

制効果は低いと考えられる。今後、**Bortezomib** の投与期間、投与日間隔等を検討し効果のアップを目指す。また、今回はNKタイプでの検討だけであったが、CD4タイプ、CD8タイプ、 $\gamma\delta$ タイプモデルにおいても評価していく。加えて**Boetozomib** 単独でなく、他の薬剤との併用も合わせて検討していく。

S-FMAU を投与したマウスの生存延長、体重減少の阻止と末梢血中および臓器中EBVゲノム量の減少が示されたことで、**S-FMAU** 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、アシクロビル投与マウスは末梢血中のEBVゲノム量は減少することはなく、上昇し投与開始から4週目で死亡するマウスが出た(それぞれ5匹中、CD8タイプ: PBS 2匹, ACV 2匹、NKタイプ: PBS 4匹, ACV 5匹、CD8タイプ: PBS, ACVともに死亡ゼロ)が、**S-FMAU** 投与群では死亡マウスはいなかった。今回、 10^5 copies/ μ gDNA で **S-FMAU** 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 10^4 copies/ μ gDNA レベルでの投与開始実験を行なっている。今後、1.投与期間の検討 2. 一日の投与回数の検討をおこなう。今回開発したモデルマウスを使い、EBVがT細胞、NK細胞に感染して難治性疾患を引き起こすメカニズムの解明と感染機序および病態発現解析を行い新規治療法の開発を進めている。また、合わせて新規薬剤評価への応用も更に行っていく予定である。新規治療薬開発と既存の他疾患使用の治療薬のEBV-T/NK-LPDへの応用を並行して進めていくことが重要であ

り、これら治療薬の評価をモデルマウスで行うことは、前臨床試験としても重要であると言える。

E. 結語

EBVがT細胞やNK細胞に感染して起こる難治性疾患であるCAEBVの新規治療薬としてOKT4, **Bortezomib**, **S-FMAU** の効果が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

① 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 type1 and 2. (* *contributed equally to this work*) Herpesviridae. 2012 Feb 10;3(1):1.

② Uchida E, Honma R, Igarashi A, Kurata M, Imadome K, Omoto E, Miura O, Arai A.

Sequential monitoring of plasma EBV-DNA level in a patient with EBV-positive Hodgkin lymphoma. Rinsho Ketsueki. 2012 Jan;53(1):87-91.

③ 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.

Intern Med. 2012 ;51(7):777-82.

④ 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 Jul 5. 1399-3046

⑤ Iijima K, Yamada H, Miharuru M, Imadome K, Miyagawa Y, Akimoto S, Kobayashi K, Okita H, Nakazawa A, Fujiwara S, Fujimoto J, Kiyokawa N.

ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis

Eur J Immunol. 2012 Sep 4, 42(12). 3405-15.

⑥ Arai A, Nogami A, Imadome K, Kurata M, Murakami N, Fujiwara S, Miura O.

Sequential monitoring of serum IL-6, TNA- α , and IFN- γ levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy.

Int J Hematol. 2012 Sep 16. 96(5),669-73

⑦ Fujiwara S., Matsuda G., Imadome K.

Humanized Mouse Models of Epstein-Barr Virus Infection and Associated Diseases

Pathogens 2013, 2(1), 153-176;

doi:10.3390/pathogens2010153

⑧ Yamamoto N., Nishimura N., Takeuchi M., Ito T., Yokozaki H., Hirase S., Kubokawa I., Mori T., Yanai T., Hayakawa A., Takeshima Y., Nishio H., Matsuo M., Imadome K., Iijima K.

The emergence of CD20-/CD19- tumor cells after rituximab therapy for Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder complicated with

hemophagocytic lymphohistiocytosis

European Journal of Pediatrics 2013,

doi:10.1007/s00431-013-2181-6

2. 学会発表

① EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析 第21回 EBV 感染症研究会 2012 東京
今留謙一、矢島美沙子、新井文子、中澤温子、川野布由子、大賀正一、森尾友宏、清水則夫、伊藤守、山本直樹、藤原成悦

② 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薬剤の評価研究 第9回 EBV 研究会 2012 鳥取

