

学位論文題名

バーキットリンパ腫細胞の増殖、生存における

EBV の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Epstein-Barr virus (EBV) はヘルペスウイルス科に属する2本鎖DNAウイルスである。殆どの健常成人に無症候性に感染している普遍的なウイルスであるが、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、胃癌、T/NK リンパ腫など様々な癌の発症に関与すると考えられている。EBV 陽性バーキットリンパ腫 (BL) はEBVの潜伏感染様式から二種類のタイプに分けられる。ひとつは latency I と呼ばれるタイプで、BamHI Q プロモーターより EBNA1 タンパク質を発現する。もう一つは Wp プロモーターから EBNA1、EBNA3A, 3B, 3C、欠損型 EBNA-LP、BHRF1 を発現する Wp-restricted latency と呼ばれるタイプである。両方のタイプに共通して発現している EBNA1 は、EBV ゲノムの維持に必須のウイルスタンパク質である。近年、BL 細胞の増殖や生存に EBV が重要な役割を果たすことが報告されたが、その詳細なメカニズムについては未だ不明の点が少ない。特に最近になってから同定された Wp-restricted latency を呈する BL については不明の点が多い。本研究は、Wp-restricted 型 BL 細胞の生存において EBV がどのような役割を果たしているかを解明することを目的として行われた。ウイルスゲノム維持に必須の EBNA1 の機能を抑制するという方法を用いて、Wp-restricted 型 BL 細胞株の P3HR-1 から EBV ゲノムを脱落させ、細胞の増殖や生存にどのような変化が起こるか解析した。さらに、どのウイルス遺伝子が重要な役割を果たすかについても検討を行った。

【材料と方法】 Wp-restricted 型 BL 細胞株 P3HR-1 において、ドミナントネガティブ EBNA1 (以下 dnEBNA1) をテトラサイクリン制御下でコンディショナルに発現する P3HR-1 安定細胞株 (P3-dnEBNA1) を作製した。dnEBNA1 は野生型 EBNA1 機能を阻害することが報告されており、EBNA1 は EBV ゲノムの維持に必須のタンパクであるため、dnEBNA1 を発現させることによって EBV ゲノムを細胞から脱落させることが可能となる。P3-dnEBNA1 細胞に、Bcl-2、BHRF1 をそれぞれ外来性に強制発現させた細胞株 P3-dnEBNA1-Bcl2、P3-dnEBNA1-BHRF1 を作製した。ノックダウン実験は、BHRF1 に対する shRNA と EGFP を発現する OriP ベクターを細胞に遺伝子導入することにより行った。

【結果】 P3-dnEBNA1 細胞を Dox 存在下で培養すると dnEBNA1 の発現は認められなかったが、Dox 非存在下で培養すると dnEBNA1 の発現が強く誘導された。dnEBNA1 発現によって P3HR-1 細胞内の EBV ゲノム量は進行性に減少した。それに伴い、EBV 遺伝子

産物の発現量も著明に減少した。したがって、dnEBNA1を発現させることによって、期待通りにEBVゲノムが脱落し、ウイルス遺伝子産物の発現も失われることが明らかになった。次に、EBVゲノムの減少が細胞にもたらす影響を検討するために、P3-dnEBNA1細胞をDox存在下(dnEBNA1非発現下)あるいはDox非存在下(dnEBNA1発現下)で培養して生細胞数を計測した。dnEBNA1を発現していない細胞では生細胞数は指数関数的に増殖したのに対し、dnEBNA1を発現した細胞では生細胞数の増加が著しく抑制された。さらに、dnEBNA1発現細胞ではアポトーシスが誘導されていた。すなわち、EBVゲノム脱落に伴って、P3HR-1細胞の増殖抑制およびアポトーシスが惹起されることが明らかになった。次に、EBVゲノム脱落細胞にみられる増殖抑制の主たる要因がアポトーシスによるものであるか検討するために、dnEBNA1をDox制御下で発現し、かつBcl-2を強制発現させた細胞株P3-dnEBNA-Bcl2を作製した。Bcl-2の強制発現でアポトーシスを阻止することによって細胞増殖抑制を回避させられるか検討した。P3-dnEBNA-Bcl2においてdnEBNA1を発現させてEBVゲノムは脱落させたところ、アポトーシス阻止とともに増殖抑制もほぼ完全に回避された。したがってEBVゲノム脱落に伴う細胞増殖抑制の主因はアポトーシスであると考えられた。この結果を受けて、EBVがコードするBcl-2ホモログであるBHRF1に着目した。BHRF1を外来性に過剰発現させたP3-dnEBNA-BHRF1細胞株を作製し、dnEBNA1を発現させてEBVゲノムを脱落させた。その結果、P3-dnEBNA-Bcl2と同様に、P3-dnEBNA-BHRF1においてもEBVゲノム脱落に伴うアポトーシスと細胞増殖抑制はほぼ完全に阻止されていた。さらに、BHRF1に対するshRNAを用いてP3HR-1細胞において内在性に発現しているBHRF1をノックダウンした結果、P3HR-1細胞に細胞死が誘導された。以上の結果から、P3HR-1細胞の生存においてEBVが必須の役割を果たしていること、BHRF1が生存因子として機能していることが明らかになった。

【考察】本研究により、Wp-restricted型BL細胞株P3HR-1の生存にウイルスBcl-2ホモログBHRF1が必須であることが判明した。BHRF1が外来性のアポトーシス誘導刺激に対するアポトーシス抵抗性を賦与することはこれまでも報告されていたが、外来のアポトーシス刺激のない至適培養条件下においてBL細胞の生存にBHRF1が必須の役割を果たしていることを示したのは本研究が初めての報告である。BL細胞ではc-myc/Ig染色体転座によるc-myc発現活性化によってアポトーシス感受性が亢進していると考えられている。Bcl-2とc-mycは協調してリンパ腫発生を促進することが知られており、BHRFもc-mycと協調的に働くことによってWp-restricted型BLの発生に貢献しているものと考えられる。本研究により、EBVゲノムを脱落させることがWp-restricted型BLの有効な治療法になりうることも明らかになった。今後、より実用的なEBNA1阻害分子が同定されて治療に応用されることが期待される。

【結論】EBVはWp-restricted型BL細胞株P3HR-1の生存に必須であること、さらに、EBVのコードするBcl-2ホモログBHRF1が生存因子として機能していることが明らかになった。本研究結果から、BHRF1はアポトーシスを抑制することによってWp-restricted型BLの発生を促進することが示唆された。さらに本研究により、EBVゲノムを細胞から脱落させることがWp-restricted型BLの有効な治療法になりうることを示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	志田 壽利
副査	教授	高田 賢藏
副査	准教授	濱田 淳一
副査	教授	畠山 鎮次
副査	准教授	松本 美佐子

学位論文題名

バーキットリンパ腫細胞の増殖、生存における EBV の役割に関する研究

Epstein-Barr virus (EBV) はヘルペスウイルス科に属する 2 本鎖 DNA ウィルスで、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、胃癌、T/NK リンパ腫など様々な癌の発症に関与すると考えられている。EBV 陽性バーキットリンパ腫 (BL) は EBV の潜伏感染様式から latency I と Wp-restricted latency の二種類のタイプに分けられる。近年、BL 細胞の増殖や生存に EBV が重要な役割を果たすことが報告されたが、その詳細なメカニズムについては未だ不明の点が多い。本研究は、Wp-restricted 型 BL 細胞の生存において EBV がどのような役割を果たしているかを解明することを目的として行われた。Wp-restricted 型 BL 細胞株 P3HR-1 において、ドミナントネガティブ EBNA1 (以下 dnEBNA1) をテトラサイクリン制御下でコンディショナルに発現する P3HR-1 安定細胞株 (P3-dnEBNA1) を作製した。dnEBNA1 は野生型 EBNA1 機能を阻害することが報告されており、EBNA1 は EBV ゲノムの維持に必須のタンパクであるため、dnEBNA1 を発現させることによって EBV ゲノムを細胞から脱落させることが可能となる。まず dnEBNA1 発現によって P3HR-1 細胞内の EBV ゲノム量が進行性に減少し、それに伴い、EBV 遺伝子産物の発現量も著明に減少することを確認した。次に、EBV ゲノムの減少が細胞にもたらす影響を検討するために、P3-dnEBNA1 細胞を dnEBNA1 非発現下あるいは dnEBNA1 発現下で培養して生細胞数を計測した。dnEBNA1 を発現していない細胞では生細胞数は指数関数的に増殖したのに対し、dnEBNA1 を発現した細胞では生細胞数の増加が著しく抑制された。さらに、dnEBNA1 発現細胞ではアポトーシスが誘導されていた。すなわち、EBV ゲノム脱落に伴って、P3HR-1 細胞の増殖抑制およびアポトーシスが惹起されることが明らかになった。次に、EBV ゲノム脱落細胞にみられる増殖抑制の主たる要因がアポトーシスによるものであるか検討するために、dnEBNA1 を Dox 制御下で発現し、かつ抗アポトーシスタンパク Bcl-2 を強制発現させた細胞株 P3-dnEBNA-Bcl2 を作製した。P3-dnEBNA-Bcl2 において dnEBNA1 を発現させて EBV ゲノムは脱落させたところ、アポトーシス阻止とともに増殖抑制も

ほぼ完全に回避された。したがって EBV ゲノム脱落に伴う細胞増殖抑制の主因はアポトーシスであると考えられた。この結果を受けて、EBV がコードする Bcl-2 ホモログである BHRF1 に着目した。BHRF1 を外来性に過剰発現させた P3-dnEBNA-BHRF1 細胞株を作製し、dnEBNA1 を発現させて EBV ゲノムを脱落させた。その結果、P3-dnEBNA-Bcl-2 と同様に、P3-dnEBNA-BHRF1 においても EBV ゲノム脱落に伴うアポトーシスと細胞増殖抑制はほぼ完全に阻止されていた。さらに、BHRF1 に対する shRNA を用いて P3HR-1 細胞において内在性に発現している BHRF1 をノックダウンした結果、P3HR-1 細胞に細胞死が誘導された。以上の結果から、P3HR-1 細胞の生存において EBV が必須の役割を果たしていること、BHRF1 が生存因子として機能していることが明らかになった。本研究により、Wp-restricted 型 BL 細胞株 P3HR-1 の生存にウイルス Bcl-2 ホモログ BHRF1 が必須であることが判明した。

発表後、志田壽利教授より EBV 陰性 BL 細胞と、今回の実験に用いた EBV 陽性 BL 細胞の生存における EBV の重要性の違いについての質問があった。また、畠山鎮次教授より BHRF1 がアポトーシスを阻害するメカニズムについて質問があった。また濱田淳一准教授より不死化 B 細胞と BL 細胞の生存メカニズムの違いに関する質問があり、松本美佐子准教授より BHRF1 の溶解感染時の役割に関する質問があった。また高田賢藏教授より BL の病因を解明するうえでの今後の展望についての質問があった。申請者は質問に対し現在までに得られている実験結果をふまえ自身の考えと今後の展望を述べた。質疑に対する応答は概ね妥当だった。

この論文は Wp 型 BL 細胞の生存における EBV の重要性を初めて示し、BL の病因において EBV が非常に重要であることを強く示唆した点が高く評価される。今後 BL の病因についての詳細が明らかにされること、また dnEBNA1 を応用した治療法の開発が期待される。

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。