

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14391

研究課題名(和文) 高発がん性EBウイルス株は存在するか？

研究課題名(英文) Are there any highly oncogenic Epstein-Barr virus strains?

研究代表者

神田 輝 (KANDA, Teru)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：50333472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本人に多い胃がんの約1割にEBウイルスの感染が認められ、発がんへの関与が疑われている。本研究では、ゲノム編集技術を応用して、EBウイルス陽性胃がん細胞から二種の全長EBウイルスゲノムDNAを単離して全ウイルスゲノム塩基配列を決定した。系統樹解析から、両者はいずれも東アジア地域に分布するウイルス株のグループに分類された。得られた胃がん細胞由来EBウイルスを不死化上皮細胞に感染させたところ、がん遺伝子産物高発現で誘導されるはずの細胞死が阻止されたことから、上皮がん発生の初期段階においてEBウイルス感染が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Approximately 10% of gastric cancer cells are positive for Epstein-Barr virus (EBV) infection. Genome editing technology was used to clone full length genomes of two EBV strains derived from gastric cancer cell lines, and their sequences were determined. Phylogenetic analyses revealed that both strains belong to EBV family commonly observed in East Asian countries. When immortalized keratinocytes were stably infected with these gastric cancer-derived EBVs, the infected cells became resistant to oncogene-induced cell death, implicating the role of EBV infection in the initial phases of epithelial carcinogenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス 胃がん ゲノム編集 クローン化 上皮細胞 発がん

1. 研究開始当初の背景

EBウイルス (Epstein-Barr virus) は健康成人の 95%以上に感染している普遍的ウイルスである一方で、厳然たる腫瘍ウイルスでもある。EBウイルス関連腫瘍の約 80%を占めるのが、上咽頭がん、胃がんなどの EBウイルス陽性上皮系がんである。最近、胃がん臨床サンプルのゲノム解析により、胃がんは 4種類に分類され、EBウイルス関連胃がんはその一つに分類され、胃がん全体の約 9%を占めることが報告された (The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature 513:203, 2014)。したがって EBウイルスによる上皮系細胞のがん化メカニズムの解明は胃がんの診断・治療を考える上でも急務である。

では大多数の人に病原性を示さないのに、なぜ時としてがんの原因となるのだろうか？これを説明するのが「ある特定の EBウイルス株が胃がんを起こしやすい」という仮説である。EBウイルスは約 180 キロベースという大きなゲノムを有するがゆえに、研究開始当初の時点では二、三のウイルス株について全ウイルスゲノム配列が決定されているに過ぎなかった。しかし最近次世代シーケンサーの導入により、数多くの EBウイルス株の塩基配列決定が行われつつある (Palser AL et al, J Virol 89:5222, 2015)。その結果、EBウイルスゲノム塩基配列のウイルス株間での多様性が明らかになりつつある。一方、上咽頭がん由来の EBウイルス株は上皮細胞へ感染しやすい特性を持つといった興味深い報告もある (Tsai MH et al, Cell Reports 5:458, 2013)。そこで EBウイルス陽性胃がん感染しているウイルス株はの特性を明らかにする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

EBウイルス陽性胃がんや上咽頭がん由来の細胞株から潜伏感染 EBウイルスゲノムを BAC クローン化して解析することで、がん細胞由来の EBウイルス株が、特殊なウイルス株であるか否かを検証した。

3. 研究の方法

(1) 胃がん細胞株由来の全長 EBウイルスゲノム DNA のクローン化

EBウイルス陽性胃がん細胞株として、韓国で樹立された二種の細胞株 (SNU-719: Korean Cell Line Bank から入手、および YCCEL1: Dr. Sun Young Rha より分与) を用いた。ウイルスゲノム DNA を BAC (bacterial artificial chromosome) ベクターにクローンする方法としては、①古典的な相同組み換え法、および②ゲノム編集技術を応用した新しいクローン化法を開発して用いた。

(2) 全長ウイルスゲノム DNA 塩基配列の決定

BAC クローン化した胃がん細胞株由来 (SNU-719 株および YCCEL1 株) EBウイルスゲノム DNA を大腸菌から精製し、PacBio ロングリードシーケンサーを用いて、両者の全長

