

学位論文題名

PCR法による Epstein-Barr ウイルスの
ヒト体内常在部位と遺伝子発現の検討

学位論文内容の要旨

【はじめに】

Epstein-Barr ウイルス(EBV)は広汎なヒトへの浸淫を示す一方で、様々な悪性腫瘍の成因にも密接な関連を有している。EBVは主として幼小児期に初感染後、宿主免疫による制御のもと、通常は終生不顕性感染として経過する。しかしこの不顕性持続感染は、様々な危険要因の関与を契機として破綻、しばしばEBV本来の腫瘍原性が顕在化する。EBVが種々の組織に感染、多様な疾患を惹起する可能性が示されつつある現在、EBVのヒト体内組織分布とその発現を明確にすることは、不顕性感染の維持と破綻に至る過程、ひいてはEBV関連疾患発生機序を知る上で重要である。従来EBVは口腔咽頭上皮とBリンパ球に感染・常在することが明らかにされているが、他の全身諸臓器組織に対してEBV体内局在の系統的検索を施行した報告は極めて乏しく、その詳細は依然不明である。

ヒトEBV感染における以上のような未知の点を明らかにする目的で、本研究は polymerase chain reaction(PCR)法を用いて全身諸臓器組織中にEBVゲノムを検索、併せてウイルス遺伝子の発現についてもRNAレベルで検討した。

【材料と方法】

1. 対象および検索材料

EBV関連疾患の既往がなく、分娩時大動脈破裂、心不全、急性心筋梗塞、脳梗塞、気管支喘息、間質性肺炎、肺癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌にて死亡、剖検となった18例(男11名、女7名、年齢22~81才、平均63.8才)のEBV既感染者を対象とした。剖検時、舌・口腔内上皮・唾液腺、頸部・腋窩・腸間膜・鼠径部の各リンパ節、食道、胃噴門側・幽門側、十二指腸、空腸、回腸、大腸、気管、肺、肝臓、胆嚢、膵臓、心筋、脾臓、骨髄、膀胱、腎臓、副腎より組織の一部を採取、速やかに凍結保存した。

2. PCRによる各組織中EBV DNA 検索

各組織からproteinase-K/SDS/phenol法にて抽出・精製したDNAに対し、EBVゲノムの *Bam* HI-W, -K断片中のそれぞれ125 bp, 209 bpを増幅するprimer対 (以下W-primer, K-primerと記す)を用いてDNA-PCRを行った。

3. EBV遺伝子発現検索

EBV潜伏感染遺伝子中、細胞内ウイルスゲノムの維持あるいはBリンパ球不死化活性に必須の特異核内抗原(EBNA)1, EBNA2, 潜伏感染膜蛋白(LMP)1, LMP2A, LMP2B各遺伝子と、EBV複製サイクルに重要な前初期遺伝子 *Bam* HI-Z leftward open reading frame no. 1(BZLF1)につき、逆転写 (RT)-PCR法でmRNA発現を検討した。被検組織より単相phenol/guanidine isothiocyanate法にて抽出・精製した全RNAをもとに、各mRNA特異的3'-primerを用いてcDNAを合成後、特異5'/3'-primer対による増幅を行った。

4. 特異的PCR産物の検出

PCR産物をアガロース電気泳動後、nested PCRはethidium bromide染色にて、他は³²P標識した特異内部プローブによるSouthern blot hybridizationにて判定した。

【結果】

1. PCRの検出感度

既知のEBV陽性細胞株中、定量性の面で有用と思われる細胞株を適宜選択し、各PCRの検出感度を検討したところ、W-及びK-primerによるDNA-PCRではそれぞれ1, 5 EBVゲノムが検出可能であり、またRT-PCRでも細胞1-2個相当のレベルのmRNAを検出し得たことから、今回採用したPCR検出系は十分な感度を有すると考えられた。

2. 各臓器組織別EBV DNA陽性率

EBV DNAの検出結果はW-, K-両primer間で概ね一致していた。少なくともいずれか一方のprimerによる増幅でEBV DNAが検出された場合をEBV陽性とした場合、各組織別のEBV陽性率は、口腔内上皮・唾液腺・舌15例中13例(13/15) (陽性率86.7%)、食道15/18 (83.3%)、胃噴門部13/18(72.2%)、胃幽門部4/9(44.4%)、十二指腸3/11(27.3%)、空腸3/9 (33.3%)、回腸2/9(22.2%)、大腸0/14(0%)、肝臓0/18(0%)、胆嚢0/12(0%)、脾臓0/13(0%)、気管2/6(33.3%)、肺実質7/17(41.2%)、リンパ節18/18(100%)、脾臓15/17(88.2%)、骨髄4/14(28.6%)、腎臓8/17(47.1%)、副腎7/15(46.7%)、心筋0/12(0%)、膀胱0/12(0%)であった。

3. 各組織におけるEBV遺伝子の発現

対象とした18例中、複数箇所の臓器組織からEBV DNAが検出された3例に対し、RT-PCR法にてEBV遺伝子発現を検討した結果、3例全例のリンパ節にLMP 2AおよびBZLF1 mRNAの発現が認められた。また、このうち1例ではLMP 2BとEBNA1 mRNAもリンパ節に、さらにLMP2A mRNAが胃粘膜組織中にも検出された。一方、脾臓、腎臓ではウイルスDNAは陽性であったものの、LMP 2A, LMP 2B, EBNA1いずれの遺伝子も発現さ

れていなかった。EBNA2とLMP1 mRNAは3例とも検索した全組織で陰性であった。

【考察】

今回の検討結果から、以下の諸点が考察される。① 口腔粘膜・舌・唾液腺などの傍口腔咽頭組織，リンパ節，脾臓，上部消化管がEBVの体内主要常在部位となっている。② リンパ節における潜伏感染遺伝子mRNAの高率な検出結果は，EBVが特異的機能形質を発現しつつリンパ節内に感染細胞として存在することを示している。③ 一部胃粘膜組織にも潜伏感染遺伝子発現が検出され，リンパ系組織以外にもEBV感染細胞が存在する可能性が考えられる。④ EBNA2，LMP1遺伝子はいずれの組織中にも検出されず，両遺伝子蛋白がEBV特異的キラーT細胞の認識抗原でもあることから，こうした潜伏感染遺伝子の選択的発現が，宿主免疫のもとEBVが持続感染する重要な機構のひとつと考えられる。⑤ 前初期遺伝子の発現検索結果から，従来知られる傍口腔咽頭組織とともに，リンパ節も体内EBV増殖の場となっていることが示唆される。⑥ 一方，リンパ節とほぼ同等のEBV DNA量が検出されたにも拘わらず，脾臓ではいずれの遺伝子発現も陰性であり，同じリンパ球に富む組織でありながら，ウイルスの感染様式が組織部位依存的に異なる可能性が考えられる。

【結語】

本研究により，従来不明であったEBVの体内分布と形質発現の概要が明らかになったものと考えられる。これらの成績は，ヒトEBV感染の実態に関する基礎的知見を提供するものであり，今後EBV関連疾患発生の機序解明と予知，および治療面における研究の進展に資するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 里 外 誉 郎
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 細 川 真 澄 男

学 位 論 文 題 名

PCR 法による Epstein-Barr ウイルスの ヒト体内常在部位と遺伝子発現の検討

申請者及川欧の学位論文「PCR法によるEpstein-Barrウイルスのヒト体内常在部位と遺伝子発現の検討」は、Epstein-Barrウイルス(EBV)が多様なヒト悪性腫瘍の病因に関与する可能性が示されつつある現在、未だ不明の体内におけるEBVの存在分布と形質発現を明らかにすることを目的としてなされた研究である。EBV関連疾患の既往のない剖検例18例の各種臓器を、EBV DNA BamHI-W 125bpおよびBamHI-K 209bpを増幅するプライマーを用いてPCR法によりEBV DNAの存在を検索した。EBV遺伝子発現は臓器より抽出されたRNAをEBV遺伝子EBNA1・2・3A・3B・3C・Lp, LMP1・2A・2BのmRNA, およびBZLF1についてRT-PCR法により検索した。その結果、EBV DNAは全例100%のリンパ節と90%の脾臓に検出され、口腔内上皮87%食道83%胃73%が高率であった。一方小腸30%気管33%肺41%骨髄29%腎臓47%副腎47%に検出されたが、大腸・肝臓・胆嚢・脾臓・心筋・膀胱の諸臓器には検出されなかった。RT-PCR法による遺伝子発現の結果は、BZLF-1・LMP2A mRNAがリンパ節全例に検出され、一部胃にLMP2AmRNAが検出された。以上の成績はEBVが全身リンパ組織、上部消化管、上部呼吸器に常在し、主としてリンパ節で増殖発現していることを意味している。

発表に際して、細川教授、吉木教授、皆川教授、小林教授より夫々極めて有意義な質問があり、申請者はおおむね適切な回答をなし得た。その後副査の細川、吉木両教授より個別に面接を受け合格と判定された。

本論文は従来部分的にのみ検索されていたEBVの体内存在部位と発現部位を、初めて系統的に検索しこれを明らかにしたもので、博士(医学)に値する研究と判断するものである。