Osaka University Knowledge Archive

Title	Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2)
Author(s)	羅, 文娟
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45400
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名	羅（ロウ）　文（ウン）　娟（ジイン）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１９２８７　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Epstein-Barr virus is integrated between *REL* and *BCL-11A* in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2) **（バーキット　リンパ腫細胞株（NAB-2）における EBV 組み込み部位は癌遺伝子 *REL* と *BCL-11A* の間にある）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　青笹　克之 （副査） 教　授　山西　弘一　　教　授　金倉　　譲

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

Epstein-Barr virus (EBV) は Burkitt リンパ腫 (BL) から単離された約 170 kbp の二重鎖 DNA ウイルスである。EBV は BL や鼻咽頭癌（NPC）などの悪性腫瘍と関係がある。一般に EBV は terminal repeat（TR）の部位で結合し宿主細胞のエピゾームに環状で存在しているが、一部の腫瘍細胞株では EBV が宿主染色体に組み込まれた状態で存在していることが知られている。NAB-2 は 14 歳女性の Burkitt リンパ腫患者から樹立された細胞株であり、細胞あたり 1 copy の EBV DNA が host genome の染色体に組み込まれているが、その正確な場所は知られていない。本研究では NAB-2 の EBV 組み込み部位を同定しその特徴を解析すること、EBV 組み込みによる影響を解析することを目的とした。

【方法ならびに結果】

EBV の TR の両側の Probe L、Probe R を作成し genomic southern blotting を施行した。NAB-2 から抽出した DNA を BamHI で切断し、解析を行ったところ ProbeL では約 25 kb、ProbeR では約 10 kb の band が検出された。この結果 NAB-2 では TR を介して integration していると考えられた。次に、EBV integration sites を含む fragment の cloning を試みた。NAB-2 由来の genomic DNA を制限酵素 BamHI あるいは BamHI＋Bgl II の二重切断を行い酵素切断後 size で分離し 10 kbp 近傍の DNA fragment を cloning の Target として、phage を用いて library を作成した。ProbeL、R を用いて 1×10^5 の plaque を screening し得られた 3・4 個の陽性 clone を、Plasmid に re-cloning した後に、sequencing した。GenBank の data base から、この genome は、chromosome 2p13 に存在する clone RP11-440P5 に位置することがわかった。両側の integration site は 11.7 kbp 離れていた。組み込み部位の周囲は Alu、L2 sequences という繰り返し配列が 100 kbp 以上にわたって連続した、組み込み部位近傍の GC content は 68%、46%であった。この部位はまた、FRA2E と呼ばれる Fragile sites の一つであった。Fragile sites は染色体上の断裂、組み換えを起こしやすい部位で、いくつかの oncogenic viruses において Fragile sites に integration が起きやすいことが示されてる。また、Fragile sites の断裂、組み換えと発がんとの関連も提唱されている。また、NAB-2 の junction sites において、host genome と EBV の塩基配列の相同性は存在ないことがわかった。

次に、EBV の組み込みによる影響を検討した。1)、今回検討した潜伏遺伝子は EBNA1、EBNA2、LMP-1、LMP2A、BARF0 で、RT-PCR 法によって各遺伝子の発現を検討した。NAB-2 において潜伏遺伝子 EBNA-1 は Cp/Wp promoter を用いて発現していることから、Latency III の pattern で発現していると考えられた。Latency III ではすべての潜伏遺伝子が発現するが、EBNA2、LMP-1、BARF0 の発現は見られたが、LMP-2A の発現は見られなかった。LMP2A 遺伝子は EBV の TR 部をまたいており、NAB-2 では組込みにより、この遺伝子が分断された結果発現が見られなくなったと考えられる。2)、組み込みにより host genome 周囲遺伝子の発現の影響を検討した。ゲノムのデータベース検索で、EBV の組み込み部位周囲には癌遺伝子 REL と BCL-11A が存在することがわかった。REL は転写因子 NF-KB をコードし、種々な腫瘍において、発現が増強していることが知られている。BCL-11A は Zinc-finger 領域を含む転写因子をコードし、t(2;14)(p13 ; q32)を含む B 細胞リンパ腫、Hodgkin リンパ腫細胞株の切断点にある遺伝子として最近 cloning され、リンパ腫の発症に関与する可能性が示唆されている。癌遺伝子 REL、BCL-11A の発現量を Real time PCR 法を用いて比較検討した。Lymphoblastoid cell line IB4 を基準に Burkitt リンパ腫由来細胞株を比較すると、NAB-2 において REL、BCL-11A とも発現が高く、特に REL の発現は他の Burkitt リンパ腫由来細胞株にくらべて有意に高くなることがわかった。

【総括】

バーキットリンパ腫由来細胞株 NAB-2 において EBV 組み込み部位を同定し、その影響について検討した。EBV は chromosome 2p13 に存在する clone RP11-440P5 上の FRA2E site 内に TR を介して組み込まれていた。host genome と EBV 塩基配列の相同性は存在しなかった。NAB-2 において EBV 潜伏遺伝子は Latency III の様式をとるが、LMP-2A は発現を認めなかった。組み込み部位近傍には癌遺伝子 REL と BCL-11A が存在した。NAB-2 では REL 発現は有意に高かった。NAB-2 では、EBV 組み込みが発癌遺伝子 REL と BCL-11A に影響を与えている可能性も考えられ、今後より詳細な検討が必要であると思われる。

論文審査の結果の要旨

Epstein-Barr virus (EBV) は Burkitt リンパ腫 (BL) や鼻咽頭癌 (NPC) などの悪性腫瘍の発生要因の一つと考えられている。一般に EBV は terminal repeat (TR) の部位で結合し宿主細胞のエピゾームに環状で存在しているが、一部の腫瘍細胞株では EBV が宿主染色体に組み込まれた状態で存在していることが知られている。NAB-2 は 14 歳女性の BL 患者から樹立された細胞株であり、1 copy/cell の EBV DNA が host genome に組み込まれているが、その正確な場所は知られていない。本研究では NAB-2 の EBV 組み込み部位を同定しその特徴を解析すること、EBV 組み込みによる影響を解析することを目的とした。

NAB-2 gDNA よりファージ ライブラリーを作製し、EBV integration sites を含む fragment の cloning を施行した。GenBank の data base 検索すると、EBV は chromosome 2p13 に存在する clone RP11-440P5 上の FRA2E site 内に TR を介して組み込まれていた。また、host genome と EBV 塩基配列の相同性は存在しなかった。NAB-2 において EBV 潜伏感染遺伝子発現は Latency III の様式をとるが、LMP-2A は発現を認めなかった。組み込み部位近傍には癌遺伝子 REL と BCL-11A が存在し、REL 発現は有意に高かった。

これまで、EBV 感染による発癌メカニズムとして LMP-1、EBNA-2 などの潜伏感染遺伝子の関与が重要とされ、また研究もされてきました。本研究で検討した NAB-2 は EBV が宿主染色体に直接的に integration し、近傍の癌遺伝子に影響を与える可能性を示していると考えられる。これは EBV 感染による癌遺伝子活性化の新しい可能性を示している。

以上より、本論文は学位授与に値すると考えられる。