

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

EBウイルスがコードするmiRNA定量による
EBウイルス関連疾患診断への応用研究

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授

研究要旨

EBウイルスがコードする特定の miRNA は、疾患のバイオマーカーになる可能性がある。慢性活動性 EB ウイルス感染症患者を対象として、血漿中の EB ウイルス特異的 miRNA を定量し、他疾患と比較した。対象は慢性活動性 EBV 感染症（CAEBV）18 例、伝染性単核症（IM）11 例、健常成人 10 例。血漿から miRNA を抽出し、EBV がコードする 12 種類の miRNA を定量した。CAEBV と IM の 2 群間で miRNA の発現量を比較したところ、IM 群では miR-BHRF1-1 と miR-BHRF1-2、CAEBV 群では BART2-5p と miR-BART5 の有意な発現量上昇を認めた。CAEBV 群を T 細胞型と NK 細胞型に分けて比較したが、miRNA の発現量に有意差を認めなかった。CAEBV 群、IM 群において、それぞれで特徴的に高発現している miRNA が存在することより、特定のウイルス miRNA 発現量が鑑別診断に役立つ可能性が示唆された。

A. 研究目的

microRNA(miRNA)は 18~25 塩基長でタンパク質をコードしない small RNA であり、分化、形態形成、細胞増殖など生物学的機能を制御している。miRNA は血漿をはじめとする体液中においても安定して存在する。EB ウイルスも少なくとも 44 個の miRNA をコードしており、感染組織で多くの miRNA を発現するが、感染組織や疾患別に発現様式/発現量が異なると考えられ、特定の miRNA が疾患のバイオマーカーになる可能性がある。EB ウイルスは多彩な疾患を引き起こし、血液検体中のウイルス DNA 定量は、EB ウイルス感染症の診断に非常に有用であるが、さらに、特定の疾患において血液検体から容易に測定できる疾患特異的マーカーがあれば、鑑別診断に応用できる。本研究では、慢性活動性 EB ウイルス感染症患者を対象として、血漿中の

EB ウイルス特異的 miRNA を定量し、他疾患と比較した。

B. 研究方法

慢性活動性 EB ウイルス感染症患者および対照者（伝染性単核症と健常者）より血液を採取。分離した血漿より miRNA を抽出し、逆転写反応により cDNA に転写後、TaqMan Micro RNA assay 法を用い、可能な限り多種類の EB ウイルス特異的 miRNA を定量した。

対象は慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）18 例（男：女=11：7）、伝染性単核症（IM）11 例（男：女=9：5）。対照として EB ウイルス既感染健常成人（Control）10 名（男：女=8：2）。CAEBV 患者のうち 10 例は T 細胞性、8 例は NK 細胞性であった。

採取した血漿 200μl から mirVana

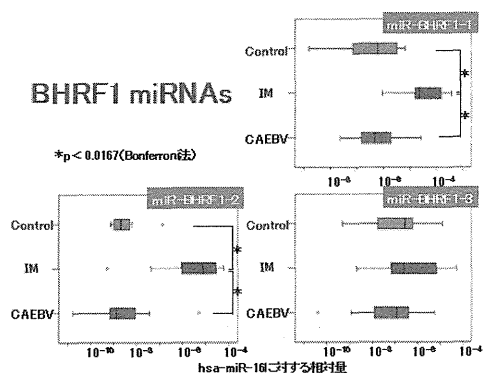
PARIS を用い miRNA を抽出。次いで EB ウイルスがコードする 12 種類の miRNA (miR-BHRF1-1,-2,-3,miR-BART1-5p, miR-BART2-5p,miR-BART4, miR-BART5,miR-BART7,miR-BART13, miR-BART15,miR-BART16,miR-BART22) を、TaqMan Reverse Transcription Kit と TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) により定量した。同一サンプル中の miR-16 (ヒトの miRNA) を基準として、相対量を算出した。3 群間の発現量の比較は Bonferroni 法を用いた。

(倫理面への配慮)

参加症例に対しては、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、患者および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ることとした。また本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認されている。

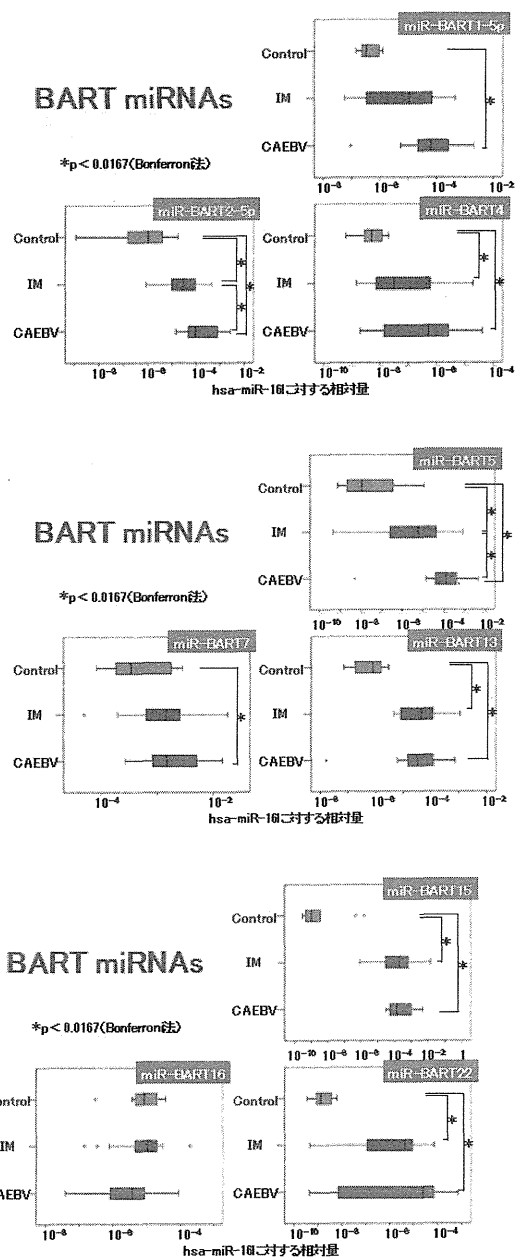
C. 研究結果

測定した miRNA の結果をクラスター別に示す。BHRF1 では IM 群において miR-BHRF1-1 と miR-BHRF1-2 が有意に高発現していた。



BART では、CAEBV 群において、miR-BART2-5p, miR-BART5 が有意に高発現

していた。



さらに、CAEBV 群を T 細胞型と NK 細胞型に分けて比較したが、12 種類の miRNA の発現量に有意差を認めなかった。

D. 考察

EB ウイルスは多数の miRNA をコードしており、血漿中に存在する特定の miRNA が疾患のバイオマーカーになる可能性がある。慢性活動性 EB ウイルス感染症患者に特異的に発現している miRNA が明らかになれば、本症の発症病理の解明の糸口になるばかりでなく、早期診断や重症化・予後

決定因子発として応用できる。

これまで、EB ウイルス関連癌(上咽頭癌、胃癌、びまん性大細胞型リンパ腫、NK/T細胞リンパ腫)の組織で miRNA を測定して、BART miRNAs は検出されたが BHRF1 miRNAs は検出されなかったとの報告がある。本研究においても、CAEBV 患者の血漿では同様に、BHRF1 miRNAs の発現量は低かった。

CAEBV 群、IM 群、それぞれの疾患において特徴的に高発現している miRNA が存在していたことから、これらの miRNA は疾患の何らかのバイオマーカーとなる可能性がある。一方、miR-BART5 は p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) を介してアポトーシスを抑制するとの報告がある。本研究で miR-BART5 の発現が CAEBV 群、IM 群、対象群の順に高かったことから、CAEBV において miR-BART5 が感染細胞のアポトーシスの抑制へ関与しているかもしれない。

E. 結論

CAEBV、IM、健常既感染者の血漿検体で EB ウイルスがコードする miRNA を相対定量することが可能であった。CAEBV 群、IM 群において、それぞれで特徴的に高発現している miRNA が存在した。これらの miRNA は疾患の何らかのバイオマーカーとなる可能性があり、病態との関連についても今後検討する必要がある

F. 研究発表

1. 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* 119:673-86, 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* 132:1401-8, 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 in adults: an underlying condition for EBV-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol* 65: 278-82, 2012
- 6) Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, Kojima S, Matsumoto K, Kinoshita T, Iwata S, Nishiyama Y, **Kimura H**. Application of flow cytometric *in situ* hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/NK lymphoproliferative diseases. *Cancer Sci* 103: 1481-8, 2012
- 7) Ito Y, **Kimura H**, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Sueoka E, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin Cancer Res* 18:

4183-4190, 2012

- 8) Ko Y-H, Kim H-J, Oh Y-H, Park G, Lee S-S, Huh J, Kim C-W, Kim I, Ng S-B, Tan S-Y, Chuang S-S, Nakamura N, Yoshino T, Nakamura S, Kimura H, Ohshima K. EBV-associated T and NK cell lymphoproliferative disorders: Consensus report of the 4th Asian Hematopathology Workshop. *J Hematopathol* 5:319-324, 2012
- 9) Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J, Yoshikawa T, **Kimura H**. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus -associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 60: 326-328, 2013
- 10) 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 in press*
- 11) Kawada J, Ito Y, Torii Y, **Kimura H**, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. *Rheumatol in press*
- 11) Isobe Y, Hamano Y, Yoshinori Ito Y, **Kimura H**, Tsukada N, Sugimoto K, Komatsu N. A monoclonal expansion of Epstein-Barr virus-infected natural killer cells after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Virol in press*

2. 学会発表

- 1) **Kimura H**. Chronic active Epstein-Barr

virus infection and related diseases in Japan. Asian Hematopathology Symposium, Soul, Jan 29, 2012

- 2) 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22日
- 3) 木村 宏. CAEBV 診療の問題点：今、求められている研究とは？ 第3回 CAEBV 患者交流会. 京都 2012年10月20日
- 4) 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21日
- 5) 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24日.
- 6) 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

研究課題：慢性活動性 EBV ウイルス感染症の発症機構解明と新規治療法開発に関する研究
課題番号：H24-難治等一般-046
分担課題：新規 CAEBV 治療薬の開発と評価
分担研究者：児玉 栄一（東北大学病院感染症科 助教）

研究要旨

慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) に対する効果的かつ安全な治療薬の開発を目指して、新たな核酸誘導体である S-FMAU の急性 EBV 感染に対する効果を判定した。S-FMAU は EBV 由来のリン酸化酵素 thymidine kinase (TK) によってリン酸化をうけたのち、宿主 DNA に取り込まれ、ガンシクロビルと同様に感染細胞を細胞死に導く。この S-FMAU の急性 EBV 感染に対する効果と新たな核酸誘導体のスクリーニングを行った。また TK の発現を増強させるためのプロモーター解析も開始した。

A. 研究目的

EBV 感染によって引き起こされる慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) は、慢性感染ののちに T リンパ球や NK 細胞由来の白血病・リンパ腫を引き起こすこともある予後不良の疾患である。現在のところ、CAEBV に対する特異的治療薬は開発されておらず、他の白血病に準じた治療が行われている。近年、骨髄移植も行われるようになり、予後は改善傾向にあるものの、未だ不十分である。EBV はヘルペスウイルスに属し、ウイルス由来の核酸リン酸化酵素を有する。この酵素のうち thymidine kinase (TK) は基質特異性が宿主のそれとは異なることが予想され、治療標的として DNA polymerase と同様、有望である。事実、単純ヘルペスウイルスや帯状疱疹ウイルスでは重要な治療標的となっており、臨床薬として acyclovir (ACV) が使われている。同様にサイトメガロウイルスでは ganciclovir (GCV) が使われている。GCV に関しては、TK 同様にウイルス由来のリン酸化酵素である phosphotransferase (protein kinase; PT または PK) によってリン酸化される。これらのリン酸化酵素によってリン酸化を受けた ACV や GCV がウイルスもしくはヒト DNA polymerase によって取り込まれ、chain termination を起こすことでウイルスの遺伝子合成を阻害、も

しくは感染細胞の排除に役だっている。

これまで GCV が EBV の PT によってリン酸化されることは報告されているが、その効果は限定的であり、補助療法に使われるにすぎない。一方、ACV 等はリン酸化を受けず、その効果を発揮することができない。これまでの核酸誘導体では効果は限定的であるが、EBV 特異的な核酸誘導体を同定できれば、EBV 特異的な治療につながることは議論の余地がない。そのため我々の研究グループは、EBV のリン酸化酵素、TK と PT を細胞に遺伝子導入し、リン酸化を経たのちに細胞毒性を示す核酸のスクリーニングを行った。また、東北大学は最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」に採択されており、東京大学創薬オープンイノベーションセンターに保存されている核酸に焦点を絞り、化合物サンプルの検討も行った。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス： KAI3 は IL-2 を添加した RPMI1640 培地を用いて培養した。骨肉腫細胞 143B は DMEM 培地を使用した。感染性 EBV は B95-8 細胞培養上清を用いた。急性感染モデルとして健常者の末梢 B リンパ球を使用した。

2) 抗ウイルス剤: S-FMAU はヤマサ醤油株式会社(銚子、千葉)で化学合成した。コントロールに用いた ACV、GCV は Sigma 社 (St. Louis, MO) から購入した。

3) 薬剤感受性試験: 薬剤感受性は健常者のリンパ球細胞を用いた。まず、健常者から採血を行い、CD19 抗体ビーズによって B 細胞を分離した。この B 細胞に薬剤存在下で EBV を接種し、その 14 日後に MTT 法による生細胞数及びに EBV 感染によっておこったトランスフォームの測定、細胞培養上清中に含まれる産生された EBV コピー数をリアルタイム PCR によって測定した。対する抗ウイルス活性として測定した。

