

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04081

研究課題名(和文) 統合的遺伝子解析を用いた慢性活動性EBV感染症の発症の機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of chronic active EBV infection by comprehensive genome study

研究代表者

木村 宏 (Kimura, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30303621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性活動性EBV感染症患者の検体・細胞株を用い、次世代シーケンサーによる統合的遺伝子解析により、以下のことくの結果を得た。1) 患者における頻度は低いものの、生殖細胞に保持されている遺伝子欠損/多型を少なくとも2つ見出した。2) 感染細胞に生じた体細胞変異を認め、一部患者で経時的解析によりクローン進化が明らかとなった。3) 患者では高率にEBV遺伝子の一部が欠失することを見出し、機能解析により遺伝子を欠失することがリンパ腫形成能に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性活動性Epstein-Barr virus (EBV) 感染症は、わが国をはじめとする東アジアに多いT/NK細胞性リンパ増殖性疾患である。本症は予後不良で治療法も確立されていない難治性疾患である上に、発症病理についても未だ不明な点が多い。本研究で得られた知見は、慢性活動性EBV感染症のみならずEBV関連リンパ腫や上咽頭がん・胃がんなどEBV関連上皮系腫瘍に共通する分子機構、さらには他の腫瘍ウイルスの発がんメカニズムを解明につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Chronic active EBV infection (CAEBV) is an intractable disease which is characterized by EBV-infected T/natural killer cells and recurrent/persistent infectious mononucleosis-like symptoms. To clarify the neoplastic nature and pathogenesis of CAEBV, we performed comprehensive genetic analysis in patients with CAEBV. The study revealed that somatic driver mutations were found in EBV-infected cells, suggesting a unique role of these mutations in neoplastic proliferation of EBV-infected cells. Interestingly, the EBV genome harbored frequent intragenic deletions that were common in various EBV-associated lymphomas. Our findings highlight a pathogenic link between intragenic EBV deletions and EBV-associated lymphomagenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Epstein-Barrウイルス 慢性活動性EBV感染症 欠失ウイルス 悪性リンパ腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) は CD21 分子をレセプターとして B 細胞に感染し、Burkitt リンパ腫や移植後リンパ増殖症など B 細胞性腫瘍の原因となる。時に EBV は T 細胞もしくは NK 細胞 (T/NK 細胞) に感染し、節外性 NK/T リンパ腫、劇症型 NK 細胞性白血病、慢性活動性 EBV 感染症などのリンパ腫・リンパ増殖性疾患をもたらす。これら EBV 関連 T/NK 細胞性疾患は、わが国をはじめとする東アジアの発生率が高いのが特徴である。

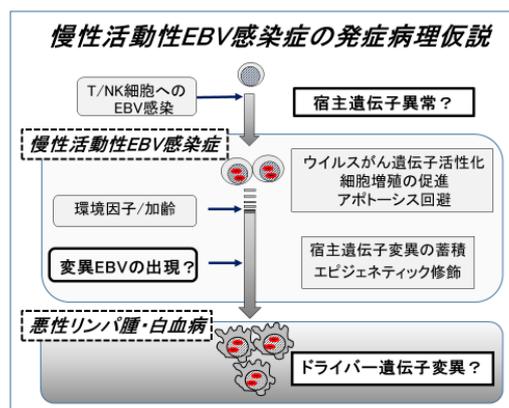
慢性活動性 EBV 感染症は、健常な小児・若年成人に、発熱・リンパ節腫脹・肝脾腫・皮疹・血球貪食症候群などの多彩な症状が現れる難治性疾患である。本症は単なる慢性感染症ではなく、EBV に感染した T/NK 細胞が、クローナリティをもって増殖・全身に浸潤するリンパ増殖性疾患である (Kimura H, Blood 2012)。また本症の経過中、節外性 NK/T リンパ腫や劇症型 NK 細胞性白血病などに進展することがある。ヒトに広く感染している EBV が、なぜごく一部の個体において T/NK 細胞に感染し、本症を発症するのかはいまだ解明されていない。慢性活動性 EBV 感染症には家族内発症がないものの、先天性免疫不全症を疑わせる遺伝子異常の存在を示唆する報告が散見される。我々も、患者には炎症性サイトカイン遺伝子多型および HLA タイプに偏りが認められること、家族性の EBV 重症化例で明らかにされている遺伝子変異が、一部の患者に認められることを報告している (Katano H, Kimura H, Blood 2004; Hatta K, Kimura H, Haematologica 2007; Ito Y, Blood 2013)。また、慢性活動性 EBV 感染症には地域性があることから、特定のウイルス株の存在が議論されている。近年、成人 T 細胞性白血病や子宮頸がんでは、複製能を欠いた HTLV1・HPV が選択的に潜伏・持続感染していることが示され、慢性活動性 EBV 感染症の発症に変異 EBV の関与も示唆される。

一方、慢性活動性 EBV 感染症の一部は悪性化するため、リンパ腫・白血病で高頻度に認められる宿主遺伝子変異が、EBV 感染細胞に生じている可能性がある。節外性 NK/T リンパ腫では、JAK3, DDX3X, ARID1A などの変異が腫瘍化に関与することが示されている。本症においては、研究代表者が JAK3 について追試したが、変異は認められなかった (Kimura H, Leuk Lymphoma 2014)。しかし、これまで JAK3 以外の宿主遺伝子解析の報告は皆無である。

近年、様々な腫瘍性疾患で、遺伝子変異とがん発生の分子基盤についての克明な解析がなされている。研究分担者も次世代シーケンサーにより、宿主遺伝子の変異・融合が血液腫瘍性疾患の発症に関与し、予後因子になりうることを報告した (Sakaguchi H, Okuno Y, Nat Genet 2013; Yoshizato T, Okuno Y, N Engl J Med 2015; Suzuki K, Okuno Y, J Clin Oncol 2016)。

慢性活動性 EBV 感染症は、右図に示したように、複合的遺伝子要因が積み重なって発症するものと推測される。遺伝的な脆弱性、すなわち、生殖細胞に受け継がれた宿主遺伝子異常や感染後の変異 EBV は、本症の発症要因となりうる。さらには、感染細胞に生じたドライバー遺伝子と呼ばれるがん遺伝子の活性化・がん抑制遺伝子の不活化が悪性リンパ腫・白血病への進展の鍵となる。

以上より、次世代シーケンサーを用い、これら宿主・ウイルスの遺伝子解析を網羅的かつ統合的に行うことで、本症の発症病理を解明できると考えた。



2. 研究の目的

本研究では、慢性活動性 EBV 感染症患者の検体・細胞株を用い、宿主の遺伝子異常、感染細胞に生じている遺伝子変異、ウイルス遺伝子変異について統合的解析を行う。これらの結果を踏まえ、宿主・ウイルス遺伝子の相互関係 (宿主遺伝子異常に起因する EBV 易感染性や EBV 感染によるドライバー遺伝子変異の誘導など) を解析し、本症の発症病理を解き明かす。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーにより、患者の全エキソ領域の遺伝子変異を探索する。非感染細胞と EBV 感染細胞の両方を用いることで、生殖細胞に受け継がれた遺伝子異常と、感染後新たに生じた宿主ドライバー遺伝子を同定する。

