

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07669

研究課題名(和文) 宮古島のHHV8にみられる遺伝子変異の意義

研究課題名(英文) Effects of mutations in HHV8 isolated from Miyakojima island, Okinawa, Japan

研究代表者

大野 真治 (Ohno, Shinji)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50419529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス(HHV)8は古典型カポジ肉腫の発生原因である。沖縄県の宮古島は古典型カポジ肉腫の高発生地域であり、HHV8の遺伝子に特有の変異がある。本研究ではORF72、ORF42について、宮古島型の遺伝子変異が細胞を腫瘍化する能力をもつかについて検討した。ORF72、ORF42をそれぞれ発現する培養細胞の増殖性について検討したところ、単独遺伝子の発現では、細胞腫瘍化への大きな影響は見られなかった。また、宮古島型の遺伝子変異も腫瘍化に影響を及ぼさなかった。上記以外に、ORF42はORF55と結合すること、ORF42の欠損によりウイルス産生能が低下することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス発がんのメカニズムを解明するうえで、ウイルス遺伝子の機能の解明は重要である。特定の地域で好発する腫瘍の場合には、住民の遺伝学的背景、その地域に分布するウイルスの特性が関連すると考えられる。現在のところ、本研究からはウイルス側の要因で腫瘍がおこりやすいという直接的な証拠は得られていない。解析が進んでいない遺伝子も残されており、最終的な結論を導き出すためにはこれらについての検討を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Human herpes virus (HHV) 8 is responsible for the development of classical Kaposi's sarcoma (KS) development. Miyakojima island (Okinawa, Japan) exhibits high incidence rate of KS and is prevalent with HHV8 which has unique amino acid residue substitutions. In this study, we evaluated the influences of the substitutions in ORF72 or ORF42 upon tumorigenicity.

We evaluated the cell growth of ORF72 or ORF42 expressing cells. Unfortunately, the genes did not stimulate cell proliferation of the cells we used. Further, the substitutions seen in Miyakojima HHV8 did not affect the cell growth.

As for ORF42, we found that this protein binds to ORF55, and HHV8 which lacks ORF42 reduces virus particle production as compared to original HHV8.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトヘルペスウイルス8 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス (HHV) 8 はカポジ肉腫、悪性リンパ腫などの発生に関連するがんウイルスである。HHV8 がもつ遺伝子のうちいくつかは腫瘍化に関連することが知られている。これらの遺伝子は、すべての感染者で発現するが、カポジ肉腫を発症するのはごく一部に限られる。多くの場合は、ヒト免疫不全ウイルス感染などの免疫不全状態をきっかけに発症する。しかし、地中海沿岸のサルディーニャ島やギリシャなど一部の地域では、免疫不全状態でない住民に古典型カポジ肉腫が多発する。その多くは 50 歳以上の男性である。また、中国の新疆ウイグル自治区での疫学調査では、HHV8 の感染率は同程度であっても、古典型カポジ肉腫の発症はウイグル民族系の住民に多く、漢民族系には少ないことが報告されている。

日本では古典型カポジ肉腫の発症は稀であるが、沖縄県の宮古島地方では多く発症しており、患者発生率はサルディーニャ島と同程度であるとされている。疫学研究では、宮古島での古典型カポジ肉腫の発生率は本土日本と比べて約 100 倍高いことが報告されている。宮古島住人の遺伝学的背景からは、宮古島住人に特有の遺伝子異常は見られなかった。

その一方で、宮古島の古典型カポジ肉腫から得られたウイルスゲノムから、宮古島のウイルスに特徴的な、アミノ酸変化を伴う変異が 17 か所、8 遺伝子にみられることも報告されている。中でも、vIRF2 や K1 遺伝子には複数の変異が集積していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、宮古島に分布している HHV8 が特有のアミノ酸置換を伴う変異を有していることに注目した。これらのアミノ酸置換を持つウイルス遺伝子産物が細胞のがん化に關与するかどうかを明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

【発現プラスミド】HHV8 の持続感染細胞からウイルスゲノムを抽出し、PCR 法を用いて目的遺伝子を増幅して真核細胞用発現プラスミドに組込んだ。タンパク質の検出を行いやすくするために、C 末端側に FLAG (DYKDDDDK) タグを付加した。配列に異常がないことをサンガーシーケンシング法で確認した。宮古島型の遺伝子変異は PCR を用いて導入した。

【細胞】HEK293T 細胞、HeLa 細胞、NIH3T3 細胞、Vero 細胞、BHK21 細胞は 10%ウシ胎児血清添加ダルベッコ改変イーグル培地で培養した。

【細胞におけるタンパク質の検出】ポリエチレンジオキシンを用いて培養細胞に発現プラスミドを導入し、ウエスタンブロット法および免疫染色法でタンパク質の発現を確認した。

【細胞増殖性の評価】培養細胞に発現プラスミドを導入し、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 対象遺伝子の絞り込み

HHV8 持続感染細胞から得られた DNA、RNA を用いて宮古島の HHV8 に変異がみられる 8 種類の遺伝子をプラスミドにクローニングし、各遺伝子の下流に FLAG タグ配列を付加した。HEK293T 細胞にプラスミドを導入し、ウエスタンブロット法でタンパク質の発現を確認した。発現が確認できた ORF26、ORF42、ORF70、ORF72 のうち、ORF42 と ORF72 を研究対象に絞り込んだ。

### (2) ORF72 について

作成したプラスミド (WT) を元にして宮古島型の変異 (MYK) を導入した (226 Ser Gly)。作成したプラスミドを HeLa 細胞に導入し免疫染色を行ったところ、WT でも MYK でも細胞内の同様の場所に分布した (図 1)。

次に、ORF72 が培養細胞を腫瘍化するかについて評価した。NIH3T3 細胞を用いて、持続的に ORF72 を発現する細胞の作出を試みた。何度か試みたものの、持続発現細胞は取得できなかった。次の試みとして、NIH3T3 細胞に一過性 ORF72 を発現させ、増殖性について評価した。タンパク質を発現しないプラスミドを導入した細胞と比較すると、WT を導入した細胞では増殖性が低下していた。また、MYK を導入した細胞の増殖性はプラスミドのみの細胞と同等であった。したがって、いずれの ORF72 も NIH3T3 細胞の増殖性を高めることはなかった (図 2)。

NIH3T3 細胞はマウスの細胞であるために、異なる動物種に由来する、BHK21 (ハムスター)、Vero (アフリカミドリ

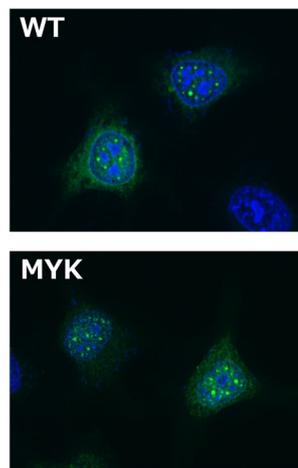


図 1. ORF72 の細胞内局在 (緑：ORF72、青：核)

ザル)、HeLa(ヒト)の各細胞株を用いて同様の検討を行ったが、いずれの細胞でも細胞増殖が高まることはなかった(データ未掲載)。また、ORF72のWTによる増殖抑制作用はNIH3T3細胞に限られており、細胞種により作用が変化することが示唆された。

### (3) ORF42 について

作成したプラスミド(WT)を元にして宮古島型の変異(MYK)を導入した(136 Arg → Gln)。作成したプラスミドをHeLa細胞に導入し免疫染色を行ったところ、WTでもMYKでも細胞内の同様の場所に分布した(データ未掲載)。類似ウイルスの報告から、ORF55タンパク質との結合が示唆されたため、両タンパク質を同時に発現させたところ、細胞内の同じ場所に2つのタンパク質が局在した。また、ORF42の局在場所が核内から細胞質内へと変化した。

免疫沈降法により両タンパク質の結合を評価した。ORF42と同時に存在する場合には、ORF55の発現量が多くなっていた。この現象が起こるメカニズムについては現在解析を進めている。免疫沈降法により、ORF55とORF42WT及びORF42MYKの結合を確認した。

### (4) 組換えウイルスを用いた解析

遺伝子組換えウイルス作成技術を用いて、ORF42を欠損するウイルス、宮古型ORF42を持つウイルスを作成し、ウイルスの産生性について正常型ORF42を持つものと比較した。正常型に比べて、ORF42の欠損ではウイルス産生量が1/30程度に、宮古型ORF42をもつウイルスでは1/6程度に減少していた。このことから、ORF42はウイルス粒子の産生効率に影響を及ぼしていると推察される。

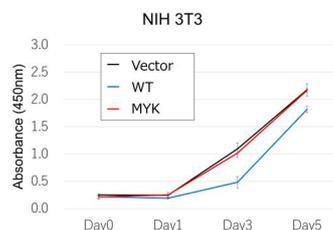


図 2. ORF72 の細胞増殖への影響

(黒線をこえると細胞増殖が高まっていることを示す)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueo Ayako, Kubota Marie, Shirogane Yuta, Ohno Shinji, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke	4. 巻 94
2. 論文標題 Lysosome-Associated Membrane Proteins Support the Furin-Mediated Processing of the Mumps Virus Fusion Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00050-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00050-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guenther Thomas, Froehlich Jacqueline, Herrde Christina, Ohno Shinji, Burkhardt Lia, Adler Heiko, Grundhoff Adam	4. 巻 15
2. 論文標題 A comparative epigenome analysis of gammaherpesviruses suggests cis-acting sequence features as critical mediators of rapid polycomb recruitment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1007838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Midori Taniguchi, Yusuke Yanagi, Shinji Ohno	4. 巻 164
2. 論文標題 Both type I and type III interferons are required to restrict measles virus growth in lung epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 439-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-018-4087-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗山 和志, 渡部 匡史, 大野 真治
2. 発表標題 沖縄県宮古島地方のKSHVがコードするORF42の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗山 和志, 渡部 匡史, 大野 真治
2. 発表標題 沖縄県宮古島地方のKSHVがコードするORF72の機能解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------