

令和 元年 8 月 30 日現在

機関番号：10101  
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
研究期間：2016～2018  
課題番号：15KK0324  
研究課題名（和文）Epstein-Barrウイルス感染細胞が放出するエクソソームの機能解析（国際共同研究強化）  
  
研究課題名（英文）Characterization of exosomes released from Epstein-Barr virus-infected cells  
(Fostering Joint International Research)  
  
研究代表者  
南保 明日香（Nanbo, Asuka）  
  
北海道大学・医学研究院・准教授  
  
研究者番号：60359487  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円  
渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：普遍的なヘルペスウイルスであるEpstein-Barrウイルス(EBV)は一部の例においてがんを引き起こすことが知られている。近年、EBV感染細胞がエクソソームと呼ばれる微小な粒子を放出し、これを取り込んだ標的細胞の性質を変えることで、EBV関連がん発症へ関与する可能性が示唆されている。本研究ではEBV感染細胞が放出するエクソソームの機能を明らかにする目的で、エクソソームに含まれる核酸（マイクロRNA）の種類を網羅的に解析した。その結果、EBV感染によって、エクソソーム量が増えること、また、特定のマイクロRNA がエクソソームに高度に濃縮されることが明らかになった

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん細胞から放出されたエクソソームが、特定のマイクロRNA を標的細胞に供給することで、がんの増殖や転移に関与することが報告されつつある。また、特定のマイクロRNA ががんの早期段階で発現し、エクソソームを介して血液中に放出される現象を利用し、血液中のマイクロRNA の量を測定することで、がんの早期発見や診断法に応用できるものと期待されている。今後、本研究を発展させることで、EBV関連がん発症メカニズムの詳細な解明につながることを期待される。また、本研究で同定された、エクソソームに濃縮される特定のマイクロRNA を対象として、EBV関連がんの診断法の実現につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Infection of Epstein-Barr virus (EBV), a ubiquitous human herpesvirus, is associated with various malignancies. EBV-infected cells have been shown to secrete extracellular micro vesicles, exosomes, which possess various functions by transferring sets of proteins, lipids and RNAs to the recipient cells.

Although accumulating evidence demonstrates that exosomes released from EBV-infected cells transfer viral factors including microRNAs to recipient cells, little is known about their roles in vital lifecycle. Here, we found that the biogenesis of exosomes is upregulated in infected cells. We also observed that several specific microRNAs were predominantly incorporated in the exosomes released from infected cells, potentially contributing to phenotypic changes in cells receiving these exosomes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Epstein-Barrウイルス エクソソーム microRNA EBV関連がん

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 新たな細胞間コミュニケーション媒体の1つとして注目されているエクソソームは、様々な細胞種から放出される直径 60-130 nm の細胞外小胞である。標的細胞に取り込まれたエクソソームは 供給細胞由来のタンパク質、マイクロ RNA (miRNA)、mRNA などを標的細胞へ輸送することで多様な生理機能を示す。近年、がんを始めとした様々な疾患とエクソソームとの関連に注目が集まっている。例えば、がん細胞が放出するエクソソームは、がんに対する免疫応答の抑制、およびがん細胞の転移能や浸潤性の増強などの機能を介してがんの進展に寄与する可能性が示されている。さらに、がん細胞においてエクソソームの分泌が増強していること、また、これらのエクソソームが特異的な腫瘍マーカーを保持していることから、新たなバイオマーカーとしてのエクソソームの有用性が期待されている。

(2) ヒト  $\gamma$ -ヘルペスウイルスに属する Epstein-Barr ウイルス(EBV)は B 細胞および上皮細胞に指向性を示す普遍的な 2 本鎖 DNA ウイルスであり、初感染後ヒトに終生持続感染する。EBV は、ほとんどの場合不顕性を示す一方で、一部の例において、パーキットリンパ腫、上咽頭がん、胃がん等の様々ながんに関連することが知られている。従来、EBV 感染細胞が放出するエクソソームが種々のウイルス因子を標的細胞に運搬することが報告されていた。しかしながら、従来の研究の多くは、特定のウイルス因子を強制発現した細胞から放出されたエクソソームを用いて行われていたことから、これらの研究成果は生理的条件を反映していない可能性があった。これに対して研究代表者は、EBV 感染細胞由来エクソソームの標的細胞での機能解析を試み、EBV 感染細胞由来エクソソームがカベオラ依存的エンドサイトーシスを介して非感染上皮細胞へ取り込まれること、さらに EBV 感染 B 細胞から放出されるエクソソームを取り込んだ標的上皮細胞において、非感染細胞由来エクソソームと比較して、細胞増殖および接着因子である intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)発現が促進することを明らかにした(Nanbo *et al.* 2013)。以上の結果から、EBV 感染細胞が放出するエクソソームは、これに内包される何らかの生理活性因子を標的細胞に輸送することで形質変動を賦与する可能性が示唆された。研究代表者は、その候補因子の1つとして、EBV がコードするがん遺伝子 latent membrane protein (LMP)1 が、ICAM-1 の発現増強に寄与することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

(1) EBV は、BART ならびに BHRF1 の 2 つの領域にコードされる 49 種類の miRNA を発現する。従来、エクソソームを介して、EBV miRNA が標的細胞に輸送されることが報告されていたが、その生理的役割については不明であった。また、EBV 感染によって細胞内 miRNA の発現様式が変動することが知られていたが、エクソソームに内包される miRNA の発現様式についてはほとんど報告がなかった。そこで本研究では、同一のパーキットリンパ腫患者から樹立された感染様式の異なる B 細胞株を用いて、次世代シーケンシングにより、エクソソームに内包される miRNA の網羅的同定を行い、EBV 感染がその発現様式に与える影響を検討した。

(2) 従来の報告から、EBV 感染の上皮細胞への主要な感染経路として、ウイルス感染 B 細胞との細胞間接触を介する可能性が示されているが、その分子機構には不明な点が多い。これに対して研究代表者は、これまで、細胞間接触を介した上皮細胞への EBV 感染に、種々の細胞内情報伝達系 (Nanbo *et al.* 2012)、ならびに、種々の接着因子が関与することを証明した (Nanbo *et al.* 2016)。以上の研究成果から、EBV 感染 B 細胞と上皮細胞が細胞間接触を介して近接することで、感染細胞由来エクソソームが効率良く上皮細胞に取り込まれ、接着因子の発現誘導を介して EBV 伝播に寄与する可能性が示唆された。そこで、本研究では、この仮説を検証することを目的として、細胞間接触を介する EBV 伝播におけるエクソソームの役割について解析した。

## 3. 研究の方法

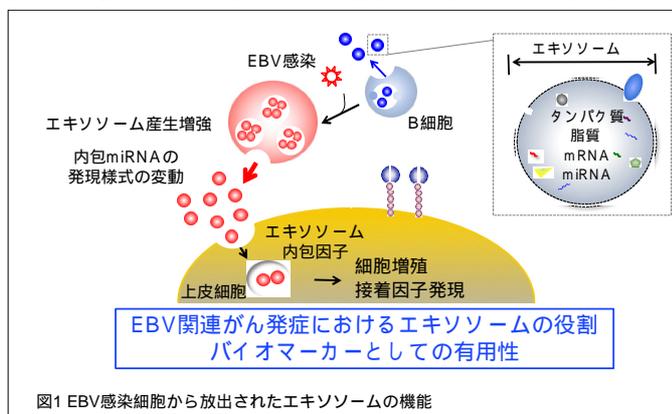
1) EBV の潜伏感染様式には I, II, III 型の 3 種が存在し、それぞれ発現するウイルス遺伝子の種類が異なる。本研究では、同一のパーキットリンパ腫患者から樹立された、EBV 陰性、I 型あるいは III 型潜伏感染 Mutu 細胞株(それぞれ Mutu-, Mutu I, Mutu III)の培養上清から超遠心法によりエクソソームを単離し、内包される宿主ならびに EBV 由来 miRNA について次世代シーケンシングにより解析を行い、その発現様式を、細胞に発現する miRNA と比較した。また、各種 Mutu

細胞でのエキソソーム産生の場合である多胞体形成、ならびにエキソソーム産生を、マーカーである CD63 を指標として、それぞれ、免疫染色法とウエスタンブロット法で検討した。

