

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19113

研究課題名(和文) EBウイルス陽性上皮細胞を腫瘍化に導くDNA編集酵素の研究

研究課題名(英文) Study on DNA editing enzymes leading EB virus infected epithelial cells to tumorigenesis

研究代表者

金廣 優一 (Kanehiro, Yuichi)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60609197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EBV感染による胃がんや上咽頭がんなどの上皮細胞の腫瘍化機構はよくわかっていない。本研究ではDNA編集酵素APOBECに着目し、EBVにより発現誘導されたAPOBEC3が宿主のミトコンドリアDNAをC-to-T変異導入を介して損傷させることを明らかとした。ミトコンドリアDNA損傷は多くのがんで認められ、がん患者の予後とも関連することから、APOBEC3とミトコンドリアDNA損傷の分子機構を解明することは、EBV感染上皮細胞の腫瘍化の解明に貢献し、予防治療薬の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：The oncogenic contribution of EBV for gastric cancer and nasopharyngeal carcinoma is not fully elucidated. In this study, we focused on DNA-editing enzyme APOBEC and clarified that EBV-induced APOBEC3 damages mitochondrial DNA via C-to-T mutagenesis. Because mitochondrial DNA damage is found in many cancers and correlates with the prognosis of cancer patients, clarifying the molecular mechanism of APOBEC3 and mitochondrial DNA damage contributes to elucidation of tumorigenesis of EBV-infected epithelial cells and leads to the development of therapeutic drugs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス 上皮性腫瘍 APOBEC ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

EBV は、成人の約 9 割が感染する普遍的なウイルスであり、Burkitt リンパ腫や、胃がんの一部、上咽頭がん等の発生に関わっている。Burkitt リンパ腫では、EBV 感染が DNA 編集酵素 AID の活性化をもたらし、がん遺伝子 c-myc の転座による過剰発現を引き起こす (Ramiro AR ら, *Cell*, 2004)。ところが、上皮性腫瘍では c-myc 転座は認められず、EBV 感染による上皮細胞の腫瘍化機構は、よくわかっていない。

APOBEC は DNA のシチジンをウリジンへ変換する酵素群で (C-to-U 変異)、I 型インターフェロン (IFN) により発現が誘導され、ウイルスゲノムの複製を阻害することでウイルス感染防御因子として作用する (Harris RS と Liddament MT, *Nat Rev Immunol*, 2004)。また APOBEC の一部は核に局在し、細胞のゲノムにも C-to-U 変異を引きこす (Michael B ら, *Nature*, 2013)。EBV 感染は、I 型 IFN の発現を誘導することから (Iwakiri D ら, *J Exp Med*, 2009)、上皮細胞への EBV 感染により APOBEC の発現が誘導される可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

申請者は、以前に EBV 感染上皮細胞において、APOBEC3 ファミリーの核に局在する A3B となどの発現上昇を確認していた。当時から、核局在する APOBEC が宿主ゲノムへの変異を誘導し、乳がんなどの腫瘍に関わることは示唆されていた。加えて、EBV 関連胃がんでは C-to-T 変異が多く蓄積されていることが報告された (Bass AJ ら, *Nature*, 2014)。従って、EBV 感染によって、上皮細胞で APOBEC の発現と核移行が誘導され、ゲノム変異が引き起こされることを明らかにするために、ゲノム編集法を用いて APOBEC-蛍光タンパク質 mCherry 融合タンパク質 (APOBEC-mCherry) を作成し、EBV 感染による APOBEC の発現誘導と局在変化を解析する。また、同手法で AAVS1 領域に

BFP を挿入し、変異による緑色蛍光への変化から APOBEC 依存的変異を定量解析する。更に、EBV 感染により発現変動する APOBEC の欠損変異株を作成し、EBV 感染によるゲノム変異のホットスポットの網羅的解析を行う。

EB ウイルス陽性胃がんは、単一のウイルス感染細胞が腫瘍化したものである (Imai S ら, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1994)。EBV 感染が APOBEC を介してゲノム変異を誘発していれば、上皮細胞に EBV が感染後、早期に APOBEC 活性は上昇すると考えられる。従って、APOBEC の発現誘導の分子機構を明らかにすれば、EBV 感染で発生する上皮細胞性腫瘍の予防法が開発できる。また APOBEC 活性の上昇は、多くのウイルス感染に共通の現象である可能性が高く、本研究は、多くの腫瘍の発生にウイルス感染が関わっている可能性を示すことになる。

