

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590715

研究課題名（和文）EB ウイルス小RNAによる自然免疫シグナルを介した胃がん発生機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of EBV-small RNA-mediated gastric carcinogenesis through the activation of innate immune signals.

研究代表者

岩切 大 (IWKAIRI DAI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：10307853

研究成果の概要（和文）：

EB ウイルス (EBV) 感染リンパ球から、EBV 小 RNA である EBER (EBV-encoded small RNA) が細胞外に放出され、ウイルス RNA センサーである toll-like receptor (TLR)3 からのシグナル伝達を活性化すること、それが活動性 EBV 感染症の病態形成に寄与しうることを示した。さらに EBER は EBV 陽性胃がん細胞においても細胞外に放出され、TLR3 シグナルを活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that EBV-encoded small RNA (EBER) is released by EBV infected lymphocytes and released EBER activates the signaling from toll-like receptor3, a sensor of viral RNA. Our results also suggest that activation of TLR3 signaling by EBER contribute to the pathogenesis of active EBV infection. We also demonstrated that released EBER activates TLR3-mediated signaling in EBV-infected gastric cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

1. 研究開始当初の背景

胃がんは日本における最も主要な消化器がんの一つであるが、我が国の胃がん全体のうちおよそ10%において、ヒト腫瘍ウイルスとして知られているEBウイルス (EBV) が関連していることが明らかになっている。EBV陽性胃がんでは、胃がん細胞の100%にEBVが感染しており、胃粘膜上皮へのEBV感染は胃がん発生に寄与していると考えら

れている。申請者らはこれまでEBVが胃がんにおいて果たしている役割を明らかにするため、EBVの胃上皮細胞への持続感染系を用いてEBVの感染が胃上皮細胞に与える影響について検証してきた。その結果、EBVの non-coding RNA である EBER (EBV-encoded small RNA) がEBV陽性胃がん細胞の増殖をインスリン様増殖因子 (IGF)1の産生誘導を介して促進すること

を明らかにした。つまり、non-coding RNAであるEBERがEBV陽性胃がんの発生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。EBERはすべてのEBV陽性がん細胞において多数コピー存在し、部分的に2本鎖RNA(dsRNA)構造をとると推測されている。

申請者らはその後の研究で、EBERがB細胞において自然免疫機構を担うRetinoic acid inducible gene (RIG)-Iを活性化し、下流のシグナル伝達を誘導することを見出した。一方、ウイルス由来のdsRNAを認識する分子としてはTLR3も知られているが、申請者らは最近の研究で、EBERがEBV潜伏感染B細胞より細胞外に放出され、TLR3を活性化するという見出しをした。これはEBV感染細胞において、EBERが恒常的にTLR3シグナルを活性化している可能性を示唆するものであり、EBV陽性胃がん細胞においても起こっていると推測された。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、本研究ではEBV陽性胃がん細胞においてEBERがRIG-I、TLR3を活性化するかどうかを明らかにする。またEBERによるこれらの分子の活性化がIGF-1産生誘導や他のサイトカイン産生誘導に関与しているか否か、また胃がん細胞の増殖に寄与しているかどうかについても検証する。そしてそれら自然免疫シグナルの活性化が発がんへ関与しているか否かについて明らかにする。またEBERによるTLR3シグナルの活性化が伝染性単核症(IM)や慢性活動性EBV感染症(CAEBV)、EBV関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)などの活動性EBV感染症の病態形成に関連しているかどうかについても検証する。

3. 研究の方法

(1)EBERによるRIG-Iシグナルの活性化についての解析

RIG-IはdsRNAを認識すると活性化されIFN産生を誘導する。EBV陽性胃がん細胞にRIG-Iを発現させた後、IFNの発現についてRT-PCRやELISA法により調べRIG-I活性化の有無を検証する。EBV陽性胃がん細胞株NU-GC-3やAGSを用いて解析し、EBV陽性細胞特異的にRIG-Iの活性化がおこっていれば

次にEBERを安定発現させた細胞を用いて同様の実験を行う。またin vitro 転写により合成したEBERを細胞内に導入し、IFNの発現誘導がおこるかどうかについて調べる。さらにRIG-Iシグナルの下流因子であるIRF3やNF- κ Bの活性化についてもウエスタンブロット法、レポーターアッセイ等を用い検証する。さらにEBV感染胃がん細胞において、EBERが恒常的にRIG-Iを活性化しているかどうかについて解析を行う。RIG-IをsiRNAによりノックダウンし、IFNの発現に変化があるか否かについて検証する。またIRF-3のノックダウンやNF- κ Bの阻害作用をもつドミナントネガティブ(dn)IkBa発現ベクターなども用いEBV陽性細胞でIFNの発現が低下するか否かについて調べ、RIG-Iシグナルの恒常的な活性化がおこっているかどうかを明らかにする。

(2)RIG-IとEBERの相互作用についての解析

EBERがRIG-Iと相互作用するかどうかについて、免疫沈降法を用いて解析する。Flagタグ付きのRIG-I発現ベクターをEBV陽性胃がん細胞に導入し、蛋白質抽出後抗Flag抗体で免疫沈降、得られた複合体よりRNAを抽出する。これを用いてRT-PCRを行い、複合体中にEBERが存在するかどうかについて検証する。

(3)EBERによる細胞増殖促進因子発現誘導へのRIG-Iシグナルの関与に関する検討

EBERによるRIG-Iの活性化がEBV感染がん細胞の増殖促進に寄与するか否かについて解析する。BL細胞および胃がん細胞に合成したEBERを細胞内導入、またEBER発現細胞にRIG-I発現ベクターを導入し、IL-10やIGF1の発現が誘導されるかどうかRT-PCRやELISAで検証する。サイトカイン発現誘導がみられれば、EBV陽性細胞やEBER発現細胞においてRIG-Iや下流因子のノックダウン等を行い、サイトカインの発現が低下するかどうかについて調べる。

(4)EBV感染胃上皮細胞からのEBERの細胞外への放出に関する検討

EBV陽性胃がん細胞の培養上清中にEBERが存在するかどうかを検証する。培養上清より抽出したRNAを用いたRT-PCR法によりEBERの検出を行うとともに、さらに上清中のEBERの定量を、in vitro転写により合成したEBERをコントロールに用いたりアルタイムPCR法によりおこなう。

(5) EBERによるTLR3の活性化とIGF1発現誘導、および細胞増殖促進への関与に関する検討

EBERがTLR3シグナルを誘導するかどうかについて、*in vitro*転写により合成したEBERを用いてNU-GC-3細胞を刺激し、RT-PCR法やELISA法によりIFNや他のサイトカイン産生誘導がおこるか検証する。またTLR3中和抗体やTLR3のsiRNAを用いたノックダウンなどでEBERがTLR3を介してIFNやサイトカイン産生誘導をおこしているかどうか確認する。

さらにTLR3の下流因子IRF3、NF- κ Bなどの活性化をウエスタンブロットやレポーターアッセイなどにより解析する。さらにEBERによるTLR3の活性化がIGF1の発現誘導をおこすかどうかについて同様の手法を用いて解析を行う。TLR3活性化によりIGF1発現の誘導がおこっていれば、TLR3シグナルの阻害の細胞増殖に対する効果を検討する。

(6) EBERによるTLR3の活性化と活動性EBV感染症との関連性に関する検討

EBV感染細胞から放出されるEBERが、ヒトの血清中に検出できるかどうかについて、特に末梢血中にEBV感染リンパ球が多数存在するIMやCAEBVなどの活動性EBV感染症患者血清を用いて解析する。検出された場合、EBERの定量をリアルタイムPCR法でおこない、疾患の病態との関連などについても検証する。

4. 研究成果

本研究で得られた成果の概要は以下の通りである。

(1) バーキットリンパ腫(BL)細胞においてEBERが細胞内の2本鎖RNA(dsRNA)認識分子であるRetinoic acid-inducible gene (RIG)-Iと相互作用しこれを活性化、IRF-3およびNF- κ Bの活性化を介しインターフェロン発現を誘導することを明らかにしていたが、これをもとにEBERとRIG-Iの相互作用がEBERによるサイトカイン産生に寄与しているかどうか検証した。その結果、EBERによるRIG-Iの活性化がIRF3の活性化を介してBL細胞の増殖因子であるIL-10の産生を誘導することを明らかにした。さらに胃癌細胞においてもEBERによりRIG-Iが恒常的に活性化され、インターフェロンや炎症性サイトカインの発現を誘導しているということが明らかになった。

(2) EBERがEBウイルス感染Bリンパ球細胞

より細胞外に放出されること、さらに放出されたEBERはToll-like receptor (TLR)3を介したシグナル伝達を惹起することを見出したが、さらにその後の研究で、このEBERによるTLR3シグナルの活性化は、EBV感染時の自然免疫応答に関与し、また伝染性単核症や慢性活動性EBV感染症、EBV関連血球貪食症候群の病態の形成に寄与している可能性があることを示すと共に、患者血清中のEBERの定量が可能であることも明らかとなった。一方、EBERは主にその結合蛋白質であるLa/SSB蛋白質と細胞外において共在していることも見出した。

