

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10057

研究課題名(和文)塩基配列データから探る日本人EBウイルス株の多様性

研究課題名(英文) Heterogeneity of Japanese Epstein-Barr virus strains explored by viral genome sequences

研究代表者

矢島 美彩子 (Yajima, Misako)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：60443131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルスは全世界の人々に感染している普遍的なウイルスである。その一方で、EBウイルスが関係する疾患の一部にはある特定の地域で高い発症率を示すものがあることが知られている。しかし、なぜこのような発症率の違いがみられるのか、その理由は不明である。

本研究では、日本人の扁桃組織に感染しているEBウイルス株の全長ゲノムウイルスの塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。日本を含む東アジアのEBウイルス株は、中国南部・東南アジア地域の株と異なるグループを形成したことから、アジア地域におけるEBウイルス株の地域分布とEBウイルス関連疾患の好発地域で一致する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBウイルスが関係する疾患の一部にはある特定の地域で高い発症率を示すものがあることが知られているが、なぜこのような発症率の違いがみられるのか、その理由は不明である。

本研究では、日本人の扁桃組織に潜伏感染しているEBウイルス株のゲノム塩基配列を調べ、比較解析を行った結果、日本のEBウイルス株には多様性があり、日本を含む東アジアのEBウイルス株が中国南部・東南アジア地域のEBウイルス株と異なる系統に属することを明らかにした。本研究は、アジアにおけるEBウイルス株の地域分布とEBウイルス関連疾患の好発地域が一致する可能性があることを示した初めての報告である。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) establishes lifelong latent infection in the majority of healthy individuals, while it is a causative agent for various diseases. Recent studies indicate that there are substantial levels of viral genome heterogeneity among different EBV strains. However, the extent of EBV strain variation among asymptotically infected individuals remains elusive. We cloned and sequenced EBV genomes derived from human tonsillar tissues, which are the reservoirs of asymptomatic EBV infection. Phylogenetic analyses revealed that Asian EBV strains could be divided into several distinct subgroups. EBV strains derived from nasopharyngeal carcinoma-endemic areas constitute different subgroups from a subgroup of EBV strains from non-endemic areas, including Japan. The results could be consistent with biased regional distribution of EBV-associated diseases depending on the different EBV strains colonizing different regions in Asian countries.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス ゲノム塩基配列決定 大腸菌人工染色体 ゲノム編集 多様性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

EB ウイルス (Epstein-Barr ウイルス) は成人の約 95% に感染している普遍的なウイルスである。その一方で、リンパ腫、上皮細胞がんなど、様々な腫瘍に関与する「ヒト腫瘍ウイルス」でもある。

EB ウイルスが関連する疾患には、「EB ウイルス陽性胃がん」のように地域特異性がみられない疾患がある一方で、中国南部・東南アジア地域に多い「上咽頭がん」や、日本・韓国などの東アジア地域に多くみられる「EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖症」のように特定の地域に偏在するものがあることが知られているが、その理由は不明である。

近年、世界各地で分離された EB ウイルス株のウイルスゲノム塩基配列が調べられており、アジア地域の EB ウイルス株がヨーロッパ・アメリカ・アフリカ地域の株とは異なる系統に属することが報告されている (Palser AL et al., J Virol. 2015)。欧米においては、EB ウイルスの塩基配列情報は、EB ウイルス関連疾患患者の検体から得られた疾患株に加え、EB ウイルス関連疾患ではない健常者などの唾液から得られた株においても調べられ解析されている。しかし、これまでまでに報告されたアジアの EB ウイルス株のゲノム塩基配列情報のほとんどは EB ウイルス関連疾患株であり、日本の EB ウイルス株で塩基配列が決定されているのは B リンパ腫由来の疾患株 1 例のみである。したがって、日本の EB ウイルス株の多様性や特徴を調べるためには、十分な数の日本の EB ウイルス株を集める必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では日本人検体から得られる EB ウイルス株のウイルスゲノム全長の塩基配列を決定し、日本人に無症候性に感染している EB ウイルス株の多様性を明らかにするとともに、日本の EB ウイルス株の参照ゲノム配列を決定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 扁桃組織由来 EB ウイルス感染細胞樹立

EB ウイルスとは関係のない疾患（慢性扁桃炎や睡眠時無呼吸症候群など）で扁桃摘出を行う日本人 EB ウイルス既感染者から、インフォームドコンセントを得たうえで摘出扁桃組織の供与を受けた。摘出扁桃組織を試験管内で培養することにより、自然樹立リンパ芽球様細胞株 (spontaneous lymphoblastoid cell line, sLCL) を得た。

(2) 全長 EB ウイルスゲノム DNA のクローニング

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた高効率 EB ウイルスゲノム DNA のクローニング法 (Kanda T et al., J Virol. 2016) を用い、sLCL から EB ウイルスゲノム DNA を BAC (Bacterial artificial chromosome) ベクターにクローニングした。

(3) 全長ウイルスゲノム DNA 塩基配列の決定

BAC クローニングした扁桃由来 EB ウイルス株のウイルスゲノム DNA を大腸菌から精製し、第 3 世代ロングリードシーケンサーを用いて全長ウイルスゲノム塩基配列を決定した（一部、国立遺伝学研究所・比較ゲノム解析研究室との共同研究）。

(4) 分子系統解析

配列を決定した扁桃由来 EB ウイルス株とデータベースから取得した世界 EB ウイルス株の全長ウイルスゲノム塩基配列を用いて分子系統解析を行った。Rapid multiple sequence alignment based on the fast Fourier transform method (MAFFT) を用いた全長ウイルスゲノム塩基配列のアライメント後、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) X を用い

て系統樹を作成した。

(5) 組換え EB ウイルスの再構成

クローン化したウイルスゲノム DNA を精製し、HEK293 細胞にトランスフェクションして安定導入細胞株を樹立した。安定導入細胞株にウイルス産生を誘導し、得られた再構成ウイルスをヒト B 細胞に感染させた。

4. 研究成果

(1) 扁桃組織由来 EB ウイルス感染細胞樹立

摘出扁桃組織を試験管内で培養し、扁桃組織に潜伏感染している EB ウイルス株により不死化されたリンパ芽球様細胞株 (sLCL) 11 株を得た。ウエスタンブロット法により sLCL におけるウイルスタンパク質の発現を調べたところ、潜伏感染時に発現するウイルスタンパク質のサイズに不均一性がみられることが明らかとなった (図 1)。

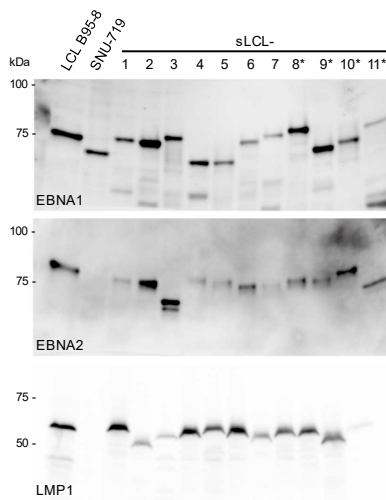


図 1 扁桃組織由来リンパ芽球様細胞株における潜伏感染ウイルスタンパク質

(2) 全長 EB ウイルスゲノム DNA のクローン化

sLCL に対して、ウイルス環状ゲノムを一ヶ所切断するゲノム編集プラスミド、および BAC ベクターを挿入するためのドナープラスミドを同時に導入し、EB ウイルスゲノムのクローン化を試みた。sLCL 11 株のうち 7 株 (sLCL 1 - 7) において全長ウイルスゲノム DNA のクローン化に成功した (図 2)。

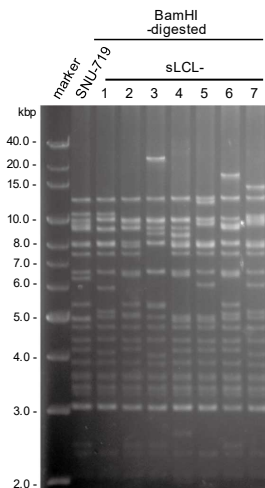


図 2 単離した 7 株の BAC クローン DNA の制限酵素切断解析結果

(3) 全長ウイルスゲノム DNA 塩基配列の決定

上記で取得した 7 株の BAC クローン DNA を大腸菌から精製し、第 3 世代ロングリードシーケンサー (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: LC573550 - LC573556)。

上記で決定した 7 株の扁桃由来 EB ウイルス株についてアノテーション解析を行い、ウイルスゲノム上にコードされたウイルスタンパク質の全 open reading frame (ORF) を決定した。その結果、潜伏感染タンパク質である EBNA1、EBNA2、EBNA3A および 3C、LMP1 においてアミノ酸数、配列ともに大きな多様性が認められた。また、EBNA 遺伝子の配列比較から、扁桃株 7 株のうち 5 株が EBV1 型、1 株が EBV2 型、1 株が型間リコンビナントウイルスであることが示された。

(4) 分子系統解析

扁桃由来 EB ウイルス株とデータベースから取得した日本および世界の EB ウイルス株の全長ウイルスゲノム塩基配列を用いて系統樹を作成したところ、アジアの EB ウイルス株はヨーロッパ・アメリカ・アフリカ・オセアニア地域に由来する株とは異なるグループを形成していた。さらに、アジア地域においては、日本を含む東アジアの株は、中国南部・東南アジアの株と分子系統上の異なるグループを形成していることを見出した (図 3)。

