

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590134

研究課題名(和文)がんウイルスEpstein-Barr Virusに対する新規分子標的薬の開発

研究課題名(英文)Development of molecular target therapy for EBV

研究代表者

野口 耕司 (NOGUCHI, Kohji)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：80291136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒトがんウイルスEpstein-Barr virus/EBVに対する新規分子標的薬の開発を目指している。本研究課題では、DNAに結合するピロールイミダゾールポリアミド化合物に着目し、EBV発がん重要なEBNA1蛋白質のDNA結合を抑制する抗EBNA1阻害剤の開発を試みた。その結果、一つのポリアミド化合物に、EBNA1-DNA結合の阻害活性が認められた。このポリアミド化合物は、EBV感染による正常B細胞の形質転換を顕著に抑制することが示された。これらの結果、EBV感染がんに対する新規の分子標的薬としてEBNA1阻害化合物が有望である事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr Virus (EBV) transforms human B lymphocytes into immortalized cells in vitro, and is associated with various malignancies in vivo. DNA-binding protein EBNA1 plays critical role for the viral episome maintenance and transactivates viral transforming genes in latently infected cells. Therefore, DNA-targeting agents that can disrupt the EBNA1-DNA interaction will offer novel functional inhibitors of EBNA1. Here, a synthetic pyrrole-imidazole polyamide bound adjacent to the EBNA1 recognition sequences located in the dyad symmetry element of oriP, and selectively inhibited EBNA1-oriP binding. This polyamide inhibited EBV-mediated B-cell immortalization. These results suggest that EBNA1 functions will be an attractive pharmacological target for EBV-associated diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ウイルス がん EBV 分子標的

### 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV)/Human herpes virus-4 (HHV-4) は、伝染性単核球症、EBV 関連リンパ増殖症 (移植後リンパ増殖性疾患やエイズ関連リンパ腫)、バーキットリンパ腫、胃がん、上咽頭がん、NK/T 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫などの原因として知られているヘルペスウイルスであり、一般に唾液などを介して口腔咽頭領域の主に B リンパ球に感染する。また、試験管内実験でヒト B リンパ球を不死化できるがんウイルスである。

EBV に関しては、ほとんどの日本人が乳幼児の時期に感染すること、また免疫機構を逃れるように潜伏感染することから、EBV ワクチンの効果はあまり期待できないと思われるが、一方、EBV に対する選択的な抗ウイルス薬は未だ開発されておらず、新しい薬理効果による新規治療薬、特に潜伏感染細胞に於いても有効な薬剤の開発が望まれている。EBV 由来分子 EBNA1 は、EBV ゲノム中の OriP と呼ばれる領域にある特異的な塩基配列の DNA に結合する。EBNA1 の DNA 結合機能は EBV の発がん、不死化、悪性形質転換プロセスに重要であることから (Noguchi *et al.*, *Cancer Sci*, 2007)、EBNA1 と OriP DNA との結合を阻害する化合物は、新規分子標的薬剤の有力な候補になると考えられた。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、ヒトがんウイルス Epstein-Barr virus/EBV に対する新規分子標的薬の開発を目指している。具体的には、DNA に結合するピロールイミダゾールポリアミド化合物に着目し、EBV 発がん重要な EBNA1 蛋白質の DNA 結合を抑制する抗 EBNA1 阻害剤の開発を目的とする。抗 EBV 薬は未だ上市されていない中、EBV 治療薬としてピロールイミダゾールポリアミドに着目した研究は世界初であり、抗 EBNA1、抗 EBV 治療薬開発、世界初のがんウイルス発がん阻害剤開発に貢献するものと期待される。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、OriP DNA 配列に結合して EBNA1 の機能を阻害する化合物の開発を目指し、(1) OriP 上の EBNA1 結合塩基配列に特異性高く結合するピロールイミダゾールポリアミド化合物のデザインと合成、(2) 合成されたポリアミド化合物による EBNA1-OriP DNA の結合阻害確認のための *in vitro* 実験、(3) 選択されたポリアミド化合物による抗 EBNA1 活性、抗 EBV 活性の薬理評価のための細胞レベルでの実験、という 3 つのステージの実験を行う。(1)と(2)については、相互にデータをフィードバックしながら最適なポリアミド化合物の合成を 3 力年の間に繰り返す。

