

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590483

研究課題名（和文） ウイルス組換え技術と疲労研究を基盤としたβ-ヘルペスウイルス再活性化因子の同定

研究課題名（英文） Fatigue and be-ta herpesvirus reactivation

研究代表者

近藤 一博 (KONDO KAZUHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70234929

研究成果の概要：

サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)、HHV-7 からなるβ-ヘルペスウイルスの再活性化機構の解明と予防策の開発は、先進医療にとって大きな意義をもつ。しかし、β-ヘルペスウイルスのみならず、ヘルペスウイルスの再活性化を誘導する物質は明らかではなかった。我々は、これらの再活性化刺激が、「疲労」と関係し、潜伏感染特異的遺伝子がストレス応答と関わる構造を持つということを示し、疲労を伝達する因子を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学／ウイルス学

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)、HHV-7 からなるβ-ヘルペスウイルスの再活性化は、幹細胞移植などの再生医療や、臓器移植患者や AIDS 患者にとって大きな問題であり、これらのウイルスの再活性化機構の解明と予防策の開発は、先進医療にとって大きな意義をもつ。しかし、β-ヘルペスウイルスのみならず、ヘルペスウイルスの再活性化を誘導する物質は未だ明らかでなく、予防策の開発の障害となっている。

移植患者などにおけるこれら3種のウイルスの再活性化はほぼ同時に生じるので、これらのウイルスの再活性化は共通の機構によって生じると考えられている。我々はβ-ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化の共通性に注目して研究を進め、

i) CMV と HHV-6 が、両者ともマクロファージ系前駆細胞で潜伏感染・再活性化を生じること、

ii) CMV と HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子を同定し、その構造が極めて類似していること、

iii) HHV-6 の潜伏感染・再活性化の制御が潜伏感染遺伝子から生じる前初期遺伝子タン

パクの発現によって行われることを示して来た。

β -ヘルペスウイルス再活性化の臨床像からは、再活性化の誘導因子として、臓器移植の際の拒絶反応によるサイトカインの異常産生や何らかのストレスが誘因であると考えられている。しかし、その原因物質は未だ明らかにされていない。

我々は、HHV-6の再活性化が過労やストレスによって非常に強く誘導されることを見出した。近年の疲労研究により、過労の際には、炎症性サイトカイン類の異常産生、活性酸素の増加、局所的なアミノ酸や酸素の不足があることが報告されている。また、臓器移植などの臨床サイドからは、炎症性サイトカインの過剰な産生が、 β -ヘルペスウイルスの再活性化を促進することも指摘されている。

しかし、疲労のシグナル伝達径路には不明な点が多く、 β -ヘルペスウイルスの再活性化との関係を直接裏付ける証拠はなかった。

2. 研究の目的

このような研究の背景から、これまで主な再活性化因子として考えられていた炎症性サイトカインとは異なる、再活性化因子の候補が浮上してきた。同時に、この物質は、これまで全く不明であった、疲労の原因物質や疲労のシグナル伝達径路と関係する物質であることも示唆された。

本研究では、 β -ヘルペスウイルスの再活性化に関するウイルス学的な研究と、疲労そのものに関するシグナル伝達径路研究を融合させることによって、 β -ヘルペスウイルスの再活性化因子、すなわち疲労因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の様な理由で、本研究では、

- ①ウイルス学的な研究手段として、
 - i) 短時間で再活性化の検出を行うために、再活性化の初期に生じる現象を可視化できる組換えウイルスを作成する。そして、このウイルスを *in vitro* でマクロファージに感染させて潜伏感染細胞を作成し、再活性化検出システムを構築する。
 - ii) 潜伏感染細胞に、疲労研究や臓器移植の情報から絞られた候補物質を作用させ、潜伏感染遺伝子の活性化やウイルスの増殖遺伝子の発現の検出によって、再活性化因子をスクリーニングする。
 - ②疲労研究からの手段として、マウスを2時間の強制水泳または、8時間の不眠状態に置くことで疲労させ、心臓、肝臓などの臓器における遺伝子発現変化を検討する。
- ①のウイルス学的な研究と、②の疲労研究の両者に共通する因子を検索することで、 β -

ヘルペスウイルスの再活性化因子すなわち疲労因子を同定した。

4. 研究成果

(1) β -ヘルペスウイルス潜伏感染遺伝子活性化因子の同定

HHV-6の再活性化の初期には、前初期遺伝子 IE1/IE2 の mRNA が発現するのではなく、潜伏感染遺伝子の IE1/IE2 の ORF から IE1/IE2 のタンパクが合成され、ウイルス増殖が開始される。このことから HHV-6 と HCMV は、uORF のストレス応答機構を利用して、前初期遺伝子タンパク IE1/IE2 を翻訳し、再活性化を生じると考えられる。この様な情報から、無数にあるストレス応答遺伝子の中の候補分子の数を、ある程度減少させることが可能であった。

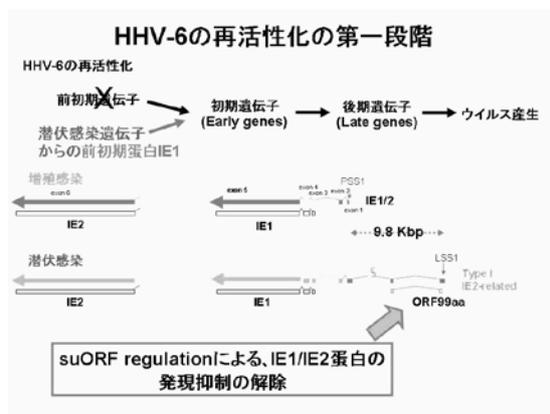


図 1: HHV-6 の再活性化機構

発現を検討した結果、再活性化は、潜伏感染特異的遺伝子にコードされる IE1/IE2 この蛋白が、uORF 制御の解除によって開始されることが判った

(2)疲労実験における疲労因子の同定

これまで HHV-6 の再活性化因子として、様々な要因が候補として挙げられてきたが、あまり効率よく再活性化を誘導する因子は見出されなかった。この理由として、HHV-6 などの β -ヘルペスウイルスの再活性化が検討されるのは、臓器移植などの免疫抑制化における場合が多いことが挙げられる。この様な状況では、免疫抑制の度合いによって、検出されるウイルス量が影響を受けるため、再活性化量を正確に測定することができない。

我々は、この様な欠点を克服するために、唾液中に再活性化する HHV-6 量を測定した。唾液中に再活性化する HHV-6 は、末梢血中に存在する、HHV-6 が潜伏感染したマクロフ

アージが再活性化刺激を受け、唾液腺で HHV-6 再活性化を生じたものであるため、免疫系の影響を受けにくい。このような条件で測定を行なうと、疲労によって HHV-6 の再活性化が効率的に誘導されることが判明した(図 2)。

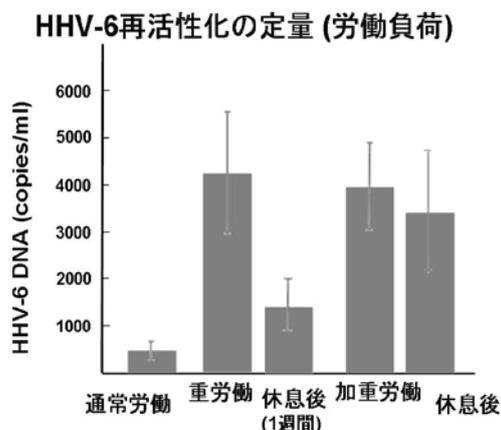


図 2: 労働負荷による HHV-6 の再活性化: 唾液中の HHV-6 DNA 量を Real-time PCR 法で測定することによって再活性化を定量化し、ストレスの蓄積状態(疲労)との関係を検討した。通常労働は、残業のない勤務を、重労働は、1 日平均 5 時間程度の残業を伴う労働を、過重労働はこれにさらに当直勤務による慢性的睡眠不足が加わる勤務状態を示す。

次に、HHV-6 や HCMV の再活性化を誘導するシグナル伝達経路や、誘導分子を同定するために、疲労マウスで増加する mRNA を検討した。HHV-6 の潜伏感染遺伝子の活性化に関わる分子を候補として、Real-time PCR 法を用いて、スクリーニングを行なった。マウスに疲労を与える方法は、2 時間程度の水泳、または、ケージに薄く水を張ることによって 1 夜程度の睡眠不足を誘導することによって行なった。

これらはいずれも、ヒトが通常の労働において、しばしば経験する程度の疲労負荷であり、HHV-6 の再活性化が誘導される必要最小限の刺激であると考えられた。これは、研究が動物を虐待せずに行なえらるとともに、過剰な刺激による、無関係な遺伝子発現を避けることができるものと考えられた。

スクリーニングの結果、脳、心臓、脾臓、肝臓など、過労による疾患や、過労死の原因であることが知られている臓器中で、不眠による疲労によって mRNA 量が増加する分子(疲労因子)を同定することができた。また、この分子は、HHV-6 や HCMV の潜伏感染部位である骨髄や末梢血液中においても、疲労によって増加することが判った。また、こ

