

表 2

全身の組織における EBVコピー数 / 100ng DNA EBV投与後 29日目)				
	HIV-1非感染		R5 HIV-1 感染	X4 HIV-1 感染
脾臓	1474,499	2750,583	103,682	検出限界以下
肝臓	191,293	555,366	7,971	検出限界以下
胸腺	19,370	102,298	911	1,478
肺	143,416	165,827	2,426	102
腎臓	229,162	45,717	538	203
副腎	464,415	607,596	348	71
小腸	526	2,450	51	7

#### 4. EBV-TK 発現細胞に対する薬剤の効果

実験に使用した薬剤 (YMS-95145, AZT, BVaraU, BVDU, GCV, ACV) のヒト骨肉種細胞由来 143BTK(-)細胞に対する細胞毒性 CC50 値 (50%細胞毒性濃度) は何れも 100  $\mu$ M 以上であり、また hu-TK 導入細胞に対する効果も 100  $\mu$ M 以上だった。EBV-TK 導入細胞に対する効果は、YMS-95145 以外は 100  $\mu$ M 以上だったのに対して YMS-95145 は 0.11  $\mu$ M と際立った低値を示し、CC50 値を 50%有効濃度 EC50 値で割った有効係数 SI 値 (Selectivity Index) は 2700 以上と非常に高値を示し、YMS-95145 は EBV-TK 陽性細胞に選択的に細胞毒性を示す非常に有望な薬剤であることが示された。

#### 5. EBV 陽性細胞株に対する YMS-95145 の効果

YMS-95145 の EBV 陽性細胞株に対する効果を検討したところ、B細胞系の B95a, NC37、NK細胞系の 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 に対する CC50 は何れも 10  $\mu$ M 以下だったが、EBV 陰性のコントロール細胞株 H9, Jurkat, PM-1, SupT1 に対する CC50 は何れも一桁多い 100  $\mu$ M 以上であり、YMS-95145 が EBV 陽性細胞株に対して選択的増殖抑制効果を持つことが示され、治療薬候補になりうることが示唆された。

#### 6. EBV-TK 遺伝子発現の解析

EBV 陽性あるいは陰性細胞株と EBV 感染あるいは非感染ヒト化 NOG マウスの組織における EBV-TK 遺伝子発現を検討した。その結果は下記の通りで、EBV 陽性サンプルは全てすべて

EBV-TK 遺伝子発現が陽性だった。

Sample	EBV genome	EBV-TK (copies/ $\mu$ g RNA)
SNK-6	+	2.0 x 10 <sup>2</sup>
SNT-8	+	2.5 x 10 <sup>2</sup>
SNK-10	+	1.5 x 10 <sup>2</sup>
マウス spleen	+	2.0 x 10 <sup>3</sup>
マウス liver	+	4.2 x 10 <sup>3</sup>
マウス PBMC	+	2.2 x 10 <sup>3</sup>
KYG1	-	Negative
Huh-7	-	Negative
PHK160b	-	Negative
マウス spleen	-	Negative
マウス liver	-	Negative
マウス PBMC	-	Negative

#### D. 考察

1. エイズ関連悪性リンパ腫は、HAART 療法により慢性疾患化したエイズの長期予後を脅かし、エイズ患者の直接死因の多くを占める。本研究では、その要因の一つとなる EBV を HIV-1 と重感染させ、日和見エイズリンパ腫発症モデルの作製を試みた。今回の実験からは、HIV-1 感染マウスでは EBV 投与後の病態進行が遅れることが判明した。現在のところその要因は明らかではないが、10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> 個の LCL を投与した場合はリンパ腫の形成時期に顕著な差はみとめられず、HIV-1 感染が EBV 初期感染の過程に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。今後、日和見エイズリンパ腫モデルの作製には、(1) EBV 接種により持続感染状態になったマウスに HIV-1 を感染させる、(2) LCL 細胞数を調節して HIV-1 感染マウスに投与する、などの検討を要すると考える。

2. ヘルペスウイルスは自身の TK 遺伝子を持つため、ヒト TK によってはリン酸化されずヘルペスウイルス TK によりリン酸化されて初めて効果を発揮する薬剤がヘルペスウイルス感染細胞に選択毒性を示す。そのような効果を持つ薬剤が多数開発され、単純ヘルペスウイルスに有効なアシクロビルやサイトメガロウイルスに有効なガンシクロビルが実用化されてい

る。しかし、何れの薬剤も EBV に対する効果は限定的で、EBV 関連疾患の治療薬として確立された薬剤は開発されていない。また、他のヘルペスウイルスはウイルスの増殖に伴って病変が現れるので、ウイルス複製サイクルで発現する TK を標的とした薬剤が有効であるが、EBV 潜伏感染細胞の増殖が病因となる EBV 感染症では、早期抗原に分類される EBV-TK 遺伝子を標的とした薬剤の効果は疑問視されていた。しかし、EBV-TK 存在下でのみ細胞増殖抑制効果を発揮する YMS-95145 を見出し、しかも EBV 潜伏感染細胞中に EBV-TK が発現されているとの実験結果は、EBV 関連疾患の治療薬を開発する際に非常に重要な知見である。

3. YMS-95145 は  $10 \mu\text{M}$  濃度で EBV 陽性細胞株の増殖を抑制するが、EBV 陰性細胞株の増殖を抑制する濃度は  $100 \mu\text{M}$  以上であることから、従来の薬剤に比べて EBV 陽性細胞に非常に強い選択毒性を有する薬剤候補と考えられる。

3. 今回用いた EBV 陽性細胞株および EBV 感染ヒト化 NOG マウス組織中には EBV ゲノムが増殖サイクルに入っていることを示す BZLF1 遺伝子発現は検出されず、少なくとも EBV 感染細胞の大部分は EBV 潜伏感染細胞と考えられる。EBV 潜伏感染細胞中に EBV-TK 遺伝子が発現していることの実験結果は新しい知見であり、EBV 関連疾患に対する治療薬を開発する上で重要な発見である。EBV 関連疾患の原因細胞はリンパ系の B, T, NK 細胞に加え上皮細胞（上咽頭癌や胃癌）と多岐に渡っているため、今回発見した現象が普遍性を持つものか否か検討していきたい。

## E. 結論

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 を感染して作成した HIV-1 持続感染マウスに EBV を感染し、エイズリンパ腫発症モデルの作成をめざした実験を行った。HIV-1 非感染ヒト化マウスに EBV を感染したコントロールマウスと、HIV-1・EBV 重感染マウス体内の EBV コピー数を経時的に測定した。HIV-1・EBV 重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

と予想し実験を行ったが、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、HIV-1 感染マウスでは EBV 投与後の病態進行が遅れることが判明した。現在のところその要因は明らかではないが、 $10^5$ - $10^6$  個の LCL を投与した場合はリンパ腫の形成時期に顕著な差はみとめられず、HIV-1 感染が EBV 初期感染の過程に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

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検索を行った。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。EBV-TK は EBV 潜伏感染細胞中にも発現していることが確認されたため、EBV 陽性エイズリンパ腫をはじめ様々な EBV 感染疾患に有効な可能性がある。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

1. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan Z, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, and Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R gamma null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral Immune Responses *Blood* 109:212-218, 2007.
2. Kawaguchi T, Sugita S, Shimizu N and Mochizuki M. Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *International Ophthalmology* 2007 May24; [Epub ahead of print]
3. Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N and Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R gamma null mice transplanted with

hematopoietic stem cell under non-myeloablative condition show prolonged life spans and allow detailed analysis of HIV-1 pathogenesis.

*Journal of Virology*, 81:13259-13264, 2007

4. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 52(2):136- 138, 2008

5. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 92(7):928-932, 2008.

6. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *British Journal of Ophthalmology* 92(4):505-8. 2008.

7. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor-kappaB. *Virus research*, 131(2):170-179, 2008.

8. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *Journal of Infectious*

*Diseases*. 198(5):673- 82, 2008.

9. Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clinical Experimental Immunology* 151:519-527, 2008.

10. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes and Infection* (in press)

11. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏 ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜内皮炎の4例 臨床眼科 2008, 62:1061-1065.

12. 鴨居功樹、杉田直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月學、森浩士、宮永将、宮田和典、清水則夫 皮膚症状を伴わない水痘帯状 疱疹ウイルス前部ぶどう膜炎の3例 臨床眼科 2008, 62: 1067-1071.

#### 国内学会発表

1. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦：ヒト臍帯血幹細胞移植NOGマウスを用いたEBウイルス感染モデルの作製 第4回EBウイルス研究会 2007年6月 東京

2. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、中川温子、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤守、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦：ヒト化マウスモデルにおけるEBウイルス特異的免疫応答 第4回EBウイルス研究会 2007年6月 東京

3. 中村浩幸、石井千尋、末廣正和、井口晃史、黒田和道、清水一史、今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、藤原成悦：EBウイルスLMP1によるBcl-3発現誘導 第4回EBウイルス研究会 2007年6月 東京

4. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦：ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウィルス特異的免疫応答 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年 10 月 札幌

5. Imadome K, Yajima M, Watanabe S, Nakagawa A, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N, Fujiwara S: Epstein-Barr virus-specific immune response in the humanized NOG mouse model. 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007 年 11 月 東京

6. 今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、中川温子、川野布由子、藤原成悦 NOG マウスを用いた慢性活動性 EB ウィルス感染症モデルの作製 第 5 回 EB ウィルス研究会 鳥取 7/18/2008

7. 鴨居功樹、杉田直、菅本良治、高瀬博、望月學、清水則夫、渡邊健 硝子体液の定量 PCR で診断できた細菌および真菌混合感染による遅発性眼内炎の 1 例 第 42 回日本眼炎症学会 2008 年 7 月福岡市