3. 研究の方法

EBV 感染に伴う経時的な APOBEC 発現変動を解析するために、完全長ゲノムの EBV に薬剤耐性遺伝子を導入した組換え Akata-EBV を胃上皮由来細胞株 AGS に感染させる。感染初期 (1 時間~1 週間) と持続感染 (1 ヶ月~半年) において、RNA、核、細胞質フラクションを採取し、APOBEC の発現量を定量的 RT-PCR と Western blotting により解析する。コントロールは EBNA1 を発現する Episomal 型ベクターを用いる。またウイルス感染後のゲノム変異を、次世代シーケンスで解析する。

ゲノム編集法を用いた蛍光タンパク質-APOBEC 融合タンパク質を作成する。CRISPR-Cas9 は、ガイド RNA との組み合わせでゲノムの指定位置を切断し、遺伝子欠失や相同組換えを生じさせる。EBV 感染により変動した APOBEC 遺伝子について、相同組換えベクターとゲノム編集法により、C 末端側に蛍光タンパク質 mCherry を挿入する。サザンブロット法により相同組換えを確認し、EBV 感染後の APOBEC の発現

誘導と核移行を、タイムラプス蛍光顕微鏡により経時的に測定する。

BFP タンパク質を用いたゲノム変異の評価系を確立する。AGS ゲノムの *AAVS1* 領域に、ゲノム編集法により EF-1 プロモーター制御 BFP 遺伝子を挿入する (BFP 発現 AGS)。BFP は、199 番目の塩基置換により、緑色蛍光を発する。BFP 発現 AGS を薬剤処理し、緑色蛍光をフローサイトメトリーで確認する。緑色蛍光と APOBEC 依存的変異の相関性を、Differential DNA Denaturation (3D)-PCR で確認する。

EBV 感染時の、APOBEC 発現、局在、変異導入活性を解析するために上記のアッセイ系を用いて、EBV 感染時の、APOBEC の発現、局在、変異導入活性の変化を解析する。更に、MAPK、 β -catenin、STAT3、NF- κ B、JAK、mTOR などのシグナル伝達経路の阻害剤を用いて、EBV 感染による APOBEC の発現誘導が、どのシグナル系に依存しているのかを明らかにする。

EBV 感染による APOBEC 依存的ゲノム変異の網羅的解析を行う。検出した遺伝子変異がどの APOBEC に依存するのか、ゲノム編集法を用いた APOBEC 欠損株を作成して決定する。遺伝子欠損は、定量的 RT-PCR や Western blotting で確認する。野生型と APOBEC 欠損株を、EBV 感染、非感染で用意し、ゲノムに C-to-U 変異が増加しているか、上記のアッセイ系と次世代シーケンスにより解析する。

EBV 感染時の APOBEC 核移行誘導因子の同定を行う。APOBEC が EBV 感染により核移行が誘導される場合、EBV 感染後の核フラクションを、抗 mCherry 抗体を用いて免疫沈降し、分離した複合体から LC-MS/MS 解析を行い、結合タンパク質を同定する。同定したタンパク質の、APOBEC との結合箇所を変異体により決定する。

4. 研究成果

組換え Akata eGFP EBV 株を EBV 感染の

レセプターである CD21 を発現させた胃上皮細胞株 AGS (AGS-CD21) に感染させ、48 時間後に、qRT-PCR により *APOBEC3* の発現を非感染細胞と比較したところ、*APOBEC3A*、*APOBEC3B*、*APOBEC3C*、*APOBEC3DE*、*APOBEC3F*、*APOBEC3G*、*APOBEC3H* の発現上昇が認められた (図 1)。

