

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09360

研究課題名(和文) EBV特異的なエクソソームおよびIFNシグナル制御を介した胃発がん機構

研究課題名(英文) Mechanisms of gastric carcinogenesis mediated by the EBV-specific exosome and IFN signaling

研究代表者

岩切 大 (IWAKIRI, DAI)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・高度先進医療研究室・リサーチアソシエイト

研究者番号：10307853

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)：EBウイルス(EBV)感染胃がんから、EBER(EBV-encoded small RNA)がエクソソーム輸送を介して細胞外に放出され、それを取り込んだ細胞のtoll-like receptor 3 (TLR3)からのシグナル伝達を活性化し細胞の増殖を促進すること、さらにそれはEBV感染細胞特異的にエクソソームにより誘導されるインターフェロン(IFN)シグナルによっておこなわれてい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

我々は、我が国の胃がんの約1割を占めるEBウイルス陽性胃がんの発生メカニズムについての研究をおこなっている。これまでの研究により、EBウイルスの小RNAであるEBERが、宿主の免疫機構を巧みに調節し、細胞を悪性化へと導くことでがんの発生に寄与していることが明らかになり、EBウイルス陽性胃がんの新たな治療法の開発へとつながることが期待される知見が得られることとなった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that EBV-encoded small RNA (EBER) is released by EBV-infected gastric cancer (GC) cells through the exosome secretion and exosomal transfer of EBER triggers the signaling from toll-like receptor 3 in the recipient cells. EBER-mediated activation of TLR3 signals led to the growth promotion of EBV-infected GC cells. Further study revealed that EBV-dependent regulation of interferon (IFN) signaling induced by exosomes contributes to the growth promotion of EBV-infected GC cells, suggesting that EBV-specific IFN signaling contributes to gastric carcinogenesis.

研究分野：腫瘍ウイルス学

キーワード：EBV EBER 胃がん エクソソーム インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

EB ウイルス(EBV)は広くヒトに感染し、伝染性単核症(IM)を始め、慢性活動性 EBV 感染症(CAEBV)、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)といった難治性疾患、さらにバーキットリンパ腫(BL)や T/NK リンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭がんや胃がんといった種々のがんとの関連でも知られる DNA ウイルスである。このうち、日本人の主要ながんの一つである胃がんに関しては、我が国の胃がん全体のうちおよそ 10%において、EBV が関連していることが明らかになっている。

胃がんと病原微生物との関連では、ヘリコバクター・ピロリ(HP)による発がん機構の研究が国内外において行われていて、HP の発がんにおける役割の詳細が明らかとなってきている。一方 EBV 陽性胃がんでは、胃がん細胞の 100%に EBV が感染しており、EBV の胃発がんにおける役割を明らかにすることも胃がん研究において重要な位置を占めるものと考えられる。

申請者らはこれまで、EBV による発がん機構に関して研究を行い、ウイルス遺伝子のひとつである EBV-encoded small RNA (EBER)とよばれる non-coding RNA(ncRNA)が発がんにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。EBER はすべての EBV 感染細胞において多数コピー存在し、部分的に 2本鎖 RNA(dsRNA)構造をとると推測される、およそ 170bp ほどの小 RNA である。EBER はこれまでの申請者らの研究で明らかにされた以下のような活性により、発がんにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。

- 1)EBER は BL 細胞では IL-10、T 細胞では IL-9、上皮細胞ではインスリン様増殖因子(IGF)1 の発現を誘導し、EBV 感染がん細胞の増殖を促進する。
- 2) EBER は宿主の dsRNA 認識分子 RIG-I と相互作用し、これを活性化して下流のシグナル伝達を誘導、インターフェロン誘導を引き起こす一方でその抗ウイルス作用を抑制し、IRF3 の活性依存的に IL-10 を誘導することにより BL 細胞の増殖促進をもたらす。つまり EBER による RIG-I シグナルの活性化は発がんに寄与している (Samanta et al. EMBO J.25:4207-4214, 2006, Samanta et al. Oncogene 27:4150-4160, 2008)。

