

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591564

研究課題名(和文) 新規に確立したヒト組織モデルによるEBウイルス感染病態解析と薬剤スクリーニング

研究課題名(英文) The pathophysiology of EB virus infection, and screening investigational drugs using a new human tissue model

研究代表者

伊藤 嘉規 (Ito, Yoshinori)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20373491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)は、悪性腫瘍など難治性疾患を引き起こす原因となる。新規に確立したEBV感染ヒト組織モデルを用いて、感染初期の感染細胞を解析し、ナイーブ・メモリーBリンパ球への感染を確認した。また、この感染組織モデルとEBV感染免疫不全マウスを利用して、ボルテゾミブ、ラパマイシン、モガリズマブ等の作用機序の異なる薬剤について、EBV関連難治性疾患へ治療効果を実験的に解析し、有望な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) causes intractable diseases, including EBV-associated malignancies. Using a new human tissue model, EBV-infected cells were analyzed during the early stage of infection. Naive and memory B cells were found to be infected with EBV. The potential effects of the investigational drugs bortezomib, rapamycin, and mogamulizumab were analyzed using the human tissue model and a murine xenograft model. They showed therapeutic effects in the models.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：Epstein-Barr ウイルス ヒト組織モデル ラパマイシン mTOR

1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、ヒトに普遍に感染し、小児期では、伝染性単核症から、血球貪食性リンパ組織球症、慢性活動性 EBV 感染症、および移植後リンパ腫に至るまで広範な疾患の病因ウイルスとして知られている。EBV の初感染では、ウイルスが口蓋咽頭の上皮組織や B リンパ球に感染すると考えられているが、どのように感染が成立し、疾患に進展していくのかは解明されていない。また、EBV 関連の悪性疾患では、EBV が通常の標的である B リンパ球ではなく、T リンパ球や NK リンパ球に感染していることが特徴であるが、こうした感染がいつ頃生じるのかは不明である。この点について解析するためには、ウイルスがヒトに感染する際の標的組織を用いて、初期の感染を再現できる感染モデルを構築し、解析することが有用な手法である。

(2) 私共は EBV 感染ヒト組織モデルを、ヒトの扁桃組織を用いて確立した。ヒトの扁桃組織は、EBV がヒトへの感染を成立させる局所であり、感染初期の状態を再現できると期待できる。さらにこの感染モデルは、抗ウイルス効果を持つ薬剤のスクリーニングに役立つことが期待された。EBV 感染症に対して臨床的に効果が確認されている抗ウイルス剤は存在しない。一方、新規の薬剤候補は存在し、簡便に薬剤をスクリーニングできる実験系は必要である。

2. 研究の目的

(1) EBV 感染ヒト組織モデル、FISH 法による感染細胞同定法、およびリアルタイム PCR 法を応用した感染細胞における EBV 関連遺伝子発現定量法を利用し、EBV が病初期に感染する細胞 (特にリンパ球) の性状を、細胞の表面抗原や発現遺伝子のパターンから明らかにする。FISH 法は、フローサイトメータを応用し、細胞毎にウイルス抗原と細胞の表面抗原を同時に蛍光染色し解析する手法であり、私共が独自に開発した。

(2) EBV 感染ヒト組織モデルを用いて、細胞株でのみ抗ウイルス効果が報告されている薬剤や、研究中新たに報告された新規薬剤候補のヒト感染組織における効果をスクリーニングすることにより、臨床への応用の可能性を検討する。

(3) 慢性活動性 EBV 感染症患者から EBV 感染細胞を分離し、免疫不全マウスに投与することで、ヒトでの病態が再現できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 医学的理由で摘出された健常扁桃組織を、2-3 ミリ角の小片に切り分けた後、ゼラチンで作られたスポンジ台の上に置き、培養液に組織片の一部が浸る状態にして培養する。このように培養した組織片に EBV を実験的に直接暴露さ

せることにより感染させ、EBV 感染組織モデルを作成する。組織におけるウイルスの増殖が明らかになる感染 12 日以後に、培養組織を機械的に破碎し、リンパ球を単離して、FISH 法により感染細胞を解析する。また、ウイルスの増殖については、培養上清中のウイルス DNA を測定することにより評価した。

