

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03493

研究課題名（和文）欠失EBVによるリンパ腫発生機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of Lymphoma Development Caused by Deletion EBV

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、Epstein-Barr virus (EBV) はウイルスゲノムの特定部位の欠失が腫瘍化と関連していることが示唆されている。本研究では、10以上のEBV関連疾患、990株を対象に、ターゲットキャプチャー法においてリシークエンス解析したところ、EBVゲノムの欠失は、EBV関連血液悪性疾患で高頻度である一方、伝染性単核球症や移植後リンパ増殖性疾患、上皮性悪性腫瘍においては低頻度であることを明らかにした。欠失頻度の高かった遺伝子をノックアウトした変異ウイルスを作成し、培養細胞を用いたin vitroおよびヒト化マウスを用いたin vivoモデルにより、ゲノム欠失の役割を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ腫以外のEBV関連腫瘍のWhole EBVシーケンシングを行い、先行研究で我々が見出した欠失ウイルスがEBV関連腫瘍で普遍的にみられる事象であるのか、リンパ腫に限定しているのか、さらには疾患特異的な遺伝子欠失が存在するのかを解析している。得られた知見は、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き明かすと考えている。また、新たな腫瘍抑制機構が解明されれば、新規がん治療開発に発展しうるため、革新的な創薬・新たな産業の育成が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recently, Epstein-Barr virus (EBV) has been suggested to be associated with tumorigenesis by deletion of specific sites in the viral genome. In this study, we re-sequenced more than 10 EBV-associated diseases and 990 EBV-associated strains in a targeted capture method and found that EBV genome deletions are highly prevalent in EBV-associated hematologic malignancies, while they are infrequent in infectious mononucleosis, post-transplant lymphoproliferative diseases, and epithelial malignancies. We generated mutant viruses knocking out the genes with high frequency of deletion and elucidated the role of genomic deletions in vitro using cultured cells and in vivo model using humanized mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Epstein-Barrウイルス 悪性リンパ腫 欠失ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr virus (EBV) は、ヘルペスウイルス科に属し、全長 170kb、約 80 遺伝子をコードする大型の DNA ウイルスである。唾液を介して感染し、時に、小児・若年成人に伝染性単核症を起こし、成人に至るまでにほぼ 95% が EBV に既感染となる。EBV は初感染後、リンパ球に潜伏感染し、様々な B 細胞性腫瘍 (バーキットリンパ腫・ホジキンリンパ腫・EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫・移植後リンパ増殖性疾患など) および T/NK 細胞性腫瘍 (節外性 NK/T リンパ腫・鼻型、種痘様水疱症関連リンパ腫、慢性活動性 EBV 病) と密接に関連している。本ウイルスはリンパ球のみならず、上皮系の細胞にも感染し、上咽頭がん・胃がん (わが国の胃がんの 1 割は EBV 関連) と関係が深い。1964 年にバーキットリンパ腫から分離された EBV は、最も古くから知られている腫瘍ウイルスであり、50 年以上にわたり、その腫瘍原性について幅広い研究が行われてきた。しかし、ほとんどの成人に感染している普遍的な EBV が、なぜ一部の個体にのみ腫瘍を生じるのかについては、長年の謎である。

(2) 最近、我々は EBV 関連リンパ腫の一種である慢性活動性 EBV 病患者に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、高率に EBV 遺伝子の一部が欠失していることを見出した。興味深いことに、節外性 NK/T リンパ腫および EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫といった他の EBV 関連リンパ腫においても、この欠失は高率に認められた。一方、非腫瘍性疾患である伝染性単核症では欠失は無かったため、EBV 関連リンパ腫に共通する現象と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これら欠失ウイルスが EBV 関連腫瘍で普遍的にみられる事象であるのか、一部の疾患に限定しているのかを明らかにする。具体的には、背景で示した 3 疾患に加えて、他の EBV 関連腫瘍 (バーキットリンパ腫・ホジキンリンパ腫・移植後リンパ増殖症・上咽頭がん・EBV 陽性胃がん) の腫瘍組織を集積し、全 EBV ゲノムシーケンシングを行う。この過程で、疾患特異的に欠失している EBV 遺伝子を同定する。次いで、それらの EBV 遺伝子を欠失した変異ウイルスを再現・作成し、培養細胞を用いた *in vitro* およびヒト化マウスを用いた *in vivo* モデルにより、当該遺伝子の役割を解明する。研究対象である EBV 関連腫瘍の多くは、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で、世界に先んじて、普遍的な EBV 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解明できると考えている。また、本研究により、遺伝的背景を同じくする集団・民族に高率にがんを発生させる根源的な謎を解き明かすことができる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1) EBV 関連腫瘍の全 EBV ゲノムシーケンシング: 種々の EBV 関連腫瘍のホルマリン固定組織を集積した。検体は主として名古屋大学医学部附属病院および愛知県がんセンター病院から得た。組織より DNA を抽出、SureSelect Target Enrichment System (Agilent) を用いたターゲットキャプチャー法により、EBV ゲノムのシーケンシングを行った。RNA ベイトは、ウイルス株間のバリエーションにも対応できるよう、日本人特有の Akata 株を含む計 7 株を網羅するように設計していたものを用いた。

