

腫(ARL)を発症するとされ、3-4%においてはその発症がAIDSの診断につながっている(Little et al., JAMA 2001;285,1880)。HAARTの導入後ARLの発症は減少しているが、最も減少したのは中枢神経原発のリンパ腫である。ARLは依然としてエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、その治療法の開発は急務である。

我が国においてARLの約半数を占めるEBV陽性リンパ腫は、PELと共に、NF- κ Bが恒常的に活性化している事が知られている。本研究においては、この恒常的活性化NF- κ Bを治療の分子標的として応用する事を検討した。既に報告されている論文において用いられている薬物はNF- κ B活性化シグナル伝達のkey playerであるIKKの阻害剤や多彩な機能を有するproteasome阻害剤を用いたものである。本研究に用いる阻害剤DHMEQはp65RelAの核内移行阻害と言う、特異な作用を持つ事から、その作用は大変期待される。実際、分担研究者らは既にNF- κ Bの恒常的活性化を特徴とする種々のリンパ性悪性腫瘍においてその作用を検証し、有効性を報告してきている。

本研究では、EBV陽性ARLのモデルとしては、健康人末梢血単核球(PBMC)にEBVを感染させて樹立したLCLを用い、PELについては細胞株を使用して、NF- κ B阻害剤DHMEQによるNF- κ B活性抑制効果および細胞死誘導能を検討した。さらに、EBV感染初期のPBMCにDHMEQを作用させ、LCL樹立に至る過程でのDHMEQの効果を検討した。

B. 研究方法

(1) NF- κ B阻害剤DHMEQを用いたEBV陽性エイズリンパ腫治療の基礎研究

LCLの培養液中にDHMEQを添加し、その後のNF- κ B活性をEMSA法により、細胞増殖能をWST-8法により解析した。また、AnnexinV染色、TUNEL法、Caspase活性測定によりアポトーシス誘導の有無を検討した。さらに、NOD/SCID/gamma(c)(null)マウス(NOGマウス)へLCLを移植し、DHMEQ存在下での腫瘍形成能を観察した。加えて、PBMCへEBVを感染させ、感染初期におけるDHMEQ存在下でのLMP-1発現細胞の増減とLCL形成能を経時的に観察し、そ

れに伴う細胞集団中のウイルスDNA量の増減をリアルタイムPCR法により定量した。

(2) NF- κ B阻害剤DHMEQを用いたPrimary effusion lymphoma(PEL)治療の基礎研究
PEL細胞の培養液中にDHMEQを添加し、その後のNF- κ B活性をEMSA法により、細胞増殖能をWST-8法により解析した。また、AnnexinV染色、TUNEL法、Caspase活性測定によりアポトーシス誘導の有無を検討した。さらに、NOD/SCID/gamma(c)(null)マウス(NOGマウス)へLCLを移植し、DHMEQ存在下での腫瘍形成能を観察中である。また、DHMEQ処理による細胞性遺伝子の発現変化を発現アレイ解析システム(CodeLink)を用いて検討し、ウイルス遺伝子発現の変化をRT-PCR法で解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認(平成19年6月4日 承認番号107022)を得た上で、同研究所の動物実験施設内感染実験区(P2施設)で行われた。

C. 研究結果

1) NF- κ B阻害剤DHMEQを用いたEBV陽性エイズリンパ腫治療の基礎研究

樹立した全てのLCLにおいて強いNF- κ B活性が認められ、DHMEQの添加によりそれらの活性が阻害された(図1)。

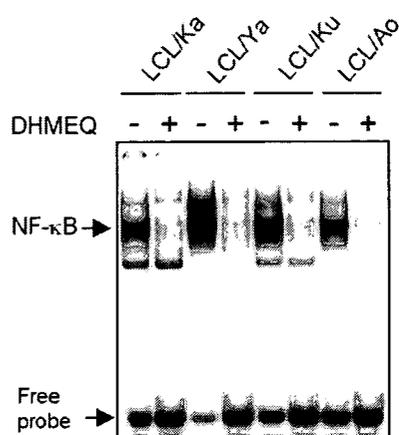


図1. DHMEQはLCLにおけるNF- κ B活性を阻害する
DHMEQ添加(+)or非添加(-)後のLCLより核抽出液を分離し、NF- κ BのDNA結合活性をゲルシフト法により検出した。樹立した全てのLCLで構成的NF- κ B活性の存在が確認され、DHMEQによりそれらの活性が阻害された。

また、全ての LCL において細胞増殖能の低下 (図 2) とアポトーシスの誘導が認められた。

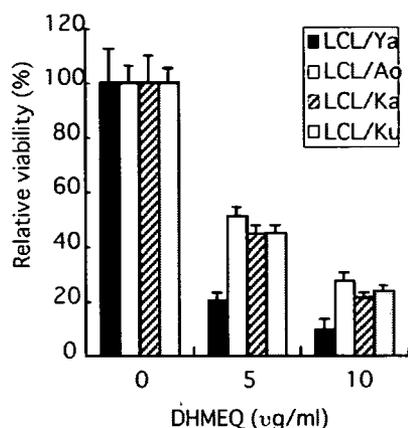


図 2. DHMEQ の細胞増殖能へ与える影響

DHMEQ 添加後の LCL の viability を WST-8 法にて測定した。全検体において、DHMEQ 濃度依存的な細胞増殖抑制効果が見られた。

LCL 移植 NOG マウスにおいては、DHMEQ の連続投与により腫瘍の形成が阻害された。さらに、EBV 感染初期の PBMC においては、DHMEQ 投与により LMP-1 発現細胞が選択的に除去され、LCL の樹立が阻害された (図 3)。細胞集団中のウイルス DNA 量は、DHMEQ 非投与群では EBV 感染後時間経過と共に明らかな増加を示したのに対し、DHMEQ 投与群ではそのような増加が見られなかった。

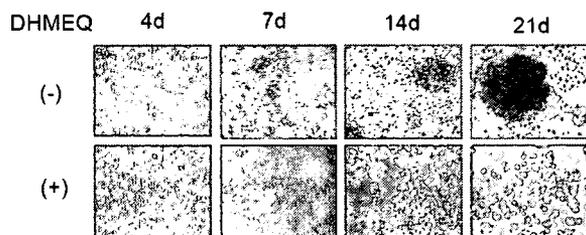


図 3. DHMEQ の EBV 感染 PBMC へ与える影響

PBMC への EBV 感染後、DHMEQ 存在下での LCL 樹立を経時的に観察した。DHMEQ 投与により LCL の樹立が阻害された。

以上の結果は現在投稿中である (Ariko Miyake, Md. Zahidunnabi Dewan, Takaomi Ishida, Mariko Watanabe, Mitsuo Honda, Tetsutaro Sata, Naoki Yamamoto, Kazuo Umezawa, Toshiki Watanabe, Ryouichi Horie. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- κ B inhibitor DHMEQ, *Micobes Infect.* In revision)

2) NF- κ B 阻害剤 DHMEQ を用いた Primary effusion lymphoma (PEL) 治療の基礎研究
HHV-8 感染 PEL 細胞株 (BCBL1, TY1, BC1) の各抽出液を用いた EMSA で、NF- κ B 活性が認められ、そのサブコンポーネントは p50/p65 であることが示された。DHMEQ の添加によりそれらの活性が 1-3 時間後に抑制されたが、効果は一過性で 24 時間後にはほぼ回復した (図 1)。

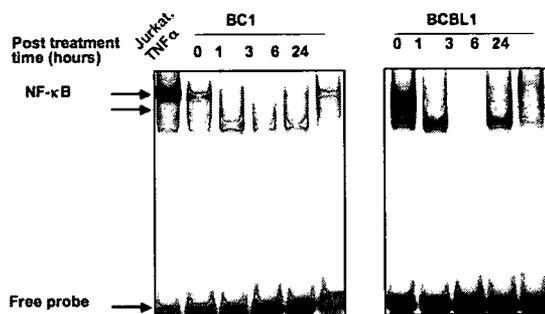


図 1. DHMEQ による一過性の NF- κ B 活性化抑制。10 μ g/ml の DHMEQ 処理後時間経過を追って各抽出液を調製し EMSA 法によって NF- κ B の DNA 結合活性を検討した。

しかし、DHMEQ 処理により、濃度及び時間依存的に全ての PEL 細胞株において細胞増殖能の低下 (図 2) とアポトーシスの誘導が認められた。

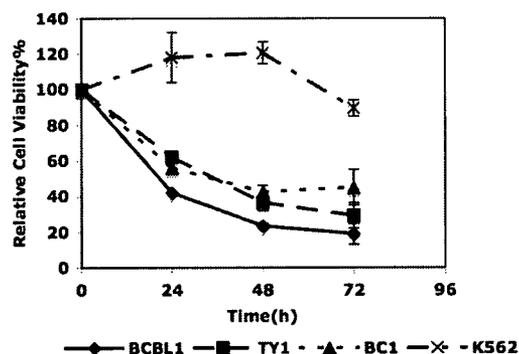


図 2. DHMEQ (10 μ g/ml) 処理後の細胞生存率の検討。WST-8 法により生存率を検討した。

アポトーシスは内在性および外来性の両方の経路の活性化が関与していた。DHMEQ 処理によって NF- κ B 活性が抑制されても、HHV8 の遺伝子

発現は顕著な変化を示さず、lytic infection への移行は認められなかった。遺伝子発現アレイ解析では、pro-apoptotic 遺伝子の発現亢進と anti-apoptotic 遺伝子の発現抑制の傾向が認められたが、現在 Agilent 社のシステムで再検討中である。感染研の片野博士の協力により、PEL 細胞移植 NOG マウスモデルで in vivo の抗腫瘍活性の解析を行った結果、この xenograft において DHMEQ の PEL 細胞に対する抗腫瘍効果が示された (図 3, 4)。

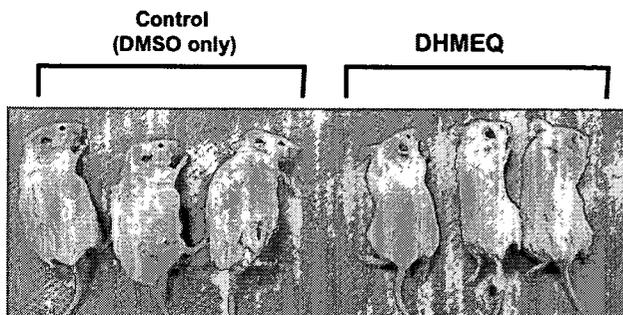


図 3. Xenograft mouse の外観。DHMEQ を投与しなかったコントロール群では腹腔内の腫瘍のため腹部が膨満している。

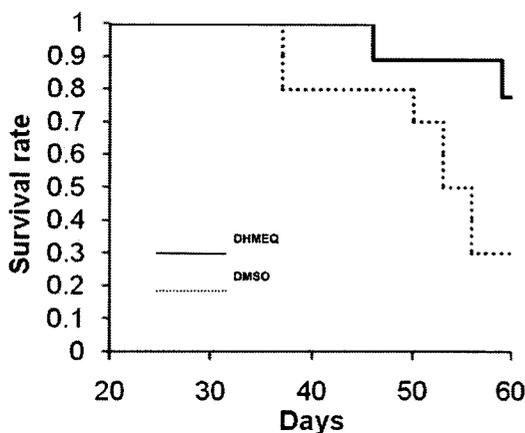


図 4. Xenograft mouse の生存曲線。DHMEQ 投与群が有意に生存率が高かった (Kaplan-Meier 法、 $p=0.044$)。

D. 考察

EBV 感染 LCL を用いた実験結果は、EBV 陽性エイズリンパ腫に対して、DHMEQ が有望な分子標的治療薬となる可能性を示している。これは、我々がこれまで報告してきた、NF- κ B の恒常的活性化を特徴とする CLL、ホジキン病、多発性骨髄腫、ATL などの、T リンパ球及び B リンパ

球の悪性腫瘍に対する有効性と同様の結果である。本研究において注目される結果は、EBV 感染初期の PBMC においては、DHMEQ 投与により LMP-1 発現細胞が選択的に除去され、LCL の樹立が阻害されたことである。この結果は、高危険群を対象としてエイズ合併リンパ腫の発症予防に DHMEQ が応用可能であることを示唆しているものである。

PEL 細胞に対する DHMEQ の結果の特徴は、NF- κ B 活性の抑制が一過性であるにもかかわらず、1日から2日後に細胞がアポトーシスを起こして死滅するという現象である。この結果は、NF- κ B 活性の抑制が、下流の遺伝子発現の制御を介して細胞死を誘導している事を明確に示すものと考えられる。NF- κ B 下流の細胞の生存と増殖に関わる遺伝子の同定は、発現アレイデータの詳細な解析を通じて可能になるものと考えられ、現在精力的に検討している。コンセンサスの結果で、他のグループからの従来の報告著明らかに異なる結果がある。それは、NF- κ B 活性を阻害すると HHV8 の遺伝子発現が最活性化され、lytic infection へ移行するというものである。しかし、我々の結果では、HHV8 の遺伝子発現の活性化は全く認められなかった。従って、従来の報告は、使用した薬剤の NF- κ B 経路以外に対する非特異的な作用の結果を見ていた可能性がある。

E. 結論

以上の結果は、NF- κ B 活性が EBV 陽性 B 細胞リンパ腫および PEL の細胞増殖抑制、及び EBV 感染 PBMC の腫瘍化抑制の分子標的となり得ること、DHMEQ がその分子標的薬として有効であることを示すものである。よって、DHMEQ のエイズリンパ腫治療への応用が期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe M, Dewan Md. Z, Taira M, Shoda M, Honda M, Sata T, Higashihara M, Kadin ME, Watanabe T, Yamamoto N, Umezawa K, Horie

- R. I κ B α -independent induction of NF- κ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Lab Invest* 87:372–382, 2007
- 2) Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Letters* 257:206–215, 2007
- 3) Horie R, Ishida T, Maruyama-Nagai M, Ito K, Watanabe M, Yoneyama A, Higashihara M, Kimura S, Watanabe T. TRAF activation of C/EBP β (NF-IL6) via p38 MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages. *Micobes Infect.* 9:721-728,2007
- 4) Katano H, Sato Y, Hoshino S, Tachikawa N, Oka S, Morishita Y, Ishida T, Watanabe T, Rom WN, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect.* 9: 1581-1589,2007
5. Han M-Y, Kosako H, Watanabe T, Hattori S. ERK MAP kinase regulates actin organization 1 and cell motility 2 by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. *Mol Cell Biol* 27:8190–820, 2007
6. Matsuoka M, Watanabe T, Kannagi M, Bangham C, Grassmann R, Marriott SJ, Green P, Jeang K-T. Meeting Report on the 13th International Conference on Human Retrovirology: Human T-Cell Leukemia Virus Research-30Years after Adult T-Cell Leukemia. *Cancer Res.* 67:1638-1641,2007
7. Franchina M, Woo AJ, Dods J, Karimi M, Ho D, Watanabe T, Spagnolo DV, Abraham LJ. The CD30 gene promoter microsatellite binds transcription factor Yin Yang 1 (YY1) and shows genetic instability in anaplastic large cell lymphoma. *J Pathol* 214: 65–74, 2008
8. Watanabe M, Ogawa Y, Itoh K, Koiwa T, Kadin ME, Watanabe T, Okayasu I, Higashihara M, Horie R. Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest* 88: 48–57, 2008
2. 学会発表
(シンポジウム)
- 1) 渡邊 俊樹. シグナル伝達異常を標的とした治療法の開発-悪性リンパ腫を例として
東京大学臨床展開シンポジウム、2007年3月2日、東京
(国内学会発表)
- 1)三宅在子、石田尚臣、Md. Zahidunnabi Dewan、梅澤一夫、山本直樹、堀江良一、渡邊 俊樹、NF- κ B 阻害剤 DHMRQ を用いたエイズリンパ腫治療の基礎研究、第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21–23日、札幌
- 2)Nazanin Dabaghmanesh, Ariko Miyake, Ryouichi Horie, Md. Zahidunnabi Dewan, Naoki Yamamoto, Toshiki Watanabe. Transient inhibition of NF- κ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21–23日、札幌
- 3) 堀江良一、渡邊真理子、Md. Zahidunnabi Dewan, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、NF- κ B 阻害薬 DHMEQ による Hodgkin リンパ腫治療の基礎的研究、第11回がん分子標的治療研究会総会、2007年7月5–6日
- 4) 堀江良一、渡邊真理子、Md. Zahidunnabi Dewan, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、変異型 I κ B α を有する H-RS 細胞での I κ B β を介した NF- κ B 誘導と DHMEQ による分子標的療法、第69回日本血液学会、2007年10月11–13日、横浜
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
なし

