

201324084B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

(H24-難治等(難)一般-046)

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

平成 24~25 年度 総合研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 26 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	
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 藤原成悦	1
II. 分担研究報告	
1. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の発症機構・病態解明と治療法開発に関する研究 新井文子	11
2. CAEBV モデルマウスを用いた治療薬候補の評価に関する研究 今留謙一	17
3. 難治性 EBV 感染症の早期診断法と新規治療法開発 木村宏	25
3. 新規 CAEBV 治療薬の開発と評価 児玉栄一	33
4. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の発症機構と迅速診断に関する研究 清水則夫	41
5. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の原因遺伝子に関する研究 森尾友宏	47
6. CAEBV モデルマウスの開発と応用 藤原成悦	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

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

研究代表者 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 CAEBV 患者 2 名およびその家族 1 名のエクソーム解析が終了した。2 名の患者に共通の variation は見つからなかったが、複数の免疫関連遺伝子において variation が見つかった。EBV 陽性の B リンパ球増殖を示す IgG2 サブクラス欠損症の患者で *PIK3CD* 遺伝子の E1021K 変異が証明され、activated *PIK3CD* syndrome であることが判明した。CAEBV 患者血漿中では EBV がコードする microRNA である miR-BART2-5p と miR-BART5 が増加しており、バイオマーカーとしての応用の可能性が考えられる。EBV 感染 T/NK 細胞の増殖において、NF- κ B, activation-induced cytidine deaminase (AID), EBV miR-BART9 などが重要な役割を果たすことが示された。heat shock protein 90 (HSP90)阻害薬の 17AAG と radicicol、HMG-CoA 還元酵素阻害剤 Simvastatin、核酸誘導体 S-FMAU、NF- κ B 阻害剤 bortezomib などは EBV 感染 T/NK 細胞の増殖を阻害することから、CAEBV 治療薬候補として有望であると考えられた。造血幹細胞移植を受けた CAEBV の 7 症例を後方視的に検証したところ、移植時に病勢が活動性であった 5 例は全例死亡し、非活動性であった 2 例は生存していることから、移植時の病勢が移植の成績に大きく影響すると考えられた。

研究分担者

新井文子（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・講師）

今留謙一（国立成育医療研究センター研究所・室長）

木村宏（名古屋大学大学院医学系研究科・准教授）

児玉栄一（東北大学大学院宮城地域医療支援寄附講座・講師）

清水則夫（東京医科歯科大学難治疾患研究所・准教授）

森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯

学総合研究科・准教授）

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 EBV DNA 量の増加を特徴とする疾患である。血球貪食性リンパ組織球症、リンパ腫、多臓器不全などの合併症をとまない予後は不良であり、造血幹細胞移植が現在唯一の根治的治療法である。CAEBV の病因は不明であるが、背景に軽度の免疫不全が存在し、そのために EBV 感染 T あるい

は NK 細胞が免疫監視機構から逃れて増殖すると推測されている。本研究では、この発症の背景となる免疫不全の原因となる遺伝子を同定し発症機構を明らかにすることを目標とする。また、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖メカニズムを解析し治療の標的分子を同定すること、EBV がコードする microRNA のバイオマーカーとしての応用を検討すること、CAEBV 治療薬候補をモデルマウスを用いて評価することなどを目的とする。

B. 研究方法

1. CAEBV 背景遺伝子の探索

患者およびその家族の唾液から DNA を生成し、すべてのエクソン領域をカバーするライブラリを作成した後、次世代シーケンサーにより、その塩基配列を決定した。

2. CAEBV 治療薬候補のスクリーニング

EBV がコードするチミジンキナーゼ (EBV-TK) あるいは蛋白質フォスホトランスフェラーゼ (EBV-PT)、あるいはヒトがコードするチミジンキナーゼを発現する細胞株を作成した。候補物ライブラリをこれらの細胞に作用させ、EBV-TK あるいは EBV-PT を発現する細胞のみに毒性を示す薬物を選択した。

3. 血漿中 microRNA の測定

慢性活動性 EBV 感染症患者および対照者 (伝染性単核症と健常者) より血液を採取した。分離した血漿より mirVana PARIS を用い miRNA を抽出し、EB ウィルスがコードする 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。

4. 新しいタイプの EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作成

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 個接種した。腫瘍形成が認められた後に、heat shock protein 90 (HSP90) 阻害剤 17AAG を、腹腔内に 50mg/kg/回、隔日で 6 回投与した。

(倫理面への配慮)

CAEBV 患者由来試料を利用する研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得て行った。患者本人あるいは保護者に対して、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。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。国立成育医療研究センター動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. CAEBV 背景遺伝子の探索

CAEBV 患者 11 名とその家族 16 名、合計 27 名より唾液 DNA を採取し、エクソーム解析を開始した。そのうち患者 2 名、家族 1 名の解析が終了している。2 名の患者に共通の variation は見つからなかったが、複数の免疫関連遺伝子において homozygous あるいは heterozygous な variation が見つかっている。これらの免疫関連遺伝子には CVID の原因遺伝子として同定されたものが複数含まれていた。

また、SIFT および PolyPhen2 による variant 蛋白質の機能予測において、機能への重大な影響が予想される variation が含まれていた。以上より、これらの variation の一部に関しては、サンガー法により他の多くの CAEBV 患者において同様の variation が存在するかどうかを調べている。

2. 免疫不全症に合併する慢性 EBV 感染症の遺伝子解析

幼小児期から 20 年近く継続する IgG2 サブクラス欠損症で、近年 EBV 陽性のリンパ節腫大を呈する患者について候補遺伝子解析を行ったところ、PIK3CD 遺伝子の E1021K 変異が証明され、いわゆる activated PIK3CD syndrome であることが判明した。なお、この症例における EBV 感染リンパ球は B 細胞であった。

3. CAEBV 患者における血漿中 EBV miRNA の特徴

伝染性単核症患者では miR-BHRF1-1 と miR-BHRF1-2 が有意に高発現していた。CAEBV 患者では miR-BART2-5p と miR-BART5 が有意に高発現していた。さらに、CAEBV 患者を 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。

4. 新しいタイプの EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウス

節外性 NK/T 細胞性リンパ腫由来の NK 細胞株 SNK6 は皮下接種により生着し腫瘍を形成した。また血中 EBV DNA 量も上昇し、血行性、リンパ行性に遠隔臓器に転移した。

5. EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖機構解析

1) EBV 感染による NF- κ B の活性化

EBV 陰性 T 細胞株 Molt-4 に EBV を感

染させると、転写因子 NF- κ B の構成蛋白質である p52, p50, RelA, RelB が核内に移行し、DNA 結合能が更新することが分かった。NF- κ B 阻害薬 bortezomib を添加すると、p52, p50, RelA, RelB の核内以降が阻害され、アポトーシスが誘導された。また、bortezomib は CAEBV モデルマウスにおいて EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖を抑制した。以上より、EBV は T 細胞・NK 細胞において NF- κ B を活性化することによりアポトーシスを抑制することが示唆された。

2) EBV 感染による AID の誘導

CAEBV 患者由来 EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株、患者由来新鮮 EBV 感染 T 細胞・NK 細胞では、免疫グロブリン遺伝子の再構成や超変異に関わる activation induced cytidine deaminase (AID) が発現されていることが分かった。また、Molt-4 細胞に EBV を感染させると、AID の発現が誘導され、c-Myc 遺伝子の変異が更新することが示された。これより、EBV は AID の発現を誘導することにより細胞遺伝子に変異を導入し、細胞を腫瘍化に導くことが示唆された。

3) EBV miRNA の役割

代表的な EBV 感染 T/NK 細胞株である SNK6 および SNT16 において、EBV miRNA の miR-BART17-5p, miR-BART7, miR-BART1-3p, miR-BART9, miR-BART10 が高発現されていた。アンチセンスオリゴヌクレオチドによりこれらの miRNA を阻害したところ、anti-miR-BART9 は SNK6 と SNT16 の両者の増殖を抑制した。また、anti-miR-BART9 はこれらの細胞における EBV 発がん蛋白質 LMP1 の発現を抑制した。以上より、miR-BART9 は LMP1 の発現を促進することにより EBV 感染

T/NK 細胞の増殖に関与することが示唆された。

6. 慢性活動性 EB ウイルス感染症に対する造血幹細胞移植の後方視的検証

CAEBV7 症例に対する造血幹細胞移植の成績を後方視的に検証したところ、移植時病勢が活動性（発熱、皮膚および筋への感染細胞浸潤）であった 2 例は死亡し、非活動性であった 5 例は全例寛解していた。これより、移植時の病勢が治療成績に大きく影響することが強く示唆された。

7. 新規 CAEBV 治療薬の開発

1) HSP90 阻害薬

HSP90 阻害薬 17AAG と radicicol は *in vitro* で SNK6 など EBV 陽性 T/NK 細胞の増殖を抑制した。また、上記の SNK6 細胞移植モデルマウスにおいては、腫瘍形成後に投与すると、腫瘍縮小と血中 EBV DNA 量の低下が認められ、治療効果を有すると考えられた。

2) S-FMAU

S-FMAU は EBV がコードするチミジンキナーゼによりリン酸化されたのち細胞 DNA に取り込まれ細胞毒性を示す薬剤であり、CAEBV 治療薬候補として期待されている。EBV を感染させた末梢血リンパ球に S-FMAU を加えたところ、濃度依存的に *viability* が低下し、上清中の EBV DNA 量も低下した。

8. CAEBV モデルマウスによる治療薬候補の評価

転写因子 NF- κ B 阻害薬 bortezomib、抗 CD4 抗体 OKT4、S-FMAU の効果を検証した。いずれの薬剤も、末梢血 EBV DNA 量を低下させる効果を示した。S-FMAU 投与マウスでは主要臓器中の EBV DNA 量が低下し、体重減少が抑制された。

D. 考察

2 名の患者で見つかった免疫関連遺伝子の *variation* について、CAEBV 発症との関連を検討している。CAEBV は個々の患者により発症年齢、進行スピード、合併症の有無とその種類などに大きな違いがあるため、その背景に存在すると考えられる遺伝子異常も単一ではなく、患者により異なる遺伝子が関与すると推測される (*genetic heterogeneity*)。PIK3CD 遺伝子の変異により発症したと考えられる *activated PIK3CD syndrome* 患者の EBV 感染は B 細胞であったため、典型的な CAEBV とは異なっているが、免疫不全により EBV 感染リンパ球の増殖が続くという根本は共通であると考えられる。CAEBV 患者血漿中において特定の EBV miRNA が増加していることから、これらの miRNA を CAEBV の診断や病勢モニタリングのためのバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。造血幹細胞移植症例の後方視的検証から、病勢が非活動性の時期の移植がよい予後につながる可能性が示されたことから、病勢モニタリングのマーカーは重要な発見と考えられる。EBV 陽性 NK 細胞株を移植して作成された新しいタイプの EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスは、均一の性状をもつ多数のマウスを作成できることから、治療薬候補の評価には特に適していると考えられる。EBV 感染 T/NK 細胞の増殖において、NF- κ B, AID, EBV miR-BART9 などが重要な役割を果たすことが示されたことは、これらの分子を標的とする治療薬の可能性を開くものと考えられる。HSP90 阻害薬の 17AAG と radicicol、HMG-CoA 還元酵素阻害剤

Simvastatin、核酸誘導体 S-FMAU、NF- κ B 阻害剤 bortezomib などは EBV 感染 T/NK 細胞の増殖を阻害することから、CAEBV 治療薬候補として有望であると考えられる。

E. 結論

CAEBV 患者 2 名およびその家族 1 名のエクソーム解析が終了した。2 名の患者に共通の variation は見つからなかったが、複数の免疫関連遺伝子において homozygous あるいは heterozygous な variation が見つかった。EBV 陽性の B リンパ球増殖を示す IgG2 サブクラス欠損症の患者で *PIK3CD* 遺伝子の E1021K 変異が証明され、activated *PIK3CD* syndrome であることが判明した。CAEBV 患者血漿中では EBV がコードする microRNA である miR-BART2-5p と miR-BART5 が増加しており、バイオマーカーとして応用できる可能性がある。EBV 感染 T/NK 細胞の増殖において、NF- κ B, AID, EBV miR-BART9 などが重要な役割を果たすことが示された。HSP90 阻害薬の 17AAG と radicicol、HMG-CoA 還元酵素阻害剤 Simvastatin、核酸誘導体 S-FMAU、NF- κ B 阻害剤 bortezomib などは EBV 感染 T/NK 細胞の増殖を阻害することから、CAEBV 治療薬候補として有望であると考えられた。造血幹細胞移植を受けた CAEBV の 7 症例を後方視的に検証したところ、移植時に病勢が活動性であった 5 例は全例死亡し、非活動性であった 2 例は生存していることから、移植時の病勢が移植の成績に大きく影響すると考えられた。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *pathogens* 2: 153-176, 2013.

2) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current studies on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatrics International*, 2014, in press.

3) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr virus infection and pathogenesis in humanized mice. *Immune Network*, 2014, in press.

4) Arai A, Yamaguchi T, Komatsu H, Imadome K, Kurata M, Nagata K, Miura O. Infectious mononucleosis accompanied by clonal proliferation of EBV-infected cells and by the infection on CD8-positive cells. *Int J Hematol*, 2014 in press.

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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)

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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

15) 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

16) Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med* 51: 777-782, 2012.

17) Yang X, Wada T, Imadome K, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae* 2012, 3:1.

18) Imadome K, Fukuda A, Kawano F, Imai Y, Ichikawa S, Mochizuki M, Shigeta T, Kakiuchi T, Sakamoto S, Kasahara M,

Fujiwara S. Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers. *Pediatr Transplant*. 2012 Nov;16(7):748-57.

19) Arai A, Nogami A, Imadome K, Kurata M, Murakami N, Fujiwara S, Miura O. Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- α , and IFN- γ levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy. *Int J Hematol* 96(5): 669-673, 2012.

20) 内田慧美、本間りこ、五十嵐愛子、倉田盛人、今留謙一、大本英次郎、三浦修、新井文子. 血漿中 EBV-DNA 量を経時的に測定した EBV 陽性 Hodgkin リンパ腫. *臨床血液*, 53(1):87-91.2012.

2. 著書・総説

1) 新井文子. EB ウイルス陽性リンパ腫の発症機構. *最新医学* 68:48-55, 2013

2) 新井文子. 慢性活動性 EBV 感染症 Chronic active EBV infection (CAEBV) とわれてきた疾患 ~EBV 陽性 T,NK リンパ増殖症 EBV-T/NK-LPDs~. *成人病と生活習慣病* 43:1073-78, 2013.

3) 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.

4) 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 「基本編ー原理と基本知識ーリアルタイム 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

5) 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 「実践編ープロトコールを中心にー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

3. 学会発表 (国際学会)

1) Fujiwara S. Reproduction and Analysis of Epstein-Barr Virus Pathogenesis in Humanized Mice. 4th International Workshop on Humanized mice. Sep 30, 2013, Seoul.

2) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Diseases in Humanized Mice. Fall Conference of the Korean Association of Immunologists. Nov 8, 2013.

3) Matsuda G, Imadome K, Yajima M, Ochiai N, Mochizuki M, Kawano F, Shimizu N, Komano J, Yamamoto N, Fujiwara S. A humanized mouse model of cell-mediated immunotherapy against EBV-associated lymphoproliferative disorder. 38th Annual International Herpesvirus Workshop, Jul 20-24, 2013, Grand Rapids.

4) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Honami Komatsu, Yukino Chiba, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. NF- κ B is a potential molecular target of EBV-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorders. The 18th Congress of European Hematology Association Jun 15, 2013, Stockholm.

5) 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

6) 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,

7) Fujiwara S. Mouse Models of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. 1st Samsung Humanized Mice Symposium, April 14, 2012, Seoul.

8) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models of Chronic Active EBV Infection and EBV-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Reveals a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. VII. International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs. 2012.2.4-6 Tokyo.

9) Kimura H. Chronic active Epstein-Barr virus infection and related diseases in Japan. Asian Hematopathology Symposium, Soul, Jan 29, 2012

(国内学会)

1) 今留謙一、松田剛、川野布由子、千葉祐規乃、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. 第61回日本ウイルス学会学術集会、

2013年11月11日、神戸.

2) 堀野雅人、今留謙一、今井耕輔、王路丹、松田剛、浜崎霞、小松穂菜実、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBVはT、NK細胞に感染後AID発現とそれによる遺伝子変異蓄積をもたらす腫瘍発症に寄与する. 第75回日本血液学会学術集会、2013年10月11日、札幌.

3) 王路丹、今留謙一、小松穂菜実、福田哲也、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBVの感染によりT、NK細胞ではIL-2の存在下CD137発現が誘導され細胞生存が亢進する. 第75回日本血液学会学術集会、2013年10月11日、札幌.

4) 小松穂菜実、今留謙一、王路丹、倉田盛人、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV陽性T、NK細胞はFOX-p3を発現し制御性T細胞同様T細胞の増殖を抑制する. 第75回日本血液学会学術集会、2013年10月11日、札幌.

5) Ayako Arai, Morito Kurata, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. EBV induces AID expression in T or NK cells leading to mutagenesis and development of lymphoma 第72回日本癌学会総会シンポジウム 2013年10月、横浜.

6) 今留謙一. EBV-T/NK-LPD (CAEBV, EBV-HLH etc.)の病態と診断. 第75回日本血液学会教育講演 2013.10.11, 札幌.

7) 藤原成悦. EBウイルス関連疾患の病態を再現するモデルマウス. 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会「感染・免疫・炎症・発癌」. 2012年6月8日、札幌.

8) 藤原成悦. EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患の病態を再現するモデルマウス. 第19回ヘルペス感染症フォーラム、2012年8月24日、札幌.

9) 仁多美奈子、山本正英、今留謙一、藤

原成悦、三浦修、新井文子. Chronic active Epstein-Barr virus infection 成人例に対する骨髄非破壊的前処置を用いた造血幹細胞移植成績. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会 2012 年 2 月 24-25 日 大阪.

10) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Ayako Nogami, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. Inflammatory cytokines can be molecular targets for treatment of CAEBV. 第 74 回日本血液学会総会、2012 年 10 月 18-20 日、京都.

11) Ludan Wang, Ken-Ichi Imadome, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. EBV infection enhances T-cell adhesion and survival contributing to EBV-T-LPD development. 第 74 回日本血液学会総会、2012 年 10 月 18-20 日、京都.

12) 松田剛、今留謙一、矢島美彩子、落合央、望月雅司、川野布由子、山田千尋、今井由美、瀧崎霞、浅田恵理子、原口摩耶、千葉祐規乃、清水則夫、駒野淳、山本直樹、藤原成悦. ヒト化マウスを用いた EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 14 日、大阪.

13) 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

14) 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

15) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

3) 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に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

4) 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

研究要旨

慢性活動性 Epstein-Barr Virus 感染症、Chronic active EBV infection (CAEBV) は非常にまれな疾患であるが、周知に従い、報告例は増加している。本研究ではその発症機構解明と新規治療法開発を目的として以下を解析した。

① 発症機構の解明

EBV の T 細胞腫瘍化への関与を解明するため *in vitro* での EBV の T 細胞への感染実験を行い、以下の結果を得た。EBV 感染によって T 細胞では NF- κ B が活性化し apoptosis が抑制された。また Activation-induced cytidine deaminase の発現が誘導され *cMyc* 遺伝子の変異が亢進した。以上から EBV 感染によりもたらされる細胞の不死化と変異の導入が、T 細胞においても腫瘍発症に関与することが示唆された。

② 病態の解明（腫瘍か、炎症か）

CAEBV 及び EBV 陽性 T/N K リンパ増殖症の疾患概念を検証するため、症例の後方視的解析を行った。急性期症状が 2 か月以上遷延した伝染性単核球症の症例を検討したところ、EBV の T 細胞への感染と病変部への浸潤に加え、感染細胞のクローナルな増殖を認めた。1 年を経て自然軽快し感染細胞も検出されなくなった。このことから、従来の CAEBV の診断指針を満たす症例の中には、EBV 陽性 T/N K リンパ増殖症という腫瘍として扱うべき症例がある一方で、急性感染症としての経過を取る例もあり、適切な治療のためには両者の明確な鑑別が必要であると考えられた。

③ 治療法の開発

CAEBV に対する当科の造血幹細胞移植治療施行例の後方視的検証を行った。7 例中 5 例で移植後臨床症状の改善と、末梢血中の EB ウイルス量の減少を認めた。移植時に活動性の病変を有した 2 例は移植後早期に死亡した。死因は病勢の悪化と敗血症性ショックであった。移植時の病勢と成績は関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性活動性 EBV 感染症、Chronic active Epstein-Barr Virus infection (CAEBV) は、伝染性単核球症 Infectious mononucleosis (IM) 様の慢性炎症症状が持続する疾患として 1978 年に報告されたが、1988 年に同疾患には T 細胞に EBV が感染し、かつクローナルに増殖している症例があることが報告された。それを皮切りにその後も同様の報告が相次ぎ、現在 CAEBV は T/NK 細胞性腫瘍の一つとしての位置付が提案されている。

細胞のクローン性増殖と多臓器浸潤を伴い致死経過をとるという報告は、CAEBV が腫瘍であることを裏付ける一方で、従来の診断指針による CAEBV 症例の中には自然軽快し感染症としての経過をとる例も存在する。CAEBV は感染症か、腫瘍か、その疾患概念はまだ未確立である。

本研究では、内科臨床医の立場から上記の問題を解決するために①発症機構の解明、②病態の解明（腫瘍か、炎症か）③治療法の開発の 3 つをテーマとして研究を行った。

B. 研究方法

① 発症機構の解明

解析には EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞株 (SNT8,13,15,16, SNK6: 清水則夫博士より供与)、および CAEBV 患者の末梢血から磁気ビーズを用いて分離した EBV 感染細胞を用いた。対照には EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株および健常者末梢血リンパ球を用いた。In vitro での EBV 感染は EBV 陽性細胞 B95-8 の培養上清から抽出した EBV を MOLT4 培養液に加え感染させて行った。

② 病態の解明

研究期間内に当科で経験した EBV 感染症の症例を解析した。

④ 治療法の開発

2009 年から 2011 年まで当施設で治療した 7 例を対象とし、経過を後方視的に解析した。CAEBV は 1. 血球中 EBV DNA が $1 \times 10^{2.5}$ コピー/ μgDNA 以上、2. EBV 感染細胞が T 細胞か NK 細胞、3. 6 ヶ月以上持続する伝染性単核球症様症状を有する、4. 感染細胞が単クローン性である、の 1-4 を満たすものとした。

(倫理面への配慮)

以上の研究は東京医科歯科大学倫理委員会で承認され(臨床試験は東京医科歯科大学医学部附属病院施設内審査委員会の承認、患者の文書による同意を患者の同意を得て施行した。)

C. 研究結果

① 発症機構の解明

EBV 感染によって NF- κ B の構成分子である p52, p50, RelA, RelB の核内移行と DNA 結合能が亢進した。また EBV 感染により血清除去および etoposide 投与による apoptosis が抑制された。Bortezomib 処理は EBV 感染 T,NK 細胞の p52, p50, RelA, RelB の核内移行を抑制すると同時に apoptosis を誘導した。さらに EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症モデルマウスに対し

Bortezomib を投与すると末梢血中の EBV-DNA 量が減少した。以上は 2013 年、第 18 回欧州血液学会年次総会で発表した。

EBV 感染によって SNT8、SNT13、SNT15、SNT16、SNK6 の 5 細胞、および CAEBV 患者 12 例 (CD4 感染型 5 例、CD8 感染型 3 例、CD56 感染型 4 例) から分離した EBV 陽性細胞において、遺伝子に能動的に変異を導入する蛋白質である Activation-induced cytidine deaminase (AID) の発現が mRNA および蛋白質レベルで認められた。また MOLT4 細胞および臍帯血由来 T 細胞に in vitro で EBV を感染させると AID の発現亢進と同時に cMyc 遺伝子の変異塩基数が増加することが Hisec2000 を用いたシーケンス解析で認められた。以上は 2013 年、第 75 回日本血液学会総会、第 72 回日本癌学会総会および第 55 回米国血液学会年次総会で発表した。

② 病態の解析

発熱、肝障害、リンパ節腫脹が 2 か月以上遷延した IM の症例を詳細に解析したところ、EBV の T 細胞への感染と肝臓への浸潤に加え、末梢血 EBV-terminal repeat サザンブロッティング解析において感染細胞のクローナルな増殖を認めた。1 年を経て自然軽快した。本例は一過性の経過から重症 IM と考えたが従来の CAEBV の診断指針を満たし EBV-T,NK-LPD との鑑別は検査所見からは困難で臨床経過での判断が必要であった。以上は Int J Hem 誌 (原著論文 2 in press) で発表した。

③ 治療法開発

CAEBV 成人例に対する非血縁同種造血幹細胞移植の有効性を後方視的に検討した。患者は年齢は 20 歳から 62 歳。女性 5 例、男性 2 例。EBV 感染細胞は CD4、CD8、CD56 陽性細胞がそれぞれ 3 例、2 例、2 例。移植時病勢は非活動性 5 例、活動性 1 例 (発熱)、進行性 1 例 (皮膚および筋への浸潤) であった。移植は非血縁骨髄 6 例、臍帯血 1 例で、HLA は全アリ

ルー一致5例、血清型一致で1アレル(DR)不一致1例。臍帯血例は3アレル(A、B、DR)不一致であった。前処置はFlu+Mel+TBI 3例、Flu+Mel+ATG 4例で、GVHD予防はFKかCsA+短期MTXを用いた。移植時活動性、進行性であった2例はそれぞれ敗血症、病気進行で移植後12日、46日に死亡。非活動性5例は移植後観察期間6~39か月で全例寛解した。ATG使用3例は移植後2週~2か月後に血中EBV DNAが上昇した。感染細胞はいずれもドナー由来B細胞で、Rituximab投与で全例EBVは陰性化した。2例でEBV特異的ドナーCTLを確認した。以上は第34回日本造血細胞移植学会で発表した。

D. 考察

大島らはEBVが感染したT/NK細胞では遺伝子変異が蓄積し、オリゴクローナルからモノクローナルな増殖を来した結果、EBV-T/NK-LPD_s、リンパ腫発症にいたる、とする発症モデルを提唱している。今回の研究結果からEBV感染によりもたらされる細胞の不死化と変異の導入がTリンパ腫発症に関与することが示唆され、大島らの発症モデルが裏付けられたと考えられる。

CAEBVという病名は、本疾患をEBVの感染症としてとらえたものである。本研究結果からその中には何らかの原因で重症化したIMと、進行する致死的経過をとりうる腫瘍であるEBV-T/NK-LPDが含まれることが示された。適切な診療のためには両者を正しく鑑別することが必要である。今後はIM重症化やEBV-T/NK-LPD発症の背景に存在する因子や、それぞれに特徴的な所見、バイオマーカーの確立によるより迅速、正確な診断の開発が必要である。

CAEBVに対する治療について、骨髄非破壊の前処置による造血幹細胞移植が成人例に対しても有効であることが示された一方、移植前

の病状コントロールが必要であることも明らかになった。近年は高齢者の症例も増加しており、全身状態不良例も合わせすべての症例が移植の適応になるわけではない。今後、有効な薬物療法の開発は急務である。

E. 結論

EBVはB細胞腫瘍のみならずT/NK細胞腫瘍の原因にもなりうると考えられた。EBV陽性T/NK細胞、という疾患はCAEBVの一部として独立して扱う必要があり、さらなる病態解明と治療法の開発が必要である。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 刊行物

原著論文

1) Wang L, Sato-Otsubo A, Sugita S, Takase H, Mochizuki M, Usui Y, Goto H, Koyama T, Akiyama H, Miura O, Ogawa S, Arai A. High-resolution genomic copy number profiling of primary intraocular lymphoma by single nucleotide polymorphism microarrays. *Cancer Science*, 2014 in press.

2) Arai A, Yamaguchi T, Komatsu H, Imadome K, Kurata M, Nagata K, Miura O.

Infectious mononucleosis accompanied by clonal proliferation of EBV-infected cells and by the infection on CD8-positive cells. *Int J Hematol*, 2014 in press.

3) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current studies on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan.

Pediatrics International, 2014, in press.

4) 福田祥子、神田紗也香、高瀬博、小林大輔、新井文子、望月學

急速に進行した劇症の原発性眼内リンパ腫の一例

眼科臨床紀要 2014 in press.

5) Yagi K, Yamamoto K, Umeda S, Abe S, Suzuki S, Onishi I, Kirimura S, Fukayama M, Arai A, Kitagawa M, Kurata M. Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells. *Histopathology*. 62:414-20. 2013.

6) Arai A, Imadome K, Wang L, Wu N, Kurosu T, Wake A, Yamamoto H, Ota Y, Harigai M, Fujiwara S, Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation

Int Medicine,51(7):777-82.2012

7) 内田慧美、本間りこ、五十嵐愛子、倉田盛人、今留謙一、大本英次郎、三浦修、○新井文子

血漿中 EBV-DNA 量を経時的に測定した EBV 陽性 Hodgkin リンパ腫

臨床血液, 53(1):87-91.2012

8) 山本 正英, 桑川 華恵, 佐々木 宏治, 村田 諭孝, 大木 学, 黒須 哲也, 福田 哲也, ○新井文子, 村上 直己, 三浦 修

再生不良性貧血の経過中に薬疹に伴い生じた著明な反応性形質細胞増加

臨床血液 53(5):526-30, 2012

9) Arai A, Nogami A, Imadome KI, Kurata M, Murakami N, Fujiwara S, Miura O.

Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- α , and IFN- γ levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy. *Int J Hematol*. 2012 Nov;96(5):669-73.

著作

1) 新井文子. PLL の診断と治療. *Diagnosis and treatment of PLL*. *血液内科*.66:351-358, 2013

2) 新井文子. EB ウイルス陽性リンパ腫の発症

機構. *最新医学* 68:48-55, 2013

3) 新井文子.慢性活動性 EBV 感染症 Chronic active EBV infection (CAEBV) と言われてきた疾患 ～EBV 陽性 T,NK リンパ増殖症 EBV-T/NK-LPDs～. *成人病と生活習慣病* 43:1073-78, 2013

4) 新井文子. 血液疾患 ポケットサイズのステロイド診療マニュアル

新興医学出版社 (宮坂信之) 2013年3月31日 p113-121

5) 新井文子.

フローサイトメトリー、染色体分析、FISH、遺伝子診断

腫瘍病理鑑別診断アトラス 造血器腫瘍 第一部 検鏡前の確認事項 I 骨髄評価のための基礎知識 文光堂 (定平吉都、北川昌伸)

2013年5月29日 p23-33

6) 新井文子

慢性活動性 EB ウイルス感染症 Chronic active EBV infection (CAEBV) 正しい診断のために内科医が知っておくべき事 内科, 110, p 263-266 南江堂 2012

7) 新井文子

多発性骨髄腫 疾患別看護課程 医学書院 p 761-765 佐藤千史/井上智子編 2012

2. 学会発表

学会発表

1) 堀野雅人, 王路丹, 今留謙一, 市川理子, 藤原成悦, 三浦修, 新井文子

慢性活動性 Epstein-Barr Virus 感染症に対する高脂血症治療薬 simvastatin の抗腫瘍効果の検討

第 23 回 EB ウイルス感染症研究会 2013年3月16日 東京

2) Ayako Arai, Masato Horino, Wang Ludan, Ken-Ichi Imadome, Kasumi Hamasaki, Morito Kurata, Ayako Ichikawa, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

Simvastatin Induces Apoptosis in EBV-Positive T- or NK-Cell Lymphoproliferative Disorders and Anti-Tumor Effects in Xenograft Models

The 4th JSH International Symposium May 24, 2103, Matsuyama

3) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Honami Komatsu, Yukino Chiba, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

NF- κ B is a potential molecular target of EBV-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorders

The 18th Congress of European Hematology Association Jun 15, Stockholm

4) 内田慧美 大谷悠祐 岡田啓五 秋山弘樹, 渡邊健 坂下千瑞子 長尾俊景 山本正英 福田哲也 黒須哲也 新井文子 三浦修

心外膜への浸潤を認めた enteropathy-associated T cell lymphoma

第 170 回日本血液学会例会 7 月 11 日 東京

5) Ayako Arai, Morito Kurata, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura.

EBV induces AID expression in T or NK cells leading to mutagenesis and development of lymphoma

第 72 回日本癌学会総会 シンポジウム 10 月 4 日 横浜

6) Masato Horino, Ken-Ichi Imadome, Kohsuke Imai, Ludan Wang, Go Matsuda, Kasumi Hamazaki, Honami Komatsu, Morito Kurata, Tetsuya Kurosu, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai,

EBV induces AID expression in T or NK cells leading to mutagenesis and development of lymphoma

第 75 回 日本血液学会総会 10 月 12 日 札幌

7) Ludan Wang, Ken-ichi Imadome, Tetsuya Fukuda, Honami Komatsu, Morito Kurata, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai

CD137 is induced by EBV in the presence of IL-2 in T or NK cells and mediates a survival signal

第 75 回 日本血液学会総会 10 月 12 日 札幌

8) Honami Komatsu, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Morito Kurata, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai
EBV-positive cells from CAEBV express FOXP3 and suppress the proliferation of the effector T cells

第 75 回 日本血液学会総会 10 月 12 日 札幌

9) Hiroki Akiyama, Keigo Okada, Toshikage Nagao, Masahide Yamamoto, Tetsuya Kurosu, Tetsuya Fukuda, Ayako Arai, Osamu Miura.

First line immunosuppressive therapy with horse or rabbit ATG for aplastic anemia

第 75 回 日本血液学会総会 10 月 12 日 札幌

10) Shunsuke Yui, Hiroki Yamaguchi, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai, Toshio Asayama, Asaka Kondo, Keiichi Moriya, Kazutaka Nakayama, Kazuo Dan, Koiti Inokuchi

A case report for EBV-positive

T-lymphoproliferative disease developed after cord blood transplantation for AML.

