

201442013A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

(H26-委託（難）一般-013)

慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する革新的治療薬を
実現するための独創的開発基盤

平成 26 年度

委託業務成果報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 27 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する革新的治療薬を実現するための独創的開発基盤
藤原成悦 1

II. 分担研究報告

1. EB ウイルス感染 T 細胞および NK 細胞の増殖機構に関する研究
新井文子 11
2. モデルマウスによる CAEBV 治療薬評価に関する研究
今留謙一 17
3. EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖における EBER の役割に関する研究
岩切 大 23
4. 慢性活動性 EB ウイルス感染症および類縁疾患の病態解明：蚊刺過敏症と種痘様水疱症の予後に関するバイオマーカー探求と体外診断用医薬品開発
岩月啓氏 29
5. 慢性活動性 EB ウイルス感染症と EB ウイルス関連血球貪食症候群における EBV-DNA 定量の臨床的意義
大賀正一 33
6. EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に対するヒト化抗 CCR4 抗体の作用機序および有効性の解析
木村 宏 35
7. 新規 CAEBV 治療薬の開発と評価
児玉栄一 39
8. 慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する多様な同種造血幹細胞ソースごとの移植の最適化に関する研究
澤田明久 43
9. EB ウイルス感染細胞の増殖機構解析と治療の標的分子探索に関する研究
清水則夫 45

10. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態解明を通じた治療法の開発に関する研究 森尾友宏	51
11. CAEBV および類縁疾患の病態解明：蚊刺過敏症を中心にして 谷内江 昭宏	55
12. CAEBV 原因遺伝子の同定を目的とする全エクソン配列解析 藤原成悦	59
III. 学会等発表実績	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷	77

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））
総括研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する革新的治療薬を実現するための独創的開発基盤

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 本研究は、遺伝子・病態解析から、治療薬シーズのスクリーニング、モデルマウスによる評価までの一連の研究を連携して進めるための体制を構築し、慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) および類縁疾患の革新的治療薬を実現することを目標とする。本年度は以下の成果を得た。①患者 DNA のエクソーム解析により、オッズ比 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) の背景遺伝子候補を同定した。②細胞の転写因子 STAT3、ヒストンメチル化因子 EZH2、EBV がコードする小分子 RNA の EBER 等が CAEBV 由来 EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖に重要な役割を果たし、治療の標的分子となる可能性が示された。③CAEBV 由来 EBV 感染 T 細胞・NK 細胞がケモカインレセプター4 (CCR4) を発現し、CCR4 に対するモノクローナル抗体 Mogamulizumab が CAEBV モデルマウス対して抗体依存性細胞傷害 (ADCC) による治療効果を示すことが分かった。④CAEBV の類縁疾患である蚊刺過敏症の病態解析により、本疾患には IgE を介した即時型アレルギー、T 細胞による炎症性サイトカイン産生、NK 細胞活性化による強い組織傷害など、多様な炎症病態が関与することが明らかとなった。⑤CAEBV 類縁疾患である種痘様水疱症と蚊刺過敏症の病態解析から、古典的種痘様水疱症に対して、重症型の種痘様水疱症と蚊刺過敏症が有意に予後不良であることが示された。また 9 歳以上の発症例は予後不良であった。さらに、EBV 遺伝子 BZLF1 の発現を認めるものは予後不良であった。BZLF1 発現を簡便に検出するキットを作製した。

研究分担者：

新井文子；東京医科歯科大学大学院血液
内科学・講師

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・室長

岩切大；北海道大学遺伝子病制御研究
所・助教

岩月啓氏；岡山大学大学院皮膚科学・教
授

大賀正一；山口大学大学院小児科学・教
授

木村宏；名古屋大学大学院ウイルス学分
野・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

澤田明久；大阪府立母子保健総合医療セ
ンター・副部長

清水則夫；東京医科歯科大学再生医療研
究センター・准教授

森尾友宏；東京医科歯科大学大学院小児
科学・教授

谷内江昭宏；金沢大学大学院小児科学・

教授

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) と、その類縁疾患である EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症、蚊刺過敏症、種痘様水疱症の 4 疾患は、原因不明の希少疾患である。EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖を共通の病態とし、発症には遺伝的素因が関わると推測されている。経過は長期に渡り、患者・家族の負担は大きい。造血幹細胞移植による治療は可能であるが、移植の合併症が多発するため、より安全な治療法の開発が急務である。本研究は、遺伝子・病態解析から、治療薬シーズのスクリーニング、モデルマウスによる評価までの一連の研究を連携して進めるための体制を構築し、革新的治療薬を実現することを目標とする。具体的には以下の 4 項目の研究をおこなう。①独自のスクリーニング法により EBV 感染細胞の増殖を選択的に阻害する核酸誘導体を同定する。②遺伝子解析により発症の原因あるいは背景となる遺伝子を特定し、発症メカニズムの解明を通じて新規治療の方法論を確立する。③患者の病態および EBV 感染細胞の増殖機構を解析し治療標的分子を特定するとともに、その機能を阻害する方法を検討する。④以上のステップにより治療薬シーズ見出し、その効果を独自のモデルマウスを用いて検証する。

B. 研究方法

1. CAEBV 患者の遺伝子解析

患者およびその両親の唾液から精製した DNA を用い、Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 キットおよび illumina

社 HiSeq 1000 によるエクソーム解析を行った。

2. EBV 感染細胞特異的に毒性を示す核酸誘導体のスクリーニング

ヒト骨肉腫細胞株 143BTK(-)に EBV 由来チミジンキナーゼ (TK) あるいはヒト由来 TK を遺伝子導入により発現させ、EBV 由来 TK を発現する細胞のみに対して毒性を示す核酸誘導体を選択した。

