

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460545

研究課題名(和文) Epstein-Barrウイルス感染細胞が放出するエクソソームの機能解析

研究課題名(英文) The role of exosomes released from Epstein-Barr virus-infected cells

研究代表者

南保 明日香 (Nanbo, Asuka)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：60359487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)は、一部の例においてがんを引き起こす。感染細胞から放出される細胞外小胞エクソソームに含まれる細胞ならびにウイルス由来マイクロRNA(miRNA)が、エクソソームを介して標的細胞に運搬されることが知られているが、その機能は不明である。本研究では、次世代シーケンシングを用いて感染細胞由来エクソソームに含まれるmiRNAを網羅的に解析した。その結果、感染細胞由来エクソソームに特定のmiRNAが濃縮されることが示された。以上の結果から、選択的に内包されるmiRNAが、取り込まれた標的細胞に作用し、EBVが引き起こすがん発症に貢献する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Infection of Epstein-Barr virus (EBV), a ubiquitous human gamma herpesvirus, is associated with various malignancies in B lymphocytes and epithelial cells. EBV encodes 49 microRNAs. Although accumulating evidence demonstrates that EBV infection regulates the profile of microRNAs in the cells, little is known about the microRNAs in exosomes released from infected cells. Here, we characterized the expression profile of intracellular and exosomal microRNAs in EBV-negative and EBV-infected B cells by next-generation sequencing. We found that the biogenesis of exosomes is upregulated in EBV-infected cells compared with EBV-negative cells. We also observed that viral and several specific host microRNAs were predominantly incorporated in the exosomes released from EBV-infected cells. Our findings indicate that EBV infection modulates the biogenesis of exosomes and the profile of exosomal microRNAs, potentially contributing to phenotypic changes in cells receiving these exosomes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Epstein-Barrウイルス エクソソーム miRNA 次世代シーケンシング

## 1. 研究開始当初の背景

新たな細胞間コミュニケーション媒体の1つとして注目されているエクソソームは、様々な細胞種から放出される直径 60-130 nm の細胞外小胞である。標的細胞に取り込まれたエクソソームは 放出細胞由来の様々なタンパク質、マイクロ RNA (miRNA)、mRNA を標的細胞へ輸送することで多様な生理機能を示す。近年、がんを始めとした様々な疾患とエクソソームとの関連に注目が集まっている。例えば、がん細胞が放出するエクソソームは、がんに対する免疫応答の抑制、およびがん細胞の転移能や浸潤性の増強などの機能を介してがんの進展に寄与する可能性が示されている。さらに、がん細胞においてエクソソームの分泌が増強していること、また、これらのエクソソームが特異的な腫瘍マーカーを保持していることから、新たなバイオマーカーとしてのエクソソームの有用性が期待されている。

ヒト  $\gamma$ -ヘルペスウイルスに属する Epstein-Barr ウイルス(EBV)は普遍的な 2 本鎖 DNA ウイルスであり、B 細胞および上皮細胞に指向性を示す。EBV は、初感染後終生ヒトに持続感染し、ほとんどの場合において不顕性である一方、一部の例において、パーキットリンパ腫、上咽頭がん、胃がん等の様々ながんに関連することが知られている。従来、EBV 感染細胞が放出するエクソソームが種々のウイルス因子を標的細胞に運搬することが報告されていた。しかしながら、従来の研究の多くは、特定のウイルス因子を強制発現した細胞由来エクソソームを用いており、これらの研究成果は生理的条件を反映していない可能性があった。また、ウイルス感染細胞由来エクソソームが標的細胞においてどのような機能を示すかについては不明であった。これに対して研究代表者は、EBV 感染細胞由来エクソソームがカベオラ依存的エンドサイトーシスを介して非感染上皮細胞へ取り込まれること、さらに EBV 感染 B 細胞から放出されるエクソソームを取り込んだ標的上皮細胞において、非感染細胞由来エクソソームと比較して、より顕著な細胞増殖および接着因子である intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)発現が誘導されることを明らかにした(Nanbo *et al.* 2013)。これらの結果から、EBV 感染細胞が放出するエクソソームは、内包する生理活性因子を標的細胞に輸送することで形質変動を賦与する可能性が示唆され、研究代表者はその候補因子の1つとして、EBV がコードするがん遺伝子 latent

membrane protein (LMP)1 が、ICAM-1 の発現増強に寄与することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

(1) EBV は、BART ならびに BHRF1 の 2 つの領域にコードされる 49 種類の miRNA を発現する。従来からの報告から、エクソソームを介して、EBV miRNA が標的細胞に輸送されることが報告されているが、その生理的役割については不明な点が多い。また、従来からの報告から、EBV 感染によって細胞内の miRNA 発現様式が変動することが知られているが、感染細胞から放出される細胞外小胞エクソソームに内包される miRNA の発現様式についてはほとんど報告がない。そこで本研究では、同一のパーキットリンパ腫患者から樹立された感染様式の異なる B 細胞株を用いて、次世代シーケンシングにより、EBV 感染がエクソソーム由来 miRNA の発現様式に与える影響を検討した。

(2) 上皮細胞への EBV 感染は、ウイルス感染 B 細胞との細胞間接触を介する可能性が示されているが、その分子機構には不明な点が多く残されている。これに対して研究代表者は、これまで、細胞間接触を介した上皮細胞への EBV 感染において、種々の細胞内情報伝達系が貢献すること (Nanbo *et al.* 2012)、さらに、細胞間接触を介する EBV 感染において ICAM-1 を含む種々の接着因子が関与することを証明した (Nanbo *et al.* 2016)。以上の研究成果から、EBV 感染 B 細胞と上皮細胞が細胞間接触を介して近接することで、感染細胞由来エクソソームが効率良く上皮細胞に取り込まれ、これに引き続いて誘導される接着因子の発現を介して EBV 伝播に寄与する可能性が予想された。しかしながら、細胞間接触を介するウイルス伝播におけるエクソソームの役割については現時点において全く明らかにされていない。そこで、本研究では、上皮細胞への EBV 感染メカニズムを分子レベルで解明する目的で、細胞間接触を介する EBV 伝播におけるエクソソームの役割の検証を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) EBV の潜伏感染様式には I, II, III 型の 3 種が存在し、それぞれ発現するウイルス遺伝子の種類が異なる。本研究では、同一のパーキットリンパ腫患者から樹立された、EBV 陰性、I 型あるいは III 型潜伏感染 Mutu 細胞

株(それぞれ Mutu<sup>-</sup>, Mutu I, Mutu III)の培養上清から超遠心法によりエキソソームを単離し、内包される宿主ならびに EBV 由来 miRNA について次世代シーケンシングにより解析を行い、細胞由来 miRNA との比較を行った。また、各種 Mutu 細胞におけるエキソソームの産生のある多胞体形成、ならびにエキソソーム産生を、マーカーである CD63 発現を指標に、それぞれ、免疫染色法とウエスタンブロット法で検討した。

(2) 細胞間接触を介するウイルス伝播におけるエキソソームの役割を検討するため、EBV 感染バーキットリンパ腫 Akata 細胞株から調整したエキソソームを前処理した上皮細胞と EBV 潜伏感染 B 細胞との共培養を行い、上皮細胞への EBV 伝播を検討した。次に、エキソソーム産生に寄与する宿主因子である Rab27 発現を shRNA によって抑制した EBV 感染 Akata 細胞を用いて、上皮細胞との共培養を行い、EBV 伝播効率に与える影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) Mutu III において、Mutu<sup>-</sup>, Mutu I と比較して、エキソソーム産生のある多胞体形成ならびにエキソソーム産生量が顕著に増加していた。また、3 種のエキソソームに内包される miRNA の発現様式及びその割合を、次世代シーケンシングにより、各種エキソソームに内包された miRNA について上位 40 種について比較したところ、Mutu I 由来エキソソームにはウイルス由来 miRNA が 3 種認められたのに対し、Mutu III 由来エキソソームには 9 種の EBV miRNA が内包されることが示された。また、Mutu III 由来エキソソームに、複数の特異的な細胞由来 miRNA が選択的に内包されることが明らかになった。さらに、Mutu III 由来エキソソームには、他のエキソソームと比較して、上位 40 種のうち 5 種の miRNA がより高濃度(100 倍以上)に濃縮されることが示された。

これらの高濃縮 miRNA の配列を検証したところ、従来の報告から、エキソソームへの選択的内包に貢献する EXOmotif が 1~8 配列存在することが示された (Cancers 投稿中)。

以上の結果から、III 型潜伏感染はエキソソーム産生ならびにエキソソームに内包される miRNA の発現様式を変動することが明らかになった。研究代表者はこれまで、Mutu III 由来エキソソームを処理した上皮細胞で細胞増殖や接着因子発現が誘導されることを明らかにしてきた。すなわち、以上の結果か

ら、Mutu III 由来エキソソームに選択的に内包される miRNA が、標的細胞の形質変動において機能する可能性が示唆された。

さらに、現時点において、EBV 関連がんの診断に有用なバイオマーカーは報告されていない。従って、今回の解析から、EBV 感染細胞由来エキソソームにおいて特異的且つ顕著に発現が増強している miRNA については今後バイオマーカーとしての有用性が期待される。

(2) 細胞間接触を介するウイルス伝播における EBV 感染細胞由来エキソソームの役割を明らかにする目的で、検討を行ったが、EBV 感染 Akata 細胞株由来エキソソームの前処理、ならびに Rab27 発現を抑制した EBV 感染 Akata 細胞との共培養共に、EBV 伝播効率への明らかな影響は認められなかった。そこで、研究代表者は、エキソソーム以外の共培養した細胞から放出される液性因子の役割について検討を行い、上皮細胞から放出される transform growth factor (TGF)-beta が、EBV 感染 B 細胞に作用し、ウイルス増殖を惹起することで、効率良い EBV 伝播に貢献することを解明した (Nanbo *et al.* Front Microbiol, *in press*) .

本研究で用いた系では、エキソソームの効果は認められなかった。一方、従来の報告から、マウスに移植した細胞株において miRNA 発現が著しく増強することが示されていることから、今後ヒト化マウスを用いた検討により、エキソソームの生理的条件下での機能が解明される可能性が期待される。

(3) (2) で示した検討を進める過程で、研究代表者は、EBV 粒子形成に關与する細胞内小器官の同定に成功した。従来の報告から、EBV は他のヘルペスウイルスファミリーと同様に、ゴルジ体で成熟する可能性が示されていたが、確定はされていなかった。研究代表者は、電子顕微鏡観察ならびに免疫染色法を用いて、種々の検討を行うことで、EBV の粒子形成が、主にシスゴルジ体で生ずることを解明した (Nanbo *et al.* Front Microbiol, 2018) .

#### < 引用文献 >

Rapaso *et al.* Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends, J Cell Biol, Vol. 200, 2013, 373-83

Meckes *et al.* Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication

Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 107, 2010, 20370-5

Pegtal *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 107, 2010, 6328-33

Nanbo *et al.* Roles of cell signaling pathways in cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission J. Virol. Vol. 86, 2013, 9285-96

Nanbo *et al.* Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells J. Virol. Vol. 87, 2012, 10334-47

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Nanbo A, Noda T, Ohba Y, Epstein-Barr Virus Acquires Its Final Envelope on Intracellular Compartments With Golgi Markers, Front Microbiol, 査読有, Vol. 9, 2018, 454  
DOI: 10.3389/fmicb.2018.00454

Nanbo A, Maruyama J, Imai M, Ujie M, Fujioka Y, Nishide S, Takada A, Ohba Y, Kawaoka Y, Ebola virus requires a host scramblase for externalization of phosphatidylserine on the surface of viral particles, PLoS Pathog, 査読有, Vol. 14, No. 1, 2018, e1006848  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006848

Horiguchi M, Fujioka M, Kondo T, Fujioka Y, Li X, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Nishide S, Nanbo A, Teshima T, Ohba Y, Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. Cell Struc. Func, 査読有, Vol. 42, No. 1, 2017, pp. 15-26  
DOI: 10.1247/csf.16019

Furuyama W, Marzi A, Carmody AB, Maruyama J, Kuroda M, Miyamoto H, Nanbo A, Manzoor R, Yoshida R, Igarashi M, Feldmann H, Takada A, Fcγ-receptor IIa-mediated Src Signaling Pathway Is Essential for the Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection. PLoS Pathog, 査読有, Vol. 12, No. 12, 2016, e1006139  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006139

Nanbo A, Kachi K, Yoshiyama H, Ohba Y, Epstein-Barr virus exploits host endocytic

machinery for cell-to-cell viral transmission rather than a virological synapse, J Gen Virol, 査読有, Vol. 97, No. 11, 2016, pp. 2989-3006

DOI: 10.1099/jgv.0.000605

Yamada T, Tsuda M, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M, Ohba Y, Receptor activator of NF-κB ligand induces cell adhesion and integrin α2 expression via NF-κB in head and neck cancers. Sci Rep, 査読有, vol. 6, 2016, 23545  
DOI: 10.1038/srep23545

Inuzuka T, Fujioka Y, Tsuda M, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Tanaka S, Ohba Y, Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C, Sci Rep, 査読有, vol. 6, 2016, 21613  
DOI: 10.1038/srep21613

Furuyama W, Marzi A, Nanbo A, Haddock E, Maruyama M, Miyamoto H, Igarashi M, Yoshida R, Noyori O, Feldmann H, Takada A : Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy, Sci Rep, 査読有, Vol. 6, 2016, 20514  
DOI: 10.1038/srep20514

Kuroda M, Fujikura D, Nanbo A, Marzi A, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Matsuno K, Miyamoto H, Yoshida R, Feldmann H, Takada A, The Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for the Cellular Entry of Ebola Virus. J Virol, 査読有, Vol. 89, No. 12, 2015, pp. 6481-6493  
DOI: 10.1128/JVI.03156-14

Strong MJ, Baddoo M, Nanbo A, Xu M, Puetter A, Lin Z, Comprehensive RNA-seq analysis reveals contamination of multiple nasopharyngeal carcinoma cell lines with HeLa cell genomes, J Virol, 査読有 Vol. 88, No.18, 2014, pp. 10696-704  
DOI: 10.1128/JVI.01457-14

Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H, Purification and Fluorescent Labeling of Exosomes, Bio-protocol, 査読有, 2014, e1103  
URL: <https://bio-protocol.org/e1103>

〔学会発表〕(計 11 件)

南保明日香, Epstein-Barr ウイルス粒子

出芽機構に関する研究,第 31 回ヘルペスウイルス研究会, 2017

南保明日香,細胞接触を介した Epstein-Barr ウイルス感染機構における分子機構の解明,第 14 回 EBV 研究会, 2017

Nanbo A, Characterization of exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells,第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016

Nanbo A, Trafficking of adhesion molecules via recycling endosomes is crucial for cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission, The Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, 2016

Nanbo A, Trafficking of adhesion molecules via recycling endosomes is crucial for cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission,第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015

Nanbo A, Characterization of exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells,第 12 回 EB ウイルス研究会, 2015

Nanbo A, Bio-imaging of entry process of Ebolavirus, 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, 2015

南保明日香,細胞間接触を介した上皮細胞への EBV 伝播の分子機構に関する研究,第 11 回 EB ウイルス研究会, 2014

南保明日香,ウイルス-宿主相互作用を可視化する,第 87 回日本生化学会大会シンポジウム「蛍光・発光タンパク質を使ったイノベーション」, 2014

Nanbo A, Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized *via* caveolae-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in the target cells, ASEMV Annual Meeting, 2014

南保明日香,細胞間接触を介した上皮細胞への EBV 伝播の分子機構に関する研究,第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014

〔図書〕(計 2 件)

南保明日香,診断と治療社,EB ウイルス関連胃癌, 2016、16-20

南保明日香,診断と治療社,EB ウイルス, 2015、39-46

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://cp.med.hokudai.ac.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

南保明日香 (NANBO Asuka)  
北海道大学・医学研究院・准教授  
研究者番号 : 60359487