

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

WT1発現リンパ芽球様細胞株の抗原提示細胞としての有用性の検証

分担研究者 神田 輝

愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部 室長

研究要旨 ヒト末梢血由来のBリンパ球にEBウイルスを試験管内感染させることで樹立できるリンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)は抗原提示細胞として機能することが知られている。前年度までの研究により、組換えEBウイルス産生技術を応用することで樹立可能なWT1 (Wilms' tumor gene 1)抗原発現LCLは、特にEBウイルス未感染者におけるWT1特異的CTL誘導において有効である可能性が示された。本年度は、この技術の基盤となる組換えEBウイルス産生細胞樹立の効率化をめざした研究を行った。その結果、B95-8株EBウイルスで欠損している約12キロベースの領域を修復したBAC(bacterial artificial chromosome)クローンをを用いることで、HEK 293細胞へ導入後の薬剤選択によるウイルス産生細胞樹立の効率が、従来のBACクローンと比べて著明に改善することを見出した。修復領域には多数のウイルス由来マイクロRNAがコードされていることから、こうしたマイクロRNAの発現がウイルス産生細胞の効率の良い樹立に寄与する可能性が考えられた。この新規BACクローンをを用いた組換えウイルス産生系により、がん抗原等を発現するLCLの樹立が、より迅速化、効率化すると期待された。

A. 研究目的

EBウイルスはヒトBリンパ球に高い感染性を示すヘルペスウイルスの一種で、健康成人の大多数に潜伏持続感染している。EBウイルス感染Bリンパ球は免疫原性を有し、既感染者の末梢血中にはEBウイルス抗原を標的とするCTLが存在する。試験管内においてEBウイルスをBリンパ球に感染させて得られる不死化細胞株であるリンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)は、EBウイルス抗原の抗原提示細胞として機能し、これを用いてEBウイルス抗原を標的とする

CTLを体外において効率良く誘導・増幅できることが報告されている。

われわれは、がん抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBウイルス(Akata株由来)を用いてLCLの樹立を行うと、ほぼ100%がん抗原を発現する細胞が得られることを報告した(Kanda et al. J. Virol. 78:7004-7015, 2004)。その後、B95-8株由来の新規BAC(bacterial artificial chromosome)クローンを取得し、このBACクローンをHEK293細胞に導入することで、より確実に高力価の組換えEBウイルス産生細胞を樹立可能であることを報告し

た(Kanda et al, PLoS One, 6, e27758, 2011)。この手法を用いてがん抗原 WT1(Wilms' tumor 1, ウィルムス腫瘍原因遺伝子)を抗原提示するLCLを樹立できることを示した(Kanda et al, Cancer Gene Ther. 19: 566-571, 2012)。

こうした手法を様々ながん抗原について応用していく上で障壁になるのは、組換えEBウイルス産生細胞を樹立する過程において、得られる細胞クローンごとにウイルス産生能が異なるという点が挙げられる。すなわちBACクローンをHEK293細胞に導入後、ハイグロマイシン選択して得られる薬剤耐性クローンのうち、ごく一部の細胞クローンが高力価組換えウイルスを産生するため、こうした細胞クローンを多くの薬剤耐性クローンの中から選別することが必要である。そこで本年度は、この過程の効率化をめざした研究を行った。

B. 研究方法

1) B95-8株で欠失している領域を修復した新規BACクローンの取得：

新たに作製したターゲティングベクターを用いて、B95-8細胞に潜伏感染したEBウイルスゲノムをBACベクターにクローン化した。その後、B95-8株EBウイルスで欠失した約12キロベースのゲノム領域を、Akata株EBウイルスのゲノムDNA断片を用いて大腸菌内相同組換え法により修復した。

2) 欠失領域を修復した新規BACクローンを用いたウイルス産生細胞樹立：

上記「修復済みBACクローン」をHEK293細胞へ導入し、ハイグロマイシン選択した。得られた複数の薬剤耐性細胞クローンに対して、ウイルス産生のスイッチ遺伝子であるBZLF1遺伝子を導入し、ウイルスの初期遺伝子、後期遺伝子の発現を調べた。また得られた細胞上清を用いて、Bリンパ球系細胞への感染実験を行った。さらに末梢血Bリ

ンパ球へ感染させて、トランスフォーム活性を調べた。

C. 研究結果

1) B95-8株で欠失している領域を修復した新規BACクローンの取得：

大腸菌内相同組換えにより、B95-8株で欠損している約12キロベースの領域を修復した「修復済みBACクローン」を取得した。得られたBACクローンのDNAを調製し、制限酵素解析およびサザンブロット法により、目的とする領域が修復されていることを確認した。

2) 欠失領域を修復した新規BACクローンを用いたウイルス産生細胞樹立：

「修復済みBACクローン」を用いることで、修復前のBACクローンを用いた場合と比較して、より効率良くウイルス産生細胞が得られることを見出した。二つの細胞クローンから得られた細胞上清をBリンパ球系細胞株へ感染させたところ、いずれも30%以上の細胞に感染した。末梢血Bリンパ球感染により、 TD_{50} (50%トランスフォーム濃度)を決定したところ、親株であるB95-8株ウイルスと同等の値(1×10^5 /ml程度)を示した。

D. 考察

B95-8株で欠失が見られる12キロベースの領域には、多数のマイクロRNAがコードされていることが報告されている。実際に、「修復済みBACクローン」を導入したHEK293細胞において、マイクロRNAが発現していることを確認した。したがって、こうしたマイクロRNAの発現が、HEK293細胞への再導入後における効率の良いウイルス産生において何らかの形で関与している可能性が考えられた。

E. 結論

より効率良く組換えEBウイルスを産生可能な新規BACクローンを取得した。今後この新規BACクローンを用いた組換えウイルス産生を採用することで、がん抗原等を発現するLCLの樹立が、より迅速化、効率化すると期待された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda T, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, and Tsurumi T: HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther.* 19(8), 566-571, 2012.
- 2) Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Kanda T, and Tsurumi T: Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. *J Virol.* 86(9), 4752-4761, 2012.
- 3) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, and Tsurumi T: Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol.* 87(4), 2120-2127, 2012.
- 4) Saito S, Murata T, Kanda T, Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, and Tsurumi T: Epstein-Barr virus deubiquitinase downregulates TRAF6-mediated NF-kappaB signaling during productive replication. *J Virol.* 87(7), 4060-4070, 2013.
- 5) Kawashima D, Kanda T, Murata T, Saito S, Sugimoto A, Narita Y, and Tsurumi T: Nuclear Transport of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Is Dependent on the BMRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90. *J Virol.* 87(11), 6482-6491, 2013.
- 6) Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol* (in press).

2. 学会発表

- 1) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析とその応用の可能性：第27回ヘルペスウイルス研究会、大府市、2012年6月
- 2) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析：第9回EBウイルス研究会、米子市、2012年7月
- 3) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Chromosome binding of Epstein-Barr virus EBNA1 protein is mediated by arginine residues within chromosome binding domains：International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases、米国 フィラデルフィア、2012年8月
- 4) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Mechanism of host chromosome binding of latently infected Epstein-Barr virus episomes：第71回日本癌学会学術総会、札幌市、2012年9月
- 5) 神田輝、鶴見達也. EBNA1蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析：第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪市、2012年11月
- 6) 神田輝、鶴見達也. ウイルス蛋白質の染色体局在におけるアルギニン残基の重要性：第30回染色体ワークショップ 第11回核ダイナミクス研究会（合同開催）、淡路、2012年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし