

201220017A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鶴見達也

平成25 (2013) 年 4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 癌遺伝子 LMP1 の発現を抑制する薬剤探索	9
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)	
免疫不全マウスを用いた EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の <i>xenograft</i> モデルの確立と新規治療薬の効果検討	14
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

21

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

23

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 今年度における本研究は、Epstein-Barr ウイルス(EBV)陽性がんに対する新規治療法を開発するため EBV 発癌遺伝子である LMP1 の発現を細胞レベルで抑制する薬剤を薬剤ライブラリーからスクリーニングし、その候補薬剤を NOG マウスを用いた EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の xenograft モデル評価系で検証することを目的とした。

LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤を探索においては標準阻害剤キットを使用し、EBV 陽性 NK 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スクリーニングしたところ、HSP90 阻害剤が LMP1 遺伝子発現を抑制し、さらに EBV 陽性 NK 細胞の増殖を強く抑制することを見いだした。

EBV 陽性 NK 細胞は、従来の免疫不全マウスに生着させることが困難であり、これまで有用な動物モデル系は存在しなかった。我々は NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NOG) マウスを用いた EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の xenograft モデルを確立した。このモデル系を用い、HSP90 阻害剤である 17AAG の EBV 陽性 NK 細胞性悪性リンパ腫に対する *in vivo* における効果を検証し、17AAG が LMP1 発現を抑制し、個体におけるリンパ腫の増殖を抑制することを示した。免疫不全マウスを用いることで、個体レベルで EBV 陽性がんに対する薬剤効果を評価できるようになったことは大変意義深く、今後の発展が期待できる。

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	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。

本研究では、まず EBV の最も主要な癌遺伝子である LMP1 の発現に着目し、この発現を抑制する薬剤を探索した。次に NOG マウスを用いた xenograft モデルを確立し、その評価系を用いて、LMP1 発現を抑制する候補薬剤の EBV 関連悪性リンパ腫に対する *in vivo* における効果について検討した。

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。また候補薬剤の SNK6、B95-8 などの EBV 陽性癌細胞の細胞増殖に与える影響を検討した。

(b) EBV 陽性 NK 細胞性悪性リンパ腫 xenograft モデルの作成：

NOG マウスに EBV 陽性もしくは陰性の T/NK 細胞株を、様々なルート（皮下、静脈、腹腔内、筋肉内）で投与し、生着・腫瘍形成の有無を調べた。腫瘍形成の判定のために、腫瘍径の測定、リアルタイム PCR 法による EBV-DNA 定量、リアルタイム RT-PCR 法による EBV 遺伝子発現定量、各臓器の病理組織像、免疫組織染色、EBV-encoded small RNA (EBER) *in situ* hybridization 法による感染細胞検出などを実施した。

(c) Xenograft モデルによる HSP90 阻害剤の効果検討：

節外性 NK/T リンパ腫由来の EBV 陽性 NK 細胞株 SNK6 を、NOG マウスの皮下に 1X10⁶ 細胞接種した。腫瘍形成が認められた後に、HSP90 阻害剤 17AAG を、腹腔内に 50mg/kg/回、隔日で 6 回投与した。対照群の NOG マウスには、細胞株を接種し皮下腫瘍が認められた後、DMSO を同量腹腔内投与した。効果判定は以下の手法により行った：1) 腫瘍サイズの経時的測定、2) 血液中のウイルス DNA 定量、3) 腫瘍中の LMP1 遺伝子発現定量、4) 組織中の EBER 陽性細胞の検出。

（倫理面への配慮）

本研究で用いた NOG マウスは遺伝子改変免疫不全マウスであるため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、及び関連省令に従って取り扱った（本研究は申請施設の組換え DNA 実験安全委員会にて平成 22 年 7 月に承認済み）。実験動物に対して動物愛護上の観点から十分に配慮した（申請施設の動物実験を申請し平成 22 年 8 月に承認済み）。

C. 研究結果

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤探索：

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。さらに

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。

(b)) EBV 陽性 NK 細胞性悪性リンパ腫 xenograft モデルの作成 :

種々の T/NK 細胞株を様々なルートで NOG マウスに接種したところ、EBV 陽性細胞では NK 細胞株の SNK6 のみが皮下注により生着した。EBV 陰性 T 細胞株である Jurkat も皮下注により生着した。

SNK6 を皮下注した NOG マウスでは、腫瘍は経時的に増大し、並行して血液中の EBV-DNA 量も増加していた。腫瘍体積と EBV-DNA 量との相関を見たところ、両者には正の相関関係が認められた。

