

医研 248

(別紙様式第3号)


論 文 要 旨

論文題目

TRANSACTIVATION OF THE *CCL5/RANTES* GENE BY EPSTEIN-BARR VIRUS
LATENT MEMBRANE PROTEIN 1

(エプスタイン・バーウイルスの潜伏感染遺伝子産物である

LMP-1 によるケモカイン *CCL5/RANTES* 遺伝子転写活性化機構)

氏 名 内原 潤 之 介 

【目的】EBウイルス（EBV）はバーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫を含む悪性腫瘍の原因ウイルスである。これらリンパ腫のリンパ節にはT細胞の集積が見られ、ケモカインの関与が指摘されている。T細胞に走化性を有するCCL5/RANTESは上記リンパ腫において発現が認められるが、その遺伝子発現制御機構は知られていない。本研究では、EBVのトランスフォーミング蛋白LMP1によるCCL5遺伝子発現誘導効果を検証し、その分子機構を解析した。

【方法】バーキットリンパ腫細胞株であるBJAB、Ramos、Raji、Daudiを解析に用いた。EBV感染の有無はDNAを抽出後、PCRで解析した。CCL5、LMP1 mRNAの発現はRT-PCRで解析した。培養上清中のCCL5濃度はELISAで、またCCL5の主要な受容体であるCCR5の発現は抗体を用いたフローサイトメトリーで測定した。CCL5遺伝子プロモーターの解析は転写開始点より上流195塩基を含むルシフェラーゼ発現プラスミドとLMP1発現プラスミドをBJABや胎児腎細胞株293T細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。転写因子のDNA結合はEMSAで解析した。

【成績】 バーキットリンパ腫株では EBV 感染を認める Raji、Daudi において LMP1 発現を認め、LMP1 発現と CCL5 mRNA の発現および CCL5 分泌の相関を認めた。全細胞株は CCR5 を発現しており、BJAB および 293T 細胞に LMP1 を発現させると、CCL5 mRNA の発現の増強と CCL5 分泌の増加が認められた。また、Daudi は少量の LMP1 と CCL5 の発現を認めたが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理により、内在性の LMP1 発現を増強したところ、CCL5 mRNA 発現の増強が認められた。ルシフェラーゼアッセイの結果、LMP1 は CCL5 遺伝子を転写レベルで活性化し、LMP1 の生物活性を担う領域である CTAR1 と CTAR2 が、CCL5 の転写活性化に重要であった。TRAF2、NIK、IKK、I κ B の優性抑制変異体を共発現させると、LMP1 による CCL5 の転写活性化が抑制された。CCL5 プロモーター領域の欠失変異体を用いて LMP-1 反応領域を検討したところ、NF- κ B 結合配列を含む A・B 領域が重要であった。また、A・B 領域に存在する NF- κ B 結合配列への転写因子の結合を EMSA にて検討した結果、LMP1 を導入した 293T 細胞において NF- κ B 結合活性の増強を認めた。さらに、バーキットリンパ腫細胞株の CCL5 発現と NF- κ B 結合活性は相関した。抗体を用いた解析により、NF- κ B の




構成成分は p50、p65、および c-Rel であることがわかった。

【結論】EBV 関連腫瘍で認められる T 細胞の集積に LMP1 が誘導する CCL5 の関与が示唆される。LMP1 の CTAR1 と CTAR2 領域は、TRAF2、NIK、IKK といった NF- κ B 経路の活性化を介して、CCL5 遺伝子の転写を活性化させる。またバーキットリンパ腫は CCR5 の発現を認めたことより、CCL5 のオートクライン機構の存在も示唆される。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	内原 潤之介
		審査日	平成 16 年 11 月 25 日	
論文審査委員		主査教授	宗 政 輝 男	
		副査教授	末 野 哲 也	
		副査教授	陣 野 吉 廣	

(論文題目)

TRANSACTIVATION OF THE *CCL5/RANTES* GENE BY EPSTEIN-BARR VIRUS
LATENT MEMBRANE PROTEIN 1

(論文審査結果の要旨)

上記論文の研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき検討した。以下の審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

EBVはバーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫を含む悪性腫瘍の原因ウイルスである。これらリンパ腫の病変部にはT細胞の集積が見られ、ケモカインの関与が指摘されている。T細胞に走化性を有するCCL5/RANTESは上記リンパ腫において発現が認められるが、その遺伝子発現制御機構は知られていない。本研究では、EBVのトランスフォーミング蛋白LMP1によるCCL5遺伝子発現誘導効果を明らかにし、その分子機構を解析した。

2. 研究内容；方法、結果および結論

(方法)

バーキットリンパ腫細胞株であるBJAB、Ramos、Raji、Daudiを解析した。EBV感染の有無をPCRで解析した。CCL5、LMP1 mRNAの発現はRT-PCRで解析した。培養上清中のCCL5濃度はELISA、CCL5の主要な受容体であるCCR5の発現は抗体を用いたフローサイトメトリーで測定した。CCL5遺伝子プロモーターの解析は転写開始点より上流195塩基を含むルシフェラーゼ発現プラスミドとLMP1発現プラスミドをBJABや293T細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。転写因子のDNA結合はゲルシフトアッセイで解析した。

- 備 考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。

(結果)

- 1) パーキットリンパ腫株ではEBV感染を認めるRaji、DaudiでLMP1発現を認め、LMP1発現とCCL5 mRNA発現及びCCL5分泌の相関を認めた。また、全細胞株でCCR5発現が認められた。
- 2) 遺伝子導入による外因性LMP1の発現誘導およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (FR901228) 処理による内在性LMP1発現を増強したところ、CCL5mRNA発現の増強が認められた。
- 3) LMP1はCCL5遺伝子を転写レベルで活性化し、LMP1の生物活性を担う領域であるCTAR1とCTAR2がCCL5の転写活性化に重要であった。
- 4) TRAF2、NIK、IKK、 $I\kappa B$ の優性抑制変異体を共発現させると、LMP1によるCCL5の転写活性化が抑制された。
- 5) CCL5プロモーター領域の欠失変異体を用いてLMP-1反応領域を検討したところ、NF- κB 結合配列を含むA・B領域が重要であった。
- 6) NF- κB 結合配列への転写因子結合をゲルシフトアッセイで検討した結果、LMP1導入293T細胞においてNF- κB 結合活性の増強を認め、パーキットリンパ腫細胞株のCCL5発現とNF- κB 結合活性は相関した。抗体を用いた解析により、NF- κB の構成成分はp50、p65、及びc-Relであった。

(結論)

EBV関連腫瘍で認められるT細胞の集積にLMP1が誘導するCCL5の関与が示唆された。LMP1のCTAR1とCTAR2領域は、TRAF2、NIK、IKKといったNF- κB 経路の活性化を介して、CCL5遺伝子の転写を活性化させる。またパーキットリンパ腫ではCCR5の発現を認め、CCL5のオートクライン機構の存在が示唆された。

3.研究成果の意義と学術水準

EBV関連腫瘍におけるCCL5/RANTESの遺伝子発現制御機構は明らかにされていなかったが、本研究では、EBVのトランスフォーミング蛋白LMP1によるNF- κB 活性経路を介したCCL5遺伝子の転写活性およびCCL5の発現制御機構を明らかにした。また、本研究はEBV関連腫瘍の研究領域において示唆に富む内容を含み、国際的にも評価されるものであると判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。