

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15165

研究課題名(和文) ヒト化マウスモデルを用いたEBV関連リンパ増殖症の病態解析と新たな標的治療の評価

研究課題名(英文) Pathological analysis and evaluation of a novel therapeutic target using a humanized mouse model in EBV-associated lymphoproliferative disorder

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エプスタインバーウイルス(EBV)は、免疫不全関連リンパ増殖性疾患の発症に関与する。サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤がウイルスの構造タンパク質をコードする遺伝子の発現を特異的に抑制できることを明らかにしてきた。本研究では、CDK阻害剤が*in vivo*レベルで治療効果が期待できるかどうかを調べた。CDK2複合体の阻害剤をLPD発症マウスモデルに投与すると延命効果をもたらし、腫瘍浸潤を抑制した。CDKの阻害はEBV陽性B細胞においてG1細胞周期の停止とアポトーシスを効率的に誘導した。これらの結果は、CDK阻害剤が細胞周期を抑制し、抗腫瘍効果をもたらすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD20モノクローナル抗体製剤であるリツキシマブはEBV関連LPDに対して有効であることが証明されているが、ときにCD20陰性の腫瘍細胞の選択的増殖による耐性化が問題である。またDNA複製機構をターゲットとした既存の抗ヘルペスウイルス薬はEBV感染症に対する有効性が示されていない。このような既存の抗ヘルペスウイルス薬は骨髄抑制を誘発するため、免疫不全の患者においては投与が困難である。CDK阻害剤が後期遺伝子発現を阻害すると共に、アポトーシスを効率よく誘導することから、LPDの重症化克服をするべく新しい治療戦略の提供に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is implicated in immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. We have previously shown that cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors are able to specifically suppress the expression of viral late genes, particularly those encoding structural proteins. In this study, we examined whether CDK inhibitors confer a therapeutic effect against LPDs *in vivo*. Treatment with an inhibitor of the CDK2 complex resulted in a survival benefit and suppressed tumor invasion in a mouse model of LPDs. Inhibition of CDK efficiently induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in EBV-positive B cells. These results suggest that CDK inhibitors suppress cell cycle progression, resulting in the antitumor effect.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBV LPD CDK マウスモデル がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス(以下 EBV)は成人の 90%以上が感染している普遍的なウイルスである。しかし、がん治療や移植医療では、強い免疫抑制に伴ってがん原性遺伝子を持つ EBV がドライバー因子となり、移植後リンパ増殖症をはじめとする免疫不全関連リンパ増殖性疾患を発症する。これら EBV 関連合併症により、がん治療や移植医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、上咽頭がん、胃がんといったさまざまな悪性腫瘍と密接に関連している。

EBV は潜伏感染と溶解感染の 2 つの感染様式を有し、潜伏感染から溶解感染が誘導されることを再活性化と言い、EBV 関連がんではウイルス再活性化が検出される(Chien et al., N Engl J Med. 2001)。再活性化した細胞は宿主細胞及びウイルス由来のサイトカインや増殖因子を放出し、がんの進展・維持に寄与していると考えられている(Murata et al., Rev Med Virol. 2014)。再活性が起こると、ウイルス DNA 合成に重要な早期遺伝子、ウイルス粒子形成に必要な後期遺伝子が順に発現し、成熟したウイルス粒子が細胞外へ放出される。この EBV の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。早期遺伝子をターゲットとした既存の抗ヘルペスウイルス薬 Acyclovir, Ganciclovir は、*in vitro* において EBV の増殖を抑制するが、臨床的には EBV 関連疾患に対する有効性は証明されていない。これらの抗ウイルス薬は骨髄抑制を誘発するため、免疫不全関連リンパ増殖症では投与が困難である。さらに Acyclovir は耐性化も問題視されている。そのため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。

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解明するために、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., Virology. 2015; 他)。先に述べたように、早期遺伝子をターゲットとした抗ヘルペスウイルス薬は骨髄抑制や薬剤耐性の問題があるうえに、EBV 感染症に対する有効性は示されていない。近年、後期遺伝子発現制御機構が新たな創薬ターゲットとして着目されている(Davis et al., Mol Cell 2015; Perng et al., PLoS Pathog 2014)。我々を含め世界中で後期遺伝子の発現に必要な分子の探索が行われ、これまで 6 つの分子が報告されてきた(Djavadian et al., PLoS Pathog. 2016; Watanabe et al., J Virol. 2015)。これらの因子は Viral pre-initiation complex(vPIC)と呼ばれる複合体を形成し、後期遺伝子の発現を転写レベルで制御している。vPIC 関連因子に共通していることは、各因子をノックアウトすると後期遺伝子の発現が特異的に抑えられ、ウイルス増殖が低下する点である。培養細胞レベルの結果では vPIC が抗ウイルス薬のターゲットになりうることを示唆される。しかし、EBV はヒトにしか感染しないため *in vivo* での評価は困難であると考えられてきた。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、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; Ma et al., J Clin Invest. 2015)。これまで当研究室では、ヒト化マウスの系を応用した EBV 関連リンパ増殖症の発症モデルマウスの樹立に着手してきた。本研究ではこのモデルマウスを利用して vPIC 関連因子の一つ BDLF4 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症の発症病理への関与を明らかにする。

2. 研究の目的

EBV 関連リンパ増殖症の優れたモデルであるヒト化マウスを最大限に利用して、リンパ増殖症発症における vPIC の役割を後期遺伝子発現との関係を含めて明らかにすること、そして抗ウイルス薬のターゲットとして有用かを評価することを目的に実験を行った。

3. 研究の方法

これまで当研究室ではウイルス溶解感染を誘導した EBV 感染細胞 B95-8 細胞に様々な化合物で処理し、後期遺伝子の発現を特異的に抑制する化合物をスクリーニングしてきた。スクリーニングで同定できた化合物 Cyclin-dependent kinase (CDK)阻害剤に着目し、後期遺伝子の発現およびウイルス増殖を抑制できる薬剤であるかどうかを検討した。さらに野生型 EBV を感染させたヒト化マウスモデルに薬剤を投与し、抗ウイルス活性を検証した。

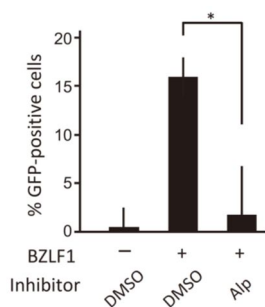
4. 研究成果

本研究により以下の知見を得た。

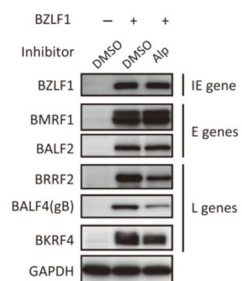
- (1) 薬剤スクリーニングにより小分子化合物 Cyclin-dependent kinase (CDK)阻害剤を同定し、その阻害剤が抗ウイルス活性を示すことを培養細胞レベルで見出した。
- (2) CDK 阻害剤が DNA 複製には影響を及ぼさず後期遺伝子の発現を負に制御することが示された。
- (3) CDK2 複合体の阻害剤を LPD 発症マウスモデルに投与すると延命効果をもたらし、腫瘍浸潤が抑制された。

(4) CDK の阻害は EBV 陽性 B 細胞において G1 細胞周期の停止とアポトーシスを効率的に誘導した。

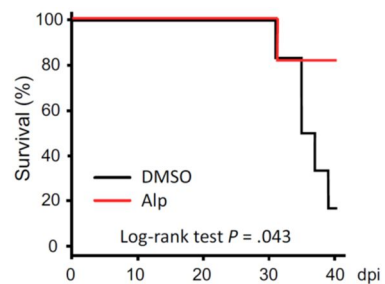
CDK 阻害剤の抗ウイルス活性



後期遺伝子の発現



生存への影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Masud H. M. Abdullah Al, Takayama Masahiro, Matsuda Hiroki, Hara Yuya, Yanagi Yusuke, Yoshida Masahiro, Goshima Fumi, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Antitumor activity of cyclin dependent kinase inhibitor alsterpaullone in Epstein Barr virus associated lymphoproliferative disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 279 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoshitaka, Watanabe Takahiro, Suzuki Chihiro, Abe Yuichi, Masud H. M. Abdullah Al, Inagaki Tomoki, Yoshida Masahiro, Suzuki Takeshi, Goshima Fumi, Adachi Jun, Tomonaga Takeshi, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 93
2. 論文標題 S-Like-Phase Cyclin-Dependent Kinases Stabilize the Epstein-Barr Virus BDLF4 Protein To Temporally Control Late Gene Transcription	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 pii: E285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01707-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Yanagi, H. M. bdullah Al Masud, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Fumi Goshima, Hiroshi Kimura, Takayuki Murata	4. 巻 21
2. 論文標題 Initial Characterization of the Epstein-Barr Virus BSRF1 Gene Product.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 01707 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11030285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masud H. M. Abdullah Al, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Goshima Fumi, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki	4. 巻 531
2. 論文標題 The BOLF1 gene is necessary for effective Epstein-Barr viral infectivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuno Yusuke, Murata Takayuki, Sato Yoshitaka, Muramatsu Hideki, Ito Yoshinori, Watanabe Takahiro, Kimura Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Defective Epstein-Barr virus in chronic active infection and haematological malignancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 404 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-018-0334-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡辺 崇広, 木村 宏
2. 発表標題 ヒト化マウスモデルを用いたEBV関連リンパ増殖症に対する新たな標的治療の評価
3. 学会等名 第48回 東海乳酸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Chihiro Suzuki, Yuichi Abe, Fumi Goshima, Takayuki Murata, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 S-phase CDKs stabilize the Epstein-Barr virus BDLF4 protein to temporally control late gene transcription
3. 学会等名 International Conference on EBV & KSHV 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Watanabe, Yusuke Okuno, Takayuki Murata, Yoshitaka Sato, Yoshinori Ito, H. M. Abdullah Al Masud, Fumi Goshima, Jun-ichi Kawada, Seiji Kojima, Seishi Ogawa, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 The presence of defective Epstein-Barr virus in patients with chronic active EBV infection and EBV-associated hematological malignancy
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村宏、渡辺崇広
2. 発表標題 ヒト化マウスモデルを用いたEBV関連リンパ増殖症に対する新たな標的治療の評価
3. 学会等名 第48回東海乳酸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺崇広、村田貴之、佐藤好隆、成田洋平、MASUD H. M. Abdullah Al、五島 典、奥野友介、木村 宏
2. 発表標題 慢性活動性EBV感染症およびEBV 関連リンパ腫における変異株の存在意義
3. 学会等名 第28回EBウイルス感染症研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関