

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K08509

研究課題名(和文) B細胞を介したガンマヘルペスウイルスによるcell to cell感染メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of cell-to-cell infection with gamma herpesviruses through B-cell

研究代表者

片野 晴隆 (Katano, Harutaka)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：70321867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトB細胞に潜伏感染するEBVやKSHV(HHV-8)が非リンパ球系細胞に細胞間(cell to cell)感染する際の分子メカニズムを解明することを目的とした。EBV, KSHV感染細胞のmiRNAの全プロファイルを疾患、組織型ごとに明らかにし、ウイルス由来のmiRNAの大量発現と、ウイルスのmiRNAにはエクソソームに優先的に取り込まれるためのモチーフがあることを示した。KSHV感染細胞と非感染細胞(接着細胞)の共培養においてKSHVの前早期タンパクRTAの発現が誘導されることを示し、細胞接触によるシグナルを解析した。また、KSHVのvIL-6の細胞増殖、感染における機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトガンマヘルペスウイルスであるEBVやKSHV(HHV-8)はヒトB細胞に潜伏感染し、その後、上皮(EBV)や血管内皮(KSHV)に感染し、それぞれ、癌やカボジ肉腫などの悪性腫瘍を発症する。細胞間感染はヘルペスウイルスの疾患の成立に重要と考えられ、その分子機構を解明することは、ヘルペスウイルス属に共通の感染機構が見いだせる可能性がある。感染細胞におけるウイルス由来のマイクロRNAが大量発現していることに関しては、感染におけるmiRNAが何らかの役割を果たしていることが推察され、新規治療法の標的となりうることを示す。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of cell-to-cell infection was investigated in EBV and KSHV infection. Next generation sequencer revealed profiles of microRNA expression in EBV or KSHV infected cells and diseases. Exo-motif which induced miRNA to exosome was identified in sequences of KSHV and EBV miRNAs. Cell-to cell contact of KSHV-infected cell with non-infected cells induced expression of RTA, an immediate early protein of KSHV. Function of KSHV-encoded vIL-6 was also analyzed on plasmablastic cells with IL-6-dependent growth.

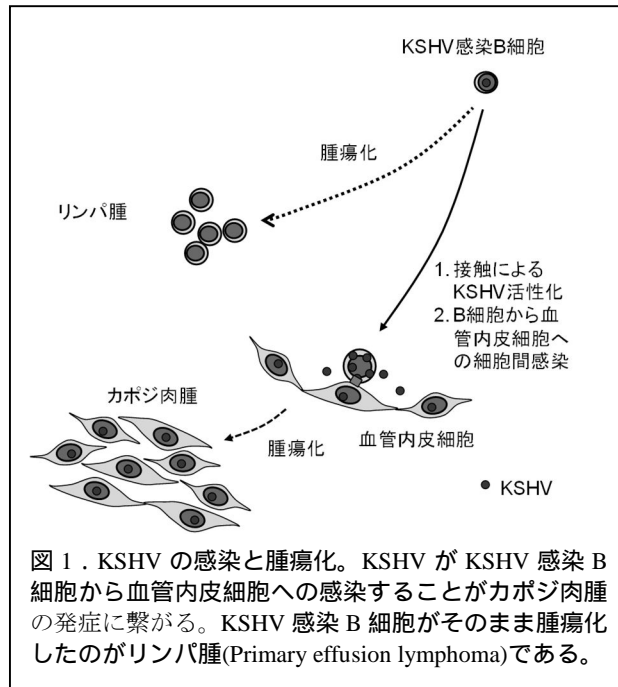
研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス

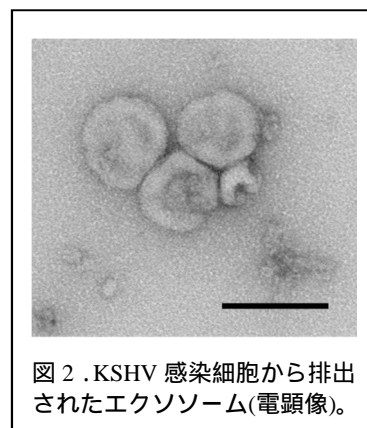
1. 研究開始当初の背景

ヒトガンマヘルペスウイルスである Epstein-Barr virus (EBV) や Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV, HHV-8)は主に B 細胞に潜伏感染し、リンパ腫の他に EBV では上咽頭癌、胃癌などに、KSHV はカポジ肉腫に関連する。EBV はほとんどの健常成人が既感染であるのに対し、KSHV の日本人の抗体保有率は約 1%であり、同性間性的接触の男性での抗体保有率が有意に高い(J Med Virol 2013. 85:1046, J Virol 2000. 74:3478)。カポジ肉腫は男性同性間性的接触のエイズ患者に発症するが、そうした限定された患者に感染、発症する理由は分かっていない。

EBV と KSHV は B 細胞リンパ腫を起こすだけでなく、上皮細胞(EBV)や血管内皮細胞(KSHV) など、異なる種類の細胞に感染し、腫瘍を起こす(図 1)。これまでわれわれは KSHV の感染実験において、ウイルス粒子単独で細胞に感染させるよりも、感染細胞と非感染細胞を接触させる方が、感染効率が高いことを世界に先駆けて見いだしている(J Virol 2001 75:7717)。この発見から 10 年後に、米国のグループにより細胞間(cell to cell)感染の効率が高いことが追証され、その感染機構が注目されている(J. Virol. 2011 85: 9767)。



一方、miRNA (microRNA) は 22 mer 程度の短い RNA であり、messenger RNA (mRNA)を標的に、タンパク転写、翻訳抑制などのさまざまな機能を持つことが知られている。われわれはこれまでの研究で、次世代シーケンサーを用い、EBV, KSHV 感染症でヒト miRNA である miR143 が高発現していること、KSHV の miRNA である miRK3 が NF- κ B 経路を抑制していることを明らかにしている。miR143 は血管形成に係わる miRNA であり、カポジ肉腫の病態との関連が示唆される。細胞から排出される 30-100nm 程度の大きさの老廃物と考えられていたエクソソーム中にも miRNA は含まれ(図 2)、エクソソームはこれらの miRNA の delivery に使われている可能性がある。



2. 研究の目的

ヒト B 細胞に潜伏感染する EBV や KSHV は上皮(EBV)や血管内皮(KSHV)に感染するが、B 細胞から非リンパ球系の細胞への感染は細胞間(cell to cell) 感染が重要と考えられる。本研究ではこの細胞間感染の分子メカニズムを解明することを目的とする。具体的には、感染細胞から放出されるエクソソームの感染における役割を明らかにすること、細胞間感染に必要な分子の同定、EBV との共感染が KSHV 感染に与える影響の検討を行う。細胞間感染はヘルペスウイルスの疾患の成立に重要と考えられ、ヘルペスウイルス属に共通の感染機構が見いだせる可能

性がある。

3 . 研究の方法

- (1) エクソソームと細胞間感染：EBV感染細胞(バーキットリンパ腫細胞株, lymphoblastoid cell line)、および、KSHV陽性primary effusion lymphoma細胞株であるTY1やBCBL1、さらには、非感染細胞のコントロールとしてEBV, KSHV陰性のリンパ腫細胞株について、Roche High Pure miRNA isolation kitを用いてsmall RNAを抽出した。抽出したmiRNAはIllumina社のTruSeq Small RNA Library Preparation Kitsを用いてsmall RNA libraryを作成し、Miseqにて解読を行った。EBV陽性リンパ腫組織についてはホルマリン固定パラフィン包埋標本から上記と同様にmiRNAを抽出し、解読を行った。解読後の解析はQiagen社 CLC Genomics Workbench で行い、17 base以上、35base 以下のreadを抽出し、miRNAのreferenceはmiRBase release 21を使用した。
- (2) 細胞間感染に必要な分子の同定：細胞接触の実験では浮遊細胞であるKSHV感染細胞(リンパ腫細胞株)と非感染細胞(接着細胞)の共培養を行った。KSHVのmRNAの定量にはTaqman のreal-time RT-PCRを行った。また、flow cytometry は抗RTAマウスモノクローナル抗体を1次抗体として染色を行った。阻害薬のスクリーニングにはInhibitorSelect 96-well Protein Kinase Inhibitor Library I, II, III (Calbiochem, San Diego, CA)を使用した。
- (3) EBVとの共感染がKSHV感染に与える影響の検討：EBV陽性形質芽細胞性リンパ腫細胞株PBL-1を用いた。KSHVがコードするvIL-6の遺伝子をレンチウイルスベクターにクローニングし、vIL-6発現レトロウイルスを作成した。また、vIL-6の遺伝子を哺乳類発現ベクターにクローニングし、ヒト腎上皮細胞で発現させ、タンパクを大量合成した。発現したタンパクは精製後、マウスに接種し、マウスモノクローナル抗体を作成した。

4 . 研究成果

(1) エクソソームと細胞間感染

エクソソームは細胞から放出される老廃物を含んだ小胞体のことであるが、近年、エクソソームには多くのマイクロRNAが含まれ、細胞から放出されたエクソソームがマイクロRNAの作用により遠隔で生理的な活性を発揮することが示されている。細胞間感染において、感染細胞から放出されるエクソソームの感染における役割を明らかにする目的で、次世代シーケンサーを用いてEBV, KSHV感染細胞のマイクロRNAの全プロファイルを明らかにした。まず、KSHV陽性 primary effusion lymphoma 細胞株であるTY1やBCBL1のmiRNAを解析した結果、KSHV感染細胞ではエクソソームに含まれるマイクロRNAの半分以上がウイルス由来のマイクロRNAであること、KSHVのmiRNAには特殊な塩基配列(モチーフ)があり、エクソソームに優先的に取り込まれ、細胞外に排出されていること、などが明らかになった。これらの結果から、ウイルスmiRNAは宿主免疫を逃れ、異常なほど多量に産生され、疾患形成に重要な働きをしている可能性があること、一方で異常産生されたmiRNAが細胞外(エクソソーム)へ排除される仕組みも持っていることが示唆された。

さらに、EBVの感染細胞であるバーキットリンパ腫細胞株、および、lymphoblastoid cell lineや、EBV陽性B細胞性リンパ腫組織において、同様に次世代シーケンサーによるmiRNAの解析を行った。その結果、KSHVと同様に、EBVのmiRNAにもエクソソームに誘導するためのモチ

ーフが含まれること、ウイルスの miRNA の発現は EBV 関連疾患の疾患ごとにその発現プロファイルが異なることを明らかにした。これらの結果から、EBV, KSHV などのヘルペスウイルスではウイルスがエクソソームを利用して遠隔細胞にマイクロ RNA を送り込むことで、エクソソームに含まれるマイクロ RNA は細胞間感染で重要な役割を果たしている可能性があることが示された。

(2) 細胞間感染に必要な分子の同定

KSHV 感染細胞と非感染細胞（接着細胞）の共培養において細胞接触によるシグナルを解析した。非感染細胞としての接着細胞に HeLa 細胞を、KSHV 感染細胞として、KSHV 陽性 primary effusion lymphoma 細胞株 TY1 と BCBL1 を用い、共培養を行った。その結果、共培養後、1 - 2 日程度で KSHV の前早期タンパクである replication and transcription activator (RTA) の mRNA が real-time RT-PCR で増加していることが確認され、さらに、共培養開始 2 - 3 日後には RTA 発現細胞数の増加が flow cytometry で確認された。これらのことから、KSHV 感染リンパ腫細胞株が細胞接触による刺激により KSHV の RTA タンパクの発現が誘導されることを示すことができた。現在、細胞接触時に活性化されるシグナル伝達系の阻害薬をスクリーニングしており、接触感染を阻害可能な薬剤の開発を目指している。

(3) EBV との共感染が KSHV 感染に与える影響の検討

KSHV, EBV 感染細胞の由来細胞と考えられている形質芽細胞について世界ではじめてその細胞株の樹立に成功し、細胞株の詳細な解析を行った。この細胞は KSHV, EBV の共感染実験には有用なツールになることが期待される。この EBV 陽性形質芽細胞株は培地にヒトインターロイキン 6 (hIL-6) を添加することが細胞増殖に必須である。そこで、レンチウイルスベクターで hIL-6 を強制的に発現させたところ、培地に hIL-6 を添加しなくても自律的増殖が可能であった。一方、レンチウイルスベクターで KSHV のコードする viral IL-6 (vIL-6) を発現させる系を作成し、本細胞株に導入したが、細胞の自律的増殖は見られなかった。また、KSHV の vIL-6 をヒト細胞において、大量合成することに成功し、この vIL-6 を形質芽細胞リンパ腫細胞株に添加したところ、増殖活性を示した。しかし、その活性は hIL-6 よりも低く、形質芽細胞株の増殖には他に増殖因子が必要であることが示唆された。さらに、合成した vIL-6 を用いて、マウスのモノクローナル抗体を複数作成した。そのうちのクローンから得られたモノクローナル抗体はカポジ肉腫、primary effusion lymphoma などの KSHV 関連疾患の病理組織において、vIL-6 を高感度に検出した。また、本抗体は KSHV 感染細胞の溶解液を使ったウエスタンブロットでも vIL-6 を認識可能であった。しかし、本モノクローナル抗体を EBV 陽性形質芽細胞株 PBL1 や KSHV 陽性 primary effusion lymphoma 細胞株 TY1 や BCBL1 の培養上清に加えても、増殖に変化はなかった。さらに、この vIL-6 マウスモノクローナル抗体の認識部位を明らかにする目的で、合成ペプチドを用いたエピトープマッピングを行ったところ、vIL-6 とヒト IL-6 の受容体である p180 の結合部位の近傍に認識エピトープがあることが判明した。今後、本抗体を用いて細胞間感染において、vIL-6 が果たす役割について、解析していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Katano Harutaka	4. 巻 1045
2. 論文標題 Pathological Features of Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 357 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-7230-7_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katano Harutaka	4. 巻 5
2. 論文標題 Expression and Function of Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpesvirus Non-coding RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Clinical Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 211 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40588-018-0101-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nanbo Asuka, Katano Harutaka, Kataoka Michiyo, Hoshina Shiho, Sekizuka Tsuyoshi, Kuroda Makoto, Ohba Yusuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Infection of Epstein-Barr Virus in Type III Latency Modulates Biogenesis of Exosomes and the Expression Profile of Exosomal miRNAs in the Burkitt Lymphoma Mutu Cell Lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 237 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10070237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mine Sohtaro, Hishima Tsunekazu, Suganuma Akihiko, Fukumoto Hitomi, Sato Yuko, Kataoka Michiyo, Sekizuka Tsuyoshi, Kuroda Makoto, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki, Fukayama Masashi, Katano Harutaka	4. 巻 7
2. 論文標題 Interleukin-6-dependent growth in a newly established plasmablastic lymphoma cell line and its therapeutic targets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10684-5	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 Sunagawa Keishin、Hishima Tsunekazu、Fukumoto Hitomi、Hasegawa Hideki、Katano Harutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Conserved sequences of BART and BHRF regions encoding viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated Lymphoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-017-2603-z	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 Sakamoto K, Sekizuka T, Uehara T, Hishima T, Mine S, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M, Katano H	4. 巻 6
2. 論文標題 Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 605-618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1006	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 Hoshina S, Sekizuka T, Kataoka M, Hasegawa H, Hamada H, Kuroda M, Katano H	4. 巻 11
2. 論文標題 Profile of Exosomal and Intracellular microRNA in Gamma-Herpesvirus-Infected Lymphoma Cell Lines	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0162574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0162574	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 Osawa M, Mine S, Ota S, Kato K, Sekizuka T, Kuroda M, Kataoka M, Fukumoto H, Sato Y, Kanno T, Hasegawa H, Ueda K, Fukayama M, Maeda T, Kanoh S, Kawana A, Fujikura Y, Katano H	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishing and characterizing a new primary effusion lymphoma cell line harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Infect Agent Cancer	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13027-016-0086-5	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 Kanno T, Uehara T, Osawa M, Fukumoto H, Mine S, Ueda K, Hasegawa H, Katano H	4. 巻 463
2. 論文標題 Fumagillin, a potent angiogenesis inhibitor, induces Kaposi sarcoma-associated herpesvirus replication in primary effusion lymphoma cells	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1267-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2015.06.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----