

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16261

研究課題名（和文）慢性活動性EBウイルス感染症における分泌型ウイルス由来マイクロRNAの機能解析

研究課題名（英文）Analysis of the secreted viral miRNA in Chronic active EBV infection

研究代表者

吉森 真由美（Yoshimori, Mayumi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：20816053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性活動性EBウイルス感染症（CAEBV）は進行性、治療抵抗性のEBV陽性T、NK細胞腫瘍である。EBV特異的マイクロRNAであるmiR-BARTsは、エクソソームに内包されて周囲の細胞に伝播し、腫瘍進展への寄与が示唆される。本課題では、CAEBVの発症、病態形成における、分泌型miR-BARTsの発現プロファイルおよびその機能を解析した。CAEBV細胞株および患者血漿を用いた発現プロファイル解析および機能解析実験により、CAEBVのEBV陽性T、NK細胞から分泌されたmiR-BARTsを内包するエクソソームは、本疾患の炎症およびその暴走であるHLH発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はCAEBVにおいてEBV由来マイクロRNAの発現とエクソソームの機能に注目した初の研究である。CAEBVの発症患者は平成21年厚労省研究班報告書では年間23.4人と希少疾患とされているが、2015年に診断基準が作成や2017年のWHO分類への記載により国内外で報告数が増えており、潜在的な患者は相当数存在すると推測される。さらに、CAEBV以外にもB細胞腫瘍、上咽頭癌、胃癌など、EBV陽性腫瘍は数多く存在する。これらはすべて難治性であり、本研究の成果は新たな治療法開発に広く応用され得る。

研究成果の概要（英文）：Chronic active EBV infection (CAEBV) is a progressive, treatment-resistant EBV-positive T- or NK-cell lymphoma. miR-BARTs, EBV-specific microRNAs, are incorporated into exosomes and translocate to surrounding cells, suggesting their contribution to tumor progression. In this project, we analyzed the expression profiles of secreted miR-BARTs and their functions in CAEBV pathogenesis and pathophysiology. We used CAEBV cell lines and patient plasma for expression profiling and functional analysis experiments. The exosomes incorporated miR-BARTs may contribute to the inflammation and HLH development.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：慢性活動性EBウイルス感染症 マイクロRNA miR-BARTs エクソソーム 単球 マクロファージ 次世代シーケンサー in situハイブリダイゼーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) は進行性、治療抵抗性の EBV 陽性 T, NK 細胞腫瘍である。発熱などの慢性炎症症状に加え、EBV が感染した T もしくは NK 細胞が腫瘍性に増殖し、末梢血および組織に浸潤する。本疾患の問題点は、なぜ一部のヒトで EBV が T もしくは NK 細胞に感染し、さらに CAEBV 発症に至るのか未解明であること、化学療法抵抗性を示し、至適薬物治療法は未確立であることである。

EBV 特異的マイクロ RNA である miR-BARTs は、EBV 陽性 B 細胞腫瘍においてエクソソームに内包されて周囲の細胞に伝播し、腫瘍発症に寄与することが報告された。そこで miR-BARTs は CAEBV においても EBV 感染細胞自身の腫瘍化のみならず、細胞外へ放出され、周囲の細胞に取り込まれその機能が制御された結果、腫瘍発症に有利な環境が形成されるのではとないか?との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では CAEBV およびその類縁疾患の細胞株に加え、CAEBV 患者試料を用いて、分泌型 miR-BARTs の発現プロファイルと臨床像との比較、病変組織の傍腫瘍細胞における miR-BARTs の発現、傍腫瘍細胞に対する分泌型 miR-BARTs の働き、を解析した。そして、新たな治療法開発への応用を試みた。

