

学 位 論 文 題 名

Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded
RNA (EBER) for efficient EBV-induced
B-lymphocyte growth transformation

(EB ウイルスがコードする小 RNA 分子、
EBER の B リンパ球トランスフォーメーション活性に関する検討)

学位論文内容の要旨

Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス) は、ヘルペスウイルスの一種で、成人の 95% 以上に無症候性に感染している普遍的なウイルスである。一方で、バーキットリンパ腫および上咽頭がん、T/NK 細胞リンパ腫、ホジキン病、胃がんなど、様々な疾患への関与も明らかにされている。主な感染の標的はヒト B リンパ球で、潜伏感染の形態をとる。また試験管内において B リンパ球に EB ウイルスを感染させると、感染リンパ球は不死化して lymphoblastoid cell line (LCL) と呼ばれる無限増殖する細胞株となる。EB ウイルスによる B リンパ球の不死化には、ウイルスがコードする膜タンパク質 LMP1 および核抗原 EBNA2 が重要な役割を果たしていることが知られているが、EBER はリンパ球不死化には必須ではないと報告されている。しかしながら一方で、LMP1 や EBNA2 を発現していない EB ウイルス感染バーキットリンパ腫細胞において、EBER が細胞増殖能の増強やアポトーシス抵抗性の賦与、細胞増殖因子の発現を誘導するなど、様々な作用を持つことが明らかになってきた。

EBER は宿主の RNA ポリメラーゼ III によって転写される、3'末端にポリ A 配列のない小 RNA であり、EB ウイルス感染細胞において普遍的かつ多数コピー (1 細胞あたり最大 10^7 コピー) 存在する。EBER には EBER1 および EBER2 の 2 種類が存在し、複数のステムループ構造を含む高度な二次構造を形成すると予想されている。多くの EB ウイルス株間で EBER の塩基配列は良く保存されており、EBER1 では 100% 同一、EBER2 において 2 塩基置換が認められるに過ぎない。

本研究では、EB ウイルス感染バーキットリンパ腫細胞でみられる EBER の作用が、EB ウイルスの B リンパ球トランスフォーメーション効率に寄与しているのではないかと考え、EBER の役割を再検討することにした。本研究では、Akata 細胞を用いた組換えウイルス産生系を用いて EBER ノックアウト EB ウイルスおよび EBER 再導入 EB ウイルスを作製し、その B リンパ球トランスフォーメーション効率の検討を定量的に行った。

EBER ノックアウト EB ウイルス[EBER(-)EBV]の作製は、Akata 細胞における相同組換え法および Cre/loxP システムによるマーカー遺伝子の除去により行った。また、組換え EB ウイルスを大量に調製するために、抗イムノグロブリン抗体処理により効率よく

ウイルス産生可能な Akata 細胞を組換えウイルス産生細胞として用いた。EBER(-)EBV 感染 Akata 細胞のウイルス産生量を調べた結果、EBER が野生型である Neo^REBV 感染細胞と同程度であることがわかった。また、等量のウイルスを EB ウイルス陰性 Akata 細胞に感染させ、その感染効率を比較した結果、組換え EBV の感染効率に差は見られなかった。このことから、EBER ノックアウトはウイルス産生と感染効率に影響しないことが明らかとなった。

組換え EB ウイルスの B リンパ球トランスフォーメーション効率は、臍帯血リンパ球に等量のウイルスを感染させ、6 週間培養後の 50% 不死化濃度を比較することにより検討した。その結果、EBER(-)EBV のトランスフォーメーション効率が、EBER が野生型である Neo^REBV の約 1/100 まで低下したことが明らかとなった。

このトランスフォーメーション効率の低下が、EBER ノックアウトによるものであることを確かめるために、EBER 遺伝子を EBER(-)EBV ゲノム上に導入した、EBER 再導入 EB ウイルス[EBER(+)]EBV を作製した。EBER(+)]EBV の作製は、EBER ノックアウトと同様の方法で行った。

EBER(-)EBV、EBER(+)]EBV および EBER が野生型である Neo^REBV の B リンパ球トランスフォーメーション効率を比較した。その結果、EBER 欠損により Neo^REBV の約 1/100 まで低下した EBER(-)EBV のトランスフォーメーション効率が、EBER 再導入により Neo^REBV と同程度まで回復したことから、EBER(-)EBV でみられた B リンパ球トランスフォーメーション効率の低下は EBER 除去によるものであることが明らかとなった。

また、LCL における EBV 遺伝子の発現パターンをイムノブロットにより調べたところ、EB ウイルスによる B リンパ球の不死化に必須である、膜タンパク質 LMP1 や核抗原 EBNA の発現量に有意な差はみられなかった。したがって、EBER が LMP1 や EBNA を介した経路でトランスフォーメーション効率に寄与する可能性は否定できると考えられる。

次に、それぞれの組換え EBV で樹立した LCL の増殖速度を比較したところ、EBER(-)EBV 感染細胞の増殖速度が、EBER が野生型である Neo^REBV 感染細胞と比較して著しく低下していることがわかった。一方で、EBER(+)]EBV 感染細胞の増殖速度は Neo^REBV 感染細胞と同程度に回復していた。さらに、組換え EBV で樹立した LCL を低密度で培養した時の細胞増殖を比較した結果、Neo^REBV または EBER(+)]EBV で樹立した LCL が低密度培養時においても増殖できたのに対し、EBER(-)EBV で樹立した LCL は増殖できなかった。以上 2 つの実験結果から、組換え EB ウイルスで樹立した LCL において、EBER が発現していることによりその増殖能が増強されることが明らかとなった。

組換え EB ウイルスで樹立した LCL において、これまで報告されたような EBER によるアポトーシス抵抗性の賦与および増殖因子の発現誘導などに関して検討を行ったが、調べたものに関しては EBER の関与は認められなかった。

本研究により、EB ウイルスによる B リンパ球トランスフォーメーションにおいて、EBER が重要な貢献をしていることが初めて明らかとなった。近年、マイクロ RNA などの、タンパク質をコードしていない小 RNA の機能分子としての重要性が広く認識されつつある。したがって、EB ウイルスが EBER のような非翻訳 RNA を感染細胞内で多量に発現することにより、何らかのメカニズムで感染細胞が増殖優位性を獲得するよう機能していると考えられる。今後は、その分子メカニズムの解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司

副 査 教 授 有 川 二 郎

副 査 教 授 高 田 賢 藏

学 位 論 文 題 名

Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA (EBER) for efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation

(EB ウイルスがコードする小 RNA 分子、
EBER の B リンパ球トランスフォーメーション活性に関する検討)

EB ウイルスがコードする小 RNA、EBER は、EB ウイルス感染細胞において普遍的かつ多数コピー存在している。EBER は、EB ウイルスによる B リンパ球トランスフォーメーションにおいて必須ではないとの報告があるが、一方では EB ウイルス感染バーキットリンパ腫細胞などにおいて細胞増殖能の亢進やアポトーシス抵抗性の賦与、増殖因子の発現誘導など様々な作用を持つことも報告されている。このような背景のもとで、申請者は、本研究の目的が EB ウイルスによる B リンパ球トランスフォーメーションにおける EBER の役割を再検討することであることを説明した。ついで、EBER ノックアウトウイルス作製に用いた Akata 細胞を使った組換えウイルス産生系について簡潔に説明した後、EBER ノックアウトウイルスの作製法およびその表現型の解析へと話を進めた。実験結果として、EBER 除去がウイルスの感染効率に影響しなかったことを示した後、野生型ウイルスと比較して EBER ノックアウトウイルスの B リンパ球トランスフォーメーション効率が低下したというデータを示した。続いて、EBER 再導入ウイルスの作製とその表現型の解析に関するデータを示し、EBER 再導入により EBER ノックアウトウイルスの B リンパ球トランスフォーメーション効率が回復したこと、さらに EBER ノックアウトウイルス感染細胞においてみられた増殖速度の低下が EBER 再導入により回復したことを説明した。以上より、申請者は、EBER が EB ウイルスによる B リンパ球トランスフォーメーションに寄与していると結論した。

質疑応答として、まず、有川教授より、①EBER 再導入後にトランスフォーメーション効率が 100%回復しなかった原因、②EBER 再導入ウイルス感染細胞における EBER の発現量の野生型ウイルス感染細胞との比較、③EBER のトランスフォーメーションへ

の関与には EBER が非常に多量に発現していることが必要なのか、④他のウイルスや宿主細胞がコードする非翻訳 RNA に EBER と相同性のあるものは知られているか、という質問があった。申請者は、①～③に対して、EBER 再導入ウイルス感染細胞では野生型ウイルス感染細胞と比較して EBER の発現量が低かったことが、トランスフォーメーション効率が完全に回復しなかった原因と考えられること、また、感染細胞における EBER の発現量がトランスフォーメーション効率に影響を与えた可能性があるとの見解を示した。④についてはアデノウイルス VA RNA と宿主細胞の U6RNA を挙げたが、一部正確さを欠く点があった。

続いて、瀬谷教授より、①B リンパ球の EB ウイルスレセプターが CR2 であるかという確認、②EB ウイルスの初感染のメカニズム、③EB ウイルスが上咽頭領域の粘膜に進入するプロセス、④EB ウイルスが上皮細胞に感染するエビデンスがあるのか、⑤上皮細胞の EB ウイルスレセプター、⑥RNA ウイルスと比較して DNA ウイルスである EB ウイルスは変異しやすいのか、⑦EBER がマイクロ RNA として機能する可能性も含めて、EBER が EB ウイルスによる B リンパ球トランスフォーメーションにおいてどのようなメカニズムで宿主側の遺伝子発現を制御しうるのか、という質問があった。①～⑥に対して、一部の質問には適切に答えられなかったが、申請者は、B リンパ球の EB ウイルスレセプターは CR2 であるが上皮細胞では CR2 レセプターを介さないメカニズムが想定されていること、ヘルペスウイルスの中では変異の程度が低いことなどを説明した。⑦について、マイクロ RNA として機能する可能性に関しては未検討であり、メカニズムは現時点では不明であるとのことだった。

最後に、高田教授より、①EBER 再導入ウイルス感染細胞で EBER の発現量が低下した原因、②トランスフォームリンパ球において増殖因子の発現の比較は行ったか、という質問があった。申請者は、スライドを示しながら EBER の発現に重要であると報告されている制御領域について説明し、今回行った改変が EBER の発現に影響を与えた可能性について言及した。また、本研究の EBER ノックアウトウイルスを用いた解析では、増殖因子の発現に EBER の関与は認められなかったとのことだった。

本学位論文は、タンパク質に翻訳されない小 RNA 分子 EBER が、EB ウイルスによる B リンパ球トランスフォーメーションに寄与することを初めて見出したものである。EBER がどのような分子メカニズムで B リンパ球トランスフォーメーション効率に寄与しているかという点については今後の課題として残されているものの、全体としては優れた実験系を用いた意義深い研究であると高く評価できる。今後、EBER の作用機序の分子メカニズムの解明を通じて、ウイルスと細胞の相互作用の新たな局面が明らかにされるものと期待される。

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。