

図 8. PKC $\beta$ 阻害による NF- $\kappa$ B 活性の抑制

Staurosporine 処理後 30 分と 60 分で各抽出液を調整し EMSA を行った。EMSA の対照としては、Jurkat 細胞を用い、TNF $\alpha$ による NF- $\kappa$ B 活性化を示した。

次に、NF- $\kappa$ B 阻害が細胞死に深くかかわっているかどうかを検討するため、NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用を検討した。その結果、これら 4 種の B 細胞株はいずれも DHMEQ に対して高い感受性を示した (図 9)。以上の結果は、Staurosporine 感受性は、その NF- $\kappa$ B 阻害作用を介している事が示唆された。

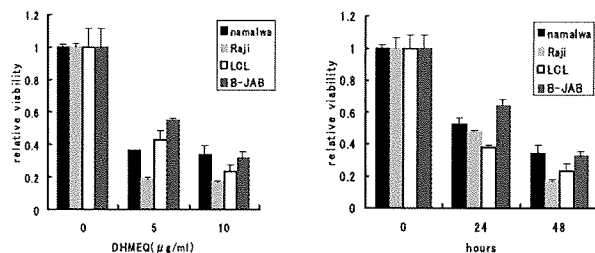


図 9. B 細胞株に対する DHMEQ の効果

各濃度の DHMEQ 添加後 4 8 時間、あるいは 10 $\mu$ g/ml の DHMEQ 添加後各時間における生細胞の割合を示した。

次に、Staurosporine 感受性に影響する EB ウイルス側の因子を検討するため、NF- $\kappa$ B 活性化に深くかかわる LMP-1 の発現とそれへの TRAF2 蛋白質の会合レベルを検討した。その結果、相対的な耐性を示す Raji 細胞と LCL 細胞では LMP-1 の発現レベルが高く TRAF2 蛋白質の会合も強い事が明らかになった (図 10)。

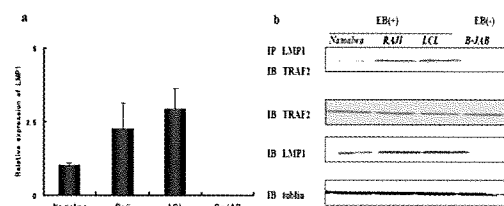


図 10. 各細胞における LMP-1 発現レベルの検討

a) Real time RT-PCR による LMP-1 mRNA レベルの検討結果。b) Immunoblot 法による蛋白質レベルでの発現解析。LMP-1 の発現レベルと TRAF2 蛋白質の共沈レベルの検討

### (3)エイズリンパ腫検体での miR-31 発現解析 (H21 年度)

我々は当初、エイズリンパ腫検体での遺伝子発現マイクロアレイ解析を目的に実験を始めた。マイクロアレイ解析では検体の RNA の quality が重大な影響を持つ。従って、まず、抽出した RNA の quality check を行った。Agilent 社の Bio Analyzer を用いて解析したところ、いずれのサンプルも著しく degradation している事が明らかになった (図 11)。

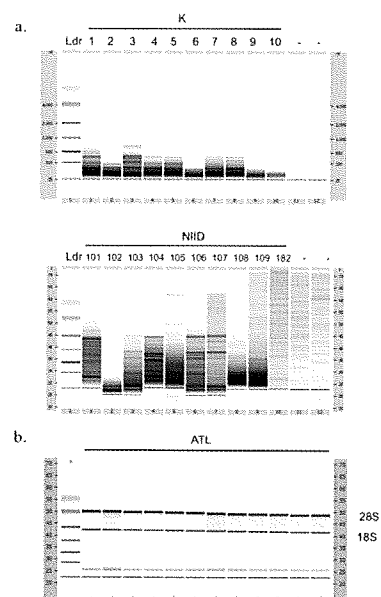


図 11. エイズ合併リンパ腫の RNA 品質チェック

Bio Analyzer の解析結果を示す。a. エイズリンパ腫検体の解析結果。b. 対照としての ATL 細胞の RNA 解析結果 28S および 18S の ribosomal RNA がシャープなバンドを形成している事が劣化の無い RNA の目安となる。

そこで当初の網羅的遺伝子発現マイクロアレイ解析には不向きなサンプルと結論付けたが、もともと 20 塩基ほどの小さな non-coding RNA、miRNA の発現解析には十分利用できると予想し、ノーマライザーとして用いられることの多い RNU48(snoRNA)の発現量を ABI 社製の RNU48 特異的プライマーセットを用いて、realtime-PCR により測定した。その結果、エイ

ズリンパ腫検体の中でもいくつかの検体では、RNU48 は十分に保存されていることが分かり、これらのサンプルが miRNA の解析には利用可能であることが確認された (図 1 2)。

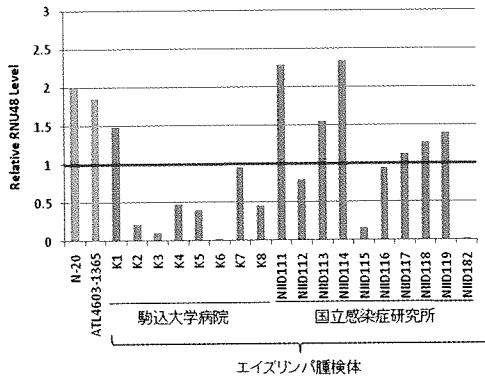


図12. エイズリンパ腫検体での RNU48 濃度の測定 緑色のバーは遺伝子発現マイクロアレイ解析に用いた健常人 CD4+T 細胞および ATL 患者の PBMC より抽出した RNA での RNU48 のレベルを示している。これらの対照群に対して、いくつかのエイズリンパ腫検体は、遜色ないレベルの RNU48 を保存していることが分かった。

我々は図 1 2 の結果をもとに、K1, 7, NIID111, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 119 の 10 検体が miRNA の解析に利用可能であると判断し、これらのエイズリンパ腫検体について、miR-31 の濃度の測定を行った。

miR-31 は NIK, CD28, NUMB, FoxP3, RhoA など、細胞周期や細胞分化に関わる重要な遺伝子群をターゲットとしており、正常な細胞では細胞の恒常性維持に重要な働きをしていると考えられている。我々の研究室では、特に non-canonical NF- $\kappa$ B 経路の主要活性化因子である NIK(MAP3K14)が、miR-31 によって強く抑制されていることを見出しており (図 1 3)、miR-31 の機能不全が NF- $\kappa$ B の過剰な活性化と細胞の癌化を引き起こす一要因になると考えている (図 1 4)。

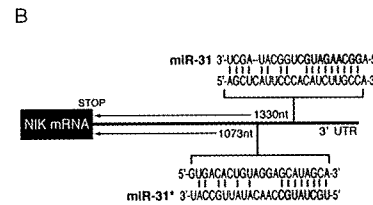
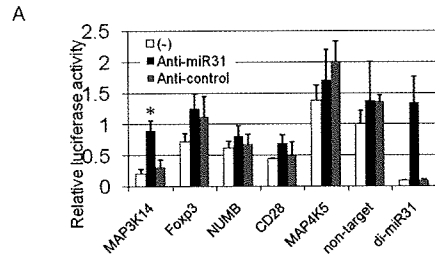


図 13. レポーターアッセイによる miR-31 のターゲット検討 データベースより予測された miR-31 のターゲット mRNA の 3'-UTR 配列を組み込んだレポーターを作成し (B)、miR-31 阻害剤を導入したときのレポーター活性への影響を検討した(A)。検討した 5 つのターゲットのうち、NIK(MAP3K14)の 3'-UTR を導入したレポーターが、miR-31 阻害剤によって最も安定化された。

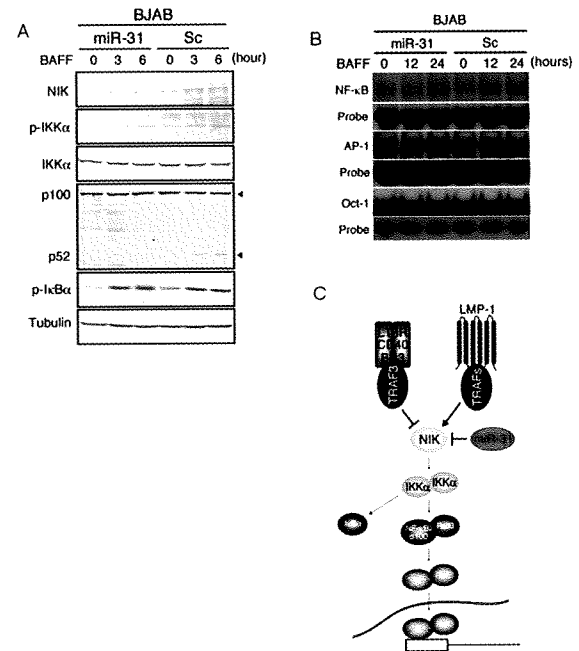


図 14. miR-31 の non-canonical NF- $\kappa$ B 経路に対する影響 BJAB に miR-31 または scramble 配列を過剰発現させた細胞株を樹立し、BAFF 刺激を加え、TRAF3 による恒常的な NIK 抑制を解除した状態で、miR-31 の過剰発現の影響を調べた。(A)miR-31 過剰発現の、non-canonical NF- $\kappa$ B 経路に関わる分子の発現量に対する影響。miR-31 を過剰発現している細胞では、コントロール細胞に比べ、BAFF 刺激による NIK の蓄積量が低く、それに伴う p-IKK $\alpha$  の発現や p52 の cleavage なども抑制されている。(B)miR-31 の

NF-κB 活性に対する影響を EMSA で検討した。その結果、BAFF 刺激によって誘導される NF-κB の活性化は、miR-31 過剰発現細胞では、特に 1 2 時間後に NF-κB の活性化が有意に抑制されていた。これらの結果より、(C)に示すように正常細胞では miR-31 が NIK の発現抑制を介して non-canonical NF-κB 経路の活性化を抑制しており、miR-31 の発現量低下が NF-κB の過剰な活性化を招くと考えられる。

この度我々は、初めてエイズリンパ腫の患者検体において、この miR-31 の発現状況を検討した。その結果、健常人検体と比較して、エイズリンパ腫検体では miR-31 の発現量が低下している傾向が見られた (図 15)。

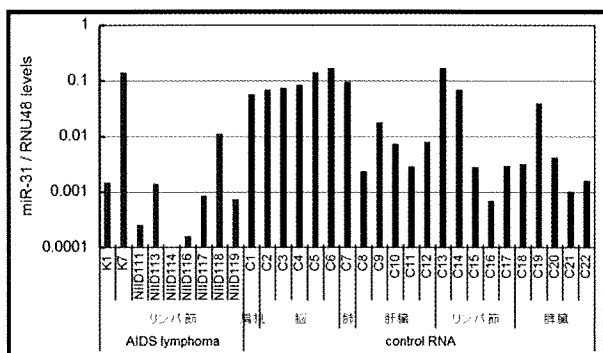


図 15. エイズリンパ腫検体での miR-31 レベルの測定 エイズリンパ腫検体 (赤) は、様々な健常人組織サンプルおよびリンパ節検体 (黒) に比べ、miR-31 の発現量が低下している傾向が見られた。

図 1 3、1 4 に示したように miR-31 は NIK の発現を制御することで、NF-κB 経路の活性化を抑制する働きがあると考えられる。よって以上のような miR-31 の発現低下およびそれに伴う機能不全が、エイズリンパ腫での NF-κB の過剰な活性化と何らかの関連があると予想している。

### D. 3 年間の研究のまとめと考察

まず PEL 細胞に対する NF-κB 阻害剤 DHMEQ の効果を遺伝子発現の包括的解析によって検討した。その結果、DHMEQ が一過性に NF-κB の活性化を阻害することが確認された。2 4 時間以内に NF-κB の活性が回復するにもかかわらず、2 日目以降は活性化 NF-κB の存在下でアポトーシスのプロセスが進行することになる。この現象がどのような分子機構によって担わ

れているかは大変興味深い。今回の発現解析の結果は、一時的な NF-κB の阻害が広汎な遺伝子発現の変化をもたらす事、全体で見ると抗アポトーシス系の遺伝子の発現抑制とプロアポトーシス系の遺伝子の発現亢進が認められる事が特徴である。これは、最近提唱されている”Oncogene addiction”および”Oncogenic shock”という概念に良く適合するデータである。

次年度には、新たに B 細胞系リンパ腫に対する PKCβ阻害剤の効果を、EBV 陽性の Namalwa 細胞、Raji 細胞および LCL と EBV 陰性の B-JAB 細胞を用いて検証した。その結果から明らかになった事は、PKCβ阻害剤 Staurosporin に対する感受性が、恒常的に活性化している NF-κB を阻害できるかどうかと相関する事である。EBV 感染 B 細胞株では LMP-1 の発現と TRAF2 蛋白質との会合のレベルが高い細胞では、Staurosporin による PKCβの阻害にもかかわらず NF-κB の活性化が維持されていた。従って、これらの細胞では NF-κB 活性が PKCβ非依存経路、つまり、主に LMP-1 からのシグナルでドライブされている事を示唆する結果と考えられる。さらに、EBV 陽性リンパ腫の治療において、PKCβ阻害剤の効果の限界を示唆する結果でもある。NF-κB 阻害剤 DHMEQ が EBV の有無にかかわらず有効であった事は、両者の併用療法の有効性を示唆すると考えられる。

最終年度では、新たにエイズリンパ腫検体での miRNA 発現異常を検討した。まず、長期保存されたエイズリンパ腫検体から抽出した RNA サンプルで、small RNA の測定が可能であることを確認した。次に、miR-31 の発現レベルを測定した結果、miR-31 がエイズリンパ腫検体で顕著に減少する傾向が見出され、miR-31 の機能不全が示唆された。miR-31 は細胞周期の調節や T 細胞の分化に関わる遺伝子群をターゲットとしていることが知られているが、その中でも特に non-canonical NF-κB 経路の主要活性化因子である NIK を強く制御しており、miR-31 の発現量が直接 NF-κB の活性化に影響することが確認された。これらの結果から、エイズリンパ腫で確認された miR-31 の発現低下が、この腫瘍で見られる NF-κB の過剰な活性化と関連があると予想している。今後はエイズリンパ腫

の解析検体数を随時増やし、miR-31 の発現低下の傾向をより明確に示すとともに、miR-31 以外の miRNA の発現量の測定、そして miRNA マイクロアレイ技術を用いた、網羅的解析の実現を目指す。

