

主論文の要旨

Role of Epstein-Barr Virus C Promoter Deletion in Diffuse Large B Cell Lymphoma

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における
Epstein-Barr ウイルス C プロモーター欠損の意義

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
高次医用科学講座 臓器病態診断学分野

(指導：加留部 謙之輔 教授)

馬淵 青陽

【緒言】

Epstein-Barrウイルス(EBV)はヘルペスウイルス科に属し、全人口の90%以上に感染する普遍的なウイルスである。EBVは唾液を通じてB細胞に感染し、一生に渡って感染を続ける。感染者の多くは無症状であるが、一部の感染者にはEBVに関連した腫瘍が発生することが知られている。EBVに関連した腫瘍ないし腫瘍様病変として、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL)、節外性NK/T細胞性リンパ腫・鼻型(Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type : ENKL)、慢性活動性EBV感染症(Chronic active Epstein-Barr virus infection : CAEBV)、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、胃癌、上咽頭癌が知られている。EBVに関連した癌は癌全体の1%以上を占めるという報告もある。EBVに関連した発癌機構は未だに不明な点が多く、我々はEBVのゲノムの機能を解析して解明を試みている。

EBVはB細胞に感染したのち、潜伏感染に移行し、一部の遺伝子のみを発現させる。宿主の免疫抑制などによりほぼ全ての遺伝子を発現して溶解感染に移行し、子孫ウイルスを産生する。*In vitro*でもこの生活環を再現することができる。B細胞にEBVを初感染させると、EBVはB細胞中に潜伏感染する。するとB細胞は増殖を始め、細胞株が樹立できる。この現象を形質転換といい、樹立された細胞株をリンパ芽球様細胞(Lymphoblastoid cell line : LCL)と呼ぶ。EBVが潜伏感染した細胞には、BZLF1というEBV遺伝子が発現させることで溶解感染を起こすことができる。

我々の先行研究において、EBVに関連して発症したDLBCL、ENKL、CAEBVの増殖細胞に含まれるEBVゲノムを解析したところ、C promoter(Cp)というEBVプロモーターに欠損を有する株を3例見出した(Figure 1, Okuno, Y et al. *Nat Microbiol.* 2019)。CpはEBVのB細胞への初感染時や潜伏感染の一部において活性化し、EBNA遺伝子群を発現させる機能が知られている。EBNA遺伝子群はEBVの感染維持に極めて重要な役割を果たしているにも関わらず、EBV関連腫瘍の臨床検体からCpの欠損が見出されるという事実は興味深い。そこで本研究ではCp欠損の腫瘍発生における意義を明らかにするために、DLBCLの臨床検体と同様の欠損をEBVゲノムに導入し、Cp欠損株と野生株のウイルスの表現型を比較した。

【方法・結果】

大腸菌内相同組換えを利用して、B95-8という野生株にCpの転写開始部位を含む332bpの欠損を導入し、Cp欠損株を作成した。Cpの欠損部に野生株と同じDNA配列を再度挿入し、復帰株も作成した(Figure 2A)。作成したゲノムをBamHI、EcoRI という2種類の制限酵素で処理して、アガロースゲル上で電気泳動を行いゲノムの切断パターンを確認した。欠損株ではCpの欠損を反映してバンドの移動が観察された(Figure 2B)。

これらのEBVゲノムをHEK293細胞(ヒト胎児腎細胞由来)に導入し、EBV感染細胞を樹立した。そこにBZLF1遺伝子を発現させて溶解感染を誘導し、子孫ウイルスを取得した。取得したウイルスの力価を標準化し、末梢血単核細胞に感染させて形質転換効

率を定量したところ、Cp欠損株は野生株、復帰株よりも10倍ほど効率的にB細胞の形質転換を引き起こすことが分かった (Figure 3A, B)。

次に、ヒト化重症免疫不全マウスであるNOGマウスを用いて、EBV関連リンパ増殖異常症 (EB virus associated lymphoproliferative disorder : EBV-LPD) のモデルを作成した。EBVに感染したヒト臍帯血細胞を腹腔内投与することでEBV-LPDを発症させ、体重の推移と死亡までの期間を観察した。すると、Cp欠損株の感染したEBV-LPDを発症したマウスの方が、野生株の感染したEBV-LPDを発症したマウスよりも有意に早く死亡するという結果が得られた ($p < 0.001$, Figure 4A, B)。また、前者ではLPD細胞がより激しく臓器に浸潤していた (Figure 4C, D)。

