

令和元年6月25日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15281

研究課題名(和文)常在ウイルスは発癌率を上げるか？

研究課題名(英文)Human polyomaviruses facilitate tumorigenesis

研究代表者

村松 正道 (Muramatsu, Masamichi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

研究者番号：20359813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポリオーマウイルスは、健常人でも検出する常在ウイルスだが、ほとんどの場合、発がんとは無縁である。最近、発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルスは、稀にメルケル細胞に発がんを起こすことが知られている。発がん機序にウイルスゲノムDNAが宿主ゲノムに挿入されることが提唱された。本研究では、ゲノム挿入を観察できる細胞系を構築し、その分子メカニズムに迫ることを目指した。薬剤耐性遺伝子を持つメルケル細胞ポリオーマウイルスを作成した。それを培養細胞に感染させ、薬剤選別を行うとウイルス複製を維持する細胞が樹立できた。また、それらの細胞では、ゲノム挿入を観察でき、ゲノム挿入観察の基盤が構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリオーマウイルスやパピローマウイルスの宿主ゲノムへのゲノム挿入現象は、発がんの中心的機構であると理解されていたが、それを培養細胞で観察する実験系がないため、研究が滞っていた。本研究では、薬剤耐性遺伝子を持つポリオーマウイルスを作成し、薬剤選別を行うことで、培養細胞でゲノム挿入現象を観察できる系を構築した。構築された細胞系を使うことで、今後ゲノム挿入を規定するウイルス側因子や宿主側因子を同定できる可能性が開け、それらを丹念に決定して行くことで、どのような時にゲノム挿入が起こるか、どのようにそれを防ぐのかといった発がんの予知や予防法の開発研究の可能性が開けた。

研究成果の概要(英文)：Recently, Merkel polyomavirus (MCV) has been reported to cause Merkel cell carcinoma. Viral DNA integration is one of the prominent molecular characteristics of MCV-derived tumorigenesis. Therefore, elucidation of the mechanism of viral DNA integration is very important to understand Merkel cell carcinoma. However, the lack of cellular model of viral DNA integration hampers the study of viral DNA integration. To develop a new cellular model of MCV viral DNA integration, we made a recombinant MCV virus that retains a drug-resistant gene. When we infected cells with the recombinant virus and cultivated the infectants in the presence of puromycin, drug-resistant infectants were obtained. Importantly, these infectants retained not only episomal viral DNA but also integrated DNA, which was detected by Southern blot hybridization. This recombinant MCV infection system may be useful for the study of MCV viral DNA integration.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトポリオーマウイルス viral DNA integration ウイルス発がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

パピローマウイルス 16 型(HPV16)は、子宮頸癌で有名な小型環状 2 本鎖 DNA をゲノムに持つウイルスであるが、このウイルスはガンを形成する際、ウイルス DNA が感染宿主細胞のゲノムに挿入(以下ゲノム挿入とする)されることが知られている。このゲノム挿入により、ウイルス癌遺伝子(E6/E7)が感染細胞に恒常的に発現するので、ゲノム挿入が発がんプロセスを進めるのに重要であると考えられる。E6/E7 の分子標的はよく研究されているが、一方、恒常的発現の物理的基盤であるゲノム挿入の分子機構はほとんどわかっていない(zur Hausen 2002 Nat. Review)。その原因の一つにゲノム挿入現象を *in vitro* で効率よく再現できる実験系がないことがある。

一方、近縁の小型環状 DNA ウイルスにヒトポリオーマウイルス(HPyV)があり、近年続々と新種のポリオーマウイルスが発見されている。HPyV は健康人でも常在的に検出される常在ウイルスで、重度免疫不全時に腎炎を起こす BK ウイルス(BKV)や脳症をおこす JC ウイルス(JCV)が知られている。2008 年に新種の HPyV であるメルケル細胞癌ウイルス(MCV あるいは Human Polyomavirus 5)がゲノム挿入を介してウイルスのがん遺伝子である腫瘍(T)抗原を恒常的に発現し、メルケル細胞癌を起こすことが示された(Feng 等 Science 2008)。メルケル細胞癌が、日本では報告数は少ないが、予後不良の皮膚癌である。この発見を契機に MCV 以外の HPyV でも発癌との関連性が議論されてはいるが、MCV の起こすメルケル細胞癌以外は未だに議論に決着をみていない。HPV や HPyV が発がんを誘発する際、ウイルス DNA のゲノム挿入が起こるが、これがどのような分子機構で起こるかについての研究は少なく、そもそもウイルスゲノム挿入を見るための細胞系や検出系が整備されていない。ゲノム挿入は、ゲノムサイズの小さい DNA 型腫瘍ウイルス(HPV, HPyV, B 型肝炎ウイルス)のウイルス発がんの共通の特徴であり、ゲノム挿入の分子機構を見るための細胞系や検出方法の確立が、これらのウイルスの発がん機構を考える上で必要となってくる。

## 2. 研究の目的

ヒトポリオーマウイルスのゲノム挿入現象を観察するための培養細胞系の確立し、それを用いて、ゲノム挿入現象の効率的な評価方法を開発する。またゲノム挿入現象のどのような分子機構で起こるかについて解明を目指す。

## 3. 研究の方法

ヒトポリオーマウイルスのうち、ゲノム挿入現象が、発がんというコンテキストで最も認知されているのは、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV, Human polyomavirus 5)である。そこで MCV ウイルスを、ゲノム挿入研究の対象ウイルスとして選択し、まずは培養細胞系を構築する。ついで、ウイルスゲノム挿入を、細胞のクローニング、サザンブロット、ゲノム挿入部位の配列決定、を行う。また、ゲノム挿入の NGS 解析が可能か検討する。またセットアップされた MCV 培養系を用いて、どのような宿主因子がゲノム挿入に影響を与えるか検討する。

## 4. 研究成果

ウイルス完全長ゲノム DNA を持つプラスミドより、ウイルス完全長ゲノム DNA を切り出し、試験管内で環状ウイルスゲノム DNA を作成した。これを MCV のキャップシド発現プラスミド(VP1, 2, 3)とともに、細胞にトランスフェクションした。用いた細胞はウイルスの複製と転写に必須の MCV ウイルス遺伝子 small T 抗原と large T 抗原を構成的に発現する 293-4T

細胞（アメリカ C. Buck 博士より供与）を用いた。その後 7 日間培養し、ウイルス粒子を産生および蓄積させた。7 日目に細胞を回収し、高塩濃度の抽出液でウイルス粒子を抽出し、生化学的にウイルス画分を精製した。このウイルスを 293-4T 細胞に感染させた。感染が成立し、ウイルス複製がおこなわれているかを検討するため、細胞の total DNA を精製した。ウイルス DNA 量は、DpnI 処理後の DNA サンプルをウイルス配列に対する qPCR で定量した。ウイルスコピー数は、感染直後が一番多く、その後時間とともに減衰し、2 週間目には、感染直後と比較して 2 ログ以上低下した。残念ながらウイルスの複製は、細胞の増殖とともに起こる希釈のスピードを大きく下回っていると想定された。

ウイルス複製の明らかな証拠がないこのような状況では、ウイルス複製やゲノム挿入を観察するのは、困難であると判断し、ウイルス作成の方法および感染させる際のウイルス量の最適化を行なった。様々な条件を検討した結果、ウイルス産生細胞には、キャップシドタンパク以外に small T antigen および large T antigen の発現ベクターを追加した方が、より高濃度のウイルス調整液が得られることがわかった。また感染時に使うウイルスチャレンジ量も多い方が、ウイルス複製を観察しやすいことがわかった。この最適化した条件で、感染後 1 週間と 2 週間後の感染細胞のウイルスゲノム挿入をサザンプロットで捉えられるかを検討した。残念ながら、ウイルスエピゾーム DNA は、弱いながらも検出できたが、ゲノム挿入と考えられるシグナルは、検出できなかった。また NGS を用いて挿入の起こったウイルス-宿主 DNA 接合点を観察しようとしたが、接合点は得られたリードにはなかった。このことは、ゲノム挿入の頻度が低い可能性や、ゲノム挿入を起こした細胞の多くが、その後、培養細胞集団から排除された可能性を示唆した。ゲノム挿入を効率よく評価するための細胞系には、ゲノム挿入イベントが起こっている細胞が、ゲノム挿入部位を保持して複製する必要があり、ゲノム挿入部位をもつ細胞が脱落しないための仕組みが必要と考えた。

そこで、ウイルスをチャレンジしたとき、細胞の大部分は、ウイルスを replication していないことがわかっていたので、まずは、ウイルスゲノムを持たない細胞を選択的に除去するための仕組みを取り入れた。ウイルスゲノムに薬剤耐性遺伝子を挿入し、その際、ウイルス遺伝子が壊れるので、その遺伝子を宿主側にトランスコンプリメンテーションし、壊れたウイルス遺伝子が補填されるようにした。薬剤耐性遺伝子をもつ組換えウイルスを作成し、トランスコンプリメンテーションした細胞に感染させ、薬剤選別を行うと、組み換えウイルスをもつ細胞が選別された。サザンプロット法で見たところ、ウイルスゲノム挿入と想定されるシグナルを多数観察した。またゲノム挿入部位も何箇所か配列を決定できた。したがって薬剤耐性遺伝子をもつ組換えウイルスの系を用いることにより、ゲノム挿入が観察できる系が構築されたと考えられた。この系を用いて、さらにゲノム挿入とガンゲノムの関連の検討やゲノム挿入の分子機構の解明が期待された。

## 5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wakae Koucho, Nishiyama Tomoaki, Kondo Satoru, Izuka Takashi, Que Lusheng, Chen Cong, Kase Kina, Kitamura Kouichi, Mohiuddin Md, Wang Zhe, Ahasan Md Monjurul, Nakamura Mitsuhiko, Fujiwara Hiroshi, Yoshizaki Tomokazu, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Nakahara Tomomi, Kiyono Tooru, Muramatsu Masamichi

Keratinocyte differentiation induces APOBEC3A, 3B, and mitochondrial DNA hypermutation

〔学会発表〕(計1件)

第70回 北日本小児科学会(招待講演) 2018年 村松正道 『ロタ、ポリオ、B型肝炎ウイルスワクチンの現状とトピックス』

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等 <http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：若江 亨祥、Que Lusheng、李莹芳、喜多村晃一、田島敦  
ローマ字氏名：Wakae Koucho Que Lusheng Li YingFang Kitamura Koichi