

学位論文題名

Epstein-Barr virus-encoded poly (A) -RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction

(EBウイルスがコードするポリ(A)-RNAの
インターロイキン10誘導を介したバーキットリンパ腫増殖促進)

学位論文内容の要旨

研究背景と目的

Epstein-Barr virus (EBV) はヒト癌との関連が指摘された最初のウイルスであり、バーキットリンパ腫 (以下BL)、上咽頭癌に加え、最近では胃癌や臓器移植後のリンパ腫との関連も明らかとなっている。BLにはアフリカに風土病的に発生するものと、全世界に散発するものがあり、前者では大部分がEBV陽性に対し、後者のEBV感染率は15~20%に過ぎない。一方、BL細胞には、EBV感染の有無に拘わらず、癌遺伝子c-mycの転座・活性化が存在する。また、EBVが大部分のヒトに感染・維持されていることもあり、BL発生に重要なのはc-mycの活性化であり、EBVはパッセンジャーに過ぎないとの見解も従来あった。さらに、BL型の感染、すなわちEBV核抗原EBNA1、ポリA(・)の小RNA EBER、BamHI-A断片領域にコードされるBARF0の3つのEBV遺伝子のみを発現する感染をin vitroで再現できなかったことも解析を困難にしていた。しかし最近、BL型感染モデルAkata細胞系が確立され、その解析からEBVがBL細胞の悪性化に寄与していること、EBVがコードする小RNA EBERがその活性を担っていることが明らかとなった。このような背景のもとに、本研究ではとくにサイトカインに着目し、BL発生におけるEBVの役割を検討した。

材料と方法

細胞および組織：EBV陽性、陰性BL細胞株、日本人BL患者生検組織を用いた。BL由来Akata細胞とMutu細胞については、本来のEBV陽性クローンと、そこから限界希釈法によって分離したEBV陰性クローンを用いた。

サイトカインmRNAの定量：Trizolにより細胞よりRNAを抽出後LightCycler™を用いたReal time RT-PCR法により定量した。

培養上清中のIL-10の定量：ELISAによった。

細胞への遺伝子導入：電気穿孔法で行い、ネオマイシン耐性によって遺伝子導入クローンを選択した。

EBER欠損EBV：相同組換え法によりEBER遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより作製した。

結果と考察

Akata細胞についてEBV陽性クローンと陰性クローンのサイトカイン発現量を比較した結果、EBV陽性クローンでEBV陰性クローンに比べIL-10の発現がmRNA、蛋白質レベルで高いことが示された。一方、IL-1β、IL-4、IL-6量に差は無かった。さらにMutu細胞に

においてもEBV陽性クローンでIL-10の上昇を認めた。すなわち、EBNA1、EBER、BARF0のみを発現するBL型のEBV感染により宿主IL-10の発現が誘導されることが示された。

次いで、EBVのどの遺伝子産物にその活性があるのかを調べた。EBV陰性Akata細胞{以下Akata(-)}へEBNA1、EBER、BARF0遺伝子をそれぞれ導入した細胞クローンを作製し、IL-10 mRNA量を測定した。その結果、EBER導入クローンでIL-10 mRNA量が増加していた。またAkata(-)にEBVを再感染させるとIL-10 mRNAの発現増加を認めたが、EBER欠損EBVの感染では増加しなかった。以上の結果、IL-10発現誘導はEBERによることが判明した。

次に、Akata細胞の増殖へのIL-10の影響を調べた。0.1%の低血清中では増殖できないAkata(-)は、IL-10の添加により低血清中での増殖能を獲得した。一方、EBV陽性Akata細胞{以下Akata(+)}は、抗IL-10抗体やIL-10に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの添加により増殖能を失った。以上の結果は、Akata細胞の増殖がIL-10に依存していることを示している。

EBV陰性のBL細胞株Louckes、BL41、BL30はいずれもIL-10 mRNAが低かった。これらの細胞株にEBER遺伝子導入したクローンではIL-10の発現上昇を認めた。従って、BL細胞一般に、EBERが発現するとIL-10の発現も誘導されることが示唆された。BL生検組織の検討では、EBV陽性のBLではEBERの発現程度に応じてIL-10 mRNAが高値を示したが、EBV陰性のBLではIL-10 mRNAはいずれも低かった。従って、EBV陽性のBL患者組織において、EBERによるIL-10誘導が起こっていることが示唆された。

EBERは蛋白に翻訳されないポリ(A)を欠く小RNAで、1細胞中に 1×10^7 個前後と多数コピー存在する。EBERはL22、La、PKRなどの細胞蛋白質に結合することが知られているが、その意義についてはほとんどわかっていない。わずかにPKRについてのみ調べられている。PKRはインターフェロンにより誘導され、2本鎖RNAにより活性化される蛋白リン酸化酵素で、蛋白質合成開始因子eIF2 α をリン酸化して蛋白質合成を抑制することが知られている。EBERはPKRに結合しその活性を阻害することが報告されている。EBERによるIL-10転写活性化とPKRの関連を調べるために、dominant-negative型PKR、EBERと同様PKR抑制活性をもつことが知られているアデノウイルスのVA1遺伝子をそれぞれAkata(-)に導入し、IL-10 mRNA量を測定した。その結果、IL-10の転写は促進されなかった。従って、EBERによるIL-10転写活性化はPKRとは別の経路によることが示唆された。

以上より、EBVがコードするEBER RNAはIL-10の転写を活性化すること、それにより産生されたIL-10はBL細胞の自己増殖因子として作用することを明らかにした。IL-10にはTH1細胞抑制活性があり、ウイルスはIL-10誘導により宿主細胞免疫を回避しつつ、自己の生存を図っているという巧妙なメカニズムが示唆された。また、本研究はRNA分子による発がんという、従来まったく知られていなかった発がんの可能性を示した点でも意義深いものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 高 田 賢 蔵
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Epstein-Barr virus-encoded poly (A) -RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction

(EB ウイルスがコードするポリ (A) -RNA の
インターロイキン10誘導を介したバーキットリンパ腫増殖促進)

Epstein-Barr virus (EBV) はヒト腫瘍との関連が指摘された最初のウイルスであるが、その発癌活性については長年不明であった。近年 Akata 細胞系を用いた実験から EBV がバーキットリンパ腫 (BL) の増殖に必要であることが証明された。しかしその分子機構については依然未知であった。申請者はこの点を明らかにすべく、特に宿主サイトカインの発現に着目した。材料は BL 由来の細胞株および生検組織を使用した。そのうち Akata 細胞と Mutu 細胞については、EBV 陽性および陰性クローンを用いた。mRNA の定量は Real time RT-PCR 法により行い、蛋白の定量は ELISA を用いた。細胞への遺伝子導入は電気穿孔法で行った。実験の結果、EBV 陽性 Akata は陰性に比べ mRNA、蛋白いずれでも IL-10 の発現が著しく亢進していた。IL-1 β 、4、6 に差は無かった。次に EBV 陰性 Akata に、EBV の潜伏感染遺伝子 3 種 (EBNA1、EBER、BARF0) をそれぞれ導入したところ、EBER 導入でのみ IL-10 の発現が増加した。また EBV 陰性 Akata に EBV を再感染させると IL-10 の発現は増加したが、EBER を欠失させた組換え EBV を再感染させると増加しなかった。したがって、IL-10 発現誘導は EBER によることが判明した。Akata、Mutu 以外の EBV 陰性 BL 株のいずれも IL-10 の発現は低かったが、これらの細胞株に EBER 遺伝子を導入すると発現は上昇した。このことから BL 細胞一般に、EBER は IL-10 の発現誘導活性があるものと思われる。次に、種々の IL-10 環境下での Akata の増殖を調べた。その結果、本来低血清中では増殖しない EBV 陰性 Akata は、IL-10 の添加により EBV 陽性 Akata に匹敵する増殖能を獲得した。逆に EBV 陽性 Akata は、抗 IL-10 抗体や IL-10 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの添加により増殖能を失った。これは BL の増殖が IL-10 に依存することを示している。BL 生検組織では、EBV 陽性組織で EBER の発現程度に応じて IL-10 の発現が高かったが、EBV 陰性組織ではいずれも低く、実際の腫瘍組織内でも

EBER が IL-10 を介して増殖に寄与していることを疑わせた。EBER が IL-10 の転写を促進する経路として、PKR (2 本鎖 RNA 依存性蛋白リン酸化酵素) の介在を考えた。しかし dominant-negative 型 PKR および PKR 抑制活性をもつアデノウイルス VA1 の導入では IL-10 の転写は促進されず、この経路は否定的であった。以上より、申請者は EBV による細胞悪性化のメカニズムの一つとして、ウイルスが宿主自身の IL-10 の発現を誘導して BL の増殖を促進していることを明らかにした。

審査に当たって藤堂教授から、他の EBV 関連腫瘍と IL-10 の関わり、IL-10 だけで悪性化の説明が可能かとの質問があった。申請者は各種文献や自身のデータを引用し、EBV 陽性胃癌では IL-10 の発現はなく、移植後リンパ増殖症では EBV の膜蛋白 LMP-1 が IL-10 を転写促進しているなど疾患により様々であること、IL-10 単独導入細胞では SCID マウス皮下での造腫瘍性が得られず、EBER-IL-10 経路は悪性化を担う因子の一つであることを回答した。次いで小林からウイルス性 IL-10 の影響の確認、IL-10 遺伝子のプロモーター領域、本研究成果の治療への応用についての質問があった。申請者はウイルス性 IL-10 については無発現を確認していること、プロモーター領域には NF κ B などの転写因子の結合部位があり、これが発現調節にかかわっている可能性があること、抗サイトカイン療法について、今後 *in vivo* での実験が必要であることを回答した。最後に高田教授から、IL-10 発現は EBV 陽性の BL に普遍的なものと推察されるかとの質問があった。申請者は、特に生検材料で EBER と IL-10 の発現量が相関していることから、そのように推察されると回答した。

この論文は、EBV による BL 増殖機構を明らかにし、また RNA 分子による発癌という従来まったく知られていなかった可能性を明らかにした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過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。