(3) EBERはEBV感染胃癌細胞からも放出され、TLR3シグナルの活性化を誘導し、NF- κ BやIRF3の活性化を惹起していることを明らかにした。さらにEBV陽性胃癌細胞においておこっているTLR3シグナルの恒常的な活性化が、EBERによるIGF1産生誘導に関与しているということを明らかにした。さらにその後の解析で、EBERによるTLR3シグナルの活性化がEBV感染胃癌細胞の増殖を促進していることが明らかとなり、TLR3シグナル活性化がEBV陽性胃癌の発生に寄与していることを示唆する結果が得られることとなった。

(4) EBERと2次構造において相同性のあるアデノウイルスVA-1およびVA-2が、EBERと同様にRIG-Iと相互作用し、下流のシグナル伝達を惹起することを見出した。VAによるRIG-I活性化は、アデノウイルス感染に対する自然免疫応答に寄与していることが示唆され、さらに、アデノウイルスベクターによる治療に際しておこる炎症性反応に関しても、VAによるRIG-Iシグナル活性化に関与している可能性が示された。

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 8件)

1. Minamitani, T., Iwakiri, D., Takada, K. Adenovirus virus-associated RNAs induce type I interferon expression through a RIG-I-mediated pathway. *J. Virol* 85, 4035-4040, 2011. (査読有)
2. Iizasa, H., Wulff, B.E., Alla, N.R., Maragkakis, M., Megraw, M., Hatzigeorgiou, A., Iwakiri, D., Takada, K., Wiedmer, A., Showe, L., Lieberman,

- P., Nishikura, K. Editing of EBV-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *J Biol Chem.* 285:33358-70, 2010. (査読有)
3. Iwakiri, D., Takada, K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. *Adv Cancer Res.* 107:119-136, 2010. (査読無)
 4. Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., 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)
 5. 岩切 大、高田賢藏 「EBVと自然免疫」 *Medical science digest* 35: 18-21, 2009. (査読無)
 6. Fukagawa, Y., Nishikawa, J., Kuramitsu, Y., Iwakiri, D., Takada, K., Imai, S., Satake, M., Okamoto, T., Fujimoto, M., Okita, K., Nakamura, K., Sakaida, I. Epstein-Barr virus upregulates phosphorylated heat shock protein 27 kDa in carcinoma cells using the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Electrophoresis* 29: 3192-3200, 2008. (査読有)
 7. Samanta, M., Iwakiri, D., 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)
 8. 岩切 大、高田賢藏 「EBウイルスによる免疫シグナル修飾と病原性発現」 *細胞工学* 27: 1237-1241, 2008. (査読無)

[学会発表] (計 12件)

1. 岩切 大 ほか「EBウイルスnon-coding RNA (EBER)による自然免疫活性化を発がん」第58回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム「ウイルスによる細胞増殖制御機構」徳島あわぎんホール 2010. 11. 9
2. 岩切 大 ほか 「EBウイルスによる自然免疫シグナル修飾と発がん」第69回日本癌学会学術総会シンポジウム「ウイルス発がん」大阪国際会議場 2010. 9. 22
3. Iwakiri D., et al. Activation of toll-like receptor 3 signaling by EBER contributes to gastric carcinogenesis 14th Biennial conference of the international association for research on Epstein-Barr virus and associated diseases, University of Birmingham, UK, 2010. 9. 5

4. 岩切 大 ほか「EBV小RNAによるTLR3シグナル修飾と病原性発現」第57回日本ウイルス学会学術集会 東京都市センターホテル 2009. 10. 27
5. 岩切 大 ほか 「EBV小RNAにより惹起されるTLR3シグナルのEBV陽性胃がんにおける役割」第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 1 パシフィコ横浜
6. 岩切 大 「EBウイルスと血球貪食症候群」第16回八幡平造血セミナー 盛岡ホテルメトロポリタン 2009. 9. 5 (招待講演)
7. 岩切 大ほか「EBウイルス小RNAによるToll-like receptor3シグナルの活性化」第31回日本分子生物学会年会 神戸国際会議場 2008. 12. 1
8. 岩切 大ほか「胃上皮細胞におけるEBウイルス小RNAによるToll-like receptor3シグナルの活性化」第67回日本癌学会学術総会 2008. 10. 29 名古屋国際会議場
9. 岩切 大「EBウイルス小RNA (EBER)による自然免疫シグナルの活性化とその活動性感染症における意義」第56回日本ウイルス学会学術集会 ワークショップ「ウイルスによる病原性発現～DNAウイルス～」 2008. 10. 26 岡山コンベンションセンター

[図書] (計 1件)

1. 岩切 大「ウイルスの構造と遺伝子 (4) EBER」, 高田賢藏監修、柳井秀雄・清水則夫編 EBウイルス, 診断と治療社, 2008, 32-37. 「代表的なEBV感染細胞株とウイルスの特性」210-214.

6. 研究組織
(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし