

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2019～2020
課題番号：19K22560
研究課題名(和文) ウイルスmiRNAが腫瘍原性に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Role of viral miRNA on tumorigenesis

研究代表者

木村 宏 (Kimura, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30303621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、我々はEBV関連リンパ腫患者では、高率にEBV遺伝子の一部が欠失することを発見した。最も高頻度に欠失していたウイルスmiRNAを含む領域を欠く組換えEBVの作成を試みたが、作成したウイルスはいずれも感染性を欠いたため、感染実験に至らなかった。次いで2番目に欠失が集中していたBALF5(viral DNA polymerase)を欠失させた変異EBVを作成し、感染により樹立したヒトB細胞株を免疫不全マウスに移植したところ、BALF5欠失EBVでは野生株に比してリンパ腫形成能が増していた。また、BALF5欠失B細胞株は野生株に比べ前初期/初期遺伝子が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

期間内にmiRNA欠失の果たす役割の解明は果たせなかったが、欠損ウイルスでは、EBV前初期遺伝子/初期遺伝子の発現亢進により、宿主細胞増殖と染色体不安定性が促進され、ドライバー遺伝子変異の蓄積、エピジェネティック修飾が加わり、リンパ腫/白血病と変容すると考えている。欠損ウイルスの腫瘍化機構が明らかになれば、EBV関連リンパ腫のみならず上咽頭がん・胃がんなどEBV関連上皮系腫瘍に共通する分子機構、さらには他の腫瘍ウイルスの発がんメカニズムが解明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have found that there is a high rate of deletion of part of the EBV gene in patients with EBV-related lymphoma. Attempts were made to generate recombinant EBVs lacking the region containing the most frequently deleted viral miRNAs, but none of the produced viruses were infectious and did not lead to infection experiments. Next, a mutant EBV lacking BALF5(viral DNA polymerase), which was the second most concentrated deletion, was created, and the established human B cell line was transplanted into immunodeficient mice. Lymphoma forming ability with BALF5-deleted EBV was increased in comparison with the wild-type strain. In addition, the BALF5-deficient B cell line had enhanced immediate-early / early genes as compared with the wild-type strain.

研究分野：ウイルス学

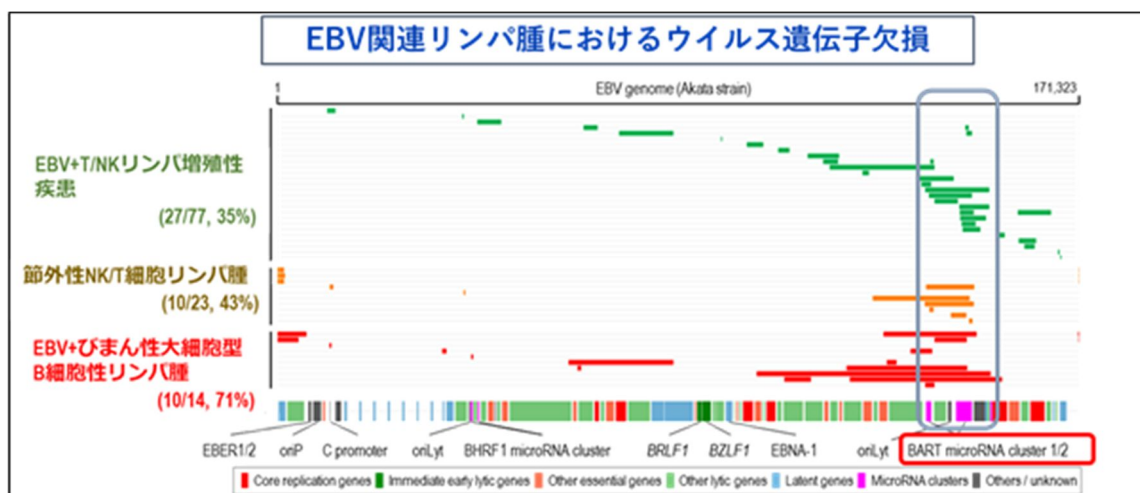
キーワード：EBウイルス miRNA

1. 研究開始当初の背景

わが国の死亡原因の第一は悪性新生物すなわち「がん」であり、発がんのメカニズムを解明し、がんを克服することが喫緊の課題である。全がんのうち、感染症関連のものが約 20%を占めるとされ、そのうち 3/5 にあたる 12%程度がウイルス関連であるとの報告もある。

これまで EBV をはじめ B 型・C 型肝炎ウイルス (肝がん)、ヒトパピローマウイルス (子宮頸がん)、ヒト成人白血病ウイルス 1 型など 7 種類のがんウイルスが知られているが、いずれも宿主であるヒトに 100%がんを発生させることはない。ある遺伝的背景を持った個体がウイルス感染した後に、環境因子・加齢が加わり、感染細胞に遺伝子変異が蓄積することでがんが発生すると考えられている。しかし、ウイルス発がんの詳細なメカニズム、特にウイルス側の因子については未だ不明の点が多かった。