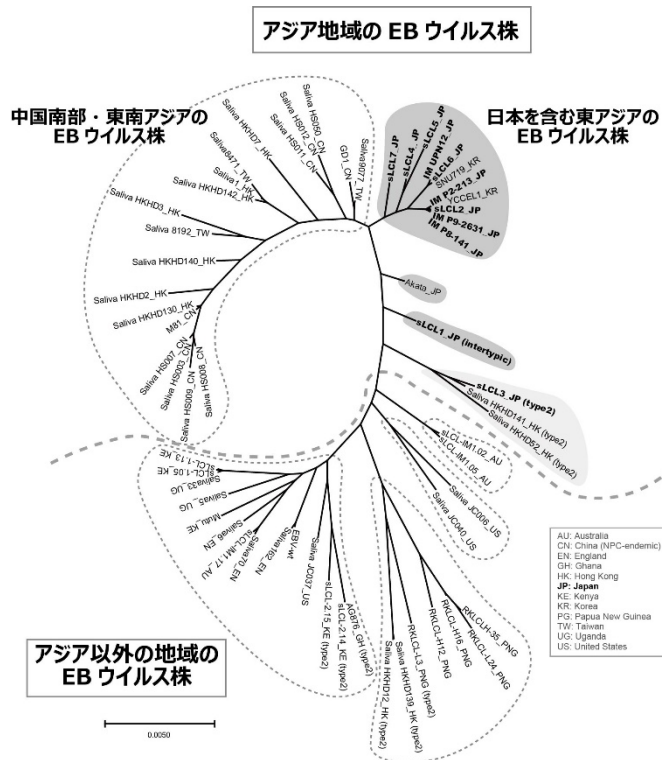


図 3 全長 EB ウイルスゲノム塩基配列の比較による分子系統樹

(5) 組換え EB ウイルスの再構成

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、扁桃由来株を感染性ウイルスとして再構成することができた。再構成ウイルスをヒト B 細胞に感染させたところ、リンパ芽球様細胞株が樹立され、クローン化した扁桃由来 EB ウイルス株が機能的に完全な状態であることが示された。

本研究において、日本の扁桃由来 EB ウイルス株 7 株について全長ウイルスゲノム DNA をクローン化し、塩基配列を決定した。その結果、①日本人に無症候性に感染している EB ウイルス株に多様性があること、②アジア株はヨーロッパ・アメリカ・アフリカ・オセアニア地域に由来する株とは異なるグループを形成すること、③アジア地域においては、日本を含む東アジア株が中

国南部・東南アジア株と異なるグループを形成していること、を見出した。

これらの結果と、EB ウイルス陽性上咽頭がんの発症率が中国南部・東南アジアで高く、慢性活動性 EB ウイルス感染症などの発症率が日本を含む東アジアで高いということを合わせて考えると、アジアにおける EB ウイルス株の地域分布と EB ウイルス関連疾患の好発地域が一致する可能性があることが示された。つまり、地域住民に見られる遺伝的背景の違いや生活習慣の違いに加えて、その地域に分布する EB ウイルス株の違いもアジアの EB ウイルス関連疾患が特定の地域に好発する理由の一つである可能性が考えられる。

今後は、異なるグループに属するアジアの EB ウイルス株（東アジア株と中国南部・東南アジア株）に特有の遺伝子多型を明らかにし、その遺伝子多型と EB ウイルス関連疾患の地域特異性との関係について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yajima Misako, Kakuta Risako, Saito Yutaro, Kitaya Shiori, Toyoda Atsushi, Ikuta Kazufumi, Yasuda Jun, Ohta Nobuo, Kanda Teru | 4. 巻 102 |
| 2. 論文標題 A global phylogenetic analysis of Japanese tonsil-derived Epstein-Barr virus strains using viral whole-genome cloning and long-read sequencing | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of General Virology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001549 | 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 Misako Yajima, Mamiko Miyata, Kazufumi Ikuta, Yasuhisa Hasegawa, Chitose Oneyama, Teru Kanda | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Efficient Epstein-Barr Virus Progeny Production Mediated by Cancer-Derived LMP1 and Virally-Encoded microRNAs. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Microorganisms | 6. 最初と最後の頁 E119 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7050119 | 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 - |
| 1. 著者名 Kanda Teru, Yajima Misako, Ikuta Kazufumi | 4. 巻 110 |
| 2. 論文標題 Epstein Barr virus strain variation and cancer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1132-1139 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13954 | 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 - |
| 1. 著者名 Misako Yajima, Kazufumi Ikuta, Teru Kanda | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Rapid CRISPR/Cas9-Mediated Cloning of Full-Length Epstein-Barr Virus Genomes from Latently Infected Cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 171-183 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v10040171 | 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 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Misako Yajima, Kazufumi Ikuta, Teru Kanda |
| 2. 発表標題 Whole-genome cloning of Epstein-Barr virus strains from asymptotically infected individuals |
| 3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 矢島美彩子、生田和史、神田輝 |
| 2. 発表標題 日本人由来「無症候感染EBウイルス株」のクローニング |
| 3. 学会等名 第33回ヘルペスウイルス研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Misako Yajima, Kazufumi Ikuta, Teru Kanda |
| 2. 発表標題 Molecular phylogenetic analysis of Epstein-Barr virus isolated in Japan |
| 3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 矢島美彩子、生田和史、神田輝 |
| 2. 発表標題 日本人由来「無症候感染EBウイルス株」解析の試み |
| 3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北医科薬科大学医学部微生物学教室
<https://tmpukandalab.com/>

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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 神田 輝 (Kanda Teru) (50333472) | 東北医科薬科大学・医学部・教授 (31305) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|