

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08716

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) The significance of host immune status and microRNA abnormalities in EBV-associated tumor

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・講師

研究者番号：60581824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)による発癌機構を解明する上で、宿主の免疫状態がどのように関連しているかを検討するために、EBV関連腫瘍90例について、EBV由来のmicroRNAの網羅的発現解析、潜伏感染様式の決定、EBVのコピー数の解析を行った。EBV由来microRNAの発現やEBVコピー数は比較的免疫能の保たれた宿主において高いことが示された。また悪性リンパ腫の前段階であるリンパ増殖性疾患においてもEBV由来microRNAの発現が高く、腫瘍発生の早期におけるEBV由来microRNAの重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではEBVに関連した上皮性あるいはリンパ球性の腫瘍発生の過程において、比較的早期の段階からEBV由来のmicroRNAの発現が重要であることを明らかにした。高齢化や移植医療の発達などにより、潜在的な免疫不全状態の患者が増加し、これに伴ってEBVに関連した腫瘍発生が増加することが予想される。本研究がEBVに関連した腫瘍発生の機序の一端を明らかにすることにより、診断や治療における有益な情報となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To explore the significance of immune host status during EBV-associated oncogenesis, analyses of EBV-microRNAs expression, latent gene expression and EBV copy number were performed using 90 cases of EBV-related tumors. EBV-microRNA expression and copy numbers were high in the relatively immunocompetent hosts. In addition, EBV-microRNA expression was higher in lymphoproliferative disorders than in monomorphic malignant lymphomas, suggesting the significance of EBV-microRNA in early stage of oncogenesis.

研究分野：病理学

キーワード：EBウイルス microRNA 潜伏感染遺伝子

1. 研究開始当初の背景

EBV は成人の 90%以上に感染しているウイルスであり、ヒトの癌の原因となるウイルスである。通常は B リンパ球に感染し、潜伏感染の状態に維持されるが、リンパ球に限らず、胃や上咽頭の上皮に感染して癌化する。さらにリンパ増殖性疾患や慢性活動性感染症などの原因となり、前癌状態としての病態を呈することも知られている。EBV 関連腫瘍には地域的偏在が見られ、特に中国、東南アジアに多い。本邦における発生も欧米に比較して多く、さらに癌の発生する臓器にも特徴がある。地理的要因や人種の違いなどが EBV 関連腫瘍の発生に密接に関連しており、本邦において各種臓器に生じる EBV 関連腫瘍について網羅的に探索し、その臨床病理学的特徴を明らかにすることは、腫瘍発生の背景にある種々の要因を同定する上で重要性が高い。さらに、高齢化や移植医療の発達により、潜在的ないし医原性に免疫不全の状態となる患者が増加するに従い、EBV による発癌が増加することが予想され、適切な診断や治療介入においても、宿主の免疫状態と腫瘍の発生に関連を解明することが重要である。

2. 研究の目的

Epstein-Barr virus (EBV) による発癌の過程において、宿主の免疫状態がどのように癌化に寄与しているかを microRNA 異常の観点から検討する。生検、外科手術、病理解剖によって得られたヒトの組織を材料として、本邦における EBV 関連腫瘍の臨床病理学的特徴を抽出し、加齢、感染症あるいは免疫抑制剤投与などの宿主の免疫状態を変化させる要因が、EBV による発癌にどのように関与しているかを明らかにする。特に免疫状態の変化により惹起される、ヒトあるいはウイルス由来の microRNA の発現異常がどのように癌化に寄与しているかを検証する。

3. 研究の方法

東京大学医学部附属病院病理部にアーカイブされている 1990-2017 年に採取された生検および手術検体の中で、EBER in situ hybridization 法により EBV 感染の有無について検索された症例をレビューした。その中で腫瘍細胞あるいは背景の炎症細胞に EBV の感染が確認された約 700 例の症例を病理組織学的に検討し、腫瘍の組織型(癌、リンパ腫など)の同定や基礎疾患(臓器移植後、加齢、化学療法後など、免疫状態に関連する因子を含む)など臨床情報の検索、抽出を行った。また EBER-ISH を行い、EBV 陽性細胞数や分布について検討を行った。

さらにその中から 90 例を抽出し、FirePlex miRNA assays を用いた EBV 由来 microRNA の網羅的発現解析、免疫組織化学的手法を用いた LMP1 や EBNA2 の発現パターンによる潜伏感染様式の決定、デジタル PCR による EBV のコピー数の解析も並行して行い、EBV 由来 microRNA の発現パターンと潜伏感染様式との関連やコピー数との関連を検討した。

次いで各症例において腫瘍内に浸潤する炎症細胞浸潤の種類や免疫関連分子 (PD-1, PD-L1) などの発現を免疫組織化学的に検討した。

EBV 関連腫瘍において高発現の見られた EBV 由来 microRNA を抽出し、ターゲット予測データベースを用いて標的遺伝子を検索し、その結果をもとにパスウェイ解析を行い、腫瘍発生に関連する遺伝子群を抽出し、その意義について検討した。

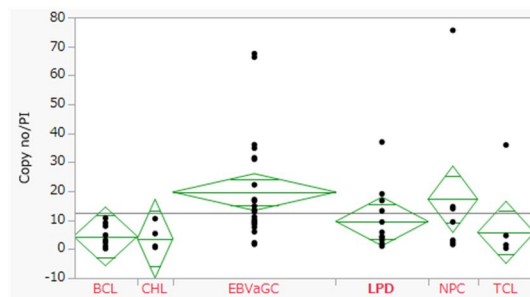
4. 研究成果

(1) EBV 感染細胞を含む組織の臨床病理学的検討

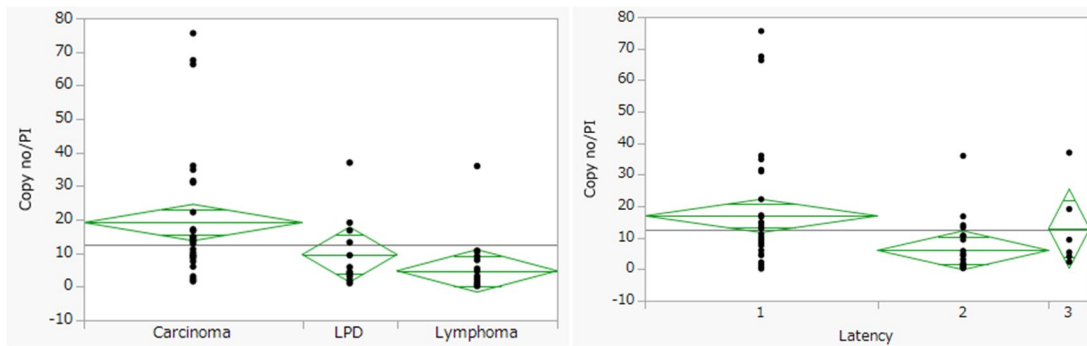
1990-2017 年に採取された生検および手術検体のうち、EBER-ISH 法により EBV の有無が検索された 2,469 例のうち、腫瘍あるいは背景の炎症細胞に EBV 陽性の細胞が見られた症例は 710 例であった。腫瘍細胞に EBV の感染が認められた症例は 518 例(胃癌が最多、次いでリンパ節、上咽頭、鼻腔、骨髄、皮膚)であり、192 例は bystander として EBV 陽性のリンパ球が背景に見られた。Bystander としての EBV 陽性細胞が見られた症例のほぼ半数がリンパ節であり、上咽頭や大腸粘膜も少数例含まれていた。

(2) EBV 関連腫瘍における EBV コピー数、潜伏感染様式の検討

EBV 関連腫瘍 90 例について、EBV コピー数の解析および潜伏感染様式を決定し、その関連を検索した。EBV のコピー数を腫瘍の組織型により比較した結果を右図に示す。EBV コピー数は組織ごとにより差があり、胃癌、上咽頭癌で高い傾向にあった。さらに症例を癌腫、リンパ増殖性疾患 (LPD)、悪性リンパ腫の群に分類し、これらの群間で比較した結果を次ページ(左図)に示す。EBV コピー数は癌腫でコピー数が高値であることが示された(one way ANOVA, $p=0.0033$)。



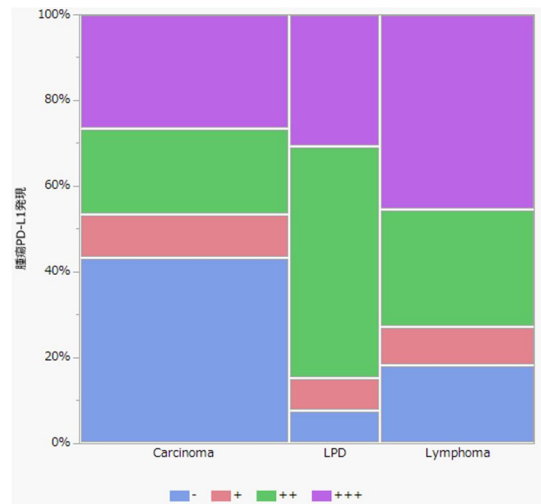
BCL: B 細胞性リンパ腫, CHL: 古典的ホジキンリンパ腫, EBVaGC: EBV 関連胃癌, LPD: リンパ増殖性疾患, NPC: 上咽頭癌, TCL: T 細胞性リンパ腫



また、潜伏感染様式によるコピー数の違いを解析したところ（右図）、latency type 1 で優位にコピー数が高い結果であった(one way ANOVA, $p=0.0324$)が、癌腫の多くは latency type 1 であることからこれらが関連している可能性は残る。

(3) EBV 関連腫瘍における炎症細胞浸潤のプロファイルおよび免疫関連分子の発現の検討

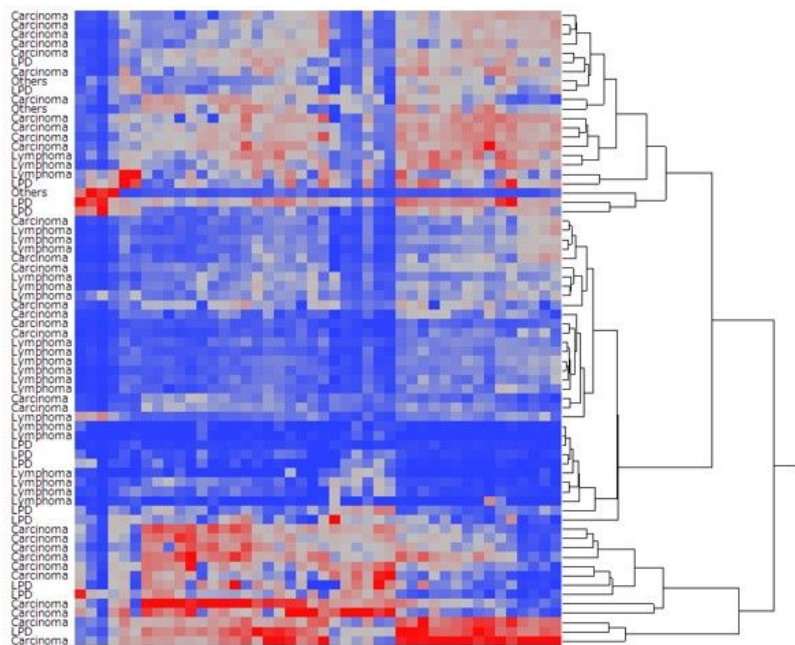
(2)と同じコホートを用いて、腫瘍における浸潤リンパ球のプロファイル(CD4, CD8, CD20, PD-1), 好中球, 好酸球, 組織球などの炎症細胞の数を定量的ないし半定量的に測定し, かつ腫瘍細胞における PD-L1 発現についても半定量的解析を行い, 結果を比較した. コホート全体で解析した結果, PD-L1 と浸潤細胞のプロファイルについては明確な関連性は見いだせなかったが, これについてはそれぞれの組織型の症例数をさらに増やして検討する余地が残っていると考える. PD-L1 の発現状態と組織型や潜伏感染様式の関連を検討したところ, PD-L1 の発現が LPD で最も高く, 癌腫で低くなる傾向が見られた(右図). PD-1 陽性リンパ球の浸潤に関しては癌腫, 悪性リンパ腫, LPD との間で差が見られたが, 腫瘍における PD-L1 の発現との相関は明らかではなかった.