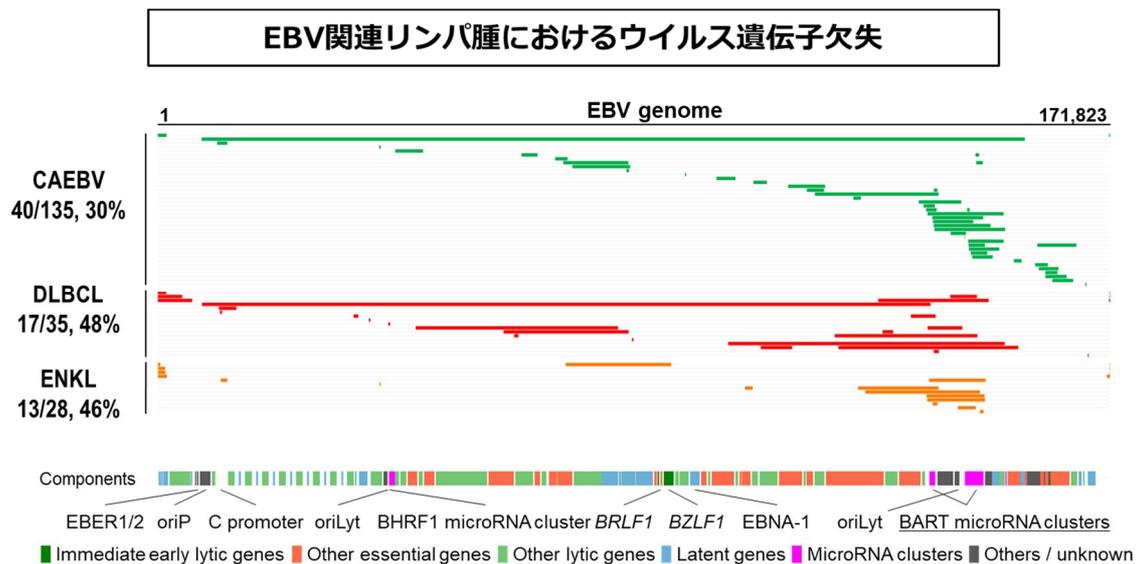
(2) 次世代シーケンサーにより、患者血液中および細胞株の EBV 全ゲノム遺伝子配列を決定し、本疾患に特異的な EBV 遺伝子変異を見出す。さらには、RNA シーケンシングにより宿主および EBV 遺伝子発現を網羅的に調査し、疾患に特有な宿主-EBV 遺伝子のパスウェイ/ネットワークを明らかにする。

(3) 同定した宿主・ウイルス遺伝子の相互関係を、細胞株を用いた in vitro 機能解析、および免疫不全マウスを用いた in vivo 機能解析により解き明かす。

4. 研究成果

慢性活動性 EBV 感染症患者 80 例に対して次世代シーケンサーを用いた統合的遺伝子解析を行い、以下の結果を得た。

- (1) 患者における頻度は低いものの、生殖細胞に保持されている遺伝子欠損/多型を少なくとも 2 つ見出した。
- (2) 感染細胞に生じた体細胞変異を認め、一部患者で経時的解析によりクローン進化が明らかとなった。急性増悪期・腫瘍転化後には、節外性 NK/T リンパ腫・鼻型で明らかとなっている DDX3X などのドライバー遺伝子のホットスポット変異が検出され、他のリンパ系腫瘍と共通するドライバー変異の獲得と、腫瘍化の機構を明らかにした。
- (3) 慢性活動性 EBV 感染症患 (CAEBV) では、高率に EBV 遺伝子の一部が欠失すること、また欠失が特定の領域に集中することを見出した。興味深いことに、EBV 関連リンパ腫である EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) および節外性 NK/T リンパ腫・鼻型 (ENKL) においても、この欠失は認められたため、EBV 関連リンパ腫に共通する現象と考えられた (下図参照)。



欠失は様々な領域に認められたが、ウイルス DNA 複製などウイルスを形作る上で必須な遺伝子が多かった。そこでウイルス DNA ポリメラーゼである BALF5 遺伝子を欠損した組換え EBV を作成し、野生株と比較したところ以下の結果を得た。

- (4) 変異 EBV ならびに野生株をヒト初代 B 細胞に感染させ、不死化細胞株を作成し、その性状を比較した。変異 EBV 由来の細胞株は、野生株由来の細胞株と比べ、in vitro の増殖性に差異は認められなかった。
- (5) RNA-Seq により遺伝子発現を調べたところ、変異 EBV 由来の細胞株ではウイルスの前初期遺伝子である BZLF1、さらには BZLF1 により活性化される前期ウイルス遺伝子群の発現が亢進していた。
- (6) 免疫不全マウスである NOG マウスに不死化細胞株を移植し、リンパ腫を発生させたところ、変異ウイルス由来細胞株では野生株に比べ、リンパ腫形成能が増していた。また、BZLF1 の発現も増強していた。

以上より、BALF5 の欠失は、前初期遺伝子 BZLF1 を契機とする溶解感染遺伝子群の発現を誘導し、リンパ腫形成能に寄与していることが示唆された。ウイルス DNA 複製に必須な遺伝子を欠いた EBV はウイルス粒子を産生できず、溶解感染を完結できないが、一方で、ウイルス溶解感染遺伝子発現により腫瘍化を促進していると考えている。

さらに、研究対象である EBV 関連リンパ腫は、東アジアやアフリカで頻度の高い疾患であり、欧米での研究は進んでいない。早急に本研究を推進することにより、世界に先んじて、普遍的なウイルスがなぜ特定の地域において、一部の個体にのみ「がん」を引き起こすのかを明らかにできる。本研究で得られた知見が、EBV 関連リンパ腫のみならず上咽頭がん・胃がんなど EBV 関連上皮系腫瘍に共通する分子機構、さらには他の腫瘍ウイルスの発がんメカニズムを解明につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe T, Sato Y, Masud HMA, Takayama M, Matsuda H, Hara Y, Yanagi Y, Yoshida M, Goshima F, Murata T, Kimura H.	4. 巻 111(1)
2. 論文標題 Antitumor activity of CDK inhibitor alsterpaullone in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	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 Sato Y, Watanabe T, Suzuki C, Abe Y, Masud HMAA, Inagaki T, Yoshida M, Suzuki T, Goshima F, Adachi J, Tomonaga T, Murata T, Kimura H.	4. 巻 93(8)
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 J Virol	6. 最初と最後の頁 e01707-18
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 Okuno Y, Murata Y, Sato Y, et al	4. 巻 4
2. 論文標題 Defective Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-related hematological malignancy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Microbiol	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 -
1. 著者名 Masud HMA, Watanabe T, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T.	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 Yanagi Y, Masud HMA, Watanabe T, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T.	4. 巻 11
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 E285
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 Konishi N, Narita Y, Hijioka F, Masud HMAA, Sato Y, Kimura H, Murata M.	4. 巻 3
2. 論文標題 BGLF2 Increases Infectivity of Epstein-Barr virus by Activating AP-1 upon de novo Infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00138-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00138-18.	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 Washio K, Oka T, Abdalkader L, Muraoka M, Shimada A, Oda M, Sato H, Takata K, Kagami Y, Shimizu N, Seto M, Nakamura S, Kimura H, Yoshino T, Tsukahara H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Gene expression analysis of hypersensitivity to mosquito bite, chronic active EBV infection and NK/T-lymphoma/leukemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma	6. 最初と最後の頁 2683-2694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2017.1304762.	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 Kimura H, Cohen JI.	4. 巻 8
2. 論文標題 Chronic Active Epstein-Barr Virus Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2017.01867	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4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Chronic Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease
3. 学会等名 12th T-cell Lymphoma Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Epstein-Barr virus in T-/NK- cell tumorigenesis
3. 学会等名 APBMT&ICBMT 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Genetics of CAEBV and Related Diseases
3. 学会等名 7th Conference on Histiocytosis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 宏
2. 発表標題 慢性活動性EBV感染症に対する包括的遺伝子解析
3. 学会等名 第34回日本生化学会北陸支部大会シンポジウム『ウイルス感染病態研究の新潮流』（招待講演）
4. 発表年 2017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
研究分担者	奥野 友介 (Okuno Yusuke) (00725533)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	伊藤 嘉規 (Ito Yoshinori) (20373491)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	村田 貴之 (Murata Takayuki) (30470165)	藤田保健衛生大学・医学部・教授 (33916)	