

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

Xenograftモデルを用いたEBV関連 NK細胞リンパ腫に対する
HSP90阻害剤の効果検証

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

EBV 感染 T/NK 細胞の増殖・不死化に大きく寄与していると考えられている latent membrane protein 1 (LMP1)の発現を抑制する物質を、小分子阻害剤パネルを用いスクリーニングしたところ、HSP90 阻害剤が特定された。HSP90 阻害剤が LMP1 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* で確かめた。次に NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NOG) マウスを用いた EBV 関連 NK 細胞リンパ腫の xenograft モデルを確立した。このモデル系を用い、HSP90 阻害剤の *in vivo* における効果を検証し、本剤がウイルス癌遺伝子である LMP1 発現を抑制し、リンパ腫増殖・転移を抑えることを示した。HSP90 阻害剤は EBV 関連 T/NK リンパ腫や慢性活動性 EBV 感染症の治療法として有望であることが示唆された。

A. 研究目的

Epstein-Barr Virus (EBV) は B 細胞のみならず T 細胞・NK 細胞にも感染し、節外性 NK/T 細胞性リンパ腫や種痘様水疱症様リンパ腫など EBV 関連 T/NK リンパ腫や慢性活動性 EBV 感染症の原因となる。これら EBV 関連 T/NK 細胞性腫瘍は、難治であり治療法も確立していない。新規治療法開発には治療モデルが必須である。これまで、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る。NOD/SCID/ γ 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。近年、Imadome らは慢性活動性 EBV 感染症患者末梢血を NOG マウスに経静脈投与し、T/NK リンパ増殖性疾患を再現してい

る (PLoS Pathog 2011)。

今回我々は、EBV 陽性 T 細胞および 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。さらに我々は HSP90 阻害剤が EBV 癌遺伝子である latent membrane protein 1 (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見出した。本研究で確立した 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も検討した。

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 (Jurkat, SNT13, SNT16, KHYG1, SNK6, KAI3) を、様々な経路 (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。

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)

NOG マウスは遺伝子組み換え生物にあたるため、「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た。なお本研究は名古屋大学医学部の組換え DNA 実験安全委員会にて承認済みである。

動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は、名古屋大学医学部動物実験施設の実験動物委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) EBV 関連リンパ腫 xenograft モデルの作成：種々の T/NK 細胞株を様々な経路で NOG マウスに接種したところ、節外性 NK/T 細胞性リンパ腫由来で NK 細胞株の SNK6 のみが皮下注により生着した。

Engraftment of Cell Lines

Cell line	Cell Type	EBV Dependency	Routes	Tumor	EBV DNA
Jurkat	T	EBV -	SC	(+)	Not done
KHYG1	NK	(-)/ve	SC	(-)	Not done
SNT13	T	+	SC, IP	(-)	(-)
SNT16	T	+	SC, IV, IP, IM	(-)	(-)
KAI3	T	+	SC, IV, IP	(-)	(-)
SNK6	NK	(+)/ve	SC	(+)	(+)
			IV	(-)	(+)

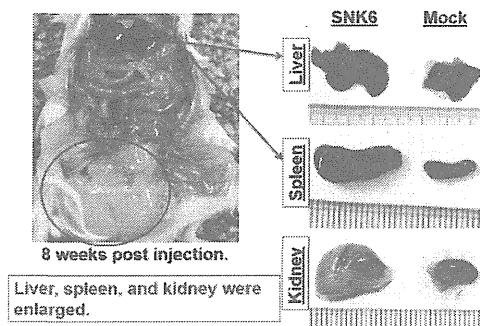
Subcutaneous inoculation (1×10^6 cells).



Among the EBV-positive and IL-2 dependent cell lines, only SNK6 cell line developed tumor.

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。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。

Metastasis to Organs



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。

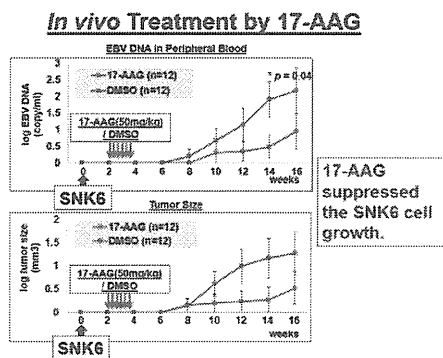
2) EBV 陽性 T/NK 細胞株の増殖を抑制する薬剤スクリーニング：

EBV 陽性 T/NK 細胞株ではウイルス関連タンパク質はわずか 3 種類しか発現されていない。この中で、細胞増殖・不死化に大きく寄与していると考えられている LMP1 の発現を抑制する物質を、小分子阻害剤パネルを用いスク

リーニングしたところ、17AAG および radicicol という HSP90 阻害剤が特定された。17AAG・radicicol はいずれも *in vitro* で SNK6 をはじめとする EBV 陽性 T/NK 細胞株の増殖を抑制した。

3) 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 HSP90 阻害剤 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 関連 NK 細胞リンパ腫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、ウイルスがん遺伝子である LMP1 の発現を抑制する物質として HSP90 阻害剤を見出した。HSP90 は分子シャペロンであり細胞増殖に関与し、その阻害剤は抗腫瘍作用を持つことが示されている。更に我々は、NOG マウスを用い、EBV 関連 NK 細胞性リンパ腫の xenograft モデルを確立し、HSP90 阻害剤である 17AAG の EBV 関連悪性リンパ腫への

治療効果を検証した。17AAG は NOG マウスに接種した SNK6 細胞の増殖を抑制した。また、組織中の LMP1 発現量も同様に抑制されていた。我々が独自に開発した NOG マウスによる xenograft 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 マウスを用いた EBV 関連 NK 細胞リンパ腫の xenograft モデルを確立した。このモデル系を用い、HSP90 阻害剤の *in vivo* における効果を検証した。NOG マウスによる xenograft モデルは、EBV 関連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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. *Rheumatol* 52:956-8 2013
2. Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 44:155-8, 2013
3. 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
4. Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S,

- Nishiyama Y. Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. *Int J Cancer* 132:1592-601, 2013
5. Torii Y, Kimura H, Hayashi K, Suzuki M, Kawada J, Kojima S, Katano Y, Goto H, Ito Y. Causes of vertical transmission of hepatitis B virus under the at-risk prevention strategy in Japan. *Microbiol Immunol* 57:118-21, 2013
 6. 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
 7. 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* 56:150-2, 2013
 8. Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y. Interleukin-17A-producing T lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbiol Immunol* 57:139-44, 2013
 9. Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32:699-701, 2013
 10. Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma viral MicroRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 208: 771-9, 2013
 11. Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different Distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol* 87: 6693-9, 2013
 12. Murata T, Iwata S, Siddiquey NA, Kanazawa T, Goshima F, Kimura H, Tsurumi T. Heat shock protein 90 inhibitors repress latent membrane protein 1 (LMP1) expression and proliferation of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lymphoma. *PLoS One* 8:e63566, 2013
 13. Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55, 566-571, 2013
 14. Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons. *Microbiol Immunol* 57:715-22, 2013
 15. Ito Y, Suzuki R, Torii Y, Kawa K, Kikuta A, Kojima S, Kimura H. HLA-A*26 and HLA-B*52 are associated with a risk of developing EBV-associated T/NK lymphoproliferative disease. *Blood e-Letter* ID: bloodjournal_el; 8085, 2013
 16. Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed AA, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active

Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report. Hum Pathol 44:2849-52, 2013

17. Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. Nagoya J Med Sci 75: 169-79, 2013

2. 学会発表

1. 木村 宏. EBV 感染症の病態と診断. EB ウイルス感染症研究会 レクチャー. 東京. 2013 年 3 月 16 日
2. Kawano Y, Iwata S, Kawada JI, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y. Circulating Viral MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Disease Status in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA, July 22, 2013
3. Kawada JI, Ito Y, Iwata S, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, and Kimura H. mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and

natural killer cell lymphoma. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA, July 22, 2013,

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 特許第 5205609 号. ウイルス検出用オリゴヌクレオチドセット、EBV、CMV 及び HHV-6 の分析方法及び検出キット. 発明者; 木村 宏、西山幸廣、和田かおる、久保田直実特許取得日: 2013 年 3 月 1 日
- 2) 特許第 5429679 号: ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット. 発明者; 木村 宏、西山幸廣. 特許取得日: 2013 年 12 月 13 日

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 EB 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

東北大学大学院医学系研究科・宮城地域医療支援寄附講座

東北大学病院・内科総合感染症科

東北大学メディカルメガバンク機構・地域医療支援部門

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、昨年度、核酸誘導体 S-FMAU が抗 EBV 効果を有することを明らかとした。S-FMAU は EBV が有するウイルス由来核酸リン酸化酵素 (thymidine kinase: TK) によってリン酸化される。本年度は酵素学的解析に向けた TK タンパクの発現系構築を行った。一方で植物由来天然化合物の効果を検討した。

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、慢性感染のうちに 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、骨髄幹細胞移植も行われるようになり、予後は改善傾向になるものの、未だ不十分である。

EBV 由来の核酸リン酸化酵素である thymidine kinase (TK) の基質特異性が宿主のそれとは異なることから治療標的となりうると仮定した。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。分担研究者もしくは東京大学創薬オープンイノベーションセンターが保有する核酸誘導体約 800 種類を

昨年度スクリーニングし、S-FMAU が CAEBV 由来腫瘍細胞に効果を示すことを明らかとした。これらの成果で EBV の治療薬候補として特許を本年度取得した。

今年は、この TK が新たな治療標的となりうることから、TK の性状を詳細に調べるための大腸菌を用いた発現系の構築を試みた。さらに核酸誘導体以外にも広く本学で合成もしくは分離された化合物のスクリーニングを行った。これらを介して難治性疾患である CAEBV の予後の改善に貢献することが目的である。

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。コントロールとして T 細胞由来腫瘍細胞である MOLT-4、SupT1 や HTLV-transformed cell line である MT-2, MT-4 を使用した。これらの細胞は RPMI1640 培地で培養した。

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 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、種々の細胞を 10×10^4 /mL に調整し、段階希釈した化合物 100 μ L を加えた 96 well plate に 100 μ L 加え、5% CO₂ 存在下 37°C で 5 日間培養を行った。培養後に MTT 法による生細胞数を測定した。

4) TK 発現系の構築: EBV-TK 遺伝子を PCR 法で増幅、大腸菌発現ベクターである pET28a に組換えた。発現は BL21 株を用いた。

(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。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。遺伝子組み換え実験は東北大学学内申請を行い、承認を得ている。

C. 研究結果

1) EBV-TK 発現系の構築

抗ヘルペス剤であるアシクロビル (ACV) が HSV-TK 依存性に効果を示すと同様に、S-FMAU は EBV-TK が発現もしくは強制発現細胞でのみ効果を示す。つまり、EBV-TK によってリン酸化され、効果を発揮すると考えられる。これまで EBV-TK に関して酵素レベルでの解析はほとんど行われてきていない。おそらく HSV に対する ACV のような有用な薬剤が開発されてこなかったことがひとつの理由であると考えられる。本

研究では、EBV 持続感染細胞である B95-8 細胞から DNA を抽出、EBV-TK コード領域を PCR 法で増幅、大腸菌発現ベクターである pET28a にクローニングした (pET-EB/TK)。塩基配列を決定したのち、BL21 株を用いて形質転換を行い、IPTG で誘導を試みた。コントロールとしてヒト TK を同様にクローニングして用いた。発現量はヒト TK と比べて少なめであったが、4 時間の IPTG 誘導ではほとんどが可溶性分画で検出することが可能であった。今後はさらなる発現効率の向上を目指して諸条件を検討するとともにタンパク精製法の改良を進めて行く予定である。この精製 EBV-TK を用いて、酵素学的解析を行う予定である。

2) 東北大学化合物ライブラリーのスクリーニング

東北大学大学院薬学研究科および多元物質科学研究所保有のそれぞれ天然物、核酸誘導体化合物ライブラリーの抗 EBV 効果を検討した。スクリーニングでは CAEBV-NK 細胞株である KA13 を指標とし、SupT1 および MT-2 細胞との比較を行った。0.1 μ M 以下の IC₅₀ を示す天然物が見出されたが、他の細胞にも効果を示し、抗 EBV 剤としての選択性は認められなかった。今後もスクリーニングを継続し、S-FMAU に続く新規抗 EBV 剤の開発を通して CAEBV の制圧を試みる予定である。

3) S-FMAU の導出の試み

S-FMAU は EBV-TK によってのみリン酸化されるため、特異性の高い薬剤である。また、分担研究者今留博士らが開発した独自の動物モデルにおいてその効果が証明されている。これまで 30 社以上の製薬関連企業と導出に関して議論を重ねたが現在のと

ころ成功していない。今後も継続して交渉を続けるとともに前臨床試験に向けた準備を行っている。

D. 考察

本年度は昨年度に見出した S-FMAU の作用機序を詳細に調べるため、EBV-TK の大腸菌発現系の確立を試みると同時にさらなるスクリーニングを行った。S-FMAU は白血病・リンパ腫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、白血病やリンパ腫への進行を止められる可能性があることを昨年度明らかとした。これらの成果をもって 30 社以上の製薬関連企業との交渉を行ったが、現時点での交渉は成立していない。今後も開発ステージをあげる等の進捗をもって導出を試みる。

本年度、EBV-TK 大腸菌発現ベクターを作製し、その発現条件を検討した。概ね順調に発現してきている。今後は大量発現・精製を通して EBV-TK の性状を検討して行きたい。これらの性状を解明することは S-FMAU の作用メカニズムが明らかになるだけでなく、次世代型新規薬剤の開発にも役立つと考えられる。

EBV に対する薬剤スクリーニングはこれまであまり行われてきていない。その理由として、まず、EBV 感染において細胞増殖促進効果があるため、lytic infection などに代表される細胞障害性を測定しにくい。具体的にはこれまで HSV や HIV などで汎用されてきた MTT 法やプラーク法が使用できない。次に EBV はヘルペスウイルス属に分類されるため、細胞障害性が非常に強く容易にスクリーニングできる HSV に対す

る薬剤をまず high through put で見出し、その後 EBV に応用という方法がとられてきている。HIV において HIV-1 の薬剤は確かに HIV-2 にも効果を示すことが多くの薬剤で証明されている（非核酸系逆転写酵素阻害剤を除く）。また HSV-1 で効果のある ACV や GCV は HSV-2 でも効果的である。しかし、EBV はガンマヘルペス属であり、かなりの相違が認められている。よって EBV 特異的な新たなスクリーニング系が必要とされる。我々の開発した EBV-TK transduced cell line を用いた MTT 法はそのひとつと考えられる。一方、本年度使用した方法は EBV 非関連 T-リンパ腫細胞との比較実験から CAEBV に対する抗ウイルス・腫瘍活性を見出すものである。これらのアッセイ系を使いわけながら新たな薬剤をスクリーニングしていこうと考えている。本年度は不幸にも新たな化合物は同定されなかったが今後もスクリーニングは継続させる予定である。

E. 結論

本年度は CAEBV に対する治療薬候補である S-FMAU の作用機序を明らかにするために EBV-TK の大量発現系の作製を行った。また、昨年に引き続き薬剤のスクリーニングを行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusasko 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* 45:908-915, 2013.
- 2 Kazuki Shimane, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Nobutaka Fujii, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan Sarafianos, and Eiichi Kodama. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:4035-4038, 2013
- 3 Eleftherios Michailidis, Emily M Ryan, Atsuko Hachiya, Karen A Kirby, Bruno Marchand, Maxwell D Leslie, Andrew D Huber, Yee T Ong, Jacob C Jackson, Kamalendra Singh, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A Parniak and Stefan G Sarafianos. Hypersusceptibility Mechanism of Tenofovir-Resistant HIV to EFdA. *Retrovirology* 10:65 doi:10.1186/1742-4690-10-65, 2013
- 4 Atsuko Hachiya, Aaron Reeve, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Ong, Karen Kirby, Maxwell Leslie, Shinichi Oka, Eiichi Kodama, Lisa Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, and Stefan Sarafianos. Evaluation of combinations of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine with clinically used antiretroviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 4554-4558, 2013.
- 5 Kirby KA, Michailidis E, Fetterly TL, Steinbach MA, Singh K, Marchand B, Leslie MD, Hagedorn AN, Kodama EN, Marquez VE, Hughes SH, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effects of substitutions at the 4' and 2' positions on the bioactivity of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:6254-64, 2013.
- 6 Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* in press 2013. doi: 10.3851/IMP2697
2. 総説
- 1 Fusako Miyamoto and Eiichi N Kodama. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*, 19:1827-34, 2013
- 2 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
- 3 Shigeyoshi Fujiwara, Hiroshi Kimura, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, Eiichi Kodama, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus

Infection in Japan. *Pediatrics International*, 54: 2014 in press

3. 学会発表 (国内)

1. Fusako Miyamoto, Fumiko Tomiyama, Kumi Kawaji, Mitsuo Kaku, Eiichi Kodama. Profile of a novel HIV reverse transcriptase inhibitor. NIH Tohoku University JSPS Symposium, Sendai, Japan, May 9-11, 2013
2. 児玉栄一. MAGI 細胞による薬剤 screening において酵素法がヒット化合物検出に優れる. 第27回日本エイズ学会学術集会. 熊本, Nov. 20-22, 2013.

G. 知的財産権

1. 児玉栄一 日本 (京都大学・ヤマサ醤油株式会社と共同) エプスタイン・バーウイルス関連疾患に対する薬剤およびそのスクリーニング法 特願 2009-532175 特許 5326173 号
2008年9月8日出願 登録平成25年8月2日
2. 児玉栄一 中国 (PCT出願) 同上 特許番号 2013092600196320 登録平成25年9月26日

慢性活動性 EB ウイルス感染症診断の迅速化に関する研究

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 感染症研究会の診断指針では末梢血単核球（PBMC）分画の EBV ゲノムコピー数が $10^{2.5}$ copies/ μ gDNA 以上が目安とされている。また、殆どの例では EBV が T/NK 細胞に感染していると報告されており、末梢血単核球（PBMC）中の B 細胞以外の細胞分画に含まれる EBV ゲノムコピー数を迅速に測定できれば、迅速な確定診断と早期の治療開始に寄与すると予想される。本研究では、特殊な試薬や機器を使用することなく迅速に PBMC 中の EBV ゲノムコピー数を測定すること目的に研究を行なった。その結果、採血後そのまま遠心して簡便に PBMC を分離できる真空採血管と EBV ゲノムを PCR 増幅し検出するための固相化試薬を組み合わせることにより、60 分程度で簡便に EBV ゲノムコピー数を定量できることが示された。現在、上記の迅速検査法に簡便に B 細胞を分離する手法を組み合わせ、迅速に EBV 感染細胞種を同定する検査系の構築を目指した試みを行なっている。

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適切に治療しないと患者のほとんどが数年から十数年の経過でリンパ腫・臓器不全・血球貪食症候群などにより死亡する。抗ウイルス剤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、造血幹細胞が現在のところ唯一の根治治療法である。一方、かつては CAEBV の症例は圧倒的に小児患者の報告が多く小児が多く罹る疾患との見方があったが、近年 30 歳以上の成人例の報告が増えており、幅広い年代の患者が存在し患者数もこれま

で予想されていたよりはかなり多いと考えられている。診断基準の確立と疾患の周知・診断技術の発達がその原因と思われる。EB ウイルス感染症研究会からは、表 1 に示すような診断指針が提唱されている。

表 1 CAEBV 診断指針

1. 持続的・再発する伝染性単核症様症状
2. VCA, EA 抗体価高値に伴う異常な EBV 抗体反応又は病変組織（含末梢血）における EBV ゲノム量の増加
3. 慢性に経過し基地の疾患とは異なること

(以上の3項目をみたと)

さらに、補足事項に EBV ゲノムコピー数は $10^{2.5}$ copies/ μ gDNA 以上が診断の目安として示されている。また、EBV 感染標的細胞の同定を行なうことが望ましいとされているが、これまで研究では殆どの患者の末梢血中の EBV 感染細胞は T 細胞あるいは NK 細胞であることが報告されているおり、感染細胞が主に B 細胞の伝染性単核症と明確な相違がある。EBV ゲノムコピー数の測定を受託検査機関に依頼することが可能であるが、保険適用外なため高価であり、また EBV 感染細胞種の同定は専門の研究室に依頼する必要がある。このような経緯から、特に中年以降の患者では典型的な症状が持続するものの確定診断が遅れ、原因不明なままリンパ腫・臓器不全・血球貪食症候群などにより死亡する例が存在すると考えられている。現在のところ造血幹細胞移植以外に根治治療法はないが、新規薬剤治療法も模索されており、適切な時期に移植するため、あるいは新規薬剤治療法が確立された場合に備えて確定診断を容易とする簡便・迅速・安価な検査法の開発が必要である。

EBV ゲノムコピー数の測定は通常リアルタイム PCR 機を使用して行なわれているが、リアルタイム PCR 機はかなり普及していることから、本研究ではリアルタイム PCR 機以外の特殊な機器を使用せずに迅速・簡便・安価に EBV ゲノムコピー数を測定できる新しい検査手法を確立することを目的に研究を行なった。

B : 研究方法

1. リアルタイム PCR 法による EBV-DNA の検出

Forward primer : cggaagccctctggacttc

Reverse primer : ccctgtttatccgatggaatg

Probe: 6FAM-tgtacacgcacgagaaatgcgcc-iowaBK

・PCR 条件

使用機器 : LightCycler480

Primer 濃度 : 0.5μ M Probe 濃度 : 0.2μ M

増幅酵素 : EX-Taq (TakaraBio)

反応条件 :

Denature 95°C10 秒

PCR 反応 95°C5 秒, 60°C20 秒
45 サイクル

2. 固相化試薬の作成 (PP-strip)

LightCycler480 で使用する 8 well Strip に EBV 定量に使用するプライマー・プローブを安定化剤とともに減圧遠心法により固相化した。

3. 固相化試薬の作成 (All-strip)

LightCycler480 で使用する 8 well Strip に EBV 定量に使用するプライマー・プローブに加えバッファー成分と増幅酵素 (EX-Taq: TakaraBio) を安定化剤とともに減圧遠心法により固相化した。

4. 末梢血からの PBMC 分離

a) リンフォセパール(免疫生物研究所)を使用し、説明書に従い比重遠心分離法により PBMC を分離した。

b) PBMC 分離用真空採血管 BD バキュティナ採血管 (クエン酸ナトリウム入り : 日本 BD) を使用し、1800g 20 分遠心し、血漿部分を可能な限り除去し、PBMC 層を分取した。

5. 試験サンプルの作成

EBV 陽性 $\gamma \delta$ T 細胞株 SNT8 を EBV ゲノム陰性の末梢血 (健常ドナーから採取) に 1 PCR 反応あたり 1 ~ 10 万個の割合で加えた試験サンプルを作成した。

6. 核酸抽出

DNA 抽出には核酸抽出機 EZ-1 (キアゲン) を

使用した。抽出プロトコールには EZ-1 Virus Kit Ver. 2.0 Card を使用し、抽出試薬は EZ-1 Virus kit をした。

7. 細胞内の EBV ゲノム DNA の直接増幅
細胞内の EBV ゲノム DNA を DNA 抽出操作なしに増幅することを目指し、PBMC に EBV 陽性細胞株を混入した試験サンプルと Ampdirect-plus (サンプル中に含まれる PCR 阻害物質の影響を抑制する働きがあり、血液や動植物組織、SDS などを含む各種サンプルより DNA を精製することなく PCR を行うことを可能とする試薬：SHIMAZU) を等量混合し、リアルタイム PCR 法により EBV ゲノム DNA を増幅した。

(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. 末梢血からの PBMC 分離

リンフォセパールなどの PBMC 分離剤を使用する比重遠心分離法は、末梢血を PBS など 2 倍に希釈し、分離液に注意深く末梢血を重ねして遠心する、などの慎重な操作が要求される。しかし、BD バキュティナ採血管を使用すれば、採血操作後に直接遠心分離して PBMC を採取することが可能であり、リンフォセパールを使用した場合と PBMC の回収率や細胞種の割合などに本質的な違いは認められなかった。分離に要する時間は、リンフォセパール法が 35 分に比べ、BD バキュティナ採血管は 20 分と操作時間の短縮化と簡便さの面で優位性があることが示された。

2. 試験サンプルから EZ1 により抽出した DNA を使用した EBV ゲノムの検出

EBV ゲノム DNA が陰性の末梢血に EBV 陽性細胞株を一定量加えた試験サンプルから EZ1

により DNA を分離した DNA を鋳型に EBV ゲノム DNA コピー数をリアルタイム PCR 法により測定した結果、1 反応中に EBV 陽性細胞由来 1 個分の DNA が含まれる場合でも検出可能なことが示された。

3. Ampdirect-plus を使用した EBV ゲノム DNA 検出系の性能検証

今回用いた EBV ゲノム DNA 検出系の感度が確かめられたため、Ampdirect-plus を用いて DNA 抽出を行なわないで検出操作を行なった場合の検出感度との比較検討を行なった。その結果、DNA 抽出を行なった場合と Ampdirect-plus を使用して DNA 抽出を行なわずにリアルタイム PCR を行なった場合と検出感度に 10 倍程度の差があり、DNA 抽出した場合の方が高感度との結果が得られた。

4. 固相化試薬を用いた EBV ゲノム DNA 検出

a) 8 well Strip にプライマー・プローブを固相化した検査ストリップ (PP-strip) を使用し、EZ1 で抽出した試験サンプル中の EBV ゲノム DNA の定量を行なった。その結果、1 反応中に EBV 陽性細胞由来 1 個分の DNA が含まれる場合でも検出可能だった。

b) 8 well strip にすべての試薬を固相化した検査ストリップ (All-strip) により EZ1 で抽出した試験サンプルを用いて EBV ゲノム DNA の定量を行なった。その結果、1 反応中に EBV 陽性細胞由来 1 個分の DNA が含まれる場合でも検出可能だった。

5. 核酸抽出操作なしの直接検査

Ampdirect-plus を使用し、PBMC からの DNA 抽出なしに試験サンプル中の EBV ゲノム DNA の検出を試みた。固相化試薬は PP-strip と All-strip を使用した両方の検討を行なったが、いずれの場合も陽性反応が検出された。しかし、DNA 抽出した場合に比べ、いずれの場合も 10~100 倍程度の感度低下が認めら

れた。しかし、まだ予備的検討段階だが、使用する増幅酵素の量を増やす、DNA の投入量を調整するなどにより感度を上昇させられる可能性があることが示されている。したがって今後の研究により、図1に示すような検査ステップにより迅速に検査結果を得ることが可能になると考えている。

パキュティナ採血管で採血し
遠心分離により単核球分離

Ampdirect-plus と混合

固相化 Strip に分注 & 溶解

リアルタイム PCR 機に
セットし PCR 反応と解析

図1： 迅速 EBV 定量系の概要

図1示すような手順による検査は、遠心とPCR以外に殆ど手間がかからないため、迅速に検査結果を得ることが可能になる。

6. 固相化試薬への定量スタンダードの組み込み
EBV ゲノム DNA を定量する際、8well strip に EBV のスタンダードを組み込んでおけば定量操作が一層簡便になる。そのような観点から EBV ゲノム定量用固相化 Strip を作成し（図2）、その有用性を検討した結果、このような定量ストリップの検出感度は通常の場合の固相化試薬を使用した場合の検出感度と相違なく、非常に簡便に EBV ゲノム DNA の定量検査を行なえることが示された。

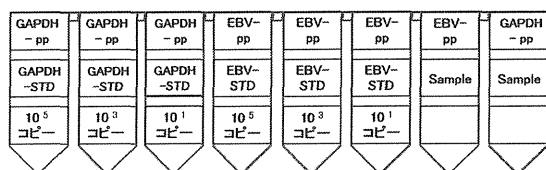


図2：EBV 定量用固相化ストリップ

1～3, 8 well には DNA 量を定量するための GAPDH 遺伝子用のプライマー・プローブを固相

化し、4～6, 7 well には EBV 定量用のプライマー・プローブを固相化する。さらに、1～3 well には GAPDH のスタンダードを 10⁵、10³、10¹ コピー加え、4～6 well には同様に EBV スタンダードを加え、また、すべての well にはバッファーと増幅酵素を添加して固相化する。検査に当たっては、スタンダードを加えた1～6 well には水を、7, 8 well にはサンプルを加え、固相化試薬を溶解後に定量 PCR を行なう。

D: 考 察

1. 現在のところ Ampdirect-plus を使用した検査系は、DNA 抽出を行なった場合に比べて感度が 10～100 倍程度低下する結果となっているが、酵素量や DNA 量の調節などにより感度を改善できる可能性が示されており、今後の開発により DNA 抽出を行なった場合に遜色ない結果が得られる可能性がある。

2. 操作を一層簡略化するためには、固相化試薬を作成する際にバッファー・増幅酵素を同時に固相化する手法が効果的である。さらに、結果6で示したようなスタンダードも含め固相化した検査ストリップと Ampdirect-plus などを組み合わせれば、ピペットによる簡単な混合操作のみで EBV ゲノム DNA 量を 60 分程度（遠心 20 分間、PCR30 分間、その他 10 分間）で正確に定量することができ、迅速に CAEBV を含め EBV 関連疾患を診断することに寄与するだろう。

3. CAEBV 患者の末梢血中に存在する EBV 感染細胞は多くの場合 B 細胞ではなく T/NK 細胞である。したがって、末梢血から分離した単核球を Ampdirect-plus と混合する前に B 細胞と特異的に結合するマグネットビーズを添加し、その後磁石でビーズと結合した B 細胞と B 細胞を除いた PBMC の 2 つのフラクションに分けた後に Ampdirect-plus を加え

リアルタイム PCR を行なえば、非常に簡便かつ迅速(検査時間 90 分を想定)に感染細胞種が同定できると考えている。そのような手順により簡便に感染細胞種を特定する実験を現在実施中である。

E: 結論

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) は、多くの場合 EBV 感染 T/NK 細胞を原因細胞とする予後不良の疾患であり、CAEBV 患者の末梢血中の EBV ゲノム DNA 量は高値を示すのが特徴である。本研究では、効率的に CAEBV の確定診断を行なうため、特殊な試薬や機器を使用することなく迅速に PBMC 中の EBV ゲノムコピー数を測定することを目的に研究を行なった。その結果、採血後そのまま遠心して簡便に PBMC を分離できる真空採血管と EBV ゲノムを PCR 増幅し検出するための固相化試薬を組み合わせることにより、60 分程度で簡便に EBV ゲノムコピー数を定量できる可能性があることが示された。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

- 1) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190–194(2013)

- 2) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood* 121: 4512-4520(2013)
- 3) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print] (2013)
- 4) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*. 52(2):201-11 (2013)

著書

1. 北條浩彦、清水則夫(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編 「基本編—原理と基本知識—リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー/プローブの設計手順 ②マルチプレックスの場合」p72-74 羊

土社, 2013

2. 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆).
原理からよくわかるリアルタイム PCR
完全実験ガイド 最強のステップ UP シ
リーズ. 北條浩彦編 「実践編-プロト
コールを中心に-IV章 遺伝子量解析 15
ウイルス感染症を診断する ウイルス
ゲノムの定性的検査と定量的検査」
p192-202 羊土社, 2013

国内学会発表

1. 今留謙一 松田剛 川野布由子 千葉佑
規乃 新井文子 中澤温子 伊藤守 清水
則夫 藤原成悦 難治性 EB ウイルス関連
T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用い
た新規治療薬 3 剤の評価研究 日本ウイル
ス学会 11 月神戸
2. 清水則夫 再生医療におけるウイルス・
マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14
回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月
(東京)

国際学会発表

なし

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(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

慢性活動性EBウイルス感染症原因遺伝子に関する研究

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)の根本原因について、“免疫不全症”を切り口に、その背景となる責任遺伝子の探索を行った。今までにFANCA異常によってCAEBVと免疫不全症を呈する患者を明らかにしているが、本年はさらに3名の患者において免疫学的解析と遺伝子解析を行った。その結果、新たにPIK3CD異常症においてEBV-LPDを主体とするEBV感染症への脆弱性を示すことが明らかになった。

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。その免疫学的解析はサイトカインや一般的な免疫細胞亜群解析にとどまっている。本研究では昨年引き続きNKTやDCサブセット、T細胞亜群解析などを駆使して免疫学的特徴を明らかにするとともに、その遺伝的背景を探るために候補遺伝子探索あるいは全エクソン解析を行い、遺伝子異常の有無を明らかにすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

1) CAEBVの免疫学的特徴に関する研究

CAEBV、EBV-LPDを合併する、あるいは持続的にEBVDNA高値をとる先天性免疫不全症患者においてmulti-parameter flow cytometry解析を行った。解析する亜群としてはB subset, T subset (naïve, central memory, effector memory), Th subset (Th1, Th2 Th17, Tfh), NKT, double negative T, Treg, DC subset, NK細胞などを選定した。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。

2) CAEBV患者の責任遺伝子探索

明らかな免疫不全症を合併しないCAEBV患者からは唾液を採取してDNA抽出を行った(解析は代表研究者)。免疫不全症に合併したEBV感染症においては、末梢血よりDNAを抽出した。これらを用いて候補遺伝子探索、あるいは全エクソン解析を行った。全エクソン解析においては原則として両親を含む Trio解析とした。得られた結果はinsertion, deletion, missense mutation, nonsense mutationを中心に抽出し、dbSNP137及びin

house Japanese SNPのフィルタリングを行った後に候補遺伝子を策定した。

(倫理面への配慮)

本研究は患者検体(末梢血及び唾液)を用いた解析を行う。研究においては、遺伝子解析、特に全エクソン解析が含まれており、各種該当指針を遵守し、被験者に対しては十分な説明と同意の元に、また個人情報管理に十分配慮して、研究を実施した。本研究では、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

昨年と同様に以下の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 (Vβ11+Vα24+CD3+), double negative T, γδT, activated T, Th1, Th2, Th17, follicular helper T
NK細胞、DC subset (pDC, mDC, activated mDC)

