

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15449

研究課題名（和文）EBウイルスの病原体認識回避機構の解明

研究課題名（英文）Research on pathogen recognition and evasion of EB virus

研究代表者

渡辺 崇広（Watanabe, Takahiro）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10624398

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）：エプスタイン・バーウイルス（EBV）は、世界中で年間約20万人の新たながん患者を生み出し、重大な死亡率につながっている。本研究では、EBVの膜融合タンパク質が自然免疫制御分子STINGに作用し、自然免疫応答を抑制することを見出した。また、膜融合タンパク質の切断がSTINGの多量体化を抑制する分子メカニズムを発見した。さらに、予備的研究により、EBVはSARS-CoV-2を含む他のエンベロープウイルスと共通点があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膜融合タンパク質に秘める免疫抑制機序について解明することによって広域抗ウイルス薬の開発につながる知見を提供し、自然免疫応答のon/offを運命づける普遍的な現象の発見に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus (EBV) causes approximately 200,000 new cancer cases annually worldwide. In this study, we found that viral membrane fusion proteins suppress innate immune responses by binding to the innate immune molecule STING. Additionally, we discovered a molecular mechanism for suppressing STING multimerization via cleavage of membrane fusion proteins. Moreover, preliminary studies have revealed similarities between EBV and other envelope viruses, such as SARS-CoV-2.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBV 自然免疫 STING cGAS

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) は成人の90%以上が感染し、生涯潜伏する、ありふれたヒトヘルペスウイルスである。時に感染細胞が腫瘍性に増殖し、様々なEBV関連がんを発症させる。EBV関連がんの新規発生者数は全世界で年20万人に及び、依然として死者数も多い (Cohen, Sci Transl Med 2011)。また、本邦を含む東アジアで発症率が多い慢性活動性EBV感染症は造血幹細胞移植が唯一寛解の可能性がある治療法であるが、移植関連死や医原性の日和見感染症が多いといった問題もある。したがって、造血幹細胞移植に代わる新たな治療法の開発は喫緊の課題であるが、EBV関連がんの発症原因や発症機構は不明な点が多いため、根治を期待できる有効な抗ウイルス薬は未だ存在しない。

一般にウイルス感染が起こると速やかに自然免疫応答が誘導される。自然免疫は獲得免疫に先行して生じる生体防御反応であり、DNAセンサーがその一旦を担っている。DNAセンサーは外来の病原体が持つ共通のパターンを直接認識する生体分子である。近年、cGASやStimulator of interferon genes (STING) などさまざまなDNAセンサー分子が同定され、DNAセンサーによる病原体の認識が、自然免疫応答の起点となり、I型インターフェロンをはじめとする液性因子の産生が誘導される (Motwani et al., Nat Rev Genet 2019)。次に、誘導された液性因子によってリクルートされたNK細胞は、感染細胞の認識および排除を実行する。その際に、非感染細胞と感染細胞の区別、すなわち自己非自己の鑑別を担っているのが、免疫補助受容体である。Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR) は抑制性の免疫補助受容体であり、標的細胞の主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子を認識し、自己非自己の鑑別を実現している。したがって、自然免疫は病原体の認識から自己非自己の鑑別という一連の共同作業によって、標的細胞を特異的に排除し、感染拡大の抑制を図っている (Saito et al., Nature 2017; Arase et al., Science 2002)。

2. 研究の目的

本研究では、DNAセンサーによるEBVの認識から、抑制性補助受容体LILRを介する自己非自己の鑑別に至る過程に着目し、EBVの自然免疫応答の制御メカニズムを探求する。具体的には、(1) 宿主DNAセンサーと相互作用するウイルスタンパク質の生理学的意義、(2) 抑制性補助受容体LILRリガンドの同定とその分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

【宿主DNAセンサー分子を制御するウイルス因子の探索研究】

cGAS, STING, DDX41などの自然免疫応答の制御分子のライブラリを構築し、すでに実績のあるNanoLuc スプリットルシフェラーゼ融合ウイルス遺伝子発現ライブラリ (Hara, Watanabe et al., J Virol 2022) を組み合わせ、相互作用タンパク質の網羅的探索を行うと共に、インターフェロン産生レベルの変化についても網羅的に検証した。

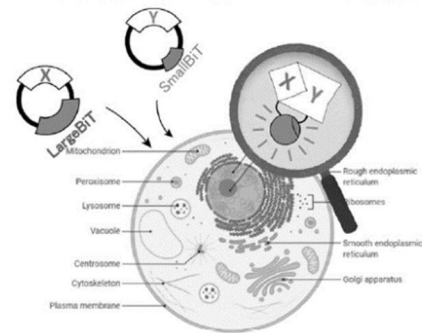
【抑制性受容体LILR分子のウイルス由来リガンドの探索研究】

LILR分子が認識するウイルス由来のリガンドの探索を行う。具体的には、当研究室で構築したウイルス遺伝子発現ライブラリを用いて、各ウイルス遺伝子を培養細胞で過剰発現させる (Konishi et al., mSphere 2018)。Fc融合LILR分子とAPC標識抗Fc抗体を反応させ、FACSにて細胞表面に結合したLILRを検出する。

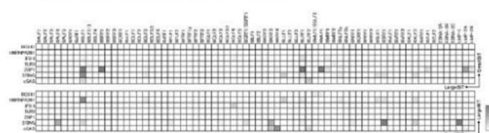
4. 研究成果

一般にタンパク質間相互作用の解析の多くは*in vitro*における検出系であり、*in vivo*では酵母を用いたYeast TwoHybrid法など限定的である。タンパク質間相互作用というリアルな生命現象に対して生細胞内で検出できる、かつハイスループット解析が可能という要件を満たした検出系の応用は世界でも類を見ない。申請者は本手法を自然免疫応答に関連する因子の探索に適用させ、EBVがコードするタンパク質とSTINGの相互作用を世界で初めて見出した。さらにその相互作用を従来法である免疫沈降法などでも再現するとともに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在を直接観察することで細胞内での挙動を明らかにした。さらに、段階的に活性化に向かうSTINGを詳細に解析することによって、本因子がSTINGの多量体化を抑制することを見出した。そこで、生細胞内におけるSTING多量体化の検出系を新たに構築し、N末側のサブユニットとSTINGが細胞内で相互作用することを明らかにした。保存性の高いドメインにさまざまなアミノ酸変異を導入し、STING多量体形成を負に制御できない変異体を見出した。小胞体膜貫通型タンパク質であるSTINGは自然免疫応答の活性化の過程でゴルジ体、リソソームへと輸送されることが知られている。その輸送過程への影響を明らかにするために、定量的イ

生きた細胞内のタンパク質間相互作用を検出できる系を構築



Epstein-Barrウイルス (DNAウイルス) における自然免疫制御因子を同定



イメージ解析の構築を目指した。さらにウイルスタンパク質が STING 多量体を負に制御すること、変異体はその制御を迫行できないことを定量的イメージ解析によって証明した。一方、遺伝子組み換えウイルスを構築し、培養細胞を用いて感染実験を実行したところ、予想に反して野生型と同等の自然免疫応答抑制の効果が観察された。さらに単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、ジカウイルス、そして SARS-CoV-2 といった他のエンベロープウイルスに着目した解析データから、この分子機序がエンベロープウイルスに共通性がある可能性が示唆されている。この成果を加速させ、ウイルスが秘める免疫抑制機序について解明することによって広域抗ウイルス薬の開発につなげる知見を提供し、パンデミックのニーズに応えたい。

一方、LILR 分子反応系によるスクリーニングについては、EBV 遺伝子 A が LILR リガンドの候補として同定された。本遺伝子の過剰発現、遺伝子ノックアウトウイルスを用いた感染実験を実行したが、細胞膜上で LILR に認識されるという現象が見られるものの、LILR 受容体の既存の下流のシグナル経路において明らかな変化は観察されず、未だ生理学的意義は未解明である。引き続き候補遺伝子の詳細解析を続けると共に、LILR 分子のリガンドとして機能しうるその他の候補ウイルス因子についても検証していく。

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 1件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Hara Yuya, Watanabe Takahiro, Yoshida Masahiro, Masud H. M. Abdullah Al, Kato Hiromichi, Kondo Tomohiro, Suzuki Reiji, Kurose Shutaro, Uddin Md. Kamal, Arata Masataka, Miyagi Shouhei, Yanagi Yusuke, Sato Yoshitaka, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki | 4. 巻 96 |
| 2. 論文標題 Comprehensive Analyses of Intraviral Epstein-Barr Virus Protein-Protein Interactions Hint Central Role of BLRF2 in the Tegument Network | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Virology | 6. 最初と最後の頁 e0051822 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00518-22 | 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 Suzuki Takeshi, Sato Yoshitaka, Okuno Yusuke, Goshima Fumi, Mikami Tadahisa, Umeda Miki, Murata Takayuki, Watanabe Takahiro, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Kitagawa Hiroshi, Kimura Hiroshi | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screen for HSV-1 host factors reveals PAPSS1 contributes to heparan sulfate synthesis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 694 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03581-9 | 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 Sato Yoshitaka, Yaguchi Masahiro, Okuno Yusuke, Ishimaru Hanako, Sagou Ken, Ozaki Somi, Suzuki Takeshi, Inagaki Tomoki, Umeda Miki, Watanabe Takahiro, Fujimuro Masahiro, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Epstein-Barr virus tegument protein BGLF2 in exosomes released from virus-producing cells facilitates de novo infection | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling | 6. 最初と最後の頁 95 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-022-00902-7 | 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, Hara Yuya, Mabuchi Seiyo, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki | 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 Miyagi Shouhei, Watanabe Takahiro, Hara Yuya, Arata Masataka, Uddin Md. Kamal, Mantoku Keisuke, Sago Ken, Yanagi Yusuke, Suzuki Takeshi, Masud H. M. Abdullah Al, Kawada Jun ichi, Nakamura Shigeo, Miyake Yasuyuki, Sato Yoshitaka, Murata Takayuki, Kimura Hiroshi | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 A STING inhibitor suppresses EBV induced B cell transformation and lymphomagenesis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 5088 ~ 5099 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15152 | 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 Uddin Md Kamal, Watanabe Takahiro, Arata Masataka, Sato Yoshitaka, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki | 4. 巻 97 |
| 2. 論文標題 Epstein-Barr Virus BBLF1 Mediates Secretory Vesicle Transport to Facilitate Mature Virion Release | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Virology | 6. 最初と最後の頁 e0043723 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00437-23 | 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 Sugimoto Atsuko, Watanabe Takahiro, Matsuoka Kazuhiro, Okuno Yusuke, Yanagi Yusuke, Narita Yohei, Mabuchi Seiyo, Nobusue Hiroyuki, Sugihara Eiji, Hirayama Masaya, Ide Tomihiko, Onouchi Takanori, Sato Yoshitaka, Kanda Teru, Saya Hideyuki, Iwatani Yasumasa, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Growth Transformation of B Cells by Epstein-Barr Virus Requires IMPDH2 Induction and Nucleolar Hypertrophy | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Spectrum | 6. 最初と最後の頁 e0044023 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00440-23 | 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 Sagou Ken, Sato Yoshitaka, Okuno Yusuke, Watanabe Takahiro, Inagaki Tomoki, Motooka Yashiro, Toyokuni Shinya, Murata Takayuki, Kiyoi Hitoshi, Kimura Hiroshi | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Epstein-Barr virus lytic gene BNRF1 promotes B-cell lymphomagenesis via IFI27 upregulation | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Pathogens | 6. 最初と最後の頁 e1011954 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1011954 | 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shouhei Miyagi, Takahiro Watanabe, Yuya Hara, Masataka Arata, Md. Kamal Uddin, Yusuke Yanagi, Yoshitaka Sato, Takayuki Murata, Hiroshi Kimura |
| 2. 発表標題 STING inhibitor suppresses EBV-induced B cell transformation and lymphomagenesis |
| 3. 学会等名 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases (EBV2021) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡辺 崇広, 佐藤 公治 |
| 2. 発表標題 EBウイルス関連腫瘍のがん微小環境における炎症性細胞浸潤メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 第66回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張メッセ国際会議場 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Md. Kamal Uddin, Takahiro Watanabe, Hiroshi Kimura, Takayuki Murata |
| 2. 発表標題 Epstein-Barr Virus BBLF1 is Involved in Efficient Virus Egress |
| 3. 学会等名 ASM Microbe 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|