

学位論文題名

Epstein-Barr ウイルス関連疾患における Epstein-Barr ウイルスの  
internal ribosome entry site の変異に関する研究

学位論文内容の要旨

<緒言>

真核生物におけるタンパク合成では、通常 mRNA の 5'末端に存在するキャップ構造がリボソームに認識されて翻訳が開始されるが、一部のウイルスや真核細胞固有の mRNA においては mRNA の内部に存在する internal ribosome entry site(IRES)といわれる領域にリボソームが結合することによって翻訳が開始される機構も存在する。Epstein-Barr ウイルス(EBV)でも 2003年に初めて Epstein-Barr nuclear antigen 1(EBNA1)遺伝子の 5'非翻訳領域に位置する U exon に IRES が含まれていることが報告された。EBV 感染により引き起こされる疾患は多岐にわたるが、その病態や重症度の違いをもたらす要因についてはまだ十分には解明されておらず、EBV 関連疾患と EBV の IRES がどのように関わっているかを知ることは、病態の違いを考えるうえでも興味深い。この研究では EBV 関連リンパ増殖性疾患の患者から検出された EBV の IRES 領域の塩基配列を解析し、変異の有無と疾患との関係について検討を行った。また、変異の有無による IRES 領域の mRNA の 2 次構造の変化や機能の変化も検討した。

<材料と方法>

伝染性単核症(IM)患者 19 例、慢性活動性 EBV 感染症(CAEBV)患者 13 例、EBV 関連血球貪食症候群(EBV-AHS)患者 6 例の末梢血単核球 (PBMC) または凍結保存組織 (リンパ節、脾臓)、IM 患者 3 例、CAEBV 患者 2 例、EBV-AHS 患者 1 例の唾液、EBV を感染させずに自然に樹立したリンパ芽球細胞株 (Lymphoblastoid cell line: LCL) 15 株 (IM 患者 7 株、CAEBV 患者 4 株、健常者 4 株) から抽出した DNA を検体として PCR とシーケンスにより U exon の塩基配列の解析を行った。mRNA の 2 次構造の予測は M Zucker's Mfold web server を用いて行った。EBNA1 の 5'非翻訳領域を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターベクターを作成し、293 細胞株と BJAB 細胞株に導入して IRES 領域の変異によるルシフェラーゼ活性の変化を比較した。

<結果>

EBV の U exon の塩基配列は高度に保存されていたが、検体により 67585 番目の塩基のみに T から C への変異がみられた。この変異がみられた頻度は臨床検体では IM の 5.3%(1/19) に対して、CAEBV では 69.2%(9/13)、EBV-AHS では 66.7%(4/6)、CAEBV と EBV-AHS を T リンパ球増殖性疾患としてまとめると 68.4%(13/19) と高く、IM と比較すると明らかな有意差を認めた ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  検定)。EBV を感染させずに自然に樹立した LCL では 15 株全てに同部位の変異がみられた。実験細胞株の B95-8 細胞株では変異はみられなかったが、

Akata 細胞株、Raji 細胞株では同部位の変異がみられた。唾液の EBV でも 1 例以外は全て同部位に変異がみられたが、1 例の CAEBV 患者の唾液中 EBV では 67585 番目の塩基に変異がある株(C)とない株(T)とが混在していた。変異により EBV IRES 領域の mRNA の 2 次構造には変化がみられた。EBV IRES を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターベクターではルシフェラーゼ活性の増強がみられたが、増強の程度には変異の有無による有意差は認められなかった。

#### <考察>

EBV の潜伏感染は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 つに分類されるが、EBNA1 は全ての潜伏感染様式において発現しており、EBV の複製やゲノムの維持に必須のタンパクであるとされている。

本研究において CAEBV や EBV-AHS では IM と比較して EBV の IRES に高頻度で変異がみられたことから、IRES の変異は CAEBV や EBV-AHS など EBV 関連疾患の進展に関与している可能性が示唆された。また、唾液中の EBV でも高頻度に変異がみられたことから、IRES に変異のある EBV は溶解感染のサイクルに入りやすい可能性が示唆された。

EBV を感染させずに自然に樹立した LCL では全ての株に IRES の変異がみられたが、健康者の PBMC に IRES に変異のない B95-8 EBV 株を感染させて樹立した LCL では変異がみられなかった。このことから、LCL でみられる変異は元々感染していた EBV 株に由来する変異であり、LCL が樹立される過程で生じた変異ではないと考えられた。EBV を感染させずに自然に樹立した LCL は、ヒト体内に混在して感染していた EBV 株のうち、変異のある EBV 株の感染した細胞が優位に増殖した状態と推測される。一般的に EBV を感染させずに自然に LCL が樹立される際には、末梢血中に存在していた EBV 感染細胞が直接不死化して増殖するのではなく、EBV 感染細胞から溶解感染のサイクルに回ったウイルスが一度放出され、そのウイルスが周囲の細胞に感染し、感染した細胞が不死化することにより LCL が樹立されるという考えが支持されている。このことより、全ての LCL で変異のある EBV 株が検出された理由については、変異のある EBV が感染細胞に何らかの growth advantage を与えて細胞の増殖能力を高めたという可能性の他に、変異のある EBV 株が溶解感染のサイクルに入りやすいためにより多く周囲の細胞に感染し、LCL が樹立された段階では優位になっているという可能性も考えられた。

EBV IRES 領域の mRNA の 2 次構造には、1 塩基置換のみであるにもかかわらず変異による構造変化が認められた。変異のみられる部位を含むドメインは IRES の活性に重要であると報告されており、この部位の構造変化が IRES の機能に影響を及ぼす可能性も十分に考えられた。ウイルスの IRES において IRES 領域の変異によりその機能が大きく変化する例が知られており、EBV においても IRES の変異がその機能に影響を及ぼしている可能性がある。本研究においては、ルシフェラーゼ・レポーターベクターへの EBV IRES 挿入によってルシフェラーゼ活性が増強することは確認できたが、増強の程度には変異の有無による有意差がみられず、変異による IRES 活性の変化を直接証明することはできなかった。

EBV 関連疾患の病因はウイルス側の問題、宿主側の問題、遺伝的な問題など様々な方面から考えられてきたが、現在は EBV の変異は地域性によるものであり、疾患特異性はないとする見解が一般的である。EBV IRES の変異が IM 以外の EBV 関連リンパ増殖性疾患の進展に関わるものであるとすれば、ウイルスの変異が疾患の発症に関わっている例としては本研究が初の報告となる。今後この EBV IRES の機能や作用機序を明らかにしていくことが、EBV の複雑な感染戦略機構や EBV 関連リンパ増殖性疾患の病態の解明、治療法の開発につながっていくことを期待したい。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正  
副 査 教 授 高 田 賢 蔵  
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

## Epstein-Barr ウイルス関連疾患における Epstein-Barr ウイルスの internal ribosome entry site の変異に関する研究

真核生物におけるタンパク合成では、通常 mRNA 5'末端のキャップ構造がリボソームに認識されて翻訳が開始されるが、内部に存在する internal ribosome entry site (IRES) から翻訳が開始される機構も存在する。Epstein-Barr ウイルス (EBV) でも 2003 年に初めて Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) 遺伝子の 5'非翻訳領域に位置する U exon に IRES が存在すると報告された。本研究において申請者は EBV 関連リンパ増殖性疾患の患者から検出された EBV の塩基配列を解析し、変異の有無と疾患の関係について検討を行った。また、変異による IRES の 2 次構造の変化や機能の変化も検討した。

伝染性単核症 (IM) 19 例、慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) 13 例、EBV 関連血球貪食症候群 (EBV-AHS) 6 例の末梢血単核球 (PBMC) または凍結保存組織、IM 3 例、CAEBV 2 例、EBV-AHS 1 例の唾液、EBV を感染させずに自然に樹立したリンパ芽球細胞株 (LCL) 15 株 (IM 7 株、CAEBV 4 株、健常者 4 株) を対象として、PCR とシーケンスにより U exon の塩基配列を解析したところ、検体により 67585 番目の塩基のみに T から C への変異がみられた。PBMC または組織でこの変異がみられた頻度は IM の 5.3% (1/19) に対して、CAEBV では 69.2% (9/13)、EBV-AHS では 66.7% (4/6) と高く、明らかな有意差を認めた。LCL では全ての株に変異がみられた。唾液でも全例に変異がみられたが、CAEBV の 1 例では変異がある株とない株が混在していた。Mfold web server を用いた IRES の 2 次構造の予測では、変異により構造の変化がみられた。EBV IRES 領域を挿入したルシフェラーゼ・レポーターベクターを作成して 293 細胞株と BJAB 細胞株に導入し、IRES の機能の変化を検討した結果では、ルシフェラーゼ活性は増強したものの、変異の有無による差は認められなかった。

CAEBV や EBV-AHS では IM と比較して EBV の IRES に高頻度で変異がみられ、唾液では全例に変異がみられたことから、CAEBV や EBV-AHS において IRES に変異のある EBV が感染細胞に何らかの growth advantage を与える可能性や、変異のある EBV が溶解感染のサイクルに入りやすい可能性が考えられた。また、LCL では全ての株に変異がみられたが、健常者の PBMC に IRES に変異のない B95-8 EBV 株を感染させて樹立した LCL では変異がみられず、こ

の変異は LCL が樹立される過程で生じたものではないと考えられた。一般的に LCL が樹立される際には、末梢血中に存在する EBV 感染細胞からウイルスが一度放出されて B リンパ球に感染し、新たに感染した B リンパ球が芽球化するという考えが支持されている。LCL では、変異のある EBV が感染細胞に何らかの growth advantage を与えて細胞の増殖能力を高めた可能性や、溶解感染のサイクルに入りやすいためより多く周囲の B リンパ球に感染して、LCL が樹立された時点で優位になっている可能性が考えられた。予測される IRES の 2 次構造には変異による変化が認められ、この構造の変化が IRES の機能に影響を及ぼす可能性も考えられた。ルシフェラーゼ・レポーターベクターへの EBV IRES 挿入では、ルシフェラーゼ活性の増強を確認できたが、変異の有無による差を証明することはできなかった。

公開発表に際し、副査の高田賢蔵教授から変異の有無による EBNA1 の発現の差、EBV 感染細胞と変異との関連性、レポーターアッセイにおけるコンストラクト等についての質問、次いで副査の清水宏教授から臨床検体で得られた結果の意味づけ、変異の有無と臨床症状との関連性、ウイルスの別の部位にも変異がある可能性等についての質問、また主査の有賀正教授から IM において唾液と PBMC での結果が解離している理由、ウイルスの変異の起こりやすさ、感染時のウイルスの混在状態等についての質問があったが、いずれの質問に対しても申請者は誠意ある妥当な回答をした。

本研究は、EBV IRES の変異が CAEBV や EBV-AHS など EBV 関連疾患の進展に関与している可能性を示唆した。今後この方面の研究発展が EBV の複雑な感染戦略機構や EBV 関連リンパ増殖性疾患の病態の解明、治療法の開発につながっていくと期待される。

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。