

令和 5 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07403

研究課題名（和文）MicroRNA異常に着目したEBウイルス関連リンパ増殖性疾患の病態解明

研究課題名（英文）Pathology of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and their associations with microRNA abnormalities

研究代表者

牛久 綾（篠崎綾）（Shinozaki-Ushiku, Aya）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60581824

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：EBウイルス関連悪性リンパ腫・リンパ増殖性疾患（LPD）の病態を明らかにするために、これらの疾患における腫瘍細胞の特徴や免疫細胞の浸潤、EBウイルス由来microRNAの発現等を含む臨床病理学的検討を行った。腫瘍内免疫細胞については組織型間で有意な違いは見られなかったが、microRNA高発現の群ではLPDやlatency type IIIの症例が多く含まれており、これらのmicroRNAが腫瘍化に関連する遺伝子を標的としている可能性が示された。また、EBウイルス陽性腫瘍細胞におけるPD-L1の発現が細胞形態やLMP-1の発現と相関していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、EBウイルス関連LPDにおけるEBウイルス由来microRNAの意義の一端を示すことができた。さらにEBウイルス陽性腫瘍細胞が抗腫瘍免疫を回避する手段として発現しているPD-L1が、細胞形態や潜伏感染遺伝子の一つであるLMP-1の発現と相関していることが明らかになった。これらの分子の発現と細胞形態との相関について、これまで詳細に検討した報告は乏しく、EBウイルス関連LPDの病態の理解に寄与するとともに、治療標的としての可能性を示唆するものとなる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the pathology of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders (LPD), clinicopathological analysis including several biological markers was performed. There were no significant differences in the profiles of intratumoral immune cells between histological subtypes, while high EBV-microRNA expression was associated with LPD and cases showing latency type III. In silico analysis demonstrated that some of these microRNAs might target cancer-related genes. The study also demonstrated that PD-L1 expression in EBV-positive tumor cells had close associations with tumor cell morphology and LMP-1 expression.

研究分野：病理学

キーワード：EBウイルス 悪性リンパ腫 リンパ増殖性疾患 microRNA PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr (EB) ウイルスは種々の悪性リンパ腫およびその前段階であるリンパ増殖性疾患 (lymphoproliferative disorder; LPD) の発生に関連する主要なウイルスである。EB ウイルス関連 LPD は患者の年齢や免疫状態、背景疾患および人種的・地理的要因により様々な病態を呈し、治療法や予後などが大きく異なる。本邦では、欧米での疾患分類に必ずしも当てはまらない病態がしばしば経験される。そのため、本邦における EB ウイルス関連 LPD の臨床病理学的解析を行い、病態の解明および予防や治療への応用につなげることが重要である。

2. 研究の目的

本邦における EB ウイルス関連 LPD を特徴づける因子をウイルスあるいは宿主双方の観点から検討し、差異を生み出している要因を見出す。さらに EB ウイルスによる腫瘍発生の機構や免疫微小環境との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

東京大学医学部附属病院病理部に保存されている生検、手術、剖検により得られた組織検体を用いて、EB ウイルス関連の LPD、悪性リンパ腫について臨床情報の収集および病理組織学的検討による EB ウイルス陽性腫瘍細胞の特徴 (腫瘍細胞の形態学的評価、免疫染色による腫瘍細胞の形質同定、EB ウイルス潜伏感染遺伝子の発現等) を検討した。また、先行研究にて発現解析を行った EB ウイルス由来 microRNA との関連について解析した。さらに腫瘍内に浸潤する非腫瘍性の炎症細胞のプロファイリング (浸潤細胞の種類、PD-L1 などの免疫関連蛋白の発現状態) を多重染色法により検討した。

4. 研究成果

(1) EB ウイルス関連悪性リンパ腫・LPD の臨床病理学的検討

1990 年～2016 年の期間で EB ウイルス関連悪性リンパ腫・LPD と診断された症例の内訳は B 細胞性悪性リンパ腫 (47 例)、T 細胞性悪性リンパ腫 (74 例)、ホジキンリンパ腫 (20 例)、その他 LPD (159 例、移植後、免疫抑制剤投与関連、AIDS 関連を含む) であった。そのうち、免疫染色や microRNA 発現解析に十分な検体が得られた症例 35 例について、詳細な解析を行った。

EB ウイルス潜伏感染遺伝子の発現について、latency type III を示すものは LPD に多く見られた (4/13)。腫瘍内に浸潤する非腫瘍性の炎症細胞 (B 細胞、T 細胞、マクロファージ、好中球、好酸球) の数については組織型間で統計学的に有意な差は見られなかった。

