

# 研究終了報告書

## 「内因性微粒子が駆動するウイルス関連疾患の理解」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：佐藤 好隆

### 1. 研究のねらい

ウイルスは内因性微粒子を巧みに操って、自身の増殖に利用していることが明らかになりつつある。ウイルスは宿主に様々な疾患を引き起こすため、この“ウイルス由来成分を含む内因性微粒子”もウイルス関連疾患の病態に関与することは想像に難くないが、未だその関与は十分に解明されていない。

ヒトに様々な腫瘍を引き起こす Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、成人の約 90% が感染しているとされる世界で最もヒトに感染しているウイルスである。EBV 感染により細胞外微粒子の放出が亢進することから、ウイルスがその病態形成において細胞外微粒子を利用している可能性が高い。予備的検討において、EBV 感染細胞から外因性微粒子としてウイルス粒子 (Virion) と内因性微粒子として細胞外微粒子 (エクソソームなど) の 2 種類の微粒子が放出され、ウイルス感染細胞から放出される細胞外微粒子は EBV 感染を促進することを見出した。

本研究では、EBV 感染細胞から放出される内因性微粒子が感染やウイルス関連腫瘍の形成にどのように関与しているのか？ また、その責任因子はなにか？ を明らかにし、ウイルス関連疾患における内因性微粒子の重要性を確立することを目指す。同時に、外因性微粒子であるウイルス粒子がどのように細胞に侵入していくのか？ 感染が成立する時にどのような変化が起きるのか？ の解明も目指す。

ウイルスの生活環やウイルス関連疾患から外因性微粒子としてのウイルス粒子や内因性微粒子として放出されるウイルス由来成分を含んだ細胞外微粒子が、標的細胞に与える影響や両者の相互作用を検討することで、微粒子が誘導する生命現象の理解に繋げたい。

微粒子とウイルス関連疾患の関係の理解は、従来の疾患概念を拡大し、感染対策や治療のパラダイムシフトを起こす可能性がある。例えば、外因性微粒子 (ウイルス粒子) のみを対象としてきたこれまでの感染対策を、内因性微粒子も対象に含む新たなウイルス感染対策への拡張・再構築や、ウイルス感染の阻害剤やウイルス関連疾患の治療薬として内因性微粒子を標的とした抗体や小分子化合物の開発などが想定される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

人類は常にウイルスに曝露され続けている。ウイルス感染細胞はウイルス粒子を産生し、これが別の細胞へと伝播され、感染が広がっていく。エクソソームに代表される内因性微粒子はほぼ全ての細胞から放出されるため、当然、ウイルス感染細胞からも放出されるが、ウイルス感染におけるその役割はほとんど分かっていない。本研究では、ウイルス感染やウイルス関連疾患の発症に、ウイルス産生細胞から放出される内因性微粒子がどのように関与するかや、外因性微粒子であるウイルス粒子との関わりを明らかにすることを目指す。

Epstein-Barr ウイルス(EBV)は成人の約 90%が既に感染しており、ありふれたウイルスの一つである。EBV の感染は一般に症状がないことが多いが、まれに発熱やリンパ節腫脹などの伝染性単核症などの良性疾患(特別な治療を要せずに治る)を起こす。一方、EBV は発がんウイルスでもあり、一部のヒトにリンパ腫や上咽頭がんなどの悪性疾患(治療なしで治癒することではなく、放置すれば死に至る)を起こし、EBV は良性疾患から悪性疾患まで様々な病気の原因となる。

本研究では、細胞外微粒子に内包される EBV タンパク質 BGLF2 と BNRF1 の機能解析を中心に研究を展開し、ウイルス産生細胞から放出された細胞外微粒子および BGLF2 を含んでいる細胞外微粒子が、EBV 感染を促進することを実証した(Sato and Yaguchi et al., Cell Commun Signal, 2022)。細胞外微粒子に内包される BNRF1 をノックアウトしたウイルスでは、マウスモデルにおいて腫瘍形成能が著しく低下し、EBV 関連腫瘍に BNRF1 は重要なウイルス遺伝子であることが示唆された。並行して、ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルス 1 型感染に関わる宿主因子の探索を実施して、PAPSS1 を単離し、ウイルスの細胞表面への吸着にヘパラン硫酸が必要であることを確認した(Suzuki et al., Commun Biol, 2022)。研究期間を通して、ウイルス感染細胞から放出される外因性微粒子(ウイルス粒子)と内因性微粒子(ウイルス由来成分を含んだ細胞外微粒子)が、標的細胞に与える影響や両者の相互作用に迫った。

