

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15578

研究課題名（和文）EBV感染腫瘍細胞の根絶を目指した慢性活動性EBウイルス感染症治療法の開発

研究課題名（英文）Development of treatment strategy for chronic active EBV infection to eradicate EBV-infected tumor cells

研究代表者

内田 晶子（UCHIDA, AKIKO）

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：70866889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：EBV陽性T/NK細胞株および慢性活動性EBウイルス感染症（CAEBV）患者由来の末梢血単核球（PBMC）でBCL2の発現が確認された。BCL2阻害剤Venetoclaxは、CAEBV患者PBMCの細胞増殖と炎症性サイトカインの産生を抑制した。CAEBVマウスモデルにVenetoclaxを投与すると、EBV感染細胞の肝臓、脾臓への浸潤が抑制された。Venetoclaxを投与したマウスでは、末梢血中のIFN-g濃度が低下する傾向にあった。これらの結果から、VenetoclaxはCAEBVの主な診療像である炎症および腫瘍抑制する効果があることが示され、新規治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBVは世界中のほぼすべてのヒトが感染している。なぜその一部でEBVがT,NK細胞への持続感染とクローナルな増殖を来してCAEBVを発症するのか、その機序は未解明である。また根治薬は未だ開発されていない。CAEBVは炎症症状で発症し、進行すると難治性リンパ腫へと進行して致死的経過をとる。本研究の結果はCAEBVの炎症症状のみならず、感染細胞自身の駆逐にも寄与し得る。CAEBVの報告はこれまで本邦に集中してきたが世界的に増えていく。グローバルな患者の予後の改善に寄与し得る。

研究成果の概要（英文）：Expression of BCL2 was confirmed in EBV-positive T/NK cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from patients with CAEBV. The BCL2 inhibitor Venetoclax suppressed cell proliferation and the production of inflammatory cytokines in PBMCs from CAEBV patients. Furthermore, administration of Venetoclax to a CAEBV mouse model inhibited the infiltration of tumor cells infected with BV into the liver and spleen. Additionally, a tendency for decreased IFN-g levels in peripheral blood was observed in mice treated with Venetoclax. These results suggest that Venetoclax has the potential to suppress the primary symptoms of CAEBV and could be a promising new therapeutic agent.

研究分野：血液内科学

キーワード：EBウイルス

1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) とは、EBV に感染した T,NK 細胞の活性化に伴う全身の炎症と、感染細胞のクローナルな増殖を伴う希少難治疾患である。炎症、腫瘍という 2 つの顔をもち、適切に治療されないと血球貪食性リンパ組織球症もしくは悪性度の高い治療抵抗性リンパ腫へと進行し、致命的経過をとる (*Blood*;119:673,2012, *Blood adv.* 14;2918,2020)。患者報告は日本を中心とする東アジアに偏っている。

EBV はヒトにひとたび感染すると B 細胞へ持続感染し生涯排除されることは無い。**なぜ一部のヒトのみ EBV が T,NK 細胞へ感染し、CAEBV が発するのか、なぜ報告はアジア、特に日本に多いのか？そのメカニズムは未解明である。腫瘍細胞の根絶に有効な薬剤はなく、唯一の根治療法は造血幹細胞移植 (以下、移植) である (図 1)。**しかし移植治療可能な患者は患者に限られており、治療薬の開発は喫緊の課題である。

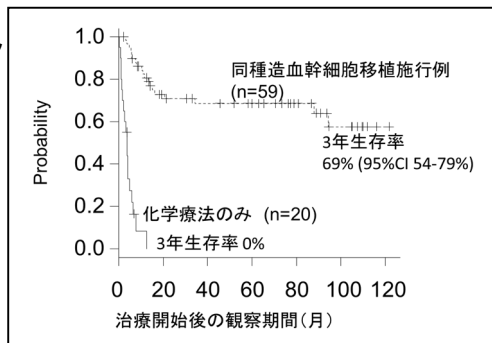


図 1

これまで研究代表者らのグループは CAEBV 患者の EBV 陽性 T,NK 細胞では NF- κ B、STAT3 が恒常的に活性化していることを報告し、その阻害剤である Bortezomib、Ruxolitinib の効果を検証してきた (*PLoS One.* 2017;12(3):e0174136 および投稿中、*Oncotarget.* 2018; 9:31077-31089.)。しかし、これまでの結果から両者ともに抗炎症効果を示すが、抗腫瘍効果は不十分であった (未発表データ)。**腫瘍細胞の根絶のためには、増殖抑制、アポトーシス誘導効果を示すあらたな薬剤を開発しなければならない。2017 年改訂された WHO 造血器腫瘍分類 (WHO2017) で、CAEBV は EB ウイルス陽性 T,NK 細胞の一つとして明記された。**これにより疾患周知が進み、**本邦のみならず海外 (アジア、欧米) でも報告は徐々に増えてきている。病態の解明、有効な治療薬の開発は私達本邦の研究者が主導的に行う責任がある。**

CAEBV の末梢血には EBV に感染しクローン性に増殖し T もしくは NK 細胞が多く存在し、純度高く分離することが可能である。それらから DNA、RNA を抽出、非感染細胞と比較することで、感染腫瘍細胞に特徴的な遺伝子変異と抗アポトーシスおよび増殖亢進に寄与する分子経路を明らかにすることができると考えられる。私たちはこれまで CAEBV 患者から樹立した EBV 陽性 T,NK 細胞株では抗アポトーシス機能をもつ Bcl2 ファミリー蛋白質の強い発現を確認した (図 2 未発表)。Bcl2 ファミリー蛋白質には阻害剤があり、その一つ Venetoclax (VEN) は CLL の治療薬としてすでに本邦でも承認され高い効果を示し注目されている。予備実験では Venetoclax が EBV 陽性 T,NK 細胞株の生存を抑制する結果も得られた (図 3)。

図 2 Bcl2 ファミリー蛋白質の発現

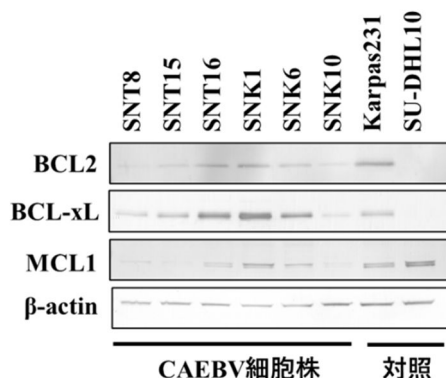
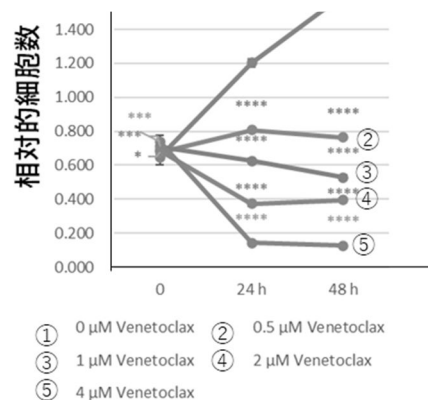


図 3 Bcl2 阻害剤 Venetoclax の増殖抑制効果



2. 研究の目的

慢性活動性 Epstein-Barr virus 感染症 (chronic active EBV infection, CAEBV) の腫瘍化分子機構を解明し、抗腫瘍効果をもつ治療薬の開発を目的とする。EBV 感染腫瘍細胞を根絶し得る治療薬は無く、唯一の根治療法は造血幹細胞移植である。そこで本研究は根治を目的とした治療薬開発に挑む。感染細胞に対し全エクソン解析およびトランスクリプトーム解析を行い腫瘍化分子の網羅的検索を行うとともに、すでに予備実験から候補因子として抽出した Bcl2 ファミリー蛋白質に注目しその機能を解析する。

