

新規組み換えヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) を用いた HHV-6B ゲノム組み込み 293T 細胞の樹立とヒトゲノム DNA への組み込み機構の解析

清水 昭 宏 小林 伸 行
嶋 田 和 也 近 藤 一 博

東京慈恵会医科大学ウイルス学講座

(受付 平成 24 年 11 月 5 日)

ESTABLISHMENT OF A HUMAN EMBRYONIC KIDNEY CELL LINE CARRYING CHROMOSOMALLY INTEGRATED HUMAN HERPESVIRUS 6B (HHV-6B) USING NOVEL RECOMBINANT HHV-6B, AND ANALYSIS OF THE INTEGRATION MECHANISM INTO HUMAN GENOMIC DNA

Akihiro SHIMIZU, Nobuyuki KOBAYASHI
Kazuya SHIMADA, and Kazuhiro KONDO

Department of Virology, The Jikei University School of Medicine

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a nononcogenic lymphotropic beta herpesvirus. HHV-6 can be classified into 2 variants: HHV-6 variant A and HHV-6 variant B (HHV-6B). Like other herpesviruses, HHV-6 establishes a latent infection within monocytes and macrophages after primary infection. HHV-6 has been shown to specifically integrate into the telomeres of chromosomes (chromosomally integrated HHV-6, CIHHV-6) in approximately 1% of the human population and to be vertically transmitted through the germ-line. Despite the consistent and frequent detection of CIHHV-6, it remains unclear how HHV-6 genomic DNA integrates into the human genome and whether persons with CIHHV-6 are at clinical risk. Here, we describe our establishment of the 293T cell line carrying integrated HHV-6B (293TintH6B) using a novel recombinant HHV-6B (H6BR28LEP) and 293T cells to determine the mechanism involved in the HHV-6 integration. A Basic Local Alignment Search Tool homology search of 293TintH6B genomic DNA confirmed the presence of an HHV-6B DNA right direct repeat telomeric sequence joined with TAACCC telomere repeats and of a chromosome 4q35 subtelomere sequence. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis revealed that 1 complete copy HHV-6B genomic DNA was included in each cell. Although the immediate early gene (U90) and the early gene (U25, U42) mRNA expression were detected at the beginning of 293TintH6B cell establishment, the expression of each mRNA was gradually silenced during the proliferation of 293TintH6B cells. These observations suggest that 293TintH6B cells represent the initial event of HHV-6B integration to all somatic cells, including germ cells, and that HHV-6B is maintaining the stable latent infection by integrating its genome into a telomeric region under a telomere-specific gene-silencing mechanism.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2013;128:41-52)

Key words: human herpesvirus 6, virus integration, virus latency, host-pathogen interactions, viral gene expression regulation

I. 緒 言

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) は 1986 年に

発見された β ヘルペスウイルスで、A, B 二つのバリエーションからなる¹⁾²⁾。HHV-6B には 90% 以上の子供が幼児期に感染し、このサブタイプは突発性

発疹の原因となる³⁾。HHV-6は、発見当初B細胞に感染するウイルスとして報告され、その後、T細胞などの血液系細胞や、上皮系細胞など、多くの細胞種に感染することが報告されている。HHV-6は他のヘルペスウイルス同様、初感染後に単球やマクロファージに潜伏感染を確立する^{4) 5)}。一般的にヘルペスウイルスの潜伏感染は、ウイルスゲノムが核内環状プラスミド(エピソード)の形態で存在し、エピソードは細胞分裂に伴い娘細胞に受け継がれることで、潜伏感染を維持していると考えられている。しかし、HHV-6では潜伏感染しているウイルスゲノムの形状がどのようなものかは確定していない。

一方で、末梢血中のHHV-6 DNAコピー数が非常に高い患者のFISH解析から、HHV-6ゲノムはヒト染色体に組み込まれ(Chromosomally integrated HHV-6, CIHHV-6)^{4) 6) 7)}、生殖細胞系を介して垂直伝播することが知られている^{8) 9)}。他のヘルペスウイルス感染においても宿主遺伝子への組み込みは報告されており、Epstein-Barr virus (EBV) や Marek's disease virus (MDV) ではHHV-6同様、全ウイルスゲノムが宿主細胞ゲノムに組み込まれることが知られている¹⁰⁾⁻¹²⁾。しかし、生殖細胞系を介する組み込みはHHV-6で報告されるのみであり、ウイルス感染動態や疾患との関連において近年非常に注目されている^{13) -15)}。

CIHHV-6を伴う個体の出現頻度は、日本においては0.21%⁸⁾、英国においては0.8%¹⁶⁾とされているが、その頻度の高さにもかかわらず、疾患とのかかわりなどは明らかになっていない。また、HHV-6組み込みがヒト染色体のテロメア領域をターゲットとしていることが報告され^{17) 18)}、染色体への組み込みにHHV-6のテロメア様配列が重要であることが示唆されている¹⁹⁾が、染色体に組み込まれたウイルスの機能や再活性化の有無はいまだ議論の分かれるところである。

今回我々は、このような染色体への組み込みにおける問題を解決するために、以前に報告したU2-U8欠損非増殖性組み換えHHV-6 (H6R28)⁵⁾をベースに新たに作製した組み換えHHV-6B (H6BR28LEP)をヒト腎上皮細胞由来細胞株293Tに感染させた。このH6BR28LEP感染細胞に対して、組み換えHHV-6の持つ選択マーカーによる

感染細胞の選択と細胞クローニングを行い、HHV-6ゲノムの組み込み部位を特定し、組み込み部位の遺伝子配列が明らかとなった細胞株、293TintH6Bを樹立した。さらに、今回新たに樹立した293TintH6Bを使用して、CIHHV-6Bにおけるウイルス遺伝子の組み込み部位とウイルス遺伝子発現を検討し、HHV-6ゲノム組み込みの生物学的意義に関する新たな知見を得た。

II. 対象と方法

1. 細胞とウイルス

臍帯血単核球(CBMC)は研究用ヒト臍帯血(理研バイオリソースセンター、茨城県つくば市)を購入し、10%非動化牛胎児血清(FBS)、10 μ g/ml IL-2 (PROLEUKIN; Chiron Corp, USA) 入りRPMI1640 medium (SIGMA, USA) で培養した。事前に1 μ g/mlのプレートコート抗CD3抗体(orthoclone OKT3; Janssen)で刺激を行った。HEK293T細胞は理研バイオリソースセンターから購入し、5%非動化FBS入りDMEM (SIGMA)で培養した。ヒト臍帯血の利用に関しては東京慈恵会医科大学、行政法人理化学研究所筑波研究所、それぞれの倫理委員会の承認を得た。

HHV-6 variant B (HST strain) は刺激後のCBMCに遠心法(1,500 rpm, 37 $^{\circ}$ C, 40分)で感染させ²⁰⁾、細胞変性効果が80%以上の細胞に対して出現するまで培養した。-80 $^{\circ}$ Cで凍結し2回凍結融解を行い、2,000 gで5分遠心した上清をウイルス液として-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

2. 組み換えウイルス作製用プラスミドの構造

HHV-6 variant B (HHV-6B)のウイルス遺伝子U2, U8間における相同組み換えによって、HCMV major immediate-early enhancer-promoter (MIEP)で発現するenhanced green fluorescent protein (EGFP)とsimian virus 40 (SV40) early promoterで発現するpuromycin resistance gene (Puro)を導入するためのプラスミド、pU2-U8 EGFP-Puroの構造は以前に報告している⁵⁾。今回新たに、MACSelect LNGFR kit (Milenyi Biotec, Germany)で組み換えウイルス感染細胞を選別するために、pMACS LNGFR-IRES (Milenyi Biotec)のLNGFR-IRESカセットをEGFP

遺伝子上流に導入した (pU2-U8 LEP, Fig. 1).

3. 組み換えウイルスの作製

CBMCを抗CD3抗体で3日間刺激し、遠心法でHHV-6Bを感染させた。感染4時間後に、 1×10^7 細胞に対して、 $1 \mu\text{g}$ のpU2-U8 LEPをelectroporation法 (AMAXA; Lonza, Switzerland) によってプロトコル通りに導入した。細胞間感染伝播によって組み換えウイルスの感染を拡大させるために、非感染CBMCと混和後に800 rpmで10分間遠心し、24時間後にpuromycin ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) で感染細胞の選択を行った。更に24時間後に感染細胞をMACSシステムでプロトコルに従い選別した。簡単には、感染細胞 1×10^7 につきバッファー (0.5% FBS, 2 mM EDTA添加PBS (-)) $70 \mu\text{l}$ で懸濁し、 $20 \mu\text{l}$ のMACSelect LNGFR MicroBeadsを混和し 4°C で15分間静置、洗浄後、MidiMACS magnetic separatorにセットしたLSカラムに添加した。カラムは3回バッファーを通して洗浄し、通過液は破棄した。

磁石から外したカラムにバッファーを添加し、組み

換えウイルスの感染によりlow-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) を発現しているCBMCを収集し、あらかじめ抗CD3抗体とIL-2で刺激していた非感染CBMCと混和することにより、組み換えウイルスの感染を拡大した。以上のpuromycinとMACSシステムによる選別を5回繰り返し、高純度の組み換えHHV-6 (H6BR28LEP) を入手した。

4. H6BR28LEPの293T細胞への感染と感染細胞のクローニング

H6BR28LEPには選択マーカーとしてEGFPとPuro, LNGFRが導入されているため、感染細胞にpuromycinを添加し、さらにMACS LNGFR selectionを行うことでH6BR28LEPに感染した細胞のみを選別することが可能である (Fig. 1)。293T細胞にmultiplicity of infection (MOI) 2でH6BR28LEPを遠心法で感染させ、2日後に $10 \text{ ng}/\text{ml}$ puromycinを添加した。翌日LNGFR selectionを行い、選択細胞を96穴プレートに段階希釈を用いて散布し、単一細胞からコロニーを樹立した。

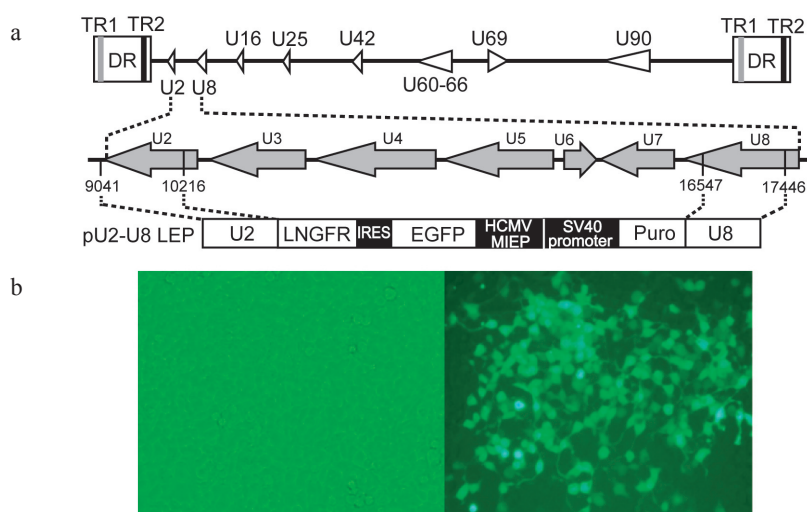


Fig. 1. Structure of H6BR28LEP genome

a. Structure of H6BR28LEP

The straight line at the top represents the genome of the HHV-6B HST, with the U2 to U8 region expanded below. In the middle, the shaded arrows show the positions from start codon to poly(A) signal of the genes in the U2-U8 gene cluster that was replaced by the EGFP-IRES-LNGFR-Puro cassette. The bottom diagram shows the structure of pU2-U8 LEP. Open boxes represent the low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR), enhanced green fluorescent protein (EGFP), and puromycin-N-acetyl-transferase (Puro) genes; filled boxes represent the internal ribosome entry site (IRES), human cytomegalovirus major immediate early promoter (HCMV MIEP), and simian virus 40 (SV40) promoter. The locations of the real-time PCR targeting lesions (U16, U25, U42, U60-66, U69 and U90) are indicated as open arrows at the top. DR = direct repeat, TR = telomere like sequence.

b. EGFP expression in 293T cells infected with H6BR28LEP

293T cells were infected with H6BR28LEP by using the centrifuge method and were observed under polarizing microscopy (left) and fluorescent microscopy (right) at 2 day after infection.

5. Inverse PCR法

単一コロニーを形成する細胞 1×10^6 から Gen-
tra Purgene Cell Kit (QIAGEN, USA) を用いてプ
ロトコールにしたがって total DNA を精製した。
精製した total DNA $1 \mu\text{g}$ を *Pst* I 1 U で 37°C 一晩消
化し, QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)
を用いてプロトコールにしたがって精製後, Li-
gation high (TOYOBO, Japan) を用いて, 一晩
self-ligation を行った。作成したライゲーション
産物から, Fig. 2 に示したようにテロメア様配列

Table 1. Primers and probes used in this study.

Name	Sequence (5' to 3')
M13-RVM	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG
M13-47	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
DR-R1	GACGACAAAGGCCGACTCTAGCAT
DR-R2	GTAATCACTTCTGTCGCGTTTCTCCCA
DR-F <i>Pst</i> 1	AGCTCACTCCGGCGTGC GTTTGACACAG
DR-F <i>Pst</i> 2	TCCGGCAGCTCTAGGTCTCTCATAC
Ch4int R	GAGCTGCATTCTGCTCAGCACAGAC
U16 F	GGCCCTAGAAAAAGTATGAGGACAC
U16 R	GGGGATTGTTAGGGGATATCGTC
U16 probe	FAM- AACATTAGCACCGTCCAAGAAATTCTGCCG -TMRA
U25 F	ACCCCGACCACAACCAATTC
U25 R	GAGGATTATCGGTTGACTCTACATAG
U25 probe	FAM- CTTCGCAACACATATAGGTCTTCGCCAGT -TMRA
U42 F	TCGACGCAAACCTTTGGATTAAAC
U42 R	GGACCTTCATGCAGCTATTCAAC
U42 probe	FAM- CGACCTACCTCAGACCTCTCATCGTTCACA- TMRA
U69 F	AGTGGTTTACGTCCCTCACAAC
U69 R	CTTCGTTGGCCGTCTTTATGG
U69 probe	FAM-ACACCTTCCGCTAGGCACCCACTCC- TMRA
U90 F	GATGCTCTTCTTCCACATTACTG
U90 R	CCAGAACTGGAAGCCTTTGATC
U90 probe	FAM- CATCCCAGAGTCTTCCAACGACATCGCT- TMRA
U60-66 F	AGGATCTTGGTAGATGCTTGGGG
U60-66 R	CGACCATCAAAATATAAAGAGCACA
U60-66 probe	FAM- AGCTGCTACAATACACAGTATACGCGGA- TMRA

を挟むようにウイルス側に設定したプライマー
セ ッ ト (DR-R1 & DR-F *Pst*1, DR-R2 & DR-F
*Pst*2) を用いて Gene Amp PCR System 9700 (Applied
Biosystems, USA) を使用し, nested PCR を行った。
PCR 条件は, GoTaq Green Master Mix (Promega,
USA) を用いて, 初期変性を 95°C 2 分 行い, 続
いて 95°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分の PCR 反応
を 1st PCR は 20 サイクル, 2nd PCR は 40 サイクル
行った。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit
(QIAGEN) で精製した後, TOPO TA cloning kit
for sequencing (Invitrogen, USA) を用いた TA ク
ローニング法でプロトコール通りに pCR4-TOPO
ベクター (Invitrogen) にクローニングし, コン
ピテント細胞 (Stbl2 細胞; Invitrogen) に形質転
換を行った。出現したコロニーから Table 1 に示
したプライマーセット (M13-RVM & DR-F *Pst*2)
でコロニー PCR を行い, 陽性コロニーから QIA-
prep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラス
ミド DNA を精製した。

6. HHV-6 ゲノム組み込み部位の同定

精製したプラスミド DNA について BigDye
Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied
Biosystems) を用いて, M13-47, M13-RVM プラ
イマーでそれぞれプロトコール通りにシーケン
シングを行った。確定したシーケンスにおいて,
ヒトゲノム配列に特異的なプライマーを設定し
(Ch4int R), DR-R2 プライマーとともに total
DNA をサンプルに PCR を行った。

7. 蛍光抗体法

H6BR28LEP ゲノムが組み込まれた 293T 細胞と,
野生株 HHV-6B を遠心法で感染させた 293T 細胞
を, それぞれ抗 HHV-6 モノクローナル抗体 (OHV-1,
OHV-2, OHV-3 の混合抗体) を一次抗体に, Alexa
Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) を二
次抗体に用いて間接蛍光抗体法で観察した²¹⁾。

8. Real-time PCR 法

H6BR28LEP ゲノムが組み込まれた 293T 細胞か
ら前述のように total DNA を精製し, 1 細胞あた
りのウイルスゲノム DNA コピー数を TaqMan
real-time PCR で測定した。PCR のプローブとプ

ライマーセットは、HHV-6ゲノムを広範にカバーするように、遺伝子領域U16, U25, U42, U69, U90にそれぞれ設計した (Fig. 1, Table 1). 増幅と検出には、Premix Ex Taq (Takara Bio, Japan) を用いて、Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を利用した。PCRの条件は、初期変性を95℃ 30秒行い、続いて95℃ 5秒, 60℃ 31秒のPCR反応を45サイクル行った。計測データはHuman TaqMan Copy Number Reference Assay (Applied Biosystems) を用いて ribonuclease P 遺伝子で標準化した。

HHV-6 mRNA発現を確認するために、total RNAをRNeasy Mini RNA isolation kit (Qiagen) でプロトコール通りに精製し、PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio) で逆転写してcDNAを作製した。HHV-6の感染初期に発現する前初期遺伝子U90と初期遺伝子U25, U42, 感染後期に発現する後期遺伝子U60-66領域に設計したプライマーとプローブセット (Fig. 1, Table1) で上記と同様の条件でreal-time PCRを行った。計測データはハウスキーピング遺伝子であるGAPDH mRNA発現量で標準化した。

III. 結 果

1. 新たな組み換えHHV-6の作製と293T細胞への感染

以前に報告した組み換えHHV-6 (H6R28) の作製は、感染細胞をpuromycinで選択することで組み換えウイルスの純化を行っていた⁵⁾。今回新たにLNGFR遺伝子をHHV-6遺伝子U2-U8間に組み込み、MACSシステムとpuromycin選択を併用することで、従来の方法よりも短い、約1ヵ月で組み換えHHV-6 (H6BR28LEP) の作製が可能となった (Fig. 1a)。

H6BR28LEPを293T細胞に遠心法で感染させたところ、感染24時間後からEGFPの発現を認めた (Fig. 1b)。腎細胞由来の293T細胞はHHV-6の本来の宿主細胞ではないが、H6BR28LEPは効率よく感染し遺伝子発現が有効に行われることが確認された。一方で上清中には感染性ウイルス粒子の放出は認めず、増殖性感染は示さないことが分かった (データは記載せず)。HHV-6が増殖性感

染を示す宿主細胞に感染した場合は、細胞溶解を誘導するため、ゲノム組み込みの検討には適さない。しかし、増殖性感染を示さない293T細胞は、細胞溶解のリスクが低く、HHV-6のヒト染色体への組み込み (CIHHV-6) の検討に有効な細胞株であることが示唆された。

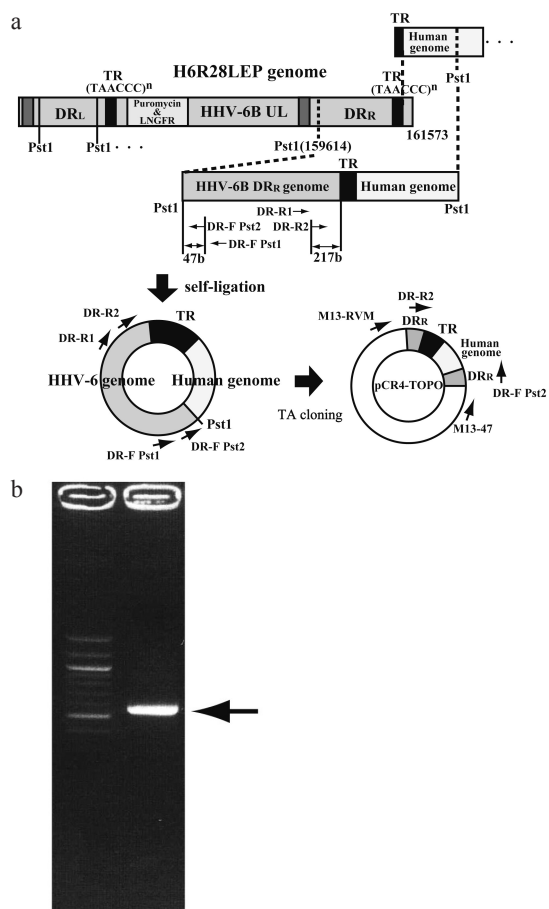


Fig. 2. Detection of H6BR28LEP genomic DNA integrated into 293T chromosome

a. Illustration of inverse PCR method

Upper boxes represent H6BR28LEP genome integrated into the subtelomeric region of human genome and Pst 1 restriction endonuclease-cleaved fragment. Lower left circle shows the self-ligated circular DNA of Pst 1-cleaved fragment. Lower right circle shows nested-PCR products inserted into pCR4-TOPO plasmid vector after TA cloning. The small arrows beside the box and circles show the positions of each primer used in nested-PCR, colony PCR, and sequencing, respectively.

b. Colony PCR analysis

The band indicated with the arrow represents the positive colony of *E. coli* transduced with pCR4-TOPO, including the Pst1-cleaved fragment.

2. H6BR28LEPゲノムが染色体に組み込まれた 293T細胞のクローニング

H6BR28LEPゲノムが染色体に組み込まれた 293T細胞をクローニングするために、293T細胞にH6BR28LEPを遠心法で感染させ、24時間後から puromycin と、抗LNGFR抗体を利用したMACS磁気マイクロビーズで感染細胞を選択し、限界希釈法を用いて単一コロニーを6クローン樹立した。それぞれのクローン 10^5 細胞からtotal DNAを精製し、HHV-6B DRR配列内に存在する制限酵素 *Pst* Iで消化した。CIHHV-6はテロメア領域における相同組み換えによると考えられている²²⁾²³⁾。そこで、*Pst* Iで消化後のtotal DNAをself-ligationで環状化させ、DRR配列に特異的な primerを用いてnested PCRを行った (Inverse PCR法, Fig. 2a)。6クローンのうち1クローンでPCRの結果が陽性であった (Fig. 2b)。

3. 組み込み領域の同定

Inverse PCRが陽性であったクローンについて、シーケンシングの結果をBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) で検索したところ、テロメ

ア配列を挟んだ上流はHHV-6 DRRと、下流は chromosome 4q35 テロメア領域を含む末端配列との一致を認めた。今回同定された chromosome 4q35 への遺伝子組み込みは、HHV-6 DRR末端のテロメア様繰り返し配列 (TTAGGG) からヒトテロメア配列 (TTAGGG) を介して行われており、従来の報告に矛盾しない結果であった (Fig. 3a)。シーケンシングで確定した配列上に設計した特異的なプライマー (ch4int R) を用いて、樹立した細胞から精製したtotal DNAに対してPCRを行ったところ、442bp近傍にバンドが検出され、シーケンシングで確定した配列から計測された塩基数と一致していた (Fig. 3b)。以上の検討から、H6BR28LEPゲノムが chromosome 4q35 テロメア領域に組み込まれた 293T細胞 (293TintH6B) の樹立を確認できた。

4. H6BR28LEP組み込み 293T細胞 (293TintH6B) におけるH6BR28LEPゲノムDNAの発現

293TintH6Bから精製したtotal DNAについて、HHV-6ゲノム全域に渡って設定したプライマー・プローブセット (U16, U25, U42, U69, U90) で

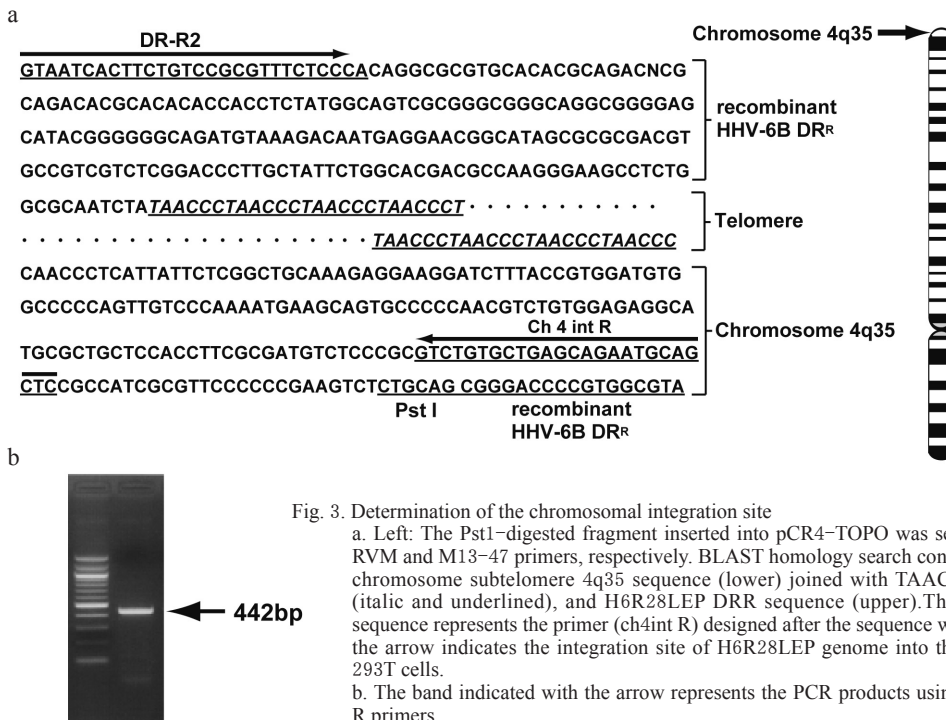


Fig. 3. Determination of the chromosomal integration site

a. Left: The *Pst*I-digested fragment inserted into pCR4-TOPO was sequenced using M13-RVM and M13-47 primers, respectively. BLAST homology search confirmed the presence of chromosome subtelomere 4q35 sequence (lower) joined with TAACCC telomere repeats (italic and underlined), and H6BR28LEP DRR sequence (upper). The arrow at the lower sequence represents the primer (ch4int R) designed after the sequence was determined. Right: the arrow indicates the integration site of H6BR28LEP genome into the chromosome 4q of 293T cells.
b. The band indicated with the arrow represents the PCR products using DR-R2 and Ch4int R primers.

定量的real-time PCRを施行し、HHV-6ゲノムコピー数を測定した。1細胞あたりのHHV-6ゲノムコピー数はいずれの領域においても1-2コピーの範疇であり、293T細胞ゲノムにH6BR28LEPゲノム全長が1コピー組み込まれている所見に矛盾しないものであった (Fig. 4)。

5. 293TintH6BにおけるウイルスmRNA発現

293TintH6Bを、HHV-6モノクローナル抗体OHV-1, OHV-2, OHV-3を用いて蛍光抗体法で染色した (Fig. 5)。野生株 (wt) HHV-6感染293T細胞は抗HHV-6モノクローナル抗体で染色された一方で、H6BR28LEPゲノムが組み込まれた293T細胞は染色されず、組み込み細胞ではウイルス粒子の産生は行われていないことを示唆していた。

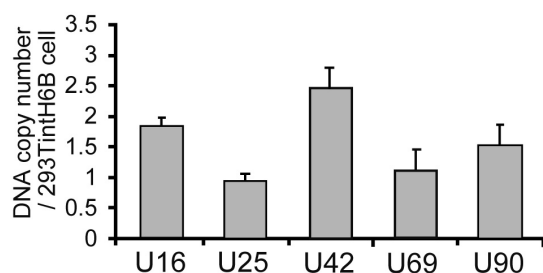


Fig. 4. Quantitative real-time PCR analysis of H6BR28LEP genomic DNA copy numbers in 293TintH6B. Total DNA was isolated from 293TintH6B and U16, U25, U42, U69 and U90 genomic DNAs were amplified by quantitative real-time PCR using specific primers and probe, respectively. Data are given as mean \pm 1 standard deviation (n = 2).

HHV-6複製における遺伝子発現は段階的に行われることが知られている²⁴⁾。感染初期に発現を認める遺伝子群を前初期遺伝子、続いて初期遺伝子、もっとも遅く発現する遺伝子群を後期遺伝子と呼び、それぞれの発現を確認することでウイルス増殖に伴う遺伝子発現の経過を追うことが可能である。組み込み細胞ではウイルス粒子の産生は認めなかったが、EGFPの発現は認めた。そこで、それぞれのmRNA発現をreal-time RT PCRで検出することで組み込み細胞におけるウイルス遺伝子発現を確認した。前初期遺伝子U90 mRNAと初期遺伝子U25, U42 mRNA, の発現は認めたものの、後期遺伝子U60-66 mRNAは検出されなかった (Fig. 6)。

6. 組み込み293T細胞における継代によるウイルスmRNA発現量の変化

293TintH6Bを継代培養したところ、継代5代目でEGFPの発現はほぼ消失した (Fig. 7a)。染色体に組み込まれたH6BR28LEPゲノムが、継代とともに脱落、消失していった可能性を考慮し、EGFP発現減弱後に再度total DNAを精製し、U16, U25, U42, U69, U90のDNAコピー数をreal-time PCRで測定した。すると、いずれのHHV-6遺伝子もEGFPが発現していた継代初期と同様に、1コピー前後の範囲で維持されていた (Fig. 7b)。

一方でウイルスmRNAは、継代数にしたがって減弱する傾向にあり (Fig. 7c)、ゲノムの組み込みは維持されているにもかかわらず、継代の反復

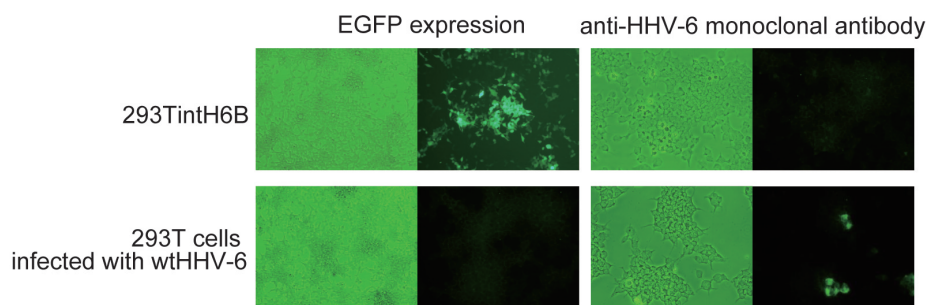


Fig. 5. Immunofluorescent analysis of HHV-6 protein expression in 293TintH6B

Upper and lower left show the EGFP expression of primary 293TintH6B and 293T cells infected with wild type (wt) HHV-6 under fluorescent microscopy. Upper and lower right show the HHV-6 protein expression in each cell using anti-HHV-6 monoclonal antibody (mixture antibody of OHV-1, OHV-2 and OHV-3). Despite of the EGFP expression, each HHV-6 protein was not detected in 293TintH6B cells.

とともにmRNA発現は抑制されていく可能性を示唆していた。

IV. 考 察

HHV-6ゲノムのヒトゲノムへの組み込み (chromosomally integrated HHV-6, CIHHV-6) についての報告は、1993年にLuppiらによってなされて以来⁶⁾、健常成人、担癌患者含め、多数行われている。本邦においては健常人において、約0.21%にCIHHV-6を認めるとの報告がある⁸⁾。CIHHV-6を伴う健常人において特定の疾患との関連性は明確にはなっていないが、臓器移植患者においてCIHHV-6を伴う場合は、細菌感染症や拒絶反応のリスクが上昇するという報告や²⁵⁾、脳炎患児やホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫の患者でCIHHV-6の割合が高いとの報告もあり^{7) 26)}、特定疾患発症の危険因子となっている可能性は指摘されている。また、CIHHV-6はすべての有核細胞に認められ、全血からの定量的PCRでは通常 1×10^6 コピー/ml以上のHHV-6ゲノムが検出されてしまうため、抗ウイルス剤の投与が必要な活動性感染患者と誤診される可能性も指摘されている²⁷⁾。このようにCIHHV-6の臨床的な意義は近年注目されてきているが、ウイルス動態の観点から詳細なメカニズムはいまだ解明されていない。そこで、今回我々は新たに作製した組み換えHHV-6B (H6BR28LEP) を用いた、HHV-6ゲノムが組み込まれた細胞株の樹立と、成立した細胞株によるCIHHV-6の解析をおこなった。HHV-6Aを用いたゲノム組み込みモデルの報告は以前になされているが¹⁸⁾、バリエーションBによるゲノム組み込みモデルの報告は今回が初めてである。本邦におけるHHV-6感染は多くがバリエーションBによるものであることが知られており、HHV-6Bゲノム組み込みの機序や病態との関連を明らかにすることは大きな意義があると考えられる。

H6BR28LEPは、抗生剤puromycinとLNGFR (CD271) タンパクに結合する磁気マイクロビーズを用いることにより、感染細胞を選択的に抽出できる。また、H6BR28LEPの293T細胞への感染では、感染性ウイルス粒子の産生を認めず、感染

細胞が長期間にわたって生存することが確認された (データ掲載せず)。H6BR28LEP感染293T細胞のこのような性質は、ゲノム組み込みの検討には最適と考えられたため、H6BR28LEPと293T細胞の両者を利用して、HHV-6Bゲノム組み込み細胞モデルを作製することにした。

HHV-6ゲノムの両端に存在するdirect repeat (DR) 領域はTAACCCの繰り返し配列を含み (Fig. 1a, 2a)、この配列がヒトゲノムのテロメア配列と相同するため、HHV-6ゲノムが相同組み換えでヒトゲノムのテロメア領域に組み込まれる可能性が示唆されている¹⁹⁾。今まで報告されているものに関しては、CIHHV-6が検出された領域はすべてテロメア配列内であり、さらに、HHV-6同様にゲノム両端にテロメア様配列を有するMarek's disease virus (MDV) も宿主細胞のテロメア領域に組み込まれることが知られている^{12) 19)}。そこで今回我々は、H6BR28LEPと293T細胞を用いて、染色体にHHV-6Bゲノムが組み込まれた293T細胞の樹立を試みるに当たり、HHV-6B DRR領域におけるテロメア様配列からヒトゲノムテロメア領域への組み込み配列を同定するアプローチを採用した。樹立したH6BR28LEPゲノム組み込み

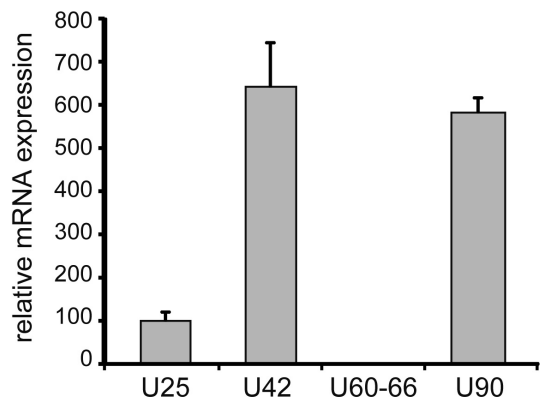


Fig. 6. Relative mRNA expression at the beginning of 293TintH6B cell establishment. Total RNA was extracted from 293TintH6B. RNA samples were reverse-transcribed and amplified by using U25, U42, U60-66 or U90-specific primers and probes, respectively. Although the immediate early gene (U90) and the early gene (U25, U42) mRNA expression were detected, the late gene (U60-66) mRNA expression was not amplified. Data are given as mean \pm 1 standard deviation (n = 2).

293T細胞 (293TintH6B) のゲノム配列を解析したところ、H6BR28LEPゲノムはDRR領域のテロメア様配列から chromosome 4q35 テロメア領域へと連絡しており、新たに確立した HHV-6 組み込み細胞株 293TintH6B には従来の報告通りにテロメア領域に H6BR28LEPゲノムが組み込まれていることが明らかとなった (Fig. 3)。

また、HHV-6BゲノムDNA全域に分布する遺伝子、U16, U25, U42, U69, U90各領域におけるDNAコピー数を real-time PCR で検討したところ、1細胞あたりに含まれる各遺伝子は1コピー程度であった (Fig. 4)。Real-time PCR の測定精度を考慮すると、chromosome 4q35 領域に1コピーの H6BR28LEPゲノム全長が組み込まれていることが強く示唆された。HHV-6ゲノムは増殖性感染時には、感染性ウイルス粒子由来の直鎖状DNAから環状DNAを形成し、多数のゲノムが連結する concatemer の形態を経て複製される。HHV-6ゲノムの宿主ゲノムへの組み込みが、DNA複製のどの段階で発生するのかは議論が分かれるが、concatemer形成時にテロメア領域における相同組み換えが成立した場合は、複数コピーの HHV-6ゲノムがヒトゲノムに組み込まれるこ

とになる。今回行った real-time PCR による検討では、293TintH6B に複数の H6BR28LEPゲノムが組み込まれている状況は否定的であり、直鎖状DNAの形態で相同組み換えを起こした可能性が高いと考えられた。また、real-time PCR で明らかになった HHV-6ゲノムコピー数が1コピー程度であったことから、293TintH6B細胞では HHV-6B のDNA複製が行われていないことも証明された。

HHV-6Bが非増殖性感染を起こす293T細胞同様、293TintH6Bの培養上清中に感染性ウイルス粒子の産生は認めなかったが、一方で、293TintH6B樹立当初はEGFPの発現を認めた (Fig. 5)。そこで、ウイルス構造タンパク複製の有無を蛍光抗体法で観察したところ、293TintH6Bは抗HHV-6モノクローナル抗体で染色されず、HHV-6タンパク産生も抑えられていることが明らかとなった (Fig. 5)。今回使用した抗HHV-6モノクローナル抗体、OHV-1, OHV-2, OHV-3は、それぞれOHV-1は初期遺伝子U39タンパク (glycoprotein B)、OHV-2は初期遺伝子U41タンパク、OHV-3は後期遺伝子U48タンパク (glycoprotein H) に対するモノクローナル抗体である^{20) 21) 28) 29)}。このことから、樹立当初から

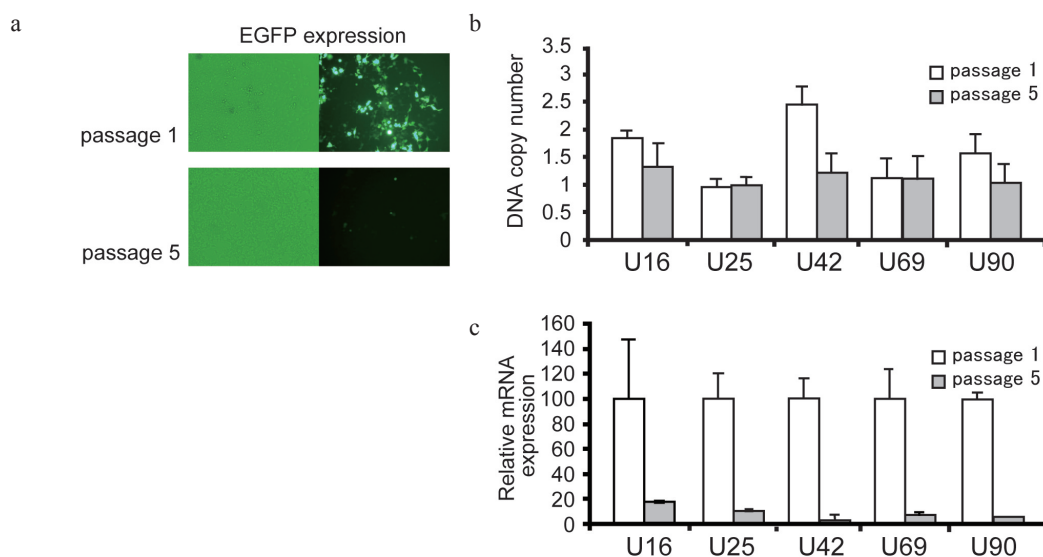


Fig. 7. Alteration of HHV-6 gene expression in 293TintH6B by passage number

a. EGFP expression in 293TintH6B at passage 1 (upper) and passage 5 (lower) under fluorescent microscopy.

b. DNA copy numbers of 293TintH6B at passage 1 and 5 were determined by quantitative real-time PCR. Data are given as mean \pm 1 standard deviation (n = 2)

c. Relative mRNA expression of 293TintH6B at passage 1 and 5 were determined by real-time RT-PCR. Each mRNA expression was silenced in 293TintH6B cells at passage 5. Data are given as mean \pm 1 standard deviation (n = 2).

293TintH6Bにおいては、HHV-6Bの初期遺伝子タンパクから後期遺伝子タンパクに至るまでウイルスタンパクの産生が抑制されていることが分かった。

つぎに、H6BR28LEPのmRNA発現を解析するために、HHV-6前初期遺伝子(U90)、初期遺伝子(U25, U42)、後期遺伝子(U60-66)mRNAをreal-time RT-PCRでそれぞれ測定した。ヘルペスウイルスの遺伝子発現は、感染後最も早く発現する前初期遺伝子タンパクが初期遺伝子発現を誘導し、初期遺伝子タンパクが後期遺伝子発現を誘導するというように、順序立った厳密なカスケードにしたがって制御されていることが知られている。293TintH6BにおけるHHV-6 mRNAは、感染初期から発現を認める前初期遺伝子・初期遺伝子に関しては発現を認めたが、後期遺伝子U60-66 mRNAの発現は認めなかった (Fig. 6)。以上のHHV-6 mRNA発現の検討と、前述の蛍光抗体法によるHHV-6タンパク発現の検討から、293TintH6B成立初期には、初期遺伝子mRNAの翻訳の過程でウイルス複製が制御されている可能性が示唆された。

さらに、293TintH6Bの培養を継続したところ、EGFP発現は次第に減弱し、継代5代目には消失した (Fig. 7a)。EGFP消失後の293TintH6Bにおける、real-time PCRによるHHV-6ゲノムDNAの検討から (Fig. 7b)、EGFPの消失は、組み込まれたHHV-6ゲノムの脱落によるものではなく、遺伝子サイレンシングによる可能性が示唆された。HHV-6 mRNA発現も、継代数にともなって減弱する傾向にあり (Fig. 7c)、HHV-6ゲノム組み込みが維持されているにもかかわらずmRNA発現が減衰していることから、ホストゲノムに組み込まれたHHV-6遺伝子発現は経過とともに抑制されていくことが明らかになった。このようなサイレンシング機構の具体的な解明は今後の課題であるが、293TintH6Bに関しては、concatemerの形態ではなく、直鎖状のDNAが1コピー組み込まれたことに要因の一つがあるものと考えられた。すなわち、DR内のテロメア様配列における相同組み換えでは、HHV-6ゲノムの両端に存在するDRの片方が失われパッケージングシグナルが消失することにより、複製過程における、環状DNAか

らconcatemerの形成が不可能となり、結果、遺伝子複製から感染性ウイルス粒子産生に至る工程が滞るからである。

CIHHV-6は全ての体細胞に対して認められるため、染色体への組み込みは生殖細胞の段階で行われると考えられている³⁰⁾。HHV-6が生殖細胞に感染後、増殖性感染を起こす、もしくは、強力にウイルス遺伝子、ウイルスタンパクの産生を維持し続けた場合、その後に生殖細胞が正常な分化、成長を成し遂げることは難しい。今回我々が樹立したHHV-6ゲノム組み込み293T細胞において、組み込み成立当初は、後期遺伝子以外のHHV-6遺伝子発現を認めたが、細胞が増殖し継代が繰り返されるにつれて、いずれの遺伝子もサイレンシングされていった。この現象は、生殖細胞を含むすべての体細胞におけるゲノムへのHHV-6組み込みの初期像を観察している可能性が高いと考えられた。HHV-6は遺伝子発現を抑制した状態でテロメア領域に組み込まれることにより、安定した潜伏感染状態を維持しているものと考えられた。

今回の研究で確立した293TintH6Bは、HHV-6に特徴的な現象であるHHV-6ゲノム組み込み機構や疾患との関連に関する実験系を提供するのみならず、潜伏感染におけるウイルス遺伝子の維持機構や再活性化機構の解明に大きく貢献するものと考えられた。

V. 結 語

今回我々は組み換えHHV-6Bを用いて、HHV-6Bゲノムが染色体テロメア領域に組み込まれた293T細胞を新たに作製した。ウイルス遺伝子発現は経過とともに抑制されていき、HHV-6Bゲノムはヒト染色体テロメア領域内で安定的に維持されていることが分かった。このことは、HHV-6Bゲノムが、世代を超えてすべての体細胞内で維持される現象の機構解明に手がかりを与えるのみならず、HHV-6の潜伏感染・再活性化の解明に関する有用な実験系を提供するものであった。

著者の利益相反 (conflict of interest: COI) 開示:

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders, *Science*. 1986; 234: 596-601.
- 2) Ablashi DV, Agut H, Berneman Z, Campadelli-Fiume G, Carrigan D, Ceccherini-Nelli L, et al. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch Virol*. 1993; 129: 363-6.
- 3) Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol*. 1991; 72: 1401-8.
- 4) Kondo K, Kondo T, Shimada K, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol*. 2002; 67: 364-9.
- 5) Kondo K, Nozaki H, Shimada K, Yamanishi K. Detection of a gene cluster that is dispensable for human herpesvirus 6 replication and latency. *J Virol*. 2003; 77: 10719-24.
- 6) Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol*. 1993; 40: 44-52.
- 7) Torelli G, Barozzi P, Marasca R, Cocconcelli P, Merelli E, Ceccherini-Nelli L, et al. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells *in vivo*. *J Med Virol*. 1995; 46: 178-88.
- 8) Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol*. 2004; 73: 465-73.
- 9) Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood*. 1999; 94: 1545-9.
- 10) Matsuo T, Heller M, Petti L, O'Shiro E, Kieff E. Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science*. 1984; 226: 1322-5.
- 11) Delecluse HJ, Bartnizke S, Hammerschmidt W, Bullerdiek J, Bornkamm GW. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol*. 1993; 67: 1292-9.
- 12) Delecluse HJ, Hammerschmidt W. Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *J Virol*. 1993; 67: 82-92.
- 13) Hall CB, Caserta MT, Schnabel K, Shelley LM, Marino AS, Carnahan JA, et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics*. 2008; 122: 513-20.
- 14) Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Shelley LM, Carnahan JA, Mario AS, et al. Transplacental congenital human herpesvirus 6 infection caused by maternal chromosomally integrated virus. *J Infect Dis*. 2010; 201: 505-7.
- 15) Mori T, Tanaka-Taya K, Satoh H, Aisa Y, Yamazaki R, Kato J, et al. Transmission of chromosomally integrated human herpesvirus 6 (HHV-6) variant A from a parent to children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection. *Transpl Infect Dis*. 2009; 11: 503-6.
- 16) Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol*. 2007; 79: 45-51.
- 17) Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, Virgili A, Howard J, Leong HN, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol*. 2008; 80: 1952-8.
- 18) Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayer A, Ablashi D, et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 5563-8.
- 19) Kaufer BB, Jarosinski KW, Osterrieder N. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J Exp Med*. 2011; 208: 605-15.
- 20) Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol*. 1999; 73: 5926-33.
- 21) Okuno T, Sao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M, Yamanishi K. Analysis of a glycoprotein of human herpesvirus 6 (HHV-6) using monoclonal antibodies. *Virology*. 1990; 176: 625-8.
- 22) Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*. 2004; 119: 355-68.
- 23) Gompels UA, Macaulay HA. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol*. 1995; 76: 451-8.
- 24) Yamanishi K, Mori Y, Pellett PE. Human herpesviruses 6 and 7. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*.

- 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.2819-45.
- 25) Lee SO, Brown RA, Razonable RR. Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2011; 92: 224-9.
- 26) Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol*. 2005; 32: 183-93.
- 27) Hubacek P, Maalouf J, Zajickova M, Kouba M, Cinek O, Hyncicova K, et al. Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica*. 2007; 92: e98-100.
- 28) Okuno T, Shao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M, Yamanishi K. Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J Gen Virol*. 1992; 73: 443-7.
- 29) Mori Y, Dhepakson P, Shimamoto T, Ueda K, Gomi Y, Tani H, et al. Expression of human herpesvirus 6B rep within infected cells and binding of its gene product to the TATA-binding protein *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*. 2000; 74: 6096-104.
- 30) Pellett PE, Ablashi DV, Ambros PF, Agut H, Caserta MT, Descamps V, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol*. 2012; 22: 144-55.