確な違いは無かった。これらの観察から、ブレオマイシンの DNA 損傷効果は両細胞で同等に起きていることが明らかになり、その後の過程でことなるシグナル伝達が誘導されているものと思われる。実際に感受性が異なることと相関して、細胞周期停止反応は、vFLIP 発現細胞の方が強く起きていた。この結果から、ウイルス遺伝子発現細胞では、それぞれの抗がん剤処理による DNA 損傷とそれに続く DNA ダメージチェックポイント機構が、NF- $\kappa$ B 経路で制御されていることが推測される。今後もその詳細な分子機構の解析が望まれる。これらの結果から、NF- $\kappa$ B 経路の活性化が、ブレオマイシン感受性の新たな分子標的となる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Yoshioka H, Noguchi K, et al. (7 人中 2 番)

Functional availability of gamma-herpesvirus K-cyclin is regulated by cellular CDK6 and p16INK4a. Biochem Biophys Res Commun. 394: 1000-1005, 2010. (査読有)

② Kawahara H, Noguchi K, Sugimoto Yet al. (5 人中 2 番目)

Pharmacological interaction with sunitinib is abolished by a germ-line mutation (1291T>C) of BCRP/ABCG2 gene. *Cancer Sci.* 101: 1493-1500, 2010. (査読有)

③ Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y et al. (10人中5番目)

In vivo expansion of MDRI-transduced cells accompanied by a post-transplantation chemotherapy regimen with mitomycin C and methotrexate.

*J Gene Med.* 12: 596-603, 2010. (査読有)

④ Shigeta J, Noguchi K, Sugimoto Y et al. (5人中4番目)

BCRP/ABCG2 confers anticancer drug resistance without covalent dimerization. *Cancer Sci.* 101: 1813-1821, 2010. (査読有)

⑤ Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y et al. (5人中4番目)

Pharmacological Interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling.

*Anticancer Res.* 29: 1059-1065, 2009. (査読有)

⑥ Noguchi K, Sugimoto Y et al. (6人中1番目)

Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib.

*Cancer Sci.* 100: 1701-1707, 2009. (査読有)

⑦ Murakami Y, Noguchi K, et al. (6人中2番目)

Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR.

*Antiviral Res.* 83: 112-117, 2009. (査読有)

⑧ Noguchi K, Sugimoto Y et al. (4人中1番目)

Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy.

*Adv Drug Deliv Rev.* 61: 26-33, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 30 件)

① Noguchi K, Yoshioka H, Maeda A, Katayama

K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y.

Functional availability of KSHV cyclin is regulated by cellular CDK6 and p16INK4a. 13th International Workshop on Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus (KSHV) and Related Agents.

2010年8月30日. Los Angeles, CA, USA

② 野口耕司, 片山和浩, 蓑島維文, 板東俊和, 杉山弘, 杉本芳一.

がんウイルス Epstein-Barr Virus 由来の EBNA1 蛋白質の DNA 結合能を阻害する化合物の探索研究.

第14回日本がん分子標的治療学会.

2010年7月7日. 東京.

③ 吉岡秀哲, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一, 野口耕司.

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)由来 k-cyclin の制御機構.

日本薬学会第130年会.

2010年3月30日. 岡山.

④ 安田愛, 片山和浩, 三橋純子, 蓑島維文, 板東俊和, 杉山弘, 山越智, 杉本芳一, 野口耕司.

がんウイルス Epstein-Barr Virus 由来の EBNA1 を新規分子標的とする阻害薬の探索研究.

日本薬学会第130年会.

2010年3月28日. 岡山.

⑤ Kohji Noguchi, Yuri Masuda, Kazuhiro Katayama, Junko Mitsuhashi, Yoshikazu Sugimoto.

Chemosensitization to bleomycin conferred by a constitutive activation of IKK pathway in viral FLIP expressing cells.

AACR-EORTC-NCI Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference 2009.

2009年11月17日. Boston, MA, USA.

⑥ 河原はる香, 野口耕司, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一.

ABC トランスポーターの P-gp/ABCB1、BCRP/ABCG2 に対する sunitinib の効果の違い.

第68回日本癌学会学術総会.

2009年10月26日. 東京.

⑦ 野口耕司, 増田由梨, 片山和浩, 杉本芳一.

カボジ肉腫関連ウイルス由来 vFLIP の発現とブレオマイシン感受性.

第57回日本ウイルス学会学術集会.

2009年10月26日. 東京.

⑧ 増田由梨、野口耕司、三橋純子、片山和浩、杉本芳一。

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス由来 vFLIP 発現細胞の Bleomycin 高感受性について。  
第 68 回日本癌学会学術総会。  
2009 年 10 月 1 日。横浜。

⑨ 野口耕司、片山和浩、杉本芳一。

カポジ肉腫関連ウイルス由来 vFLIP 発現と抗がん剤感受性。  
第 13 回日本がん分子標的治療学会学術集会。  
2009 年 6 月 26 日。徳島。

⑩ 野口耕司、片山和浩、杉本芳一。

KSHV/HHV-8 viral genes expression modulates chemosensitivity of human 293 cells。  
第 67 回日本癌学会学術総会。  
2008 年 10 月 28 日。名古屋。

⑪ 野口耕司、片山和浩、杉本芳一。

カポジ肉腫関連ウイルスの遺伝子発現と抗がん剤感受性変化。  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会。  
2008 年 10 月 26 日。岡山。

⑫ 吉岡秀哲、片山和浩、野口耕司、杉本芳一。

がん関連ウイルスの遺伝子発現による抗がん剤感受性への影響。  
第 52 回日本薬学会関東支部大会。  
2008 年 10 月 4 日。野田。

⑬ 野口耕司、片山和浩、杉本芳一。

カポジ肉腫関連ウイルスの分子標的に関する研究。  
第 12 回がん分子標的治療研究会総会。  
2008 年 6 月 26 日。東京。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 耕司 (NOGUCHI KOHJI)  
慶應義塾大学・薬学部・准教授  
研究者番号：80291136

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし