

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390129

研究課題名 (和文) EBウイルスによる自然免疫活性化と病原性に関する研究

研究課題名 (英文) EBV's pathogenicity through activation of innate immunity

研究代表者 高田 賢蔵 (TAKADA KENZO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30133721

研究成果の概要：伝染性単核症、慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV)、EBV 関連血球貪食症候群 (EBV-HLH) などの活動性の EBV 感染症では TNF- α 、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカインが大量に分泌され、サイトカインストームの状態を呈し、それが病態形成の主役を担っていると考えられる。我々は、EBV がコードする小 RNA EBER が La との複合体の形で細胞外へ放出され、toll-like receptor 3 (TLR-3) により二本鎖 RNA として検知され、インターフェロンや炎症性サイトカインの発現を誘導することを見出した。また、急性 EBV 感染症患者の血清中に TLR-3 の活性化を誘導するに十分量の EBER が存在することも明らかにした。これらの知見は、何故 EBV の急性感染症でサイトカインストームが引き起こされるのかを説明できる可能性がある。

本年度の研究では、EBER が樹状細胞の活性化を起こすか否かの検討を行った。ヒト末梢血より樹状細胞を分離し、*in vitro* で合成した EBER を培地中に加え、各種炎症性サイトカインの誘導を RT-PCR 法、ELISA 法により調べた。その結果、EBER が樹状細胞の活性化を引き起こすことが確認された。さらに、*in vivo* での EBER の活性を調べるために、EBER トランスジェニックマウスを作製した。U6 プロモーターに連結した EBER 遺伝子を組み込んだマウスで EBER が発現することを *in situ* Hybridization 法で確認した。今後、EBER トランスジェニックマウスで TLR3 の活性化、炎症性サイトカインの誘導が起こるか否かを検討する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,691,054	2,307,316	9,998,370
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,091,054	4,227,316	18,318,370

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

生体防御を司る免疫系は自然免疫系と獲得免疫系から成り立っている。これまでは T リンパ球、B リンパ球が主役を務める獲得免疫系が脚光を浴びてきた。しかし最近、自然免疫系の重要性が俄然クローズアップされてきた。自然免疫系はウイルス感染を細胞外あるいは細胞内で検知して自然免疫系を発動させる。ウイルス感染に伴って産生される二本鎖 RNA は細胞表面においては Toll-like receptor 3 (TLR3)により、細胞内にある Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) や melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)により検知され、その結果、interferon regulatory factor 3 (IRF-3)及び NF κ B が活性化し、インターフェロン (IFN) や各種サイトカインの発現が誘導される (Akira et al., Cell 124: 783-801, 2006)。

EB ウイルス (EBV) の初感染像である伝染性単核症は異型 T リンパ球の出現が病態形成の主体をなし、これは EBV 感染に対する過剰免疫反応と理解される。また、慢性活動性 EBV 感染症にしばしば合併する EBV 関連血球貪食症候群 (EBV-AHS) は IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 などの高サイトカイン血症が病態形成の主要な役割を果たしている。このような過剰免疫反応、高サイトカイン血症は EBV 感染の様々な局面において病態形成に重要な役割を果たしていると推測される。

EBV がコードする約 170 塩基の RNA 分子 EBER は蛋白質に翻訳されず、感染細胞当り $\sim 10^7$ コピーと多量に存在する。多数の stem-loop からなる二本鎖 RNA 様構造をとる

ものと予測されている。我々は既に、EBER が二本鎖 RNA と競合して IFN 誘導性の蛋白質キナーゼ PKR へ結合しその活性化を阻害すること、その結果、細胞は IFN による抗ウイルス作用に対して抵抗性となること (Nanbo et al., EMBO J. 21: 954-965, 2002)、また、メカニズムは不明であるが、B リンパ球においては IL-10 (Kitagawa et al., EMBO J. 19: 6742-6750, 2000)、T リンパ球においては IL-9 (Yang et al., Cancer Res. 64: 5332-5337, 2004)、上皮細胞においてはインスリン様成長因子 IGF-1 (Iwakiri et al., Cancer Res. 63: 7062-7067; Iwakiri et al., Oncogene 24: 1767-1773, 2005) の発現を誘導し、感染細胞のオートクライン増殖をサポートすることを報告している。

最近、我々は、EBER が二本鎖 RNA と同様に RIG-I を活性化し、IFN の発現を誘導することを見いだした (Samanta et al. EMBO J. 25: 4207-4214, 2006)。すなわち、EBER が二本鎖 RNA と同様に RIG-I、MDA5、TLR3 により検知され、自然免疫系を惹起し、過剰免疫反応、高サイトカイン血症などを引き起こしている可能性が示唆された。上述の EBER による IL-10、IL-9、IGF-1 などの発現誘導も EBER による自然免疫系活性化による可能性が示唆された。

既に、EBER が MDA5 発現細胞において IFN の発現を誘導すること、EBV 陰性培養細胞培地中に in vitro で合成した EBER を添加すると IFN の発現が誘導されること、を確認した (未発表データ)。

2. 研究の目的

EBV 感染症ではなぜ過剰免疫反応、高サイトカイン血症が惹起されるのか、本研究は、EBER による自然免疫活性化にその原因を求めめるものである。

1) EBV 陰性培養細胞培地中に *in vitro* で合成した EBER を添加した時に起こる IFN の発現誘導が EBER による TLR3 活性化によるものか、2) EBER による TLR3 活性化により各種サイトカインの誘導が惹起されるか、3) EBER が TLR3 を介し樹状細胞を活性化し得るか、4) EBV 感染症患者の病態と血清中の EBER 量、サイトカイン量との関連、を明らかにする。

本研究は、EBER が RIG-I を活性化するという我々の独自の研究成果をベースに展開するものである。ウイルス RNA による RIG-I 活性化はニューカッスル病ウイルス (NDV)、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、脳心筋炎ウイルス (EMCV) などの RNA ウイルスで報告されているが (Yoneyama et al., Nat. Immunol. 5: 730-737, 2004)、DNA ウイルスがコードする RNA が RIG-I を活性化することは我々が初めて見いだした。

EBER による自然免疫系活性化は EBV の病原性発揮に重要な役割を果たしている可能性がある。本研究は、EBV 関連疾患の治療法開発に資することが期待できる。

3. 研究の方法

研究計画・方法

本研究ではバーキットリンパ腫由来の EBV 陽性細胞株 Akata、Daudi、Mutu、それらの細胞株から分離した EBV 陰性細胞クローン Akata⁻、Daudi⁻、Mutu⁻、EBV 陰性細胞クローンへ EBV 又は EBER ノックアウト EBV を再感染した細胞クローン、EBV 陰性細胞クローンへ EBER プラスミドを導入した細胞、対照と

してネオマイシン耐性 (Neo^r) プラスミドを導入した細胞を用いる。

4. 研究成果

(1) EBER による TLR3 活性化の検討

我々は既に、EBV 陽性細胞培養上清中に EBER が存在すること、*in vitro* で合成した EBER を EBV 陰性細胞培地中に添加すると IFN の発現が誘導されること、を見いだしている。そこで、このような可溶性の EBER による IFN 誘導が TLR3 の活性化によるものか否かの検討を行った。

① TLR3 に対する中和抗体、TLR3 の siRNA により、EBV 陰性細胞培地中に EBER を添加した時の IFN、ISG 誘導が阻止されることを RT-PCR 法で確認した。

② 更に、EBER を EBV 陰性細胞培地中に添加した時に NF κ B、IRF3 の活性化が起こることを、リン酸化 NF κ B、リン酸化 IRF3 を認識する抗体を用いた Western Blot 法で確認した。NF κ B については NF κ B プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイにより調べた。更に、ドミネガ型 I κ B- α プラスミド、IRF3 の siRNA により NF κ B、IRF3 の活性化を抑制すると EBER による IFN、ISG の発現も抑制されることを RT-PCR 法で確認した。