今留謙一、川野布由子、千葉祐規乃、新井文子、中澤温子、大賀正一、森尾友宏、清水則夫、伊藤守、藤原成悦

③ 小児生体肝移植後の EBV ゲノム定量モニタリングの重要性と免疫抑制剤

減量に伴う EBV 特異的 CTL 誘導の検討 第 60 回日本ウイルス学会 2012 大阪

今留謙一、福田晃也、川野布由子、今井由美、望月雅司、山田千尋、重田孝信、坂本靖介、笠原群生、藤原成悦

④ 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 Tokyo

Ken-Ichi Imadome, Misako Yajima, Ayako Arai, Atsuko Nakazawa, Fuyuko Kawano, Sayumi Ichikawa, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, Tomohiro Morio, Shouichi Ohga, Hiroyuki Nakamura, Mamoru Ito, Osamu Miura, Jun Komano, and Shigeyoshi Fujiwara

⑤ 分類不能型免疫不全症に合併した慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) の 1 例

川上由香里、坂本めぐみ、鷺尾健、小倉香奈子、福永淳、錦織千佳子、早川晶、今井耕輔、今留謙一、井上雅美

関西免疫不全症研究会 2013.7.27 神戸

⑥ 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

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、大賀正一、森尾友宏、濱崎霞、原口摩耶、上市裕子、清水則夫、伊藤守、藤原成悦

第 10 回 EB ウイルス研究会 2013.7.12 京都

⑦ 小児肝移植後 EB ウイルス感染症への対策

福田晃也、今留謙一、坂本靖介、佐々木健吾、内田孟、濱野郁美、重田孝信、中澤温子、笠原群生

第 49 回日本移植学会 2013.9.5 – 9.7 京都

⑧ 小児心移植後の移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)

加藤文代、老谷嘉樹、本間哲、今留謙一、杉原茂孝、布田伸一

第 49 回日本移植学会 2013.9.5 – 9.7 京都

⑨ 特徴的な皮疹から EBV 関連皮膚リンパ球増殖症と診断した 2 例

榊真一郎、今留謙一、新関寛徳、余谷暢之、橋本直也、阪井祐一、中舘尚也、石黒精

第 68 回神奈川血液研究会 2013.9.7 横浜

⑩ The regulation of “inflammatory niche” with tumor derived small RNAs.

Natsuko Yamakawa, Kazuaki Yokoyama, Jun Lu, Ken-Ichi Imadome, Toshiki Watanabe, Ryoichi Horie, Katsuto Hozumi, Takashi Yahata, Kiyoshi Ando, Naoya Nakayama, Ai Kotani

第 75 回日本血液学会 2013.10.11 – 10.13 札幌

⑪ EBV-positive cells from CAEBV express FOX-p3 and suppress the proliferation of the effector T cells

Honami Komatsu, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Morito Kurrata, Takatoshi

Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai

第 75 回日本血液学会 2013.10.11 – 10.13 札幌

⑫ CD137 is induced by EBV in the presence of IL-2 in T or NK cells and mediates a survival signal

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

第 75 回日本血液学会 2013.10.11 – 10.13 札幌

⑬ EBV induces AID expression in T or NK cells leading to mutagenesis and development of lymphoma

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

第 75 回日本血液学会 2013.10.11 – 10.13 札幌

⑭ A case report for EBV-positive T-lymphoproliferative disease developed after CBT for AML

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

第 75 回日本血液学会 2013.10.11 – 10.13 札幌

⑮ EBV-T/NK-LPD (CAEBV, EBV-HLH etc.)の病態と診断

今留謙一 第 75 回日本血液学会 教育講演 2013.10.11, 10.13 札幌

⑯ 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

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、大賀正一、森尾友宏、濱崎霞、原口摩耶、上市裕子、清水則夫、伊藤守、藤原成悦

第 56 回日本ウイルス学会 2013.11.10 神戸

⑰ 難聴、発熱で発症し膠原病様症状を呈した慢性活動性 Epstein-Barr virus 感染症 (CAEBV) の 1 例

大谷一博, 野田健太郎, 浮地太郎, 金月勇, 今留謙一, 黒坂大太郎

第 41 回日本臨床免疫学会

2013.11.27-11.29 下関

⑱ EBV 関連リンパ増殖症を契機に明らかとなった、低ガンマグロブリン血症を伴わず、memory B 細胞が減少した 1 男児例

小林千恵, 鈴木涼子, 酒井愛子, 福島紘子, 福島敬, 神保教広, 増本幸二, 里見介史, 野口雅之, 南木融, 中澤温子, 今留謙一, 小野寺雅史, 須磨崎亮

第 55 回日本小児血液がん学会 2013.11.29 – 12.1 福岡

⑲ 特徴的な皮疹から EBV 関連皮膚リンパ球増殖症と診断した 2 例

榎真一郎, 今留謙一、新関寛徳、余谷暢之、橋本直也、阪井祐一、中舘尚也、石黒精

第 55 回日本小児血液がん学会 2013.11.29 -12.1 福岡

⑳ The regulation of “inflammatory niche” with tumor derived small RNAs.

YAMAKAWA Natsuko, IMADOME
Ken-Ichi, HOZUMI Katsuto, ANDO
Kiyoshi, KOTANI Ai

第 42 回日本免疫学会 2013.12.11 –
12.13 幕張

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（総合）研究報告書

難治性 EBV 感染症の早期診断法と新規治療法開発

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

- 1) 慢性活動性 EBV 感染症患者を対象として、血漿中の EBV 特異的 miRNA を定量し、他疾患と比較した。慢性活動性 EBV 感染症群、伝染性単核症群において、それぞれで特徴的に高発現している miRNA が存在したことから、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。
- 2) 難治性 EBV 感染症に対する新規治療法開発のために、小分子阻害剤ライブラリを用いウイルスがん遺伝子である LMP1 の発現を抑制する薬剤を探索し HSP90 阻害剤を同定した。次いで、マウス xenograft モデルを用いて、HSP90 阻害剤が EBV 陽性 NK リンパ腫の増殖・転移を抑えることを確認した。以上より、HSP90 阻害剤は難治性 EBV 感染症の新規治療法として有望であることが示された。

A. 研究目的

Epstein-Barr Virus (EBV) は B 細胞のみでなく T 細胞や NK 細胞に感染し、慢性活動性 EBV 感染症をはじめ、様々な病態を引き起こす。慢性活動性 EBV 感染症は EBV に感染した T 細胞もしくは NK 細胞が短クローン性に増殖する T/NK リンパ増殖性疾患であることが明らかとされている。難治かつ治療法が確立していない本疾患の予後改善のためには、早期診断法と新規治療法の確立が急務である。

初年度である平成 24 年度は新規診断法開発の一環として、ウイルス microRNA (miRNA) に関する研究を行った。慢性活動性 EBV 感染症は時に伝染性単核症や EBV 関連血球貪食症候群との鑑別が難しいことがある。EBV は少なくとも 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。

次年度の平成 25 年度は、新規治療開発のため、まず NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG) マウスに、EBV 陽性 T/NK 細胞株を接種し、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 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、確立した NOG マウスモデルを用い、HSP90 阻害剤の EBV 関連悪性リンパ腫に対する *in vivo* における効果について検討した。

B. 研究方法

- 1) 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。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 EBV 特異的 miRNA を定量した。対象は慢性活動性 EBV 感染症 18 例(男:女=11:7)、伝染性単核症 11 例(男:女=9:5)。対照として EBV 既感染健常成人 (Control) 10 名(男:女=8:2)。慢性活動性 EBV 感染症患者のうち 10 例は T 細胞性、8 例は NK 細胞性であった。採取した血漿 200 μ l 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。

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

次いで、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)

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。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。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。

なお、本研究は名古屋大学医学部の倫理委員会、組換え DNA 実験安全委員会、実験動物委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

1) 患者血清中の EBV 特異的 miRNA の定量: BHRF1 では伝染性単核症群において miR-BHRF1-1 と miR-BHRF1-2 が有意に高発現していた。BART では、慢性活動性 EBV 感染症群において、miR-BART2-5p, miR-BART5 が有意に高発現していた。さらに、慢性活動性 EBV 感染症群を 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。

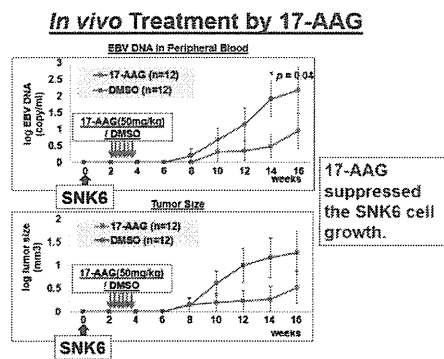
2) EBV 関連リンパ腫 xenograft モデルの作成: 種々の T/NK 細胞株を様々なルートで NOG マウスに接種したところ、節外性 NK/T 細胞性リンパ腫由来で NK 細胞株の SNK6 のみが皮下注により生着した。

