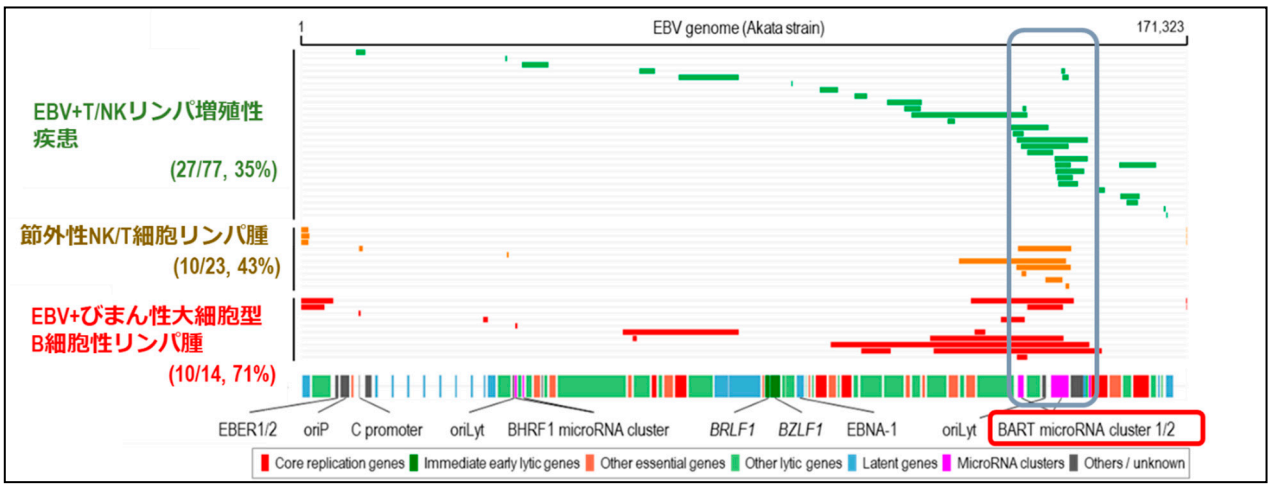
29　ウイルスmiRNAがリンパ腫発生に果たす役割の解明	木村　宏

【目的】Epstein-Barr virus（EBV）は、最も古いがんウイルスであり、リンパ球に潜伏感染し、様々なリンパ腫と関連している。最近、我々は次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、EBV 関連リンパ腫では、高率に EBV 遺伝子の一部が欠失すること、また欠失が特定の領域に集中することを見出した。共通して欠質する領域には、ウイルスがコードする複数の miRNA をはじめ、これまでウイルス増殖・持続感染に促進的に働いていると考えられてきた遺伝子が存在する。一方、EBV 陽性リンパ腫の多くでは、これらの領域を欠損していることから、腫瘍化には抑制的に働いていると考えられる。本研究の目的は、ウイルス miRNA をはじめとする *EBV* 遺伝子のリンパ腫原性における役割を明らかにすることである。

【方法】先行する網羅的遺伝子解析で高頻度に欠質していた *EBV* 遺伝子を欠損した組換え EBV を作製し、細胞株を用いた *in vitro* 機能解析、および免疫不全マウスを用いた *in vivo* 機能解析により、各遺伝子役割の解明を試みた。

【結果】*EBV* 欠失は BART microRNA cluster と呼ばれる領域に最も集中していたため、まずこの領域を欠く変異ウイルスの作製を試みた。作製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。次いで 2 番目に欠失が集中していた core replication genes の一つである *BALF5*（viral DNA polymerase）を欠失させた変異 EBV を作製し、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。また、同様に欠質が集中していた *C promoter（Cp）* を欠損した変異ウイルスを作製し、野生株と比較したところ、*Cp* 欠損株は、野生株よりも効率的に B 細胞の形質転換を引き起こした。さらに、EBV を臍帯血単核球細胞に感染させた後に免疫不全マウスに移入するリンパ増殖性疾患モデルでは、*Cp* 欠損株は野生株に比し、病勢の進行を早めることがわかった。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* 遺伝子を欠質したウイルスはリンパ腫を発生しやすいことを示した。詳細なメカニズムの解明はこれからであるが、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、エピジェネッ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。

