

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07600

研究課題名(和文) ウイルスマイクロRNAに特有の代謝生理を利用した新規診断治療法およびDDSの開発

研究課題名(英文) Metabolism and function of virus-encoded miRNA; its application for diagnosis and drug delivery system

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAウイルスはウイルス固有のマイクロRNA(miRNA)をコードしており、特定のウイルス疾患で異常なほど多量に産生される。本研究では進行性多巣性白質脳症において、JCポリオーマウイルスがコードするウイルスmiRNAが大量に発現していること、また、その局在をin situ hybridizationで明らかにした。さらに、ヒトヘルペスウイルス8感染症の病変部で高発現しているmiR-K3遺伝子をレンチウイルスベクターにより、ヒトリンパ腫細胞株に強制発現させ、miRK3によって発現が変動する遺伝子のプロファイルを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスmiRNAを進行性多巣性白質脳症の病理組織からin situ hybridizationで検出したのは世界初であり、意義深い。ウイルスmiRNA発現系の開発、機能解析、発現解析で得られた成果は、ウイルス疾患成立におけるmiRNAの役割の一端が解明されるとともに、miRNAのための新規drug delivery systemの開発に有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：Metabolism and function of virus-encoded miRNA was investigated in JC polyomavirus (JCV) and human herpesvirus 8 (HHV-8, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) infection. Highly expression of JCV-encoded miRNA was observed in progressive multifocal leukoencephalopathy. In situ hybridization showed the localization of JCV-encoded miRNA in the pathological samples. Lentivirus vector expressing miRK3, a miRNA encoded by human herpesvirus 8, was established and next generation sequencer revealed profiles of human mRNA expression in lymphoma cells expressing miRK3.

研究分野：感染病理学

キーワード：miRNA ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

miRNA はすべての真核細胞に多量に発現し、特定の mRNA に結合し、その転写、翻訳を制御する働きを持つ。多くの DNA ウイルスはその遺伝子中に miRNA をコードしており、ウイルスの miRNA を発現させる。近年では、ウイルス miRNA が細胞周期やサイトカインの発現、および、NF-kB のシグナル伝達に関与するなど、発癌に関連することが示されている。エクソソームは細胞から排出される 30-100nm 程度の大きさの小胞体であり、長らく細胞の老廃物と考えられていた。近年、このエクソソーム中にも miRNA が含まれることが明らかになり、エクソソームは miRNA の遠隔細胞への delivery に使われている可能性がある。

われわれはこれまでに

- 1) Epstein-Barr virus (EBV)やカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV、ヒトヘルペスウイルス 8、HHV8)感染細胞、および、その病理検体において、ウイルス miRNA の発現は全 miRNA の半分以上を占めるなど、その発現が異常に高く、疾患、組織型ごとに特異的な発現プロファイルがあること(Hoshina et al. PLoS One 2016, Sakamoto et al. Cancer Med 2017)。
- 2) 免疫不全患者ではウイルス miRNA の発現が高いこと(Sakamoto et al. Cancer Med 2017)。
- 3) 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(Hoshina et al. PLoS One 2016, Nanbo et al. Cancers 2018)などを示してきた。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うること、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る。

## 2. 研究の目的

本研究ではウイルス miRNA の発現、作用を疾患ごとに明らかにし、異常高発現ウイルス miRNA を標的とした新規診断治療法の開発と、そのエクソソームへ移行する代謝生理を応用することで miRNA の新しい DDS の開発を行うことを目的とする。

ヘルペス、ポリオーマなどの DNA ウイルスの疾患は重篤化する症例もあり、これまでとは異なるアプローチによる新規治療法、診断法の開発が必要である。ウイルス miRNA を標的とした研究は多いが、miRNA の代謝生理を捉え、利用する研究はこれまでにない。とくにエクソソームに排出されるための特異的モチーフについてはわれわれの発見であり、エクソソームを用いた miRNA のための新規 DDS の開発に道を開く可能性を含む。

### 3. 研究の方法

#### (1) 次世代シーケンサーによる疾患特異的に発現する miRNA の同定

JC ポリオーマウイルス(JCV)感染細胞およびヒト進行性多巣性白質脳症患者の病理組織から small RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより RNA ゲノム解析を行った。ウイルス由来 miRNA のみならず、ヒト miRNA についても解析を行った。同様に、KSHV 関連疾患(カポジ肉腫、リンパ腫など)などの病理検体、および、KSHV 感染細胞、レンチベクターで miRNA を導入した細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、RNA および miRNA の網羅的な解析を行った。

#### (2) ウイルス miRNA を発現するレンチウイルスベクター系の開発

ウイルス miRNA と相同性のある配列を持つオリゴマーを作成し、レンチウイルスベクターに組み込み、発現ウイルスベクターを作成した。レンチウイルスベクターの導入効率はベクターに組み込まれた GFP の発現により確認した。

#### (3) ウイルス miRNA を検出する in situ hybridization

ウイルス miRNA の組織における発現を確認するため、miRNA を検出する in situ hybridization を行った。両側末端に digoxigenine を標識した Locked Nucleic Acids probe を用い、miRCURY LNA probe のプロトコールに従って行った。

### 4. 研究成果

JCVが原因である進行性多巣性白質脳症において、JCVがコードするウイルスmiRNA発現の詳細な解析を行った。JCVはlarge T抗原遺伝子内にmiR-J1をコードしており、髄液などの患者検体でその発現があることが報告されている。進行性多巣性白質脳症の病変部組織を用いた次世代シーケンサーによるsmall RNAの解析では、多くのリード数のmiR-J1が検出された。さらに、組織内のウイルス感染細胞の主に核内にmiR-J1が局在することをin situ hybridizationで明らかにした。進行性多巣性白質脳症の組織25例の解析の結果、ウイルスmiRNAのin situ hybridizationはJCVの免疫染色とほぼ同等の感度であり、診断にも有用と考えられる。さらにmiRNAが欠損する組み換えJCVを作成し、in vitroでの感染細胞での解析から、miR-J1がウイルスの複製を抑制していることを明らかにした。ウイルスmiRNAの解析を感染細胞において効率よく行うため、複製能の高いJCV株の遺伝子をCos7細胞に導入し、効率の高いウイルスの複製、および、ウイルスmiRNAが高発現する系を立ち上げた。感染細胞からRNAを抽出し、long readの次世代シーケンサーによるゲノム解析を行ったところ、既報告にない新たなRNA転写物が同定された。

KSHVには12個のpre-miRNAがコードされており、pre-miRNAの5p, 3p側からひとつづつの

mature miRNAが産生されることから、KSHVからは合計24のmiRNAが産生されると考えられている。これまでの研究から、カポジ肉腫やprimary effusion lymphomaなどのKSHV感染症の病変部では、miR-K3の5pが最も多量に発現しているKSHV関連miRNAであることを明らかにしてきた。また、KSHVが潜伏感染しているリンパ腫細胞株について、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一つが、ウイルス由来のRNAをこれまでよりも飛躍的に高発現させることを見出し、ウイルスmiRNAの解析に有用な実験系を立ち上げた。miR-K3の機能を明らかにする目的で、レンチウイルスベクターを用い、ヒトリンパ腫細胞株や293細胞などにmiRK3を強制発現させた。同時にmiRK3の機能を抑制するsiRNAの発現系も作成し、ヒトヘルペスウイルス8感染細胞におけるmiRK3の機能抑制を試みた。これらの細胞からRNAを抽出し、RNAseqを行い、miRK3によって発現が変動する遺伝子のプロファイル、および、KSHV感染細胞でmiR-K3の機能を抑制した場合に変化する遺伝子群の同定を行った。結果、miR-K3は細胞増殖に係るシグナル伝達系の活性化を誘導することが明らかにされた。

JCVの実験結果に関してはウイルス miRNA が新たな診断マーカーとなる可能性を示しており、今後、新たな診断法の開発につながる可能性がある。また、miRNA は治療薬の標的となる可能性もあり、効率の良い miRNA の阻害法や DDS の開発が望まれる。また、既報告にない新たな転写についてはウイルス感染において、どのような機能を持っているものか、今後の解析が必要である。KSHV の miRNA の機能解析においても、これまでと矛盾のない結果が得られた。KSHV のコードする miRK3 が、KSHV 感染、および、宿主細胞の腫瘍化に重要な働きをしている可能性が示唆されたことから、本 miRNA を抑制する方法や、エクソソームへの移行を促進し、分解を誘導するような新たな方法が見つかればウイルス発癌の新規阻害薬、治療薬に結び付く可能性がある。miRNA をターゲットとした新しい薬剤の開発、特に miRNA を用いた DDS に関する知見はまだ少なく、さらなる調査、研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Iida Shun, Mine Sohtarō, Ueda Keiji, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki, Katano Harutaka  | 4. 巻<br>95      |
| 2. 論文標題<br>Suberoyl Bis-Hydroxamic Acid Reactivates Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus through Histone Acetylation and Induces Apoptosis in Lymphoma Cells | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Virology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1128/JVI.01785-20   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi K, Sato Y, Sekizuka T, Kuroda M, Suzuki T, Hasegawa H, Katano H.   | 4. 巻<br>16             |
| 2. 論文標題<br>High expression of JC polyomavirus-encoded microRNAs in progressive multifocal leukoencephalopathy tissues and its repressive role in virus replication | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>PLOS Pathogens   | 6. 最初と最後の頁<br>e1008523 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.ppat.1008523  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nako T, Fukumoto H, Hasegawa H, Saeki H, Katano H   | 4. 巻<br>73              |
| 2. 論文標題<br>Functional Analysis of Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus-Encoded Large T Antigen | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Jpn J Infect Dis  | 6. 最初と最後の頁<br>132 ~ 139 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.7883/yoken.JJID.2019.391  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔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<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|