

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17637

研究課題名（和文）DNAメチル化形質によるEBV陽性B細胞性悪性リンパ腫の層別化と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Profiling of EBV positive DLBCL by DNA methylation epigenotype

研究代表者

大島 渚 (Oshima, Nagisa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20791932

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ウイルス陰性DLBCLは全例が高メチル化形質を示した。一方、EBウイルス陽性DLBCLでは、背景の免疫不全の有無でDNAメチル化形質が大きく異なり、免疫不全下に発症したEBウイルス陽性DLBCLは全例低メチル化形質を示し、免疫不全の背景のないEBウイルス陽性DLBCLでは、EBウイルス陰性DLBCLにはない超高メチル化形質が認められていた。

この結果を遺伝子発現の結果と併せると、DNA超高メチル化の標的遺伝子が免疫不全の背景のないEBウイルス陽性DLBCLの難治化の原因になっていると考えられた。現在いくつかの遺伝子について過剰発現細胞等を用いてその機能と難治性形成の機序につき検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBウイルス陰性DLBCLは既存のR-CHOP療法で高率に治癒するのと比較して、EBウイルス陽性DLBCLは強度を上げた化学療法を用いても治療抵抗性である。本研究ではEBウイルス陽性DLBCLが免疫不全の背景の有無により異なるDNAメチル化形質を有し、それにより発症メカニズムも異なっていることを初めて証明した。エピゲノム異常を適切に制御することで抗腫瘍効果を発揮する、DNAメチル化阻害薬等を既存の化学療法に加えて投与することにより難治性悪性リンパ腫の病勢コントロールに繋がられるような新規治療法の開発につながる事が期待されるため、本研究は高い社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：De novo EB virus positive DLBCL showed markedly higher DNA methylation pattern. De novo EB virus negative DLBCL demonstrated high methylation pattern but it's not so high as de novo EB virus positive DLBCL. Immunosuppression based EB virus positive DLBCL showed low DNA methylation pattern as immortalized lymphocytes.

Next we performed RNA sequence and combined them with DNA methylation data. DNA methylation and gene expression showed inverse correlation. Thus, aberrant hyper DNA methylation induced suppression of key transcription factor targeted genes for the pathogenesis of EB virus positive DLBCL. Our work provided that we could profile the pathogenesis of EB virus positive DLBCL by DNA methylation epigenotype, and they depended on if they have background of immunodeficiency or not.

研究分野：血液内科

キーワード：EBV陽性DLBCL DNAメチル化 メチル化アレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの固形癌と造血器腫瘍では、特定の CpG アイランドの DNA 高メチル化が、癌抑制遺伝子の発現を、癌特異的に抑制することが知られている。エピゲノム異常は適切に制御することで生理的発現を回復させることが可能であり、これに基づく腫瘍形成機序の理解は難治性造血器腫瘍の本態解明に結びつくとともに、新規治療法開発における治療標的としても注目されている。実際、古くから存在していたアザシチジンやデシタピン(DAC)は造血器腫瘍の一つである骨髄異形成症候群(MDS)の治療薬として機序不明のまま用いられていたが、DNA メチル化阻害作用の発見とともに再び脚光を浴びている。

申請者らは MDS に着目し、ヒトゲノムにおいて同時機能喪失が高頻度に報告されている *Tet2* 遺伝子(DNA 脱メチル化に関与)低発現と *Ezh2* 遺伝子(ヒストン修飾から遺伝子発現抑制に関与)欠損のコンパウンドマウス (*Tet2^{KD/KD}Ezh2^{-/-}*) を用いて DNA メチル化とヒストン修飾、遺伝子発現変化について網羅的解析を行い、病態形成過程を探索してきた。*Tet2^{KD/KD}Ezh2^{-/-}* マウスは MDS 様の病態を呈し、特異的な DNA メチル化プロファイルを示した。DNA 高メチル化遺伝子群の多くは造血に重要な転写因子であり、発現と負の相関を示す割合が高かった。これを DAC で治療したところ有意な DNA メチル化解除を認め、一部造血に重要な因子の遺伝子発現も回復した。

