

63. EB ウイルスマイクロ RNA の上皮細胞発がんへの関与

神田 輝

Key words: EB ウイルス, マイクロ RNA, がん, NDRG1

*愛知県がんセンター研究所
腫瘍ウイルス学部

緒言

EB ウイルスはヒト腫瘍ウイルスである。B リンパ球を主な感染宿主細胞として、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、移植後リンパ増殖症などの発症に関与する。一方で、EB ウイルスは上咽頭がんや胃がんなど上皮細胞系由来のがん発生への関与が強く疑われているが、その機序の詳細は不明である。上咽頭がん、胃がん細胞において EB ウイルスは潜伏感染状態にある。潜伏感染状態では、ごく限られたウイルス蛋白質のみが発現する一方で、ウイルスのコードするマイクロ RNA (miRNA) 群が非常に高いレベルで発現することが知られている。特に BART (BamHI A rightward transcript) と呼ばれる領域に存在する一群の miRNA (以下、BART miRNA) の高発現は特徴的であり、こうしたウイルス由来 miRNA が EB ウイルスによる上皮細胞発がん過程において何らかの重要な働きをする可能性が考えられる。そこで本研究では、ウイルスのコードする BART miRNA の機能解析を組換えウイルスを用いた感染実験により明らかにすることを試みた。その結果、BART miRNA 群の標的遺伝子として *NDRG1* 遺伝子を同定し、また *NDRG1* 遺伝子の発現抑制を行う一連の BART miRNA 群を決定した。

方法および結果

1. ウイルス miRNA 群の標的遺伝子 *NDRG1* の同定

まず BART miRNA を欠損あるいは保持する組換えウイルスのペアを作製した。BART 領域には計 22 個の pre miRNA 遺伝子が存在するが、EB ウイルスの標準株として汎用されている B95-8 株は、BART miRNA 群の pre miRNA 遺伝子 22 個のうち、18 個を含む約 12 キロベースの領域を欠いている (図 1 A)。そこで BART miRNA 欠損株として B95-8 株 EB ウイルスを親株として用い、欠損している 12 キロベースの領域を野生型 EB ウイルスゲノム断片で修復することで「BART 修復ウイルス」ゲノムを作製した (図 1 B)。組換えウイルスゲノムの作製は、全て EBV-BAC (bacterial artificial chromosome) システムにより行った^{1,2)}。

作製した BAC クローンを元に、「BART 欠損ウイルス」および「BART 修復ウイルス」をそれぞれ産生し、これらの組換え EB ウイルスが潜伏感染した各種細胞を樹立した (図 1 C)。これらの BART miRNA 発現、非発現の細胞ペアにおける宿主遺伝子発現の違いをマイクロアレイで解析した。その結果、EB ウイルス由来 miRNA により発現抑制されるターゲット遺伝子の候補として *NDRG1* (N-myc downstream regulated gene-1) を同定した。

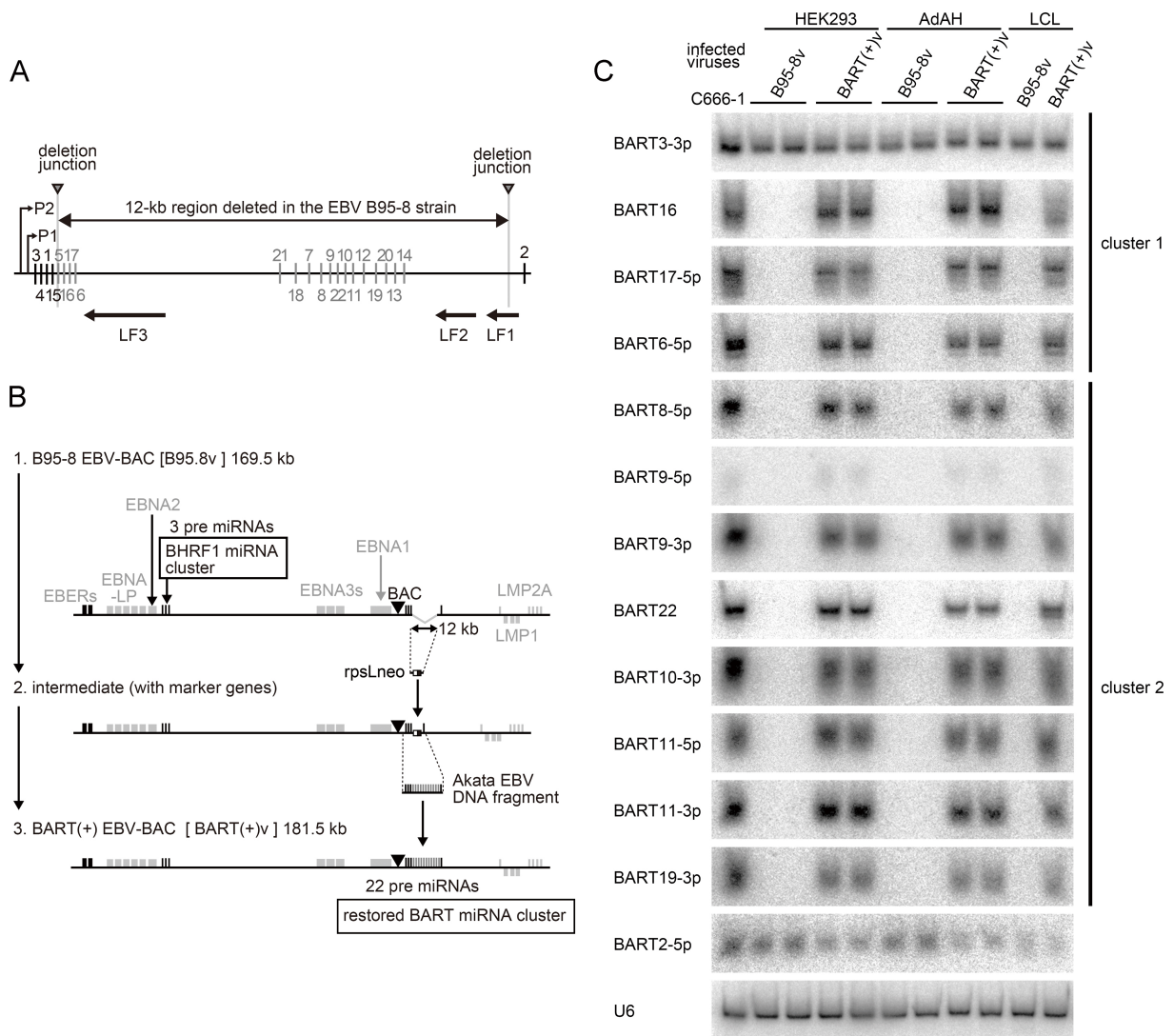


図1. EBウイルス BART miRNA 群を欠損する、あるいはこれを修復した組換えウイルスの作製.

A) EBウイルス BART miRNA 領域の pre miRNA 遺伝子の分布. B95-8 株ウイルスでは図に示す 12 キロベースの領域が欠損している. BART primary miRNA の転写開始点 (P1, P2), およびこの領域に存在する ORF (open reading frame, 左向き矢印) を示す. B) BART 修復ウイルス作製法の概略図. B95-8 EBV-BAC を Akata 株 DNA 断片を用いて大腸菌内での相同組換え法により修復し, BART(+)-EBV-BAC を得た. rpsLneo は相同組換えに用いるマーカー遺伝子である. C) BART 欠損ウイルス (B95.8v) および BART 修復ウイルス [BART(+)-v] の感染した各種細胞における miRNA 発現. 各細胞より調製した RNA をノザンブロット法により解析した結果, BART(+)-v 感染細胞では修復領域の miRNA 群が発現していることを確認した.

2. 組換えウイルス感染細胞における NDRG1 蛋白質発現の解析

マイクロアレイ法により同定した *NDRG1* 遺伝子について, その蛋白質発現レベルをウェスタン法により解析したところ, 予想通り BART 欠損ウイルス感染上皮細胞では, *NDRG1* が高いレベルで発現しているのに対して, BART 修復ウイルス感染細胞では *NDRG1* の発現は低レベルであった (図 2 A). さらに BART 修復ウイルスの BART miRNA 遺伝子群を再欠損させた BART 再欠損ウイルスが感染した細胞では, *NDRG1* の発現は BART 欠損ウイルス感染細胞と同様のレベルにまで回復することから, *NDRG1* 蛋白質の発現抑制は, 確かに BART miRNA 領域に依存していることが明らかになった. また各種細胞株における *NDRG1* 蛋白質の発現をウェスタン法により解析した. その結果, Akata, P3HR-1, Daudi, B リンパ芽球様細胞株 (LCL) など B リンパ球系の細胞株において *NDRG1* 発現はほとんど認め

られないが, AdAH, Caco-2, PC-3 などの上皮系の細胞株, さらに初代培養上皮細胞株 (HBEc1, PrEc) において NDRG1 発現は高レベルであることを明らかにした (図 2 B).

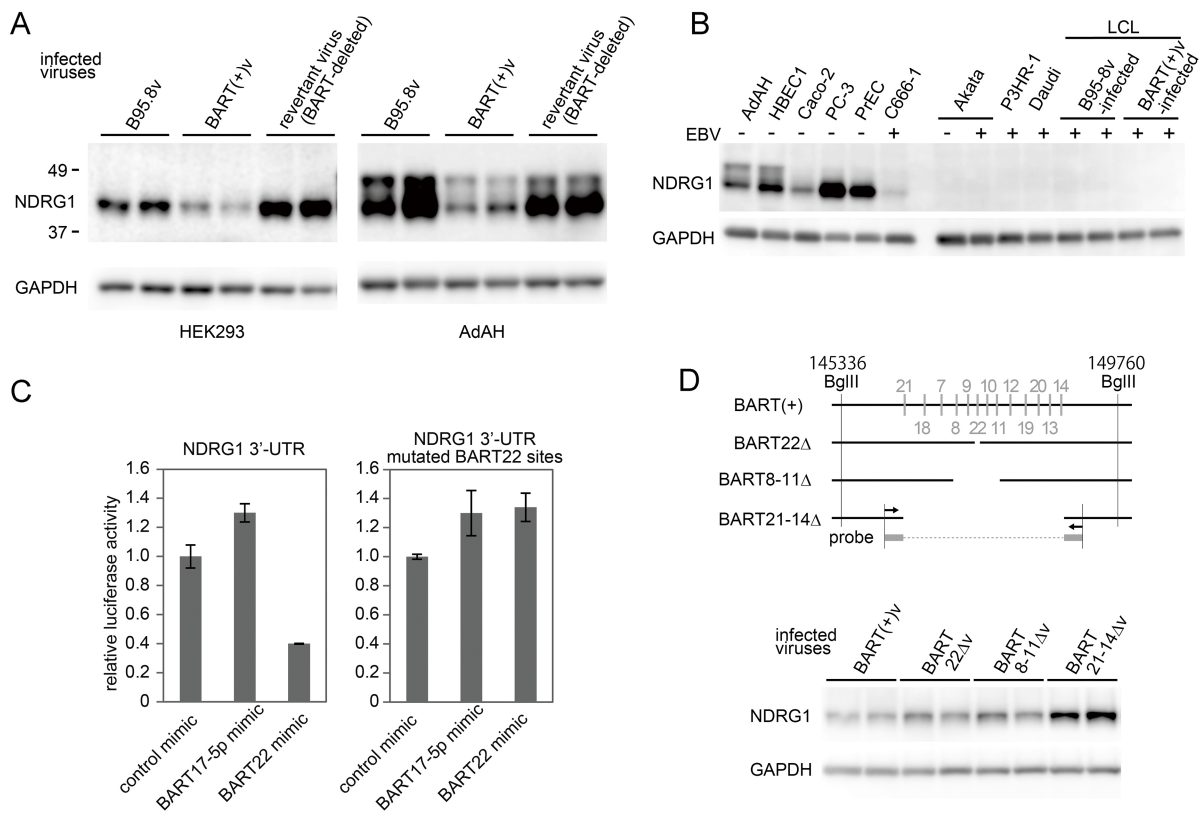


図 2. EB ウイルス感染細胞株における BART miRNA 群による *NDRG1* 遺伝子発現抑制.

