

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08336

研究課題名(和文) EBウイルス感染による細胞不死化制御機構の解明と不死化阻害薬の開発研究

研究課題名(英文) The study of control of immortalization of EBV-infected cells and the development of the immortalization inhibitor

研究代表者

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

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)：本研究ではヒト化マウスを利用し、PTLD発症の鍵となるEBV感染細胞の不死化(がん化)制御機構の解明と不死化阻害薬の開発を目指し、PTLD発症予防法の確立を目指した。CD40シグナル阻害による不死化効率を低下させる阻害剤CD40Igの作製を従来の昆虫細胞による作製からヒト細胞に変換し、より阻害効率の上昇と投与量の減量を可能にした。また、CD40リガンド(CD40L)にも注目し、CD40Lへのシグナル阻害も可能にするCD40LIgの作製も成功した。その結果、ヒト細胞を使用した分泌型CD40Igと分泌型CD40LIgの作製および回収に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Epstein-Barr virus (EBウイルス：EBV)は移植医療後のリンパ増殖症 (PTLD: Posttransplant lymphoproliferative disorder)を引き起こす代表的なウイルスである。PTLDは、小児の臓器移植後に発生する悪性腫瘍の90%以上を占め、移植医療成績を左右する重要な合併症である。PTLD発症は成人よりも10倍以上小児が多く、その予防と治療法の確立は急務である。本研究の成果の実用化により、EBV未感染移植治療実施小児に対し、CD40Ig,CD40LIgを用いることでPTLD発症予防が可能になる初めての治療薬となることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used humanized mice in this study and aimed at the elucidation of the control of immortalization (transformation) of EBV-infected cells, and at the development of the immortalization inhibitor. And we aimed at the establishment of the PTLD prophylaxis. We converted human cells from insect cells to manufacture CD40Ig of the CD40-signal inhibitor. CD40 signal was inhibited by CD40Ig which reduced the efficiency of immortalization. We enabled increase of the inhibition efficiency and the weight loss of the dose. Also, we paid attention to CD40 ligand (CD40L), and manufacture of CD40LIg which the signal inhibition to CD40L. As a result, manufacture of secretor CD40Ig and secretor CD40LIg using human cells and a collection were successful.

研究分野：感染免疫学

キーワード：CD40シグナル EBウイルス PTLD

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EB ウイルス: EBV)は移植医療後のリンパ増殖症 (PTLD: Posttransplant lymphoproliferative disorder)を引き起こす代表的なウイルスである。PTLDは、小児の臓器移植後に発生する悪性腫瘍の90%以上を占め、移植医療成績を左右する重要な合併症である。PTLD発症は成人よりも10倍以上小児が多く、その予防と治療法の確立は急務である。現在、EBVに対する抗ウイルス薬はなく対処療法が主な治療になり、骨髄移植を選択しなくてはならない症例も少なくない。臓器移植を実施される小児の多くはEBV未感染で移植臓器と一緒にドナーのEBV感染細胞がレシピエントに移行し所管線が成立する。免疫抑制状態下においてPTLD発症リスクは上昇するため、小児における臓器移植においてはEBVによる不死化をいかに抑制するかが重要と言える。現在のところPTLD予防薬は存在しないため、その開発は重要なミッションである。

## 2. 研究の目的

EBVはBリンパ球を主な標的細胞とする。試験管内でEBVに感染したB細胞は無制限に増殖可能な不死化(がん化)細胞に形質転換する。EBV関連PTLD(EBV-PTLD)は形質転換したEBV感染細胞の増殖によって引き起こされるリンパ増殖症(EBV-LPD)である。EBVによるB細胞の活性化・増殖は、抗原刺激とT細胞ヘルプによる生理的な活性化と共通の細胞内分子機構によると考えられている。このように、EBVのライフサイクルはB細胞の正常な増殖・分化の機構を巧みに利用したものとなっている。B細胞活性化へのT細胞ヘルプにおいては、活性化T細胞上のCD40リガンド(CD40L)によるB細胞上のCD40への刺激が中心的なシグナルとなる。CD40への刺激はまた、免疫グロブリンのクラススイッチにも必要とされる。申請者らは、B細胞には通常発現していないCD40 ligand(CD40L)がEBV感染により発現誘導され、T細胞には通常発現していないCD40がEBV感染により発現誘導され、B、T細胞の両者においてCD40LとCD40の同時発現状態になることを示した(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7839-7840,2003)。また、CD40LとCD40の相互作用を阻害するとアポトーシスが増加し、EBV感染によるBリンパ球の不死化効率が著しく低下することを明らかにし、両分子の相互作用を阻害することによる新しいEBV感染症治療法の可能性を示した。一方、EBV感染Bリンパ球によるCD40Lの発現は、活性化T細胞を介さずCD40が刺激され、自己抗体の産生に至る可能性を示している。EBVの潜伏感染遺伝子の一つであるLMP1はCD40シグナルを模して感染細胞の活性化や不死化に関わっていると報告されてきた。しかし最近、感染細胞の腫瘍化(白血化)にはLMP1からのシグナルよりもCD40シグナルの方が重要であるという報告があり、CD40シグナルの不死化への重要性だけでなく腫瘍化への役割も合わせて検討することが重要といえる。

これまで申請者らはCD40阻害剤(CD40Ig)を作製し、CD40LとCD40の相互作用を阻害し不死化効率の低下を見出した。CD40IgはCD40の細胞外ドメイン領域とIgGのFc領域を融合させた融合タンパク質である。バキュロウイルスを利用しCD40Igを発現する組換えウイルスを作製し、そのCD40Ig発現組換えウイルスを昆虫細胞に感染させることでCD40Igの大量生産が可能である。しかし、研究を進める過程で分泌型のCD40Igの回収率が低いこと、昆虫細胞を使用することによるヒト糖鎖修飾がないこと、親和性が低いことからヒト化マウスを利用した*in vivo* EBV感染モデルでの検討に移行できずにいた。申請者らはヒトにしか感染しないEBVのモデルマウスを作製するために、ヒト化マウスを作製後、EBV感染させEBV感染モデルマウスを作製し、多くの研究に応用している。そのため、*in vivo*での阻害剤評価が可能である。最近、申請者らはヒト細胞を用いた分泌型タンパク質大量生産技術を開発した。CD40、CD40Lはlipid raftに存在するため分泌量は少ないが、スタチンを培養液に添付することでCD40Igの分泌量が増加することを見出している。そこで、これらの技術を利用しヒトCD40ないしCD40Lに親和力(力価)の強いCD40Ig(CD40を阻害)とCD40LIg(CD40Lを阻害)を大量生産し、*in vitro*および*in vivo*でのCD40L-CD40相互作用の効果的阻害法確立を目指す。大腸菌でのタンパク質発現系では糖鎖が保持されず、昆虫細胞ではヒトの糖鎖との乖離があり親和性も低く大量のタンパク質投与にならなかった。本研究ではヒト細胞Expi293を使用し、目的タンパク質とHis-tagを融合させた大量発現系を利用し、ヒトの糖鎖が保持され、ヒトCD40ないしCD40Lと親和力(力価)の高いCD40Ig、CD40LIgを作製・精製する。そして、CD40シグナル阻害によるEBV感染細胞の不死化効率への影響と効果を検討し、PTLD発症予防への応用を検討した。

本研究ではNOGマウスにヒト造血幹細胞(CD34陽性細胞)を移植し作製するヒト化マウスを利用し、PTLD発症の鍵となるEBV感染細胞の不死化(がん化)制御機構の解明と不死化阻害薬の開発を目指し、PTLD発症予防法の確立を目標とする。これまでの研究でCD40シグナルがEBV不死化効率に重要な役割を果たしていることが明らかとなっていた。そこでCD40シグナルを阻害する阻害薬を開発し、EBV不死化効率の抑制によるPTLD発症阻止を目的とした。

### 3. 研究の方法

大腸菌でのタンパク質発現系では糖鎖が保持されず、昆虫細胞ではヒトの糖鎖との乖離があり親和性も低く大量のタンパク質投与になった。本研究ではヒト細胞 Expi293 を使用し、目的タンパク質と His-tag を融合させた大量発現系を利用し、ヒトの糖鎖が保持され、ヒト CD40 ないし CD40L と親和力(力価)の高い CD40Ig, CD40LIg を作製・精製する。CD40 シグナル阻害による EBV 感染細胞の不死化効率への影響と効果を *in vitro* および *in vivo* 検討し、PTLD 発症予防への応用を検討する。NOG マウスに臍帯血から分離した CD34 陽性細胞を移植しヒト化マウスを作製した後、EBV をマウス尾静脈よりウイルス摂取することで感染モデルを作製する。感染時、感染成立後に ナイーブ B 細胞に試験管内で感染させた B 細胞に CD40Ig, CD40LIg を投与する マウス尾静脈より CD40Ig, CD40LIg を投与することで不死化効率の抑制効果を検討する。

### 4. 研究成果

ヒト細胞を使用した分泌型 CD40Ig と分泌型 CD40LIg の作製および回収に成功した。これらの分泌型 CD40Ig と分泌型 CD40LIg による *in vitro* 実験での EBV 感染不死化効率抑制効果は通常的不死化効率の 1/10 以上であった。また、CD40Ig および CD40LIg を同時に作用させることで、単独に使用するよりも不死化効率を上昇することを明らかにした。現在、ヒト化マウスへの EBV 感染モデルを利用した *in vivo* 実験を継続しているが、第 1 実験においては EBV によるがん発症数は 1/10 程度であった。*in vivo* においても効果は期待できる。課題としては分泌型 CD40Ig と分泌型 CD40LIg の回収率の低さである。今後は分泌型 CD40Ig と分泌型 CD40LIg の回収率のアップと精製工程の短縮である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Sakata Naoki, Okano Munehiro, Masako Ryujin, Tanaka Ai, Yamashita Yuhei, Karasuno Takahiro, Imadome Ken-Ichi, Okada Mitsuru, Sugimoto Keisuke	4. 巻 113
2. 論文標題 Donor-derived myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation in a family with germline GATA2 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 290 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kotaki Ryutarō, Kawashima Masaharu, Yamamoto Yuichiro, Higuchi Hiroshi, Nagashima Etsuko, Kurosaki Natsumi, Takamatsu Masako, Kikuti Yara Yuki, Imadome Ken-Ichi, Nakamura Naoya, Kotani Ai	4. 巻 10
2. 論文標題 Dasatinib exacerbates splenomegaly of mice inoculated with Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4355-4363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61300-y	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 Nishiyama Kei, Watanabe Yuka, Ishimura Masataka, Tetsuhara Kenichi, Imai Takashi, Kanemasa Hikaru, Ueki Kenji, Motomura Yoshitomo, Kaku Noriyuki, Sakai Yasunari, Imadome Ken-Ichi, Ohga Shouichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Parvovirus B19-Infected Tubulointerstitial Nephritis in Hereditary Spherocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Open Forum Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sakamoto Atsushi, Yamada Masaki, Tsujimoto Shin-ichi, Osumi Tomoo, Arai Katsuhiro, Tomizawa Daisuke, Ishiguro Akira, Matsumoto Kimikazu, Imadome Ken-Ichi, Kato Motohiro	4. 巻 112
2. 論文標題 A case of human herpesvirus 6 encephalitis following pediatric hematopoietic stem cell transplantation: early diagnosis and treatment matters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 751 ~ 754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kawaguchi Shinichiro, Sato Kazuya, Oshiro Hisashi, Imadome Ken-Ichi, Kanda Yoshinobu	4. 巻 59
2. 論文標題 Recurrent Enteritis Associated with Epstein-Barr Virus-positive CD4 <sup>+</sup> T-cell Lymphoproliferative Disorder after Autologous Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2565 ~ 2569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kotaki Ryutarō, Kawashima Masaharu, Yamamoto Yuichiro, Higuchi Hiroshi, Nagashima Etsuko, Kurosaki Natsumi, Takamatsu Masako, Kikuti Yara Yukie, Imadome Ken-Ichi, Nakamura Naoya, Kotani Ai	4. 巻 10
2. 論文標題 Dasatinib exacerbates splenomegaly of mice inoculated with Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4355-4363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61300-y	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 該当する

1. 著者名 Katahira Yasuhiro, Higuchi Hiroshi, Matsushita Hiromichi, Yahata Takashi, Yamamoto Yuichiro, Koike Ryo, Ando Kiyoshi, Sato Katsuaki, Imadome Ken-Ichi, Kotani Ai	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased Granulopoiesis in the Bone Marrow following Epstein-Barr Virus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49937-w	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 該当する

1. 著者名 Sakaki Shinichiro, Imadome Ken Ichi, Kawano Fuyuko, Nakadate Hisaya, Ishiguro Akira	4. 巻 61
2. 論文標題 Shift in Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in chronic active EBV disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 825 ~ 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13935	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 該当する

1. 著者名 Ishimura Masataka, Eguchi Katsuhide, Shiraishi Akira, Sonoda Motoshi, Azuma Yoshihiro, Yamamoto Hiroyuki, Imadome Ken-ichi, Ohga Shouichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Systemic Epstein-Barr Virus-Positive T/NK Lymphoproliferative Diseases With SH2D1A/XIAP Hypomorphic Gene Variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2019.00183	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 該当する

1. 著者名 Tanita Kay, Hoshino Akihiro, Imadome Ken-Ichi, Kamiya Takahiro, Inoue Kento, Okano Tsubasa, Yeh Tzu-wen, Yanagimachi Masakatsu, Shiraishi Akira, Ishimura Masataka, Schober Tilmann, Rohlf Meino, Takagi Masatoshi, Imai Kohsuke, Takada Hidetoshi, Ohga Shouichi, Klein Christoph, Morio Tomohiro, Kanegane Hirokazu	4. 巻 7
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus-Associated T-Cell Lymphoproliferative Disorder Associated With Hypomorphic IL2RG Mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2019.00015	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------