(2) EB ウイルス関連悪性リンパ腫・LPD における EB ウイルス由来 microRNA の発現

FirePlex miRNA assays を用いて測定した EB ウイルス由来 microRNA の発現量によるクラスター解析を行った (図 1)。

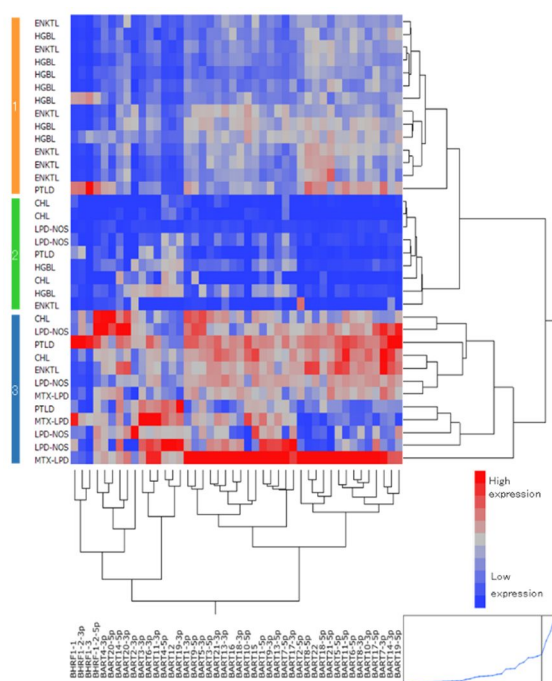


図 1 ウイルス由来 microRNA の発現

発現パターンにより3つの群に分けられ、全体としてmicroRNAの発現が高いGroup 3に、LPD症例やlatency type IIIの症例が多く含まれることが示された。悪性リンパ腫と比較してLPDで発現が有意に高かったmicroRNAの標的候補となる遺伝子をデータベース用いて抽出し、それらについてパスウェイ解析を行ったところ、発癌やTGF-経路、wnt経路との関連が明らかとなった。

(3) EBウイルス潜伏感染遺伝子と細胞形態、PD-L1発現との関連

42症例のEBウイルス関連悪性リンパ腫・LPD症例について、Mantra quantitative pathology workstationを用いた多重免疫染色およびin situ hybridization (ISH)(図2)により、潜伏感染遺伝子と細胞形態、PD-L1の発現について検討したところ、LMP-1陽性でHodgkin/Reed-Sternberg細胞類似の形態を示す腫瘍細胞においてPD-L1の発現が高いことが示された(図3)。EBNA2とPD-L1の発現には相関は見られなかった。EBウイルス由来microRNAの発現解析が可能であった症例について、PD-L1との相関を検討したが、有意な相関を示すmicroRNAは認められなかった。

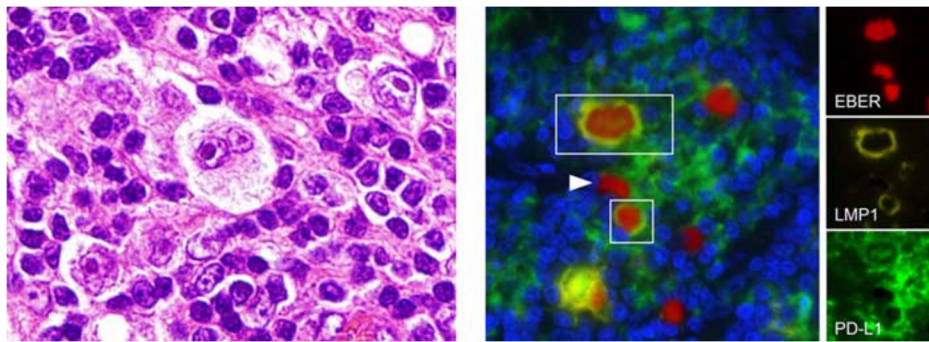


図2 多重免疫染色/ISHによる潜伏感染遺伝子とPD-L1発現解析

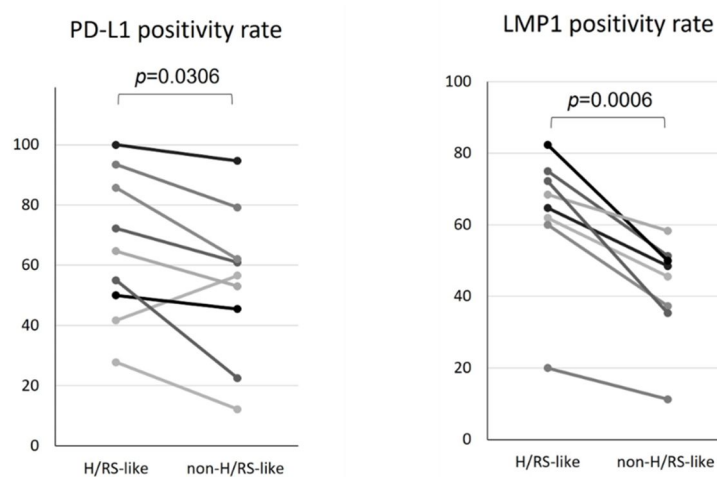


図3 PD-L1とLMP-1発現と細胞形態の関連

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 0件）

1. 著者名 Kume Ayako, Shinozaki-Ushiku Aya, Kunita Akiko, Kondo Atsushi, Ushiku Tetsuo	4. 巻 46
2. 論文標題 Enhanced PD-L1 Expression in LMP1-positive Cells of Epstein-Barr Virus-associated Malignant Lymphomas and Lymphoproliferative Disorders: A Single-cell Resolution Analysis With Multiplex Fluorescence Immunohistochemistry and In Situ Hybridization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1386 ~ 1396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PAS.0000000000001919	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久米絢子, 牛久綾, 国田朱子, 牛久哲男
2. 発表標題 EBV関連悪性リンパ腫/リンパ増殖性疾患におけるEBV潜伏感染遺伝子とPD-L1発現の関連
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久米絢子, 牛久綾, 牛久哲男
2. 発表標題 EBV関連腫瘍における宿主の免疫状態およびmicroRNA異常の意義の解明
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------