

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32713

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23907

研究課題名(和文) CAEBVにおけるEBウイルス由来RNAの解析：発症への関与と治療標的の可能性

研究課題名(英文) Analysis of Epstein-Barr virus derived RNA in CAEBV: involvement in onset and potential therapeutic targets

研究代表者

大橋 彩香 (Ohashi, Ayaka)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：60844371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性活動性EBウイルス感染症(CAEBV)及びその類縁疾患の細胞株から、EBV由来マイクロRNAであるmiR-BART7-3pを最も多く内包しているエクソソームが分泌されていることを確認した。血管内皮細胞でmiR-BARTsを内包するエクソソームの取り込みを確認した。これはエクソソームに内包されたmiR-BARTsが血管内皮細胞等周辺の非感染細胞において病態を形成する可能性を示した。CAEBV等細胞株、患者細胞でRNA分解作用を持つRNase1と、RNaseを阻害するRNase inhibitor (RI)の高い発現を確認した。CAEBVの病態において何らかの役割を担っているものと推測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAEBV等細胞株で高い発現が見られたmiR-BART7-3pはCAEBV患者の感染細胞及び血漿中でも高発現しており、CAEBVの発症及び病態形成に関与することを示唆すると共に、治療標的になり得ると考えられた。本研究成果はCAEBVの発症及び病態の解明に寄与すると共に、miR-BARTs等RNAに着目した全く新しい治療法、バイオマーカーの開発に貢献し得る。今後、miR-BARTsとRNase1のinteractionについてさらなる研究を行い、臨床への還元を目指す。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that cell lines of Chronic Active EB virus infection (CAEBV) and related diseases secreted exosomes containing the largest amount of miR-BART7-3p, which is an EBV-derived micro RNA. We confirmed the uptake of exosomes containing miR-BARTs in vascular endothelial cells. This indicated that miR-BARTs contained in exosomes might form a pathological condition in surrounding non-infected cells such as vascular endothelial cells. We also confirmed high expression of RNase1 which has RNA degrading action and RNase inhibitor (RI) which inhibits RNase in cell lines such as CAEBV and patient cells. It was speculated that it might play a role in the pathology of CAEBV.

研究分野：血液・腫瘍学

キーワード：慢性活動性EBウイルス感染症 エクソソーム miR-BARTs 血管内皮細胞 RNase1

1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) は発熱、肝機能障害等の慢性炎症症状に加え、EBV が感染した T, NK 細胞が腫瘍性に増殖し、末梢血及び組織に浸潤する疾患である。自然軽快はなく、数か月から数年を経て悪性度の高いリンパ腫、血球貪食性リンパ組織球症を発症して死に至る。CAEBV の根治療法は造血幹細胞移植のみで有効な治療薬は無い (2015 年 AMED 研究班調査)。EBV は唾液を介して主に B 細胞に感染する。本邦の成人ではほぼ 100% が感染を受け、ひとたび感染すると生涯にわたり潜伏し続ける。このような普遍的なウイルスが、なぜ一部のヒトで T, NK 細胞に感染し排除されないのか? そして、これらの細胞が増殖、活性化し CAEBV 発症に至るのか? なぜ CAEBV は治療抵抗性を示すのか? これらは未だ明らかにされていない。

miR-BARTs は、ゲノム上にクラスターとして存在する 40 種の EBV 由来マイクロ RNA である。EBV 陽性 B 細胞腫瘍において網羅的に発現し、腫瘍化に関与する宿主及びウイルス蛋白質の発現制御を担う可能性が報告されている。さらに miR-BARTs はエクソソームに内包されて細胞外へと分泌され、周囲の細胞に伝播されて腫瘍発症に寄与することが報告された (Nanbo et al. cancers 2018, Higuchi et al. Blood 2018)。CAEBV でも患者血漿中 (Kawano et al. J Infect Dis 2013)、細胞株 (申請者ら未発表) で miR-BARTs の存在が認められている。以上より、CAEBV においても miR-BARTs を含むウイルス由来マイクロ RNA が細胞内に発現かつ分泌され、感染腫瘍細胞のみならずその周囲に存在する反応性 T 細胞、組織球、樹状細胞等の傍腫瘍細胞へ取り込まれ、前者の不死化や、後者の制御による免疫応答異常を介して CAEBV 発症に関与しているのではないかと考えた。さらに CAEBV 患者の EBV 陽性 T, NK 細胞の遺伝子発現プロファイルを同じフェノタイプの健常者細胞と比較すると RNase 1 と RNase inhibitor (RI) が有意に高かった (申請者ら未発表) によって、RNase 1 と RI は CAEBV の病態成立に miR-BARTs を含むウイルス由来 RNA の制御を介して何らかの機能を持つのではないかと考えた。

2. 研究の目的

CAEBV 及びその類縁疾患の細胞株、CAEBV 患者の腫瘍細胞におけるマイクロ RNA の発現と、分泌されたマイクロ RNA の傍腫瘍細胞に対する機能、それに対する RNase 1, RI の機能を解明し、病態解明に加え、新たな治療法、診断法、バイオマーカーの開発への基礎とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EBV 陽性 T, NK 腫瘍細胞中の miR-BARTs の発現と分泌の解析

CAEBV 及び類縁疾患の細胞株、患者由来の EBV 陽性 T, NK 腫瘍細胞、これらの培養上清、CAEBV 患者血漿からエクソソームを分離後、全 RNA を抽出し次世代シーケンサー、定量 PCR (qPCR) でウイルス及び宿主由来マイクロ RNA、mRNA の発現を解析した。

