

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K06819
研究課題名(和文) EBウイルスエピゾーマルベクターを応用した疾患モデルマウスでの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy using EBV episomal vector in model mouse of EBV infectious diseases

研究代表者
松田 剛 (Matsuda, Go)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・高度先進医療研究室・研究員

研究者番号：60392130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)は様々な腫瘍性疾患に関与する。EBVには特効薬はなく、新規治療法の開発が望まれる。本研究の目的はEBV疾患モデルマウス内でEBVエピゾーマルベクターおよびヘルペスウイルス(TK)-ガンシクロビル(GCV)療法を応用した感染細胞特異的に細胞死を誘導する治療法の開発である。今回、培養細胞レベルでEBV感染細胞に十分な細胞増殖抑制効果が得られたが、マウスではTK発現減少のため効果が得られなかった。しかし、感染細胞でのTK発現の増加により新規治療法につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is associated with various neoplastic diseases. The development of new therapy is desired because there is not a specific cure for EBV. The aim of this study is to develop the therapy which induce apoptosis to specific infected cells with EBV episomal vector and Herpesvirus TK-GCV therapy in model mouse of EBV disease. In this research, at the culture cell level we showed that the inhibitory effect of EBV was enough but the effect was not observed in the mice because decreasing the expression level of TK. However, the new therapy may be developed by increasing the expression level of TK.

研究分野：実験動物学、ウイルス学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ ウイルス 感染症 癌 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr ウイルス(EBV)はバーキットリンパ腫、慢性活動性 EBV 症候群(CAEBV)、移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)など様々な腫瘍性疾患に關与する。CAEBV の治療は造血幹細胞を移植する以外に有効な手立てがない。EBV には特效薬はなく PTL D の抑制は、今後の再生医療による移植の安全性を確保するには早急に抗ウイルス薬や新規治療法の開発が望まれる。

(2) 研究代表者はこれまでに様々な臓器にリンパ腫を誘発する EBV 疾患モデルマウスの作製に成功しており、全ての疾患に必須な治療標的となる EBV EBNA1 のゲノム配列を細胞内で切断することにも成功している。

2. 研究の目的

(1) 本研究は臨床応用を想定した、EBV エピゾーマルベクターを利用したウイルスゲノム切断および単純ヘルペスウイルス(HSV) TK 遺伝子による新規治療法の開発を目指す。

(2) EBV 疾患モデルマウス内での治療を試みる。

3. 研究の方法

(1) EBV 感染細胞内で EBNA1 切断によるウイルスゲノムへの影響を確認するため、CRISPR/Cas9 によるウイルスゲノム切断のため特異的 EBNA1 切断 guide RNA および複製起点 oriP、薬剤マーカー-puromycin および蛍光タンパク質 E2C-Crimson を含む発現ベクターを作製する。EBNA1 標的配列の切断効率を確認する。

(2) EBV 感染細胞内に予め EBNA1 を標的とした CRISPR/Cas9 システムを導入した細胞株の樹立後、EBV 疾患モデルマウスあるいはヒト化マウス内でウイルスゲノム切断による治療効果の検証を行う。

(3) EBV 感染細胞内で TK 遺伝子による感染細胞の細胞死誘導を行うため、Cag promoter 下に HSV-1 TK 遺伝子と自己切断配列 P2A をつなげて E2C-Crimson 蛍光タンパク質をドライブし、oriP および薬剤マーカー-puromycin を含む発現ベクターを作製する。EBV 感染細胞に transfection し、puromycin 選択で細胞株を得て Crimson の発現を蛍光顕微鏡で確認する。ガンシクロビル(GCV)添加の有無により、細胞死誘導を確認する。

(4) EBV 疾患モデルマウスあるいはヒト化マウス内で TK 遺伝子による治療効果の検証を行う。体重減少によりマウスが衰弱してきたら解剖し、各臓器の EBV コピー数およびウイルス遺伝子発現を確認する。FCM により移植した細胞の確認をする。生存曲線を作製し優位差を判定する。

4. 研究成果

(1) EBV 感染細胞内で EBNA1 切断によるウイルスゲノムへの影響、CRISPR/Cas9 システムによる EBNA1 を切断可能な EBV 複製起点 oriP を有するエピゾーマルベクターを作製した。EBNA1 標的配列を切断すると蛍光タンパク質 AcGFP が発現するベクターと共に 293FT 細胞に transfection し、切断効率を確認した。標的配列を含まないコントロールベクターでは非特異的な切断は起こらなかった。しかし、テトラサイクリンによる誘導がなくても EBNA1 を切断し、AcGFP の蛍光が観察された。

(2) EBV 疾患モデルマウスおよびヒト化マウス内でウイルスゲノム切断による治療効果の検証は細胞株の樹立がリークにより困難であるため行わなかった。

(3) EBV 感染細胞 B 細胞株 Raji に TK、細胞表面マーカー CD4、蛍光タンパク質および薬剤耐性因子(puromycin)を同時に発現するベクターを導入し、翌日、蛍光タンパク質(katushka 2S)及び TK の発現を確認した(図 1)。TK 導入細胞として CD4 発現細胞をマグネットビーズで分画し、毎日 GCV あるいは溶媒 DMSO 添加の有無により、細胞死誘導を行った。遺伝子導入 4 日後に GCV を添加したものは Raji の集合体形成の抑制、蛍光タンパク質の発現減少(図 2)や細胞の増殖抑制効果があった(図 3)。コントロールとして TK 遺伝子発現のないベクターを導入した場合は、効果は見られなかった(図 4)。

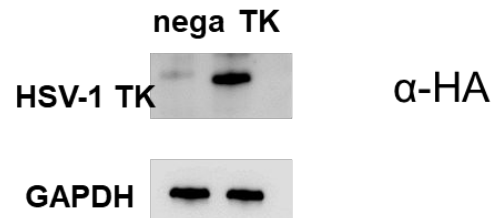


図 1 TK 発現確認 (抗 HA 抗体)

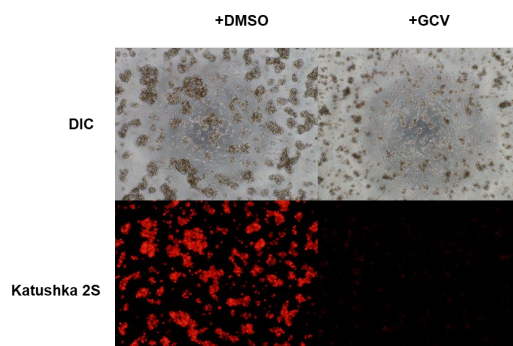


図 2 TK 遺伝子による GCV 効果

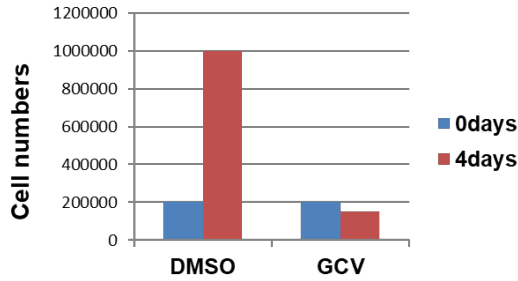


図3 GCVによる細胞増殖抑制効果

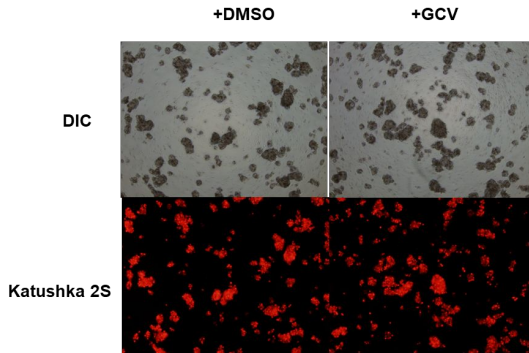


図4 コントロールベクターの影響

(4)EBV 疾患モデルマウス内で治療効果の検証を行う為、薬剤選択により TK 発現細胞を増殖させた。マウスに細胞を移植1週間後から、GCVあるいはPBSを毎日静注した。細胞を移植した全てのマウスが2~3週間で衰弱した。GCVによるマウスへの毒性は見られなかった。解剖後、多臓器にEBV DNAが検出された(図5)。GCVによるマウスの生存への影響はみられなかった(図6)。脾臓、肝臓および末梢血中のヒトB細胞中のCD4発現量に差が見られ、TK発現の低下した細胞はGCVが効かない可能性が考えられた(図7)。

今回、培養細胞でTK-GCV療法はEBV感染細胞特異的に細胞死を誘導する十分な効果が得られ、国内外での報告はない。マウスでは効果が得られなかったが、原因が判明しており、TK発現の安定化により感染細胞特異的な新規治療法につながると期待される。

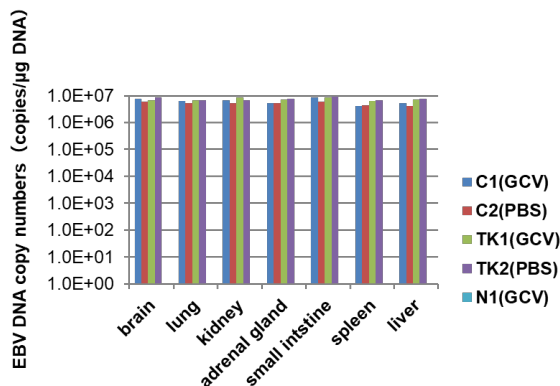


図5 マウス内での治療効果の検証 (各臓器におけるEBV DNA量)

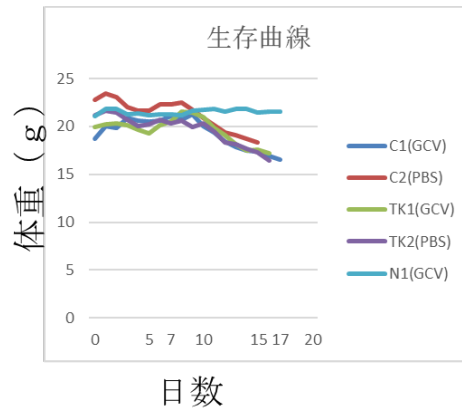


図6 TK-GCV療法によるマウスの生存日数

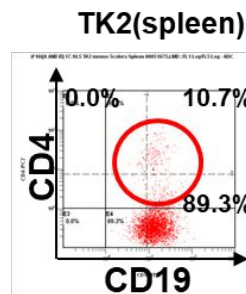


図7 CD4発現低下によるTK発現低下

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計7件)

- 松田 剛、他、EBV関連悪性腫瘍に対する新規治療法の開発、第40回日本分子生物学会 第90回日本生化学会、2017年
- 松田 剛、他、EBV関連悪性腫瘍に対する新規治療法の開発、第65回日本ウイルス学会、2017年
- Go Matsuda, et al、Structure-function relationship of Epstein-Barr Virus EBNA3C NLS and transport receptor、The 8th International Symposium of Advanced Energy Science、2017
- 松田 剛、他、EBウイルス核遺伝子EBNA3Cの新たな核局在化シグナル(NLS)の発見と複数のNLSの戦略的使用、第39回日本分子生物学会、2016年
- Go Matsuda, et al、Identification and functional analysis of Epstein-Barr virus EBNA3C Nuclear localization signal 4 (NLS4)、第64回日本ウイルス学会、2017年

- 松田 剛、他、 Identification and functional analysis of Epstein-Barr virus EBNA3C Nuclear localization signal 4 (NLS4)、第 13 回 EB ウイルス研究会、2016 年
- 松田 剛、他、 E B ウイルス核遺伝子 E B N A 3 C の新たな核局在化シグナル、第 30 回ヘルペスウイルス研究会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 剛 (MATSUDA Go)
国立成育医療研究センター・高度先進医療
研究室・研究員
研究者番号：6 0 3 9 2 1 3 0

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
該当なし