

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16878

研究課題名（和文）咽頭上皮におけるEBウイルスによるオートファジー誘導の生物学的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of biological significance of EBV-induced autophagy in pharyngeal epithelium

研究代表者

石川 和也（Ishikawa, Kazuya）

金沢大学・医学系・助教

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）：EBV潜伏感染リンパ球のcell lineである、EBfaV-GFPを用いた実験を行った。溶解感染を誘発したEBfaV-GFPにクロロキンでオートファジーを阻害したところ、著明に細胞が死滅することが明らかとなった。このことから、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。オートファジー活性の違いによるBZLF1、BRLF1、EBNA1の発現に関して検討したが、有意な結果は得られなかった。EBV潜伏感染上皮細胞の樹立は出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスに対するオートファジー反応が明らかになりつつあるが、ウイルスの種類によって、オートファジーが抗感染効果を示す場合と、ウイルス複製に利用される場合があることが分かってきた。EBVもオートファジーを亢進す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EBVを排除するのか、それともEBVに利用されるのかはまだ明らかになっていない。本研究は、EBVによる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、新規治療法開発の礎を構築することに寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The experiment was performed using EBfaV-GFP, which is the EBV latently infected lymphocyte cell line. Inhibition of autophagy by chloroquine in the EBfaV-GFP which was activated lytic phase 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. We examined the expression of BZLF1, BRLF1, and EBNA1 depending on the difference in autophagy activity, however no significant difference was observed. EBV latently infected epithelial cells could not be established.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：オートファジー EBV クロロキン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EBVは上咽頭癌の発癌に寄与する。しかし、通常の健常人ではEBVが上咽頭上皮細胞へ感染すると、初期遺伝子発現(BZLF1、BRLF1)につづき早期遺伝子(早期抗原EAなどをコード)、後期遺伝子(VCAなどをコード)発現へとカスケードが進み成熟ウイルスが大量に産生され、感染細胞は破裂して血中もしくは咽頭内腔にウイルスを放出する溶解感染がおこる。つまり、癌化するどころか、死んでしまう。このため、溶解感染から潜伏感染へと感染モードを変更することが発癌に必須のステップである。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・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、リソソームで分解して生存に必要なエネルギーを確保している。このオートファジーが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ぐ、基底オートファジーと呼ばれる仕組みが細胞内の恒常性を保つことで発癌過程が抑制されていると考えられている。また、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も確立された。ここで問題となるのがウイルス性発癌におけるオートファジーの役割である。基底オートファジーによる癌の抑制効果がウイルス性発癌において機能しているかどうかは疑問である。多くの場合はウイルスの持続感染が発癌に先行して成立しており、ウイルスに対する選択的オートファジーが起こりうるためである。また、オートファジーによる防御機構が働き得るにも関わらず、その持続感染が成立するのはなぜなのかという疑問が生じる。このように、一般的な癌におけるオートファジーの役割が徐々に明らかになりつつあるが、ウイルス性発癌におけるオートファジーの役割については未解明のままである。

### 2. 研究の目的

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た。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。申請者は、細胞の恒常性を保つ目的で誘導されるオートファジーをEBVが逆に利用することで、細胞溶解やアポトーシスに陥ることを阻止し、免疫原性の高いウイルス抗原の細胞内分解により潜伏感染を維持するのに利用している可能性があるのではないかと考えた。具体的には、オートファジーはウイルスに対する生体防御機構として活性化するが、EBV感染によって活性化したオートファジーがウイルス由来蛋白を処理して細胞内の恒常性を保つことが、潜伏感染を維持するメカニズムの一つとなり、その後の発癌に寄与するのではないかと仮説を立てた。

本研究の目的は、EBV感染咽頭上皮で誘導されるオートファジーの生物学的意義を明らかにすること。そして、オートファジーのモジュレーションにより、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を構築することである。

### 3. 研究の方法

#### 1) EBV潜伏感染上皮細胞の作成

EBV受容体であるCD21は通常上皮では発現していないので、まずはCD21を遺伝子導入した293細胞を作成する。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株はすでに当教室にあり、これにサイトメガロウイルスプロモーター下流にBZLF1遺伝子を組み込んだBZLF1発現ベクターをトランスフェクションすることで溶解感染状態となり、培養液中に組換えGFP-EBVを放出する。この培養上清から採取した組換えGFP-EBVを、CD21を導入した293細胞に添加し、感染させることでEBV潜伏感染上皮細胞を作成する。

#### 2) EBV潜伏感染上皮細胞におけるオートファジーの評価

1)で作成したEBV潜伏感染上皮細胞と293細胞において、LC3-、LC3-をウエスタンブロットで評価しオートファジー誘導を比較する。

次に、このEBV潜伏感染上皮細胞をクロロキン(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作用を持つ)で処理し、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する。潜伏感染に必須であるウイルス蛋白の発現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する。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あわせて行う。

#### 3) EBV再活性化モデル細胞の作成

1)で作成したEBV潜伏感染上皮細胞にサイトメガロウイルスプロモーター下流にBZLF1遺伝子を組み込んだBZLF1発現ベクターを導入することで、溶解感染のトリガーとなる。この細胞にクロロキンやラパマイシンで処理することでオートファジーを阻害/誘導し、溶解感染時に発現がみられるBZLF1やBRLF1などのウイルス蛋白発現や遺伝子発現の変化をウエスタンブロットとRT-qPCRで評価する。

また、溶解感染では細胞が死滅するため、オートファジーを阻害/誘導することで細胞の生存

数に差がでるかどうかが MTT アッセイを用いて評価し、溶解感染がオートファジーでコントロールできるかどうかを検討する。

4 )

1 )で作成した EBV 潜伏感染上皮細胞を免疫不全マウスに接種する。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。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誘導し、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可能性について検討を試みる。

#### 4 . 研究成果

1 ) 293 細胞に CD21 発現ベクターをトランスフェクションしたが、トランスフェクション効率が不良であった。解決策として遺伝子導入方法を、ウイルスベクターを用いた方法にしてみることを検討したが、本研究の期間中に CD21 発現上皮細胞を樹立することが出来なかった。

2・3 ) EBV 潜伏感染上皮細胞の樹立が出来ていなかったため、これらの実験系に関しては進めることが困難であった。その為、この実験系の先行実験として EBV 潜伏感染リンパ球 cell line である、EBfaV-GFP を用いた実験を行った。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 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溶解感染に与える影響について MTT アッセイを用いて検討した。その結果、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著明に細胞が死滅することが明らかとなった。また、LC3-、LC3- の発現をウエスタンブロットで評価し、実際に CQ がオートファジーを阻害していることも確認できた。このことから、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。次に、潜伏感染状態の EBfaV-GFP と、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、BZLF1、BRLF1、EBNA1 の蛋白発現をウエスタンブロットで評価した。溶解感染した EBfaV-GFP では潜伏感染に比べて BZLF1 は高発現していることが確認できたが、オートファジー活性の違いによる BZLF1 の発現には有意な差を認められなかった。BRLF1 の発現はメンブレンのバンドが不鮮明で評価困難であった。EBNA1 の発現に関しては潜伏感染と溶解感染間の有意差や、オートファジー活性の違いによる有意差は認められなかった。他のウイルス蛋白がオートファジー発現によって調節されている可能性について検討を考えたが、本研究の期間中には困難であった。

4 ) EBV 潜伏感染上皮細胞を免疫不全マウスに接種する予定であったが、EBV 潜伏感染上皮細胞の樹立ができなかった為、本研究期間中に行うことを断念した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Endo Kazuhira, Ueno Takayoshi, Ishikawa Kazuya, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 46
2. 論文標題 Effects of l-carnitine administration on health-related quality of life during cisplatin-based chemoradiotherapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 431 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakisaka Naohiro, Endo Kazuhira, Kitazawa Tomohiro, Shimode Yuzo, Kato Koroku, Moriyama-Kita Makiko, Koda Wataru, Ikeda Hiroko, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Sugimoto Hisashi, Yoshimura Kenichi, Tsuji Hiroyuki, Kawashiri Shuichi, Omoto Kiyoka, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 139
2. 論文標題 Detection of sentinel lymph node using contrast-enhanced agent, Sonazoid?, and evaluation of its metastasis with superb microvascular imaging in oral and oropharyngeal cancers: a preliminary clinical study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2018.1535193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kano Makoto, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Wakae Kosho, Aga Mituharu, Moriyama Kita Makiko, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Kitamura Kouichi, Muramatsu Masamichi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 145
2. 論文標題 Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus positive oropharyngeal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1547 ~ 1557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川和也、野田昌生、杉本寿史、吉崎智一
2. 発表標題 唾液腺分離腫の1例
3. 学会等名 第41回日本顔面神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川和也
2. 発表標題 甲状腺癌治療の主軸 手術治療
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川和也、吉崎智一
2. 発表標題 乳児期に手術加療を行った中咽頭奇形腫の一例
3. 学会等名 第32回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishikawa K, Yoshizaki T
2. 発表標題 Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the tongue
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

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