の分子は、不眠による疲労だけでなく、水泳による疲労によっても増加することが判った。

この分子は、マウスだけでなく、ヒトでもその相同分子が存在する。ヒトの疲労因子を、発現ベクターにクローニングし、ハイドロダイナミック法を用いてマウスに静中し、in vivo の肝臓で発現させた。この結果、コントロールとして、用いた EGFP 遺伝子ではマウスの自発運動量に変化がないのに対し、疲労因子では、顕著な自発運動量の低下が見られた。

この結果、この因子は疲労の原因や疲労感の伝達に機能する分子であることが明らかとなった。また、この分子の機能から、HHV-6 や HCMV の再活性化因子としても機能することが判った。

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)

[学会発表](計 15 件)

1. 小林伸行、嶋田和也、清水昭宏、近藤一博
ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 潜伏感染中間状態特異的タンパクによる気分障害の発症機序
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 岡山)

2. 鎌田美乃里、近藤一博
HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6 潜伏感染細胞の同定
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 岡山)

3. 清水昭宏、小林伸行、近藤一博
遺伝子治療を目的としたヒトヘルペスウイルス 6 ベクターの性状解析
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 岡山)

4. 嶋田和也、近藤一博
スプライシング関連因子 SART3 のアンチセンスによるヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) ie1/ie2 mRNA の選択的スプライシングに対する影響
(第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 岡山)

5. K. Kondo, N. Kobayashi, K. Shimada, H. Kuratsune, H. Matsunaga.
Identification of novel HHV-6 latent protein associated with mood disorders in CFS, depressive disorder, bipolar disorder

and HHV-6 encephalopathy.
International Symposium on Viruses in
Chronic Fatigue Syndrome
(June 22, Baltimore 2008)

6. T.Sugino, Y.Kajimoto, H. Kuratsune, Y.
Watanabe, K. Kondo.

Enhancement of herpes virus 6 (HHV-6)
and herpesvirus 7 (HHV-7) reactivation in
saliva during the fatigue state.
International Association of Chronic
Fatigue Syndrome (Fort Lauderdale 2007)

7. 近藤一博

疲労のバイオマーカーとしてのヘルペス
ウイルス再活性化
第2回日本疲労学会(2006年7月大阪)

8. 鎌田 美乃里、近藤一博

HHV-6 感染 SCID-hu マウスにおける
HHV-6 感染様式の解析
第54回日本ウイルス学会(2006年11月名古屋)

9. 嶋田和也、武本眞清、山西弘一、近藤一博

ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) 初期遺伝
子制御機構の解析 - 初期遺伝子プロモータ
ー間の比較検討 -
第54回日本ウイルス学会(2006年11月名古屋)

10. 近藤一博、鎌田美乃里、小林伸行

ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 と HHV-7
の再活性化の誘導因子としての疲労
第54回日本ウイルス学会(2006年11月名古屋)

11. 清水 昭宏、近藤一博

ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7)の細胞
指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析
第54回日本ウイルス学会(2006年11月
名古屋)

12. 小林伸行、嶋田和也、清水昭宏、近藤一
博

ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 潜伏感染
特異的タンパクによるうつ症状の発症機序
(第55回日本ウイルス学会、2007年10
月札幌)

13. 鎌田美乃里、近藤一博

HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた
HHV-6 潜伏感染細胞の同定
(第55回日本ウイルス学会、2007年10月札
幌)

14. 清水昭宏、小林伸行、近藤一博

ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6)の細胞指向
性に関するウイルス遺伝子の同定と解析
(第55回日本ウイルス学会、2007年10月札
幌)

15. 近藤一博、清水昭宏、小林伸行
β-ヘルペスウイルスのストレス応答による再
活性化機構の解明

(第55回日本ウイルス学会、2007年10月札
幌)

[図書] (計 2 件)

1. K. Kondo. Chronic Fatigue Syndrome
and Herpesvirus Infection. In: Fatigue
Science for Human Health. Springer
Press, 2008. pp. 137-152.

2. K. Kondo and Yamanishi K. HHV-6A,
6B, and 7: molecular basis of latency
and reactivation. In: Ann Arvin et.al.
editors. Human Herpesviruses.
Cambridge University Press, 2007. pp.
843-849.

[その他]

ガイドライン

渡辺恭良、平山佳伸、近藤一博、倉恒弘彦
日本疲労学会 抗疲労臨床評価ガイドライ
ン (2008年2月16日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤一博 (KONDO KAZUHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70234929

(2)研究分担者

(3)連携研究者