

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：90101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20173

研究課題名(和文) 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるマイクロRNAを対象としたバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Circulating Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma

研究代表者

駒林 優樹 (Komabayashi, Yuki)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター・がん研究部・研究員

研究者番号：40548864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：鼻性NK/T細胞リンパ腫は、EBウイルス関連腫瘍であり、予後不良な悪性リンパ腫である。患者血清を用いて、EBウイルスmiRNAの網羅的解析を行った結果、miR-BART2-5pが高発現していることが確認された。血清中miR-BART2-5pは、治療により低下し、病期進行例において有意に高値であった。さらに血清中miR-BART2-5p高発現群は、有意に予後不良であった。以上から血清中miR-BART2-5pは、鼻性NK/T細胞リンパ腫において有用なバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nasal natural killer /T-cell lymphoma is an Epstein-Barr virus (EBV)-associated malignancy and is characterized by a poor prognosis. Sera of patients with nasal natural killer /T-cell lymphoma were subjected to PCR-based EBV-miRNA profiling. This analysis revealed high miR-BART2-5p expression level in sera of patients. Level of miR-BART2-5p significantly decreased after treatment compared with those before treatment. Furthermore, a high circulating miR-BART2-5p level was associated with disease progression and poor prognosis in patients with nasal natural killer /T-cell lymphoma. Our findings suggest that circulating miR-BART2-5p may serve as a potential biomarker in patients with nasal natural killer /T-cell lymphoma.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：EBウイルス microRNA 悪性リンパ腫 miR-BART2-5p

1. 研究開始当初の背景

鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部に沿って進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変を主体とするNK細胞あるいはT細胞由来のリンパ腫である。また、本リンパ腫は、腫瘍細胞にEpstein-Barr virus (EBウイルス)を認め、その発癌への関与も報告されている。本疾患は、他のリンパ腫と比較し破壊性が強いことが特徴であり、肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、予後が極めて不良である。さらに病理組織学的特徴として広範な細胞浸潤と壊死像を伴うため、病理組織学的診断が困難な場合が多く、早期の診断を難しくしている。しかし、これまでに本疾患における病態の解明は、他癌と比較し十分なされていない。よって治療、診断を念頭に置いた腫瘍特性の理解が早急に求められている。

microRNAは、タンパクをコードしていない約22塩基長の短い一本鎖RNAでありmRNAからタンパクへの翻訳を負に制御することで様々な生命現象に関与している。一方でmicroRNAの発現異常による発癌が種々の癌において報告されており、RNAを使用した薬剤への道も開けてきている。また、血液中に循環するmicroRNAの存在が明らかにされており、各種癌において血清中microRNAのバイオマーカーとしての有用性が数多く報告されてきている。さらに近年、感染しているウイルス由来のmicroRNAが宿主であるヒトの遺伝子発現を制御することで疾患の病態に関与していることが解ってきた。本疾患の病態に深く関与しているEBウイルスにもmicroRNAが存在する。これらEBウイルスmicroRNAは、正常細胞には存在せずウイルス感染細胞にのみ存在するため、診断的観点から非常に有用な標的分子と考えられる。本疾患と同様にEBウイルス関連疾患である上咽頭癌や慢性活動性EBウイルス感染症では、血清中のebv-miR-BART7-3pとebv-miR-BART2-5p、13、15がそれぞれ疾患のバイオマーカーに成り得る事が明らかにされている。しかし、本疾患における血液中に循環するEBウイルスmicroRNAについての報告は皆無である。血清中EBウイルスmicroRNAが本疾患に特異的に高発現しており、病勢と関連していることが見出せれば、本疾患の早期診断が可能となり、治療効果判定や予後予測において有用な診断ツールとなり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、鼻性NK/T細胞リンパ腫患者血清におけるEBウイルスmicroRNAの発現解析を行い、臨床経過との関連性を検討し、本疾患のバイオマーカーとなり得るかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた血清中EBウイルスmicroRNAの網羅的解析

鼻性NK/T細胞リンパ腫7症例の患者血清からmicroRNAを抽出した。血清中microRNAを用いてmicroRNA PCRアレイ解析を行い、EBウイルスmicroRNAの発現を網羅的に解析した。対照群は、EBウイルス既感染の健常ボランティア5例の血清を用いた。

(2) 血清中EBウイルスmicroRNAの定量的PCR解析

アレイ解析により高発現していた候補EBウイルスmicroRNAについて鼻性NK/T細胞リンパ腫16症例、健常コントロール13例の血清を用いて定量的PCR解析を行い、血清中の発現を解析した。内部標準は、RNA抽出時に添加した*C. elegans* miRNA-39 (cel-miR-39)を用いてそれぞれ 2^{-CT} 法で相対定量した。

(3) 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株を用いた候補EBウイルスmicroRNAの発現解析

血清中EBウイルスmicroRNAが腫瘍細胞から産生されているか否かを検討するため、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株の培養上清から細胞株由来のexosomeを回収し、exosome中のEBウイルスmicroRNAについて定量的PCR法で発現解析を行った。

(4) 血清中EBウイルスmicroRNA発現と臨床経過との関連性の検討

患者血清中に高発現しているEBウイルスmicroRNAについて、治療後の発現変化、病期や生存率との関連性について統計学的解析を行った。以上の検討により血清中EBウイルスmicroRNAが本疾患のバイオマーカーとなり得るかを評価した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた血清中EBウイルスmicroRNAの網羅的解析

PCRアレイ解析の結果、健常コントロールと比較し鼻性NK/T細胞リンパ腫症例の血清において幅広い種類のEBウイルスmicroRNAが高発現していることが確認された。

(2) 血清中EBウイルスmicroRNAの定量的PCR解析

PCRアレイ解析の結果、特に高発現を認めたmiR-BART2-5p、miR-BART7-3p、miR-BART13-3p、miR-BART1-5pについて、症例を増やし定量的RT-PCR解析を行った。その結果、健常コントロールと比較し鼻性NK/T細胞リンパ腫血清においていずれのEBウイルス

microRNAも有意に高発現していることが確認された。またROC解析の結果、AUC値が優れた値をとることが確認された

(miR-BART2-5p :0.962 [95% CI 0.904-1.00] , miR-BART7-3p :0.885 [95% CI 0.765-1.00] , miR-BART13-3p :0.957 [95% CI 0.893-1.00] , miR-BART1-5p :0.938 [95% CI 0.858-1.00])。

(3) 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株培養上清中のexosomeを用いた候補EBウイルスmicroRNAの発現解析

鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6、SNT8、そしてEBウイルス陽性NK細胞株であるKAI3の培養上清中exosomeには、miR-BART2-5p、miR-BART7-3p、miR-BART13-3p、miR-BART1-5pの発現を認めた。一方、EBウイルス陰性NK細胞株であるKHYG1のexosomeには、いずれのEBウイルスmicroRNA発現も認めなかった。

(4)血清中EBウイルスmicroRNA発現と臨床経過との関連性の検討

鼻性NK/T細胞リンパ腫症例における治療前後の血清中EBウイルスmicroRNA発現の変化を比較検討した結果、miR-BART2-5p、miR-BART7-3p、miR-BART13-3p、miR-BART1-5pともに治療前と比較し治療後において有意に低下することが示された。また、Ann Arbor臨床病期 Ⅰ期症例と Ⅱ期症例の血清中EBウイルスmicroRNA発現を比較検討した結果、Ⅱ期症例においてmiR-BART2-5pおよびmiR-BART7-3pの発現が有意に高いことが確認された。さらに、血清中EBウイルスmicroRNAの発現レベルを中央値で2群に分けて患者予後との関係をKaplan-Meier法で検討した結果、血清中miR-BART2-5p高発現群において有意に予後が不良であることが示された。

本研究では、鼻性NK/T細胞リンパ腫血清において複数のEBウイルスmicroRNAが高発現していることを見出した。これらのEBウイルスmicroRNAは腫瘍細胞が分泌しており、治療に反応し低下すること、臨床病期と相関することを明らかにした。さらに血清中EBウイルスmicroRNA高発現群は、有意に予後が不良であることが示された。以上より、血清中EBウイルスmicroRNA、特にmiR-BART2-5pは、鼻性NK/T細胞リンパ腫の診断および予後予測において有用なバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

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4件)

Komabayashi Y, Kishibe K, Nagato T,

Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y. Circulating Epstein-Barr virus-encoded micro-RNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Hematol Oncol*, 2016;1-9. DOI 10.1002/hon.2360 査読有
Takahara M, Nagato T, Kishibe K, Ueda S, Komabayashi Y, Yamashina M, Takahashi K, Harabuchi Y. Novel treatment for early-stage nasal natural killer/T-cell lymphoma: intra-maxillary arterial infusion chemotherapy with concomitant radiotherapy. *Hematol Oncol* 2015. DOI 10.1002/hon.2273 査読有
Kumai T, Nagato T, Kobayashi H, Komabayashi Y, Ueda S, Kishibe K, Ohkuri T, Takahara M, Esteban C, Harabuchi Y. CCL17 and CCL22/CCR4 signaling is a strong candidate for novel targeted therapy against nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64, 697-705. DOI

10.1007/s00262-015-1675-7 査読有
駒林優樹, 林達哉 耳鼻咽喉科処方マニュアル 頭頸部がん メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患 耳鼻咽喉・頭頸部外科 88: 322-324, 2016. 査読無

〔学会発表〕(計3件)

Komabayashi Y, Kishibe K, Harabuchi Y. Circulating Epstein-Barr virus-encoded micro-RNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. 第75回日本癌学会: 11.8, 2016, 横浜.
Kishibe K, Komabayashi Y, Nagato T, Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y. Diagnostic values of circulating Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. The 17th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV2016): Aug.8-12, 2016, Zürich, Switzerland.
駒林優樹, 岸部 幹, 長門利純, 上田征吾, 高原 幹, 原淵保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫における血清中EBウイルスmicroRNAを対象としたバイオマーカーの探索. 第117回日本耳鼻咽喉科学会: 5.21, 2016, 名古屋.

6. 研究組織

(1)研究代表者

駒林 優樹 (KOMABAYASHI YUKI)

札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター

がん研究部・研究員
研究者番号：40548864