

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | あがわ ひでゆき<br>阿 川 英 之  |
| 学位の種類    | 博士（生命科学）   |
| 学位記番号    | 甲第45号  |
| 学位授与年月日  | 平成17年 3月11日  |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位論文題目   | Down-regulation of spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in the P3HR-1 cell line by L-arginine<br>(L-アルギニンによる P3HR-1 細胞株における EB ウイルス再活性化の抑制) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 日野茂男<br>(副査) 箸本英吉 西連寺 剛   |

## 学位論文の内容の要旨

EBウイルス(EBV)はヘルペスウイルス科に属し、伝染性単核球症、Burkitt's リンパ腫(BL)や上咽頭癌など発がんに関連している。EBVは宿主細胞内にウイルス遺伝子として潜伏し、種々の要因によって再活性化される。EBV再活性化は発がん、及び感染症の要因となる。一酸化窒素(NO)は感染・炎症・免疫反応において誘導されるNO合成酵素(iNOS)により、その基質であるL-アルギニン(L-Arg)から合成され、多様な微生物に対する感染防御反応のエフェクター分子として知られている。L-Arg欠乏培地でEBV感染細胞を培養するとEBVが効率良く再活性化することが古くから知られている。しかし、その再活性化機構は明らかでない。本研究はEBV再活性化機構に着目し、L-Argから合成されるNOがEBV再活性化を抑制するという仮説を立証したものである。

## 方法

EBV感染細胞株としてBL細胞株P3HR-1、EB1、及びBリンパ芽球細胞株OBを用いた。L-Argの生理的濃度(0.4, 0.7, 0.9, 1.2 mM)で培養液(DMEM+10%牛胎児血清)を調整し、細胞を37℃で培養した。P3HR-1細胞は33℃でも培養した。細胞数はトリパンブルー染色で生細胞数を計測した。iNOS mRNA発現はRT-PCR サザンブロット法により半定量的に解析した。NOの産生量はその代謝産物であるNO<sub>x</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)として測定した。iNOS特異的阻害剤としてNG-monomethyl-L-Arg(L-NMMA)を用いた。EBV前初期遺伝子BZLF1 mRNAとその蛋白ZEBRA、早期抗原(EA)の発現を各々ノザンブロット法、ウェスタンブロット法、及び蛍光抗

体法で解析した。EBV 感染価は Raji 細胞への EBV 重感染による EA 誘導能 (EA inducing unit: EAIU/ml) により算出した。

## 結 果

P3HR-1 細胞の EBV 再活性化は、培地中の L-Arg 濃度の増加に依存して減少した。すなわち、EBV 前初期遺伝子 BZLF1 mRNA とその蛋白 ZEBRA の発現量、EA 陽性細胞の割合、培養液中感染性 EBV 量は、ともに L-Arg 濃度の増加に依存して低下した。L-Arg 添加による EBV 再活性化の抑制は L-Arg から合成される NO によることを解析した。iNOS mRNA の発現量、NO から代謝される NO<sub>x</sub> の産生量は、ともに L-Arg 添加により増加した。一般に EBV の再活性化は 37℃ よりも 33℃ の培養で亢進しているが、EA 陽性細胞の割合は 37℃ に比べて 33℃ で増加しており、NO<sub>x</sub> の産生量は逆に 37℃ で増加していた。さらに、L-Arg による EBV 再活性化の抑制効果は iNOS 特異的阻害剤 L-NMMA の添加によって消失した。すなわち、EA 陽性細胞の割合、ZEBRA、及び EA-D 発現は L-NMMA 添加により顕著に増強した。

## 考 察

本研究は、以前から知られていた EBV 感染細胞株を L-Arg 欠乏培地で培養すると EBV 再活性化が起こるという現象に対して、L-Arg の添加により濃度依存性に EBV 再活性化が抑制されることを見出し、それは L-Arg から合成される NO の作用であることを証明した。すなわち、L-Arg 添加後の iNOS mRNA 発現の上昇、及び NO<sub>x</sub> で見た NO 産生量と EBV 再活性化は負の相関が見られた。L-Arg から合成される NO による EBV 再活性化の抑制は BL 細胞株 (P3HR-1、EB1)、更に B リンパ芽球細胞株 (OB) でも同様に見られることから、EBV 感染細胞での共通の機構である。L-Arg から合成される NO を介した EBV 再活性化抑制は感染の拡大を阻止する宿主細胞の持つ防御機構と考えられる。

## 結 論

培地中に存在する L-Arg により濃度依存性に NO が合成され、EBV 再活性化が抑制される。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は L-Arg の EBV 再活性化抑制機構を解析したものである。その結果、L-Arg から合成された NO が EBV 再活性化を抑制することが明らかになった。L-Arg による EBV 再活性化抑制作用は Burkitt's リンパ腫細胞株だけでなく、その他の細胞株でも同様に観察されることから EBV 感染細胞における共通の機構であり、EBV 感染の拡大を阻止する宿主細胞の持つ防御機構であることが示唆された。本研究により新たに L-Arg が EBV 再活性化の抑制因子として作用す

ることが証明された。本研究は EBV 再活性化関連疾患の病態の解明、及び治療においての重要な知見であり、明らかに学術水準を高めたものと認められる。