4) EBV-TK の転写開始点の解析: EBV-TK のプロモーター解析を行うにあたり、まず初めに転写開始点の同定を試みた。B95-8 細胞から RNA を分離し、5'-RACE 法を応用したシークエンス解析を行った。

5) 東京大学創薬オープンイノベーションセンター保有化合物ライブラリーのスクリーニング: アッセイは EBV-TK もしくは EBV-PT を導入した 143B 細胞を用いてこれらのリン酸化酵素の働きでリン酸化を受けて細胞毒性を示す薬剤のスクリーニングを行った。検出は MTT 試薬を用いた吸光度法を用いた。

(倫理面への配慮)

創薬への応用を含めたシステム構築を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していない。健常者のリンパ球は、東北大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。遺伝子組換え実験は東北大学遺伝子組換えセンターの承認を得ている。

C. 研究結果

1) S-FMAU の効果

S-FMAU は表 1 に示したように EBV-TK の発現細胞において効果を示す。コントロールとして用いた ACV は全く効果を示さず、GCV が弱い効果を示すのみ

であった。過去の測定同様 GCV と比べ、強い活性があった。この効果を末梢リンパ球への急性感染もしくは細胞 transform 活性を検討した。MTT で細胞の transform 能を検討したところ、EBV-TK 発現細胞とほぼ同等の活性を示した (図 2)。ドナー間の差は少なく、どのようなドナーでも効果があると考えられた。

上清に放出される EBV コピー数をリアルタイム PCR で検討したところ、濃度依存的に効果を示した (図 2)。やや放出されるウイルス量の効果は低いように見えるが、動物 (マウス) で毒性を示さないレベルで、ウイルスコピー数を減らせることが明らかとなった。一方、どのドナーにおいても GCV は S-FMAU よりも効果が低かった。

2) 東大の化合物ライブラリーのスクリーニング

東京大学創薬オープンイノベーションセンター保有核酸誘導体化合物ライブラリーに登録されている化合物数 558 のうち EB ウイルス由来リン酸化酵素導入細胞において、化合物 50 μ M 存在下で生細胞率 70 % 以下の毒性を示すものは 61 種であった。しかしながらこれらは同時に行ったヒト由来リン酸化酵素導入細胞においても毒性を示し、今回のアッセイ系では有効なヒット薬剤の同定には至らなかった。コントロールの薬剤は毎回、効果を示した。このスクリーニングでは、GCV や S-FMAU を上回る活性を示す薬剤が見出されなかった。

3) 転写開始点は 5'-RACE で検討をしている。現在のところ翻訳開始点より割と短い範囲 150b 程度の上流が候補として挙げられている。今後、詳細に確定していく予定である。

D. 考察

末梢リンパ球への感染とその後起こる形質転換を阻害したことから、S-FMAU は白血になってしまった後だけでなく、前がん状態や慢性感染にも効果を示すと考えられ、白血病化やリンパ腫への進行を止められる可能性がある。それだけでなく、急性感染によって引き起こされる伝染性単核球症や肝炎、血球貪食症候群などにも幅広く使える可能性を示した。

化合物ライブラリーのスクリーニングでは 500 以上の化合物を検査したが、効果のあるものを見出すことができなかった。これまでも EBV に対する治療薬の開発は行われてきたが、GCV を越えるものが見出されていないこと、その他の抗ヘルペス剤がほとんど無効であることから、EBV のリン酸化酵素の基質特異性は非常に高く、薬の開発は難しいことが考えられる。今後も他施設からの核酸誘導体の検査依頼があり、今後もスクリーニングを継続する。

TK の遺伝子解析について、I 型潜伏感染では TK が発現していないため、S-FMAU の効果を発揮することができない。この理由を解析するために、TK が発現している B95-8 細胞における TK プロモーター領域の解析を進めている。まずはプロモーター領域を決定するために転写開始点を解析中である。これらの情報からプロモーター領域を決定し、他の I 型潜伏感染細胞においてプロモーター領域の変異の有無やメチル化の影響を検討していく。これらを通して、I 型潜伏感染細胞における TK の発現抑制機序を解明し、その機序から発現を促すことができれば、S-FMAU の効果発現に大きく寄与する。つまりは S-FMAU の効果拡大ができ、患者の予後改善に大いに役立つものと考えられる。

E. 結論

本年は CAEBV に対する治療法の確立を考え、S-FMAU が急性感染などにも治療効果の拡大できること、新たな薬剤のスクリーニングを行い、これまでに 500 強の薬剤をスクリーニングしたが有用なヒットは得られていないこと、TK の遺伝子解析を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanyaradzwa P. Ndongwe, Adeyemi O. Adedeji, Eleftherios Michailidis, Yee Tsuey Ong, Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Emily M. Ryan, Devendra K. Rai, Karen A. Kirby, Angela S. Whatley, Donald H. Burke,

Marc Johnson, Shilei Ding, Yi-Min Zheng, Shan-Lu Liu, Ei-Ichi Kodama, Krista A. Delviks-Frankenberry, Vinay K. Pathak, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. Biochemical, inhibition, and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Research* 40:345-359, 2012

2) Ryo Masuda, Shinya Oishi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Akira Hirasawa, Gozoh Tsujimoto, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives. *Future Medicinal Chemistry* 4:837-844, 2012

3) Xiaoguang Li, Hua Qian, Fusako Miyamoto, Takeshi Naito, Kumi Kawaji, Kazumi Kajiwara, Toshio Hattori, Masao Matsuoka, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Eiichi N. Kodama. A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424:257-261 2012

4) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Xiongying Tu, Krzysztof Palczewski, Yee Tsuey Ong, Daniel T. Griffin, Matthew M. Schuckmann, Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Eiichi N. Kodama and Stefan G. Sarafianos. HIV-1 reverse transcriptase (RT) polymorphism 172K, suppresses the effect of clinically relevant drug resistance mutations to both nucleoside and nonnucleoside RT inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 287:29988-29999, 2012

5) Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of n348i, a connection subdomain

drug resistant hiv-1 reverse transcriptase mutant. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 58:187-195, 2012

6) Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan G. Sarafianos, and Eiichi N. Kodama.

Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* in press 2013.

7) Fusako Miyamoto and Eiichi N. Kodama.. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*, in press 2013

8) 児玉栄一、宮本総子 新しい抗ウイルス剤開発の考え方 臨床と微生物 40:51-55, 2013

2. 学会発表

1) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Eiichi N Kodama, Michael A Parniak, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, Stefan G Sarafianos. The Combination of 4'-Ethyne-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine with Rilpivirine Shows Synergistic Anti-HIV-1 Activity In Vitro. The 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo Apr16-19,2012

2) Eleftherios Michailidis, Jordan Wilkins, Emily M. Ryan, Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos. Effect of 4'- and 2-NRTI Substitutions on the Inhibition Mechanism of HIV Reverse Transcriptase and Toxicity. 25th International Conference on Antiviral Research.Ssapporo Apr16-19, 2012.

