

# Studies on Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) modulating the innate immunity in Burkitt's lymphoma cells

(バーキットリンパ腫における EBER と自然免疫に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

**Background:** The Epstein-Barr virus (EBV), a member of B lymphotropic  $\gamma$ -herpesvirus, is the causative agent of infectious mononucleosis (IM), and is associated with Burkitt's lymphoma (BL), Hodgkin lymphoma, nasopharyngeal carcinoma (NPC) and other lymphoproliferative diseases. In these cancer cells EBV maintains latent infections, and in all types of latency (type-I, II and III), EBERs (EBER1 and EBER2) are the most abundant viral transcripts ( $10^7$  copies/cell). EBERs induce IL-10 in B cells, IGF-1 in epithelial cells, IL-9 in T cells and all of these induced cytokines function as an autocrine growth factor. EBERs confer resistance to IFN- $\alpha$  mediated apoptosis and play a significant role in EBV-associated carcinogenesis. EBERs are un-capped, polyA<sup>+</sup>, non-coding, non-translated RNAs of 167 and 173 nucleotides, respectively, and form double stranded RNA-like secondary structures with short stem-loops. Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) is a cytosolic protein that plays a key role in innate immunity by sensing viral double-stranded RNA (dsRNA) inside the cell, and thereby activating signaling pathways to induce type-I interferons (IFNs) and cytokines leading to the antiviral responses. We hypothesized that as dsRNA, EBER could be recognized by RIG-I and can activate the RIG-I signaling pathway in BL cells.

**Materials and methods:** We used BL-derived EBV-negative Daudi cells, EBV-positive and EBV-negative Akata and Mutu cells, Akata cells infected with EBER-knockout EBV or EBER-reintroduced EBV, Akata cells stably transfected with EBER plasmid or control plasmid. RIG-I expression was knocked down by transfecting RIG-I siRNA by using Lipofectamine RNAiMax. To express RIG-I, we transfected GFP-tagged RIG-I plasmid by electroporation. RIG-I plasmid with deleted CARD domains functioned as dominant-negative RIG-I, and was transfected by electroporation. Purified EBERs were synthesized by in-vitro transcription. RT-PCR was used for semi-quantitative estimation of IFN- $\alpha/\beta$ , IFN-stimulated genes (ISGs), IL-10, IRF-3, RIG-I, EBER and GAPDH gene expressions. Reporter assay was employed to measure NF- $\kappa$ B and IL-10 promoter activation. ELISA was used to measure IL-10 in the cell culture supernatants.

**Results:** Transfection of RIG-I plasmid induced type-I IFNs and ISGs in EBV-positive BL cells, but not in their EBV-negative counterparts or EBER-knockout EBV-infected BL cells. Silencing of RIG-I by siRNA resulted in down-regulation of type-I IFNs in EBER-positive BL cells. Transfection of EBER-expression plasmid or *in vitro*-synthesized EBERs induced type-I IFNs and ISGs in RIG-I-expressing EBV-negative BL cells, but not in RIG-I-minus counterparts. EBERs activated RIG-I's substrates, NF- $\kappa$ B and IFN regulatory factor 3 (IRF-3),

which were necessary for the induction of type-I IFN. Co-immunoprecipitation assay revealed that EBER formed complexes with RIG-I in BL cells. These results together, demonstrated that EBERs were recognized by RIG-I, and activated the down-stream signaling pathway to induce type-I IFNs and ISGs in EBV-infected BL cells. Previously it was reported that in BL cells, EBER induced IL-10 which functioned as an autocrine growth factor. We investigated whether EBER could induce IL-10 through the activation of RIG-I signaling. Our results demonstrated that knocked down of RIG-I by RIG-I siRNA and blocking RIG-I by dominant-negative RIG-I plasmid resulted in down-regulation of IL-10 expression in EBER-positive EBV-infected, and EBER plasmid stably transfected BL cells, but not in their EBER-negative counterparts. Transfection of EBER-expressing plasmid or *in vitro*-synthesized EBER induced IL-10 in RIG-I-expressing cell clones, and activation of IL-10 promoter by EBER was blocked by dominant-negative RIG-I. Blocking of NF- $\kappa$ B by dominant-negative I $\kappa$ B- $\alpha$  plasmid did not block IL-10 expression, whereas knocked down of IRF-3 by siRNA resulted in down-regulation of IL-10 in EBER-positive BL cells. Thus EBER induced IL-10 through RIG-I mediated IRF-3 signaling.

**Discussion:** It was established previously that RIG-I could be activated by dsRNA, which was synthesized as a replicative intermediate during replication of RNA viruses like NDV and VSV. We demonstrated that DNA virus like EBV, which expressed EBER in all forms of latency could also be recognized by RIG-I and thereby could activate RIG-I mediated downstream signaling. In EBV-positive BL cells, EBER induced type-I IFNs which could activate the interferon inducible gene PKR. However, EBER bound PKR, inhibited its phosphorylation and thereby prevented IFN- $\alpha$ -mediated apoptosis. Moreover, EBER induced IL-10 through RIG-I signaling, which functioned as an autocrine growth factor in BL cells. EBER induced IL-9 in T cells and IGF-1 in epithelial cells and these cytokines functioned as an autocrine growth factor. It may be possible that EBER induced these cytokines through the activation of RIG-I signaling. Further studies will be needed to elucidate the overall picture of the interaction of EBERs and RIG-I and to uncover strategies by which EBV evades and/or utilizes this surveillance mechanism to establish stable infection not only in BL cells, but also in other EBV-associated malignancies.

**Conclusion:** We demonstrated that in EBV-infected BL cells, EBV-encoded small RNAs were recognized by RIG-I and activated signaling to induce type-I IFNs. We further demonstrated that EBER induced an anti-inflammatory and growth promoting cytokine IL-10, through RIG-I-mediated IRF-3 but not NF- $\kappa$ B signaling. These findings suggested a new mechanism of dsRNA signaling pathway, where viral small RNA promoted tumor growth through interaction with the host immune system.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 田 賢 蔵

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 有 賀 正

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) modulating the innate immunity in Burkitt's lymphoma cells

(バーキットリンパ腫における EBER と自然免疫に関する研究)

ヘルペスウイルスのメンバーである EB ウイルス (EBV) は、バーキットリンパ腫 (BL)、ホジキンリンパ腫、上咽頭がん (NPC) などとの関連が明らかとなっている。それらのがん細胞では、EBV は潜伏感染状態で維持され、EBV がコードする小 RNA 分子 EBER が細胞当たり最大  $10^7$  コピーと大量に存在している。EBER は BL において IL-10 を誘導し、オートクライン増殖をサポートする。また、EBER はインターフェロンによるアポトーシスへの抵抗性を付与し、発がんにおいて重要な役割を果たしている。EBER は約 170 塩基からなるポリ A マイナスの RNA で、蛋白質には翻訳されず、多数の短いステムループからなる二本鎖 RNA 様構造をとるものと予測されている。retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) は細胞質蛋白で、細胞内でウイルスの二本鎖 RNA を検知し、I 型インターフェロン (IFN) やサイトカインなどの抗ウイルス反応を惹起し、自然免疫において重要な役割を果たしている。申請者は、EBER が BL において、RIG-I により二本鎖 RNA として検知され、RIG-I によるシグナル伝達系を活性化する可能性を検証した。

先ず、EBV 陽性の BL 細胞では RIG-I プラスミドを導入すると I 型 IFN や IFN-stimulated gene (ISG) の発現が誘導されるが、EBV 陰性の BL 細胞では誘導されないことを見出した。また、EBER 陽性の BL 細胞では siRNA を用いて RIG-I を抑制すると I 型 IFN の発現も抑制された。RIG-I を発現させた EBV 陰性の BL 細胞へ EBER プラスミド又は in vitro で合成した EBER を導入すると I 型 IFN、ISG の発現が誘導されたが、RIG-I を発現していない細胞では誘導されなかった。EBER は I 型 IFN 発現に必要な RIG-I の基質、NF- $\kappa$ B、interferon regulatory factor 3 (IRF-3) の活性化を誘導した。さらに、EBER が RIG-I と結合することを免疫共沈法により確認した。以上の結果、EBER が EBV 陽性 BL 細胞において RIG-I に結合し、その下流シグナルを活性化することにより I 型 IFN や ISG を誘導することが明らかとなった。次いで、EBER が RIG-I の活性化を介して IL-10 を誘導するか否かの検討を行った。siRNA または dominant-negative RIG-I により RIG-I の発現を抑制すると、EBER 陽性 EBV 感染 BL 細胞や EBER を安定発現させた EBV 陰性 BL 細胞では IL-10 の発現抑制が起こることが確認された。RIG-I を強制発現させた EBV 陰性 BL 細胞へ EBER プラスミド又は in vitro で合成した EBER を導入すると IL-10 の発現が誘導され、dominant-negative RIG-I を共発現させると IL-10 の活性化がブロックされた。同じ実験系で、I $\kappa$ B- $\alpha$  プラスミドを用いて NF- $\kappa$ B の活性化をブロックしても IL-10 の発現に影響を

認めなかったが、siRNA を用いて IRF-3 の発現を抑制すると IL-10 の発現も抑制された。以上の結果、RIG-I を介する炎症性サイトカイン誘導は NF- $\kappa$ B を介することが知られているが、EBER による IL-10 誘導は RIG-I により活性化された IRF-3 を介して起こることを明らかにした。

RIG-I が、ニューカッスル病ウイルス、水疱性口内炎ウイルスなどの RNA ウイルスの複製中間体として合成される二本鎖 RNA により活性化されることは既に確立されている。申請者は、DNA ウイルスである EBV 由来で、すべての EBV 関連がんが発現している EBER が RIG-I により検知され、その下流シグナルを活性化することを明らかにした。

公開発表は 7 月 7 日 13 時より約 25 名の参加のもとに行われた。まず、申請者が約 20 分で論文内容の説明を行い、次いで質疑応答がなされた。副査の有賀教授からは、ヒト IL-10 とウイルス IL-10 の区別がされているか、EBER が RIG-I と同様に二本鎖 RNA を検知する toll-like receptor 3 を活性化するか検討したか、小野江教授からは、EBER が *in vivo* で RIG-I を活性化するか、RIG-I のどのドメインが EBER 認識に必要なか、などの質問があった。最後に、主査の高田教授から、RIG-I の活性化には EBER のどの領域が必要か、EBER が EB ウイルス関連がんの治療標的分子となる可能性があるか、などについて質問があった。これらの質問に対して、申請者は、これまでの知識と実験結果をもとに概ね妥当な回答を行った。

本論文は「DNA ウイルスがコードする小 RNA 分子が自然免疫系の修飾を介して発がんに貢献している」という発がんメカニズムにおけるブレークスルーとなる発見であり、トップジャーナルである *EMBO Journal*、*Oncogene* に掲載された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。