

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461588

研究課題名(和文) EBウイルス感染に伴い発現変化するBリンパ腫細胞遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Gene expression profiling linked to Epstein-Barr virus infection in B-cell lymphoma

研究代表者

藤枝 幹也 (FUJIEDA, Mikiya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：60209020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス(EBV)は加齢性リンパ腫や移植後リンパ増殖性疾患などのB細胞リンパ腫の発症に関与する。今回、EBV型潜伏感染様式を示すB細胞リンパ腫において、感染に伴い発現変化する遺伝子発現解析を行った。同一症例から樹立された同じクローン由来のペアリンパ腫細胞株を用いて、マイクロアレイで比較解析した。その結果、EBV陽性リンパ腫細胞で発現亢進がみられた遺伝子は、細胞周期制御に関わる遺伝子、細胞の分化制御に関わる遺伝子、細胞接着に関わる遺伝子、チロシンキナーゼ/受容体をコードする遺伝子、LMP1と相互作用する遺伝子などであり、これらがEBV陽性リンパ腫の発症、病態形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is closely associated with various types of B-cell lymphoma such as diffuse large B-cell lymphoma of the elderly and post-transplant lymphoproliferative disorder. We aimed to find candidate genes associated with pathogenesis of EBV-driven lymphomas with EBV latency III infection. We established two EBV-positive and -negative B-cell lymphoma cell lines derived from same patient's tumor clone. Utilizing the paired cell lines, pathway analysis of microarray data identified 'transcriptional misregulation in cancer' as the most significantly upregulated in EBV-positive cells compared with EBV-negative cells. The pathway included genes regulating cell cycle, cell differentiation and cell adhesion, and genes associated signal transductions through tyrosine kinase receptors. These genes may be associated with pathogenesis of EBV-driven lymphomas and could be potential therapeutic targets for the diseases.

研究分野：小児科学、感染症学、ウイルス学

キーワード：ウイルス リンパ腫 感染症

### 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr(EB)ウイルスは伝染性単核球症などの急性感染症を惹起する一方で、多系統の細胞の癌化に關与する腫瘍ウイルスでもある。EBウイルスはバーキットリンパ腫、加齢性リンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患など B 細胞リンパ腫の発症にも深く關与する。これまでの EB ウイルス關連 B 細胞リンパ腫の病態に關する研究では、B 細胞の無制限増殖に働く責任 EB ウイルス遺伝子の同定に主眼が置かれていた。その一方で、移植後リンパ増殖性疾患のような EB ウイルス型潜伏感染様式(LMP1、LMP2A、EBNA2などを発現)を有するリンパ腫において、どのような細胞側遺伝子が発現あるいは抑制され、それがどのように働くかについては十分に明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に樹立した解析系を用いて、EBウイルス感染に伴い発現変化する型潜伏感染様式を示す B 細胞リンパ腫の遺伝子の網羅的探索を行うことを目的にした。これにより、B 細胞性リンパ腫での EB ウイルス腫瘍化機序の解明、さらには新規分子標的療法のためのターゲット因子同定へと展開できる研究につなげる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株の樹立

我々は同一の非ホジキンリンパ腫症例から EB ウイルス陽性と EB ウイルス陰性のペア B 細胞リンパ腫細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株は染色体解析などから同一クローン腫瘍細胞由来の細胞株であることが判明している。EB ウイルス陽性 B 細胞株を HMG-EB(+)、EB ウイルス陰性 B 細胞株を HMG-EB(-)と名づけた。HMG-EB(+ )における EB ウイルス由来 mRNA および蛋白発現を RT (reverse transcription)-PCR (polymerase chain reaction)法とウエスタンブロット法で解析した結果、LMP1、EBNA2 の発現が認められ、EB ウイルス型潜伏感染様式を示した。また、EB ウイルスのクロナリティを調べるサザンブロット法解析の結果、HMG-EB(+ )細胞での感染 EB ウイルスはモノクロナリティ感染であることが判明した。以上の結果より、HMG-EB(+ )細胞と HMG-EB(- )細胞における遺伝子発現パターンを比較解析することは、EB ウイルス感染に伴いどのような遺伝子が発現変化するかを知る上で有用であると考えた。