3) Fusako Miyamoto, Kumi Kawaji, Toshio Hattori, Hiroaki Mitsuya, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama. Sustained Activity of 4'-Ethyne Nucleosides to Variants

with M184V Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase. 25th International Conference on Antiviral Research.Sapporo. Apr16-19,2012

4) Masahiro Watanabe, Koichi Hashimoto, Yusaku Abe, Eiichi Kodama, Ryota Nabika, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Mitsuaki Hosoya. A novel peptide derived from measles virus fusion protein inhibits the replication of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus in vitro and in vivo. 25th International Conference on Antiviral Research.Sapporo, Apr16-19, 2012.

5) Eiichi Kodama. Recent development of anti HIV-1 agents and their resistance. Center for AIDS Research Seminar.Kumamoto, May21, 2012.

6) Eiichi Kodama. 抗 HIV 薬・抗ウイルス薬の基礎開発について. ヴィーブヘルスケアセミナー.東京 May28,2012

7) 服部俊夫、鈴木定彦、山岡昇司、井戸栄治、一瀬休生、仲宗根正、久保亨、白澤基紀、垣本和弘、福本学、児玉栄一. サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築の試み. 第 27 回日本国際保健医療学会学術大会. Okayama, Nov3-4, 2012.

8) 宮本総子、満屋裕明、児玉栄一. EFdA および EdDAP に対する耐性変異が耐性度と複製能力に及ぼす影響. 第 26 回日本エイズ学会学術集会.Yokohama, Nov3-4, 2012.

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし

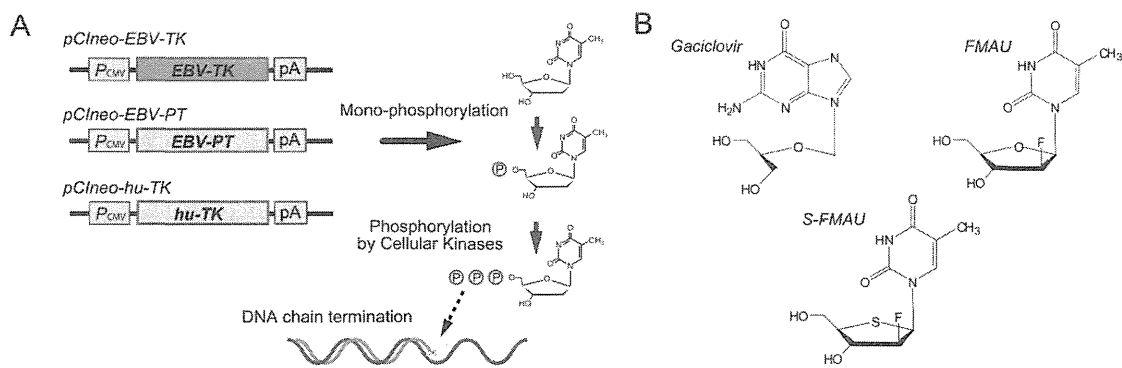


図1 EBV 感染細胞を排除する新規薬剤のスクリーニング法の概略(A)と効果がみられた薬剤(B) スクリーニング法(A)としては、ヒト thymidine kinase (TK)が欠損した骨肉腫細胞である 143B を用いて、EBV 由来のリン酸化酵素である TK と phosphotransferase (PT)を CMV プロモーター下に組み込み強制発現細胞を樹立した。樹立された細胞を用いて核酸誘導体を添加し、5 日目の生細胞数を MTT 色素法によって検討した。ヒト TK 導入細胞と比較し、生細胞数が減少したものを効果があると判定した。本研究で主に用いた核酸誘導体であるガンシクロビルと S-FMAU を示す。S-FMAU は以前抗ヘルペス剤として同定された FMAU の誘導体である。FMAU 自体には抗 EBV 効果は認められなかった。

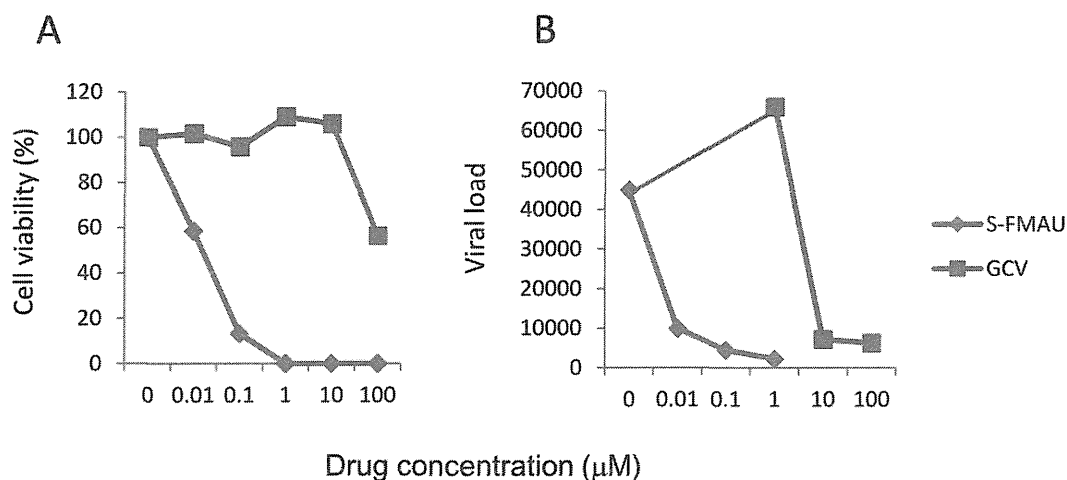


図2 EBV 感染 B 細胞の細胞毒性と上清の EBV-viral load

健康人から B 細胞を分離し、B95-8 細胞の上清に含まれる EBV を感染させた。薬剤存在下・非存在下での細胞増殖能と上清に含まれる EBV viral load をリアルタイム PCR で検討した。

表1 S-FMAU と既存の核酸誘導体の効果

Table 1

Compound	IC ₅₀ * (μM) of 143B transduced with		
	EBV-TK	EBV-PT	huTK
3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT)	>100	> 100	> 100
5-Fluoro-2'-deoxyuridine(5FdU)	0.40 ±0.08 [†]	ND	0.27 ±0.03
Bromovinyl-araU (BVaraU)	> 200	>200	> 200
Bromovinyl-dU (BVdU)	122 ± 68	> 100	> 100
Ganciclovir (GCV)	> 100	61 ± 16	> 100
Acyclovir (ACV)	> 100	>100	> 100
5-Methyl-FaraU (FMAU)	> 100	>100	> 100
4'-Sulfo-FMAU (S-FMAU)	0.11±0.053	>300	> 300
SFMAcytidine (S-FMAC)	1.9± 0.6	2.5± 1.5	3.5± 0.4
SFMAadenosine (S-FMAA)	21± 12	ND [‡]	32±2.7
2F-SFMAadenosine (FS-FMAA)	4.2±0.17	ND	31±0.5
SFMAguanosine (S-FMAG)	1.4±0.9	ND	3.4±0.3

薬剤添加後 5 日間培養後、細胞毒性は MTT 色素法を用いて検討した。.*50%細胞毒性として示す。†データは平均値± 標準偏差で表した。‡検討していない。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

EBV 感染 T/NK 細胞の維持と増殖における EBV miRNA の役割について

分担研究者：清水 則夫

（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）は、EBV 感染 T/NK 細胞を体内から免疫学的に排除することができず、末梢血中に持続的に検出され続けるのが特徴である。EBV には 40 以上の miRNA がコードされているが、EBV 感染 T/NK 細胞の維持にどのように関与しているのかについては明らかになっていない。我々は、EBV 感染 T/NK 細胞株に発現する BART miRNA の解析を行い、BART9 が非常に高いレベルで発現していることを見出した。BART9 の発現を抑制すると細胞株の増殖および LMP-1 の発現が阻害され、BART9 miRNA を過剰発現させると LMP-1 の発現も増強した。これらの結果は、BART9 が EBV 陽性 T/NK 細胞株の増殖を LMP-1 発現の調節により制御していることを示唆している。したがって、CAEBV の原因細胞である EBV 感染 T/NK 細胞が患者体内で維持・増殖には、EBV-miRNA-BART9 を介した LMP1 の発現調節が重要な働きをしている可能性がある。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）は予後不良の疾患であり、適切に治療しないと患者のほとんどは数年から十数年の経過で死亡する。抗ヘルペスウイルス剤（アシクロビルやガンシクロビル）や抗ガン剤による治療が行われているが、これらの薬剤治療では根治は望めず、長い経過を経て症状が徐々に悪化し、臓器不全、血球貪食症候群やリンパ腫の発症により死に至るケースが多い。現在までに唯一治療効果が確認されている治療法は造血幹細胞移植であるが、移植関連死亡が多いため他の安全な治療法が模索されている。これまでの研究から、EBV 感染 T/NK 細胞を免疫学的に排除できないことが

CAEBV の原因と考えられているが、EBV 感染 T/NK 細胞の成立や体内での維持に関する分子機構は必ずしも明らかになっていない。EBV には多くの miRNA をコードされているが、その多くは BamHIA 断片から転写されるため BARTs と呼ばれている。BARTs には非常に多くの miRNA がコードされており、BHRF1 由来のものを含めると少なくとも 40 種類の EBV-miRNA が同定されているが、それらの EBV 感染細胞中での機能や病態との関連に関する理解は進んでいない。これまでの研究により、EBV-miRNA の一部は潜伏感染状態の維持に関与していると考えられており、EBV 感染 T/NK 細胞の成立や体内での維持にも重要

な働きをしていると考えられる。

我々は、EBV 感染 T/NK 細胞の維持・増殖に対する EBV-miRNA の役割を明らかにするため、我々が樹立した EBV 感染 T/NK 細胞に発現する miRNA をマイクロアレイと定量 PCR 法により解析し、細胞増殖や EBV 関連タンパク質の発現に与える影響を検討した。

B : 研究方法

1. 細胞株 : 我々が樹立した EBV 感染 T/NK 細胞株 SNK6, 10 (NK 細胞株), SNT8, 15 (γ δ T 細胞株), 16 (α β 細胞株) を使用した。培地は Artemis2 (日本テクノサービス) を用い、37°C、5%炭酸ガス存在下で培養した。
2. miRNA マイクロアレイ解析 : 各種細胞株から Total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ (LC Sciences) で解析した。
3. アンチセンスオリゴの導入と解析 : EBV BART miRNA に対するアンチセンスオリゴ (Exiqon) を Oligofectamine により細胞株にトランスフェクトした。(Anti-EBV-miR-BAT9 の配列は 5' -ACTACGGGACCCATGAAGTGTTA-3'、Scramble Negative Control の配列は、5' -GTGTAACACGTCTATACGCCCA-3')
4. RT-realtime PCR による EBV-mRNA の定量 : EBV 感染細胞から Total RNA を抽出し、LMP1 の発現を定量した(コントロールは α -tublin)。プライマー配列は、LPM1
F: 5' AGCCCTCCTGTCTCTATTCCTT-3'
R: 5' -ACCAAGTCGCCAGAGAATCTCCAA-3'
 α -tublin
F: 5' -CCTGACCACCCACACCACAC-3'
R: 5' -TCTGACTGATGAGCGGTTGAG-3'
5. 細胞増殖の検討 : 96well plate に

5×10^5 cells in 100μ l/well の割合で播種し、100 pmol の anti-EBV-miRNA あるいはコントロールオリゴをトランスフェクトした。1 晩培養後に細胞を 24 well plate に移し、その後 24 時間毎に細胞数と生存率をカウントした。

6. Immunoblot 解析 : 細胞を EBCD buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5mM dithiothreitol) により溶解し、各種単クローン抗体 (LMP1 (S12), EBNA-LP (JF186), EBNA3C (A10), EBNA2 (R3), EBNA1 (1EB12), BZLF1, β -Actin, α -tublin) により EBV 関連タンパク質を反応させ、HRP ラベル 2 次抗体を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要と考えられる研究は行わなかった。

C : 結果

1. 細胞株に発現する EBV 関連タンパク質の解析 : 単クローン抗体を使用した Immunoblotting 法により解析した結果、実験に使用した EBV 感染 T/NK 細胞株 (SNK6, 10, SNT8, 15, 16) はすべて、EBNA1 陽性、LMP1 陽性、他の EBV 関連タンパク質の発現は陰性のいわゆる 2 型の EBV 潜伏感染細胞であることが確認された。
2. miRNA マイクロアレイプロファイリング : 代表的な 2 種類の細胞株 (SNK6 と SNT16) について miRNA マイクロアレイプロファイリングを行った。その結果、20 個の EBV-miRNA が 2 つの細胞ともに高値を示した (cut-off value 500)。RT-PCR 法により発現量を定量したところ 20 種のうち特に発現量が高いものは、BART17-5p, BART7, BART1-3p,

BART9, BART10 だった (図 1 : SNK6 と SNT16 におけるマイクロアレイで発現が確認された EBVmiRNA の発現量の定量解析結果。5 種類の EBVmiRNA が 2 つの細胞株ともに特に多量に発現していることが分かる)。

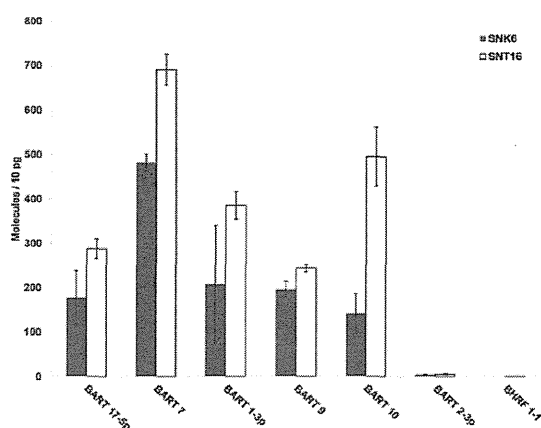


図 1

3. アンチセンスオリゴによる EBVmiRNA の抑制と細胞増殖への効果: miRNA のマイクロアレイ解析の結果を基に高発現の 5 種類の EBVmiRNA を選択し、アンチセンスオリゴのトランスフェクトによる影響を調べた。その結果、anti-EBV-miRNA-BART9, anti-EBV-miRNA -BART7, anti-EBV-miRNA -BART17-5p が SNK6 の増殖を有意に抑制 (19 ~ 29%) したが、その 3 種類のうち anti-EBV-miRNA -BART9 のみが SNT16 の増殖も有意に抑制 (~34%) した。これらの結果は、特に EBV-miRNA-BART9 が細胞増殖に関与していることを示している。

4. EBVmiRNA-BART9 の発現抑制による LMP1 の発現抑制: EBV にコードされる LMP1 は、細胞のシグナル伝達に関与し、細胞増殖に影響を与えていることが知られている。そこで、Immunoblot 解析により EBV BART miRNA の発現と LMP1 の発現との相関を解析した。その結果、anti-EBV-miRNA-BART9 による BART9 の発現抑制により LMP1 の発現が 50%程度抑制することを見出した。BART9 の抑制による

LMP1mRNA の発現は半分程度に抑制されており、BART9 miRNA は LMP1 の mRNA の蓄積を増強することにより LMP1 の発現増強に働いていることを示唆している (図 2 : SNK6 に anti-EBV-miRNA-BART9 (右側) あるいはコントロールオリゴ (左側) をトランスフェクトした際の LMP1mRNA 量の変動。anti-EBV-miRNA-BART9 をトランスフェクトすると LMP1mRNA の発現量が半分程度に低下することが示された)

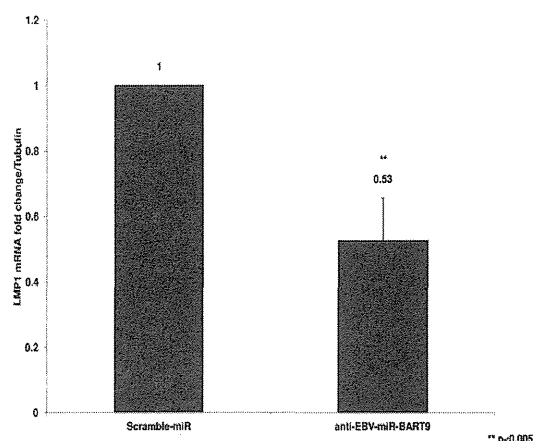


図 2

D: 考察

1. EBVmiRNA は様々な EBV 株で保存されており、ウイルスの生存に重要な働きをしていると考えられている。その発現状況は EBV 感染細胞の種類により大きく変動することが知られているが、これまでの研究では EBV 感染 B 細胞や上皮細胞における解析が主になされており、EBV 感染 T/NK 細胞での EBVmiRNA の発現状況に関する知見は乏しかった。本研究により、EBV 感染 T/NK 細胞には約 20 種類の EBVmiRNA が発現し、そのなかでも BART17-5p, BART7, BART1-3p, BART9, BART10 の 5 種類が大量に発現していることが示された。5 種類の中でも BART9 の発現レベルが LMP1 (EBV 潜伏感染細胞の発現し、感染細胞の腫瘍化に密接に関与することが

知られている)の発現と直接的な関連があり、細胞増殖にも関連していることが示され、EBV陽性T/NK細胞が患者体内で維持・増殖する際にEBVmiRNAの発現がLMP1の発現制御を通じて寄与していることが示唆された。

2. 他の2型のEBV潜伏感染細胞として知られている上咽頭癌やホジキン病の細胞におけるEBVmiRNAの発現パターン解析が行われているが、EBV感染T/NK細胞との発現状況は大きく異なっている。したがって、同じEBV潜伏感染遺伝子発現タイプに分類される細胞間でも、その細胞種の増殖に関連したEBVmiRNAが選択的に発現している可能性があり、今後さらに詳しく解析する必要があると考えられる。

3. SNK6では、BART9の発現抑制がLMP1mRNAおよびLMP1タンパク質の発現抑制を誘導することが示された。この結果は、EBV感染T/NK細胞ではBART9がLMP1mRNA発現を制御している可能性を示唆している。BART9はLMP1の発現をLMP1発現のリプレッサーの発現抑制を通じてアップレギュレートしている可能性が考えられるが、他方、BART9がLMP1mRNAの安定性に関与し、その半減期を伸ばしている可能性も考えられる。今後LMP1mRNAの安定性及ばす影響を検討する必要がある。

4. LMP1の発現レベルが恒常的に高いと細胞増殖がむしろ阻害され、しかも細胞障害性T細胞の標的となりやすい事が報告されている。しかし、特定の条件ではLMP1の発現上昇がEBV感染細胞の維持・増殖に有利に働くことが示されており、BART9によるLMP1発現の制御がEBV感染T/NK細胞の維持・増殖およびCAEBVの病態と密接に関連している可能性がある。今後その点を念頭に研究を継続する計画である。

E: 結 論

EBVには40以上のmiRNAがコードされているが、EBV感染T/NK細胞の維持にどのように関与しているのかについては明らかになっていない。我々は、EBV感染T/NK細胞株に発現するBART miRNAの解析を行い、BART9が非常に高いレベルで発現していることを見出した。BART9の発現を抑制すると細胞株の増殖およびLMP-1の発現が阻害され、BART9 miRNAを過剰発現させるとLMP-1の発現も増強した。これらの結果は、BART9がEBV陽性T/NK細胞株の増殖をLMP-1発現の調節により制御していることを示唆している。したがって、CAEBVの原因細胞であるEBV感染T/NK細胞が患者体内で維持・増殖には、EBV-miRNA-BART9を介したLMP1の発現調節が重要な働きをしている可能性がある。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

論文発表

1. Ogawa M, Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Nakagawa I, Mochizuki M. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol*. 56(6):529-535, 2012.
2. Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 12;53(8):4692-8. 2012.
3. Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, **Shimizu N**, Mochizuki M. Novel diagnosis of fungal

endophthalmitis by broad-range real-time PCR
detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes
Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883,
2012.

学会発表

1. 吉山 裕規、高田 賢蔵、南保 明日香、
清水 則夫 EBV遺伝子BNLF2aと
BNLF2 b は溶解感染初期と潜伏期に発現
し、腫瘍化に関与する 第60回日本ウイ
ルス学会学術集会 2012年11月15日 大
阪市
2. 清水則夫 網羅的ウイルス検査法の
開発と臨床ウイルス学的検査への応用
第30回日本染色体遺伝子検査学会学術集
会 2012年11月10日 東京都
3. 清水則夫 移植医療・細胞治療におけ
るウイルス検査系の開発 輸血学会関東
甲信越支部会 2012年9月29日 東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「慢性活動性EBウイルス感染症の遺伝的素因に関する研究」

研究分担者 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 森尾友宏

研究要旨

慢性活動性EBV感染症(Chronic active EB virus infection: CAEBV)は血液中および組織のEBV-DNA量の増加とT細胞あるいはNK細胞への感染を特徴とする予後不良の疾患であるが、その原因については未だ明らかになっていない。ヘルペス属感染症に脆弱性を示す単一遺伝子異常症の存在からは、CAEBVにおいても背景となる遺伝子異常が存在する可能性がある。本研究では、CAEBVの分子基盤を明らかにするために、その責任遺伝子探索を行い、候補遺伝子の策定を行った。

A. 研究目的

CAEBVは、持続あるいは再発する伝染性単核症様症状と、末梢血および病変組織におけるEBVDNA量の増加を特徴とする予後不良の疾患である。T細胞やNK細胞へのEBVの持続感染が特徴であるが、その免疫学的解析はサイトカイン測定などにとどまり未だに限定的である。CAEBVの免疫機能解析基盤を確立すること、その遺伝的背景を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) CAEBVの免疫学的特性に関する研究

CAEBVの免疫学的特性を明らかにするために、主にCAEBVを合併する、あるいは持続的にEBVDNA量高値をとる、先天性免疫不全症を中心に検討を行った。具体的には10 parameter flow cytometryにてB, T, NK, DC亜群を解析した。またBZLF1, EBNA1, LMP2特異的T細胞を、それぞれの領域をカバーするペプチドで末梢血単核球を刺激し、細胞内IFN-gamma産生で検出する方法の確立と、それぞれの特異的T細胞をさらに増幅する検討を行った。

2) CAEBV患者の責任遺伝子探索

上記患者の末梢血単核球よりDNAを抽出して、全エクソン解析を行った。また明らかな免疫不全症を合併しないCAEBV患者(造血細胞移植後患者)から唾液を採取してDNA抽出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体(末梢血及び唾液)を用いて解析を行った。今回の解析においては遺伝子解析が含まれており、各種指針を遵守し、個人情報

管理に十分配慮した研究を実施した。本研究に関しては、医学部遺伝子解析に関わる倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) CAEBV患者における免疫学的特性の解析

CAEBVを合併する免疫不全症患者では以下のsubsetについてその比率と絶対数を算定した。

B細胞: transitional B (T1, T2, T3), naïve B (CD27-IgM-IgD-CD19+), memory B (IgM+, IgG+, IgA+ memory), plasmablast, plasma cells

T細胞: naïve T, central memory T, effector T, regulatory T (CD25+CD127-CD4+), NKT (Vb11+Va24+CD3+), Th1, Th2, Th17, follicular helper T

NK細胞、DC subset (pDC, mDC, activated mDC)

加えてB, T細胞新生能をsj/cjKRECs (kappa deleting recombination excision circles), TRECs(T-cell receptor excision circles)手法を用いて検討した。

またBZLF1, EBNA1, LMP2特異的T細胞を計測し、IL-4/IL-7の存在下で最大限の効率で増幅する技術を確立した。

解析の結果CAEBVを合併する免疫不全症患者においてのB, T細胞, NK, DCサブセットやKRECs, TRECs値は様々であるが、一部NKT細胞が減少するものや、KRECs/TRECs低値で複合型免疫不全症のパターンを呈する症例があることが明らかになった。

2) 遺伝的背景の研究

昨年度の検討において2名のCAEBV合併分類不能型免疫不全症患者では染色体の安定性

維持やDNA修復に関与する遺伝子の homozygous mutationが同定された。本変異は両親にhetero alleleに同定された。DNA損傷刺激後のfoci形成にも異常を認めている。既に造血細胞移植が行われているが、既知遺伝子の稀な表現型を呈する疾患として、CAEBVの分子基盤としてさらに検討を加えている。

この症例に加えて分類不能型免疫不全症30例程度で全エクソン解析を実施した。現在 compound heterozygoteあるいはhomozygoteを呈する遺伝子異常を継続してピックアップしているところである。

D. 考察

本年も免疫不全症を背景としたCAEBV患者に絞って解析を継続し、背景となっている遺伝子異常についてはその機能解析から、意味のある遺伝子異常であることを明らかにした。今後このようなDNA修復異常と慢性EBV感染症が一般化される問題かどうかの検証が必要である。

さらに全エクソン解析を継続しているが、両親あるいは同胞の検体を加える形での解析により、errorの排除や原因遺伝子の絞り込みに有用であろうと考えている。現在は患者及び両親においての唾液検体を採取中であり、代表者が中心となり実施する全エクソン解析により、候補遺伝子が絞り込まれることが期待できる。今後の解析により、CAEBVの根本原因を明らかにし、さらには予防法、根治的治療法の開発に繋がることを期待できる。

E. 結論

免疫不全症をバックグラウンドとして発症したCAEBVの免疫能解析および責任遺伝子探索を行った。その中の1例では遺伝子異常を明らかにした。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表(原班と同じとしてください)

1. 学術雑誌での発表 (英文論文)
1. Isoda T, Mitsui N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwar M, Araki S, Nagasawa M, **Morio T**, Takagi M, Mizutani S. Irreversible Leukoencephalopathy After Reduced-intensity Stem Cell Transplantation in a Dyskeratosis Congenita Patient With TINF2 Mutation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012 Dec 13. [Epub ahead of print]

2. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, **Morio T**, Imai K, Mitsui N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2012 Dec 12. doi: 10.1111/ejh.12057. [Epub ahead of print]
3. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, **Morio T**, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Oct 26. doi:pii: S0091-6749(12)01455-8. 10.1016/j.jaci.2012.08.040. [Epub ahead of print]
4. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, **Morio T**, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Sep 28. doi: 10.1002/pbc.24359. [Epub ahead of print].
5. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nishii R, Masaki S, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, **Morio T**, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood*. 120:789-799, 2012.
6. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, **Morio T**, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T. Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clinical Endocrinol*. 77:628-634, 2012.
7. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol*. 13: 369-378, 2012.
8. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, **Morio T**, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E. Extensive gene deletions in Japanese patients

with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. **119**:2376-84, 2012.

9. Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, **Morio T**. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASP. *Int. J. Hematol.* **95**:299-310, 2012.

