

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461423

研究課題名(和文) 感染を基盤として発症する造血器腫瘍の病態および腫瘍化機構の解明とその制御

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of hematological malignancies associated with persistent viral infection

研究代表者

大畑 雅典 (DAIBATA, Masanori)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：50263976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫はしばしば感染・炎症を基盤に発症することが知られている。その代表として膿胸関連リンパ腫があげられる。膿胸関連リンパ腫は肺結核後の長期にわたる膿胸腔に発生するB細胞リンパ腫であるが、ほぼ全例でEBウイルスの感染が認められる。今回、膿胸関連リンパ腫の病態を形成付ける遺伝子の探索を目的に研究を行った。その結果、CCL4/CCR5などのケモカイン発現亢進およびIL12aなどのサイトカイン発現亢進が膿胸関連リンパ腫の病態形成に関与することが示唆された。また、ZIC2やJAG1遺伝子などの発現亢進は様々なシグナル伝達経路を介して細胞増殖に関わり、本リンパ腫の発症に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to find candidate genes associated with pathogenesis of malignant lymphomas in the context of chronic inflammation and viral infection. Pyothorax-associated lymphoma (PAL) develops in patients with a long-standing pyothorax caused by an artificial pneumothorax created for previous treatment of pulmonary tuberculosis. The most striking feature of this lymphoma is that the Epstein-Barr virus (EBV) genome is present in the lymphoma cells of all cases. Thus, PAL is representative of lymphoma associated with viral infection and chronic inflammation. Our PCR array analysis identified several upregulated genes in PAL cells compared with other EBV-negative lymphoma cells. The upregulated genes included genes encoding cytokines and chemokines/chemokine receptors, such as IL12a and CCL4/CCR5, and genes involved in signaling pathways that are associated with cell proliferation. These genes may be potential therapeutic targets for lymphomas associated with chronic inflammation.

研究分野：血液内科学、ウイルス学、腫瘍学、感染症学

キーワード：リンパ腫 ウイルス 感染 炎症

1. 研究開始当初の背景

癌は先進諸国における最大の死亡原因である。悪性腫瘍の中でも、感染という明確な外因を基盤とする癌 (= 感染癌) は全癌死亡の約 20 ~ 25% も占める。造血器腫瘍は、Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス)、ヒト T 細胞白血病ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 8 型などの腫瘍ウイルスが密接に関与し、悪性腫瘍の中でも、とりわけ感染に伴う慢性炎症の関連性が高い腫瘍カテゴリーである。

これら腫瘍ウイルスは持続感染し、感染後長い年月を経て、腫瘍を発症させる。これまでの「感染癌」の研究は、発癌に働く責任微生物遺伝子の同定に主眼が置かれてきた。その一方で、慢性炎症を基盤に発症する造血器腫瘍では、どのような細胞側遺伝子が発現変化し、腫瘍発生に関与するのかが十分に解明されていない現状であった。

2. 研究の目的

「感染 炎症 宿主反応 腫瘍化」のプロセスにおいて、感染関連造血器腫瘍の発症および病態修飾に関係する細胞側遺伝子を網羅的に探索することを本研究の目的とした。これにより新規治療法の開発に向けて、標的分子の同定へと発展させることができる基盤研究を目指した。本研究では炎症・感染関連造血器腫瘍の代表として膿胸関連リンパ腫をとりあげた。

3. 研究の方法

膿胸関連リンパ腫において特異的に発現していると考えられる遺伝子群を網羅的に探索するために、まず PCR (polymerase chain reaction) アレイ法を用いた。そこで得られた遺伝子発現プロファイルを定量的リアルタイム RT (reverse transcription)-PCR 法で確認した。

サンプルは膿胸関連リンパ腫細胞株 (OPL1、OPL2、OPL3.2、OPL4、OPL5、OPL7、Pal1、Deglis) を用いた。

(1) PCR アレイ法

細胞から RNA を抽出し、RT² Nano PreAMP cDNA 合成キット (Qiagen 社) を用いて cDNA に変換した。25 ng の RNA から変換した cDNA を PCR アレイ法 (RT² Profiler PCR Array: Qiagen 社) に供した。遺伝子発現レベルは Thermal Cycler Dice Real Time System Single ソフトウェアにて解析した。

(2) 定量的リアルタイム RT-PCR 法

細胞から RNA を抽出し、SuperScript III First-Strand 合成キット (Invitrogen 社) を用いて cDNA に変換後、StepOnePlus リアルタイムシステム (Life Technologies 社) を使って遺伝子発現量を解析した。

4. 研究成果

膿胸関連リンパ腫は肺結核に関連して、長年にわたる慢性炎症を基盤に発生するリンパ腫である。その発症例は本邦からの報告が

大多数を占め、日本人特有の B 細胞リンパ腫といえる。全例に EB ウイルス感染が関与することから、「EB ウイルス感染-慢性炎症-腫瘍化」の優れた研究材料となると考えられる。

それぞれの膿胸関連リンパ腫細胞株から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、PCR アレイで遺伝子発現が亢進あるいは低下している遺伝子群を探索した。コントロールとして EB ウイルス陰性 B 細胞リンパ腫細胞株 (BJAB) を用いた。

解析した全ての膿胸関連リンパ腫細胞株において、10 倍以上の発現亢進あるいは 5 倍以上の発現低下が認められた遺伝子群は以下のとおりであった。

・発現亢進

IRF4, IL13R, IFNGR1, CCL4, CXCR4, CCR4, TLR2, CXCL10, TNFSF14, IL12a, ZIC2, LRP5, CCR1, PVRL, CCR5, GBP2, JAG2, HES1, HEY1, CCR2, JAG1, SHH, AICDA

・発現低下

IL-10, BLR, SMO, DTX, Notch4, FZD3, DLL, HEYL, LMO2

これらの遺伝子群について、その発現レベルを定量的リアルタイム RT-PCR で確認した (コントロールは BJAB)。その結果、以下に示す遺伝子の発現レベルが PCR アレイの結果と合致した。

・発現亢進

IRF4, CCL4, CXCR4, CCR4, CXCL10, TNFSF14, IL12a, CCR1, PVRL, CCR5, ZIC2, LRP5, GBP2, HES1, HEY1, JAG1, AICDA

・発現低下

IL-10, BLR, SMO, DTX, FZD3, DLL, HEYL, LMO2

さらに、他の EB ウイルス陰性びまん性大細胞型 B リンパ腫細胞株をコントロールとして、定量的リアルタイム RT-PCR で解析した結果、共通して発現亢進あるいは発現低下が認められた遺伝子を以下に示す。

・発現亢進

CCL4, CCR5, IL12a, ZIC2, JAG1, PVRL, GBP2, HES1, HEY1

・発現低下

BLR, SMO, DLL

以上の結果を総合すると、CCL4/CCR5 のリガンド/レセプターの発現亢進および IL12a などのサイトカインの発現亢進が膿胸関連リンパ腫の病態形成に関与することが示唆された。また、ZIC2 や JAG1 遺伝子などの発現亢進はさまざまなシグナル伝達経路を介して細胞増殖に関わり、本リンパ腫の発症に関与することが示唆された。今後もさらなる解析を進めていく。

さらに、これまで報告されている膿胸関連リンパ腫は肺結核治療としての人工気胸施工後の慢性膿胸から発生するリンパ腫であるが、我々は外傷後の膿胸においても、それが慢性化した場合、EBウイルス陽性のリンパ腫が発症することを実臨床例で突き止めた。

肺結核後 EB ウイルス陽性膿胸関連リンパ腫は奇矯な形質発現がしばしばみられるが、外傷後 EB ウイルス陽性膿胸関連リンパ腫においても、通常の B 細胞性リンパ腫とは異なった細胞表面マーカーの発現パターンがみられることが判明した。例えば、B 細胞マーカーである CD20 の発現が認められず、一方では T 細胞性マーカーである CD3 が発現される症例も確認することができた。

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 9 件)

Masahiko Hayashida, Masanori Daibata, Erika Tagami, Takahiro Taguchi, Fumiyo Maekawa, Katsuhiko Fukutsuka, Takamasa Hayashi, Yoshinori Iwatani, Hitoshi Ohno. Establishment and characterization of a novel Hodgkin lymphoma cell line, AM-HLH, carrying the Epstein-Barr virus genome integrated into the host chromosome. *Hematological Oncology*. 査読有. 2017 (掲載決定). DOI: 10.1002/hon.2369.

