

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15448

研究課題名（和文）EBウイルスがT/NK細胞内で形成するスーパーエンハンサーの解析

研究課題名（英文）Super-enhancer analysis of EBV-associated T/NK lymphoma

研究代表者

佐藤 好隆（Sato, Yoshitaka）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40754940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Epstein-Barrウイルス（EBV）は、B細胞を自然宿主とする普遍的なウイルスであるが、時にT細胞およびNK細胞にも感染し、予後不良なT/NK細胞性腫瘍の原因となる。本研究では、細胞を特徴付ける転写プロファイルと密接な関係をもつスーパーエンハンサーに着目し、EBV関連T/NK細胞腫瘍に特異的なスーパーエンハンサーを解析した。その過程で、EBVゲノムが感染細胞内で高次構造をとることを明らかにし、ウイルス遺伝子発現におけるウイルスゲノム高次構造の重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト腫瘍ウイルス Epstein-Barrウイルス（EBV）が陽性であるT/NK細胞性腫瘍（EBV関連T/NK細胞腫瘍）は日本をはじめとした東アジアで報告が多く、予後不良で有効な治療法は未だ存在しない。本研究では、ウイルスゲノムが感染細胞内で高次構造をとり、ウイルスゲノム内でのゲノム間相互作用の構造の違いにより、ウイルス遺伝子発現が制御されていることが明らかとなった。ゲノム編集によりEBVゲノムに構造変化を加えると、EBV遺伝子発現も変化し、ゲノム高次構造が治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus (EBV) persists in human cells as episomes. EBV episomes are chromatinized and their 3D conformation varies greatly in cells expressing different latency genes. We compared the EBV episome intragenomic interactions in different cancer cell lines expressing three different types of EBV latency genes using a new method, HiChIP. H3K27ac HiChIPs were done in 4 T/NK lymphoma cell lines and 2 primary effusion lymphoma cell lines, together with published data from cell line expressing type III latency genes. We found that in type II latency infected cells, the episome looping patterns were similar to cells expressing type III latency genes. Similar to previous reports using a different method to compare the EBV 3D genome looping using captured Hi-C, more restricted type I latency infected cells had much less loopings. These data suggested that looping is a way for EBV to regulate its oncogene expression in various EBV associated cancer cells.

研究分野：ウイルス学

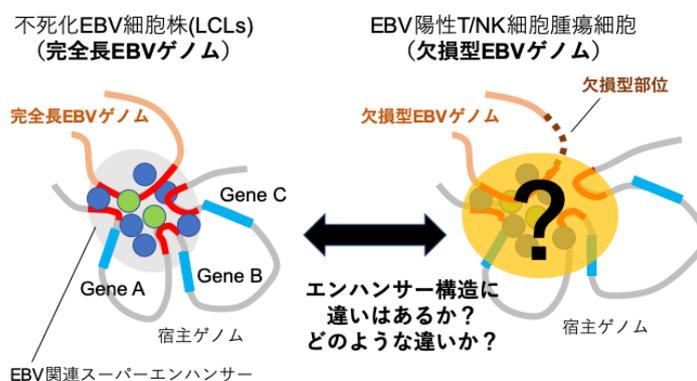
キーワード：Epstein-Barrウイルス ゲノム高次構造 ウイルス遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、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、上咽頭癌、胃癌などとの関連が指摘されており、EBV 関連腫瘍の発生件数は全世界で約 20 万件/年にも達する (Cohen et al., *Sci Transl Med*, 2011)。その中でも、EBV 関連 T/NK 細胞腫瘍は日本をはじめとした東アジアで報告が多い予後不良な血液腫瘍である (Sato, *Front Pediatr*, 2018)。血中 EBV ゲノム量と予後が相関することから、EBV が腫瘍の形成・維持に何らかの役割を持っていることが示唆されるが、未だ EBV と腫瘍形成に関わる分子メカニズムは明らかになっていない。近年、EBV 関連腫瘍の臨床サンプルの網羅的ゲノム解析から、欠損型 EBV (ウイルスゲノムの一部が欠失した EBV) の存在が明らかとなり (Okuno et al., *Nat Microbiol*, 2019)、EBV 関連 T/NK 細胞腫瘍の腫瘍形成メカニズムの解明に期待が持たれている。

一つの生物を構成する細胞の遺伝情報は同じにも関わらず、それぞれの細胞で異なる機能がある。これは、それぞれの細胞で発現している遺伝子・遺伝子産物の違いによる。つまり、遺伝子発現パターンが細胞を特徴付けているということである。この個性を規定する一つのメカニズムが、遺伝子群を制御する転写調節ユニットである「スーパーエンハンサー」である。スーパーエンハンサーは遺伝子群を制御する転写調節ユニット構造であり、ゲノム内に点在するエンハンサーやプロモーターがループ構造により空間的近傍に集まることで、転写因子や RNA ポリメラーゼも凝集し、効率のよい転写を可能にする (Chapuy et al., *Cancer Cell*, 2013; Hnisz et al., *Cell*, 2013; Lovén et al., *Cell*, 2013; Whyte et al., *Cell*, 2013)。そのため、腫瘍細胞に特徴的なスーパーエンハンサーの破壊は、関連する遺伝子発現を強く抑制し、新たな治療ターゲットとなり得ると考える。

EBV により不死化した B 細胞であるリンパ芽球様細胞株 (lymphoblastoid cell lines; LCLs) では、EBV 特異的なスーパーエンハンサー構造が報告されている (Zhou et al., *Cell Host Microbe*, 2015)。基本的に、LCLs では欠損のない完全長のウイルスゲノムが存在する。そのため、



LCLs 内で形成されるスーパーエンハンサー構造は、完全長のウイルスゲノムと転写因子・宿主ゲノムによる高次構造であり、これが生存や増殖に関わる遺伝子群を制御している。一方、EBV 関連 T/NK 細胞腫瘍ではウイルスゲノムの一部が欠失した EBV が存在するという事実 (Okuno et al., *Nat Microbiol*, 2019) は、欠損型 EBV は完全長 EBV ゲノムではみられないようなスーパーエンハンサー構造を形成する可能性を示唆する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、EBV 関連腫瘍の臨床サンプルから見出された欠損型 EBV が腫瘍細胞内でどのようなスーパーエンハンサー構造を形成するかを明らかにすることである。EBV ゲノムの一部欠損が遺伝子発現パターンに与える影響や、発現パターンとスーパーエンハンサー構造との関係を

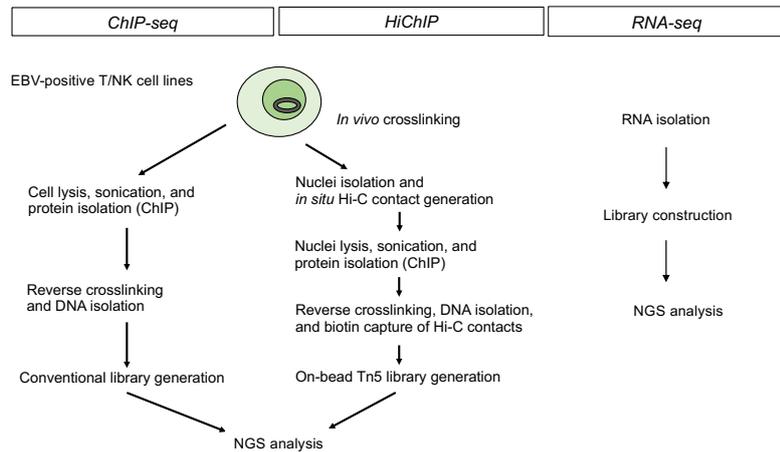
明らかにすることで、予後不良な EBV 関連 T/NK 細胞腫瘍の新たな治療法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、先行研究(Okuno et al., *Nat Microbiol*, 2019)で見出したウイルスゲノムの一部が欠失した EBV が感染している NK 細胞 2 株および T 細胞 2 株とコントロールとして EBV 陰性の NK 細胞 1 株、T 細胞 1 株の少なくとも 6 株のスーパーエンハンサー構造を解析することを第一の目標とした。抗 H3K27ac 抗体を使用した ChIP-seq と HiChIP、および各細胞の発現プロファイルを取得する RNA-seq の 3 つの解析を中心に研究を実施した。

得られた結果は、HiC-Pro、hichipper method、MACS2、ChIA-PET、ROSE、WashU Epigenome Browser などのアプリケーション/プログラムを使用して解析し、EBV 関連 T/NK 細胞腫瘍を特徴付けるスーパーエンハンサーの同定を行った。

また、EBV ゲノムの一部欠損が遺伝子発現パターンに与える影響や、発現パターンとスーパーエンハンサー構造との関係を、CRISPR/Cas9 システムを使用したゲノム編集によって宿主遺伝子を欠失させたり、ウイルスゲノムに任意の欠損を挿入したりすることで解析した。



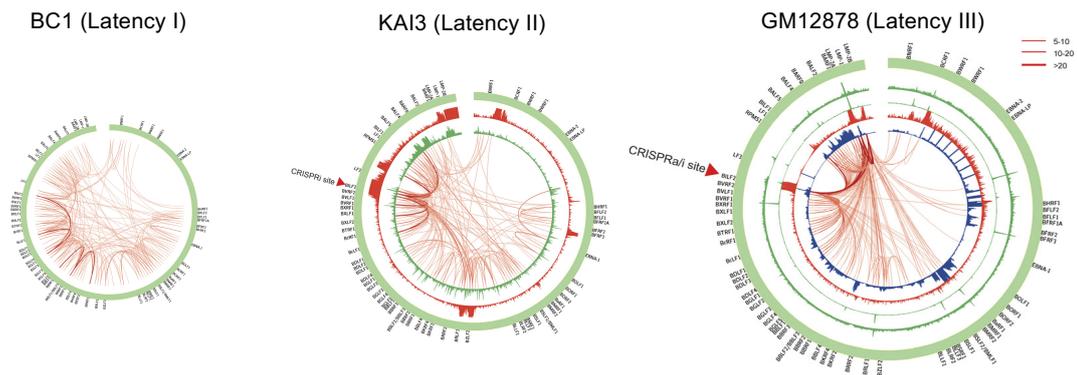
### 4. 研究成果

各種の T/NK 細胞株において実施した抗 H3K27ac 抗体を使用した ChIP-seq の結果から ROSE によってスーパーエンハンサーの同定とランク付けを実施した。同時に、公共データベースに公開されている EBV 陰性腫瘍細胞および正常 T/NK 細胞と比較し、EBV 特異的な T/NK 細胞性腫瘍におけるスーパーエンハンサーの候補を 95 箇所見出した。現在は、95 箇所の EBV 特異的スーパーエンハンサー候補の中から、EBV 陽性 T/NK 細胞性腫瘍のフェノタイプを制御する部位の同定を進めている。

先行研究より(Zhou et al., *Cell Host Microbe*, 2015)、EBV 陽性の B 細胞株 (LCLs) では EBV 特異的スーパーエンハンサーが MYC locus に存在していることが知られている。本研究で得られたデータと LCL の抗 H3K27ac 抗体を使用した ChIP-seq 結果を比較すると、H3K27ac のシグナルパターンは B 細胞と NK/T 細胞で大きく異なっていることが明らかとなり、EBV は宿主細胞に応じて、異なる EBV 特異的なスーパーエンハンサーを形成していることが示唆された。

さらに、EBV ゲノムは感染細胞の核内で高次構造を保った状態で保持されていることが明らかとなった。EBV は宿主細胞内で潜伏感染をしており、宿主細胞ごとに発現するウイルス遺伝子が異なる (Latency type I から type III まで存在する)。さらに興味深いことに、潜伏感染状態

に応じて、EBV ゲノムの立体構造（ウイルスゲノム間での相互作用部位）が異なることを見出した。



実際に、CRISPR/Cas9 システムを利用して、ウイルスゲノム間の相互作用を阻害すると、ウイルス遺伝子発現のパターンが変化することも示すことができた。以上より、ウイルス遺伝子発現もウイルスゲノムの立体構造により制御されていることが明らかとなった。

