

学 位 論 文 題 名

Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype
and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata

（バーキットリンパ腫細胞株 Akata の悪性形質およびアポトーシス
抵抗性におけるエプスタイン-バーウイルスの役割に関する研究）

学位論文内容の要旨

エプスタイン-バーウイルス（EBV）はヒトヘルペスウイルス科に属し、1964年 EpsteinとBarrらにより赤道アフリカの小儿に多発するバーキットリンパ腫（BL）の培養細胞から発見された。EBVはヒトの癌ウイルスとして記載された初のウイルスである。EBVはBLのほか、良性の疾患である伝染性単核球症や、その他いくつかの悪性腫瘍、たとえば上咽頭癌、日和見リンパ腫、胃癌などの関連が示唆されている。しかし発癌のメカニズムはいまだ十分には解明されていない。

我々が使用したAkata細胞は、日本人BLに由来する。この細胞は他のBL細胞株には無いユニークな性質を持っている、Akata細胞は長期の培養を続けても、latency Iを維持することができる。latency Iは、EBNA 1、EBERs、BARF0のみが発現し、*in vivo* BL細胞や樹立後間もないBL細胞株はこの感染様式をとる。しかし、培養を続けると、ほとんど全てのBL細胞株はlatency IIIへと変化してしまう。latency IIIでは、上記に加えて5種類のEBNAと3種類のLMPが発現する。latency IIIへと変化した細胞は、もはや生体内での腫瘍細胞の性質を再現しておらず、真の意味でEBVの発癌活性を調査する対象にはならない。Akata細胞は、継代を重ねるうちに徐々にEBVが脱落し、EBV陽性細胞から陰性細胞を分離することができる。EBV陽性BL細胞株からEBV陰性細胞が分離されたのは世界初である。単一の遺伝的背景をもつEBV陽性と陰性のAkata細胞を比較することにより、EBVが細胞にどのような影響を与えるのかを解析することが可能となった。その結果、EBVの脱落に伴い細胞が悪性形質を失うことが明らかになった。これはEBVが細胞の癌形質に寄与していることを示している。本研究にて、我々は（1）EBV再感染系を構築し、EBVが細胞の悪性形質に貢献していることをより直接的に証明した。次に、（2）EBVは*bcl-2*遺伝子の発現を増強させることにより、細胞にアポトーシス抵抗性を付与していることを示した。さらに、（3）これまで発癌活性が指摘されてきたウイルス遺伝子EBNA1は、悪性形質やアポトーシス抵抗性の責任遺伝子ではないことを明らかにした。

（1）これまでEBV陰性Akata細胞にウイルスを感染させて、再感染細胞を分離することは困難であった。我々は、EBV陰性Akata細胞に薬剤耐性遺伝子を組み込んだウイルスを感染させ、薬剤で選択することにより、再感染細胞を容易に分離することに成功した。再感染細胞は親株同様に、latency Iを再現することをウエスタン法およびRT-PCR法により証明した。我々は、ウイルス再感染によりEBV陰性Akata細胞が悪性形質を再獲得するかを確かめるため、軟寒天におけるコロニー形成

能、およびSCIDマウスにおける造腫瘍性について検索した。コントロールとして薬剤耐性遺伝子のみを導入した細胞を用いた。その結果、再感染細胞は軟寒天でコロニーを形成し、SCIDマウスにて造腫瘍性を示したが、コントロールの細胞は、軟寒天でのコロニー形成能およびSCIDマウスにおける造腫瘍性を欠いていた。以上よりEBV陰性Akata細胞がウイルス再感染により悪性形質を再獲得することが明らかになった。Akata細胞において、EBVは細胞の悪性形質に必須であることがより直接的に証明された。

(2) 次に、EBV陽性と陰性のAkata細胞を比較することにより、EBVがアポトーシス抵抗性に寄与することを証明した。EBV陽性と陰性のAkata細胞を紫外線、サイクロヘキシミド、グルココルチコイドで処理してアポトーシスを誘導後、アポトーシスに陥らなかった生細胞をMTT法にて検出し、生存率を算定した。その結果、EBV陽性細胞は陰性細胞と比較して、有意に生存率が高いことが明らかとなった。以上より、EBVがアポトーシス抵抗性に寄与することが示唆された。さらに、EBV陰性Akata細胞がウイルス再感染により再びアポトーシス抵抗性を獲得するかを確かめるために、再感染系を用いてアポトーシス抵抗性を検索した。その結果、再感染細胞の生存率はコントロールに比較して有意に増加していた。以上より、EBV陰性Akata細胞はウイルス再感染によりアポトーシス抵抗性を再獲得することが明らかとなった。これらの結果より、Akata細胞において、EBVは細胞の悪性形質だけでなくアポトーシス抵抗性にも必要であることが証明された。latency IにおいてEBVがアポトーシス抵抗性に貢献していることを示したのは、我々が世界で初めてである。EBVがどのようなメカニズムで細胞にアポトーシス抵抗性を付与しているのかを解明するため、いくつかのアポトーシス関連遺伝子の発現について検索を行った。その結果、抗アポトーシス活性を有する**bcl-2**がウイルス感染細胞にて特異的に発現が増強していることが示された。一方、**bcl-2**発現を誘導することが知られているウイルス遺伝子LMP1や、**bcl-2**と高い相同性を有するウイルス遺伝子BHRF1は、ウイルスが溶解感染に移行してはじめて発現が誘導される。従って、潜伏感染にあるAkata細胞において、これらがアポトーシス抵抗性に関与しているのは否定的であった。以上より、EBVは**bcl-2**遺伝子の発現を増強させることにより、細胞にアポトーシス抵抗性をも付与していることが明らかとなった。

(3) それでは、いずれのEBV遺伝子がAkata細胞に悪性形質やアポトーシス抵抗性を賦与しているのであろうか。Akata細胞には4つのウイルス遺伝子が発現している。EBNA1、EBERs、BARF0、そして少量のLMP2Aである。中でも、EBNA1はウイルスゲノム維持に必須であるだけでなく、トランスジェニックマウスにおいてリンパ腫を発生させたり、上咽頭癌細胞株において癌形質を増強する活性が知られている。我々はEBNA1がAkata細胞に悪性形質やアポトーシス抵抗性を賦与している可能性を考え、EBV陰性Akata細胞にEBNA1を導入することにより細胞が再び悪性形質やアポトーシス抵抗性を獲得するかを検討した。その結果、予想に反してEBV陰性細胞にEBNA1を導入しても、悪性形質やアポトーシス抵抗性は回復しなかった。EBNA1発現細胞における**bcl-2**の発現は増強していなかった。以上より、Akata細胞において、EBNA1が悪性形質やアポトーシス抵抗性の責任遺伝子ではないことが明らかとなった。これらの結果は、従来考えられてきたEBNA1の活性に一石を投じるものである。悪性形質やアポトーシス抵抗性の責任遺伝子を同定するのは、今後の研究課題である。

本研究により、EBVはBL細胞に悪性形質とアポトーシス抵抗性を付与することにより、*in vivo*における造腫瘍性に貢献していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 高 田 賢 蔵

学 位 論 文 題 名

Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype
and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata

(バーキットリンパ腫細胞株 Akata の悪性形質およびアポトーシス
抵抗性におけるエプスタイン-バーウイルスの役割に関する研究)

エプスタイン-バーウイルス (EBV) は、EpsteinとBarrらにより赤道アフリカの小児に多発するバーキットリンパ腫 (BL) の培養細胞から発見されたヘルペスウイルス科に属する癌ウイルスである。EBVはBLのほか、上咽頭癌、日和見リンパ腫、胃癌などとの関連が示唆されている。しかし発癌のメカニズムはいまだ十分には解明されていない。本研究では、生体のBL細胞での潜伏感染様式を長期にわたって保持し、EBVの発癌活性を調査する対象として最適なAkata細胞株の継代を重ねてEBV陰性細胞を初めて分離し、さらにこの細胞に薬剤耐性遺伝子を組み込んだウイルスを感染させ薬剤で選択することによりEBV再感染系を構築した。そして、これらのEBV陽性および陰性Akata両細胞株を比較することにより、EBVが細胞の癌化やアポトーシスにどのような影響を与えるかを解析して以下の成績を得た。(1) EBVが細胞の悪性形質に必須であることを直接的に証明した。(2) EBVがBcl-2遺伝子の発現を増強させることにより、紫外線、サイクロヘキシミド、グルココルチコイドで処理して誘導されるアポトーシスに対する抵抗性を付与していることを示した。この結果より、Akata細胞においてはEBVの潜伏感染が細胞の悪性形質だけでなくアポトーシス抵抗性にも必要であることが初めて証明された。(3) ウイルスゲノム維持に必須であるだけでなく、トランスジェニックマウスにおいてリンパ腫を発生させたり、上咽頭癌細胞株において癌形質を増強する活性が知られているウイルス遺伝子EBNA1は、単独では悪性形質やBcl-2遺伝子の発現増強およびアポトーシス抵抗性を誘導しないことを明らかにした。

審査に当たっては、副査吉木教授より、1. EBV陽性および陰性両細胞とくに核での形態の差異について、2. Bcl-2 ファミリー蛋白質のうちアポトーシスの誘導に働くBax

の発現について、3. アポトーシスをおこす癌抑制蛋白質p53の発現に変化がなかったかについて、4. EBVが関与している胃癌でも同様の機構があてはまるかについて、5. 細胞のアポトーシスを回避する他のウイルスの遺伝子について質問があった。申請者はこれらの質問に対して的確な回答をおこなった。さらに副査高田教授より、1. 今回観察されたAkata細胞の所見が一般のバーキットリンパ腫の癌化機構に普遍化できるかについて、2. myc癌遺伝子の転位および発現との関係について、3. EBV陰性のバーキットリンパ腫の原因をどのように考えるかについて質問があった。発表者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。また主査葛巻より、1. EBNA1が癌化に関与していないことに関して、他の因子と共同して作用している可能性について、2. EBERs、BARF0、LMP2Aの癌化における役割の可能性について、3. EBVがBcl-2発現を高める機構について、4. EBV関連蛋白質LMP1が発現を高めると報告のある転写調節因子A20や逆に発現を抑えるというmyc癌遺伝子の発現について質問をおこなった。また、細川教授からEBV感染細胞の免疫原性や免疫感受性の変化について質問がなされた。申請者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。

この論文は、EBVがリンパ球に悪性形質とアポトーシス抵抗性を付与することによりバーキットリンパ腫細胞へと転換させ、かつその造腫瘍性にも貢献していることを初めて明確に証明した。今後悪性形質やアポトーシス抵抗性の責任遺伝子が同定され、EBVによる癌化機構が一層明らかになることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。