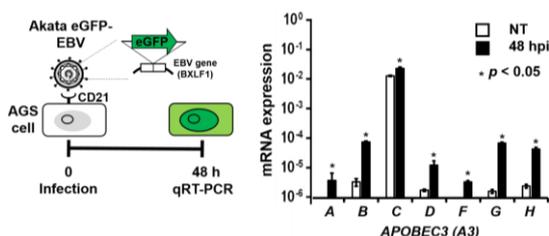


図1. EBV感染胃上皮細胞はAPOBEC3ファミリーの発現を亢進する

また EBV を潜伏感染させた AGS 細胞 (AGS-EBV+) では *APOBEC3A*、*APOBEC3B*、*APOBEC3C*、*APOBEC3DE*、*APOBEC3G* の発現上昇が認められた。次に APOBEC 依存的な変異をモニタリングするために変異型 BFP の発現ベクターを作成した。BFP 遺伝子は 199 番目の cytosine が thymine に置換することによって緑色蛍光を発する。従って、核に局在する *APOBEC3A* や *APOBEC3B* が対象とする遺伝子配列モチーフ TCW を 199 番目に配置し、その他の遺伝子配列では TCW モチーフを大幅に減少させた変異 BFP (mBFP) を作成した。mBFP 発現ベクターは AGS-CD21 細胞内で安定に発現した。しかし、mBFP 発現後 48 時間で EBV を感染後、C-to-T 変異による緑色蛍光は認められなかった。そこで、C-to-T 変異を検出する方法として 3D-PCR を利用した。本法は、C-to-T 変異により塩基対の水素結合が減少し、DNA の解離温度が低下することを利用した方法であり、DNA に C-to-T 変異が導入されることで、より低い DNA 解離温度で対象遺伝子が増幅される。EBV を感染させ、48 時間後にゲノム DNA を抽出し、3D-PCR を行った。宿主ゲノム遺伝子として、*PI3KCA* と *tp53*、ミトコンドリア遺伝子として *D-loop* (Non-coding displacement loop) と *MT-CO1*、EBV ゲノム遺伝子として、*EBNA1* と *eGFP* を増幅した。宿主遺伝子とウイルス遺伝子に

は感染により、変異の導入は検出されなかった。宿主ゲノムでは、遺伝子修復機能が高いので、ウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG) などの遺伝子修復酵素を阻害する系との組み合わせや、広範なゲノム中の APOBEC がターゲットとする領域の検索が必要と考えられる。

一方、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の遺伝子には C-to-T 遺伝子変異が検出され、特に D-loop 領域に多くの変異が導入されていた (図 2)。D-loop 領域における PCR

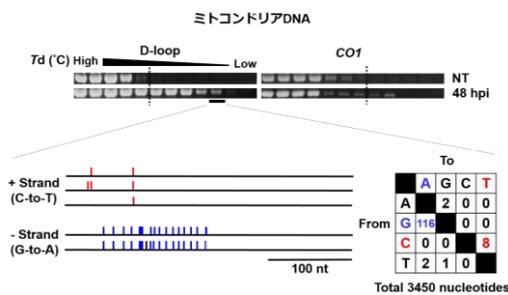


図2. EBV感染によりミトコンドリアDNAにC-to-T変異が導入される

産物を配列解析すると、C-to-T 変異が+鎖で8か所、-鎖で116か所導入されていた。EBV感染のコントロールとしてEBNA1を発現するEpisomal型ベクターを遺伝子導入し、同様に解析したところ、mtDNAに変異は導入されなかった。またEBVを潜伏感染させたAGS-EBV+においても非感染と比較して、mtDNAに変異が導入されていた。従って、EBV感染は胃上皮細胞株のミトコンドリアDNAにC-to-T変異を導入することが明らかとなった。

次に、EBV感染により発現誘導されるAPOBEC3ファミリーについて、それぞれのAPOBEC3遺伝子を導入した発現ベクターを用いて、D-loop領域のC-to-T変異を解析した。APOBEC3発現ベクター2μgをAGS細胞に遺伝子導入後、48時間でDNAを回収し、3D-PCRを行った。APOBEC3A、APOBEC3C、APOBEC3Gの過剰発現下において、mtDNAにC-to-T変異が導入された (図3)。C-to-T変異は、APOBEC3Aでは+鎖で6か所、-鎖で67か所、APOBEC3Cでは+鎖で2か所、-鎖で215か所、APOBEC3Gでは+鎖で2か所、-鎖で41か所導入されていた。特に

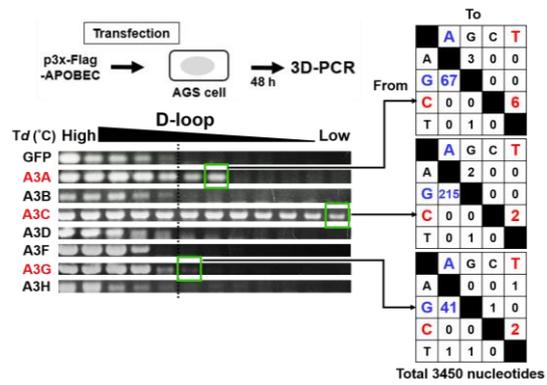


図3. APOBEC3CはミトコンドリアDNAにC-to-T変異を高効率に導入する

APOBEC3CではmtDNAのC-to-T変異が高頻度に導入されており、このmtDNA変異は、発現ベクターの遺伝子導入量に依存して増加したことから、APOBEC3CはmtDNA変異において重要な因子であることが明らかとなった。

次に、EBV感染がAGS細胞におけるmtDNAのコピー数に影響を与える可能性について検討した。EBVをAGS-CD21細胞に感染後、48時間でDNAを回収し、定量的PCRによりミトコンドリア遺伝子MT-tRNAを宿主遺伝子b-2マイクログロブリン($\beta 2M$)で補正して算出した。EBV感染によってmtDNAのコピー数が13%減少した (図4)。

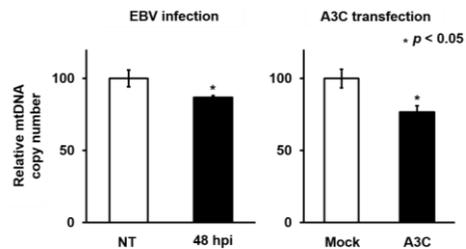


図4. EBV感染とAPOBEC3Cの過剰発現におけるミトコンドリアDNAのコピー数の低下

またAGS-EBV+細胞では非感染AGS細胞と比較して、11.1%減少していた。従ってEBV感染によって胃上皮細胞のmtDNAのコピー数が減少することが明らかとなった。

APOBEC3C発現ベクター2μgをAGS細胞に遺伝子導入後、48時間でDNAを回収し、同様の方法でコピー数を算出したところ、Mockと比較して23.4%減少した (図4)。従って、APOBEC3Cの過剰発現はAGS細胞のmtDNAを減少させることが明らかとなった。

本研究において、EBV感染によりmtDNAにC-to-T変異が導入されていることが明らかとなった。またAPOBEC3の発現が誘導さ

れていることや、APOBEC3C が特に mtDNA の変異に寄与していることが明らかとなった。当初の計画では、宿主ゲノム及びウイルスゲノムにおいても C-to-T 変異が導入されていることを期待していたが、変異は検出できなかった。以前の報告から、遺伝子修復酵素を阻害することによって、遺伝子変異を検出できることが報告されている (Suspène R ら, *PNAS*, 2011, Suspène R ら, *J Virol.* 2011)。従って、宿主ゲノムやウイルスゲノムは遺伝子修復酵素によって高度に保護されていると考えられる。一方で、mtDNA では遺伝子修復酵素を阻害することなく変異を検出することができた。この検出感度の違いは遺伝子コピー数に由来すると考え、宿主ゲノムにおいて 10^5 - 10^6 のコピー数を有する Alu に着目した。AGS 細胞を用いて EBV 感染 48 時間後に 3D-PCR 解析したところ、変異は検出されなかった。これより、mtDNA への変異導入は高いコピー数に由来するものではないことが考えられた。

EBV 感染時及び APOBEC3C の過剰発現時において、mtDNA の D-loop の変異導入とコピー数低下が認められた。D-loop 領域は非翻訳領域であるが複数種のがんで変異が認められている (Lommarini L ら, *Int J Biochem Cell Biol*, 2013)。また複数のがんにおいて、mtDNA コピー数低下と予後悪化に相関性があることが報告されている (Reznik E ら, *eLife*, 2016)。よって、EBV 感染による上皮細胞の腫瘍化において、APOBEC3 の発現と mtDNA の損傷が関わると考えられ、その分子機構を解明することは、腫瘍化リスクの予測や、ウイルスによる腫瘍化の予防治療薬の開発につながる。

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 6 件)

1. 金廣優一、Ricardo Timmy、Kim Hyoji、飯笹久、吉山裕規. EBウイルス感染症

(特集：古くて新しい日和見感染症) .

臨床と微生物, 近代出版 (in press)

2. 金廣優一、Ricardo Timmy、飯笹久、吉山裕規 (共著) EBウイルスの胃上皮細胞への感染と不死化、1-8頁(柳井秀雄、西川潤、清水則夫、吉山裕規編：**EBウイルス関連胃癌**、診断と治療社、東京、2016.
3. 吉山裕規、金廣優一、Kim Hyoji、Muhtar Amrizal、Ricardo Timmy、飯笹久. 感染に伴って起こるがん: Epstein-Barrウイルス関連胃癌を中心に. *島根医学* 36 (3): 1-6, 2016 査読有
4. Iizasa H, Ishihara S, Richardo T, Kanehiro Y, Yoshiyama H. Dysbiotic infection in the stomach. *World Journal of Gastroenterology* 21: 11450-11457, 2015 査読有
5. Tatano Y, Kanehiro Y, Sano C, Shimizu T, Tomioka H. ATP exhibits antimicrobial action by inhibiting bacterial utilization of ferric ions. *Scientific Reports*; 5: 8610, 2015 査読有
6. Nishikawa J, Yoshiyama H, Iizasa H, Kanehiro Y, Nakamura M, Nishimura J, Saito M, Okamoto T, Sakai K, Suehiro Y, Yamasaki T, Oga A, Yanai H, Sakaida I. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Cancers (Basel)* 7;6(4):2259-2274, 2014 査読有
[学会発表] (計 10 件)
1. Kanehiro Y, Richardo T, Kim H, Iizasa H, Yoshiyama H; EBV infection induces APOBEC3-dependent mitochondrial DNA mutation in epithelial cells. *17th International Symposium on EBV and associated diseases*, Zurich, Switzerland, 2016.
2. Yuichi Kanehiro, Timmy Richardo, Hisashi Iizasa, Kim Hyoji, Masamichi Muramatsu, Hironori Yoshiyama: Mitochondrial DNA mutation by

- APOBEC3 in EBV infected gastric epithelial cells **第64回日本ウイルス学会総会**, 札幌, 2016.
3. **金廣 優一**、Timmy Richardo、Hyoji Kim、飯笹 久、吉山 裕規: 胃上皮細胞におけるEBV感染はAPOBEC3の発現誘導を介してミトコンドリアDNAに変異を導入する。 **第30回ヘルペスウイルス研究会**, 東京, 2016.
 4. Timmy Richardo、**金廣優一**、Hyoji Kim、飯笹久、吉山裕規: EBV 感染は胃上皮細胞においてミトコンドリア DNA に変異を誘導する。 **第31回中国四国ウイルス研究会**、鳥取大学農学部大講義室, 鳥取, 2016.
 5. **金廣優一**、富岡祐高、小早川義貴、多田納豊、飯笹久、富岡治明、佐野千晶、吉山裕規: *K. pneumoniae*のAerobactin合成遺伝子*icuBI*はバイオフィルムとジデロフォアを介して病原性に寄与する、 **第89回日本細菌学会**, 大阪, 2016.
 6. Hyoji Kim、飯笹久、**金廣優一**、Timmy Richardo、吉山裕規: Evaluation of genetic instability of cells infected with Epstein-Barr virus. **第63回日本ウイルス学会学術集会**, 福岡, 2015.
 7. Timmy Richardo、飯笹久、**金廣優一**、吉山裕規: EBV感染に伴う細胞ゲノム不安定性について。 **第12回EBウイルス研究会 -国際学術集会-**. 出雲, 2015.
 8. **金廣優一**、富岡祐高、小早川義貴、多田納豊、飯笹久、富岡治明、佐野千晶、吉山裕規: *Klebsiella pneumoniae* のAerobactin はバイオフィルム形成に重要な病原因子である。 **第88回日本細菌学会総会**, 岐阜, 2015.
 9. **金廣優一**、富岡祐高、小早川義貴、多田納豊、飯笹久、富岡治明、佐野千晶、吉山裕規. *Klebsiella pneumoniae* におけるバイオフィルム形成とAerobactinについての基礎的検討。 **第67回日本細菌学会中国・四国支部総会**, 徳島,

2014.

10. **金廣優一**、富岡祐高、小早川義貴、多田納豊、富岡治明、佐野千晶. 肺炎桿菌のバイオフィルム形成能と病原性発現におけるAerobactinの機能解析。 **第87回日本細菌学会総会**, 東京, 2014.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等
<http://yoshiyama-lab.org>

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
金廣 優一 (KANEHIRO, Yuichi)
 島根大学・医学部・助教
 研究者番号：60609197

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()