

学位論文題名

Role of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein2A  
on virus-induced immortalization and virus activation

(Epstein-Barr ウイルス latent membrane protein2A の  
細胞不死化、ウイルス活性化における役割)

学位論文内容の要旨

目的

EBウイルスがパーキットリンパ腫や上咽頭癌の原因ウイルスであることは広く知られているが、近年、さらにTリンパ腫、ホジキン病、さらに胃癌や唾液腺癌などの上皮性腫瘍における病因的関与が明らかにされつつあり、その発癌機構の解明は重要な課題となっている。

EBウイルスがコードする latent membrane protein2A (LMP2A) は、EBウイルス関連悪性腫瘍のみならず、末梢血中のEBウイルス潜伏感染Bリンパ球でも発現が示されている遺伝子であり、EBウイルス感染の維持に重要な役割を担っていると考えられている。膜免疫グロブリンの架橋を介したシグナル伝達は潜伏EBウイルスの活性化を誘導する。LMP2AはこのシグナルをブロックすることによりEBウイルス活性化を抑制すると考えられる。また組み換えEBウイルスを用いた報告により、LMP2AのBリンパ球の不死化効率に対する影響について論争されている。本研究では、組み換えEBウイルスをモノクローナルに大量に産生することのできるAkata細胞系を用いてLMP2AノックアウトEBウイルス [LMP2A(-)EBウイルス] を作成し、LMP2AのBリンパ球不死化に対する影響について定量的に検討するとともに、Akata細胞で少量発現しているLMP2AがEBウイルス活性化を抑制するか否かを検討した。

材料と方法

細胞：Akata細胞はパーキットリンパ腫患者から樹立された細胞株で、1細胞に約20コピーのEBウイルスプラスミドを有している。EBウイルス(+)Akata細胞よりlimiting dilution法でEBウイルス(-)Akata細胞を分離することができる。

LMP2A(-)EBウイルス：LMP2Aの第1エクソンにネオマイシン耐性遺伝子(neo<sup>r</sup>)を挿入し、第1エクソン両側のBglII fragmentをのりしろとしたtargeting plasmidを構築した。electroporation法でEBウイルス(+)Akata細胞に遺伝子導入し薬剤選択した。Southern-blot法で相同組み換えしたLMP2A(-)EBウイルスを有するAkata細胞を同定し、野生型EBウイルスとLMP2A(-)EBウイルスの混合液を調整した。ウイルス混合液をEBウイルス(-)Akata細胞に感染させ薬剤選択することによってLMP2A(-)EBウイルスのみに感染したAkata細胞を獲得し、モノクローナルなLMP2A(-)EBウイルスを調整した。RT-PCR、immuno-blot法でLMP2A(-)EBウイルスAkata細胞、LMP2A(-)EBウイルスで樹立したlymphoblastoid cells(LCL)においてLMP2Aの発現の有無を検討した。

臍帯血Bリンパ球の不死化：EBウイルスDNA量で定量化したLMP2A(-)EBウイルス、neo<sup>r</sup>組み込みEBウイルスを臍帯血Bリンパ球に感染させ不死化の効率を比較した。

Calcium mobilization：膜免疫グロブリンを介したシグナル伝達に対するLMP2Aの影響を細胞内Ca<sup>2+</sup>

ルシウムイオンを測定し検討した。蛍光色素Fluo3で標識しフローサイトメーターで測定した。LMP2A高発現細胞：EBウイルス(+)Akata細胞からRT-PCRによりLMP2AのcDNAをクローニングし、neo<sup>r</sup>を組み込んだpSG5 vectorに挿入した(LMP2A-pSG5)。LMP2A-pSG5をelectroporation法でBJAB、Akata細胞に導入した。

ウイルス活性化：膜免疫グロブリンを介したウイルス活性化を蛍光抗体法で検討した。early antigens(EA)、viral capsid antigens(VCA)の陽性率を比較した。

## 結果

Akata細胞にtargeting vectorを遺伝子導入後、96well plateに5000個/wellで播き薬剤selectionを行った。2880well中薬剤耐性cloneは984well出現し、そのうち2cloneに組み換えEBウイルスが存在した。Southern-blot法による解析ではEcoR I / BamH I で digestされたDNAで8.3kbの相同組み換えによるband及び6.8kbの野生型のbandが検出され、EcoR I / Sac II で digestされたDNAで11.8kbの相同組み換えによるband及び3.7kbの野生型のbandが検出された。

