

## Epstein-Barr ウィルス関連リンパ腫におけるエキソソームの機能解析

南保明日香

北海道大学大学院医学研究科 生理学講座 細胞生理学分野

### 【研究の背景】

生体内の細胞間情報伝達を制御する媒体として注目されている細胞外小胞エキソソームは、様々な細胞種から放出され、供給細胞由来の膜タンパク質、細胞質因子、脂質、mRNA、microRNA(miRNA)等の因子を標的細胞に運搬することで免疫系の制御や多様な生理機能を示す<sup>1)</sup>。

ヒトγ-ヘルペスウィルスに属する普遍的な2本鎖DNAウイルスであるEpstein-Barrウイルス(EBV)は、多くの場合、不顕性持続感染を維持する一方で、一部の例においてバーキットリンパ腫、胃がん、上咽頭がんを始めとした種々のがんと関連する<sup>2)</sup>。従来、EBV感染細胞が放出するエキソソームが、種々のEBV由来因子を標的細胞に輸送する可能性が示唆されていたが、その生理的役割については明確ではなかった。

研究代表者は、これまで、EBV感染細胞由来エキソソームが、カベオラ依存的エンドサイトーシスを介して様々なヒト由来上皮細胞に取り込まれること、また取り込まれた標的細胞において、細胞増殖あるいは接着因子の1つであるintercellular adhesion molecule 1(ICAM-1)の発現が増強することを証明した。さらにEBVがコードするがん遺伝子であるlatent membrane protein(LMP)-1がエキソソームを介して標的細胞に輸送されること、そして、ICAM-1の発現亢進に貢献することを明らかにした<sup>3)</sup>。以上の結果から、EBV感染細胞由来エキソソームを介して輸送された種々の生理活性物質によって、標的細胞の形質が変動する可能性が示された。

### 【目的】

研究代表者の先行研究から、EBV感染細胞由来エキソソームを介してLMP1が標的細胞に輸送され、接着因子の発現亢進に貢献することが明らかとなった<sup>3)</sup>。EBVはBHRFおよびBARTクラスターにコードされる合計44のmiRNAを発現することが知られており、これらのEBV由来miRNAが様々な機能を示すことが明らかになっている。

本研究では、EBV感染細胞由来エキソソームの生理的機能をさらに理解するため、エキソソームに内包される細胞およびEBV由来miRNAを同定し、さらにこれらの役割を解明することを目的として以下に示す検証を行った。

### 【方 法】

EBV潜伏感染には、I型、II型、III型の3種が存在し、それぞれ特異的なウイルス遺伝子発現パターンを示す。また、バーキットリンパ腫や胃がんはI型潜伏感染、上咽頭がんはII型、臓器移植後リンパ腫はIII型潜伏感染に特異的な遺伝子発現をそれぞれ示す(表1)<sup>1)</sup>。本研究では、エキソソーム産生細胞として、同一のバーキットリンパ腫患者から単離した、I型およびIII型潜伏感染Mutu細胞株(それぞれ、Mutu I、Mutu III)、また、Mutu I細胞からEBVゲノムが脱落した、EBV陰性Mutu<sup>-</sup>細胞株の3種を用いた。

#### 1. 各種 Mutu 細胞由来エキソソームの精製

Mutu<sup>-</sup>、Mutu I、Mutu III細胞( $2 \times 10^8 / 200 \text{ mL}$ )の培養上清から、超遠心(35,000 rpmで2時間)によってエキソソーム画分を単離した[それぞれexosome(-)、exosome(I)、exosome(III)と称する]。

#### 2. Mutu細胞由来エキソソームに内包されるmiRNAの同定

精製エキソソームから単離した total RNA から small RNA 画分を抽出後、ライブラリを作成し、Miseq による次世代シーケンシングを行った。解析によって得られた配列について、データベース (miRBase および Homo\_sapiens.GRCh37.57.ncrna) を用いて既知の miRNA およびノンコーディング RNA についてそれぞれアノテーションを行った。

### 3. EBV 感染がエキソソーム産生に与える影響

各種 Mutu 細胞から精製したエキソソーム画分のタンパク質量を Bradford 法により定量した。また Mutu 細胞におけるエキソソームが産生される細胞内小器官、多胞体を、CD63 に対する抗体を用いた免疫染色法により検出した。

## 【結果】

### 1. 各種エキソソームに内包される miRNA の同定

各種 Mutu 細胞から精製した画分にエキソソームが存在することをネガティブ染色により確認した(図 1)。エキソソームから単離した small RNA について、次世代シーケンスを行った結果、解析に用いた RNA 量と相關したリード数が得られた。このうち約半数の small RNA がデータベースによってアノテートされ、exosome (-) および (I) については約 20% が、exosome (III) については約 6% が miRBase によって既知の miRNA として同定された。また、exosome (-) については、EBV 由来 miRNA は同定されず、一方、exosome (I) および (III) については miRBase によってアノテートされた miRNA の約 5% が EBV 由来 miRNA であることが示された(表 2)。

### 2. 各種エキソソーム間での miRNA の比較

次に、各種エキソソーム間で miRNA の比較を行った。上位 20 種について検討した結果、全てのエキソソームに共通する 12 種の細胞由来 miRNA が認められた。また exosome (-) および (I) に共通する 6 種類の細胞由来 miRNA が認められた。一方、3 種の EBV 由来 miRNA を含む特異的な miRNA が exosome (III) に内包されることが明らかになった(表 3)。

次に、I 型および III 型潜伏感染 Mutu 細胞由来エキソソームに内包された EBV 由来 miRNA について比較を行った。その結果、BART miRNA については、ほぼ同様に内包されることが明らかになった。一方、一部の BHFR miRNA が特異的に exosome (III) に内包されることが示された(図 2)。

### 3. EBV 感染がエキソソーム産生に与える影響

各種 Mutu 細胞から放出されたエキソソーム量についてタンパク質量を指標に検討した結果、Mutu III においてエキソソーム産生が増強していることが明らかになった(図 3A)。また、免疫染色法により、各種 Mutu 細胞における多胞体を観察した結果、Mutu III でその形成が亢進することが明らかになった(図 3B)。次に、エキソソーム産生増

表1 潜伏感染タイプとEBV関連がん

	I型	II型	III型
EBV遺伝子	EBNA1 BARFO EBERs	EBNA1 LMP1・2A・B BARFO EBERs	EBNA1・2・3A・C LMP1・2A・B BARFO EBERs
EBV関連がん	バーキットリンパ腫 胃がん	ホジキン病 上咽頭がん	臓器移植後リンパ腫 トランスマルチリンパ球

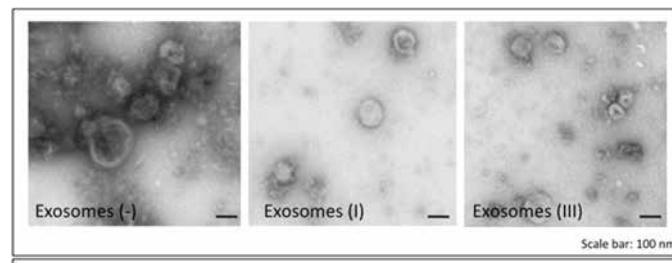


図1 Mutu細胞由来エキソソームのネガティブ染色

表2 各種Mutu由来エキソソームに内包されたmiRNAのまとめ

RNAs used for NGS	Exosome (-) (96 ng)		Exosome (I) (58.2 ng)		Exosome (III) (178.5 ng)	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Annotated	276,649	47.4	556,515	51	915,458	47.1
- with miRBase	61,348	22.2	102,702	18.5	58,350	6.4
- Homo sapiens	61,344	100	97,730	95.2	55,274	94.7
- Epstein Barr virus	4	0	4,972	4.8	3,076	5.3
- with Homo_sapiens.GRCh37.57.ncrna	215,301	77.8	453,813	81.5	857,108	93.6
Total	584,067	100	1,090,228	100	1,942,637	100

(-) および (I) に共通する 6 種類の細胞由来 miRNA が認められた。

表3 各種Mutu由来エキソソームに内包されたmiRNA(上位20)

Exosome (-)	Expression ratio (%)	Exosome (I)	Expression ratio (%)	Exosome (III)	Expression ratio (%)
1 mir-92a-1	9.32	mir-142	8.44	mir-92a-1	20.71
2 mir-92a-2	8.91	mir-92a-1	7.72	mir-A	19.75
3 mir-378a	5.24	mir-92a-2	7.23	mir-92a-2	19.49
4 mir-142	5.07	mir-191	5.65	mir-B	4.68
5 mir-181a-1	4.96	mir-186	5.14	mir-148a	2.27
6 mir-181a-2	4.87	mir-378a	3.27	mir-142	2.26
7 mir-191	4.06	mir-16-2	2.65	mir-181a-1	1.39
8 mir-186	3.64	mir-16-1	2.59	mir-181a-2	1.39
9 mir-30e	3.08	mir-181a-1	2.58	mir-BHFR1-1	1.33
10 mir-16-2	2.82	mir-21	2.57	mir-30d	1.28
11 mir-16-1	2.76	mir-181a-2	2.56	mir-21	1.22
12 mir-30d	2.37	mir-30d	2.33	mir-BART11	1.09
13 mir-22	2.28	mir-30e	2.33	mir-378a	0.99
14 mir-25	2.25	mir-22	1.99	mir-16-2	0.95
15 mir-10b	2.08	mir-28	1.92	mir-30e	0.93
16 mir-423	1.93	mir-10b	1.72	mir-16-1	0.92
17 mir-143	1.76	mir-423	1.63	mir-155	0.86
18 mir-21	1.76	mir-25	1.62	mir-182	0.85
19 mir-27b	1.54	mir-143	1.38	mir-191	0.78
20 mir-486-2	1.52	mir-151a	1.24	mir-BART8	0.67

EBV由来miRNA

強に関与する責任遺伝子として、LMP1 に着目してさらに検討を行った。Mutu-に LMP1 を強制発現させたところ、多胞体形成が増強した(図 4AB)。一方、siRNA を用いて Mutu III の LMP1 発現をノックダウンした結果、その形成が抑制された(図 4CD)。

## 【考 察】

以上の結果から 研究代表者が想定する仮説モデルを図 5 に示す。exosome (III) に、特異的な細胞および EBV 由来 miRNA が選択的に内包されたことから(表 2-3、図 2)、LMP1 に加えて、これらの miRNA が標的細胞の形質変動に関与する可能性が示された。さらに III 型潜伏感染において LMP1 依存的にエキソソームの産生が増強することが示された(図 3、4)。現在、各種 Mutu 細胞に発現する miRNA を同様の方法で解析し、エキソソームへの miRNA の取込みに選択性があるか否かについて検証している。選択性が認められた場合、その作用機序を今後解明していく予定である。また、これらの miRNA の標的細胞における役割について、アンチセンス RNA および欠失組換え EBV を用いて検討を行っている。

また、上皮細胞への EBV 感染は主に、潜伏感染 B リンパ球細胞と上皮細胞との細胞間接触を介して成立することが知られている。研究代表者らの研究によって、このプロセスに接着因子が関与することが明らかになった<sup>4-6)</sup>。この研究成果から、細胞間接触が形成される際に、近接する EBV 感染 B 細胞が放出するエキソソームが上皮細胞に効率良く取り込まれ、接着因子発現を亢進させることで細胞間接触を安定化する可能性が示唆される。現在、この仮説を証明するため、このプロセスにおけるエキソソームの役割について検討を行っている。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

従来、がん細胞が放出するエキソソームが、がん免疫応答の抑制、転移能や浸潤性の増強を賦与することでがんの進展に寄与する可能性が示されている。さらに、がん細胞においてエキソソームの分泌が増強していること、また、これらが特異的な腫瘍マーカーを保持していることから、新たなバイオマーカーとしての有用性が期待されている<sup>1)</sup>。

現時点において、EBV 関連リンパ腫の発症機構の分子基盤については不明な点が数多く残されており、この発症機構におけるエキソソームの役割を分子レベルで理解することが望まれている。従って、本研究を展開することで、EBV 関連がん発症機構の理解に貢献することが期待される。

また、EBV 関連がんに関する有効なバイオマーカーならびに治療法は未開発であり、本研究を展開することで、EBV 関連がん発症機構の理解に貢献することに加えて、研究代表者が同定した感染細胞由来エキソソームに内包される特異的 miRNA について、新規バイオマーカーの有用性を検討することで、EBV 関連リンパ腫の診断法の開発へと展開する可能性が期待される。

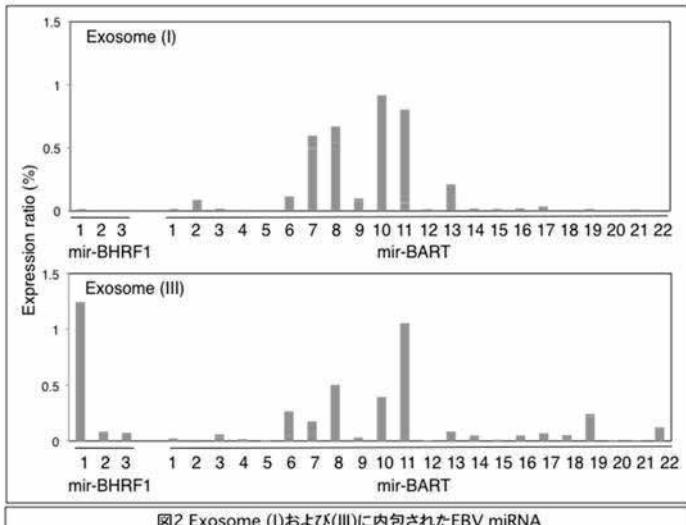


図2 Exosome (I)および(III)に内包されたEBV miRNA

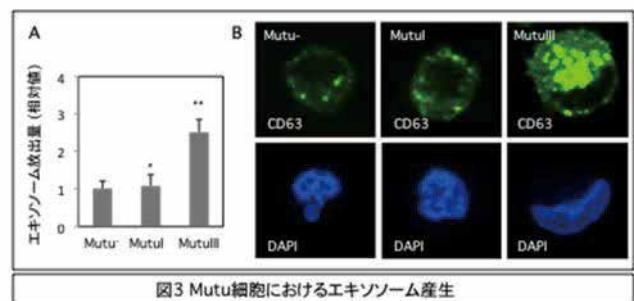


図3 Mutu細胞におけるエキソソーム産生

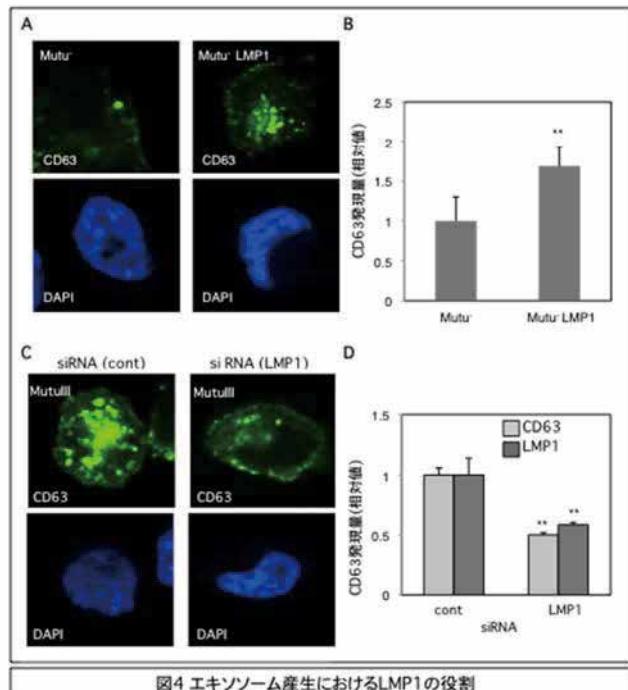
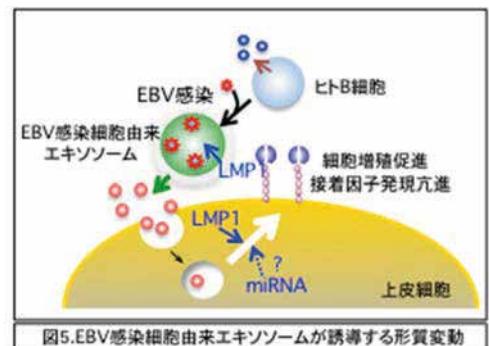


図4 エキソソーム産生におけるLMP1の役割

【参考・引用文献】

1. Raposo G, Stoorvogel W. J Cell Biol. 200(4):373-383. 2013.
2. Kieff E, & Rickinson A, B. Fields virology. 6th ed Lippincott Williams & Wilkins, 2511-2573. 2013.
3. Nanbo A, Terada H, Kachi K, Takada K, Matsuda T. J Virol. 86(17):9285-9296. 2012.
4. Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, and Yoshiyama H. J Virol 87(18):10334-10347. 2013.
5. Nanbo A, Kachi K, Yoshiyama H, Ohba Y. J Gen Virol. 97(11):2989-3006. 2016.
6. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M, Yoshiyama H. Viruses 4, 3420-3439. 2012.



【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 先進医薬研究振興財団に深謝いたします。また、共同研究者である西川潤博士(山口大学大学院医学研究科)、Bill Sugden 博士(ウイスコンシン大学マディソン校)、Wolfgang Hammerschmidt 博士(ドイツ環境衛生研究所)、エキソソームに内包される miRNA 解析においてご協力頂きました国立感染症研究所感染病理部第一室の片野晴隆博士に心より感謝申し上げます。