

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590534

研究課題名(和文)EBウイルスの新しい潜伏感染遺伝子の腫瘍化分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of oncogenic role of novel EBV latent genes

研究代表者

吉山 裕規(Yoshiyama, Hironori)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：10253147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス(EBV)の潜伏感染遺伝子として10種類余りが知られている。従来溶解感染初期遺伝子と分類されていたEBVゲノムのBam Nhet領域にシストロニックにコードされるBNLF2a/BNLF2b遺伝子が、潜伏感染期にも発現することを明らかにした。EBV関連腫瘍の形成に一定の働きをすと考えられた。その他、1) BNLF2a/BNLF2b遺伝子はLMP1と同様に溶解感染早期にも発現が増加する。2) BNLF2a蛋白はHLA class Iの発現低下を引き起こす。3) BNLF2b遺伝子は細胞のアポトーシスを抑制する働きが認められる。等のことがわかった。

研究成果の概要(英文)：EBV is a ubiquitous human herpes virus with oncogenic activity. Around 10 latent genes are known and many of them play roles for development and maintenance of EBV-associated malignancies. Recently identified BNLF2a gene was expressed at an early lytic infection and contributed evasion of EBV-infected cells from specific CD8+ T cell recognition. Here, we found BNLF2a and novel BNLF2b, of which gene locates 9-bp downstream of BNLF2a gene, were expressed not only at lytic, but at latent infection. Since BNLF2a downregulated surface MHC class I, BNLF2a may contribute establishment of persistently EBV infected B cells in vivo by inducing immune evasion from viral antigen-specific CD8+ T cell recognition. BNLF2b conferred apoptotic resistance to EBV-infected cells, thus supporting proliferation of infected cells. Suggesting that both BNLF2a and BNLF2b contribute to development of EBV-associated malignancies through proliferation of EBV-infected cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：EBウイルス 病原性 腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

EB ウイルス(EBV)は、成人に達するまでに9割以上の人々が感染する普遍的なヘルペスウイルスで、潜伏感染と溶解感染(初期、早期、後期に分かれる)の2種類の感染様式をとることで感染の維持と拡大を行っている。一方、EBVはバーキットリンパ腫や10%の胃癌、全ての鼻咽頭癌等の原因で、試験管内でBリンパ球にEBVを感染させると、トランスフォームした不死化リンパ球(LCL)が形成される。LCLはEBVの腫瘍化活性に重要な、約10種類の潜伏感染遺伝子をすべて発現し、III型潜伏感染様式をとる。一方、バーキットリンパ腫はEBNA1とEBERのみを発現し、I型潜伏感染様式を示す。

申請者らは、EBウイルスベクターのためのパッケージング細胞システム(国際特許PCT/JP03/15419)を作製する過程で、Terminal Repeats(TR)を破壊することにより、TR近傍のウイルス遺伝子の発現変化を調べた。その過程で、TRの5'側に位置するLMP1遺伝子の下流にある*BNLF2a*及び*BNLF2b*遺伝子がI型潜伏感染細胞で転写されていることを発見した。

*BNLF2a* および *BNLF2b* 遺伝子の機能を明らかにするために、*BNLF2a* と *BNLF2b* 遺伝子のダブルノックアウトEBVを作製した。ダブルノックアウトEBVはLCL(LCL-BNLF2 KO EBV)を形成したが、野生型EBVで作製したLCL(LCL-野生型EBV)よりも、T細胞存在下での細胞株樹立頻度が低下した。このことは、*BNLF2a*の発現により、細胞表面のMHC class I分子の発現量が低下するためと考えられた。

これより、*BNLF2a*も*BNLF2b*もトランスフォームそのものに必須の遺伝子ではないが、少なくとも*BNLF2a*が免疫監視を逃れたトランスフォーム細胞の形成に働くことが明らかになった。さらに、*BNLF2a*、または、*BNLF2b*発現ベクターをそれぞれ細胞に導入すると、*BNLF2b*発現細胞のみが3倍も多く発現クローンを形成することもわかった。

### 2. 研究の目的

潜伏感染時に発現する遺伝子として*BNLF2a*と*BNLF2b*遺伝子のいずれか一方、あるいは両方が、EBVによる細胞腫瘍化活性の一端を担っていると考えられたので、*BNLF2a*、*BNLF2b*遺伝子の作用分子機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)BNLF2b タンパク質の修飾と局在

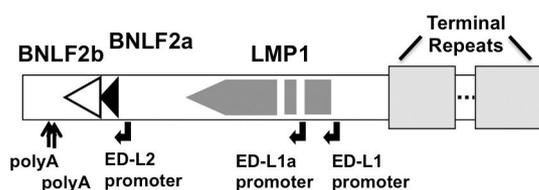


図1 BNLF2aおよびBNLF2bのEBVゲノム上の位置

*BNLF2a* と *BNLF2b* のゲノム上の位置とおおよその大きさが図1に示してある。98アミノ酸からなる*BNLF2b*のC末端にHaloタグを付加した後、AGS細胞やMDCK細胞に発現させ、局在を調べる。次に、この発現プラスミドを用いて、核移行シグナルを破壊した*BNLF2b*、リン酸化モチーフのひとつひとつをセリンからアラニンに置換した*BNLF2b*を、MDCK細胞に発現させ、細胞内局在が変化するかを調べる。

同時に、ウサギに免疫して作製した*BNLF2b*抗体を用いて、発現量の多いB95-8細胞からProtein G Magnetic Beadsを用いて*BNLF2b*タンパク質を免疫沈降し、二次元電気泳動を行い、Pro-Q Diamond染色あるいはリン酸化蛋白を認識する抗体を用いたウェスタン法を行うことにより、いくつかのリン酸化修飾がなされているのかを予想する。リン酸化モチーフを改変した*BNLF2b*を用いて同様な操作を行い、リン酸化部位を同定する。

#### (2)EBV感染細胞の増殖におけるBNLF2aとBNLF2bの働き

LCL-BNLF2 KO EBVがLCL-野生型EBVに較べて増殖が遅いことより、LCL-BNLF2 KO EBVに*BNLF2a*または*BNLF2b*遺伝子を導入して補うことで、増殖速度の回復を観察し、*BNLF2a*と*BNLF2b*のいずれがLCLの増殖に重要なかを明らかにする。

また、LCL-BNLF2 KO EBVとLCL-野生型EBVを較べると、LCLが分泌するサイトカインプロファイルが変化していると予想される。各LCLの培養上清中のサイトカインプロファイルを調べ、産生が低いものは外来性に補充し、産生が高いものはサイトカイン中和抗体やサイトカイン遺伝子のshRNA導入などによるサイトカインシグナルの遮断を行い、LCLの増殖速度に影響しているサイトカインシグナルを明らかにする。LCL-BNLF2 KO EBVに*BNLF2a*あるいは*BNLF2b*遺伝子を再導入した細胞のサイトカインプロファイルも調べ、*BNLF2a*と*BNLF2b*のいずれがサイトカインプロファイル変化の責任遺伝子であるかを明らかにする。

#### (3)腫瘍組織におけるBNLF2aとBNLF2bの発現と腫瘍の悪性度の相関

EBV陽性のI型バーキットリンパ腫細胞(6種類)、III型バーキットリンパ腫細胞(5種類)、また、EBV感染上皮細胞(5種類)の調べた全ての感染細胞において、*BNLF2a*と*BNLF2b*の発現が認められた。そこで、EBV関連癌の臨床サンプルを用いて、*BNLF2a*と*BNLF2b*の発現の有無と組織型や臨床像との関係を調べる。EBV陽性胃癌、および、鼻咽頭癌の検体を用いて免疫染色を行う。また、未固定標本から、RNAを抽出し、定量PCRを行い、*BNLF2a*と*BNLF2b*の発現と組織型の関連を調べる。

#### (4)EBV感染細胞の細胞死におけるBNLF2の働き

LCL-BNLF2 KO EBVがLCL-野生型EBVに較

べて、細胞の増殖速度が遅い原因について、アポトーシスの亢進がないかを調べる。アネキシンV染色や活性型 Caspase 3 等の染色を行い、差が認められた場合は、さらに詳しく、活性型 Caspase 9、活性型 Caspase 6、活性型 Caspase 7 等の染色を行う。さらに、分画遠心法で分離したミトコンドリア分画と細胞質分画における cytochrome C の変化を調べ、アポトーシスが内因性か外因性かを明らかにする。LCL-BNLF2 KO EBV に *BNLF2a* あるいは *BNLF2b* 遺伝子を再導入することで、細胞のアポトーシス亢進が、LCL-野生型 EBV と同じ程度まで復帰しているかを確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1)EBV 感染細胞における BNLF2a と BNLF2b の局在

免疫染色で BNLF2a は核周囲の小胞体に局在し、BNLF2b は膜と核に局在した(図 2)。アミノ酸配列は、BNLF2a は膜貫通領域を持っていた。BNLF2b は核移行シグナルとリン酸化モチーフを持っており、修飾による構造変化が細胞内局在を変化させると考えられた。

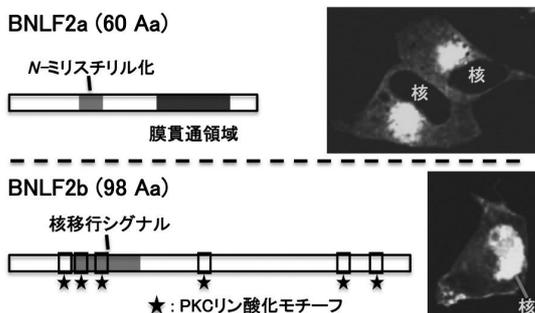


図2 BNLF2aおよびBNLF2bの構造と細胞内局在

##### (2)EBV 感染細胞の増殖における BNLF2a と BNLF2b の働き

*BNLF2a* と *BNLF2b* 遺伝子のダブルノックアウト EBV を作製した。ダブルノックアウト EBV で作成した LCL (LCL-BNLF2 KO EBV) は、野生型 EBV で作成した LCL (LCL-野生型 EBV) に比べて、細胞の増殖速度が低下することが明らかになった。(図 3)。また、サイトカインプロファイルを調べると、LCL-野生型 EBV に

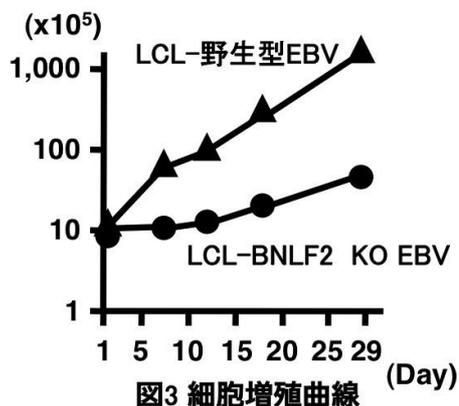


図3 細胞増殖曲線

比べ、LCL-BNLF2 KO EBV が分泌する IL-10 の産生低下が認められた。

##### (3)腫瘍組織における BNLF2a と BNLF2b の発現

NKT 細胞腫瘍株 5 種類と上咽頭癌細胞株 4 種類を用いて、BNLF2a および BNLF2b の発現が認められることを、RNA レベル、および、蛋白レベルで確認した。

##### (4)細胞死におけるBNLF2の働き

抗がん剤を用いたアポトーシス誘導の実験において、BNLF2b は NFκB の活性化を介してアポトーシス抵抗性を示すことが明らかになった。

#### 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 15 件)

Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, Yanai H, Nishikawa J, Nakazawa T, Iizasa H, Jinushi M, Sakaida I, Yoshiyama H. Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother*, 査読有, 20 (3), 169-174, 2014.

DOI: 10.1016/j.jiac.2013.09.007.

Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J. Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by EBV type III latency that up-regulates CD150/SLAM. *Cancer Sci*, 査読有, 105 (2), 211-8, 2014.

DOI: 10.1111/cas.12324.

Baghdadi M, Yoneda A, Yamashina T, Nagao H, Komohara Y, Nagai S, Akiba H, Foretz M, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Takeya M, Viollet B, Yagita H, Jinushi M. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. *Immunity*, 査読有, 39, 1070-1081. 2013.

DOI: 10.1016/j.immuni.2013.09.014.

Jinushi M, Yagita H, Yoshiyama H, Tahara H. Putting the brake on anticancer therapies: suppression of innate immune pathways by tumor-associated myeloid cells. *Trends in Molecular Medicine*, 査読有, 19 (9), 536-545, 2013.

DOI: 10.1016/j.molmed.2013.06.001

Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveolae-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in the target cells. *J Virol*, 査読有, 87(18), 10334-10347, 2013.

DOI: 10.1128/JVI.01310-13  
Baghdadi M, Yoshiyama H, Akiba H, Yagita H, Akita H, Jinushi M. Combined blockade of TIM-3 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas. *Cancer Immunol Immunother*, 査読有, 62, 629-637, 2013.  
DOI: 10.1007/s00262-012-1371-9  
Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Kinoshita I, Yoshiyama H, Hirashima M, Dosaka-Akita H, Uede T, Takaoka A, Yagita H, Jinushi M. Dendritic cell-derived TIM-3 is a universal repressor of nucleic acids-mediated antitumor innate immune responses. *Nat Immunol*, 査読有, 13, 832-842, 2012.  
DOI:10.1038/ni.2376  
Jinushi M, Baghdadi M, Chiba S, Yoshiyama H. Regulation of cancer stem cell activities by tumor associated macrophages. *Am J Cancer Res*, 査読有, 2(5), 529-539, 2012.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433107/>  
Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M, Yoshiyama H. EBV-associated gastric carcinoma. *Viruses*, 査読有, 4(12), 3420-3439, 2012.  
DOI:10.3390/v4123420.  
Baghdadi M, Chiba S, Yoshiyama H, Jinushi M. MFG-E8 regulates the immunogenic potential of dendritic cells primed with necrotic cell-mediated inflammatory signals. *PLoS ONE*, 7(6), e39607, 2012.  
DOI:10.1371/journal.pone.0039607.  
Jinushi M, Chiba S, Baghdadi M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Ito K, Yoshiyama H, Yagita H, Uede T, Takaoka A. ATM-mediated DNA damage signals suppress antitumor immunity by integrin- $\alpha$ 3-dependent mechanisms. *Cancer Res*, 査読有, 72(1):56-65, 2012.  
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-2028  
Kanda T, Shibata S, Saitou S, Murata T, Isomura H, Yoshiyama H, Takada K, Tsurumi T. Unexpected instability of family of repeats (FR), the critical cis-acting sequence required for EBV latent infection, in EBV-BAC systems. *PLoS ONE*, 査読有, 6(11), e27758, 2011.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0027758  
Noda C, Murata T, Kanda T, Yoshiyama H, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Tsurumi T. Identification

and characterization of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) as a transcriptional activator for Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1. *J Biol Chem*, 査読有, 286(49):42524-33, 2011.  
DOI: 10.1074/jbc.M111.271734  
Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Yagita H, Takaoka A, Tahara H. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anti-cancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 108(30), 12425-30, 2011.  
DOI: 10.1073/pnas.1106645108  
Miyachi K, Urano E, Yoshiyama H, Komano J. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci*, 査読有, 102, 1236-41, 2011.  
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01924.x

〔学会発表〕(計 12 件)

飯笹 久、林泰弘、中澤晶子、吉山裕規、  
酸耐性 *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、東京、2014  
年 3 月 26-28 日  
南保明日香、川西絵里、吉田龍二、吉山  
裕規、EBV 感染 B 細胞が放出するエキソ  
ソームの機能解析、第 61 回日本ウイル  
ス学会総会、神戸、2013 年 11 月 10-12  
日  
吉山裕規、飯笹 久、呉里美、坂井香織、  
藤田奈々、林泰弘、南保明日香、高田賢  
蔵、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、京都、2013 年 7 月 12 日  
Yoshiyama H, Jinushi M, Hayashi Y,  
Takada K, Hatakeyama M, Tanaka S,  
Fukayama M; Epithelial cell  
transformation by Epstein-Barr virus  
and its stemness. English Oral  
Session “EBV”;第 72 回日本癌学会学  
術総会、横浜、2013 年 10 月 3-5 日  
吉山裕規、赤田純子、濱田和希、林泰弘、  
山口博之、中村和行、*Helicobacter*  
*Pylori* Augments Epstein-Barr Virus  
Infection of Gastric Epithelial Cells  
(ピロリ菌が胃上皮細胞への EB ウイル  
スの感染を増強する) 第 86 回日本細菌  
学会総会、千葉、2013 年 3 月 18-20 日  
Yoshiyama H, Nanbo A, Jinushi M,  
Iizasa H, Shimizu N, Takada K; Latent  
expression of BNLF2a and BNLF2b in  
EBV-infected cells and their

oncogenic roles. *Frontiers in Cancer Science* 2012; 4<sup>th</sup> Annual Conference of the Cancer Science Institute of Singapore, Singapore, 2012, Nov. 5-8  
千葉殖幹、ムハンマドバグダーディー、秋葉久弥、吉山裕規、上出利光、高岡晃教、八木田秀雄、地主将久、腫瘍浸潤性樹状細胞上のTIM-3は、核酸に対する自然免疫応答を阻害する、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19-21日

吉山裕規、高田賢蔵、南保明日香、清水則夫、EBVの遺伝子BNLF2aとBNLF2bは溶解感染初期と潜伏期に発現し、腫瘍化に関与する、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、2012年11月13-15日

Yoshiyama H; Latent expression of Epstein-Barr virus genes, BNLF2a and BNLF2b and their oncogenic roles. Symposium : 2nd International Symposium, Research Center for Infection-associated Cancer, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan, 2012. Mar. 12-13.

吉山裕規、高田賢蔵、林泰弘、蛭川沙也加、山口博之、赤田純子、中村和行、ピロリ菌共生感染による胃上皮細胞でのEBウイルスの感染拡大、第9回EBウイルス研究会、米子、2012年7月6日

吉山裕規、高田賢蔵、南保明日香、清水則夫、EBVの新規遺伝子BNLF2aとBNLF2bは溶解感染初期と潜伏期に発現する、第27回ヘルペスウイルス研究会、愛知県東浦町、2012年6月7-9日

吉山裕規、南保明日香、地主将久、Epstein-Barrウイルスの新規遺伝子BNLF2a、BNLF2bは、溶解感染のみならず潜伏感染期にも発現し、ウイルスの腫瘍化活性に寄与する 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13-16日

北海道大学・医学部・准教授  
研究者番号：6035948

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉山 裕規 (YOSHIYAMA HIRONORI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：10253147

### (2) 研究分担者

地主 将久 (JINUSHI MASAHISA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：40318085

### (3) 連携研究者

南保 明日香 (NANBO ASUKA)