### 4. 研究成果

(1) OriP DNA 配列に結合して EBNA1 の機能を阻害する化合物の開発を目指し、OriP 上の

EBNA1 結合塩基配列に特異性高く結合するピロールイミダゾールポリアミド化合物のデザインと合成実験を行った。まず、OriP 上の DS 領域の 4 力所の DNA 配列 site 1~4 に対するポリアミド化合物 DSE1,2,3,4 を実際に合成、精製した。また、本化合物を用いての *in vitro* EMSA 用に大腸菌組換え蛋白質、GST-EBNA を大量精製した。この組換え蛋白質を用いた GST-EBNA1 と OriP DNA との *in vitro* binding EMSA assay の実験系を最適化した。その過程で、GST-EBNA1 があまり高濃度存在すると、それにより塩基配列特異的な結合よりも、GST-EBNA1 の非特異的な DNA 結合が生じてしまうことが判明した。そのためより選択的な実験条件を検討したところ、反応液に少量のデタージェンを加味することで、より塩基配列特異的な DNA 結合が安定して見られるようになった。この実験条件で、ポリアミド化合物と OriP DNA の結合を検討した結果、マイクロモルオーダーでのポリアミド化合物と OriP DNA との結合が確認された。さらに EMSA アッセイにより、その条件では一つのポリアミド化合物に、EBNA1-DNA 結合の阻害活性が認められた。

(2) この化合物については、その標的となる DNA 塩基配列を確定させるために、*in vitro* の Footprinting assay を行い、確かに目的の標的配列に結合している事が判明した。類似の構造のポリアミドでも検討したところ、標的となる塩基配列はそれぞれ予想通り EBNA1 が結合するであろうと思われる配列であったが、その結合力に違いがあることが明らかになった。数種のポリアミドの標的 DNA の結合力は、EBNA2 と DNA の結合を阻害する活性の強さと相関が見られた事から、これらのポリアミドは、競合阻害により EBNA1 と DNA の結合を抑制していることが推測される。また、EBNA1 の結合サイトではあるが、塩基配列が少々異なる site 1-4 についても EBNA1-DNA 結合に対するポリアミドの阻害能力も検定したところ、理論的に 100% マッチする塩基配列をもつオリゴ DNA に対する阻害効果が最も強かった事から、DNA とポリアミドの結合力が、その阻害効果に極めて需要であることが示唆された。

(3) この化合物の細胞レベルでの薬理作用を検討したところ、このポリアミド化合物は、EBV 感染による正常 B 細胞の形質転換を顕著に抑制することが示された。これらの結果、EBV 感染がんに対する新規の分子標的薬として EBNA1 阻害化合物が有望である事が明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- ① Fujita Y, Noguchi K, Suzuki T, Katayama K, Sugimoto Y. Biochemical Interaction of Anti-HCV Telaprevir with the ABC Transporters P-glycoprotein and Breast

- Cancer Resistance Protein. *BMC Research Notes*. (査読あり)  
Vol 6:445, 2013.  
doi: 10.1186/1756-0500-6-445.
- ② Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. FBX015 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin-proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Science*. (査読あり)  
Vol 104:694-702, 2013.  
doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.007.
- ③ Tanaka AR, Noguchi K, Fukazawa H, Igarashi Y, Arai H, Uehara Y. p38MAPK and Rho-dependent kinase are involved in anoikis induced by anicequol or 25-hydroxycholesterol in DLD-1 colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり)  
Vol 430: 1240-5, 2013.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.067.
- ④ Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, Sato M, Katayama K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり)  
Vol 418: 736-41, 2012.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.090.
- ⑤ Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, Fujimuro M. Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり)  
Vol 415: 573-578, 2011.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.107.
- ⑥ Yasuda A, Noguchi K, Minoshima M, Kashiwazaki G, Kanda T, Katayama K, Mitsuhashi J, Bando T, Sugiyama H, Sugimoto Y. DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-Induced Immortalization. *Cancer Science*. (査読あり)  
Vol 102:2221-2230, 2011.  
doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02098.x.
- ⑦ Masuda Y, Noguchi K, Segawa H, Tanaka N, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Novel regulatory role for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vFLIP in chemosensitization to bleomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり)  
Vol 415: 305-312, 2011.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.050.
- [学会発表](計31件)
- 野口耕司, 梅津宏紀, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 由来 RTA によるヒト IL-10 プロモーターの活性制御機構.  
日本薬学会第134年会, 2014年3月30日, 熊本
- 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-糖タンパク質/ABCB1 のリン酸化と機能制御.  
日本薬学会第134年会, 2014年3月29日, 熊本
- 野口耕司, 深澤秀輔, 山越智, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 由来 RTA/ORF50 の機能制御に対する BET family member の関与.  
第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10日, 神戸
- 田中伯享, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. PIK1 阻害剤によるアポトーシス誘導機構の解析.  
第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月26日, 東京
- 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PP5/PPP2R3C 複合体は P-糖タンパク質/ABCB1 発現を抑制する.  
第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 横浜
- 近藤慎吾, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. ABCB5 遺伝子導入細胞の薬剤耐性.  
第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 横浜
- 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. c-Myc and HDAC3 suppress KSHV Replication and Transcription Activator (RTA) protein.  
第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 横浜
- 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PP5/PPP2R3C による P-糖タンパク質/ABCB1 の発現制御.

第 17 回日本がん分子標的治療学会学術総会, 2013 年 6 月 13 日, 京都

野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. がんウイルス KSHV 由来の転写調節因子 RTA/ORF50 に対する HDAC 阻害剤と Bromodomain 阻害剤の効果.

第 17 回日本がん分子標的治療学会学術総会, 2013 年 06 月 14 日, 京都

野口耕司, 橋本幸輝, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 由来の RTA/ORF50 の機能制御に関するリシン残基の関与.

日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜

片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PP5/PPP2R3C による P-糖タンパク質/ABC1 の発現と活性制御.

日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜

野口耕司, 橋本幸輝, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 由来の RTA/ORF50 の機能制御に関するリシン残基の役割.

第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13 日, 大阪

石川宣明, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ヒト大腸がん細胞の Snail 誘導上皮間葉転換における ABC 輸送体の発現.

第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 21 日, 札幌

近藤慎吾, 三橋純子, 片山和浩, 野口耕司, 中野浩史, 岡部隆義, 杉本芳一. 新規 Pim kinase 阻害薬の抗腫瘍効果.

第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日, 札幌

田中伯享, 野口耕司, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一. PI3K 阻害による抗有糸分裂効果はカスパーゼの活性化に依存する.

第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日, 札幌

片山和浩, 野口耕司, 三橋純子, 杉本芳一. FBX015 による P-糖タンパク質/ABC1

の分解制御.

第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 21 日, 札幌

野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 関連リンパ腫に対する HDAC 阻害薬と抗ウイルス薬の相乗効果の分子基盤.

第 16 回日本がん分子標的治療学会, 2012 年 6 月 28 日, 北九州

片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-糖タンパク質に対するユビキチン E3 リガーゼ FBX015 の同定と機能解析.

第 16 回日本がん分子標的治療学会, 2012 年 6 月 28 日, 北九州

Katayama K, Noguchi K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. FBX015 is an F-box protein in E3 ligase complex for P-glycoprotein.

AACR Annual Meeting 2012, 2012 年 3 月 31 日, Chicago, IL, USA

神田輝, 鶴見達也, 野口耕司. 新規抗ウイルス薬開発をめざした EBNA1 蛋白質機能阻害の戦略.

第 21 回 EB ウイルス感染症研究会, 2012 年 3 月 17 日, 東京

⑳ 川野辺峻哲, 中村祥代, 三橋純子, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 発現細胞における BSO の影響.

日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 31 日, 札幌

㉑ 近藤慎吾, 川野辺峻哲, 三橋純子, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ヒト ABCB5 のメタボローム解析.

日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 31 日, 札幌

㉒ 野口耕司, 原一郎, 橋本幸輝, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一. がん関連ウイルス KSHV 由来の転写因子 RTA の機能制御に関する解析.

日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌

- ②4 原一郎, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. KSHV 由来の RTA/ORF50 の転写活性を変動させる薬物の探索  
第 55 回日本薬学会関東支部大会, 2011 年 10 月 8 日, 習志野
- ②5 川野辺峻哲, 野口耕司, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一. ヒト ABCB5 は ATPase 活性を有するが, ABCB1 の基質は活性に影響を与えない.  
第 55 回日本薬学会関東支部大会, 2011 年 10 月 8 日, 習志野
- ②6 片山和浩, 野口耕司, 三橋純子, 杉本芳一. P-糖タンパク質/ABCB1 結合タンパク質の同定.  
第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋
- ②7 野口耕司, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一. ウイルス由来 vFLIP によるブレオマイシン誘導 G2/M 期チェックポイントの制御.  
第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋
- ②8 川野辺峻哲, 野口耕司, 片山和浩, 三橋純子, 杉本芳一. ヒト ABCB5 の ATPase 活性の検討.  
第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 4 日, 名古屋
- ②9 Noguchi K, Yasuda A, Katayama K, Mitsunashi J, Kanda T, Minoshima M, Bando T, Sugiyama H, Sugimoto Y. EBV-induced immortalization is inhibited by polyamide targeting EBNA1-oriP binding.  
XV International Congress of Virology/IUMS2011 Congress, 2011 年 9 月 13 日, 札幌
- ③0 野口耕司, 片山和浩, 蓑島維文, 板東俊和, 杉山弘, 杉本芳一. EBNA1-OriP 結合を阻害するポリアミド化合物による EB ウイルス感染細胞の不死化阻害.

第 15 回日本がん分子標的治療学会, 2011 年 6 月 23 日, 東京

- ③1 野口耕司, 安田愛, 片山和浩, 三橋純子, 蓑島維文, 坂東俊和, 杉山弘, 神田輝, 杉本芳一. EBNA1 機能阻害剤による抗 EBV 作用.  
日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, 静岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
ホームページ:  
<http://www.pha.keio.ac.jp/laboratory/laboratory15.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口耕司 (NOGUCHI Kohji)  
慶應義塾大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 80291136

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし