

- 5) 照井康仁：ニューモシスチス肺炎予防化学療法の領域 25(11) 85-91, 2009
- 6) 照井康仁：カリケアマイシン抱合抗CD22 抗体によるB細胞性リンパ腫の治療研究 血液・腫瘍科 59(4), 2009
- 7) 照井康仁：CD22 3章 おさえておくべき検査の知識 がん診療レジデントハンドブック 畠清彦編著 中外医学社 134-135, 2009
- 8) 照井康仁：悪性リンパ腫に用いられる分子標的治療薬 臨床腫瘍プラクティス 5(4) 362-367, 2009
- 9) 照井康仁：HyperCVAD ±MA 療法 2. 治療レジメンと治療遂行上の注意点 悪性リンパ腫治療マニュアル 改訂第3版 飛内賢正、堀田知光、木下朝博編集、南江堂 256-258, 2009
- 10) 照井康仁：カリケアマイシン抱合CD22 抗体によるB細胞性リンパ腫の治療研究 血液・腫瘍科 59(4) 402-406, 2009
- 11) 畠清彦、照井康仁：B細胞性リンパ腫におけるリツキシマブ耐性癌と化学療法 36(4) 548-551, 2009
- 12) 照井康仁、畠清彦：腫瘍量とリツキシマブ効果 血液・腫瘍科 59(6) 685-690, 2009

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

未治療の HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する 抗レトロウイルス療法併用 R-CHOP 療法の有用性に関する

多施設共同臨床第Ⅱ相試験

分担研究者 田沼順子 国立国際医療センター戸山病院
エイズ治療研究開発センター

研究要旨 抗レトロウイルス療法（HAART）により、HIV 感染者の長期予後は飛躍的に改善し、日和見疾患による死亡数も激減したが、HIV 関連悪性リンパ腫は、相対的に増加しており、今なお予後不良の悪性疾患である。しかし、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する標準治療は、確立されておらず、治療成績に関するデータの蓄積が急務である。そこで、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する R-CHOP 療法の、腫瘍縮小効果と安全性を評価する、多施設共同研究を開始した。本研究は、HIV 関連悪性リンパ腫を対象とした、日本初の多施設共同臨床試験であるが、学術的意義のみならず、本試験のネットワークを通じて、専門性の高い HIV 関連悪性リンパ腫の診療体制を整備するといった社会的貢献が期待されている。

A. 研究目的

HIV 感染者においては、HIV 非感染者に比べて、悪性リンパ腫の発生頻度が 100 倍も高いことが知られている。抗レトロウイルス療法（HAART）により、HIV 感染者の長期予後は改善され、日和見疾患による死亡数も激減したが、HIV 関連悪性リンパ腫は、相対的に増加しており、今なお予後不良の悪性疾患である。しかし、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する標準的治療は、未だ確立されていない。通常、HIV 非感染者の CD20 陽性非ホジキンリンパ腫と同様に、R-CHOP 療法が選択されることが最も多いが、効果と安全性に関する一定の見解は得られておらず、治療成績に関するデータの蓄積が急務である。

そこで、本邦における HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する R-CHOP 療法の腫瘍縮小効果を検証すると共に、HAART 療法や日和見予防対策などの支持療法を強化した場合の治療関連感染症死や日和見疾患発生頻度を検証することを目的に、多施設共同研究を開始した。

なお、本試験は、2007 年 9 月 6 月の当院倫理委員会で承認された「未治療の CD20 陽性 HIV 関連非ホジキンリンパ腫に対する抗レトロウイルス療法を併用した R-CHOP 療法の有用性に関する臨床試験」（当院倫理委員会承認番号 467）のプロトコルを踏襲し、多施設に拡大したものである。

B. 研究方法

1. 試験デザインと治療プロトコール

多施設共同臨床第Ⅱ相試験である。

治療プロトコールは、非エイズ aggressive lymphoma の標準療法であり、安全性も確立している CHOP 療法を採用した。Rituximab の併用は奏効率を向上することが明らかになっているが、HIV 陽性例における安全性は確立していない。本試験では、必ず HAART を併用することとし、積極的な日和見疾患対策を推奨しつつ、Rituximab を併用することとした。

2. エンドポイント

本試験の第一の目的は、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する初回標準治療としての、R-CHOP 療法の寛解率の確認である。そのため、主要評価項目 (primary endpoint) を治療終了時の完全寛解率 (complete response) とした。

副次的評価項目 (secondary endpoint) としては、2 年時点での無増悪生存率 (progression-free survival) および生存率 (overall survival)、無イベント生存率 (期間) Event-free survival (EFS)、4 コース、6 コース、8 コース終了時の寛解率、重要な有害事象・治療感染死亡、日和見疾患発生頻度、など、治療有効性と治療関連毒性を評価する予定である。

3. 対象・登録期間

対象は、病理学的に診断された、未治療の HIV 陽性 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫で、測定可能な標的病変を有し、performance status score 0 から 3、登録時年齢が 20 歳以上 70 歳未満とした。バーキットリンパ腫と中枢神経浸潤例、またコントロール不良な感染症合併例は除外した。

永井らの行った全国調査では、回答のあった 349 施設中 143 施設 (41%) で HIV 関連悪性リンパ腫を経験しており¹⁾、年間発症数は 20-30 例と思われる。よって、全国の拠点病院等に呼びかけを行うことにより、年間 15 例/年の登録は可能と考えられる。過去の報告によると、HIV 関連非ホジキンリンパ腫の CDE または CHOP による完全寛解率は、およそ約 50% である²⁾。一方、海外における HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する R-CHOP 療法の完全寛解率は 47-77%³⁻⁵⁾ である。本研究において、完全寛解が 65% に期待さ

れると仮定し、閾値を 45% とした場合、有意水準 0.05 (片側)、検出力 0.80 として統計学的に必要なサンプル数を推計すると、最低 38 例となる。事後不適格や逸脱等の確率を 10% と仮定し、目標症例数は 42 例とした。

登録期間は 3 年 (但し予定症例数に達した時点で終了)、主たる解析終了後も副次的評価項目の評価目的にて登録終了後 2 年間を追跡期間とした。

(倫理面への配慮)

本試験は、ヘルシンキ宣言 (2008 年ソウル改訂) の精神に従い、「臨床試験に関する倫理指針」(平成 15 年 7 月 30 日制定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 7 月 31 日全部改正、厚生労働省) に準拠して実施する。また、本試験が実施される各施設において、倫理委員会で承認を得てから行われる。

C. 研究結果

本年度は、本試験の研究代表者として、多施設共同プロトコールの作成と、研究体制の整備を行った。

参加施設は、エイズ診療拠点病院・ブロック拠点病院を中心に 11 施設が登録され、事務局とデータセンターが国立病院機構名古屋医療センター (臨床研究センター) 内に設置された。

以下のごとく、参加施設は全国に広がる。

施設名 (施設代表者) : 北海道大学第二内科 (遠藤知之)、国立病院機構仙台医療センター血液内科 (伊藤俊広)、都立駒込病院感染症科 (味澤篤)、東京医科大学臨床検査医学科 (四本美保子)、国立国際医療センター戸山病院エイズ治療・研究開発センター (田沼順子)、横浜市立市民病院血液腫瘍内科 (仲里朝周)、国立病院機構名古屋医療センター血液内科 (永井宏和)、国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科 (上平朝子)、広島大学輸血部 (藤井輝久)、国立病院機構九州医療センター免疫感染症科 (南留美)、熊本大学血液内科 (宮川寿一)

新たに作成された多施設共同プロトコールは、研究代表施設である当院の倫理委員会において、承認を得て (申請番号 678、承認通知 平成 21 年 12 月 14 日受理)、平成 21 年 12 月 15 日に患者登録が開始された。

D. 結論

本研究は、エイズリンパ腫治療を対象とした、日本初の多施設共同臨床試験であり、エイズリンパ腫治療指針を作成する上で、質の高い evidence を提供することを目的としている。

また、社会的な側面として、本試験を通じて、全国的な研究体制が整備されたことは、大変意義深い。エイズリンパ腫の治療は、HAART と抗がん剤の薬物相互作用や、多岐にわたる合併症のため、しばしば困難を極め、非エイズリンパ腫の治療時とは異なる配慮が必要な、専門性の高い分野に属する。本試験を通じて組織されたネットワークは、エイズリンパ腫の診療上重要な情報交換の場となり、高度医療の均点化に寄与するものと考えられる。

今後は、本臨床試験を継続するとともに、本試験で整備されたエイズリンパ腫診療ネットワークを通じて、活発な情報交換とエイズ関連リンパ腫の疫学的研究、病態解明の基礎研究に貢献するシステムの構築等、実施してゆきたい。

E. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 古西満、菊池嘉、小田原隆、富成伸次郎、永井英明、今村顕史、田沼順子、善本英一郎. 第 22 回日本エイズ学会シンポジウム記録 シンポジウム「抗 HIV 療法をいつ、どの薬剤で始めるか-症例経験から考える-」エイズ関連悪性リンパ腫における HAART. 日本エイズ学会誌、11:75-80, 2009

2. 学会発表

(国際学会)

なし

(国内学会)

1) 萩原将太郎、田沼順子、岡慎一. AIDS 関連リンパ腫: 当院における後方視的検討. 第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会、2009 年 10 月 30 日、東京

2) 萩原将太郎、田沼順子、岡慎一. 難治性・再発

性 AIDS 関連リンパ腫の後方視的解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26-28 日

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

参考文献)

- 1) Nagai H et al: Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol* 87:442-443, 2008
- 2) Sparano JA, Phase II trial of infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Trial (E1494). *J Clin Oncol.* 22:1491-500. 2004
- 3) Kaplan LD, et al. Rituximab does not improve clinical outcome in a randomized phase 3 trial of CHOP with or without rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin lymphoma: AIDS-Malignancies Consortium Trial 010. *Blood,* 106:1538-1543. 2005
- 4) Boué F, et al. Phase II trial of CHOP plus rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 24:4123-8. 2006
- 5) Ribera JM, et al; PETHEMA, GELTAMO, GELCAB and GESIDA Groups. Safety and efficacy of cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone and rituximab in patients with human immunodeficiency virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: results of a phase II trial. *Br J Haematol.* 4:411-9. 2

エイズ合併リンパ腫の分子標的治療法開発に関する研究

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 教授

研究協力者： 片野晴隆（分担研究者：国立感染症研究所感染病理部）
中野和民、山岸誠（東京大学大学院新領域科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）
堀江良一（北里大学医学部）
梅澤一夫（慶應義塾大学理工学部）

研究要旨 エイズ合併リンパ腫検体由来 RNA の解析を行ったところ、small RNA が比較的分解されずに保存されていることがわかった。Small RNAのうち、microRNA は内在性の機能性 RNA であり、複数の遺伝子発現を負に制御する因子として細胞の様々な機能に非常に重要である。また miRNA の発現異常は細胞の腫瘍化、悪性を強く誘導することから、本年度の研究ではこの miRNA に着目し、とくに NF- κ B の活性化に関連する miRNA の発現及び機能解析を行い、以下のことを明らかにした。(1) エイズリンパ腫検体はコントロール RNA と比較して miR-31 の発現が減少していることがわかった。(2) miR-31 の標的遺伝子として MAP3K14 (NIK)を同定し、miR-31 の発現低下が NIK の過剰発現を誘導することを示した。(3) miR-31 は NIK を負に制御することにより NF- κ B の活性化を抑制する因子であることを明らかにした。(4) NF- κ B pathway のうち、miR-31 は Noncanonical pathway の上流に位置し、膜からの刺激に対して負に働く。(5) miR-31 の発現は転写レベルで制御されており、その分子メカニズムとしてヒストンのメチル化による抑制的クロマチン構造であることが ChIP assay により示唆された。以上の研究データから、エイズリンパ腫の新たな分子メカニズムの可能性が示され、同時に NF- κ B の新たな経路を見いだすことに成功した。

A. 研究目的

HIV 感染者はエイズ発症期に、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を合併する。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)。

エイズに合併するリンパ腫 (AIDS-related lymphoma, ARL) 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。このような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。また、2001 年の WHO 分類で、HHV8/KSHV の感染が診断基準とされた Primary Effusion Lymphoma (PEL)は、その約 80%が HIV 感染者に認められる

(Kobayashi et al., Act Haematol 2007;117:132)。ARL の中で PEL が占める割合は 5%以下とされており(Chen et al., The oncologist 2007;12:569)、頻度は少ないが、エイズ患者に高発し、50%生存期間 6.2 ヶ月と言う予後不良のウイルス性の悪性リンパ腫である(Boulanger et al., J Clin Oncol 2005;23:4372)。

HIV 感染者の 5~20%の例でエイズ合併リンパ腫を発症するとされ、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。我々は昨年度までに NF- κ B の特異的阻害剤である DHMEQ を用いて、LCL および PEL 細胞株における NF- κ B 活性抑制効果および細胞死誘導能を報告して

きた。また種々の PKC 阻害剤を用いた実験を行い、NF- κ B pathway の重要性を見いだした。

今年度は、都立駒込病院及び国立感染症研究所で凍結保存されているエイズ合併リンパ腫検体を用いて、実際のエイズリンパ腫細胞における NF- κ B 活性化の分子メカニズムを解析することを目的とした。昨年度のデータから検体の RNA の分解が認められたが、small RNA は比較的分解されずに保存されていることを発見した。そこで、近年注目されている miRNA の発現解析を行うこととした。miRNA は 21-23mer の小さな RNA で、様々な遺伝子の 3'UTR に結合し、遺伝子発現を負に制御する機能性 RNA であるが、標的配列の揺らぎが存在するため、一つの miRNA が様々な遺伝子の発現を制御する非常にインパクトの大きい細胞性因子として研究が急速に進んでいる。miRNA の発現異常は、細胞内の遺伝子発現の攪乱を引き起こし、腫瘍化あるいは悪性化と強く結びついている。これらの背景からもエイズリンパ腫における miRNA の解析は必須であると考えられた。

我々はこれまでに NF- κ B の活性化に関わることが示唆される miRNA を同定しており、エイズリンパ腫検体における miRNA の発現解析及び NF- κ B の活性化に与える影響を検討することにより、患者由来のサンプルから NF- κ B の活性化メカニズムにアプローチした。

B. 研究方法

(1) エイズリンパ腫サンプルを用いた microRNA (miRNA)の発現解析

エイズリンパ腫検体、及び正常リンパ節標本より抽出した total RNA を用いて、注目する miRNA に特異的な定量的 RT-PCR を行うことにより(miRNA Assays, Applied Biosystems)、miR-31 および Internal control として RNU48 を定量した。定量には TaqMan probe を用いた real-time PCR により検出を行った。

(2) エイズリンパ腫で減少している miR-31 の標的遺伝子の決定

miR-31 の機能解析を行うため、標的となる遺伝子のスクリーニングを行った。まず MiRanda、TargetScan、Pic Tar、PITA という 4 つの標的予

測アルゴリズムを用いて miR-31 の標的候補遺伝子を絞り込み、スコアが高く、また細胞の増殖や生存に関わるシグナル伝達因子 5 遺伝子について、3'UTR を Luciferase 遺伝子に連結したレポーター plasmid を作成し、Dual Luciferase assay (Promega)により標的遺伝子を決定した。またその確認の為に、miR-31 の Seed region に相補的な結合領域に変異を導入したレポーターも作成し、検討を行った。

(3) NF-κB pathway における miR-31 の機能解析
miR-31 の減少が細胞にどのような影響を与えるのかを検討するために、NIK を過剰発現している ATL 患者由来細胞株 TL-Om1 細胞に miR-31 前駆体(Applied Biosystems)を導入し、その影響を Western blotting, EMSA, NF-κB-reporter assay により解析を行った。また HeLa 細胞に miR-31 inhibitor (Applied Biosystems)を導入し、NF-κB の活性化に与える影響を検討した。膜からの刺激による NF-κB の活性化に対する miR-31 の機能解析には、レトロウイルスベクターを用いて、miR-31 を恒常的に発現する細胞株を作成し、TNF-αおよび BAFF に対する応答性を Western blotting および EMSA で評価した。

(4) miR-31 発現減少の分子メカニズムの解析
エイズリンパ腫で減少している miR-31 の発現量を規定する因子を同定するために、ゲノム中の miR-31 をコードする領域について、ChIP assay を用いてヒストンのメチル化の解析を行った。各メチル化特異的ヒストン抗体を用いて免疫沈降したのち、miR-31 領域、MYT1 遺伝子領域、GAPDH 領域について real-time PCR を用いて定量を行った。

C. 研究結果

(1) エイズリンパ腫サンプルの miRNA 発現解析

前年度に Bio Analyzer を用いてエイズリンパ腫サンプル由来 RNA の質を評価した結果、mRNA、rRNA のような長い RNA の分解が広く認められた。そこで、成熟した miRNA が 21-23mer と短く、比較的安定して存在することに注目し、その存在量について miRNA specific quantitative

RT-PCR により検討した。その結果 snoRNA の一種で miRNA の Internal control として使用されている RNU48 の発現量が、健常者 PBMC と同レベルの発現が確認できるサンプルが複数利用できることがわかった(図 1)。

エイズリンパ腫のほとんどが DLBCL であり、DLBCL における恒常的な NF-κB の活性化が悪

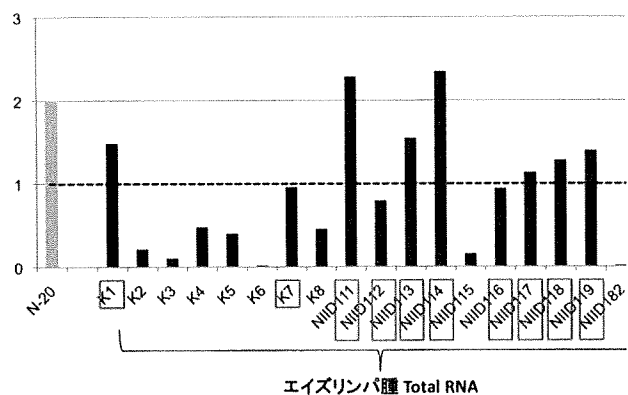


図 1. エイズリンパ腫検体における miRNA の発現チェック。エイズリンパ腫由来 RNA から RNU48 に特異的な RT-PCR を行い、miRNA の質のチェックを行った。赤い四角で示したサンプルについては miRNA の定量が可能であることがわかった。緑のバーは健常者 PBMC 由来。

性度と相関があると報告されている(Compagno et al., Nature 2009;459)。B 細胞における miRNA の網羅的解析は世界中で進められており、本研究ではむしろ特徴的な miRNA の発現変動と、その機能解析、とくに NF-κB に焦点をあて研究を進めた。我々はこれまでに microRNA-31 (miR-31)の発現量が、NF-κB に影響を与えることを見いだしており、エイズリンパ腫における miR-31 の発現異常の有無に注目し、検討を行った。

エイズリンパ腫 9 検体と比較対象としてリンパ節を始めとする各種 RNA を用いて、miR-31 の存在量を定量 PCR 法により検討した結果、複数のエイズリンパ腫検体において miR-31 の発現量が大きく減少しており、全体的に低い発現量であることを見いだした(図 2)。

(2) エイズリンパ腫で減少傾向が見られた miR-31 の標的遺伝子の決定

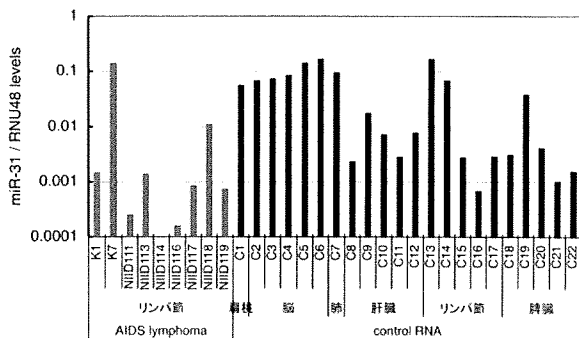


図2. エイズリンパ腫検体における miR-31 の定量。
エイズリンパ腫由来 RNA から miR-31 に特異的な RT-PCR を行い、RNU48 で標準化した。エイズリンパ腫検体は赤いバーで示した。

miR-31 の減少がエイズリンパ腫においてどのような意義を持つのかを検討するために、まず miR-31 によって発現量が制御される標的遺伝子のスクリーニングを行った。これまでも miR-31 の標的遺伝子がいくつか同定されているが (Valastyan et al., Cell 2009;137)、リンパ球系細胞の増殖に有利に働く標的遺伝子の報告がない。本研究では標的遺伝子の新規探索を行うことにより、新たな分子メカニズムにアプローチした。4つのアルゴリズムを用いて miR-31 によって制御される 3'UTR を持つ遺伝子を網羅的に検索し、候補遺伝子を 5 つ挙げた (MAP3K14, FOXP3, NUMB, CD28, MAP4K5)。これらの遺伝子の 3'UTR をそれぞれ Luciferase 遺伝子の下流に挿入したレポーター plasmid を作成し assay を行ったところ、MAP3K14 が miR-31 の新規標的遺伝子であることがわかった (図 3A)。MAP3K14 は NF- κ B Inducing Kinase (NIK) と呼ばれ、IKK α のリン酸化を介して下流にシグナルを伝達するキナーゼであり、複数の腫瘍細胞において過剰発現とそれに伴う NF- κ B の恒常的活性化が報告されている。DNA 配列を調べた結果、NIK の 3'UTR には miR-31 とそのアンチセンスである miR-31* の標的配列を持つことがわかった (図 3B)。そこで、これらの標的配列に変異を導入したレポーターを作成し (図 3C)、同様に検討した結果、NIK の 3'UTR は miR-31 の結合領域によって負に制御されていることが明らかになった (図 3D)。エイズリンパ腫における miR-31 の発現減少は、NIK の発現の脱制御を誘導することにより、NF- κ B の活性化を引き起こすことが考えられた。

(3) NF- κ B pathway における miR-31 の機能解析

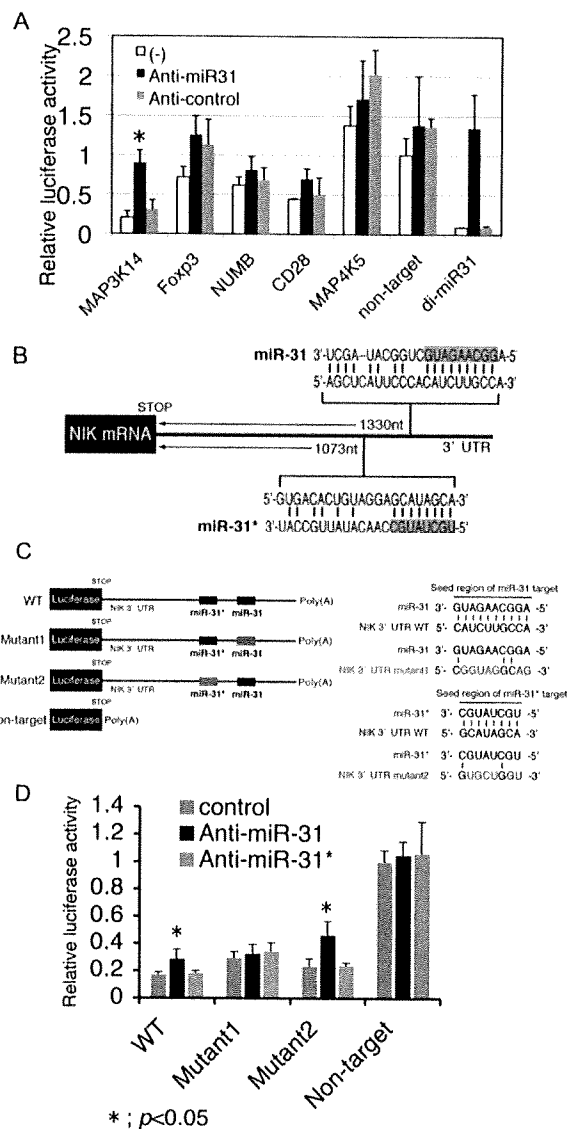


図3. miR-31 の標的遺伝子の決定
(A) 3'UTR レポーターアッセイ。各遺伝子の 3'UTR に対して miR-31 が抑制効果を示す状態に、miR-31 inhibitor を導入した。MAP3K14 (NIK) に対する抑制効果が阻害されたことから、miR-31 は MAP3K14 を抑制していると考えられる。(B) NIK mRNA の構造。miR-31 結合配列が存在する。(C) Seed region 結合配列に対する変異の導入。(D) 変異レポーターを用いたアッセイの結果。NIK の 3'UTR は miR-31 によって抑制されることがわかった。

エイズリンパ腫で減少している miR-31 が、NIK の発現を負に制御すると考えられた。そこで miR-31 の減少が NF- κ B の活性化状態に与える影響を検討した。Adult T-cell leukemia (ATL) は NIK が過剰に発現することにより NF- κ B が恒常的に活性化していることが知られている (Saitoh et al., Blood 2008;111)。ATL 細胞株 TL-Oml に対して miR-31 前駆体を導入し、その影響を調べたところ、NIK のタンパク質レベルが低下し、その下流に存在する IKK α のリン酸化レベルの低下が見られた (図 4A)。このときの NF- κ B の活性化状態を EMSA 及びレポーターア

ッセイにより調べたところ、miR-31 の導入により NF- κ B の活性が低下することがわかった(図4B,C)。

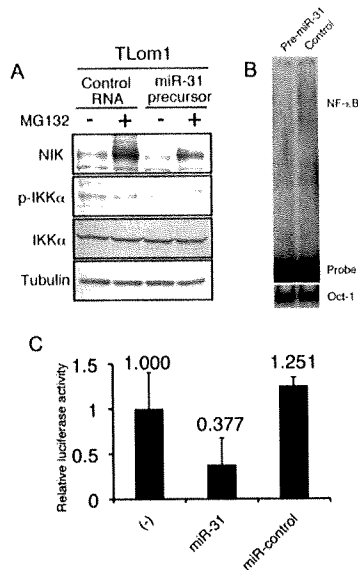


図4. miR-31 による NF- κ B 抑制効果

(A) miR-31 による NIK タンパク質の減少。miR-31 前駆体の導入により NIK の蓄積が抑制され、下流の IKK α のリン酸化も抑制された。(B) EMSA、(C) レポーターアッセイによる NF- κ B 活性の評価。miR-31 の導入により NF- κ B の活性が抑制された。

一方で NIK の発現が低く、NF- κ B の活性化レベルも低い HeLa 細胞に対して、内在性 miR-31 を阻害する miR-31 inhibitor を導入したところ、NIK の量が増加し、NF- κ B の活性化レベルが増大した(図5)。以上のことから miR-31 は NIK の mRNA 及びタンパク質レベルを低下させることにより NF- κ B を負に制御する因子であることがわかった。エイズリンパ腫で見られた miR-31 レベルの減少は NIK の過剰発現を介した NF- κ B の活性化を誘導していると考えられる。

NF- κ B 経路は様々な因子によって複雑なネットワークが構成されているが、大きく分けて2つの pathway が存在する。Canonical pathway と呼ばれる経路は IKK $\alpha/\beta/\gamma$ complex、I κ B α のリン酸化カスケードを介し、RelA/p50 によって様々な遺伝子が転写される。一方、Noncanonical pathway と呼ばれるもう一つの経路は、膜レセプターの下流に位置する NIK が IKK α をリン酸化し、p52 の核移行を介して遺伝子発現を誘導する。2つの経路にはクロストークが存在すると報告されているが、その詳細は不明である。

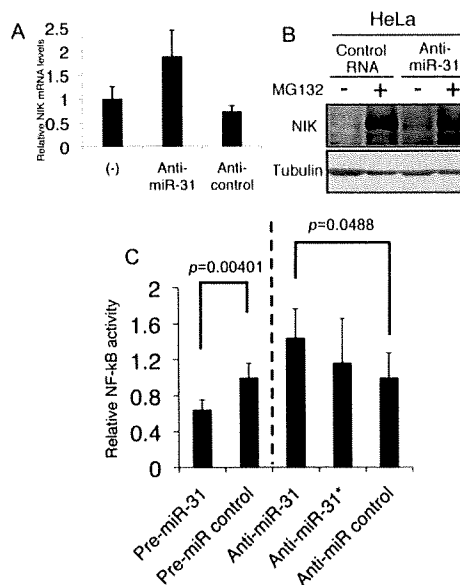


図5. miR-31 の阻害による NF- κ B の活性化

(A,B) miR-31 inhibitor による NIK mRNA 及びタンパク質の増加。(B) レポーターアッセイによる NF- κ B 活性の評価。miR-31 inhibitor の導入により NF- κ B の活性が促進された。

本研究で同定した miR-31 による NIK の負の制御が NF- κ B pathway に与えるインパクトを検討するために、レトロウイルスベクターを用いて miR-31 を過剰に発現する細胞株を樹立し、活性化刺激に対する応答性を検討した。Jurkat 細胞に対して TNF- α による刺激を導入すると Canonical pathway の活性化が誘導されるが、miR-31 の過剰発現による大きな影響は見られなかった(図6)。一方 Noncanonical pathway に対する刺激を検討する為、miR-31 を過剰に発現する BJAB 細胞を樹立し、BAFF に対する応答性を検討した結果、miR-31 の過剰発現が NIK の蓄積を阻害し、NF- κ B の活性化レベルを低下させることがわかった(図7)。以上のことから、miR-31 は NIK のレベルを制御することによって主に Noncanonical pathway の活性化レベルを低下させることがわかった。

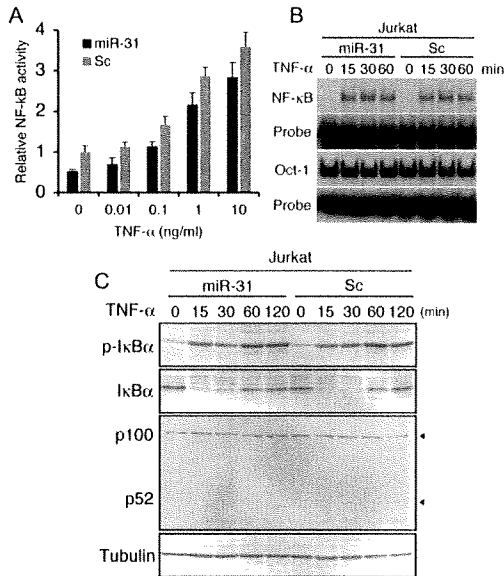
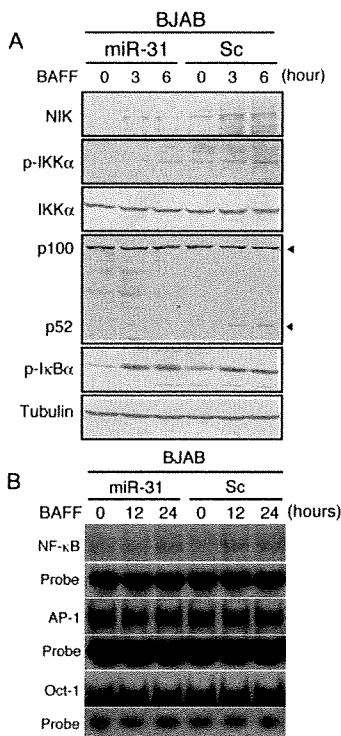


図 6. Canonical NF-κB activation における miR-31 の働き
(A) TNF-α の刺激下における NF-κB の活性化状態。TNF-α による活性化に対し、miR-31 による抑制効果は見られなかった。(B) EMSA による NF-κB の評価。(C) Canonical pathway のマーカーとして IκBα のリン酸化レベルを検討した。TNF-α によるシグナル伝達に対して miR-31 は効果を示さなかった。



(4) miR-31 の発現を抑制するヒストンのメチル化の解析

これまでに miR-31 の発現ユニット及び Promoter の解析の報告はなく、どのように発現低下が引き起こされているのか不明である。miR-31 はゲノム上の LOC554202 遺伝子の

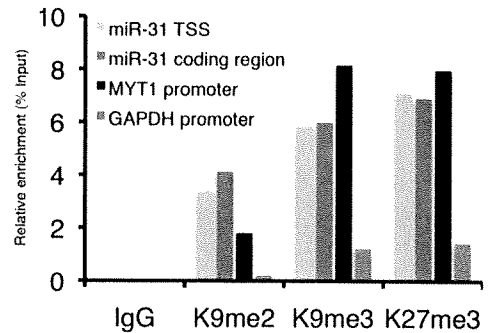
図 7. Noncanonical NF-κB activation における miR-31 の働き
(A) miR-31 による BAFF 刺激に対する抑制効果。BAFF によって蓄積が誘導される NIK のレベルを miR-31 が抑制した。NIK の減少により下流の IKKα のリン酸化及び p52 へのスプライシングが阻害された。(B) EMSA による NF-κB の評価。miR-31 は BAFF による NF-κB の活性化を抑制した。

Intron 領域に存在するが、我々はこれまでに miR-31 は独立した転写が行われていること、さらに成熟 miR-31 の存在量と転写レベルの相関を示唆するデータを得ている。そこで転写を抑制するメカニズムとしてエピジェネティクスの変化に注目し、ヒト PBMC を用いて miR-31 をコードする領域についてヒストンのメチル

図 8. miR-31 領域のヒストンのメチル化パターン

ヒト PBMC について H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 の抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、miR-31 領域のメチル化状態を real-time PCR により検討した。ヒストンのメチル化により抑制されている MYT1 遺伝子と同レベルのメチル化パターンであることから、ヒストンのメチル化が転写抑制に働いていると考えられた。

化を ChIP assay により解析した結果、miR-31 をコードする領域及び -2500bp 上流の TATA box 周辺のヒストンの H3K9 及び H3K27 がトリメチル化されていることがわかった(図 8)。H3K9 及び H3K27 のトリメチル化は転写の抑制に働くマーカーであり、miR-31 の発現はヒストンのメチ



ル化によって制御されている可能性を見いだした。

D. 考察

エイズリンパ腫のほとんどが DLBCL であり、さらに約半数が EB ウイルスの感染が認められる。近年の報告から、悪性度の高い DLBCL では特に NF-κB の恒常的な活性化が報告されている。NF-κB の Noncanonical pathway は最近になり注目を集めているシグナル伝達経路で、B 細胞の増殖や分化に特に重要な役割をもつことが知られており、B 細胞性の悪性リンパ腫の分子標的を考える上で重要である。さらに EB ウイルス遺伝子の LMP-1 は Noncanonical pathway の上流に位置し、NIK を介して恒常的

に NF- κ B のシグナルを伝える。このようにエイズリンパ腫の分子メカニズムの理解と、そこから得られる新しい治療法の開発を考える上で NF- κ B の研究は非常に重要だと考えられる。本年度に明らかにした miR-31 の発現減少と、それにとまなう Noncanonical NF- κ B pathway の活性化は、miRNA による新しい NF- κ B の制御機構であり、エイズリンパ腫に留まらず、他の悪性リンパ腫、種々の白血病、NF- κ B の活性化を伴う乳がんなどの固形癌に対しても新たな知見を与えるものであると考えられる (図 9)。また NF- κ B は炎症、細胞増殖、分化、細胞運動など、種々の生物学的意義を持つものであり、本研究の成果は基礎と臨床の両面に寄与すると期待される。

miRNA の発現異常の分子メカニズムは様々な報告がある。一般には miRNA のゲノムレベルでの異常、miRNA の前駆体 RNA の転写レベルの異常、もしくは miRNA の成熟過程の異常がある。特定の miRNA の発現低下は、種々の標的遺伝子の発現上昇を誘導し、細胞に対して非常に有害な結果をもたらすことが複数報告されており、腫瘍化の分子メカニズムの理解を進める上で重要な研究である。B 細胞の増殖、分化などにおいても種々の miRNA が働いており、エイズリンパ腫を特徴付ける miRNA の同定は、重要な意味を持つと考えられる。miRNA の発現パターンは細胞種、または環境によって大きく変動することから、細胞株を用いた発現解析には限界がある。本研究ではエイズリンパ腫のサンプルを用いることで、より実際の病態を反映するデータを得ることができると考えられた。miR-31 はこれまでに、乳がん細胞における発現低下と、それに伴う癌細胞の転移、浸潤への影響が報告されている (Valastyan et al., Cell 2009;137)。しかしながら細胞の増殖や生存に関わる pathway に対しての知見はなかった。我々が今回同定したメカニズムは、腫瘍細胞の生存や抗アポトーシス作用に大きく関わると考えられる。エイズリンパ腫検体で確認された miR-31 の減少は RhoA, RDX, ITGA5 などの既知の標的遺伝子の機能による細胞運動の亢進と、NF- κ B の活性化の両面に働いていると考えられ、miR-31 の機能や発現パターンの研究が今後

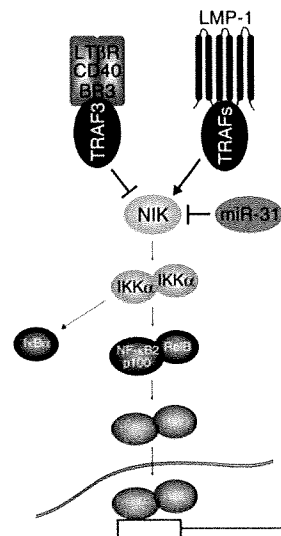


図 9. miR-31 による NF- κ B 抑制メカニズム
膜からの刺激により活性化した NIK は下流に細胞の増殖、生存シグナルを伝える。miR-31 は NIK の mRNA、タンパク質を抑制しているが、エイズリンパ腫でみられる miR-31 の減少は NIK の蓄積を誘導し、NF- κ B の恒常的な活性化へつなぐと考えられる。

の課題であろう。本研究の結果から示唆された、エピジェネティックな制御による miR-31 の発現制御機構は、エピゲノムと腫瘍化のイベントを結びつける概念であり、さらに研究を進めることにより、リンパ腫の分子メカニズムの理解に近づけると期待される。

E. 結論

エイズリンパ腫の一部で観察された miR-31 の減少は、NF- κ B の活性化に寄与するものである。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF- κ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. **Cancer Sci** 100:737-746, 2009
- 2) Thao LB, Vu HA, Yasuda K, Taniguchi S, Yagasaki F, Taguchi T, Watanabe T, Sato Y. Cas-L was overexpressed in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells. **Cancer Biol Ther** 8(8):683-688, 2009
- 3) Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Cooper DA, Kelleher AD, Suzuki K, Watanabe T. Retroviral delivery of Promoter-targeted shRNA induces

long-term silencing of HIV-1 transcription.

Microbes Infect 11:500-508, 2009

- 4) Togano T, Sasaki M, Watanabe M, Nakashima M, Tsuruo T, Umezawa K, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. Induction of oncogene addiction shift to NF- κ B by camptothecin in solid tumor cells. **Biochem Biophys Res Comm**, 390(1): 60-64, 2009

2. 学会発表

(国内発表)

- 1) 堀江良一、渡邊真理子、中島 誠、梶野富輝、東原正明、渡邊俊樹、梅澤一夫、「NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の標的分子と核への分布を阻害するドメインの同定」、第 13 回がん分子標的治療研究会総会、2009 年 6 月 26 日 (2009 年 6 月 24 日~26 日)、徳島
- 2) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 細胞における microRNA 発現異常の解析 : miR-31 の発現低下と NF- κ B シグナル伝達系に及ぼす影響」、第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2009 年 8 月 30 日 (2009 年 8 月 29 日~30 日)、東京大学医科学研究所
- 3) 川幡亮一郎、加藤元博、真田 昌、佐藤康晴、竹内賢吾、滝田順子、野本順子、朝倉義崇、渡邊俊樹、吉野 正、小林幸夫、小川誠司、「悪性リンパ腫における NF κ B 経路制御遺伝子の変異解析」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日~3 日)、パシフィコ横浜
- 4) 神林佑輔、堀江良一、渡邊俊樹、梅澤一夫、「エイズ関連リンパ腫細胞における NF- κ B 阻害剤(-)-DHMEQ に発現が抑制されるタンパク質のスクリーニング」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日~3 日)、パシフィコ横浜
- 5) 堀江良一、渡邊真理子、中島 誠、梶野富輝、東原正明、渡邊俊樹、梅澤一夫、「Identification of the RelA domain responsible for the action of a new NF- κ B inhibitor DHMEQ」、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 23 日 (2009 年 10 月 23 日~25 日)、京都
- 6) 小林美栄、原 拓馬、山岸 誠、三宅在子、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 にコードする antisense RNA の新規探索と機能解析」、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日 (2009 年 10 月 25 日~27 日)、東京
- 7) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 細胞における microRNA 発現異常の解析 : miR-31 の発現低下と NF- κ B シグナル伝達系に及ぼす影響」、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日 (2009 年 10 月 25 日~27 日)、東京
- 8) 鈴木一雄、石田尚臣、山岸 誠、Cooper David, Kelleher Anthony, 渡邊俊樹、「プロモーター領域をターゲットとした shRNA による特異的 HIV-1 gene silence」、第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日 (2009 年 11 月 26 日~28 日)、名古屋
- 9) 原 拓馬、松田有加、山岸 誠、三宅在子、石田尚臣、渡邊俊樹、「ヒト PBMC を用いた HIV-1 潜伏感染モデルの構築と解析」、第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日 (2009 年 11 月 26 日~28 日)、名古屋
- 10) 小林美栄、原 拓馬、山岸 誠、三宅在子、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 ゲノムアンチセンス鎖にコードする RNA の探索と機能解析」、第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日 (2009 年 11 月 26 日~28 日)、名古屋
- 11) 山岸 誠、松田有加、原 拓馬、三宅在子、鈴木一雄、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 潜伏化における Polycomb group の機能解析」、第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日 (2009 年 11 月 26 日~28 日)、名古屋
- 12) 中野和民、山岸 誠、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 患者における microRNA 発現異常の解析 : miR-31 の発現低下が NIK および NF- κ B シグナル伝達系に及ぼす影響」、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日 (2009 年 12 月 9 日~12 日)、横浜