## (2) 詳細

### プロジェクト 1: EBV タンパク質 BGLF2 を含有する細胞外微粒子を介した EBV 感染の促進

EBV は約 80 個のウイルスタンパク質と約 30 個の miRNA をゲノムにコードしており、十分に機能が解析されていないものも多い。内因性微粒子はウイルス-宿主間の相互作用に大きな影響を与えうるため、EBV のコードする oncoprotein である LMP1 の他にも EBV のコードする遺伝子の中に「ウイルス感染細胞から放出される exosome の産生を調節する因子」や「exosome に取り込まれ周囲の微小環境を調整する因子」が複数含まれている可能性が高いと考えた。

ウイルス産生感染を誘導した EBV 陽性細胞の培養上清を、OptiPrep を使用した密度勾配遠心によって、異なるフラクションに細胞外微粒子とウイルス粒子を濃縮することに成功した。それぞれのフラクションでの単位 EBV ゲノムあたりの感染率を算出したところ、感染細胞から放出される細胞外微粒子は EBV の感染を促進することがわかった。

細胞外微粒子を介した EBV 感染促進の分子メカニズムを解析するため、EBV 遺伝子ライブラリー(Konishi et al., mSphere, 2018)を使用したスクリーニングを実施した。EBV のコードするタンパク質をそれぞれ 293T 細胞にトランスフェクトし、それぞれの細胞の培養上清から細胞外微粒子を精製した。この細胞外微粒子をライブラリーとして、細胞外微粒子に取り込まれる EBV 遺伝子(遺伝子産物)とウイルス感染を促進する EBV 遺伝子(遺伝子産物)を同定した。このスクリーニングより、ウイルスタンパク質 BGLF2(細胞外微粒子に取り込まれ、BGLF2 を含有する細胞外微粒子は EBV 感染を正に制御する)を見出した。

BGLF2 を含有する細胞外微粒子の添加により、コントロールの細胞外微粒子添加に比べてウイルス遺伝子の発現が約 3 倍ほど上昇し、自然免疫に関わる遺伝子群の発現が低下することを明らかにし、BGLF2 を含有する細胞外微粒子と精製ウイルス粒子を使用した感染実験に

よって、BGLF2を含有する細胞外微粒子がEBV感染を促進することを確認した。実際に、ウイルス感染細胞から放出された細胞外微粒子に BGLF2 タンパク質は存在していた。以上より、BGLF2 タンパク質を含む細胞外微粒子による EBV 感染の促進メカニズムが明らかとなった (Sato and Yaguchi et al., Cell Commun Signal, 2022)。

EBV の初感染を契機に発症した伝染性単核症患者の血清に BGLF2 を含有する細胞外微粒子が存在するか否かを検証するため、抗 BGLF2 抗体と抗 syntenin 抗体の共染色による Exoview 解析を行ったが、自作の抗 BGLF2 抗体が解析に十分な感度および特異度を有しておらず、臨床サンプルからの BGLF2 タンパク質を含有する細胞外微粒子の検出できなかった。

### プロジェクト 2: 異種ウイルス間の相互作用

プロジェクト 1 から、ウイルス感染細胞からもウイルス由来成分を含んだ細胞外微粒子が放出されることがわかってきた。この細胞外微粒子は体液や血液中に存在し、他のウイルスの感染に対して影響を与える可能性がある。そこで、EBV 感染細胞から放出された BGLF2 タンパク質を含有する細胞外微粒子が、他のウイルス感染に影響を与えるかどうか(異種ウイルス間の相互作用)を検討した。解析は完了していないが、研究期間終了後も引き続き本プロジェクトを通じて様々なウイルスを専門とする研究者達と連携しながら、新たな現象を見つけるための努力をしていく予定である。

### プロジェクト 3: 細胞外微粒子に内包される EBV タンパク質 BNRF1 と EBV 関連腫瘍形成

プロジェクト 1 で実施したスクリーニングより、腫瘍を形成するヘルペスウイルスのみに存在するウイルスタンパク質 BNRF1 が細胞外微粒子に取り込まれることを見出した。BNRF1 遺伝子を欠損させた組換え EBV によって作製した不死化 B 細胞株 LCL(dBNRF1) は、NOG マウス (NOD/Shi-scid,IL-2R $\gamma$ KO) の腹腔内に移植をすると、腫瘍形成が野生型に比べ著しく低下し、BNRF1 は EBV 関連腫瘍の形成に大きな役割を持つことが示唆された。

BNRF1 を含有する細胞外微粒子が細胞に与える影響を検索する中で、BNRF1 を含有する細胞外微粒子の添加により B 細胞の増殖が促進されることを見出し、この現象を軸として、BNRF1 が EBV 関連腫瘍に与える影響を解析した。BNRF1 を強制発現した Akata 細胞の RNAseq から、BNRF1 により発現が誘導される遺伝子として IFI6 や IFI27 などの interferon-stimulated genes (ISGs)を同定した。このとき、interferon alpha および beta 遺伝子の発現自体は上昇しておらず、BNRF1 による ISGs の発現上昇はサイトカインに依存しない変化であると考えられる。IFI6 は抗アポトーシス活性が報告されている (Cheriyath et al., J Clin Invest, 2007)。実際に、BNRF1 遺伝子を欠損させた組換え EBV によって作製した不死化 B 細胞株 LCL(dBNRF1)では、飢餓や cycloheximide で処理すると野生型に比べて、アポトーシスが誘導されやすく、IFI6 の発現によりアポトーシスへの抵抗性が増すことが示された。以上より、BNRF1-ISGs axis が EBV 関連腫瘍の形成に関与するという新たな知見が得られた(論文準備中)。

### プロジェクト 4: 外因性微粒子の細胞内侵入に関する解析

ウイルス感染細胞からは、外因性微粒子としてウイルス粒子と内因性微粒子として細胞外微粒子の2種類の微粒子が放出される。ウイルス粒子自体が細胞へどのように侵入し、細胞にどのような影響を与えるのかを解析することは、微粒子が誘導する細胞の反応を理解する上で重要と考え、解析を実施した。

ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルス1型は、ヒトに口唇ヘルペスや皮膚疾患から失明の原因になる眼疾患や致死的な脳炎まで多様な病態を引き起こす。この単純ヘルペスウイルス1型もEBVと同様に成人の70%以上が既感染とされる“ありふれた”ウイルスである。この単純ヘルペスウイルス1型の感染に関与する宿主因子を同定するため、ハプロイド細胞を使用したCRISPR-KOスクリーニングを実施し、細胞表面糖鎖であるヘパラン硫酸の生合成に関わる一連の遺伝子群を単離した。さらに、糖鎖の硫酸化修飾を担う遺伝子PAPSS1が単純ヘルペスウイルス1型の感染に関わる新たな宿主因子であることを見出した。

PAPSS1 遺伝子の機能をノックアウトすると、細胞表面のヘパラン硫酸量が1/100以下に減少し、単純ヘルペスウイルス1型の細胞表面への吸着が1/1000以下に低下した。したがって、感染の第一ステップである単純ヘルペスウイルス1型の細胞表面への吸着にはヘパラン硫酸が関与していることが確認されました。また、PAPSS1 遺伝子をノックアウトすると、単純ヘルペスウイルス1型だけでなく、B型肝炎ウイルスやヒト風邪コロナウイルスの細胞への吸着量も低下したことから、多くのウイルスが細胞への吸着にヘパラン硫酸を利用していることが分かり、ウイルス粒子が細胞表面への吸着する際にヘパラン硫酸が重要であることが再確認された(Suzuki et al., Commun Biol, 2022)。

本さがけ研究の中心的解析対象であるEBVが、感染後に細胞に生じさせる変化についても解析した。EBV感染に伴う時系列トランスクリプトーム解析および感染のダイナミクスを表現する数理モデル構築を組み合わせ、感染直後に一過性にウイルス産生に関わる遺伝子が発現するabortive lytic phaseが存在することを明らかにした(Inagaki and Sato et al., Front Microbiol, 2021)。感染細胞の複雑性を理解するため、シングルセルRNAseq解析も実施した(論文準備中)。また、EBVの潜伏感染が成立した細胞において、ウイルス遺伝子発現はエピジェネティックな制御を受けており、かつ、ウイルスゲノムの立体構造もウイルス遺伝子発現に寄与することを証明し、ウイルスゲノム内の相互作用により潜伏感染状態が規定される可能性を示した(Ding, Wang, and Narita et al., J Virol, 2022)。

### プロジェクト5: その他

研究期間中に新型コロナウイルスの世界的なパンデミックが生じ、新型コロナウイルス研究の一つとして新型コロナウイルスの感染に必須の宿主因子TMPRSS2の阻害剤開発を名古屋大学ITbM研究所 藤本和宏博士(理論化学者)、大松亨介博士(有機合成学者)、藤田医科大学 村田貴之博士(ウイルス学)らとともに実施した。ナファモスタットおよび類縁体とTMPRSS2の直接相互作用が、抗ウイルス活性に重要であることを明らかにするとともに、SARS-CoV-2に対してナファモスタットと同等以上に効果のある化合物を見出した(Fujimoto et al., Viruses, 2022)。

## 3. 今後の展開

本研究により、ウイルス感染細胞からウイルス粒子と細胞外微粒子の 2 つの粒子が放出され、機能的な相互作用を生み出し、ウイルス感染および関連する病態形成に寄与している可能性が示された。しかし、技術的な問題から臨床検体で細胞外微粒子の疾患への関与を実証するには至っていない。今後は新たな解析技術を積極的に応用し、臨床検体での解析を完了させ、ウイルス粒子と細胞外微粒子が協調して引き起こす生体反応の包括的な理解を目指したい。臨床検体での実証は、細胞外微粒子もターゲットとした新たな感染対策や治療戦略の立案に貢献できると考えている。

#### 4. 自己評価

本研究ではウイルス感染細胞から放出される内因性微粒子と外因性微粒子が相互に与える影響を解析し、ウイルス関連疾患における内因性微粒子の重要性を確立することを目標に研究を推進した。ヒトに最も浸淫しているウイルスの一つである EBV 感染細胞から内因性微粒子(細胞外微粒子など)と外因性微粒子(ウイルス粒子)の両者が放出され、EBV 感染に感染細胞から放出された細胞外微粒子が促進的に働くこと、と、その分子メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。細胞外微粒子にカーゴとしてウイルスタンパク質が搭載されることで、ウイルスタンパク質の作用領域が拡大するという新しいコンセプトを実証できた。

しかし、臨床検体においてウイルスタンパク質を含有する細胞外微粒子が実際に存在するかどうかの検討に関しては技術的な問題から現時点では証明が不十分で有り、今後の研究で明らかにしていく必要があると考え、引き続き、取り組んでいく予定である。

当初の予定にはなかったが、外因性微粒子であるウイルス粒子も研究対象として加えて、ありふれたウイルスであるヒトヘルペスウイルスの感染や感染後に生じる細胞の変化も解析をし、外因性微粒子と内因性微粒子が織りなすイベントとして、ウイルス感染を捉えようとしたのはよい試みであったと考える。

本研究を通して、多分野の研究者と出会い、交流を深め、領域内外を問わず多くの研究者と共同研究を行い、研究ネットワークを構築することができたことは今後の研究人生を続けていく上での貴重な財産となった。特に、本研究で開始したシングルセル解析(シングルセル RNAseq や 1 細胞イメージング)は、今後の自身の研究にとって礎となるものであり、ウイルス感染および関連疾患における細胞集団の複雑性を軸に研究を発展させていきたい。本研究期間を通して、研究は円滑に進行させることができ、研究費は適切に執行された。全体的には、将来的に発表できると見込まれる知見も含め、十分な研究成果を挙げることができたと考える。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. **Sato Y<sup>#,\*</sup>**, Yaguchi M<sup>#</sup>, Okuno Y, Ishimaru H, Sagou K, Ozaki S, Suzuki T, Inagaki T, Umeda U, Watanabe T, Fujimuro M, Murata T, Kimura H\* (<sup>#</sup>equally contribution, \*Co-correspondence) “Epstein-Barr virus tegument protein BGLF2 in exosomes released from virus-producing cells facilitates *de novo* infection” *Cell Communication and*

<i>Signaling</i> , 2022, 20, 95
Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染細胞からは細胞外微粒子の放出が亢進するため、EBV が細胞外微粒子を自身の増殖に利用していることが示唆された。そこで、EBV がコードするタンパク質(約 80 個)を発現するライブラリーを使用して、EBV 感染を正に制御し、かつ、細胞外微粒子に存在する EBV タンパク質のスクリーニングを実施した。EBV-BGLF2 が細胞外微粒子に内包され、標的細胞内の環境を整え、感染に有利な状況を作り出すことを明らかにし、EBV 感染における細胞外微粒子の重要性を見出した。
2. Suzuki T, <b>Sato Y*</b> , Okuno Y, Goshima F, Mikami T, Umeda M, Murata T, Watanabe T, Watashi K, Wakita T, Kitagawa H, Kimura H* (*Co-correspondence) "Genome-wide CRISPR screen for HSV-1 host factors reveals PAPSS1 contributes to heparan sulfate synthesis" <i>Communications Biology</i> , 2022, 5, 694
ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルス 1 型の感染に関わる宿主因子を CRISPR スクリーニングにより探索し、ヘパラン硫酸の合成に関わる PAPSS1 を単離した。ヘパラン硫酸はウイルス粒子の細胞表面への吸着に関与し、単純ヘルペスウイルス 1 型だけでなく、様々なウイルス粒子の細胞への吸着にも関与することを確認した。
3. Ding W#, Wang C#, Narita Y#, Wang H, Leong M, Huang A, Liao Y, Liu X, Okuno Y, Kimura H, Gewurz B, Teng M, Jin S*, <b>Sato Y*</b> , Zhao B* (#equally contribution, *Co-correspondence) "The Epstein-Barr virus enhancer interaction landscapes in virus associated cancer cell lines" <i>Journal of Virology</i> , 2022,96, e00739-22
EBV 感染細胞の潜伏感染が成立した細胞内でのウイルスゲノムの高次構造について解析した。ウイルス遺伝子発現がエピジェネティックな制御を受けていること、と、ゲノム間の相互作用によりウイルス遺伝子の発現が調整されていることを、日米の研究チームが協力して明らかにした。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表] **佐藤好隆** 「内因性微粒子が駆動するウイルス関連疾患の理解」 第 95 回日本生化学会大会, 2S06e-20064, 名古屋, 2022 年 11 月 (シンポジウム口演)

[学会発表] **Sato Y**, Inagaki T, Okuno Y, Watanabe T, Murata T, Kimura H. "The abortive lytic phase occurred prior to latency establishment during EBV primary infection to B-cells" **The 45<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop (IHW2021)**, Gammaherpes Satellite symposium, # 36, Virtual (ON-LINE), August 2021 (シンポジウム口演)

[受賞] **佐藤好隆** 杉浦奨励賞 日本ウイルス学会, 2019 年 10 月

[著作物] **佐藤好隆** 「ウイルス感染と細胞外小胞」 実験医学増刊・EVs 細胞外小胞の生物学,

2021, 39, 93-97

[プレスリリース] 「細胞表面とウイルス感染の甘い関係~細胞表面糖鎖によるウイルス感染の補助~」名古屋大学・神戸薬科大学・JST 共同配信, 2022 年 7 月 15 日 (日本経済新聞および日経バイオテック 2022 年 7 月 20 日オンライン版に掲載)

[市民講座] 佐藤好隆 「ヒトと共存できるウイルスと共存できないウイルス」 Aichi Science Festival 2020 サイエンストーク, 2020 年 10 月 (オンライン市民公開講座)