

主論文の要旨

Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection

〔 血漿中ウイルス由来マイクロ RNA プロファイルは慢性活動性
Epstein-Barr ウイルス感染症のバイオマーカー候補を明らかにする 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

河野 好彦

【緒言】

マイクロ RNA (以下、miRNA) は 18~25 塩基長の small noncoding RNA であり、形態形成、細胞増殖など生物学的機能を制御する。miRNA は血中に安定して存在するためバイオマーカーへの応用が期待される。

Epstein-Barr ウイルス (以下、EBV) は少なくとも 44 個の miRNA をコードしており感染組織で多くの miRNA を発現する。感染組織や病態別に発現様式が異なると考えられ、特定の miRNA が疾患のバイオマーカーになる可能性がある。

難治性 EBV 関連疾患である慢性活動性 EBV 感染症 (以下、CAEBV) は EBV が T/natural killer (以下、NK) 細胞に感染しており血中 EBV DNA 量が診断や治療効果の評価に用いられているが、他に重症度や予後のバイオマーカーとなりうる因子は定まっていない。CAEBV 患者検体で EBV 由来 miRNA を測定した報告はなく、今回、CAEBV 患者血漿で EBV miRNA を測定してバイオマーカーとなりうるか検討した。

【対象および方法】

CAEBV 19 例 (27 検体)、伝染性単核症 (以下、IM) 14 例 (14 検体)、健常既感染者 (以下、Control) 11 例 (11 検体) を対象とし、同意を得て血漿を採取した。各群の背景を表 1 及び表 2 に示す。CAEBV 19 例のうち 7 例から治療前/治療中/治療後の、9 例から治療前/無治療の、3 例から治療中/治療後の血漿を得た。mirVana PARIS Kit (Ambion 社) を用いて血漿 200 μ l から miRNA を抽出した。TaqMan Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays (いずれも Applied Biosystems 社)、Mx3000P real-time PCR system (Stratagene 社) を用いて 12 種類の EBV miRNA (miR-BART1-5p、2-5p、4、5、7、13、15、16、22、miR-BHRF1-1、1-2、1-3) を reverse transcription-polymerase chain reaction で定量し、hsa-miR-16 を基準として相対量を算出した。EBV 陽性細胞株 (B/T/NK 細胞) で同様の定量を行った。血漿中 EBV miRNA と EBV DNA との比較も行った。統計解析には Mann-Whitney の U 検定、Wilcoxon の符号順位検定、Bonferroni 補正法、Pearson の相関係数を用いた。

【結果】

CAEBV 群、IM 群、Control 群での比較

治療前/無治療の CAEBV 群 16 検体、IM 群 14 検体、Control 群 11 検体で測定した miRNA を比較した。CAEBV 群で miR-BART1-5p、2-5p、5、22 が IM 群 ($P=0.002$ 、 0.004 、 <0.001 、 0.004) や Control 群 ($P<0.001$ 、 <0.001 、 <0.001 、 <0.001) と比べ有意に高く、IM 群で miR-BHRF1-1、1-2 が CAEBV 群 ($P<0.001$ 、 <0.001) や Control 群 ($P<0.001$ 、 <0.001) と比べ有意に高かった (図 1)。

血漿検体と細胞株との比較

EBV 陽性細胞株 (B/T/NK 細胞) で miRNA を測定したところ T/NK 細胞株で類似した発現パターンを認めた (図 2)。また、CAEBV 患者血漿中 miRNA と T/NK 細胞

株の miRNA を比較したところ類似した発現パターンを示した (図 3A)。

異なる臨床条件での比較

CAEBV 群を (1) 全身症状の有無 (9 検体 vs. 7 検体)、(2) 治療介入の前後 (16 検体 vs. 11 検体)、(3) 造血幹細胞移植 (以下、HSCT) を受け完全寛解 (以下、CR) に至った 5 症例における HSCT 前後に分けて比較検討した。(1) miR-BART2-5p、4、7、13、15、22 が全身症状有で ($P=0.013$ 、 0.013 、 0.044 、 0.001 、 0.017 、 0.030 ; 図 4A)、(2) miR-BART1-5p、2-5p、5、7、13、15、22 が治療介入前で ($P < 0.001$ 、 0.007 、 <0.001 、 0.002 、 0.004 、 0.002 、 0.002 ; 図 4B)、(3) miR-BHRF1-2、miR-BART1-5p、2-5p、5、7、13、15、22 が HSCT 前で ($P=0.043$ 、 0.043 、 0.043 、 0.043 、 0.043 、 0.043 、 0.043 、 0.043 ; 図 4C)、それぞれ有意に高値を示した。

血漿中 miRNA と EBV DNA との比較

CAEBV 患者血漿の miRNA と EBV DNA を比較検討した。全身症状の有無 (8 検体 vs. 7 検体) で検討すると、EBV DNA では全身症状の有無を明確に区別できなかったが miR-BART13 では $10^{-4.3}$ で分けることができた (図 5A)。また、HSCT を受けて CR に至った 5 症例の HSCT 前後の各検体に、HSCT を受けておらず CR に至っていない 16 検体を加えて検討すると、非 CR の 4 検体で EBV DNA が検出感度未満であり EBV DNA では CR 群と非 CR 群を明確に区別できなかった。一方、miR-BART2-5p と miR-BART15 では 10^{-5} で明確に分けることができた (図 5B、C)。

【考察】

EBV 関連疾患は EBV 潜伏感染遺伝子の発現パターンにより 3 種類の latency type に分けられ、CAEBV は type II、IM は type III に分類される。BHRF1 miRNA は type III を示す細胞で高発現するという報告があり (Xia ら、2008 年 Cancer Research 誌)、miR-BHRF1-1、1-2 が CAEBV 群と比べ IM 群で高発現していた本研究の結果と一致する (図 1)。また、Pratt らは type II を示す上咽頭癌や胃癌由来の細胞株では type I や III を示す他の細胞株と比べ BART miRNA が高発現していると示しており (2009 年 Virology 誌)、CAEBV 群で BART miRNA が上昇していた本研究の結果と一致する (図 1)。こうした結果から血漿中の EBV miRNA は EBV 感染細胞の潜伏感染様式を反映している可能性がある。我々は以前、HSCT を受けた CAEBV 患者の経過観察に際して血漿中ウイルス量が末梢血単核球中ウイルス量よりもモニターとして有用であることを明らかにした (Gotoh ら、2008 年 Clinical Infectious Diseases 誌)。本研究の結果から、血漿中ウイルス量に加えて血漿 miRNA を測定することで、CAEBV の病勢をより詳細に評価できる可能性がある。

EBV miRNA の機能は未解明な部分が多いが、miR-BART2-5p は EBV を免疫機構から回避させるとの報告が (Barth ら、2008 年 Nucleic Acids Research 誌; Nachmani ら、2009 年 Cell Host & Microbe 誌)、miR-BART5 はアポトーシスから回避させるとの報告が (Choy ら、2008 年 The Journal of Experimental Medicine 誌)、miR-BART22 も免疫機構から回避させるとの報告があり (Lung ら、2009 年

Neoplasia 誌)、いずれも EBV 感染細胞を持続させることに寄与する。本研究において、これらの miRNA が IM 群や Control 群より CAEBV 群で高発現しており、さらに CAEBV 群の中でも症状が重篤/進行している群の方がより高値であったことは興味深い (図 4)。

CAEBV は難治性かつ予後不良であり、重症度や予後評価のためのバイオマーカーが求められる。本研究において特定の血漿中 EBV miRNA が全身症状や CR の有無といった 2 群を明確に分類することができ (図 5)、CAEBV におけるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

【結語】

CAEBV、IM、Control の血漿を用いて EBV miRNA を相対定量することが可能であった。各疾患でそれぞれ特徴的に高発現している miRNA が存在した。これらの miRNA が CAEBV のバイオマーカーとなる可能性がある。