(2) 傍腫瘍細胞に対する分泌型 miR-BARTs の機能解析

CAEBV 及びその類縁疾患の細胞株の培養上清を、EBV 非感染細胞である血管内皮細胞株 (ヒト臍帯静脈内皮細胞株: Ea.hy926) と共培養し、機能 (増殖、生存、サイトカイン産生能等) の変化を解析した。CAEBV 患者の病変組織において EBV 陽性 T, NK 腫瘍細胞およびその周囲に存在する傍腫瘍細胞における miR-BARTs の発現を in-situ hybridization にて解析を試みた。

(3) RNase 1 と RI の発現の解析

CAEBV 及びその類縁疾患の細胞株の RNase 1 と RI の発現を qPCR、western blot 法で確認した。

4. 研究成果

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) 及びその類縁疾患の細胞株からエクソソームが分泌されていることを確認した。エクソソームは EBV 由来マイクロ RNA である miR-BARTs を内包しており、miR-BART7-3p が最も高く発現していた。miR-BART7-3p は CAEBV 患者の感染細胞及び血漿中でも高発現しており、CAEBV の発症及び病態形成に関与することを示唆すると共に、治療標的になり得ると考えられた。血管内皮細胞で miR-BARTs を内包するエクソソームの取り込みが確認された。これはエクソソームに内包された miR-BARTs が血管内皮細胞に伝播され、周辺非感染細胞において病態を形成する可能性を示した。CAEBV 等細胞株において、RNA 分解作用を持つ RNase1 と、RNase を阻害する RNase inhibitor (RI) の発現を確認した。RNase1 及び RI は CAEBV 患者細胞で高発現していたことから、CAEBV の病態において何らかの役割を担っているものと推測した。CAEBV 及びその類縁疾患において、miR-BART7-3p をはじめとする miR-BARTs がエクソソームに内包され、血管内皮細胞等の周辺非感染細胞に伝播されることを見出した。本研究成果は CAEBV の発症及び病態の解明に寄与すると共に、miR-BARTs 等

RNAに着目した全く新しい治療法、バイオマーカーの開発に貢献し得る。なお、2021年開催の第83回日本血液学会学術集会に"Plasma level of IL-1 β in Chronic Active EBV Infection can be a biomarker of angiopathy"として演題登録し、論文作成中である。今後、miR-BARTsとRNase1のinteractionについてさらなる研究を行い、臨床への還元を目指す。

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 1件）

1. 著者名 Yoshimori Mayumi, Shibayama Haruna, Imadome Ken-Ichi, Kawano Fuyuko, Ohashi Ayaka, Nishio Miwako, Shimizu Norio, Kurata Morito, Fujiwara Shigeyoshi, Arai Ayako	4. 巻 5
2. 論文標題 Antineoplastic and anti-inflammatory effects of bortezomib on systemic chronic active EBV infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1805 ~ 1815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020002417	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayaka Ohashi, Takatoshi Koyama, Klaus T. Preissner, Silvia Fischer, Ayako Arai
2. 発表標題 The expression and the secretion of ribonuclease inhibitors by tumor and vascular endothelial cells
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Shixing Wu, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Norio Shimizu, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai
2. 発表標題 Expression and function of EBV-derived micro-RNA in chronic active EBV infection
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井文子、吉森真由美、大橋彩香、西尾美和子、小池竜司
2. 発表標題 慢性活動性Epstein-Barrウイルス感染症におけるSTAT3活性化とその制御
3. 学会等名 第47回臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Ken-Ichi Imadome, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 Products of EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induce Differentiation into Macrophages and Procoagulant Activity of Monocytes, which Leads to HLH
3. 学会等名 25th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Ken-Ichi Imadome, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induce Macrophage Differentiation from monocytes, Leading to HLH
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Megumi Tateishi, Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 The Cytokines of EBV+Neoplastic NK-Cells Enhance the Procoagulant Activity of Monocytes Causing DIC
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wu Shixing, Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shimizu Norio, Miwako Nishi, Ayako Arai
2. 発表標題 The Elucidation of Targets of EBV-Derived Micro-RNA in Chronic Active EBV Infection
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中家瞳、澤田めぐみ、富田知里、吉森真由美、大橋彩香、呉詩星、立石萌、西尾美和子、新井文子
2. 発表標題 Survey on the positive rate of Epstein Barr virus infection in healthy young adults.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊木優喜、大橋彩香、吉森真由美、西尾美和子、新井文子
2. 発表標題 Epstein-Barr (EB)ウイルス陽性T細胞株におけるエクソソーム分泌の検討
3. 学会等名 第14回日本臨床検査学教育学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉森真由美、今留謙一、立石萌、呉詩星、大橋彩香、西尾美和子、清水則夫、新井文子
2. 発表標題 EBV 陽性 NK 腫瘍細胞産生、分泌するサイトカインは単球系細胞の凝固活性とマクロファージへの分化を亢進させる
3. 学会等名 第16回EBウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋彩香、上村悠、吉森真由美、和田尚美、今留謙一、遊道和雄、小山高敏、西尾美和子、新井文子
2. 発表標題 慢性活動性EBウイルス感染症患者血漿中のIL-1 は血管病変のバイオマーカーとなり得る
3. 学会等名 第34回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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