組み換えEBウイルスプラスミドを有するAkata細胞を活性化し、野生型EBウイルスと組み換えEBウイルスの混合液を調整し、EBウイルス(-)Akata細胞に感染させ96well plateに5000個/wellで播き薬剤selectionを行った。薬剤耐性cloneは96well中12well出現し、Southern-blot法による解析では組み換えEBウイルスのみが感染していた。

RT-PCRによる解析で、組み換えEBウイルス (LMP2A(-)EBウイルス) 感染Akata細胞はLMP2A mRNAを発現していなかった。Immuno-blotによる解析で、LMP2A(-)EBウイルスで樹立したLCLはLMP2Aを発現していなかった。

LMP2A(-)EBウイルス感染Akata細胞とBXL1にneo<sup>r</sup>を組み込んだEBウイルス(neo<sup>r</sup>EBウイルス)感染Akata細胞のウイルス産生量を比較した。LMP2A(-)EBウイルス感染Akata細胞の3クローンは1リットルの培養液中に4.2、4.5、5.3 μgのウイルスDNAを産生しneo<sup>r</sup>EBウイルスAkata細胞の3クローンは1リットルの培養液中に2.9、4.0、5.8 μgのウイルスDNAを産生した。ウイルスDNA4ng相当のウイルス液を調整し、臍帯血Bリンパ球に感染させ不死化の効率を比較した。2回の実験で50% immortalization doseはLMP2A(-)EBウイルスは10<sup>4.8</sup>、10<sup>5.2</sup>、neo<sup>r</sup>EBウイルスは10<sup>5.2</sup>、10<sup>4.6</sup>であった。LMP2AはBリンパ球不死化の効率に影響なかった。

Akata細胞においてEBウイルスはI型潜伏感染様式をとり、LMP2Aの発現レベルはLCLと比較するとかなり低い。膜免疫グロブリン架橋によるcalcium mobilizationについてLMP2A(-)EBウイルス感染Akata細胞と野生型EBウイルス感染Akata細胞を比較したが、差はなく、ウイルス活性化の程度も差がなかった。野生型EBウイルス感染Akata細胞に遺伝子導入によってLMP2Aを高発現させると、膜免疫グロブリン架橋によるcalcium mobilizationは抑制されウイルス活性化も抑制された。一方、LMP2A(-)EBウイルス感染LCLでは野生型EBウイルス感染LCLと異なり膜免疫グロブリン架橋によるカルシウム動員は抑制されず、ウイルス産生誘導は高かった。EBウイルス(-)Akata細胞、BJAB細胞にLMP2Aを高発現させると、空ベクターを遺伝子導入した細胞と比較して、膜免疫グロブリン架橋によるcalcium mobilizationは抑制された。

## 考察

LMP2A(-)EBウイルスをモノクローナルに大量に産生し不死化効率を定量的評価した報告はこれまでなかった。本研究により、LMP2Aを欠失してもBリンパ球の不死化効率に影響がないことが示された。LMP2A、LMP2B両者を欠失した組み換えEBウイルスではBリンパ球の不死化効率が低下すると報告があるため、LMP2Bの不死化効率との関わりについては検討を要する。

LMP2AはEBNA2によりtransactivateされる。I型潜伏感染様式をとりEBNA2が発現しないAkata細胞ではLMP2Aの発現レベルはLCLと比較すると低い。EBウイルス感染末梢血リンパ球ではPCRでEBNA1とLMP2Aのみの発現が認められ、EBNA2は検出されないことよりLMP2Aの発現レベルは低いと考えられる。LMP2Aの発現レベルが低いAkata細胞で、膜免疫グロブリン架橋によるEBウイルス活性化が抑制されないことより、*in vivo*でのLMP2Aの発現レベルではEBウイルス活性化が抑制さ

れない可能性がある。

#### 結語

LMP2AはEBウイルスのBリンパ球不死化効率に影響を与えない。

LMP2Aは高発現すると膜免疫グロブリン架橋によるシグナル伝達を抑制しウイルス活性化を抑制するが低発現では抑制しない。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 高 田 賢 蔵  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## Role of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein2A on virus-induced immortalization and virus activation

(Epstein-Barr ウイルス latent membrane protein2A の  
細胞不死化、ウイルス活性化における役割)

EBウイルスがバーキットリンパ腫や上咽頭癌の原因ウイルスであることは広く知られているが、近年、さらにTリンパ腫、ホジキン病、さらに胃癌や唾液腺癌などの上皮性腫瘍における病因的関与が明らかにされつつあり、その発癌機構の解明は重要な課題となっている。

EBウイルスがコードする latent membrane protein2A (LMP2A) は、EBウイルス関連悪性腫瘍のみならず、末梢血中のEBウイルス潜伏感染Bリンパ球でも発現が示されている遺伝子であり、EBウイルス感染の維持に重要な役割を担っていると考えられている。膜免疫グロブリンの架橋を介したシグナル伝達は潜伏EBウイルスの活性化を誘導する。LMP2AはこのシグナルをブロックすることによりEBウイルス活性化を抑制すると考えられる。また組み換えEBウイルスを用いた報告により、LMP2AのBリンパ球の不死化効率に対する影響について論争されている。本研究では、組み換えEBウイルスをモノクローナルに大量に産生することのできるAkata細胞系を用いてLMP2AノックアウトEBウイルス (LMP2A(-)EBウイルス) を作成し、LMP2AのBリンパ球不死化に対する影響について定量的に検討するとともに、Akata細胞で少量発現しているLMP2AがEBウイルス活性化を抑制するか否かを検討した。

LMP2Aの第1エクソンにネオマイシン耐性遺伝子(neo<sup>r</sup>)を挿入し、第1エクソン両側の*Bgl*II fragmentをのりしろとしたtargeting plasmidを構築した。electroporation法でEBウイルス (+)Akata細胞に遺伝子導入し薬剤選択した。Southern-blot法で相同組み換えしたLMP2A (-)EBウイルスを有するAkata細胞を同定し、野生型EBウイルスとLMP2A(-)EBウイルスの混合液を調整した。ウイルス混合液をEBウイルス(-)Akata細胞に感染させ薬剤選択することによつてLMP2A (-)EBウイルスのみに感染したAkata細胞を獲得し、モノクローナルなLMP2A(-)EBウイルスを調整した。RT-PCR、immuno-blot法でLMP2A(-)EBウイルスAkata細胞、LMP2A(-)EBウイルスで樹立したlymphoblastoid cells(LCL)においてLMP2Aの発現の有無を検討した。EBウイルスDNA量で定量化したLMP2A(-)EBウイルス、neo<sup>r</sup>組み込みEBウイルスを臍帯血Bリンパ球に感染させ不死化の効率を比較した。膜免疫グロブリンを介したシグナル伝達に対するLMP2Aの影響を細胞内カルシウムイオンを測定し検討した。蛍光色素Fluo3で標識しフローサイトメーターで測定した。EBウイルス (+)Akata細胞からRT-PCRによりLMP2AのcDNAをクローニングし、neo<sup>r</sup>を組み込んだpSG5 vectorに挿入した(LMP2A-pSG5)。LMP2A-pSG5をelectroporation法でBJAB、Akata細胞に導入した。膜免疫グロブリンを介したウイルス活性化を蛍光抗体法で検討した。early antigens(EA)、viral

capsid antigens(VCA)の陽性率を比較した。

Akata細胞にtargeting vectorを遺伝子導入後、96well plateに5000個/wellで播き薬剤selectionを行った。2880well中薬剤耐性cloneは984well出現し、そのうち2cloneに組み換えEBウイルスが存在した。Southern-blot法による解析ではEcoR I / BamH I で digestされたDNAで8.3kbの相同組み換えによるband及び6.8kbの野生型のbandが検出され、EcoR I / Sac II で digestされたDNAで11.8kbの相同組み換えによるband及び3.7kbの野生型のbandが検出された。

組み換えEBウイルスプラスミドを有するAkata細胞を活性化し、野生型EBウイルスと組み換えEBウイルスの混合液を調整し、EBウイルス(-)Akata細胞に感染させ96well plateに5000個/wellで播き薬剤selectionを行った。薬剤耐性cloneは96well中12well出現し、Southern-blot法による解析では組み換えEBウイルスのみが感染していた。

RT-PCRによる解析で、組み換えEBウイルス [LMP2A(-)EBウイルス] 感染Akata細胞はLMP2A mRNAを発現していなかった。Immuno-blotによる解析で、LMP2A(-)EBウイルスで樹立したLCLはLMP2Aを発現していなかった。

LMP2A(-)EBウイルス感染Akata細胞とBXLFIにneo<sup>r</sup>を組み込んだEBウイルス(neo<sup>r</sup>EBウイルス)感染Akata細胞のウイルス産生量を比較した。LMP2A(-)EBウイルス感染Akata細胞の3クローンは1リットルの培養液中に4.2、4.5、5.3 μgのウイルスDNAを産生しneo<sup>r</sup>EBウイルスAkata細胞の3クローンは1リットルの培養液中に2.9、4.0、5.8 μgのウイルスDNAを産生した。ウイルスDNA4ng相当のウイルス液を調整し、臍帯血Bリンパ球に感染させ不死化の効率を比較した。2回の実験で50% immortalization doseはLMP2A(-)EBウイルスは10<sup>4.8</sup>、10<sup>5.2</sup>、neo<sup>r</sup>EBウイルスは10<sup>5.2</sup>、10<sup>4.6</sup>であった。LMP2AはBリンパ球不死化の効率に影響なかった。

Akata細胞においてEBウイルスはI型潜伏感染様式をとり、LMP2Aの発現レベルはLCLと比較するとかなり低い。膜免疫グロブリン架橋によるcalcium mobilizationについてLMP2A(-)EBウイルス感染Akata細胞と野生型EBウイルス感染Akata細胞を比較したが、差はなく、ウイルス活性化の程度も差がなかった。野生型EBウイルス感染Akata細胞に遺伝子導入によってLMP2Aを高発現させると、膜免疫グロブリン架橋によるcalcium mobilizationは抑制されウイルス活性化も抑制された。一方、LMP2A(-)EBウイルス感染LCLでは野生型EBウイルス感染LCLと異なり膜免疫グロブリン架橋によるカルシウム動員は抑制されず、ウイルス産生誘導は高かった。EBウイルス(-)Akata細胞、BJAB細胞にLMP2Aを高発現させると、空ベクターを遺伝子導入した細胞と比較して、膜免疫グロブリン架橋によるcalcium mobilizationは抑制された。

LMP2A(-)EBウイルスをモノクローナルに大量に産生し不死化効率を定量的評価した報告はこれまでなかった。本研究により、LMP2Aを欠失してもBリンパ球の不死化効率に影響がないことが示された。LMP2A、LMP2B両者を欠失した組み換えEBウイルスではBリンパ球の不死化効率が低下するとの報告があるため、LMP2Bの不死化効率との関わりについては検討を要する。

LMP2AはEBNA2によりtransactivateされる。I型潜伏感染様式をとりEBNA2が発現しないAkata細胞ではLMP2Aの発現レベルはLCLと比較すると低い。EBウイルス感染末梢血リンパ球ではPCRでEBNA1とLMP2Aのみの発現が認められ、EBNA2は検出されないことよりLMP2Aの発現レベルは低いと考えられる。LMP2Aの発現レベルが低いAkata細胞で、膜免疫グロブリン架橋によるEBウイルス活性化が抑制されないことより、*in vivo*でのLMP2Aの発現レベルではEBウイルス活性化が抑制されない可能性がある。

口頭発表において、吉木敬教授よりLMP2A過剰発現による膜免疫グロブリンの発現量の変化、LMP2A(-)EBウイルスにおけるLMP2Bの発現の程度その活性について質問があった。続いて高田賢蔵教授よりLMP2Aと発癌との関係、Akata細胞とLCLにおけるEBウイルス活性化の差異について質問があった。また加藤紘之教授よりEBウイルスと食道癌との関係について質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

審査員一同は、この研究成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を授与されるのに充分値するものと判定した。