

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07450

研究課題名(和文) nCounter systemを用いたEBV関連リンパ増殖性疾患の網羅的発現解析

研究課題名(英文) Gene expression analyses by nCounter system for EBV associated lymphoproliferative disorders.

研究代表者

三好 寛明 (Miyoshi, Hiroaki)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30647780

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)： Epstein-Barr virus (EBV)はある種のリンパ増殖性疾患(Lymphoproliferative disorder: LPD)の発症に深く関与していると報告されており、EBV関連分子と周囲の腫瘍免疫を含む腫瘍周囲環境関連分子が進展に重要だと考えられている。

本研究では網羅的発現解析を行ったところ、EBVの関与が指摘されているメトトレキサート関連LPDではある特定の遺伝子群が高値であった。EBV-T/NK LPD、EBV陽性末梢性T細胞リンパ腫、節外性NK/T細胞リンパ腫の検討では、EBV-T/NK LPDにおいて特定の免疫細胞の遺伝子が高値となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ増殖性疾患は希少疾患であり、病態解明が進みにくい現状がある。しかしながら、今回の研究により、メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患およびEBV関連T/NK細胞リンパ増殖性疾患では、他の疾患と比較した場合に腫瘍周囲の免疫環境に違いがあることが示された。

今回の結果をもとにさらに病態解明が進むことで、EBVの関与しているリンパ増殖性疾患に対する適切な治療選択や患者さんの予後の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)： Epstein-Barr virus (EBV) is reported to play significant role in tumorigenesis of some kinds of lymphoproliferative disorders (LPDs). EBV-associated molecules and tumor microenvironment-associated molecules including tumor immunity are considered to be important in progression of those LPDs.

In this study, gene expression analyses showed that MTX associated LPDs had higher expression of specific genomic group, which might contribute to disease progression. EBV-T/NK LPD had higher expression of specific immune cells in comparison to EBV positive T-cell lymphoma and extranodal NK/T cell lymphoma.

研究分野：血液病理学

キーワード：EBウイルス mRNA 発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EBV(Epstein-Barr virus)はリンパ増殖性疾患(Lymphoproliferative disease: LPD)の発症および病態の進展に関わっており、悪性リンパ腫を含む LPD の多数の亜型で EBV の関与が証明されている。EBV 関連 LPD(EBV-LPD)では EBV 感染腫瘍性リンパ球の腫瘍化、進展において EBV 関連分子と免疫逃避に関連する腫瘍周囲環境関連分子との相互関係が大きな役割を果たしている。

これまでに申請者は EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患や節外性 T/NK 細胞リンパ腫、鼻型の全例で、また、ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫および末梢性 T 細胞性リンパ腫、特異型の一部の症例で腫瘍細胞に EBV 感染を確認している。さらに、最近注目されているメトトレキサート関連 LPD(Methotrexate associated LPD: MTX-LPD)においても申請者は病態の進展における EBV 感染の重要性を報告している。一方で悪性リンパ腫を含む LPD の発症・進展において腫瘍細胞と腫瘍免疫を含む腫瘍周囲環境との関係が極めて重要であると考えられており、申請者も実際に PD-L1、PD-1 などの腫瘍周囲環境の差異によって悪性リンパ腫の病態の進展が異なり患者の予後にも影響を及ぼすことを報告した。さらに、同一の疾患においても腫瘍細胞に EBV の感染がみられるかどうかで PD-L1 発現などの腫瘍周囲環境が大きく異なることも見出している。

上述のように EBV-LPD では EBV 感染腫瘍性リンパ球の腫瘍化、進展において EBV 関連分子と EBV 感染腫瘍性リンパ球の免疫逃避に関わる腫瘍周囲環境関連分子との関係が極めて重要な役割を果たしている。しかしながら、EBV 関連分子と腫瘍免疫周囲環境分子の mRNA・蛋白がどのような関係にあるかについて詳細に検討した研究はこれまでに行われておらず、EBV-LPD の発症・進展においてこれらの分子がどのような役割を果たしているかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では EBV-LPD において EBV 関連分子、腫瘍周囲環境関連分子の mRNA の網羅的発現解析を nCounter system を用いてホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して行い、それらの分子に対する蛋白発現の解析を行う。本研究により EBV-LPD の EBV 関連分子、腫瘍周囲環境関連分子の mRNA・蛋白が病態の進展にどのような役割を果たしているかが解明され、その結果により EBV-LPD の症例が層別化されることによって患者の予後が改善されることを目的としている。

