

201019035A

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

多角的解析による EB ウイルス発癌を抑制する
新規薬剤開発とワクチン開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鶴見達也

平成23 (2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

多角的解析による EBV 発癌を抑制する新規薬剤開発とワクチン開発	1
研究代表者 鶴見達也	

II. 分担研究報告

EBV 発癌を抑制する新規薬剤開発.....	9
鶴見達也 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍ウイルス学部)	
摘出扁桃を用いたヒトリンパ組織モデルの確立についての研究.....	15
木村宏 (名古屋大学大学院医学系研究科)	
伊藤嘉規 (名古屋大学医学部附属病院)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	21
------------------------	----

I. 総括研究報告書

多角的解析による EBV 発癌を抑制する新規薬剤開発とワクチン開発

研究代表者 鶴見達也 愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部 部長

研究要旨 本研究では、Epstein-Barr ウイルス(EBV)陽性がんに対する治療法を開発するため EBV 再活性化の分子機構およびウイルス発癌遺伝子である LMP1 の発現制御機構を明らかにし、それらを制御する薬剤を細胞レベルでスクリーニングすること、さらにヒトリンパ球初代培養を用いた *ex vivo* モデル及び摘出扁桃を用いた EBV 感染モデルによりヒトに近いレベルでの新規薬剤のスクリーニング系を確立し、候補物質の薬効を確認すること及びワクチン開発を目的としている。本年度の研究成果として(a)潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索、(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定、(c) 摘出扁桃を用いたヒトリンパ組織モデル について以下のように報告する。

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索：LMP1 遺伝子の転写を制御する宿主因子を網羅的に同定するために、cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングを遂行し、LMP1 プロモーターを活性化する宿主因子の探索を行った。これまでに 2 万個以上のクローンを精査し、15 のヒットを得た。ヒットのうちの 1 つには転写因子 C/EBPe の cDNA 全長がコードされていた。LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP ファミリーについて解析を開始した。

薬剤ライブラリーを用いた新規薬剤の探索では標準阻害剤キットを使用し、EBV 陽性 NK 細胞リンパ腫である SNK6 細胞を用いて、LMP1 遺伝子の発現を抑制するような薬剤を探索し、現在までに LMP1 遺伝子発現を抑制し、SNK6 細胞の増殖を強く抑制することのできる候補物質を一つ得た。

(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定：潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子の転写を制御する宿主因子を網羅的に同定するために、cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングを遂行し、BZLF1 プロモーターを制御する宿主因子の探索を行った。これまでに 2 万個のクローンを精査して 11 のヒ

ットを得た。このうち転写を抑制する JDP2 について解析を開始した。

(c) 摘出扁桃を用いたヒトリンパ組織モデル：EBV は野生株 B95-8 および EGFP を発現する組み換え EBV を用い、EBV 培養上清を、口蓋扁桃組織小片に直接かけて感染させた。EBV 感染後、上清および単核球のウイルス DNA 量（定量的 PCR 法にて測定した）は経時的に増加した。さらに、潜伏感染遺伝子（潜伏感染 III）に加え、感染 12 日後からは、溶解感染遺伝子（BZLF1 および gp220）の発現が real-time RT-PCR 法にて確認された。EGFP ウイルスを用いた感染組織中単核球の EGFP 陽性細胞の性状解析から、EBV は主として CD19 陽性 B 細胞に感染していることを確かめた。さらに、EBV を扁桃組織小片に感染後、抗ウイルス薬アシクロビルを培養液に加え、ウイルスの増殖への影響を評価したところ、アシクロビルは濃度依存性にウイルス増殖抑制を示した。

研究分担者	所属施設名	職名
木村宏	名古屋大学大学院医学系研究科	准教授
伊藤嘉規	名古屋大学医学部附属病院	講師

A. 研究目的

EBV はバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性活動性 EBV 感染症、NK/T 細胞リンパ腫、日和見 B 細胞リンパ腫、胃癌、上咽頭癌などの原因となる。多くは悪性度が高く、我が国でも少なからぬ発症があり、治療、予防の手段が切望されている。しかしながら現在までのところ、既存の抗癌剤などが処方されているに過ぎず、これらの EBV 陽性癌に対する効果の高い特異的治療法はない。

本研究の(a)では EBV の最も主要な癌遺伝子である LMP1 の発現に着目し、この発現を制御することで治療、予防法を開発することを目的とした。LMP1 遺伝子発現を制御する新規因子が同定できれば、新しい創薬ターゲットとしての可能性が出てくる。LMP1 遺伝子発現を抑制するような薬剤の探索は、ヒットした候

補物質がそのまま EBV 陽性癌に対する治療薬としての使用につながる可能性が高い。

本研究の(b)では、細胞増殖性と関係の深い EBV のライフサイクルに着目し、ウイルスの潜伏感染の維持、再活性化について詳細な解析を行う。この研究により薬剤などで EBV の感染様式を薬剤などで人為的に操作することで細胞増殖を停止させるような試みのための分子基盤を明らかにする。

EBV はヒトにしか感染せず適当な小動物モデルがないために、これまで薬剤やワクチンに対する有効性の検討が困難であった。ヒトにおける病原性を調べるためには、ヒトそのものの組織を用いた感染モデルを用いるのが最も直接的である。ヒト扁桃組織を用いれば、EBV が自然感染した後の病態を再現できる可能性が高

いので、本研究 (c) では、ヒト扁桃組織を用いて EBV の感染モデル (*ex vivo* モデル) の作成を試みた。このモデル系を用いて、感染組織内での感染細胞の性状の解析に加え、新規薬剤スクリーニングへの応用も期待できる。

B. 研究方法

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索：

LMP1 遺伝子の転写を制御する宿主因子の網羅的解析のため、cDNA 発現ライブラリを用いたファンクショナルスクリーニングを行った。ライブラリは骨髄細胞由来のものを使用している。レポーターとして、LMP1 プロモーターでホタルルシフェラーゼを発現させるプラスミドを使用した。HEK293T 細胞に導入して 24 時間後にアッセイを行い、スクリーニングした。アッセイの効率化のため、一次スクリーニングでは 10-20 個程度のライブラリクローンをまとめてプールとして使用し、二次スクリーニングでは一次スクリーニングで LMP1 プロモーター活性を増強したプールから個々のクローンを拾ってアッセイを行った。

一方、LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤の探索は、特定領域研究の提供する標準阻害剤 (約 300 種類) を、濃度を振ってスクリーニングに供した。細胞は、EBV 陽性リンパ腫である SNK6 や B95-8 細胞などを用いた。LMP1 遺伝子の発現は、特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により検出、定量した。

(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定：

上記(a)と同様の方法で、潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子のプロモーターについてスクリーニングを行った。またクロマチン免疫沈降法 (ChIP) や阻害薬により、BZLF1 遺伝子プロモーター周辺のエピジェネティックな修飾による転写制御の解析も行った。

(c) 摘出扁桃を用いたヒトリンパ組織モデル：

EBV は標準株である B95-8 と、EGFP を発現する組み換え EBV (Akata 細胞由来 BXLF1 に挿入) の 2 種類を用いた。健常小児から医学的必要性のために摘出された口蓋扁桃組織を小片に切断後、各小片をコラーゲン製スポンジ様ゲルの上に置き、下部が培養液に浸る状態にして、組織培養を行った。上記 2 種の EBV 培養上清を直接かけて感染させ、以後 72 時間に培養上清を回収し、real-time PCR 法により、回収した培養上清中の EBV-DNA を定量した。また、72 時間毎に一部の感染組織を破砕し、単核球を回収した後、one-step real-time RT-PCR 法にて EBV 関連遺伝子の発現を定量した。

EGFP-EBV を感染させた組織モデルにおいては、組織中の単核球を分離後、表面抗原を染色し、フローサイトメーターにて EGFP 陽性細胞の性状を解析した。

さらに、B95-8 ウイルス上清を扁桃組織に感染させた後、抗ウイルス薬アシクロビルを様々な濃度で培養液に加え、ウイルスの増殖への影響を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する組織は、医学的理由

による外科手術の結果、本来処分される摘出組織を使用した。提供者に対しては、平成 15 年 7 月 30 日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者もしくは親権者よりインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報保護の擁護に努めた。(本研究は申請施設の倫理委員会にて平成 18 年 10 月に承認済みである)。

C. 研究結果

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索：

cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングを遂行し、LMP1 プロモーターを活性化する宿主因子の探索を行った。これまでに 2 万個以上のクローンを精査した結果、15 のヒットを得た。これらから偽陽性を除くと、ほとんどは転写因子であった。ヒットのうちの 1 つには転写因子 C/EBP ϵ の cDNA 全長がコードされていた。LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP ファミリーについて解析を開始した。C/EBP γ や ζ による LMP1 プロモーター活性化は限定的であったが、C/EBP α , β , ϵ の 3 つは高い転写活性化能を持つことをレポーターアッセイで確認した。今後はより生理的条件に近い実験に臨むため、同結合サイトに変異を加えた EBV 株作製などを予定している。

一方、LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤の探索を遂行した。この中で、19 番と 30 番の二つの薬剤が LMP1 遺伝子発現を強力に抑制していた。実はこの二つは、物

質は異なるものの、どちらも同一のあるシグナル関連因子をターゲットにした阻害剤であったため、この因子が有力な創薬ターゲットの候補になることが明確になった。この因子は SNK6、B95-8 などの EBV 陽性癌細胞の増殖を培養細胞レベルで強く抑制することも確認した。今後はこの候補物質およびその類縁体も含めてより生理的条件に近い系での試験に供し、薬剤としての効果をさらに確認する。

(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定：

上記(a)と同様の方法で、潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子のプロモーターについてスクリーニングを行った。これまでに 2 万個のクローンを精査して 11 のヒットを得た。このうちいくつかの候補について解析を開始した。LMP1 遺伝子制御因子の研究と同様、まず新規転写因子結合サイトをレポーターアッセイで明らかにし、さらにそのサイトを変異させた EBV を作製するなどして、より生理的条件での実験を行う。

また潜伏、再活性化を司る BZLF1 遺伝子周辺のエピジェネティックスのダイナミズムを、溶解感染誘導前後で比較検討した。これまでにヒストンアセチル化がウイルス再活性化に重要であることは知られていたが、今回これ以外に BZLF1 遺伝子発現に関係するヒストン修飾として、ヒストン H3K4 メチル化、H3K9 メチル化、H3K27 メチル化、H4K20 メチル化など複数の修飾を新規に明らかにした。これまでの我々の予備実験において、あ

る特異的エピジェネティクス阻害剤を処理することで EBV 潜伏感染/再活性化を制御できることを新規に見いだした。

(c) 摘出扁桃を用いたヒトリンパ組織モデル：

B95-8, EGFP-EBV のいずれも、扁桃組織に感染後、上清および単核球の EBV-DNA 量は経時的に増加した。EBV 関連潜伏感染遺伝子 (潜伏感染 III) に加え、感染 12 日後からは、溶解感染遺伝子 (BZLF1 および gp220) の発現が確認された。以上から、本モデルにおいて EBV 感染が成立することが示された。EGFP ウイルスを用いた感染扁桃組織中単核球の EGFP 陽性細胞の性状解析から、EBV は主として CD19 陽性細胞に感染していることが確かめられた。

このモデル系を用いて、ヌクレオシドアナログであるアシクロビルの効果をみたところ、濃度依存性にウイルス増殖抑制を示した。

D. 考察

LMP1、BZLF1 の制御因子の網羅的解析はいずれも成功裏に進行しており、新たな知見が得られてきている。質の高い学術雑誌に掲載される可能性が高く、創薬ターゲットとしてのポテンシャルも高い。

薬剤スクリーニングは、これまでにはこのような系でモニターして EBV 陽性癌の予防、治療薬を探索するような試みはされていないものと推測され、独創性が高い。単純なアッセイ系であることもあり、結果もクリアである。同アッセイ系を用いてさらに広い薬剤ライブラリを模

索するとともに、すでに得られた候補物質について実用化を目指すべく、より毒性の低い類縁化合物をテストしたり、より生理的条件に近い条件、すなわち木村、伊藤分担研究者による摘出ヒト扁桃培養系やヒューマナイズドマウスによる検討を進める。

また今回我々は、世界で初めて、扁桃組織を用いたヒトリンパ組織の EBV 感染モデルを確立した。このヒトリンパ組織モデルは、ヒト細胞だけからなり、扁桃という完全なリンパ組織構築を保った組織から構成されているため、ここで見られた事象はヒト生体内でも認められる可能性が極めて高い。この組織中には、ウイルスの感染ターゲットとなる細胞から、抗原提示細胞、自然および獲得免疫のエフェクター細胞まで、ウイルスの感染・初期免疫応答にかかわる細胞がすべてそろっている。これまで、EBV の初感染時のターゲット細胞をはじめとする感染動態は、不明な点が多かった。今回確立したモデル系を用い、EBV 初感染時のより詳細な病態解析の解明が期待できる。

また、これまでアシクロビルの EBV に対する効果は *in vitro* の細胞培養系でのみしか示されていなかった。本研究において、*ex vivo* のヒト組織において、アシクロビルの EBV に対する増殖抑制能を検証したことは画期的な進歩である。今後、このモデル系を用いて、様々な薬剤の EBV に対する増殖抑制・活性化制御解析を進めていきたい。

E. 結論

上記のように、本科学研究補助金を使用

しての新規薬剤開発の研究は、総じて順調に推移している。LMP1 および BZLF1 遺伝子発現に関しては新規の制御因子が得られている。また薬剤スクリーニングによって、LMP1 および BZLF1 の発現を制御する候補物質も複数取得している。特に LMP1 発現抑制物質およびその類縁体に関しては非常に明瞭な効果が観察されており、期待できる。

さらに摘出扁桃というヒトリンパ組織を用いた EBV 感染モデル (*ex vivo* モデル) を確立した。今後、EBV 初感染時の局所組織における病態解析および新規薬剤スクリーニングへの応用が期待される。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Sato Y. and Tsurumi T.
Noise Cancellation: Viral Fine Tuning of the Cellular Environment for its Own Genome Replication. PLoS Pathog. 6: e1001158. 2010
- 2) Nakayama S, Murata T, Yasui Y, Murayama K, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. Tetrameric Ring Formation of EBV Polymerase Processivity Factor is Crucial for Viral Replication. J.Virol. 84:12589-12598. 2010
- 3) Murata T, Hotta N, Toyama S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Ohshima T, Kanda T, Tsurumi T. Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association

of histone deacetylase.

J Biol Chem. 285:23925-23935. 2010

- 4) Sato Y, Shirata N, Murata T, Nakasu S, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. : Transient increases in p53-responsible gene expression at early stages of Epstein-Barr virus productive replication. Cell Cycle. 9: 807-814. 2010
- 5) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y., Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H.
Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. J Gen Virol 90: 42-50, 2010
- 6) Gotoh K, Ito Y., Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H.
Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. J Infect Dis 202:461-469, 2010
- 7) Ito Y., Takakura S, Ichiyama S, Ueda M, Ando Y, Matsuda K, Hidaka E, Nakatani A, Ishioka J, Nobori T, Sasaki M, Kimura H. Multicenter evaluation of prototype real-time PCR assays for Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in whole blood samples from transplant recipients. Microbiol Immunol 54:516-22, 2010
- 8) Calatini S, Sereti I, Scheinberg P, Kimura H., Childs R, Cohen JI.
Detection of EBV genomes in

- plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders using Immuno-FISH. *Blood* 116:4546-59, 2010
- 9) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. *Int J Cancer in press*
2. 学会発表
- 1) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染 EB ウイルスエピゾームの宿主染色体付着機構の解析. 第 25 回ヘルペスウイルス研究会、浜松市、2010 年 5 月.
- 2) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染細胞中で EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子の解析. 第 7 回 EB ウイルス研究会、札幌市、2010 年 9 月.
- 3) 村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス BZLF1 は SUMO 化によりその転写活性を強く抑制される. 第 7 回 EB ウイルス研究会、札幌市、2010 年 9 月.
- 4) Kanda T, Tsurumi T. The impact of viral repetitive sequences on the biological properties of Epstein-Barr virus recombinants: 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. Birmingham. 2010.9.
- 5) Murata T, Tsurumi T. Screening of cellular factors that enhance reactivation from Epstein-Barr virus latency: 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. Birmingham. 2010.9.
- 6) 神田輝、越智俊元、安川正貴、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、鶴見達也. Utilizing WT1-expressing lymphoblastoid cell lines for the induction of WT1-specific cell immunity. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月.
- 7) 村田貴之、鶴見達也. Screening of cellular factors that enhance reactivation of Epstein-Barr virus from latency. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月.
- 8) 中山早苗、村田貴之、鶴見達也. Tail to tail contact for tetrameric ring formation of EBV BMRF1 is crucial for viral replication. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月.
- 9) 佐藤好隆、鶴見達也. EB ウイルス産生感染における核内環境制御. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.
- 10) 神田輝、鶴見達也. EB ウイルス潜伏感染細胞内における EBNA1 蛋白質結合細胞性因子の解析. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.
- 11) 村田貴之、鶴見達也. EBV 再活性化の分子メカニズム. 第 8 回日本ウイ

ルス学会学術集会徳島市、2010年11月。

- 12) 村田貴之、遠山恵則、鶴見達也。EBウイルス BGLF5 のヌクレアーゼ活性とシャットオフ活性のウイルス学的検討。第8回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月。
- 13) 中山早苗、村田貴之、安井善宏、村山和隆、鶴見達也。EBVポリメラーゼ付随蛋白質の4量体形成のtail-to-tail結合はウイルス複製に重要である。第8回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月。
- 14) 野田千恵子、村田貴之、鶴見達也。EBウイルス LMP1 の発現を制御する細胞性因子のスクリーニング。第8回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月。
- 15) 杉本温子、西山幸廣、鶴見達也。Epstein-Barr ウイルス replication compartment の構造解析。第8回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月。
- 16) 後藤研誠、伊藤嘉規、丸尾聖爾、高田賢藏、岩田誠子、五島典、木村宏。ヒトリンパ組織を用いた Epstein-Barr Virus 感染モデルの確立とその応用。第58回日本ウイルス学会総会。徳島。2010.1
- 17) Kawada J, Iwata S, Yano S, Gotoh K, Ito Y, Fujiwara S, Isobe Y, Sugimoto K, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells

Independent of Epstein-Barr Virus Infection. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases Birmingham, UK. 2010.9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許願：特願 2011-14548 発明者：鶴見達也 磯村寛樹 提出日：H23年1月26日
発明の名称：弱毒ヒトサイトメガロウイルス及びそのワクチンとしての使用

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

EBV 発癌を抑制する新規薬剤開発

研究分担者 鶴見達也 愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部 部長

研究要旨 本研究では、Epstein-Barr ウイルス(EBV)陽性がんに対する治療法を開発するため EBV 再活性化の分子機構およびウイルス発癌遺伝子である LMP1 の発現制御機構を明らかにし、それらを制御する薬剤を細胞レベルでスクリーニングし、その作用機序を明らかにすることを目的としている。本年度の研究成果として(a)潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索、(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定 について以下のように報告する。

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索：LMP1 遺伝子の転写を制御する宿主因子を網羅的に同定するために、cDNA 発現ライブラリを用いたスクリーニングを遂行し、LMP1 プロモーターを活性化する宿主因子の探索を行った。これまでに 2 万個以上のクローンを精査し、15 のヒットを得た。ヒットのうちの 1 つには転写因子 C/EBP ϵ の cDNA 全長がコードされていた。LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP ファミリーについて解析を開始した。

薬剤ライブラリを用いた新規薬剤の探索では標準阻害剤キットを使用し、EBV 陽性リンパ腫である SNK6 や B95-8 細胞を用いて、LMP1 遺伝子の発現を抑制するような薬剤を探索した。現在までに LMP1 遺伝子発現を抑制し、さらに細胞の増殖を強く抑制することのできる候補物質を一つ得た。

(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定：潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子の転写を制御する宿主因子を網羅的に同定するために、cDNA 発現ライブラリを用いたスクリーニングを遂行し、BZLF1 プロモーターを制御する宿主因子の探索を行った。これまでに 2 万個のクローンを精査して 11 のヒットを得た。このうちいくつかの候補について解析を開始した。また転写エピジェネティクス解析から、潜伏感染/再活性化を制御するような候補物質を一つ得ている。

A. 研究目的

EBV はバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性活動性 EBV 感染症、NK/T 細胞リンパ腫、日和見 B 細胞リンパ腫、胃癌、上咽頭癌などの原因となる。多くは悪性度が高く、我が国でも少なからぬ発症があり、治療、予防の手段が切望されている。しかしながら現在までのところ、既存の抗癌剤などが処方されているに過ぎず、これらの EBV 陽性癌に対する効果の高い特異的治療法はない。本研究の(a)では EBV の最も主要な癌遺伝子である LMP1 の発現に着目し、この発現を制御することで治療、予防法を開発することを目的とした。LMP1 遺伝子発現を制御する新規因子が同定できれば、新しい創薬ターゲットとしての可能性が出てくる。LMP1 遺伝子発現を抑制するような薬剤の探索は、ヒットした候補物質がそのまま EBV 陽性癌に対する治療薬としての使用につながる可能性が高い。本研究の(b)では、細胞増殖性と関係の深い EBV のライフサイクルに着目し、ウイルスの潜伏感染の維持、再活性化について詳細な解析を行う。この研究により薬剤などで EBV の感染様式を薬剤などで人為的に操作することで細胞増殖を停止させるような試みのための分子基盤を明らかにする。

B. 研究方法

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索：
LMP1 遺伝子の転写を制御する宿主因

子の網羅的解析のため、cDNA 発現ライブラリを用いたファンクショナルスクリーニングを行った。ライブラリは骨髄細胞由来のクオリティの高いものを、さらにジャンクのクローンを除くための処理をしたのち使用している。レポーターとして、LMP1 プロモーターでホタルルシフェラーゼを発現させるプラスミドを用意し、コントロールとして CMV プロモーターでレニラルシフェラーゼをドライブするプラスミドを使用した。これらを HEK293T 細胞に導入して 24 時間後にアッセイを行い、LMP1 プロモーターの活性を CMV プロモーター活性で標準化した数値を指標としてスクリーニングした。アッセイの効率化のため、一次スクリーニングでは 10-20 個程度のライブラリクローンをまとめてプールとして使用し、二次スクリーニングでは一次スクリーニングで LMP1 プロモーター活性を増強したプールから個々のクローンを拾ってアッセイを行った。

一方、LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤の探索は、特定領域研究の提供する標準阻害剤（約 300 種類）を、濃度を振ってスクリーニングに供した。細胞は、EBV 陽性リンパ腫である SNK6 や B95-8 細胞などを用いた。LMP1 遺伝子の発現は、特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により検出、定量した。

(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定：
上記(a)と同様の方法で、潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な

BZLF1 遺伝子のプロモーターについてスクリーニングを行った。またクロマチン免疫沈降法(ChIP)や阻害薬により、BZLF1 遺伝子プロモーター周辺のエピジェネティックな修飾による転写制御の解析も行った。

C. 研究結果

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構とそれを制御する薬剤探索：

LMP1 転写を制御する宿主因子を網羅的に同定するために、cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングを遂行し、LMP1 プロモーターを活性化する宿主因子の探索を行った。これまでに 2 万個以上のクローンを精査した結果、15 のヒットを得た。これらから偽陽性を除くと、ほとんどは転写因子であった。多くの陽性クローンは、既に同プロモーターを活性化することが報告されている Ets ファミリーの転写因子であったことから、このスクリーニング系の信頼性の高さが証明された。ヒットのうちの 1 つには転写因子 C/EBP ϵ の cDNA 全長がコードされていた。LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP ファミリーについて解析を開始した。C/EBP γ や ζ による LMP1 プロモーター活性化は限定的であったが、C/EBP α , β , ϵ の 3 つは高い転写活性化能を持つことをレポーターアッセイで確認した。今後はより生理的条件に近い実験に臨むため、同結合サイトに変異を加えた EBV 株作製などを予定している。

一方、LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤の探索を遂行した。図 1 にそのスクリーニングの例を示す。この中で、19 番と 30 番の二つの薬剤が LMP1 遺伝

子発現を強力に抑制していた。実はこの二つは、物質は異なるものの、どちらも同一のあるシグナル関連因子をターゲットにした阻害剤であったため、この因子が有力な創薬ターゲットの候補になることが明確になった。この因子は SNK6、B95-8 などの EBV 陽性癌細胞の増殖を培養細胞レベルで強く抑制することも確認した。今後はこの候補物質およびその類縁体も含めてより生理的条件に近い系での試験に供し、薬剤としての効果をさらに確認する。