エイズ関連リンパ腫に対するスタチンと DHMEQ の併用療法の検討

分担研究者：片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：渡邊俊樹（分担研究者、東京大学新領域メディカルゲノム）
石田尚臣（東京大学新領域メディカルゲノム）
中村智之、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）
梅澤一夫（慶應義塾大学理工学部）

研究要旨 Epstein-Barr virus (EBV)関連日和見リンパ腫はエイズ関連リンパ腫の半数程度を占め、エイズ関連リンパ腫の中では比較的発症機構がよく解析されている病型であるが、確立した治療法は存在しない。われわれはエイズ関連 EBV 陽性リンパ腫の新規治療法として高コレステロール血症治療薬として用いられている HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）と NF- κ B 阻害剤 dehydroxymethylepoxyquinomycin (DHMEQ)の併用療法について、試験管内実験および動物実験で検討した。EBV 陽性 lymphoblastoid cell line (LCL) を用いた試験管内実験では 2 剤の併用により、抗リンパ腫効果の増強が見られた。しかし、LCL を免疫不全マウスに移植した動物モデルによる検討では併用群はスタチン単独投与群と比較して、明らかな相乗、相加効果は見られなかった。これらの検討から、スタチンの有効性が改めて確認されたものの、DHMEQ との併用療法については再検討を要し、他の抗癌剤との併用が今後の検討課題であろう。

A. 研究目的

エイズ患者にはニューモシスチス肺炎やサイトメガロウイルスなどの日和見感染症の他にカポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍が合併する。近年の highly active anti-retroviral therapy (HAART)の導入により、多くの日和見感染症は減少する傾向にあるが、カポジ肉腫、リンパ腫は逆に発症率としては増加傾向にある（平成 18 年度 厚生労働科学研究費 エイズ対策研究事業「重篤な日和見感染症の早期発見と最適治療に関する研究」報告書）。カポジ肉腫は皮膚に好発するが、限局した病変での予後はよく、

HAART のみで軽快する場合も多い。一方でリンパ腫は一般に進行が早く、コントロールが困難で致死率も高い。

エイズ関連リンパ腫のほとんどは diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であり、その約半数に Epstein-Barr virus (EBV)の感染が認められる。EBVはヒトヘルペスウイルスの一種で、遺伝子上に複数の癌遺伝子をコードし、単独で B細胞を形質転換する能力を持っていることから、ヒト癌ウイルスと考えられている。EBVが B細胞に感染すると潜伏感染状態に入り、潜伏感染タンパクである EBNAや LMPを発現する。健常者の免疫はこ

うしたウイルス抗原を認識し、抗原陽性細胞を排除するが、エイズなどの免疫不全者ではEBV感染細胞は免疫反応を逃れ増殖し、やがてリンパ腫と認識されるほどの量に増殖する。これがEBV関連日和見リンパ腫である。

エイズ関連EBV陽性日和見リンパ腫はリンパ節外性に発症することが多く、進行が早い上、多発病変を作りやすいという特徴があり、エイズ関連リンパ腫の中でも予後が悪い。これまでエイズ関連EBV陽性日和見リンパ腫に対する有効な治療法は確立していない。CHOPなどの化学療法が有効とされるが、エイズ患者では骨髄抑制が問題となり、減量や中止を余儀なくされることがしばしばである。抗癌剤以外にもいくつかの薬剤がエイズ関連リンパ腫治療薬の候補として考えられている。高コレステロール血症治療薬であるHMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）もその一つである(Katano et al. PNAS 101:4960-5, 2004)。スタチンの一種であるシンバスタチンをEBVにより形質転換して得たB細胞株lymphoblastoid cell line (LCL)の培養上清に添加すると、LCLは増殖できず、細胞死に陥る。その増殖抑制効果は動物実験でも確かめられており、LCLを移植した重度複合免疫不全(severe combined immunodeficiency, SCID)マウスにシンバスタチンを投与するとLCLの増殖が抑えられ、生存期間が延長する。こうした報告はスタチンがエイズ関連EBV陽性日和見リンパ腫に有効である可能性を示唆するものである。しかし、LCLに細胞死を誘導できるような量は高コレステロール血症治療薬として用いられる濃度の数百倍であり、長期間の投与は筋融解症や神経変性などの副作用を起す可能性がある。

同様にLCLに細胞死を誘導する新規薬剤として期待されているものにdehydroxymethylepoxyquinomycin (DHMEQ)がある。DHMEQはNF- κ Bを特異的にブロックする薬剤として同定された化合物で、NF- κ Bが恒常的に活性化されている腫瘍に

おいてNF- κ Bの活性をブロックすることにより細胞死を誘導する(Watanabe et al. Blood 106:2462-71, 2005)。一方でNF- κ Bはさまざまな非腫瘍細胞でも活性化しており、これをターゲットとするDHMEQは特異性の問題がある。スタチンとDHMEQは、ともに最終的にはNF- κ Bの活性を標的とすることから、本研究ではこの2剤を併用し、LCLに対する有効性をin vitroとin vivoで検討し、エイズ関連EBV陽性日和見リンパ腫の新規治療法としての可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

EBV感染ヒトB細胞の細胞株LCLまたはEBV陰性バーキットリンパ腫細胞株BJABは10%牛胎児血清添加RPMI1640(抗生物質添加済)中で37°C、5%CO₂の培養器にて培養を行った。シンバスタチン(メルク社)は溶解、活性化した後、培養上清に加えた。DHMEQはdimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解後、溶解液を目的濃度になるよう培養上清に加えた。

2. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖はCell proliferation assay(XTT assay, ロシュ・ダイアグノスティックス社)により測定した。

3. 動物実験

1x10⁷のLCLをSCIDマウス(8週齢、日本クレア)の腹腔に接種した。LCLの生着率が100%でないことや、Kaplan-Meyer生存曲線の比較の際に一群10匹程度の個体数があれば有意差が出やすいことを考慮し、一群10匹として、Group 1: control, 2: statin 単独投与, 3: DHMEQ 単独投与, 4: statin+DHMEQ 併用とし、生存期間を記録、安楽殺後に検体の採取を行った。シンバスタチンはマウスでは代謝が早く、血中濃度を2 μ Mに保つためには計算上5 μ Mの濃度になるよう投与する必要があり、これは0.042mg/Mouse(20g)に相当する。また、DHMEQは8 mg/kgが至適投与量とされ、これは0.16mg/Mouse(20g)である。薬剤の投与

は LCL を腹腔接種する前日から接種後 30 日まで、週に 3 回行い、投与直前に各薬剤の上記必要量を 0.5% メチルセルロースに溶解し、マウスの腹腔に投与した。マウスの観察は細胞投与後、60 日まで行い、観察期間終了時に生存したマウスは安楽殺し、腫瘍の浸潤を病理学的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認(平成 19 年 6 月 4 日 承認番号 107022)を得た上で、同研究所の動物実験施設内感染実験区(P2 施設)で行われた。

C. 研究結果

1. LCL を用いた試験管内実験

スタチンと DHMEQ の LCL に対する有効性を比較した。LCL を 5 種類と BJAB に対してシンバスタチン、DHMEQ を別々に加え培養したところ、シンバスタチンでは細胞死が誘導されるまで 4-5 日を要したが、DHMEQ は 1-2 日でその効果が現れた。シンバスタチンでは LCL に特異的に細胞死が誘導され、BJAB には細胞死を誘導しなかった(図 1)。シンバスタチン投与 5 日後には 2 μM で LCL の 8 割が死細胞であった。一方、DHMEQ は細胞死誘導の期間は短いものの、BJAB にも LCL と同様に細胞死を誘導した。

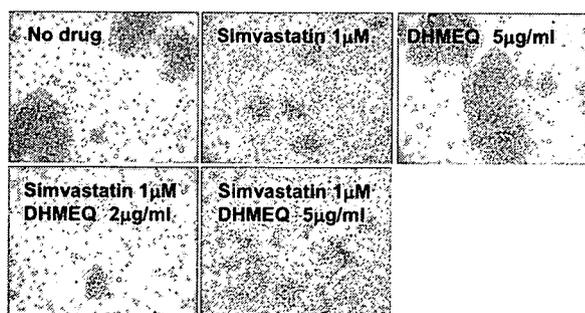


図 2. In vitro におけるシンバスタチンと DHMEQ の併用の検討 (1)

投与後 4 日後の細胞の状態を示す。LCL は通常クランプを作りながら増殖する(左上)。シンバスタチン 1 μM では小さなクランプが残り(中上)、また、DHMEQ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では大きなクランプが見られたが(右上)、シンバスタチンと DHMEQ を併用するとクランプはほとんど見られなくなる(下 2 つ)。

つぎに、シンバスタチンと DHMEQ の併

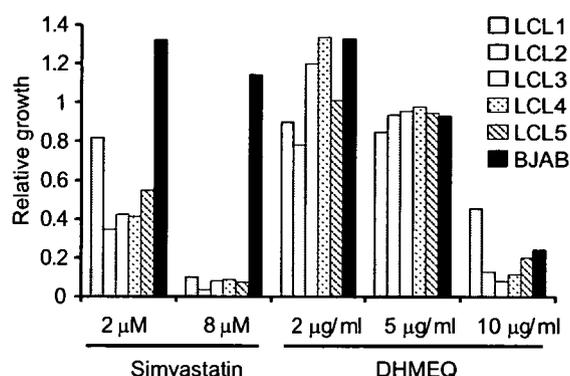


図 1. シンバスタチンと DHMEQ の LCL に対する細胞死の誘導

5 種類の LCL と BJAB に薬剤を投与し、4 日後の XTT assay の結果を示す。縦軸は薬剤を添加していない LCL の吸光度を 1 とした比を示す。

用について検討した。LCL は通常クランプを作りながら増殖するが、そこにシンバスタチン 2 μM または DHMEQ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を加えるとクランプは完全に消失し、ほとんどは死細胞となる。濃度を下げて、LCL にシンバスタチン 1 μM を加えると、濃度が十分でないため、小さなクランプが残存する(図 2)。また、DHMEQ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも大きなクランプが見られた。そこで、シンバスタチ

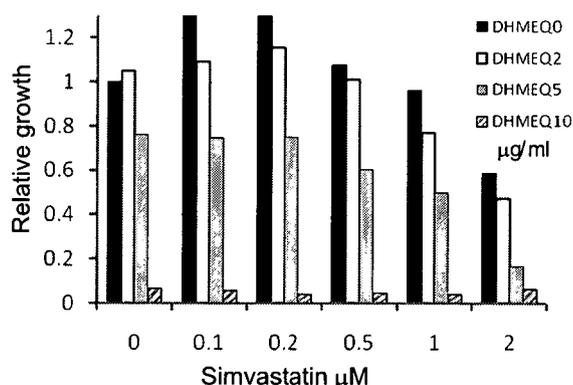


図 3. In vitro におけるシンバスタチンと DHMEQ の併用の検討 (2)

薬剤投与後 3 日後の XTT assay の結果を示す。図 1 と同様、縦軸は薬剤を添加していない LCL の吸光度を 1 とした比を示す。シンバスタチンの効用は 4-5 日かかるので、3 日後に半分程度の吸光度になっていることを効果の目安とした。細胞は図 1 の LCL1 を使用したが、複数の LCL で同様の結果が得られている。

ン 1 μM と DHMEQ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を培養上清中に併用して使用するとクランプはほとんど観察されなくなった (図 2 の下図)。細胞増殖アッセイではシンバスタチン 1 μM および DHMEQ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用でも十分な効果が得られることが示唆された (図 3)。

2. 動物実験

試験管内実験で併用の効果が認められたことから、実際に動物に発症したリンパ腫に対する有効性を確認するために、動物実験を行った。LCL を SCID マウスの腹腔に接種すると 1 - 2 ヶ月後に EBV 陽性のリンパ腫を発症する。この動物モデルにスタチンと DHMEQ の併用療法を試みた。コントロール群 (薬剤非投与群) では細胞接種後 60 日に生存したマウスは 10 匹中わずか 1 匹であり、病理組織検査では生存したマウスを含めて、全てのマウスからリンパ腫細胞が検出された (図 4)。シンバスタチン単独投与群は細胞接種後 60 日に 5 匹が生存し、Kaplan-Meyer 生存曲線ではコントロールと比べ有意な差があった (Log-rank test, $P < 0.05$)。一方で、DHMEQ 単独投与群、およびシンバスタチン-DHMEQ 併用群では細胞接種後 60 日での生存マウスはそれぞれ 0

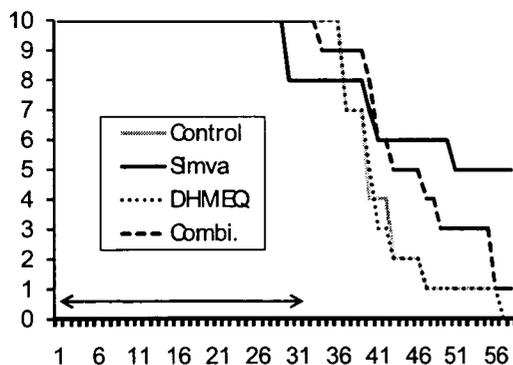


図 4. 動物実験の結果 (Kaplan-Meyer 生存曲線)

Control, Simva, DHMEQ, Combi. はそれぞれコントロール群 (薬剤非投与群)、シンバスタチン単独投与群、DHMEQ 単独投与群、シンバスタチン-DHMEQ 併用投与群を示す。凡例の下の方の矢印は薬剤の投与期間を示し、LCL を腹腔接種する前日から接種後 30 日までを示す。コントロール群とシンバスタチン単独投与群との間には Log-rank test で有意差が認められた。

匹と 1 匹であり、コントロールとの差はなかった。これらの結果は試験管内実験と異なり、動物実験においてはシンバスタチンと DHMEQ の併用投与による相加、または相乗効果は見られず、この併用投与が必ずしも EBV 陽性日和見リンパ腫に有効とは限らないことを示唆する。

D. 考察

スタチンはこれまで高コレステロール血症治療薬として長年使用されてきた実績がある。そうした意味では安全性が確認されている薬剤であるが、本研究で示したように抗リンパ腫薬として使用する際には通常使用される濃度よりもはるかに高い濃度が必要である。スタチンの長期大量投与には低頻度ながらも筋融解症や神経変性疾患などの副作用が報告されている。一方で、メカニズムは不明だがスタチンは従来から大腸癌やメラノーマの発症を抑える作用のあることが報告されており (Demierre et al. *Nat Rev Cancer*. 5:930-42. 2005)、抗リンパ腫作用もこうしたスタチンの副次的な効果の一つに加わるものである。臨床応用の際には改めて安全性の検証をする必要があるが、濃度の問題さえ解決すれば有効な治療薬として期待できる。こうした観点から、スタチンが低濃度で有効性を発揮するような併用薬剤を検索することは臨床応用を考える上で意義がある。