Mikiya Fujieda, Kazushi Tsuruga, Tetsuya Sato, Hiroaki Kikuchi, Wataru Tamaki, Masayuki Ishihara, Masaki Yamamoto, Taku Oishi, Hiroshi Tanaka, Masanori Daibata. Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate or tocilizumab. *Modern Rheumatology*. 査読有. 27: 66-71, 2017. DOI: 10.1080/14397595.2016.1177247.

Yumiko Hashida, Kimiko Nakajima, Hideki Nakajima, Takeo Shiga, Moe Tanaka, Masanao Murakami, Shigenobu Matsuzaki, Seiji Naganuma, Naoki Kuroda, Yasutaka Seki, Harutaka Katano, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata. High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. *Journal of Clinical Virology*. 査読有. 82: 101-107, 2016. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.07.011.

Yumiko Hashida, Mikio Kamioka, Moe Tanaka, Sena Hosokawa, Masanao Murakami, Kimiko Nakajima, Hiroaki Kikuchi, Mikiya Fujieda, Shigetoshi

Sano, Masanori Daibata. Ecology of Merkel Cell Polyomavirus in Healthy Skin Among Individuals in an Asian Cohort. *The Journal of Infectious Diseases*. 査読有. 213: 1708-1716, 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw040.

Misaki Takahashi, Hidetsugu Fukuda, Yuki Yokouchi, Yumiko Hashida, Masanori Daibata, Hideki Mukai. Concurrent Merkel cell carcinoma and squamous cell carcinoma in a chest nodule. *European Journal of Dermatology*. 査読有. 25: 492-494, 2015. DOI: 10.1684/ejd.2015.2607.

Ayuko Taniguchi, Yumiko Hashida, Yuiko Nemoto, Hisanori Machida, SungGi Chi, Takayuki Ikezoe, Akihito Yokoyama, Masanori Daibata. Epstein-Barr virus-positive pyothorax-associated lymphoma arising from a posttraumatic empyema. *Acta Haematologica*. 査読有. 134: 155-160, 2015. DOI: 10.1159/000380809.

Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, Masanao Murakami, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, Masanori Daibata. Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. 査読有. *Infectious Agents and Cancer*. 10: 3 (9 pages), 2015. DOI: 10.1186/1750-9378-10-3.

Yumiko Hashida, Masanori Daibata. Considerations on the link between Merkel cell polyomavirus and lung cancer. *Lung Cancer Management*. 査読有. 3: 297-299, 2014. <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/1mt.14.20>.

Masanao Murakami, Yumiko Hashida, Masayuki Imajoh, Akihiko Maeda, Mikio Kamioka, Yasutaka Senda, Tetsuya Sato, Mikiya Fujieda, Hiroshi Wakiguchi, Masanori Daibata. PCR array analysis of gene expression profiles in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbes and Infection*. 査読有. 16: 581-586, 2014. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.04.004.

[学会発表](計 15 件)

Moe Tanaka, Masanao Murakami, Masanori Daibata, et al. Phylogenetic analysis of Merkel cell polyomavirus based on full-length *LT* and *VP1* sequences derived from normal skin of healthy individuals. 2016 年 10 月 23 ~ 25 日. 札幌コンベンションセンター

(北海道・札幌市)
Yumiko Hashida, Masanao Murakami,
Masanori Daibata, et al.
Epidemiological study of Merkel cell
polyomavirus in healthy skin among
healthy individuals in Japan. 第64
回日本ウイルス学会学術集会. 2016年
10月23日~25日. 札幌コンベンション
センター(北海道・札幌市)
Ichiro Murakami, Masanori Daibata, et
al. Ecology of Merkel cell
polyomavirus in healthy skin among
individuals in an Asian cohort shows
close agreement with IL-1 loop model
in langerhans cell histiocytosis.
32nd Annual Meeting of the Histiocyte
Society. October 17~19, 2016. Dublin
(Ireland)
Kimiko Nakajima, Masanori Daibata, et
al. High burden of Merkel cell
polyomavirus DNA in the nonlesional,
sun-exposed skin of patients with
Merkel cell carcinoma. 46th Annual
European Society of Dermatological
Research meeting. September 7~10,
2016. Munich (Germany)
林田 雅彦, 大畑 雅典, 他. EB ウイ
ルスゲノムが染色体にインテグレート
されたホジキンリンパ腫細胞株 AM-HLH
の樹立. 第56回日本リンパ網内系学会
総会・第26回日本樹状細胞研究会・第
19回日本血液病理研究会. 2016年9月1
日~3日. ホテル日航熊本, くまもと県
民交流館パレア(熊本県・熊本市)
上岡 樹生, 大畑 雅典, 他. 膠芽腫
におけるウイルス感染. 第32回世界医
学検査学会・第65回日本医学検査学会.
2016年9月1日~4日. 神戸国際会議場
(兵庫県・神戸市)
Kimiko Nakajima, Masanori Daibata, et
al. High burden of Merkel cell
polyomavirus DNA in the sun-exposed
skin of elder adults. Asia-Pacific
Combined Dermatology Research
Conference. August 25~28, 2016.
Noosa (Australia)
Yumiko Hashida, Masanao Murakami,
Masanori Daibata, et al. Virus
infection in glioblastoma multiforme
(GBM): Possible association of human
papillomavirus with pathogenesis of
GBM. 第63回日本ウイルス学会学術集会.
2015年11月22日~24日. 福岡国際会
議場(福岡県・福岡市)
上岡 樹生, 大畑 雅典, 他. 非小細
胞肺癌発症におけるメルケル細胞ポリ
オーマウイルスの関与. 第62回日本臨
床検査医学会学術集会. 2015年11月19
日~22日. 長良川国際会議場, 岐阜都
ホテル(岐阜県・岐阜市)

佐藤 哲也, 大畑 雅典, 他. 若年性
特発性関節炎(JIA)における治療とEB
ウイルス(EBV)動態について. 第47回
日本小児感染症学会総会・学術集会.
2015年10月31日~11月1日. ザ・セ
レクトン福島, ホテル福島グリーンパ
レス, コラッセふくしま(福島県・福島
市)
石原 正行, 大畑 雅典, 他. 若年性特
発性関節炎(JIA)における Epstein-
Barr virus (EBV) 動態について. 第25
回日本小児リウマチ学会総会・学術集会.
2015年10月9日~11日. 金沢歌劇座(石
川・金沢市)
Masanao Murakami, Masanori Daibata,
et al. Nm23-H1 regulates cell
migration via interaction with Asef1
and Asef2. 第74回日本癌学会学術総会.
2015年10月8日~10日, 名古屋国際会
議場(愛知県・名古屋市)
橋田 裕美子, 八幡 俊男, 村上 雅
尚, 谷口 亜裕子, 上岡 樹生, 上羽
哲也, 大畑 雅典. 膠芽腫におけるウ
イルス感染の調査. 第62回日本ウイル
ス学会学術集会. 2014年11月10日~12
日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
Mika Teraishi, Masanao Murakami,
Masanori Daibata, et al. Adult T-cell
Leukemia/Lymphoma cells identified by
flow cytometry and HTLV-1 proviral
load. 3rd Eastern Asia Dermatology
Congress, September 24~26, 2014.
Jeju (Korea)
Masanao Murakami, Masanori Daibata,
et al. PCR array analysis of gene
expression profiles in chronic active
Epstein-Barr virus infection. 39th
International Herpesvirus Workshop,
July 19~23, 2014. Kobe (Japan)

〔図書〕(計1件)

谷口 亜裕子, 大畑 雅典. 医薬ジャ
ーナル社. EBウイルスが関与するホ
ジキンリンパ腫. 血液フロンティア(ホ
ジキンリンパ腫). 2016年. 47-53.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_mcrbi/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大畑 雅典(DAIBATA, Masanori)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・教授
研究者番号: 50263976

(2) 研究分担者

村上 雅尚(MURAKAMI, Masanao)

高知短期大学・医療衛生学科医療検査専
攻・准教授
研究者番号：80571017

(3)連携研究者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI, Hiroaki)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・講師
研究者番号：90346560