(b) EBV 潜伏感染からの再活性化に關与する転写因子の同定：

上記(a)と同様の方法で、潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子のプロモーターについてスクリーニングを行った。これまでに 2 万個のクローンを精査して 11 のヒットを得た。このうちいくつかの候補について解析を開始した。LMP1 遺伝子制御因子の研究と同様、まず新規転写因子結合サイトをレポーターアッセイで明らかにし、さらにそのサイトを変異させた EBV を作製するなどして、より生理的条件での実験を行う。

また潜伏、再活性化を司る BZLF1 遺伝子周辺のエピジェネティックスのダイナミズムを、溶解感染誘導前後で比較検討した。これまでにヒストンアセチル化がウイルス再活性化に重要であることは知られていたが、今回これ以外に BZLF1 遺伝子発現に關係するヒストン修飾として、ヒストン H3K4 メチル化、H3K9 メチル化、H3K27 メチル化、H4K20 メチル化など複数の修飾

を新規に明らかにした。EBVの潜伏感染/再活性化というライフサイクルは細胞増殖性と強くリンクしていることが知られており、これらのエピジェネティック修飾を創薬ターゲットにすることで、EBVの潜伏感染/再活性化、すなわち細胞増殖を人為的に制御できる可能性がある。これまでの我々の予備実験において、ある特異的エピジェネティック阻害剤を処理することでEBV潜伏感染/再活性化を制御できることを新規に見いだした。

D. 考察

LMP1、BZLF1の制御因子の網羅的解析はいずれも成功裏に進行しており、新たな知見が得られてきている。質の高い学術雑誌に掲載される可能性が高く、創薬ターゲットとしてのポテンシャルも高い。

薬剤スクリーニングは、これまでは

このような系でモニターしてEBV陽性癌の予防、治療薬を探索するような試みはされていないものと推測され、独創性が高い。単純なアッセイ系であることもあり、結果もクリアである。同アッセイ系を用いてさらに広い薬剤ライブラリを模索するとともに、すでに得られた候補物質について実用化を目指すべく、より毒性の低い類縁化合物をテストしたり、より生理的条件に近い条件、すなわち木村、伊藤分担研究者による摘出ヒト扁桃培養系やヒューマナイズドマウスによる検討を進める。

E. 結論

上記のように、我々の分担範囲において、本科学研究補助金を使用しての新規薬剤開発の研究は、総じて順調に推移している。LMP1およびBZLF1遺伝子発現に関しては新規の制御因子が得

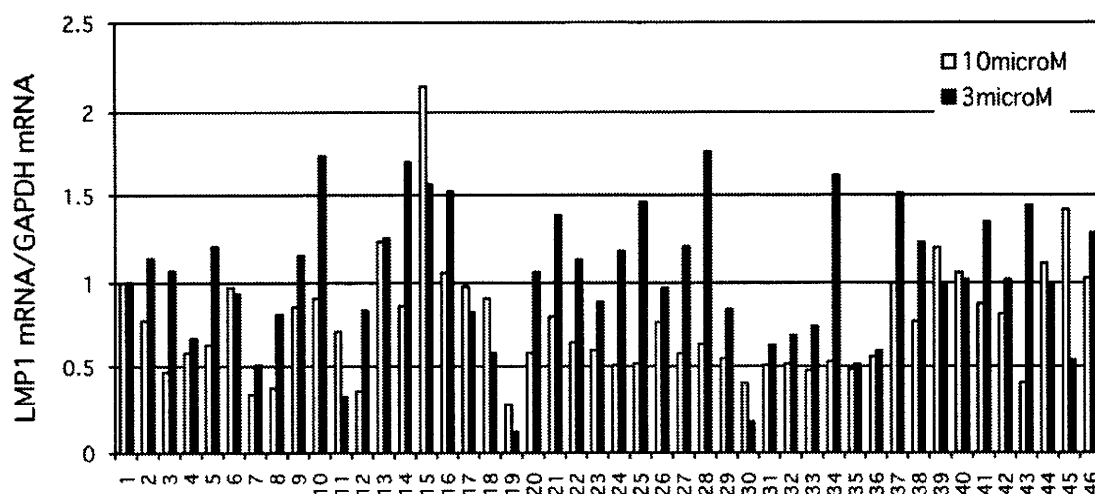


図1. LMP1遺伝子発現を制御する薬剤スクリーニングの一例。EBV陽性NKリンパ腫(SNK6)細胞を様々な候補化学物質で2日間処理し、回収したRNAを特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRに供した。溶媒コントロールである1番の値を1として、GAPDHに対するLMP1の相対的なmRNA量を表示している。この中で19番と30番がLMP1発現を特に強く抑制しているが、この二つはある同一の細胞内シグナル関連因子を阻害する薬剤であった。

られている。また薬剤スクリーニングによって、LMP1 および BZLF1 の発現を制御する候補物質も複数取得している。特に LMP1 発現抑制物質およびその類縁体に関しては非常に明瞭な効果が観察されており、期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Sato Y. and Tsurumi T.
Noise Cancellation: Viral Fine Tuning of the Cellular Environment for its Own Genome Replication. *PLoS Pathog.* 6: e1001158. 2010
- 2) Nakayama S, Murata T, Yasui Y, Murayama K, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. Tetrameric Ring Formation of EBV Polymerase Processivity Factor is Crucial for Viral Replication. *J.Virol.* 84:12589-12598. 2010
- 3) Murata T, Hotta N, Toyama S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Ohshima T, Kanda T, Tsurumi T.
Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J Biol Chem.* 285:23925-23935. 2010
- 4) Sato Y, Shirata N, Murata T,

Nakasu S, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T.: Transient increases in p53-responsible gene expression at early stages of Epstein-Barr virus productive replication. *Cell Cycle.* 9: 807-814. 2010

2. 学会発表

- 1) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染 EB ウイルスエピゾームの宿主染色体付着機構の解析. 第 25 回ヘルペスウイルス研究会、浜松市、2010 年 5 月.
- 2) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染細胞中で EBNA1 蛋白質と相互作用する細胞性因子の解析. 第 7 回 EB ウイルス研究会、札幌市、2010 年 9 月.
- 3) 村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス BZLF1 は SUMO 化によりその転写活性を強く抑制される. 第 7 回 EB ウイルス研究会、札幌市、2010 年 9 月.
- 4) Kanda T, Tsurumi T. The impact of viral repetitive sequences on the biological properties of Epstein-Barr virus recombinants: 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. Birmingham. 2010.9.
- 5) Murata T, Tsurumi T. Screening

of cellular factors that enhance reactivation from Epstein-Barr virus latency:14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. Birmingham. 2010.9.

- 6) 神田輝、越智俊元、安川正貴、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、鶴見達也. Utilizing WT1-expressing lymphoblastoid cell lines for the induction of WT1-specific cell immunity. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月.
- 7) 村田貴之、鶴見達也. Screening of cellular factors that enhance reactivation of Epstein-Barr virus from latency. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月.
- 8) 中山早苗、村田貴之、鶴見達也. Tail to tail contact for tetrameric ring formation of EBV BMRF1 is crucial for viral replication. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月.
- 9) 佐藤好隆、鶴見達也. EB ウイルス産生感染における核内環境制御. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.
- 10) 神田輝、鶴見達也. EB ウイルス潜伏感染細胞内における EBNA1 蛋白質結合細胞性因子の解析. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳

島市、2010 年 11 月.

- 11) 村田貴之、鶴見達也. EBV 再活性化の分子メカニズム. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会徳島市、2010 年 11 月.
- 12) 村田貴之、遠山恵則、鶴見達也. EB ウイルス BGLF5 のヌクレアーゼ活性とシャットオフ活性のウイルス学的検討. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.
- 13) 中山早苗、村田貴之、安井善宏、村山和隆、鶴見達也. EBV ポリメラーゼ付随蛋白質の 4 量体形成の tail-to-tail 結合はウイルス複製に重要である. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.
- 14) 野田千恵子、村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス LMP1 の発現を制御する細胞性因子のスクリーニング. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.
- 15) 杉本温子、西山幸廣、鶴見達也. Epstein-Barr ウイルス replication compartment の構造解析. 第 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許願：特願 2011-14548 発明者：鶴見達也 磯村寛樹 提出日：H23 年 1 月 26 日

発明の名称：弱毒ヒトサイトメガロウイルス及びそのワクチンとしての使用

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

摘出扁桃を用いたヒトリンパ組織モデルの確立についての研究

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科 准教授

伊藤嘉規 名古屋大学医学部附属病院 講師

研究要旨

Epstein-Barr Virus (EBV)はヒトにしか感染せず適当な小動物モデルがないため、感染モデル系の確立が望まれてきた。今回、私共は、ヒト扁桃組織を用いて **EBV** の感染モデル (*ex vivo* モデル) の作成を試みた。健常小児から摘出された口蓋扁桃組織を小片に切断後、組織培養を行い、**EBV** を感染させた。感染後、培養上清および組織から遊離した単核球の **EBV-DNA** 量は経時的に増加した。遊離単核球分画では感染 3 日後から **EBV** 関連潜伏感染遺伝子に加え、12 日後からは溶解感染遺伝子 (**BZLF1** および **gp220**) の発現が確認された。また、**EGFP** 発現ウイルスを用いた感染細胞の表面抗原解析から、**EBV** は主として **CD19** 陽性 **B** 細胞に感染していることを確かめた。さらに、抗ウイルス剤アシクロビルを培養液に加え、ウイルスの増殖への影響を評価したところ、アシクロビルは濃度依存性にウイルス増殖抑制効果を示した。本モデル系は、**EBV** 初感染時の局所組織における病態解析および新規薬剤のスクリーニング系としての応用が期待される。

A. 研究目的

Epstein-Barr Virus (EBV)はヒトにしか感染せず適当な小動物モデルがないために、これまで薬剤やワクチンに対する有効性の検討が困難であった。ヒトにおける病原性を調べるためには、ヒトそのものの組織を用いた感染モデルを用いるのが最も直接的である。今回、私共は、ヒト扁桃組織を用いて **EBV** の感染モデル (*ex vivo* モデル) の作成を試みた。扁桃組織は、代表的なリンパ組織であり、**HIV**, **Human herpesvirus 6** などリンパ球に感染する他のウイルスにも応用されている。ヒト扁桃組織を用いれば、**EBV**

が自然感染した後の病態を再現できる可能性が高い。更にこのモデル系を用いて、感染組織内での感染細胞の性状の解析に加え、新規薬剤スクリーニングへの応用も期待できる。

B. 研究方法

EBV は標準株である **B95-8** と、**EGFP** を発現する組み換え **EBV** (**Akata** 細胞由来 **BZLF1** に挿入) の 2 種類を用いた。健常小児から医学的必要性のために摘出された口蓋扁桃組織を小片に切断後、各小片をコラーゲン製スポンジ様ゲルの上に置き、下部が培養液に浸る状態にして、組織培養を行った。

スポンジ様ゲルに置かれた各小片（9個/1ゲル）に、上記2種のEBV培養上清を直接かけて感染させ、以後72時間に培養上清を回収し、real-time PCR法により、回収した培養上清中のEBV-DNAを定量した。また、72時間毎に一部の感染組織を破碎し、単核球を回収した後、one-step real-time RT-PCR法にてEBV関連遺伝子の発現を定量した。

EGFP-EBVを感染させた組織モデルにおいては、組織中の単核球を分離後、表面抗原を染色し、フローサイトメーターにてEGFP陽性細胞の性状を解析した。

さらに、B95-8ウイルス上清を扁桃組織に感染させた後、抗ウイルス薬アシクロビルを様々な濃度で培養液に加え、ウイルスの増殖への影響を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究で使用する組織は、医学的理由による外科手術の結果、本来処分される摘出組織を使用した。提供者に対しては、平成15年7月30日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者もしくは親権者よりインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報の擁護に努めた。（本研究は申請施設の倫理委員会にて平成18年10月に承認済みである）。

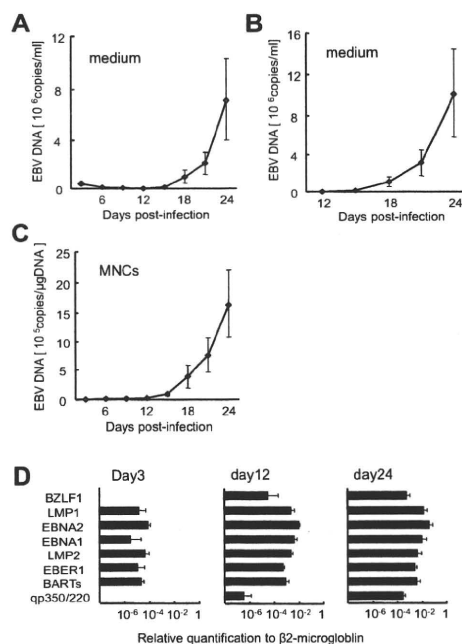
C. 研究結果

1) B95-8, EGFP-EBVのいずれも、扁桃組織に感染後、上清および単核球のEBV-DNA量は経時的に増加した（図1-A, B, C）。

2) EBV関連潜伏感染遺伝子（潜伏感染III）に加え、感染12日後からは、溶解感染遺伝子（BZLF1およびgp220）の発現が確認された（図1-D）。以上から、本モデルにおいてEBV感染が成立することが

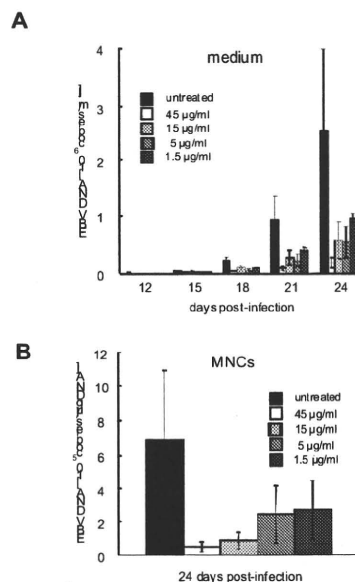
示された。

図1 扁桃組織にB95-8を感染させた後のウイルスDNA/RNAの動態（A:上清中EBV-DNA, B:上清中積算EBV-DNA, C:単核球中EBV-DNA量, D:単核球中のEBV関連遺伝子発現）



3) EGFPウイルスを用いた感染扁桃組織中単核球のEGFP陽性細胞の性状解析から、EBVは主としてCD19陽性細胞に感染していることが確かめられた。

図2 アシクロビルのEBV増殖抑制効果



4) このモデル系を用いて、ヌクレオシドアナログであるアシクロビルの効果のみ