8. 山本紗也香、杉田直、二神百合、堀江 真太郎、望月學、清水則夫、森尾友宏 角膜病変を伴わない HSV-1 関連虹彩毛様体炎の 3 症例 第 42 回日本眼炎症学会 2008 年 7 月福岡市

9. 宮永将、杉田直、清水則夫、森尾友宏、宮田和典、望月學 サイトメガロウィルスによる虹彩炎と角膜内皮炎の臨床像比較 第 6 2 回日本臨床眼科学会 2008 年 10 月 東京

10. 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學 帯状疱疹に伴う角結膜炎の涙液中 VZV-DNA 量および眼所見 第 6 2 回日本臨床眼科学会 2008 年 10 月 東京

11. 鴨居功樹、高瀬博、杉田直、菅本良治、田中裕一郎、望月 學、渡邊健、清水則夫 Broad-range PCR システムで診断した真菌性眼内炎の 1 例 第 6 2 回日本臨床眼科学会 2008 年 10 月 東京

12. 清水則夫 再生医療とウィルス安全性確保

第 8 回医薬品等ウィルス安全性シンポジウム  
2008 年 12 月 東京

#### 国際学会発表

1. Fox CP, Long HM, Lowe C, Shimizu N and Rowe M. LMP2A AS A TARGET FOR T CELL RECOGNITION IN EBV-ASSOCIATED T AND NK CELL TUMOURS EBV Association General meeting, November 2008, Guangzhou, China.

#### 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 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。エイズリンパ腫が予防できれば HIV-1 感染者の予後/QOL を大きく改善できる。そこで、本研究ではエイズリンパ腫のうちそ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。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫では特異的予防・治療標的分子として EBV 潜伏感染関連核抗原 EBNA1 が指摘されている。本研究により EBNA1 機能を阻害することにより、B 細胞不死化関連ウイルス抗原発現を抑制し、エイズに合併する EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫の発生が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 の評価を確立したことをうけて、EBNA1 inhibitor の開発が期待される。今後は EBV 陰性のリンパ腫についても予防や治療の標的分子の探索が求められる。

### 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は依然確立していない。

EBV の B 細胞への感染は吸着の後エンド再トーススがおこり、細胞とウイルスの膜融合がエンドソームで起こる。細胞質内で脱殻が起こり、直鎖状のウイルス DNA ゲノムは核に移行する。EBV ゲノムの両端には末端反復配列 (Terminal Repeat : TR) が存在し、細胞の核内で TR を介して環状化する。EBV ゲノムには潜伏感染時の複製起点 *oriP* がコードされており、宿主ゲノムと同期した複製開始とゲノムの娘細胞分配到に機能する。感染後、EBV ゲノムからは核抗原の EBNA2 と EBNA-LP が最初に発現する。転写活性化因子の EBNA2 は宿主の遺伝子の発現をトランスに増強して細胞を増殖させると同時に、EBV ゲノム上の EBNA2 responsive element に結合して C プロモーターからのウイ

ルス遺伝子の発現を増強する。これによって他の EBNA とともに EBNA1 が発現する。EBNA1 は *oriP* に結合して、EBV ゲノムの複製と C/W プロモーター (C/W<sub>p</sub>) を活性化する。これは更に EBNA 発現を増強させる。加えて潜伏感染膜タンパク質 (Latent membrane protein : LMP-1 / -2) の発現も活性化される。非コードウイルス RNA の一種 EBER も発現し、増殖因子の自己分泌の誘導等を介して B 細胞の悪性形質維持に関与している。以上のメカニズムによって、EBV は B 細胞を悪性形質転換しその形質を維持する。

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 への 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/W<sub>p</sub> 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という観点で、EBV 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詳細に検討することを通じて、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した。

## 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ものである。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)。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 293T 細胞へ 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。特異性を検討するために CMV プロモーターにより luciferase を発現するベクターを使用した。

(2) 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 B cell acute lymphocytic leukemia である EBV 陰性細胞株 B-ALL に感染させた。B-ALL 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、GFP 陽性細胞を sorting し、細胞増殖、形態等に関する基礎的検討を行った。

(3) 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 B-ALL 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。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の total RNA を使用した end point semi-quantitative RT-PCR および quantitative RT-PCR にて検討した。EBER1 と LMP-2A の primer は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。C/W promoter からの転写産物は W1/W2 exon を標的にした primer を使用し、その配列は以下の通りである : 5'-ccctggacagctcctaag-3', 5'-cttcaactcggtctccccta-3'。PCR の特異性は virus 非感染 B-ALL で amplicon が増幅されない事、EBV-immortalized B-LCL で amplicon が増幅されること、amplicon の核酸配列により検証した。

(4) GFP または GFP-dnE1 を恒常的に発現する B-ALL 細胞に対して、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  $5 \times 10^3$ /well で 96 ウェルプレートにて培養を行った。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)

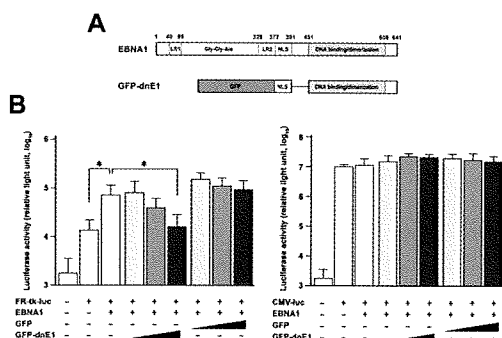
特記すべきことなし。

## C. 研究結果

(1) DNE1 発現ベクター pcmmp GD の構築 : Luciferase assay の結果、EBNA1 の発現によりルシフェラーゼ活性は約 12 倍に増加した。これに加え

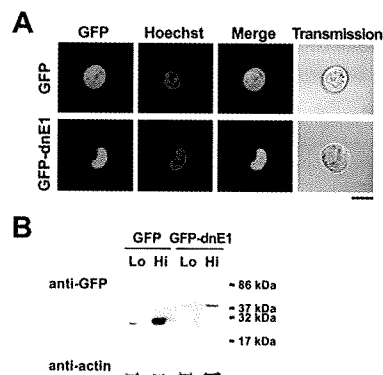
て GD を共発現させると、プラスミド量依存的にルシフェラーゼ活性が低下した。一方、pcmmp GD のかわりに pcmmp GFP を、FR-TK-Luciferase のかわりに CMV Luciferase を使用しても同様の現象を認めなかった。以上より我々の作製した GD に EBNA1 に対する dominant-negative 活性があることが確認できた。(図 1)。

Fig. 1



(2) レトロウイルスベクターによる DNE1 発現ユニットの transduction: 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、その割合はおおよそ 20-50%であった。100%陽性の細胞集団を得るため、FACS sorting により GFP 陽性細胞を bulk collection した。GFP 蛍光レベルが高いものと低いものを収集し相互に比較した。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。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。GD は核移行シグナルによって主として核に局在したが、GFP は細胞質と核に均一に存在した。GD は EBNA 蛍光補体法でも核内に点状シグナルとして検出された(図 2)。

Fig. 2



(3) 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 B-ALL の GFP, GD 細胞を使用して EBV 感染に対する GD の影響について検索した。EBV 感染に対する GD の影響を解析するために、EBV 感染から 15 時間後までのウイルス挙動を、感染後細胞に吸着した EBV ゲノム量と感染後 15 時間後に細胞の核内に到達した EBV ゲノム量を比較することにより解析した。EBV ゲノム量は BamHI W repeat を標的とする Real-Time PCR にて定量した。この標的は1ゲノム中に約10コピー反復しているため、検出効率を高くすることが出来る。

GD 細胞では GD 発現量の違いに関わらず核移行ウイルスゲノム量は漸減し、その効率はそれぞれ 47-66 %と 58-68 %とほぼ同程度であった。ウイルスゲノム量減少率は感染後から一定で、GFP と GD 発現細胞間でも GD 発現レベルが異なる細胞間でも有意な差を認めなかった(表 1)。GD による EBV ゲノム脱落効率に対する影響を解析するため、上記に加えて EBV 感染直後から2 週間後までの細胞内ウイルスゲノム量の推移を同様に解析した。GD 細胞では GD の発現量の違いに関わらず EBV ゲノム量は細胞分裂 1 回あたり約 10-16 %の比率で漸減し、その程度は GFP 発現細