第 75 回 日本血液学会総会 10 月 12 日 札幌

11) Ayako Arai, Masato Horino, Ken-Ichi Imadome, Kohsuke Imai, Ludan Wang, Go Matsuda, Kasumi Hamazaki, Honami Komatsu, Morito Kurata, Tetsuya Kurosu, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

Epstein-Barr virus Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in T or NK Cells Leading to Mutagenesis and Development of Lymphoma

55th Annual meeting of American Journal of Hematology

December 7, New Orleans

12) 今留謙一、矢島美沙子、○新井文子、中澤温子、川野由布子、大賀正一、森尾友宏、清水則夫、伊藤守、山本直樹、藤原成悦

第 21 回 EB ウイルス感染症研究会 2012 年
3 月 17 日 東京

EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウス
の作成と解析

13)新井文子

慢性活動性EB ウイルス感染症は悪性腫瘍か？

第 52 回日本リンパ網内系学会総会 シンポジ
ウム V リンパ増殖性疾患：良性か？悪性か？

2012 年 6 月 16 日 福島

14)仁多美奈子、山本正英、今留謙一、藤原成
悦、三浦修、○新井文子

Chronic active Epstein-Barr virus infection 成人例
に対する骨髄非破壊的前処置を用いた造血幹
細胞移植成績

第34 回日本造血細胞移植学会総会2012年2月
24日 大阪

15)岡田啓五、○新井文子、秋山めぐみ、秋山弘
樹、渡邊大介、長尾俊景、山本正英、黒須哲也、
福田哲也、東田修二、小山高敏、村上直巳、三
浦修、小児科 森尾友宏

高 IgE 症候群に合併し、骨髄移植後早期に再発
し肺胞蛋白症を併発した急性骨髄性白血病

168 回日本血液学会例会

2012 年 7 月 28 日東京

16) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Ludan
Wang, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama,
Ayako Nogami, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu
Miura

Inflammatory cytokines can be molecular targets
for treatment of CAEBV.

第 74 回日本血液学会総会 2012 年 10 月 21 日
京都

16) Ludan Wang, Ken-Ichi Imadome,
Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi
Fujiwara, Osamu Miura, ○Ayako Arai

EBV infection enhances T-cell adhesion and
survival contributing to EBV-T-LPD development

第 74 回日本血液学会総会 2012 年 10 月 20 日
京都

H. 知的財産権の出願・取得状況
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 H24~H25 年度—難治等(難)—一般—046)
総合研究報告分担研究報告書

「CAEBV モデルマウスを用いた治療薬候補の評価に関する研究」

研究分担者 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 感染防御研究室室長

研究要旨

慢性活動性 EB ウイルス感染症(CAEBV)の疾患モデルマウスの作製を行い、病態発現機構の解明と新規治療薬の開発を目指した。

H24~H25 年度は おもに CAEBV に対する新規治療薬候補である 3 剤(OKT4, Bortezomib, S-FMAU)についての評価研究をおこなった。それぞれの薬剤候補を CAEBV モデルマウスに投与しその効果を検討した。

①OKT4 では 1000 copies/ μ gDNA 以上の減少が全てのマウスで見られ、陰性化したマウスもいた。②Bortezomib ではマウス末梢血中の EBV ゲノム量の 10 copies/ μ gDNA 以上の減少、③S-FMAU では 100 copies/ μ gDNA 以上の減少が示された。

今回は単剤での評価をおこなったが、2 剤以上の併用も今後検討していく予定である。また、上記 3 剤以外の候補についても検討していく予定である。

A. 研究目的

これまで我々は、慢性活動性EBウイルス (EBV)感染症(CAEBV)やEBV関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)などの難治性EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患(EBV-T/NK LPD)のモデルマウスの作製と病態発現解析を進めてきた。

作製した EBV-T/NK LPD モデルマウスのこれまでの研究により、1) CD4 タイプでは感染細胞である CD4 細胞のみを移植した場合にも生着する 2) CD8, $\gamma\delta$ -T, NK タイプは PBMC から CD4 細胞を除去したものを移植すると感染細胞は生着しない 3) 4 タイプ全てにおいて PBMC から感染細胞の分画を除去すると感染細胞の生着しないことが明らかとなった。そ

こでこれらのモデルマウスにおいて、新規治療薬候補の評価をおこなった。

CAEBV は感染細胞が存在する分画の CD4, CD8, $\gamma\delta$ -T, NK タイプの 4 つのタイプに分類されるが、この全てのタイプのモデルマウスを作製し、in vivo における新規治療薬候補の評価を行い、新規治療薬の開発を目指した。また、モデルマウスを使用し病態発現のメカニズムの解明を進めた。

B. 研究方法

(1) CD4 を標的とした治療効果について OKT4 (抗 CD4 抗体)、Bortezomib(NF κ B 阻害剤)、S-FMAU(EBV-TK により特異的にリン

酸化され細胞毒性を発揮する薬剤)をそれぞれのタイプ(CD4, CD8, $\gamma\delta$ -T, NKタイプ)のモデルマウスに投与し、その効果と影響を検討した。

- (2) CAEBV モデルマウスの作製は、CAEBV 患者の末梢血から PBMC を分離し、 1×10^6 細胞(PBMC)をマウス尾静脈より移植する。移植後毎週、移植マウスの採血をし、末梢血中の EBV-DNA 定量解析と FCM 解析によるヒト細胞の生着および増殖をチェックする。感染細胞を含めたヒト細胞の増殖と末梢血 EBV-DNA 量が 1×10^4 copies/ μ gDNA 以上になった時点で① S-FMAU をマウス尾静脈より 80mg/kg/day、5 日連続投与する。② Bortezomib をマウス尾静脈より 1.67g/kg/週 2 回、3 週間投与する。③ OKT4 をマウス尾静脈より 2 日連続で 1 回 100 μ g 投与する。その後は通常週 1 回/週で、体重減少が 2g 以上ある時に限り 2 回/週 (2 日連続投与) する。それぞれの薬剤投与後は毎週採血し、末梢血中の EBV-DNA 定量解析と FCM 解析による細胞表面抗原マーカー解析を行なう。コントロール群には PBS、アシクロビル(ACV)を投与する。採血に当たっては、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得ており、本研究への参加を求める前に、患者本人、あるいは保護者、あるいは両者に対して文書および口頭により研究内容等の十分な説明をおこない、自由意思により参加の有無を決定するための環境を整える。また、同意後も自由に撤回できることを説明する。検体は取得する医療機関担当者に

より連結可能匿名化され、匿名化照合表は施錠のうえ厳重に保管される。従って、研究者には提供者の個人情報には伝えられず、その漏洩の危険はない。学会・論文発表の際には、個人を特定する情報を含めないため、プライバシーは保護される。

C. 研究結果

①OKT4: 患者 PBMC(CD8 タイプ)投与 4 週目 1×10^6 copies/ μ gDNA で OKT4 抗体の投与を開始した。OKT4 抗体の 2 日連続投与により末梢血中の CD4⁺T 細胞は消滅する。PBS 投与マウスは 6,7 週で死亡し、EBV-DNA 量も 10^7 copies/ μ gDNA 以上になった。一方、OKT4 抗体を投与したマウスでは、末梢血 EBV-DNA 量がおおよそ 10^2 copies/ μ gDNA の減少が認められ、生存も 15~19 週まで延長した。末梢血中の EBV ゲノム量が増加に転じてくる時期の末梢血の FCM 解析結果を見ると僅かであるが CD4⁺T 細胞が検出された。OKT4 抗体投与マウスを解剖し FCM 解析を行った。その結果、脾臓・肝臓に CD4⁺T 細胞が検出され、感染細胞分画も検出された。NK タイプや $\gamma\delta$ -T タイプでも同様の結果を得ている。②Bortezomib: 患者 PBMC (NK タイプ)の CAEBV モデルマウスを作製し、マウス末梢血中の EBV-DNA 量が 10^4 copies/ μ gDNA 以上になった時に Bortezomib、PBS、AcV をマウス尾静脈より投与し、マウス末梢血中の EBV ゲノム量の変化を検討した (それぞれの薬剤に対し 8 匹ずつ投与し検討)。(1)PBS、AcV 投与マウスでは末梢血中 EBV-DNA は上昇を続けたが、

Bortezomib 投与マウスでは投与開始時の末梢血中 EBV-DNA 量よりも減少した。最大で 1/100 以上の EBV-DNA 減少が示された。最終的には 1/10~1/100 の減少が示された。(2)Bortezomib、PBS、AcV 投与マウスでは Bortezomib 投与マウスにおいて体重減少が一番抑えられた。PBS、AcV 投与マウスでは体重減少の変化に差は認められなかった。(3)モデルマウス解剖時における各臓器中（肝臓、脾臓、腎臓、副腎、小腸、肺、心臓、脳、骨髄）の EBV-DNA 量を定量解析した結果、それぞれの薬剤による EBV-DNA 量に顕著な差は示されなかった。③ S-FMAU: 患者 PBMC(CD4 タイプ、CD8 タイプ、NK タイプ)モデルマウスでそれぞれ 5 匹ずつおこなった。全てのタイプで投与前から末梢血 EBV-DNA 量が 1/100~1/1000 の減少が見られ、解剖時の臓器中 EBV-DNA 量も多く臓器で減少しており、感染細胞の臓器浸潤抑制の効果も示された。

D. 考察

OKT4 抗体を投与したマウスの生存延長、体重減少の阻止と EBV ゲノム量の減少により非感染 CD4⁺T 細胞の除去による感染 T/NK 細胞増殖阻害効果は明らかである。コントロールの PBS 投与マウスは末梢血中の EBV ゲノム量は減少することなく、上昇し 8 週目で 2 匹とも死亡している。一方、OKT4 抗体投与マウスの寿命は毛並みが悪く運動能も低下した所で解剖しているが、2 倍以上の生存を示している。EBV ゲノム量が検出感度以下にならないのは、臓器に浸潤している感染細胞が

OKT4 抗体の影響が低く生き残っている CD4⁺T 細胞のヘルプにより増殖し、末梢血中に供給される可能性が考えられる。今回、10⁶ copies/μgDNA で OKT4 抗体の投与を開始したが、現在患者で初診時に見つかる時が多いゲノム量である 10⁴ copies/μgDNA レベルでの投与開始実験を行なっている。マウスの中では末梢血ゲノム量が陰性になるものも出始めている。

Bortezomib によるモデルマウス末梢血中の EBV 感染細胞増殖抑制効果は示された。コントロールとして投与した PBS、AcV は EBV 感染細胞増殖を抑えることはできなかったのに対し、Bortezomib 投与マウスでは投与時と比較して末梢血中 EBV-DNA 量が 1/100 に減少し感染細胞増殖は抑制されていた。また、モデルマウス内の EBV 感染細胞増加に伴いマウス体重の減少・運動能低下・マウスの毛ヅヤ劣化が見られるが、Bortezomib 投与マウスではこれら症状は見られるものの、AcV、PBS と比較して遥かに少なかった。EBV 感染細胞のマウスに及ぼすマイナスの影響が Bortezomib により軽減されていることが示されたと言える。しかし、CAEBV 末期患者でも度々見られる感染細胞の臓器浸潤に対する抑制効果 Bortezomib 投与マウスで示されなかった。Bortezomib、PBS、AcV 投与マウス全てにおいて各臓器中（臓、脾臓、腎臓、副腎、小腸、肺、心臓、脳、骨髄）の EBV-DNA 量に顕著な差は見られなかった。このことから、Bortezomib は末梢血中の EBV 感染細胞の増殖に対する抑制効果は認められるが、臓器浸潤した感染細胞増殖抑