

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15168

研究課題名(和文) EBV感染が核や細胞質で誘導するAPOBEC3sの協調的な上皮細胞腫瘍化の研究

研究課題名(英文) Cooperative epithelial cell tumorigenesis by APOBEC3s expressed in the nucleus and cytoplasm induced by EBV infection

研究代表者

金廣 優一 (Kanehiro, Yuichi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：60609197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、EBV感染上皮細胞の腫瘍化における核と細胞質局在型のDNA編集酵素APOBEC3の役割について研究した。組み換えEBV-eGFPを用いた感染実験から、EBV感染は、I型IFNを介して細胞質局在型のAPOBEC3Cを発現誘導し、APOBEC3CによってmtDNAに変異が導入されることでミトコンドリアが傷害を受けることを明らかにした。核に局在するAPOBEC3AもI型IFNにより誘導されることから、EBV感染により誘導される細胞質局在型と核局在型のAPOBEC3は、協調的に宿主ゲノムやミトコンドリアゲノムに変異を導入し、細胞を腫瘍化に導くと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBウイルス陽性上皮細胞性腫瘍は、単一のウイルス感染細胞が腫瘍化したものである。EBV感染がAPOBEC3を介して宿主ゲノムやミトコンドリアゲノムに変異を導入し、細胞を腫瘍化に導くとすれば、APOBEC3は発がんのリスク因子となりうる。従って、EBV感染が誘導するAPOBEC3による腫瘍化機構を明らかにすれば、EBV感染で発生する上皮細胞性腫瘍の予防法が開発できる。また宿主ゲノムやミトコンドリアゲノムへの変異は、多くのウイルス感染に共通の現象である可能性が高く、本研究は多くのウイルス感染による腫瘍の発生にAPOBEC3が関わっている可能性を示すことになる。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of the nuclear- and cytoplasm-localized DNA editing enzyme APOBEC3 in the tumorigenesis of EBV-infected epithelial cells. Infection experiments using recombinant EBV-eGFP revealed that EBV infection induces the expression of cytoplasm-localized APOBEC3C via type I IFNs and that mitochondria are injured by mutations in mtDNA by APOBEC3C. Since the nuclear-localized APOBEC3A is also induced by type I IFNs, we hypothesized that cytoplasm-localized and nuclear-localized APOBEC3 induced by EBV infection would introduce mutations into the host and mitochondrial genomes in a coordinated manner, leading to cell tumorigenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス APOBEC3 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、成人の約 9 割が感染する普遍的な DNA ウイルスである。一方で、潜伏持続感染細胞から、パーキットリンパ腫、上咽頭がん、胃がんの 10% などの、EBV 関連腫瘍が発生する。DNA 編集酵素 APOBEC3 ファミリーは、レトロウイルス(HIV など)や、DNA ウイルス(HBV や HPV など)のゲノムに、シチジンをチミジンに変える (C-to-T) 変異を導入し、ウイルスゲノムの複製を阻害する。一方、核に局在する APOBEC3A や 3B は、宿主ゲノムにも変異を導入し、乳がんや口腔がん形成に関与する (Burns MB ら, *Nature*, 2013, Chen TW ら, *Nat Commun*, 2017)。従って、腫瘍ウイルスである EBV も、感染に伴って様々な APOBEC3 を発現誘導し、腫瘍化を導く可能性がある。このことを示唆するかのように、パーキットリンパ腫では、APOBEC ファミリーの一つ AID の発現が誘導されることにより、がん遺伝子 c-Myc が転座により過剰発現する (Ramiro AR ら, *Cell*, 2004)。また、EBV 関連胃がんの腫瘍細胞には、他の胃がんとは異なり、PI3KCA などの変異や C-to-T 変異の蓄積が認められる (TCGA, *Nature*, 2014)。さらに我々は以前に、EBV 感染により発現誘導される細胞質に局在する APOBEC3C がミトコンドリアゲノムに変異を導入することを発見した。様々な腫瘍でミトコンドリア変異は報告されているが、ミトコンドリア変異と腫瘍形成を統合的に説明する研究は行われていない。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアゲノムの変異は腫瘍の転移や腫瘍悪性化因子の発現を誘導することから (Ishikawa K ら, *Science*, 2008, Sun W ら, *Clin Cancer Res*, 2009) EBV 感染に伴い発現増加する細胞質局在型 APOBEC3 は、核局在型 APOBEC3 と協調的に宿主ゲノムやミトコンドリアゲノムに変異を導入し、腫瘍形成に働くと考えた。すなわち本研究の目的は、EBV 感染で上皮細胞に発現誘導される、核および細胞質局在型 APOBEC3 の腫瘍化への役割を解明することである。