ウイルスゲノム塩基配列を決定した。

(3) アノテーション解析および系統樹解析

アノテーション解析、および系統樹解析は東北大学・大学院医学研究科・微生物学分野との共同研究により行った。

(4) 組換え EBウイルス産生による機能解析

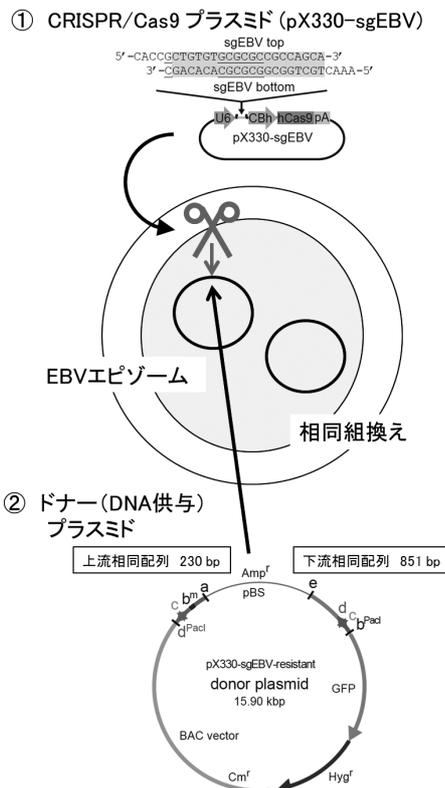
取得した SNU-719 株、および YCCEL1 株のウイルスゲノム DNA を精製して、HEK293 細胞にトランスフェクションして安定導入細胞を樹立した。その細胞から産生した組換え EBウイルスをヒト不死化ケラチノサイトに感染させて、細胞の表現型変化を解析した (国立がん研究センター・発がん予防研究分野との共同研究)。

4. 研究成果

(1) 胃がん細胞株由来の全長 EBウイルスゲノム DNA のクローン化

古典的な方法を用いて試みたターゲッティングでは相同組換えクローンを取得することができなかった。そこでゲノム編集技術を応用することで、短い相同領域でも効率良く相同組換えを行うことができる新たな実験系を開発した (Kanda T et al, J Virol 2016)。すなわち EBウイルス潜伏感染細胞に対して、ウイルス環状ゲノム (エピゾーム) を一ヶ所切断するゲノム編集プラスミド、およびドナープラスミドを同時に導入することで、相同組換え修復によりウイルスゲノム DNA 全長 (約 170 キロベース) を効率良く BAC クローン化する技術である (図 1)。

図 1 ゲノム編集技術を応用した EBウイルスゲノムのクローン化方法の概略



この方法により胃癌細胞株 SNU-719 および YCCEL1 から全長 EB ウイルスゲノムを 2 株 BAC クローン化した(図 2)

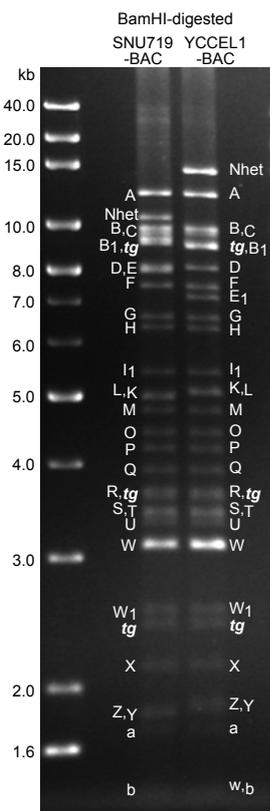


図 2  
単離された BAC クローン DNA の制限酵素切断解析結果

### (2) 全長ウイルスゲノム DNA 塩基配列の決定

上記で取得した 2 株の BAC クローン DNA を大腸菌から精製し、第 3 世代シークエンサ (PacBio) を用いて全ウイルスゲノム塩基配列を決定した (GenBank accession number AP015015, AP015016)。特記すべきこととして、従来塩基配列決定がきわめて困難であった反復配列部分についても、きわめて正確に塩基配列決定が可能であった。

### (3) アノテーション解析および系統樹解析

アノテーション解析によりウイルスゲノム上にコードされたウイルス蛋白質の全 open reading frame (ORF) を決定した。その結果、潜伏感染蛋白質である EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C において、B95-8 株 (米国・伝染性単核症由来株)、SNU-719 株、YCCEL1 株 (韓国・胃癌由来株) の間でアミノ酸数、配列ともに大きな多様性が認められた。

系統樹解析の結果、SNU-719 株、および YCCEL1 株は、アジア地域に分布する EB ウイルス株 (Akata 株、M81 株、GD1 株) と同系統に属する EB ウイルスであることを確認した (図 3)。

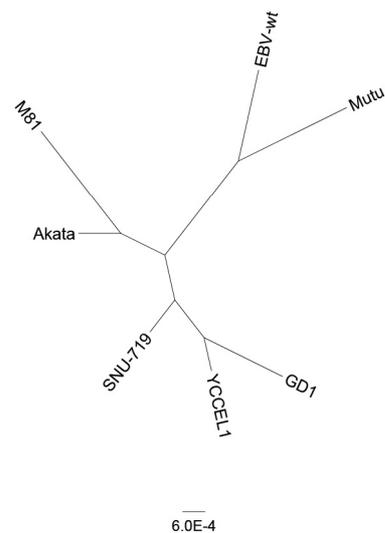


図 3  
全長 EB ウイルスゲノム塩基配列の比較による系統樹解析

### (4) 組換え EB ウイルス産生による機能解析

クローン化したウイルス DNA を安定導入した HEK293 細胞は感染性ウイルスを産生した。すなわち胃癌細胞株内では厳密な潜伏感染状態で維持されていたウイルスを、感染性ウイルスとして再構成することができた。

このウイルスを不死化ケラチノサイトに感染させて薬剤選択 (ハイグロマイシン選択) することで潜伏感染細胞を樹立した。対照として、ハイグロマイシン耐性のある不死化ケラチノサイト (EB ウイルス院生) も樹立した。EB ウイルス感染不死化ケラチノサイト、および対照ケラチノサイトにおいて変異型 RAS 蛋白質を誘導発現させたところ、EB ウイルス感染細胞においてのみ、RAS の誘導発現後の細胞死が阻止された。

本研究成果の意義は大きく二つ挙げられる。第一に、ゲノム編集技術を応用することで、様々な EB ウイルス陽性細胞からウイルスゲノムを BAC クローン化する技術を確立したことである。これにより、胃癌のみならず、上咽頭がん、NK/T リンパ腫など様々な疾患由来の細胞株からウイルスゲノム全長を迅速かつ確実にクローン化することができるようになった。こうしたウイルス株を解析することで発がんや細胞腫瘍化の過程に関与したと考えられるウイルス株そのものを単離・再構成できる。このことは今後の EB ウイルス関連各種疾患の病態解明において、きわめて重要な技術的進歩である。

第二の意義として、EB ウイルス感染によって起こる上皮細胞の形質変化について、不死化ケラチノサイトを使った実験により明確に示した点がある。この実験結果は、EB ウイルス感染が上皮細胞がん化の初期過程に起こることで、がん遺伝子活性化によって引き起こされる細胞死に対する抵抗性を付与する可能性を示す。

EBウイルスによる上皮細胞がん化過程の解析は、試験管内での再現が困難なこと、マウスモデルが存在しないことなどから解析が遅れており、未だ不明な点が多い。本研究で用いた不死化ケラチノサイトへの感染系ではウイルスマイクロRNA発現レベルが低いことを観察しており、この点はEBウイルス陽性胃がん組織における高レベルの発現との間に乖離がある。今後より優れた上皮細胞感染系を樹立することが必須である。

本研究で取得した胃がん由来EBウイルス株が、Bリンパ球に無症候性に感染しているEBウイルス株とどのような違いがあるのかについては今後の検討課題として残された。本研究の「高発がん性EBウイルス株は存在するか？」という命題に対しては、研究期間内に明確な回答を得ることはかなわなかった。一方で、ゲノム編集技術によるEBウイルスゲノムクローン化法の確立は、EBウイルス臨床株の系統的な解析を可能にしたという点で大きな意義がある。今後、こうした技術を用いて無症候感染EBウイルス株と疾患由来株をさらに多数取得する予定である。そのために、臨床由来EBウイルス感染細胞の樹立法、およびクローン化したEBウイルスゲノムの塩基配列決定の効率化を試みる。EBウイルス臨床株の解析を積み重ねることで、「特殊なウイルス株が疾患を起こすか」という問いをさらに追究していく予定である。

#### 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 2件)

- ① Kanda T, Furuse Y, Oshitani H, Kiyono T. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated cloning and functional characterization of gastric cancer-derived Epstein-Barr virus strains. *J Virol.* 90(9): 4383-4393, 2016.  
査読有.  
DOI: 10.1128/JVI.00060-16
- ② Kanda T, Miyata M, Kano M, Kondo S, Yoshizaki T, Iizasa H.: Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. *J Virol.* 89(5):2684-2697, 2015.  
査読有.  
DOI: 10.1128/JVI.03189-14.

[学会発表] (計 4件)

- ① 神田輝. ゲノム編集技術による胃がん由来EBウイルス株の単離と解析: 第30回へ

ルペスウイルス研究会、セミナーハウス  
クロス・ウェーブ府中(東京都・府中市)、  
2016年6月18日

- ② 神田輝、古瀬祐気、押谷仁、清野透.  
Development of highly efficient and widely applicable CRISPR/Cas9-mediated cloning method of EBV genomes and its application to EBV-positive gastric cancer cell lines. 17<sup>th</sup> International Symposium on Epstein-Barr virus and associated diseases、チューリッヒ (スイス)、2016年8月8日
- ③ 神田輝. Cloning of gastric cancer-derived Epstein-Barr virus genomes by means of genome editing technology: 第75回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2016年10月7日
- ④ 神田輝、古瀬祐気、押谷仁、清野透.  
CRISPR/Cas9-mediated cloning of entire EBV genome DNAs derived from latently-infected cells: 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)、2016年10月24日

[図書] (計 1件)

- ① Kanda T. In: Mori Y, Kawaguchi Y, and Kimura H, editors. Human herpesvirus. Springer (in press)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 巨大環状ウイルスゲノムDNAの単離方法  
発明者: 神田輝  
権利者: 愛知県  
種類: 特願  
番号: 2016-017387  
出願年月日: 平成28年2月1日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等  
<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/medicine/about/microbiology/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 輝 (KANDA, Teru)  
東北医科薬科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50333472