3. 研究の方法

- (1) CAEBV の‘腫瘍’発症分子メカニズムの解明 CAEBV 患者の末梢血には EBV 感染腫瘍細胞が多く含まれる。これらを感染細胞の表面マーカーに対する抗体付き磁気ビーズを用いて CD4, 8, 56, 19 陽性細胞の分画に分離する。それぞれから DNA、RNA を抽出、保存する。20 例を目標に 2021-22 年度に試料収集を完了し 2023 年度に解析する。CAEBV の腫瘍細胞に特異的な遺伝子変異の解明 CAEBV 患者の末梢血単核球の腫瘍細胞分画 (EBV 感染 T、NK 細胞) から抽出した DNA と、非腫瘍細胞 (EBV 非感染細胞) 分画の DNA に対し全エクソンシーケンスを施行、両者を比較する。CAEBV に特徴的な遺伝子発現パターンと機能の解明 CAEBV 患者の末梢血単核球の腫瘍細胞から抽出した RNA に対し、末梢血より同様の方法で分離した EBV 非感染の同一フェノタイプの細胞をコントロールとし、マイクロアレイ RNAseq を用いたトランスクリプトーム解析を施行する。EBV 感染の有無は EBV 蛋白質である EBNA 1 の発現の有無を RT-PCR 法で確認し、決定する。
- (2) CAEBV 発症における Bcl2 ファミリー蛋白質の機能の解明 CAEBV の EBV 陽性 T、NK 細胞における Bcl2 ファミリー蛋白質の発現と腫瘍発症への機能を明らかにする。2021 年度は細胞株を、2022 年度は患者細胞を解析する。細胞株、患者細胞、患者組織を用いて Bcl2、Bcl-XL、MCL の発現を mRNA (RT-PCR 法)、蛋白質レベル (Western blotting、免疫組織染色) で明らかにする。細胞株、患者細胞をそれぞれの阻害剤により処理し、増殖、アポトーシス、サイトカイン産生への影響を検討する。Bcl2 ファミリー蛋白質阻害剤と Bortezomib、Ruxolitinib との併用効果を検討する。
- (3) CAEBV に対する治療薬の開発 2022 年以降上記の知見を元に治療薬の候補を抽出、細胞株、患者腫瘍細胞およびマウスモデルを用いて効果を検証する。

4. 研究成果

EBV 陽性 T/NK 細胞株および慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) 患者由来の末梢血単核球 (PBMC) で BCL2 の発現が確認された。BCL2 阻害剤 Venetoclax は、CAEBV 患者 PBMC の細胞増殖と炎症性サイトカインの産生を抑制した。CAEBV マウスモデルに Venetoclax を投与すると、EBV 感染細胞の肝臓、脾臓への浸潤が抑制された。Venetoclax を投与したマウスでは、末梢血中の IFN-g 濃度が低下する傾向にあった。これらの結果から、Venetoclax は CAEBV の主な診療像である炎症および腫瘍抑制する効果があることが示され、新規治療薬としての可能性が示唆された。本研究の結果は CAEBV の炎症症状のみならず、感染細胞自身の駆逐にも寄与し得る。CAEBV の報告はこれまで本邦に集中してきたが世界的に増えている。グローバルな患者の予後の改善に寄与し得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Manabu Matsunawa, Yasuyuki Inoue, Kunihiro Yagihashi, Yoshio Aida, Akiko Uchida, Yu Uemura, Yusuke Saiki, Madoka Takimoto, Fumiaki Sano, Ikuo Miura, Ayako Arai	4. 巻 194
2. 論文標題 The clinicopathological analysis of organising pneumonia in myelodysplastic syndrome: high frequency in der(1;7)(q10; p10)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 214-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17473	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平川経晃, 齊木佑輔, 内田晶子, 上村 悠, 大橋彩香, 吉森真由美, 小島尚美, 清水則夫, 今留謙一, 新井文子
2. 発表標題 HLA半合 致末梢血幹細胞移植を行った慢性活動性EBウイルス感染症
3. 学会等名 第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田晶子, 上村悠, 平川経晃, 大橋 彩香, 吉森真由美, 小島茂樹, 櫻田勉, 新井文子
2. 発表標題 HLHに伴う高サイトカイン血症に対するPEとCHDFの効果
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸礼乃, 齊木祐輔, 内田晶子, 上村悠, 平川経晃, 加藤雅之, 富田直人, 山本浩平, 今留謙一, 新井文子
2. 発表標題 発熱、肝障害、進行する皮膚病変を認めた全身型慢性活動性EBウイルス感染症に対するJAK1/2阻害剤ルキソリチニブ治療
3. 学会等名 第16回日本血液学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし

--

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
---------	---------