

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590443

研究課題名(和文) 上咽頭がん幹細胞におけるEBウイルス感染の関与

研究課題名(英文) The effect of EB virus infection in nasopharyngeal carcinoma cancer stem cell

研究代表者

飯笠 久 (Iizasa, Hisashi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：80306662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス(EBV)陽性上咽頭がん株C666-1より、EBV陰性株樹立を試みた。FISH解析ではC666-1細胞1つあたり大量のEBVが存在し、薬剤処理や限界希釈法を組み合わせた陰性株樹立はできなかった。これらは、C666-1細胞増殖はEBVに依存することを示唆している。次にごん幹細胞分離のため、幹細胞特異的転写因子SOX2の解析を行った。SOX2プロモーター活性はSOX2遺伝子発現と相関し、プロモーター活性陽性細胞は高いスフェア形成能を有していた。更にSOX2プロモーター結合タンパク質を同定し、SOX2を介してがん幹細胞形成制御をしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We had tried to establish EB virus (EBV) negative cell lines from EBV harboring human nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1. C666-1 had a large number of EBV copies per cell and we could not establish EBV negative cell line from C666-1 using drug treatment and dilution cloning. These results suggest that EBV infection is essential to keep C666-1 cell proliferation. Next, to isolate cancer stem cell population from nasopharyngeal carcinoma, we analyzed the expression mechanism of stem cell specific transcription factor SOX2 in cancer cell lines. SOX2 promoter activity was related to SOX2 mRNA expression level and promoter positive cell population showed high sphere activity. Moreover, we identified SOX2 promoter binding protein and this protein regulated cancer stem cell formation by the regulation of SOX2 promoter activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：がん幹細胞 EBウイルス SOX2 プロモーター

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、造血幹細胞のように自己複製能を有し、分化によって周囲の多様ながん細胞集団を生み出す細胞である。がん幹細胞は、抗がん剤への強い耐性を有することから、**がん幹細胞形成の分子機序を理解することは、がん治療にとって極めて重要である。**

EBウイルスは、バーキットリンパ腫、上咽頭がん、胃がんなどに感染が認められる。しかしながら、EBウイルス陽性腫瘍から上皮細胞株を樹立した場合、ほとんどの例ではEBウイルスを脱落する。そのため、上皮細胞の腫瘍におけるEBウイルスの役割については、不明な点が多い。C666-1は、著名な上咽頭がん細胞株としては唯一EBウイルスの潜伏感染を持続している。最近、C666-1は非接着培養により、がん幹細胞マーカーCD133や幹細胞特異的転写因子Oct4の発現を劇的に増加することが報告された (Xia H et al., J Biol Chem (2010))。また私は、EBウイルス由来miRNAがmiRNA産生酵素Dicerを標的とし、C666-1およびバーキットリンパ腫細胞株においてウイルスの潜伏感染を誘導することを発見した (業績論文2)。上皮細胞におけるDicerの発現減少は、上皮-間葉系移行 (EMT) を誘導することから (Martello G et al., Cell (2010))、これらの報告は、**上咽頭におけるEBウイルスの感染は、上皮細胞の脱分化を誘導し、がん幹細胞の形成を誘導する可能性を強く示唆している。**

2. 研究の目的

研究機関内に、**上咽頭がん細胞へのEBウイルス感染によりがん幹細胞が誘導される**ことを明らかにする。そのために初年度は、上咽頭がん細胞株C666-1よりEBウイルス陰性細胞株を樹立し、がん幹細胞を高感度で検出するベクターを開発する。更に、樹立した細胞株と親株を比較して、幹細胞数および、関連遺伝子の発現量を比較する。次年度以降は、がん幹細胞形成に関与するウイルス遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

[平成23年度]

(1) C666-1からのEBウイルス陰性上咽頭がん細胞株の樹立

C666-1は、EBウイルス潜伏感染マーカーであるEBER陰性集団を含んでいる。EBウイルス陽性上咽頭がん細胞株C666-1を、上咽頭がん増殖因子IGF-1存在または非存在下で限界希釈法を用いて培養する。細胞が増加したところで、その一部からgenomic DNAを抽出し、PCR法にてEBウイルスゲノムを検出する。宿主DNAと比べ、ウイルスDNAの少ない集団から再度限界希釈を行い、EBウイルスゲノムが検出できなくなるまで繰り返し、EBNA-1の免疫染色な

どを行い、EBウイルスの混入がないことを確認する。

(2) 幹細胞特異的ベクターを用いたがん幹細胞の検出

(1)で樹立した細胞株、及び親株に幹細胞特異的ベクターを遺伝子導入する。ベクターは、ES細胞で発現するearly transposonを改変したプロモーターと、幹細胞特異的転写因子Oct4もしくはSox2のエンハンサーを含み、幹細胞特異的にGFPもしくはDs-Redを発現する。遺伝子導入後、GFP+Ds-Red+集団を分離し、幹細胞を多く含むことを確認する。開発したベクターを、(1)及び親株に遺伝子導入し、幹細胞集団数を測定する。

(3) EBウイルス感染上皮細胞株におけるがん幹細胞集団

(2)において増加した幹細胞集団が、どのような性質を保持しているのか解析を行う。即ち、細胞株に当初から存在した幹細胞集団と、ウイルス感染後増加した幹細胞集団をFACS-Aria Proにて分離し、幹細胞特異的転写因子 (Oct4, Sox2, KLF4, Nanog)、幹細胞表面抗原 (CD133, CD44) の発現をReal-time PCRもしくは、Western Blotting法によって確認する。また、接着依存性増殖、細胞運動性、低酸素条件下での細胞増殖についても解析を行う。

[平成24年度以降]

(4) EBウイルス陽性及び陰性上咽頭がん細胞株C666-1における遺伝子発現解析

(1)及び親株における遺伝子発現の差を、DNAアレイ及びmiRNAアレイを用いて網羅的に解析する。EBウイルス感染により発現変動が認められた、cDNA, non-coding RNA, miRNAのうち幹細胞に関連したものがあるかを検索する。

(5) 幹細胞誘導活性を有するEBウイルス遺伝子の同定

EBウイルス陽性C666-1に、EBウイルス遺伝子に対するsiRNAを導入し、FACS解析にて幹細胞集団が減少を確認する。次に、siRNAで変動が認められた遺伝子の発現ベクターを、(1)の細胞株に導入し、幹細胞集団が増加するかを確認する。EBウイルス由来miRNAに幹細胞誘導活性が認められた場合、miRNAの標的遺伝子の検索を、Ago2に対する抗体を用いて免疫沈降法にて行う。

(6) Cell-to-Cell contact methodを用いたEBウイルスの細胞株への感染

(1)で樹立したEBウイルス陰性株に、Neomycin耐性遺伝子を組み込んだEBウイルスを有するAkata細胞株を共培養し、G418による薬剤選抜法を用いてEBウイ

ルス感染 C666-1 を再度樹立する。EB ウイルスの感染は、II 型潜伏型感染のマーカー (EBNA1, LMP1, LMP2A, EBER) を RT-PCR 法にて確認し、幹細胞集団は FACS 解析にて解析する。

(7) 上咽頭がんにおける EB ウイルス由来幹細胞誘導因子の解析

(1) で樹立した細胞株に、(6) の方法を用いて同定した遺伝子を欠落する EB ウイルスを感染させる。この細胞株と (6) の細胞株を比較して、上咽頭がんの EB ウイルス感染における幹細胞誘導因子の役割について、詳細な解析を行う。また同時に、接着依存性増殖、細胞運動性、低酸素条件下での細胞増殖についても解析を行い、このときがん幹細胞集団の細胞数に変化が認められるかを解析する。

4. 研究成果

本研究で得られた成果の概要は、以下の通りである。

(1) EB ウイルス陽性上咽頭がん細胞株 C666-1 から薬剤処理及び限界希釈法を用いて、ウイルス陰性株の株化を試みた。しかしながら、陰性株樹立はできなかった。EB ウイルス陰性株が報告されているパーキットリンパ腫細胞株 Akata (0-40 コピー/細胞) や、陰性コントロールである Daudi EB ウイルス陰性株と比較して、FISH 法解析では C666-1 細胞 1 つあたり大量の EB ウイルス (50-100 コピー/細胞) が存在した。染色体への EB ウイルス遺伝子の組み込みは認められなかったが、Akata と異なり EB ウイルスがない細胞は認められなかった (南保明日香博士との共同研究)。これらの結果は、上咽頭がん細胞株 C666-1 の細胞増殖は、EB ウイルスに依存することを示唆している。

(2) EB ウイルス感染がヒト上皮細胞に与える影響を解析するために、ヒト乳腺上皮不死化細胞株 MCF10A に EB ウイルスを感染させたところ、E-cadherin の発現は減少しなかったが、その局在は細胞外から細胞内へと変化し、E-cadherin を基質とするユビキチンリガーゼの発現が上昇していた。これらの結果は、EB ウイルス感染上皮細胞では E-cadherin の局在異常を介して、上皮間葉系移行が成立していることを示している。現在、より詳細な分子機構を解析中である (吉山裕規博士との共同研究)。

(3) がん幹細胞集団を分離するために幹細胞特異的転写因子 SOX2 プロモーターの解析を行い、SOX2 プロモーター活性は SOX2 遺伝子の発現と相関性があり、プロモーター活性陽性細胞は、高い Sphere formation 活性を有していた (Liang Set al, Biochem Biophys Res Commun. 2013)。

更に SOX2 プロモーター結合タンパク質を同定し、同定した因子が SOX2 プロモーターの活性を抑制し、Sphere formation 活性や Side population 活性などの、がん幹細胞に特徴的な活性の制御を行なっていることが明らかとなった。これらの結果は、がん細胞における SOX2 の転写活性はプロモーターに依存し、がん幹細胞集団において SOX2 が重要であることを示唆している。現在上咽頭がん細胞株に应用可能か解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Sai Y, Nishimura T, Lizasa H (他 3 名, 4 番目). Basic Fibroblast Growth Factor Is Essential to Maintain Endothelial Progenitor Cell Phenotype in TR-BME2 Cells. *Biol Pharm Bull.* 37 (4): 688-693 (2014). 査読有, https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/4/37_b13-00841/article.
2. Okamoto T, Hayashi Y, Lizasa H, (他 7 名, 7 番目). Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother.* 20 (3): 169-174 (2014). 査読有, doi: 10.1016/j.jiac.2013.09.007.
3. Goudarzi H, Lizasa H (他 11 名, 2 番目). Enhancement of in vitro cell motility and invasiveness of human malignant pleural mesothelioma cells through the HIF-1 -MUC1 pathway. *Cancer Lett.* 339 (1): 82-92 (2014). 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2013.07.020.
4. Liang S, Lizasa H (他 5 名, 7 番目). Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 437 (2): 205-211 (2013). 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.038.
5. Ota H, Sakurai M, Lizasa H (他 6 名, 7 番目), Davuluri RV, Nishikura K. ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing. *Cell* 153 (3): 575-589 (2013). 査読有, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.024.
6. Oda K, Nishimura T, Lizasa H (他 6 名, 6 番目). Estrogen receptor induction by mitoxantrone increases Abcg2 expression in placental trophoblast cells. *J Pharm Sci* 102 (9): 3364-3372 (2013). 査読有, doi:

- 10.1002/jps.23549.
7. Goudarzi H, Hida Y, Iizasa H (他 3 名, 5 番目). Hypoxia affects in vitro growth of newly established cell lines from patients with malignant pleural mesothelioma. *Biomed Res* 34 (1): 13-21 (2013). 査読有, https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/34/1/34_13/article
 8. Iwakiri D, Minamitani T, Samanta M. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A contributes to anoikis resistance through ERK activation. *J Virol.* 87 (14): 8227-8234 (2013). 査読有, doi: 10.1128/JVI.01089-13.
 9. Iizasa H, Nanbo A (他 3 名, 1 番目), Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses.* 4 (12): 3420-3439 (2012). 査読有, <http://www.mdpi.com/1999-4915/4/12/3420>
 10. Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D (他 6 名). A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood.* 117 (21): 5663-5673 (2011). 査読有, doi: 10.1182/blood-2010-09-305979.
 11. Minamitani T, Iwakiri D, Takada K. Adenovirus virus-associated RNAs induce type I interferon expression through a RIG-I-mediated pathway. *J Virol.* 85 (8): 4035-4040 (2011). 査読有, doi: 10.1128/JVI.02160-10.

[学会発表](計 26 件)

1. 飯笹久(他 3 名, 1 番目). 酸耐性形質を示す *Kingella Denitrificans* 亜株の異所性胃内分布と同菌による *Helicobacter pylori* の酸抵抗性の増強. 第 87 回日本細菌学会総会. タワーホール船堀(東京), 3/26/2014
2. 浜田淳一、ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他 10 名, 3 番目). 低酸素環境による MUC1 の転写活性化と悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤能の増強. 第 11 回がんとハイポキシア研究会. 東北大学片平さくらホール(仙台), 12/14/2013
3. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他 8 名, 2 番目). MUC1 は低酸素下におけるヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤能の増強に中心的な役割を果たす. 第 72 回日本癌学会学術集会. パシフィコ横浜(横浜), 10/5/2013
4. 林泰弘、飯笹久(他 4 名, 4 番目). ピロリ菌感染が胃粘膜上皮細胞への EB ウイルス感染増殖を促進する. 第 72 回日本癌学会学術集会. パシフィコ横浜(横浜), 10/3/2013

5. 飯笹久(他 5 名, 1 番目)、梁珊珊. ヒト乳がん細胞株から分離した SOX2 プロモーター活性陽性細胞の解析. 第 72 回日本癌学会学術集会. パシフィコ横浜(横浜), 10/3/2013
6. 梁珊珊、飯笹久(他 7 名, 9 番目). RNA 結合タンパク質 p54^{nrB} は、SOX2 プロモーター制御を介して SOX2 の発現を抑制する. 第 72 回日本癌学会学術集会. パシフィコ横浜(横浜), 10/3/2013
7. 梁珊珊、飯笹久(他 7 名, 9 番目). RNA 結合タンパク質 p54^{nrB} は、SOX2 の転写・翻訳抑制を介して乳癌幹細胞様活性を制御する. 第 15 回 RNA ミーティング. 松山全日空ホテル(松山), 7/25/2013
8. 吉山裕規、飯笹久(他 6 名, 2 番目). EBV 感染によるヒト上皮細胞の極性喪失について. 第 10 回 EB ウイルス研究会、キャンパスプラザ京都(京都), 7/12/2013
9. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他 10 名, 2 番目). 低酸素下における MUC1 の発現亢進はヒト悪性胸膜中皮腫細胞の細胞運動・浸潤能を増強する. 第 22 回日本がん転移学会、ホテルブエナビスタ(松本), 7/11/2013
10. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他 7 名, 2 番目). HIF1alpha 依存的な MUC1 の発現亢進がヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤性を増強させる. 第 10 回がんとハイポキシア研究会. 横浜開港記念会館(横浜), 12/7/2012
11. Goudarzi H, Iizasa H (他 11 名, 2 番目), MUC-1 plays an important role in enhancement motility and invasiveness of human malignant mesothelioma cells under hypoxia. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Ito hall (International Research Center), Tokyo, Japan, 11/30/2012.
12. Yoshiyama H, Nanbo A, Iizasa H (他 3 名, 4 番目). Latent expression of BNLF2a and BNLF2b in EBV-infected cells and their oncogenic roles. *Frontiers in Cancer Science* 2012; 4th Annual Conference of the Cancer Science Institute of Singapore (Frontiers in Cancer Science 2012), Cancer Science Institute of Singapore, Singapore, 11/5/2012.
13. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他 8 名, 2 番目). HIF1alpha 依存的な MUC1 の発現亢進が低酸素環境におけるヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤能を増強させる. 第 92 回北海道医学大会腫瘍系分科会、北大医学部学友会館フラテ(札幌) 10/6/2012
14. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他 7 名, 2 番目). HIF1alpha 依存的な MUC1 の発

- 現亢進がヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤性を増強させる。第71回日本癌学会学術集会。ロイトン札幌(札幌), 9/21/2012
15. 飯笹久(他3名, 1番目)。EBウイルス由来 microRNA miR-BART6 は上皮細胞に上皮間葉系移行を引き起こす。第71回日本癌学会学術集会。札幌市教育文化会館(札幌), 9/19/2012
 16. 林えりか、飯笹久(他2名, 2番目)。ヒト *LEFTY1* 遺伝子プロモーターを改変した Kruppel-like factor 4 レポーターシステムの開発。第71回日本癌学会学術集会。ロイトン札幌(札幌), 9/19/2012
 17. 梁珊珊、飯笹久(他2名, 2番目)。ヒト乳癌細胞株における SOX2 プロモーター領域の解析。第71回日本癌学会学術集会, ロイトン札幌(札幌), 9/19/2012
 18. Iizasa H, Yoshiyama H, Iwakiri D (他7名, 1番目)。Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs regulate viral latency and induce epithelial-mesenchymal transition. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases, Sheraton Philadelphia City Center Hotel, Philadelphia, PA, 8/2/2012.
 19. 飯笹久、吉山裕規、西倉和子。ウイルス由来 microRNA による潜伏感染と上皮間葉移行の制御。第14回 RNA ミーティング。東北大学百周年記念会館川内萩ホール(仙台), 7/19/2012
 20. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他6名, 2番目)。ヒト悪性胸膜中皮腫細胞の低酸素培養状態における細胞運動・浸潤能の増強 (Selected as an oral presentation for workshop)。第21回日本がん転移学会、オリエンタルホテル広島(広島) 7/13/2012
 21. 浜田淳一、Goudarzi Homan、飯笹久(他6名, 4番目)。ヒト悪性胸膜中皮腫細胞の *in vitro* 増殖能に及ぼす低酸素の影響。第9回がん&ハイポキシア研究会、東京(学習院大) 11/26/2011
 22. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他3名, 2番目)。低酸素条件下の培養はヒト悪性胸膜中皮腫細胞の悪性を促進する。第70回日本癌学会学術集会。名古屋, 10/4/2011
 23. 飯笹久(他8名, 1番目), Bjorn-Erik Wulff, 岩切大。ウイルス由来 microRNA によるウイルス潜伏感染調節機構の解析。第5回北大若手研究者交流会, 札幌, 10/3/2011
 24. 梁珊珊、飯笹久(他3名, 2番目)。乳癌細胞株における SOX2 プロモーター領域の解析。第70回日本癌学会学術集会, 名古屋, 10/3/2011

25. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久(他2名, 2番目)。ヒト悪性胸膜中皮腫細胞の低酸素培養条件下における増殖・運動・浸潤能の変化。第20回日本がん転移学会学術集会, 浜松, 7/1/2011

〔図書〕(計2件)

1. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T and Iizasa H. "MicroRNAs and oncogenic human viruses." MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. (Ed. Sadegh Babashah) Springer, p155-182 (総ページ数 433) (2014).
2. 飯笹久. A-to-I RNA 編集とウイルス感染-宿主防御因子としての ADAR1 の役割-. *医学のあゆみ第5土曜特集 RNA 医学・医療-あらたな診断・治療を拓く* 中村義一 企画。(医歯薬出版) 238: p573-578 (総ページ数 608) (2011)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/crg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯笹久 (IIZASA HISASHI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号: 80306662

(2) 連携研究者

岩切大 (IWAKIRI DAI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号: 10307853