3. 研究の方法

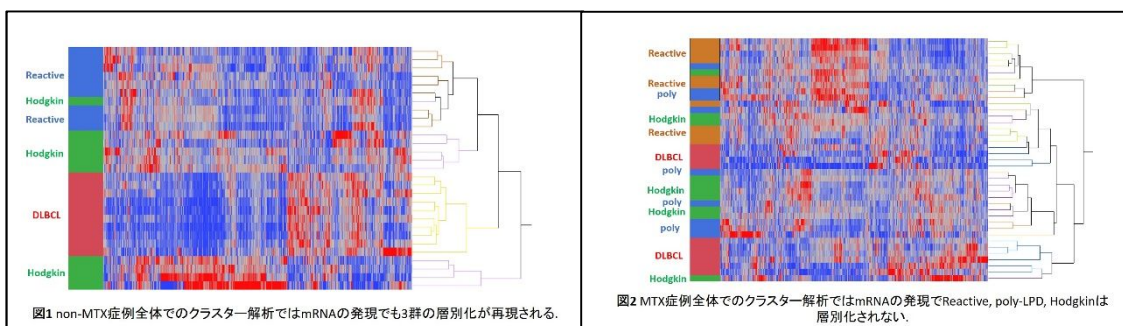
(1) MTX-LPD の症例と MTX を使用せずにリンパ腫を発症した症例(non-MTX)を網羅的発現解析にて比較検討をおこなった。MTX-LPD の症例の組織型として Reactive lymphadenitis、polymorphous lymph proliferative disorder (polymorphous LPD)、Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)、Hodgkin lymphoma を解析対象とし、対照群の non-MTX の症例の組織型として、Reactive lymphadenitis、DLBCL、Hodgkin lymphoma との比較検討を行った。発現解析は、nCounter を使用し、対象遺伝子はがんおよびがん免疫に関連する遺伝子群を対象とした。発現解析の結果、抽出された遺伝子群を代表する蛋白の発現を確認するために免疫染色を行った。

(2) EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患、EBV 陽性末梢性 T 細胞リンパ腫、非特異型、節外性 NK/T 細胞リンパ腫の症例に対して、網羅的発現解析にて比較検討した。発現解析は、nCounter を使用し、対象遺伝子はがんおよびがん免疫に関連する遺伝子群と EBV 関連遺伝子群を対象とした。発現解析の結果を受け、蛋白の発現を確認するための染色を行った。

4. 研究成果

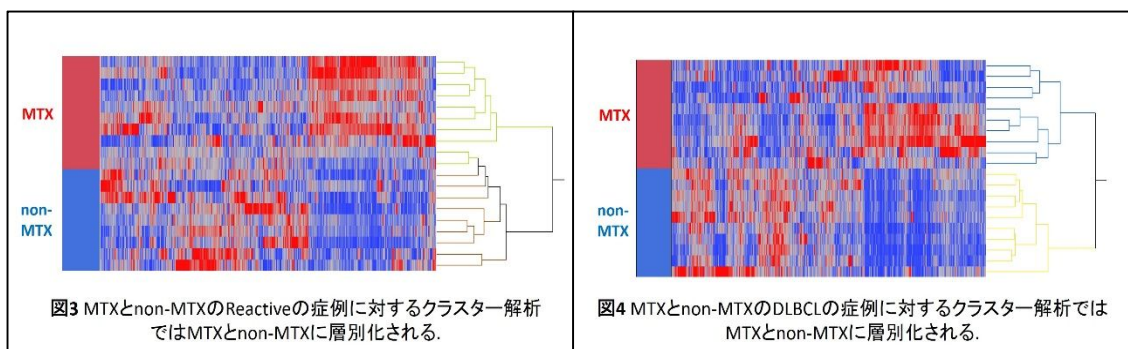
(1)MTX-LPD に関する研究成果は下記の通りである。

MTX および non-MTX の疾患群での検討対象遺伝子群によるクラスター解析

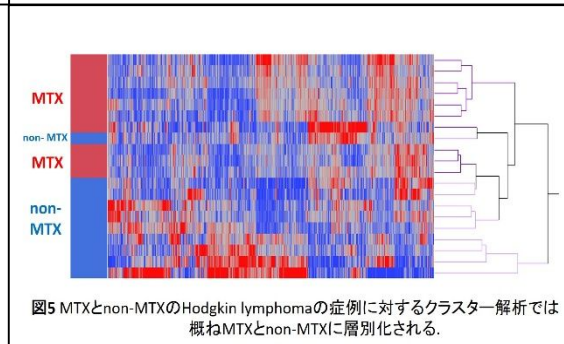


一般的に MTX、non-MTX とともに Reactive lymphadenitis、polymorphous LPD、DLBCL、Hodgkin lymphoma の病理組織形態は異なっている。したがって、mRNA の発現レベルでもある程度層別化できることが予想され、non-MTX の症例では mRNA の発現レベルにおけるクラスター解析でも層別化が再現されている(図 1)。しかしながら、MTX の症例でのクラスター解析では、層別化することができておらず(図 2)、MTX の症例においては、がんおよびがん免疫関連の遺伝子発現が亜型によって差異が乏しい事を示している。これは MTX 症例での特異性を示すものと考えられる。

組織型(Reactive lymphadenitis、DLBCL、Hodgkin lymphoma)でのクラスター解析



Reactive lymphadenitis、DLBCL、Hodgkin lymphoma の形態像を示す症例群で、遺伝子発現によるクラスター解析を行ったところ、Reactive lymphadenitis (図 3)、DLBCL(図 4) においては明瞭に、Hodgkin lymphoma(図 5)では概ね MTX と non-MTX に層別化された。これは、病理組織像では同一の形態として分類される疾患においても MTX、non-MTX でがんおよびがん免疫に関する遺伝子発現が明らかに異なる事を示しており、MTX の疾患の病態の特異性を示しているものと考えられる。

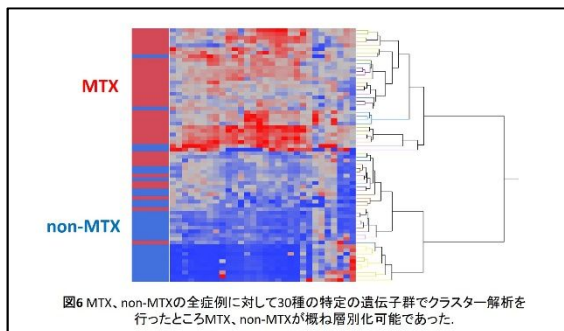


各組織型での MTX と non-MTX の比較で差異がみられる遺伝子の抽出

クラスター解析によって同一の形態を示す疾患の中でも MTX と non-MTX で異なる遺伝子発現パターンが同定された。具体的にどういった遺伝子の発現が異なるかを調べるために fold change (cut off:2 倍)、p 値 (cut off:0.001) で volcano plot を作成した。Reactive lymphadenitis および DLBCL の症例の検討においてある特定の遺伝子群が non-MTX と比較して MTX において高値であった。一方で、Hodgkin lymphoma の症例での volcano plot では MTX の症例に特徴的な遺伝子群は同定されなかった。

MTX および non-MTX の疾患群での特定の遺伝子群によるクラスター解析

特定の遺伝子群が MTX の症例を特徴づける可能性が示唆されたため、MTX、non-MTX の全症例に対して当該遺伝子群に含まれる 30 種の遺伝子でクラスター解析を行った(図 6)。その結果、MTX、non-MTX の症例が概ね層別化可能であった。これは、形態的に異なる疾患群でも特定の遺伝子群により MTX、non-MTX を層別化できる可能性を示唆しており、MTX の症例の病態解明において極めて重要な結果であると考えられる。



同定された遺伝子群に関連するタンパクの MTX 症例での発現の確認
発現解析において同定された特定の遺伝子群の意義に関して妥当性を確認するために MTX の

症例に対して当該遺伝子群に関連するタンパクの免疫染色を行った。すると、MTX の症例にタンパク陽性の細胞が確認され、MTX と特定の遺伝子群の関連に関する妥当性が確認された (図 7)。

今回の研究により、EBV が病態に関連しているとされている MTX-LPD において特定の遺伝子群が病態に深くかかわっていることが示された。本結果をもとに、今後さらなる病態の解明が進むことが期待される。なお、本研究は EBV 関連遺伝子の発現解析も試みたが、実験中に解析困難な状況となり、有効な結果は得られていない。

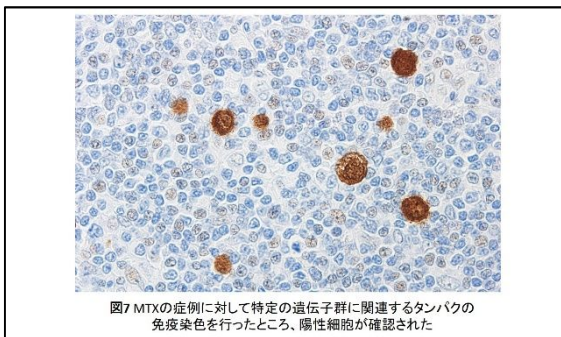


図7 MTXの症例に対して特定の遺伝子群に関連するタンパクの免疫染色を行ったところ、陽性細胞が確認された

(2) EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患、EBV 陽性末梢性 T 細胞リンパ腫、非特異型、節外性 NK/T 細胞リンパ腫の症例に対して行った発現解析では、これらの 3 群に関連して差異のある EBV 関連遺伝子は同定されなかった。一方で、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患において、他の 2 群と比較して特定の免疫細胞に関連する遺伝子群が高値を示した。免疫染色を用いて発現解析の結果の妥当性を確認したところ、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患において特定の免疫細胞の蛋白をもつ細胞が多数確認され、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患と当該免疫細胞の関連に関する妥当性が確認された。

今回の研究により、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患、EBV 陽性末梢性 T 細胞リンパ腫、非特異型、節外性 NK/T 細胞リンパ腫の間で EBV 関連遺伝子に差異が無かったことによって、この 3 者は EBV 自体の違いではなく、周囲環境の違いが病態の差異の原因となっていることが示唆された。本結果をもとに、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の病態解明が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Daisuke Kurita, Hiroaki Miyoshi, Ayako Ichikawa, Koji Kato, Yoshitaka Imaizumi, Ritsuko Seki, Kensaku Sato, Yuya Sasaki, Keisuke Kawamoto, Joji Shimono, Kyohei Yamada, Reiji Muto, Masahiro Kizaki, Koji Nagafuji, Jun-Ichi Tamaru, Michihide Tokuhira, Koichi Ohshima	4. 巻 43
2. 論文標題 Methotrexate-Associated Lymphoproliferative Disorders in Patients with Rheumatoid Arthritis: Clinicopathological Features and Prognostic Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Surg Pathol	6. 最初と最後の頁 869-884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001271.	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 Mai Takeuchi, Hiroaki Miyoshi, Kazutaka Nakashima, Keisuke Kawamoto, Kyohei Yamada, Eriko Yanagida, Hiroko Muta, Mayuko Moritsubo, Takeshi Umeno, Takaharu Suzuki, Masao Seto, Koichi Ohshima	4. 巻 99
2. 論文標題 Comprehensive immunohistochemical analysis of immune checkpoint molecules in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Hematol	6. 最初と最後の頁 1093-1098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-03967-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 Ryo Kazama, Hiroaki Miyoshi, Mai Takeuchi, Kohta Miyawaki, Kazutaka Nakashima, Noriaki Yoshida, Keisuke Kawamoto, Eriko Yanagida, Kyohei Yamada, Takeshi Umeno, Takaharu Suzuki, Koji Kato, Jun Takizawa, Masao Seto, Koichi Akashi, Koichi Ohshima	4. 巻 111
2. 論文標題 Combination of CD47 and SIRP constituting the "don't eat me signal" is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2608-2619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14437	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 Eriko Yanagida, Hiroaki Miyoshi, Mai Takeuchi, Noriaki Yoshida, Kazutaka Nakashima, Kyohei Yamada, Takeshi Umeno, Yasumasa Shimasaki, Takuya Furuta, Masao Seto, Koichi Ohshima	4. 巻 38
2. 論文標題 Clinicopathological analysis of immunohistochemical expression of CD47 and SIRP in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hematol Oncol	6. 最初と最後の頁 680-688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2768	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 Takeuchi M, Miyoshi H, Ohshima K.	4. 巻 61
2. 論文標題 Tumor microenvironment of adult T-cell leukemia/lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop	6. 最初と最後の頁 202-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2972	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0件

〔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
---------	---------