101　患者から得られたカポジ肉腫関連ウイルスの表現型解析	大野　真治

【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。

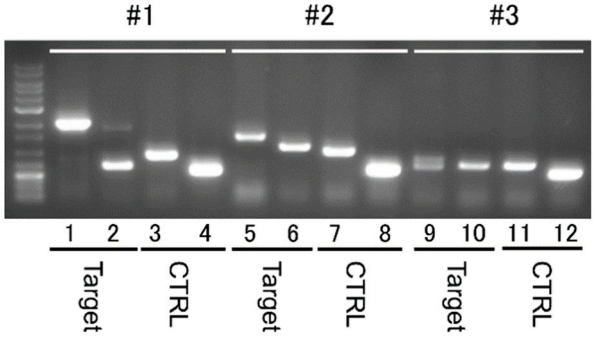
カポジ肉腫患者と健常者との間には高い発症率を説明できるだけの遺伝学的な相違は見られなかった。一方、宮古島の KSHV には、他の地域の KSHV には見られないアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が複数あることが報告された。これらのことから、宮古島の KSHV は他の地域のウイルスに比べて造腫瘍性が高いという仮説をたてた。臨床検体からの感染性 KSHV の回収は困難であることが知られている。しかし、Epstein-Barr ウイルスを細菌人工染色体（BAC）にクローニングする技術が開発され、臨床検体からのウイルス回収が比較的容易に行えるようになった。本研究では、
1. EBV で樹立されたウイルスゲノ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



101. 患者から得られたカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの表現型解析

大野　真治

琉球大学 大学院医学研究科 ウイルス学講座

Key words：カポジ肉腫，カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス，発がん，組み換えウイルス，CRISPR/Cas9

緒　言

カポジ肉腫は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）の感染を原因とする腫瘍である。4 つの病型があり、多くは後天性免疫不全（AIDS）に合併する AIDS 型である。しかし、明らかな免疫異常を持たない者に発症する古典型の存在が古くから知られている。古典型はサルディーニャ島などの地中海沿岸地域、中国の新疆ウイグル自治区などに多発することが知られている。沖縄県の宮古島でも古典型カポジ肉腫が高頻度に発症することが知られている。日本本土との発症率を比較すると、発症頻度が 1,000 倍以上高く、これは当該地域住民の KSHV 感染率の高さだけでは説明することができない［1］。

宮古島地域でのカポジ肉腫患者と健常者との遺伝学的背景が調べられたが、高い発症率を説明できるだけの違いが認められなかった［1］。一方、KSHV のゲノム配列解析から、宮古島のウイルスに特有のアミノ酸変化を伴う変異が複数の遺伝子に認められることが報告された［1］。これらのことから、宮古島の KSHV はその他の地域のウイルスに比べて造腫瘍性が高いとの仮説を立て、検証することとした。感染性のある KSHV を臨床検体から回収することは困難であることが知られている。しかし、同じヘルペスウイルスに分類され、同様に感染性ウイルス回収が困難とされている Epstein-Barr ウイルス（EBV）の全ゲノム情報を、細菌人工染色体（BAC）プラスミドに比較的簡単にクローニングする技術が開発された［2］。この方法は、CRISPR/Cas9 法によるウイルスゲノムの一箇所切断と、Homology arm を用いた相同組換えを組み合わせたものである（図 1）。

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。

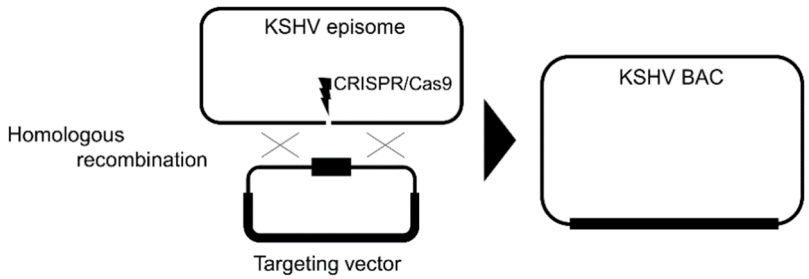


図 1. 本研究で使用したウイルスゲノムのクローニング方法
細胞中で episome として存 在している KSHV ゲノムを CRISPR/Cas9 法で切断し、切断部周辺の配列との Homology arm を持つ Targeting vector との間に相同組換えを起こさせることでクローニングする。

方　法

1. ターゲティング BAC プラスミドの作製

ウイルスゲノム上にはウイルスの増殖に必須の領域も存在することから、既報を参考に BAC プラスミドを挿入可能と思われる 3 箇所を選出した（図 2）。EBV で用いられた方法と同様に、ウイルスゲノムをサブクローニングするためのターゲティング用 BAC プラスミド、および CRISPR/Cas9 プラスミドをそれぞれ作製した。

2. プラスミドの培養細胞（BCBL-1）への導入と薬剤選択

HHV8 の BAC へのクローニング技術を確立するために、HHV8 の研究でよく用いられている、原発性滲出性リンパ腫由来の BCBL-1 細胞を選択した。条件検討を行い、細胞へのプラスミド導入は 0.4 cm キュベットを用いてエレクトロポレーション法（Bio-rad 社 : Gene pulser Ⅱ、220 V、1000 μF）で行った。エレクトロポレーションバッファーとしてタカラ社の Ingenio® Electroporation Solution を手順書どおりに使用した。導入するプラスミド DNA 比は BAC : CRISPR/Cas9 ＝ 1 : 9 とした。ハイグロマイシン耐性遺伝子を含んでいる BAC プラスミドを持つ BCBL-1 細胞を選択培養するため、プラスミド導入 2 日後から 200 μg/ml のハイグロマイシン B 添加培地で培養した。

3. 培養細胞からの DNA 回収・確認 PCR

選択培地で 3～6 週培養することでハイグロマイシン B 耐性 BCBL-1 細胞を増殖させた。BAC プラスミドは GFP 遺伝子を含むため、GFP の発現を確認後、Hirt 法を用いて DNA を回収した。組み換え反応を確認するための PCR は、タカラ社の ExTaq ポリメラーゼを用いて、手順書どおりに行った。

4. 大腸菌への DNA 導入

大腸菌株 DH10B（New england biolab 社）と HST08（タカラ社）を購入し、使用した。大腸菌への DNA 導入は、0.1 cm キュベットを用いてエレクトロポレーション法（Bio-rad 社 : Gene pulser Ⅱ、1.8 kV、25 μF、200 Ω）で行い、クロラムフェニコールを含む寒天培地に塗布した。

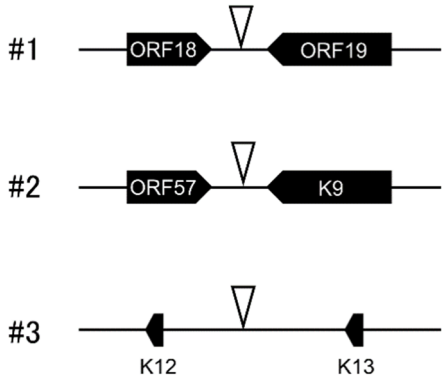


図 2. BAC の挿入領域
特定の遺伝子を破壊しない領域を 3 箇所選択し、矢頭の部分に BAC 配列を挿入できるように CRISPR/Cas9 プラスミドとクローニング用 BAC プラスミドをそれぞれデザインした。

結　果

1. ハイグロマイシン B 存在下の選択培養

BCBL1 細胞に CRISPR/Cas9 発現プラスミドと KSHV クローニング用 BAC プラスミドの二種類を導入し、ハイグロマイシン B 存在下で 3～6 週間培養を続けた。KSHV クローニング用の BAC プラスミドにはハイグロマイシン耐性遺伝子と GFP 遺伝子の発現カセットが組み込まれており、選択培養すると図 3 に示すような GFP 陽性の細胞凝集塊を形成する。本研究で試みた 3 箇所への BAC 挿入セットのいずれにおいても GFP 陽性の細胞塊の形成を確認することができた（図 3）。

2. ハイグロマイシン B 耐性細胞中には BAC にクローニングされた KSHV（KSHV BAC）が含まれる

選択培養した細胞から DNA を回収し、そのなかに KSHV BAC が含まれるかについて PCR を用いて確認した。図 4 に示すように、ターゲティング用 BAC プラスミドの Homology arm の外側に設定したプライマーと BAC 配列に設定したプライマーを用いることで相同組換えが起こったかどうかを知ることができる。図 5 に示すように、＃1～＃3 の GFP 陽性細胞凝集塊から抽出した DNA いずれからも、組み換え反応が起こったときに見られる PCR 断片が検出された（図 5 lane 1 と 2、lane 5 と 6、lane 9 と 10）。

3. KSHV BAC の大腸菌への導入

回収した DNA 中に KSHV BAC が含まれることが分かったため、単離及び増幅を目的に大腸菌への導入を試みた。エレクトロポレーションにより DNA を導入した大腸菌を寒天プレートに塗布し、生育してきたコロニー中に KSHV BAC が含まれるかについて検討した。しかし、大腸菌株（DH10B、HST08）、エレクトロポレーション条件、DNA 量、DNA 精製カラムを用いた追加精製などの条件検討を行ったが、コロニーが出現せず、現在も条件検討を継続中である。

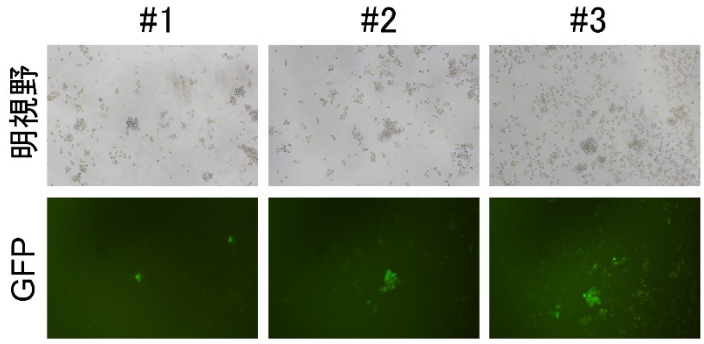


図 3. GFP 陽性細胞凝集塊の形成
KSHV クローニング用 BAC プラスミドにはハイグロマイシン耐性遺伝子と GFP 遺伝子の発現カセットが組み込まれている。ハイグロマイシン B 存在下での選択培養により、GFP 陽性の細胞凝集塊が出現する。

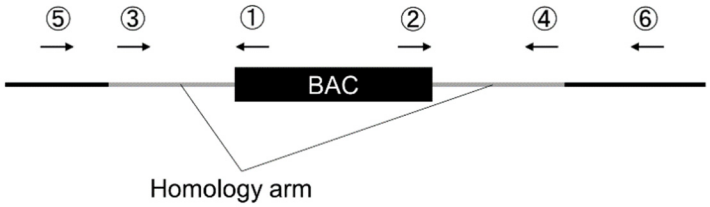


図 4. KSHV BAC 確認のためのプライマーセット
KSHV クローニング用 BAC プラスミドの内部に設定したプライマー①（もしくは②）と、Homology arm の外側に設定したプライマー⑤（もしくは⑥）を用いることにより、PCR 断片が出現すれば相同組換えが起こったと判断できる。PCR の陽性コントロールとして、Homology arm の内側にプライマー③、④を設定した。

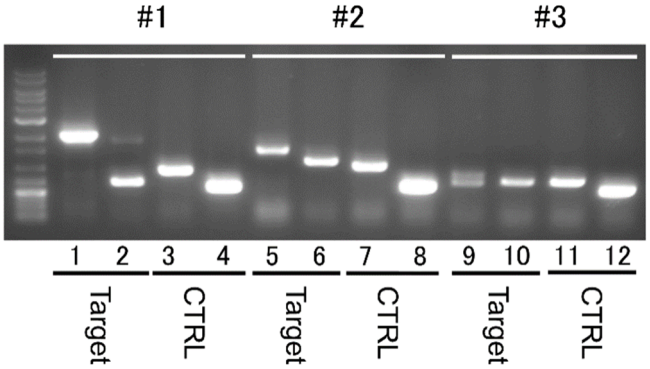


図 5. KSHV BAC 確認の PCR

Target（lane 1 と 2、lane 5 と 6、lane 9 と 10）は図 4 の①と⑤、および②と⑥に該当するプライマーセットで PCR をした結果を示す。CTRL（lane 3 と 4、lane 7 と 8、lane 11 と 12）は図 4 の①と③、および②と④に該当するプライマーセットで PCR をかけた陽性コントロールを示したものである。

考　察

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスは、カポジ肉腫以外にも原発性滲出性リンパ腫（PEL）などの悪性腫瘍の発生に関連する。PEL に由来する培養細胞は複数樹立されており、それらを用いて多くの基礎研究がなされてきた。本研究は宮古島のカポジ肉腫に感染している KSHV を BAC に回収し、造腫瘍性を評価することを目的としているが、本年度は PEL に由来する BCBL-1 細胞を用いた技術基盤の確立に終始した。BCBL1 細胞へのプラスミド導入効率が低く、条件検討のため GFP 陽性細胞株の樹立に想定以上に時間がかかってしまった。また、GFP 陽性 BCBL-1 細胞から抽出した DNA からの、大腸菌を用いた KSHV BAC の回収についても、目下条件検討を進めているところである。図 5 のデータから、培養細胞から回収した DNA 中には KSHV BAC が含まれていることから、大腸菌株や DNA 濃度の条件を検討することによって単離可能であると考えられる。

今後は、KSHV BAC 作製の技術的基盤を確立できたのち、患者検体を用いて宮古島に分布する KSHV のクローニング・解析を継続して行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、琉球大学大学院医学研究科皮膚病態制御学講座（現：皮膚科学講座）の高橋健造教授である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Awazawa R, Utsumi D, Katano H, Awazawa T, Miyagi T, Hayashi K, Matori S, Uezato H, Takahashi K. High Prevalence of Distinct Human Herpesvirus 8 Contributes to the High Incidence of Non-acquired Immune Deficiency Syndrome-Associated Kaposi's Sarcoma in Isolated Japanese Islands. J Infect Dis. 2017 Oct 17;216(7):850-858. doi: 10.1093/infdis/jix424.

2） Kanda T, Furuse Y, Oshitani H, Kiyono T. Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Cloning and Functional Characterization of Gastric Cancer-Derived Epstein-Barr Virus Strains. J Virol. 2016 Apr 14;90(9):4383-93. doi: 10.1128/JVI.00060-16.