(著書・総説)

1. 森尾友宏:(分担執筆)第21章 先天性免疫不全症 Wiskott-Aldrich 症候群、最新ガイドライン準拠 小児科診断・治療指針、遠藤文夫編、p840、中谷書店、東京、2012年9月
2. 森尾友宏:(分担執筆)第19章 リウマチ性疾患 アレルギー性疾患 先天性補体欠損症 免疫不全症、赤林朗、大内尉義、黒川峰夫、小池和彦、辻省次、長瀬隆英、藤田敏郎、森屋恭爾、山本一彦編、門脇孝、永井良三編、カラー版内科学、p1333、西村書店、東京、2012年7月
3. 森尾友宏:先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント 血液内科 65(4) 599-607,2012.
4. 森尾友宏:[クローズアップ感染症] <感染性疾患の基礎的な知見の進歩・概念の変化> 感染症と自然免疫 小児内科 44(7)959-965, 2012.
5. 森尾友宏:[サイトカインのすべて(完全改訂版)] サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症 臨床免疫・アレルギー科 57:Suppl.21 838-844, 2012.
6. 森尾友宏:原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T細胞系免疫異常症における遺伝子診療 日本遺伝カウンセリング 33(1) 49-53, 2012.
7. 森尾友宏:分類不能型免疫不全症 日本臨床 70:2011-2021, 2012.
8. 森尾友宏:分類不能型免疫不全症 Update

日本臨床免疫学会雑誌 35:14-22, 2012.

2. 学会発表

1. **Morio T**. Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. **2012 KSMCB Annual Meeting**. Seoul, Korea. October 2012.
 2. Isoda T, Takagi M, **Morio T**, Kawamoto H, Mizutani S. Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency. **15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012)**. Florence, Italy. October 2012.
 3. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, **Morio T**, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). **15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012)**. Florence, Italy. October 2012.
 4. 森尾友宏 :Multivirus specific cytotoxic T-cells for post-transplant virus infection.、第54回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム)、横浜、2012年11月30日-12月2日
 5. 森尾友宏:細胞内寄生菌にたいする感染防御機構、第44回日本小児感染症学会総会・学術集会(教育セミナー)、北九州、2012年11月23日
 6. 森尾友宏:先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋、第36回日本小児皮膚科学会学術大会(シンポジウム)、前橋市、2012年7月15日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

CAEBV 原因遺伝子の同定を目的とする全エクソン配列解析

研究分担者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) の原因は不明であるが、EBV の特定の蛋白質に対する T 細胞応答が欠損する患者が存在すること、分類不能型免疫不全症患者の一部が CAEBV と区別できない病態を示すことなどから、微細な免疫不全が原因となり EBV 感染 T 及び NK 細胞を除去できない状態にあることが疑われる。本研究はこのような微細な免疫不全の原因遺伝子を全エクソン配列決定により同定することを目的とする。今年度は患者 6 名およびその父母 7 名、合計 13 名の唾液から唾液を採取した。このうち患者 3 名およびその父母 3 名、合計 6 名の DNA について全エクソン領域のライブラリーを作成しその配列を決定した。現在、バイオインフォマティクス解析により原因遺伝子の同定を試みている。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) は遷延する伝染性単核症様症状と末梢血における EBV DNA 量の上昇を認める疾患であり、EBV 感染 T あるいは NK 細胞の増殖を特徴とする。発症機構不明、予後不良の疾患であり、現時点では造血幹細胞移植以外に根治療法がない。患者末梢血で増加している EBV 感染 T あるいは NK 細胞は異形性を欠き慢性の臨床経過を示すため、腫瘍性疾患とは区別されるべきと考えられる。明らかな免疫不全を有する場合、現在の診断指針では CAEBV から除外されるが、詳細な免疫学的検討を行うと、EBV の特定蛋白質に対する細胞傷害性 T 細胞を欠損する患者が存在し、サイトメガロウイルスに対する免疫応答も低下していることから、微細な免疫不全の存在が疑われる。さらに、分類不能型免疫不全症 (common

variable immunodeficiency (CVID)) の患者から CAEBV と区別できない症候を示す患者が複数見いだされたことから、CVID とは無関係に発症する CAEBV においても、遺伝的素因にもとづく微細な免疫不全が存在し、そのため EBV 感染 T および NK 細胞を除去できない状態にあることが疑われた。CAEBV のように患者数が少ない疾患の原因遺伝子を探索するには、近年開発された次世代シーケンサーを利用した全エクソン配列解析が適すると考えられる。そこで、de novo 変異による発症の可能性も踏まえ、患者および両親の DNA を採取し全エクソン配列解析による CAEBV 原因遺伝子の探索を開始した。

B. 研究方法

1. CAEBV 患者

大阪府立母子保健総合医療センターおよび九州大学医学部小児科において診断

された CAEBV 患者 6 名とその父母の合計 13 名を対象とした (表 1)。CAEBV の診断は EB ウイルス感染症研究会が策定した診断指針によった。EBV が感染している細胞のタイプにより CAEBV は CD4、CD8、NK、 $\gamma\delta$ T の 4 タイプに分けられる。それぞれのタイプ或いは患者ごとに臨床所見が少しずつ異なっているため、複数の原因遺伝子が関わっている可能性 (genetic heterogeneity) も否定できない。そのため今回は若年発症の NK タイプの患者を選択して対象とした。

2. DNA 採取

CAEBV においては EBV 感染 T あるいは NK 細胞がモノクローナルあるいはオリゴクローナルに増殖しており、末梢血中にはこのような感染細胞が多数含まれている。これらの細胞は多数回の分裂を経てきているためすでに体細胞変異を蓄積している可能性が高い。体細胞変異の存在は発症の根本的原因となる germ line あるいは de novo 変異の検出を困難にさせると考えられたため、本研究では唾液から抽出した DNA を解析に用いた。唾液からの DNA 採取には Oragene DNA 採取キットを用いた。また、継続的な DNA 使用を可能とするため末梢血から EBV によるリンパ芽球様細胞株を樹立した。

3. 全エクソン配列解析

全エクソン領域のライブラリー作成には Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 キットを用いた。エクソン部分の配列解析は illumina 社 HiSeq 1000 を用いた。得られた配列データをアラインメントプログラム BWA によりヒトゲノム配列 hg18 上に位置づけ、Genome analysis toolkit (GATK) などにより 1000 ゲノムプロジェクト、dbSNP、HapMap などのデータと照

合し、変異を検出する作業を行っている。検出される変異については、SIFT や Seattle Seq 等のプログラムによりその変異が蛋白質機能に与える影響を推定する。

(倫理面への配慮)

全エクソン配列解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行われた。研究計画書は国立成育医療研究センターおよび DNA 採取機関の倫理委員会による審査を受け承認されている。患者は主に小児であるため、保護者に対して本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得した。試料、DNA 配列データおよび臨床情報は匿名化され、患者の個人情報には厳重に管理された。血液の提供を受ける場合は、通常の診療に必要なとされる採血の際に余分に血液を採取することにより苦痛の軽減を図った。

C. 研究結果

平成 25 年 2 月 7 日の段階で、6 名の CAEBV 患者と父母計 7 名、合計 13 名からインフォームドコンセントを取得し、唾液から DNA を抽出した。また一部の対象者の末梢血より単核細胞を分離し EBV を感染させてリンパ芽球様細胞株を樹立した。6 名の患者に関するデータを表 1 に示す。まず 3 名の患者とその父母から得られた計 6 検体の DNA について、全エクソン領域のライブラリーを作成し配列の決定を完了した。現在バイオインフォーマティクス解析を行っている。

D. 考察

CAEBV においては明らかな免疫不全