(2) 細胞間接触を介する上皮細胞へのウイルス伝播でのエキソソームの役割を、以下の方法により検証した。EBV 感染パーキットリンパ腫 Akata 細胞株から放出したエキソソームを精製し、上皮細胞を処理した。その後、上皮細胞と GFP をゲノムに挿入した組換え EBV が潜伏感染した B 細胞との共培養を行い、上皮細胞への EBV 伝播を GFP の発現を指標として評価した。また、エキソソーム産生に寄与する宿主因子である Rab27 発現を shRNA によって抑制した GFP-EBV 感染 B 細胞を用いて、上皮細胞と共培養し、EBV 伝播効率に与える影響を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) Mutu, Mutu I と比較して、Mutu III では、エキソソーム産生の場合である多胞体形成ならびにエキソソーム産生量が顕著に増加していた。また、各種エキソソームに内包された miRNA 上位 40 種について次世代シーケンシングにより解析・比較したところ、Mutu I 由来エキソソームにはウイルス由来 miRNA が 3 種認められたのに対し、Mutu III 由来エキソソームには 9 種の EBV miRNA が同定された。さらに、Mutu III 由来エキソソームには、他のエキソソームと比較して、5 種の特定の miRNA が高濃度(100 倍以上)に濃縮されることが示された。これらの高濃縮 miRNA の配列を検証したところ、エキソソームへの選択的な取り込みに関与すると報告されている特異的なモチーフ (EXOmotif) が存在した (Cancers, 2018)。以上の結果から、III 型潜伏感染はエキソソーム産生ならびにエキソソームに内包される miRNA の発現様式を変動することが証明された。研究代表者は先行研究で、Mutu III 由来エキソソームを処理した上皮細胞で細胞増殖や接着因子発現が促進することを解明した。すなわち、以上の結果から、Mutu III 由来エキソソームに選択的に内包される miRNA が、標的細胞の形質を変動させることで EBV 関連がんの発症に寄与する可能性が示唆された(図 1)。また、現時点において、EBV 関連がんの診断に有用なバイオマーカーは報告されていない。従って、今後、本研究において同定された感染細胞由来エキソソームに特異的かつ高濃度に内包される miRNA の、バイオマーカーとしての有用性が期待される。



(2) 細胞間接触を介するウイルス伝播における EBV 感染細胞由来エキソソームの役割について検討するため、EBV 感染 Akata 細胞株由来エキソソームを処理した上皮細胞、あるいは Rab27 発現を抑制した GFP-EBV 潜伏感染 B 細胞を用いて、上皮細胞への EBV 伝播への影響を調べた。その結果、いずれの場合においても、EBV 伝播への顕著な影響は認められなかった。そこで、共培養した細胞から放出されるエキソソーム以外の液性因子の役割について検討を行った結果、上皮細胞から放出された transform growth factor (TGF)-beta が、EBV 感染 B 細胞に作用し、ウイルス増殖を惹起することで、EBV 伝播に貢献することを解明した (Nanbo *et al.* Front Microbiol, 2018)。

従来の報告から、マウスに移植した EBV 感染 B 細胞株での miRNA 発現が、移植前と比較して著しく増加することが示されている。本研究においてエキソソームの EBV 伝播への顕著な影響が認められなかった理由の 1 つとして、*in vitro* の系で解析を行った点が挙げられる。従って、今後ヒト化マウスを用いた *in vivo* の EBV 感染系を用いて、この過程でのエキソソームの役割をさらに検討することが望まれる。

(3) (2) の解析を進める過程で、EBV 粒子の成熟に関与する細胞内小器官の同定に成功した。従来、EBV は他のヘルペスウイルスファミリーと同様に、トランスゴルジネットワーク由来の小胞で成熟する可能性が示されていたが、実証はされていなかった。研究代表者は、電子顕微鏡観察ならびに免疫染色法によって、EBV の粒子形成が、他のヘルペスウイルスファミリーとは異なり、主にシスゴルジ体で生ずることを解明した (Nanbo *et al.* Front Microbiol, 2018)。

5 . 主な発表論文等  
( 研究代表者は下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 16 件 )

Fujioka Y, Satoh AO, Horiuchi K, Fujioka M, Tsutsumi K, Sasaki J, Nepal P, Kashiwagi S, Paudel S, Nishide S, Nanbo A, Sasaki T, Ohba Y, A peptide derived from phosphoinositide 3-kinase inhibits endocytosis and influenza virus infection, *Cell Struct Funct*, 査読有, pii: E48, 2019  
DOI: 10.1247/csf.19001

Zhao M, Nanbo A, Sun L, Lin Z, Extracellular Vesicles in Epstein-Barr Virus' Life Cycle and Pathogenesis, *Microorganisms*, 査読有, Vol. 7, No. 2, 2019  
DOI: 10.3390/microorganisms7020048

Nanbo A, Kawaoka Y, Molecular Mechanism of Externalization of Phosphatidylserine on the Surface of Ebola Virus Particles, *DNA Cell Biol*, 査読有, Vol. 38, No. 2, pp. 115-120, 2018  
DOI: 10.1089/dna.2018.4485

Nanbo A, Ohba Y, Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway, *J Infect Dis*, 査読有, Vol. 218, pp S388-S396, 2018  
DOI: 10.1093/infdis/jiy460

Nanbo A, Katano H, Kataoka M, Hoshina S, Sekizuka T, Kuroda M, Ohba Y, 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, *Cancers*, 査読有, Vol. 10, No. 7, pii: E237, 2018  
DOI: 10.3390/cancers10070237

Nanbo A, Ohashi M, Yoshiyama H, Ohba Y, The Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Cell-to-Cell Contact-Mediated Epstein-Barr Virus Transmission, *Front Microbiol*, 査読有, Vol. 9, 984, 2018  
DOI: 10.3389/fmicb.2018.00984

Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Suzuki T, Kato I, Fukuhara H, Fujioka M, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Kashiwagi S, Wang J, Horiguchi M, Sato Y, Paudel S, Nanbo A, Miyazaki T, Hasegawa H, Maenaka K, Ohba Y. A Sialylated Voltage-Dependent  $Ca^{2+}$  Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host Microbe*, 査読有, Vol. 23, pp. 809-818, 2018  
DOI: 10.1016/j.chom.2018.04.015

Nanbo A, Noda T, Ohba Y, Epstein-Barr Virus Acquires Its Final Envelope on Intracellular Compartments With Golgi Markers, *Front Microbiol*, 査読有, Vol. 9, pp. 454, 2018  
DOI: 10.3389/fmicb.2018.00454

Nanbo A, Maruyama J, Imai M, Ujie M, Fujioka Y, Nishide S, Takada A, Ohba Y, Kawaoka Y, Ebola virus requires a host scramblase for externalization of phosphatidylserine on the surface of viral particles, *PLoS Pathog*, 査読有, Vol. 14, No. 1, e1006848, 2018  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006848

Horiguchi M, Fujioka M, Kondo T, Fujioka Y, Li X, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Nishide S, Nanbo A, Teshima T, Ohba Y, Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Stru. Func*, 査読有, Vol. 42, No. 1, pp. 15-26, 2017  
DOI: 10.1247/csf.16019

Furuyama W, Marzi A, Carmody AB, Maruyama J, Kuroda M, Miyamoto H, Nanbo A, Manzoor R, Yoshida R, Igarashi M, Feldmann H, Takada A, Fc $\gamma$ -receptor IIa-mediated Src Signaling Pathway Is Essential for the Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection. *PLoS Pathog*, 査読有, Vol. 12, No. 12, e1006139, 2016  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006139

Nanbo A, Kachi K, Yoshiyama H, Ohba Y, Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission rather than a virological synapse, *J Gen Virol*, 査読有, Vol. 97, No. 11, pp. 2989-3006, 2016  
DOI: 10.1099/jgv.0.000605

Yamada T, Tsuda M, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M, Ohba Y, Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand induces cell adhesion and integrin  $\alpha$ 2 expression via NF- $\kappa$ B in head and neck cancers. *Sci Rep*, 査読有, Vol. 6, 23545, 2016  
DOI: 10.1038/srep23545

Inuzuka T , Fujioka Y , Tsuda M , Fujioka M , Satoh AO , Horiuchi K , Nishide S , Nanbo A , Tanaka S , Ohba Y, Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C, Sci Rep, 査読有 , Vol. 6, 21613, 2016

DOI: 10.1038/srep21613

Furuyama W , Marzi A , Nanbo A , Haddock E , Maruyama M , Miyamoto H , Igarashi M , Yoshida R , Noyori O , Feldmann H , Takada A : Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy, Sci Rep, 査読有 , Vol. 6, 20514, 2016

DOI: 10.1038/srep20514

Kuroda M , Fujikura D , Nanbo A , Marzi A , Noyori O , Kajihara M , Maruyama J , Matsuno K , Miyamoto H , Yoshida R , Feldmann H , Takada A, The Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for the Cellular Entry of Ebola Virus. J Virol , 査読有 , Vol. 89, No. 12, pp. 6481-6493, 2015

DOI: 10.1128/JVI.03156-14

〔学会発表〕(計 14 件)

南保 明日香 , 大場 雄介, Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018

南保 明日香 , 大橋 誠 , 吉山 裕規 , 大場 雄介, 細胞間接触を介した Epstein-Barr ウイルス感染機構における TGF- $\beta$  の役割, 第 15 回 EBV 研究会, 2018

南保 明日香 , エボラウイルスの細胞内侵入機構の解明, 第 30 回北海道輸血シンポジウム (招待講演) , 2018

南保 明日香 , Understanding of molecular mechanism of Ebola virus entry, 第 17 回あわじしま感染症・免疫フォーラム (招待講演) , 2018

南保 明日香 , エボラウイルスエンベロープへのホスファチジルセリン集積に関する宿主スクランブラーゼの同, 7th Negative Strand Virus-Japan, 2018

Nanbo A , Maruyama J , Komatsu H , Watanabe T , Fujimuro M , Takada A , Ohba Y , Kawaoka Y , EBOV requires a host scramblase for its efficient entry, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017

Nanbo A , Maruyama J , Watanabe T , Fujimuro M , Ohba Y , Takada A , Kawaoka Y , EBOV requires a host scramblase for its efficient entry, 9th International Symposium on Filoviruses, 2017

南保 明日香 , 加持 邦弘 , 吉山 裕規 , 大場 雄介, 細胞接触を介した Epstein-Barr ウイルス感染機構における分子機構の解明, 第 14 回 EBV 研究会, 2017

南保 明日香 , Bill Sugden, 大場雄介, Epstein-Barr ウイルス粒子出芽機構に関する研究, 第 31 回ヘルペスウイルス研究会, 2017

Nanbo A , Katano H , Yoshiyama H , Characterization of exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016

Nanbo A , Kachi K , Yoshiyama H , Ohba Y , Trafficking of adhesion molecules via recycling endosomes is crucial for cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission, The Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, 2016

Nanbo A , Trafficking of adhesion molecules via recycling endosomes is crucial for cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015

Nanbo A , Characterization of exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells, 第 12 回 EB ウイルス研究会, 2015

Nanbo A , Bio-imaging of entry process of Ebolavirus, 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, 2015

〔図書〕(計 2 件)

南保 明日香 , 診断と治療社、EB ウイルス関連胃癌、2016、16-20

南保 明日香 , 診断と治療社、EB ウイルス、2015、39-46

〔その他〕

ホームページ等

<http://cp.med.hokudai.ac.jp>

プレスリリース(2018)

EB ウイルス感染細胞がまき散らす粒子の性質を解明

~EB ウイルスが引き起こすがん発症の解明と診断への応用に期待~

[https://www.hokudai.ac.jp/news/180806\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/180806_pr.pdf)

## 6 . 研究組織

### 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ビル サグデン

ローマ字氏名：Bill Sugden

所属研究機関名：ウィスコンシン大学マディソン校

部局名：マッカードル癌研究所

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：大場 雄介

ローマ字氏名：OHBA Yusuke

研究協力者氏名：Bill Sugden

ローマ字氏名：Bill Sugden

研究協力者氏名：吉山 裕規

ローマ字氏名：YOSHIYAMA Hironori

研究協力者氏名：片野 晴隆

ローマ字氏名：KATANO Harutaka

研究協力者氏名：野田 岳志

ローマ字氏名：NODA Takeshi

研究協力者氏名：大橋 誠

ローマ字氏名：OHASHI Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。