

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。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 ウイルス陰性 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(+)^REBV 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(+)^REBV のトランスフォーメーション効率は EBERs(+)^REBV と同程度まで回復したが、EBER1(+)^REBV 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(+)^REBV 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(+)^REBV で樹立した LCL は野生型 LCL や EBERs(+)^RLCL 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(+)^REBV 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、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 ウイルスは非翻訳 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 蔵

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 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かと答えた。

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 との関係に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 ウイ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起こし、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 ウイ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イ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 ウイ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十分な資格を有するものと判定した。