この機序を解明するために、野生株、Cp欠損株、復帰株を末梢血中のB細胞に感染させてLCLを樹立し、RNAシーケンスによる遺伝子発現スクリーニングとRT-qPCRを行った。Cp欠損株ではCpの代わりにW promoter (Wp) という別のEBVプロモーターを活性化していること、またLMP2AというEBV遺伝子の転写が亢進していることが判明した (Figure 5A-J)。

LMP2AはB細胞の生存に関わるEBV遺伝子で、形質転換にも寄与していることが知られている。そこでCp欠損株にLMP2Aの欠損を導入して二重欠損株を作成したが、LMP2Aの単独欠損株と比較してもなお形質転換効率の上昇が観察された。よって、Cpの欠損による形質転換効率の上昇は、LMP2Aの発現上昇では説明できないと解釈した (Figure 6A-B)。

次に、BHRF1というEBV遺伝子に着目した。BHRF1はヒトのBCL2のホモログで、強力な抗アポトーシス活性を持つこと、Wpより高発現することが知られている。そこでCp欠損株のBHRF1遺伝子に終止コドンを挿入して二重欠損株を作成し、形質転換効率を定量したが、BHRF1単独欠損株と比較してもなお形質転換効率の上昇が観察された。LMP2Aと同様に、Cpの欠損による形質転換効率の上昇は、BHRF1の発現上昇では説明できないと解釈した (Figure 7A-B)。

【考察】

これまで、EBVに関連した腫瘍の発生には様々なメカニズムが提唱されてきた。例えば、EBVの遺伝子が感染した細胞の生存に働く、宿主ゲノムの変異を誘発する、宿主のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の発現をエピジェネティックに制御する、免疫逃避に寄与するなどの報告がある。

本研究では、先行研究でDLBCLの臨床検体から発見したEBVのCpの欠損が、EBVによるB細胞の形質転換効率を上昇させることを明らかにした。形質転換においては、細胞増殖の促進とアポトーシスの障害が起きているため、この現象はCpの欠損が腫瘍発生に関与することを示唆している。実際に、マウスモデルではCpの欠損がEBV-LPDの病勢進行を早めることも観察された。今までは、腫瘍に含まれるEBVのゲノムの変異は例外的だと考えられており、EBV関連腫瘍の発生とは関連づけられることはなか

ったが、本研究によりEBVのゲノム変異がEBVに関連した発癌、癌の進行に関与していることが示唆された。

Cp欠損株の表現型については先行研究が存在するが、本研究とは異なり、Cpの欠損により形質転換効率が低下するという報告であった(Tierney, RJ et al. *J Virol.* 2015)。この研究ではCpの転写開始部位を含む1391bpの欠損を挿入していた。本研究(332bp)よりも欠損が大きく、プロモーターの前後の転写因子の結合部位やエンハンサー領域が削られたために、形質転換効率が低下したものと考えられる。本研究ではLMP2AやBHRF1といったEBV遺伝子の発現を元にCpと形質転換の関係性について検討したが、Cp欠損による形質転換効率の上昇の機序について明らかにすることはできなかった。今後、Cp周囲の配列の機能を明らかにすることで、Cpと形質転換との関係性についてさらに理解を深めることができると考えられる。

【結論】

EBVは腫瘍関連ウイルスであるが、未だにEBVがどのようにして腫瘍発生に関連するのかについては不明な点が多い。本研究により、DLBCLの臨床検体から発見されたEBVのC promoterの欠損がEBVに関連した発癌、癌の進行に関与していることが示唆された。今後分子生物学的な機構を明らかにすることで、EBV関連腫瘍の診断や治療に貢献することを目指している。