大半の症例においてT細胞はCD69+, HLADR+の細胞集団を含み、活性化されていることが明らかである。またTCRVBレパートアでは偏りをしめず症例が存在した。NKT細胞の減少は1例にて認められた。KRECs, TRECsについてはTRECs低下例が約半数であった。

2) 遺伝的背景の研究

本年は3例において候補遺伝子探索を行った。1例は幼小児期から20年近く継続するIgG2サブクラス欠損症で、免疫グロブリン補充まで肺炎を

反復している。近年リンパ節腫大が著明になり末梢血でもEBVが検出されるようになった。当科にての候補遺伝子解析によりPIK3CD遺伝子にE1021K変異があることが明らかになった。いわゆるactivated PIK3CD syndromeであった。その他2症例においては両親及び同胞を含めた全エクソン解析を行い、候補遺伝子を絞り込んでいくところである。その中1例ではEBV-LPDとなり汎血球減少症を呈している。

D. 考察

免疫不全症の観点から、CAEBVの背景には何らかの遺伝子異常があるとの考えから、候補遺伝子探索を継続した。その結果2013年末に明らかになったactivated PIK3CD異常症ではEBV感染症に脆弱性があることが明らかになった。実際に欧州からの報告ではEBV感染症によるリンパ組織の腫大やリンパ腫の存在が明らかになっている。TやNKへの感染症はまだ報告されておらずB細胞への感染症が主体の用である。一方今回は家族検体を含めた全エクソン解析が行われており、今後関連のある遺伝子変異が同定される可能性がある。

免疫学的解析では、EBV感染症を呈する免疫不全症は比較的類似した表現型をとっていた。T細胞の活性化やNKTの減少は共通項となっている可能性がある。

E. 結論

免疫不全症を背景とした持続性EBV感染症において詳細な免疫学的解析と候補遺伝子探索を行った。その結果1名においてはPIK3CD異常が同定された。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol*. **131**: 1437-40, 2013.
2. Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T,

Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol*. **35**: 482-5, 2013.

3. 山田尚、森尾友宏、古川恵一:EB ウイルス感染症のピットホール 成人病と生活習慣病 **43**: 1021-32, 2013.

2. 学会発表

1. 森尾友宏:悪性腫瘍を合併する免疫不全症、**第54回日本小児血液・がん学会学術集会**(シンポジウム)、福岡、2013年11月29日-12月1日
2. 森尾友宏:免疫不全症候群から学ぶ human immunology、**第41回日本臨床免疫学会総会**(シンポジウム)、山口、2013年11月27日-29日
3. 森尾友宏:病原体と宿主からみる呼吸器ウイルス感染症:その分子基盤と免疫操作による感染制御、**第16回茨城県小児感染症研究会**(招待講演)、茨城、2013年11月20日
4. 森尾友宏:易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、**平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会**、北海道、2013年10月25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

共同研究者 今留謙一 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
新井文子 東京医科歯科大学大学院 血液内科
大賀正一 九州大学大学院 周産期小児医療学
澤田明久 大阪府立母子保健総合医療センター 血液・腫瘍科

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、発症の背景には微細な免疫不全が存在し、そのために T 細胞に対して抗原性の弱い EBV 感染 T 及び NK 細胞が免疫監視機構から逃れていると推測される。本研究はこのような微細な免疫不全に関わる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、昨年度からの研究を継続して患者 2 名およびその家族 1 名、合計 3 名の唾液由来 DNA のエクソーム解析を終了した。2 名の患者に共通の変異は認められなかったが、分類不能型原発性免疫不全症の原因遺伝子の変異が認められた。また、免疫関連遺伝子の変異も複数認められたため、現在さらに多くの患者 DNA において、サンガー法によりその変異の存在を検索している。また、今年度新たに 9 名の患者とその家族 15 名、合計 24 名より唾液由来 DNA を採取し解析を開始した。

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。EBV

感染 T および NK 細胞においては、T 細胞に対して免疫原性の強い EBNA3, EBNA2 などのウイルス蛋白質が発現されないため、軽度の免疫不全状態でも免疫監視機構から逃れることがありうると考えられる。発症の初期には EBV 感染 T および NK 細胞の悪性度は低いと考えられるが、増殖を続けるうちに変異を蓄積し、リンパ腫の発症に至ると推測される。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と考えられる。遺伝形式の解明や de novo 変異の検証にも役立つため、患者および両親の DNA を採取し全エクソン配列解析を行っている。

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（澤田明久博士）、九州大学医学部周産期小児医療学（大賀正一博士）、および東京医科歯科大学血液内科（新井文子博士）において診断された CAEBV 患者 11 名とその家族 16 名の合計 27 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。

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 (variation) の検出を困難にすると考えられたため、本研究では唾液から Oragene DNA 採取キットを用い

て抽出した DNA 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、in house database などのデータと照合し、変異を検出する作業を行った。検出される変異については、SIFT や PolyPhen 2 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した。

（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。患者本人あるいは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 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

CAEBV 患者 2 名およびその家族 1 名、