Epstein-Barr virus (EBV) は世界中で成人の 90%以上が感染しているヘルペスウイルスに属する DNA ウイルスである。また、ヒトのがん細胞から最初に発見されたウイルスであり、上皮系癌や B 細胞腫瘍への関与が知られている。EBV 潜伏感染は通常無症候性だが、高齢者や免疫抑制状態では EBV が再活性化し造血器腫瘍へ進行する。特にびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) では多変量解析の結果 EBV(+)が独立した難治、予後不良因子となることが報告されている。他方、連携研究者である金田、松坂らは、胃癌における DNA メチル化の網羅的解析を通じて EBV(+)胃癌が EBV(-)胃癌と独立した超高 DNA メチル化形質を示し、さらに *in vitro* の EBV 感染により EBV 感染そのものが超高 DNA メチル化形質の原因であることを証明している。

2. 研究の目的

本研究では EBV(+)DLBCL とその前癌状態でもある EBV(+)リンパ増殖性疾患(EBV-LPD)の患者検体を EBV 陰性 DLBCL 検体と比較することで、EBV 感染と DNA メチル化異常の関係を網羅的に解析、層別化し、EBV(+)DLBCL 発症と治療抵抗性の機序を明らかにすることを目的とした。本研究の成果により新規治療の開発、治療成績向上に繋がることが期待された。

3. 研究の方法

1. 当院で加療された DLBCL、EBV-LPD 患者の、EBV 感染の有無による後方視的生存解析:

2011 年～2016 年の 5 年間に、当院で加療された DLBCL、EBV-LPD 患者計約 100 名の後方視的予後・生存解析を行い、当院における EBV(+)DLBCL の長期予後を明らかにする。

2. DLBCL、EBV-LPD 患者検体における DNA メチル化を中心としたエピジェネティック異常と遺伝子発現の関係性の網羅的解析:

当院でリンパ節生検を施行した DLBCL 患者、EBV-LPD 患者のリンパ節切片約 70 検体を薄切し、標本でリンパ腫細胞含有率を判定した上で、悪性細胞高含有率のものを選定し DNA、RNA を抽出する。以下の方法で DNA メチル化形質と遺伝子発現をゲノムワイドに解析し、その結果に基づき DLBCL、EBV-LPD を層別化し、EBV(+)DLBCL の病態形成と治療抵抗性をもたらす重要因子を同定、さらに新規治療法の開発を目指す。

a)DLBCL、EBV-LPD の DNA メチル化解析と層別化

DNA を抽出し、網羅的 DNA メチル化アレイ Infinium 450k (Illumina®)を行う。これにより EBV(+)DLBCL、EBV-LPD、EBV(-)DLBCL それぞれの DNA メチル化形質を包括的に解析し、EBV 感染による DNA メチル化異常の標的遺伝子、標的モチーフを明らかにし、層別化をはかる。

b) B 細胞におけるエンハンサーの同定

ヒストンのアセチル化(H3K27Ac)やメチル化(H3K4me)に関するクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)を行い、a)の結果と併せエンハンサー(特にスーパーエンハンサー)等の転写調節に重要な部位における DNA メチル化標的を明らかにする。

c) DLBCL、EBV-LPD の遺伝子発現解析

抽出した RNA を用いて RNA シーケンスを施行し、DLBCL、EBV-LPD の exon の転写状態についてゲノムワイドに解析を行う。a)、b)の DNA メチル化解析のデータと併せ、EBV 感染により DNA メチル化を受ける影響で転写活性が低下する標的遺伝子を同定し、病態・治療抵抗性の形成に重要な DNA メチル化標的遺伝子・標的部位を同定する。

3. DNA メチル化阻害薬の、EBV(+)DLBCL への効果の解析:

DNA メチル化阻害薬の効果を確認、EBV(+)DLBCL 治療へ応用されることの妥当性を検討する。

a) DLBCL 細胞株に rEBV を感染させて作成する EBV(+)DLBCL 細胞株モデル、もしくは既存の EBV(+)悪性リンパ腫細胞株に対して、既に臨床応用されている DNA メチル化阻害薬を投与し、投与群・非投与群それぞれの細胞増殖能を観察する。増殖能に差が認められる場合は、アポトーシスや細胞増殖をアネキシン V や BrdU を用いて調べ、その機序を明らかにする。

b) これら細胞株治療モデルについても 2.に示した DNA メチル化、遺伝子発現の網羅的解析を行い、EBV(+)DLBCL における DNA メチル化が胃癌と同様に EBV 感染そのものによって生じ、かつ DNA メチル化阻害薬により解除されることを確認する。また、それら DNA メチル化が解除された遺伝子群の転写が脱抑制され発現レベルが回復することを調べ、DNA メチル化阻害薬の標的遺伝子、さらには治療応答マーカーを同定することを目指す。