## E. 結論

これまでの研究結果から、DHMEQ による NF- $\kappa$ B 有効な戦略であることを確認するとともに、PKC $\beta$ 阻害剤の応用は EBV 陽性リンパ腫の場合、DHMEQ との併用を検討する必要があることを示唆するものと考えられる。また miRNA、特に miR-31 の発現異常とエイズリンパ腫の腫瘍化を結びつける知見が初めて得られ、今後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新しい局面を明らかにできると期待している。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 Lett** 257:206–215, Nov. 2007
- 2) 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, Nov.–Dec. 2007
- 3) 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, Jan. 2008
- 4) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MDZ, Sugimoto H, Martinez VJ, Iwasaki Y, Matsu-bara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S, “Overexpressed NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells”, **Blood** 111:5118-5129, May 2008
- 5) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R, “Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ”, **Microbes Infect** 10:748-756, Jun. 2008
- 6) Makishi S, Okudaira T, Ishikawa C, Sawada S, Watanabe T, Hirashima M, Sunakawa H, Mori N, “A modified version of galectin-9 induces cell cycle arrest and apoptosis of Burkitt and Hodgkin lymphoma cells”, **Br J Haematol** 142:583-594, Aug. 2008
- 7) Suzuki K, Juelich T, Lim H, Ishida T, Watanabe T, Cooper DA, Rao S, Kelleher AD, “Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region”, **J Biol Chem** 283:23353-23363, 2008
- 8) Kurata A, Katayama R, Watanabe T, Tsuruo T, Fujita N, “TUSC4/NPRL2, a novel PDK1-interacting protein, inhibits PDK1 tyrosine phosphorylation and its downstream signaling”, **Cancer Sci** 99:1827-1834, Sep. 2008
- 9) Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. “Identification of the Rela domain responsible for action of a new NFkappaB inhibitor DHMEQ”, **Biochem Biophys Res Commun** 376:310-314, Nov. 2008
- 10) Matsuo J, Tsukumo Y, Sakurai J, Tsukahara S, Hae-Ryong P, Shin-ya K, Watanabe T, Tsuruo T, Tomida A, “Preventing the unfolded protein response via aberrant activation of 4E-BP1 by versipelostatin”, **Cancer Sci** 100:327-333, Feb. 2009
- 11) Iwasaki R, Ito K, Ishida T, Hamanoue M, Adachi S, Watanabe T, Sato Y, “Catechin,

green tea component, causes caspase-independent necrosis-like cell death in chronic myelogenous leukemia”, **Cancer Sci** 100:349-356, Feb. 2009

- 12) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. **Cancer Sci** 100:737-746, Apr. 2009
- 13) 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, Apr. 2009
- 14) 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- $\kappa$ B by camptothecin in solid tumor cells. **Biochem Biophys Res Comm**, 390(1): 60-64, Dec. 2009
- 15) Miyake A, Ishida T, Yamagishi M, Hara T, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Inhibition of active HIV-1 replication by NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ. **Microbes Infect** (in press)

(総説)

- 1) 渡邊俊樹、「ホジキンリンパ腫発症の分子機構」, 血液・腫瘍科, 57(12): 595-600、2008

2. 学会発表

(国際発表)

- 1) Uota S, Dewan Z, Watanabe T, Muto S, Itai A, Yamamoto N, Yamaoka S, “A novel IKK Inhibitor, IMD-0354 Inhibits the Growth and Survival of ATL Cells both *in vitro* and *in vivo*”, 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV-1 and Related Viruses, May 23, 2007 (May 22-25, 2007), Hakone
- 2) Watanabe T, “Searching for molecules for a targeted therapy based on molecular allelo-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays”, The

International Symposium on Advanced Diagnosis and Therapy of Refractory Disease Caused by Viral Infection, Mar. 27, 2008, Kagoshima

- 3) Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Suzuki K, Watanabe T, “Promoter-targeted shRNA driven by retroviral vector achieves long-term repression of HIV-1 replication”, 11<sup>th</sup> Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, 2008, Selected Abstracts, Baltimore, Maryland. USA
- 4) Takahasi R, Ando T, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Watanabe T, “Possible dysfunction of NMD in ATL cells”, 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul. 2, 2009, Salvador, Brazil
- 5) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Uozumi k, Ogata M, Uchimaruk, Okayama A, Koh K-R, Kamihira S, Yamaguchi K, “Sequential Monitoring of HTLV-1 Provirus Load and Clinical Data in HTLV-1 Infected Individuals in the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD)”, Jul. 4, 2009, Salvador, Brazil

(国内発表)

- 1) 山岸誠、三宅在子、原拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「Study of the transcriptional gene silencing induced by retrovirus-mediated shRNA targeted to the HIV-1 promoter region」、平成 19 年度文部科学省科学研究費補助金がん研究に係る特定領域研究「ATL 発症高危険群の同定—発症予防を目指して」研究発表会、2007 年、青梅
- 2) 石原美栄、山岸誠、原拓馬、三宅在子、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV は antisense 鎖を利用しているのか?」、平成 19 年度文部科学省科学研究費補助金がん研究に係る特定領域研究「ATL 発症高危険群の同定—発症予防を目指して」研究発表会、2007 年、青梅
- 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- $\kappa$ 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 日 (2007 年 7 月 5 日～6 日)、大阪
- 4) Yamamoto K, Ishida T, Furukawa Y, Tanaka Y, Nakamura Y, Watanabe T, “HTLV-1 Tax-histone H3K4 methyltransferase SMYD3 interaction induces cell cycle dependent subcellular distribution of Tax”, 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 4 日 (2007 年 10 月 3 日～5 日)、横浜
  - 5) Horie R, Watanabe M, Dewan Md-Z, Taira M, Yamamoto N, Watanabe T, “1kBb mediated NF- $\kappa$ B induction in H-RS cells bearing mutant 1kBb and its inhibition by DHMEQ”, 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 5 日 (2007 年 10 月 3 日～5 日)、横浜
  - 6) 堀江良一、渡邊真理子、Dewan MdZ, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、「変異型 I $\kappa$ B $\alpha$  を有する H-RS 細胞での I $\kappa$ B を介した NF- $\kappa$ B 誘導と DHMEQ による分子標的療法」、第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会、2007 年 10 月 12 日 (2007 年 10 月 11 日～13 日)、横浜
  - 7) 岩崎礼央、伊藤金次、足立壮一、上辻由里、渡邊俊樹、佐藤裕子、「緑茶カテキンは慢性骨髄性白血病細胞に対し、カスパーゼ非依存性ネクローシス様細胞死を起こす」、第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会、2007 年 10 月 12 日 (2007 年 10 月 11 日～13 日)、横浜
  - 8) 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- $\kappa$ B 阻害剤 DHMPQ 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 22 日 (2007 年 10 月 21 日～23 日)、札幌
  - 9) 山岸 誠、三宅在子、原 拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「shRNA 発現レトロウイルスベクターを用いた TGS 誘導による HIV-1 抑制効果の検討」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 22 日 (2007 年 10 月 21 日～23 日)、札幌
  - 10) Dabaghmanesh N, Miyake A, Horie R, Dewan MdZ, Yamamoto N, Watanabe T, “Transient inhibition of NF- $\kappa$ 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 22 日 (2007 年 10 月 21 日～23 日)、札幌
  - 11) 山岸 誠、三宅在子、原拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「U3 領域を標的にした shRNA による HIV-1 増殖抑制効果の検討」、第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年 11 月 28 日 (2007 年 11 月 28 日～30 日)、広島
  - 12) 三宅在子、山岸誠、石田尚臣、渡邊俊樹、「SIV LTR プロモータ領域を標的とした siRNA による SHIV 増殖抑制機構の解析」、第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年 11 月 28 日 (2007 年 11 月 28 日～30 日)、広島
  - 13) 山岸 誠、三宅在子、原 拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「プロモーター標的 shRNA を用いた TGS 誘導による HIV-1 抑制効果とメカニズムの検討」、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 12 月 11 日 (2007 年 12 月 11 日～15 日)、横浜
  - 14) 堀江良一、渡邊真理子、小川裕司、伊藤金次、小岩 司、Marshall E. Kadin, 岡安 勲、渡邊俊樹、東原正明、「CD30 プロモーター CpG メチル化と JunB を介した CD30 誘導機構の解析」、第 48 回日本リンパ網内系学会総会・第 11 回日本血液病理研究会、2008 年 6 月 14 日 (2008 年 6 月 13 日～14 日)、札幌
  - 15) Nazanin Dabaghmanesh, 三宅在子、片野晴隆、佐多徹太郎、梅澤一夫、堀江良一、渡邊俊樹、「Inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication」、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 27 日 (2008 年 6 月 26 日～27 日)、東京
  - 16) 梶野富輝、佐々木栄貴、渡邊真理子、東原正明、鶴尾隆、渡邊俊樹、梅澤一夫、堀江良一、「薬剤耐性腫瘍細胞株に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤の抗腫瘍効果の検討」、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 27 日 (2008 年 6 月 26 日～27 日)、東京
  - 17) 三宅在子、石田尚臣、Dewen MD, Zahidunnabi,

- 山本直樹、梅澤一夫、堀江良一、渡邊俊樹、  
「NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ を用いたエイズリンパ腫治療の基礎研究」、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 27 日 (2008 年 6 月 26 日～27 日)、東京
- 18) 松尾純一、築茂由則、新家一男、鶴尾 隆、渡邊俊樹、富田章弘、「UPR 阻害剤 Versipelostatatin による 4E-BP1 活性化と GRP78 発現抑制」、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、学術総合センター、2008 年 6 月 27 日 (2008 年 6 月 26 日～27 日)、東京
- 19) 神林佑輔、鈴木絵里子、渡邊俊樹、堀江良一、梅澤一夫、「エイズ関連リンパ腫細胞の表現型解析と NF- $\kappa$ B 阻害剤(-)-DHMEQ による抑制」、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、学術総合センター、2008 年 6 月 27 日 (2008 年 6 月 26 日～27 日)、東京
- 20) 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、中村祐輔、渡邊俊樹、「HTLV-1 Tax のヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 との相互作用を介した細胞周期異存的細胞内局在変化とその機能的意義」、第 1 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2008 年 8 月 23 日～24 日、東京
- 21) 堀江良一、渡邊真理子、小川裕司、伊藤金次、Marshall E Kadin, 小岩 司、岡安 勲、渡邊俊樹、東原正明、「CD30 プロモーター CpG メチル化と JunB を介した CD30 誘導機構の解析」、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 12 日 (2008 年 10 月 10 日～12 日)、京都
- 22) 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、渡邊俊樹、「HTLV-1 Tax のヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 との相互作用を介した細胞周期異存的細胞内局在変化とその機能的意義」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日 (2008 年 10 月 26 日～28 日)、岡山
- 23) 三宅在子、山岸 誠、石田尚臣、渡邊俊樹、「SIV LTR プロモーター領域を標的とした siRNA による SHIV 増殖抑制機構の解析」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 28 日 (2008 年 10 月 26 日～28 日)、岡山
- 24) 山岸 誠、石田尚臣、三宅在子、鈴木一雄、渡邊俊樹、「プロモーター標的 shRNA を用いた HIV-1 の長期抑制効果とメカニズムの検討」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 28 日 (2008 年 10 月 26 日～28 日)、岡山
- 25) 片平量平、渡邊俊樹、鶴尾 隆、藤田直也、「がん抑制因子 TUSC4 による PDK1 活性制御機構」、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日 (2008 年 10 月 28 日～30 日)、名古屋
- 26) 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、マーシャルイ カデイン、渡邊俊樹、岡安 勲、東原正明、「CD30 プロモーター CpG メチル化と JunB を介した CD30 誘導機構の解析」、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日 (2008 年 10 月 28 日～30 日)、名古屋
- 27) 三宅在子、山岸 誠、石田尚臣、渡邊俊樹、「SIV LTR プロモーター領域を標的とした siRNA による SHIV 増殖抑制機構の解析」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日 (2008 年 12 月 9 日～12 日)、神戸
- 28) 山岸 誠、石田尚臣、三宅在子、鈴木一雄、渡邊俊樹、「HIV-1 プロモーター領域に対する shRNA は、ヒストン H3K27 のメチル化を介して長期的に転写を抑制する」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 12 日 (2008 年 12 月 9 日～12 日)、神戸
- 29) 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- $\kappa$ 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
- 30) 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- $\kappa$ 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
- 31) 石渡 優、矢持忠徳、山岸 誠、中野和民、渡邊俊樹、「植物アルカロイドセファラン

- チンによる、HTLV-1 感染細胞に対する抗腫瘍効果」、第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2009 年 8 月 29 日～30 日、東京
- 32) 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-κB 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)、横浜
- 33) 山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「ATL, HTLV-1 感染細胞における EZH2 の発現及び機能的解析」、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)、横浜
- 34) 三宅在子、山岸 誠、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 患者でのマイクロアレイ技術を用いたマイクロ RNA 発現異常の解析」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、横浜
- 35) 石渡 優、矢持忠徳、山岸誠、中野和民、渡邊俊樹、「ビスコクラウリン型アルカイド製剤セフェランチンによる、HTLV-1 感染細胞に対する細胞毒性効果」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、横浜
- 36) 山岸 誠、三宅在子、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「MicroRNA Expression Profiling and Abnormal MicroRNA Expression in Adult T-Cell Leukemia」、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
- 37) 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-κB 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
- 38) 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
- 39) 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-κB 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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-κB 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
- 44) 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

#### 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の分子病態に基づく治療法の開発

研究分担者：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 (研究分担者、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)

比島恒和 (東京都立駒込病院病理科)

梅澤一夫 (慶應義塾大学理工学部)

**研究要旨** エイズ関連リンパ腫の分子病態に基づく治療法の開発を目指し、以下の成果を得た。(1) エイズ関連 Epstein-Barr virus (EBV)陽性日和見リンパ腫の新規治療法として、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) と NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の併用療法について検討し、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ものの、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、明らかな相乗、相加効果は見られなかった。(2) EBV の LMP1 を標的として、JAK(Janus kinase), MEK(MAPK/ERK kinase)阻害薬が、LCL を 2-20 $\mu$ M の濃度で増殖を抑制することを見いだした。(3) エイズ関連リンパ腫サンプル 20 例を収集し、基礎情報として EBV, HIV, HHV-8 などのウイルスを検出した。

### A. 研究目的

エイズに合併する悪性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。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、リンパ腫とカポジ肉腫は発症率として増加傾向にある。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。本研究ではエイズ関連リンパ腫に対する新規治療薬の開発を目指し、下記の3点について検討した。

### 1. スタチンとDHMEQの併用療法

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）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(Katano et al. PNAS 101:4960-5, 2004)。また、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。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こす可能性がある。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- $\kappa$ 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- $\kappa$ Bが恒常的に活性化されている腫瘍においてNF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

### 2. LMP1を標的とした治療法

EBV関連日和見リンパ腫はEBVの主要な癌タンパクであるLMP1が陽性でNF- $\kappa$ Bは恒常的に活性化している。このリンパ腫ではLMP1が活性化する様々なシグナル経路が形質転換に重要である。LMP1が誘導するシグナル経路にはおおまかに、NF- $\kappa$ Bを活性

化する経路、AP-1を活性化する経路、Jak-Statの経路の3つが知られている。いずれも転写因子の活性化から最終的には細胞増殖や抗アポトーシスなどの効果をもたらす。これらの経路はLMP1の細胞質内C末端にTRAF, TRADD, JAK3などが結合する活性化ドメイン CTAR(C-terminal activation region)1, 2, 3があり、これらを介して最終的にはNF- $\kappa$ B, AP1, STAT3といった転写因子の活性化を引き起こす。今回はLMP1により活性化するNF- $\kappa$ B以外の転写因子 AP-1, STAT3に着目した。そしてAP1, STAT3の活性化につながるMEK-ERK, JAK-STATの2つの経路を阻害するMEK阻害薬, JAK阻害薬について検討した。

### 3. エイズ関連リンパ腫におけるEBV, HHV-8, HIV感染の検討

HAART導入後、本邦ではEBV陰性エイズ関連リンパ腫も増えてきている。これらのリンパ腫の組織型はEBV関連日和見リンパ腫と同様にDLBCLであるが、その発症機構はほとんど知られていない。本分担研究ではこうした近年のエイズ関連リンパ腫を遺伝子発現プロファイルなどから分子病態ごとに再分類することを一つの目標としており、今回は、エイズ関連リンパ腫20例を収集し、そこに含まれるウイルスを検出し、遺伝子発現プロファイル検索の基礎情報とする。

## 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%CO<sub>2</sub>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。JAK阻害剤(Calbiochem社 #420097)、MEK阻害剤 U0126 (プロメガ社)

はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解後、目的濃度になるように培養上清に加えた。

## 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

$1 \times 10^7$  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。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。

## 4. 細胞周期分析、アポトーシス誘導の検討

$2 \times 10^4$ /ml の細胞に試薬添加 3 日後に 70% EtOH 固定、PI 染色し、DNA 量をフローサイトメーター(partec社)で測定さらに FlowJo ソフトウェア(Digital Biology社)にて解析を行った。アポトーシス誘導の有無の検討は Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit(BD Bioscience社)を用いて行った。

## 5. NF- $\kappa$ B 活性 (EMSA法)

$2 \times 10^4$ /ml の細胞に試薬添加 3 日後に核分画抽出を行い、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (PIERCE 社)を用いて解析を行った。

## 6. エイズ関連リンパ腫 20 例におけるウイルスの検出

国立感染症研究所感染病理部、および東京都立駒込病院病理科に保存してあるエイズ関連リンパ腫の凍結標本 20 例につき、EBV, HHV-8, HIV の検索を行った。組織型は

すべて diffuse large B cell lymphoma であり、生検、または剖検時に採取し、凍結保存後、DNA・RNA 抽出した。ウイルスの検出はリンパ腫から抽出した DNA を用いて、通法の PCR を行った。EBV は W-region, HHV-8 は ORF26, HIV は gag 領域を標的とした。また、内因性コントロールとして beta-globin 遺伝子の増幅を行った。

## (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。ヒト由来試料(エイズ関連リンパ腫の凍結標本)の検索に関して、サンプルはすべて匿名化された状態で使用され、研究計画は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会による承認を受けた(承認番号 156, 157)。

## C. 研究結果

### 1. スタチンと DHMEQ の併用療法

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  $2 \mu\text{M}$  または DHMEQ  $10 \mu\text{g/mL}$  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  $1 \mu\text{M}$  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。また、DHMEQ  $5 \mu\text{g/mL}$  でも大きなクランプが見られた。そこで、シンバスタチン  $1 \mu\text{M}$  と DHMEQ  $5 \mu\text{g/mL}$  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。細胞増殖アッセイではシンバスタチン  $1 \mu\text{M}$  および DHMEQ  $5 \mu\text{g/mL}$  の併用でも十分な効果が得られることが示唆された(図 1)。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。

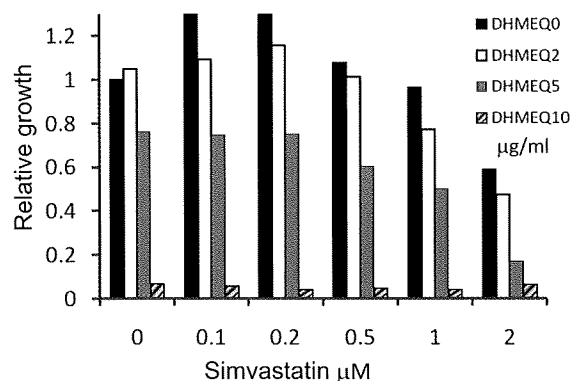


図1. In vitro におけるシンバスタチンとDHMEQの併用の検討

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。複数のLCLで同様の結果が得られている。

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

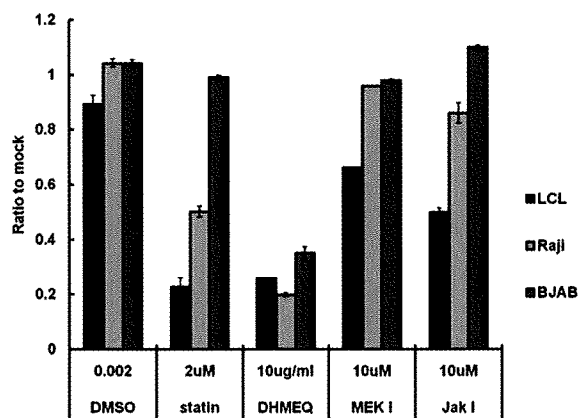


図2 JAK阻害剤、MEK阻害剤添加3日後のXTT assayによる細胞数の解析結果を示す。ともにLCLの増殖を抑制する。スタチン、DHMEQに比較してLMP1陽性のLCLに対して特異性が高いと考えられる。

-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。

## 2. LMP1を標的とした治療法

JAK阻害剤、MEK阻害剤を2μMの濃度でLCLに添加し4日目に細胞増殖アッセイを行うとLCLの増殖抑制効果が認められた(図2)。この抑制効果はEBV陽性LMP1陰性のRajiやEBV陰性LMP1陰性のBJABに対しては効果が認められないか、効果はごくわずかであった。LMP1陰性のリンパ腫細胞株に増殖抑制効果を示すDHMEQと異なり、JAK阻害剤、MEK阻害剤はLMP1陽性のLCLに対して選択的に増殖抑制効果がみられ特異性が高いと考えられた。またこの増殖抑制効果は2-20μMの濃度で濃度依存的に認められた(図3)。さらに、LCLが増殖するときに認められるクランプ形成について、薬剤添加後4日目に顕微鏡下で観察したところ、スタチンと同様にクランプ形成は認められなかった。(図4) JAK阻害剤、MEK阻害剤添加群のNF-κB活性をEMSA法にて検討したところ、JAK阻害剤では変化が見られなかったが、MEKを20μM加えた群で活性低下が

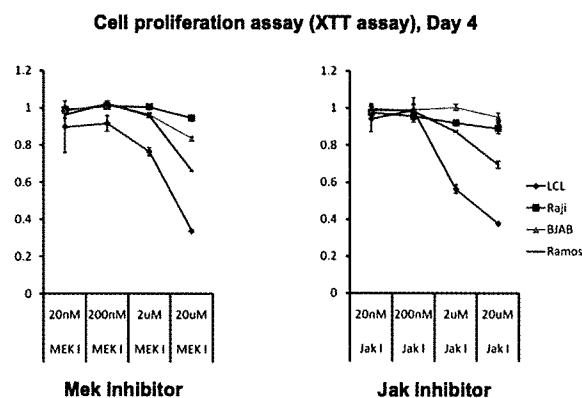


図3 JAK阻害剤、MEK阻害剤ともに2-20μMの濃度で濃度依存的にLCLの増殖を抑制した。

認められた。これはJAK阻害剤はNF-kBの活性化を阻害せず、NF-kBとは異なる経路を標的としていることを示している。

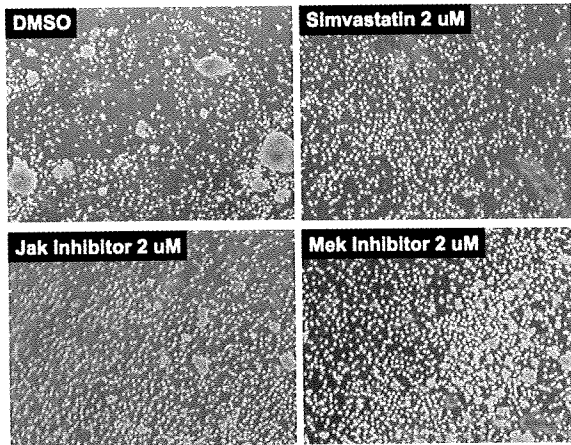


図4 JAK阻害剤、MEK阻害剤ともにLCL増殖の際に認められるクランプの形成が消失した。

### 3. エイズ関連リンパ腫におけるEBV, HHV-8, HIV感染の検討

日本人エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイルを明らかにする目的でエイズ関連リンパ腫サンプル20例につき、EBV, HHV-8、およびHIVをconventional PCRにより検出を試みた。結果、EBVは20例中18例に検出され、一方でHHV-8の検出されるサンプルはなかった(図5)。HIVはDNA PCRで20例中6例に検出された。EBVのウイルス量は1細胞当たり1コピー以上のサンプルが12例であり、残り6例は1細胞当たり0.1コピー以下であった。HIVは多くの症例で1細胞当たり0.01コピー以下と低コピー数であったが、1例のみに1細胞当たり3コピー

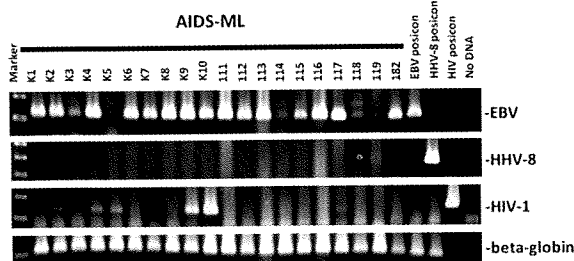


図5 エイズ関連リンパ腫20例におけるEBV, HHV-8, HIVの検出。

一程度の高いコピー数が検出された。この症例ではHIVのインテグレーションが疑われた。

### D. 考察

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。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、LMP1は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-kBの活性が低下し、最終的にEBV感染細胞が細胞死に陥る。一方、DHMEQはNF-kB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-kBの活性化が阻害されることがそのメカニズムとなる。スタチンとDHMEQの併用は間接的および直接的にNF-kBの活性化を阻害する薬剤の組み合わせであり、作用点異なることと、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ろうが、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。

JAK 阻害薬、MEK 阻害薬ともに LCL の増殖抑制効果を認めたが、スタチン、DHMEQ などこれまでに効果が確認された薬剤に比べて効果は弱い。今後より特異性の高い薬剤を使用し詳細に標的となる蛋白リン酸化酵素を絞り込む必要があると考えられる。一方で JAK 阻害薬による NF- $\kappa$ B 活性の抑制効果が見られなかったことから、NF- $\kappa$ B を標的とするスタチンなどの薬剤との併用では増強効果が期待できる。また LMP1 陽性細胞に特異性が高いことからエイズ関連 EBV 感染日和見リンパ腫の新たな治療薬として有力な候補になるかもしれない。

近年のエイズ関連リンパ腫の分子病態を明らかにするためには、いくつかの複合的手段を駆使する必要がある。EBV 陽性リンパ腫はいまだに半数を占め、これらは EBV による日和見リンパ腫として分類することができる。問題は EBV 陰性リンパ腫であり、これらは共通の遺伝子異常や染色体転座などを持たない。一般に、EBV、HHV-8 以外のウイルスが直接的にリンパ腫発症と関連する可能性は低い。今回、EBV は2例で陰性であったが、PCR は感度が高いため、病因と関連しない、by standing なウイルスを検出している可能性もある。また、組織学的には EBER の in situ hybridization が EBV の検出には信頼のある手法とされるが、PCR の結果とは合致しない症例も存在した。定量的 PCR では1細胞当たりのコピー数が1を越えている症例は12例に過ぎず、8例は EBV 陰性、または低コピー数であり、病態と関連していない可能性がある。HIV 陽性のリンパ腫はきわめて珍しく、以前我々が報告した例では HIV が Stat3 遺伝子上流にインテグレーションし、stat3 遺伝子発現の亢

進を誘導し、リンパ腫発症に関連していた。今回の検索でも1例に高コピー数の HIV が検出されており、今後の解析対象としたい。

## E. 結論

1. 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- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の併用療法を検討し、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。
2. LMP1 を標的とし、JAK および MEK 阻害薬が、LCL を 2-20  $\mu$ M の濃度で増殖を抑制することを見いだした。LMP-1 の発現細胞特異的に増殖効果が見られ、これらの阻害薬はエイズ関連 EBV 感染日和見リンパ腫の新たな治療薬の候補であると考えられた。
3. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析のため、エイズ関連リンパ腫サンプル20例を収集し、基礎情報として、EBV、HIV、HHV-8 などのウイルスを検出した。その結果、すくなくとも2例の EBV 陰性リンパ腫が含まれていることが分かった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Ishak Mde O, Martins RN, Machado PR, de Souza LL, Machado LF, Azevedo VN, Katano H, Sata T, Hasegawa H, Vallinoto AC, Ishak R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. J Med Virol. 2007;79:1537-44.
2. 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.* 2007;9:1581-9.
3. Kuhara T, Yoshikawa T, Ihira M, Watanabe D, Tamada Y, Katano H, Asano Y, Matsumoto Y. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2007;144:79-85.
  4. Ueno T, Mitsuishi T, Kimura Y, Kato T, Hasegawa H, Katano H, Sata T, Kurane S, Kawana S. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. *Eur J Dermatol.* 2007;17:539-40.
  5. Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, Yamamoto N, Morishita K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol.* 2008;82:11958-63.
  6. Cheng B, Martinez FP, Katano H, Tang Q. Evidence of inability of human cytomegalovirus to reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency in body cavity-based lymphocytes. *J Clin Virol.* 2009;46:244-8.
  7. Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF-kappaB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Sci.* 2009;100:737-46.
  8. Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J Cancer.* 2009;124:622-9.
  9. Hoshino Y, Katano H, Zou P, Hohman P, Marques A, Tyring SK, Follmann D, Cohen JI. Long-Term Administration of Valacyclovir Reduces the Number of Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected B Cells but Not the Number of EBV DNA Copies per B Cell in Healthy Volunteers. *J Virol.* 2009;83:11857-61.
  10. Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, Tsuji T, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T. Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2009;81:1951-8.
  11. Takahashi-Makise N, Suzu S, Hiyoshi M, Ohsugi T, Katano H, Umezawa K, Okada S. Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway. *Int J Cancer.* 2009;125:1464-72.
  12. Hatano B, Kojima A, Sata T, Katano H. Virus detection using viro-adembeads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63:52-4.
  13. Kanno T, Sato Y, Nakamura T, Sakamoto K, Sata T, Katano H. Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *J Med Virol.* 2010;82:400-6.

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回へ

- 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.
  5. 片野晴隆、菅野隆行、佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第97回日本病理学会総会 2008.4 金沢
  6. 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆. RTA発現レベルの異なるKSHV感染細胞におけるウイルス感染維持 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山.
  7. 片野晴隆、加納基史、中村智之、菅野隆行、浅沼秀樹、佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイルの解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山.
  8. 片野晴隆、中村智之、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎. KSHV感染におけるKSHV全遺伝子発現プロファイルの解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山.
  9. 片野晴隆、佐多徹太郎. エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器における多種類ウイルスの定量. 第22回日本エイズ学会学術集会 2008年12月、大阪.
  10. 片野晴隆、坂本康太、浅沼秀樹、中村智之、菅野隆行、佐多徹太郎. KSHVのワクチン開発に関する基礎研究—KSHV粘膜ワクチン開発の可能性. 第6回EBウイルス研究会 2009年6月 東京
  11. 片野晴隆 HHV-8感染とカポジ肉腫、primary effusion lymphomaの発症病理. 基礎系シンポジウム「エイズ発症の危険因子としての微生物間相互作用」第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月名古屋
  12. 片野晴隆 カポジ肉腫の臨床病理とHHV-8感染. 臨床系シンポジウム2「HIV-1感染と悪性腫瘍」第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月名古屋
  13. 坂本康太、浅沼秀樹、中村智之、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆. KSHVのワクチン開発に関する基礎研究—KSHV粘膜ワクチン開発の可能性 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月東京
  14. 菅野隆行、中村智之、坂本康太、佐藤由子、佐多徹太郎、片野晴隆 日本におけるKSHV関連疾患の臨床病理とKSHVサブタイプ解析 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



## エイズリンパ腫発症モデルと薬剤治療モデルの確立

分担研究者 清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所  
フロンティア研究室ウイルス治療学 准教授

### 研究要旨

1. 免疫不全マウス NOD にヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植したヒト化マウスに HIV-1 を感染して HIV-1 持続感染マウス(エイズモデルマウス)を作成した。エイズモデルマウスに EB ウイルス (EBV) を重感染し、コントロールマウス (HIV-1 非感染ヒト化マウス) に EBV を感染したところ、HIV-1 感染マウスの方がマウス体内における EBV コピー数が高くなるとの予想に反し HIV-1 非感染マウスの方が全身の EBV コピー数が高いことが示された。
2. エイズリンパ腫の約半数が EBV 陽性であることに着目し、EBV が存在することにより選択毒性を発揮する薬剤の探索を行った。その結果、EBV が持つチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化される薬剤 (2'-fluoro-4'-thio- arabinofuranosyl-methyl-uracil) を見出し、EBV 感染細胞株に対する特異的かつ強力な増殖抑制効果があることを確認した。

### A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)の感染者は年々増加しており、2008 年に新たに判明した HIV 感染者・エイズ患者は 1545 人と報告され、6 年連続最多を更新している（厚生労働省エイズ動向委員会発表）。一方、近年導入された薬剤治療法 (Highly Active Anti- Retroviral Therapy : HAART 療法) の導入により HIV-1 感染者の予後は大幅に改善され、現在では HIV-1 感染症は治療可能な慢性疾患となった。しかし、HAART 療法によっても感染者から HIV-1 を完全に排除することは不可能であり、抗ウイルス剤の長期服用による副作用や薬剤耐性 HIV-1 の出現など多くの問題が生じている。さらに、エイズ関連悪性リンパ腫 (エイズリンパ腫) の発症率は HAART 療法導入後もあまり下がっておらず、また再発率が高く再発後は治療抵抗性となるため、現在でもエイズ患者の長期的予後を脅かす最大の要因となっている。エイズリンパ腫患者全体に占める EBV 陽性例は減少傾向にあるものの、依然半数近くのエイズリンパ腫は EBV 陽性である。我々は EBV 陽性エイズリンパ腫の治療法を確立するため、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細

胞を移植した NOG マウス (ヒト化マウス) を利用したエイズリンパ腫モデル実験系を確立し、エイズリンパ腫の新規治療法開発に応用することを目的に実験を行った (平成 19 年度)。

さらに、我々は EBV 陽性エイズリンパ腫の治療法を確立するため、EBV が存在することにより選択毒性を発揮する薬剤の探索を行った。その結果、EBV がコードするチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化され細胞毒性を発揮する (2'-fluoro-4-thio- arabinofuranosyl-methyl-uracil : YMS-95145) を見出した (東北大学医学部児玉栄一博士との共同研究)。従来、EBV-TK 遺伝子は早期遺伝子に分類され、EBV 陽性エイズリンパ腫のような EBV 潜伏感染細胞に発現するか否か詳細な検討はなされていない。

様々な EBV 感染細胞株の EBV-TK 遺伝子発現の解析とそれら細胞株に対する YMS-95145 の効果を確認することを通じて、YMS-95145 のエイズリンパ腫に対する治療薬としての可能性を検討することを目的に研究を行った (平成 20 年度)。

## B. 研究方法

### 1. NOG マウスへのヒト造血幹細胞移植

- 臍帯血バンクより入手した研究用臍帯血から Ficol1 遠心分離法により、単核球 (CBMC) 層を回収した。分離した CBMC から MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を使用して CD34 陽性造血幹細胞を分離した。
- 6-8 週齢の NOG マウスへ尾静脈より  $2 \times 10^4$ - $1.0 \times 10^5$  個の CD34 陽性造血幹細胞を投与した。

### 2. フローサイトメトリー解析

移植後 1-8 ヶ月のマウスの末梢血、脾臓、骨髓、胸腺を採取し、フローサイトメトリー用に単核球細胞を分離した。末梢血および各組織から分離した単核球細胞を抗ヒト CD45, CD3, CD19, CD4, CD8 抗体および抗マウス CD45 (すべて Beckman Coulter) 抗体で染色し、フローサイトメトリー (Beckman Coulter) 解析を行った。HIV-1 投与マウス由来のサンプルは、染色後 1% ホルマリンで固定し解析した。

### 3. HIV-1 感染実験

移植後、120-151 日目のマウスに、HIV-1<sub>JRCSF</sub> (R5 指向性)、HIV-1<sub>MNp</sub> (X4 指向性) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) をそれぞれ尾静脈より投与した (20000-60000 TCID<sub>50</sub>/mouse)。投与後 4 ヶ月間に渡り定期的に採血、剖検を行い、ウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。

### 4. マウス血漿中 HIV-1 の定量

HIV-1 感染マウスから回収した血漿から RNA を抽出した (QIAamp Viral RNA Mini kit: QIAGEN)。HIV-1 ゲノムコピー数は、ABI7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社) で定量した。

### 5. マウスへの HIV-1 と EBV の重感染実験

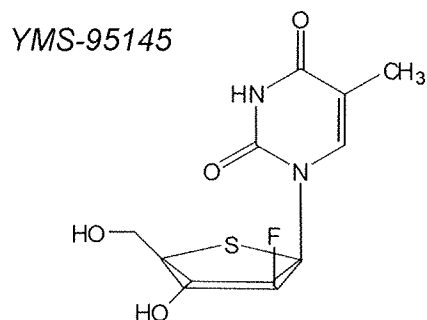
移植後 4-5 ヶ月のマウスに、HIV-1<sub>JRCSF</sub> (R5 指向性) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) を尾静脈より投与し、さらに 8 週間後に Akata 細胞培養上清由来の EBV を尾静脈より投与した。その後定期的に採血、剖検を行い、EB ウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。EBV-DNA は QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) にて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system で定量

した。

また、同ドナー由来の臍帯血細胞から樹立した EBV 感染 B 細胞株 (LCL) を HIV-1 感染マウスに投与し、その後 EB ウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。

### 6. 抗ウイルス剤

今回使用した YMS-95145 は、ヤマサ醤油株式会社により合成、供給されたものを使用した。また、コントロールとして AZT, BVaraU, BVDU, GCV, ACV を使用した。YMS-95145 の構造式を以下に示す。



### 7. EBV-TK 導入細胞の増殖を抑制する薬剤の探索

EBV 感染細胞の増殖抑制を指標に薬剤の探索を行った。ヒトゲノム由来および EBV ゲノム由来のチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (hu-TK or EBV-TK) を pClneo ベクター (薬剤耐性マーカーとサイトメガロウイルスのプロモートおよび polyA シグナルを持つ: プロメガ) にそれぞれクローニングした。

それぞれのプラスミドを TK 遺伝子を欠損しているヒト骨肉種細胞由来の 143BTK(-) 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を各種薬剤存在下で培養を行うことにより hu-TK 導入細胞には毒性を示さず、EBV-TK 導入細胞に毒性を示す薬剤の探索を MTT アッセイにより行った。

#### a. EBV 陽性細胞株

EBV 陽性細胞株に対する増殖抑制効果を測定するため、EBV 陽性 B 細胞株 (B95a, NC37)、EBV 陽性 NK 細胞株 (KAI3, SNK-6, SNK-10, YT-A1)、EBV 陽性 T 細胞株 (SNT-8, SNT-15, SNT-16)、コントロールとして EBV 陰性 T 細胞株 (H9, Jurkat, PM-1, SupT1) を使用した。

#### b. EBV-TK 遺伝子発現の定量

EBV-TK は EBV ゲノム BamHIX 断片上の左向きの

オープンリーディングフレーム BXLFI にコードされていることが明らかとなっているため、BXLFI 遺伝子の中に下記のような RT-PCR 用のプライマー・プローブを設計した。

Primer F: CGCATCGGTCAGGGACTAC

Primer R: GTGTGGGAAAGACTACTATGCTGAATC

Probe : 6FAM-TCAGGTCCCAAAAGACAGCCTTC-  
AAA-iowaBlack

RNA 抽出: QIAGEN RNeasy mini kit により抽出した。

DNaseI 処理: RNA 抽出後、TAKARA DNaseI で 37°C 15 分間処理し、再度 QIAGEN RNeasy mini kit にてクリーンアップした。

RT-PCR: 下記の条件で RT-PCR を行った。

RNA solution	1 $\mu$ l
X2 Buffer	10 $\mu$ l
10 $\mu$ M Primer Mix	1 $\mu$ l
4 $\mu$ M Probe	1 $\mu$ l
RT-taq polymerase	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6.5 $\mu$ l

---

Total 20  $\mu$  l

RT-PCR Reaction

RT reaction	50°C	20 分
Denature	95°C	15 分
PCR (50Cycle)	95°C	0 秒
	60°C	30 秒

PCR (DNaseI 処理後の残存 DNA 確認)

RNA solution	1 $\mu$ l
AB gene X10 Buffer	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M Primer Mix	2 $\mu$ l
4 $\mu$ M Probe	1 $\mu$ l
AB gene taq polymerase and anti-taq high	0.2 $\mu$ l
20mg/ml BSA	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12.3 $\mu$ l

---

Total 20  $\mu$  l

PCR Reaction

Denature	95°C	0 秒
PCR (45Cycle)	95°C	0 秒
	60°C	20 秒

### (倫理面への配慮)

研究にはヒト臍帯血を移植したマウス (ヒト化マウス) 由来の試料を一部使用した。ヒト化マウスの作成に当たっては、以下の点に留意した。

1. 臍帯血の使用に関しては、国立感染症研究所、日本大学医学部および東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。
2. 臍帯血の採取は、あらかじめ医師を通じて妊産婦に研究内容を説明し、文書による承諾を得た上で行った。実際の採取は産婦人科の医師が行い、匿名処理を行うなど研究者には必要以上に提供者の情報が伝わらないよう留意した。また、臍帯血は他の研究目的には使用しないため、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。
3. 動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。放射線照射、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。これは動物実験における実験処置に対する倫理基準のカテゴリー B (動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験) レベルの実験に相当する。

### C. 研究結果

#### 1. 長期生存するヒト化マウスの確立と発生するヒト細胞の解析

HIV-1 感染とそれに伴うエイズ発症モデルの確立には、マウスの安定した長期生存が不可欠である。我々は、ヒト造血幹細胞の移植方法の改良を行い、移植後 300 日以上安定したマウスの生存を可能とした。従来の SCID マウスや NOG マウスへのヒト造血幹細胞の移植には放射線照射が不可欠とされていたが、NOG マウスでは放射線照射を行わなくてもヒト細胞の生着、発生が十分に起こることが判明した。このヒト化マウスの 80%以上は移植後 300 日以上生存し (平均生存期間: 387 日)、300cGy の放射線照射したマウス (平均生存期間: 188 日) に比べて明らかな長期生存を示した。ヒト細胞の発生を経時的に解析すると、発生初期のヒト細胞のほとんどが B 細胞であったが、移植後 100 日以降にヒト T 細胞が顕著に増加するのがみ

とめられた。また、脾臓や骨髄などの組織では単球/マクロファージ、樹状細胞など免疫や HIV-1 感染に重要なヒト細胞群の発生も確認された。

## 2. HIV-1 感染実験

造血幹細胞移植後 120-151 日目のマウスを用い、R5 指向性 HIV-1<sub>JRCSF</sub> (65,000 TCID<sub>50</sub> / マウス) および X4 指向性 HIV-1<sub>MNp</sub> (20,000 TCID<sub>50</sub> / マウス)、X4 指向性 HIV-1<sub>NL4-3</sub> (60,000 TCID<sub>50</sub> / マウス) をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 116 日目までの血漿中のウイルスコピー数を測定したところ、すべてのマウスで感染が成立し、3 ヶ月以上にわたって高いウイルスコピー数 ( $<7.8 \times 10^6$  copies/ml) が持続する慢性感染が成立した。感染マウスにおける末梢血 CD4/CD8 の割合、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の絶対数の変動を経時的にモニタリングした結果、CD4/CD8 の割合は、非感染コントロールマウス (7 匹) では、時間の経過と共にやや増加する傾向があるのに対し、X4 指向性 HIV-1<sub>MNp</sub> (5 匹) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (6 匹) に感染した 2 つの個体群では経時的に減少していくのがみられた。一方、R5 指向性 HIV-1<sub>JRCSF</sub> (7 匹) 感染マウスにおいても CD4/CD8 は減少するもののその減少速度は比較的緩やかであった (図 2. A)。末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の絶対数についても同様な傾向がみられたが (図 2. B)、CD8 陽性 T 細胞数は主に X4 指向性 HIV-1 においてのみ減少する傾向がみられた (図 2. の結果から、このマウスがエイズモデルとしてさまざまな研究に応用できる可能性が示された。

## 3. HIV-1 と EBV の重感染実験

エイズ関連悪性リンパ腫の要因の一つとなる EBV は健常人の 90%以上が感染しているが、免疫によって潜伏感染状態に抑えられている。一方でエイズや移植などで免疫不全状態になると B 細胞リンパ腫を発症することが問題となっている。我々は HIV-1 感染と並行して EBV 感染実験を行い、リンパ腫発症モデルの作製を行った (分担研究者藤原担当)。その結果、このヒト化 NOG マウスが EBV に対して強い免疫反応を示し、投与時期やウイルス投与量によってリンパ腫の形成をコントロールできることが明らかとなった。そこで、HIV-1 と EBV を重感染させ、免疫不全状態を誘導することにより「エイズに伴う日和見リンパ腫再現モデル」

」の作製を試みた。

感染実験では、まず HIV-1 を感染させて CD4 陽性 T 細胞の減少を再現し、その後 EBV を感染させて病態の解析を行った。その結果、まず最初に HIV-1 非感染マウス (3 匹) から末梢血中 EBV コピー数が検出され、その後顕著な体重減少を示した。一方、R5 指向性 HIV-1<sub>JRCSF</sub> (4 匹) および X4 指向性 HIV-1<sub>NL4-3</sub> (4 匹) に感染したマウスでは、体重減少および末梢血中の EBV コピー数の増加が遅れてみとめられた。EBV 投与後 29 日目のマウス 4 匹を剖検した結果、HIV-1 非感染マウスでは各組織でリンパ腫の形成がみとめられ、全身組織で高い EBV コピー数が検出されたのに対し、HIV-1 感染マウスでは肉眼的にリンパ腫の形成はみとめられず、全身組織の EBV コピー数も HIV-1 非感染マウスに比べて低い数値を示した (表 1)。このことから、HIV-1 感染マウスにおいては、何らかの要因によって EBV 感染後の病態進行が遅れることが示された。

表 1

EBV コピー数 / 100ng DNA (  $1 \times 10^5$  LCL 投与後 21 日目)

	HIV-1非感染	R5 HIV-1 感染	X4 HIV-1 感染	ヒト細胞未移植	
脾臓	$2.9 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$
肝臓	$3.5 \times 10^4$	$4.7 \times 10^5$	$5.5 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$
肺	$7.7 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$
腎臓	$8.1 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$4.4 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$6.6 \times 10^5$
副腎	$8.1 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$
リンパ節	$2.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
末梢血	$4.0 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$

次に、HIV-1 非感染マウス (4 匹)、HIV-1 感染マウス (6 匹) およびヒト細胞未移植マウス (6 匹) に同臍帯血ドナー由来の EBV 感染細胞 (LCL、 $1 \times 10^5$ - $10^6$  細胞数) を投与し、その後の病態を比較した。その結果、LCL 投与後 20-25 日目にはすべての個体群で体重減少および末梢血中 EBV コピー数の増加がみられ、剖検解析からもリンパ腫の発生および全身組織の EBV コピー数に顕著な差はみられなかった (表 2)。このことから、HIV-1 感染が腫瘍形成の進行ではなく、EBV 初期感染の過程で何らかの影響を与える可能性が示された。