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。

3) Xenograft モデルによる HSP90 阻害剤の効果検討: 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。

次に、2) で確立したモデル系を用いて 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。

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 EBV 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 EBV 関連がん（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、慢性活動性 EBV 感染症患者の血漿では同様に、BHRF1 miRNAs の発現量は低かった。

慢性活動性 EBV 感染症群、伝染性単核症群、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 の発現が慢性活動性 EBV 感染症群、伝染性単核症群、対象群の順に高かったことから、慢性活動性 EBV 感染症において 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。

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

1) 慢性活動性 EBV 感染症群、伝染性単核

症群において、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る

2) 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、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, 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. Li Z, Yamauchi Y, Kamakura M, Murayama T, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y. Herpes simplex virus requires PARP activity for efficient replication and induces ERK-dependent phosphorylation and ICP0-dependent nuclear localization of tankyrase 1. *J Virol* 86: 492-503, 2012
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. Luo C, Goshima F, Kamakura M, Mutoh Y, Iwata S, Kimura H, Nishiyama Y. Immunization with a highly attenuated replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant, HF10, protects mice from genital disease caused by herpes simplex virus type 2. *Front Microbiol* 3: 158, 2012
8. Yasuda K, Sugiura K, Ishikawa R, Kihira M, Negishi Y, Iwayama H, Ito K, Kimura H, Kosugi I, Akiyama M. Perinatal cytomegalovirus-associated bullae in an immunocompetent infant. *Arch Dermatol* 148: 770-2, 2012
9. Esaki S, Yamano K, Kiguchi J, Katsumi S, Keceli S, Okamoto H, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y, Murakami S. Diabetic mice show an aggravated course of herpes-simplex-virus-induced facial nerve paralysis. *Otol Neurotol* 33:1452-7, 2012
10. 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
11. 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
 12. Muto Y, Goshima F, Ushijima Y, Kimura H, Nishiyama Y. Generation and characterization of UL21-null herpes simplex virus type 1. *Front Microbiol* 3:394, 2012
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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
24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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
 30. 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. Kimura H. Chronic active Epstein-Barr virus infection and related diseases in Japan. Asian Hematopathology Symposium, Seoul, 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. 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
 7. 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

8. 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

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、感染細胞を細胞死に導くことから慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) に対する効果的かつ安全な治療薬候補として期待される。この S-FMAU の急性 EBV 感染に対する効果とさらなる核酸誘導体および天然物由来化合物のスクリーニングを行った。平成 25 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。

A. 研究目的

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・リンパ腫に移行することが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ったが、依然確実な治療法は確立していない。

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。そのうち 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ると考えられる。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

ロウイルスに対して使用される ganciclovir (GCV) は TK 同様にウイルス由来リン酸化酵素、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。

上記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 に対する有効な治療につながることは議論の余地がない。そのため 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。その中から、EBV-TK によって特異的にリン酸化

され、かつ細胞毒性を示す薬剤 S-FMAU (図 1) を見出している。この薬剤は GCV と比べ 10-100 倍程度 EBV 感染細胞特異的に効果を示し、有望な治療薬のひとつとして今後の開発が望まれる。本研究班では S-FMAU と EBV-TK の発現について検討を行った。

EBV-TK は一部の細胞では遺伝子サイレンシングされており、S-FMAU の効果を発揮することができない。これを解除することは治療成績を飛躍的に伸ばし、また適応拡大にもつながる。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化合物検討も行った。

平成 25 年度からは EBV-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を目的としている。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス： KA13 は IL-2 を添加した RPMI1640 培地を用いて培養した。骨肉腫 143B 細胞は DMEM 培地を使用した。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。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

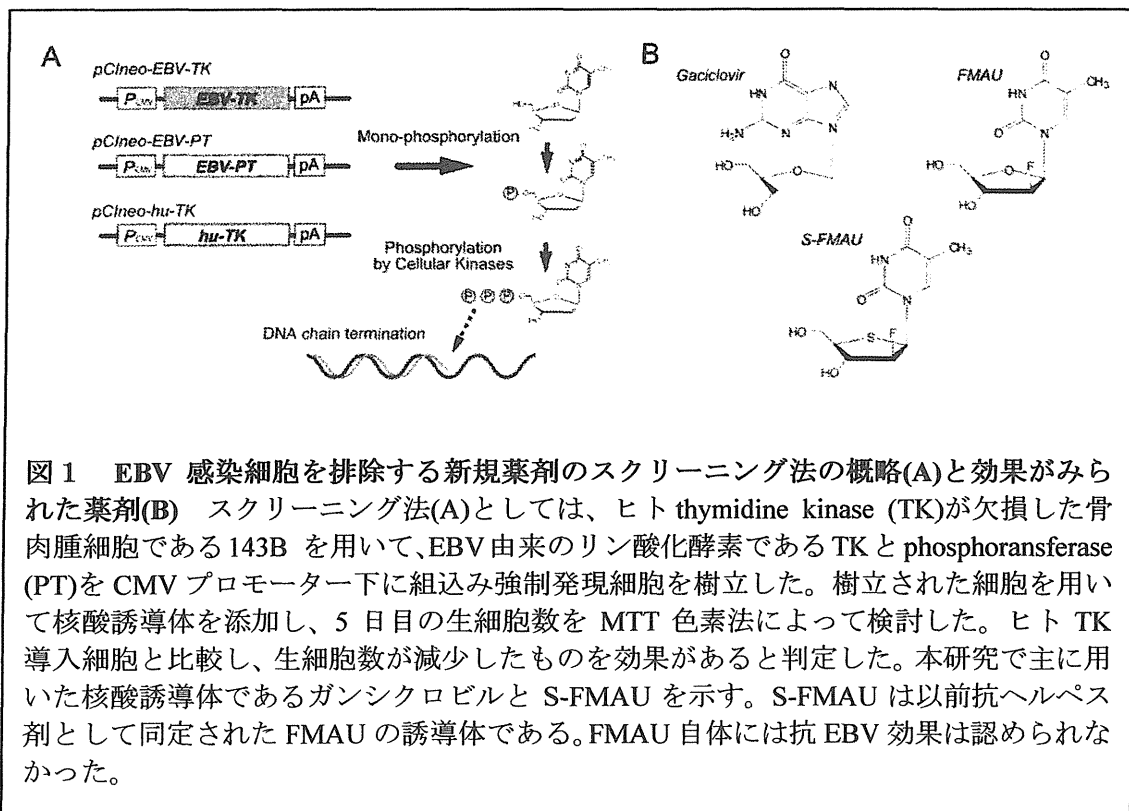


図 1 EBV 感染細胞を排除する新規薬剤のスクリーニング法の概略(A)と効果がみられた薬剤(B) スクリーニング法(A)としては、ヒト thymidine kinase (TK)が欠損した骨肉腫細胞である 143B を用いて、EBV 由来のリン酸化酵素である TK と phosphotransferase (PT)を CMV プロモーター下に組み込み強制発現細胞を樹立した。樹立された細胞を用いて核酸誘導体を添加し、5 日目の生細胞数を MTT 色素法によって検討した。ヒト TK 導入細胞と比較し、生細胞数が減少したものを効果があると判定した。本研究で主に用いた核酸誘導体であるガンシクロビルと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

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 感染によって起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) 東京大学東京大学創薬オープンイノベーションセンターおよび分担研究者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。抗白血病細胞薬剤感受性は、種々の細胞を $10 \times 10^4 / \text{mL}$ に調整し、段階希

釈した化合物 $100 \mu\text{L}$ を加えた 96 well plate に $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、5% CO_2 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。

5) 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。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。