皮下腫瘍を形成したマウスを剖検したところ、肉眼的に所属リンパ節・脾臓・肝臓・腎臓などが腫大していた。組織から凍結切片を作成、EBER *in situ* hybridization 法を施行した結果、EBER 陽性細胞を皮下腫瘍のみならず、リンパ節・脾臓・腎臓そして肝臓の一部に認めた。

以上、EBV 陽性 NK 細胞株である SNK6 の皮下接種により、NOG マウスに腫瘍が形成され、リンパ行性・血行性に諸臓器に転移することが示された。

(c) Xenograft モデルによる HSP90 阻害剤の効果検討 :

次に、このモデル系を用いて 17AAG の腫瘍抑制効果を検証した。皮下に SNK6 を接種し腫瘍形成を認めた時期から、17AAG を腹腔内投与したところ、対照群に比べ腫瘍の縮小を認めた。血液中の EBV-DNA 量も 17AAG 投与群の方が有意に少なかった。

以上から、免疫不全マウスを用いた xenograft モデルにより、17AAG は生体においても、LMP1 発現を抑制し、EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍に対して増殖抑制効果を有することが確かめられた。

D. 考察

今回我々は、NOG マウスを用い、EBV 陽性 NK 細胞性リンパ腫の xenograft モデルを確立した。EBV 陽性 T/NK 細胞株は原則として interleukin (IL)-2 依存性である。IL-2 は主に活性化 T 細胞から産生されるため、T 細胞を欠く免疫不全マウスではほとんど産生されない。またマウス IL-2 が産生されていたとしてもヒト細胞への効果は無いか、あったとしても極めて低いと考えられる。これまで EBV 陽性 T/NK リンパ腫に対する xenograft モデル系が確立できなかったのは、この IL-2 依存性にも起因していたと推測される。事実、IL-2 非依存性の B 細胞株は比較的容易に免疫不全マウスに生着する。同じく IL2 非依存性である EBV 陰性 T 細胞株 Jurkat も、NOG マウスに容易に生着した。本研究において、EBV 陽性 T/NK 細胞株のうち SNK6 のみが生着した理由は不明である。SNK6 は IL2 依存性であるが、IL-2 非存在化で培養を行ったところ、僅かながら増殖が認められた。一方、生着しなかった他の細胞株は全く増殖が認めらなかった。また、他の細胞株を皮下接種後、IL-2 を腹腔内投与すると、腫瘍の生着が認められた。以上の結果より、SNK6 は IL-2 に低依存性であるため、他の T/NK 細胞株に比べ NOG マウスに生着しやすいと推測される。また、SNK6 が IL-2 を自己産生している可

能性もある。SNK6 が生着しやすいメカニズムを明らかにすることは、EBV 関連 T/NK 細胞性リンパ腫の発症病理の解明のみならず、これらリンパ腫の治療戦略の構築にもつながると考えられ、今後の重要な課題である。

この xenograft モデルを用い、HSP90 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫への治療効果を検証したところ、腫瘍形成は有意に抑制された。また、組織中の LMP1 発現量も同様に抑制されていた。元々、17AAG は、*in vitro*において、LMP1 発現を抑制する薬剤としてスクリーニングされたものであり、これらの結果は予測されていた。しかしながら、我々が独自に開発した NOG マウスによる EBV 陽性 T/NK 悪性リンパ腫モデルを用い、その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、HSP90 阻害剤の投与量・投与間隔など至適条件の決定、作用機序の詳細な解明のみならず、これまで報告したプロテアソーム阻害剤 (bortezomib)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (valproic acid)、HSP90 阻害薬等を始めとする様々な医薬品及びその組み合わせ投与による効果を検証する予定である。

E. 結論

NOG マウスを用い EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の xenograft モデルを確立した。このモデル系を使用し、HSP90 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫に対する *in vivo* における癌抑制効果を検証することができた。本研究で確立した免疫不全マウスを用いた EB ウイルス関連リンパ腫治療モデルを

用いることで、LMP1 発現を阻害する薬剤を始めとする様々な薬剤及びその組み合わせを投与することにより、個体レベルにおける EBV 陽性がんに対する効果を評価できるようになったことは大変意義深く、今後の臨床応用に期待できる。

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*, 86: 4752-4761, 2012.
- 2) Kanda T, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Tsurumi T: HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther*, 19: 566-571. 2012
- 3) Sato Y, Tsurumi T. Genome guardian p53 and viral infections. *Rev Med Virol*. 2012 Dec 17. [Epub ahead of print]
- 4) Saito S, Murata T, Kanda T, Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Tsurumi T.

- Epstein-Barr Virus Deubiquitinase Down-regulates TRAF6-mediated NF- κ B Signaling during Productive Replication. *J Virol.* 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 5) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol.* ;87:2120-2127. 2013
- 6) Kawada J, Iwata N, Kitagawa Y, Kimura H, Ito Y. Prospective monitoring of Epstein-Barr virus and other herpesviruses in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate and tocilizumab. *Mod Rheumatol* 22: 565-70, 2012
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected $\gamma\delta$ T-cells. *J Invest Dermatol* 132:1401-8, 2012
2. 学会発表
- 1) 神田輝、鶴見達也、野口耕司. 新規抗ウイルス薬開発をめざした EBNA1 蛋白質機能阻害の戦略. 第 21 回 EB ウイルス感染症研究会. 東京 2012 年 3 月.
- 2) 斉藤伸一、村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス脱ユビキチン化酵素 BPLF1 による NF- κ B 経路の阻害を介したウイルス DNA 複製の促進. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月
- 3) 杉本温子、木村宏、鶴見達也. EBV capsid 形成・成熟・DNA packaging の場の解析. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
- 4) 村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス感染様式の制御メカニズム. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月
- 5) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析とその応用の可能性. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
- 6) 成田洋平、村田貴之、木村宏、鶴見達

- 也。Pin1 は EB ウイルス複製に重要な因子である。第 27 回ヘルペスウイルス研究会。大府。2012 年 6 月。
- 7) 川島大介、鶴見達也。EBV の DNA ポリメラーゼの核移行はその付随因子と Hsp90 に依存する。第 27 回ヘルペスウイルス研究会。大府。2012 年 6 月
 - 8) 神田輝、村田貴之、鶴見達也。EBNA 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析。第 9 回 EB ウイルス研究会。米子。2012 年 6 月。
 - 9) Murata T, Tsurumi T. Cis- and trans-elements that affect reactivation of Epstein-Barr virus from latency. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, USA. 2012 年 8 月
 - 10) Sugimoto A, Kimura H, Tsurumi T. Epstein-Barr virus genome packaging factors converge at inner part of viral genome storeroom of the BMRF1 core within viral replication compartment. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, USA. 2012 年 8 月
 - 11) Kanda T, Murata T, Tsurumi T. Chromosome binding of Epstein-Barr virus EBNA1 protein is mediated by arginine residues within chromosome binding domains. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, USA. 2012 年 8 月
 - 12) Kawashima D, Tsurumi T. Involvement of Hsp90 in Epstein-Barr Virus Lytic Replication. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM). 京都。2012 年 8 月
 - 13) 齊藤伸一、村田貴之、鶴見達也。Epstein-Barr virus deubiquitinase BPLF1 inhibits the canonical NF-kappaB pathway to promote viral lytic DNA replication. 第 71 回日本癌学会学術総会。札幌。2012 年 9 月
 - 14) 村田貴之、野田千恵子、神田輝、鶴見達也。Induction of Epstein-Barr virus Oncogene LMP1 by Transcription Factor AP-2 in Epithelial Cells. 第 71 回日本癌学会学術総会。札幌。2012 年 9 月
 - 15) 神田輝、村田貴之、鶴見達也。Mechanism of host chromosome binding of latently infected Epstein-Barr virus episomes. 第 71 回日本癌学会学術総会。札幌。2012 年 9 月
 - 16) 杉本温子、木村宏、鶴見達也。Epstein-Barr virus genome packaging factors converge at inner part of viral genome storeroom of the BMRF1 core within viral replication compartment. 第 71 回日本癌学会学術総会。札幌。2012 年 9 月
 - 17) 齊藤伸一、村田貴之、鶴見達也。Epstein-Barr virus 脱ユビキチン化酵素 BPLF1 は TRAF6 を介した NF- κ B 経路の活性化を阻害することによってウウイルス DNA 複製を促進する。第 71 回日本ウイルス学会学術集会。大阪。2012 年 11 月
 - 18) 村田貴之、鶴見達也。EBV 再活性化におけるエピジェネティックヒストン

