総 説

EB ウイルスによる細胞の癌化機構について

— 文献的考察 —

屋 鋪 豊

Viral Oncogenesis ; Epstein-Barr Virus

Yutaka Yashiki

(Kyoto University)

Epstein-Barr Virus (EBV) is associated with a number of lymphoid malignancies. However, the malignancy showing the most consistent association with the virus is undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma (NPC).

Underlying the viral involvement in these EBV-associated diseases appears to be the capacity of EBV to transform the growth of human B cells, a phenomenon most easily studied in vitro where experimental infection of resting B lymphocytes leads to cellular activation and to the growth of permanently virus-transformed lymphoblastoid cell lines.

EBV not only induces growth transformation of human B lymphocytes, but has more recently been shown to enhance B cell survival under suboptimal conditions in which growth is inhibited.

The interplay between EBV infection and expression of cellular genes has important implications for the pathogenesis of virus-associated malignant disease. We are now studying the possible involvement of Fc ϵ RII/CD23 and ADF in the enhancement of cell survival under suboptimal conditions.

Key words: Epstein-Barr Virus, Nasopharyngeal Carcinoma, lymphoid malignancies, B cell survival

はじめに

Epstein-Barr Virus (EBV) は上咽頭癌 (Nasopharyngeal Carcinoma ; NPC) やバーキットリンパ腫と密接な関係を持つことが知られているが, EBV は既知の癌遺伝子を持たず, EBV 単独では細胞を癌化することは出来ない.

一方, 発癌に至るステップは数段階あると思われるが, 分子生物学の進歩によってヒト

の細胞側の癌遺伝子, 癌抑制遺伝子の解析が進み, これらの細胞側の遺伝子にウイルス遺伝子が作用し, これらの活性化や不活性化を引き起こすことがこれらのステップのうちのいくつかを進めることが分かってきた.

そこで発癌に至る重要なステップとして最近クローズアップされている細胞の不活化にスポットをあて, EBV との関係でいままでに分か

っていることを、特に分子生物学的に明らかにされてきたことを中心にして文献的にまとめた。また、本文中の内容を最後にまとめた図にしてみたので参考にされたい(図1)。EBV と NPC 癌化に関する一般的な総説は多数報告があるのでそれらを参照されたい^{1)~3)}。

腫瘍ウイルスとしての EB ウイルスに関する歴史的背景

1964年 Epstein, Barr によってバーキットリンパ腫 (Burkitt Lymphoma) 由来培養細胞中に発見された Epstein-Barr Virus (EBV)⁴⁾ は当時ヒトで最初に発見された腫瘍ウイルスとされた。

1966年 Old ら⁵⁾ が BL の血清疫学の調査に際し、その対照として選んだ上咽頭癌 (Nasopharyngeal Carcinoma ; NPC) 症例で抗 EBV 抗体価が高かったことが判明し、このウイルスが NPC の病態に関与しているのではないかと考えられる端緒となった。

1973年には Henle らによって EBV が伝染性単核症の原因ウイルスであることがつきとめられた⁶⁾。

一方 NPC 患者においては EBV 関連抗原に

対して高い抗体価を示し⁷⁾、また NPC 腫瘍細胞中に EBV-DNA が見出され⁸⁾、EBV 関連核内抗原が確認され⁹⁾、NPC 組織の EBV-DNA が単クローン性であることが証明された¹⁰⁾。これらのことより NPC はバーキットリンパ腫と同じように EBV 感染細胞が無限に増殖したものであると考えられるようになっている。しかし EBV はわれわれのほとんどが成人するまでに感染している、きわめて普遍的なウイルスでもあり、いまだに EBV が NPC 発症に直接関与しているのかどうかは不明である。NPC の発症に関わる分子機構の研究は in vitro で増殖可能な NPC の細胞株が極めて稀であること、上皮細胞に EBV を感染させることが困難であることなどから遅れている。

EBV による細胞の不死化 (immortalization) 機構

EBV はその一方でバーキットリンパ腫、伝染性単核症 (Infectious Mononucleosis ; IM)、一部の悪性リンパ腫 (Malignant Lymphoma ; ML) 等の原因ウイルスでもあり、B リンパ球 (B 細胞) によく感染する。

図1 考えられる EBV による細胞の増殖/不死化機構

B細胞上にはEBVに対する受容体(CD21(CR2))があり、試験管内でEBVを感染させることからEBVの感染による細胞の変化についての解析はB細胞を中心に進んでいる。

ヒトのB細胞は試験管内では何回か分裂した後に死んでしまうが、EBVが感染すると多くの癌細胞がそうであるように永久に増殖可能となることがわかっており、これをEBVによるB細胞の不活化と呼ぶ。

生体内でもEBVの初感染時にB細胞の不活化が起きると考えられているが、EBV感染B細胞に対する免疫反応によってEBV感染B細胞は除去され、無規律な増殖が制御されていると考えられている。またこの時の生体の免疫反応が伝染性単核症の病態であると考えられている¹¹⁾。

また、臓器移植後等にも免疫抑制剤の投与によりEBV感染B細胞が活性化され、EBV感染B細胞の増殖を招き、時に悪性リンパ腫を発症することもある。また、免疫抑制剤投与時のEBV感染B細胞の増殖は免疫抑制剤の減量や中止で軽快することが殆どである。

EBV感染細胞の増殖において生体の免疫反応とともに、EBV感染細胞が不活化を起こすことが重要であると思われる。発癌は複数の遺伝子の変異によって引き起こされると考えられているが、EBVによって不活化したB細胞が即ちEBV陽性の悪性リンパ腫というわけではなく、不活化したB細胞がさらにいくつかの遺伝子の変異をきたし、ついに癌化したものがEBV陽性の悪性リンパ腫と考えられている。

しかしEBVによるB細胞の不活化がどのような機構で起きているのかもよくわかっておらず、EBVによる癌化の機構を解明するにはまずこの機構を解明する必要がある。

予定された細胞死 (programmed cell death)

われわれの身体を形成する過程で生体にとって無用となった細胞はその発生過程で死滅し、分化した成熟細胞もその役割を終えると速やか

に除去される。これらの細胞死はprogrammed cell deathと呼ばれ、物理的にあるいは化学的に傷害された細胞にみられるaccidental cell deathと区別されている。

このprogrammed cell deathの中でも有名なものは、クロマチンの凝集やDNAの断片化を来し、アポトーシス(apoptosis)と呼ばれる。最近になってこの分野の研究が進み、この予定された細胞死をもたらす生体内分子や予定された細胞死から細胞を救う生体内分子が多数報告されている。

そのなかで、bcl-2を例として、発癌とこの分野の関係について触れてみたい。

ヒトの癌細胞に高頻度でみられる染色体異常は細胞性癌遺伝子の活性化を引き起こすことによって発癌に働いていることが明らかとなった。このことから癌遺伝子の探索に染色体転座の解析が有用であることがわかるが、ろ胞性B細胞リンパ腫のt(14;18)転座の解析を通して発見された癌遺伝子がbcl-2である¹²⁾。

血液系細胞へのDNA導入実験やbcl-2トランスジェニックマウス(bcl-2の遺伝子を高発現するように作られたマウス)を用いた実験から、bcl-2は血液系細胞の種々の致死条件下でのアポトーシスを抑制することができることが分かった¹³⁾。また、NPCにおいてもbcl-2の発現の増強が報告されている¹⁴⁾。

発癌機構のひとつのしくみとして、細胞の増殖力の増大のほかに、予定された細胞死の抑制が重要であることがにわかにクローズアップされてきている。

そこでそうした観点でいままでに文献的に報告されていることをまとめてみたい。

EBV関連抗原

EBVにより不活化したB細胞には約175 kbpの完全長のEBV DNAが存続するが、そこに含まれる100種類前後のEBV遺伝子のうち不活化細胞に発現しているのは、6種類の核抗原(Epstein-Barr Virus determined nuclear antigens; EBNAs)と3種類の膜蛋白質(Latent

Membrane Proteins ; LMPs) など9種類にすぎない。

このうちNPCで発現していることが知られているものはEBNA-1とLMP-1のみである。

LMP-1遺伝子の導入によりB細胞でのbc1-2の誘導とアポトーシスの阻止¹⁵⁾, 上皮細胞の分化の阻害¹⁶⁾が起きることなどが報告されている。

また, 正常B細胞を不死化できないEBVの変異種ではEBNA-2が欠損しており, B細胞の不死化にはEBNA-2が必要であると考えられている。最近発見されたインターロイキン10(IL10)はEBVの遺伝子BCRF-1の産物と約70%の相同性であることがわかった¹⁷⁾¹⁸⁾。BCRF-1産物はB-cellの生存維持作用¹⁹⁾や抗ウイルス作用を持つinterferon gamma (IF- γ)の産生抑制作用²⁰⁾をもち, 細胞内でのEBVの存続に利用されている可能性がある。

