

4. Dominant-negative EBNA1 による EB ウイルス腫瘍の抑制

今井 章介¹, 黒田 正幸¹, 山下 竜右¹, 石浦 嘉人^{1,2}

高知大学医学部 生体機能・感染制御学講座

¹ 感染分子病態学教室, ² 小児思春期医学教室

Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 (EBNA1) は EBV 感染増殖細胞で普遍的に発現され、環状 EBV ゲノム (episome) が感染細胞内で複製・維持されるために必須な唯一のウイルス蛋白である。したがって EBNA1 は、格好の EBV 陽性腫瘍の治療標的分子になりうると考えられる。我々は、野生型 (wild-type, wt) EBNA1 の N 末側ドメインの大半を欠失する EBNA1 変異体を独自に作製、これが wtEBNA1 の機能を阻害することで、latency type, cell type を問わず高率に感染細胞から EBV episome 脱落を促進する dominant-negative (dn)EBNA1 であることを明らかにした。さらにこの dnEBNA1 はウイルス episome の追い出しに伴い、EBV 陽性バーキットリンパ腫細胞の悪性増殖形質の抑制にも機能することが *in vitro*, *in vivo* で確認された。この結果は、dnEBNA1 が様々な EBV 腫瘍に対し汎用性を有する理想的な新規の特異的遺伝子治療用分子となりうることを示している。ウイルスのゲノム自体を細胞から駆逐するという治療理念は、EBV と同様 episome として細胞に持続感染する他のウイルスによる難治性疾患にも応用できる可能性がある。また、この dnEBNA1 の活用により、従来否定的な意見が多かった EBNA1 の直接的な細胞増殖亢進への関与が明らかにできるものと期待される。

1. はじめに

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は *in vitro* で効率的 B 細胞不死化能を示すヒトヘルペスウイルスであるが、臨床的にはバーキットリンパ腫や免疫抑制患者の日和見リンパ球増殖症、ホジキンリンパ腫などの B 細胞性腫瘍だけでなく、上咽頭癌、胃癌といった上皮性腫瘍、さらに鼻性あるいは鼻型 T, NK リンパ腫といった多様な組織由来のヒト癌に関連する¹⁻⁵⁾。また、慢性活動性 EBV 感染症、種痘様水疱症は小児に多くみられる予後不良疾患であり、その本態はやはり EBV 感染 T ないし NK 細胞を主体とする単/寡クローン性増殖である^{6,7)}。米国研究機関の推計によれば、

世界でのこれら EBV 関連疾患の年間新規発生数は 50 万人以上にのぼり⁸⁾、本邦でも日和見リンパ球増殖症や慢性活動性 EBV 感染症を含めると、毎年 1 万人近くが新たに罹患すると考えられる。EBV 関連腫瘍性疾患は概して経過が aggressive であり、抗ウイルス剤は無効、通常の抗癌化学療法や放射線療法に対しても抵抗性、易再発性のものが多い。EBV 関連疾患の分子生物学的診断、経過のモニタリング法は既にほぼ確立をみたが、反面、生命予後の大きな改善に結びつくような効果的な新規治療法の開発研究に見るべき格段の進展がないまま今日に至っている。これは EBV 関連腫瘍性疾患の発生母地組織が多岐にわたり、しかも疾患によって異なる潜伏感染遺伝子の発現パターン (潜伏感染型, Latency I, II, III に分類される) を呈する^{1,9,10)} といった理由から、EBV 関連腫瘍に普遍的に有効な治療戦略が立てにくいことも一因となっている。

一方、近年 EBV 陽性腫瘍細胞の悪性形質が EBV あるいは特定の EBV 潜伏感染遺伝子に大きく依存していることを示す多くの具体的実験成績が蓄積されてきた¹¹⁻¹⁹⁾。したがって EBV 陰性腫瘍に比べて、むしろここに EBV 陽性腫瘍に対するウイルス特異的な癌治療理念形成の余地がある。

連絡先

〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮
高知大学医学部 生体機能・感染制御学講座
感染分子病態学教室
TEL : 088-880-2321 FAX : 088-880-2324
E-mail : shoimai@med.kochi-u.ac.jp

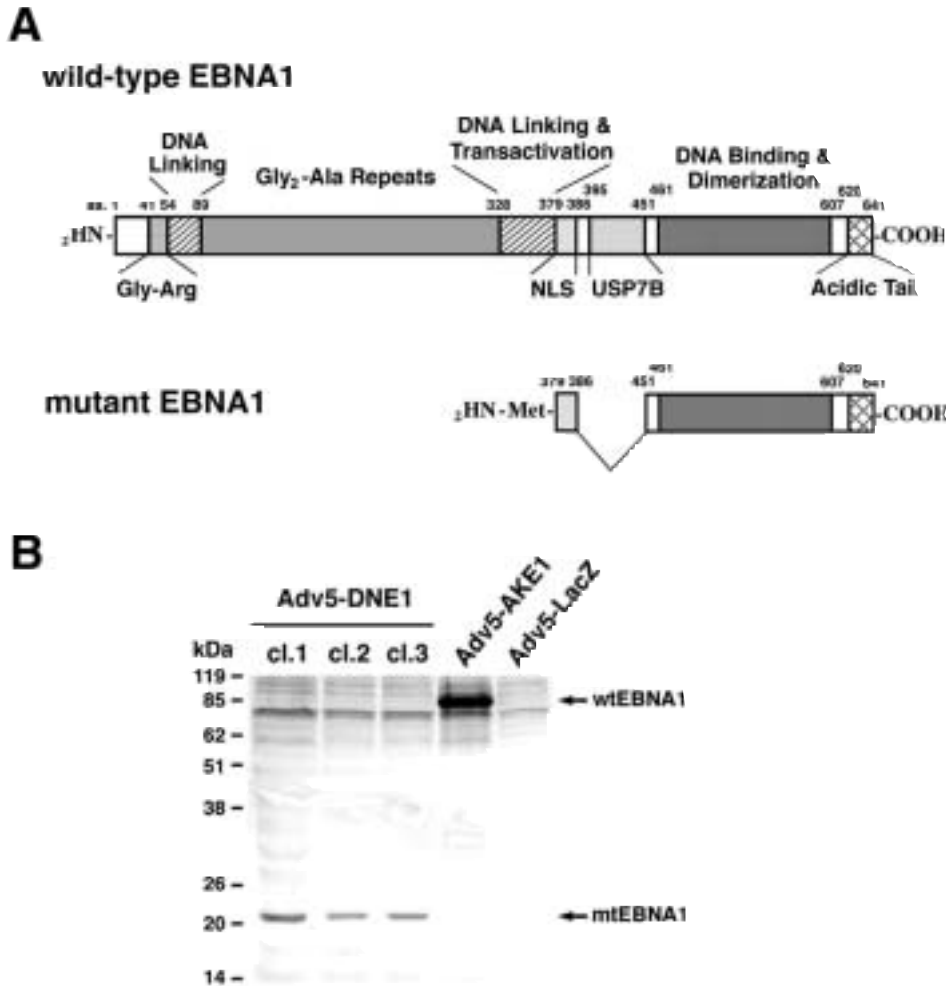


図1 作製した EBNA1 変異体の構造と発現

(A) 変異体 (mtEBNA1) 構造の wtEBNA1 機能ドメイン (上) との比較. 境界線上の数字は B95-8 株 EBV 由来のアミノ酸残基番号を示す. NLS: nuclear localization signal; USP7B: ubiquitin-specific protease 7 binding domain. (B) アデノウイルスベクターによる mtEBNA1 発現のウェスタンブロット解析. Adv5-DNE1 cls.1~3: mtEBNA1 遺伝子搭載ベクターの3クローン接種; Adv5-AKE1: wtEBNA1 遺伝子搭載ベクター接種対照; Adv5-LacZ: β -gal 遺伝子搭載ベクター接種対照. EBV 陰性胃癌細胞株 NU-GC-3 に MOI = 2 ~ 5 で導入後3日目. mtEBNA1 蛋白 (約 21 Kd), wtEBNA1 蛋白 (約 82 Kd) の発現が認められる. 抗体プローブは EBV 陽性リンパ腫患者血清の 100 倍希釈.

EBV そのものを感染腫瘍細胞から駆逐できれば、腫瘍細胞に増殖停止/細胞死、あるいは少なくともその増殖能の著しい低下を誘導することができると考えられる。つまり EBV の存在自体を標的とする遺伝子治療の可能性である。

我々はこの治療理念に基づき、EBV episome (後述) の複製・維持システムにとって唯一必須なウイルス蛋白である EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) 遺伝子の欠損変異体を作製、これを EBV 陽性腫瘍に導入することで極めて迅速かつ効率的に細胞からの EBV episome の「追い出し」に初めて成功した²⁰⁾。ここではこの dominant-negative EBNA1 (dnEBNA1) に関する研究経緯とともに、これまでに提案されてきた EBV 特異的遺伝子治療の可能性につ

いて通覧する。

2. EBNA1 の機能とドメイン構造

EBV ゲノムは通常、染色体外環状 DNA (episome) として存在し、細胞染色体に integrate されるのはごく少数に過ぎない⁹⁾。EBV episome は 1 細胞あたり数コピーから数十コピー存在するが、EBNA1 が複製起点 (origin of plasmid replication, *oriP*) の認識配列に結合する機構により、細胞内で安定に複製・維持され、結果、感染細胞に増殖能が持続して賦与される^{9,13,21)}。EBNA1 蛋白の *oriP* への結合はまた、*oriP* 下流の *Bam*HI-C 領域に存在する EBNA 転写プロモーター (Cp ; Latency III で活性化している)

や²²⁾, episome 上で 10 kb 以上離れた latent membrane proteins 1, 2B (LMP1/2B) 転写プロモーターに対して enhancer 活性を発揮する²³⁾. EBNA1 蛋白は *Bam*HI-Q 領域に存在する別の EBNA 転写プロモーター (Qp; Latency I, II で活性化) 近傍の DNA エlementにも結合し, Qp の転写活性を自己制御することも知られている^{24,25)}. このような機能の発現には EBNA1 分子が二量体を形成することが必須である²⁶⁾.

EBNA1 蛋白は 641 アミノ酸からなり (prototype である B95-8 株 EBV: GenBank accession no. AJ507799), 近年その機能ドメインの局在がかなり明らかとなってきた (図 1A). 特に episome 複製と分裂細胞への episome 分配 (細胞染色体への tethering) にかかわるドメインとして DNA linking domain と N 末側の glycine-arginine rich domain^{27,29)}, また認識塩基配列への結合と二量体形成を担う DNA binding/dimerization domain²⁶⁾, 核局在シグナル (nuclear localization signal, NLS) は重要である. その他, エンハンサー機能に関係する transactivation domain^{27,29)} が同定されている (C 末側最尾の acidic tail もこの機能を持つとの成績もある). EBNA1 の免疫逃避にかかわる領域は glycine-glycine-alanine repeats domain であることが明らかとなっている^{30,31)}. EBNA1 の機能ドメインに関するより詳細な情報は, すぐれた総説 (文献番号 32, 33) があるのでそちらを参照されたい. 最近, EBNA1 の oncogenic な機能 (細胞生存あるいは apoptosis 抑制) と密接に関連する可能性があるドメインとして ubiquitin-specific protease 7 binding domain が新たに同定され³⁴⁾, 注目を集めている (後述).

3. EBNA1 変異体 (mutant (mt) EBNA1) の構築

我々の目指す新規治療理念に沿い, wtEBNA1 の機能阻害により細胞からの「EBV ゲノム追い出し」に作用する変異体分子の作製を試みた. 明らかにされている wtEBNA1 の機能ドメイン構成をもとに, B95-8 株 EBV 由来

wtEBNA1 コード領域 BKRF1 中, N 末側の Gly₂-Ala repeats と DNA linking/looping domain に相当する segment を欠き, NLS, dimerization/DNA binding domain のみを残存する EBNA1 変異体 (mtEBNA) 遺伝子を構築した (図 1A). この変異体は二量体を形成して認識 DNA 配列に結合するが, ゲノム複製能を欠くと予想される²⁰⁾. 類似の変異体を用いた解析で, wtEBNA1 安定発現細胞での人為的 *oriP* プラスミドの複製・維持, および Cp に対する wtEBNA1 のエンハンサー活性が阻害されることは示されている³⁵⁾. しかし EBV episome 自体の細胞内複製・維持に対する阻害効果は未知であり, 我々はまず独自に作製した mtEBNA1 がこの作用を有するかどうかを検討した.

4. mtEBNA1 の EBV episome 脱落促進作用

EBNA1 変異体の導入発現には E1/E3 欠損組換え 5 型アデノウイルスベクター (Adv5)³⁶⁾ および Adv5 ファイバーを 35 型のもので置換したベクター (Adv5/35f)³⁷⁾ を用いた (図 1B). 被験細胞は B リンパ球系, T リンパ球系, 上皮細胞系の各種 EBV 陰性細胞株に, ネオマイシン耐性遺伝子 (*neo^r*) をウイルスゲノム内に挿入した組換え EBV (rEBV)³⁸⁾ を感染させ, G418 選択にて人為的に樹立した EBV 陽性変換細胞株 (latency type I ~ III 型を呈するものそれぞれを準備) である³⁸⁻⁴¹⁾. これら陽性変換細胞株は rEBV ゲノムの脱落・保持のモニターが可能であり, しかも Adv5 あるいは Adv5/35f のいずれかにより >80% の高い遺伝子導入率が得られる²⁰⁾. 事前に導入遺伝子発現に適した転写プロモーター, 至適ベクター感染価 (multiplicity of infection, MOI) を細胞ごとに厳密に決定した.

mtEBNA1 導入ベクター (Adv5-DNE1, Adv5/35f-DNE1) を rEBV 陽性変換細胞に接種後の細胞内ウイルスゲノム (episome) 量の推移を経時的に検討した. その結果, 対象とした 4 つの陽性変換細胞株いずれにおいても G418 非添加培養で, mtEBNA1 導入後 3 日目より定量 PCR 検出で

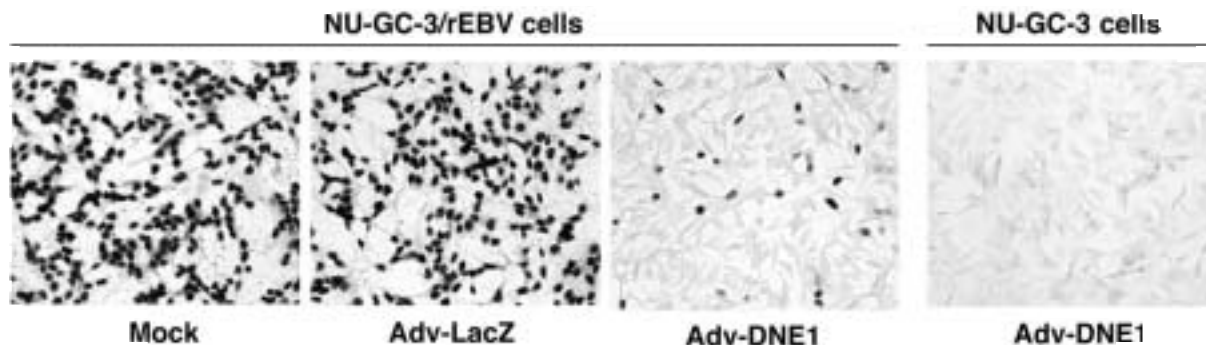


図 2 mtEBNA1 導入による細胞からの EBV episome 脱落

EBER1 *in situ* hybridization. NU-GC-3/rEBV 細胞 (上皮系, Latency I; 本文参照) での成績を代表して示す. G418 非存在下で培養した細胞にベクター接種 (MOI = 20) 後 9 日目の結果. Adv5-DNE1 接種で EBER1 陽性細胞 (核が濃染) の著減を認める. NU-GC-3 は EBV 陰性親細胞株の対照. (× 100)

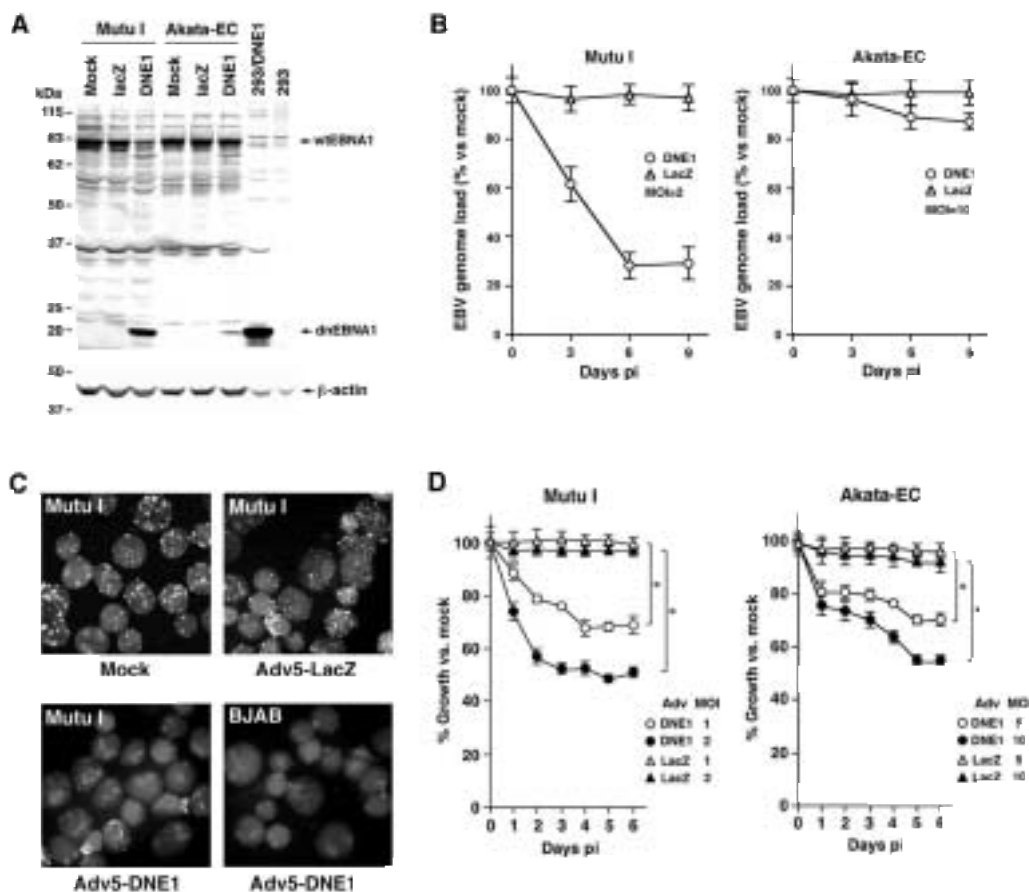


図3 dnEBNA1 導入によるバーキットリンパ腫細胞からの EBV episome 脱落と増殖抑制

本来 EBV 陽性のバーキットリンパ腫細胞株 Mutu I と Akata-EC での結果。(A) dnEBNA1 発現のウェスタンブロット解析。Adv5-DNE1 あるいは Adv5-LacZ 接種 3 日後。Mutu I 細胞には MOI = 2 で、Akata-EC 細胞には MOI = 10 で接種。Mock : ベクター非接種対照。293/DNE1 : dnEBNA1 安定発現 293 細胞クローン (陽性対照)。Mutu I 細胞では wtEBNA1 量の低下が見られるが、Akata-EC 細胞では認められない (本文参照)。(B) Real-time PCR による経時的 EBV ゲノム定量結果。ベクター非接種対照 (Mock) に対する相対値 (%) で表わした。Mutu I 細胞ではウイルスゲノム量が著明に低下するが、Akata-EC 細胞では変化がない (本文参照)。PCR primer は EBV ゲノム BNLFI 領域に設定し、培養中には lytic cycle genomes を除外する目的で aciclovir 0.1 mM を持続的に添加した。(C) FISH 法による single cell レベルでの EBV ゲノム脱落の確認。Mutu I 細胞に Adv5-DNE1 あるいは Adv5-LacZ を MOI=2 で接種後 6 日目の結果。シグナル dot を持つ細胞が EBV ゲノム陽性。Adv5-DNE1 接種の場合のみ、51% の細胞が EBV ゲノムシグナル陰性となっている ($p < 0.01$, t 検定)。BJAB は EBV 陰性対照。(×200) (D) 増殖阻害効果。ベクター接種後の細胞増殖動態を WST-1 アッセイにて検討した結果。ベクター非接種対照 (Mock) に対する Adv5-DNE1, Adv5-LacZ 接種での生細胞の相対値 (%)。Mutu I 細胞, Akata-EC 細胞いずれにおいても dnEBNA1 による増殖の有意な抑制 ($* p < 0.01$) が認められる。有意差検定は ANOVA ならびに *post-hoc* Dunnett test による。

意なウイルスゲノムの低下が認められ、また EBER1 *in situ* hybridization にて個々の細胞レベルでも感染細胞率の著減が確認された (図 2) のに対し、lacZ 導入対照では観察期間中、ほぼ 100% の細胞が EBER1 陽性のままであった (図 2)。同様の実験を G418 存在下で行った場合、mtEBNA1 を導入した rEBV 陽性変換細胞はいずれも 4~5 日後には lacZ 導入対照の 16~20% 程度にまで生細胞数が落ち込んだ (結果省略, 文献番号 20 参照)。この G418 抵

抗性の喪失はすなわち mtEBNA1 が機能した細胞からの rEBV episome の完全脱落を意味する。ウェスタンブロット上でも、導入した mtEBNA1 蛋白は約 9 日間検出された一方、rEBV episome 由来の wtEBNA1 蛋白量は日を追って低下し、これもウイルスゲノムの減少を反映していると考えられた (結果省略, 文献番号 20 参照)。以上から、我々の作製した mtEBNA1 は dominant-negative 体 (dnEBNA1) として機能することが明らかとなった。

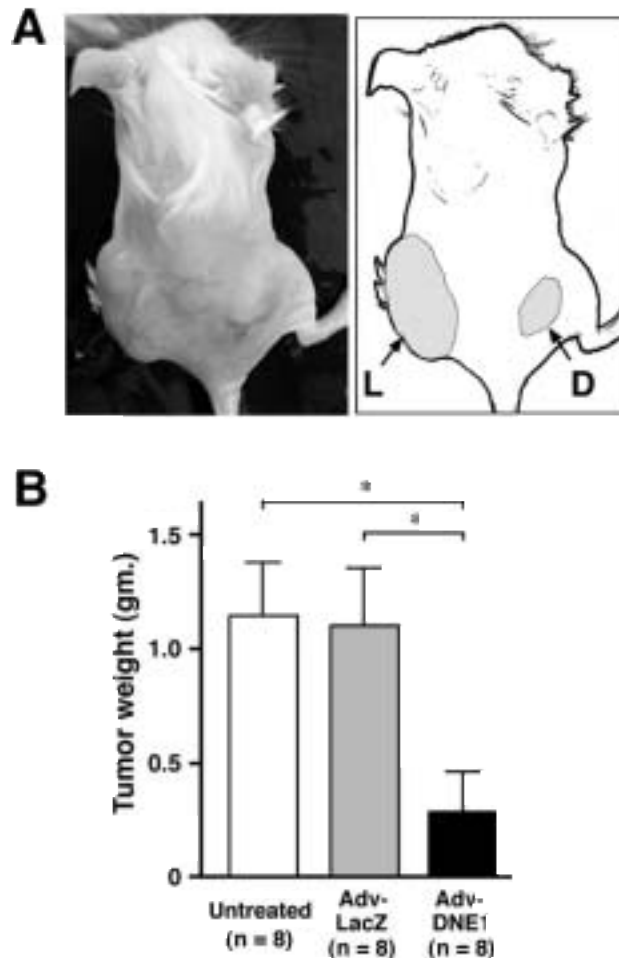


図4 BL腫瘍細胞に対するdnEBNA1のin vivo増殖抑制効果

(A) in vivo腫瘍増殖抑制効果. SCIDマウスの皮下にMutu I細胞 10^7 個を移植して形成させた腫瘍塊(移植後9~11日目)にAdv5-LacZ('L'で示す)およびAdv5-DNE1('D'で示す)の 10^8 p.f.u.を直接注入し, さらに9日後の例. (B) 各ベクター処理群, 対照群(PBS注入)での摘出腫瘍のサイズ(重量)測定結果. * $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test).

5. EBV腫瘍増殖に対するdnEBNA1の抑制効果

dnEBNA1が本来EBV陽性の腫瘍細胞に対しても同様にウイルスを追い出し, それに伴って細胞の悪性増殖も抑制するかどうかを, バーキットリンパ腫細胞株Mutu I⁴²⁾とAkata-EC^{19,43)}(その増殖はEBV依存性が高いとされる)を対象に検討した. 両細胞株ともに約50~60%の遺伝子導入率であり, 十分量のdnEBNA1発現も確認された(図3A)が, Mutu Iで有意なEBVゲノムとwtEBNA1発現量の著明な減少を認めたのに対し, Akata-ECではほとんど減少を認めなかった(図3A, B). この結果はfluorescence *in situ* hybridization (FISH)(図3C), EBER1 *in situ* hybridization(結果省略)による観察でも確認された. ところがdnEBNA1導入後の経時的細胞増殖動態をみると, Mutu I, Akata-EC両細胞株ともにLacZ導入対照および

mock対照に比べて, 日を追って生細胞が減少し, 6日後には対照のおよそ1/2程度にまで低下した(図3D). この観察結果, つまり両細胞株での見かけ上のウイルス陰性細胞率の相違は次のように説明できる. すなわち, どちらの細胞でもdnEBNA1発現により多数のEBV episome脱落クローンが生じるが, Mutu IのEBV陰性化クローンは増殖が停止ないしは著しく抑制されるものの生存可能であるのに対し, Akata-ECのEBV脱落クローンは早期に細胞死に至るためと理解される²⁰⁾. 実際, Akata-ECではdnEBNA1導入後まもなくよりAnnexin V陽性細胞(early apoptosis)が25%程度検出されたが, Mutu Iでは数%に過ぎなかった²⁰⁾.

このdnEBNA1の腫瘍増殖抑制効果は, SCIDマウスの皮下に形成させたMutu I細胞移植腫瘍に対する腫瘍塊の有意な退縮および造腫瘍阻止として, in vivoでも確認す

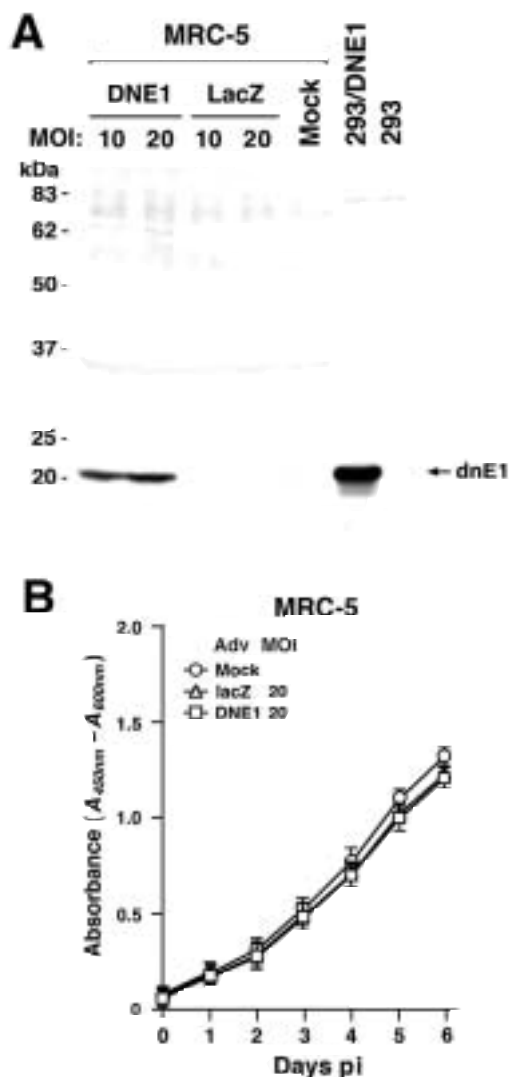


図5 dnEBNA1の安全性

(A) EBV陰性正常細胞の増殖への影響. Adv5/35f-DNE1接種 (MOI = 10および20)後のヒト線維芽細胞MRC-5でのdnEBNA1発現のウェスタンブロット解析. いずれのMOI値でも十分量のdnEBNA1発現が見られる. (B) WST-1アッセイ. 縦軸(細胞増殖)は直接の吸光値を示す. Adv5-DNE1接種とAdv5-LacZ接種間に増殖の差は認めない ($p = 0.386$, ANOVAおよび *post-hoc* Tukey test).

ることができた (図4, および文献番号20参照).

6. dnEBNA1の安全性

dnEBNA1の細胞毒性を検討するため, ヒト正常fibroblast (MRC-5細胞)にAdv5/35f-DNE1を接種し (図5A), 同一条件でAdv5/35f-LacZを接種したもの, および未処理のMRC-5とで増殖曲線を比較検討した, いずれの細胞群間においても経時的生細胞数に差異は認められず, dnEBNA1発現自体に起因する細胞傷害性はないものと考えられた (図5B). NU-GC-3, BJABなど他のEBV陰性細胞を用いた場合でも同様の結果であった (結果省略, 文献番号20参

照).

7. 治療用分子としてのdnEBNA1の利点

多彩なEBV関連腫瘍性疾患に対するウイルス標的治療を考える時, いかにして各疾患への汎用性と感染細胞特異性を持たせるかが課題となる. 従来, EBV特異的遺伝子治療に関しては,

- ① いわゆる“EBVoriP (EBV-based) ベクター”に自殺遺伝子 (cytosine deaminase) を組み込み, 腫瘍細胞から供給されるEBNA1によってこの殺細胞oriPベクターが腫瘍細胞内でのみ維持される⁴⁴⁾, あるいはoriP

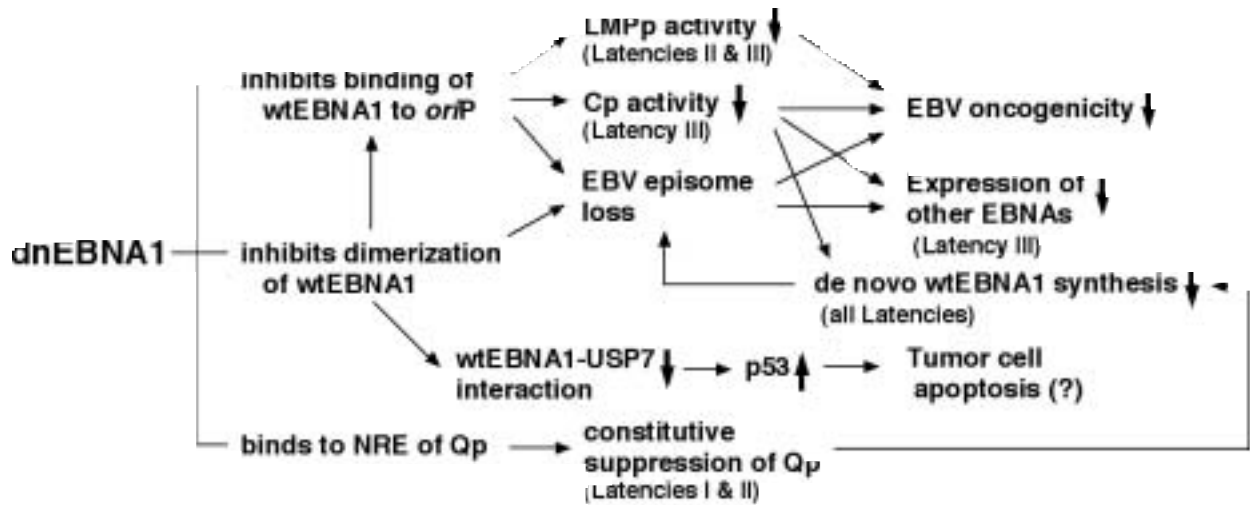


図6 dnEBNA1の抗腫瘍機序

dnEBNA1はwtEBNA1のoriP結合に対する直接的競合阻害だけでなく、wtEBNA1の転写プロモーターであるCp (Latency IIIでactive) 活性を低下させる、あるいはQp (Latency IとIIでactive) 近傍のDNA配列 (negative regulatory element of Qp, NRE) にも結合し、Qp活性を負に制御することによって、いずれにしてもwtEBNA1のde novo合成を抑制する。その結果、EBV episomeの複製・維持を間接的に阻害する。また、おそらくはwtEBNA1とheterodimerを形成することでwtEBNA1のubiquitin-specific protease 7 (USP7) との結合も阻害し、p53の上昇を招き、EBV陽性腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するといった複数の機序によって、抗EBV作用を発揮するものと推定される。(本文参照)

の下流にheterologous promoter駆動の自殺遺伝子(p53)を配置し同様に細胞から供給されるEBNA1のoriP結合にもとづくエンハンサー活性によりp53を発現させる⁴⁵⁾

- ② EBVのB細胞不死化蛋白のひとつであるEBNA2依存的に活性化するEBNAプロモーターCpを利用し、Cpの制御下に自殺遺伝子(HSV-1 tk)を発現させる治療用ベクター⁴⁶⁾
- ③ EBV最初期遺伝子BZLF1/BRLF1を外来導入して強制的にlytic cycleを誘導、同時にガンシクロビル投与によって感染腫瘍細胞を溶解死させる試み^{47,48)}
- ④ 主要なEBV発癌蛋白とされるLMP1あるいはそのシグナル経路を阻害する戦略⁴⁹⁾
- ⑤ mini-EBV⁵⁰⁾あるいはpseudo-EBV virion⁴⁴⁾を利用する方法

が主な研究成果として報告されてきた。しかし、①はEBNA1-oriPシステムを逆利用する点で優れているが、正常な細胞(分裂速度の遅い)にも一時的に傷害が及ぶ可能性があり、また“EBVoriPベクター”は環状DNAでないと機能せず、いかにしてgene deliveryを行うか(通常のウイルスベクターは環状DNAを導入不能)が問題となる⁴⁴⁾。またEBNA1-oriPのエンハンサー活性制御による自殺遺伝子発現は、期待されるほどの厳密な発現コントロールが得られるのかに疑問が残る⁴⁵⁾。②もEBV遺伝子発現調

節機構を巧みに利用するものであるが、EBV陽性腫瘍細胞の大半はEBNA2陰性(Latency I, II)であり、この場合には無効となる。また③については、BZLF1/BRLF1自体の多彩なトランス活性化能により正常細胞への悪影響が懸念されること、必ずしもBZLF1/BRLF1が移入・発現された腫瘍細胞の全てがlytic cycleには入らない(上咽頭癌ではむしろlytic cycle誘導刺激に抵抗性となること)が癌化に必要との報告もある、など実用上の問題点を有する。④は当然ながらLMP1陰性(Latency I)の腫瘍には効果が期待できず、さらにLMP1が関与するシグナル経路は実に多岐にわたるため、腫瘍特異的な阻害法でなければ正常細胞にも不測の傷害が及ぶ可能性がある。発現されるEBV潜伏感染遺伝子の組み合わせで各latency typeが定義されているものの、症例ごとに個々の腫瘍細胞をみるとlatencyにheterogeneityが認められるとの観察結果もあり⁵¹⁻⁵³⁾、特定のlatencyプログラムで機能するような遺伝子治療システムの設計は有用性が劣るものとなる。⑤もEBVの特性を活かした方法だが、B細胞を主体とするEBVレセプター(CD21)陽性の細胞にしか遺伝子導入できず、酵素等の補充療法としては有効であろうが、抗腫瘍療法に活用するにはやはり限界がある^{44,50)}。いずれも一長一短である。

他方、我々のdnEBNA1を利用する方法はこのような欠点を克服するものであり、ユニークな作用標的、汎用の可能性をあわせ持つと考えられる。つまり、(1)異なる組織

由来の腫瘍にも適用可能, (2) Latency type を問わない, (3) 実験室 EBV 株など特定のウイルス株だけでなく野生株 EBV にも有効, (4) EBV 特異性が高く, かつ正常細胞には傷害性がない, といった治療学的特性を有する. 実際我々の検討から, パーキットリンパ腫細胞だけでなく, 慢性活動性 EBV 感染症や鼻性・鼻型リンパ腫 (T/NK 細胞株), 慢性膿胸リンパ腫や EBV 不死化 B リンパ球 (B 細胞株), 胃癌 (上皮細胞株) に対しても同等の EBV 駆逐作用を発揮することがわかっている (論文執筆中). 我々の dnEBNA1 の具体的抗 EBV 作用メカニズムについては単に wtEBNA1 の oriP 結合に対する競合阻害だけでなく複数あると推定されるものの, dnEBNA1 が効果を発揮する dnEBNA1: wtEBNA1 分子量比も含めてまだ不明の点もある. 現時点で解析中の事項とともに想定される作用機序を 図 6 に示す.

8. 今後の課題と展望

これまで述べてきたように, dnEBNA1 は EBV を丸ごと細胞から追い出すという, EBV 関連腫瘍性疾患に対するウイルス特異的治療用分子として従来にない革新的有用性を持つと考えられる. 今後は臨床実用する上で, 他の遺伝子治療の場合と同様, dnEBNA1 遺伝子の in vivo delivery 法が大きな課題となろう. 持続感染ウイルスはそれぞれ巧妙な細胞内持続手段を有しているが, dnEBNA1 にみるように, その存在自体を標的にする治療理論は, 他のヘルペスウイルスや一部の Human papilloma virus など EBV と同様に episome として細胞に持続するウイルスにも応用できる可能性がある. 類似の試みとして, EBNA1 に対する antisense oligonucleotide の影響をみた報告があるが, EBV 不死化 B リンパ芽球株での増殖抑制であり, 腫瘍に対する効果は検討されていない⁵⁴⁾. 最近, small hairpin (sh) RNA を用いて EBNA1 の機能を阻害する試みも報告されているが, EBV 関連疾患への治療学的汎用性については不明である⁵⁵⁾. また薬剤を用いて EBV ゲノム自体を腫瘍細胞から脱落させた報告⁵⁶⁾ もあるが, 筆者の経験では細胞毒性が問題になり, 実用性に乏しいと判断される.

これまで, EBNA1 自体が細胞癌化に直接関わっているのかという点に関しては結論が出されておらず, それを肯定する意見^{14,57-59)} よりむしろ否定的な見解が支配的であった^{1,9,60,61)}. 最近も, 我々の dnEBNA1 と類似の EBNA1 変異体 (FDNE と命名されている) を用いて解析した報告で, EBNA1 は少なくとも B リンパ球不死化には直接的に関係していないとの結果が出されている⁶⁰⁾. 一方で, EBNA1 はパーキットリンパ腫細胞の survival あるいは apoptosis 抑制に機能しているなど重要な機能を担うとの報告もなされた^{62,63)}. 我々もこの点には大いに関心を持ち解析を進めているが, 上述の FDNE を用いた検討結果⁶⁰⁾ と全く相反する結果を得ている (第 53 回日本ウイルス学会で

一部発表, 論文作成中). また, 本稿で示した結果 (図 3D) でも, いまだウイルスゲノムが脱落していないと考えられる dnEBNA1 導入後早期より腫瘍細胞増殖の抑制が認められていることから, EBNA1 が細胞の増殖に直接的に関与していることが示唆される²⁰⁾. これは報告された FDNE⁶⁰⁾ と我々の dnEBNA1²⁰⁾ の構造上の違い, すなわち ubiquitin-specific protease 7 binding domain (図 1) が決定的な要因であるかも知れない (文献番号 34, および図 1 参照). 現在さらに詳細に検討を進めているが, 最近, それを支持する報告が他のグループからも出されている⁶⁴⁾. dnEBNA1 を活用した癌化促進因子としての EBNA1 機能の分析も今後の重要な課題のひとつである.

参考文献

- 1) Rickinson AB, Kieff E: Epstein-Barr virus. In *Fields Virology, 4th ed., Vol. 2* (Knipe DM, Howley PM, Eds.), pp. 2575-2627. Lippincott, Philadelphia, 2001.
- 2) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T: Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335: 128-130, 1990.
- 3) Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS: Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337: 320-322, 1991.
- 4) Imai S, Koizumi S, Sugiura M, Tokunaga M, Uemura Y, Yamamoto N, Tanaka S, Sato E, Osato T: Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9131-9135, 1994.
- 5) Jaffe ES, Chan JK, Su IJ, Frizzera G, Mori S, Feller AC, Ho FC: Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/Natural killer cell lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am. J. Surg. Pathol.* 20: 103-111, 1996.
- 6) Imai S, Sugiura M, Oikawa O, Koizumi S, Hirao M, Kimura H, Hayashibara H, Terai N, Tsutsumi H, Oda T, Chiba S, Osato T: Epstein-Barr virus-carrying and -expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood* 87: 1446-1457, 1996.
- 7) Iwatsuki K, Xu Z, Takata M, Iguchi M, Ohtsuka M, Akiba H, Mitsunashi Y, Takenoshita H, Sugiuchi R, Tagami H, Kaneko F: The association of latent Epstein-Barr virus infection with hydroa vacciniforme. *Br. J. Dermatol.* 140: 715-21, 1999.
- 8) Levin LI, Levine PH: The epidemiology of Epstein-Barr virus-associated human cancer. *Gann Monogr. Cancer Res.* 45: 51-74, 1998.
- 9) Kieff E, Rickinson AB: Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology, 4th ed., Vol. 2* (Knipe DM, Howley PM, Eds.), pp. 2511-2573. Lippincott, Philadelphia, 2001.
- 10) Sugiura M, Imai S, Tokunaga M, Tokunaga M, Koizumi S, Uchizawa M, Okamoto K, Osato T: Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma. Unique viral laten-

- cy in the tumour cells. *Br. J. Cancer* 74: 625-631, 1996.
- 11) Hammerschmidt W, Sugden B: Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340: 393-397, 1989.
 - 12) Wei MX, Ooka T: A transforming function of the BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus. *EMBO J* 8: 2897-2903, 1989.
 - 13) Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y, Takada K: Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J. Virol.* 68: 6069-6073, 1994.
 - 14) Wilson JB, Bell JL, Levine AJ: Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J* 15: 3117-3126, 1996.
 - 15) Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N: Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11963-11968, 1998.
 - 16) Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K: Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 73: 9827-9831, 1999.
 - 17) Nishikawa J, Imai S, Oda T, Kojima T, Okita K, Takada K: Epstein-Barr virus promotes epithelial cell growth in the absence of EBNA2 and LMP1 expression. *J. Virol.* 73: 1286-1292, 1999.
 - 18) Kitagawa N, Goto M, Kurozumi K, Maruo S, Fukayama M, Naoe T, Yasukawa M, Hino K, Suzuki T, Todo S, Takada K: Epstein-Barr virus-encoded poly(A)-RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* 19: 6742-6750, 2000.
 - 19) Maruo S, Nanbo A, Takada K: Replacement of the Epstein-Barr virus plasmid with the EBEB plasmid in Burkitt's lymphoma cells. *J. Virol.* 75: 9977-9982, 2001.
 - 20) Nasimuzzaman M, Kuroda M, Dohno S, Yamamoto T, Iwatsuki K, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kumita W, Matsuzaki S, Rashel M, Nakamura H, Wakiguchi H, Imai S: Eradication of Epstein-Barr virus episome and associated inhibition of infected tumor cell growth by adenovirus vector-mediated transduction of dominant-negative EBNA1. *Mol. Ther.* 11: 578-590, 2005.
 - 21) Yates JL, Warren N, Sugden B: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313: 812-815, 1985.
 - 22) Puglielli MT, Woisetschlaeger M, Speck SH: OriP is essential for EBNA gene promoter activity in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 70: 5758-5768, 1996.
 - 23) Gahn TA, Sugden B: An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J. Virol.* 69: 2633-2636, 1995.
 - 24) Schaefer BC, Strominger JL, Speck SH: Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10565-10569, 1995.
 - 25) Sample J, Henson EBD, Sample C: The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *J. Virol.* 66: 4654-4661, 1992.
 - 26) Ambinder RF, Mullen MA, Chang YN, Hayward GS, Hayward SD: Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J. Virol.* 65: 1466-1478, 1991.
 - 27) Mackey D, Sugden B: The linking regions of EBNA-1 are essential for its support of replication and transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3349-3359, 1999.
 - 28) Ceccarelli DF, Frappier L: Functional analyses of the EBNA1 origin DNA binding protein of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74: 4939-4948, 2000.
 - 29) Wu H, Kapoor P, Frappier L: Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J. Virol.* 76: 2480-2490, 2002.
 - 30) Levitskaya J, Shapiro A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG: Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12616-12620, 1997.
 - 31) Yin Y, Manoury B, Fåraeus R: Self-Inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* 301: 1371-1374, 2003.
 - 32) Mackey D, Sugden B: Applications of oriP plasmids and their mode of replication. *Methods. Enzymol.* 306: 308-328, 1999.
 - 33) Leight ER, Sugden B: EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 10: 83-100, 2000.
 - 34) Holowaty MN, Zeghouf M, Wu H, Tellam J, Athanasopoulos V, Greenblatt J, Frappier L: Protein profiling with Epstein-Barr nuclear antigen-1 reveals an interaction with the herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease HAUSP/USP7. *J. Biol. Chem.* 278: 29987-29994, 2003.
 - 35) Kirchmaier AL, Sugden B: Dominant-negative inhibitors of EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 71: 1766-1775, 1997.
 - 36) Mizuguchi H, Kay MA: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum. Gene Ther.* 9: 2577-2583, 1998.
 - 37) Mizuguchi H, Hayakawa T: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene.* 285: 69-77, 2002.
 - 38) Shimizu N, Yoshiyama H, Takada K: Clonal propagation of Epstein-Barr virus (EBV) recombinants in EBV-negative Akata cells. *J. Virol.* 70: 7260-7263, 1996.
 - 39) Yoshiyama H, Shimizu N, Takada K: Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. *EMBO J.* 14: 3706-3711, 1995.
 - 40) Imai S, Nishikawa J, Takada K: Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J. Virol.* 72: 4371-4378, 1998.