スタチンが EBV 陽性リンパ腫に細胞死を誘導する機序は、スタチンが接着因子 LFA-1 の細胞外ドメインに結合し、LFA-1 のリガンドである ICAM-1 との結合を阻害することに関係する。LFA-1 はリンパ球の主要な接着因子であり、EBV 感染は LFA-1 の発現を誘導し、細胞間の接着能を亢進することによりリンパ腫形成を誘導する。さらに EBV は自らコードする癌タンパク LMP-1 などを感染細胞の表面に発現させ、感染細胞を形質転換するが、LMP-1 も LFA-1 も細胞表面上のコレステロールの豊富な部位である lipid raft に局在する。スタチンは LFA-1

の細胞外ドメインに結合するだけでなく、コレステロール低下作用により、lipid raftを破壊し、lipid raft上に存在する分子の機能に大きな影響を与える。特に LMP-1 は raft上で3量体を形成してはじめて下流のシグナルを伝達することができるが、raftが破壊されると3量体の形成ができなくなり、下流の TRAF との結合が不可能となる。これにより、さらに下流の NF- κ B の活性が低下し、最終的に EBV 感染細胞が細胞死に陥る。これが、スタチンが LCL などの EBV 感染細胞に細胞死を誘導するメカニズムと考えられている。

DHMEQ は NF- κ B の活性を直接、阻害することから、スタチンと DHMEQ はともに最終的に NF- κ B の活性化が阻害されることがそのメカニズムとなる。しかし、スタチンの NF- κ B に対する影響は raft, LMP-1 を介した間接的なものであり、細胞死が誘導されるまでに4-5日を要するのはこうした間接的なメカニズムによる。スタチンと DHMEQ の併用は間接的および直接的に NF- κ B の活性化を阻害する薬剤の組み合わせであり、作用点が異なることと、2剤で作用時間が異なることはむしろ併用療法の効率を高めるものと期待された。本研究では試験管内実験ではこうした期待に沿った実験結果が得られたが、動物実験ではむしろ併用により、治療、予防効果の減弱が認められた。生体内では併用により予期せぬ薬剤の不活性化や作用機序を阻害する因子が存在したと思われるが、その要因を同定することは困難である。

これまでのエイズ関連リンパ腫の治療法の大きな問題点は抗癌剤による骨髄抑制にある。スタチンや DHMEQ はこれらの療法の補助療法として、抗癌剤との併用、あるいは他の方法が功を奏さなかった際のサルベージ療法として有望と思われる。スタチンと DHMEQ は単剤では投与量や特異性の問題があるが、この2剤の併用でなく、減量した抗癌剤との併用であれば、骨髄抑制などの副作用を抑えつつリンパ腫の治療

ができる可能性がある。したがって、今後は抗癌剤との併用を検討すべきであろう。

E. 結論

エイズ関連 EBV 陽性日和見リンパ腫の新規治療法として高コレステロール血症治療薬スタチンと NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の併用療法を試験管内実験と動物実験で検討した。試験管内実験では2剤の併用で抗リンパ腫効果の増強が見られたものの、動物実験では明らかな増強効果は見られなかった。これらの薬剤と他の抗癌剤などとの併用を検討すべきである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Ishak Mde, O., Martins, R.N., Machado, P.R., de Souza, L.L., Machado, L.F., Azevedo, V.N., Katano, H., Sata, T., Hasegawa, H., Vallinoto, A.C., and Ishak, R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. *J. Med. Virol.*, 79: 1537-1544, 2007.
2. Katano, H., Sato, Y., Hoshino, S., Tachikawa, N., Oka, S., Morishita, Y., Ishida, T., Watanabe, T., Rom, W., Mori, S., Sata, T., Weiden, M., and Hoshino, Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect.* 9: 1581-1589, 2007.
3. Kuhara, T., Yoshikawa, T., Ihira, M., Watanabe, D., Tamada, Y., Katano, H., Asano, Y., and Matsumoto, Y. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, 144: 79-85, 2007.
4. Ueno, T., Mitsuishi, T., Kimura, Y., Kato, T.,

Hasegawa, H., Katano, H., Sata, T., Kurane, S., and Kawana, S. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. Eur. J. Dermatol., 17: 539-540, 2007.

学会発表

国内

1. 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器におけるヒトヘルペスウイルスの定量. 第22回ヘルペスウイルス研究会 2007年6月、福岡.
2. 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器における

DNA ウイルスの感染プロファイル. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月、札幌.

3. 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆. サイトカインによるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)遺伝子の誘導. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月、札幌.

4. 片野晴隆. エイズ関連悪性腫瘍の感染病理に関する研究. 第53回日本病理学会秋期特別総会 2007年12月、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

B 細胞腫瘍化の主因である EBV を標的にした治療法開発

分担研究者 駒野 淳 国立感染症研究所エイズ研究センター第3室 主任研究官

研究要旨 悪性リンパ腫はエイズに伴う悪性腫瘍としては日本で最も多く、エイズ発症の初発疾患として顕れることもあり、治療が最も困難なエイズ関連疾患である。しかし、リンパ腫治療は未だ研究的な段階であり、その病因を同定し特異的治療法を確立することはエイズの予後を決定する重要なファクターとなる。エイズリンパ腫のうち、EBV 陽性の B 細胞リンパ腫はその多くの割合を占めており、リンパ腫の原因が EBV の存在に依存することが明らかである点において他のリンパ腫と異なる。EBV 陽性の B 細胞リンパ腫には特異的な治療標的分子として EBV 核抗原 EBNA1 の存在が指摘されているが、その分子標的候補としての評価は依然確立していない。本研究ではエイズに合併する EBV 陽性 B 細胞リンパ腫における治療・予防のための分子標的としての EBNA1 の評価を行いリンパ腫治療法開発に資することを目的にする。

A. 研究目的

悪性リンパ腫はエイズに伴う悪性腫瘍としては日本で最も多く、エイズ発症の初発疾患として顕れることもあり、治療が最も困難なエイズ関連疾患である。しかし、リンパ腫治療は未だ研究的な段階であり、その病因を同定し特異的治療法を確立することはエイズの予後を決定する重要なファクターとなる。エイズリンパ腫のうち、EBV 陽性の B 細胞リンパ腫はその多くの割合を占めており、リンパ腫の原因が EBV の存在に依存することが明らかである点において他のリンパ腫と異なる。EBV 陽性の B 細胞リンパ腫には特異的な治療標的分子として EBV 核抗原 EBNA1 の存在が指摘されているが、その治療標的としての重要性は近年指摘されているにもかかわらず、予防の分子標的候補としての評価は依然確立していない。

Epstein-Barr virus(EBV)は、多くの成人が感染しているヒトヘルペスウイルスである。また、EBV はバーキットリンパ腫や上皮性腫瘍といった、多くのヒト細胞の腫瘍化に関連するとされている。EBV の複製に必須とされているのが、Epstein-Barr virus nuclear antigen1(EBNA1)である。二量体化した EBNA1 は EBV ゲノム(エピゾーム)の複製起点に結合し、転写を活性化させる。現在までに、EBNA1 の核移行シグナルと二量体化ドメイン以外を欠失させた EBNA1 変異体である dominant-negative EBNA1(DNE1)を発現させることによって、EBV が感染した B リンパ腫細胞や上皮系腫瘍細胞株から EBV のゲノムを脱落させ、悪性増殖形質を低下させることが報告されている (Kennedy et al, PNAS 2003; Nasimuzzaman, et al Mol Therapy 2005)。しかしリンパ腫の治療・予防のための分子標的候補評価において、ウイルスの感染を防止するための分子標的であるかどうかは依然検索され

ていない。本研究は EBNA1 の阻害剤として DNE1 を使用し、DNE1 発現細胞が EBV 感染に対する抵抗性を獲得できるかを評価することを目的として、これを通じて EBNA1 に対する治療・予防のための分子標的候補としての評価を行い、新たな原因特異的リンパ腫治療および予防法開発に資することを目的とする。