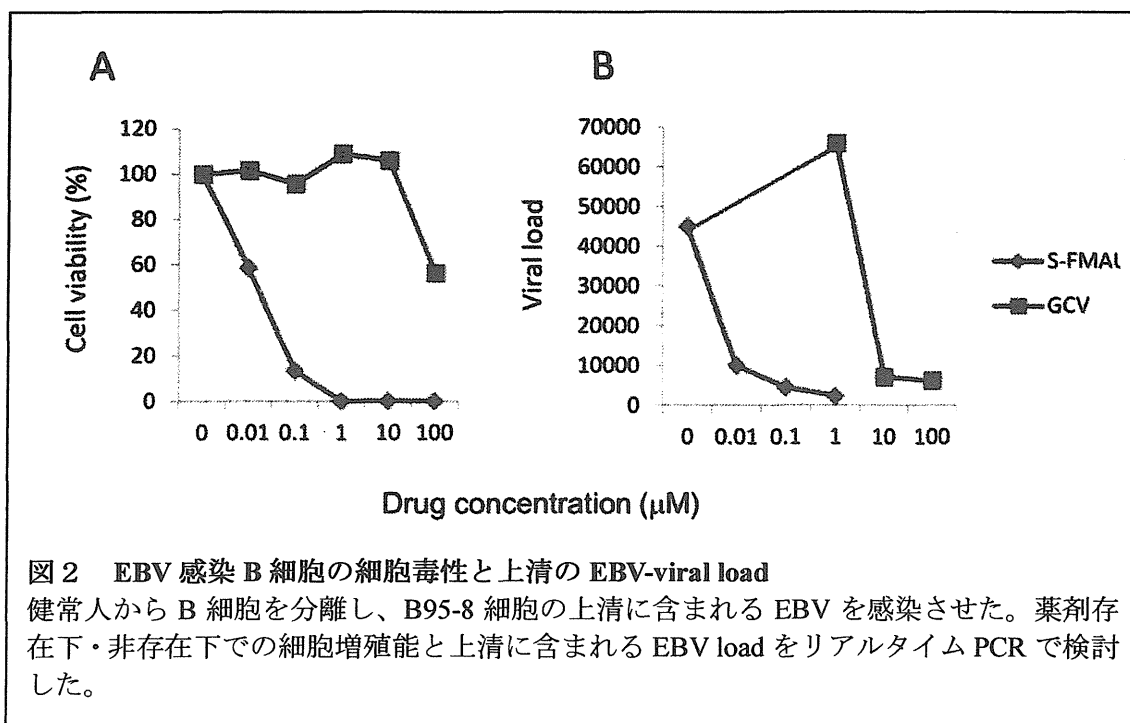


図2 EBV 感染 B 細胞の細胞毒性と上清の EBV-viral load

健常人から 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 load をリアルタイム PCR で検討した。

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 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。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 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)。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)。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) 核酸ライブラリースクリーニング

東京大学創薬オープンイノベーションセンターと分担研究者が保有する核酸誘導体約 800 化合物をスクリーニングした。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) 天然物ライブラリースクリーニング

東北大学大学院薬学研究科保有の天然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 KAI3 を指標とし、SupT1 および MT-2 細胞との比較を行った。0.1 μM 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。

4) 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いない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、酵素的解析を行う予定である。

5) 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特異性の高い薬剤である。また、分担研究者今留謙一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

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。

本研究ではこれまでに 800 を超える化合物をスクリーニングしてきているが S-FMAU 以外に選択性を有する化合物を同定できていない。HSV などであればかなりの核酸誘導体に抗 HSV 効果がある程度認められることから考察すると、おそらく EBV-TK/PT もしくは EBV-DNA polymerase

の基質特異性が高いのではないかと予想される。今後もスクリーニングは継続させる予定である。

一方で EBV-TK 大腸菌発現ベクターを作製し、酵素学的解析から創薬への応用を試みている。今後は大量発現・精製を通して EBV-TK の性状を検討、さらに EBV-TK のプロモーターも解析を進める。これらの研究は 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。

E. 結論

新たな薬剤のスクリーニングを用いて CAEBV 治療薬候補として S-FMAU を見出した。今後も候補薬剤のスクリーニングを継続する。これらの補助として TK の酵素学的検討および遺伝子解析等の基礎研究を行っている。

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* 45:908-915, 2013.
 - 7 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
 - 8 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

- 9 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.
- 10 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.
- 11 Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hirotomo 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・バール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
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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（総合）分担研究報告書

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

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。本研究では、1. CEEBV の確定診断を早期に行なうための迅速検査系の作成と、2. CAEBV の原因細胞である EBV 感染 T/NK 由来の細胞株に発現する BART miRNA の解析を行なった。その結果、1. リアルタイム PCR 法により 60 分程度で簡便に EBV ゲノムコピー数を定量することに見通しがつき、2. CAEBV の原因細胞である EBV 感染 T/NK 細胞が患者体内で維持・増殖するためには、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ことが示された。

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。抗ウイルス剤や抗がん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、近年小児例に加え 30 歳以上の成人例の報告が増えており、幅広い年代により多くの患者が存在していると考えられている。CAEBV の診断基準は EB ウイルス感染症研究会から提唱されており、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 細胞と報告されているおり、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できるが、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、早期に確定診断適切し治療するためには、簡便・迅速・安価な検査法の開発が必要である。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