(2) 変異ウイルス作成: Bacterial artificial chromosome (BAC) を用い、該当する遺伝子/エレメントを欠失した組換えウイルスを作成した。BAC システムにより作成した組換えウイルスは、上皮系細胞での解析は比較的容易である一方、B 細胞には感染しにくいという欠点があった。我々は、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用い、B 細胞株に潜伏感染している EBV を変異させるシステムを新たに構築した。本研究では、上皮系/B 細胞の両方に対応すべく、BAC および CRISPR/Cas9 システムの双方を用いて、組換えウイルスを作成した。

(3) 細胞を用いた *in vitro* 機能解析: 得られた変異 EBV を種々の細胞株およびヒト初代 B 細胞に感染させ、その感染率・不死化能・潜伏感染率などを野生株と比較した。次いで、RNA シーケンシングにより宿主及びウイルス遺伝子発現解析を行った。野生型との比較により、変異 EBV 感染細胞でその発現が増強・減弱した遺伝子を探索した。探索した遺伝子をノックアウト/ノックダウンし、候補遺伝子機能解明の全容に迫るべく機能解析を行った。

(4) ヒト化マウスを用いた *in vivo* 機能解析: 免疫不全マウスである NOG マウスにヒト臍帯血由来造血幹細胞を移入、ヒト化マウスを構築した。このヒト化マウスに EBV を感染させて、リンパ腫を発生させた。EBV 陽性腫瘍細胞の動態・臓器浸潤、転移について変異ウイルスと野生型を比較した。また、腫瘍組織を用い、RNA シーケンシングにより宿主及びウイルス遺伝子の発現解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 10 以上の EBV 関連疾患を対象に、EBV 陽性解析株を 990 株に増やしリシーケンス解析し、欠失、重複、逆位、ならびにヒトゲノムへの挿入を検出した。EBV ゲノムの欠失は、慢性活動性

EBV 病や、血液悪性疾患 (EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫、節外性 NK/T 細胞リンパ腫) で高頻度である一方、伝染性単核球症や移植後リンパ増殖性疾患、あるいは上皮性悪性腫瘍 (胃癌、上咽頭がん) においては低頻度であった。欠失の長さにも違いがあり、血液悪性疾患では平均 1,000 塩基を超える欠失が存在したが、他の疾患においては 1,000 塩基未満の欠失が大半であった。慢性活動性 EBV 病などで高頻度に見られた microRNA クラスターは、血液悪性疾患において高頻度に欠失していたが、上皮性悪性腫瘍や健康人においてはほとんど欠失が見られなかった。

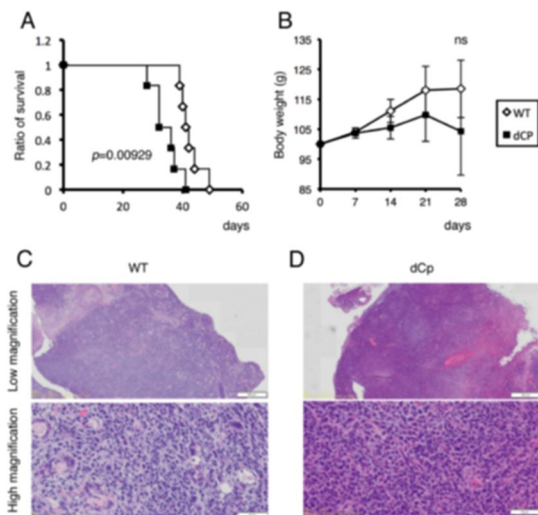
(2) EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に置いて欠損頻度の高かった C promoter (Cp) の意義を明らかにするために、Cp 欠損を EBV ゲノムに導入し、Cp 欠損株と野生株のウイルスの表現型を比較した。Cp 欠損株は、子孫ウイルスの産生能および子孫ウイルスの感染性については野生型と差がみられなかった。しかし Cp 欠損株は、野生株よりも効率的に B 細胞の形質転換を引き起こした。形質転換においては、細胞増殖の促進とアポトーシスの阻害が起きているため、この現象は EBV に関連した発癌に直接関与している可能性があると考えた。さらに、EBV ヒトを臍帯血単核球細胞に感染させた後に免疫不全マウスに移入するリンパ増殖性疾患モデルでは、Cp 欠損株は野生株に比し、病勢の進行を早めることがわかった。