B. 研究方法

(1) DNE1 発現ベクターの構築: DNE1 を GFP との融合タンパク質として発現するレトロウイルスベクター pCMMP GFP DNE1(GD) を構築した。DNE1 は Kennedy et al, PNAS 2003 に記載されているものを使用した。これは nuclear localization signal および dimerization and DNA binding domain のみを有する DNE1 である。pCMMP は CMV と MLV LTR の融合プロモーターから遺伝子発現を誘導する哺乳類細胞遺伝子発現ベクターでもあり、遺伝子の発現と機能解析も本ベクターにて行った。また陰性コントロールとして GFP のみを発現する pCMMP GFP を使用した(Komano et al., Mol Biol Cell 2004)。

(2) DNE1 発現と機能の確認: pCMMP GFP DNE1(GD) を 293FT にトランスフェクションして GD 発現を抗 GFP 抗体にて Western blot 法により解析した。EBNA1 依存的転写を抑制するかについては、EBNA1 依存的プロモーターにて luciferase を発現する FR-tk-Luc と EBNA1 を cotransfection すると同時に GD または GFP 発現ベクターを導入して転写レベルの減少を luciferase 活性にて測定した。

(3) レトロウイルスベクターによる DNE1 発現 ユニットの transduction : pCMMP, pVSV-G, pMDgag-pol を同時に 293T 細胞にトランスフェクションして 2 日後に培養上

清を回収して 0.45um で filter したものをウイルス液とした。ウイルス液には polybrene を添加した。これを、EBV 陰性バーキットリンパ腫細胞株 BJAB または B cell acute lymphocytic leukemia である EBV 陰性細胞株 BALL に感染させた。BJAB または BALL 細胞を $0.5-1.0 \times 10^5$ 個準備しこれにウイルス液 1 ml に resuspend して 4°C で 1 時間 rotate し細胞にウイルスを吸着させた後、培養液に置換して培養を続けた。

Gene transduction は GFP 蛍光により検出し、細胞増殖、形態等に関する検討を行った。

(4) DNE1 発現細胞に対する EBV 感染と EBV 遺伝子発現およびゲノム維持に関する検討: GD または GFP を導入した BJAB 細胞に対し EBV B95-8 株を polybrene を欠く条件下で MLV と同様の protocol にて感染させた。本実験では BJAB への感染効率がおよそ 5% となるウイルス量/感染条件であった。感染後およそ 2 週間にわたってウイルス遺伝子発現およびウイルスゲノム維持に関する基礎的検討を PCR にて行った。ウイルスの細胞への吸着は感染後 3 回細胞を培養液で洗浄した細胞由来のウイルスゲノム量にて、感染後のウイルスゲノム核内移行は感染後 1 日目の核内 DNA 中におけるウイルスゲノム量を BamHI W fragment に対する PCR primer を用いてそれぞれ quantitative PCR にて定量した。これは cellular genomic DNA 重量あたりの EBV genome W 断片検出量をウイルスゲノムコピー数としてあらわした。また、感染細胞におけるウイルス遺伝子発現は細胞由来の total RNA を使用した end point semi-quantitative RT-PCR にて検討した。これらの primer は全て過去に記載されたものを使用し、その reference は Brooks et al., J Virol 1993; Miller et al., J Virol 1993; Busson et al., J Gen Virol 1995;

Bell et al., J Gen Virol 2006 である。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

(1) DNE1 発現ベクターの構築: GFP-DNE1 (GD) は EBNA1 の アミノ酸 377-391 (NLS) から 451-641 (DNA binding and dimerization domain) までを GFP の N 末端側に融合させるように構築した。これを哺乳類発現ベクター pCMMP に AgeI-MfeI を用いてクローニングして pCMMPGD を構築した。以降 pCMMPeGFP をコントロールとして使用した (Kirchmaier and Sugden, J Virol 1997; Kennedy et al., PNAS 2003)。

(2) DNE1 発現と機能の確認: GD のタンパク質発現を pCMMPGD を transient に transfection した 293T 細胞にて確認した。Western blot において anti-GFP 抗体にて GD に期待される約 54kDa のシグナルを検出した。緑色蛍光の細胞内 distribution は核内に集積して観察され、期待された localization であった。EBNA1 機能に対する dominant-negative effect を確認するため、転写抑制が誘導できるかを確認したところ、dose-dependent に EBNA1-dependent tk promoter-driven luciferase activity の低下を検出することができた (図 1)。

(3) レトロウイルスベクターによる DNE1 発現ユニットの transduction: 293T, BJAB または BALL 細胞にウイルスを感染後 2-3 日後に GFP 陽性細胞が現れ、その割合はおよそ 20-50% であった。100%陽性の細胞集団を得るため、limiting dilution または FACS sorting により GFP 陽性細胞を cloning または bulk collection した。これらの細胞における GFP および GD の発現は 293T と同様に Western blotting にて

確認された (図 2) と同時に confocal microscopy により 293T と同様の細胞内 distribution を示した (図 3)。細胞増殖および細胞形態は GFP, GD 発現により明らかな違いを呈することはなかったが、クローン間での variation が BJAB にて観察された。

(4) DNE1 発現細胞に対する EBV 感染と EBV 遺伝子発現およびゲノム維持に関する検討: 増殖速度のほぼ同じ BJAB の GFP, GD 細胞クローンを使用して EBV 感染に対する GD の影響について検索した。ウイルス吸着効率には GD は影響せず、核内へのウイルスゲノム移行に対しても GD は抑制活性を示さなかった。EBV genome からの遺伝子発現は W promoter からの transcript は GD・GFP とともに検出されたが、GD 発現細胞で Wp からの transcript 量が少ない傾向にあった (典型的な結果について図 4 に示す)。Cp からの transcript 量には両者間で大きな違いを検出しなかった。LMP1, LMP2A, BARF0 transcript については全て GD が低い傾向にあった。ウイルスゲノム量は感染後から次第に減少し、感染後 3 週間まで検出された。しかし本実験で得られた GD 発現レベルにおいてはウイルスゲノムコピー数の推移は GD と GFP 発現細胞で相違を認めなかった (図 5)。

D. 考察

DNE1 を GFP と融合させた機能的な GD タンパク質発現を計画通りレトロウイルスベクターを利用して細胞に安定して発現させることに成功した。ウイルス感染に対し、本実験で得られた GD 発現レベルにおいては感染を完全にブロックすることはできなかった。また、ウイルスゲノムの欠落を増進することもできなかったが、ウイルス由来の transforming gene である EBNA5, LMP1 などの発現効率を低下させる

ことが明らかとなった。EBNA1 が BARF0 や LMP2a に対しても感染初期においては転写制御を行っていることが本実験によってはじめて明らかになった。EBNA1 が新規 EBV 感染に際しても B 細胞の癌化プロセスに対して抑制的に働くことが判明した。

実験的には BJAB クローニングによる細胞増殖または形態の多様性があるものが得られたが、GFP、GD 発現細胞によりその頻度が同程度であり、それ以外の遺伝子発現によっても同様な現象が観察されたので内在性の clonal variation であることが示唆された。よって clonal variation の差が少ない BALL を使用して bulk population による実験を最終的に行うことにした。今後は発現レベルが高い細胞での GD の影響を検索する事、定量的な実験を全ての遺伝子にわたって行うと同時にタンパク質レベルでのウイルス遺伝子発現確認を試みる予定である。

E. 結論

Dominant-negative EBNA1 を用いて EBV 感染初期過程における EBNA1 の影響を検索した結果、EBNA1 は EBV 感染初期における発がん活性を有するウイルス遺伝子発現を抑制することが示唆された。EBNA1 の機能障害がリンパ腫の発生を予防するための良い分子標的足りえることが示唆された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (AIDS, in revision)
- 2) Akihide Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda1, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)
- 3) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. (Traffic in press)
- 4) Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. In vitro translation to study HIV protease activity. Methods Mol Biol. 375: 135-49. 2007. Review.
- 5) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. Biochem Biophys Res Commun. Aug 3; 359(3):729-34,2007.
- 6) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting

- lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. AIDS. Mar 12; 21(5):575-82, 2007.
- 7) Futahashi Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. Cancer Sci. Mar; 98(3):373-9, 2007.
- 8) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions (Review) The Journal of AIDS Research. 9(2); 102-107, 2007.
1. 学会発表
(国際学会)
- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano, Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 2) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yoshiharu Miura, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. CD63 AND ITS MUTANTS INHIBIT FUSION OF CXCR4-CONTAINING VESICLES TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCK X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Urano Emiko, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, and Jun Komano, RErouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 4) Kei Miyagawa, Tsutomu Murakami, Yuki Ohsaki, Jun Komano, Toyoshi Fujimoto and Naoki Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and tip47 and its associated proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 5) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Donald M Engelman, and Zene Matsuda. The specific phase of membrane-spanning helix of HIV-1 gp41 is critical for intracellular transport of env. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- Jun Komano, Characterization of neutralizing antibodies purified from Japanese LTNP hemophiliacs, US-Japan Cooperative Medical Science Program 20th Joint Meeting of the AIDS Panels September 13-14, 2007 & NHPM2007 Presentation at AIDS Panel: Sept 14, 2007, Monterey, CA
(国内学会)
- 1) 藤秀義、辰巳絢子、栗田明宙、駒野淳、星野忠次：コンピュータ支援による HIV-1 治療薬の開発。レトロウイルス研究会夏期セミナー 2007 プログラム 2007 年
- 2) 濱武 牧子 駒野 淳 浦野 恵美子 巖馬華 中原 徹 堤 浩 宮内 浩典 森川 裕子 玉村 啓和 杉浦 互 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する 6 アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 熊本エイズセミナー 2007 年、熊本
- 3) 駒野 淳 浦野 恵美子 巖馬華 中原

- 徹 堤 浩 濱武 牧子 宮内 浩典 森川 裕子 玉村 啓和 杉浦 亙 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年, 札幌
- 4) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Cyclin K/CPR4による HIV-1 複製抑制とそのメカニズムの解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年, 札幌
- 5) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. Gag タンパク質の形質膜輸送シグナルがミリスチル化であることのウイルス学的意義について. 第21回日本エイズ学会学術集会, 2007年, 広島
- 6) 浦野 恵美子、奥長 造之、森川 裕子、駒野 淳. Co-chaperone タンパク質 DNA J/HSP40 family による HIV-1 複製抑制. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007年, 横浜
- 7) 濱武 牧子、二橋 悠子、青木 徹、山本 直樹、駒野 淳. Biophysical analysis of homotypic interaction facets that mediate the clustering of the G-protein-coupled receptor CXCR4 in the absence of SDF-1alpha. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007年, 横浜
- 8) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. 非ミリスチル化 Gag を用いたレトロウイルス Gag の Vps 輸送経路を通過することによる影響およびそのウイルス学的意義. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007年, 横浜
- 9) 辰巳 絢子、藤秀義、駒野 淳、根矢三郎、星野 忠次. HIV-1 の RNaseH を標的とした新規抗 HIV 薬の設計・評価・合成、日本薬学会第128年会, 2008年
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

図1 Verification of GD function by a transient transfection assay

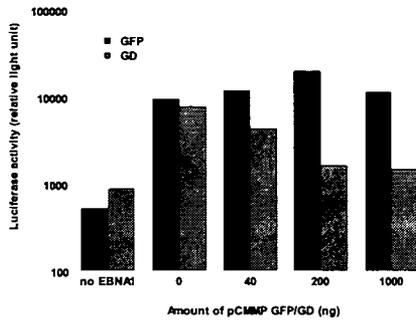


図2 Expression of GD in BJAB cells examined by Western blotting

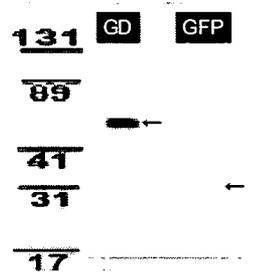


図3 Distribution of GD and GFP in BALL cells

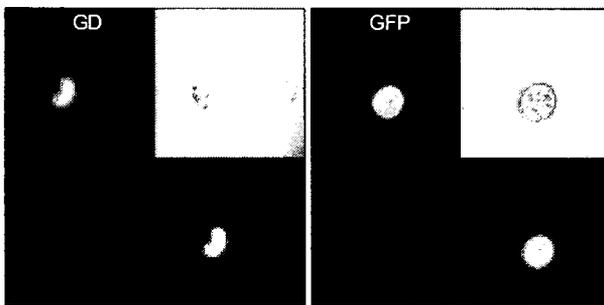
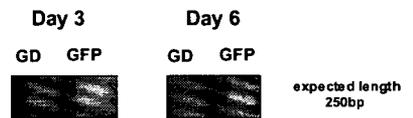
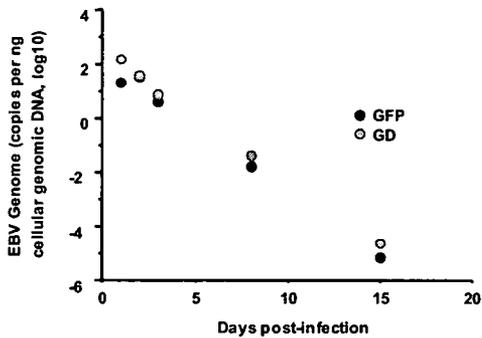


図4 Expression of GD decreased the Wp-driven transcription



*WpはEBVのmajor transforming genesであるEBNA2,3などの遺伝子発現を制御するプロモーターである。

図5 Expression of GD did not accelerate the loss of EBV DNA



EB ウイルスによるリンパ腫発症モデルの開発

分担研究者 藤原成悦 国立成育医療センター研究所母児感染研究部 部長

研究要旨 エイズリンパ腫モデルマウス開発の第一段階として、EB ウイルス（EBV）持続感染マウスを作製・解析した。NOD/Shi-*scid*/γc^{null} マウス（NOG マウス）に臍帯血由来造血幹細胞を移植してヒト化したのち少量（ $\leq 10^1$ TD₅₀）の EBV を感染させることにより、マウスの一般状態に変化が認められない持続感染状態を誘導することに成功した。持続感染マウスのウイルス学的・病理学的・免疫学的解析により、持続感染の成立と維持に免疫応答が役割を果たすことなど、ヒト健常者の EBV 潜伏感染との類似点が認められた。

A. 研究目的

エイズ患者に発生するリンパ腫（エイズリンパ腫）の約半数で、EB ウイルス（EBV）が発症に深く関わると考えられている。EBV は *in vitro* でヒト B リンパ球を不死化しリンパ芽球様細胞株を樹立する能力を持つ。このリンパ芽球様細胞に相当する細胞は健常者体内においては、EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞により速やかに除去されるが、エイズ患者では免疫監視機構破綻のため無制限に増殖しリンパ腫発症に至ることがある。従って、EBV によるヒト B リンパ球増殖の誘発機構解明はエイズリンパ腫発症機構の解明および治療法開発に必須の基盤研究となる。また、個体レベルでのリンパ腫発症機構の解析や新規治療法の評価には動物モデルが必要である。EBV 関連リンパ腫の小動物モデルとしては従来 *scid* マウスが用いられてきたが、このマウスではウイルス特異的免疫応答が再現されていなかった。NOD/Shi-*scid*/γc^{null} マウス（NOG マウス）は我が国で最近開発された免疫不全マウスであり、造血幹細胞（HSC）の移植により、EBV の主な標的となる B 細胞の他、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞など主要な免疫系細胞の発生が認められる（ヒト化マウス）。これまでの我々の研究により、ヒト化 NOG マウスには EBV 感染が成立し、主に高濃度のウイルス感染によりリンパ腫

が発生すること、EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されること等が示されている。また時にリンパ腫を発症せず長期生存するマウスも認められた（持続感染マウス）。通常の EBV 関連エイズリンパ腫では、まず EBV が潜伏感染を確立したのちに HIV-1 が感染し、免疫不全の進行とともにリンパ腫を発症するという経過をとる。従って、この持続感染状態をヒト健常者の EBV 潜伏感染と同等のものと仮定すれば、持続感染マウスに HIV を感染させてリンパ腫が発生した場合、それがエイズリンパ腫モデルとして最適であると考えられる。本年は、このような EBV 関連エイズリンパ腫モデル作製の第一段階として、ヒト化マウスにおける EBV 持続感染成立条件を検討し、また持続感染状態のウイルス学的・病理学的解析を行った。また、HIV-1 感染に引き続くリンパ腫発生をモデル実験で再現するためには、このマウスにおける T 細胞応答が実際に防御機構として機能していることが前提となるので、その点について検証した。

B. 研究方法

1. 臍帯血

東京臍帯血バンク分離保存施設（日本大学医学部）に提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できないものを利用した。

2. NOD/Shi-*scid*/γc^{null} マウス（NOG マウス）

NOD/Shi-*scid*/ γ c^{null} マウス（以下、NOG マウス）は NOD/Shi-*scid* マウスと、IL-2 受容体コモン γ 鎖ノックアウトマウスを掛け合わせたもので、ヒト HSC の移植に最も適した免疫不全マウスの一つである。雌 6~8 週齢の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育・実験を行った。

3. 臍帯血造血幹細胞の分離と移植

臍帯血から Ficoll 比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34+ アイソレーションキット（Miltenyi Biotec）あるいは Stemsep キット（ステムセルテクノロジー社）を用いて CD34 陽性 HSC を分離した。1×10⁴~1.2×10⁵ 個の CD34 陽性細胞を、尾静脈内投与により移植した。その後、フローサイトメトリーにより末梢血、骨髄、脾臓、胸腺などからヒト CD45、CD19、CD3 陽性細胞を検出し、それぞれヒトリンパ球、ヒト B 細胞、ヒト T 細胞分化の指標とした。

4. EBV 感染実験

EBV は、Akata 細胞の培養上清を 0.45 μ m フィルターを通過させたのちに尾静脈内に接種した。

5. フローサイトメトリー

Beckman Coulter 社 Cytomics FC-500 を用いて解析した。

6. EBV 遺伝子発現の解析

組織内の EBV 蛋白質 EBNA2 および LMP1 は免疫化学染色により、また EBV がコードする小分子 RNA である EBER は in situ hybridization により検出した。また、RT-PCR により末梢血細胞および各臓器における EBV 遺伝子発現を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血

提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 不顕性持続感染成立条件の検討

異なる提供者に由来する HSC を移植した 2 群（各群 6 頭）のヒト化マウスに、10³, 10², 10¹, 10⁰, 10⁻¹ TD₅₀ (50% transforming dose) の EBV を感染させ、末梢血 EBV DNA 量、末梢血リンパ球マーカー発現および、体重等一般状態を定期的に観察した。各群から 1 頭ずつを対照として培養液を注射した。両群のマウスのうち 10³ および 10² TD₅₀ の感染を受けたものは 5~10 週間にリンパ腫を発症し一般状態が極めて悪化したため安楽死させた。他のマウス（10¹, 10⁰, 10⁻¹ TD₅₀）は、22 週間の観察期間中著変を認めなかった。実験終了時の解析では、脾臓、肝臓をはじめとする諸臓器に病的変化を認めなかったが、EBV DNA が検出され、持続感染状態であることが判明した（表 1）。

2. 不顕性持続感染マウスの解析

比較的低濃度（10¹, 10⁰, 10⁻¹ TD₅₀）の EBV を感染させたマウスでは、末梢血 EBV DNA レベルが変動し、一部のマウスではいったん上昇したのち検出感度以下にとどまった（図 1A）。また、EBV DNA 上昇にやや遅れて末梢血 CD8(+)T 細胞の増加が認められた（図 1B）。実験終了時（感染後 22 週）、脾臓組織において EBER in situ hybridization を行ったところ EBER 陽性細胞（EBV 感染細胞）が散見された（図 2）。

3. 持続感染成立における免疫応答の役割の検討

ヒト化 NOG マウスでは、HSC 移植後約 2 ヶ月から B 細胞、4 ヶ月から T 細胞の分化が認められる。EBV 関連 LPD 発症に対する T 細胞免疫応答の防御機能を検証するために、移植後 3 ヶ月で B 細胞のみが末梢血に認められる時期（6 頭）と、6 ヶ月で T 細胞が十分分化した時期（6

頭)の両者においてEBVを感染させたところ、3ヶ月マウスでは、6ヶ月マウスと比較して、LPD発症時期が早く、末梢血および諸臓器におけるEBV DNA量が高いことが示された。さらに、HSCの違いによる影響を除くために、同一提供者由来HSCによるヒト化マウス12頭を用いて実験を行ったところ、結果は同様であり、移植後6ヶ月で感染させたマウス(6頭)では、3ヶ月で感染させたもの(6頭)と比べてリンパ腫の発症が早く、早期に重篤化する傾向が認められた。

4. 免疫抑制剤投与実験

不顕性持続感染状態のマウスにHIVを感染させエイズリンパ腫モデルを作製する計画は、不顕性持続感染の維持に免疫監視機構が関与することを前提とする。この点を検証するために、免疫抑制剤投与実験を行った。4 TD₅₀のEBVを感染後35日目以降 cyclosporine A (5~10 mg/kg/day)あるいは抗CD3抗体OKT3 (2 µg/ml)を静脈内投与したところ、投与後35日において、対照群5頭のうち3頭が生存していたのに対して、cyclosporine A投与群は5頭すべて、OKT3投与群は3頭全てが死亡した(図3)。剖検の結果、死亡マウスはリンパ腫を発症したことが示された。これは、不顕性持続感染状態の維持、すなわちリンパ腫の発症阻止に免疫監視機構が関与することを示唆している。

D. 考察

エイズリンパ腫のマウスモデルを作製し、治療法開発および治療プロトコル最適化に応用することが、本研究課題における分担研究者の役割である。本年度は、エイズリンパ腫モデル作製の第一段階であるEBV持続感染マウスの作製条件の検討及び持続感染マウスのウイルス学的病理学的検討、持続感染維持にたいする免疫監視機構の役割について検討した。

ヒト化NOGマウスのEBV感染では、感染ウイルス量が感染の帰結に大きく影響することが示された。比較的高濃度(10³および10² TD₅₀)では、リンパ腫が高頻度に発生し、それ以下のウイルス濃度(10¹, 10⁰, 10⁻¹ TD₅₀)では、主に不顕性の持続感染が成立した。従って、不顕性持続感染状態の誘導には、10¹ TD₅₀以下のEBV

感染が適すると考えられた。

このような低濃度で感染させると、末梢血EBV DNAが一時的に上昇したのち検出感度以下に低下するマウスが多く見られた。また、末梢血EBV DNAの上昇にやや遅れて末梢血CD8(+)^T細胞の増加が認められたことから、EBV特異的T細胞が誘導されたと考えられる。脾臓などの組織を病理学的に観察すると、EBV感染細胞は極めて低頻度に存在し、増殖傾向を認めなかった。

HSC移植後3ヶ月および6ヶ月のマウスを用いた感染実験では、ヒトT細胞が充分分化した時期において、リンパ腫の発症に対してより抵抗性であることが示唆された。さらに、cyclosporine Aや抗CD3抗体など免疫抑制剤がリンパ腫の発症を促進することを示唆する結果が得られた。これらの結果は、免疫監視機構がリンパ腫に対して抵抗性を与えることを示唆している。今後さらにマウスの個体数を増やし結果を確認する予定である。

これらの結果をまとめると、低濃度のEBVを感染させ不顕性持続感染状態となったマウスは、EBVの潜伏感染を受けた健常者と類似する状態にあり、この状態のマウスにHIVを感染することにより、免疫不全が誘導されエイズリンパ腫類似のリンパ腫が発生する可能性が高いと考えられた。来年度以降はこれらの実験を遂行し、EBV単独の感染で発症するリンパ腫と比較するとともに、治療薬の評価、新規治療プロトコルの評価に応用する計画である。

E. 結論

ヒト化NOGマウスに低濃度(≤10¹ TD₅₀)のEBVを感染させることにより効率よく持続感染状態を誘導することに成功した。この持続感染の維持には免疫監視機構が関わること、従ってHIVにより免疫不全状態をもたらすことによりエイズリンパ腫モデルを作製しうることを示唆された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表