4. 研究成果

68検体のDLBCLのリンパ節組織の薄切を行い、標本でリンパ腫細胞含有率を判定した。このうち腫瘍含有率が70%以上と高率な58検体からDNAとRNAの抽出を行った。13検体EBV(+)DLBCL、13検体のEBV(-)DLBCLから抽出した500ngのDNAについて、バイサルファイト処理を行い、網羅的DNAメチル化アレイInfinium 450kを試みた。EBV(-)DLBCLは13例とも高メチル化形質を示した。一方、EBV(+)DLBCLのうち2検体では超高メチル化形質を認め、4検体は高メチル化形質、7検体は不死化リンパ球と同等のレベルの低メチル化形質を示した(図1)。低メチル化形質を示した7例は背景にT細胞リ

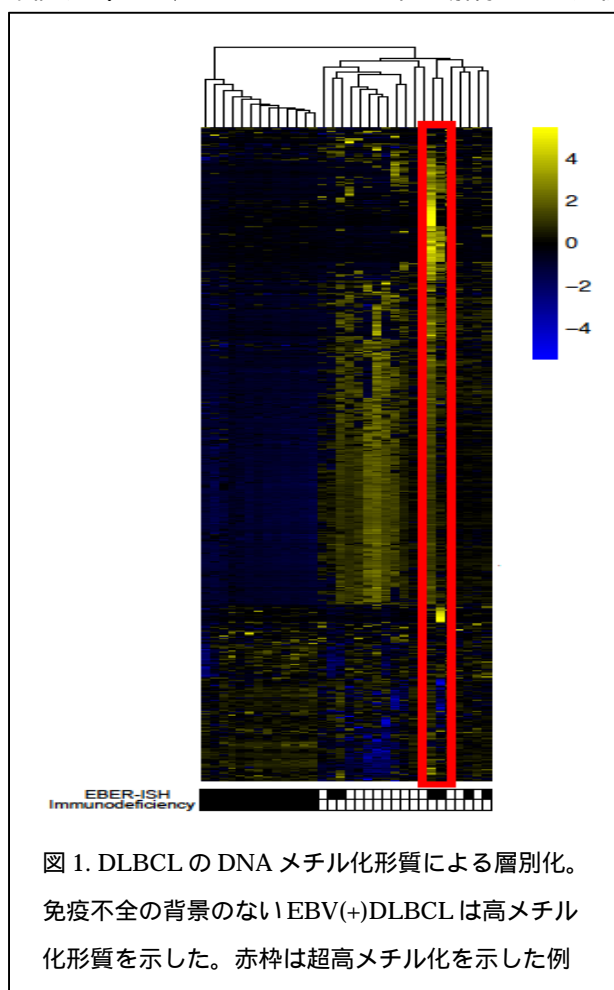


図 1. DLBCL の DNA メチル化形質による層別化。免疫不全の背景のない EBV(+)DLBCL は高メチル化形質を示した。赤棒は超高メチル化を示した例

リンパ腫や免疫抑制剤使用者等のT細胞機能不全を含む免疫不全があるDLBCLだった。高メチル化を示した症例、超高メチル化を示した症例は高齢者が含まれるものの背景の免疫不全の存在は明らかではなかった。前述のEBV(+)胃癌と比較してDLBCLで高メチル化を示した遺伝子は515遺伝子であった。そのうち、超高メチル化を示したEBV(+)DLBCL群で特異的にDNA高メチル化を示した遺伝子は463遺伝子であった。EBV(-)DLBCLは全例が高メチル化形質を示し、EBV(+)DLBCLでは、背景の免疫不全の有無でDNAメチル化形質が大きく異なることが示された。免疫不全の背景のないEBV(+)DLBCLではEBV(-)DLBCLには見られることのなかった超高メチル化形質が認められており、これらの比較で同定された超高メチル化遺伝子群がEBV感染によるDNAメチル化異常の標的遺伝子と考えられた。

また、RNA シーケンスの結果を主成分分析で表した結果、EBV(-)DLBCL と、EBV(+)DLBCLは遺伝子発現パターンが大きく異なることが明らかとなった。さらに、EBV(+)DLBCL の中でも、背景の免疫不全の有無により遺伝子発現パターンが変わる傾向があることが明らかとなった(図 2)。

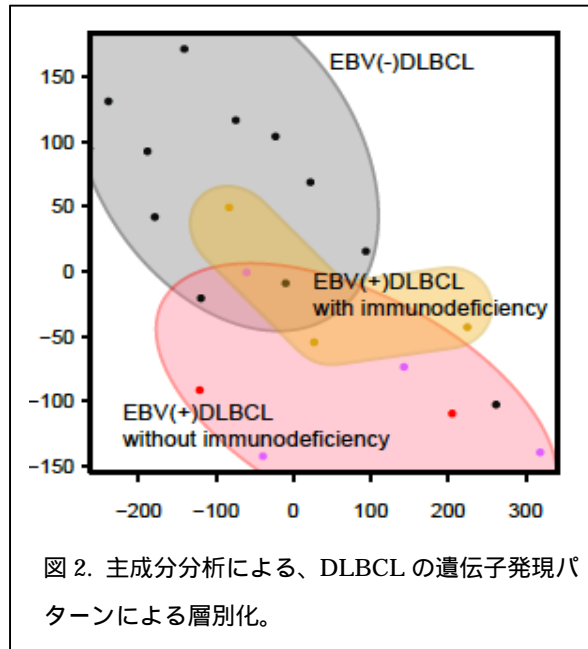


図 2. 主成分分析による、DLBCL の遺伝子発現パターンによる層別化。

EBV(-)DLBCL と、EBV(+)DLBCLは遺伝子発現パターンが大きく異なることが明らかとなった。さらに、EBV(+)DLBCL の中でも、背景の免疫不全の有無により遺伝子発現パターンが変わる傾向があることが明らかとなった(図 2)。DNA メチル化アレイの結果と併せて解析したところ、DNA 高メチル化による遺伝子発現低下が示唆される遺伝子群が認められた。これらの DNA 超高メチル化の標的遺伝子が EBV(+)DLBCL の難治化の原因になっていると考えられ、いくつかの遺伝子について過剰発現細胞等を用いて検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura A, Ohwada C, Oshima-Hasegawa N, Sakaida E, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Detection of MYD88 L265P mutation by next-generation deep sequencing in peripheral blood mononuclear cells of Waldenstrom's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0221941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221941	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 Mishina T, Oshima-Hasegawa N, Tsukamoto S, Sakaida E, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Successful autologous stem cell transplantation for POEMS syndrome with an unusually large osteolytic lesion: A case report and literature review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Myeloma	6. 最初と最後の頁 19-23
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 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 Takaishi K, Muto T, Oshima-Hasegawa N, Sakaida E, et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Long-term complete remission following tandem autologous stem cell transplantation and consolidative radiotherapy for refractory mediastinal gray-zone lymphoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 452-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-2471-x	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 和泉真太郎, 木村賢司, 竹田勇輔, 塚本祥吉, 大島渚, 堺田恵美子, 他	4. 巻 12
2. 論文標題 高IgM血症を伴いワルデンシュトレームマクログロブリン血症との鑑別を要したMALTリンパ腫.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 2600-2605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.59.2600	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 改, 大島 渚, 堺田恵美子, 他.
2. 発表標題 ニボルマブ治療後に同種移植を行いIGVHDコントロールに難渋した再発難治性ホジキン リンパ腫の一例.
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会, 046-2, 2019/3/9, 大阪
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大島渚、堺田恵美子、横手幸太郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Cardio-Renal Diabetes	5. 総ページ数 4
3. 書名 加齢に伴うクローン性造血とアテローム性動脈硬化型心血管障害リスク	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----