- 13) 松田有加、山岸 誠、原 拓馬、三宅在子、
鈴木一雄、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 潜
伏化における Polycomb group の機能解析」、
第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12
月 11 日 (2009 年 12 月 9 日～12 日)、横浜

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

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 主任研究官

研究要旨 本研究ではエイズリンパ腫の多くの割合を占める EBV 陽性の B 細胞性リンパ腫に着目し、発症を予防するための標的分子同定を試みた。我々は昨年度までに EBNA1 の阻害分子発現系を確立し、EBNA1 機能阻害条件下で B 細胞に EBV を感染させると、EBV ゲノムの核内移行とゲノムの脱落効率は阻害されないが、発現関連 EBV 遺伝子の発現が抑制される事を見いだした。本年度はさらに EBNA1 の阻害分子による潜伏感染成立の効率について評価を行った。その結果、EBV 感染時に EBNA1 阻害分子が存在すると EBV 潜伏感染の成立が完全に抑制され、EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫の発生も抑止できる可能性が示唆された。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫予防の分子標的として EBNA1 の評価を確立した研究結果を発展させて、今後は小分子化合物による EBNA1 inhibitor の開発が期待される。

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、Epstein-Barr virus(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 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。現在 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 タンパク質の存在が指摘されて

いる。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に依然確立していない。

EBV による発ガン活性を阻害するために、現在までに EBNA2、EBNA1、LMP-1 を創薬標的として研究が行われてきた。EBNA1 は EBV ゲノムの複製・維持とウイルス遺伝子転写の活性化という B 細胞の悪性化に関わる重要なタンパク質であるため、我々は創薬標的として特に注目している。EBV ゲノムの複製とウイルス遺伝子の転写の活性化は、*oriP* を構成する family of repeat (FR) と dyad symmetry element (DS) の EBNA1 binding site (EBNA1 BS) へ EBNA1 が結合することによって起こる。EBNA1 BS は FR に 20、DS に 4ヶ所存在する。DS に EBNA1 が結合することにより、EBV ゲノムの複製が促進する。また EBNA1 が *oriP* に結合すると、エンハンサー機能が活性化する。それにより C/Wp が活性化して、ウイルス遺伝子の転写が増強す

る。加えて EBNA1 は EBV ゲノムと宿主ゲノムを結合させることによって、EBV ゲノムを効率的に娘細胞へ分配させる。

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解析することを通じて 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。

我々は昨年度までに EBNA1 の阻害分子存在下で B 細胞に EBV を感染させてもウイルスゲノムの核内移行とゲノムの脱落効率は阻害されないが、発がん関連ウイルス遺伝子の発現が抑制される事を見いだした。これは EBV によるリンパ腫発生を防止するための分子標的として EBNA1 が妥当である事を示している。本年度はさらに EBNA1 の機能阻害分子が EBV 潜伏感染樹立効率に与える影響について評価を行った。

B. 研究方法

GFP-dnE1 融合タンパク質と GFP をコードする MLV ベクターを感染させ、GFP 蛍光をマーカーにして FACS sorting する手法を用いて GFP

または GFP-dnE1 を恒常的に発現する B-ALL 細胞を樹立した。これらに対して、G418 耐性遺伝子を選択マーカーとして有する組み換え EBV を感染させた。使用したウイルスの調整と感染の条件は Kanda T et al., J Virol 2004 に詳述されている。感染 2 日後から G418 が 1 mg/ml 存在する条件下にて細胞を 5×10^3 /well で 96 ウェルプレートで培養を行った。選択後約 2 週間後に G418 耐性細胞が現れるウェルの割合を耐性細胞出現率として算出した。ウイルス感染の陽性コントロールとして BJAB 細胞、Daudi 細胞、B-ALL の親細胞を使用した。なお、本研究は北海道大学遺伝子病制御研究所感染癌研究センター吉山裕規博士との共同研究である。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

BJAB 細胞、Daudi 細胞においては 100%の効率で G418 耐性細胞が出現した。B-ALL の親細胞、および B-ALL の GFP 発現細胞においては G418 耐性細胞が 56-67%の効率で出現した。ほぼ同等の出現効率である事から、GFP が EBV の潜伏感染樹立効率に関与しない事が示唆される。一方、GFP-dnE1 においては dnE1 の発現が高いもの (GFP-dnE1 Hi)、低いもの (GFP-dnE1 Lo)、ともに G418 耐性細胞は出現しなかった (0/12 wells、0% : Table 1 参照)。

D. 考察

野生型 EBV の B 細胞への感染に際し、細胞増殖に対する EBV 感染依存的な正の選択圧が存在しない条件下で、感染直後からウイルスの EBNA1 を阻害したときにみられる潜伏感染移行効率を評価したのは我々が世界で初めてである。

Table 1. The establishment efficiency of EBV latency.

Cell	Emergence of G418-resistant cells ^a	
BJAB	100%	(6/6)
Daudi	100%	(10/10)
BALL	Parental	56% (5/9)
	GFP Hi	67% (2/3)
	GFP-dnE1 Hi	0% (0/6)
	GFP-dnE1 Lo	0% (0/6)

^a Percentage of wells positive for G418-resistant cells over the number of tested wells of 96 well plates indicated in the bracket. Shown are the sum of two independent experiments.