一方、その後申請者らは、EBER が細胞外に放出されて機能するというを新たに見出した。EBER は EBV 感染リンパ球より細胞外へ放出され、放出された EBER が免疫系細胞の TLR3 シグナルを活性化することが明らかになり、さらに IM や CAEBV、EBV-HLH といった活動性 EBV 感染症患者血清中には放出された EBER が多量に存在し、それが TLR3 シグナルを介し免疫系細胞を活性化することがわかり、EBER による TLR3 シグナルを介した免疫系の活性化が病態の形成に寄与する可能性が示された (Iwakiri et al. J Exp Med. 206: 2091-2099, 2009)。この結果は、ウイルス RNA の細胞外への放出がウイルスによる病原性発現機構として存在しうることを示すものである。以上の申請者らの研究成果は、宿主の免疫防御分子である RIG-I や TLR3 が、EBV 感染細胞においては恒常的なシグナル活性化の標的となり、結果ウイルスの病原性発現に貢献するというメカニズムを示すこととなった。なお EBER の細胞外への放出と免疫系活性化に関する報告は申請者らに続き他の研究施設からも報告されている。

これらの知見をふまえ、その後申請者は EBER による自然免疫シグナル修飾が胃がんの発生にも関与しているという仮説のもとに研究を行っている。EBV の胃上皮細胞への持続感染系を用いて行ってきた解析により、以下のようなことが明らかになった。

1. EBER は EBV 陽性胃がん細胞から細胞外に放出され、放出された EBER は胃上皮細胞の TLR3 シグナルを活性化し、インターフェロン(IFN)の産生が誘導される。
2. TLR3 シグナル活性化により、EBV 陽性胃がん細胞の増殖因子である IGF1 の産生が誘導され、その誘導は TLR3 活性化により産生誘導される IFN の作用によりおこる。
3. EBV 陽性胃がん細胞より分泌されるエクソソームには EBER が含まれていて、エクソソームはそれを取り込んだ細胞の IFN 産生を誘導する。

以上の結果は、エクソソームを介して分泌される EBER による TLR3 シグナルの活性化で誘導される IFN が、実は胃がん発生に寄与するというを示唆するものである。抗ウイルス因子であるはずの IFN が、本来の作用とは相反して、ウイルス感染細胞の増殖促進に働くという機構の存在が示唆され、このエクソソームにより惹起される IFN シグナルが胃がんの発生に寄与している可能性が示されたことになる。エクソソームの機能に関しては、近年がん細胞より分泌されるエクソソームに含まれるマイクロ RNA(miRNA)に関する研究が進展し、機能性の miRNA の発がんにおける役割の重要性も明らかにされつつある。また EBV 感染細胞からも機能性のエクソソームが分泌されるということが最近報告されている。しかし EBV 感染胃がん細胞から分泌される、EBER や miRNA を含んだエクソソームが胃上皮においてどのような機能を果たしているのか、また胃がん発生にどのように関わっているのかについての詳細はまだ不明であり、特にエクソソームにより惹起される IFN シグナルが EBV 感染胃がん細胞においてどのように制御され、細胞増殖に働くのかについても明らかになっていない。

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究では EBV 感染による胃がんの発生に関して、エクソソームに含まれる EBER や miRNA といった ncRNA の発がんにおける役割、またエクソソームにより惹起される IFN シグナル伝達機

構について明らかにし、それを標的とした新規の EBV 陽性胃癌治療法の開発を目標にする。その柱となるのはエクソソーム放出やその取り込みを起点とする EBV 陽性胃癌細胞に特異的で EBER や miRNA が関与する、IFN シグナル制御も含めた細胞増殖促進機構の解明である。細胞外の ncRNA は EBV 感染胃粘膜上皮において、局所における炎症の惹起、慢性化、細胞増殖制御の破綻から発がんへと至る過程に寄与すると予想される一方で、ncRNA とは別のエクソソーム含有因子による炎症性シグナルが惹起されている可能性も考えられる。本研究では EBV 感染胃癌細胞由来のエクソソームの活性やその取り込み機構、それを細胞増殖へとつなげる IFN シグナルを介したシグナル伝達機構を明らかにし、発がんに至るシグナル活性化の制御法を見出すことを目的として行うものである。

3. 研究の方法

1) EBV 感染細胞におけるエクソソームを介した EBER 放出機構についての検証

EBV 感染細胞株の培養上清よりエクソソームを抽出し、得られたエクソソームから RNA を抽出、RT-PCR 法で EBER の検出を行う。エクソソームの抽出の確認は、マーカー蛋白質である CD63 や Rab-5b 等の存在の有無をチェックして行う。また種々の EBV 感染胃癌細胞や他の上皮細胞株で EBER がエクソソームに存在するかどうかを検証、さらにエクソソーム放出の阻害剤などを用いた実験を行い、エクソソーム輸送依存的に EBER が細胞外に放出されていることも確認する。

2) エクソソームに含まれる miRNA の網羅的解析

EBV 感染胃癌細胞より分泌されるエクソソームに含まれる miRNA について、miRNA アレイを用い網羅的に解析する。また、EBV 非感染細胞も用い、含まれる miRNA の比較検討を行う。EBV 感染細胞特異的に含まれる miRNA が同定されれば、それは EBV 依存的に分泌されていると推測され、その機能予測から、胃癌細胞の増殖に関わると予想されるものを中心に、miRNA の細胞内導入などで細胞増殖に与える影響を調べるなど、実際の機能を探っていく。

3) エクソソームによる TLR3 シグナル活性化とその意義に関する検討

EBV 感染胃癌細胞由来のエクソソームを取り込んだ細胞では TLR3 シグナルの活性化がおこる。そこでこの TLR3 シグナルについてさらに以下のような解析を行う。

1. EBV 感染細胞培養上清よりエクソソームを抽出、細胞に投与し、IFN および炎症性サイトカイン産生などについて検証する。産生誘導に関して、加えるエクソソーム量への依存性があるかどうかについても検証する。IFN は IGF1 を誘導することが既にわかっているので、エクソソーム誘導性 IFN の IGF1 産生誘導の有無とその細胞増殖促進効果についても解析を行う。増殖が促進されれば抗 IFN 抗体が細胞増殖抑制効果をもつかどうかについても検証する。

2. 1 で得られた結果をもとに、さらに野生型 EBV 感染細胞、EBER 欠損 EBV 感染細胞を用いた比較も行い、EBER の存在の有無でエクソソームによるサイトカイン産生誘導や細胞増殖促進に違いがみられるか否かについて検証する。

4) EBV 感染による IFN シグナル制御機構についての解析

EBV 感染細胞と非感染細胞を用い、mRNA やタンパク質アレイなどにより、インターフェロン調節因子 (IRF) など IFN シグナル関連遺伝子の発現の違いについて検証する。EBV 感染細胞特異的に抑制あるいは誘導されている IFN シグナル関連遺伝子があれば、それらの機能が EBV 感染胃癌細胞における IFN シグナル伝達とそのアウトプット(サイトカインや IGF1 産生)に関連していると予想されるため、後述の実験解析につなげていく。

5) EBV 感染細胞特異的な IFN シグナル制御の役割についての検証

先述の実験で同定された EBV 感染特異的に変化している IFN シグナル関連因子について、発現抑制されている因子については強制発現を、また発現誘導されているものがあればロックダウン実験などを行い、EBV 感染細胞における IFN 産生に与える影響について調べる。またエクソソーム取り込みにより IFN の産生が誘導される場合、それらの因子の発現誘導やロックダウンでエクソソーム刺激による IFN 産生がどう変化するかについても調べる。

さらに EBV 感染細胞特異的に抑制あるいは誘導されている IFN シグナル関連因子の導入あるいはロックダウン下の状況で、エクソソーム刺激による IGF1 産生および細胞増殖促進がどう変化するかについて検証する。同時にリコンビナント IFN を用いた刺激実験も行う。

一連の実験により、EBV 感染細胞特異的な IFN シグナル制御がエクソソーム取り込みを発端とする IFN 産生誘導およびその後の IGF1 の産生誘導、細胞増殖促進において果たしている役割を明らかに出来ると考えられる。

6) エクソソーム誘導性シグナルによる遺伝子発現変化の網羅的解析

EBV 感染胃癌細胞から放出されるエクソソームの刺激によって、それを取り込んだ細胞の遺伝子発現がどう変化するかについて、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析、IFN 誘導性因子とは別の、発がんに関わる因子に変化がないかどうかを検証する。そのような変化が認められた場合、エクソソーム内の EBER の存在の有無の影響についても、EBER 欠損 EBV 感染細胞由来のエクソソームを用いて同様の解析を行う。そして対象となる遺伝子 (EBER の存在の影響のあるものもないものも共

に)の強制発現やノックダウンなど種々の方法で細胞の形質に与える影響を調べ、発がんと関連をあきらかにしていく。

7) EBER 発現と細胞内 miRNA の関連性についての検討

EBV 感染胃癌細胞内の miRNA について、非感染細胞、および EBER 欠損ウイルス感染細胞との比較を miRNA アレイ解析により行う。EBV 感染により影響を受けるもの、さらにそれが EBER 依存的に影響をうけているのかがその結果により推測できる。EBER 依存的に発現が変化しているものについては、EBER 安定発現細胞を用いての実験でこれを再確認する。さらにその発現変化がエクソソーム輸送によってもたらされているのかどうかについてはエクソソーム内の miRNA 解析の結果と比較検討して推測出来、対象となる miRNA の機能解析を行うことにより、EBV 感染胃癌細胞特異的なエクソソーム輸送による細胞内 miRNA 量の制御の細胞増殖に与える影響、がん化との関わりなどが明らかになっていくものと予想される。一連の実験により、EBV 感染胃癌細胞特異的な、そこから放出されるエクソソームを介した宿主細胞の miRNA 制御機構の一端を明らかにできると考えられる。

8) EBER 放出阻害による、EBER 誘導性シグナル抑制効果についての検討

エクソソーム分泌阻害剤が EBV 感染胃癌細胞の TLR3 シグナル活性化や増殖に与える影響について、IFN 等のサイトカイン産生が低下するかどうか、IGF1 産生が低下し細胞増殖が抑制されるかどうか等を調べる。

4. 研究成果

本研究により得られた結果は以下の通りである。

1) 樹立した種々の EBV 感染胃癌細胞の培養上清からエクソソームを抽出、そこから RNA をさらに抽出して EBER の検出を試み、用いた全ての EBV 感染胃癌細胞由来のエクソソームで EBER の存在を確認した。さらにエクソソーム分泌の阻害剤により、培養上清中の EBER の量が減少したことから、EBER がエクソソーム依存的に放出されていることがわかった。一方胃癌細胞以外の EBV 感染細胞株(B リンパ腫、T/NK リンパ腫細胞株など)でエクソソームを抽出し、EBER の存在を確認した。このことから EBER のエクソソームへの取り込みおよび放出は、種々の EBV 感染細胞において普遍的に起こっているものと考えられた。さらに EBV 非感染細胞に EBER を安定発現させた細胞でも、同様にエクソソーム依存的な EBER 放出が認められたことから、EBER の放出は EBV 感染に依存していないことが明らかになった。

2) EBV 感染細胞と非感染細胞を用いてその培養上清のエクソソームに含まれる miRNA について網羅的な解析をおこない、EBV 感染細胞に特異的と思われる miRNA の存在が確認された。このうちその機能が細胞増殖に関わると予想されるものについて、それらが関連している細胞増殖シグナルへの影響について現在検証中である。

3) EBER を含んだエクソソームが惹起するシグナル伝達について解析し、エクソソーム刺激を受けた細胞(レシピエント細胞)では I 型インターフェロン(IFN)の産生が誘導されることがわかった。この IFN 産生は TLR3 のノックダウンにより抑制されたことから、エクソソームを取り込んだ細胞では TLR3 シグナル活性化を介して IFN 産生が誘導されると考えられた。さらに EBER 欠損 EBV 感染細胞由来のエクソソームでは野生型 EBV 感染細胞由来のエクソソームに比して IFN 産生誘導が低下したことから、エクソソーム内に含まれる EBER がレシピエント細胞の TLR3 シグナル活性化に寄与していることが示唆された。一方、エクソソームによる刺激で、EBV 胃癌細胞の増殖因子である IGF1 の産生が誘導され、細胞増殖促進を行っていることも明らかになった。

4) EBV 感染胃癌細胞と非感染細胞の遺伝子発現の DNA マイクロアレイによる比較解析から、EBV 感染細胞では、非感染細胞に比して複数の IFN 誘導性遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。これらについて、EBV 感染、非感染細胞での発現量の比較、および野生型 EBV 感染細胞と EBER 欠損 EBV 感染細胞での発現量の比較も行い、EBER 依存的に発現が抑制されているもの、いないものが明らかになった。現在さらに各々についての解析をすすめている。

5) 4)の解析で明らかになった因子のひとつである IRF5 に関して解析をおこなった。その結果、EBV 感染細胞において IRF5 の発現を誘導すると EBV 感染細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。一方、EBV 非感染細胞で IRF5 をノックダウンしたところ、細胞増殖への影響はみられなかったが、IFN 刺激を加えるときにみられる細胞増殖の抑制効果は IRF5 ノックダウンにより減弱した。これらの結果は、EBV 感染細胞においては IRF5 の制御が細胞増殖に寄与しているということを示唆するものであると考えられた。

6) エクソソームにより誘導される TLR3 シグナル活性化と IRF5 の関わりについて検証した。まず、EBV 感染細胞において IRF5 を発現誘導すると、細胞増殖が抑制されること、それはエクソソームによる TLR3 シグナル活性化に依存していることがわかった。一方 EBV 非感染細胞において IRF5 をノックダウンし、EBV 感染細胞由来のエクソソームで刺激すると、細胞増殖が促進されたが、EBV 非感染細胞由来のエクソソーム刺激ではそれはおこらなかった。これらの結果から、EBV 感染細胞において、放出されるエクソソームが誘導する TLR3 シグナル活性化を介した細胞増殖の促進には、IRF5 が介在しているということが示唆された。

7) エクソソームにより惹起される IFN シグナルが IRF5 に与える影響について解析し、EBV 非感染細胞では IFN により IRF5 発現が誘導されたが、EBV 感染細胞では IFN 刺激による IRF5 の誘導が抑制されていることが明らかになった。これにより EBV 感染細胞では独自に IFN シグナルが制御されていることが示唆された。

8) EBV 感染胃癌細胞内の miRNA について、EBV 非感染細胞、および EBER 欠損ウイルス感染細胞との比較を miRNA アレイ解析により行い、EBV 感染による影響をうけるもの、さらにその発現が EBER 依存的に調節されているものなどが明らかになった。EBER 依存的に発現が変化しているものについては、EBER 安定発現細胞を用いての実験で同じ傾向を示した miRNA も同定しており、現在解析を進めている。

9) エクソソーム分泌の阻害剤が細胞増殖に与える影響について検証したところ、EBV 感染胃癌細胞の増殖は阻害剤により抑制されたことから、EBV 感染胃癌細胞の増殖はエクソソームにより誘導される細胞内シグナル伝達に依存していることが示唆された。さらにエクソソーム分泌阻害剤により EBV 感染細胞から産生される IFN の減少を認め、さらに IGF1 の産生も減少したことから、EBV 感染細胞においてはエクソソーム依存的な IFN シグナル活性化とそれに伴う IGF1 産生の誘導により細胞増殖が促進されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩切 大
2. 発表標題 ウイルスとがん
3. 学会等名 九段生涯健康塾セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	今留 謙一 (IMADOME KEN-ICHI) (70392488)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・高度感染症診断部・部長 (82612)	