

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 渡邊 亜美

### 学位論文題名

#### バーキットリンパ腫細胞の増殖、生存における EBV の役割に関する研究

【背景と目的】 Epstein-Barr virus (EBV) はヘルペスウイルス科に属する 2 本鎖 DNA ウイルスである。殆どの健常成人に無症候性に感染している普遍的なウイルスであるが、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、胃癌、T/NK リンパ腫など様々な癌の発症に関与すると考えられている。EBV 陽性バーキットリンパ腫 (BL) は EBV の潜伏感染様式から二種類のタイプに分けられる。ひとつは latency I と呼ばれるタイプで、BamHI Q プロモーターより EBNA1 タンパク質を発現する。もう一つは Wp プロモーターから EBNA1、EBNA3A, 3B, 3C、欠損型 EBNA-LP、BHRF1 を発現する Wp-restricted latency と呼ばれるタイプである。両方のタイプに共通して発現している EBNA1 は、EBV ゲノムの維持に必須のウイルスタンパク質である。近年、BL 細胞の増殖や生存に EBV が重要な役割を果たすことが報告されたが、その詳細なメカニズムについては未だ不明の点が少なくない。特に最近になってから同定された Wp-restricted latency を呈する BL については不明の点が多い。本研究は、Wp-restricted 型 BL 細胞の生存において EBV がどのような役割を果たしているかを解明することを目的として行われた。ウイルスゲノム維持に必須の EBNA1 の機能を抑制するという方法を用いて、Wp-restricted 型 BL 細胞株 の P3HR-1 から EBV ゲノムを脱落させ、細胞の増殖や生存にどのような変化が起こるか解析した。さらに、どのウイルス遺伝子が重要な役割を果たすかについても検討を行った。

【材料と方法】 Wp-restricted 型 BL 細胞株 P3HR-1 において、ドミナントネガティブ EBNA1 (以下 dnEBNA1) をテトラサイクリン制御下でコンディショナルに発現する P3HR-1 安定細胞株 (P3-dnEBNA1) を作製した。dnEBNA1 は野生型 EBNA1 機能を阻害することが報告されており、EBNA1 は EBV ゲノムの維持に必須のタンパクであるため、dnEBNA1 を発現させることによって EBV ゲノムを細胞から脱落させることが可能となる。P3-dnEBNA1 細胞に、Bcl-2、BHRF1 をそれぞれ外来性に強制発現させた細胞株 P3-dnEBNA1-Bcl2、P3-dnEBNA1-BHRF1 を作製した。ノックダウン実験は、BHRF1 に対する shRNA と EGFP を発現する OriP ベクターを細胞に遺伝子導入することにより行った。

【結果】 P3-dnEBNA1 細胞を Dox 存在下で培養すると dnEBNA1 の発現は認められなかったが、Dox 非存在下で培養すると dnEBNA1 の発現が強く誘導された。dnEBNA1 発現によって P3HR-1 細胞内の EBV ゲノム量は進行性に減少した。それに伴い、EBV 遺伝子産物の発現量も著明に減少した。したがって、dnEBNA1 を発現させることによって、期待通りに EBV ゲノムが脱落し、ウイルス遺伝子産物の発現も失われることが明らかになっ

た。次に、EBV ゲノムの減少が細胞のにもたらす影響を検討するために、P3-dnEBNA1 細胞を Dox 存在下 (dnEBNA1 非発現下) あるいは Dox 非存在下 (dnEBNA1 発現下) で培養して生細胞数を計測した。dnEBNA1 を発現していない細胞では生細胞数は指数関数的に増殖したのに対し、dnEBNA1 を発現した細胞では生細胞数の増加が著しく抑制された。さらに、dnEBNA1 発現細胞ではアポトーシスが誘導されていた。すなわち、EBV ゲノム脱落に伴って、P3HR-1 細胞の増殖抑制およびアポトーシスが惹起されることが明らかになった。次に、EBV ゲノム脱落細胞にみられる増殖抑制の主たる要因がアポトーシスによるものであるか検討するために、dnEBNA1 を Dox 制御下で発現し、かつ Bcl-2 を強制発現させた細胞株 P3-dnEBNA-Bcl2 を作製した。Bcl-2 の強制発現でアポトーシスを阻止することによって細胞増殖抑制を回避させられるか検討した。P3-dnEBNA-Bcl2 において dnEBNA1 を発現させて EBV ゲノムは脱落させたところ、アポトーシス阻止とともに増殖抑制もほぼ完全に回避された。したがって EBV ゲノム脱落に伴う細胞増殖抑制の主因はアポトーシスであると考えられた。この結果を受けて、EBV がコードする Bcl-2 ホモログである BHRF1 に着目した。BHRF1 を外来性に過剰発現させた P3-dnEBNA-BHRF1 細胞株を作製し、dnEBNA1 を発現させて EBV ゲノムを脱落させた。その結果、P3-dnEBNA-Bcl-2 と同様に、P3-dnEBNA-BHRF1 においても EBV ゲノム脱落に伴うアポトーシスと細胞増殖抑制はほぼ完全に阻止されていた。さらに、BHRF1 に対する shRNA を用いて P3HR-1 細胞において内在性に発現している BHRF1 をノックダウンした結果、P3HR-1 細胞に細胞死が誘導された。以上の結果から、P3HR-1 細胞の生存において EBV が必須の役割を果たしていること、BHRF1 が生存因子として機能していることが明らかになった。

【考察】 本研究により、Wp-restricted 型 BL 細胞株 P3HR-1 の生存にウイルス Bcl-2 ホモログ BHRF1 が必須であることが判明した。BHRF1 が外来性のアポトーシス誘導刺激に対するアポトーシス抵抗性を賦与することはこれまでも報告されていたが、外来のアポトーシス刺激のない至適培養条件下において BL 細胞の生存に BHRF1 が必須の役割を果たしていることを示したのは本研究が初めての報告である。BL 細胞では c-myc/Ig 染色体転座による c-myc 発現活性化によってアポトーシス感受性が亢進していると考えられている。Bcl-2 と c-myc は協調してリンパ腫発生を促進することが知られており、BHRF も c-myc と協調的に働くことによって Wp-restricted 型 BL の発生に貢献しているものと考えられる。本研究により、EBV ゲノムを脱落させることが Wp-restricted 型 BL の有効な治療法になりうることも明らかになった。今後、より実用的な EBNA1 阻害分子が同定されて治療に応用されることが期待される。

【結論】 EBV は Wp-restricted 型 BL 細胞株 P3HR-1 の生存に必須であること、さらに、EBV のコードする Bcl-2 ホモログ BHRF1 が生存因子として機能していることが明らかになった。本研究結果から、BHRF1 はアポトーシスを抑制することによって Wp-restricted 型 BL の発生を促進することが示唆された。さらに本研究により、EBV ゲノムを細胞から脱落させることが Wp-restricted 型 BL の有効な治療法になりうることを示された。