感染直後からEBNA1機能を阻害する事により acute phase(感染後1～2週間まで)のウイルスゲノム脱落効率は変化しなかったが(昨年度の研究結果)、sub-acute phase(感染後2週間以上)における潜伏感染樹立効率は著しく強く阻害される事が判明した。EBVが感染して潜伏感染が樹立するのはepigeneticで稀な現象と考えられるが、EBNA1阻害はepigeneticな潜伏感染移行を効率よく抑止出来る。この分子的背景は、EBNA1がN末端ドメインによりORC複合体をoriPに近傍に集合させることが必要であることが知られている。dnE1はこのプロセスを阻害することによりEBVゲノムのautosomal repliconとしての樹立を阻害すると考えられる。これはEBNA1阻害剤がEBV潜伏感染を阻止し、リンパ腫発生を予防する事が出来る可能性を直截的に示している。

現在エイズリンパ腫予防法は存在しない。しかし、リスクファクターが明らかなエイズリンパ腫であるEBV陽性B細胞性腫瘍においては、"dnE1 mimic"によるEBNA1阻害剤はエイズリ

ンパ腫発症阻害剤として高い有用性が期待できる。今後はEBNA1阻害剤の開発と並行して、EBV陰性のB細胞性リンパ腫における治療・予防標的の同定が重要な研究課題になると考えられる。

E. 結論

本研究により、EBVのEBNA1はエイズリンパ腫の治療と予防のために標的分子となることが証明された。我々の使用したdnE1と同様の作用機序を持つ小分子化合物を創成することにより、EBV関連Bリンパ腫予防・治療薬に使用できると思われる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*. In press.
- 2) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*. In press.
- 3) Makiko Hamatake, Jun Komano, Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J*

Immunol. In press.

- 4) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsuma, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs *N*-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology*. 2009 Nov;221(2):458-468.
- 5) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake, Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy*. 2009 Jul;53(7):2940-2948.

学会発表

(国際学会)

- 1) Tsutomu Murakami, Kei Miyakawa, Cecilia Bucci, Jun Komano, Naoki Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009
- 2) Emiko Urano, Hiroyuki Okunaga, Yuko Morikawa, Jun Komano. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

(国内学会)

- 1) 駒野 淳. オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクトシンポ

ジウム「これからのHIV研究の進むべき方向」
第23回日本エイズ学会, 名古屋, 11月27日
2009

- 2) 濱武牧子, 宮内浩典, 青木 徹, 浦野恵美子, 駒野 淳. Higher-order homotypic oligomerization determines the steady-state cell surface levels of CXCR4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 3) 上原大輔, 坂本真衣子, 吉川治孝, 泉川圭一, 早川俊哉, 駒野 淳, 高橋信弘. Proteomic search for the function of HIV-1 Rev protein in human cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 4) 青木 徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 濱武牧子, 寺嶋一夫, 玉村啓和, 村上 努, 山本直樹, 駒野 淳. Development of 5th generation lentiviral vector. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 5) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 6) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. Rab蛋白質とそのエフェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割 (Rab7を中心に). 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009
- 7) 浦野 恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. 酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009
- 8) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. T細胞における

HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング
-SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解
析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東
京, 2009

9) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田 史子, 長塚靖子,
竹腰 正隆. HIV-1複製抑制能を有する健常人
由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離: HIV-1
に対するnatural humoral resistance. 第57回日本
ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

10) 滝澤 万里, 草川 茂, 北村克彦, 長縄
聡, 村上 利夫, 本多 三男, 山本 直樹, 駒
野 淳. Diversified HIV-1を利用した中和抗体
KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の
網羅的解析. 第57回日本ウイルス学会学術集
会, 東京, 2009

11) 村上 努, 呉 鴻規, 富田 香織, 伯川 冬
美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本 直樹. HIV-1粒
子形成におけるRab7とそのエフェクタータン
パク質の役割. 第57回日本ウイルス学会学術
集会, 東京, 2009

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of
high-titer lentivirus production system by
modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年
11月19日 特願2009-263587).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

研究協力者 矢島美彩子 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部
今留謙一 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部
清水則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所
山本直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨 エイズリンパ腫の主原因となる EB ウイルス (EBV) の感染モデルマウスを作成し、リンパ腫発症メカニズムの解析と治療法の開発への応用を進めている。本年度は、モデルマウスに誘導される EBV 特異的 T 細胞免疫応答が実際に宿主防御機構として機能するかどうかを検討した。EBV 感染後のマウスに抗 CD8 抗体を投与し CD8⁺ T 細胞を除去するとマウスの生存期間が短縮すること、感染マウスの脾臓から分離した CD8⁺ T 細胞は EBV によるリンパ球トランスフォーメーションを抑制することが示された。これらの結果はこの EBV 感染モデルマウスを用いて、EBV 感染症に対する免疫療法の基礎実験やワクチン候補の評価を行うことが可能であることを示唆している。

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）の約半数は、EB ウイルス (EBV) が原因となる。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は健常者においては、EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞により除去されるが、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、時にリンパ腫発症に至る。エイズリンパ腫を含む 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誘導されないことや、感染初期の事象を解析できないことが欠点であった。

NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ c^{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 が感染し、EBV 特異的な細胞性及び液性免疫応答が誘導されること、主に高レベルの EBV 感染によりリンパ腫が発生し、低レベルの感染では不顕性持続感染となることなど分かっている。

このモデルマウスを用いて免疫療法の基礎実験やワクチン候補の評価を行うためには、マウスに誘導される EBV 特異的

免疫応答が実際に防御機構として機能することが一つの条件となる。本年度は、 $CD8^+$ T 細胞についてこの点を検討した。

B. 研究方法

1. 臍帯血

東京臍帯血バンク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*/IL-2R γ c^{null} マウス

NOD/Shi-*scid*/IL-2R 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、ヒト造血幹細胞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した。

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社) を用いて $CD34$ 陽性造血幹細胞を分離した。 $1 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$ 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 $0.45 \mu m$ フィルターを通過させたのちに尾静脈内に接種した。

5. $CD8^+$ T 細胞除去実験

ヒト化マウスに 10^2 TD₅₀ の EBV を感染させ、3 週間後から T 細胞表面マーカー

$CD8$ に結合するモノクローナル抗体 (B9.11, Beckman-Coulter; 2.0~2.5 $\mu g/mouse$) を週 4~5 回静脈内投与した。対照としては、溶媒に用いた PBS を同じスケジュールで投与した。

6. EBV 感染細胞増殖阻止試験

EBV 未感染ヒト化 NOG マウスの脾臓より分離した単核細胞に EBV を感染させ、マイクロプレートに分注した。これらの細胞を 2 群に分け、1 群には EBV 感染マウス脾臓より分離した $CD8^+$ T 細胞を、他の群には未感染ヒト化マウスの脾臓から分離した $CD8^+$ T 細胞をそれぞれ階段希釈して混合した。8 週間培養したのち増殖を示した well の数を両群の間で比較した。EBV 感染細胞と $CD8^+$ T 細胞は、同一の造血幹細胞サンプルによりヒト化したマウスに由来するものを用いた。実験結果から Reed-Muench 法により 50% regression dose を決定した。

(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で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