

主論文の要旨

**Direct evidence of abortive lytic infection-mediated
establishment of Epstein-Barr virus latency during
B-cell infection**

〔 B 細胞初感染時において Epstein-Barr ウイルスが
一過性の溶解感染を経由することの直接的な証明 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 ウイルス学分野

(指導：木村 宏 教授)

稲垣 知希

【緒言】

Epstein-Barr ウイルス (EBV) はヘルペスウイルス科に属し、成人の 90%以上が既感染である普遍的なウイルスである。ヒト B 細胞を自然宿主としており、多くの場合が不顕性感染となるが、一部のヒトに悪性リンパ腫や胃がんなどを引き起こす (Shah et al, Clin Microbiol Infect, 2009)。

EBV は、自身の生存維持・拡大のために、潜伏感染と溶解感染という二つの感染形態を取る (Murata et al, Rev Med Virol, 2013)。潜伏感染では、EBV は一部のウイルス遺伝子のみ発現することで宿主免疫を回避し、感染細胞内における自身の維持を図る。一方、溶解感染に移行すると全てのウイルス遺伝子を発現し、効率的な子孫ウイルスの産生による自身の伝播を図る。また初感染では、一過性に溶解感染に似た状態を経て、潜伏感染へ移行することが近年明らかとなってきた (Wen et al, J Virol, 2009)。一般に、ウイルスの感染は感染細胞に宿主防御機構を発動させ、アポトーシスを引き起こす。EBV は初感染後に溶解感染遺伝子を発現させ、感染細胞のアポトーシスを回避することで、初感染後の感染成立に寄与しているのではないかと考える。

実際に、我々の行った RNA-seq 解析によるウイルス遺伝子の発現プロファイルの経時的な観察から、初感染後に一過性の溶解感染関連遺伝子の発現が観察された。しかしながら、バルク RNA-seq 解析で得られたデータは、感染事象のスナップショットであり、ある時点における細胞集団の転写産物の平均値にすぎない。従って、個々の感染細胞が初感染後にどのような運命を実際に辿るかを捉えることはできない。本研究では、細菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome) 技術による組換えウイルス作成と、Flippase (Flpe) - Flpe recognition target (FRT) システムによる部位特異的遺伝子組み換え技術を融合し、EBV の初感染における個々の感染細胞の fate mapping を行った。

【方法・結果】

EBV 感染による宿主遺伝子およびウイルス遺伝子の発現を網羅的に解析するため、EBV 陰性の Burkitt リンパ腫由来 B 細胞株 (Akata(-)細胞) を用いて、初感染時における感染細胞の経時的な遺伝子発現プロファイルの解析を行った (Fig. 1A 及び Fig. 1B)。クラスタリング解析により、遺伝子発現パターンは 10 つの群に分類でき、Gene Ontology 解析により初感染後の細胞分裂や生合成代謝に関わる遺伝子群 (Cluster 1 and 10) の発現低下を認めた (Fig. 1C)。また、続いて実施した network 解析では、RAS/MAPK 経路の活性化に関わる遺伝子 *PTPN11* と相互作用を示す遺伝子群が初感染後に有意に発現が上昇していた (Fig. 1D)。一方、ウイルス遺伝子は、初感染後にまず全ての EBV 遺伝子の一時的な発現上昇が確認され (Fig. 2A)、その後、潜伏感染状態のウイルス遺伝子発現パターンへの移行を認めた (Fig. 2B-D)。この初感染後の EBV 遺伝子の一時的な発現上昇は、EBV の自然宿主細胞である primary B 細胞においても同様に確認された (Fig. 2E)。

しかし、この事象はバルク集団での解析であり、観察されたデータは集団における

平均値にすぎず、一部の感染細胞が溶解感染状態にある可能性もある。

そこで、初感染でのウイルス粒子産生能の検討を行った。Akata(-)細胞株に GFP 遺伝子を発現する組換え EBV を感染させ、その 7 日後に培養上清を回収し、感染性ウイルス粒子産生を評価した (Fig. 3A)。培養上清中には、ウイルスゲノム DNA および感染性粒子を認めなかった (Fig. 3B, C)。

さらに EBV 初感染後に溶解感染遺伝子を発現した細胞の運命を非破壊的かつ経時的に解析するため、組み換え EBV を用いた感染細胞の fate mapping を行った。組み換え酵素 (Flpe) の特異的認識配列 (FRT 配列) の下流に DsRed カセットを Akata (-)細胞のゲノムに挿入し、Flpe 存在下でのみ細胞が赤色に蛍光されるレポーター細胞を樹立した (Fig. 4A)。また、ウイルスゲノム複製に関与する溶解感染関連遺伝子 (*BMRFL1*) のプロモーター下に *Flpe* 遺伝子を置換した溶解感染関連遺伝子の発現と同期して *Flpe* 遺伝子が発現する組み換え EBV を作成した (Fig. 4B)。この組み換え EBV をレポーター細胞に感染させたところ、感染細胞のうち、約 30%が溶解感染遺伝子の発現を経由し、潜伏感染状態に至ることが明らかとなった (Fig. 4C)。したがって、初感染における溶解感染関連遺伝子の発現は、感染性粒子産生を伴わない不完全な溶解感染によるものであることが直接的に証明された。

さらに興味深いことに、この初感染時の溶解感染関連遺伝子の発現は、EBV 溶解感染関連遺伝子の誘導を司るウイルス転写因子 (*BZLF1*) を欠損させた組換えウイルスでも確認され、初感染における溶解感染関連遺伝子発現はウイルス産生時とは異なるメカニズムで制御されていることが示唆された (Fig. 5A, B)。

【考察】

RNA-seq 解析による EBV の B 細胞への感染におけるに経時的な発現プロファイル解析により、潜伏感染の成立前に溶解感染関連遺伝子が一時的に起きることが明らかとなった。しかしながら、RNA-seq 解析で得られたこの知見は、ある時点における細胞集団全体の平均値としての事象であり、個々の感染細胞が初感染後に辿る運命は不明であった。本研究ではウイルス遺伝子編集技術と Flpe-FRT システムを組み合わせることにより、個々の感染細胞の fate mapping を行い、不完全な溶解感染を経由した後に、潜伏感染が成立する細胞が存在することを示した (Fig. 4)。一部の溶解感染関連遺伝子は、p53 分解に伴う抗アポトーシス (Sato et al, PLoS Pathog, 2009) や、宿主免疫回避に寄与する (Shahram et al, Virology, 2002) ことが報告されている (Kalla et al, PNAS, 2010)。EBV 初感染後にこのような溶解感染関連遺伝子が発現することで、宿主の抗ウイルス作用を回避し、感染細胞の生存・増殖に寄与していると考えられる。また、RNA-seq 解析結果から宿主遺伝子 *PTPN11* の潜伏感染成立への関与が示唆された (Fig. 1D)。PTPN11 は細胞増殖シグナル伝達に関与する RAS/MAPK 経路の活性化に寄与し (Chan and Feng et al, Blood, 2007)、これらのシグナル伝達経路は EBV 遺伝子によっても活性化されることが知られており、PTPN11 が仲介タンパク質として機能している可能性がある。

また、初感染でウイルス粒子産生を認めなかったことは (Fig. 3)、初感染での溶解感染関連遺伝子の発現が、ウイルス産生を伴う溶解感染関連遺伝子発現とは異なる機構によるためであるかも知れない。実際に、ウイルス産生を伴う溶解感染の誘導に必須のウイルス転写因子 BZLF1 タンパク質を欠損させた組換えウイルスを B 細胞に感染させても、初感染時の一過性の溶解感染関連遺伝子の発現を認めた (Fig. 5)。したがって、初感染における溶解感染関連遺伝子の発現は、ウイルス産生を伴わず、不完全な溶解感染であることが本研究から明らかとなった。溶解感染関連遺伝子の発現制御機構も、ウイルス産生を伴う溶解感染とは別の機構を介することが示唆され、その機構の解明という新たな課題も見つかった。

【結論】

本研究において、EBV 初感染時に一過性の不完全な溶解感染を経由し、潜伏感染に至る細胞の存在を直接的に証明した。また、この初感染における溶解感染関連遺伝子の発現は、ウイルス産生時とは通常とは異なる機構で制御されている可能性が示唆された。さらに詳細なウイルス初感染時における感染細胞の運命決定機構を解明し、ウイルスの不活化や感染成立防止などによる EBV 関連腫瘍の発症予防、制御を目指していきたい。