(4) EBV 関連腫瘍における EBV 由来 microRNA の網羅的発現解析

(2)と同じコホートを用いて, FirePlex miRNA assays を用いた EBV 由来 microRNA の網羅的発現解析を行った. Micro RNA の発現量をもとにクラスター解析を行ったところ, 右図のように大きく 4 群に分類されることが明らかとなった. このうち microRNA の発現量が高い群に癌腫の症例が多く含まれ, 一方, 悪性リンパ腫は総じて microRNA の発現量が少ない群に含まれているものが多かった.

さらに LPD と悪性リンパ腫との比較において, 5 つの EBV 由来 microRNA の発現が LPD で優位に高いことが示され, この中で発現の絶対量が少ないものを除く 4 つの microRNA について, Web 上に公開されている予測ツールを用いて標的遺伝子の候補となるものを抽出し, さらにそれらの遺伝子群についてパスウェイ解析を行ったところ, 細胞増殖や抗原提示に関連する複数の遺伝子が含まれていることが明らかになった. 今後はこれらの遺伝子の EBV 発癌への寄与について詳細な検討を加えることを予定している.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5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 Furuya G, Abe H, Shinozaki-Ushiku A, Yamashita A, Ihara S, Hirata Y, Chiba A, Fujioka Y, Kurokawa M, Koike K, Fukayama M.	4. 巻 214
2. 論文標題 Extranodal NK/T-cell lymphoma of the nasal cavity developed in a patient with intestinal Epstein-Barr virus-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract	6. 最初と最後の頁 1051-1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2018.05.022.	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 -
1. 著者名 Abe H, Saito R, Ichimura T, Iwasaki A, Yamazawa S, Shinozaki-Ushiku A, Morikawa T, Ushiku T, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M.	4. 巻 472
2. 論文標題 CD47 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: coexistence with tumor immunity lowering the ratio of CD8+/Foxp3+ T cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virchows Arch.	6. 最初と最後の頁 643-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-018-2332-2.	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 -
1. 著者名 Karakawa A, Taoka K, Kaburaki T, Tanaka R, Shinozaki-Ushiku A, Hayashi H, Miyagi-Maeshima A, Nishimura Y, Uekusa T, Kojima Y, Fukayama M, Kurokawa M, Aihara M.	4. 巻 183
2. 論文標題 Clinical features and outcomes of secondary intraocular lymphoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 668-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.15005.	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 -
1. 著者名 Tsukui D, Kanda H, Shinozaki-Ushiku A, Tateishi S, Takeshima Y, Nagafuchi Y, Sasaki O, Iwasaki Y, Harada H, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Kubo K, Fujio K, Nakamura F, Kurokawa M, Fukayama M, Yamamoto K	4. 巻 28
2. 論文標題 Polymorphic lymphoproliferative disorders in patients with rheumatoid arthritis are associated with a better clinical outcome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 621-625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2017.1387223.	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 -

1. 著者名 Mizuno Hideaki, Koya Junji, Fujioka Yosei, Ibaraki Toshio, Nakamura Fumihiko, Hayashi Akimasa, Shinozaki-Ushiku Aya, Akamatsu Nobuhisa, Hasegawa Kiyoshi, Kokudo Norihiro, Fukuyama Masashi, Kurokawa Mineo	4. 巻 96
2. 論文標題 Extranodal NK/T cell lymphoma in a living donor liver transplant recipient	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1051~1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-017-2969-y	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 -

1. 著者名 牛久綾・牛久哲男	4. 巻 2
2. 論文標題 EBウイルス関連胃癌	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 消化器・肝臓内科	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 牛久綾・牛久哲男	4. 巻 32
2. 論文標題 EBウイルス関連胃癌とH.pylori	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床消化器内科	6. 最初と最後の頁 1497-1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Aya Shinozaki-Ushiku
2. 発表標題 Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma -The roles of cellular and viral microRNAs in its carcinogenesis-
3. 学会等名 Belfast Pathology 2017 (10th Joint Meeting of the British Division of the International Academy of Pathology and the Pathological Society of Great Britain & Ireland) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久米 絢子, 牛久 綾, 国田朱子, 深山正久, 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発現異常の意義の解明
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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〕

東京大学医学部 人体病理学・病理診断学分野のホームページ http://pathol.umin.ac.jp/

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