3. 研究の方法

分泌型 miR-BARTs の発現プロファイルと臨床像との比較

CAEBV およびその類縁疾患の細胞株培養上清に加え、CAEBV 患者血漿を用いて解析する。これらの試料から直接、あるいは超遠心法で分離したエクソソームから、全 RNA を抽出する。これら試料を次世代シーケンサー (HiSeq2500) で解析し、発現する EBV 由来の miR-BARTs および宿主由来マイクロ RNA 発現プロファイルを解析した。

さらに、分泌型 miR-BARTs の発現状態と予後との相関を解析する。

病変組織の傍腫瘍細胞における miR-BARTs の発現

保存された CAEBV 患者の病変脾臓組織を、免疫染色法に加え、miRNA scope を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにて解析し、傍腫瘍細胞における miR-BARTs の発現と発現細胞のフェノタイプを検討した。組織における傍腫瘍細胞として、エクソソームの取り込みが報告されているヒトマクロファージを検討した。

傍腫瘍細胞に対する分泌型 miR-BARTs の働き

分泌型 miR-BARTs による傍腫瘍細胞のサイトカイン発現、マクロファージ抗原の変化を解析する。ヒト単球は健常人の末梢血から抗体付き磁気ビーズを用いて分離した。サイトカイン発現は Taqman 法を用いた qRT-PCR を施行した。マクロファージ抗原はフローサイトメトリーにより解析した。健常者ヒト単球に分泌型 miR-BARTs が含まれるエクソソームおよび細胞株の培養上清を添加し、共培養して、傍腫瘍細胞の機能変化を解析した。また、エクソソームの産生を抑制する GW4869 (Sigma-Aldrich) を用いて、阻害試験を行った。

新たな治療法開発への応用

miR-BARTs を網羅的に抑制する核酸医薬 (ASO) を細胞株に導入し、エクソソームを抽出して miR-BARTs 発現量を Taqman 法を用いた qRT-PCR で測定した。

4. 研究成果

分泌型 miR-BARTs の発現プロファイル解析

まず、分泌型 miR-BARTs の発現プロファイルを解析するために、miRNA-sequencing を施行した。CAEBV およびその類縁疾患の細胞株 (SNT15, SNT16, SNK1, SNK10) から得られたエクソソームにおける分泌型 miR-BARTs の発現プロファイルを図 1 に示す。発現量は TMM normalized CPM で示されている。全 40 種類の miR-BARTs が検出され、miR-BART7-3p が突出して高発現を示していた。続いて、CAEBV 患者 8 名の血漿における分泌型 miR-BARTs の発現プロファイルを図 2 に示す。広範囲な miR-BARTs が検出され、エクソソームと同様に miR-BART7-3p が突出して高発現を示していた。

そこで、miR-BART7-3p 発現量と予後との相関を解析した (図 3)。解析時に未治療の症例 7 例を用いて、miR-BART7-3p 高発現群 2 例と低発現群 5 例で解析を施行した。miR-BART7-3p 高発現では CAEBV の予後は非常に不良である可能性が示唆された。少数例のため、さらに検体数を増やした解析が必要である。

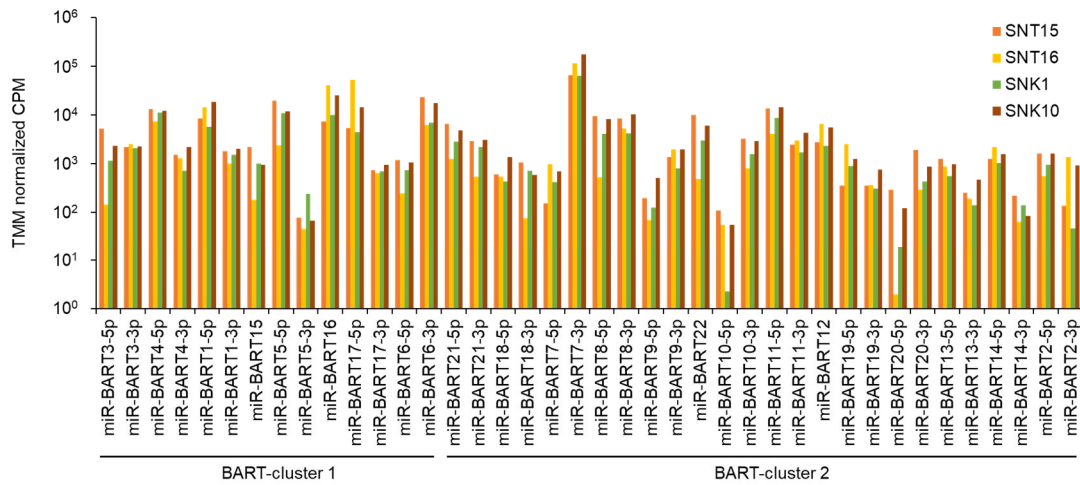


図 1. CAEBV 由来細胞株培養上清から分離したエクソソームにおける分泌型 miR-BARTs 発現

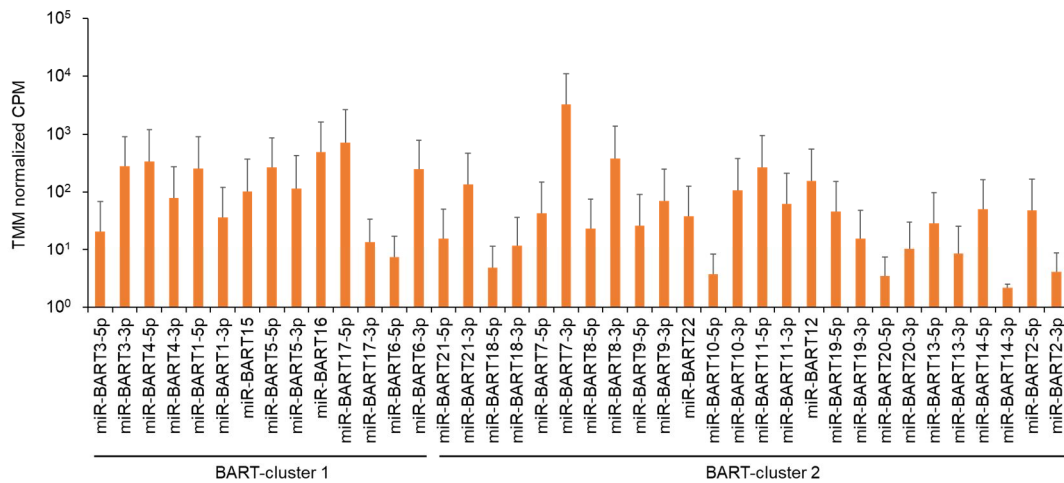


図 2. CAEBV 患者血漿における分泌型 miR-BARTs 発現

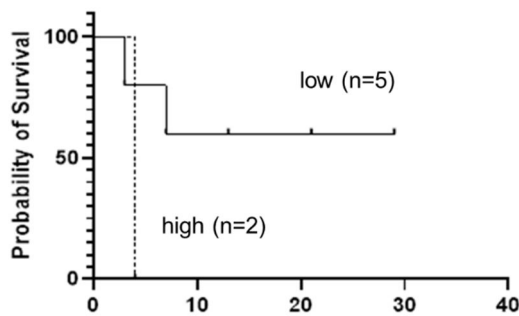


図 3. 分泌型 miR-BART7-3p 発現量における Overall survival (Log-rank test)

病変組織の傍腫瘍細胞における miR-BARTs の発現

EBV 感染細胞浸潤の認められた患者脾臓組織を用いて miR-BART7-3p とマクロファージ抗原である CD163 および CD68 の共染色を施行した (図 4)。非コード RNA の陽性像は赤色、CD163 および CD68 は黒色に染色されている。ポジティブコントロールとして RNU6、ネガティブコントロールとして scramble のプローブを用いた。miR-BART7-3p と、CD163 または CD68 共染色像 (赤矢印) が得られたことから、EBV 感染細胞から分泌された miR-BART7-3p が傍腫瘍細胞であるマクロファージに取り込まれていることが示唆された。

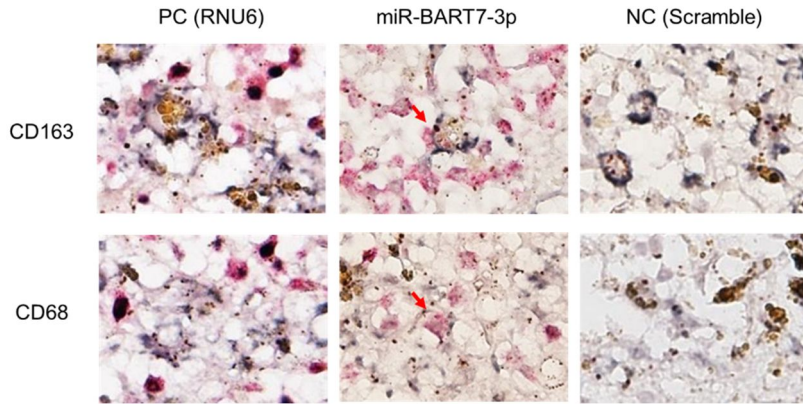


図 4. CAEBV 患者脾臓組織における miR-BART7-3p とマクロファージ抗原の共染色像

傍腫瘍細胞に対する分泌型 miR-BARTs の働き

分泌型 miR-BART を取り込んだヒトマクロファージまたは単球の機能変化を検討した。まず、CAEBV 由来細胞株の培養上清とヒト単球を共培養した。NK 細胞感染型の細胞株培養上清を添加した場合、マクロファージ様細胞への形態変化、炎症性マクロファージ抗原 (CD80) の発現、炎症性サイトカイン発現が亢進した (Cancers (Basel). 2021;13(20). 5097.)。続いて、CAEBV 由来細胞株 (SNT15, SNT16, SNK10) の培養上清から分離したエクソソーム 6, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をヒト単球に添加し、培養した。コントロール (PBS 添加) と比較して各エクソソーム添加により、形態変化 (図 5A)、CD80 発現 (図 5B)、炎症性サイトカイン発現 (IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α : 図 5C) が亢進した。エクソソームによる作用であることを証明するために、エクソソームの産生を抑制する GW4869 を用いた阻害実験を行ったところ、CD80 発現が有意に低下した (図 5D)。以上より、CAEBV の EBV 陽性 T, NK 細胞から分泌された miR-BARTs を内包するエクソソームは、本疾患の炎症およびその暴走である HLH 発症に寄与している可能性が示唆された。第 25 回欧州血液学会、第 64 回米国血液学会で発表し、論文は Cancers (2021;13(20)) に掲載された。

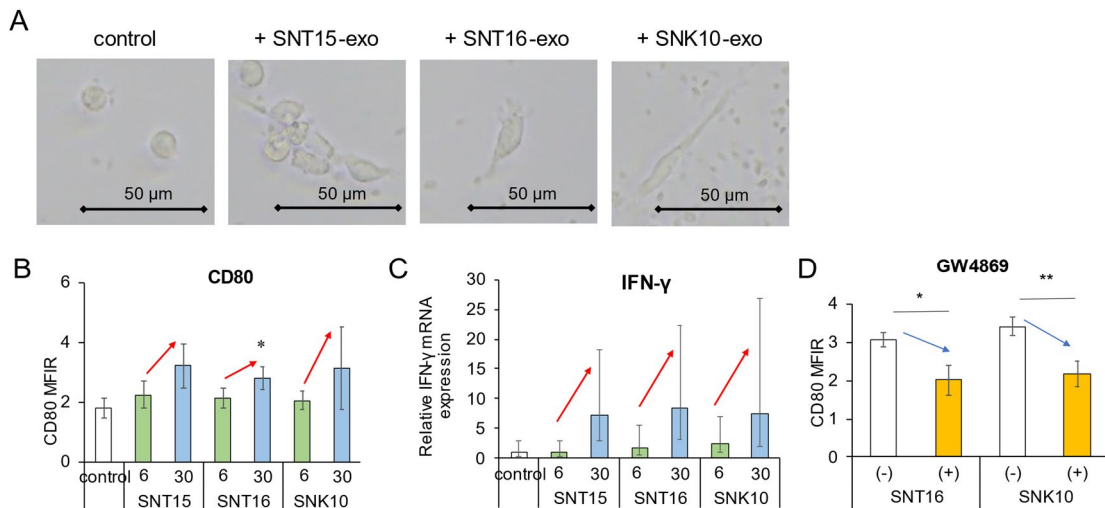


図 5. CAEBV 細胞株由来エクソソームによるヒト単球の機能解析

新たな治療法開発への応用

申請者の研究グループでは、miR-BARTs を網羅的に抑制する ASO を開発し「EBV 関連疾患を標的とする核酸医薬」として、特許出願および PCT 出願を行った。本開発物を SNT16 細胞に導入してエクソソーム中の分泌型 miR-BARTs 発現量への効果を検討したところ、コントロールと比較して発現量の低下が認められた。miR-BARTs を制御する ASO は EBV 感染細胞のみならず、非感染細胞も制御することで病態の改善に寄与することが期待される。

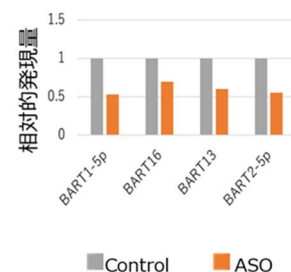


図 6. エクソソーム内 miR-BARTs 発現

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 4件）

1. 著者名 Yoshimori Mayumi, Nishio Miwako, Ohashi Ayaka, Tateishi Megumi, Mimura Ayaka, Wada Naomi, Saito Minoru, Shimizu Norio, Imadome Ken-Ichi, Arai Ayako	4. 巻 13
2. 論文標題 Interferon- Produced by EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induces Differentiation into Macrophages and Procoagulant Activity of Monocytes, Which Leads to HLH	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5097 ~ 5097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13205097	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 Yoshimori Mayumi, Shibayama Haruna, Imadome Ken-Ichi, Kawano Fuyuko, Ohashi Ayaka, Nishio Miwako, Shimizu Norio, Kurata Morito, Fujiwara Shigeyoshi, Arai Ayako	4. 巻 5
2. 論文標題 Antineoplastic and anti-inflammatory effects of bortezomib on systemic chronic active EBV infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1805 ~ 1815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020002417	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Kotaro Yoshioka, Takanori Yokota, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 Expression profile of EBV-derived micro-RNA in systemic chronic active EBV disease.
3. 学会等名 64th ASH ANNUAL MEETING & EXPOSITION. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Ayaka Mimura, Ken-Ichi Imadome, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 IFN- , which is Produced by EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induces Macrophage Differentiation and Upregulates Blood Coagulation of which Both Causing HLH.
3. 学会等名 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Ken-Ichi Imadome, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 Products of EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induce Differentiation into Macrophages and Procoagulant Activity of Monocytes, which Leads to HLH
3. 学会等名 25th Annual Congress of EHA (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 EBV関連疾患を標的とする核酸医薬	発明者 新井 文子、横田 隆 徳、吉岡 耕太郎、吉 森 真由美、清水 則	権利者 国立大学法人東 京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/48097	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 EBV関連疾患を標的とする核酸医薬	発明者 新井 文子、横田 隆 徳、吉岡 耕太郎、吉 森 真由美、清水 則	権利者 国立大学法人東 京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-211802	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------