(2) EBV 感染ヒト組織モデルに抗ウイルス作用が期待できる薬剤を投与し、ウイルス増殖を指標として、新規薬剤候補のスクリーニングを行う。同様の効果判定を、EBV 感染細胞株でも行う。抗ウイルス効果のメカニズムを、細胞株を用いて解析した。

(3) 抗ウイルス作用の解析は、EBV 陽性 T 細胞株 (SNT13、SNT16、MT2/rEBV)、EBV 陽性 NK 細胞株 (SNK6、KA13、TL1)、EBV 陰性 T 細胞株 (Jurkat、MT2/hyg)、EBV 陰性 NK 細胞株 (KHYG1、NKL) の各細胞株を EBV 陽性細胞株として使用した。期待される薬剤効果に応じてそれらの細胞において、特定の受容体シグナル関連タンパクの発現や、受容体阻害薬投与下での細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、オートファジー、及び EBV 関連遺伝子発現の変化を解析した。細胞内分子の解析は、ウェスタンブロット、EBV 関連遺伝子発現はリアルタイム PCR 法で行った。

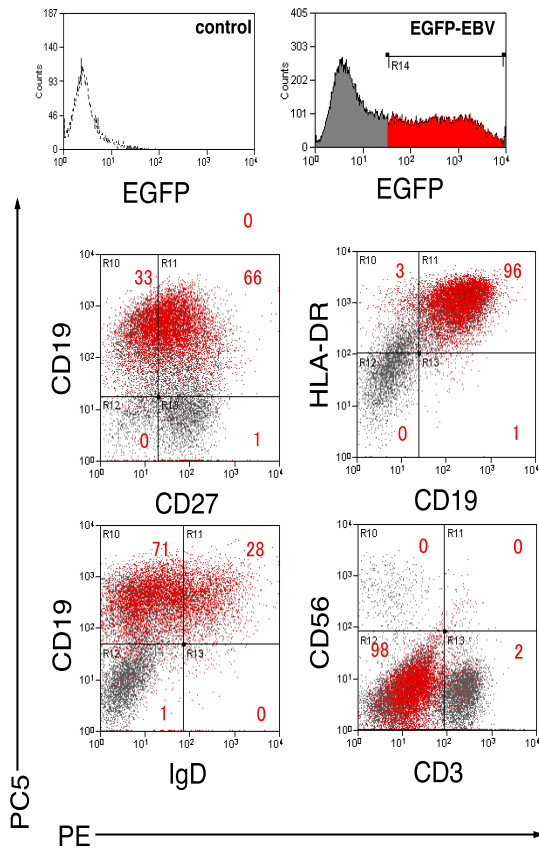
(4) NOD/Shi-scid/IL-2Rg^{null} (NOG) マウスは、特種な免疫不全マウスであり、ヒトの造血幹細胞を投与すると着生し、分化したリンパ球系を構築する。このマウスモデルにヒト EBV 感染細胞を導入し、感染モデルとして応用する。感染したマウスは、導入された細胞による腫瘍を形成するため、その大きさを測定することで、薬剤効果を評価することが可能である。

4. 研究成果

(1) EBV ヒト感染組織モデルの組織片から単離したリンパ球を解析し、EBV は主として CD19 陽性細胞に感染していることが確かめられた。さらにこの細胞はナイーブ (IgD 陽性) およびメモリー (CD27 陽性) B 細胞から構成されていた (図 1)。一方、同様に EBV ヒト感染組織モデルから単離した T/NK リンパ球を解析したが、EBV 抗原陽性となる細胞数が検出限界に近く、明らかな結論を得ることができなかった。今後、培養する組織片を増やして、解析対象の細胞数を増やす、あるいは、培養組織から得られた組織切片を染色することにより解析ができないか検討を進めることが必要である。

