

論 文 要 旨

Sequence variation in the *BARF1* promoter and *LMP2A* of Epstein-Barr virus isolated from gastric carcinoma

Epstein-Barr ウイルス関連胃癌から検出された
EBV-BARF1 プロモーターおよび LMP2A 領域の
塩基配列の変異

Paula Ordonez Suarez

Abstract

Backgrounds and the purpose of this study

Epstein-Barr virus (EBV), a human gammaherpesvirus, is known to be associated with 2-20% of gastric carcinomas. In EBV-associated gastric carcinoma (EBV-GC), a few subset of latent genes are expressed: EBV-encoded RNAs (EBERs), *BARF0*, *BARF1* and latent membrane protein 2A (*LMP2A*). EBERs are abundantly expressed in EBV-GC, and are considered to play important roles in EBV-GC development. Recently, *BARF1* and *LMP2A* are in the picture as oncoproteins in EBV-GC. To evaluate possibilities of *BARF1* and *LMP2A* involvement in EBV-GC development, the present study examined sequence variations of *BARF1*-promoter regions and exon 6 and 7 of *LMP2A*, including epitopes restricted through HLA-A11 or -A2, of EBV genomes detected in EBV-GC in comparison with those in throat washing specimens from healthy donors.

Subjects and Methods

The first part of the present study examined the sequence variation of *BARF1*-promoter region (-488/+87) of EBV genomes detected in 22 Colombian and 17 Japanese EBV-GCs. In addition, the EBV genomes in throat washing samples from 11 Colombian and 9 Japanese healthy donors (controls) were examined. The second part of present study examined the sequences of *LMP2A* exon 6 (codons 335-391) and exon 7 (codons 392-461) in 11 EBV-GCs and 31 throat washing specimens from healthy subjects in Peru. B95-8 sequence was used as a prototype strain to define nucleotide variations. To examine potential transcription factor binding sites in *BARF1*-promoter region, the MatInspector 2.2 software (Genomatix) was used.

Results

All the EBV strains isolated from healthy donors had the same *BARF1*-promoter-region sequence as the prototype strain B95-8. In contrast, the EBV-GCs showed the following 8 point mutations in comparison to the B95-8 strain: G→C at -367 in 2 Colombian EBV-GC cases; T→A at -356 in 1 Colombian EBV-GC case; C→G at +15 in 1 Colombian EBV-GC case; C→T at +24 in 5 Colombian EBV-GC cases; T→G at +26 in 3 Colombian EBV-GC cases; T→C at +29 in 7 and 2 Colombian and Japanese EBV-GC cases, respectively; T→A at +44 in 5 Colombian EBV-GC cases; and G→A at +46 in 1 Japanese EBV-GC case. The observed case-control difference at position +29 was statistically significant ($p=0.022$, Fisher's exact test). Although the frequency of this point mutation in Colombian EBV-GCs was higher than that in Japanese EBV-GCs, the difference was not statistically significant ($p=0.251$).

Sequence analysis of LMP2A revealed that EBV strains from healthy controls had the same amino acid sequence in those codons as prototype EBV, B95.8. On the other hand, four EBV-GC cases had amino acid variations at codon 350 (I→N in 1 EBV-GC and I→V in 3 EBV-GCs) but not in codon 348. The observed difference between EBV-GCs and healthy controls was statistically significant ($p=0.003$, Fisher's exact test), suggesting that the amino acid changes in this codon may confer an advantage for viral persistence in tumor cells. The established cell lines, GD1(NPC-derived), Akata (Burkitt lymphoma derived), and SNU-719 (EBV-GC derived), did not have any amino acids at codon 350, but at codon 348 (S→T). AG876, another Burkitt-lymphoma derived cell line did not have this change. In conclusion, amino-acid change at codon 350 was more frequently found in EBV from EV-GC. Amino acid changes within LMP2A epitopes, for instance at codon 348, may affect the binding of HLA molecules. Although codon 350 is not contained within the HLA-A11 restricted epitope 340-349, the observed amino acid changes at codon 350 may alter the specificity of excision by proteasome enzymes.

Conclusion

In summary, the present study, examining the *BARF1*-promoter region of EBV genomes detected in 39 EBV-GCs and throat washing specimens from 20 healthy donors, found a statistically significant increase of the point mutation of T→C at position +29 in EBV-GC. In addition, amino-acid changes in LMP2A at codon 350 were more frequently found in EBV from EV-GC. Although codon 350 is not contained within the epitope 340-349, the observed amino acid changes may alter the specificity of excision by proteasome enzymes. Further studies seem warranted to clarify the etiological significance of these findings.

論文審査の要旨

報告番号	総研第 70 号	学位申請者	Paula Ordonez Suarez
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	小田 紘	副査 竹内 亨
	副査	馬場 昌範	副査 夏越 祥次

Sequence variation in the *BARF1* promoter and *LMP2A* of
Epstein-Barr virus isolated from gastric carcinoma

Epstein-Barr ウイルス関連胃がんから検出された EBV-BARF1 プロモーターおよび
LMP2A 領域の塩基配列の変異

Epstein-Barr (EB) ウイルス関連胃がんは、胃がん全体の 2-20% の頻度で世界各国より報告されており、EB ウイルス関連がんの一つとして認識されている。胃がんでは、EB ウイルスは潜伏感染の状態が存在しており、発現が認められる EBERs、BARF1 および LMP2A などが発がん過程に関与している可能性が指摘されている。EBERs の発がん過程における役割は明らかになりつつあるが、BARF1 および LMP2A に関しては不明な点が多い。そこで学位申請者は、EB ウイルス関連胃がんのがん部から検出された EB ウイルスと健常人のうがい液から検出された EB ウイルスの BARF1 プロモーター領域と LMP2A のエクソン 6 と 7 の塩基配列を比較し、EB ウイルス関連胃がんの発がん過程において、これらの蛋白が関与している可能性について検討・考察した。

BARF1 プロモーター領域(-488/+87)の解析の対象は、日本とコロンビアの EB ウイルス関連胃がん症例 39 名と健常人 20 名である。同定された塩基配列結果を基に、MatInspector 2.2 解析ソフトを用いてこの領域に結合する可能性のある転写因子を検討した。LMP2A 解析の対象は、南米ペルーの EB ウイルス関連胃がん症例 11 名と健常人 31 名である。得られた塩基配列の結果は、EB ウイルス陽性細胞株である B95-8 の塩基配列と比較した。その結果、本研究では以下の知見が明らかとなった。

- 1) コロンビアおよび日本の健常人うがい液から検出された EB ウイルス BARF1 プロモーター領域の塩基配列は B95-8 と同じであった。
- 2) 一方、EB ウイルス関連胃がん症例から検出された EB ウイルスでは 8 つの点変異が確認され、特に+29 位における T→C 変異 (アミノ酸変異: L→P) は 9 例 (コロンビア 7 例、日本 2 例) と最も多く、健常人と比較して有意に高い頻度であった (P=0.022)。
- 3) LMP2A のエクソン 6 および 7 領域においても、健常人うがい液から検出された EB ウイルスの塩基配列は、B95-8 と同じ配列であった。
- 4) 一方、HLA-A11 拘束性エピトープとの報告があるコドン 348 の変異は認めなかったものの、4 例の EB ウイルス関連胃がんにおいて、近傍であるコドン 350 のアミノ酸変異を伴う塩基配列の点変異を認めた。この変異は、MAPPP プログラムによる解析より、プロテオソーム分解の特異性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

BARF1 プロモーター領域の塩基配列を詳しく検討した報告はこれまでになく、本研究結果は EB ウイルス関連胃がんにおける BARF1 の関与を検討する上で重要な知見を与えるものと考えられる。また LMP2A においても明確な結果は得られなかったものの、一部の EB ウイルス関連胃がんにおいては、ウイルス側の変異が宿主の免疫応答に影響を与えている可能性を示唆している。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 70 号		学位申請者	Paula Ordonez Suarez
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位	博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	小田 紘	副査	竹内 亨
	副査	馬場 昌範	副査	夏越 祥次

主査および副査の5名は、平成21年6月23日、学位申請者 Paula Ordonez Suarez 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Epstein-Barr (EB) ウイルス陽性胃がんとは EB ウイルス関連胃がんの定義は異なるのか。

(回答) 一般的に、in situ hybridization (ISH)法で EBERs の発現が確認された胃がんを EB ウイルス関連胃がんとして定義している。PCR 法で EB ウイルスゲノムが検出されても ISH 法で EBERs が確認されない症例は EB ウイルス関連胃がんではない。

質問2) 潜伏感染のタイプは、何によって定義されるのか。

(回答) EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2, EBERs および BARTs などの latent 遺伝子の発現パターンによる。

質問3) コロンビアにおける EB ウイルス関連胃がんの頻度はどれくらいか。

(回答) Carrascal らの報告では 13%である。

質問4) 黒人集団における EB ウイルス関連胃がんの頻度はどれくらいか。米国で行われた研究対象には黒人は含まれているのか。

(回答) EB ウイルス関連胃がんは世界各地において認められるものの、その頻度には地域差があると思われる。黒人集団のみを対象とした報告はない。米国での調査はロサンゼルスで行われており、対象者に黒人も含まれていた可能性はあるが、論文には明記されていない。

質問5) EB ウイルス関連胃がんの頻度に地域差がある理由は何か。EB ウイルス関連胃がんの頻度と胃がんの罹患率には関連があるのか。

(回答) EB ウイルス関連胃がんの頻度と胃がんの罹患率との関連を示唆する論文もあるが、明確な結論は得られていない。EB ウイルス関連胃がん頻度の地域差は、部分的にはウイルス多型などのウイルス側の要因によって説明できるかもしれない。

質問6) 日本の一般集団における EB ウイルス抗体陽性率はどれくらいか。

(回答) 日本人成人の抗体保有率は 90%以上と言われているが、幼児期の抗体陽性率には近年、変化が見られる。1990年代前半までは、80%以上の者が 5-7 歳までに EB ウイルスに感染していたが、90年代後半には 59%と低くなり、2006年のデータでは 50%と、初感染年齢が後退する現象が認められる。

質問7) EB ウイルス関連胃がん患者で、抗体価の上昇が見られたウイルス抗原は何か。

(回答) Levine らの報告では、EB ウイルスカプシド抗原 (VCA) に対する IgA と、初期抗原 (EA) に対する IgG の上昇が報告されている。

質問8) 一般的にうがい液中から EB ウイルスゲノムが検出される頻度はどれくらいか。

(回答) うがい液の保存状態によるが、文献的報告によると 75-85%ぐらいである。

最終試験の結果の要旨

質問 9) EB ウイルス関連胃がん症例のうがい液は調べたのか。他に、がん部とうがい液を比較した研究はあるのか。末梢血中の B 細胞から検出される EB ウイルスゲノムとの比較はどうか。

(回答) 今回の対象者については、うがい液は得られていないので解析は行っていない。Corvalan らは、5 例の EB ウイルス関連胃がん症例について、胃がん部とうがい液からそれぞれ検出された EB ウイルスの多型を解析しており、うち 4 例については部位間で同じ多型であったと報告している。EB ウイルス関連胃がんにおいて、末梢血中の B 細胞から検出される EB ウイルスとの比較を行った研究はない。

質問 10) 今回の研究と同様の解析は、鼻咽頭がん (NPC) でも行われているのか。これまでに BARF1 プロモーター領域の変異に関する報告はあるのか。

(回答) BARF1 プロモーター領域の塩基配列解析は、NPC でも行われておらず、変異の有無は不明である。また、転写因子に関する報告もない。NPC から検出された EB ウイルスの LMP2A の変異に関する報告があるが、本研究で確認された点変異の報告はない。

質問 11) 本研究で報告した BARF1 プロモーター領域の変異は、BARF1 の発現レベルと関連するのか。

(回答) 本研究ではパラフィン包埋病理標本を試料としているため、mRNA および蛋白レベルのいずれにおいても発現レベルとの関連を検討できていないが、今後の課題と考える。

質問 12) 本研究で認められた BARF1 プロモーター領域+29 位の変異は、転写開始部位より下流であるが、BARF1 の転写活性に影響を与えるのか。

(回答) 転写開始より下流の領域にあるがその遺伝子の転写活性に影響を与えている領域は downstream promoter elements (DPE) と呼ばれ、転写活性因子複合体の形成を安定化させる働きをすることが知られている。また、TATA ボックスを有していない遺伝子においては、TATA ボックスと類似の機能を示すことも報告されている。

質問 13) BARF1 は細胞分化にどのような影響を与えているのか。

(回答) BARF1 は colony stimulating factor 1 (CSF1) 受容体を持っているため、細胞外へ分泌された BARF1 は CSF1 分子と複合体を形成することによって、マクロファージからのインターフェロン α の分泌を抑制し、細胞分化を抑制すると考えられる。

質問 14) 胃は環境中の他の変異原物質の曝露も受けていると考えられるが、EB ウイルス関連胃がんで見つかったウイルスの変異は、どこで生じたと考えるか。また、T→C 転位は胃がんによく見られるのか。

(回答) 本研究では、ウイルスの点変異がいつ、どこで生じたのかを推測できる結果は得られていないので不明である。今後、同じ EB ウイルス関連胃がん症例のがん部とうがい液から検出された EB ウイルスの解析を行うことなどにより、明らかにすることが可能と思われる。T→C 転位の頻度については、非 EB ウイルス関連胃がんも含めた今後の解析が必要である。

質問 15) ペルーの一般集団における HLA-A の分布はどうであるか。

(回答) ペルーの HLA 分布に関する報告は少ないが、ある報告では A2 が最も多くアレル頻度が 79.1% で、A11 の頻度は 8.8% である。

質問 16) B95-8 細胞の由来は何か。

(回答) 白人伝染性単核症患者の末梢血から得られた EB ウイルスを、マーモセットのリンパ球に感染させることによって樹立した細胞株である。

質問 17) うがい液を用いた EB ウイルス関連がんの診断の可能性はあるのか。

(回答) NPC 患者においては、うがい液や咽頭ぬぐい液を用いて、検出された EB ウイルスががん細胞由来であるか否かを判断する解析法についての報告がある。

質問 18) EB ウイルス関連胃がん特異的な治療法の可能性にはどのようなものが考えられるか。

(回答) LMP2A の発現レベルにはばらつきがあるものの、いくつかの HLA エピトープ領域を有しており、CTL による免疫療法の可能性が考えられる。将来的には、発がんに関与するウイルス遺伝子を標的とした siRNA による治療や、溶解感染を誘導した後に抗ウイルス薬を用いる治療法などの可能性がある。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。