

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15525

研究課題名(和文) ハプロイド細胞を用いたEBウイルス潜伏・不死化機構の探索

研究課題名(英文) Research for the mechanism of latency and immortalization of Epstein-Barr virus using haploid cells

研究代表者

木村 宏 (Kimura, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30303621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr virus (EBV)は、多彩な難治性感染症・腫瘍性疾患と関連している。ヒト由来ハプロイド細胞であるHAP-1細胞は、ゲノムを1セットしか有しないため、機能喪失型の遺伝子スクリーニングに適している。本研究では、EBVの潜伏感染維持・不死化/腫瘍化に関与する宿主遺伝子を同定することを目的とし、EBVを感染させたHAP-1細胞と次世代シーケンス技術を組み合わせ、網羅的な遺伝子スクリーニングを試みた。組換えEBVをHAP-1細胞に感染させたHAP-1/EBV細胞の樹立には成功したが、安定した維持ができず、宿主遺伝子を同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is associated with a variety of intractable infections and malignancies. HAP-1 cells, which have only one genome set, is suitable for genome screening. In this study, we tried screening of host genes to be associated with latency or immortalization of EBV using HAP-1 cells and next generation sequencing. We successfully generated HAP-1/EBV cells, but could not identify any host genes because of the lack in the maintenance of EBV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBV HAP-1 溶解感染

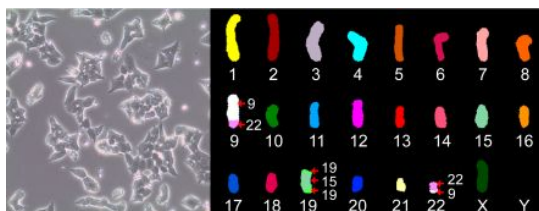
1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr (EB)ウイルスは唾液を介して咽頭に侵入し、伝染性単核症の原因となる。初感染後、EBウイルスはB細胞に潜伏・不死化し、細胞性免疫抑制下で、移植後リンパ増殖症を始めとした免疫不全関連リンパ増殖性疾患を引き起こす。本ウイルスは、さらにバーキットリンパ腫などのB細胞リンパ腫とも密接に関連している。一方、EBウイルスはB細胞のみならずT細胞・NK細胞にも感染・潜伏し、慢性活動性EBウイルス感染症、EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症、種痘様水疱症、蚊刺過敏症など、多彩なT/NK細胞性リンパ増殖性疾患の原因にもなる。これらT/NK細胞性リンパ増殖性疾患は本邦を初めとした東アジアの小児・若年成人に多く発症する (Kimura H, Blood 2012)。

(2) Burkittリンパ腫を始めとしたB細胞性疾患に関しては、容易にEBウイルス感染細胞株が得られることもあり、潜伏感染機構やc-myc転座/活性化などの不死化に関する分子基盤の詳細が明らかとされてきた。また、治療面でも、B細胞の多くが発現しているCD20分子をターゲットとする分子標的治療が奏功している。他方、慢性活動性EBウイルス感染症を始めとしたT/NK細胞性リンパ増殖性疾患では、その発症病理に不明の点も多い上、適当な分子標的がないため治療法が未確立であり、未だ予後不良であるのが現状である。以上を背景に、EBウイルス関連疾患の発症病理機構を解明し、新規治療標的を探索するために、難治性EBウイルス疾患発症に関与する宿主遺伝子のスクリーニングシステムの開発が急務と考えた。

2. 研究の目的

(1) ヒト白血病細胞由来の1倍体細胞 (ハプロイド細胞) である HAP-1 細胞は、下図のごとく染色体が1本であるため、変異導入・責任遺伝子の決定が容易である。この細胞を用いエボラウイルスの侵入機構 (Carette JE, Nature 2011) や細菌毒素の宿主受容体 (Schorch B, PNAS 2014) が見出されている。本研究では、まずEBウイルスゲノムを細胞内に有する HAP-1 細胞を樹立し、この細胞を用い、EBウイルスの潜伏感染・不死化に関与する宿主遺伝子をスクリーニング・同定する。

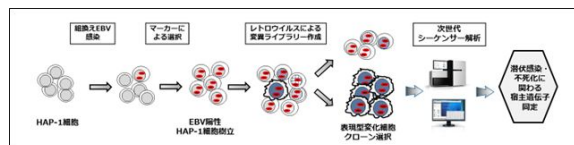


(2) 本システムにより、これまでヒトを含む哺乳類細胞では困難であった順遺伝学 (forward genetics) による責任遺伝子同定が可能となる。すなわち、ハプロイド細胞ゆえに変異の導入と後の解析が容易なため、導入により得られた表現型変化を目印に、その細胞クローンの遺伝子変異を読み解くことができる。これまで順遺伝学的解析は、酵母やショウジョウバエなど限られた生物種のみで行われてきた。一方、哺乳類細胞では、特定の遺伝子に変異を導入し、その形質を見る逆遺伝学 (reverse genetics) の手法が用いられてきた。しかし、逆遺伝学では、あらかじめ想定した遺伝子のみしか解析できず、スクリーニングには限界がある。

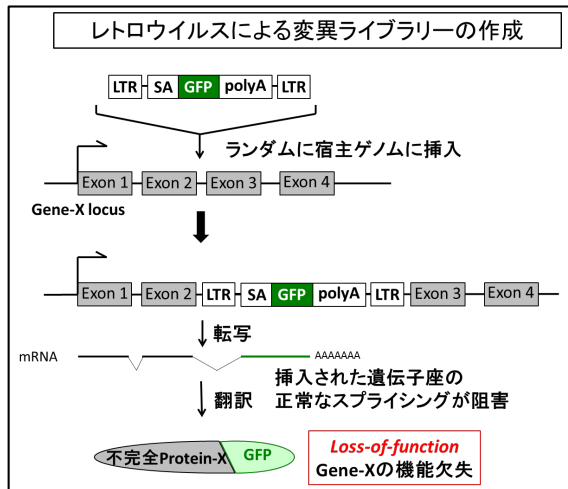
(3) ハプロイド細胞と次世代シーケンス技術を組み合わせることにより、哺乳類細胞にても網羅的な遺伝子スクリーニングが可能となる。また、自然界では得られない変異も、ハプロイド細胞では導入できることも、本システムの利点の一つである。すなわち、想定しなかった疾患関連宿主遺伝子が抽出されたり、予想もしなかった治療標的がスクリーニングされたりする可能性がある。

3. 研究の方法

(1) ハプロイド細胞である HAP-1 細胞に、組換え EB ウイルスを感染させ、EB ウイルス陽性 HAP-1 細胞を樹立する。次に、レトロウイルス感染により、各細胞に変異を一つだけ持った細胞集団 (変異ライブラリー) を取得する。潜伏感染できなくなった変異体、細胞不死化能/増殖能の落ちた変異体、溶解感染誘導できなくなった変異体を選別し、次世代シーケンサーを用いターゲットシーケンスをすることで、それぞれの表現型変化に関わる責任遺伝子を網羅的に同定する。



(2) HAP-1/EBV 細胞変異ライブラリーの作成は以下のごとく行った。HAP-1/EBV 細胞に、プロモーターの代わりに splicing acceptor (SA) 配列を GFP の上流に組み込んだレトロウイルスを感染させる (オランダ癌研究所 Brummelkamp 博士より供与)。感染したレトロウイルスはランダムにゲノムに挿入され、挿入された部位にある遺伝子の機能を破壊する。HAP-1 細胞あたり感染価 1 未満のレトロウイルスを感染させることで、各細胞に変異を一つだけ持った細胞集団 (変異体ライブラリー) を取得できる。(次ページ参照)



(3) 上記スクリーニングで同定された宿主責任遺伝子候補の機能と役割を、分子生物学的および細胞生物学的手法により明らかにし、EB ウイルス感染との関わりを詳細に解析する。

(4) 研究代表者の木村は、全体の総括と組換えウイルス作成および宿主遺伝子マッピング/遺伝子機能解析を担当した。研究分担者の佐藤は、スクリーニング/次世代シーケンサーによる宿主責任遺伝子同定を担当した。次世代シーケンサーのデータ解析には、バイオインフォマティクスに通じた研究者の参加が必須であるため、名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター 奥野友介博士を研究協力者に加えた。奥野は次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析に関する豊富な実績を有する (Yoshizato T, Okuno Y, N Engl J Med 2015)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 平成 28 年度

初年度、まず EBV 陽性細胞をモニターできるように、大腸菌内での組換え技術を応用し赤色蛍光タンパク質とハイグロマイシン耐性遺伝子を EBV ゲノムに組み込んだ組換え EBV を作成した。この組換え EBV を HAP-1 細胞に導入した HAP-1/EBV 細胞を 30 クローン樹立した。これらの細胞株からウイルス粒子を産生させるために BZLF1 遺伝子を強制発現し、溶解感染誘導を行ったが、いずれの細胞株も誘導がかからなかった。

EB ウイルス潜伏感染細胞は、溶解感染を誘導することにより細胞死に至らしめることが可能である。溶解感染を誘導できなくなったクローンを得ることで、溶解感染に関与する宿主遺伝子を同定でき、これを標的とし、溶解感染/細胞死を誘導する新規治療法を確立できると考えていた。しかし、予想に反して、EBV 感染 HAP-1 細胞に溶解感染誘導が起こらず、ウイルス粒子産生が行ななかったため、Gene-trap 用のレトロウイルス感染の

ステップに進めなかった。

並行して、以下の実験も実施した。HAP-1 細胞に Gene-trap 用のレトロウイルスを感染させ、変異体ライブラリーを作成し、さらに Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) を感染させた。その結果、細胞傷害効果を示さない HAP-1 細胞変異体の単離に成功した。次いで、次世代シーケンサーにより宿主遺伝子のスクリーニングに着手し、いくつかの候補遺伝子を同定した。以上より、HAP-1 細胞によるスクリーニングシステムが動作することは確認された。

##### (2) 平成 29 年度

前年度はウイルスの直接感染を試みたが、HAP-1 細胞への EBV 感染は効率が極めて低かったため、ウイルス粒子ではなく、EBV 遺伝子の全長を細胞内へ導入することで、HAP-1/EBV 細胞を樹立した。

ウイルス粒子の代わりに EBV DNA 全長を含む bacterial artificial chromosome を electroporation により細胞導入を試みたが、細胞内で EBV を適切に維持するのが難しく、細胞クローンをどれだけ拾っても、溶解感染が誘導できなかった。

EBV の自然宿主は B 細胞である。他方で、EBV は上皮細胞にも感染されるとされるが、EBV を細胞内に維持した上皮細胞株はごく限られている。このことから、EBV を安定して細胞内に維持するには「特殊なフェノタイプ (まだ解明されていない)」が必要と推測された。

また、前年度、HSV-1 でうまくいっていると思われたレトロウイルス感染による変異体ライブラリーについても、その再現性について疑問が得られるような結果が相次いだ。HAP-1 細胞は、CML 由来の浮遊細胞 KBM-7 に山中 4 因子をレトロウイルスで導入し、接着して増殖可能な細胞として樹立された。本研究でライブラリー作成のために使用したレトロウイルスの配列と、HAP-1 細胞樹立時に使用されたレトロウイルスの配列には一部類似性があり、この類似性 (相同性) のため、次世代シーケンサーによるレトロウイルス挿入部位の決定のステップが効率よくワークしなかったと考えられた。

今後、レトロウイルスベクターを変更するなど、変異体ライブラリー作成方法を変えて、再度、スクリーニングを行う予定である。

#### 引用文献

Kimura H, et al. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 2012; 119(3): 673-86.

Carette JE, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 2011; 477(7364):

340-3.

Schorch B, et al. LRP1 is a receptor for Clostridium perfringens TpeL toxin indicating a two-receptor model of clostridial glycosylating toxins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(17): 6431-6.

Yoshizato T, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. N Engl J Med. 2015; 373(1):35-4

#### 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 3件)

木村 宏, 慢性活動性 EB ウイルス感染症：現状と課題. 日本小児科学会雑誌 122(3): 561-570, 2018 査読無し

Kimura H, Cohen JI. Chronic Active Epstein-Barr Virus Disease. Front Immunol 8:1867, 2017 doi: 10.3389/fimmu.2017.01867 査読有り

木村 宏, 慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態と治療の最新知見. 小児内科 49:1686-9, 2017 査読無し

〔学会発表〕(計 2件)

佐藤好隆、奥野友介、吉田全宏、五島典、村田貴之、木村宏, HSV 病原性発現機構に関わる宿主因子の網羅的探索. 第 31 回ヘルペスウイルス研究会、松江、2017 年 6 月 17 日

Sato Y, Nakagiri K, Murata T, Goshima F, Kimura H. Screen for small compounds that inhibit EBV late gene expression. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 25 日

〔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 無し

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30303621

##### (2)研究分担者

佐藤 好隆 (SATO, Yoshitaka)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40754940

##### (3)連携研究者

無し

##### (4)研究協力者

奥野 友介 (OKUNO, Yusuke)  
名古屋大学・医学部附属病院・特任講師