

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460546

研究課題名(和文) EBウイルス陽性胃がんの発生に関わるピロリ菌の作用の研究

研究課題名(英文) Effect of H. pylori coinfection on genesis of EB virus associated gastric cancer

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌は胃がんの発生に働く。一方、EBウイルス(EBV)も10%程度の胃がんの発生に関与している。それぞれの微生物は、胃がんの発生において別個に働くと考えられてきたが、EBV陽性胃がんの周囲に、ピロリ菌感染による萎縮性胃炎がしばしば認められる。これより、EBV陽性胃がんの形成に、ピロリ菌が協働している可能性が考えられた。そこで、胃上皮細胞を用いてピロリ菌感染によるEBV感染状態の変化を解析した。

ピロリ菌のLPSが胃上皮細胞の自然免疫応答を攪乱し、感染細胞でのEBVの増殖を促した。ピロリ菌とEBVの二重感染が宿主細胞のシグナル応答を変化させ、EBV関連胃がんの発生を促進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)： We studied Epstein-Barr virus (EBV) associated gastric cancer as a model of epithelial infection and tumor formation by EBV. Both EBV and H. pylori causally associates with gastric cancer. These two pathogens are considered to play roles for gastric oncogenesis independently. However, we have observed that EBV-associated gastric cancer frequently locates near the mucosal atrophic border, where inflammatory response is strong. We examined pathogenic role of H. pylori by coinfecting with EBV on gastric epithelial cells.

H. pylori infection enhanced expression of EBV genes for up to 10 fold with increase of interferon-beta; production. Toxin non-producing H. pylori also enhanced EBV gene expression. A bacterial component from H. pylori enhanced expression of the EBV genes up to 10 fold. Disturbance of anti-viral response by bacterial infection seems to enhance EBV infection of epithelial cells. The mechanism of enhancement should be clarified.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス ピロリ菌 胃がん 発がん EBウイルス関連胃がん

### 1. 研究開始当初の背景

EBウイルス(EBV)は成人の90%以上が感染しているヘルペスウイルスである。EBVは、Bリンパ球と上皮細胞に感染し、バーキットリンパ腫、日和見Bリンパ腫、上咽頭癌、および、EBV関連胃がんなどの腫瘍の原因となる。Bリンパ球由来の腫瘍では、EBV感染が遺伝子組換え酵素の活性化を促し、プロモーターが組み替わることでc-mycの過剰発現が起こることが明らかにされている。それに較べて、EBV関連上皮細胞性腫瘍の発癌に関わる分子機構については解明されるべきことが多く残されている。

また、一方で、EBVは世界人口の90%が感染している普遍的なヘルペスウイルスである。多くのEBV感染者のうち限られた者からのみEBV関連腫瘍が発生し、大部分の感染者は無症状であるということは、大きな謎である。遺伝的要因や環境因子などがEBV関連腫瘍の形成過程に関与していると考えられているが、分子基盤的な理解を含め、詳細は明らかになっていない。胃がん全体に対するEBV関連胃がんの割合は地域差が認められ、ドイツで高く(18%)英国で低い(2%)。また、バーキットリンパ腫はアフリカの赤道直下に、上咽頭癌は東アジア南部に集積して発症する。一方、エイズに伴うBリンパ腫や移植治療の免疫抑制剤使用に伴う日和見リンパ腫の発生などでは、宿主の免疫機能の低下が腫瘍の発生と進展に関与している。

### 2. 研究の目的

EBVは、しばしばB細胞性あるいは上皮細胞性の腫瘍を形成する。一部のB細胞性腫瘍ではc-mycの活性化機構が明らかになっているが、上皮細胞においては、その腫瘍化機構は不明な点が多い。多くのEBV感染者のうちごく一部の人のみが発癌する理由として、宿主の免疫機能の変化との関わりが予想されるが、詳細な機構は不明である。今回、ピロリ菌が存在することが、胃上皮細胞におけるEBVの感染増殖を促進することを観察した。バクテリアとウイルスの二重感染が宿主細胞のシグナル応答を変化させ、ウイルス増殖を促していると考えられた(図1)ので、その分子機構を解明し、創薬等の治療戦略に役立てる。

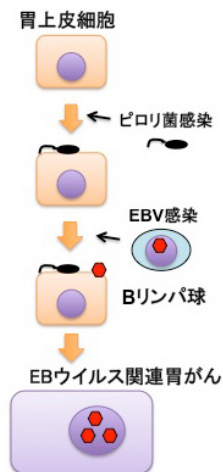


図1 ピロリ菌とEBV関連胃がん

### 3. 研究の方法

ピロリ菌が接触した胃上皮細胞においてEBVの感染増殖が促進したことは、ピロリ菌感染による宿主細胞の細胞応答の変化の結

果と考えられたので、その分子機構を解明する。平成26年度は、ピロリ菌の責任分子と細胞側のレセプターを明らかにするとともに、臨床データによる仮説の裏付けを行う。平成27年度は詳細な分子機構を明らかにし、ウイルス増殖と細胞内防御メカニズムの分子的理解を行う。

### ① 上皮細胞でEBV感染を増幅させるピロリ菌の責任分子の同定

胃上皮細胞由来のAGS細胞に1細胞当たり100個(m.o.i. 100)のピロリ菌を感染させ、その7時間後にGFP遺伝子を発現できる組換えEBV(GFP-EBV)を、m.o.i. 3で感染させた。48時間後にEBER EBV遺伝子の発現変化を調べたところ、ピロリ菌感染に伴いEBV遺伝子の発現が増加した(図2)。

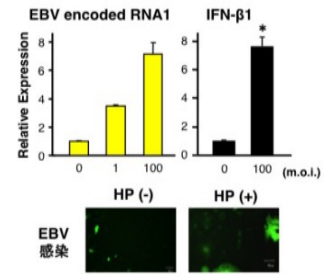


図2 ピロリ菌感染に伴うEBV感染増強

EBV感染を増幅させるピロリ菌の責任分子の同定を行った。最初に、ピロリ菌の持つ毒素が責任分子である可能性があるため、CagAおよびVacA毒素の遺伝子破壊菌を作製した。それぞれの破壊菌を用いて実験を行い、ピロリ菌毒素がEBV感染を増幅させる責任分子であるかを確認する。毒素が責任分子で無い場合は、毒素以外のものとして、菌に大量に存在する病原体関連分子パターン(PAMPs)のうち細胞表面に存在するものから責任分子を探索する。各PAMPsの用量に依存的にEBV遺伝子発現が増加するかを調べる。中和抗体、ポリミキシンB、CAP18などの阻害剤も使用して特異性を確認する。

### ② ピロリ菌の責任分子に対する宿主細胞のレセプターの同定

EBV感染を増幅させるピロリ菌の責任分子れに対応するTLRが予測される。HEK293細胞にEBVレセプターであるCD21分子を発現させた細胞(293-CD21細胞)はEBVに感染しウイルスを増殖できるため、293-CD21細胞を用いて、TLR4/MD-2/CD14、TLR7、TLR9等を順次発現させたクローンを作製する。それぞれのTLR発現293-CD21細胞を対応するPAMP分子で刺激し、EBVを感染させ、EBV遺伝子の発現を調べる。EBV感染を増幅させるピロリ菌の責任分子と対応するレセプターを同定する。

### ③ EBV感染増幅の分子機構の解明

EBV感染増幅が、EBV粒子の胃上皮細胞への侵入と、感染後のEBVゲノムの増幅の、いずれを促進する結果であるのかを明らかにする(図3)。EBVの溶解増殖感染のスイッチとなるウイルス転写調節因子BZLF1の

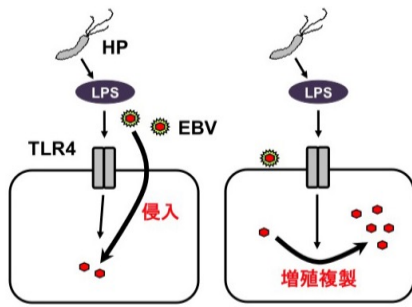


図3 ピロリ菌とEBVの相互作用

ノックアウト EBV (BZLF1-KO EBV) は細胞に感染し、感染細胞をトランスフォームするが、増殖はできない。しかし、BZLF1-KO EBV 持続感染細胞に外来性に BZLF1 を補うことで、BZLF1-KO EBV を産生できるようになる。この BZLF1-KO EBV はゲノムに GFP 遺伝子が組み込んである。当ウイルスを用いて実験を行い、ピロリ菌と接触させた上皮細胞で GFP 陽性細胞の数を算定することによって、エントリーの亢進であるのか EBV ゲノムの増幅であるのかを明らかにする。

EBV ゲノムの増幅である場合は、BZLF1 の転写を活性化させる細胞性因子を探索する。BZLF1 プロモーターでホタルルシフェラーゼを発現するプラスミドを用意し、レポーターアッセイを行う。活性化していると予測される転写因子について、定量的 PCR を行い、確認する。

#### 4. 研究成果

EBV 感染を増幅させるピロリ菌の責任分子の同定を行った。最初に調べたピロリ菌の持つ毒素は責任分子ではないことが明らかになった。次に、菌の細胞表面に存在するものから責任分子を探索し、ピロリ菌のリポポリサッカライド (LPS) が用量依存的に EBV 遺伝子発現を増加させることがわかった (図 4)。

ピロリ菌の LPS を作用させることにより、CD21 に代わるコレセプターとされるインテグリン分子が胃上皮細胞で発現増強したことより、EBV 感染増幅は、感染後の EBV ゲノムの増幅ではなく、EBV 粒子の胃上皮細胞への侵入促進による結果であると考えられた。

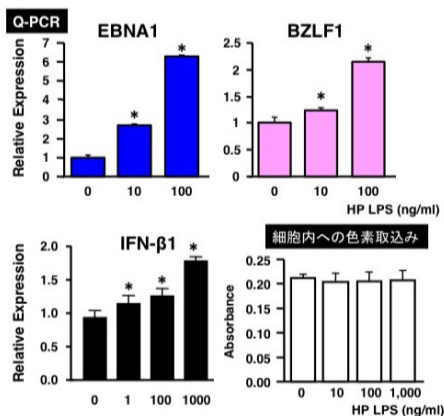


図4 ピロリ菌LPSがEBV遺伝子発現量を高める

#### 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 16 件)

- ① Torii Y, Kawada J, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLoS ONE* 査読有 12: e0175053, 2017.
- ② Furuyama W, Marzi A, Carmody AB, Maruyama J, Kuroda M, Miyamoto H, Nanbo A, Manzoor R, Yoshida R, Igarashi M, Feldmann H, Takada A. Fc $\gamma$ -receptor IIa-mediated Src signaling pathway is essential for the antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *PLoS Pathog* 査読有 12: e1006139, 2016.
- ③ Nanbo A, Kachi K, Yoshiyama H, Ohba Y. Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission. *J Gen Virol* 査読有 97: 2989-3006, 2016.
- ④ Murata T, Noda C, Narita Y, Watanabe T, Yoshida M, Ashio K, Sato Y, Goshima F, Kanda T, Yoshiyama H, Tsurumi T, Kimura H. Induction of Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1) by transcription factor activating protein 2 (AP-2). *J Virol* 査読有 90: 3873-3889, 2016.
- ⑤ Furuyama W, Marzi A, Nanbo A, Haddock E, Maruyama J, 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 6: 20514, 2016.
- ⑥ Iizasa H, Ishihara S, Ricardo T, Kanehiro Y, Yoshiyama H. Dysbiotic infection in the stomach. *World J Gastroenterol* 査読有 21, 11450-11457, 2015.
- ⑦ Kanda T, Miyata M, Kano M, Kondo S, Yoshizaki T, Iizasa H. Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. *J Virol* 査読有 37: 2684-2697, 2015.
- ⑧ Nishikawa J, Yoshiyama H, Iizasa H, Kanehiro Y, Nakamura M, Nishimura J, Saito M, Okamoto T, Sakai K, Suehiro Y, Yamasaki T, Oga A, Yanai H, Sakaida I. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Cancers* 査読有 6, 2259-74, 2014.
- ⑨ 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: 169-174, 2014.
- ⑩ Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H. Purification and fluorescent labelling of exosomes. *Bio-protocols* 査読有 4 (7), Apr 05, 2014.
- ⑪ 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: 211-218, 2014.
- ⑫ Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y. A Ca(2+)-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat Commun* 査読有 4:2763, 2014.
- ⑬ Sai Y, Nishimura T, Muta M, Iizasa H, Miyata T, Nakashima E. Basic fibroblast growth factor is essential to maintain endothelial progenitor cell phenotype in TR-BME2 cells. *Biol Pharm Bull* 査読有 37: 688-693, 2014.
- ⑭ 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.
- ⑮ 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: 10334-10347, 2013.
- ⑯ 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.
- ① Kanehiro Y, Richardo T, Kim H, Iizasa H, Yoshiyama H; EBV infection induces APOBEC3-dependent mitochondrial DNA mutation in epithelial cells. 17<sup>th</sup> International Symposium on EBV and associated diseases, Zurich, Switzerland, 2016. Aug 8-12.
- ② Nanbo A, Kachi K, Yoshiyama H, Ohba Y; Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission. 17<sup>th</sup> International Symposium on EBV and associated diseases, Zurich, Switzerland, 2016. Aug 8-12.
- ③ Iizasa H, Richardo T, Kanehiro Y, Kim H, Yoshiyama H; Bacterial coinfection augments Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Gordon Research Conference 'Nasopharyngeal Carcinoma'*, The Hong Kong University of Science and Technology, China, 2016. June 26-July 1.
- ④ Iizasa H, Kim H, Yoshiyama H; Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART6 regulates viral latency and induces epithelial-mesenchymal transition. *Gordon Research Conference 'Nasopharyngeal Carcinoma'*, The Hong Kong University of Science and Technology, China, 2016. June 26-July 1.
- ⑤ Iizasa H, Nishikura K, Yoshiyama H, Kawachi H; Role of viral miRNA in Epstein-Barr virus positive malignant tumor cells. The 11th Research Symposium on Human Natural Defense System, Yonsei University College of Medicine, Seoul, 2015. Oct 17-18.
- ⑥ Kawada J, Torii Y, Suzuki M, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y; EBV infection of human monocytes induces AIM2 inflammasome activation. The 40<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop, Boise, Idaho, 2015. July 25-29.
- ⑦ Yoshiyama H, Iizasa H, Kanehiro Y, Tatano Y, Nanbo A, Takada K; A model of genesis of Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Frontiers in Cancer Science 2014; 6<sup>th</sup> Annual Conference of the Cancer Science Institute of Singapore*, Singapore, 2014. Nov 3-5.
- ⑧ Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J; Measles virus as a potential oncolytic virotherapy against B cell lymphomas. English Oral Session "EBV"; 73<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer

- Association, Yokohama, Japan, 2014, Sep. 25-27.
- ⑨ Yoshiyama H, Iizasa H, Tatano Y, Jinushi M, Nanbo A; Epstein-Barr virus genes, BNL2a and BNL2b are not only lytic but latent genes and contribute viral tumorigenicity. The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe, Japan, 2014. July 19-23.
- ⑩ 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. The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe, Japan, 2014. July 19-23.
- ⑪ Yoshiyama H, Iizasa H, Jinushi M, Baghdadi M, Nanbo A, Takada K; Epstein-Barr virus genes, BNL2a and BNL2b are latently expressed and contribute viral tumorigenicity. 16<sup>th</sup> International EBV meeting, Brisbane, Australia, 2014. July 16-19.
- ⑫ Kim H, Iizasa H, Kanehiro Y, Richardo T, Yoshiyama H, The regulatory region in the promoter for Epstein-Barr virus encoded BART microRNAs、ワークショップ Herpesviruses (6)W3-4-02、第 64 回日本ウイルス学会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日
- ⑬ 吉山裕規、咽頭癌とウイルス -分子機構-、第 29 回日本口腔・咽頭学会、教育講演、松江テルサ (松江)、2016 年 9 月 9 日
- ⑭ 飯笹久、Timmy Richardo、金廣優一、Hyoji Kim、溝手朝子、吉山裕規、ピロリ菌感染は EB ウイルスの胃上皮細胞における感染増殖を活性化する、第 89 回日本細菌学会、ワークショップ 13:Bacteria meet viral infection 大阪国際交流センター(大阪)、2016 年 3 月 23-25 日. 日本細菌学雑誌 2016; 71(1): 37
- ⑮ Nanbo Asuka, Yoshiyama Hironori, Ohba Yusuke, Trafficking of adhesion molecules via recycling endosomes is crucial for cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission、ワークショップ W1-C-06、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日
- ⑯ Ichikawa Takaya, Sato Yoshitaka, Goshima Fumi, Yoshiyama Hironori, Kanda Teru, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki, Role of histone H3 lysine 27 methyltransferase EZH2 in latency and reactivation of Epstein-Barr virus、

ワークショップ W1-C-05、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

[図書] (計 4 件)

- ① 金廣優一、Ricardo Timmy、飯笹久、吉山裕規. EB ウイルスの胃上皮細胞への感染と不死化、p53-59 (柳井秀雄、西川潤、清水則夫、吉山裕規 編: **EB ウィルス関連胃癌**、診断と治療社、東京)、2016 年 8 月
- ② 飯笹久、Hyoji Kim、吉山裕規. EB ウィルス関連胃癌研究の最近の動向、p32-35 (柳井秀雄、西川潤、清水則夫、吉山裕規 編: **EB ウィルス関連胃癌**、診断と治療社、東京)、2016 年 8 月
- ③ 吉山裕規、柳 壹夫 EB ウィルスの構造と遺伝子、p6-16 (高田賢藏 監修、柳井秀雄、清水則夫、吉山裕規 編: **EB ウィルス改訂 3 版**、診断と治療社、東京)、2015 年 9 月
- ④ 飯笹久、吉山裕規 組換え EB ウィルス作製法、p198-203 (高田賢藏 監修、柳井秀雄、清水則夫、吉山裕規 編: **EB ウィルス改訂 3 版**、診断と治療社、東京)、2015 年 9 月

[その他]

ホームページ等

<http://yoshiyama-lab.org>

## 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) 連携研究者

南保 明日香 (NANBO ASUKA)  
北海道大学・医学部・准教授  
研究者番号: 6035948

### (3) 連携研究者

飯笹 久 (IIZASA HISASHI)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80306662