近年、子宮頸がん、成人 T 細胞白血病では、腫瘍組織にて高率に欠損ウイルスが存在することが報告され、腫瘍化との関わりが注目を集めている。一方、我々は EBV 関連リンパ腫においてウイルス miRNA をコードする領域に欠失が認められることを世界で初めて見出した (文献 1)。



この領域には、ウイルスがコードする複数の miRNA が存在する。miRNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、真核生物において他の遺伝子の転写後発現調節に関与している。EBV は約 40 の miRNA をコードし、宿主および自身の遺伝子を制御し、ウイルス増殖に有利な環境を作っていると考えられてきた。しかし、ウイルス miRNA の腫瘍原性における詳細な役割は不明であった。一方、EBV 陽性リンパ腫の多くでは、この領域を欠損していることから、ウイルス miRNA は腫瘍化には抑制的に働いていると推測した。

2. 研究の目的

研究対象である EBV 関連リンパ腫は、東アジアやアフリカで頻度の高い疾患であり、欧米での研究は進んでいない。早急に本研究を推進することにより、世界に先んじて、普遍的なウイルスがなぜ特定の地域において、一部の個体にのみ「がん」を引き起こすのかを解明できる。本研究により、東アジアに特異的なウイルス株、あるいは個体・集団の中で産生・選択された変異株が、遺伝的背景を同じくする集団・民族に高率にがんを発生させる根源的な謎を解き明かすことができる。本研究で得られた知見により、EBV 関連リンパ腫のみならず上咽頭がん・胃がんなど EBV 関連上皮系腫瘍に共通する分子機構、さらには他の腫瘍ウイルスの発がんメカニズムが解明できる可能性がある。ウイルスがん特異的な遺伝子パスウェイ/ネットワークが解明されれば、ウイルス分野に留まらず、細胞・腫瘍生物学分野にも渡る新たな研究分野の創成につながる。さらには、miRNA による宿主免疫抑制機構が解明されれば、新規がん免疫治療開発に発展しうるため、革新的な創薬・新たな産業の育成が期待できる。

3. 研究の方法

EBV miRNA のリンパ腫原性における役割を明らかにするために、以下の手順でウイルス miRNA をはじめ種々の遺伝子を欠損した組換え EBV を作成し、各遺伝子の役割の解明を試みた。

(1) 組換えウイルスの作成

Bacterial artificial chromosome (BAC) を用い、該当する遺伝子/エレメントを欠失した組

換えウイルスを作成した。BAC システムにより作製した組換えウイルスは、上皮系細胞での解析は比較的容易である一方、B 細胞には感染しにくいという欠点があった。我々は、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用い、B 細胞株に潜伏感染している EBV を変異させるシステムを新たに構築した。本研究では、上皮系/B 細胞の両方に対応すべく、BAC および CRISPR/Cas9 システムの双方を用いて、組換えウイルスを作成した。

(2) 細胞を用いた in vitro 機能解析

得られた変異 EBV を種々の細胞株およびヒト初代 B 細胞に感染させ、その感染率・不死化能・潜伏感染率などを野生株と比較した。次いで、RNA シーケンシングにより宿主及びウイルス遺伝子発現解析を行った。野生型との比較により、変異 EBV 感染細胞でその発現が増強・減弱した遺伝子を探索した。

(3) 免疫不全マウスを用いた in vivo 機能解析

EBV 重度はヒトにしか感受性がないため、通常の動物を用いた感染実験はできない。本研究では、免疫不全マウスである NOD/Shi-scid, IL-2R KO (NOG) マウスに、EBV 感染したヒト B 細胞株を移入する異種移植モデルを用いた。変異ウイルス株感染細胞と野生株由来の EBV 感染細胞をマウスに移入後、リンパ腫細胞の動態・臓器浸潤、転移について変異ウイルスと野生型を比較することで当該遺伝子の役割を解明した。

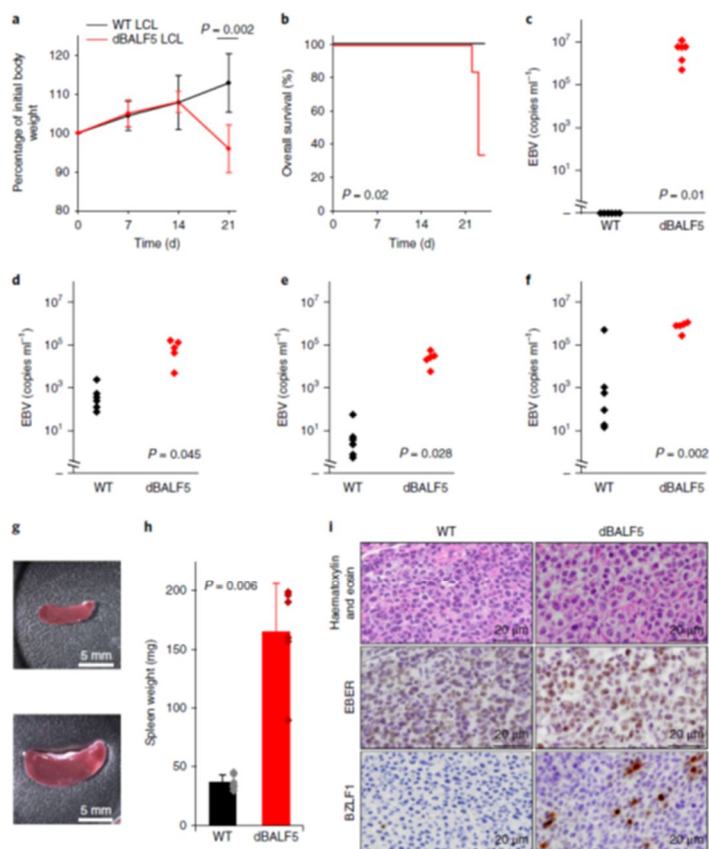
4. 研究成果

(1) miRNA 欠質の役割

EBV 欠失は BART microRNA cluster と呼ばれる領域に集中していたため、この領域を欠く変異ウイルスの作成を試みた。作成したウイルスはいずれも感染性を欠いたため、次のステップであるヒト初代 B 細胞やヒト化マウスへの感染実験に至らなかった。なお、最も高頻度に欠失していた ebv-mir-BART6-5p と ebv-mir-BART6-3p は、前初期遺伝子である BZLF1 および BRLF1 を負に制御しており、この領域を欠損させた変異 EBV は、異種移植モデルにおいて BZLF1 誘導を介してリンパ腫形成能を高めることが示されている

(2) BALF5 欠質の役割

BART microRNA cluster 以外で欠損していたのは、ウイルス複製に必須とされる core replication genes を含む溶解感染関連遺伝子の一群であった。そこで core replication genes の一つである BALF5 (viral DNA polymerase) を欠失させた変異 EBV を作成し、ヒト B 細胞に感染させることにより、初代 B 細胞株を樹立した。次いで、免疫不全マウスに移植したところ、BALF5 欠失 EBV では野生株に比してリンパ腫形成能が増していた (下図)。



また、BALF5 欠失 B 細胞株は野生株に比べ前初期/初期遺伝子が亢進していた。以上より、core replication genes である BALF5 の欠失は、前初期遺伝子発現を契機とする溶解感染関連遺伝子群の発現を誘導し、リンパ腫形成能に寄与していることが示唆された。先行研究により、BNRF1、BGLF5、BALF3 など複数の溶解感染遺伝子が宿主ゲノム不安定性に関与していることがわかっているが、そのほかにも BHRF1 (viral BCL-2), BCRF1 (viral interleukin-10) は細胞増殖を促すとされる。BALF5 などの core replication genes を欠いた EBV はウイルス粒子を産生できず、溶解感染を完結できないが、一方で abortive な溶解感染を誘導し、ウイルス溶解感染遺伝子発現により腫瘍化を促進していると考えている。

欠損ウイルスと腫瘍との関連については、これまでも他の腫瘍ウイルスでは多くの報告がなされてきた。しかし、EBV のように 70 以上の遺伝子を有する大型ウイルスでの遺伝子欠失の成り立ちと意義については、未だ不明な点が多かった。今回我々は、ウイルス miRNA をはじめいくつかの EBV 遺伝子を欠失したウイルスがむしろリンパ腫発生しやすいことを示した。一方で、欠失 EBV からは感染性を有するウイルス粒子を複製できない。おそらくは個体の中で偶然に欠失 EBV が生じ、リンパ球もしくは前駆細胞に感染すると考えられるが、いまだその実証はない。そして、EBV 前初期遺伝子群をはじめとする溶解感染遺伝子発現亢進により、宿主細胞増殖と染色体不安定性が促進され、ドライバー遺伝子変異の蓄積、エピジェネティック修飾が加わり、リンパ腫/白血病と変容するのであろう。他方、欠失 EBV がどの時点で生じるのか、生体内のどこでどのような細胞に感染しているのか、この現象は EBV 関連リンパ腫のみならず上皮系腫瘍にも共通することなのかなど、未解明の部分が多い。さらなる研究により EBV によるリンパ腫形成のメカニズム解明が待たれる。

引用文献

- 1) Okuno Y, Murata Y, Sato Y, et al. Defective Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-related hematological malignancy. *Nat Microbiol.* 2019 Mar;4(3):404-413.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mabuchi Seiyo, Hijioka Fumiya, Watanabe Takahiro, Yanagi Yusuke, Okuno Yusuke, Masud H. M. Abdullah Al, Sato Yoshitaka, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Epstein-Barr Virus C Promoter Deletion in Diffuse Large B Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 561 ~ 561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13030561	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 該当する

1. 著者名 Yanagi Yusuke, Okuno Yusuke, Narita Yohei, Masud H.M. Abdullah Al, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Kanda Teru, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki	4. 巻 557
2. 論文標題 RNAseq analysis identifies involvement of EBNA2 in PD-L1 induction during Epstein-Barr virus infection of primary B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2021.02.004	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Chronic Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease
3. 学会等名 12th T-cell Lymphoma Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------