

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ウイルスを用いて任意のがん抗原を発現するLCLを樹立できること、また樹立したLCLにおいて実際にはがん抗原WT1が抗原提示されることを示した。さらに広くLCLの樹立に使われている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、より効率良く組換えEBウイルス産生細胞を樹立可能であることを明らかにした。本年度は、修復した12キロベース領域に存在するウイルス由来マイクロRNAの機能解析を行うことで、ウイルス産生細胞樹立効率の違いの分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、ウイルスマイクロRNAのターゲット遺伝子の候補として、上皮細胞特異的に発現する細胞性因子を同定した。この因子はWntシグナル経路の抑制因子であることから、ウイルスマイクロRNAが細胞のシグナル伝達経路の抑制を解除することが、効率の良いウイルス産生に寄与する可能性が示唆された。

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ある。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)は抗原提示細胞として機能する。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)クローンをを用いて実験系を改良し(Kanda et al, PLoS One, 6, e27758,

2011)、この系を用いてがん抗原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)。

組換えウイルス産生細胞の樹立は、EBウイルスゲノムDNAのBACクローンをHEK293細胞に導入し、薬剤耐性クローンを取得することで行う。前年度の研究により、広くLCLの樹立に使われている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、より効率良く組換えEBウイルス産生細胞を樹立できることが示された。そこで本年度は、修復した12キロベース領域(BARTと呼ばれる転写産物をコードする領域)に存在するウイルス由来マイクロRNA(BART miRNA)に注目し、その機能解析を

行うことで、ウイルス産生細胞樹立効率の違いの分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) ウイルスマイクロRNA発現の有無による細胞性遺伝子発現変化の網羅的解析：

プロトタイプウイルスとして汎用されているB95-8株EBウイルスは、22個のBART pre miRNAのうち17個のpre miRNAがコードされる約12キロベースの領域を欠損する「BART欠損ウイルス」である。この領域をAkata株ゲノム断片で修復した「BART修復ウイルス」を作製した。「BART欠損ウイルス」および「BART修復ウイルス」のBACクローンDNAをHEK293細胞へ導入してウイルス産生細胞を樹立し、BART miRNAの発現をノザン法により確認した。BART miRNAの発現の有無による宿主遺伝子発現変化をマイクロアレイ法により調べた。

2) ウイルスマイクロRNAの標的遺伝子候補の同定、および機能アッセイによる確認：

ターゲット検索プログラムを用いて、BART miRNAの標的遺伝子を予測し、上記マイクロアレイ解析において発現抑制がみられる細胞性遺伝子と照らし合わせを行うことで、BART miRNAの標的候補遺伝子を同定した。

C. 研究結果

1) ウイルスマイクロRNA発現の有無による細胞性遺伝子発現変化の網羅的解析：

「BART修復ウイルス」を導入したHEK293細胞において、修復したBART miRNA群の発現を認めた。発現レベルは、BART miRNAが高発現することで知られている上咽頭がん由来C666-1細胞のそれに匹敵するレベルであった。マイクロアレイ解析により、BART miRNA群が発現している細胞において発現が抑制される細胞性遺伝子を複数同定した。

2) ウイルスマイクロRNAの標的遺伝子候補

の同定、およびその確認：

上記結果、およびBART miRNAのターゲット予測の結果から、標的遺伝子候補としてWnt抑制因子の一つに注目した。この遺伝子の3'-UTRをルシフェラーゼ遺伝子の下流に連結したレポーター遺伝子を作製し、一連のBART miRNA mimicと共に細胞に導入することで、レポーター遺伝子を発現抑制するBART miRNAを同定した。またBART miRNA mimicを細胞へトランスフェクションすると、Wnt抑制因子の蛋白質発現が著明に低下した。

D. 考察

「BART修復ウイルス」を産生するHEK293細胞においては、一連のBART miRNA群が発現することで、宿主遺伝子の発現変化が生じることが判明した。興味深いことにBART miRNAのターゲット遺伝子候補として同定されたWnt抑制因子は、上皮細胞で特異的に高発現する因子であった。すなわちBART miRNAは、上皮細胞の一種であるHEK293細胞においてWnt抑制因子によるシグナル経路抑制を解除し、結果的にWnt経路が活性化されることが明らかになった。こうしたシグナル伝達経路の活性化が、効率の良い組換えウイルス産生に貢献する可能性が示された。上皮細胞におけるWntシグナル経路の活性化は、発がん過程においても重要であると考えられており、ウイルスマイクロRNAによる発がん促進という観点からも注目される。

E. 結論

組換えEBウイルス産生細胞の樹立過程において、細胞性遺伝子発現がウイルスのコードするマイクロRNAによる制御を受ける可能性が示された。組換えEBウイルスを用いて樹立できるLCLは、各種免疫学的解析において非常に有用な研究ツールであり、本研究成果はこうした実験系のさらなる改良に資するものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, and Tsurumi T: Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. *J Biol Chem.* 288(33), 24189-24199, 2013.
- 2) Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, and Tsurumi T: Different distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol.* 87(12), 6693-6699, 2013.
- 3) 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.
- 4) Murata T, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Kanda T, and Tsurumi T: Contribution of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) family transcription factors to BZLF1 expression in Epstein-Barr virus reactivation from latency. *J Virol.* 87(18), 10148-10162, 2013.
- 5) 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, 2013.

- 6) 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.

2. 学会発表

- 1) 神田輝、鶴見達也. EB ウイルス感染上皮細胞におけるウイルス由来マイクロ RNA による宿主遺伝子発現制御：第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月
- 2) 杉本温子、佐藤好隆、神田輝、木村宏、鶴見達也. Replication compartment 内において EBV 初期遺伝子と後期遺伝子の転写産物では異なった分布を示す：第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月
- 3) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells：6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma、トルコ イスタンブール、2013 年 6 月
- 4) 神田輝、鶴見達也. ウイルス由来マイクロ RNA による上皮細胞特異的因子の発現制御：第 10 回 EB ウイルス研究会、京都市、2013 年 7 月
- 5) 神田輝、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013 年10月
- 6) 神田輝、鶴見達也. EBウイルス由来マイクロRNAによる上皮細胞特異的因子の発現制御：第61回日本ウイルス学会学術総会、神戸市、2013年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし