

学位論文題名

Quantitative evaluation of the role of Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 in B-cell transformation

(EB ウイルス前初期遺伝子 BZLF1の

B リンパ球トランスフォーメーションにおける役割の検討)

学位論文内容の要旨

背景

Epstein-Barr virus (EBV)はヒト癌ウイルスの一つである。EBV は *in vitro* でヒト B リンパ球を無限増殖(不死化)させる活性を持ち、バーキットリンパ腫、日和見リンパ腫、胃癌、上咽頭癌といった様々な腫瘍性疾患に関係している。EBV はその生活環において潜伏感染と溶解感染の二つの感染様式を持つ。大部分の腫瘍細胞において、EBV は潜伏感染の状態で存在していることから、今まで EBV による発癌メカニズムについての研究は潜伏感染下で発現する遺伝子に焦点を当てて行われてきた。しかし、腫瘍細胞の一部に自発的に溶解感染に移行する細胞が認められる事や一部の溶解感染遺伝子が B リンパ球の感染初期に発現する事、そして、溶解感染時に IL-6、IL-10、IL-13 といった増殖因子が誘導されると報告された事から溶解感染も EBV による発癌に貢献するのでは、という可能性が指摘されてきた。そこで、我々は溶解感染遺伝子が発癌に寄与する可能性を検討するために、潜伏感染から溶解感染へ移行するためのスイッチとなるウイルス転写因子 BZLF1 を欠失した組換えウイルスを作製しウイルス産生に対する影響及び B リンパ球の不死化に対する影響を解析した。

手法

BZLF1 遺伝子を含むウイルスゲノムをクローニングし、それを用いて BZLF1 に欠失変異を導入したターゲティングベクターを作製した。電気穿孔法を用いて GFP 発現 EBV (野生型 EBV) 感染 Akata 細胞にターゲティングベクターを遺伝子導入した後、hygromycin 選択により相同組換えによって BZLF1 遺伝子がノックアウトされた EBV(ZKO-EBV)を含む Akata 細胞を樹立した。さらにこの細胞を抗ヒト IgG 抗体でウイルス産生誘導を行う事により得られたウイルス液を EBV 陰性 Akata 細胞に感染させ、再び hygromycin 選択を行う事により ZKO-EBV 単独感染 Akata 細胞を樹立した。相同組換えの確認はサザンブロットにより行った。野生型 EBV 感染 AGS 細胞、ZKO-EBV 感染 AGS 細胞は BZLF1 強制発現によりウイルス産生誘導を行った野生型 EBV 感染 Akata 細胞、ZKO-EBV 感染 Akata 細胞を AGS 細胞と共培養する事で樹立した。EBV 感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現はイムノブロット、蛍光免疫染色、RT-PCR、FACS で評価した。ウイルス産生は EBV 陰性 Daudi 細胞に感染後、GFP 陽性率、EBNA 陽性率により評価した。ZKO-EBV のトランスフォーメーション活性は同じ力価の野生型 EBV と ZKO-EBV を段階希釈してヒト B リンパ球に感染させる事で評価した。また、ウイルスゲノムのコピー数の変化はサザンブロット及び FISH により検討した。

結果

樹立された ZKO-EBV 感染 Akata 細胞はサザンブロットから ZKO-EBV が単独感染している事が確認された。まず、ウイルス産生における BZLF1 の役割を調べたところ、野生型 EBV 感染 Akata 細胞は抗ヒト IgG 抗体や TPA/nBA で処理する事で約 50%の細胞に溶解感染遺伝子の発現が起こりウイルスゲノムの増幅、子孫ウイルスの産生が認められた。それに対して、ZKO-EBV 単独感染 Akata 細胞は抗ヒト IgG 抗体や TPA/nBA 処理によるウイルス産生誘導には全く反応せず、溶解感染遺伝子の発現やウイルスゲノムの増幅、子孫ウイルスの産生は全く認められなかった。しかし、BZLF1 を強制発現させた場合、溶解感染遺伝子の発現、ウイルスゲノムの増幅、子孫ウイルスの産生が認められた。ただし、子孫ウイルスの産生は弱く、それを用いて ZKO-EBV のトランスフォーメーション活性を検討する事は困難であった。そこで、より効率の良いウイルス産生系を造るために、ウイルス産生を誘導した Akata 細胞と AGS 細胞を共培養する事で野生型 EBV 感染 AGS 細胞、及び ZKO-EBV 感染 AGS 細胞を樹立した。野生型 EBV 感染 AGS 細胞では 10-20%の細胞で自発的な溶解感染が認められ、それに伴って自発的なウイルスゲノムの増幅、子孫ウイルスの産生が認められた。それに対して、ZKO-EBV 感染 AGS 細胞では Akata 細胞の場合と同様に溶解感染遺伝子の発現やウイルス産生は認められなかった。しかし、AGS 細胞に BZLF1 を発現させた場合、 6×10^6 GFP inducing unit/ml 程度の高い力価のウイルス液が得られた。これにより、ZKO-EBV を用いて潜伏感染成立における BZLF1 の役割を検討する事が可能となった。AGS 細胞を用いて同力価のウイルス液を調整し、まず、ヒト B リンパ球に野生型 EBV を感染させた時には、一過性に BZLF1 が発現するが、ZKO-EBV を感染させた時には BZLF1 は発現しない事を確認した。次にトランスフォーメーション活性を評価したところ、野生型 EBV、ZKO-EBV ともに約 1×10^5 TD₅₀/ml であり、BZLF1 の有無で大きな差は認められず、ZKO-EBV も野生型 EBV と同様、効率的にヒト B リンパ球を不死化する事が明らかとなった。樹立された不死化 B リンパ球 (LCL) では野生型 EBV 感染株でのみ自発的な溶解感染遺伝子の発現が認められたが、増殖速度、潜伏感染遺伝子の発現パターンには違いは認められなかった。また、サザンブロットや FISH による解析では両者とも約 5 コピーのウイルスゲノムを保持しており BZLF1 の有無による感染細胞中の EBV ゲノムコピー数における違いは認められなかった。

考察

今回の結果から BZLF1 が EBV 感染 B リンパ球、上皮細胞で溶解感染を起こす為に必須の因子である事が示された。それに対し、B リンパ球に感染させたときに不死化効率に差が無く LCL の性状にも特に差が認められなかったことから BZLF1、及びそれに誘導される溶解感染遺伝子は B リンパ球における EBV の潜伏感染の成立に対しては影響を与えない事が明らかとなった。これは EBV が少数の潜伏感染遺伝子のみで効率的に B リンパ球を不死化できることを示している。しかし、BZLF1 はインターフェロン γ や TNF α のシグナルを抑制する事、また、BZLF1 に誘導される BILF1、BNLF2a、BGLF5 といった溶解感染遺伝子は HLA-I の発現を抑制する事が報告されている。これらの報告は BZLF1 が宿主の免疫監視機構からの逃避に寄与する可能性を示唆している。そこで我々は今後、そういった観点から BZLF1 が EBV による病態形成に寄与している可能性を検討する予定である。

結論

BZLF1 は EBV が溶解感染を起こし、子孫ウイルスを産生する為に必須の遺伝子である。BZLF1、及びそれによって誘導される溶解感染は B リンパ球における潜伏感染の成立には影響しない。

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

Quantitative evaluation of the role of Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 in B-cell transformation

(EB ウイルス前初期遺伝子 BZLF1の
B リンパ球トランスフォーメーションにおける役割の検討)

EB ウイルスはヒト正常 B リンパ球を不死化 (トランスフォーメーション) する活性をもち、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、胃癌、上咽頭癌、免疫不全患者における移植後リンパ増殖症などの発症に関与する。申請者は、EB ウイルスがコードする転写因子 BZLF1 が潜伏感染から溶解感染へのスイッチ蛋白質であること、また、感染後早期に BZLF1 の一過性発現がみられることをまず説明し、本研究の目的が、BZLF1 が B リンパ球のトランスフォーメーションに寄与しているか否かを明らかにすることであると説明した。次に、BZLF1 ノックアウト 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。BZLF1 ノックアウト EB ウイルスは溶解感染への移行が障害されていた。BZLF1 ノックアウトウイルスのトランスフォーメーション活性は野生型ウイルスと同程度であった。樹立された不死化 B リンパ球 (LCL と呼ばれる) の細胞増殖活性およびウイルスゲノムのコピー数は、BZLF1 ノックアウト LCL と野生型 LCL で明らかな違いは認められなかった。以上より、BZLF1 の有無は B リンパ球のトランスフォーメーションに影響を与えないと結論した。

質疑応答として、まず志田教授より、なぜ AGS 細胞は他の細胞株に比べて高いタイトーのウイルスを産生できるのか質問があった。それに対して申請者は、AGS 細胞は遺伝子導入効率が良いこと、上皮細胞由来の EB ウイルスは B 細胞への感染効率が高いこと、AGS では溶解感染を促進する宿主遺伝子の発現が高いことなどがその理由として考えられると説明した。また、SCID マウスにおける LCL の造腫瘍性を検討した過去の報告について質問があり、SCID マウスの系では、BZLF1 依存的に溶解感染に入った一部の細胞から産生された IL-6 が周囲の潜伏感染細胞の増殖を促進することが報告されていると説明した。さらに、90%以上のヒトが EB ウイルスに感染しているのになぜ病気になるヒトが稀なのか、という質問に対しては、例えばパーキットリンパ腫におけるマラリア感染や上咽頭癌における塩漬け魚などが発症のコファクターとして知られており、こうしたコファクターが必要であるために病気になるヒトが稀なのであろうと答えた。

次に、有川教授より、本研究のような基礎研究が発癌の予防に役立つ可能性があるか、という質問がなされた。申請者は、発癌の予防は難しいかもしれないが、基礎研究が発癌

の治療に役立つ可能性はあると答えた。一例として、EBNA1 蛋白質の発現を抑制する薬剤を投与することにより *in vitro* および *in vivo* における LCL の増殖を抑制できることを報告した最近の論文を紹介した。

最後に高田教授より、SCID マウスに移植した LCL の増殖に対する BZLF1 の影響と *in vitro* での LCL 増殖に対する BZLF1 の影響との間に乖離がみられるのはなぜか、という質問がなされた。それに対して申請者は、*in vitro* の方が細胞にとって優しい環境で *in vivo* はより厳しい環境であるため、*in vivo* において差が顕在化し易いのではないかと考えられると答えた。それに対して高田教授から、*in vivo* の実験も行うべきであるとの助言がなされた。

この論文は、BZLF1 遺伝子の有無が *in vitro* における B リンパ球のトランスフォーメーションに影響を与えないことを初めて明確に示した点で高く評価される。組換え EB ウイルスの作製は手間と時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ここない、示された実験データは質の高いものであった。*in vivo* での腫瘍増殖に対する BZLF1 の影響については今後の検討課題であろう。また、様々な EB ウイルス関連癌において BZLF1 が果たす役割について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。今後のさらなる BZLF1 の研究が、EB ウイルス関連癌の発症メカニズムの解明および治療法の開発につながることを期待される。

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。