

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590909

研究課題名(和文) TLR3シグナルを介したEBウイルス陽性胃癌発生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of EBV-mediated gastric carcinogenesis depending on TLR3 signals

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス(EBV)感染胃癌から、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 3 (TLR3)からのシグナル伝達を活性化、それがEBV陽性胃癌細胞の増殖の促進、発がんに寄与していることを示した。さらに膜蛋白質LMP2A (latent membrane protein2A) がEBV感染上皮細胞においてanoikis抵抗性を誘導し、上皮細胞の悪性化に寄与していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that EBV-encoded small RNA (EBER) is released by EBV-infected gastric cancer cells and released EBER triggers the signaling from toll-like receptor 3, a sensor of viral RNA. Further study indicated that EBER-mediated activation of TLR3 signals led to the growth promotion of EBV-infected gastric cancer cells, suggesting that EBER contribute to gastric carcinogenesis through TLR3 activation. We also demonstrated that latent membrane protein 2A (LMP2A) confers anoikis resistance to EBV-infected epithelial cells, leading to epithelial malignancy.

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：EBウイルス 胃癌 EBER TLR3 LMP2A

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。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。胃上皮細胞への感染による発がん機構の研究はヘリコバクター・ピロリ(HP)に関するものを中心に国内外において行われ、HPの発がんにおける役割の詳細が明らかとなってきたが、EBVの胃がんへの関与については、最適の解析モデルである胃上皮へのEBVの持続感染系を用いた申請者らの研究が世界ではじめて行われた詳細な解析であり、結果以下のようなEBV陽性胃がんに関する重要な事実を明らかにしてきた。まずEBVが胃上皮細胞に感染するとEBVのnon-coding (nc) RNAであるEBV-encoded small RNA (EBER) により誘導される insulin-like growth factor (IGF)1によって感染細胞の増殖促進がおこること、またEBV陽性胃がん組織においてIGF1の発現が高いということを示し、さらに、EBERはIGF1の転写活性化によりその発現を誘導すること、IGF1の中和抗体は、EBV陽性胃がん細胞の増殖を抑制することも明らかにした。こうした申請者らのこれまでの研究により、non-coding RNA (ncRNA) 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陽性胃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るncRNAである。申請者らはその後の研究で、EBV潜伏感染バーキットリンパ腫(BL)細胞において、EBERが細胞内の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して下流のシグナル伝達を誘導することを見出した。RIG-Iの活性化はI型インターフェロン(IFN)産生およびサイトカイン産生誘導をおこすことが知られているが、その後申請者らは、EBERによるRIG-Iの恒常的な活性化がBL細胞でIL-10を誘導し、その増殖促進をもたらしていることを明らかにした。つまり、EBERによるRIG-Iシグナルの活性化が発がんに寄与するということを示した。一方、最近申請者らはEBERが細胞外に放出されて機能するということを新たに見出した。EBERはEBV感染リンパ球より細胞外へ放出され、放出されたEBERが、もうひとつのウイルス由来の

dsRNA認識分子であるTLR3を活性化することが明らかとなり、さらにEBERは伝染性単核症(IM)や慢性活動性EBV感染症(CAEBV)などの活動性EBV感染症患者血清中に多量に存在し、EBERによる免疫系の活性化が病態の形成に寄与している可能性が示された。

近年、マイクロRNA(miRNA)に関する研究においてmiRNAがエクソソームとして細胞外に放出され、他の細胞に取り込まれて機能するということが明らかにされている。EBV感染細胞から放出されるEBERも、他の細胞に取り込まれて機能していることが明らかになり、EBVによる新たな病態形成メカニズムの存在が示唆され、これはEBV陽性胃がん組織においても起こりうると思われる。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究ではまずEBV陽性胃がん細胞においてEBERが細胞外へ放出されるかどうか、またTLR3を活性化するかどうかを明らかにする。またEBERによるTLR3シグナルの活性化がIGF1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どうかについても検証する。さらにEBV陽性胃がん細胞から分泌されるエクソソームの解析を行い、EBERが含まれているかどうか、また他のmiRNAで含まれているものを明らかにし、胃がん発生との関連について明らかにするとともに、細胞外のEBERの活性を標的とした新たなEBV陽性胃がん治療法の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) 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。種々の組み替えEBV感染胃がん細胞株を用い、培養上清より抽出したRNAを用いたRT-PCR法によってEBERの検出を行う。さらに上清中のEBERを定量的に解析するため、in vitro転写により合成したEBERを培養液中に段階希釈したものを標準コントロールに用いたリアルタイムPCR法により、放出されているEBERの量を算出する。

(2) EBERによるTLR3の活性化とIGF1発現誘導への関与に関する検討

EBERがTLR3シグナルを誘導するかに、in vitro転写により合成したEBERを用いて胃がん細胞を刺激し、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knock-down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IRF-3、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IGF-1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。

(3) EBV感染胃上皮細胞から放出されるエクソソームに関する検討

EBV陽性胃がん細胞の培養上清中に放出されるエクソソームについての解析を行う。培養上清よりエクソソームを分離し、EBERが存在するかどうかを検証する。EBERが存在した場合、エクソソームによる細胞刺激実験を行い、TLR3シグナルの活性化がおこるかどうか、あるいはIGF1産生誘導がおこるか否かについて検証する。また、EBER欠損EBV感染胃がん細胞株のエクソソームを用いた実験も同様にを行い、TLRシグナル活性化に差があるかどうかについて調べる。

(4) EBV感染胃上皮細胞から放出されるエクソソームに含まれるmiRNAの解析

EBV陽性胃がん細胞の培養上清中に放出されるエクソソームについて、含まれているmiRNAについてmiRNAアレイなどを用いて網羅的に解析する。EBER欠損EBV感染細胞株のエクソソームとも比較し、EBER依存的な相違点がないか調べる。エクソソーム中のmiRNAのうち、細胞増殖に関わる可能性のあるものを中心にそれらの胃がん細胞における役割を明らかにしていく。

(5) EBERによる細胞増殖促進へのTLR3シグナルの関与に関する検討

TLR3活性化によりIGF-1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。TLR3中和抗体やTLR3のsiRNAを用いたknock-down法などでIGF-1の産生を抑えEBV陽性胃がん細胞の増殖も抑制されることが期待できる。さらにEBERによるTLR3活性化によって他のサイトカインの産生の誘導もおこるか否か検証し、それがEBV陽性胃がん細胞の増殖において何らかの役割を果たしているかについて明らかにする。その結果をもとに、TLR3シグナル阻害によるEBV陽性胃がん細胞の増殖抑制効果について検討する。

(6) EBV膜蛋白質LMP2Aの機能解析

EBV膜蛋白質であるLMP2A (latent membrane protein 2A)はEBV陽性胃がん細胞において発現が認められ、その活性は発がんにも関わっていることが報告されている。このLMP2Aを欠損させたEBVと野生型EBVの感染細胞を樹立し、詳細に比較検討することで、LMP2Aの発がんにおける役割を明らかにする。

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) 種々のEBV陽性胃がん細胞株を用いた実験から、EBERが細胞外に放出されていることを明らかにした。EBERが胃がん細胞のTLR3シグナルを活性化し、IRF3やNF- κ Bの活性化を介しインターフェロンや炎症性サイトカインの産生を誘導するということが明らかにした。EBERによるTLR3シグナルの活性化はEBV陽性

胃がん細胞で恒常的に起こっていることを示し、それがEBV陽性胃がん組織においても起こっていることが示唆された。

(2) EBERによるTLR3シグナルの活性化により、胃がん細胞の増殖因子であるIGF1の産生が誘導されることを見出した。さらに詳細な解析により、TLR3シグナルの恒常的活性化がEBV陽性胃がん細胞の増殖を促進していることを明らかにした。これらの結果は、自然免疫シグナルの活性化がEBV陽性胃がんの発生に寄与していることが示唆するものと考えられた。

(3) EBV陽性胃がん細胞由来のエクソソーム中にEBERが含まれることを見出した。エクソソーム分泌を阻害すると細胞外に放出されるEBERが減少することから、EBERはエクソソーム依存的に細胞外に放出されていることが示された。このことは、EBV陽性胃がん細胞から放出されるエクソソームの活性にEBERが関与していることを示唆するものと考えられた。

(4) EBV感染で発現するLMP2Aが上皮細胞の性質に与える影響について解析し、その結果、LMP2Aが、上皮細胞が足場を消失した際に誘導されるアポトーシス (anoikis) に対する抵抗性をもたらすということを見出した。LMP2Aは自身で細胞内シグナル伝達を惹起し、ERKの活性化を介してanoikis誘導因子であるBimの分解を促進する。その結果、EBV感染細胞はanoikisに対して抵抗性を獲得、細胞の悪性化-がん化への進展がおこるものと考えられた。

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 4 件)

1. 岩切 大 「EBウイルス感染と胃発癌」日本臨床増刊号「最新胃癌学」72: 58-61, 2014. (査読無)
2. Iwakiri, D., Minanitani, T., Samanta, M. Epstein-Barr virus latent membrane 2A contributes to anoikis resistance through ERK activation. J. Virol. 87: 8227-8234, 2013. (査読有)
3. Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., Koyanagi, Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. Blood 117: 5663-5673, 2011. (査読有)
4. Minanitani, 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)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 岩切 大 「EB ウイルスによる発癌の分子機構」第 61 回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム 2013.11.10 神戸国際会議場 神戸

2. 岩切 大 「EB ウイルスによる自然免疫シグナル修飾と発癌がん」共同利用・共同研究拠点 研究集会 感染と癌・感染癌のエフェクター分子とその標的 2012.9.18 北海道大学 札幌

3. Iwakiri, D., Minamitani, T. Exosomal transfer of EBV contributes to gastric cancer development. The 15th biennial conference of International association of EBV-associated disease. 2012. 8.3 Sheraton hotel Philadelphia Philadelphia

4. Iwakiri, D., Minamitani, T., Takada, K. EBV-encoded small RNA is secreted via exosomes in gastric epithelial cells. 第 70 回日本癌学会学術総会 English oral session 2011. 10.4 名古屋国際会議場 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：