

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09468

研究課題名(和文) EBV陽性T/NK細胞リンパ腫におけるAPOBECの機能

研究課題名(英文) Function of APOBEC3 in EBV-positive T or NK-cell lymphoproliferative diseases

研究代表者

新井 文子 (ARAI, Ayako)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号：70359678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：EBV陽性T,NKリンパ増殖症の一つ、慢性活動性EBウイルス感染症(CAEBV)のEBV感染腫瘍細胞ではAPOBEC3Bの発現が亢進していることを細胞株、患者細胞を用いて示した。プロテアソーム阻害剤 bortezomib処理によりこれらの細胞でAPOBEC3Bの発現は抑制されるとともに、増殖抑制、サイトカイン抑制がもたらされた。さらにCAEBVモデルマウスにおいてbortezomibはPBSと比較し末梢血中のEBV-DNA量を有意に減少された。以上の結果を元に、bortezomibによるCAEBVの抗腫瘍効果を検証する医師主導臨床試験を開始した。

研究成果の概要(英文)：Chronic active EBV infection (CAEBV) is a neoplasm of EBV-infected T- or NK-cells. It was newly defined as a disorder including conventional CAEBV, severe mosquito bite allergy, and hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder according to the WHO classification of lymphoid neoplasms revised in 2017. CAEBV is resistant to chemotherapies, and the only curative treatment strategy thus far has been hematopoietic stem cell transplantation. We found that APOBEC3B expression was increased in the EBV-positive T- or NK-cell lines cells from patients of CAEBV, one of EBV-positive T or NK-cell lymphoproliferative diseases. A proteasome inhibitor, bortezomib suppressed APOBEC3B expression in these cells and inhibited proliferation and cytokine production in these cells. In addition, bortezomib administration decreased EBV-DNA load in the peripheral blood of CAEBV xenograft models. Based on the results, we started an investigator-initiated clinical research of bortezomib for CAEBV.

研究分野：医歯薬学

キーワード：EBV陽性T,NKリンパ増殖症 EBウイルス NF-kB bortezomib APOBEC3B

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) は、ヘルペスウイルス科に分類される二本鎖 DNA ウイルスで、ひとたびヒトに感染すると、排除されずに生涯 B 細胞に潜伏する。近年一部の T もしくは NK 細胞腫瘍にも細胞内にそのゲノムが認められ、その発症への関与が推測されている。EBV 陽性 T,NK 細胞リンパ腫は炎症と腫瘍の 2 つの性質をもつ。発症頻度は稀で発症機構や病態は未解明である。また、治療抵抗性で予後は悪い。発症機構の解明と治療薬の開発は喫緊の課題である。

EBV 陽性 T,NK 細胞リンパ腫の一つに、慢性に進行する病型、慢性活動性 EB ウイルス感染症 (chronic active Epstein-Barr virus infection : CAEBV) が知られている。CAEBV は経過中、悪性度の高い T,NK 細胞リンパ腫へ進行することが知られているが、EBV 感染 T、NK 細胞が経過中にポリクローナルからモノクローナルへ、クローンの進化が起きていることが観察されている。この背景には感染細胞の中で遺伝子変異が蓄積されていると考えられるがそのメカニズムは不明である。それが解明され制御が可能になれば、CAEBV からリンパ腫への進行は食い止められるかもしれない。そこで注目したのが AID (activation-induced cytidine deaminase) / APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide) ファミリーである。これらは一本鎖 DNA 上のシトシンを脱アミノ化してウラシルに変換し遺伝子に積極的に C→T (G→A) 変異を導入するシチジン脱アミノ化酵素である。AID はヒトの 12 番染色体に存在し、活性化した B 細胞に発現し免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異やクラススイッチに必須である。APOBEC ファミリーには APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3、APOBEC4 がある。そのうち APOBEC3 はヒトの 22 番染色体 (22q13.1) に存在し、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、

APOBEC3DE、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H の 7 種類が存在する。APOBEC3 は C→T (G→A) 変異をウイルスゲノムに導入しその複製を阻害することで抗ウイルス作用を持つ<sup>3</sup>。

AID/APOBEC ファミリー蛋白質は変異原性を持つという性質上、通常その発現は厳しく制限されている。近年、その恒常的な発現と腫瘍発症への関与が注目されている。特に、APOBEC3B はリンパ腫細胞株で高発現していることや、APOBEC3A や APOBEC3B の発現により、リンパ腫細胞株で DNA に変異が導入されることが報告されている<sup>4</sup>。そこで、CAEBV においてもこれらの APOBEC3 ファミリー蛋白質が、感染細胞のクローンの進化、リンパ腫発症へ関与しているのではないかと考え、細胞株と、臨床試料を用いてその発現を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究も目的は、DNA、RNA に変異を導入する cytidine deaminases、APOBEC が、EBV によって発現誘導され、EBV 陽性 T、NK リンパ腫の発症と進展を正に制御する、という仮説を立て、細胞株と臨床検体の解析、in vitro での EBV の T 細胞への感染実験によりそれを証明する。腫瘍発症、進展機構の解明は、EBV 陽性 T,NK 細胞リンパ腫のみならず多くの腫瘍の病態解明と治療法の開発に貢献すると考えられる。

