

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18246

研究課題名（和文）EBV感染によって惹起される細胞内オートファジー活性の意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of cellular autophagy activation induced by EBV infection

研究代表者

石川 和也（Kazuya, Ishikawa）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60623650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：咽頭上皮ではEpstein-Barr ウイルス（EBV）は溶解感染を起こし感染細胞は死滅するため、上咽頭癌発癌のためにEBVが潜伏感染へ移行することが必須である。本研究では、オートファジーのEBV感染細胞における役割を検討した。EBV潜伏感染リンパ球・上皮細胞株を用い検討すると、溶解感染を誘発した細胞にクロロキンでオートファジーを阻害すると著明に細胞が死滅し、溶解感染による細胞死から細胞を守る作用があると考えられた。一方、オートファジーの違いによるEBV遺伝子発現の変化は認めなかった。EBV潜伏感染モデル細胞を免疫不全マウスに接種実験は生着しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスに対する選択的オートファジー反応が明らかになりつつある。ウイルスの種類によって、オートファジーがウイルスを排除する抗感染性を示す場合と、ウイルス複製に利用される場合がある。EBVは、オートファジーを亢進させる機能があることが示唆されているが、EBVの感染によるオートファジーは、最終的にウイルスを排除するのか、それともウイルスに利用されるのかは不明である。本研究はウイルス性発癌である上咽頭癌において、感染から発癌の過程でオートファジーが果たす役割を明らかにした。この結果は、上咽頭癌の新規治療法開発の礎となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： In pharyngeal epithelium, Epstein-Barr virus (EBV) infection leads lytic infection so that infected epithelial cells become cell death. For initiation of nasopharyngeal carcinoma, it is mandatory lytic infection changes to latent infection. In this study, we analyzed whether autophagy enhances EBV-infected cell lines. The experiment was performed using EBV-infected lymphocyte and epithelial cell lines. Inhibition of autophagy by chloroquine in the EBV-infected cell lines showed activation of lytic infection markedly enhanced the cell death. From this, it was considered that autophagy has a function of protecting cells from cell death due to lytic infection. On the other hand, we did not find any difference of expression of EBV genes. We could not establish the model that EBV infected cell lines engraft in immunodeficient mouse.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：Epstein-Barr virus オートファジー 溶解感染

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) 感染は上咽頭癌の発癌に強く関わる。しかし、通常の健常人において、咽頭上皮で EBV が感染を起こすと、初期遺伝子発現 (BZLF1、BRLF1) につづき、早期遺伝子 (EA)、後期遺伝子 (VCA) 発現へとカスケードが進み、成熟ウイルスが大量に放出され溶解感染を起こし、感染細胞は破裂して死滅する。そのため、上咽頭癌発癌のためには EBV が溶解感染後にすみやかに潜伏感染へ移行することが必須である。潜伏感染に移行すれば、EBV 癌遺伝子 LMP1 の発現によって形質転換を起こし上咽頭癌へと進展する。しかし、潜伏感染で発現する抗原 (EBNAs、LMPs) の多くは細胞性免疫応答の際の標的ペプチドとなることが明らかとなり、これらの抗原を発現した細胞は細胞障害性 T 細胞などにより排除されると考えられている。このため、EBV は潜伏感染抗原に対する免疫応答を何らかの機序で回避しつつ、潜伏感染を成立させ維持している。

オートファジーは細胞質の一部を隔離膜で取り込み、細胞質成分をリソソームで分解することで生存に必要なエネルギーを確保して細胞内の恒常性を維持している。また、恒常的に低いレベルで働くことで、細胞内に異常なタンパク質が蓄積することを防ぎ、細胞内の恒常性を保っている。近年、オートファジーが病原体など、特定のものを標的とする選択的オートファジーという概念が確立された。選択的オートファジーは種々のウイルスの排除機構においても重要な役割をはたしているが、ウイルスによってその反応結果は様々であり、逆にオートファジーを複製に利用するウイルスがいることも判明している。EBV の感染においては、オートファジーを亢進する可能性が示唆されているがその生物学的意義は明らかではない。しかし、EBV が潜伏感染状態の細胞内では潜伏感染抗原に対する免疫応答を何らかの機序で回避しつつ、恒常性が維持されている。

2. 研究の目的

本研究では、EBV 感染上皮で誘導されるオートファジーが潜伏感染の成立に寄与しているのではないかという仮説のもと、オートファジーの感染細胞における生物学的な役割と発癌過程に及ぼす影響を究明する。そして、オートファジーのモジュレーションで上咽頭癌発癌を予防し、癌化した細胞において EBV 再活性化を促すことで溶解感染に移行した癌細胞を死滅させることで、新規治療法開発の礎の構築を目的とした。

3. 研究の方法

これまでのパイロットスタディから、EBV 潜伏感染細胞である EBfaV-GFP は tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) と butyric acid (NaB) を添加することで溶解感染を惹起できる。この細胞をクロロキン (CQ; オートファジー阻害作用を持つ) やイベルメクチン (オートファジー活性化作用を持つ) で処理し、オートファジー活性の変化が溶解感染に与える影響を検討したところ、溶解感染を誘発した EBfaV-GFP に CQ でオートファジーを阻害したものでは著明に細胞が死滅することが明らかとなった。すなわち、オートファジーが溶解感染による細胞死から細胞を守る作用があると考えられた。

そこで以下の研究を計画した。

オートファジーが溶解感染の生産物の除去に関与し、細胞を守るのではないかという仮説を検証すべく、溶解感染を誘発した EBfaV-GFP を CQ やイベルメクチンで処理し、オートファジー活性の変化が BZLF1 や BRLF1 などのウイルス蛋白発現に及ぼしている影響をウエスタンブロットで評価し、オートファジー発現と比較を行った。また、オートファジーが遺伝子発現自体には影響を及ぼさない可能性も考え、RT-qPCR による遺伝子発現の検討も併用した。また、溶解感染を誘発していない潜伏感染状態の EBfaV-GFP のオートファジーを活性 / 阻害することでオートファジー活性の変化が潜伏感染のウイルス遺伝子産物におよぼす影響を検討した。潜伏感染に必須であるウイルス遺伝子の発現をウエスタンブロットと RT-qPCR で検討した。

また、逆に EBV 由来蛋白の発現を siRNA などで抑制し、オートファジーの発現におよぼす変化も検討した。

の実験を上咽頭癌の発生する上皮細胞でも検討するため、EBV 潜伏感染上皮細胞を樹立した。EBV 潜伏感染モデル細胞として GFP 遺伝子が組み込まれた B95-8EBV 株を用いた。EBV 受容体である CD21 は通常上皮では発現していないので、CD21 を遺伝子導入した 293 細胞を作成し、組換え GFP-EBV を感染させた。これにより作成し EBV 潜伏感染上皮細胞を用い、EBV 感染により誘導されるオートファジーが溶解感染および潜伏感染に与える影響を検討し、オートファジーを調整することで溶解感染を誘導できるか、潜伏感染様式を 型から 型、すなわち免疫原性の高い様式へとスイッチさせることができるか検討を行った。

で作成した EBV 潜伏感染モデル細胞を免疫不全マウスに接種した。このマウスに生着した

EBV 潜伏感染モデル細胞からは発癌が期待できるほか、リンパ増殖性疾患や日和見リンパ腫を発症することも期待できると考えられる。これらの EBV 関連腫瘍の発生が観察できれば、クロロキンを投与してオートファジーを阻害することで溶解感染を促進し、EBV 感染細胞を死滅させることで腫瘍の発生が予防できるか計画した。

4. 研究成果

EBV 潜伏感染細胞である EBfaV-GFP は tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) と butyric acid (NaB) を添加することで溶解感染を誘導されることは前段階の研究で確認されている。この細胞をクロロキンやイベルメクチンで処理し、オートファジー活性の変化が溶解感染に与える影響を検討したところ、溶解感染を誘発した EBfaV-GFP に CQ でオートファジーを阻害したものでは著明に細胞が死滅した。すなわち、オートファジーが溶解感染による細胞死から細胞を守る作用があると考えられた。また、溶解感染を誘発した EBfaV-GFP を CQ やイベルメクチンで処理し、オートファジー活性の変化が BZLF1 や BRLF1 などのウイルス蛋白発現に及ぼしている影響をウエスタンブロットで評価し、オートファジー発現と比較した。CQ で処理を行った場合には、オートファジー発現標識の一つである LC3 の発現減弱が認められた。しかし、BZLF1 や BRLF1 の発現レベルに変化は蛋白レベルでも mRNA レベルでもみられなかった。

上咽頭癌の発生する上皮細胞において同様の現象が起こるかを確認するため、EBV 潜伏感染上皮細胞を作成した。EBV 受容体である CD21 を遺伝子導入した 293 細胞ならびに上咽頭癌細胞 HK1 を作成し、組換え GFP-EBV を感染させた。これにより作成した EBV 潜伏感染上皮細胞を用い、EBV 感染により誘導されるオートファジーが溶解感染および潜伏感染に与える影響を検討しオートファジーを調整することで溶解感染を誘導できるか検討した。CQ で処理を行った場合には、オートファジー発現標識の LC3 の発現減弱が EBfaV-GFP 同様に認められた。しかし、BZLF1 や BRLF1 の発現レベルに変化は蛋白レベルでも mRNA レベルでもみられなかった。また、オートファジーを調整することで潜伏感染様式を変化させることはできなかった。

研究の最終段階として、EBV 潜伏感染モデル細胞を免疫不全マウスに接種実験を施行したがマウスへの生着は成立しなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Makita H, Endo K, Kasahara Y, Nakata A, Moriyama-Kita M, Ishikawa K, Ueno T, Nakanishi Y, Kondo S, Wakisaka N, Gotoh N, Yoshizaki T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Xenografts derived from patients with head and neck cancer recapitulate patient tumour propertie	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wakae K, Kondo S, Pham HT, Wakisaka N, Que L, Li Y, Zheng X, Fukano K, Kitamura K, Watashi K, Aizaki H, Ueno T, Moriyama-Kita M, Ishikawa K, Nakanishi Y, Endo K, Muramatsu M, Yoshizaki T.	4. 巻 20
2. 論文標題 EBV-LMP1 induces APOBEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 7663-7671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------