以上の実験により、EBER による IFN 活性化が TLR3 を介する NF κ B、IRF3 の活性化によるものであることが確認された。

③ 上述のように、EBV 陽性細胞培養上清中には予想外に大量の EBER が存在することを見いだしている。そこで、各種 EBV 陽性細胞の培養上清中に存在する EBER 量を定量的 PCR 法により調べた。培養上清中の EBER を EBV 陰性細胞の培地中に添加した時に IFN の活性化が起こることを確認した。

④ EBER は細胞内で La、L22、PKR などの宿主蛋白質と結合することが知られている。この内、La はエクソゾームとして分泌されることが知られている。そこで、EBV 陽性細胞培養上清中の EBER が La の分泌に伴う能動的なものか、死細胞からの遊出によるものかを明らかにした。抗 La、抗 L22、抗 PKR 抗体を用いて培養上清から La、L22、PKR を免疫沈降し、UV クロスリンク後、RNA を抽出し、沈降物中に EBER が存在するか否かを RT-PCR 法で調べた。その結果、La の沈降物中にのみ EBER が存在することが確認され、EBER が La と共に能動的に細胞外へ分泌されたことが証明された。

(2) EBER による TLR3 活性化とサイトカイン誘導の検討

RIG-I、MDA5、TLR3 の活性化は、IFN に加えて各種サイトカインの発現を誘導することが知られている。また、EBER により RIG-I が活性化し IFN の誘導が起こることを既に報告した。そこで、EBER による TLR3 活性化がサイトカイン誘導を起こすか否かの検討を行った。

EBV 陰性 Mutu 細胞の培地中に EBER を添加した時に IL-6、IFN- γ 、TNF- α の発現が誘導されることを RT-PCR 法で確認した。EBER による TLR3 の活性化によりサイトカインの誘導が起こることが確認された。

(3) EBER による樹状細胞活性化についての検討

樹状細胞は TLR3 を強発現しており、二本鎖 RNA により活性化されることが明らかとなっている。そこで EBER が TLR3 を介し樹状細胞を活性化し得るか否かについて検討した。

① EBER によるサイトカイン産生誘導の解析：in vitro 転写により合成した EBER を用い未熟樹状細胞を刺激後、TNF-

α 、IL-6 などのサイトカイン産生誘導がおこるかことを RT-PCR 法で確認した。

② 補助分子発現誘導の解析：樹状細胞活性化のマーカーである CD80、CD86、CD83 などの補助分子の発現が誘導されることを FACS を用いて確認した。

③ TLR3 の中和抗体を用いた検討：樹状細胞による上記の活性化が TLR3 の中和抗体によりブロックされることを確認した。

(4) EBV 感染症患者血清中の EBER 出現とサイトカイン動態の検討

伝染性単核症、慢性活動性 EBV 感染症、EBV-AHS などでは過剰な免疫反応、高サイトカイン血症が出現する。これらと EBER による自然免疫系活性化との関連を調べる。

伝染性単核症、慢性活動性 EBV 感染症、EBV-AHS 患者の急性期、回復期の血清を用い、可溶性 EBER を RT-PCR 法で定量した。これら患者の急性期の血清中には TLR3 を活性化するに十分な量の EBER が存在することが確認された。今後、伝染性単核症、慢性活動性 EBV 感染症、EBV-AHS の病態と EBER 量、サイトカイン量を更に検討する予定である。

研究成果の概要

EB ウイルスがコードする小 RNA 分子 EBER が La との複合体として細胞外へ放出され、自然免疫系の二本鎖 RNA 検知分子である TLR3 を活性化すること、その結果各種サイトカインの誘導が起こること、急性 EBV 感染症血清中には TLR3 活性化に十分量の EBER が存在すること、を明らかにした。急性 EBV 感染症における過剰免疫反応、高サイトカイン血症が EBER による自然免疫活性化によることが示唆された。

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 10 件)

- ① Hsiao, J.R, Chang, K.C., Chen, C.W., Wu, S.Y., Hsu, M.C., Jin, Y.T., Tsai, S.T., Takada, K. and Chang, Y.: Endoplasmic reticulum stress triggers XBP-1-mediated upregulation of an EBV oncoprotein in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.*, in press, 査読有
- ② Hino, R., Uozaki, H., Murakami, N., Ushiki, T., Shinozaki, A., Ishikawa, S., Morikawa, T., Nakaya, T., Sakatani, T., Takada, K. and Fukayama, M.: Viral protein LMP2A induces STAT3/DNMT1-mediated promoter methylation of the PTEN gene in EBV-associated gastric carcinoma, *Cancer Res.*, in press, 査読有
- ③ Maruo, S., Wu, Y., Ito, M., Kieff, E.D. and Takada, K.: Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C residues critical for maintaining lymphoblastoid cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 4419-4424, 2009, 査読有
- ④ Alajez, N.M., Mocanu, J.D., Shi, W., Chia, M.C., Breitbach, C.J., Hui, A.B.Y., Knowles, S., Bell, J.C., Busson, P., Takada, K., Lo, K.-W., O'Sullivan, B., Gullane, P. and Liu, F.-F.: Efficacy of Systemically administered mutant vesicular stomatitis virus (VSV{capital delta}51) combined with radiation for nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 14: 4891-4897, 2008, 査読有
- ⑤ Samanta, M., Iwakiri, D. and Takada, K.: Epstein-Barr virus-encoded small RNA (EBER) induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene*, 27: 4150-4160, 2008, 査読有
- ⑥ Hino, R., Uozaki, H., Inoue, Y., Shintani, Y., Ushiki, T., Sakatani, T., Farrell, P.J., Takada, K. and Fukayama, M.: Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Res.*, 68: 1427-1435, 2008, 査読有
- ⑦ Seto, E., Ooka, T., Middeldorp, J. and Takada, K.: Reconstitution of nasopharyngeal carcinoma-type Epstein-Barr virus infection induces tumorigenicity. *Cancer Res.*, 68: 1030-1036, 2008, 査読有
- ⑧ Wu, Y., Maruo, S., Yajima, M., Kanda, T. and Takada, K.: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA 2 (EBER2) but not EBER1 plays a critical role in EBV-induced B-cell growth transformation. *J. Virol.*, 81: 11236-11245, 2007, 査読有
- ⑨ Kanda, T., Kamiya, M., Maruo, S., Iwakiri, D. and Takada, K.: Symmetrical localization of extrachromosomally-replicating viral episomes on sister chromatids. *J. Cell Sci.*, 120: 1529-1539, 2007, 査読有
- ⑩ Wen, W., Iwakiri, D., Yamamoto, K., Maruo, S., Kanda, T. and Takada, K.: Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate early gene following primary infection of B-lymphocytes. *J. Virol.*, 81: 1037-1042, 2007, 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① Takada, K., Iwakiri, D. and M. Samanta: Epstein-Barr virus-induced oncogenesis through utilizing the innate immunity system. 13th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Guangzhou, 2008. 11.8
- ② Takada, K.: Activation of innate immunity by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. 3rd Symposium of High Technology Research Center. Chiba, 2007.11.16
- ③ Takada, K.: EBV-encoded non-coding RNA exerts oncogenic activity by utilizing the innate immunity system. 13rd International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Orvieto, Italy, 2007.11.5
- ④ Takada, K. and Iwakiri, D.: Role of Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNAs and innate immunity in oncogenesis. 第 66 回日本癌学会学術総会シンポジウム「ウイルス発がん」、横浜、2007.10.3
- ⑤ Takada, K., Samanta, M., Iwakiri, D., Wu, Y. and Maruo, S.: Role of Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNAs and innate immunity in oncogenesis. East-West Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Sunshine Coast, Australia, 2007. 8.2

〔図書〕（計 2 件）

- ① 高田賢蔵（編集）：「医科ウイルス学」、第 3 版、南江堂、東京、2009.
- ② 高田賢蔵（監修）：「EBウイルス」、第 2 版、診断と治療社、東京、2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 賢蔵 (TAKADA KENZO)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：30133721

(2) 研究分担者

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

瀬戸 絵理 (SETO ERI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所
学術研究員
研究者番号：40431382

(3) 連携研究者

なし