

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06867

研究課題名(和文) 遺伝子改変EBウイルスとヒト化マウスを用いたリンパ増殖性疾患の発症病理の解析

研究課題名(英文) Research for the pathogenic mechanism using transgenic EB virus and humanized mice

研究代表者

渡辺 崇広 (Watanabe, Takahiro)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10624398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr ウイルス(EBV)はガンマヘルペスウイルス亜科に属し、EBV関連リンパ増殖性疾患やさまざまな悪性腫瘍と関連している。EBVはこれまで培養細胞レベルでの研究を中心に展開されてきたが、*in vivo*レベルでの解析については十分とは言えない。本研究では生体レベルでのEBV関連リンパ増殖症の発症病理の解析可能な造血系ヒト化マウスモデルを樹立した。*In vitro*でEBVを感染させた臍帯血由来単核球を移植した重度免疫不全マウスでは効率よくリンパ増殖症を発症した。本モデルマウスがウイルス増殖過程やリンパ増殖症の発症病理解明に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is a member of gamma-herpesvirus, associated with lymphoproliferative disorders (LPDs) and malignant tumors. EBV has been studied extensively *in vitro*, but its *in vivo* analysis has not been sufficient. In this study, we established the humanized mouse model which enabled pathological analysis in a physiological setting. Severely immunodeficient mice transplanted with cord blood infected with EBV *in vitro* efficiently developed lymphoproliferative disorder. These findings suggested that this animal model was available for research of the pathogenic mechanism.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBV ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス(EBV)は1964年に世界で最初に報告された“ヒトがんウイルス”である。EBV は成人の大部分が既に感染しており、死ぬまでに何の病気も引き起こさない場合がほとんどである。しかし、化学療法による骨髄抑制や先天性・後天性免疫不全における免疫不全状態ではEBV は再活性化し、移植後リンパ増殖症を初めとする免疫不全関連リンパ増殖性疾患を引き起こす。これらEBV 関連合併症により、がん治療や移植治療の継続が困難となる場合も多い。さらに EBV はバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、胃癌といったさまざまな悪性腫瘍と関連する。これら EBV 関連癌の多くは悪性度が高く、予後不良である。また、EBV 感染症に有効な抗ウイルス薬は存在せず、新たな作用機序を有する新規治療薬の開発が望まれている。

### Epstein-Barrウイルス(EBV)

- ▶ 90%以上の成人が感染
- ▶ ヒトがんウイルス

リンパ系	バーキットリンパ腫 移植後リンパ増殖症
上皮系	上咽頭癌 胃癌



- ▶ 強い免疫抑制に伴って免疫不全関連リンパ増殖性疾患を発症

#### EBV感染症の臨床的問題点

- 1) EBV関連がんの多くは難治性
- 2) 移植後リンパ増殖症が移植医療の障害
- 3) EBV感染症に有効な抗ウイルス薬はない

ヘルペスウイルス科のウイルスは潜伏感染とウイルス産生感染という二つの感染様式を示すことが特徴である。潜伏感染ではヒト細胞内で維持するために必要な遺伝子のみを発現している。一方で免疫不全状態に陥るとウイルス産生感染が起こり、感染性をもつ成熟ウイルス粒子が爆発的に産生される。このウイルス増殖過程はウイルス特異的な現象であるため、抗ウイルス薬のターゲットとして極めて適している。これまで、当研究室ではガンマヘルペスウイルス独自の増殖機構を明らかにするために、ウイルス遺伝子をノックアウトした変異型 EBV を作製し、培養細胞レベルで解析してきた(Watanabe et al, J Virol, 2015; 他)。しかし、in vivo に関しては、EBV はヒトにしか感染しないため実験動物学的解析が不十分である。

近年、重度免疫不全マウスにヒト臍帯血由

来幹細胞を移植してマウスにヒトの免疫系を再構築させる、ヒト化マウスを用いた EBV 感染動物モデルが報告されている (Sato et al, Blood, 2011)。したがって、本研究ではヒト化マウスを応用した病態モデル動物を樹立し、EBV 遺伝子をノックアウトした変異型 EBV を感染させ、より生体に近いレベルでの EBV 増殖過程およびリンパ増殖性疾患の発症病理を解析する。

## 2. 研究の目的

(1) 免疫不全マウスに投与したヒト造血幹細胞が生着させ、ヒト免疫系を形成するかどうかを検討する。EBV が感染可能かつ EBV 関連リンパ増殖性疾患を発症する動物実験モデル(ヒト化マウス)を確立する。

(2) ヒト化マウスに変異ウイルスを感染させ、リンパ増殖性疾患に類似した病態を形成するかどうか検討する。臓器への感染細胞の浸潤、感染細胞の動態・性状、シグナル伝達経路、サイトカインの解析を通じて、リンパ増殖性疾患発症におけるウイルス遺伝子の役割を解明する。研究期間中、EBV 遺伝子をノックアウトさせた変異ウイルスを、ヒト化マウスに感染させ、生体レベルでのフェノタイプを明らかにする。

(3) ヒト化マウスにおける変異 EBV と野生型 EBV のウイルス増殖過程や病態形成の違いを総合的に評価し、新規抗ウイルス薬のターゲットを同定するための基盤となる知見を得る。

### 研究計画

#### 学術的問題点

EBVはヒトにしか感染しないためin vivoモデルは極めて限定

#### 本研究の目的

- ・ EBVが感染可能な動物実験モデル(ヒト化マウス)を確立
- ・ 変異型EBVを感染させ、EBV増殖過程およびリンパ増殖性疾患の発症病理を解明

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト化マウスモデルの樹立

臍帯血由来造血幹細胞を理化学研究所バイオリソースセンターより入手し、6 週齢のNOG マウスに経静脈投与する。12 週間後に末梢血を採取し、FACS 解析により B 細胞、T 細胞、NK 細胞、マクロファージといったヒト免疫系細胞が分化していることを確認する。

### (2) 適正な感染条件の決定

初年度は野生型 EBV をヒト化マウスに感染させ、感染時期、投与経路、ウイルス量などの感染条件を決定する。ウイルスの調整に

については、ウイルス産生が可能な培養細胞の系で得られたウイルス液を超遠心機にて濃縮したものをを用いる。濃縮ウイルスの一部を用いて EBV 陰性 B 細胞株に感染させ、GFP 陽性率を FACS で測定することで、感染性ウイルス粒子の数を計測する。

#### (3) ヒト化マウスにおける EBV 感染実験

EBV 遺伝子をノックアウトさせた変異型 EBV を、樹立したヒト化マウスに感染させる。変異型 EBV は野生型と同様、超遠心にて濃縮させたウイルス液を用い、感染性ウイルス粒子の数を野生型と同じになるよう調整する。ヒト化マウスに感染後、末梢血中のウイルス定量をリアルタイム PCR 法で経時的に行う。感染細胞の同定は当研究室で開発された細胞表面抗原と EBV encoded small RNA (EBER) を同時に染色・検出する Flow cytometric in situ hybridization 法で行う。

#### (4) 変異 EBV を感染させたマウスモデルの病態解析

EBV 投与後は EBV 関連リンパ腫の発生率を調べる。EBV 関連の腫瘍を探索する際には、EBV に導入されている GFP の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡で観察する。摘出した各臓器を用いてパラフィン切片を作製し、in situ hybridization (ISH)、RT-PCR、免疫染色を行い、ウイルス遺伝子の発現パターン、感染細胞の同定、腫瘍悪性度の評価を行う。脾臓部から分離した細胞傷害性 T 細胞活性や産生サイトカインの定量など免疫学的検討を行う。さらにマウス生存日数を Mann-Whitney の U 検定により、生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検定する。以上より、変異型 EBV の病態を野生型と比較することで、抗ウイルス薬の適正な新規ターゲットを同定するための基盤となる新規知見を得る。

#### 4. 研究成果

##### 【平成 28 年度】

初年度、まず EBV が感染可能なマウスモデルを樹立するために造血系ヒト化マウスの作製に着手した。ヒト臍帯血由来造血幹細胞を理化学研究所バイオリソースセンターより入手し、6 週齢の NOG マウスに経静脈投与した。末梢血中に B 細胞、T 細胞、NK 細胞、マクロファージといったヒト免疫系細胞が分化していることを確認できた。超遠心で濃縮した B95-8 株由来の感染性ウイルスをヒト化マウスに投与した。感染は成立するものの

効率よくリンパ増殖症の病態の再現することができなかった。そこで臍帯血由来単核球を同センターより入手し、in vitro で EBV ウイルスと共培養し、腹腔内投与する方法に変更した。このモデル系では EBV 関連リンパ増殖症の病態が効率よく再現された。

実験に必要なウイルス液は、EBV を感染維持させた HEK293 細胞から得た。超遠心により濃縮させたウイルス液の一部を用いて EBV 陰性 B 細胞株に感染させ、GFP 陽性率を FACS で測定することで、感染性ウイルスを定量化した。使用した感染性ウイルス量とマウスにおける病態発現を総合的に評価し、本モデルマウスに適正な感染条件を決定することができた。

##### 【平成 29 年度】

平成 28 年度の条件検討に基づいて、大腸菌内相同組み換えの手法で作製した変異型 EBV を感染させた。EBV ゲノムに導入されている GFP の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡下で検出し、EBV 感染細胞が腹腔内で増殖していることを確認できた。また、各臓器に浸潤した感染細胞を in situ hybridization 法や免疫染色にて可視化し、EBER 陽性 B 細胞が腫瘍性に浸潤していることがわかった。さらに各摘出臓器をホモジナイズし、臓器内のウイルス DNA 量をリアルタイム PCR 法にて定量化した。

#### 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 6 件)

1) Kawada JI, Ando S, Torii Y, Watanabe T, Sato Y, Ito Y, Kimura H. Antitumor effects of duvelisib on Epstein-Barr virus-associated lymphoma cells. *Cancer Med*, 10.1002/cam4.1311. 2018, 査読あり

2) Yoshida M, Murata T, Ashio K, Narita Y, Watanabe T, Masud HMA, Sato Y, Goshima F, Kimura H. Epstein-Barr Virus BKRF4 Gene Product Is Required for Efficient Progeny Production. *J Virol* 14;91(23), 10.1128/JVI.00975-17 2017, 査読あり

3) Masud HMA, Watanabe T, Yoshida M, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. Epstein-Barr Virus BKRF4 Gene Product Is Required for Efficient Progeny Production. *J Virol* 14;91(23), 10.1128/JVI.00975-17

2017, 査読あり

4) Yoshida M, Watanabe T, Narita Y, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The Epstein-Barr Virus BRRF1 Gene Is Dispensable for Viral Replication in HEK293 cells and Transformation. Sci Rep. Jul 20;7(1):6044.

10.1038/s41598-017-06413-7 2017, 査読あり

5) Watanabe T, Sakaida K, Yoshida M, Masud HMA, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The C-Terminus of Epstein-Barr Virus BRRF2 Is Required for its Proper Localization and Efficient Virus Production. Front Microbiol 31;8:125.

10.3389/fmicb.2017.00125 2017 査読あり

6) Ando S, Kawada J, Watanabe T, Suzuki M, Sato Y, Torii Y, Asai M, Goshima F, Murata T, Shimizu N, Ito Y, Kimura H, Tofacitinib Induces G1 Cell-Cycle Arrest and Inhibits Tumor Growth in Epstein-Barr Virus-Associated T and Natural Killer Cell Lymphoma Cells, Oncotarget 22;7(47):76793-76805.

10.18632/oncotarget.12529 2016 査読あり

〔学会発表〕(計 6件)

1) 渡辺崇広, 佐藤公治, 松尾浩一郎. Cyclin Dependent Kinase 阻害剤はヘルペスウイルス増殖を抑制する Molecular mechanisms of inhibition of herpesvirus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors 第62回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 国立京都国際会館, 京都 2017/10/20

2) Watanabe T, Yoshida M, Masud HMA, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The C-Terminus of Epstein-Barr Virus BRRF2 Is Required for its Proper Localization and Efficient Virus Production. 42th Annual International Herpesvirus Workshop, Ghent International Convention Center (ICC), Ghent, Belgium, July 29-August 2, 2017

3) 渡辺崇広, 村田貴之, MASUD H.M. Abdullah AI, 吉田全宏, 佐藤好隆, 五島典, 木村宏. EBV BGLF4 は EBV 関連リンパ増殖症の進展に關与する 第31回ヘルペスウイルス研究会 松江ニューアーバンホテル 松江 2017/6/15

4) Watanabe T, Goshima F, Kimura H, Murata T, Epstein-Barr Virus Protein Kinase

Contributes to LPD Development in Mice Model 第9回 NAGOYA グローバルリトリート, 愛知健康プラザ 大府, 2017/2/10

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 1件)

名称: Cyclin dependent kinase(CDK)阻害剤による Epstein-Barr ウイルスのウイルス産生抑制

発明者: 佐藤好隆, 木村宏, 渡辺崇広

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: C20170269

取得年月日: 2017/12/26

国内外の別: 日本

〔その他〕

ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 崇広 (WATANABE, Takahiro)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10624398

### (2) 研究分担者 無し

### (3) 連携研究者 無し

### (4) 研究協力者

木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30303621