#### (2) マイクロアレイ解析

細胞より RNA を抽出し、cDNA に変換後マイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイは、CodeLink Human Whole Genome Bioarray (Applied Microarrays 社)を用いた。このアレイはおよそ 55,000 のエクソン遺伝子から成る。遺伝子発現解析は MicroArray Data

Analysis Tool Version 3.2 (Filgen 社)で行った。遺伝子オントロジーエンリッチメント解析(GO 解析)およびパスウェイ解析(KEGG\_PATHWAY)は DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)を使って行った。

### 4. 研究成果

マイクロアレイ解析の結果、HMG-EB(-)細胞に比べて、HMG-EB(+ )において 2.54 倍以上(Z スコア 2 倍以上)の発現レベルの差が認められた遺伝子を拾い上げ、以下の解析を行った。

#### (1) 発現亢進遺伝子群の GO 解析

発現亢進が認められた遺伝子群に対して GO 解析を行った。エンリッチメントスコア 3.00 で、アノテーションクラスター1に含まれていた GO タームには interferon signaling pathway などがあった。エンリッチメントスコア 2.36 で、アノテーションクラスター2に含まれていた GO タームには zinc finger が、またエンリッチメントスコア 2.35 で、アノテーションクラスター3に含まれていた GO タームには fibronectin があつた。

#### (2) 発現低下遺伝子群の GO 解析

発現低下が認められた遺伝子群に対して GO 解析を行った。エンリッチメントスコア 4.22 で、アノテーションクラスター1に含まれていた GO タームには SH3 domain があつた。

#### (3) 発現亢進遺伝子群のパスウェイ解析

発現亢進が認められた遺伝子群に対してパスウェイ解析を行った。最大の有意差をもって同定されたパスウェイタームは、Transcriptional misregulation in cancer ( $P = 0.001$ )であつた。他に有意差を示したものに、ErbB signaling pathway ( $P = 0.004$ )、Rap1 signaling pathway ( $P = 0.010$ )、Cytokine-cytokine receptor interaction ( $P = 0.021$ )、NF-kappa B signaling pathway ( $P = 0.040$ )、Chemokine signaling pathway ( $P = 0.040$ )などがあつた。

#### (4) 発現低下遺伝子群のパスウェイ解析

発現低下が認められた遺伝子群に対してパスウェイ解析を行った。有意差をもって同定されたパスウェイタームは、Cell adhesion molecules ( $P = 6.64 \times 10^{-5}$ )などがあつた。

KEGG\_PATHWAY 解析の結果、有意差をもって発現亢進パスウェイとして同定された Transcriptional misregulation in cancer に含まれる遺伝子は以下のとおりであつた。

LMO2, MLLT3, SIX1, TRAF1, CSF1R, CCND2, CDKN1A, HIST2H3A, HIST2H3C, HPGD, IGF1R, ITGAM, MMP9, PLAU, PTK2, BMP2K,

これらは、細胞周期制御に関わる遺伝子、細胞の分化制御に関わる遺伝子、細胞接着に関わる遺伝子、炎症の進行に関わる遺伝子、チロシンキナーゼ/受容体をコードする遺伝子、およびEBウイルスのLMP1と相互作用する遺伝子などであり、EBウイルス型潜伏感染様式を示すB細胞リンパ腫の発症、病態形成に關与することが示唆された。今後さらなる解析を進めていく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計12件)

Motomura K, Ganchimeg T, Nagata C, Ota E, Vogel JP, Betran AP, Torloni MR, Jayaratne K, Jwa SC, Mittal S, Dy Recidoro Z, Matsumoto K, Fujieda M, Nafiou I, Yunis K, Qureshi Z, Souza JP, Mori R. Incidence and outcomes of uterine rupture among women with prior caesarean section: WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *Sci Rep*. 査読有. 7: 44093, 2017. DOI: 10.1038/srep44093.

Muchanga SM, Yasumitsu-Lovell K, Eitoku M, Mbelambela EP, Ninomiya H, Komori K, Tozin R, Maeda N, Fujieda M, Sukanuma N. Preconception gynecological risk factors of postpartum depression among Japanese women: The Japan Environment and Children's Study (JECS). *J Affect Disord*. 査読有. 217: 34-41, 2017. DOI: 10.1016/j.jad.2017.03.049

Nagai T, Uemura O, Kaneda H, Ushijima K, Ohta K, Gotoh Y, Satomura K, Shimizu M, Fujieda M, Morooka M, Yamada M, Wada N, Hashimoto Y. The true distribution volume and Bioavailability of mizoribine in children with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 査読有. 2017 (掲載決定). DOI: 10.1007/s10157-016-1353-x.

Fujieda M, Tsuruga K, Sato T, Kikuchi H, Tamaki W, Ishihara M, Yamamoto M, Oishi T, Tanaka H, Daibata M.

Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate or tocilizumab. *Mod Rheumatol*. 査読有. 27: 66-71, 2017. DOI: 10.1080/14397595.2016.1177247.

Yamamoto M, Shimizu T, Shimizu S, Higashi Y, Nakamura K, Fujieda M, Saito M. Effect of naftopidil on brain noradrenaline-induced decrease in arginine-vasopressin secretion in rats. *J Pharmacol Sci*. 査読有. 132:

86-91, 2016. DOI:

10.1016/j.jphs.2016.09.002.

Hashida Y, Kamioka M, Tanaka M, Hosokawa S, Murakami M, Nakajima K, Kikuchi H, Fujieda M, Sano S, Daibata M. Ecology of Merkel cell polyomavirus in healthy skin among individuals in an Asian cohort. *J Infect Dis*. 査読有. 213: 1708-1716, 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw040.

Hattori M, Iwano M, Sako M, Honda M, Okada H, Akioka Y, Ashida A, Kawasaki Y, Kiyomoto H, Terada Y, Hirano D, Fujieda M, Fujimoto S, Masaki T, Maruyama S, Matsuo S. Transition of adolescent and young adult patients with childhood-onset chronic kidney disease from pediatric to adult renal services: a nationwide survey in Japan. *Clin Exp Nephrol*. 査読有. 20: 918-925, 2016. DOI:

10.1007/s10157-016-1231-6.

Kaneda H, Shimizu M, Ohta K, Ushijima K, Gotoh Y, Satomura K, Nagai T, Fujieda M, Morooka M, Yamada M, Wada N, Takaai M, Hashimoto Y, Uemura O. Population pharmacokinetics of mizoribine in pediatric patients with kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 査読有. 20: 757-763, 2016. DOI:

10.1007/s10157-015-1209-9.

Tamaki W, Tsuda E, Takehiro I, Tanaka N, Fujieda M. Importance of evaluation of the right coronary artery by two-dimensional echocardiography in patients after Kawasaki disease: a right parasternal approach. *Heart Vessels*. 査読有. 30: 178-185, 2015. DOI: 10.1007/s00380-014-0476-9.

石原 正行, 藤枝 幹也, 他. 二次性腎移植後にBKウイルス腎症を発症し、免疫グロブリン療法で軽快した女児例. *日本小児腎不全学会雑誌*. 査読有. 34: 69-71, 2014.

藤枝 幹也, 他. ロタウイルス腸炎と急性腎障害(AKI). *小児科診療*. 査読有. 77: 779-784, 2014.

<http://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-1025534169-00>.

Murakami M, Hashida Y, Imajoh M, Maeda A, Kamioka M, Senda Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H, Daibata M. PCR array analysis of gene expression profiles in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbes Infect*. 査読有. 16: 581-586, 2014. DOI:

10.1016/j.micinf.2014.04.004.

##### [学会発表](計22件)

藤枝 幹也. ロタウイルス胃腸炎に伴

う腎後性腎不全 成因に対する考察.  
第 19 回福岡小児腎疾患治療研究会.  
2016 年 11 月 5 日. 西鉄グランドホテル  
(福岡県・福岡市)  
藤枝 幹也. 小児腎移植における EBV の  
動態と抑制について. 第 24 回北陸腎疾  
患・血液浄化療法研究会. 2016 年 10 月  
29 日. ポルテ金沢(石川県・金沢市)  
長尾 佳樹, 藤枝 幹也, 他. neonatal  
AKI が CKD の原因と考えられた 1 例. 第  
51 回日本小児腎臓病学会学術集会.  
2016 年 7 月 7 日~9 日. ウィンクあいち  
(愛知県・名古屋市)  
濱本 諒, 藤枝 幹也, 他. 急性腎盂  
腎炎による続発性偽性低アルドステロ  
ン症と考えられた 2 歳男児例. 第 51 回  
日本小児腎臓病学会学術集会. 2016 年 7  
月 7 日~9 日. ウィンクあいち(愛知  
県・名古屋市)  
玉城 渉, 藤枝 幹也, 他. 先天性左  
室憩室の 2 例. 第 52 回日本小児循環器  
学会総会・学術集会. 2016 年 7 月 6 日~  
8 日. 東京ドームホテル(東京都・文京  
区)  
山本 雅樹, 藤枝 幹也, 他. 先天性  
QT 延長症候群(1 型)を合併した  
Loeys-Dietz 症候群の周術期管理の経験.  
第 52 回日本小児循環器学会総会・学術  
集会. 2016 年 7 月 6 日~8 日. 東京ド  
ームホテル(東京都・文京区)  
大石 拓, 藤枝 幹也, 他. 慢性好酸  
球性肺炎と考えられた 9 歳男児例. 第  
65 回日本アレルギー学会学術集会.  
2016 年 6 月 17 日~19 日. 東京国際フォ  
ーラム(東京都・千代田区)  
丸金 拓蔵, 藤枝 幹也, 他. A case of  
hypoplastic left heart syndrome with  
hemiconvulsion hemiplegia epilepsy  
syndrome. 第 58 回日本小児神経学会学  
術集会. 2016 年 6 月 3 日~5 日. 京王プ  
ラザホテル(東京都・新宿区)  
森田 志穂, 藤枝 幹也, 他. A case of  
spinal muscular atrophy type 1 with  
epilepsy. 第 58 回日本小児神経学会学  
術集会. 2016 年 6 月 3 日~5 日. 京王プ  
ラザホテル(東京都・新宿区)  
玉城 渉, 藤枝 幹也, 他. 先天性胆  
道拡張症と鑑別が困難であった胆道閉  
鎖症の一例. 第 119 回日本小児科学会学  
術集会. 2016 年 5 月 13 日~15 日. ロイ  
トン札幌, ホテルさっぽろ芸文館(北海  
道・札幌市)  
山本 雅樹, 藤枝 幹也, 他. トレッド  
ミル運動負荷試験で誘発された血管迷  
走神経反射による運動誘発性失神の一  
例. 第 119 回日本小児科学会学術集会.  
2016 年 5 月 13 日~15 日. ロイトン札幌,  
ホテルさっぽろ芸文館(北海道・札幌市)  
寺内 芳彦, 藤枝 幹也, 他. 経鼻不  
活化全粒インフルエンザワクチンと皮

下注射型インフルエンザ HA ワクチンの  
ヒトにおける安全性の比較検討. 第 19  
回日本ワクチン学会学術集会. 2015 年  
11 月 14 日~15 日. 名鉄犬山ホテル(愛  
知県・犬山市)  
菊地 広朗, 藤枝 幹也, 他. RS ウイ  
ルス細気管支炎に対するネーザルハイ  
フローの使用経験. 第 67 回中国四国小  
児科学会. 2015 年 11 月 7 日~8 日. ANA  
クラウンプラザホテル宇部(山口県・宇  
部市)  
佐藤 哲也, 藤枝 幹也, 大畑 雅典,  
他. 若年性特発性関節炎(JIA)における  
治療と EB ウイルス(EBV)動態について.  
第 47 回日本小児感染症学会総会・学術  
集会. 2015 年 10 月 31 日~11 月 1 日.  
ザ・セレクトン福島, ホテル福島グリー  
ンパレス, コラッセふくしま(福島県・  
福島市)  
森田 志穂, 藤枝 幹也, 他. 亜急性硬  
化性全脳炎における長期インターフェ  
ロン髄腔内注射中に Guillain-Barre 症  
候群を発症した一例. 第 47 回日本小児  
感染症学会総会・学術集会. 2015 年 10  
月 31 日~11 月 1 日. ザ・セレクトン福  
島, ホテル福島グリーンパレス, コラ  
ッセふくしま(福島県・福島市)  
石原 正行, 大畑 雅典, 藤枝 幹也,  
他. 若年性特発性関節炎(JIA)におけ  
る Epstein-Barr virus (EBV) 動態につ  
いて. 第 25 回日本小児リウマチ学会総  
会・学術集会. 2015 年 10 月 9 日~11 日.  
金沢歌劇座(石川県・金沢市)  
長尾 佳樹, 藤枝 幹也, 他. 腎生検後  
に動静脈瘤による間欠的な疼痛、血尿を  
長期に認め、10 年後に腎細胞癌が発見さ  
れた 1 例. 日本小児腎臓病学会学術集会  
第 50 回記念大会. 2015 年 6 月 18 日~20  
日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)  
丸金 拓蔵, 藤枝 幹也, 他.  
Cytomegalovirus の先行感染後に発症し  
た Guillain-Barre 症候群が疑われた 3  
歳男児例. 第 57 回日本小児神経学会学  
術集会. 2015 年 5 月 28 日~30 日. 帝国  
ホテル大阪(大阪府・大阪市)  
Karasawa M, Fujieda M, et al.  
Pathological role of peroxiredoxin 2  
in patients with Kawasaki disease.  
Pediatric Academic Societies Annual  
Meeting. April 25~28, 2015. San Diego  
(USA)  
菊地 広朗, 藤枝 幹也, 他. 自家末梢  
血幹細胞移植後の血栓性微小血管障害  
にエクリズマブ療法が奏効した 5 歳女  
児例. 第 118 回日本小児科学会学術集会.  
2015 年 4 月 17 日~19 日. 大阪国際会議  
場, リーガロイヤルホテル(大阪府・大  
阪市)  
丸金 拓蔵, 藤枝 幹也, 他. マイコ  
プラズマ髄膜脳炎の 3 例. 第 46 回日本

小児感染症学会総会・学術集会. 2014  
年10月18日～19日. 京王プラザホテル  
(東京都・新宿区)

- 22 Murakami M, Fujieda M, Daibata M, et al. PCR array analysis of gene expression profiles in chronic active Epstein-Barr virus infection. 39th International Herpesvirus Workshop, July 19～23, 2014. Kobe (Japan)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_pdatr/](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_pdatr/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤枝 幹也 (FUJIEDA, Mikiya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・教授

研究者番号：60209020

### (2) 研究分担者

大畑 雅典 (DAIBATA, Masanori)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部  
門・教授

研究者番号：50263976

村上 雅尚 (MURAKAMI, Masanao)

高知短期大学・医療衛生学科医療検査専  
攻・准教授

研究者番号：80571017