- 41) Imai S, Nishikawa J, Kuroda M., Takada K: Epstein-Barr virus infection of human epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 258: 161-184, 2001.
- 42) Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB: Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J. Gen. Virol.* 71: 1481-1495, 1990.
- 43) Takada K, Horinouchi K, Ono Y, Aya T, Osato T, Takahashi M, Hayasaka S: An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *Virus Genes* 5: 147-156, 1991.
- 44) Kenney S, Ge JQ, Westphal EM, Olsen J: Gene therapy strategies for treating Epstein-Barr virus-associated lymphomas: comparison of two different Epstein-Barr virus-based vectors. *Hum Gene Ther.* 9: 1131-1141, 1998.
- 45) Li JH, Chia M, Shi W, Ngo D, Strathdee CA, Huang D, Klamut H, Liu F-F: Tumor-targeted gene therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62: 171-178, 2002.
- 46) Judde JG, Spangler G, Magrath I, Bhatia K: Use of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 in targeted therapy of EBV-associated neoplasia. *Hum. Gene. Ther.* 7: 647-653, 1996.
- 47) Franken M, Estabrooks A, Cavacini L, Sherburne B, Wang F, Scadden DT: Epstein-Barr virus-driven gene therapy for EBV-related lymphomas. *Nat. Med.* 2: 1379-1382, 1996.
- 48) Westphal EM, Mauser A, Swenson J, Davis MG, Talarico CL, Kenney SC: Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-associated malignancies using adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 59: 1485-1491, 1999.
- 49) Li X-P, Li G, Peng Y, Kung H-F, Lin MC: Suppression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 212-218, 2004.
- 50) Banerjee S, Livanos E, Vos JMH: Therapeutic gene delivery in human B-lymphoblastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* 1: 1303-1308, 1995.
- 51) Niedobitek G, Aggathangelou A, Rowe M, Jones EL, Jones DB, Turyaguma P, Oryema J, Wright DH, Young LS: Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma. *Blood* 86: 659-665, 1995.
- 52) Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF: Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* 91: 1373-1381, 1998.
- 53) Xue SA, Labrecque LG, Lu QL, Ong SK, Lampert IA, Kazembe P, Molyneux E, Broadhead RL, Borgstein E, Griffin BE: Promiscuous expression of Epstein-Barr virus genes in Burkitt's lymphoma from the central African country Malawi. *Int. J. Cancer* 99: 635-643, 2002.
- 54) Roth G, Curiel T, Lacy J: Epstein-Barr viral nuclear antigen 1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Blood* 84: 582-587, 1994.
- 55) Hong M, Murai Y, Kutsuna T, Takahashi H, Nomoto K, Cheng C-M, Ishizawa S, Zhao Q-L, Ogawa R, Harmon BV, Tsuneyama K, Takano Y: Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by RNA interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132: 1-8, 2005.
- 56) Chodosh J, Holder VP, Gan YJ, Belgaumi A, Sample J, Sixbey JW: Eradication of latent Epstein-Barr virus by hydroxyurea alters the growth-transformed cell phenotype. *J. Infect. Dis.* 177: 1194-1201, 1998.
- 57) Snudden DK, Hearing, J, Smith PR, Grasser FA, Griffin BE: EBNA-1, the major nuclear antigen of Epstein-Barr virus, resembles 'RGG' RNA binding proteins. *EMBO J.* 13: 4840-4847, 1994.
- 58) Srinivas SK, Sixbey JW: Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 and RAG2. *J. Virol.* 69: 8155-8158, 1995.
- 59) Kube D, Vockerodt M, Weber O, Hell K, Wolf J, Haier B, Grasser FA, Muller-Lantzsch N, Kieff E, Diehl V, Tesch H: Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is associated with enhanced expression of CD25 in the Hodgkin cell line L428. *J. Virol.* 73: 1630-1636, 1999.
- 60) Kang MS, Hung SC, Kieff E: Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 activates transcription from episomal but not integrated DNA and does not alter lymphocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 15233-15238, 2001.
- 61) Kang M-S, Lu H, Yasui T, Sharpe A, Warren H, Cahir-McFarland E, Bronson R, Hung S-C, Kieff E: Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 820-825, 2005.
- 62) Kennedy G, Komano J, Sugden B: Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 14269-14274, 2003.
- 63) Humme S, Reisbach G, Feederle R, Delecluse H-J, Bousse K, Hammerschmidt W, Schepers A: The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 10989-10994, 2003.
- 64) Saridakis V, Sheng Y, Sarkari F, Holowaty MN, Shire K, Nguyen T, Zhang RG, Liao J, Lee W, Edwards AM, Arrowsmith CH, Frappier L: Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1: implications for EBV-mediated immortalization. *Mol. Cell.* 18: 25-36, 2005.

Therapeutic inhibition of Epstein-Barr virus-associated tumor cell growth by dominant-negative EBNA1

Shosuke IMAI¹, Masayuki KURODA¹, Ryusuke YAMASHITA¹, Yoshihito ISHIURA^{1,2}

¹Department of Molecular Microbiology and Infections, ²Department of Pediatrics
Program of Bio-signaling and Infection Control, Kochi Medical School
Kohasu, Oko-cho, Nankoku 783-8505, Kochi, Japan

Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 (EBNA1), a latent viral protein consistently expressed in infected proliferating cells, is essentially required *in trans* to maintain EBV episomes in cells. Thus EBNA1 will be an appropriate target for specific molecular therapy against EBV-associated cancers. We constructed a mutant (mt) EBNA1 lacking the N-terminal-half, relative to wild-type (wt) EBNA1, and demonstrated that it exerted dominant-negative effects on maintenance of the viral episome from cells regardless of viral latency or tissue origin thereby leading to significant suppression of naturally EBV-harboring Burkitt's lymphoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. Our mutant can act as dominant-negative (dn) EBNA1 and will afford an additional therapeutic strategy specifically targeting EBV-associated malignancies. The similar approach can be applicable to exploit novel remedial protocols against uncontrollable diseases caused by other persistently-infected viruses. In addition, dnEBNA1 may also provide a useful analytical tool for the possible oncogenic function(s) of wtEBNA1.