

【目的】カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) はカポジ肉腫の発症に関与するウイルスである。カポジ肉腫は後天性免疫不全 (AIDS) に合併する AIDS 型が最も高頻度である。しかし、免疫能に異常がない者に発症する古典型の存在も古くから知られている。古典型カポジ肉腫は地中海沿岸地域や、中国の新疆ウイグル自治区などの特定の地域に好発することが知られている。沖縄県の宮古島地域にも古典型カポジ肉腫が多発することが知られており、本土日本と比較すると発症頻度は 1,000 倍以上であることが報告された。

カポジ肉腫患者と健常者との間には高い発症率を説明できるだけの遺伝学的な相違は見られなかった。一方、宮古島の KSHV には、他の地域の KSHV には見られないアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が複数あることが報告された。これらのことから、宮古島の KSHV は他の地域のウイルスに比べて造腫瘍性が高いという仮説をたてた。臨床検体からの感染性 KSHV の回収は困難であることが知られている。しかし、Epstein-Barr ウイルスを細菌人工染色体 (BAC) にクローニングする技術が開発され、臨床検体からのウイルス回収が比較的容易に行えるようになった。本研究では、

1. EBV で樹立されたウイルスゲノムクローニング技術を KSHV に転用するための技術的基盤を確立すること、
2. 患者由来の臨床検体から KSHV を BAC プラスミドにクローニングし、遺伝子組み換えウイルスを作製することで宮古島のウイルスの造腫瘍性について評価することを目的とする。

【方法】

1. KSHV ゲノムを一箇所だけ切断する CRISPR/Cas9 プラスミド、切断部位周辺の配列を Homology arm として組み込んだウイルスゲノムクローニング用の BAC プラスミドを作製した。
2. KSHV クローニング技術基盤の確立を目指し、KSHV 陽性培養細胞株 BCBL-1 へ上記 2 種類のプラスミドを導入した。
3. プラスミド導入細胞を選択するため、ハイグロマイシン存在下で培養した。
4. ハイグロマイシン耐性細胞から DNA を回収し、KSHV がクローニングされた BAC (KSHV BAC) の存在を PCR で確認した。
5. ハイグロマイシン耐性細胞から回収した DNA 中の KSHV BAC をサブクローニングするため、大腸菌を形質転換し、寒天培地に塗布した。

【結果】BAC プラスミドの挿入がウイルスの増殖に抑制的な影響を与える可能性を考え、3 種類のプラスミドセットを作製した (#1~#3)。それぞれのプラスミドセットを BCBL-1 細胞に導入し、ハイグロマイシンで選択培養したところ、いずれのプラスミドセットを導入した場合にもハイグロマイシン耐性の細胞凝集塊が認められた。それらの細胞凝集塊から抽出した DNA 中には KSHV BAC が含まれることを PCR で確認することができた (下図 lane 1 と 2, lane 5 と 6, lane 9 と 10)。現在、KSHV BAC を大腸菌にサブクローニングするための条件検討を進めている。

選択培養した BCBL-1 細胞には KSHV BAC の DNA が含まれる

