

学 位 論 文 題 名

Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded *BARF1* Gene Is  
Expressed in Nasopharyngeal Carcinoma and  
EBV-Associated Gastric Carcinoma Tissues in the  
Absence of Lytic Gene Expression

(EB ウイルスがコードする *BARF1* 遺伝子の上咽頭癌および  
EB ウイルス関連胃癌における発現解析に関する研究)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

Epstein-Barr ウイルス (EBV) はヘルペスウイルスの一種で、バーキットリンパ腫 (BL) をはじめとするリンパ系の癌だけでなく、上咽頭癌 (NPC) や胃癌 (GC) といった上皮系の癌とも関連している。EBV がコードする *BARF1* 遺伝子はマウス線維芽細胞をトランスフォームすることやサル初代上皮細胞を不死化するというオンコジーンとしての活性を有することが報告されている。また *BARF1* はプロトオンコジーンであるヒトコロニー刺激因子 1 レセプター (hCSF-1R) とアミノ酸レベルでホモロジーを有する。リコンビナント *BARF1* 蛋白質は *in vitro* において hCSF-1R のリガンドである hCSF-1 と結合することから、*BARF1* が CSF-1 のアンタゴニストとして免疫調節に関わる可能性が指摘されてきた。

EBV 関連上皮癌では全ての癌細胞に完全長 EBV ゲノムがウイルス産生のない潜伏感染状態で存在している。BL 由来 EBV 陽性 B 細胞株における解析では、*BARF1* は潜伏感染時には発現しておらず、溶解感染 (ウイルス産生) 時に誘導されることから、溶解感染遺伝子群のひとつとして分類されてきた。過去の研究から *BARF1* 遺伝子が EBV 関連上皮癌組織において高頻度に発現していることが RT-PCR 法や NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) 法により示されたが、その発現は一部の溶解感染に移行した細胞における発現を反映していると考えられていた。

本研究では EBV 関連上皮癌において *BARF1* が潜伏感染時に発現しているという可能性を考えて、EBV 陽性 GC および NPC 組織における *BARF1* と他の溶解感染遺伝子群の発現を定量 PCR 法により解析した。

【方法と結果】

EBV 陽性細胞株および EBV 陽性 GC、NPC 組織から cDNA を合成し、それらを鋳型とし

て BARF1 およびウイルス溶解感染時に発現する遺伝子群 (BZLF1、BMRF1、BLLF1) について定量 PCR を行った。24 時間抗免疫グロブリン (Ig) 抗体処理を行ってウイルス産生を誘導した EBV 陽性 Akata 細胞をポジティブコントロールとして検量線を作成し、各サンプルのコントロールに対する相対的な発現量を算出した。その結果、EBV 陽性 GC 組織では 6 例中 5 例、NPC 組織では 16 例中 15 例において BARF1 の発現が認められた。一方、溶解感染遺伝子群の発現はほとんど認められなかった。そのうち NPC 2 例では BARF1 が抗 Ig 抗体処理を行った EBV 陽性 Akata 細胞を上回る高いレベルで発現していた。さらに EBV 陽性 GC および NPC のマウス可移植腫瘍についても定量を行い、同様の結果を得た。

次に NPC 組織における BARF1 蛋白質の発現をウェスタンブロッティング法により調べた。その結果、7 例中 5 例では BARF1 蛋白質が検出されず、残り 2 例に低レベルでの発現を認めた。ついで BARF1 の蛋白質としての発現をさらに検討するために BARF1 蛋白質の C 末端側に FLAG タグを付加した FLAG-BARF1 発現プラスミドを作製した。このプラスミドを NPC 由来 EBV 陰性細胞株である CNE1 細胞にトランスフェクションし薬剤選択を行って、FLAG-BARF1 安定発現株を作製した。この安定発現株を 72 時間培養後、細胞ライゼートと培養上清をそれぞれ回収して抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティング法により BARF1 蛋白質の検出を試みた。その結果、BARF1 蛋白質は細胞ライゼート中にはほとんど存在しないが、培養上清中に大量に存在することが明らかとなった。

### 【考察】

本研究において定量 PCR を用いた解析により、BARF1 が EBV 関連上皮癌組織において溶解感染遺伝子の発現とは全く解離した状態、すなわち潜伏感染遺伝子として発現していることを明らかにした。さらに FLAG-BARF1 安定発現細胞を用いた解析から、産生された BARF1 蛋白質が細胞内にとどまらず速やかに細胞外に分泌されることを明らかにした。このことが、RNA レベルで BARF1 の発現が高い NPC 組織においても BARF1 蛋白質の検出が困難である理由と考えられた。

我々はすでに FLAG-BARF1 安定発現細胞の培養上清中に分泌された BARF1 蛋白質が CSF-1 中和活性を有するという実験結果を得ている。CSF-1 は単球およびマクロファージの遊走能、貪食能を活性化するサイトカインである。BARF1 の CSF-1 中和活性は EBV 感染細胞に対する宿主免疫抑制に作用する可能性がある。また BARF1 がいかにしてオンコジーンとしての活性を発揮するのかについては今後の検討課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎

副 査 教 授 志 田 壽 利

副 査 教 授 高 田 賢 藏

## 学 位 論 文 題 名

### Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded *BARF1* Gene Is Expressed in Nasopharyngeal Carcinoma and EBV-Associated Gastric Carcinoma Tissues in the Absence of Lytic Gene Expression

(EB ウイルスがコードする *BARF1* 遺伝子の上咽頭癌および  
EB ウイルス関連胃癌における発現解析に関する研究)

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、上咽頭癌 (NPC) や胃癌といった上皮系の癌と関連している。EBV がコードする *BARF1* 遺伝子はマウス線維芽細胞をトランスフォームすることやサル初代上皮細胞を不死化するといったオンコジーンとしての活性を有することが報告されている。近年の研究から、*BARF1* 遺伝子が NPC や EBV 陽性胃癌組織において高頻度に発現していることが RT-PCR 法などにより示された。そこで申請者は EBV による上皮発癌因子の候補として *BARF1* に着目した。

これまで *BARF1* はバーキットリンパ腫由来 EBV 陽性 B 細胞株における解析から、溶解感染遺伝子群のひとつとして分類されてきた。EBV 関連上皮癌では全ての癌細胞に EBV ゲノムが潜伏感染状態で存在している。そのため EBV 関連上皮癌組織における *BARF1* の発現は、一部の溶解感染に移行した細胞における発現を反映していると考えられていた。申請者は EBV 関連上皮癌組織において *BARF1* が潜伏感染時に発現しているという可能性を考え、EBV 陽性胃癌および NPC 組織における *BARF1* と他の溶解感染遺伝子群の発現を定量 PCR 法により解析した。

その結果、EBV 陽性胃癌組織では 6 例中 5 例、NPC 組織では 16 例中 15 例において *BARF1* の発現が認められた一方で、溶解感染遺伝子群の発現はほとんど認められなかった。そのうち NPC 2 例では抗 Ig 抗体処理により溶解感染を誘導した EBV 陽性 Akata 細胞を上回る高いレベルで *BARF1* の発現を認めた。さらに EBV 陽性胃癌および NPC のマウス可移植腫瘍についても定量を行い、同様の結果を得た。

次に NPC 組織における *BARF1* 蛋白質の発現を調べたところ、7 例中 5 例では

BARF1 蛋白質が検出されず、残り 2 例に低レベルでの発現を認めた。そこで BARF1 の蛋白質としての発現をさらに検討するために、NPC 由来 EBV 陰性細胞株である CNE1 細胞の FLAG-BARF1 安定発現株を作製した。この安定発現株の細胞ライゼートと培養上清を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティング法により BARF1 蛋白質の検出を試みたところ、BARF1 蛋白質は細胞ライゼート中にはほとんど検出されず、培養上清中に大量に検出された。この結果から、BARF1 蛋白質が産生後速やかに細胞外に分泌されること、そのために RNA レベルで BARF1 の発現が高い NPC 組織においても BARF1 蛋白質の検出が困難であることを明らかにした。

次にリコンビナント BARF1 蛋白質はヒトコロニー刺激因子-1(hCSF-1)と *in vitro* において結合するというこれまでの知見から、BARF1 蛋白質の CSF-1 シグナリングに対する影響を検討した。その結果、分泌 BARF1 蛋白質が CSF-1 中和活性を有するという実験結果を得た。CSF-1 は単球およびマクロファージの遊走能、貪食能を誘導するサイトカインである。BARF1 蛋白質の CSF-1 中和活性は BARF1 蛋白質が EBV 感染細胞に対する宿主免疫抑制に作用し、感染細胞の維持に貢献している可能性を示すものであった。

さらに BARF1 のアポトーシス抵抗性についても検討を行った。その結果、上皮細胞株における BARF1 の発現が無血清培養によるアポトーシス誘導に抵抗性を賦与することを明らかにした。

審査において副査の志田教授から、1) EBV 関連癌において上皮組織特異的に BARF1 の発現が検出される理由、2) 分泌 BARF1 蛋白質の翻訳後修飾に関して質問があった。次いで主査の有川教授から、1) EBV 関連上皮癌患者の血清中への BARF1 蛋白質の分泌について、2) EBV 感染による宿主免疫の変化について、3) 分泌 BARF1 蛋白質の CSF-1 中和活性が宿主免疫抑制に与える効果について、4) 本研究の結果および癌ウイルスに関する基礎研究の臨床応用への展望、5) BARF1 の発癌活性の機序について質問があった。次いで副査の高田教授から BARF1 によるアポトーシス抵抗性の機序について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は本人の実験結果や文献的知識に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本論文は EBV 関連上皮癌組織において BARF1 が潜伏感染遺伝子として発現していることを初めて示したものであり、BARF1 遺伝子の発癌因子としての重要性を明らかにした点で意義のある研究と考えられた。

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単位取得なども併せ、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。