胞とほぼ同程度であった。2 回の独立した B-ALL 細胞と BJAB 細胞への EBV 感染実験で同様の結果を得た (表1、図3)。

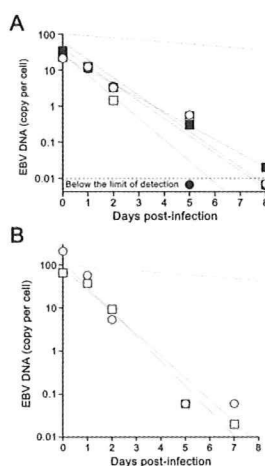
Table 1

Table 1. The kinetics of EBV DNA in the acute phase of EBV infection.						
Cell	Copy number of EBV DNA per cell at the indicated day <sup>a</sup>				Nuclear transport (%)	Rate of loss of EBV DNA (% per cell generation) <sup>b</sup>
<b>Expt 1</b>						
BALL	day 0	day 1	day 2	day 5		
GFP Hi	20.38	11.92	3.57	0.01 <sup>c</sup>	108.6	85.9
GFP Lo	17.26	11.68	3.21	0.56	43.3	44.1
GFP-dnE1 Hi	23.02	10.79	3.30	0.30	47.2	54.9
GFP-dnE1 Lo	18.83	12.36	1.46	0.53	49.9	28.7
BJAB	day 0	day 1	day 2	day 5		
GFP	155.1	58.8	5.38	0.06	37.4	77.7
GFP-dnE1	64.6	37.4	5.69	0.05	58.0	79.4
<b>Expt 2</b>						
BALL	day 0	day 1	day 2	day 6		
GFP Hi	16.33	17.73	11.10	4.74	58.5	19.2
GFP Lo	17.35	7.51	8.75	1.13	67.7	40.1
GFP-dnE1 Hi	18.46	8.71	8.95	3.38	46.9	21.6
GFP-dnE1 Lo	14.14	7.05	6.97	2.79	65.6	20.5

<sup>a</sup> The nuclear DNA was used for day 1 data.  
<sup>b</sup> Estimated from day 0 and day 1 data.  
<sup>c</sup> Estimated from day 2 and day 5 or day 6 data with the exponential decay.  
<sup>d</sup> Below the limit of detection.

以上より B 細胞での EBV ゲノム脱落効率は約 10-16 %であり、GD 発現は EBV ゲノム脱落効率に影響しないことが判明した。なお、感染後は細胞をアシクロビルを含むメディアウムで培養して溶解感染細胞を除いているため、検出された EBV ゲノム量は潜伏感染細胞のみを反映している。

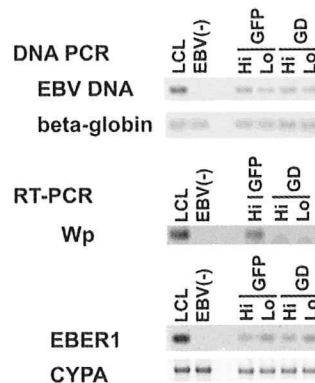
Fig. 3



GD による EBV 遺伝子転写に対する影響を解析するため、EBV 感染から 2 日後の細胞における EBV 遺伝子産物として C / Wp 由来転写産物、LMP2A の mRNA、EBER1 RNA について Real-Time RT-PCR にて解析した。C / Wp 由来転写産物は B 細胞の悪性形質転換・維持を担う EBV

遺伝子 EBNA1 / 2 / 3 をコードする。検出効率を上げるため、mRNA 内の反復配列 W1 と W2 エクソンを標的とした。C / Wp 由来転写産物は GFP 細胞で検出されたが、GD 細胞では検出限界以下であった。EBER1 の発現は GFP、GD 両方の細胞にほぼ同程度検出された。LMP2A の発現は全ての細胞で検出限界以下であった (図 4)。2 回の独立した B-ALL 細胞への EBV 感染実験で同様の結果を得た。以上より GD は EBV ゲノムからの C / Wp 由来の転写を特異的に抑制することが判明した。

Fig. 4



(4) 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ことから、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% : 表 2 参照)。

Table 2

Table 2. The establishment efficiency of EBV latency.			
Cell		Emergence of G418-resistant cells <sup>a</sup>	
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)

<sup>a</sup> 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.

#### D. 考察

EBV感染に対するdnE1の活性をB細胞において評価したのは、我々が初めてである。Sugdenらが行ったように、上皮系細胞での一過性トランスフェクションにおいてdnE1は*oriP*プラスミドの脱落を促進する活性を示す。ところが、GDはB-ALL細胞とBJAB細胞において、感染でもたらされるEBVゲノムの脱落を促進することは出来なかった。一方、GDによるEBVゲノムからのEBNA1依存的転写抑制は観察された。これと同様の転写抑制がdnE1を発現させたEBV陽性リンパ腫細胞においても観察されている。以上の結果より、GDはEBVゲノムの複製・維持よりも転写に対してより大きな影響を与えると考えられる。

GDの転写とEBVゲノム複製への影響：EBVゲノムの複製と転写へのGDの作用は、ともに*oriP*へのEBNA1結合阻害に由来する。それにも関わらず転写への影響が大きく検出されたのは、(1) EBVゲノムの複製・維持に比べて転写促進はEBNA1をより多く必要とする可能性と、(2) 感染直後のEBVゲノムの複製・維持は、樹立されたEBV潜伏感染細胞よりもEBNA1依存度が低い可能性が考えられる。(1)の可能性はKennedyらがEBV陽性B細胞腫瘍株でdnE1効果を解析した際にも同様に指摘されている。Wysokenskiらは*oriP*

プラスミドを用いて転写とEBVゲノムの複製・維持におけるEBNA1 BSの必要数をEBV陽性細胞株であるRaji細胞において解析した。その結果、転写に必要なEBNA1 BSの数はEBV DNAの複製・維持より多かったと報告している。これはGDの効果が転写でのみ観察できた我々のデータとよく合致する。(2)の可能性はLeightらの報告によって裏付けられる。彼らはEBVゲノムのモデルとして*oriP*プラスミド (約10kbp) を使用して、安定した*oriP*プラスミド保持細胞からのプラスミド脱落効率は細胞周期ごとに約4% であると報告している。我々の実験からEBVを感染させたB細胞からの脱落効率は約10-16% であり、上記の2.5-4倍である。これは安定なEBNA1 / *oriP*依存的EBVゲノム複製は感染後すぐには確立できず、EBNA1 / *oriP*システムが感染直後に十分に機能していないことを示唆している。一方、Leightらによると、トランスフェクションによって一過性に*oriP*プラスミドを導入した上皮細胞からは、プラスミド脱落効率は細胞周期ごとに25% 以上であった。我々の実験からEBVを感染させたB細胞からの脱落効率はこの約半分であった。これは、*oriP*プラスミド複製・維持効率は上皮細胞系での一過性導入実験とB細胞でのEBV感染系では質的に異なることを示唆する。EBVはプラスミドと異なり、EBNA1 / *oriP*システム非依存的に複製できるの。例えばRaji細胞に感染するEBVの複製が*oriP*に非依存性であることが報告されている。また、Heinzelらは長いDNA断片は多くの複製起点を供与しDSを機能的に肩代わりしやすいことを報告している。さらに、B細胞ではEBVゲノムの複製効率が低い、もしくはEBVゲノムの娘細胞への分配効率が低い可能性も否定できない。現在これを直接的に支持する報告はない。しかし、EBNA1がEBVゲノムの複製・維持に機能を発揮するために宿主因

子を必要とすることは明らかであるため、宿主因子の存在比率等の影響によりB細胞ではEBVゲノム複製効率や娘細胞への分配効率が特徴的な振る舞いをするのかもしれない。これらのデータはEBVゲノムがEBNA1非依存的な複製・維持しやすいことを示しており、より自然に近い状態を再現したEBV感染実験によって得られたデータはoriPプラスミドを利用した既報がどのようなファクターによって影響をうけるかを示唆する重要な知見であると考えられる。

以上をまとめると、おそらく本実験系では(1) - (2) のどちらかもしくは両方の可能性の影響があったと推測される。(1) を検証するためには、EBVに潜伏感染したGD / GFP細胞からEBVゲノム - EBNA1複合体を抽出し、実際にEBNA1 BSに結合しているEBNA1数を定量する必要がある。(2) を検証するためには、EBV感染細胞からEBVゲノムを回収し、2次元電気泳動 / サザンブロット法による複製起点の検索を行う必要がある。細胞種特異的なEBVゲノム挙動を検証するためには、宿主因子の存在比率の違うB細胞同士や他細胞種などでEBV感染後のウイルスゲノムの挙動を解析する必要がある。EBV持続感染予防効果について:安定したoriPレプリコンの樹立は、プラスミドを導入された細胞の数 %しか達成できないことが一過性のトランスフェクションで示されている。これをestablishment効率と呼ぶ。Leightらによると、上皮系細胞へのoriPプラスミド導入実験では、establishment効率は約1-10 %程度であると報告されている。この現象はB細胞株にEBVを感染させたときにも同様に観察される。このestablishment効率をGDが低下させるのであれば、GDは悪性形質関連EBV遺伝子発現を阻止するだけでなく、EBV持続感染も阻止できると結論できる。我々の実験では、感

染直後からEBNA1機能を阻害する事によって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、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。

EBV関連リンパ腫予防薬開発の分子標的としてのEBNA1:EBVは多くの予後不良の疾患の原因として知られている。多くの成人では不顕性かつ慢性的に感染するものの悪性疾患が高い頻度で現れないことから、EBVに対する予防法や治療法の開発は積極的に行われてこなかった。すべてのEBV感染細胞に発現するEBNA1は、それ自身が細胞の悪性形質維持に関与するだけでなく、細胞の悪性形質獲得に関与する他のEBV遺伝子産物の発現を増強する。さらに、ウイルスゲノムの複製・維持を担う中心的役割を果たすため、EBV感染症の治療・予防の分子標的としてもっともふさわしいと期待される。我々の研究によって、EBNA1機能阻害がEBV関連リンパ腫およびEBV関連疾患の予防分子標的となり得ることが世界で始めて実証された。これを実用化するためには、dnE1と同様の機能をもつ小分子化合物をスクリーニングし、EBNA1阻害剤を得るこ

とが必要である。EBNA1のタンパク質主体構造はX線回析により既に同定されている。これを基にEBNA1核酸結合を阻害する化合物か、EBNA1の2量体を阻害する化合物をデザインし、EBVによるV細胞不死化抑制能力および不死化したB細胞増殖抑制能力を評価すればよい。このような化合物がdnE1 "mimic"として作用させる際に細胞生理学的副作用の懸念は低いことが本研究であわせて示された。

EBNA1阻害剤が開発できたとしたら、どのように使用するのが最も効果的だろうか？予防のため長期間にわたり服薬するのは費用対効果が悪く、現実的ではない。予防的投薬にはPTLDと死因の上位を占めるエイズリンパ腫の予防が最も効果的と思われる。PTLDなどでは免疫抑制剤から離脱できない期間に限定的に免疫抑制剤と併用することが現実的だと思われる。実際には移植前の免疫抑制剤開始以前からレシピエントに予防的投与を行うのが効果的であろう。エイズリンパ腫を予防するためには、エイズ患者が多剤併用療法 (High Active Anti-Retroviral Therapy : HAART)と共に常にEBNA1阻害剤を服用することが実際的と考えられる。EBNA1阻害剤はEBV関連疾患の治療にも応用できるため、治療用として使用するのはもちろん可能である。一剤で予防と治療の2つの効果を持つ優れた薬剤となることが期待できる。

現在エイズリンパ腫における日本人に最適化した化学療法プロトコールは確立していない。また、その予防方法も存在しない。しかし、リスクファクターが明らかなリンパ腫はEBV陽性B細胞性腫瘍である。エイズに合併するリンパ腫の約半数がEBV陽性B細胞リンパ腫であることから、dnE1 "mimic"の有用性は高いと思われる。今後はヒト化マウスにおける dnE1

によるEBV感染の抑止について検討していきたい。

## E. 結論

本研究により、エイズリンパ腫の治療と予防のためにEBVのEBNA1は治療標的になることが判明した。我々の使用した dominant negative EBNA1 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。EBNA1の機能阻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

( 欧文 )

- 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 for cellular regulatory genes 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.
- 6) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009 Jan 29; 52(5): 1380-1387.
- 7) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. *Cancer Science*. Jan;100(1):95-102. 2009.
- 8) Komano J, Hamatake M, and Yamamoto N. Analyses of long-term surviving HIV-infected Japanese patients with coagulation disorders hint at

novel means to prevent and treat HIV/AIDS (review). Challenging practices on HIV/AIDS in Japan 2008, Kashiwazaki ed., JFAP publications, 97-99, 2008.

- 9) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS letters*. Dec 10;582(29):4053-4058. 2008.
- 10) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *The Journal of General Virology*. Dec;89(Pt 12):3144-3149. 2008.
- 11) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS*. May 31;22(9):1081-1083. 2008.
- 12) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*. Apr;9(4):540-558. 2008.
- 13) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K,

- Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jan 8;105(1):294-299. 2008.
- 14) 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):575-582. 2007.
- 15) 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Aug 3;359(3):729-734. 2007.
- 16) 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 Science*. Mar;98(3):373-379. 2007.
- 17) Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. In vitro translation to study HIV protease activity. *Methods in Molecular Biology*. 375:135-149. 2007.
- ( 邦文 )
- 1) 村上 努, Gottlinger H, 森川 裕子, 駒野 淳, 梁 明秀, 佐藤 裕徳. Regulation of Gag trafficking and functions (Review). *The Journal of AIDS Research*. 9(2); 102-107. 2007.
- 2) 村上 努, 駒野 淳. ARVのUniversal Access時代を迎えて ; エイズ研究センターの国際研修活動について. *病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR)*. Vol. 28, No. 6 (No.328); 164-166. 2007.
1. 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
- 3) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, Awaji Island, Hyogo, Japan 2008
- 4) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th

- Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, Awaji Island, Hyogo, Japan 2008
- 5) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, Awaji Island, Hyogo, Japan 2008
- 6) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Functional substitution of the myristoylation signal of HIV-1 gag with phospholipase c delta 1 pleckstrin homology domain. CSHL Meeting on Retroviruses, CSH, NY, USA 2008
- 7) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSHL Meeting on Retroviruses, CSH, NY, USA 2008
- 8) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits CXCR4 trafficking to the plasma membrane and blocks X4 HIV-1 entry. CSHL Meeting on Retroviruses, CSH, NY, USA 2008
- 9) Jun Komano. Rerouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with heterologous membrane proteins. Special seminar at Univ. Massachusetts, Center for AIDS Research-Umass, Massachusetts, USA 2007
- 10) Hirokazu Tamamura, Atsushi Komano, Toru Nakahara, Nami Ohashi, Tomohiro Tanaka, Hiroshi Tsutsumi, Wataru Nomura, Emiko Urano, Yan Hua, Hideyoshi Fuji, Makiko Hamatake, Kosuke Miyauchi, Yuko Morikawa, Tyuji Hoshino, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto. Identification of Sequential Motifs Relevant to Inhibitory Activity against HIV Integrase. The 4th International Peptide Symposium in conjunction with the 7th Australian Peptide Conference and the 2nd Asia-Pacific International Peptide Symposium 2007, Australia 2007
- 11) Jun Komano. Characterization of neutralizing antibodies purified from Japanese LTNP hemophiliacs. US-Japan Cooperative Medical Science Program 20th Joint Meeting of the AIDS Panels, Monterey, CA, USA 2007
- 12) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Donald M Engelman, Zene Matsuda. The specific phase of membrane-spanning helix of hiv-1 gp41 is critical for intracellular transport of env. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2007
- 13) Kei Miyagawa, Tsutomu Murakami, Yuki Ohsaki, Jun Komano, Toyoshi Fujimoto, Naoki Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and tip47 and its associated proteins. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2007
- 14) Toru Aoki, Saki Shimizu, Urano Emiko, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto,

Jun Komano. RErouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2007

15) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yoshiharu Miura, Yuetsu Tanaka, 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, Cold Spring Harbor, NY, USA 2007

16) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2007

17) Makiko Hamatake, Emiko Urano, Hideji Hanabusa, Shingo Kato, Tee Kok Keng, Yutaka Takebe, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. (poster) Keystone symposia, HIV vaccine and molecular and cellular determinants of HIV pathogenesis, Whistler, British Columbia, Canada 2007

(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-1Rev 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
- 12) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. BMB2008 (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), 神戸, 2008
- 13) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. BMB2008 (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), 神戸, 2008
- 14) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. BMB2008 (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), 神戸, 2008
- 15) 小林明子, 芳田 剛, 駒野 淳, 小柳義夫. レンチウイルスベクターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2008
- 16) 浦野 恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 山本直樹, 駒野 淳. Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2008
- 16) 高橋良明, 村上 努, 駒野 淳, 古田 篤司, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 宿主由来タンパクOX40L, OX40のHIV-1感染に与える影響. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2008
- 17) 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, 森川裕子, 山本直樹, 駒野 淳. HIV-1 Pre55Gagのミリスチル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2008
- 18) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 仲宗根正, 濱武牧子, 駒野 淳, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2008
- 19) 駒野 淳, 濱武 牧子, 青木 徹, 浦野 恵美子, 二橋 悠子, 山本 直樹. BiFC/BRETによる癌転移増強分子CXCR4のLigand非依存的な多量体形成の解析. 第67回日本癌学会各術

総会, 名古屋, 2008

20) 駒野 淳, 浦野 恵美子, 刈屋 祐美, 二橋 悠子, 市川 玲子, 濱武 牧子, 深觸 秀輔, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 山本直樹. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C末端ドメインの同定とその機能解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008

21) 浦野 恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 駒野 淳. DNA J/HSP40 Co-chaperone familyによるHIV-1複製抑制. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008

22) 辰巳絢子, 藤秀義, 駒野 淳, 根矢三郎, 星野忠次. HIV-1のRnase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, 横浜, 2008

23) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, 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), 横浜, 2007

24) 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), 横浜, 2007

25) 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), 横浜, 2007

26) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, 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, 広島, 2007

27) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, 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, 札幌, 2007

28) 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 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. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007

29) 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, 熊本, 2007

30) 藤秀義, 辰巳絢子, 栗田明宙, 駒野 淳, 星野忠次. コンピューター支援による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, 長野, 2007

## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 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) Masataka Takekoshi, Jun Komano, et al. Use of anti-CD4 antibody from a healthy individual as a therapeutic drug against HIV-1 infection (出願2009年1月28日 特願2009-017340) .

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 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（研究分担者）  
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** エイズリンパ腫の約半数は EB ウイルス (EBV) が原因となる。我々はヒト化マウスを用いて、EBV によるリンパ腫発症モデルを開発した。このモデルでは、 $10^2$  TD<sub>50</sub> 以上の EBV 感染によりエイズリンパ腫に酷似したリンパ腫が発症したが、 $10^1$  TD<sub>50</sub> 以下では不顕性持続感染状態となった。EBV 感染マウスには細胞性および液性の EBV 特異的免疫応答が誘導された。感染後のマウスに抗 CD3 あるいは抗 CD8 抗体を投与して T 細胞を除去すると、マウスが早期にリンパ腫により死亡すること、感染マウスの CD8<sup>+</sup>T 細胞は EBV によるリンパ球不死化を抑制することから、感染マウスに誘導される免疫応答は実際に宿主防御機構として機能すると考えられる。従って、マウスの不顕性持続感染状態は、健常者の EBV 潜伏感染状態と同様に免疫監視機構により維持されると考えられる。このモデルをエイズリンパ腫の発症機構解析と治療法開発に応用したい。

### 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。NOD/Shi-*scid*/IL-2R  $\gamma$  c<sup>null</sup> 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)。本研究は、このヒト化 NOG マウスに EBV を感染させリンパ腫発症モデルを開発することを目的とした。

### 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 $\gamma$ c<sup>null</sup> マウス

6~8 週齢雌の NOD/Shi-*scid*/IL-2R  $\gamma$  c<sup>null</sup> マウス (以下、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