右図・異種移植による EBV 関連リンパ増殖症モデル

A) ヒト臍帯血に野生株 (WT) もしくは Cp 欠損株 (dCp) を感染させ、免疫不全マウスに移入後、生存率を比較した (logrank test)。B) 体重変化の比較 (Student t test)。Cp 欠損株では、生存期間の短縮と体重減少が認められた。

C, D) 脾臓の腫瘍組織像。Cp 欠損株では、腫瘍細胞の著明な浸潤が観察された。

この機序を解明するために、RNA シーケンスによるスクリーニングと qRT-PCR を行ったところ、Cp 欠損株では Cp の代わりに W promoter (Wp) という別の EBV プロモーターを活性化していること、また LMP2A の転写が亢進していることが判明した。しかし Cp 欠損株に LMP2A の欠損を導入しても、LMP2A の単独欠損株と比較して形質転換効率の上昇が観察されたため、Cp 欠損株における形質転換効率の上昇は、LMP2A の発現上昇では説明できないと解釈した。



(3) EBV 陽性バーキットリンパ腫で時に見られる EBNA2 欠損についても解析を試みた。EBNA2 を欠損した EBV を B 細胞に感染させたところ、RNAseq により免疫チェックポイント分子である宿主 PD-L1 の発現が減弱することを見出した。さらに、PD-L1 の発現は EBV 溶解感染を誘導し、NFκB、MAPK、AKT 経路を活性化させ、EBNA2 の欠損はこれらの発現を減弱させることを確認した。以上より、EBV は EBNA2 の発現を介して PD-L1 を誘導し、免疫回避を行っていることが推測された。

欠損ウイルスと腫瘍との関連については、他の腫瘍ウイルスでは多くの報告がなされてきたが、EBV のような大型ウイルスでの遺伝子欠失の成り立ちと意義については、未だ不明な点が多かった。我々は、ウイルス Cp をはじめいくつかの EBV 遺伝子を欠損したウイルスは腫瘍を発生しやすいことを示した。詳細なメカニズムの解明はこれからであるが、欠損ウイルスでは、EBV 前初期/初期遺伝子の発現亢進により、宿主細胞増殖と染色体不安定性が促進され、ドライバ遺伝子変異の蓄積、エピジェネティック修飾が加わり、腫瘍へと変容すると考えている。

#### < 引用文献 >

- Okuno Y et al. Defective Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-related hematological malignancy. *Nat Microbiol.* 2019 Mar;4(3):404-413
- Kimura H et al. Deletion of Viral microRNAs in the Oncogenesis of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma. *Front Microbiol.* 2021 Jul 8;12:667968.
- Mabuchi S et al. Role of Epstein-Barr virus C promoter deletion found in diffuse large B cell lymphoma. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 1;13(3):561.
- Yanagi Y et al, RNAseq analysis identifies involvement of EBNA2 in PD-L1 induction during Epstein-Barr virus infection of primary B cells. *Virology.* 2021May;557:44-54.

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 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yanagi Yusuke, Okuno Yusuke, Narita Yohei, Masud H.M. Abdullah Al, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Kanda Teru, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki	4. 巻 557
2. 論文標題 RNAseq analysis identifies involvement of EBNA2 in PD-L1 induction during Epstein-Barr virus infection of primary B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2021.02.004	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 該当する

1. 著者名 Mabuchi Seiyo, Hijioka Fumiya, Watanabe Takahiro, Yanagi Yusuke, Okuno Yusuke, Masud H. M. Abdullah Al, Sato Yoshitaka, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Epstein-Barr Virus C Promoter Deletion in Diffuse Large B Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 561 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13030561	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

1. 著者名 Kimura Hiroshi, Okuno Yusuke, Sato Yoshitaka, Watanabe Takahiro, Murata Takayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Deletion of Viral microRNAs in the Oncogenesis of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 667968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.667968	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4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

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 19th International Symposium on Epstein-Bar virus and associated diseases. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 宏
2. 発表標題 欠失EBVの潜伏とリンパ腫原性
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 宏
2. 発表標題 ウイルス感染症の猛威 EBウイルス感染症を考える
3. 学会等名 第6回日本集中治療医学会東海北陸支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Murata, Atsuko Sugimoto, Takahiro Watanabe, Yusuke Yanagi, Kazuhiro Matsuoka, Yusuke Okuno, Yoshitaka Sato, Teru Kanda, Yasumasa Iwatani, Hiroshi Kimura.
2. 発表標題 Induction of IMPDH2 and nucleolar hypertrophy are required for growth transformation of resting b cells by EBV.
3. 学会等名 The 20th International Symposium on Epstein-Barr virus (EBV) and Associated Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022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)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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	渡辺 崇広 (Watanabe Takahiro)  (10624398)	名古屋大学・医学系研究科・助教  (13901)	
研究分担者	川田 潤一 (Kawada Jun-ichi)  (20532831)	名古屋大学・医学系研究科・准教授  (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)	

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