

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460932

研究課題名(和文) エクソソーム誘導性シグナルを介したEBウイルスによる胃発がん機構

研究課題名(英文) Mechanisms of EBV-mediated gastric carcinogenesis through the exosome-induced signaling.

研究代表者

岩切 大(Iwakiri, Dai)

人間総合科学大学・人間科学部・特任教授

研究者番号：10307853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス(EBV)感染胃がんから、EBER(EBV-encoded small RNA)がエクソソーム輸送を介して細胞外に放出され、それを取り込んだ細胞のtoll-like receptor 3 (TLR3)からのシグナル伝達を活性化すること、さらにそれがEBV陽性胃がん細胞の増殖を促進することを示し、EBERのエクソソーム輸送は胃発がんに寄与していることが示唆された。またエクソソーム分泌の阻害により、EBV感染胃がん細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that EBV-encoded small RNA (EBER) is released by EBV-infected gastric cancer (GC) cells through the exosome secretion and exosomal transfer of EBER triggers the signaling from toll-like receptor 3 in the recipient cells. EBER-mediated activation of TLR3 signals led to the growth promotion of EBV-infected gastric cancer cells, suggesting that exosomal transfer of EBER contributes to gastric carcinogenesis. Further study revealed that treatment with exosome inhibitor reduces the growth potential of EBV-infected GC cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：EBウイルス 胃がん EBER TLR3

1. 研究開始当初の背景

EBウイルス(EBV)は広くヒトに感染し、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)といった難治性の炎症性疾患、さらにバーキットリンパ腫(BL)やT/NKリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭がんや胃がんといった種々のがんとの関連でも知られるDNAウイルスである。このうち、日本人の主要ながんの一つである胃がんに関しては、我が国の胃がん全体のうちおよそ10%において、EBVが関連していることが明らかになっている。

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陽性胃がんでは、胃がん細胞の100%にEBVが感染しており、EBVの胃発がんにおける役割を明らかにすることも胃がん研究において重要な位置をしめるものといえる。

申請者らはこれまで、EBVによる発がん機構に関して研究を行い、EBV-encoded small RNA (EBER)とよばれるnon-coding RNA(ncRNA-A)が発がんにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。EBERはすべてのEBV感染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およそ170bpほどの小RNAであるが、BL細胞においてはIL-10、T細胞ではIL-9、上皮細胞ではIGF1の発現を誘導し、それぞれのEBV感染がん細胞の増殖を促進することが申請者らにより明らかとなった。さらに申請者らは最近の研究で、EBERが宿主のdsRNA認識分子と相互作用し、それらを活性化するという見出しをした。まずEBERは細胞内のdsRNA認識分子である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が明らかになった。RIG-Iの活性化は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が、その後の研究で、EBERによるRIG-Iの恒常的な活性化がBL細胞でIRF3の活性依存的にIL-10産生を誘導し、BL細胞の増殖促進をもたらすことが示された。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明らかにしたのである。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見出しをした。EBERはEBV感染リンパ球より、その結合蛋白質であるLa蛋白質と共に細胞外へ放出され、放出されたEBERが免疫系細胞のTLR3シグナルを活性化する。さらにEBERはIMやCAEBV、EBV-HLHといった活動性EBV感染症患者血清中に多量に存在し、それがTLR3シグナルを介し免疫系細胞を活性化することがわかり、EBERによるTLR3シグナルを介した免疫系の活性化が病態の形成に寄与する可能性が示された。つまり、ウイルス

RNAの細胞外への放出がウイルス性の炎症性疾患における病原性発現機構として存在していることが示されたのである。以上の申請者らの研究成果は、宿主の免疫防御分子であるRIG-IやTLR3が、EBV感染細胞においては恒常的なシグナル活性化の標的となり、結果ウイルスの病原性発現に貢献するというメカニズムを示すこととなった。

これらの知見をふまえ、申請者はEBERによる自然免疫シグナル修飾が胃がんの発生にも関与しているという仮説のもとに研究を行っている。これまでEBVの胃上皮細胞への持続感染系を用いて行ってきた解析で、上記仮説に関し、現在までに以下のような知見を得ている。

1)EBERはEBV陽性胃がん細胞から細胞外放出され、放出されたEBERは胃上皮細胞のTLR3シグナルを活性化する。

2)TLR3シグナル活性化により、EBV陽性胃がん細胞の増殖因子であるIGF1の産生が誘導され、その誘導はTLR3活性化により産生誘導されるIFNの作用によりおこる。

3)EBV陽性胃がん細胞より分泌されるエクソソームにはEBERが含まれている。

以上の結果は、エクソソームを介して分泌されるEBERによるTLR3シグナルの活性化で誘導されるIFNが、実は胃がん発生に寄与するということを示唆するものである。近年がん細胞より分泌されるエクソソームに含まれるマイクロRNA(miRNA)に関する研究が進展し、機能性のmiRNAの発がんにおける役割の重要性も明らかにされつつあるが、EBV感染細胞からも機能性のエクソソームが分泌されるということが最近明らかにされている。EBV感染胃がん細胞から分泌されるエクソソームにおけるEBER、miRNAの機能や胃がん発生における役割も今後明らかにされるべき課題と考えられる。

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究ではEBV感染による胃がんの発生に関して、エクソソームに含まれるEBERやmiRNAといったncRNAの発がんにおける役割を明らかにし、それらを標的とした新規のEBV陽性胃がん治療法の開発を目標にする。具体的には、エクソソーム放出やその取り込みを起点とする、EBV陽性胃がん細胞特異的な、EBERやmiRNAが関与する(IFNシグナルも含めた)細胞増殖促進機構の全貌の解明である。細胞外のncRNAはEBV感染胃粘膜上皮において、局所における炎症の惹起、慢性化、細胞増殖制御の破綻から発がんへと至る過程に寄与すると予想される。よってEBERを含んだエクソソームの活性やその取り込み機構、EBV感染胃がん細胞におけるIFNシグナルの役割等の解析を行うことにより、エクソソームにより誘導される、発がんへ

と至る細胞内シグナル伝達活性化の制御法を見出すことを目的として行うものである。

3. 研究の方法

1) EBV 感染細胞より放出されるエクソソームに関する検討

EBV 感染細胞株の培養上清よりエクソソームを抽出し、得られたエクソソームから RNA を抽出、RT-PCR 法で EBER の検出を行う。エクソソームの抽出の確認は、マーカー蛋白質である CD63 や Rab-5b 等の存在の有無をチェックして行う。種々の胃癌細胞や他の上皮細胞でそれが普遍的に起こっているかについても検証する。同時にエクソソーム放出の阻害剤などを用いた実験を行い、エクソソーム輸送依存的に EBER が細胞外に放出されていることも確認する。さらにその輸送には細胞特異性がないかについて、リンパ球細胞についても同様の検証を行う。

2) エクソソーム内に含まれる miRNA に関する検討

EBV 感染胃癌細胞より分泌されるエクソソームに含まれる miRNA について、miRNA アレイを用い網羅的に解析する。また EBV 非感染細胞も使い、含まれる miRNA の比較検討を行う。EBV 感染細胞特異的に含まれる miRNA が同定されれば、それは EBV 依存的に分泌されていると推測され、その機能予測から、胃癌細胞の増殖に関わると予想されるものを中心に、細胞内導入などで実際の機能の解析を行っていく。また EBER 欠損ウイルス感染細胞も使い、含まれる miRNA の比較検討を行う。EBER の存在依存的に含まれる miRNA が同定されれば、それは EBER 依存的に放出されていると予想され、その機能と炎症惹起との関連についても検討、EBER 放出による炎症シグナル活性化に寄与しているか否かを詳細に調べる。

3) EBER 発現と細胞内 miRNA の関連性についての検討

EBV 感染胃癌細胞内の miRNA について、非感染細胞、および EBER 欠損ウイルス感染細胞との比較を miRNA アレイ解析により行う。EBV 感染により影響を受けるもの、さらにそれが EBER 依存的に影響を受けているのかどうかはその結果により推測できる。EBER 依存的に発現が変化しているものについては、EBER 安定発現細胞を用いての実験でこれを再確認する。

4) 細胞外に放出されるエクソソームが TLR3 シグナル活性化に与える影響に関する検討

エクソソーム中に EBER が存在していることから、エクソソームが TLR3 シグナル活性化能を持つと予想される。そこで以下の実験を行う。EBV 感染細胞培養上清よりエク

ソソームを抽出、細胞に投与、IFN および炎症性サイトカイン産生などについて検証する。野生型 EBV 感染細胞、EBER 欠損 EBV 感染細胞を用い、EBER の存在の有無がエクソソームによるサイトカイン産生誘導に与える影響を調べる。

5) エクソソーム刺激により誘導される、IFN 産生及び細胞増殖シグナルについての解析

エクソソームによる刺激で胃癌細胞の増殖が誘導されるかどうか、細胞増殖能や細胞周期に関する解析、シグナル伝達解析等を中心に行う。またエクソソームに含まれる miRNA の影響について、とくに細胞増殖に関わるものが、細胞内で取り込まれ発現しているか否かについてリアルタイム PCR で詳細に解析する。エクソソーム取り込みにより IFN の産生が誘導される場合、IFN は IGF1 を誘導することが既にわかっているので、IFN の細胞増殖促進効果についても解析を行う。増殖が促進されれば抗 IFN 抗体が細胞増殖抑制効果をもつかどうかについても検証する。こうしてエクソソームによって誘導される IFN シグナルの、胃癌細胞増殖における役割を明らかにすることができる。

6) エクソソーム刺激が細胞内遺伝子発現に与える影響に関する検討

EBV 感染胃癌細胞から放出されるエクソソームの刺激によって、それを取り込んだ細胞の遺伝子発現がどう変化するかに関し DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析、がん化と関わる因子に変化がないかどうか検証する。そのような変化が認められた場合、エクソソーム内の EBER の存在の有無の影響についても、EBER 欠損 EBV 感染細胞由来のエクソソームを用いて同様の解析を行う。そして対象となる遺伝子 (EBER の存在の影響のあるものもないものも共に) の強制発現やノックダウンなど種々の方法で細胞の形質に与える影響を調べ、発がんとの関連をあきらかにしていく。

7) EBER 放出阻害による、EBER 誘導性シグナル抑制効果についての検討

EBV 感染胃癌細胞では放出された EBER による TLR3 シグナルの恒常的な活性化が起こることがすでに申請者らの研究により明らかになっている。これをもとに、エクソソーム分泌阻害剤を用いて EBV 感染胃癌細胞の TLR3 シグナル活性化や増殖に与える影響について検証する。具体的には、IFN 等のサイトカイン産生が低下するかどうか、IRF3 や NF- κ B の活性が低下するか、IGF1 産生が低下し細胞増殖が抑制されるかどうか等を調べる。阻害効果が認められれば、このエクソソーム依存

的な炎症シグナル活性化に miRNA が関与しているか否かについて検証する。一方、La との複合体として EBER がエクソソーム非依存的にも放出されることが明らかになった場合、先述の実験の解析結果をもとに、La-EBER 複合体の放出に関わる蛋白質の阻害剤や siRNA を用いることによって、EBV 感染胃癌細胞の恒常的な TLR3 シグナル活性化や細胞増殖シグナルに対する影響を調べる。

4. 研究成果

本研究により得られた結果は以下の通りである。

1) 樹立した種々の EBV 感染胃癌細胞の培養上清からエクソソームを抽出、そこから RNA をさらに抽出して EBER の検出を試み、用いた全ての EBV 感染胃癌細胞由来のエクソソームで EBER の存在を確認した。さらにエクソソーム分泌の阻害剤により、培養上清中の EBER の量が減少したことから、EBER がエクソソーム依存的に放出されていることがわかった。一方胃癌細胞以外の EBV 感染細胞株 (B リンパ腫、T/NK リンパ腫細胞株など) でエクソソームを抽出し、EBER の存在を確認した。このことから EBER のエクソソームへの取り込みおよび放出は、種々の EBV 感染細胞において普遍的に起こっているものと考えられた。

2) エクソソームを加えたレシピエント細胞内において EBER の存在が確認され、エクソソームを介した細胞内への EBER 取り込みが行われていることがわかった。エクソソーム刺激を受けた細胞(レシピエント細胞)では I 型インターフェロンの産生が誘導されることがわかった。この IFN 産生は TLR3 のノックダウンにより抑制されたことから、エクソソームを取り込んだ細胞では TLR3 シグナル活性化を介して IFN 産生が誘導されると考えられた。さらに EBER 欠損 EBV 感染細胞由来のエクソソームでは野生型 EBV 感染細胞由来のエクソソームに比して IFN 産生誘導が低下したことから、エクソソーム内に含まれる EBER がレシピエント細胞の TLR3 シグナル活性化に寄与していることが示唆された。

3) EBV 感染細胞と非感染細胞を用いてその培養上清のエクソソームに含まれる miRNA について網羅的な解析をおこない、EBV 感染細胞に特異的と思われる miRNA の存在が確認された。このうちその機能が細胞増殖に関わると予想されるものも確認されている。また EBER 欠損ウイルス感染細胞と野生型ウイルス感染細胞間での比較について現在検証中である。

4) エクソソームの取り込みが細胞増殖に与える影響について検証し、EBV 感染細胞由来のエクソソームが、これを取り込んだレシピエント細胞の増殖を促進するということが明らかになった。さらに EBER 欠損 EBV 感染細胞由来のエクソソームでは野生型 EBV 感染細胞由来のエクソソームに比して細胞増殖促進効果が減少したことから、エクソソーム内の EBER が細胞増殖促進に寄与していることが示唆された。EBER を含んだエクソソームは IFN 産生誘導能をもつという結果と併せ、レシピエント細胞の増殖は EBER による TLR3 シグナル活性化を介して促進されると考えられ、さらに検証を進めている。

5) エクソソーム分泌の阻害剤が細胞増殖に与える影響について検証したところ、EBV 感染胃癌細胞の増殖は阻害剤により抑制されたことから、EBV 感染胃癌細胞の増殖はエクソソームにより誘導される細胞内シグナル伝達に依存していることが示唆された。さらにエクソソーム分泌阻害剤により EBV 感染細胞から産生される IFN の減少を認めたことから、エクソソーム分泌阻害により EBER による恒常的な TLR3 シグナルの活性化が抑制されていることが示唆され、さらに検証をおこなっている。

6) EBV 感染胃癌細胞と非感染細胞の遺伝子発現の DNA マイクロアレイによる比較解析から、EBV 感染細胞では、非感染細胞に比して複数の IFN 誘導性遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。一般に IFN 誘導性遺伝子は細胞増殖抑制シグナルを誘導すると考えられる。EBV 感染胃癌細胞では IFN による細胞増殖抑制シグナルが EBV により阻害されているために、エクソソームとりこみによる TLR3 シグナル活性化が細胞の増殖に働くという機構の存在が示唆され、さらに検証を行っている。

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 6 件)

1. Mukohyama J., Iwakiri D., Zen Y., Mukohara T., Minami H., Kakeji Y., Shimono Y. Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens. *Oncotarget*, 査読有, 31,50150-50160,2016

doi:10.18632/oncotarget.10322.

2. Iwakiri D. Multifunctional non-coding Epstein-Barr virus-encoded RNAs(EBERs) contribute to viral pathogenesis.

Virus Res, 査読有, 212, 30-38, 2016 doi:
10.1016/j.virusres.2015.08.007.

3. 岩切 大 EB ウイルスによる発癌機構
癌と化学療法、 査読無、 42、 1133-1136、
2015.

4. Iwakiri D. Epstein-Barr virus encoded RNAs:
Key molecules in viral pathogenesis.

Cancers, 査読有, 6, 1615-1630, 2014, doi:
10.3390/cancers6031615.

5. 岩切 大 EB ウイルスによる発癌の分子
機構 ウイルス、 査読無、 64、 49-56、
2014 doi: 10.2222/jsv.64.49.

6. 岩切 大 EB ウイルス感染と胃発癌
日本臨床、 査読無、 増刊、 58-62、 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Iwakiri D. Molecular mechanisms of
Epstein-Barr virus-mediated
oncogenesis. Seminario in University of Rome.
2015.7.1, Rome, Italy.

2. 岩切 大 胃癌細胞における EB ウイルス
小 RNA の exosome 輸送を介した機能発現
日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10
日～12 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜
市)

3. Iwakiri D. Activation of toll-like receptor 3
signaling by Epstein-Barr virus-encoded small
RNAs contributes to gastric carcinogenesis. 17th
Annual meeting of European society for Clinical
Virology 2014.9.29-10.2 Prague, Czech
Republic.

4. Iwakiri D., Minamitani T. Exosomal transfer
of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs
contributes to gastric cancer development. 39th
International Herpesvirus Workshop 2014 年 7 月
19 日～23 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸
市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩切 大 (IWAKIRI, Dai)

人間総合科学大学・人間科学部・特任教授
研究者番号: 10307853