

201220017B

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22-24年度 総合研究報告書

研究代表者 鶴見達也

平成25 (2013)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷り	27
-------------------------	----

I. 総合研究報告書

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）

総合研究報告書

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、さらに免疫不全マウスに EBV 陽性がんを移植し生着させ、個体レベルの評価系を確立することにより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た。平成22年度では(a)潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構 (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 について以下の結果を得た。

(a) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現調節機構：

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/EBPε 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。

(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。

平成 23 年度では、(a)潜伏感染 LMP 1 遺伝子発現調節機構 (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結果を得た。

(a) 潜伏感染 LMP 1 遺伝子発現調節機構：LMP1 を制御する因子として C/EBP を同定したので詳細に解析し、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。

(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)を同定したので詳しく解析した。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。

平成24年度（最終年度）においては、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/ $\gamma c^{-/-}$ (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。

平成22年度においては、(a)EBV の最も主要な癌遺伝子である LMP1 の発現に着目し、LMP1 遺伝子発現を制御する新規転写因子を同定することを目標とした。新規因子を同定できれば、新しい創薬ターゲットとしての可能性が出てくる。

(b) EBV の潜伏感染の維持、再活性化について詳細な解析を行い、EBV の感染様式を薬剤で人為的に操作することで細胞死を誘導する試みのための分子基盤を明

らかにすることを目標とした。

(c) 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した。

平成23年度においては EBV の最も主要な癌遺伝子である LMP1 遺伝子発現を制御する新規因子として C/EBP を同定したので、その分子機構について詳細に解析した。

(b)では、EBV 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)を同定したので詳しく解析した。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。

(c) 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ふ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。

最終年度においては (a) 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。(b) 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

(1) 潜伏感染 LMP1 遺伝子発現に関与する転写因子の同定：

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。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。

(2) 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(1)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。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。

(3) 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 BXL1 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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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)。

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)。

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) 潜伏感染LMP1遺伝子発現を制御

する新規転写因子の同定とその解析：

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 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。

(2) EBV 潜伏感染からの再活性化に関与する転写因子の同定とその解析：

上記(1)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。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わ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。

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。

(3) 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。

(4) 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 陽性かる 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。

(5) 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。

(6) 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られた。

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。

(7) 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

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。

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。

さらに我々は 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

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。

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。

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) 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* 54:516-522, 2010
 - 8) Calatini S, Sereti I, Scheinberg P, Kimura H, Childs R, Cohen JJ. 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* 116:4546-4559, 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* 119:2263-2273
 - 10) 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
- 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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*. 85:6127-6135. 2011
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 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* 92:2590-2595, 2011
 - 17) 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
 - 18) 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: 780-782, 2011
 - 19) 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
- 20) 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* 103:375-378, 2012
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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.
- 24) 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
- 25) Sato Y, Tsurumi T. Genome guardian p53 and viral infections. *Rev Med Virol*. 2012 Dec 17. [Epub ahead of print]
- 26) 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]
- 27) 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
- 28) 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: 565-570, 2012
- 29) 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
- 30) 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
2. 学会発表
- 1) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染 EB ウイルスエピソード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.
- 18) 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
- 19) 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.
- 20) 神田輝、村田貴之、高田賢藏、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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Sugimoto A, Nishiyama H, Tsurumi T. Anatomy of Epstein-Barr virus genome manufacturing plant. IUMS Internatinal Congress of Virology. Sapporo. 2011.9.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.

- 33) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K, Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y. *Ex vivo* model for Epstein-Barr virus primary infection using human tonsil tissue explants. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan. 2011. 9.
- 34) 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.
- 35) 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
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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. 2012.8 月.
- 45) 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.
- 46) Kanda T, Murata T, Tsurumi T.