3. CAEBV モデルマウスの作製

患者末梢血単核細胞を免疫不全マウス (NOG マウス) の静脈内に移植し、全身性の EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖や高サイトカイン血症を再現した。また、EBV 感染 NK 細胞株 SNK6 を NOG マウスの皮下に移植し、局所増殖と遠隔転移のモデルマウスを作製した。

4. EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖機構解析

CAEBV 由来 T 細胞・NK 細胞株、患者末梢血から分離した EBV 感染 T 細胞・NK 細胞、in vitro で実験的に EBV を感染させたヒト T 細胞株 Molt-4 などの遺伝子発現を解析し、EBV 感染細胞で発現が高い遺伝子を見出した。次いで、これらの遺伝子がコードする蛋白質の機能を特異的に阻害する分子を用いて、その感染細胞増殖における役割を解析した。

5. 既存薬剤の効果検討

Mogamulizumab、valproic acid、suberoylanilide hydroxamic acid、radicicol、17-AAG などについて、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株やモデルマウスを用いて EBV 感染細胞に対する増殖抑制効果を検証した。

(倫理面への配慮)

CAEBV 患者および両親のエクソーム解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に

関する倫理指針」、それ以外の患者試料を用いる研究は「臨床研究に関する倫理指針」に則って行われた。国立成育医療研究センターをはじめとする実施研究機関の倫理委員会の承認を得て研究を行った。唾液由来の DNA を用いるため、侵襲や健康への影響は想定されない。研究対象者或いは保護者に対しては、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とした。試料および臨床情報は匿名化され、患者の個人情報には厳重に管理された。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および実施機関の動物実験委員会に研究計画を示し、承認を得ている。

C. 研究結果

1. CAEBV 患者の遺伝子解析

CAEBV 患者 8 名、家族 19 名の計 27 名の全エクソン配列解析を完了した。今回対象としたのは、主に EBV が $\gamma\delta$ T 細胞あるいは NK 細胞に感染するタイプの患者である。1 名の患者において免疫関連遺伝子の蛋白質コード領域に non-synonymous な稀少 variation が homozygous に検出された。この variant ではコードされる蛋白質の機能が大きく変化していることが、解析プログラムにより推測された。この variation を Sanger 法によりスクリーニングしたところ、さらに 2 名が homozygous な variation を有していた。この variation の homozygote の野生型 homozygote に対するオッズ比は 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) と算定された。

分類不能型免疫不全症 (CVID) に

CAEBV を合併して発症した患者のエクソーム解析から NF- κ B2 遺伝子の遺伝子異常が検出された。また、家族性の EBV 関連リンパ腫患者からは、血球系の分化に関与する転写因子の autosomal dominant な遺伝子異常が見出された。

2. EBV 感染細胞特異的に毒性を示す核酸誘導体のスクリーニング

東北大学多元物質科学研究所および崇城大学薬学部で合成された核酸誘導体に加えて、市販の核酸誘導体 (約 50) をスクリーニングしたが、現時点でリード薬剤を見出していない。またチミジンキナーゼを介さない作用機序も考慮して、東北大学大学院薬学研究科で分離精製された天然物ライブラリーの抗 EBV 効果をランダムスクリーニングで検討したが、現在のところヒット薬剤を得ていない。

3. EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株の増殖機構解析

1) STAT3 の役割

転写因子 STAT3 は JAK2 によりチロシンリン酸化を受けて活性化され細胞質から核に移行し、細胞の生存・増殖・分化に関わる転写制御に関与する。STAT3 は多くの白血病やリンパ腫で恒常的に活性化されている。今年度の研究により、CAEBV 患者の EBV 感染 T 細胞・NK 細胞およびそれらに由来する細胞株では STAT3 が恒常的に活性化され核に存在すること、EBV 感染によりヒト T 細胞株の STAT3 がリン酸化を受け核に移行すること、STAT3 阻害薬が EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖を阻害することが明らかになった。以上の結果は、STAT3 が EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株の増殖に重要な役割を果たすこと、治療の標的となることを示唆している。

2) EBER の役割について

CAEBV 等に由来する EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株の培養上清には、EBV がコードする小分子 RNA である EBER を含むエクソソームが存在すること、これらの細胞株は宿主の double-strand RNA センサーである RIG-I や TLR3 を発現し I 型インターフェロンを産生すること等が示された。このことから、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞においても、B 細胞や上皮細胞と同様に、EBER と RIG-I や TLR3 との相互作用がその増殖において重要な役割を果たす可能性が考えられた。

3) EZH2 の役割と ALDH1 の発現について

CAEBV の EBV 感染細胞において、ヒストンのメチル化を促進し様々な遺伝子の発現を抑制する EZH2 の発現が高いことが報告されていた。そこで EZH2 発現を特異的に抑制する DZNep を CAEBV 由来 EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株に投与したところ、EZH2 の発現が低下するとともにアポトーシスが増加し、生細胞率が低下した。EZH2 は CAEBV の治療標的になりうると考えられた。また、CAEBV 由来細胞株では幹細胞マーカーとして知られる ALDH1 の発現が比較的高く認められた。CAEBV に対する分子標的薬を開発する際には、この幹細胞性を考慮する必要があると考えられた。

4. 既存薬剤の効果検証

EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株の大部分 (5/6) がケモカインレセプター4 (CCR4) を発現していた。また、CAEBV をふくむ EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患 17 例中 8 例において EBV 陽性細胞が CCR4 を発現していた。

CCR4 陽性の EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株に末梢血単核細胞 (PBMC) 存在下で

抗 CCR4 モノクローナル抗体 Mogamulizumab を投与すると抗体濃度依存的に生細胞率が低下した。またこの現象は NK 細胞が関与する抗体依存性細胞傷害 (ADCC) によるものと考えられた。また、患者末梢血から分離した EBV 感染 T 細胞・NK 細胞に対しても Mogamulizumab が PBMC 存在下で傷害作用をもつことが示された。さらに、EBV 感染 NK 細胞株を NOG マウスの皮下に移植する xenograft モデルにおいても、Mogamulizumab と PBMC を腹腔内投与することにより皮下腫瘍の縮小が認められた。

