

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07580

研究課題名(和文) EBVテグメントタンパク質による不完全溶解感染の制御

研究課題名(英文) Regulation of abortive lytic infection by EBV tegument proteins

研究代表者

村田 貴之 (Takayuki, Murata)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：30470165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、Epstein-Barr virus (EBV) の不完全溶解 (abortive lytic) 感染という状態が、効率のよい感染の成立やがん化に重要であることを示唆する知見が出てきているが、現在までほとんど解明されていない。本研究では特にEBVのテグメントタンパク質の不完全溶解感染への寄与に着目して研究を開始した。研究は順調に推移し、複数の論文を報告することができた。特にプライマリーB細胞への感染実験でのRNAseqから多くの知見を得た。ただし、当初期待していたほどテグメントタンパク質の寄与は大きくなく、むしろEBNA2やLMP1といった潜伏感染関連遺伝子の影響が大きいようであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効率のよい感染の成立やがん化に重要であると考えられるが、その分子機構の大部分が未解明であった Epstein-Barr virus (EBV) の不完全溶解感染 (abortive lytic) という状態について、新しい知見を得ることができた。このことはウイルス学、ひいては科学における学術的進展である。また、EBVは感染直後主にEBNA2を介してPD-L1の発言を増強し、宿主免疫から逃避していることが明らかになった。すなわち、EBNA2を標的とした抗がん剤創薬が可能であること、さらにPD-1/PD-L1免疫チェックポイント阻害剤がEBVによるB細胞がん化を抑制できる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Recently, "abortive lytic" state of Epstein-Barr virus (EBV) has been focused by researchers, but its contribution to the infection and immortalization remains elusive. We here focused on the contribution of viral tegument proteins to the abortive lytic infection. Overall, we made a smooth progress and published some papers. Especially, RNAseq analyses of primary B cells infected with EBV provided many important data, although contribution of tegument proteins to abortive lytic cycle transcriptome appeared not as potent as we first expected when we started this project. For example, we found that EBV evades host immune reaction by over-expressing PD-L1 gene (Yanagi et al., Virology 2021). This induction of PD-L1 was predominantly achieved by viral latent protein EBNA2, but not viral tegument proteins. PD-L1 was increased by viral lytic cycle, but this was also brought about by EBNA2 but not tegument proteins (Yanagi et al. Virology 2022).

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBV abortive lytic tegument

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) は初感染で伝染性単核症を引き起こし、のちにバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、免疫不全/移植関連リンパ腫、慢性活動性 EBV 感染症、T/NK 細胞リンパ腫、上咽頭癌、胃癌などの多様ながんの原因となる。1964 年に初めてその存在が報告されて以来 50 年を超える研究の歴史があるが、EBV は 80 を超える遺伝子を有し、複雑な生活環をとるウイルスであり、宿主特異性が高く、増殖効率も低いため、その研究は容易でない。このため未だに特異的、効果的な抗ウイルス薬やワクチンは存在せず、EBV 研究の進展が強く望まれている。

EBV は感染細胞内で、潜伏感染 (latent infection) と溶解感染 (lytic infection) という 2 つの感染様式をとる。潜伏感染から溶解感染への移行を再活性化と呼ぶ。潜伏感染において EBV は、核内でクロマチン化されたエピソームとして存在し、EBNA1 などごく限られたウイルス遺伝子のみを発現してウイルスゲノムの維持を優先する。一方、溶解感染においては全てのウイルス遺伝子を発現し、独自の複製系によって強力なゲノム複製を遂行し、子孫ウイルス粒子の産生に至る。

研究開始当初、EBV の不完全溶解感染 (abortive lytic infection) という状態が、効率のよい感染の成立やがん化に重要であることを示唆する知見が出てきていた。不完全溶解感染とは、感染細胞においてウイルスが潜伏状態と再活性化状態の中間的な平衡状態をとることを意味する。特にウイルスが細胞に新規に感染した直後、潜伏感染を成立させる前に不完全溶解感染となることが知られており、これを潜伏前不完全溶解感染 (pre-latent abortive lytic infection) と呼ぶ。しかしながら不完全溶解感染の分子機序や意義はほとんど解明されておらず、現在でも明らかになっていない部分が多い。

2. 研究の目的

上記のような理由から、本研究では特に EBV のテグメントタンパク質の不完全溶解感染への寄与に着目して研究を開始した。

なおテグメントタンパク質とは、ウイルス粒子のエンベロープとヌクレオカプシドの間に存在するタンパク質群のことで、細胞に感染すると直ちに細胞質内に放出されて、効率的な感染成立を促すものとして知られている。

3. 研究の方法

歴史的に、これまで EBV 感染の研究は主にウイルスを細胞株に感染させることで観察されてきた。細胞株の扱いは比較的容易であり、再現性も高いというメリットがある。一方で細胞株は既に不死化、がん化している細胞のクローナルな集団であるため、必ずしもヒト体内での EBV 感染を反映していない可能性がある。そこで本研究では、健常人のプライマリー B 細胞を分離して感染実験に使用することとした。これによって、より自然な状況での EBV 感染の様子を観察することができる。

EBV の複製効率は決して高くないため、高い力価のウイルスを産生させることは困難であった。今回は AGS-EBV 細胞からウイルスを産生させることで、力価の高い野生型ウイルスを調整することに成功した。

上記高力価ウイルスをプライマリー B 細胞に感染させることで実験を行った。具体的には、RNAsesq、qRT-PCR、K-means クラスタ解析、組み換えウイルス作成・感染、Gene ontology (GO) 解析、過剰発現、chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイ、chromatin interaction analysis by paired-end tag sequence (ChIA-PET)、レポーターアッセイなどを行った。

4. 研究成果

まず、EBV を健常人由来プライマリー B 細胞に感染させ、経時的に RNA を回収してトランスクリプトーム解析を行った。EBV 感染によって細胞の遺伝子発現は大規模な影響を受けており、特にシグナル、細胞周期、転写、免疫に関わる遺伝子群の変化が見られた。K-means クラスタリング解析により、EBV 感染による発現量変動のパターンから、8 つの群に分けられることが明らかになった (図 1 A)。この中で、特に免疫チェックポイント遺伝子 PD-1 のリガンドである PD-L1 は、感染後徐々に発現量が増強する II 群のパターンに含まれることが見えてきた (図 1 B)。さらに欠損株ウイルスを用いた感染実験から、PD-L1 は、テグメントタンパク質ではなく、主にウイルスのコードする潜伏感染関連遺伝子である EBNA2 によって発現を誘導されていることを解明した (図 2)。ChIP および ChIA-PET 解析から、EBNA2 は PD-L1 遺伝子のプロモーター領域、および下流に存在する 2 つのエンハンサー領域に結合し、PD-L1 を増強していることが明らかとなった (Yanagi et al., 2021 Virology)。

関連して、EBV 再活性化により PD-L1 発現が増強することも見出した。この PD-L1 発現増強はやはりテグメントタンパク質や溶解感染関連遺伝子ではなく、EBNA2 によって制御されていることが分かった (Yanagi et al., Virology 2022)。

上記 PD-L1 関係の研究成果のほか、テグメントタンパク質 BBRF2 についての報告 (Masud et al., Microorganisms 2019) や、プロモーター欠損ウイルスのがん化に及ぼす影響についての報告 (Mabuchi et al., Cancers 2021) も行った。

図1. プライマリーB細胞に野生型 EBV を感染させ、日を追って RNA を回収し、RNAseq に供した。A は K-means クラスター解析の結果。B は代表的な遺伝子の発現量の推移を折れ線グラフにしたもの。

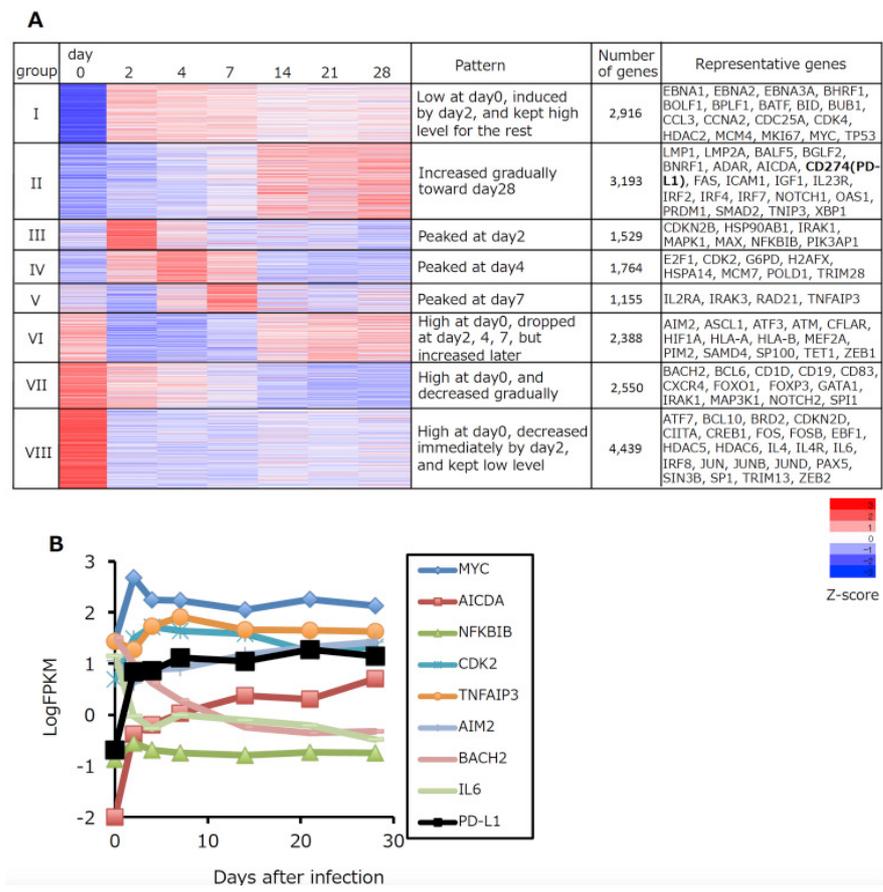


図2. プライマリーB細胞に野生型、EBNA2 欠損株、LMP1 欠損株の EBV を感染させ、2 日後に RNA を回収し、RNAseq に供した。K-means クラスター解析の結果、PD-L1 の発現は主に EBNA2 欠損によって制御を受けている群に含まれることが明らかになった。

group	day 0	2	2	2	Pattern	Number of genes	Representative genes
	EBV (-)	WT	dE2	dL1			
i	Blue	Red	Blue	Red	Induced by EBV, and deletion of E2 canceled the induction	4,646	BATF, CDC25A, E2F1, FAS, BUB1, H2AFX, HDAC2, HSP90A1, HSPA14, IRAK1, MAX, MCM4, MCM7, MYC, NFKB1B, POLD1, PRDM1, TRIM28, XBP1,
ii	Blue	Red	Blue	Red	Induced by EBV, and deletion of E2 partially canceled the induction	3,891	EBNA1, ENA3A, LMP1, LMP2A, BHRF1, BNRF1, AICDA, BID, CCL3, CD274(PD-L1) , CDK4, IGF1, IRF4, MKI67, TP53
iii	Blue	Blue	Red	Blue	Unaffected by EBV, but increased by deletion of E2	2,654	BDF3, BGLF2, BKRF4, CDKN2B, IL2RA, IRF2, IRF7, NOTCH1, SMAD2, SPI1
iv	Red	Blue	Blue	Blue	Decreased by EBV, and restored by deletion of E2	5,456	ATF7, B2M, BACH2, BCL6, BCL10, BRD2, CD1D, CD19, CDKN2D, CIITA, CREB1, CXCR4, EBF1, FOXO1, FOXP3, GATA1, HDAC5, HIF1A, IL4, IL6, MAP3K1, MEF2A, NOTCH2, PAX5, SMAD4, TRIM13, ZEB2
v	Red	Blue	Blue	Blue	Decreased by EBV, and further decreased by deletion of E2	3,287	ATF3, BAD, CCL5, CD83, DDX3X, EGF, FOS, FOSB, HAUS3, ID1, IRF1, IRF8, JUN, JUNB, JUND, KLF4, TET1, ZEB1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yusuke Yanagi, Yuya Hara, Seiyo Mabuchi, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Hiroshi Kimura, Takayuki Murata	4. 巻 568
2. 論文標題 PD-L1 upregulation by lytic induction of Epstein-Barr Virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2022.01.006	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 Takayuki Murata, Atsuko Sugimoto, Tomoki Inagaki, Yusuke Yanagi, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Hiroshi Kimura	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13122344	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 該当する
1. 著者名 Murata Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Human Herpesvirus and the Immune Checkpoint PD-1/PD-L1 Pathway: Disorders and Strategies for Survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9040778	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 Yanagi Yusuke, Okuno Yusuke, Narita Yohei, Masud H.M. Abdullah Al, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Kanda Teru, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki	4. 巻 557
2. 論文標題 RNAseq analysis identifies involvement of EBNA2 in PD-L1 induction during Epstein-Barr virus infection of primary B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2021.02.004	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 該当する

1. 著者名 Mabuchi Seiyo, Hijioka Fumiya, Watanabe Takahiro, Yanagi Yusuke, Okuno Yusuke, Masud H. M. Abdullah Al, Sato Yoshitaka, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Epstein-Barr Virus C Promoter Deletion in Diffuse Large B Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 561 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13030561	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 該当する

1. 著者名 Murata Takayuki, Okuno Yusuke, Sato Yoshitaka, Watanabe Takahiro, Kimura Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Oncogenesis of CAEBV revealed: Intragenic deletions in the viral genome and leaky expression of lytic genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reviews in Medical Virology	6. 最初と最後の頁 e2095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmv.2095	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 Masud H. M. Abdullah Al, Yanagi Yusuke, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus BBRF2 Is Required for Maximum Infectivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 705 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms7120705	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 該当する

1. 著者名 Sugimoto Atsuko, Yamashita Yoriko, Kanda Teru, Murata Takayuki, Tsurumi Tatsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Epstein-Barr virus genome packaging factors accumulate in BMRF1-cores within viral replication compartments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222519	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takayuki Murata
2. 発表標題 RNAseq analysis identifies involvement of EBNA2 in PD-L1 induction during Epstein-Barr virus infection of primary B cells
3. 学会等名 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳雄介、村田貴之、HMAA Masud、渡辺崇広、佐藤好隆、五島典、木村宏
2. 発表標題 EBウイルスステグメントタンパク質BSRF1は子孫ウイルス産生に寄与する
3. 学会等名 第33回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
バングラデシュ	University of Chittagong		
米国	Harvard Medical School	University of California Davis	