## 3. 研究の方法

### 細胞株

EBV 陽性 T、NK 細胞株として、CAEBV もしくは節外性 NK/T 細胞リンパ腫の患者から樹立された細胞株を用いた。EBV 陽性 T 細胞株は SNT8、SNT15、SNK16 を、EBV 陽性 NK 細胞株は SNK1、SNK6、SNK10 を用いた。培養液は Artemis medium-2 (日本テクノサービス株式会社)を用いた。EBV 陰性 T、NK 細胞株は Jurkat、HPBALL、Molt4、KHYG-1、

MTA を、EBV 陰性 B 細胞株は Ramos を用いた。培養液は 10%FBS-RPMI (和光純薬株式会社) を用いた。KHYG-1 のみ 175 U/mL の IL-2 (R&D Systems) を加えた 10%FBS-RPMI を用いた。

#### 臨床試料

2015 年に厚生労働省研究班が作成した、以下の診断基準を満たす 11 名の臨床試料を用いた。

伝染性単核球症様症状が 3 か月以上持続 (連続的または持続的) 末梢血または病変組織における EB ウイルスゲノム量の増加 (EBV-DNA 量が  $1 \times 10^{2.5}$  コピー/ $\mu\text{gDNA}$  以上)

T 細胞あるいは NK 細胞に EB ウイルス感染を認める 既知の疾患とは異なること。これらの臨床試料は学内の各審査委員会で承認後、患者の文書による同意を得て用いた。

#### 末梢血単核球の分離

末梢血から SEPARATE-L (武藤化学株式会社) を用いて密度勾配遠心法で単核球を分離した。それらを抗体付磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて CD4、CD8、CD56 陽性細胞に分離した。

#### マイクロアレイ解析

解析に必要な試料の得られた 3 名の CAEBV 患者の末梢血から EBV 感染 T、NK 細胞分画である CD4、CD8、CD56 陽性細胞を、健常者末梢血単核球から同じく CD4、CD8、CD56 陽性細胞を分離後、ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) で RNA を抽出し、SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8roarray (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いて遺伝子発現を解析した。

#### In vitro での EBV 感染実験

EBV 陽性 B 細胞株 B95-8 の培養上清から EBV を遠心分離し 10% FBS-RPMI 培地に再懸濁後、Molt4 および健常者リンパ球培養液に加えて培養し EBV を感染させた。

#### 定量 PCR

細胞株および患者細胞から ISOGEN (株式

会社ニッポンジーン) を用いて RNA を抽出し、APOBEC3 mRNA の発現量を測定した。内在性コントロールは GAPDH (Applied Biosystems) を用いて測定した。結果は Ct 法で解析した。

#### Western blotting

一次抗体は、抗 APOBEC3A 抗体 (Santa Cruz: sc-130688)、抗 APOBEC3B 抗体 (Sigma Aldrich)、抗 APOBEC3C/D/F 抗体 (Santa Cruz: sc-46732-)、抗 APOBEC3G 抗体 (abcam: ab71634)、抗 APOBEC3H 抗体 (LifeSpan BioScience : LS-C151868-50)、抗 Erk 抗体 (merck: 06-182) を用いた。抗 APOBEC3B 抗体は C 末端の 20 アミノ酸 EEHSQALSGLRLAILQNQGN をウサギに免疫して作成した。

#### 阻害剤による処理

EBV 陽性 T、NK 細胞株をプロテアソーム阻害剤である bortezomib (Millennium Pharmaceuticals) と JAK1/JAK2 阻害剤である ruxolitinib (LC Laboratories) でそれぞれ 24 時間処理した細胞から ISOGEN を用いて RNA を抽出し、APOBEC3 mRNA の発現量を PCR 法で測定した。

#### 統計解析

定量 PCR 法の結果の統計解析には Mann-Whitney U-test を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## **4 . 研究成果**

EBV 陽性 T、NK リンパ増殖症の一つ、慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) の EBV 感染腫瘍細胞では APOBEC3B の発現が亢進していることを細胞株、患者細胞を用いて示した。EBV を健常者の T、NK 細胞に感染させると APOBEC3B の発現が亢進した。

EBV 陽性 T、NK リンパ増殖症の EBV 感染腫瘍細胞株および CAEBV 患者細胞では NF- $\kappa$ B の恒常的活性化を認めること、EBV を in vitro で感染させると T 細胞では NF- $\kappa$ B の

活性化が誘導されることを見出した。これらの細胞ではbortezomib処理でNF-κBの活性とAPOBEC3B発現が抑制され、アポトーシスが誘導された。さらにCAEBVモデルマウスにおいてbortezomibはPBSと比較し腫瘍量を反映する末梢血EBVDNA量を有意に減少させた。

EBV感染腫瘍細胞株およびCAEBV患者細胞ではSTAT3の恒常的活性化を認め、ruxolitinibで処理すると細胞生存の抑制、アポトーシス誘導とともに、サイトカイン産生能も抑制された。

以上の結果をもとに、NF-κBおよびSTAT3を標的とする治療法の開発に着手した。NF-κBを標的としてbortezomibによる抗腫瘍効果をエンドポイントとする医師主導臨床研究を開始した(UMIN00020315)。さらにSTAT3を標的としてruxolitinibによる抗炎症効果をエンドポイントとする医師主導治験を立案、2018年度AMED難治性疾患実用化研究事業に採択された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計30件)

Takada H, Imadome KI, Shibayama H, Yoshimori M, Wang L, Saitoh Y, Uota S, Yamaoka S, Koyama T, Shimizu N, Yamamoto K, Fujiwara S, Miura O, Arai A. EBV induces persistent NF-κB activation and contributes to survival of EBV-positive neoplastic T- or NK-cells. PLoS One. 査読有 2017;12(3): e0174136.

Imai A, Takase H, Imadome KI, Matsuda G, Ohnishi I, Yamamoto K, Kudo K, Tanaka Y, Maehara T, Miura O, Arai A. Development of extranodal NK/T-cell lymphoma nasal type in cerebrum following Epstein-Barr virus-positive uveitis. Internal Medicine. 査読有 2017;56(11): 1409-1414.

Toriihara A, Nakajima R, Arai A, Nakadate M, Abe K, Kubota K, Tateishi U. Pathogenesis and FDG-PET/CT findings of Epstein-Barr virus-related lymphoid neoplasms. Ann Nucl Med. 査読有 2017; 31(6):425-436. [Epub ahead of print]

Toriihara A, Arai A, Nakadate M, Yamamoto K, Imadome KI, Miura O, Tateishi U. FDG-PET/CT findings of chronic active Epstein-Barr virus infection. Leuk Lymphoma. 査読有 2017 Oct 12:1-4.[Epub ahead of print]

Tokoro S., Namiki T., Miura K., Watanabe K., Arai A, Imadome KI, Yokozeki H. Chronic active Epstein-Barr virus infection with cutaneous lymphoproliferation: haemophagocytosis in the skin and haemophagocytic syndrome. J Eur Acad Dermatol Venereol. 査読有 2017 Oct 12. [Epub ahead of print]

小野澤枝里香、柴山春奈、今留謙一、甘楽明穂、小山高敏、三浦修、新井文子. 慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス感染症における炎症性サイトカイン産生. 臨床血液. 査読有 2017;58(3):189-196.

柴山 春奈, 今留 謙一, 小野澤 枝里香, 甘楽 明穂, 三浦 修, 小山 高敏, 新井 文子. 慢性活動性 Epstein-Barr virus 感染症における EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞. 臨床血液 査読有 2017;58(6):583-588

Hosoi H, Imadome KI, Tamura S, Kuriyama K, Murata S, Yamashita Y, Mushino T, Oiwa T, Kobata H, Nishikawa A, Nakakuma H, Hanaoka N, Isobe Y, Ohshima K, Sonoki T. An Epstein-Barr virus susceptible immature T-cell line, WILL4, established from a patient with T-lymphoblastic lymphoma bearing CD21 and a clonal EBV genome. Leuk Res. 査読有 2017Apr;55:1-5.

Imadome KI, Fujiwara S. Generation and analysis of humanized mouse model of EBV infection. *Methods Mol Biol.* 査読有 2017; 1532:241-254

Arai A, Sakashita C, Hirose C, Imadome KI, Yamamoto M, Jinta M, Fujiwara S, Tomita M, Shimizu N, Morio T, and Miura O : Hematopoietic stem cell transplantation for adults with EBV-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorders: efficacy and predictive markers. *Bone Marrow Transplant.* 査読有 2016 Feb 22.

Matsui S, Takeda Y, Isshiki Y, Yamazaki A, Nakao S, Takaishi K, Nagao Y, Hasegawa N, Togasaki E., Shimizu R, Kawajiri C, Sakai S., Mimura N, Takeuchi M, Ohwada C, Sakaida E, Iseki T, Imadome KI, Nakaseko C. Chronic active Epstein-Barr virus infection with marked pericardial effusion successfully treated with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Rinsho Ketsueki.* 査読有 2016 May; 57(5): 624-9.

Yoshimori M, Takada H, Imadome KI, Kurata M, Yamamoto K, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A : P-glycoprotein is expressed and causes resistance to chemotherapy in EBV-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Med.* 査読有 4(10):1494-504. 2015.

Matsuda G, Imadome K, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Immunotherapy.* 査読有 2015 Apr;7(4): 335-41.

Fujiwara S, Imadome KI, Takei M.

Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med.* 査読有 2015 Jan 23; 47: e135.

Fukuda A, Imadome KI, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, Kasahara M. Evaluation of the immune function assay in pediatric living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 査読有 2015 Mar; 19(2):144-52.

[学会発表](計 100 件)

米瀬一朗、坂下千瑞子、今留謙一、小林徹、澤田明久、伊藤嘉規、福原規子、廣瀬朝生、竹田勇輔、牧田雅典、遠藤知之、木村俊一、石村匡崇、富田誠、中村桂子、三浦修、大賀正一、木村宏、藤原成悦、新井文子. 慢性活動性EBウイルス感染症の本邦における診療実態. 第27回EBウイルス感染症研究会 2018年3月18日 東京

新井文子. 慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス感染症～発症分子機構の解明と治療法の開発～ 第 27 回 EB ウイルス感染症研究会 2018 年 3 月 18 日 東京

今留謙一. ヒト化マウスを用いた EB ウイルス疾患モデルマウス作製と病態発現解析～限界とこれから～東京医科歯科大学小児科 Monday-Seminar 2018 年 2 月 26 日東京 ( 招聘講演 )

Onozawa E, Shibayama H, Aoki S, Tuzura A, Imadome KI, Koyama K, Miura O, Arai A. STAT3 is constitutively activated and can be a therapeutic target of JAK inhibitors in chronic active Epstein-Barr virus infection. The 22th Congress of European society of Hematology ( Madrid ) 20170623

Tsuzura A, Yoshimori M, Konno K, Imadome KI, Onozawa E, Ohkawa R, Tozuka M, Miura O, Arai A. *Tumor Cells*

from EBV-Positive T- or NK-Cell  
Neoplasms Induce Differentiation and  
Activation of Macrophages by Secreting  
Humoral Factors. The 49<sup>th</sup> American Society  
of Hematology Annual Meeting (Atlanta)  
20171211

今留謙一. EBV 関連 T/NK 細胞リンパ増殖症の病態把握と診断および治療戦略.  
第 2 回血液疾患研究会 2017 年 1 月 27 日  
和歌山 ( 招聘講演 )

Shibayama.H, Imadome KI, Sakashita.C,  
Watanabe K, Kawano F, Shimizu N, Koyama  
T, Fujiwara S, Miura O, Arai.A. In vitro and  
in vivo effects of bortezomib on  
EBV-T/NK-LPDs. The 78th Annual  
Meeting of the Japanese Society of  
Hematology. 2016年10月14日 横浜

今留謙一. 臓器横断的シンポジウム 3 移  
植後感染症 ( 小児 ) 移植治療後の日和見  
感染症関連ウイルス疾患の病態把握と治  
療戦略. 第 52 回日本移植学会 2016  
年 9 月 30 日 東京 ( 招聘講演 )

小松穂菜実、今留謙一、柴山春奈、矢田  
知隆、山田桃子、山本浩平、小山高敏、  
藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV陽性  
T,NKリンパ増殖症におけるSTAT3の恒常  
的活性化とその意義. 第24回EBV感染症  
研究会 2015年3月15日 東京

今留謙一. ヒト化マウスを用いた疾患モ  
デルマウスの作製と応用. 高知大学大学  
院DCセミナー 2015年7月 高知 ( 招  
聘講演 )

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 新井文子. エルゼビア『今日の臨床サポ  
ート』(改訂第 3 版) 血球貪食症候群  
2017 年 3 月公開

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
東京医科歯科大学医歯学総合研究科先端血  
液検査学分野

<https://labohematology.jimdo.com/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

新井 文子 ( ARAI, Ayako )  
東京医科歯科大学・保健衛生学研究科・准教授  
研究者番号 : 70359678

### (2)研究分担者

今留 謙一 ( IMADOME, Ken-ichi )  
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・  
高度感染症診断部 部長  
研究者番号 : 70392488

### (3)連携研究者

小原 収 ( OHARA, Osamu )  
公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム医療  
推進部・部長  
研究者番号 : 20370926