A) BART 欠損ウイルス (B95.8v), BART 修復ウイルス [BART(+)/v], および BART 再欠損ウイルス (revertant) 感染細胞における *NDRG1* 蛋白質の発現をウェスタン法により解析した. B) 各種上皮系細胞株, および B リンパ球系の細胞株における *NDRG1* 蛋白質の発現をウェスタン法により確認した. C) BART 欠損ウイルス感染細胞を用いたレポーターアッセイの結果を示す. *NDRG1* 遺伝子の 3'非翻訳領域 (3'-UTR) を組み込んだレポーター遺伝子を BART17-5p mimic あるいは BART22 mimic とコトランスフェクションすると BART22 mimic のみが強い抑制効果を示した. D) BART miRNA cluster 2 領域を選択的に欠失する組換えウイルスの作製 (上), およびその感染細胞における *NDRG1* 蛋白質発現を解析した. BART21-14Δ ウイルス感染細胞では, *NDRG1* 蛋白質発現抑制が解除された.

3. *NDRG1* 発現抑制に関与する責任 miRNA 群の同定

NDRG1 遺伝子の 3'非翻訳領域をクローン化したレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイにより, *NDRG1* 遺伝子発現抑制に関与する責任 miRNA を探索した. その結果, BART22 が候補として同定された. *NDRG1* の 3'非翻訳領域内には BART22 miRNA の認識配列が 3ヶ所存在し, この配列に変異を導入することで, BART22 による発現抑制が解除されることを確認した (図 2 C). そこで同定した BART22 の pre miRNA 遺伝子のみを欠損する組換えウイルスを作製し, その潜伏感染細胞における *NDRG1* 発現を調べたところ, 予想に反して *NDRG1* 蛋白質レベルは低いままであった. 一方で, BART22 を含む BART miRNA cluster 2 領域 (BART21 から BART14 まで) を全て欠損するウイルスを作製して同様の実験を行ったところ, *NDRG1* 発現抑制は解除された (図 2 D). すなわち BART miRNA cluster 2 領域に存在する miRNA 群が協調して *NDRG1* の発現抑制に関与することが明らかになった.

4. EB ウイルス陽性上咽頭がん組織における NDRG1 発現抑制

EB ウイルス陽性がん組織においてもウイルス miRNA 群による NDRG1 発現抑制が見られるか否かについて、上咽頭がん組織を用いた検討を行った。EB ウイルス感染の有無は EBER (EB ウイルスの発現する小 RNA) の *in situ* hybridization (ISH) により判定した。その結果、EBER-ISH 陽性の上咽頭がん組織では、EBER-ISH 陰性の上咽頭がん組織と比較すると、有意に NDRG1 の発現低下が見られた (図 3 A, B, C)。

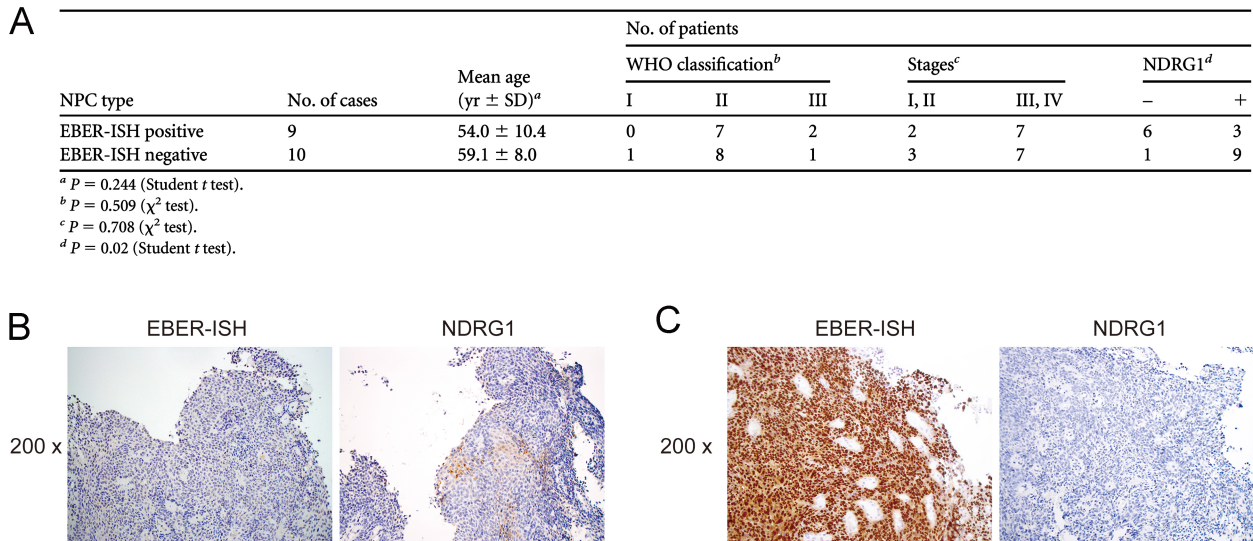


図 3. EB ウイルス陽性、あるいは EB ウイルス陰性の上咽頭がん組織における NDRG1 発現レベルの解析。

A) 検体の臨床病理学的特徴、および NDRG1 染色結果のまとめ。B) EBER-ISH 陰性、NDRG1 陽性を示す EB ウイルス陰性上咽頭がん組織の染色例。C) EBER-ISH 陽性、NDRG1 陰性を示す EB ウイルス陽性上咽頭がん組織の染色例。

考 察

EB ウイルス陽性上皮系がん細胞において、EB ウイルスがコードする BART miRNA と呼ばれる一群の miRNA が高レベルの発現する。本研究は、BART miRNA 群を欠損するウイルス株 (B95-8 株ウイルス) と、これを修復した BART 修復ウイルスのペアを用いて、EB ウイルス感染上皮細胞における BART miRNA 群の標的遺伝子を網羅的に探索した初めての研究である¹⁾。同定した NDRG1 蛋白質は上皮細胞の分化特異的に発現する転移抑制因子として知られる。生体内において EB ウイルスが上皮細胞に感染することで、NDRG1 発現を抑制し、細胞の分化の抑制や細胞増殖能の増強に与与する可能性がある。

本研究において、BART miRNA 欠損ウイルス感染細胞と BART miRNA 修復ウイルス感染細胞との間で、細胞増殖、細胞浸潤能の違いを認めることはできなかった。この理由としては、今回感染対象細胞として使用した細胞はいずれもがん細胞であり、既に EB ウイルス非依存性に増殖する能力を獲得している細胞であることが挙げられる。NDRG1 は、初代培養上皮細胞において高レベルで発現しており、こうした「非がん細胞」を用いた感染実験を行うことが今後の重要な課題である。ただ初代上皮細胞への EB ウイルス感染による形質転換実験は未だに確固とした成功例の報告がない。上皮系がん細胞には特殊な EB ウイルス株が感染しているという報告もあり、こうしたウイルス株は発がん性の亢進した特殊な EB ウイルス株である可能性も否定できない。こうしたがん細胞・組織由来のウイルス株を用いた感染実験は、EB ウイルスによる発がん研究に新たな展開をもたらすと期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、愛知県がんセンター研究所・感染腫瘍学部の宮田真美子、金沢大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科の吉崎智一、近藤 悟、加納 亮、島根大学微生物学教室の飯笹 久である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kanda, T., Miyata, M., Kano, M., Kondo, S., Yoshizaki, T. & Iizasa, H. : Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. *J. Virol.* **89** : 2684-2697, 2015.
- 2) Kanda, T., Shibata, S., Saito, S., Murata, T., Isomura, H., Yoshiyama, H., Takada, K. & Tsurumi, T. : Unexpected instability of family of repeats (FR), the critical cis-acting sequence required for EBV latent infection, in EBV-BAC systems. *PLoS One*, **6** : e27758, 2011.