CD23とEBVによる細胞の不死化

また, bc1-2以外の細胞側の遺伝子としては, ノードマウスに移植されたNPC細胞株では低親和性IgEレセプター(Fc ϵ RII/CD23)が発現している²¹⁾。

IgEのFc部分に対するレセプターは, IgEとの親和性の違いにより2つに分けられる。肥満細胞, 好塩基球の細胞表面に発現する高親和性のFc ϵ RIと, B細胞, 単球などに発現する低親和性のFc ϵ RIIである。Fc ϵ RIIはモノクローナル抗体による解析の結果, B細胞の分化抗原であるCD23と同一分子であることが判明した。Fc ϵ RII/CD23はIgE産生の調節以外にも多彩な機能を持っていることが明らかになりつつある。CD23はB細胞の活性化抗原として知られていたがEBVにより不死化したB細胞はCD23を高発現しており, 後述するような報告から, EBVによる細胞の不死化に何らかの役割を果たしていると考えられている。

CD23の分解産物である可溶性CD23(soluble CD23; sCD23)はB細胞にとって増殖因子である可能性があることが言われていたが, B

細胞のprogrammed cell deathを阻止することがわかった²²⁾。CD23はB細胞にEBNA-2やLMP-1を導入することにより発現が増強される。

また最近になってCD23と特異的に結合する分子としてIgEの他に補体第3因子の受容体であり, 今までに明らかとなっている唯一のEBV受容体でもあるCD21(CR2)もCD23と特異的に結合する可能性が報告され²³⁾, EBVにより不死化した細胞におけるCD23-CD21相互作用の関与がクローズアップされてきている²⁴⁾。

一方上咽頭癌では時にリンパ上皮腫とも呼ばれるように一般に著明なリンパ球浸潤が特徴であり, 上皮細胞とリンパ球との相互作用にCD23がリンパ球活性化因子として関与している可能性もある²⁵⁾。ただ, 標本からの腫瘍組織染色にてCD23はほとんど発現していなかったとする報告もある²⁶⁾。

ADFとEBVによる不死化

成人T細胞白血病(Adult T cell Leukemia; ATL)細胞株の培養上清から発見された還元補酵素であるThioredoxinのヒトホモログ(同族体)である成人T細胞白血病由来因子(Adult T cell Leukemia Derived Factor; ADF²⁷⁾)はその後EBV陽性B細胞株3B6にとってのauto-crine growth factorとして報告された3B6-IL1と同一であることが明らかとなった²⁸⁾。ADFはEBV陽性のB細胞株で発現が増強していることがわかっている。またADFはヒト単球様細胞株U937のTNFによる細胞死を防ぐことがわかった²⁹⁾。ADFには活性酸素消去作用があることが報告されており, 活性酸素は細胞傷害を起こすことがわかっているののでわれわれは活性酸素を産生すると言われているサイトカインであるTNFによる細胞死の阻止にADFの活性酸素消去作用が関与しているのではないかと考えている。

また, 最近ADFがミトコンドリアにも存在することがわかり, 同じくミトコンドリアに局

在するといわれている bcl-2 の活性化, ミトコンドリアにおける酸化のりん酸化へのその還元活性による関与の可能性などの点で興味深い。

EBV のどの遺伝子が ADF の発現を増強するのか, また ADF の発現は細胞の不死化の原因と結果のいずれに関係するのか, 原因ならばどのような分子機構を介して細胞の不死化を起こすのか興味もたれる。上述の NPC 細胞株においても ADF は高発現しているという報告もある³⁰⁾。

癌抑制遺伝子と NPC

この10年間で発癌機構において癌遺伝子の活性化の他に癌抑制遺伝子の不活性化もまた劣らず重要な役割を果たしていることがわかった。癌抑制遺伝子とは、本来増殖に対して抑制的に作用している遺伝子であり、両方の対立遺伝子で欠失や変異などによって不活化されることによって細胞の癌化に関与する遺伝子である。癌抑制遺伝子のうち最も研究の進んでいる p53 もやはりアポトーシスの制御において重要な役割を担っていることが最近明らかとされつつある。

NPC においてもその発症と癌抑制遺伝子の突然変異との関連が予想されるが、いまのところ癌抑制遺伝子の変異の有無についての報告は癌抑制遺伝子のひとつである p53 の変異が NPC の腫瘍組織からは認められなかったとする報告があるのみである³¹⁾。

EBV の遺伝子産物は正常癌抑制遺伝子産物と結合しその発癌抑制機能を阻害するのも知れない。例えば SV40 ウイルスの large T 抗原, アデノウイルスの E1A 抗原, ポリオーマウイルスの E7 抗原は癌抑制遺伝子産物のひとつである RB 蛋白と結合しそれによって RB 蛋白の DNA との結合を妨げ細胞周期に影響を与え、このことがこれらのウイルスによる発癌に関与しているのではないかと考えられている。EBV では EBNA-5 が RB 蛋白と結合する可能性が示されている³²⁾。

EBV の上皮細胞への感染経路

EBV の上皮細胞への感染が NPC 発症の第 1 段階であると考えられているが、この点につき最後に少し触れてみたい。

EBV は主に唾液を介して伝播し、まず口腔内の上皮細胞でウイルスの増殖が起こり、次いで B 細胞に感染し、そこで潜伏感染を確立する³³⁾。口腔内の上皮細胞にも EBV は感染する。エイズに合併する舌の毛状白板症は EBV の増殖性病変である³⁴⁾。

上咽頭の上皮細胞への EBV の感染経路として上咽頭の上皮細胞にも CD21 が認められるとする報告もありこの分子を介して B 細胞から出た EBV が感染するという経路が考えられているが、他に EBV レセプターが存在する可能性もある³⁵⁾。

最近になり、血中の B 細胞から上皮細胞への EBV の感染経路について興味ある報告がなされた。形質細胞で産生された IgA は上皮細胞の管腔でない側の表面に発現している分泌成分 (secretory component) と結合し、形成された IgA-分泌成分複合体は上皮細胞内に取り込まれ、細胞の反対側、すなわち管腔に分泌される。血中の EBV は EBV に対する IgA 抗体と結合し、IgA の分泌経路にのって上皮細胞へ感染する可能性が報告された³⁶⁾。この知見は、ウイルス特異的なレセプターを介さない新たな感染様式が有り得ることを示したものである。

最後に

EBV の発見から30年が経過しようとしている。

日本人の死因の 1 位は依然として悪性腫瘍であり、NPC はその数こそ日本ではそう多くないが、頭頸部腫瘍のなかでも予後の悪いもののひとつであり、その根本的な治療法の開発が待たれ、基礎的な研究がこれに寄与できる日が望まれる。

この総説を書くにあたり、数々の御助言、御指導を賜った京都大学ウイルス研究所 増谷 弘、同教

授 淀井淳司, 京都大学耳鼻咽喉科学教室 大森孝一, 同教授 本庄 巖の諸先生方に深く感謝致します.

参考文献

- 1) 綾 隆夫 : 上咽頭癌と EB ウイルス. *JOHNS* **6** : 37~43, 1990.
- 2) 佃 守 : 上咽頭癌. *JOHNS* **6** : 75~80, 1990.
- 3) 古川 侃 : 上咽頭癌と Epstein-Barr ウイルス. 癌と化学療法 **17** : 601~607, 1990.
- 4) Epstein MA and Barr YM : Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* **1** : 252~253, 1964.
- 5) Old LJ, Boyse EA and Oettgen HF : Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **56** : 1699~1704, 1966.
- 6) Henle W and Henle G : Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis. *N Engl J Med* **288** : 263~264, 1973.
- 7) Henle N, HO JHC, Kwan HC, et al : Nasopharyngeal carcinoma ; significance of changes in Epstein-Barr virus related antibody patterns following therapy. *J Cancer* **20** : 603~672, 1977.
- 8) Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Kein G, et al : EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* **228** : 1056~1058, 1970.
- 9) Haung DP, Ho JHC and Henle G : Demonstration of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. *Int J Cancer* **14** : 580~588, 1974.
- 10) Raab-Traub N and Flynn K : The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* **47** : 883~889, 1986.
- 11) 浅野茂隆 : 伝染性単核細胞症. 内科学(上田英雄, 武内重五郎編). 1341~1342頁, 朝倉書店, 東京, 1987.
- 12) Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al : Cloning of the chromosome breakpoint of the neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science* **226** : 1097~1099, 1984.
- 13) Vaux DL, Cory S and Adams JM : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with v-myc to immortalise pre-B cells. *Nature* **335** : 440~442, 1988.
- 14) Qi-Long Lu, Elia G, Lucas S, et al : Bcl-2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **53** : 29~35, 1993.
- 15) Gregory CD, Dive C and Rickinson AB : Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* **349** : 612~614, 1991.
- 16) Dawson CW, Rickinson AB and Young LS : Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* **344** : 777~780, 1990.
- 17) Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, et al : Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones ; homology to Epstein-Barr Virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 1172~1176, 1991.
- 18) Hudson GS, Bankier AT, Satchwell SC, et al : The short unique region of B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Virology* **147** : 81~98, 1985.
- 19) Go NF, Castle BE, Barrett R, et al : Interleukin 10(IL-10), a novel B cell stimulatory factor ; unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* **172** : 1625~1631, 1990.
- 20) Fiorentino DF, Zlotnik A, Viera P, et al : IL-10 acts on the macrophage to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* **146** : 3444~3451, 1991.
- 21) Billaud M, Busson P, Tursz T, et al : Epstein-Barr virus (EBV)-containing nasopharyngeal carcinoma cells express the B-cell activation antigen Blast 2/CD23 and low levels of the EBV receptor CR2. *J Virol* **63** : 4121~4128, 1989.
- 22) Liu Y-J, Cairns JA, Holder M, et al. *Eur J Immunol* **21** : 1107~1114, 1991.
- 23) Aubry J-P, Pochon S, Graber P, et al : CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* **358** : 505~507, 1992.

- 24) Bonnefoy J-Y, Pochon S, Aubry J-P, et al : A new pair of surface molecules involved in human IgE regulation. *Immunol Today* **14** : 1~2, 1993.
- 25) Rousselet G, Billaud M, Tursz T, et al : CD23 and Epithelial Cells.
- 26) Niedobitek G, Young LS, Rickinson AB, et al : Expression of Epstein-Barr Virus Genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Am J Pathol* **140** : 879~887, 1992.
- 27) Yodoi J, Teshigawara K, Maeda M, et al : TCGF (IL-2) receptor inducing factor (s) (I) Regulation of IL-2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J Immunol* **134** : 1623~1630, 1985.
- 28) Wakasugi H, Rimsky R, Mahe Y, et al : Epstein-Barr virus-containing B-cell line produced an interleukin 1 that it uses as growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 804~808, 1987.
- 29) Matsuda M, Masutani H, Nakamura H, et al : Protective activity of adult T cell leukemia-derived factor (ADF) against tumor necrosis factor-dependent cytotoxicity on U937 cells. *J Immunol* **147** : 3837~3841, 1991.
- 30) Yodoi J and Tursz T : ADF : An endogenous reducing protein homologous to thioredoxin ; involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV. *Adv. Cancer Res* **57** : 381~411, 1991.
- 31) Effert P, McCoy R, Raab-Traub N, et al : Alterations of p 53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **66** : 3768~3775, 1992.
- 32) Jiang WQ, Szekely L, Rosen A, et al : Colocalization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp Cell Res* **197** : 314~318, 1991.
- 33) 高田賢蔵 : EB ウイルス発現機構. *Medical Immunology* **21** : 375~385, 1991.
- 34) Greenspan JS, Greenspan D, Fresse UK, et al : Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukemia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* **313** : 1564~1571, 1985.
- 35) Sixbey JW, Davis DS, Rickinson AB, et al : Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor. *J Gen Virol* **68** : 805~811, 1987.
- 36) Sixbey JW and Yao QY : Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* **255** : 1578~1580, 1992.

（原稿受付：平成5年8月3日
原稿採択：平成5年10月25日
別刷請求先：屋鋪 豊
〒606 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学医学部耳鼻咽喉科学教室）