本研究の結果の一部は、ウイルス学分野の国際誌 (Ding et al., *J Virol*, 2022) に発表した。その他の結果についても発表の準備をしている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ding Weiyue, Wang Chong, Narita Yohei, Wang Hongbo, Leong Merrin Man Long, Huang Alvin, Liao Yifei, Liu Xuefeng, Okuno Yusuke, Kimura Hiroshi, Gewurz Benjamin, Teng Mingxian, Jin Shuilin, Sato Yoshitaka, Zhao Bo	4. 巻 96
2. 論文標題 The Epstein-Barr Virus Enhancer Interaction Landscapes in Virus-Associated Cancer Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00739-22	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 Suzuki Takeshi, Sato Yoshitaka, Okuno Yusuke, Goshima Fumi, Mikami Tadahisa, Umeda Miki, Murata Takayuki, Watanabe Takahiro, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Kitagawa Hiroshi, Kimura Hiroshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screen for HSV-1 host factors reveals PAPSS1 contributes to heparan sulfate synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03581-9	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 Sato Yoshitaka, Yaguchi Masahiro, Okuno Yusuke, Ishimaru Hanako, Sagou Ken, Ozaki Somi, Suzuki Takeshi, Inagaki Tomoki, Umeda Miki, Watanabe Takahiro, Fujimuro Masahiro, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Epstein-Barr virus tegument protein BGLF2 in exosomes released from virus-producing cells facilitates de novo infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-022-00902-7	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13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

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 Biennial Conference International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木高子, 佐藤好隆, 鳥居ゆか, 福田悠人, 春田一憲, 山口慎, 奥野友介, 濱麻人, 木村宏, 伊藤嘉規, 川田潤一
2. 発表標題 シングルセルシーケンスを用いたEBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症の病態解析
3. 学会等名 第54回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐合健, 佐藤好隆, 奥野友介, 渡辺崇広, 木村宏
2. 発表標題 EBV溶解感染遺伝子BNRF1はアポトーシス阻害により腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤好隆
2. 発表標題 内因性微粒子が駆動するウイルス関連疾患の理解
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐合健、佐藤好隆、奥野友介、渡辺崇広、木村宏
2. 発表標題 EBV溶解感染遺伝子BNRF1の欠損は腫瘍形成能を著しく低下させる
3. 学会等名 第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Suzuki, Yoshitaka Sato, Yusuke Okuno, Takayuki Murata, Takahiro Watanabe, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 A genome-wide CRISPR screen reveals the importance of genes related to heparan sulfate biosynthesis and the requirement of PAPSS1 for HSV-1 infection and binding
3. 学会等名 The 45th Annual International Herpesvirus Workshop (IHW2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitaka Sato, Tomoki Inagaki, Yusuke Okuno, Takahiro Watanabe, Takayuki Murata and Hiroshi Kimura
2. 発表標題 The abortive lytic phase occurred prior to latency establishment during EBV primary infection to B-cells
3. 学会等名 The 45th Annual International Herpesvirus Workshop (IHW2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitaka Sato, Masahiro Yaguchi, Yusuke Okuno, Hanako Ishimaru, Takahiro Watanabe, Masahiro Fujimuro, Takayuki Murata, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Exosomes containing Epstein-Barr virus tegument proteins are released from the infected cells and support de novo infection to target cells
3. 学会等名 The 19th International Symposium on EBV and associated diseases (EBV2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Okuno, Takayuki Murata, Yoshitaka Sato, Yoshinori Ito, Akihisa Sawada, Koichi Ohshima, Seiichi Kato, Masato Nakaguro, Akira Satou, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Epstein-Barr virus carrying structural variations in hematological and epithelial cell malignancies
3. 学会等名 The 19th International Symposium on EBV and associated diseases (EBV2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Narita, Weiyue Ding, Chong Wang, Merrin Man Long Leong, Hongbo Wang, Minxiang Teng, Hiroshi Kimura, Yoshitaka Sato, Bo Zhao
2. 発表標題 Genomic landscape in CAEBV cell lines
3. 学会等名 The 19th International Symposium on EBV and associated diseases (EBV2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤好隆
2. 発表標題 Exosomal transfer of Epstein-Barr virus tegument protein BGLF2 and its contribution to the infection
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤好隆, 成田洋平, Minxiang Teng, 木村宏, Bo Zhao
2. 発表標題 慢性活動性EBV病患者由来細胞で認めるウイルスゲノムの高次構造解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤好隆
2. 発表標題 新型および旧型コロナウイルスのウイルス学的特徴と今後の課題
3. 学会等名 第34回日本動物細胞工学会2021年度大会（招待講演）
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		
米国	ハーバード大学	ノースカロライナ大学	デューク大学