

博士(医学) 武艺

学位論文題名

Epstein - Barr virus (EBV) -Encoded RNA2 (EBER2)
but Not EBER1 Plays a Critical Role in EBV-Induced
B-Cell Growth Transformation

(EBウイルスがコードする小RNA EBER1とEBER2の
Bリンパ球トランスフォーメーションにおける役割)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】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、様々な悪性腫瘍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。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。

EBERは宿主のRNAポリメラーゼⅢによって転写され、3'末端にポリA配列をもたず蛋白質に翻訳されない小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は様々な細胞株において、サイトカイン産生を刺激することにより細胞の増殖を促進することが報告されている。最近、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ウイルスが作製され、EBER欠損によりBリンパ球トランスフォーメーション効率が約1/100に低下することが報告され、EBERがEBVによるBリンパ球トランスフォーメーションに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。EBERにはEBER1およびEBER2の2種類が存在する。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。EBER1およびEBER2はともに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。しかし、EBER1とEBER2の機能に違いがあるか否かについてはこれまでほとんど検討されていない。

本研究では、EBER1、EBER2のいずれがBリンパ球トランスフォーメーションに寄与しているか検討を行った。

【方法と結果】EBERノックアウトEBウイルス[EBER(-)EBV]をもとにして、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EBER1再導入EBウイルス[EBER1(+)EBV]、EBER2再導入EBウイルス[EBER2(+)EBV]、EBER1およびEBER2再導入EBウイルス[EBERs(+)EBV]を作製した。また、組換え

EB ウィ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。ウイルス産生量を調べた結果、いずれも野生型である 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 ウィルス陰性 Daudi 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 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 ウィルスの 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% 不死化効率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 まで低下することが確認された。EBERs(+)EBV ではトランスフォーメーション効率の回復が認められた。EBER2(+)EBV のトランスフォーメーション効率は EBERs(+)EBV と同程度まで回復したが、EBER1(+)EBV ではまったく回復が認められなかった。

次に、それぞれの組換え EBV で樹立した LCL の低細胞密度における増殖能を比較したところ、EBER(-)EBV で樹立した LCL は Neo^REBV や EBERs(+)EBV で樹立した LCL と比較して低細胞密度における増殖能が低下していることがわかった。EBER2(+)EBV で樹立した LCL は野生型 LCL や EBERs(+)LCL と同程度まで低細胞密度における増殖能が回復したが、一方 EBER1(+)EBV で樹立した LCL はまったく回復しなかった。以上の結果から、EBER1 ではなく EBER2 が B リンパ球トランスフォーメーションおよび 低細胞密度における LCL 増殖において重要な役割を果たすことが明らかになった。

EBER は様々な細胞株においてサイトカイン産生を誘導することが報告されている。LCL が産生すると報告されているサイトカインについて検討を行った。EBER2 を発現する EBV で樹立した LCL は EBER2 を発現しない EBV で樹立した LCL と比べて IL-6 の発現が高いことがわかった。EBER2 を発現しない LCL の増殖は培地に rIL-6 を加えることにより促進された。さらに、EBER2 を発現する LCL の増殖は IL-6 中和抗体により抑えられた。また、LCL に rIL-6 を添加することにより apoptosis に陥る細胞の割合は減少し、逆に IL-6 の中和抗体を添加することにより apoptosis 細胞の割合が増加した。以上の結果は、EBER2 が IL-6 の発現を誘導することにより LCL の増殖および生存に貢献していることを示唆している。だが、EBER2 欠損による EBV のトランスフォーメーション効率の低下を rIL-6 添加のみで完全に回復させることはできなかった。

【考察】本研究により、EB ウィルスによる B リンパ球トランスフォーメーションにおいて、EBER1 ではなく EBER2 が重要な貢献をしていることが明らかとなった。さらに、EBER2 による IL-6 産生誘導が LCL の増殖と生存に寄与することが示唆された。近年、マイクロ RNA などの、タンパク質をコードしない小 RNA の機能分子としての重要性が広く認識されつつある。EB ウィルスは非翻訳 RNA である EBER を感染細胞内で多量に発現することにより、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。本研究により、EBER1 と EBER2 が異なる機能を有することが初めて示された。今後は、EBER1 と EBER2 のそれぞれの機能とその分子メカニズムのさらなる解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主査教授 有川二郎

副査教授 今村雅寛

副査教授 高田賢藏

学位論文題名

Epstein - Barr virus (EBV) -Encoded RNA2 (EBER2) but Not EBER1 Plays a Critical Role in EBV-Induced B-Cell Growth Transformation

(EBウイルスがコードする小RNA EBER1とEBER2の
Bリンパ球トランスフォーメーションにおける役割)

EBウイルスはヒト正常Bリンパ球をトランスフォーメーションする活性をもち、トランスフォームされたBリンパ球は免疫能の著しく低下したヒトの体内で増殖して移植後リンパ増殖症やエイズリンパ腫の原因となる。EBウイルスがコードする小RNA分子EBERは、Bリンパ球トランスフォーメーションにおいて重要な役割を果たす。申請者は、EBERにはEBER1とEBER2の二種類が存在することをまず説明し、本研究の目的が、EBER1とEBER2のどちらがBリンパ球トランスフォーメーションに寄与しているかを組換えウイルスを用いた解析により明らかにすることであると説明した。次に、本研究で用いたEBER1のみ、あるいはEBER2のみを発現するEBウイルスの作製方法について説明を行った後、結果の説明へと話を進めた。EBER2を発現するEBウイルスはトランスフォーメーション活性が高く、EBER2を発現しないEBウイルスは低いことを明らかにした。トランスフォームされたBリンパ球(LCLと呼ばれる)の細胞増殖活性も、EBER2を発現するLCLでは高く、EBER2を発現しないLCLでは低かった。さらに、EBER2を発現するLCLではIL-6の産生が亢進しており、IL-6がLCLのオートクライイン増殖因子として働いていることも示した。以上より、二種類のEBERのうちEBER2が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、まず今村教授より、EBER2はBリンパ球トランスフォーメーションにessentialであるかcriticalであるか質問があった。それに対して申請者は、EBER2を発現しないウイルスは効率は低いがBリンパ球をトランスフォームできるのでcriticalであると説明した。また、EBERの発現量と癌の悪性度との間に相関関係が知られているかとの質問に対しては、その点に関してはこれまで詳しく調べられていないと回答した。さらに、EBER1の役割について質問があった。申請者は、LCLではEBER2が重要であることが判明したが、他の癌ではEBER1の方が重要な役割を果たしている可能性があると答えた。

次に、有川教授より、EBER再導入ウイルスのトランスフォーメーション活性が野生型ウイルスより少し低い理由について質問があり、申請者は、EBER再導入ウイルスではEBER

遺伝子近傍に loxP 配列が入っていることが影響している可能性があると答えた。また、EBER と似た塩基配列をもつ遺伝子が知られているかとの質問に対して、アデノウイルスの VA1 と VA2 が知られていると回答した。さらに、EBER 単独で発癌活性があるかとの質問があり、現在作製されつつある EBER トランスジェニックマウスがその答えを与えてくれるであろうと答えた。

最後に高田教授より、EBER1 と EBER2 は構造が似ているのになぜ EBER2 だけが IL-6 を誘導するのかという質問があった。それに対して申請者は、塩基配列に違いがあるので、塩基配列に特異的なメカニズムの関与が考えられると回答した。次に、IL-6 が LCL の増殖因子であることはこれまでに報告されているかとの質問に対し、申請者は、IL-6 と LCL との関係を記載したこれまでの報告について紹介した。さらに、今回の結果がどのように治療に応用されるかについて質問があった。申請者は、エイズリンパ腫で血清 IL-6 が高い例では抗 IL-6 抗体が有効である可能性があること、さらに、EBER2 による IL-6 発現誘導メカニズムが明らかになればその経路を抑制する治療法の開発に役立つであろうことを説明した。

この論文は、EBER1 と EBER2 が異なる機能を果たしていることを初めて示した点で重要である。組換え EB ウィルスの作製は手間のかかる作業であるが、申請者は数多くの実験を根気強く着実におこない、示された実験データは質の高いものであった。EBER2 が B リンパ球のトランスフォーメーションにおいて重要な役割を果たすことを明確に示した本研究は高く評価できる。LCL において EBER2 が IL-6 を誘導するメカニズムについては今後の課題である。また、様々な EB ウィルス関連癌において EBER1 と EBER2 が異なる機能を果たしているかという点も今後明らかにされるべきであるが、本研究で樹立した組換えウィルスはそのような研究において多大な貢献をするものと考えられる。EBER の分子メカニズムの解明を通じて、EB ウィルス関連疾患の発症メカニズムおよび治療法の開発につなが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充分な資格を有するものと判定した。