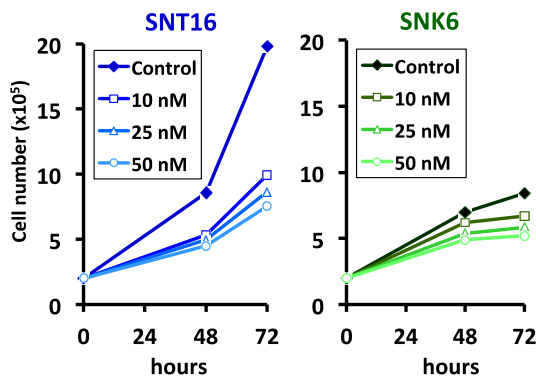
(2) EBV ヒト感染組織モデルを用いて、抗 EBV 作用が知られているアシクロビルの抗ウイルス作用を検証した。アシクロビルは濃度依存的にウイルス増力抑制効果が観察された。一方、ウイルスの表面抗原に対する抗体であ

る抗 gp350 抗体の薬剤効果を検討したが、濃度依存性の効果について明確な結論は得られず、抗体薬の抗ウイルス効果のスクリーニングは困難であることが示唆された。



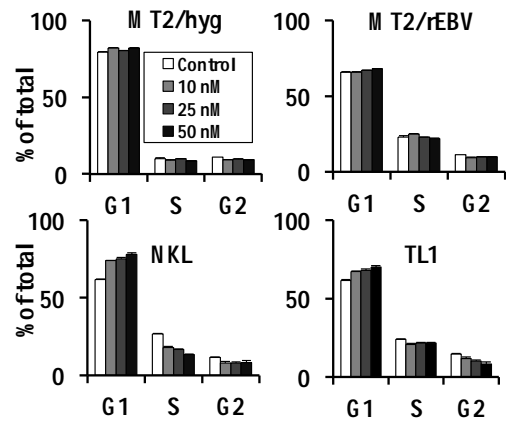
(図 1) EBV ヒト感染組織モデルから単離したリンパ球の表面抗原の解析

(3) EBV 関連の悪性疾患ではウイルス感染リンパ球の増殖が重要な病因である。ラパマイシンは、放線菌が産生する化合物で、がんに対する増殖抑制効果がよく知られている。このラパマイシンが細胞に作用する際、mTOR という名称の細胞内酵素が重要な役割を果たす。そこで、EBV 感染細胞において、mTOR 阻害薬による増殖抑制効果を、EBV 感染細胞で検討した。その結果、EBV 感染細胞株の増殖を抑制することが判明した(図 2)。



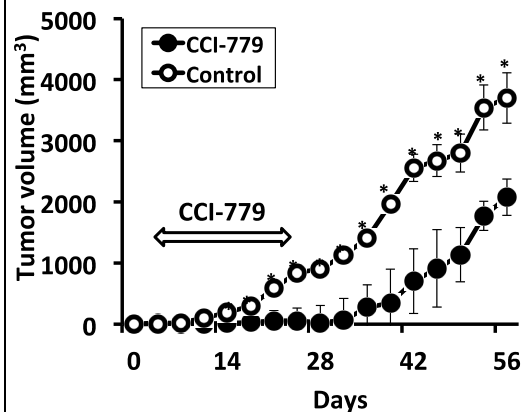
(図 2) ラパマイシンは濃度依存性に EBV 陽性細胞株の増殖を抑制する

次に細胞株におけるラパマイシンの効果を解析したところ、T/NK 細胞株において mTOR の活性化が確認された。T 細胞株において強い増殖抑制が観察されたが、EBV 陽性細胞株と、EBV 陰性細胞株で、明らかな増殖抑制の差はみとめなかった。mTOR 阻害薬により、G1 期での細胞周期停止や、p27、Rb 等の細胞周期関連タンパクの発現の変化を認めた(図 3)。一方で、mTOR 阻害薬によるアポトーシスや、オートファジーの誘導、EBV 関連遺伝子発現の変化は明らかではなかった。



(図 3) ラパマイシンは EBV 陽性細胞株における細胞周期を停止させる

この効果を in vivo で検証するため、慢性活動性 EBV 感染症患者から分離した感染細胞を投与した EBV 感染マウスモデルを用いて検討したところ、EBV 関連腫瘍の増大に対する抑制効果(図 4)および血液中 EBV 量の低下が確認された。