## 3. 研究の方法

- (1) EBV 感染による APOBEC3C の発現経路を明らかにするために、胃上皮細胞株に EBV を感染後、抗ウイルス因子の発現を誘導する I 型インターフェロンの発現を qRT-PCR で経時的に測定した。
- (2) I 型インターフェロン IFN- $\beta$  を加えた培地で培養し、APOBEC3C の発現の変化やミトコンドリア傷害に伴うミトコンドリア DNA (mtDNA) のコピー数の低下について qPCR 法を用いて経時的に定量した。
- (3) EBV 感染に伴う APOBEC3C の局在の変化を、GFP 融合 APOBEC3C や免疫染色法を用いて観察した。

## 4. 研究成果

組み換え EBV-eGFP を CD21 発現上皮細胞株 AGS 細胞 (AGS-CD21) に MOI=10 で感染し、感染後 4-72 時間後に APOBEC3C の発現量を測定すると EBV 感染後 24 時間から APOBEC3C の発現とミトコンドリアゲノムの変異が誘導された (図 1A, B, C)。EBV 感染後 4 時間から 12 時間にかけて IFN- $\beta$  とその誘導遺伝子である Interferon stimulation gene 15 (*ISG15*) の発現が増加した (図 1D)。IFN- $\beta$  (100 unit/ mL) を AGS-CD21 細胞に加えて 6 時間培養すると、*ISG15* と APOBEC3C の発現が誘導された (図 1E)。同培養条件で mtDNA のコピー数は約 40% 低下した (図 1F)。これらの結果から、EBV 感染は、I 型インターフェロンを介して APOBEC3C を発現誘導することで、ミトコンドリアゲノムを傷害することが考えられた。

次に、EBV 感染時の APOBEC3C の細胞内局在を観察するために、まず GFP 融合 APOBEC3C

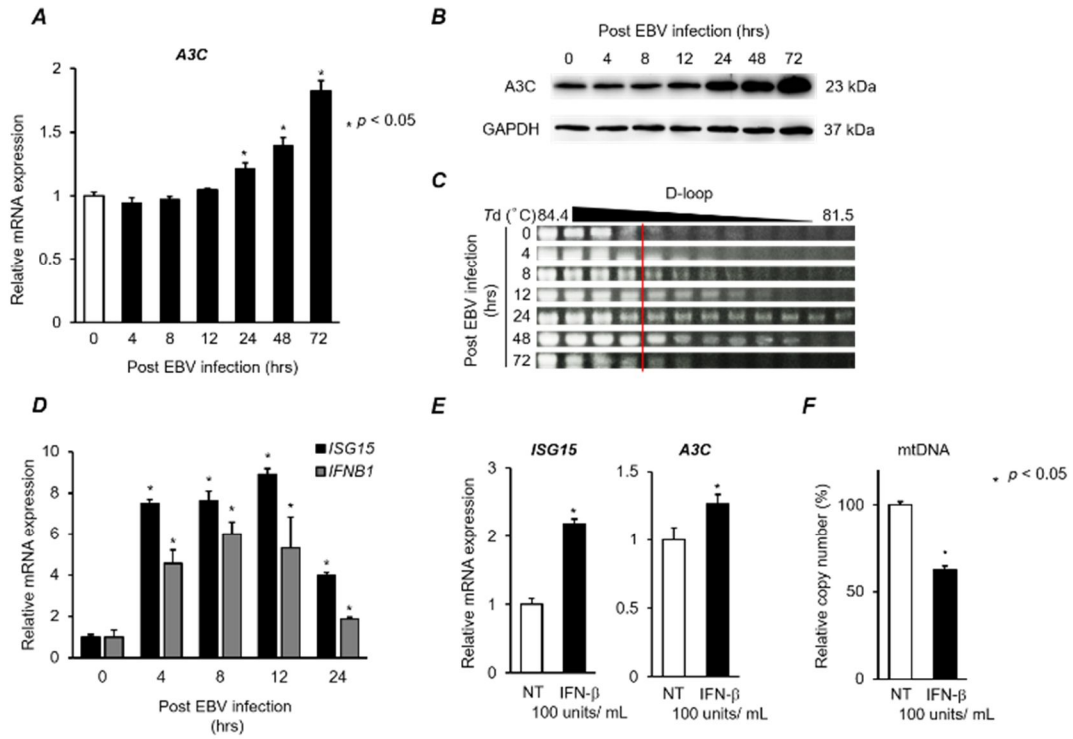


図1. 上皮細胞においてEBV感染はI型インターフェロンを介したAPOBEC3Cの発現とミトコンドリア傷害を誘導する

(A3C-GFP)を AGS-CD21 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にミトコンドリアマーカーHSP60 と共に共焦点顕微鏡で観察した。A3C-GFP は核の周囲に局在し、ミトコンドリアと約 50%共局在していた (図 2A)。また内因性 APOBEC3C の局在を EBV 感染 AGS 細胞と非感染細胞で比較したところ、EBV 感染細胞では APOBEC3C のミトコンドリアへの局在が非感染時の約 1.5 倍に増加していた (図 2B)。これらの結果から、EBV 感染は APOBEC3C の細胞内局在をミトコンドリアに移行させる可能性が考えられた。以上より、上皮細胞に EBV が感染すると、I 型インターフェロンにより APOBEC3C が発現誘導され、ミトコンドリアに移行した APOBEC3C は、mtDNA の変異を介してミトコンドリア傷害を誘導することが明らかになった。核に局在する APOBEC3A も I 型インターフェロンにより 誘導されることから、EBV 感染により誘導される細胞質局在型 APOBEC3 と核局在型 APOBEC3 は、協調的に宿主ゲノムやミトコンドリアゲノムに変異を導入し、腫瘍形成に働くと考えられた。