- 修飾. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会.大阪. 2012 年 11 月
- 19) 成田洋平、村田貴之、木村宏、鶴見達也. Pin1 は EB ウイルス複製に重要な因子である. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月
- 20) 神田輝、鶴見達也. EBNA1 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会.大阪. 2012 年 11 月
- 21) 杉本温子、木村宏、鶴見達也. EBV capsid 形成・成熟・DNA packaging の場の解析. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月
- 22) Tsurumi T. Epstein-Barr virus Replication Factory. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan 2012 年 9 月
- 23) 鶴見達也 EBV 陽性細胞の増殖を制御するウイルス遺伝子の発現調節機構 感染と癌 -感染癌のエフェクター分子とその標的- 札幌 2012 年 9 月
- 24) Kimura H. Chronic active Epstein-Barr virus infection and related diseases in Japan. 11th Korean-Japanese Lymphoreticular Workshop 2012: Asian Hematopathology Symposium, Soul, Jan 29, 2012.1
- 25) Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N, Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. International Congress on Oncogenic Herpesvirus and Associated Disease, Philadelphia, USA, 2012.8.
- 26) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Plasma viral microRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. ID Week 2012, San Diego, USA, 2012.10
- 27) 木村 宏. ウイルス学の基礎よりみた臓器移植後の感染症. 第 48 回日本移植学会総会、教育セミナー. 名古屋 2012 年 9 月
- 28) 木村 宏. EBV と血液・腫瘍性疾患. 第 74 回日本血液学会学術集会 教育講演. 京都 2012 年 10 月
- 29) 中川光、岩田誠子、鎌倉真紀、五島典、木村宏. EBV 関連悪性リンパ腫に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012 年 11 月
- 30) 河野好彦、岩田誠子、川田潤一、神谷泰子、鈴木道雄、鳥居ゆか、木村宏、伊藤嘉規. 慢性活動性 EB ウイルス感染用における EB ウイルス由来 miRNA の血漿中バイオマーカーとしての応用. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012 年 11 月
- 31) 木村 宏. 難治性 EB ウイルス感染症～EBV-HLH と CAEBV の病態から治療まで～: CAEBV～アジア型と欧米型～. 第 44 回日本小児感染症学会学術集会 ワークショップ. 小倉 2012 年 11 月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

II. 分担研究報告

EBV 癌遺伝子 LMP1 の発現を抑制する薬剤探索

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 今年度における本研究は、Epstein-Barr ウイルス(EBV)陽性がんに対する新規治療法を開発するため EB ウイルス発癌遺伝子である LMP1 の発現を細胞レベルで抑制する薬剤を薬剤ライブラリーからスクリーニングし、その候補薬剤を NOG マウスを用いた EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の xenograft モデル評価系で検証することを目的とした。

LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤を探索するため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スクリーニングしたところ、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見いだした。

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。

本研究では EBV の最も主要なウイルス癌遺伝子である LMP1 の発現に着目し、この発現を抑制する薬剤を探索することを目的とした。LMP1 遺伝子

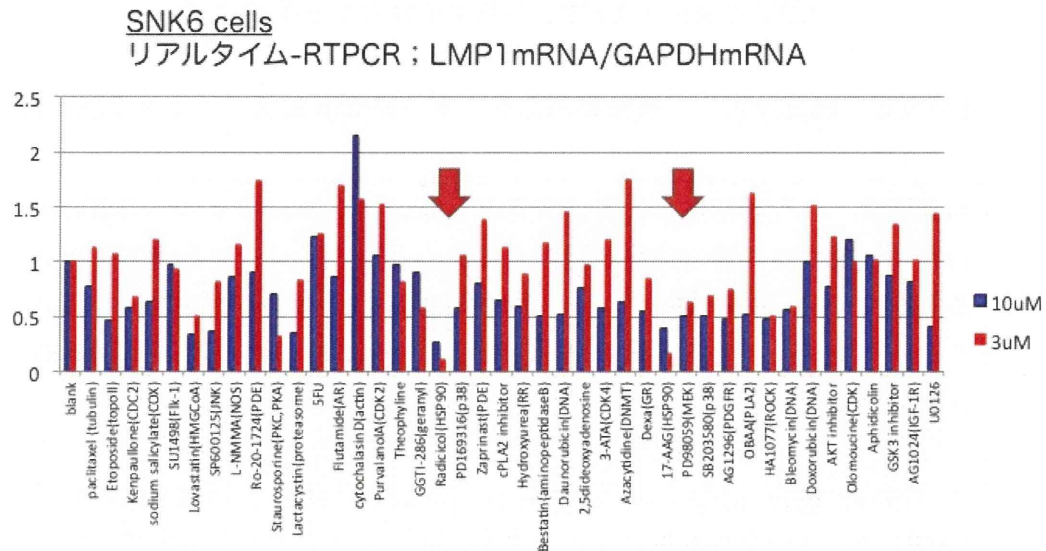
発現を抑制するような薬剤の探索は、ヒットした候補物質がそのまま EBV 陽性癌に対する治療薬としての使用につながる可能性が高い。

B. 研究方法

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現を制御する薬剤探索：

LMP1 遺伝子発現を抑制する薬剤の探索は、文部科学省特定領域研究の提供する標準阻害剤（約 300 種類）を、濃度（3 μ M, 10 μ M）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

図1.LMP1転写を抑制する薬剤の探索（一例）



PCRにより検出、定量した。また候補薬剤のSNK6、B95-8などのEBV陽性癌細胞の細胞増殖に与える影響を検討した。

C. 研究結果

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(図2)。

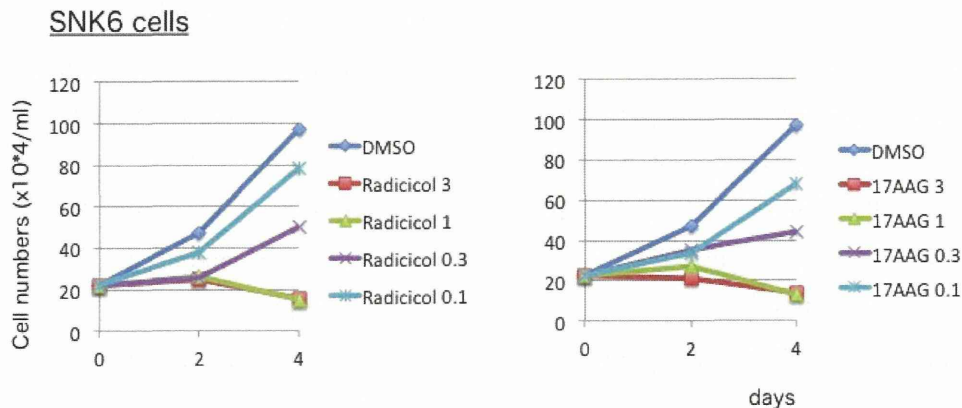
D. 考察

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、より生理的条件下に近い条件、すなわちNOGマウスによる個体レベルの薬剤効果の検討を進める。

図2.HSP90阻害剤は、EBV陽性NK細胞リンパ腫(SNK6)の増殖を抑制する



E. 結論

上記のように、薬剤スクリーニングによって、LMP1 の発現を抑制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, 86: 4752-4761, 2012.
- 2) Kanda T, Ochi T, Fujiwara H,

Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Tsurumi T.: HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. Cancer Gene Ther, 19:566-571. 2012

- 3) Sato Y, Tsurumi T. Genome guardian p53 and viral infections. Rev Med Virol. 2012 Dec 17. [Epub ahead of print]
- 4) Saito S, Murata T, Kanda T, Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Tsurumi T. Epstein-Barr Virus Deubiquitinase Down-regulates TRAF6-mediated NF- κ B Signaling during Productive Replication. J Virol. 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 5) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T,

- Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the epstein-barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol.* ;87:2120-7. 2013
2. 学会発表
- 1) 神田輝、鶴見達也、野口耕司. 新規抗ウイルス薬開発をめざした EBNA1 蛋白質機能阻害の戦略. 第 21 回 EB ウイルス感染症研究会. 東京 2012 年 3 月.
 - 2) 斉藤伸一、村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス脱ユビキチン化酵素 BPLF1 による NF- κ B 経路の阻害を介したウイルス DNA 複製の促進. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
 - 3) 杉本温子、木村宏、鶴見達也. EBV capsid 形成・成熟・DNA packaging の場の解析. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
 - 4) 村田貴之、鶴見達也. EB ウイルス感染様式の制御メカニズム. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
 - 5) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析とその応用の可能性. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
 - 6) 成田洋平、村田貴之、木村宏、鶴見達也. Pin1 は EB ウイルス複製に重要な因子である. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 大府. 2012 年 6 月.
 - 7) 川島大介、鶴見達也. EBV の DNA ポリメラーゼの核移行はその付随因子と Hsp90 に依存する. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会. 口演. 大府. 2012 年 6 月.
 - 8) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析. 第 9 回 EB ウイルス研究会. 米子. 2012 年 6 月.
 - 9) Murata T, Tsurumi T. Cis- and trans-elements that affect reactivation of Epstein-Barr virus from latency. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, USA. 2012 年 8 月.
 - 10) Sugimoto A, Kimura H, Tsurumi T. Epstein-Barr virus genome packaging factors converge at inner part of viral genome storeroom of the BMRF1 core within viral replication compartment. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, USA. 2012 年 8 月.
 - 11) Kanda T, Murata T, Tsurumi T. Chromosome binding of Epstein-Barr virus EBNA1 protein is mediated by arginine residues within chromosome binding domains. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, USA. 2012 年 8 月.
 - 12) Kawashima D, Tsurumi T. Involvement of Hsp90 in

- Epstein-Barr Virus Lytic Replication. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM). 京都. 2012年8月.
- 13) 齊藤伸一、村田貴之、鶴見達也. Epstein-Barr virus deubiquitinase BPLF1 inhibits the canonical NF-kappaB pathway to promote viral lytic DNA replication. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌. 2012年9月.
- 14) 村田貴之、野田千恵子、神田輝、鶴見達也. Induction of Epstein-Barr virus Oncogene LMP1 by Transcription Factor AP-2 in Epithelial Cells. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌. 2012年9月.
- 15) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Mechanism of host chromosome binding of latently infected Epstein-Barr virus episomes. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌. 2012年9月.
- 16) 杉本温子、木村宏、鶴見達也. Epstein-Barr virus genome packaging factors converge at inner part of viral genome storeroom of the BMRF1 core within viral replication compartment. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌. 2012年9月.
- 17) 齊藤伸一、村田貴之、鶴見達也. Epstein-Barr virus 脱ユビキチン化酵素 BPLF1 は TRAF6 を介した NF-κB 経路の活性化を阻害することによってウウイルス DNA 複製を促進する. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月.
- 18) 村田貴之、鶴見達也. EBV 再活性化におけるエピジェネティックヒストン修飾. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月.
- 19) 成田洋平、村田貴之、木村宏、鶴見達也. Pin1 は EB ウイルス複製に重要な因子である. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月.
- 20) 神田輝、鶴見達也. EBNA1 蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月.
- 21) 杉本温子、木村宏、鶴見達也. EBV capsid 形成・成熟・DNA packaging の場の解析. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月.
- 22) Tsurumi T. Epstein-Barr virus Replication Factory. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan 2012年9月.
- 23) 鶴見達也. EBV 陽性細胞の増殖を制御するウイルス遺伝子の発現調節機構 感染と癌 -感染癌のエフェクター分子とその標的- 札幌 2012年9月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

免疫不全マウスを用いた EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の *xenograft* モデルの確立と
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 教授

伊藤嘉規 名古屋大学医学部附属病院 講師

研究要旨

ヒトにしか感染しない Epstein-Barr Virus (EBV) に対して適当な小動物モデルがないことが、EBV 関連疾患に対する治療薬の開発を妨げてきた。ことに、EBV 陽性 T 細胞もしくは NK 細胞は、従来の免疫不全マウスに生着させることが困難であり、これまで有用なモデル系は存在しなかった。今回我々は NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG) マウスを用いた EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の *xenograft* モデルを確立した。このモデル系を用い、HSP90 阻害剤である 17AAG の EBV 陽性 NK 細胞性悪性リンパ腫に対する *in vivo* における効果を検証し、17AAG が LMP1 発現を抑制すること、リンパ腫の増殖を抑制することを示した。NOG マウスによる *xenograft* モデルは、EBV 陽性悪性リンパ腫の病態解析および新規薬剤のスクリーニング系に有用であり、更なる応用が期待される。

A. 研究目的

Epstein-Barr Virus (EBV) は種々のリンパ腫・白血病や上咽頭がん、胃がんの一部などに感染しており、発がんに関与している。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫に対しては、ヒト化 CD20 モノクローナル抗体による分子標的治療法が確立しているが、B 細胞以外の EBV 陽性腫瘍には未確立である。ヒトにしか感染しない EBV に対しては、適当な小動物モデルがないことが、新規治療薬の開発を妨げてきた。薬剤の効果判定・作用機序の解明には、EBV 陽性 B 細胞株を用いた *in vitro* の系が専ら用いられてきた。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安全性を調べるためには限界があり、マウスなどの

小動物モデルの確立が望まれてきた。しかしながら、EBV 陽性 T 細胞もしくは NK 細胞は、従来の免疫不全マウスに生着させることが困難であり、これまで有用なモデル系は存在しなかった。

NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG) マウスは、NOD/scid マウスと IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウトマウスを組み合わせることにより生まれ、極めて重度な複合型免疫不全を呈する。NOG マウスでは T・B 細胞のみならず NK 細胞も欠失しているため、異種細胞であるヒト腫瘍を容易に受け入れることができる。今回我々は、EBV 陽性 T 細胞もしくは NK 細胞株を免疫不全マウスである NOG マウスに接種し、悪性リンパ腫を生体内で再構築する *xenograft* モデルの確立を試みた。一方、研究代表者

の鶴見らは、HSP90 阻害剤が EBV 癌遺伝子である LMP1 の発現を抑制し、EBV 陽性 T/NK 細胞株の増殖を抑えることを *in vitro* で明らかにしている。本研究では、新たに確立した NOG マウスによる xenograft モデルを用い、HSP90 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫に対する *in vivo* における効果とその作用機序について検討した。

B. 研究方法

1) EBV 陽性 NK 細胞性悪性リンパ腫 xenograft モデルの作成：

NOG マウスに EBV 陽性もしくは陰性の T/NK 細胞株を、様々なルート（皮下、静脈、腹腔内、筋肉内）で投与し、生着・腫瘍形成の有無を調べた。腫瘍形成の判定のために、腫瘍径の測定、リアルタイム PCR 法による EBV-DNA 定量、リアルタイム RT-PCR 法による EBV 遺伝子発現定量、各臓器の病理組織像、免疫組織染色、EBV-encoded small RNA (EBER) *in situ* hybridization 法による感染細胞検出などを実施した。用いた細胞は以下の通りである。

EBV 陰性 T 細胞：Jurkat

EBV 陽性 T 細胞：SNT13, SNT16

EBV 陰性 NK 細胞：KHYG1

EBV 陽性 NK 細胞：KAI3, SNK6

2) Xenograft モデルによる HSP90 阻害剤の効果検討：

節外性 NK/T リンパ腫由来の EBV 陽性 NK 細胞株 SNK6 を、NOG マウスの皮下に 1×10^6 細胞接種した。腫瘍形成が認められた後に、HSP90 阻害剤 17AAG を、腹腔内に 50mg/kg/回、隔日で 6 回投与した。対照群の NOG マウスには、細胞株を接種し皮下腫瘍が認められた後、DMSO を同量腹腔内投与した。効果判定は以下の手法により行った：1) 腫瘍サイズの

経時的測定、2) 血液中のウイルス DNA 定量、3) 腫瘍中の LMP1 遺伝子発現定量、4) 組織中の EBER 陽性細胞の検出。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた NOG マウスは遺伝子改変免疫不全マウスであるため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、及び関連省令に従って取り扱った(本研究は申請施設の組換え DNA 実験安全委員会にて平成 22 年 7 月に承認済み)。実験動物に対して動物愛護上の観点から十分に配慮した(申請施設の動物実験を申請し平成 22 年 8 月に承認済み)。

C. 研究結果

1) EBV 陽性 NK 細胞性悪性リンパ腫 xenograft モデルの作成：

種々の T/NK 細胞株を様々なルートで NOG マウスに接種したところ、下図に示したごとく、EBV 陽性細胞では NK 細胞株の SNK6 のみが皮下注により生着した。EBV 陰性 T 細胞株である Jurkat も皮下注により生着した。

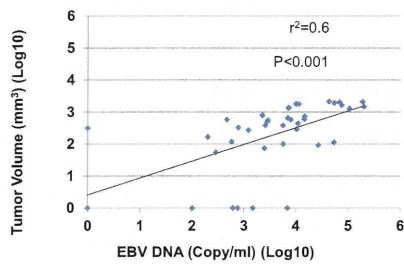
SNK6 を皮下注した NOG マウスでは、腫瘍は経時的に増大し、並行して血液中の EBV-DNA 量も増加していた。腫瘍体積と EBV-DNA 量との相関を見たところ、両者には正の相関関係が認められた。

Tumor formation by inoculation of cell lines

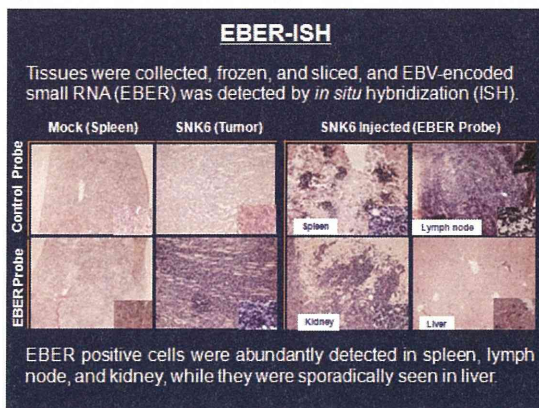


Cell line	Cell Type	EBV	Route of Injection	Tumor	EBV DNA
Jurkat	T	EBV (-)ve	SC	(+)	ND
SNT16	T	EBV (+)ve	SC, IV, IP, IM	(-)	(-)
SNT13	T	EBV (+)ve	SC, IP	(-)	(-)
KHYG1	NK	EBV (-)ve	SC	(-)	ND
KAI3	NK	EBV (+)ve	SC, IV, IP	(-)	(-)
SNK6	NK	EBV (+)ve	SC	(+)	(+)

Correlation of EBV DNA Load and Tumor Volume



皮下腫瘍を形成したマウスを剖検したところ、肉眼的に所属リンパ節・脾臓・肝臓・腎臓などが腫大していた。組織から凍結切片を作成、EBER *in situ* hybridization 法を施行した結果、下図のごとく、EBER 陽性細胞を皮下腫瘍のみならず、リンパ節・脾臓・腎臓そして肝臓の一部に認めた。



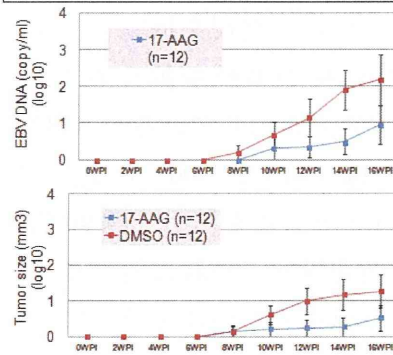
以上から、EBV 陽性 NK 細胞株である SNK6 の皮下接種により、NOG マウスに腫瘍が形成され、リンパ行性・血行性に諸臓器に転移することが示された。

2) Xenograft モデルによる HSP90 阻害剤の効果検討：

次に、このモデル系を用いて 17AAG の腫瘍抑制効果を検証した。皮下に SNK6 を接種し腫瘍形成を認めた時期から、17AAG を腹腔内投与したところ、対照群に比べ腫瘍の縮小を認めた。血液中の EBV-DNA 量も 17AAG 投与群の方が有意に少なかった。

更に、組織中の LMP1 発現量を比較した

Efficacy of 17-AAG *in vivo*



結果、17AAG 投与群では対照群に比べ有意に発現量が少なかった。

以上から、免疫不全マウスを用いた xenograft モデルにより、17AAG は EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍に対して増殖抑制効果を有することが示された。また、17AAG は生体内においても、LMP1 発現を抑制することが確かめられた。

D. 考察

今回我々は、NOG マウスを用い、EBV 陽性 NK 細胞性リンパ腫の xenograft モデルを確立した。EBV 陽性 T/NK 細胞株は原則として interleukin (IL)-2 依存性である。IL-2 は主に活性化 T 細胞から産生されるため、T 細胞を欠く免疫不全マウスではほとんど産生されない。またマウス IL-2 が産生されていたとしてもヒト細胞への効果は無いか、あったとしても極めて低いと考えられる。これまで EBV 陽性 T/NK リンパ腫に対する xenograft モデル系が確立できなかったのは、この IL-2 依存性にも起因していたと推測される。事実、IL-2 非依存性の B 細胞株は比較的容易に免疫不全マウスに生着する。同じく IL2 非依存性である EBV 陰性 T 細胞株 Jurkat も、NOG マウスに容易に生着した。本研究において、EBV 陽性 T/NK 細胞株のうち SNK6 のみが生着した理由は不明である。SNK6 は IL2 依存性であるが、IL-2 非存在化で培養を行ったところ、僅かながら増殖が

認められた。一方、生着しなかった他の細胞株は全く増殖が認められなかった。また、他の細胞株を皮下接種後、IL-2 を腹腔内投与すると、腫瘍の生着が認められた。以上の結果より、SNK6 は IL-2 に低依存性であるため、他の T/NK 細胞株に比べ NOG マウスに生着しやすいと推測される。また、SNK6 が IL-2 を自己産生している可能性もある。SNK6 が生着しやすいメカニズムを明らかにすることは、EBV 関連 T/NK 細胞性リンパ腫の発症病理の解明のみならず、これらリンパ腫の治療戦略の構築にもつながると考えられ、今後の重要な課題である。

この xenograft モデルを用い、HSP90 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫への治療効果を検証した。SNK6 を接種した NOG マウスに対して、HSP90 阻害剤である 17AAG を投与したところ、腫瘍形成は有意に抑制された。また、組織中の LMP1 発現量も同様に抑制されていた。元々、17AAG は、*in vitro*において、LMP1 発現を抑制する薬剤としてスクリーニングされたものであり、これらの結果は予測されていた。しかしながら、我々が独自に開発した NOG マウスによる EBV 陽性 T/NK 悪性リンパ腫モデルを用い、その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、HSP90 阻害剤の投与量・投与間隔など至適条件の決定、作用機序の詳細な解明のみならず、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く予定である。

E. 結論

NOG マウスを用い EBV 陽性 NK 細胞性腫瘍の xenograft モデルを確立した。このモデル系を使用し、HSP90 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫に対する *in vivo* における効果を検証した。本モデルは、EBV

陽性悪性リンパ腫の病態解析および新規薬剤のスクリーニング法として、更なる応用が期待される。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Kawada J, Iwata N, Kitagawa Y, Kimura H, Ito Y. Prospective monitoring of Epstein-Barr virus and other herpesviruses in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate and tocilizumab. *Mod Rheumatol* 22: 565-70, 2012
- 2) 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
- 3) 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* 119:673-686, 2012
- 4) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected $\gamma\delta$ T-cells. *J Invest Dermatol* 132:1401-1408, 2012
- 5) Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK-cell type chronic active Epstein-Barr virus (EBV) disease