

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013002

研究課題名（和文） EBウイルスによる胃がん発症の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of development of stomach cancer by Epstein-Barr virus

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（和文）：

EBウイルス（EBV）は大部分のヒトに感染しヒトと共存しているが、一部の胃がんやエイズ・臓器移植に合併するリンパ腫などの原因として注目されている。我々は、EBウイルスが産生するRNA分子EBERが発がんにおいて重要であることを報告してきた。本研究では、EBERがヒトの防御システムである自然免疫系を逆用して発がんに貢献していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In most people, Epstein-Barr virus (EBV) is maintained without specific manifestations, but is occasionally associated with various malignancies including lymphoma in immunodeficient hosts and gastric carcinoma. Previously, we have reported that EBV-encoded non-coding RNA (EBER) plays critical roles in oncogenesis. In this research, we have demonstrated that EBER exerts its oncogenic activity by utilizing an innate immunity system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	10,700,000	0	10,700,000
2006年度	10,700,000	0	10,700,000
2007年度	10,700,000	0	10,700,000
2008年度	10,700,000	0	10,700,000
2009年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	53,500,000	0	53,500,000

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：胃がん、ウイルス、RNA、サイトカイン、自然免疫、分子機構、EBウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

日本における胃がん死者数は1年当たり5万人に達し、その約7%の例ですべての胃がん細胞にEBウイルス（EBV）が感染している。ウイルス粒子内で線状のEBVゲノムは

胃がん細胞内では環状プラスミドとして存在する。ゲノム両端の繰り返し配列のコピー数はウイルス粒子毎に異なるが、胃がん細胞EBVプラスミド中の繰り返し配列のコピー数は各胃がん症例で均一であることから、

EBV 陽性胃がんは 1 個の EBV 感染細胞がモノクローナルに増殖して形成されたこと、すなわち、EBV が存在することが胃がん形成に重要な役割を果たしたことが明らかとなっている。上皮細胞は B リンパ球と異なり *in vitro* での EBV 感染に抵抗性で、胃がんのモデルとなる EBV 感染系が存在しなかった。我々は、薬剤耐性遺伝子を組み込んだ EBV を開発し EBV 感染後に薬剤選択することにより、世界で初めて、上皮細胞への EBV 感染系を確立し、EBV 感染により細胞の増殖亢進、アポトーシス抵抗性が起こることを明らかにした。EBV 陽性胃がんでは核抗原 EBNA1、小 RNA 分子 BER が EBV 産物として発現している。我々は、この 2 つの内、EBER が細胞の増殖亢進、悪性を担っていることを既に明らかにした。EBER は約 170 塩基の RNA 分子で蛋白質に翻訳されず、感染細胞当たり  $\sim 10^7$  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想されている。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 や FAS リガンドによるアポトーシスに抵抗性となること、また、胃がん細胞においてインスリン様成長因子 IGF-1 の発現を誘導し、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。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、EBER による発がんの分子メカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究では、パーキットリンパ腫由来の EBV 陽性細胞株 Akata, Daudi, Mutu-I、それらの細胞株から分離した EBV 陰性細胞クローン、EBV 陰性胃がん細胞株 NU-GC-3、EBV 陰性上咽頭がん細胞株 CNE1、HONE1、それらの細胞へ 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遺伝子 (Neo<sup>r</sup>) プラスミドを導入した細胞株を用いる。さらに EBV 陽性上咽頭がん細胞株 C666-1、EBV でトランスフォームした B リンパ芽球様細胞株 (LCL)、胃がん及び上咽頭がん組織生検材料を使用する。

## 4. 研究成果

EBER による RIG-I 活性化を介した IL-10 の発現誘導

Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1) は、Toll-like receptor 3 (TLR3) と同様、ウイルス由来の dsRNA を認識し、IFN regulatory factor 3 (IRF3) や NF- $\kappa$ B の活性化により IFN や炎症性サイトカインを誘導

する分子である。我々は、BL 細胞株の EBV 陽性、陰性細胞クローン、EBV 陰性 BL 細胞株へ EBER プラスミドを導入した細胞クローン、EBV 陰性 BL 細胞株へ野生株 EBV、EBER ノックアウト EBV を感染させた細胞クローンを用いて、EBER 陽性細胞に RIG-I を発現させると I 型インターフェロン (IFN) 及び IFN-stimulated gene の発現が誘導されることを見いだした。さらに、細胞内で EBER が RIG-I と結合していること、EBER が RIG-I による IFN 誘導に重要な NF- $\kappa$ B、IFN-regulatory factor 3 の発現を誘導することを明らかにした。

次いで、EBER が RIG-I 活性化により IL-10 の発現を誘導するか否かの検討を行った。EBER 陽性 BL 細胞では EBER 陰性 BL 細胞よりも IL-10 の発現が高いことは既に報告した。EBER 陽性 BL 細胞へ RIG-I を過剰発現すると IL-10 の発現が更に高くなり、EBER 陽性 BL 細胞をドミナントネガティブ型 RIG-I、RIG-I の siRNA で処理すると IL-10 の発現が低下することが確認された。

以上の結果は、EBV 感染細胞内において EBER が RIG-1 によって dsRNA として認識されシグナル伝達を惹起し、その結果誘導された IL-10 がオートクライン増殖因子としてがん細胞の増殖に寄与していることを示している。

i) EBV 陽性細胞株培養上清中の EBER の検出  
EBV 陰性胃がん細胞株 NUGC3 へ EBV を持続感染させた細胞クローンの培養上清中に EBER が存在しているかどうかについて、培養上清より RNA を抽出し RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、EBER1、2 共に検出され、培養日数に従いその量は増加していた。さらに、EBV 陰性胃がん細胞株 AGS、EBV 陰性上咽頭がん細胞株 CNE1 へ EBV を持続感染させた細胞クローンを用いた実験でも同様の結果が得られた。また、EBV 陽性 BL 細胞株 Akata、Mutu、Daudi でも同様の結果となった。以上のことから、EBV 感染細胞からは EBER が細胞外へ放出されていることが明らかとなった。

次いで、EBER の細胞外への放出メカニズムを明らかにするために、EBER 結合蛋白質 PKR、La、L22 に Flag タグを付加した発現プラスミドを EBV 感染細胞へ導入し、培養上清の Flag 免疫沈降物中の PKR、La、L22 の存在を調べた。その結果、細胞内ではいずれの蛋白質も同程度に発現していたが、培養上清中には La のみが検出され、そこには EBER も共沈していた。以上の結果、EBER は La との複合体として La の分泌とともに細胞外へ放出されることが明らかとなった。

ii) 胃がん細胞株における TLR3 活性化と IGF-1 誘導

次いで、細胞外へ放出された EBER が TLR3 を活性化するか否かについて検討した。

NUGC3 細胞培養液中に *in vitro* 転写により合成した EBER を加え RT-PCR および ELISA 法により IFN- $\beta$  の発現誘導について解析した。その結果、EBER が濃度依存的に IFN- $\beta$  の産生が誘導された。また、TLR3 中和抗体処理により EBER による IFN- $\beta$  の産生が抑制された。さらに、EBER により IRF3 のリン酸化がおこることも確認された。

TLR3 シグナルは様々なサイトカインの産生誘導をおこすことが知られている。これまで我々は、胃癌細胞において EBER が IGF-1 産生を誘導しオートクライン作用により EBV がん細胞の増殖を促進することを報告している。そこで、EBER による TLR3 の活性化が IGF-1 産生を誘導するか否かの検討を行った。その結果、NUGC3 細胞培養液中に EBER を加え TLR3 を活性化すると IGF1 の発現が誘導されることが確認された。

#### 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 56 件)

1. Watanabe, A., Maruo, S., Ito, T., Ito, M. and Takada, K.: Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue functions as a survival factor in Burkitt lymphoma. *J. Virol.*, 84: 2893-2901, 2010, 査読有
2. Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K. and Takada, K.: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.*, 206: 2091-2099, 2009, 査読有
3. 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
4. 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
5. 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
6. Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T. and Takada, K.: EB virus-encoded RNAs (EBERs) are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J.*, 25: 4207-4214, 2006, 査読有
7. Nanbo, A. and Takada, K.: Epstein-Barr virus-encoded poly(A)-RNA confers resistance to apoptosis mediated through Fas by blocking the PKR pathway in human epithelial Intestine 407 cells. *J. Virol.*, 79: 12280-12285, 2005, 査読有
8. Seto, E., Yang, L., Middeldorp, J., Sheen, J.S., Chen, J.Y., Eizuru, Y. and Takada, K.: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression: implication of a new EBV latency type. *J. Med. Virol.*, 76: 82-88, 2005, 査読有
9. Yajima, M., Kanda, T. and Takada, K.: Role of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA (EBER) for efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.*, 79: 4298-4307, 2005, 査読有
10. Iwakiri, D., Sheen, T.-S., Chen, J.-Y., Huang, D. P. and Takada, K.: Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces insulin-like growth factor 1 and supports growth of nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Oncogene*, 24: 1767-1773, 2005, 査読有

[学会発表] (計 69 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
2. 高田賢蔵、岩切 大: EBVによる自然免疫系の修飾と発がん、第 67 回日本癌学会学術総会「ウイルス発がん」、名古屋、2008.10.
3. 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.

4. 高田賢蔵：EBウイルスと癌、第96回日本病理学会総会、大阪、2007.3.
5. Takada, K.: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: role of virus-encoded small RNAs and innate immunity in oncogenesis. The Croucher Foundation Advanced Study Institute: Viruses and cancer, Hong Kong, 2007.1.
6. 高田賢蔵：EBウイルスと発癌、第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006.11.
7. Takada, K.: EBV-encoded non-coding RNAs and oncogenesis. The 19th International Symposium of Foundation for Promotion of Cancer Research. [Infection, Cancer and Prevention], Tokyo, 2006.2.
8. Takada, K.: EBV: establishment of latent infection and reactivation. The 19th International Symposium of Foundation for Promotion of Cancer Research. [Infection, Cancer and Prevention], Tokyo, 2006.2.

[図書] (計 11 件)

1. Iwakiri, D. and Takada, K.: Epstein-Barr virus and gastric cancers. *In* Epstein-Barr Virus (ed. Robertson, E.S.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 157-169, 2005.
2. Takada, K.: Role of EBERs. *In* Epstein-Barr Virus (ed. Robertson, E.S.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 429-438, 2005.

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

丸尾 聖爾 (MARUO SEIJI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・  
准教授  
研究者番号：70292018

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

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：