

学位論文題名

CD21-Mediated Entry and Stable Infection
by Epstein-Barr Virus in Canine and Rat Cells

(ヒト CD21 遺伝子を導入したイヌ及び
ラット細胞における EB ウイルス持続感染の成立)

学位論文内容の要旨

EB ウイルス (EBV) は B リンパ球に特異的に発現している補体レセプター (CD21) を介して細胞へ吸着し、このことが EBV の B リンパ球指向性、狭い宿主域を規定している。EBV 感染の成立には、この吸着段階でのバリアーに加えて、EBV プラスミドの維持機構が関わっている。EBV は感染細胞内で宿主 DNA に組み込まれず、プラスミドとして維持される。このプラスミドの維持も宿主域が限定されており、ラット、マウスなどのげっ歯類では働かず、従って、EBV は一部の霊長類にしか感染しないとされていた。本研究では、ヒト CD21 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、各種哺乳類細胞にヒト CD21 を強制発現させて吸着ステップのバリアーを取り除き、ヒト以外の哺乳類細胞でも EBV の感染が成立するか否かを検討した。

各種の哺乳類細胞株 MDCK (イヌ)、BHK (ハムスター)、9L (ラット)、CKDH (ラット)、CSST-2 (ラット)、Rat-1 (ラット)、NIH3T3 (マウス) にヒト CD21 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Adv-CD21) を感染させた。陰性コントロールとして LacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Adv-LacZ) を用いた。フローサイトメトリーにて解析した結果、上記のいずれの細胞株においてもヒト CD21 の発現が認められた。ヒト CD21 を発現させた哺乳類細胞にネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) を組み込んだ EBV (EBV-Neo^R) を感染させ、G418 耐性クローンの出現を検討した。ヒト CD21 を発現させた MDCK、9L、CSST-2 細胞において G418 耐性クローンの出現が得られた。蛍光抗体法ではすべての G418 耐性クローンにおいて EBV 核抗原 (EBNA) の発現が認められ、感染の成立が確認された。

得られた EBV 感染クローンについて EBV 潜伏感染遺伝子の発現及び EBNA1 プロモーターの使用について解析を行った。ウェスタンブロット法にて EBNA1 と膜蛋白質 (LMP1) の発現を検討し、他の EBV 潜伏感染遺伝子の発現及び EBNA1 プロモーターの使用を RT-PCR 法により解析した。MDCK クローンにおいてポリ A(-) の EBV-encoded small RNA (EBER)、EBNA1、LMP2A 及び BamHI A 断片領域にコードされる BARF0 が発現していた。その他の EBV 潜伏感染遺伝子の発現は認められなかった。EBNA1 プロモーターの分析では、Qp が活性化され Cp と Wp は不活性で、いわゆる I 型 EBV 潜伏感染であった。9L と CSST-2 クローンでは、全ての EBV 潜伏感染遺伝子、すなわち 6 種類の EBNA1s、3 種類の LMPs、BARF0 及び EBER が認められ、III 型類似の EBV 潜伏感染パターンであった。しかし、III 型感染と異なり、EBNA2、EBNA3s、LMP1 及び LMP2B の発現レベルは低く、EBNA1 プロモーターは、Qp、Cp、Wp が全て活性化された状態であった。

次に、EBV が感染した哺乳類細胞において EBV がプラスミドとして維持されているか否かを検討するために、*gardella gel analysis* を行った。この方法はエピゾーム状のウイルス DNA と宿主細胞 DNA に *integration* したウイルス DNA を区別するテクニックである。MDCK、9L 及び CSST-2 のいずれの細胞クローンにおいても、EBV はプラスミドとして維持されていることが明らかになった。

さらに、EBV 溶解感染関連遺伝子の発現を調べた。蛍光抗体法で、すべての MDCK クローンと 9L クローン 1 つにおいて早期蛋白質 BMRF1 陽性細胞が認められたが、エンベロープ蛋白質 gp110 及び gp350/220 陽性細胞はほとんど見られなかった。他の感染クローンでは、早期蛋白質 BMRF1 及びエンベロープ蛋白質 gp110 と gp350/220 のいずれの発現も認めなかった。EBV 産生を誘導するために、3 mM の *n*-butyric acid (*n*-BA) と 20 ng の 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) /ml で EBV 感染 MDCK、9L 及び CSST-2 クローンを処理した。MDCK クローンにおいて約 68% の細胞に早期蛋白質 BMRF1 が誘導されたが、gp110 陽性細胞は 18% と低く、gp350/220 陽性細胞はほとんど誘導されなかった。9L 及び CSST-2 クローンにおいても早期蛋白質 BMRF1 が 1 - 14% 誘導されたが、エンベロープ蛋白質 gp110 と gp350/220 はほとんど誘導されなかった。さらに、EBV DNA の複製をサザンブロット法により解析した。その結果、すべての MDCK、9L 及び CSST-2 クローンでウイルス DNA の複製が誘導された。最後に、ウイルス感染クローンが感染性ウイルス粒子を産生するか否かを検討するために、*n*-BA と TPA で処理した細胞の培養上清を臍帯血 B リンパ球に接種した。しかし、EBV で不活化された細胞クローンは得られず、感染細胞に溶解感染が誘導されるが、感染性ウイルスの産生は起こらないことが明らかとなった。

以上の結果から、吸着ステップのバリアーを取り除くことで、イヌ、ラットなどの哺乳類細胞でも EBV 持続感染は成立しうることが明らかとなった。このことは、ヒト CD21 トランスジェニックイヌ、ラットが EBV 感染モデル動物になる可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 志 田 壽 利

副 査 教 授 高 田 賢 蔵

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

CD21-Mediated Entry and Stable Infection by Epstein-Barr Virus in Canine and Rat Cells

(ヒト CD21 遺伝子を導入したイヌ及び
ラット細胞における EB ウイルス持続感染の成立)

EB ウイルス (EBV) は B リンパ球に特異的に発現している補体レセプター (CD21) を介して細胞へ吸着し、このことが EBV の B リンパ球指向性、狭い宿主域を規定している。EBV 感染の成立には、この吸着段階でのバリアーに加えて、EBV プラスミドの維持機構が関わっている。EBV は感染細胞内で宿主 DNA に組み込まれず、プラスミドとして維持される。このプラスミドの維持に関しても宿主域が限定されており、ラット、マウスなどのげっ歯類では働かず、従って、EBV は一部の霊長類にしか感染しないとされていた。申請者は、ヒト CD21 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、各種哺乳類細胞にヒト CD21 を強制発現させて吸着ステップのバリアーを取り除き、ヒト以外の哺乳類細胞でも EBV の感染が成立するか否かを検討した。

各種の哺乳類細胞株にヒト CD21 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Adv-CD21) を感染させた。フローサイトメトリーにて解析した結果、いずれの細胞株においてもヒト CD21 の発現を認めた。ネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) を組み込んだ EBV (EBV-Neo^R) を感染させることにより、ヒト CD21 を発現させた MDCK (イヌ)、9L (ラット)、CSST-2 (ラット) 細胞において G418 耐性クローンを得た。蛍光抗体法ですべての G418 耐性クローンにおいて EBV 核抗原 (EBNA) の発現を認め、感染の成立を確認した。

得られた EBV 感染クローンについて EBV 潜伏感染遺伝子の発現及び EBNA1 プロモーターの使用について解析を行い、MDCK クローンにおいては I 型、9L と CSST-2 クローンでは III 型類似の EBV 潜伏感染パターンである事を示した。次に、EBV が感染した哺乳類細胞において EBV がプラスミドとして維持されていることを *gardella gel analysis* 法で調べた。その結果、MDCK、9L 及び CSST-2 のいずれの細胞クローンにおいても、EBV はプラスミドとして維持されていることを明らかにした。

さらに、EBV 溶解感染関連遺伝子の発現を蛍光抗体法で調べた。すべての MDCK クローンと 9L クローン 1 つにおいて早期蛋白質 BMRF1 陽性細胞が認められたが、エンベロープ蛋白質 gp110

及び gp350/220 陽性細胞はほとんど見られなかった。CSST-2 クローンではいずれの発現も認めなかった。しかし、EBV 産生を誘導する n-butyric acid (n-BA)と 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) でこれらの細胞を処理すると、MDCK クローンにおいて約 68%の細胞に早期蛋白質 BMRF1 が誘導された。しかし、gp110 陽性細胞は 18%と低く、gp350/220 陽性細胞はほとんど誘導されなかった。9L 及び CSST-2 クローンにおいても早期蛋白質 BMRF1 が 1 - 14%誘導されたが、エンベロープ蛋白質 gp110 と gp350/220 はほとんど誘導されなかった。さらに、EBV DNA の複製をサザンブロット法により解析することにより、すべての細胞でウイルス DNA の複製が誘導される事を示した。最後に、感染性ウイルス粒子を産生するか否かを、細胞の培養上清を臍帯血 B リンパ球に接種することにより調べた。しかし、EBV で不死化された細胞クローンは得られず、感染性ウイルスの産生は起こらなかった。以上の結果から、申請者は吸着ステップのバリアーを取り除くことで、イヌ、ラットなどの哺乳類細胞でも EBV 持続感染が成立しうることを示した。

審査員から「ウイルスの感染性欠如の原因について」「技術的な問題点とその改良法について」「ウイルス糖蛋白質間の発現制御の違い」「上皮細胞の持つ受容体」について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は未発表の自分自身のデータや過去の論文を引用し、おおむね妥当な解答をした。

この論文はヒト CD21 トランスジェニックイヌ、ラットが EBV 感染モデル動物になる可能性を示唆しており、個体レベルでの EBV 感染の解析と予防と治療法の開発に道を開くものである。

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。