

学 位 論 文 題 名

EB ウイルス (EBV) 関連・非腫瘍性 T リンパ球
増殖性疾患における EBV 潜伏感染様式の検討

学位論文内容の要旨

<緒言>

EB ウイルス(EBV)はガンマヘルペスウイルスに属し、初感染の後潜伏感染という状態で終生生体内の存在し続ける。またパーキットリンパ腫、上咽頭癌、およびホジキン病などの発癌に深く関わっており、EBV 感染と細胞の癌化との関係が注目されている。EBV の潜伏感染は、12 個の潜伏感染関連遺伝子の発現様式により Latency I、Latency II、および Latency III の 3 種類に分類されている。EBV 関連癌において見られる Latency I および II では、潜伏感染関連遺伝子の発現は制限されており、cytotoxic T lymphocyte (CTL) の主な標的となる潜伏感染関連遺伝子である EBV 核抗原(EBNA)2 や EBNA3 を発現しておらず、宿主の免疫機構から逃れるのに都合がよいのに対し、Latency III では全ての潜伏感染関連遺伝子が発現しており移植後リンパ球増殖性疾患等で見られる様式である。潜伏感染関連遺伝子の発現の違いは、各種疾患における EBV の潜伏感染様式を反映しているものと思われ、疾患の病態を考える意味でもその潜伏感染様式を知ることが重要と考えられる。慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) は、明らかな免疫不全がないにも関わらず EBV が原因で、発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫などの症状が持続した状態であり、重症例では多臓器不全やリンパ腫、血球貪食症候群により死亡する予後不良の疾患である。一方 EBV 関連血球貪食症候群 (EBV-AHS) は、主に EBV 初感染に伴い、伝染性単核球症 (IM) 様の症状に加え、汎血球減少、disseminated intravascular coagulation (DIC)、高サイトカイン血症などが進行し、骨髄、リンパ節、肝臓等で血球貪食像が認められる症候群である。CAEBV、EBV-AHS に共通した最も特徴的な点は、EBV のトロピズムが B リンパ球であるにも関わらず、T リンパ球で感染しているということである。さらに、EBV 感染細胞はモノクローナル、あるいはオリゴクローナルな増殖を来しているにも関わらず、光顕上芽球様の形態を示さず、正常の T リンパ球と区別が困難である。このことは、CAEBV における EBV の潜伏感染様式は癌化した細胞におけるものとは異なる可能性を示唆するものである。過去に非腫瘍性の T リンパ球増殖性疾患の潜伏感染関連遺伝子発現に関する報告はない。今回我々は、非腫瘍性リンパ球増殖性疾患である CAEBV および EBV-AHS 患者の組織における潜伏感染関連遺伝子の発現を検討した。さらに、潜伏感染関連遺伝子の発現を制御している 3 つの EBNA プロモーターの使用状況およびプロモーター活性の制御に重要と考えられているプロモーター領域のメチル化の状態も合わせて検討した。

<対象と方法>

対象は CAEBV 5 例、EBV-AHS 3 例である。診断は臨床症状、ウイルス学的検査にて行い、EBV-AHS 例ではさらに骨髄検査において血球貪食像を確認した。EBV 感染細胞の検索は CAEBV の 5 例中 3 例で行っており、2 例は T リンパ球、1 例は稀な B リンパ球であった。潜伏感染関連遺伝子の発現および使用プロモーターの検討は、患者組織検体を用い RT-PCR 法で行った。EBNA プロモーター領域のメチル化の解析には、メチル化特異的

bisulfite PCR 法を用いた。

<結果>

CAEBV では、潜伏感染関連遺伝子の発現は制限されており、2 例が Latency II, 1 例が Latency I, そして1 例が健康保因者と同じ潜伏感染様式を示した。残りの1 例では、EBER1 および EBNA1 の他 EBNA2 のみ発現していた。EBV-AHS では、調べた全ての潜伏感染関連遺伝子の発現を認め Latency III の発現様式であった。プロモーターは、CAEBV では Cp, EBV-AHS では Cp/Wp および Qp の両方が使用されていた。プロモーター領域のメチル化の検討では、CAEBV、EBV-AHS とともに Cp および Wp 領域は高度にメチル化されていたが、EBV-AHS では、Cp 領域がほとんどメチル化されていない少数の EBV 感染 B リンパ球の混在を認めた。

<考察>

EBV は B リンパ球と上皮細胞にのみ感染すると長年考えられてきたが、近年 T リンパ球にも感染することが示され、T リンパ球増殖性疾患にも重要な役割を担っていること、また腫瘍性の T リンパ球増殖性疾患や、培養 T 細胞株を用いた EBV 潜伏感染関連遺伝子発現では、いずれも Latency II の感染様式であると報告されている。本研究で、CAEBV でも、潜伏感染関連遺伝子の発現は制限されており、T 細胞リンパ腫など癌と同様の感染様式が示唆された。しかし、EBNA プロモーターの使用は癌とは異なり Qp ではなく、一般に Latency III で使用されている Cp であった。さらに、プロモーター活性とプロモーター領域のメチル化の程度は逆相関することが報告されているが、CAEBV では Cp を使用しているにも関わらず、Cp 領域は高度にメチル化されているという一見矛盾した結果であった。このことから、CAEBV では、Cp から開始されるが EBNA1 しか誘導しない特異なスプライシングパターンが存在し、さらに Cp 領域が高度にメチル化されているにも関わらず Cp を活性化できる新たな活性化機序の存在が示唆された。一方 EBV-AHS では、Latency III の潜伏感染関連遺伝子発現パターンを示し、また Cp/Wp および Qp 両方のプロモーターの使用が確認され、EBV 初感染である IM と同様の感染様式が示唆された。しかし、Cp 領域のメチル化状態は IM とは異なっており、EBV-AHS では高度にメチル化されていたのに対し、IM ではほとんどメチル化されていなかった。EBV-AHS、IM とともに Cp/Wp あるいは Qp を使用する異なる細胞集団が混在した状態と考えられるが、EBV-AHS では、大多数を占める EBV 感染 T リンパ球は Qp を使用し制限された潜伏感染関連遺伝子しか発現していないため CTL の標的になりにくいのに対し、IM では Cp/Wp を使用し Latency III の感染様式を示す細胞が大多数であり EBV 感染細胞は CTL により速やかに生体内から排除されると考えられ、このことが EBV-AHS と IM の臨床症状や重症度の違いを反映しているものと推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 高 田 賢 蔵

学位論文題名

EBウイルス (EBV) 関連・非腫瘍性Tリンパ球 増殖性疾患における EBV 潜伏感染様式の検討

EBウイルス(EBV)はガンマヘルペスウイルスに属し、初感染の後潜伏感染という状態で終生生体内の存在し続ける。またバーキットリンパ腫、上咽頭癌、およびホジキン病などの発癌に深く関わっており、EBV感染と細胞の癌化との関係が注目されている。EBVの潜伏感染は、12個の潜伏感染関連遺伝子の発現様式により Latency I、Latency II、および Latency III の3種類に分類されている。EBV関連癌において見られる Latency IおよびIIでは、潜伏感染関連遺伝子の発現は制限されており、cytotoxic T lymphocyte (CTL)の主な標的となる潜伏感染関連遺伝子であるEBV核抗原(EBNA)2やEBNA3を発現しておらず、宿主の免疫機構から逃れるのに都合がよいのに対し、Latency IIIでは全ての潜伏感染関連遺伝子が発現しており移植後の免疫抑制時に発症する移植後リンパ球増殖性疾患等で見られる様式である。潜伏感染関連遺伝子の発現の違いは、各種疾患におけるEBVの潜伏戦略を反映しているものと思われ、疾患の病態を考える意味でもその潜伏感染様式を知ることは重要である。慢性活動性EBV感染症(CAEBV)は、明らかな免疫不全がないにも関わらずEBVが原因で、発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫などの症状が持続し、重症例では多臓器不全やリンパ腫、血球貪食症候群により死亡する予後不良の疾患である。一方EBV関連血球貪食症候群(EBV-AHS)は、主にEBV初感染に伴い、伝染性単核球症(IM)様の症状に加え、汎血球減少、disseminated intravascular coagulation (DIC)、高サイトカイン血症などが進行し、骨髄、リンパ節、肝臓等で血球貪食像が認められる症候群である。CAEBV、EBV-AHSに共通した最も特徴的な点は、EBVのトロピズムがBリンパ球であるにも関わらず、Tリンパ球が感染しているということである。さらに、EBV感染細胞はモノクローナル、あるいはオリゴクローナルな増殖を来しているにも関わらず、特にCAEBVでは光顕上芽球様の形態を示さず、正常のTリンパ球と区別が困難なことある。このことは、CAEBVにおけるEBVの潜伏感染様式は癌化した細胞におけるものとは異なる可能性を示唆する。過去に非腫瘍性のTリンパ球増殖性疾患の潜伏感染関連遺伝子発現に関する報告はない。今回申請者は、非腫瘍性リンパ球増殖性疾患であるCAEBVおよびEBV-AHS患者の組織における潜伏感染関連遺伝子の発現を検討した。さらに、潜伏感染関連遺伝子の発現を制御している3つのEBNAプロモーターの使用状況およびプロモーター活性の制御に重要と考えられているプロモーター領域のメチル化の状態も合わせて検討した。

対象はCAEBV 5例、EBV-AHS 3例である。診断は臨床症状、ウイルス学的検査にて行い、EBV-AHS例ではさらに骨髄検査において血球貪食像を確認した。EBV感染細胞の検索は

CAEBV の 5 例中 3 例で行っており、2 例は T リンパ球、1 例は稀な B リンパ球であった。潜伏感染関連遺伝子の発現および使用プロモーターの検討は、患者組織検体を用い RT-PCR 法で行った。EBNA プロモーター領域のメチル化の解析には、メチル化特異的 bisulfite PCR 法を用いた。

CAEBV では、潜伏感染関連遺伝子の発現は制限されており、2 例が Latency II, 1 例が Latency I, そして 1 例が健康保因者と同じ潜伏感染様式を示した。残りの 1 例では、EBER1 および EBNA1 の他 EBNA2 のみ発現していた。EBV-AHS では、調べた全ての潜伏感染関連遺伝子の発現を認め Latency III の発現様式であった。プロモーターは、CAEBV では Cp、EBV-AHS では Cp/Wp および Qp の両方が使用されていた。プロモーター領域のメチル化の検討では、CAEBV、EBV-AHS とともに Cp および Wp 領域は高度にメチル化されていたが、EBV-AHS では、Cp 領域がほとんどメチル化されていない少数の EBV 感染 B リンパ球の混在を認めた。

EBV は B リンパ球と上皮細胞にのみ感染すると長年考えられてきたが、近年 T リンパ球にも感染することが示され、T リンパ球増殖性疾患にも重要な役割を担っていること、また腫瘍性の T リンパ球増殖性疾患や、培養 T 細胞株を用いた EBV 潜伏感染関連遺伝子発現では、いずれも Latency II の感染様式であると報告されている。本研究で、CAEBV でも、潜伏感染関連遺伝子の発現は制限されており、T 細胞リンパ腫など癌と同様の感染様式が示唆された。しかし、EBNA プロモーターの使用は癌とは異なり Qp ではなく、一般に Latency III で使用されている Cp であった。さらに、プロモーター活性とプロモーター領域のメチル化の程度は逆相関することが報告されているが、CAEBV では Cp を使用しているにも関わらず、Cp 領域は高度にメチル化されているという一見矛盾した結果であった。このことから、CAEBV では、Cp から開始される EBNA1 しか誘導しない特異なスプライシングパターンが存在し、さらに Cp 領域が高度にメチル化されているにも関わらず Cp を活性化できる活性化機序の存在が示唆された。一方 EBV-AHS では、Latency III の潜伏感染関連遺伝子発現パターンを示し、また Cp/Wp および Qp 両方のプロモーターの使用が確認され、IM と同様の感染様式が示唆された。しかし、Cp 領域のメチル化状態は IM とは異なっており、EBV-AHS では高度にメチル化されていたのに対し、IM ではほとんどメチル化されていなかった。このことから、EBV-AHS は IM と同様に Cp/Wp あるいは Qp を使用する異なる細胞集団が混在した状態と考えられるが、EBV-AHS では、大多数を占める EBV 感染 T リンパ球は Qp を使用し制限された潜伏感染関連遺伝子しか発現していないため CTL の標的になりにくいのに対し、IM では Cp/Wp を使用し Latency III の感染様式を示す細胞が大多数であるため、感染細胞は CTL により速やかに生体内から排除されると考えられ、このことが EBV-AHS と IM の臨床症状や重症度の違いを反映しているものと推測された。

公开发表に際し、副査の長嶋教授から、転写因子とプロモーター領域のメチル化との関連、3 疾患間におけるプロモーター使用とメチル化の差と症候の違いについて等、また、副査の高田教授から、用いた症例の診断法、組織の感染細胞の割合、PCR の感度、EBNA2 の変異の有無などについて、また主査の小林教授から、EBV-AHS で感染 T 細胞が Qp を使用している証拠、メチル化されたプロモーター領域が活性化される他の実例、および今後研究の方向についての質問があった。最後にフローアから、潜伏感染様式が似る EBV-AHS と IM が異なる臨床経過を示す理由についての質問があった。申請者は何れの質問に対しても、ほぼ妥当な回答を行った。

本研究は、CAEBV および EBV-AHS における潜伏感染関連遺伝子発現とそのプロモーター領域の解析から、両疾患の違いおよび EBV 関連癌との類似性と相違点を明らかにし、今後の本疾患の治療法選択に大きな示唆を与えた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。