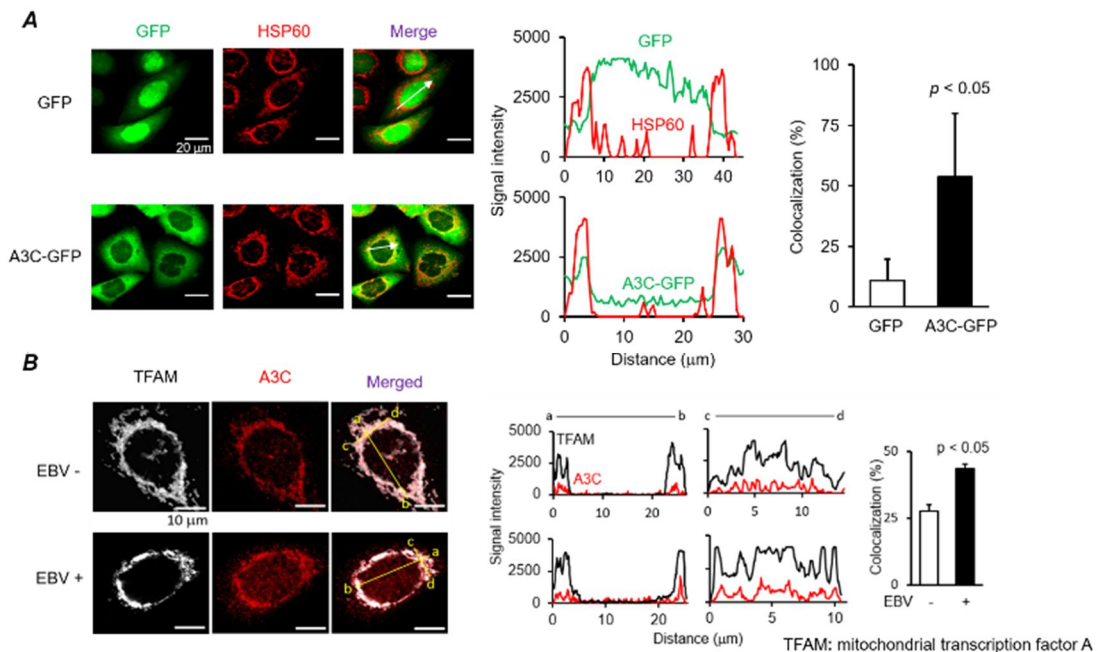


図2. EBV感染はAPOBEC3Cのミトコンドリア局在を促進する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 金廣優一、上野詩織、吉山裕規	4. 巻 95(4)
2. 論文標題 ヘルペスウイルス感染症の動向	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床と研究	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanehiro Y, Tomioka H, Pieters J, Tatano Y, Kim H, Iizasa H, Yoshiyama H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of novel mycobacterial inhibitors against mycobacterial protein kinase G.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.01517. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Heawchaiyaphum C, Iizasa H, Ekalaksananan T, Burassakarn A, Kiyono T, Kanehiro Y, Yoshiyama H, Pientong C	4. 巻 8
2. 論文標題 Epstein-Barr virus infection of oral squamous cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8030419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 金廣優一、飯笹久、康宇&#23159;、丁丹、上野詩織、飯田慶治、吉山裕規	4. 巻 39
2. 論文標題 ヘルペスウイルス感染症の特徴 [第126回生涯教育講座]	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 島根医学	6. 最初と最後の頁 113-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iizasa H, Kim H, Kartika AV, Kanehiro Y, Yoshiyama H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of viral and host microRNAs in immune regulation of Epstein-Barr virus-associated diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mughtar A, Kartika V, Ding D, Kang Y, Nagoshi K, Kanehiro Y, Iizasa H, Yoshiyama H.	4. 巻 37
2. 論文標題 Comprehensive prevention of hepatitis B virus to reduce primary liver cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shimane J Med Sci	6. 最初と最後の頁 13-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kartika Andy Visi、飯笹 久、梶 俊介、Fekadu Sintayehu、金廣 優一、柳井 秀雄、吉山 裕規
2. 発表標題 胃内視鏡生検標本を用いた胃炎とEpstein-Barr virusゲノム増幅の関連性の研究
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Amrizal Mughtar、飯笹久、Dan Ding、金廣優一、吉山裕規
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスの増殖を抑制するヒトmiRNAの同定.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Kanehiro, Hisashi Iizasa, Hironori Yoshiyama
2. 発表標題 Epstein-Barr virus infection induces mitochondrial DNA mutation through APOBEC3C expression in gastric epithelial cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ati Burassakarn, Hisashi Iizasa, Yuting Kang, Chukkris Heawchaiyaphum, Yuichi Kanehiro, Chamsai Pientong, Tipaya Ekalaksan, Hironori Yoshiyama
2. 発表標題 EBV-encoded BART miRNA induces HIF-1 $\alpha$ -mediated glycolysis by regulating VHL-dependent pathway in head and neck cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyoji Kim、飯笹久、金廣優一、清水則夫、吉山裕規
2. 発表標題 Transcriptional activation of Epstein-Barr virus encoded BART miRNAs in NK/T lymphomas.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Heawchaiyaphum C, Ekalaksananan T, Iizasa H, Kanehiro Y, Kiyono T, Yoshiyama H, Pientong C
2. 発表標題 Biological properties of Epstein-Barr virus positive oral squamous cell carcinoma cell lines
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hyoji Kim、飯笹久、金廣優一、吉山裕規
2. 発表標題 EBウイルスmiRNAの発現は、ウイルス感染によって誘導された宿主転写因子ETS-Aにより制御される
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hyoji Kim、飯笹久、上野詩織、田中星奈、金廣優一、清水則夫、吉山裕規
2. 発表標題 EBウイルス関連NK/Tリンパ腫におけるBART miRNA転写活性化について
3. 学会等名 第15回EBウイルス研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hyoji Kim、飯笹久、金廣優一、清水則夫、吉山裕規
2. 発表標題 EBウイルス関連NK/Tリンパ腫におけるBART miRNA転写活性化について
3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Chukkris Heawchaiyaphum, Chamsai Pientong, Tipaya Ekalaksananan, 飯笹久, 金廣優一, Amrizal Muhtar, Sintayehu Fekadu, 清野透, 吉山裕規
2. 発表標題 EBウイルス陽性口腔扁平上皮癌の実験モデルの構築
3. 学会等名 第33 回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 金廣優一、飯笹久、Sintayehu Fekadu、上野詩織、吉山裕規
2. 発表標題 EBウイルス感染がもたらす胃上皮細胞のミトコンドリアDNA変異
3. 学会等名 平成30年度中四国乳酸菌研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Kim H, Iizasa H, Kanehiro Y, Yoshiyama H.
2. 発表標題 LMP2A regulates BART miRNAs' transcription by translational activation of ETS family gene.
3. 学会等名 18th International Symposium on EBV and KSHV. (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Kanehiro Y, Kim H, Fekadu S, Iizasa H, Yoshiyama H.
2. 発表標題 Epstein-Barr virus infection of epithelial cells causes mitochondrial DNA mutation.
3. 学会等名 The 19th Royal Golden Jubilee Ph.D. Congress `Innovation Challenges toward Thailand 4.0
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----