様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 28 年　 6 月 11 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：25293109

研究課題名（和文）EBV関連Tリンパ腫発生に関与する宿主遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification of host genes that are associated with EBV-positive T-cell lymphoma and its functional analysis

研究代表者
木村　宏（Kimura, Hiroshi）

名古屋大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30303621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：種痘様水疱症関連リンパ腫は、新たに定義づけられたEBV陽性のT細胞性腫瘍である。本疾患患者5例に対してアレイCGH解析を行い、共通する遺伝子欠損・増幅領域をそれぞれ1種類、見出した。次に、MLPA解析により、遺伝子の欠損・増幅の確認を行ったところ、いずれも欠損・増幅は認められなかった。更に、RT-PCR法により該当遺伝子の発現を調べたが、発現の減弱・亢進も認められなかった。以上より、アレイCGHで抽出された2つの遺伝子異常は、種痘様水疱症関連リンパ腫とは関連がないと考えられた。

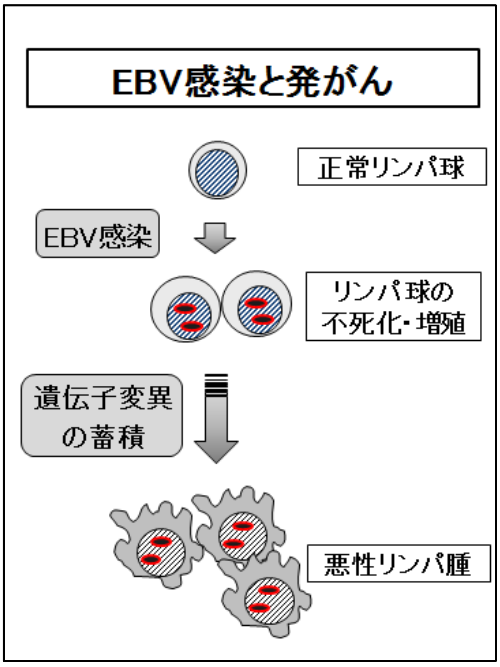
研究成果の概要（英文）：Hydroa vacciniforme-like lymphoma is a newly defined EBV-positive T-cell lymphoma. We performed microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH) on 5 patients with hydroa vacciniforme-like lymphoma, and found a potentially deleted gene and an amplified gene, respectively. Next, we tried multiplex ligation probe amplification to confirm the gene modifications, but could not find deletion nor amplification. Furthermore, reverse-transcriptase polymerase chain reaction was done to clarify the expression of the corresponding genes, but neither decrease or increase of them was recognized. These results indicate that potentially disease-associated genes, which had been selected by array CGH, were not associated with hydroa vacciniforme-like lymphoma.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス発がん　EBウイルス　遺伝子解析

１．研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) は Burkitt リンパ腫・免疫不全関連リンパ腫などの B 細胞性腫瘍の原因となるが、時に T 細胞や NK 細胞にも感染し、種痘様水疱症関連リンパ腫、節外性 NK/T リンパ腫、劇症型 NK 細胞性白血病などの T/NK 細胞性腫瘍を来す。腫瘍ウイルスである EBV は、感染リンパ球を in vitro で不死化し増殖させるが、in vivo での腫瘍化には遺伝子変異の蓄積、すなわちがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の欠損が必要と考えられている（下図)。B 細胞腫瘍である Burkitt リンパ腫では、がん遺伝子である c-myc が転座により活性化していることは古くから知られている。



最近、我々は EBV 関連 NK 細胞性腫瘍である節外性 NK/T リンパ腫の 36%にがん抑制遺伝子である FOXO3 が欠損していること、この FOXO3 欠損が NK 細胞特異的な腫瘍化形成に関与していることを見出した(Karube K, Blood 2011, Karube K, Exp Hematol 2012)。一方、EBV 関連 T 細胞リンパ腫の腫瘍形成に関わる宿主遺伝子は、未だ同定されていない。その理由として、EBV 関連細胞性腫瘍は、欧米では比較的稀で研究されてこなかったこと、それゆえに疾患概念の確立が遅れていたことなどが挙げられる。

種痘様水疱症関連リンパ腫は、2008 年に改訂された WHO のリンパ腫分類にて、新たに定義づけられた EBV 陽性の T 細胞性腫瘍である(Quintanilla-Martinez L, Kimura H, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008)。本症は日光過敏性の水疱疹を特徴とし、我が国の小児・若年成人に好発するする難治性疾患である。近年、我々は本症が EBV 陽性γδT 細胞の単クローン性増殖によること、本症患者末梢血中に EBV 陽性細胞が高頻度に出現することを明らかにした（Kimura H, J Infect 2009, Kimura H, Blood 2012)。臨床的に極めて特徴的で均質である本疾患に共通する遺伝子異常は、腫瘍形成に関与している可能性がある。加えて、最近我々は、本疾患を含む EBV 陽性 T 細胞性リンパ腫では、体細胞遺伝子の変異を誘導する酵素である Activation induced cytidine deaminase (AID)が高発現していることを見出した（Nakamura M, Eur J Dermatol 2011)。

EBV 関連 T 細胞リンパ腫、ことに種痘様水疱症関連リンパ腫は、東アジアで頻度の高い疾患であり、我が国で最も研究が進んでいる。よって、我々の研究により、欧米に先んじて、EBV 関連 T 細胞リンパ腫発生に関与する宿主遺伝子を同定できる可能性がある。宿主遺伝子を同定できれば、該当遺伝子の機能解析により、下流シグナル伝達経路をはじめとしたT細胞性リンパ腫の腫瘍形成に関する分子基盤の解明につながる。さらに、本研究にて見出された分子基盤は EBV 関連リンパ腫のみならず、HTLV-1 による成人 T 細胞性白血病や非ウイルス性のT細胞性腫瘍に共通の機構である可能性も考えられる。

２．研究の目的

以上の背景を基に、種痘様水疱症関連リンパ腫患者の末梢血中の腫瘍細胞に生じている遺伝子異常を明らかにし、EBV 関連 T 細胞性リンパ腫発生に関わる遺伝子を探索したいと考えた。

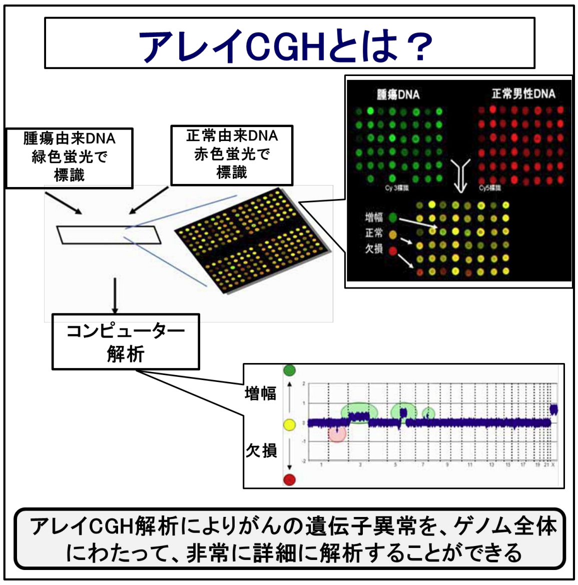
比較ゲノムハイブリダイゼーション（アレイ CGH）法は、ヒト全遺伝子配列を網羅する多数の DNA 断片をアレイ化したスライドグラスを用い、遺伝子の欠損・重複を検出する技術である。我々は、オリゴヌクレオチドを用いたアレイ CGH 法により、腫瘍細胞に生じた微小な遺伝子異常を同定してきた（Umino A, Blood 2011, Karube K, Blood 2011)。同法により、腫瘍細胞中に見出された遺伝子異常は、腫瘍形成に関連している可能性がある。ことに、腫瘍に共通して欠損している遺伝子はがん抑制遺伝子である場合があり、共通して重複・活性化している遺伝子はがん遺伝子かもしれない。今回、我々は、アレイ CGH 法を用い、種痘様水疱症関連リンパ腫関連の宿主遺伝子を探索することとした。

本研究により、(1) EBV 発がんに関連する新規宿主がん遺伝子・がん抑制遺伝子が発見される、(2) EBV 関連 T 細胞リンパ腫の腫瘍形成に関する分子基盤が解明される、(3) 疾患関連シグナル伝達経路が解き明かされ、分子標的を用いた治療開発に発展する、(4) 本疾患の発症病理解明・治療法確立につながる、などの成果が期待された。

３．研究の方法

以下の手順にて、種痘様水疱症関連リンパ腫に共通する遺伝子異常を絞り込んだ。(1) 患者末梢血から腫瘍細胞と正常細胞を分画、

(2) 比較ゲノムハイブリダイゼーション（アレイ CGH）法により、腫瘍細胞で欠損/重複している遺伝子を検出、(3) 患者に共通する遺伝子変異を同定、(4) Multiplex Ligation Probe Amplification（MLPA）・reverse transcriptase polymerase chain reaction（RT-PCR）法にて遺伝子変異および変異遺伝子の発現を確認した。



対象患者は名古屋大学医学部附属病院に入院・通院している種痘様水疱症関連リンパ腫患者とした。実施に際して、本人および保護者に十分な説明を施し、文書により同意を得た。本疾患に対する網羅的遺伝子研究は、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認を受けた。採取した検体はすべて連結可能符号化し、遺伝子解析を含めた実験に用いた。

アレイ CGH 法は以下の手順で行った。

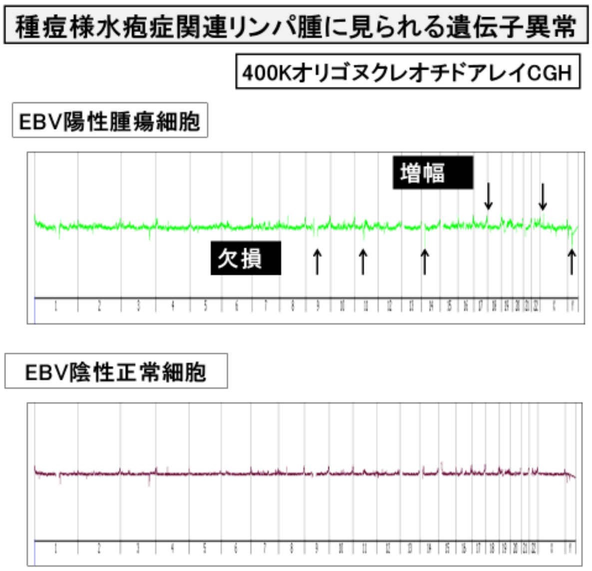
① 患者より末梢血を採取、単核球分離後、EBV 感染細胞を分画した。末梢血中の EBV 感染細胞の検出・分離には、我々が独自に開発した Flowcytometric in situ hybridization (FISH) 法を用いた(Kimura H, J Infect Dis 2009, Iwata S, Int J Cancer 2011)。

② EBV 陽性腫瘍細胞分画・陰性正常細胞分画からそれぞれ DNA を抽出し、腫瘍 DNA を Cy3、正常 DNA を Cy5 で標識後、400,000 個のオリゴヌクレオチドプローブをスポットしたスライドグラス上でハイブリダイゼーションを行う。蛍光をアレイスキャナー（Agilent Micro Array Scanner）で読みとり、専用ソフトウェアにより欠損/増幅している遺伝子領域を検出した。

③ 患者に共通して欠損・重複・転座している遺伝子領域を同定した。

４．研究成果

種痘様水疱症関連リンパ腫患者 5 例に対してアレイ CGH 解析を行い、複数の共通する遺伝子欠損・増幅領域を見出した。解析したすべての患者で欠損していた遺伝子 CCCTC-binding transcription factor（CTCF）は、これまでの文献報告から推定される機能と併せ、がん抑制遺伝子である可能性があった。また、全ての患者で増幅が見られた遺伝子座 17q21.3 にはリンパ球の homing に関連する遺伝子 C-C motif chemokine receptor 10（CCR10）が含まれており、種痘様水疱症関連リンパ腫に見られる特徴的な水疱疹形成・腫瘍の転移に関与している可能性が考えられた。



次いで、症例数を増やし、約 12 例の種痘様水疱症関連リンパ腫患者に対して、MLPA 解析により、遺伝子の欠損・増幅の確認を行ったところ、CTCF および CCR10 のいずれも欠損・増幅は認められなかった。更に、腫瘍細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により該当遺伝子の発現を調べたが、発現の減弱・亢進も認められなかった。

以上より、アレイ CGH で抽出された 2 つの遺伝子異常は偽陽性であり、種痘様水疱症関連リンパ腫とは関連がないと考えられた。アレイ CGH は、網羅的に遺伝子欠損・増幅を抽出できる一方、特異性には欠け、一定の割合で偽陽性が出現することが知られている。また、アレイ CGH 法の欠点として、点突然変異や微小欠損・増幅は検出できないことが挙げられる。

これらのアレイ CGH 法の欠点を補うために、新たに用いられるようになった手技として次世代シーケンサーを用いた全エキソン解析がある。我々は、種痘様水疱症関連リンパ腫および細胞株に対して、全エキソン解析を行い、アレイ CGH 法では得られなかった新たな疾患関連候補遺伝子を複数個、抽出した。これらの遺伝子に対して、サンガー法による塩基配列決定を行ったところ、確かに点突然変異による遺伝子欠損が生じていることを確かめることができた。今後、これらの候補遺伝子について、機能解析を行い、種痘様水疱症関連リンパ腫発生との関連について、検討が必要と考えられた。

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　８ 件）

1. Murata T, Noda C, Narita Y, Watanabe T, Yoshida M, Ashio K, Sato Y, Goshima F, Kanda T, Yoshiyama H, Tsurumi T, Kimura H. Induction of Epstein-Barr Virus Oncoprotein LMP1 by Transcription Factors AP-2 and Early B Cell Factor. J Virol 90(8):3873-89, 2016. 10.1128/JVI.03227-15. 査読有り
2. Watanabe T, Narita Y, Yoshida M, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The Epstein-Barr virus BDLF4 gene is required for efficient expression of viral late lytic genes. J Virol 89(19):10120-4, 2015, 10.1128/JVI.01604-15 査読有り
3. Suzuki M, Takeda T, Nakagawa H, Iwata S, Watanabe T, Siddiquey MN, Goshima F, Murata T, Kawada JI, Ito Y, Kojima S, Kimura H. The heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 suppresses the growth of T and natural killer cell lymphomas. Front Microbiol 6:280, 2015. 10.3389/fmicb.2015.00280. 査読有り
4. Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey MN, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-CCR4 monoclonal antibody mogamulizumab for the treatment of EBV-associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases. Clin Cancer Res 20:5075-84, 2014, 10.1158/1078-0432.CCR-14-0580 査読有り
5. Ito T, Kawazu H, Murata T, Iwata S, Arakawa S, Sato Y, Kuzushima K, Goshima F, Kimura H. Role of latent membrane protein 1 (LMP1) in chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV)-derived T/NK cell proliferation. Cancer Med 3: 787-795, 2014 10.1002/cam4.256 査読有り
6. Fujiwara S, Kimura H, Imadome KI, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. Pediatr Int 56, 159-166, 2014　10.1111/ped.12314 査読無し
7. Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer- cell lymphoma. Cancer Sci 105:713-722, 2014 査読有り 10.1111/cas.12418
8. Kimura H, Karube K, Ito Y, Hirano K, Suzuki M, Iwata S, Seto M. Rare occurrence of JAK3 mutations in NK cell neoplasms in Japan. Leuk Lymphoma 55:962-3, 2014 10.3109/10428194.2013.819577 査読有り

〔学会発表〕（計　６ 件）

1. Sato Y, Murata T, Kanda T, Goshima F, Kimura H. Loss of growth advantages of the LMP1-positve cells by the mosaic culture with the LMP1-negative cell. 第63回日本ウイルス学会学術集会，福岡国際会議場、福岡県福岡市，2015/11/22
2. Kimura H. EBV Infection and Hematological Malignancies. 27th International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases Symposium, Paris, France, 2015/9/21
3. Watanabe T, Kimura H, Goshima F, Murata T. Roles of Epstein-Barr virus BGLF3.5 Gene and Two Upstream Open Reading Frames in Lytic Viral Genes. 40th Internnational Herpesvirus Workshop, Boise, USA, 2015/7/29
4. Kimura H. Epigenetic therapy of EBV-associated T/NK-cell lymphoma. 7th T Cell Lymphoma Forum, St Francisco, USA, 2015/1/30
5. Kimura H. Current understanding of the role of Epstein-Barr virus in lymphomagenesis. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会 International Session, 福岡国際会議場、福岡県福岡市，2014/7/18
6. Kimura H. T/NK-cell lymphomagenesis. 50th Anniversary of the discovery of Epstein-Barr virus. Oxford, UK. 2014/3/25.

６．研究組織
(1)研究代表者
木村　宏．(KIMURA Hiroshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30303621.

(2)研究分担者
伊藤　嘉規．(ITO Yoshinori)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号： 20373491.

瀬戸　加大．(SETO Masao)
久留米大学・医学部・客員教授
研究者番号：80154665.