Mogamulizumab の他にも、NF- κ B 阻害薬 Bortezomib、ヒストンデアセチラーゼ阻害薬 valproic acid および suberoylanilide hydroxamic acid、熱ショック蛋白質 90 (HSP90) 阻害薬 radicicol および 17-AAG などの既存薬剤が、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞株の増殖を抑制することが示された。

5. 蚊刺過敏症の病態解析

CAEBV の類縁疾患である蚊刺過敏症 5 例の検討で、全例に蚊特異 IgE 抗体価の異常高値、好塩基球活性化試験陽性など、蚊抗原に対する即時型アレルギーの存在が示された。また、末梢血リンパ球解析では HLA-DR を強く発現する NK 細胞の増殖が例外なく認められた。EBV の存在を EBER-1 ISH 法で確認すると、活性化 NK 細胞に選択的に EBV が感染していた。患者 T 細胞を蚊抗原で刺激することにより、培養上清中への IFN- γ 産生が誘導された。これらの結果より、蚊刺過敏症患者には IgE を介した即時型アレルギー、T 細胞を介した炎症性サイトカイン産生、さらに NK 細胞活性化による強い組織傷害など、多様な炎症病態が存在すること

が明らかとなった。

6. 蚊刺過敏症・種痘様水疱症の生命予後、重症化機序と予後に関わる分子マーカー

CAEBV の類縁疾患である蚊刺過敏症と種痘様水疱症 50 例のコホート調査から、古典的種痘様水疱症 (cHV)、全身性種痘様水疱症 (sHV)、蚊刺過敏症 (HMB)、蚊刺過敏症と種痘様水疱症の合併 (HV+HMB) の 4 つの病型に分類することができた。cHV に対して、sHV($p=0.016$) と HMB ($P=0,015$) は有意に予後不良であった。また、9 歳以上の発症例は予後不良であった ($p<0.01$)。さらに、EBV 感染細胞に EBV 遺伝子 BZLF1 の発現を認めるものは予後不良であった。BZLF-1mRNA を検出することが可能な「ウイルス潜伏感染の検査方法および検査用キット」(特許 4182227 号、PCT/JP2006/317851) を開発した。

7. 減強度前処置 (RIC) による造血幹細胞移植の検討

前処置として、ATG (anti-thymocyte globulin) 1.25 mg/kg \times 2 days, fludarabine 30 mg/m²/day \times 6 days, L-PAM 70 mg/m²/day \times 2 days, etoposide 100 mg/m²/day \times 2-3 days を投与した。放射線照射は全廃している。今年度は 4 例に施行し、3 例は無病生存中であり、残る一例は化学療法に抵抗性で血球貪食症候群を発症しての移植であり、致死的経過をとった。

8. モデルマウスをもちいた治療薬候補の評価

EBV がコードするチミジンキナーゼにより特異的にリン酸化されて細胞毒性を発揮する核酸誘導体である S-FMAU の効果をモデルマウスを用いて検証した。80, 50, 20mg/kg の 3 段階で検討したところ、80 および 50mg/kg ではマウス末梢血中の

EBV DNA が減少したが、20mg/kg では効果が認められなかった。

9. CAEBV と EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症における EBV DNA 定量の臨床的意義について

血漿・血清の EBV DNA 量が CAEBV と EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症のいずれにおいても病勢を反映することが示唆された。血漿・血清中 EBV DNA が検出感度未満で細胞中 EBV DNA が高く維持される場合は、CAEBV では非活動期、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症では、再燃の前兆を示唆するものであった。

D. 考察

エクソーム解析で同定された候補遺伝子は免疫関連遺伝子であり、注目している稀少 variation は蛋白質機能に大きく影響することが解析ソフトにより示唆されている。この variation の homozygote が見つかったのは 3 名の患者のみであるが、CAEBV は、発症年齢と進行のスピード、合併症の有無とその種類等に関してきわめて多様性に富むため、患者によって異なる遺伝子が関わる可能性が高い。この遺伝子が一部の CAEBV 症例の原因遺伝子である可能性は十分考えられる。

抗 CCR4 抗体 Mogamulizumab は近年成人 T 細胞白血病の分子標的薬として認可され、きわめて予後が悪いことが知られていた同疾患の治療成績向上と予後改善が実現されつつある。CAEBV をふくむ EBV 関連 T 細胞・NK リンパ増殖性疾患に由来する EBV 感染細胞に対しても同抗体の ADCC を介する増殖抑制効果が、in vitro と in vivo の両者において示されたことから、Mogamulizumab が EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に対しても有効である

可能性が考えられる。

STAT3 や EZH2 が EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖に関与することが明らかになったため、この分子を標的とする新規治療法開発の可能性が示された。今後これらの蛋白質の機能を阻害する様々な分子の効果を比較検討する計画である。また、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞が産生するエクソゾームに含まれる EBER も治療標的となる可能性がある。

CAEBV の類縁疾患である種痘様水疱症と蚊刺過敏症についてその病型分類や発症年齢、BZLF1 発現の有無などによる予後推定が可能となったこと、BZLF1 mRNA を検出するキットを開発したことは、これらの疾患の正確な診断に基づく適切な治療を可能とすると考えられる。

蚊刺過敏症について、蚊抗原特異的な IgE の存在、即時型アレルギー、T 細胞活性化、NK の選択的増殖・活性化など、病態に関連した多様な指標が示された。これらの指標は早期診断の指標となるのみでなく、病態進展の指標ともなり、適切な治療選択の基盤となると考えられる。

E. 結論

① オッズ比 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) の CAEBV 背景遺伝子候補を同定した。②STAT3、EZH2、EBER 等が CAEBV 由来 EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖に重要な役割を果たし、治療の標的分子となる可能性が示された。③ CCR4 に対するモノクローナル抗体 Mogamulizumab が、CAEBV モデルマウス対して抗体依存性細胞傷害 (ADCC) による治療効果を示すことが分かった。④ CAEBV の類縁疾患である蚊刺過敏症の病態解析により、本疾患には IgE を介し

た即時型アレルギー、T 細胞による炎症性サイトカイン産生、NK 細胞活性化による強い組織傷害など、多様な炎症病態が関与することが明らかとなった。⑤ CAEBV 類縁疾患である種痘様水疱症と蚊刺過敏症の病態解析から、古典的種痘様水疱症に対して、重症型の種痘様水疱症と蚊刺過敏症が有意に予後不良であることが示された。また 9 歳以上の発症例は予後不良であった。さらに、EBV 遺伝子 BZLF1 の発現を認めるものは予後不良であった。BZLF1 発現を簡便に検出するキットを作製した。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer- cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2014; 105(6):713-22.
- 2) Yoshimori M, Imadome KI, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. *PLoS ONE*, 2014 Nov 19;9(11):e112564.
- 3) Jinta M, Imadome K, Komatsu H, Yoshimori M, Kurata M, Fujiwara S, Miura O, Arai A. L-Asparaginase monotherapy for

- EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases: A pilot Study. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 2015, in press.
- 4) Matsuda G, Imadome K-I, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, and Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Immunotherapy*, 2015, in press.
- 5) Murata T, Sato Y, Kimura H. Modes of infection and oncogenesis by the Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 24: 242–253, 2014.
- 6) Ito T, Kawazu H, Murata T, Iwata S, Arakawa S, Sato Y, Kuzushima K, Goshima F, Kimura H. Role of latent membrane protein 1 (LMP1) in chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV)-derived T/NK cell proliferation. *Cancer Med* 3: 787-795, 2014.
- 7) Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey MN, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-CCR4 monoclonal antibody mogamulizumab for the treatment of EBV-associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases. *Clin Cancer Res* 20:5075-84, 2014.
- 8) Kawada JI, Ito Y, Iwata S, Suzuki M, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, Kimura H. mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 20:5412-22, 2014.
- 9) Coleman CB, Wohlford EM, Smith NA, King CA, Ritchie JA, Baresel PC, Kimura H, Rochford R. Epstein-Barr virus Type 2 latently infects T-cells inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J Virol* [Epub ahead of print]
- 10) Sawada A, Inoue M, Koyama-Sato M, Kondo O, Yamada K, Shimizu M, Isaka K, Kimoto T, Kikuchi H, Tokimasa S, Yasui M, Kawa K. Umbilical cord blood as an alternative source of reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation for chronic Epstein-Barr virus-associated T or natural killer cell lymphoproliferative diseases. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 214-221, 2014.
- 11) 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*, 99:671-52, 2014.
- 12) Hattori T, Arai A, Yokota T, Imadome K, Tomimitu H, Miura O, Mizusawa H. Immune-mediated neuropathy with Epstein-Barr virus-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Internal Medicine*, in press.
- 13) Miyake T, Yamamoto T, Hirai Y, Otsuka M, Hamada T, Tsuji K, Morizane S, Suzuki D, Aoyama Y, Iwatsuki K. Survival rates and prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites. *Br J Dermatol*. 2014; e-pub ahead of print.
- 14) Hamada T, Nakamura S, Ko YH, Yoshino T, Ohshima K, Matsuzawa T, Miura K, Takahashi T, Nomura H, Hoshino T, Suzuki D, Shimada S, Iwatsuki K. Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell

lymphomas in the elderly: The first consensus meeting in Kofu 2013. *J Dermatol* 2014; 41: 40-42.

15) Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27, 2014.

16) Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T. Two Novel Gain-of-Function Mutations of STAT1 Responsible for Chronic Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of Anti-IL-17F Autoantibody. *J Immunol*. 193:4880-7, 2014.

17) Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8+ T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol*. 2013;74:1579-85.

18) Watanabe Y, Sasahara Y, Satoh M, Looi CY, Katayama S, Suzuki T, Suzuki N, Ouchi M, Horino S, Moriya K, Nanjyo Y, Onuma M, Kitazawa H, Irie M, Niizuma H, Uchiyama T, Rikiishi T, Kumaki S, Minegishi M, Wada T, Yachie A, Tsuchiya S, Kure S. A case series of CAEBV of children and young adults treated with reduced-intensity conditioning

and allogeneic bone marrow transplantation: a single-center study. *Eur J Haematol*. 2013;91:242-8.

19) Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Ohta S, Wakiguchi H, Kanegane H, Oda M, Ishii E: Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: report from the Japan HLH/LCH Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 61(7):1257-62, 2014.

2. 著書・総説

1) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M. Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* 47, e136; doi:10.1038/emm.2014.102 Published online 23 January 2015.

2) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Epstein-Barr virus infection in humanized mice. In Poluektova, L.Y., Garcia-Martinez, J.V., Koyanagi, Y., Manz, M.G., Tager, A.M. Eds. *Humanized Mice for HIV Research*, Springer, Berlin, February 14, 2015, pp515-25.

3) 澤田明久, 井上雅美. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態と治療. *日本造血細胞移植学会誌* 3: 1-11, 2014.

4) 新井文子. Epstein-Barr ウイルス陽性腫瘍における制御性 T 細胞 臨床免疫・アレルギー科 62 p524-527, 2014 科学評論社.

5) Iwakiri D. Epstein-Barr virus encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis *Cancers*.2014;6:1615-30.

6) 岩切 大 EB ウイルスによる発癌の分子機構 *ウイルス* 2014;64:49-56.

7) 下村麻衣子, 大賀正一. V 造血管器悪性疾患 血球貪食症候群/血球貪食性リンパ組織球症. 特集小児血液疾患—よくわ

かる最新知見—41. 小児科 55 卷 11 号
1775-1781, 2014.

8) 大賀正一. リンパ増殖性疾患 ～
Epstein-Barr ウイルスの関与する遺伝性素
因～. 臨床血液 55 卷; 2221-4, 2014.

3. 学会発表

(国際学会)

1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F,
Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S.
Applications of mouse models of
EBV-associated diseases for the evaluation of
novel therapies. 16th International
Symposium on EBV and Associated Diseases.
Brisbane, 16-19 July, 2014.

2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F,
Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S.
Preclinical studies of novel therapies for
Epstein-Barr virus-associated diseases in
humanized mouse models. 39th Annual
International Herpesvirus Workshop. Kobe,
20-23 July, 2014.

3) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M,
Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S,
Nakamura H. The highly conserved human
cytomegalovirus UL136 ORF generates
multiple Golgi-likalizing protein isoforms
through differential translation initiation.
39th Annual International Herpesvirus
Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

4) Siddiquey M, Nakagawa H, Iwata S,
Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K,
Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H.
Anti-tumor effects of suberoylanilide
hydroxamic acid on Epstein-Barr
virus-associated T- and natural killer-cell
lymphoma. 39th Annual International
Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July,
2014.

5) Nagasawa Y, Natsumi I, Nozaki T,
Inomata H, Imadome K-I, Iwata M, Kitamura
N, Fujiwara S, Takei M. Human
Osteoclasts are Mobilized in Erosive Arthritis
of Epstein-Barr Virus-infected Humanized
NOD/Shi-scid/IL-2R γ null Mice. American
College of Rheumatology Annual meeting,
Boston, November 14-19, 2014.

6) Komatsu H, Imadome K-I, Shibayama H,
Yada T, Yamada M, Yamamoto K, Koyama T,
Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is
activated by EBV in EBV-T/NK-LPDs
leading to development of the disorders.
December 6, 2014, American Society of
Hematology Annual Meeting, San Francisco,
CA, USA.

7) Kimura H. T/NK cell lymphomagenesis.
EBV 50th Anniversary Conference, Keble
College, Oxford, March 23-25, 2014.

8) Kimura H. International Session-
Epstein-Barr virus-associated lymphomas-
Current understanding of the role of
Epstein-Barr virus in lymphomagenesis. The
12th annual meeting of Japanese Society of
Medical Oncology, Fukuoka, July 18, 2014.

9) Murata T, Kimura H, Tsurumi T.
Contribution of MEF2 family transcription
factors to BZLF1 expression in EBV
reactivation from latency. 14th International
Union of Microbiological Societies Congress.
Montreal, Canada, July 29, 2014.

10) Azusa Mayumi, Akihisa Sawada, Maho
Sato, Mariko Shimizu, Aya Ioi, Kohei
Higuchi, Osamu Kondo, Masahiro Yasui,
Keisei Kawa, Masami Inoue. Favorable
impact of intensified conditioning regimen on
the engraftment of cord blood transplantation
for chronic Epstein-Barr virus-associated T

or Natural Killer cell lymphoproliferative diseases. The 19th congress of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation. Hangzhou, China. 16th-19th/Oct/2014.

11) Iwakiri D. Activation of toll-like receptor 3 signaling by EBV-encoded small RNA contributes to gastric carcinogenesis. In: 17th Annual meeting of European society for clinical virology, Oral presentation 2014 Sept.28- Oct. 1: Prague, Czech.

(国内学会)

1) 木村 宏. シンポジウム「ウイルス感染症診療のこれから」ウイルス関連血球貪食症候群. 第 55 回臨床ウイルス学会. 札幌. 2014 年 6 月 15 日.

2) 村田貴之、伊藤卓冬、川津英賢、岩田誠子、佐藤好隆、五島典、木村宏. 慢性活動性 EBV 感染症における LMP1 の役割. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜、2014 年 9 月 25 日.

3) 鈴木道雄、岩田誠子、Siddiquey MNA、佐藤好隆、伊藤嘉規、五島典、村田貴之、木村宏. EBV 関連 T/NK リンパ腫・リンパ増殖性疾患に対するヒト化抗 CCR4 抗体の効果の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10 日.

4) 澤田明久、井上雅美、佐藤真穂、近藤 統、眞弓あずさ、井坂華奈子、樋口紘平、清水真理子、安井昌博、河 敬世. 慢性活動性 EB ウイルス感染症:成人および小児における同種造血幹細胞移植成績の比較. 第 36 回日本造血細胞移植学会. 沖縄. 2014 年 3 月 7-9 日.

5) 小松穂菜実、今留謙一、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子. EB ウイルスは T 細胞に感染後 LMPL1 を介して STAT3

を活性化し T 細胞リンパ腫発症に寄与する. 第 76 回 日本血液学会 2014 年 10 月 31 日 大阪.

6) 三宅智子、岩月啓氏他: 痂皮と水疱蓋を用いた種痘様水疱症と蚊刺過敏症の低侵襲診断的検査の鋭敏度と特異度に関する研究(第 114 回日本皮膚科学会総会 2015 年 5 月 28-31 日において発表予定:抄録採択済み、アブストラクト賞を受賞)

7) 廣瀬千紘、坂下千瑞子、山本正英、今留謙一、富田誠、藤原成悦、森尾友宏、清水則夫、三浦修、新井文子 成人 EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析 造血幹細胞移植学会 平成 27 年 3 月(神戸市)

8) 森尾友宏: 原発性免疫不全症からみる Common Disease: 病態解析及び治療の最近の進歩、第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014 年 9 月 25 日.

9) 榊原康久、村岡正裕、和田泰三、東馬智子、谷内江昭宏. 蚊刺過敏症症例における蚊特異的 IgE の検出: 好塩基球活性化試験を用いた解析. 第 46 回日本小児感染症学会 東京. 2014 年 10 月 18 日.

10) 大賀正一: 小児の造血および免疫不全症~EB ウイルスが関与する免疫異常~第 16 回京阪こどもカンファレンス 特別講演 2014.10.11 大阪.

11) 大賀正一: リンパ増殖性疾患 ~ Epstein-Barr ウイルスの関与する遺伝性素因~第 76 回 日本血液学会学術集会 教育講演 2014.10.31 大阪.

Ⅲ. 知的財産権の出願・登録状況

1) 岩月啓氏ら. 「ウイルス潜伏感染の検査方法および検査用キット」(特許 4182227 号、PCT/JP2006/317851)

EB ウイルス感染 T 細胞および NK 細胞の増殖機構に関する研究

分担研究者 新井文子 (東京医科歯科大学大学院血液内科学 講師)

研究要旨

Epstein-Barr virus (EBV) は B 細胞のみならず、T 細胞や NK 細胞腫瘍にもそのゲノムを認め、腫瘍発症に関与すると考えられるが、その分子機序は明らかになっていない。私たちは EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症 (いわゆる慢性活動性 EB ウイルス感染症、EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases; EBV-T/NK-LPDs) 細胞における STAT3 の活性化を検討し、その病態・発症を解明することを試みた。細胞株および患者検体において細胞の増殖に関与する転写因子 STAT3 が恒常的に活性化していることが western blotting と組織染色により確認された。また、EBV の *in vitro* での感染により T 細胞株 MOLM4 において、感染後に STAT3 が核へ移行する事が、免疫蛍光染色にて認められた。さらに STAT3 阻害薬処理により EBV 陽性 T もしくは NK 細胞株の増殖が抑制されること、また、STAT3 の核内移行が抑制されることが観察された。以上から EBV の感染により STAT3 が活性化し、STAT3 が細胞の増殖に関与していることが示唆された。以上を第 76 回 日本血液学会 (大阪) および 56th ASH Annual Meeting and Exposition (San Francisco) にて発表した。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus (EBV) は、ヘルペスウイルス科に属する 2 本鎖 DNA ウイルスである。通常はヒト B 細胞に潜伏、持続感染をする。ひとたびヒトへ感染すると一生排除されず、免疫抑制により B 細胞腫瘍を発症することが知られている。近年 EBV は T もしくは NK 細胞リンパ腫にもそのゲノムが認められることが明らかになった。EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症 (EBV-positive T or NK-cell lymphoproliferative diseases; EBV-T/NK-LPDs) は EBV 陽性 T もしくは NK 細胞リンパ腫のひとつで、従来慢性活動性 EB ウイルス感染症と呼ばれてきた疾患である。日本をはじめとした東アジアからの報告が多

く、頻度は極めてまれである。炎症症状の持続と共に末梢血中にクローナルに増殖した EBV 陽性 T もしくは NK 細胞を認めることが特徴である。2008 年度に改訂された WHO 造血器腫瘍分類では T、NK 細胞腫瘍の一つと位置付けられているが、その予後は不良で、病態の解明と治療法の開発は喫緊の課題である。

STAT3 はシグナル伝達と標的分子の転写活性化を行うことで分化や生存、増殖などを調節する転写因子であり、白血病やリンパ腫細胞で恒常的に活性化しており、腫瘍細胞の生存、増殖の亢進を介して、癌化に関与すると考えられている。非活性化状態時では細胞質に局在するが、サイトカイン等の細胞外の刺激によって JAK2 によりチロシンリン酸化を受ける。リン

酸化を受けた STAT3 は二量体化し、核内に移行して標的遺伝子のプロモーター部位に結合する。セリンリン酸化も STAT3 の活性化に必須である。これまで、ヒトの乳癌細胞において STAT3 の機能を阻害すると、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されること (Breast Cancer Res Treat. 2014;146:71-84.)、また節外性 T/NK 細胞リンパ腫において STAT3 は恒常的に活性化しており、その阻害は腫瘍細胞の増殖を抑制すること (Leukemia. 2009;23:1667-78.) が報告されてきた。そこで、本研究では EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞における STAT3 の活性化を検討し、病態・発症への関与を解明することを試みた。

B. 研究方法

1) EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症は診断基準を用いて診断した (Blood. 2012;119:673-686.)。

2) 使用した細胞、試薬

EBV 陽性細胞として EBV 陽性 T もしくは NK 細胞株である SNT8、SNT 15、SNT 16、SNK1、SNK 6、SNK 10、EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症患者末梢血から分離した EBV 陽性 T、NK 細胞を用いた。細胞株はヒト IL-2 175U/mL を含むヒト血清添加 RPMI 培地で培養した。EBV 陰性細胞として Jurkat、Molt4、MTA を 10% ウシ胎児血清添加 RPMI 培地で培養したものを使用した。

ヒト IL-2 は R&D Systems 社のものを用いた。STAT3 阻害剤としては Santa Cruz 社の STAT3 inhibitor V を用いた。

3) western blotting

S-IP buffer に 1mL に Aprotinin, Leupeptin を 1 μ L, PMSF を 10 μ L 加えた混合液を用いて

細胞融解を行なった。その後、SDS 処理を行い、SDS-PAGE で展開し、western blotting を行なった。

4) 免疫染色

サイトスピンによってスライドガラスに細胞を付着させた後、4% Paraformaldehyde で固定し、blocking、一次抗体、二次抗体の順に反応させ、ProLong Gold with DAPI を用いて封入、核染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV10i-DOC, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

5) シーケンス解析

STAT3 の SH2 ドメインのテンプレートと、対象とするサンプルのフォワードとリバースそれぞれの塩基配列を比較して変異があるかどうか解析した。

C. 研究結果

まず、EBV 陽性 T/NK 細胞における STAT3 活性化を調べるために以下の実験を行った。

EBV 陽性 T/NK 細胞株を用いて western blotting で STAT3 の活性化を検討した。EBV 陽性 T/NK 細胞株では STAT3 の恒常的なチロシンリン酸化がみられたが、EBV 陰性株ではみられなかった (Fig. 1)。次に、EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症患者 (Table 1) から分離した EBV 陽性 T もしくは NK 細胞の STAT3 チロシンリン酸化を western blotting で検討したところ、5 例中 4 例で STAT3 のチロシンリン酸化がみられた (Fig. 2A)。また、症例 CD8-1 リンパ節組織を検討したところ、STAT3 のチロシンリン酸化とその核への局在が認められた (Fig. 2B)。これら 6 種の細胞株と患者細胞を解析したところ、結果は示さない

が STAT3 の SH2 ドメインには遺伝子変異は認められなかった。

そこで、EBV 陽性 T/NK 細胞における STAT3 の活性化には EBV 感染が関与しているのではと考え、*in vitro*での感染実験をおこなった。EBV 感染前後の Molt4 細胞での STAT3 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。EBV の感染によって、STAT3 の核内への移行が認められた(Fig. 3)。

最後に、EBV 陽性 T/NK 細胞における STAT3 の機能について解析した。EBV 陽性 T/NK 細胞を STAT3 阻害剤で処理すると STAT3 の核への局在が阻害される、すなわち活性化が抑制されることが示された (Fig. 4)。さらに STAT3 阻害剤は EBV 陽性 T/NK 細胞株の増殖を抑制した (Fig. 5)。以上から、EBV 陽性 T/NK 細胞において STAT3 の恒常的な活性化は細胞増殖の亢進に働いていることが示唆された。

D. 考察

EBV 陽性 T もしくは NK 細胞では EBV 感染により STAT3 が活性化し、細胞増殖の亢進に関与すると考えられた。このことから、EBV が B 細胞性リンパ腫同様、EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症の発症の直接の原因となることも示唆された。

EBV によるリンパ球の腫瘍化は今まで B 細胞を中心に解析され、EBV 蛋白質 LMP1 が腫瘍化に必須であることが明らかになっている。一方 EBV 陽性 T もしくは NK リンパ腫においても LMP1 は発現している。さらに、EBV 陽性 T もしくは NK リンパ腫と同様の感染形式をとる鼻咽頭癌において、LMP1 の発現はリン

酸化 STAT3 と相関していることも報告されている (4)。このことから T、NK 細胞でも B 細胞同様 LMP1 が STAT3 活性化に関与していることが推測され今後検討を予定している。

EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症は化学療法の効果にとぼしく、唯一の根治療法は造血幹細胞移植である。今回の研究から、STAT3 は治療の標的分子となりうると考えられ、その阻害剤の有用性が期待できる。今後もさらなる研究を行う予定である。

E. 結論

EBV の感染により STAT3 が活性化し、STAT3 が細胞の増殖に関与していることが示唆された。

以上は、第 76 回 日本血液学会および第 56 回 米国血液学会 (Abstract Achievement Award 受賞, 小松穂菜実) にて発表した。

F. 研究危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 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 Sci.* 105:592-9, 2014

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*, 99:671-52, 2014

3) Hattori T, Arai A, Yokota T, Imadome K,

Tomimitu H, Miura O, Mizusawa H.

Immune-mediated neuropathy with Epstein-Barr virus-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Internal Medicine*, 2014 in press

4) Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsuiki N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T.

Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Sep;49(9):1155-61.

5) Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda F, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A.

CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. *PLoS One*. 2014 Nov 19;9(11):e112564

6) 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*, 56:159-66, 2014.

2. 総説および著書

1) 自己免疫性疾患に合併する悪性リンパ腫
リウマチ科 51 p415-420, 2014 科学評論社

2) Epstein-Barr ウイルス陽性腫瘍における
制御性 T 細胞 臨床免疫・アレルギー科
62 p524-527, 2014 科学評論社

3) 看護病態 発熱 改訂 第2版 2014年11
月1日 (第一版 2011年11月1日) 井上
智子 稲瀬直彦 編 p2-6

4) エルゼビア 今日の臨床サポート 改訂
第2版 血球貪食症候群

3. 学会発表

1) 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 細胞リンパ増殖症の EBV 陽性 T,NK
細胞は FOX-p3 を発現し T 細胞の増殖を抑制す
る. EB ウイルス感染症研究会 2014 年 3 月 20
日, 東京.

2) Arai A. Treatment for EBV-positive
lymphoproliferative diseases. NK 腫瘍研究会
2014 年 3 月 16 日 東京.

3) 小松穂菜実、今留謙一、小山高敏、藤原成
悦、三浦修、新井文子. EB ウイルスは T 細胞
に感染後 LMPL1 を介して STAT3 を活性化し T
細胞リンパ腫発症に寄与しうる. 第 76 回 日
本血液学会 2014 年 10 月 31 日 大阪.

4) 秋山弘樹、高瀬博、久保文人、三木徹、山
本正英、富田誠、望月學、三浦修、新井文子. 硝
子体内投与に続く全身 MTX 投与は原発性眼内
リンパ腫の中樞神経への進展を予防する. 第
76 回 日本血液学会 2014 年 11 月 1 日 大阪.

5) Ken-Ichi Imadome, Go Matsuda, Fuyuko
Kawano, Eiichi Kodama, Ayako Arai, Norio
Shimizu, and Shigeyoshi Fujiwara. Preclinical
studies of novel therapies for Epstein-Barr
virus-associated diseases in humanized mouse
models. 39th International Herpesvirus Workshop,
Kobe, July 2014.

6) Ken-Ichi Imadome, Go Matsuda, Fuyuko
Kawano, Eiichi Kodama, Ayako Arai, Norio
Shimizu, and Shigeyoshi Fujiwara. Applications of
mouse models of EBV-associated diseases for the
evaluation of novel therapies. 16th International
Symposium on EBV and Associated
Diseases. Brisbane, Australia – 2014

7) Makoto Arai, Ayako Arai, Shun-ichiro Izumi.
Postgraduate education in Kampo (traditional
Japanese) medicine: A current survey of clinical
training hospitals. AMEE 2014 Milan.

8) Hiroki Akiyama, Hiroshi Takase, Fumito Kubo,
Tohru Miki, Masahidde Yamamoto, Makoto
Tomita, Manabu Mochizuki, Osamu Miura, Ayako
Arai. Systemic following intravitreal MTX

administration prevents CNS infiltration of Primary intraocular lymphoma. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014.

9) Komatsu H, Imadome K, Shibayama H, Yada T, Yamada M, Yamamoto K, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is activated by EBV in T or NK cells leading to development of EBV-T/NK-lymphoproliferative disorders. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014.

H. 知的財産権の出願・取得状況

なし

モデルマウスによる CAEBV 治療薬評価に関する研究

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。

新規治療薬候補である S-FMAU に対するモデルマウスを使った薬剤評価実験をおこなうとともに、EBV が T 細胞や NK 細胞に感染し増殖する要因について検討した。

S-FMAU 投与量を 80, 50, 20mg/kg で薬剤効果とマウスへの影響を検討した。その結果、80, 50mg/kg ではマウス末梢血中の EBV-DNA は減少したが、20mg/kg では効果は見られなかった。これにより S-FMAU は濃度依存的に効果を発揮することが示された。今後は頭数を増やして引き続き検討するとともに、血中サイトカインへの影響も合わせて検討する。

EBV が T 細胞や NK 細胞に感染し増殖する要因の一つとして EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞(EBV-CTL)の誘導阻害や EBV-CTL の機能不全が考えられる。HLA-A は A2402 の患者 5 人について検討した結果、3 人で EBV-CTL の誘導は検出されなかった。残る 2 人は EBV-CTL の誘導は検出されたが、感染細胞と共培養しても IFN- γ の誘導は検出されなかった。このことから、CAEBV 患者では EBV-CTL が誘導されにくい、誘導されても機能していない可能性が示された。感染細胞が免疫応答によって排除されないために感染細胞が増殖し、病態を発症する可能性が示された。今後は症例数を増やして更に詳細な解析を進めていく予定である。

A. 研究目的

CAEBV モデルマウスを作製し、in vivo 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

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 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ copies/ μ gDNA になった時点で S-FMAU をマウス尾静脈より投与する。S-FMAU は 5 日連続で 1 日 1 回 80mg/kg, 50mg/kg, 20mg/kg それぞれのマウスに投与する。F-SMAU 投与後も毎週採血し末梢血中の EBV-DNA 定量解析と FCM 解析を行なう。コントロール群には PBS を投与する。患者末梢血採血に当たっては、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とは伝えられず、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

(1)S-FMAU の感染細胞制御と効果評価

a)濃度依存的効果の検討

新規治療薬候補のヌクレオシドアナログ 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 CD4 タイプ、NK タイプのモデルマウスそれぞれ 20 匹作製した。CAEBV モデルマウス作製は、CAEBV 患者末梢血単核細胞を移植し、末梢血 EBV DNA 量が約 $10^3 - 10^4$ copies/ μ g DNA に達した時点で薬剤投与を開始した。S-FMAU 投与は 5 日間連続、3 段階で濃度を変えて 1 日 1 回投与し、それぞれの濃度における効果

と影響を検討した。同一ロットのモデルマウス 20 頭を 4 群に分け、5 頭ずつに S-FMAU を①80 mg/kg/day②50 mg/kg/day③20 mg/kg/day 投与し、残り 5 頭に PBS(コントロール)を投与して薬剤効果を検討した。

CD4 タイプでは①80 mg/kg/day 投与群では 5 頭中 3 頭で末梢血 EBV DNA 量が一過性に約 1/1000 に減少し、1 頭で 1/100 に減少し、1 頭では陰性化した。②50 mg/kg/day 投与群では 5 頭中 2 頭で末梢血 EBV DNA 量が一過性に約 1/1000 に減少し、3 頭で 1/100 に減少した。③20 mg/kg/day 投与群では 5 頭中 2 頭で末梢血 EBV DNA 量が一過性に約 1/100 に減少し、2 頭でウイルス量の減少も増加もなく、1 頭でウイルスの増加があった。残る 5 頭には対照として PBS を投与したところ、全てのマウスで末梢血 EBV DNA 量が約 10^{6-7} copies/ μ g DNA に達した。NK タイプでは①80 mg/kg/day 投与群では 5 頭中 2 頭で末梢血 EBV DNA 量が一過性に約 1/1000 に減少し、2 頭で 1/100 に減少し、1 頭では陰性化した。②50 mg/kg/day 投与群では 5 頭中 3 頭で末梢血 EBV DNA 量が一過性に約 1/1000 に減少し、2 頭で 1/100 に減少した。③20 mg/kg/day 投与群では 5 頭中 1 頭で末梢血 EBV DNA 量が一過性に約 1/100 に減少し、3 頭でウイルス量の減少も増加もなく、1 頭でウイルスの増加があった。残る 5 頭には対照として PBS を投与したところ、CD4 タイプと同様に全てのマウスで末梢血 EBV DNA 量が約 10^{6-7} copies/ μ g DNA に達した。

これにより、S-FMAU が濃度依存的に効果を発揮する可能性が示された。