(図 4) ラパマイシンの誘導体である CCI-779 を投与した EBV 感染マウスモデルにおける EBV 陽性 NK 細胞腫瘍の退縮効果

(4) ボルテゾミブ(Bortezomib)は EBV 陽性 B リンパ腫細胞株において NF B の活性化を阻害しアポトーシスを誘導することが報告されていた。この薬剤の EBV 感染 T/NK 細胞に対する薬剤効果を検討するため、EBV 陽性 T/NK 細胞株を用いた実験を行い、濃度依存性の生細胞率低下を認めた。そのメカニズムは I B の分解を抑制し NF B の活性化を阻害

することでアポトーシスを引き起こしていると推測された。この薬剤の効果を、ヒト組織モデル、マウスモデルで検証することが課題である。

(5)EBV 感染 T/NK リンパ球に発現する抗 CC ケモカイン受容体 4 に対する分子標的薬であるモガリズマブ (抗 CC ケモカイン受容体 4 抗体) および EBV 感染細胞に発現するウイルス関連膜タンパクである LMP1 の発現を抑制する BIIB021 (Hsp90 阻害剤) が EBV 感染細胞株の増殖を抑制することを確認した。この作用メカニズム細胞レベルで解析すると共にヒト組織モデル、マウスモデルで検証することが重要である。

以上より、EBV ヒト感染組織モデルによる EBV 感染の解析、薬剤効果のスクリーニング・検証、さらに、マウスモデルを応用した薬剤効果の検証を行い、EBV が T/NK 細胞に感染する難治性の疾患への新規治療法の基盤となる成果を得た。

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 24 件)

Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, et al., Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric blood & cancer*, 60: 326-328, 2013. 査読有.
DOI: 10.1002/psc.24319

Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis*. 208(5):771-779. 2013
DOI:10.1093/infdis/jit222

Ito Y, Kimura H, Maeda Y, et al., Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin Cancer Res*, 18(15):4183-4190, 2012. 査読有.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1064

Kimura, H, Ito Y, Kawabe S, et al., Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases, *Blood* 119(3):673-686, 2012. 査読有.
DOI: 10.1182/blood-2011-10-381921.

Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, et al., Application of flow cytometric in situ hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/natural killer cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Science* 103(8):1481-1488, 2012. 査読有.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02305.x

Gotoh K, Ito Y, Maruo S, et al., Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 6(10):e25490, 2011. 査読有.
DOI:10.1371/journal.pone.0025490

[学会発表](計 28 件)

川田潤一、伊藤嘉規、他、mTOR 阻害薬の EBV 関連 T/NK リンパ腫に対する抗腫瘍効果の検討、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.12、神戸国際会議場(神戸市)。

鈴木道雄、伊藤嘉規、他、EBV 関連 T/NK 腫瘍に対する Hsp90 阻害剤の効果、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.11、神戸国際会議場(神戸市)。

Kawada J, Ito Y, et al., mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma, 38th Annual International Herpesvirus Workshop, 2013.7.22, Amway Grand Plaza Hotel (Grand Rapids), USA.

伊藤嘉規、他、EB ウイルス関連血球貧食性リンパ組織球症例におけるウイルス感染細胞の性状を中心とした病態解析、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、2012.11.24、西日本総合展示場(北九州市)。

河野 好彦、伊藤嘉規、他、慢性活動性 EB ウイルス感染症における EB ウイルス由来 miRNA 血漿中バイオマーカーとしての応用、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012.11.13-15、グランキューブ大阪(大阪市)。

Kimura H, Ito Y, et al. Establishment of *ex vivo* primary EBV infection model using human tonsil tissue explants. 15th international Conference on the Immunobiology and Prophylaxis of Herpesvirus Infections. 2011.10.12. San Servolo Conference Center (Venice), Italy.

[図書](計 1 件)

伊藤嘉規. 医学書院、今日の小児治療指針(第 15 版) 2012、1001(311-312)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 嘉規 (ITO, Yoshinori)

名古屋大学・医学部附属病院小児科・講師
研究者番号: 20373491

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし