

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鶴見達也

平成24 (2012) 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	11
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）

ヒトリンパ球初代培養による <i>ex vivo</i> モデルを用いた EBV 関連リンパ腫に対する新規治療薬の 効果検討	17
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

23

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

27

I. 総括研究報告書

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）

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探索すること、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の同定、(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) ヒトリンパ球初代培養を用いた *ex vivo* 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の同定：前年度において 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い、転写因子 C/EBP ϵ を同定した。今年度は LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP について詳細に解析し、EBV 陽性がんの潜伏感染 II 型における LMP1 発現に重要な転写因子であることを見つけた。

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薬剤を探索したところ HSP 90 阻害剤が 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を発見した。

(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：潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子の転写を抑制し潜伏感染状態を維持する宿主因子として、Jun dimerization protein 2 (JDP2)を同定した。JDP2 は幅広い組織細胞に発現しているユビキタスな b-Zip 型転写抑制因子で、EB ウイルス感染細胞においては、BZLF1 プロモーターの ZII と呼ばれるシス配列に結合していた。さらに JDP2 は、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC をリクルートすることで BZLF1 の転写を抑制し、潜伏感染の維持に貢献していることを明らかにした。

(c) ヒトリンパ球初代培養による *ex vivo* モデルを用いた EBV 関連リンパ腫に対する新規治療薬の効果検討：EBV 関連リンパ腫患者からのリンパ球初代培養による *ex vivo* モデルを用い、近年抗腫瘍薬として注目を浴びているプロテアソーム阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の EBV 関連リンパ腫に対する効果を検討した。EBV 関連 T/NK 悪性リンパ腫患者末梢血からリンパ球を分離し、磁気ビーズ法により EBV 感染分画と非感染分画に分け、それぞれの分画にプロテアソーム阻害剤として bortezomib、HDAC 阻害剤として valproic acid、およびその両方を投与した。bortezomib、valproic acid 共に EBV 陽性腫瘍細胞に対してのみ増殖抑制および殺傷効果を示した。さらに、両者の併用投与を行ったところ、それぞれの単独投与よりも強い殺傷効果が得られ、相加的な効果が見られた。bortezomib、valproic acid は EBV 関連 T/NK リンパ腫に対して有効である可能性が示唆された。また、本モデル系は、EBV 関連がんの新規薬剤のスクリーニング系およびその作用機序の解析法としての応用が期待される。

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

ば、新しい創薬ターゲットになる可能性がある。LMP1 遺伝子発現を抑制するような薬剤の探索は、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、EBV 陽性がん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。

本研究 (c) では実際のヒト腫瘍に対する効果やその作用機序を調べるためには、患者から得られたフレッシュな腫瘍細胞を用いるのが理にかなっている。我々は、

EBV 関連 T/NK 悪性リンパ腫患者末梢血からリンパ球を分離し、EBV 感染分画と非感染分画に分け、初代培養した後に、各種薬剤の効果を検討するヒトリンパ球初代培養を用いた *ex vivo* モデルを確立した。さらにこのモデルを用い、近年抗腫瘍作用の標的として注目を浴びているプロテアソーム阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の効果とその作用機序について検討した。

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。同定された C/EBP について、LMP1/ED-L1 プロモーター上における C/EBPa の結合領域を、レポーターアッセイを用いて検討した。また結合部位に変異を持つ組替え EB ウイルスを作成し、感染のレベルでの C/EBP による LMP1 発現の影響を検討した。

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：

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-

ーターを用いたレポーターアッセイの結果から、BZLF1 の発現を抑制する可能性のある宿主因子として、Jun dimerization protein 2 (JDP2)を得た。レポーターアッセイの他、EBV 陽性 B 細胞株 B95-8 や Akata 細胞を用いて、過剰発現や、siRNA を用いたノックダウンなどをおこない、その効果を検討した。さらに EMSA、ChIP、レポーターアッセイにより、BZLF1 プロモーター上に JDP2 の機能的結合部位を同定した。また、この結合サイトに変異を導入した EBV 株を作製し、BZLF1 の発現を野生株と比較検討した。

(c) ヒトリンパ球初代培養を用いた EBV 関連リンパ腫に対する新規治療薬の効果検討：

EBV 関連 T 細胞及び NK 細胞リンパ腫患者から同意を得て末梢血を採取。比重遠心法にて単核球分離した後、磁気ビーズ (MACS) を用いて TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞、CD56 陽性細胞など EBV 感染細胞分画とその他の分画に分けた。flowcytometric *in situ* hybridization (FISH) 法を用いて、各分画における EBER 陽性率を確認した。プロテアソーム阻害剤として bortezomib を、HDAC 阻害剤として valproic acid (VPA) を用いた。EBV 陽性・陰性のそれぞれの細胞分画に対して bortezomib 0.5 μ M, VPA 1mM を単独もしくは併用で加え生細胞率および細胞増殖抑制の変化を検討した。更に、各薬剤投与後、経時的に細胞を Annexin V および 7-aminoactinomycin D (7AAD) で標識し flowcytometry により、早期 apoptosis 細胞を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、EBV 関連リンパ腫患者の末梢血を使用した。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。(本研究は名古屋大学医学部倫理委員会にて平成 22 年 7 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：

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、転写因子 C/EBP ϵ を同定した。C/EBP ファミリーのうち 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。

C/EBP の過剰発現、ノックダウンの結果から、C/EBP は、EBV II 型潜伏感染細胞において、LMP1 の2つのプロモーター(遠位、近位)からの転写をいずれも活性化していることが明らかになった。

さらに EMSA、およびレポーターアッセイの mutagenesis の実験から C/EBP の機能的結合サイトを、LMP1 近位プロモーター上に一か所同定した。さらに、同結合サイトに変異を加えた EBV 株を作製し、LMP1 の発現を野生株と比較検討した。予想通り、C/EBP 結合サイト変異株では、野生株よりも

LMP1 の発現が減少しており、C/EBP 過剰発現に対する反応性も大幅に減弱していた。

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、二つの薬剤が LMP1 遺伝子発現を強力に抑制していた。この二つは、HSP90 阻害剤であったため、HSP90 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。HSP90 阻害剤は 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：

EBV の再活性化を抑制し潜伏感染を維持する細胞性因子として、新規に JDP2 を同定した。JDP2 は幅広い組織細胞に発現しているユビキタスな b-Zip 型転写抑制因子で、分化や癌化など様々な生理現象に関与することが報告されている。我々は、JDP2 が、EB ウイルス感染細胞においては、BZLF1 プロモーター上の ZII と呼ばれるシス配列に結合していることを明らかにした。さらに JDP2 は、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC を BZLF1 プロモーター上にリクルートすることで BZLF1 の転写を抑制し、潜伏感染の維持に貢献していることが明らかとなった。EBV BZLF1 プロモーター上の JDP2 結合サイトである ZII エlement に点変異を導入した変異ウイルスを作製し、BZLF1 の発現について、野生株、リバータント(変異復帰株)と比較検討した。

(c) ヒトリンパ球初代培養を用いた EBV 関連リンパ腫に対する新規治療薬の効果検討：

EBV 関連リンパ腫患者 3 例のリンパ球に VPA および bortezomib を単独および併用で投与したところ、いずれの薬剤も EBV 陽性細胞分画(腫瘍細胞)に対して強い殺傷効果および増殖抑制を示した。また両者の併用による相加効果を認めた。Bortezomib, VPA 共に投与後、Annexin V 陽性から 7AAD 陰性細胞が経時的に増加し、両薬剤とも EBV 感染腫瘍細胞に対して apoptosis を誘導することが示された。一方、対照として用いた健常ヒトリンパ球に対して、両薬剤とも細胞殺傷効果を認めなかった。

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。創薬ターゲットになるポテンシャルが高い。

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ニズドマウスによる検討を進める。

EBV 関連 T 細胞リンパ種の初代培養を用いた *ex vivo* モデルを用い、プロテアソーム阻害剤および HDAC 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫への治療効果を検討したところ、HDAC 阻害である VPA はプロテアソーム阻害剤との併用で EBV 関連 T/NK リンパ腫に対して有効である可能性が示唆された。患者リンパ球初代培養を用い、薬剤の EBV 関連腫瘍細胞に対する効果を確認できたことは極めて意義深い。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。

Bortezomib、VPA は EBV 関連 T/NK リンパ腫に対して有効である可能性が示唆された。また、ヒトリンパ球初代培養を用いた *ex vivo* モデルは EBV 陽性悪性リンパ腫細胞に対する新規薬剤のスクリーニング系および病態解析として、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) Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. *J Virol*. in press.
- 2) Kanda T, Shibata S, Saito S, Murata T, Isomura H, Yoshiyama H, Takada K, Tsurumi T. Unexpected instability of family of repeats (FR), the critical cis-acting sequence required for EBV latent infection, in EBV-BAC systems. *PLoS One*. 6:e27758. 2011
- 3) Noda C, Murata T, Kanda T, Yoshiyama H, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Tsurumi T. Identification and characterization of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) as a transcriptional activator for Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1. *J Biol Chem*. 286:42524-42533. 2011
- 4) Murata T, Noda C, Saito S, Kawashima D, Sugimoto A, Isomura H, Kanda T, Yokoyama KK, Tsurumi T. Involvement of Jun dimerization protein 2 (JDP2) in the maintenance of Epstein-Barr virus latency. *J Biol Chem*. 286:22007-22016. 2011
- 5) Sugimoto A, Kanda T, Yamashita Y, Murata T, Saito S, Kawashima D, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T. Spatiotemporally different DNA repair systems participate in Epstein-Barr virus genome maturation. *J Virol*. 85:6127-35. 2011
- 6) Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 50: 244-246, 2011
- 7) 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* 129: 2263-2273, 2011
- 8) Yamaguchi M, Kwong YL, Kim WS, Maeda Y, Hashimoto C, Suh C, Izutsu K, Ishida F, Isobe Y, Suzumiya J, Kodama T, Kimura H, Hyo R, Nakamura S, Oshimi K, Suzuki R. Phase II study of SMILE chemotherapy for newly-diagnosed stage IV, relapsed or refractory extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: the NK-cell Tumor Study Group (NKTSG) study. *J Clin Oncol* 29: 4410-4416, 2011
- 9) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi K, Ando H, Kimura H. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory B cells in patients after transplantation. *J Gen Virol* 92:2590-5, 2011

- 10)Gotoh K, Ito Y, Maruo S, Takada K, Mizuno T, Teranishi M, Nakata S, Nakashima T, Iwata S, Goshima F, Nakamura S, Kimura H. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 6: e25490, 2011
 - 11)Nakamura M, Iwata S, Kimura H, Tokura Y. Elevated expression of activation-induced cytidine deaminase in T and NK cells from patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Eur J Dermatol* 21: 780-2, 2011
 - 12)Takahashi E, Ohshima K, Kimura H, Hara K, Suzuki R, Kawa K, Eimoto T, Nakamura S. Clinicopathological analysis of the age-related differences in patients with Epstein-Barr virus-associated extranasal NK/T-cell lymphoma with reference to the relationship with aggressive NK cell leukemia and chronic active Epstein-Barr virus infection-associated lymphoproliferative disorder. *Histopathology* 59:660-671, 2011
 - 13)Iwata S, Saito T, Ito Y, Kamakura M, Gotoh K, Kawada J, Nishiyama Y, Kimura H. Antitumor activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. *Cancer Sci* 103:375-8, 2012
 - 14)Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 119:673-86, 2012
 - 15)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) Sugimoto A, Nishiyama H, Tsurumi T. Spatiotemporally defferent DNA repair systems participate during Epstein-Barr virus genome maturation. *Structural Biology & DNA Repair*. Amsterdam. 2011.10
 - 2) 野田千恵子、村田貴之、神田輝、鶴見達也. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月.
 - 3) 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也. FR (family of repeats) 1 次配列の EB ウイルス株間における多様性とその意義. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月.
 - 4) 川島大介、神田輝、鶴見達也. Influence of Hsp90 in Epstein-Barr Virus Lytic Replication. 第 70 回日本癌学会学術

- 総会、名古屋市、2011 年 10 月。
- 5) 村田貴之、鶴見達也. Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the Maintenance of Epstein-Barr virus Latency. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月。
 - 6) Kawashima D, Kanda T, Tsurumi T. Involvement of Hsp90 in Epstein-Barr Virus Lytic Replication. -Hsp90 facilitates the interaction between BALF5 and BMRF1 and leads to their proper localization-. IUMS International Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
 - 7) Noda C, Murata T, Kanda T, Tsurumi T. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1. IUMS International Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
 - 8) Kanda T, Tsurumi T. Primary Sequence Heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr Virus (EBV) results in Strain-Specific Differences in the FR Stability in BAC vectors. IUMS International Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
 - 9) Sugimoto A, Nishiyama H, Tsurumi T. Anatomy of Epstein-Barr virus genome manufacturing plant. IUMS International Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
 - 10) Murata T, Tsurumi T. Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the Maintenance of Epstein-Barr virus Latency. IUMS International Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
 - 11) 神田 輝、鶴見達也. Family of repeats(FR)1 次配列の EBV 株間における多様性と共通点について. 第 8 回 EB ウイルス研究会、大阪市、2011 年 9 月。
 - 12) 杉本温子、西山幸廣、鶴見達也. EBV ウイルスゲノム複製の場の構造解析. 第 8 回 EB ウイルス研究会、大阪市、2011 年 9 月。
 - 13) Murata T, Noda C, Kanda T, Tsurumi T. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1 in Epithelial Cells. 5th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Penang. 2011.6.
 - 14) Kanda T, Murata T, Takada K, Tsurumi T. Primary Sequence Heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr Virus (EBV) results in Strain-Specific Differences in the FR Stability in BAC vectors. 5th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Penang. 2011.6.
 - 15) Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, Iwata S, Nishiyama Y, Kojima S, Kimura H. Noninvasive identification of EBV-infected lymphocyte subtypes in EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases. The 2011 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, Denver, Colorado.USA. 2011.4.
 - 16) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K, Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y. *Ex vivo* model for Epstein-Barr virus primary

- 17) infection using human tonsil tissue explants. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan. 2011. 9.
- 18) Iwata S, Ito Y, Gotoh K, Kawada J, Kamakura M, Nishiyama Y, Kimura H.: Anticancer activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan. 2011. 9.
- 19) 木村 宏. EB ウイルスリンパ関連 T/NK リンパ増殖性疾患. 第 43 回, 日本小児感染症学会、教育講演. 岡山. 2011. 10
- 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

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：前年度において 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い、転写因子 C/EBP ϵ を同定した。LMP1 を制御する因子としては新規であったため、C/EBP について詳細に解析し、EBV 陽性がんの潜伏感染 II 型における LMP1 発現に重要な転写因子であることを見つけた。

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薬剤を探索し、HSP 90 阻害剤が 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を見いだした。

(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：潜伏感染からウイルス産生感染への切替えに必須な BZLF1 遺伝子の転写を抑制する宿主因子として、Jun dimerization protein 2 (JDP2)を同定した。JDP2 は幅広い組織細胞に発現しているユビキタスな b-Zip 型転写抑制因子で、EB ウイルス感染細胞においては、BZLF1 プロモーターの ZII と呼ばれるシス配列に結合していた。さらに JDP2 は、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC をリクルートすることで BZLF1 の転写を抑制し、潜伏感染の維持に貢献していることを明らかにした。

- 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。同定された C/EBP について、LMP1/ED-L1 プロモ-

ーター上における C/EBPa の結合領域を、レポーターアッセイを用いて検討した。また結合部位に変異を持つ組換え EB ウイルスを作成し、感染のレベルでの C/EBP による LMP1 発現の影響を検討した。

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：

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を用いたレポーターアッセイの結果から、BZLF1 の発現を抑制する可能性のある宿主因子として、Jun dimerization protein 2 (JDP2)を得た。レポーターアッセイの他、EBV 陽性 B 細胞株 B95-8 や Akata 細胞を用いて、過剰発現や、siRNA を用いたノックダウンなどをおこない、その効果を検討した。さらに EMSA、ChIP、レポーターアッセイにより、BZLF1 プロモーター上に JDP2 の機能的結合部位を同定した。また、この結合サイトに変異を導入した EBV 株を作製し、BZLF1 の発現を野生株と比較検討した。

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、転写因子 C/EBP ϵ を同定した。C/EBPファミリーのうち 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。

C/EBP の過剰発現、ノックダウンの結果から、C/EBP は、EBV II 型潜伏感染細胞において、LMP1 の2つのプロモーター(遠位、近位)からの転写をいずれも活性化していることが明らかになった。

さらに EMSA、およびレポーターアッセイの mutagenesis の実験から C/EBP の機能的結合サイトを、LMP1 近位プロモーター上に一か所同定した。さらに、同結合サイトに変異を加えた EBV 株を作製し、LMP1 の発現を野生株と比較検討した。予想通り、C/EBP 結合サイト変異株では、野生株よりも LMP1 の発現が減少しており、C/EBP 過剰発現に対する反応性も大幅に減弱していた。

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、二つの薬剤が LMP1 遺伝子発現を強力に抑制していた。この二つは、HSP90 阻害剤であったため、HSP90 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。HSP90 阻害剤は 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下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：

EBV の再活性化を抑制する細胞性因子として、新規に JDP2 を同定した。JDP2 は幅広い組織細胞に発現しているユビキタスな b-Zip 型転写抑制因子で、分化や癌化など様々な生理現象に関与することが報告されている。

今回我々は、EMSA、ChIP などの結果から、JDP2 が、EB ウイルス感染細

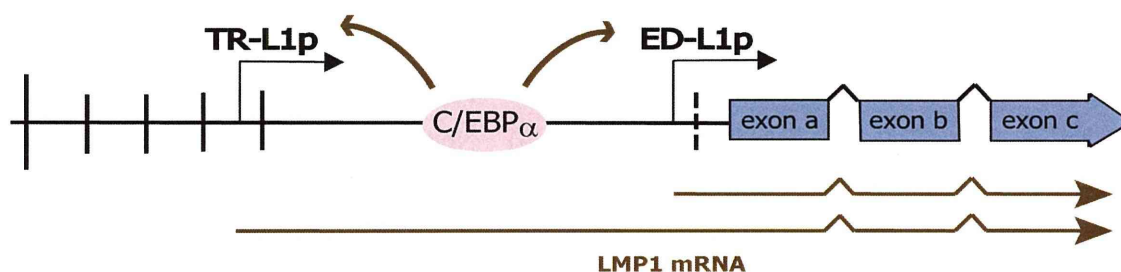


図 C/EBPによるLMP1プロモーターの活性化。

C/EBPは近位プロモーター(ED-L1p)上の一か所に結合し、近位、遠位(TR-L1p)両方のプロモーターを活性化する。

胞においては、BZLF1 プロモーター上の ZII と呼ばれるシス配列に結合していることを明らかにした。

免疫沈降、ChIP などから、JDP2 は、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC を BZLF1 プロモーター上にリクルートすることで BZLF1 の転写を抑制し、潜伏感染の維持に貢献していることが明らかとなった。

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。創薬ターゲットになるポテンシャルが高い。

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、より生理的条件下に近い条件、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) Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. J Virol. in press.
- 2) Kanda T, Shibata S, Saito S, Murata T, Isomura H, Yoshiyama H, Takada K, Tsurumi T. Unexpected instability of family of repeats (FR), the critical cis-acting sequence required for EBV latent infection, in EBV-BAC systems. PLoS One. 6:e27758. 2011
- 3) Noda C, Murata T, Kanda T, Yoshiyama H, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Tsurumi T. Identification and characterization of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) as a transcriptional activator for Epstein-Barr virus oncogene latent

membrane protein 1. J Biol Chem. 286:42524-42533. 2011

- 4) Murata T, Noda C, Saito S, Kawashima D, Sugimoto A, Isomura H, Kanda T, Yokoyama KK, Tsurumi T. Involvement of Jun dimerization protein 2 (JDP2) in the maintenance of Epstein-Barr virus latency. J Biol Chem. 286:22007-22016. 2011
- 5) Isomura H, Stinski MF, Murata T, Yamashita Y, Kanda T, Toyokuni S, Tsurumi T. The human cytomegalovirus gene products assemble into prereplication complexes before viral DNA replication. J Virol. 85:6629-6644. 2011
- 6) Sugimoto A, Kanda T, Yamashita Y, Murata T, Saito S, Kawashima D, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T. Spatiotemporally different DNA repair systems participate in Epstein-Barr virus genome maturation. J Virol. 85:6127-35. 2011

2. 学会発表

- 1) Sugimoto A, Nishiyama H, Tatsuya T. Spatiotemporally different DNA repair systems participating during Epstein-Barr virus genome maturation. Structural Biology & DNA Repair. Amsterdam. 2011.10
- 2) 野田千恵子、村田貴之、神田輝、鶴見達也. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月.
- 3) 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也. FR (family of repeats) 1 次配列の EB ウイルス株間における多様性とその意義. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月.
- 4) 川島大介、神田輝、鶴見達也. Influence of Hsp90 in Epstein-Barr Virus Lytic Replication. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月.
- 5) 村田貴之、鶴見達也. Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the Maintenance of Epstein-Barr virus Latency. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月.
- 6) Kawashima D, Kanda T, Tsurumi T. Involvement of Hsp90 in Epstein-Barr Virus Lytic Replication. -Hsp90 facilitates the interaction between BALF5 and BMRF1 and leads to their proper localization-. IUMS Internatinal Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
- 7) Noda C, Murata T, Kanda T, Tsurumi T. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1. IUMS Internatinal Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
- 8) Kanda T, Tsurumi T. Primary Sequence Heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr Virus

- (EBV) results in Strain-Specific Differences in the FR Stability in BAC vectors. IUMS Internatinal Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
- 9) Sugimoto A, Nishiyama H, Tsurumi T. Anatomy of Epstein-Barr virus genome manufacturing plant. IUMS Internatinal Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
- 10) Murata T, Tsurumi T. Involvement of Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) in the Maintenance of Epstein-Barr virus Latency. IUMS Internatinal Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
- 11) 神田 輝、鶴見達也. Family of repeats(FR)1 次配列の EBV 株間における多様性と共通点について. 第8回EBウイルス研究会、大阪市、2011年9月.
- 12) 杉本温子、西山幸廣、鶴見達也. EBV ウイルスゲノム複製の場の構造解析. 第8回EBウイルス研究会、大阪市、2011年9月.
- 13) Murata T, Noda C, Kanda T, Tsurumi T. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activator for EBV Oncogene LMP1 in Epithelial Cells. 5th Internatinal Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Penang. 2011.6.
- 14) Kanda T, Murata T, Takada K, Tsurumi T. Primary Sequence Heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr Virus (EBV) results in Strain-Specific Differences in the FR Stability in BAC vectors. 5th Internatinal Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Penang. 2011.6.
- 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

ヒトリリンパ球初代培養による *ex vivo* モデルを用いた EBV 関連リンパ腫に対する新規
治療薬の効果検討

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、抗ウイルス剤の効果判定には細胞培養株を用いた *in vitro* 系しかなかった。今回、我々は EBV 関連リンパ腫患者からのリンパ球初代培養をによる *ex vivo* モデルを用い、近年抗腫瘍薬として注目を浴びているプロテアソーム阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の EBV 関連リンパ腫に対する効果を検討した。EBV 関連 T/NK 悪性リンパ腫患者末梢血からリンパ球を分離し、磁気ビーズ法により EBV 感染分画と非感染分画に分け、それぞれの分画にプロテアソーム阻害剤として bortezomib、HDAC 阻害剤として valproic acid、およびその両方を投与した。bortezomib、valproic acid 共に EBV 陽性腫瘍細胞に対してのみ増殖抑制および殺傷効果を示した。さらに、両者の併用投与を行ったところ、それぞれの単独投与よりも強い殺傷効果が得られ、相加的な効果が見られた。bortezomib、valproic acid は EBV 関連 T/NK リンパ腫に対して有効である可能性が示唆された。また、本モデル系は、EBV 関連がんの新規薬剤のスクリーニング系およびその作用機序の解析法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、これまで薬剤に対する有効性の検討が困難であった。よって、抗ウイルス剤の効果判定するには、EBV 感染した、B 細胞株などの培養細胞株を用いた *in vitro* 系を用いるしかなかった。これらの細胞株は扱いやすいという利点がある一方、実際のヒト腫瘍に対する効果やその作用機序を調べるためには、患者から得られたフレッシュな腫瘍細胞を用いるの

が理にかなっている。

今回、我々は、EBV 関連 T/NK 悪性リンパ腫患者末梢血からリンパ球を分離し、磁気ビーズ法により EBV 感染分画と非感染分画に分け、初代培養した後に、各種薬剤の効果を検討するヒトリリンパ球初代培養を用いた *ex vivo* モデルを確立した。さらにこのモデルを用い、近年抗腫瘍作用の標的として注目を浴びているプロテアソーム阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の効果とその作用機序について検討した。プロテアソーム阻害