EBV 関連リンパ腫におけるウイルス遺伝子欠損



29. ウイルス miRNA がリンパ腫発生に果たす役割の解明

木村　宏

名古屋大学 大学院医学系研究科 ウイルス学

Key words：EB ウイルス，miRNA，悪性リンパ腫，欠損ウイルス

緒　言

発がんのメカニズムを解明し、がんを克服することはわが国の喫緊の課題の一つである。全がんのうち 12%程度がウイルス関連であるとされ、Epstein-Barr virus（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。これら「がんウイルス」は、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く、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し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。

EBV は、1964 年 Burkitt リンパ腫から分離・発見された最も古いがんウイルスであり、リンパ球に潜伏感染し、様々なリンパ腫（Burkitt リンパ腫・EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫・移植後リンパ増殖症、節外性 NK/T リンパ腫・鼻型、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患）と関連している。これらのリンパ腫の多くは特定の地域・国に集積する特徴を持ち、我が国をはじめとする東アジアでは節外性 NK/T リンパ腫・鼻型、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患が多いことが報告されている。ほとんどの成人に感染する普遍的な EBV がなぜ特定の地域において、一部の個体にのみリンパ腫／リンパ増殖性疾患を引き起こすのかについては、未だ謎である。

最近、我々は EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、高率に *EBV* 遺伝子の一部が欠失すること、また欠失が特定の領域に集中することを見出した［1］。興味深いことに、節外性 NK/T リンパ腫・鼻型および EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫においても、この欠失は認められたため、EBV 関連リンパ腫に共通する現象と考えた（図 1）。

共通して欠質する領域には、ウイルスがコードする複数の miRNA が存在する。ウイルス miRNA は宿主およびウイルス遺伝子発現を制御し、ウイルス増殖・持続感染に促進的に働いていると考えられてきた。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考えられる。

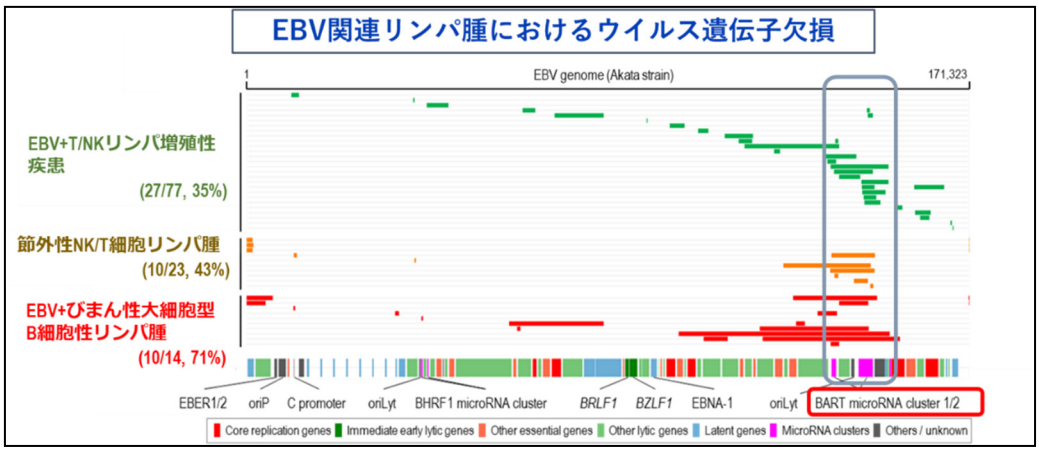


図 1. EBV 関連リンパ腫におけるウイルス遺伝子欠損

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 を作製し、各遺伝子の役割の解明を試みた。

1.　組換えウイルスの作製

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製した［2］。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［3］。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製した。

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 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-2Rγ 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、もしくは *ex vivo* でヒト臍帯血単核球細胞に EBV を感染させた後にマウスに移入するリンパ増殖疾患モデルのいずれかを用いた。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］。

結　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製を試みた。作製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、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 EBV の前初期遺伝子の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［5］。

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 を作製し［6］、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（図 2）［1］。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［1］。

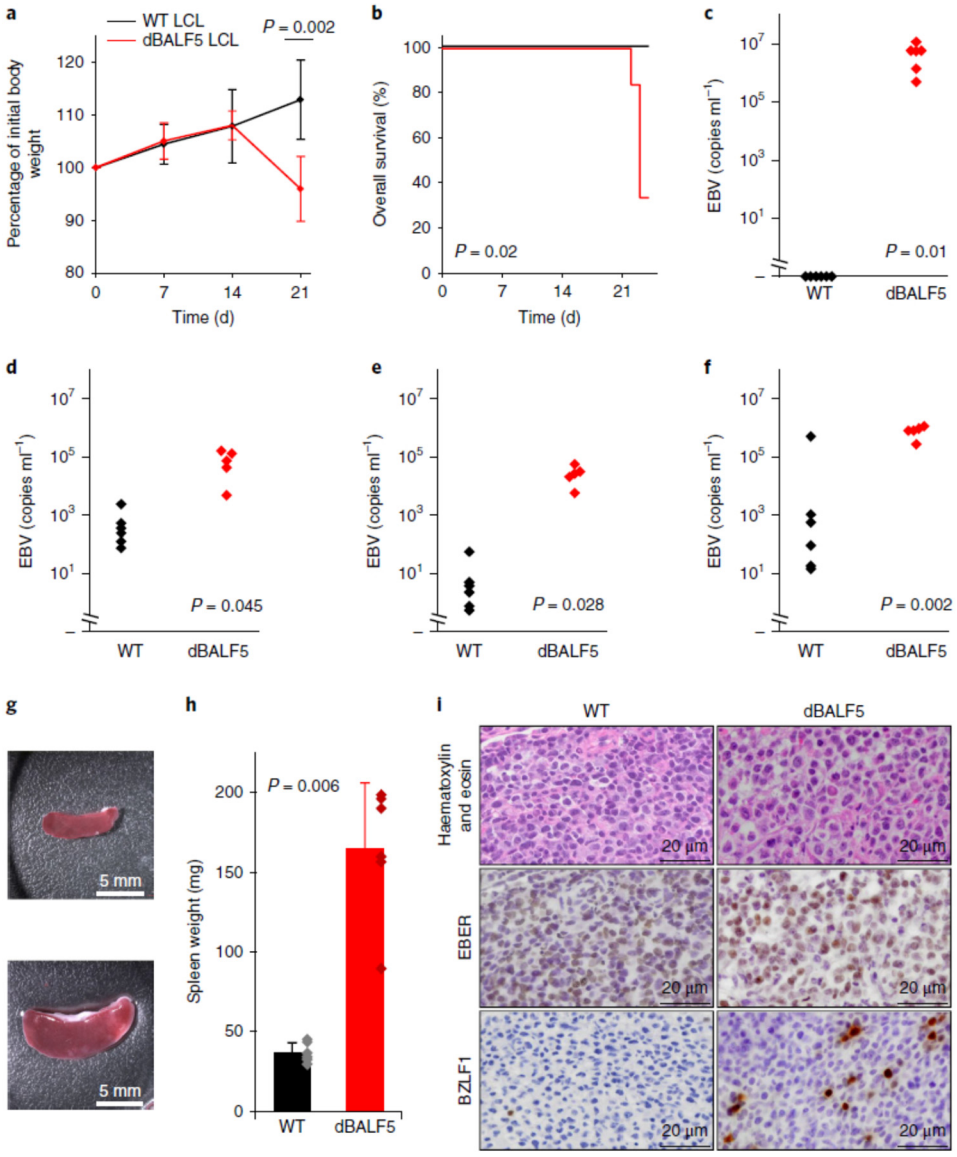


図2. *BALF5*（viral DNA polymerase）欠損ウイルスを感染させたB細胞株によるリンパ腫形成能

a) 欠損ウイルス（dBALF5）と野生株（WT）由来のB細胞株を免疫不全マウスに移入し、体重増加を比較（Student *t* test）。

b) 生存率の比較（logrank test）。

c～f) 21日後の血液中のウイルス量の比較（Student *t* test）。24日後の脾臓中（d）、肝臓中（e）、膵臓中（f）のウイルス量の比較（Student *t* test）。

g) 24日後の脾臓の外観。スケールバー: 5 mm。

h) 24日後の脾臓重量の比較（Student *t* test）。

i) 24日後の膵臓の組織像とEBV encoded small RNA (EBER)と前初期遺伝子BZLF1の発現の比較。スケールバー: 20 μm。

3. *C promotor* 欠質の役割

core replication genesに次いで頻度の高かった部位はC promoter（Cp）であった。CpはIII型の潜伏感染において活性化し、*EBNA*などの遺伝子を発現させることが知られている。この*Cp*の欠損の意義を明らかにするために、BACシステムを用いて臨床検体と同様の欠損をEBVゲノムに導入し、*Cp*欠損株と野生株のウイルスの表現型を比較した。*Cp*欠損株は、子孫ウイルスの産生能および子孫ウイルスの感染性については野生型と差がみられなかった［7］。

しかし *Cp* 欠損株は、野生株よりも効率的に B 細胞の形質転換を引き起こした。形質転換においては、細胞増殖の促進とアポトーシスの阻害が起きているため、この現象は EBV に関連した発癌に直接関与している可能性があると考えた。さらに、EBV ヒトを臍帯血単核球細胞に感染させた後に免疫不全マウスに移入するリンパ増殖性疾患モデルでは、*Cp* 欠損株は野生株に比し、病勢の進行を早めることがわかった（図 3）[7]。

この機序を解明するために、RNA シーケンスによるスクリーニングと qRT-PCR を行ったところ、*Cp* 欠損株では Cp の代わりに W promoter（Wp）という別の EBV プロモーターを活性化していること、また LMP2A の転写が亢進していることが判明した。しかし *Cp* 欠損株に *LMP2A* の欠損を導入しても、*LMP2A* の単独欠損株と比較して形質転換効率の上昇が観察されたため、*Cp* 欠損株における形質転換効率の上昇は、LMP2A の発現上昇では説明できないと解釈した。

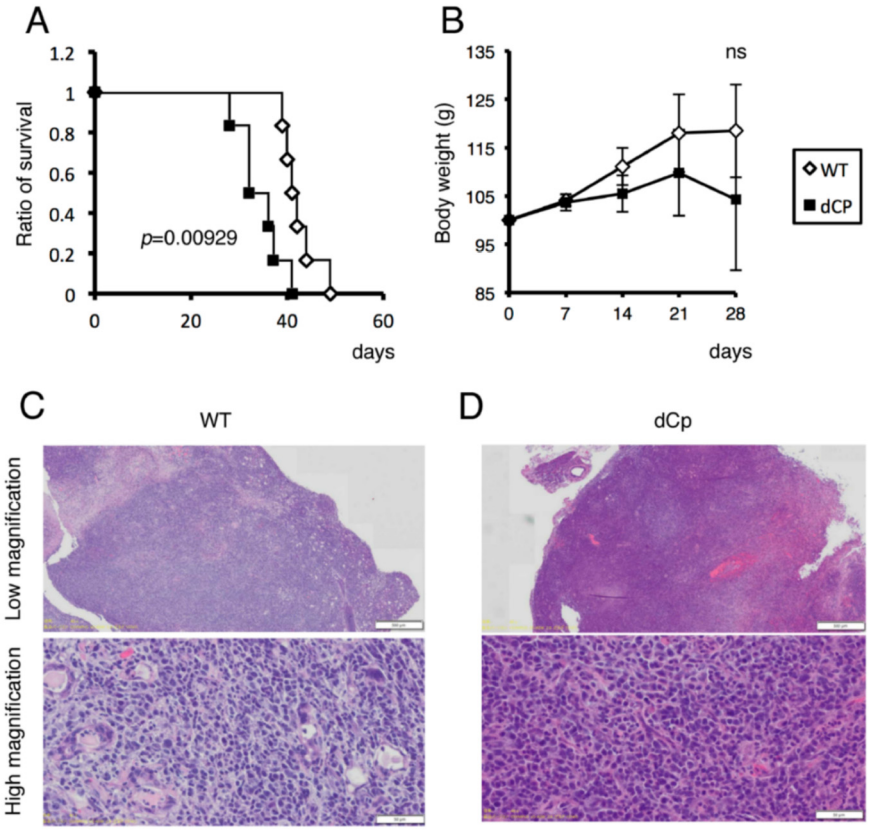


図3. 異種移植によるEBV関連リンパ増殖症モデル

A) ヒト臍帯血に野生株（WT）もしくは *Cp* 欠損株（dCp）を感染させ、免疫不全マウスに移入後、生存率を比較（logrank test）。

B) 体重変化の比較（Student *t* test）。

C、D）膵臓の腫瘍組織像。スケールバー：上段 500 μm、下段 50 μm。

考　察

EBV 関連リンパ腫でみられる欠質の役割を解明するために、変異ウイルスと免疫不全マウスを用いた異種移植モデルを用い解析した。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、未だ不明な点が多い。

今回我々は、ウイルス miRNA をはじめいくつかの *EBV* 遺伝子を欠質したウイルスがむしろリンパ腫が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、エピジェネッ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［8，9］。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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学の佐藤好隆、渡辺崇広、同小児科学川田潤一、名古屋大学医学部附属病院ゲノム医療センター奥野友介、藤田医科大学医学部ウイルス・寄生虫学村田貴之である。

文　献

1) Okuno Y, Murata Y, Sato Y, Muramatsu H, Ito Y, Watanabe T, Okuno T, Murakami N, Yoshida K, Sawada A, Inoue M, Kawa K, Seto M, Ohshima K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Narita Y, Yoshida M, Goshima F, Kawada JI, Nishida T, Kiyoi H, Kato S, Nakamura S, Morishima S, Yoshikawa T, Fujiwara S, Shimizu N, Isobe Y, Noguchi M, Kikuta1 A, Iwatsuki K, Takahashi Y, Kojima S, Ogawa S, Kimura H. Defective Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-related hematological malignancy. Nat Microbiol. 2019 Mar;4(3):404-413. PMID: 30664667. doi: 10.1038/s41564-018-0334-0.

2) Sato Y, Watanabe T, Suzuki C, Abe Y, Masud HMA, Inagaki T, Yoshida M, Suzuki T, Goshima F, Adachi J, Tomonaga T, Murata T, Kimura H. S-Like-Phase Cyclin-Dependent Kinases Stabilize the Epstein-Barr Virus BDLF4 Protein To Temporally Control Late Gene Transcription. J Virol. 2019 Apr 3;93(8). pii: e01707-18. PMID: 30700607. doi: 10.1128/JVI.01707-18.

3) Masud HMA, Watanabe T, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T. The BOLF1 Gene is Necessary for Effective Epstein-Barr Viral Infectivity. Virology. 2019 May;531:114-125. PMID: 30856483. doi: 10.1016/j.virol.2019.02.015.

4) Watanabe T, Sato Y, Masud HMA, Takayama M, Matsuda H, Hara Y, Yanagi Y, Yoshida M, Goshima F, Murata T, Kimura H. Antitumor activity of CDK inhibitor alsterpaullone in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. Cancer Sci. 2020 Jan;111(1):279-287. PMID: 31743514. doi: 10.1111/cas.14241.

5) X. Lin, M.H. Tsai, A. Shumilov, R. Poirey, H. Bannert, J.M. Middeldorp, R. Feederle, and H.J. Delecluse, The Epstein-Barr Virus BART miRNA Cluster of the M81 Strain Modulates Multiple Functions in Primary B Cells. PLoS Pathog. 2015 Dec 22;11(12):e1005344. PMID: 26694854. doi: 10.1371/journal.ppat.1005344.

6) Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Watanabe T, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T, Murata T. A herpesvirus specific motif of Epstein-Barr virus DNA polymerase is required for the efficient lytic genome synthesis. Sci Rep. 2015 Jun 30;5:11767. PMID: 26123572. doi: 10.1038/srep11767.

7) Mabuchi S, Hijioka F, Watanabe T, Yanagi Y, Okuno Y, Masud HMA, Sato Y, Murata T, Kimura H. Role of Epstein-Barr virus C promoter deletion found in diffuse large B cell lymphoma. Cancers (Basel). 2021 Feb 1;13(3):561. PMID: 33535665. doi: 10.3390/cancers13030561.

8) Münz C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. Nat Rev Microbiol. 2019 Nov;17(11):691-700. PMID: 31477887. doi: 10.1038/s41579-019-0249-7.

9) Murata T, Okuno Y, Sato Y, Watanabe T, Kimura H. Oncogenesis of CAEBV revealed: intragenic deletions in the viral genome and leaky expression of lytic genes. Rev Med Virol. 2020 Mar;30(2):e2095. PMID: 31845495. doi: 10.1002/rmv.2095.