

EBウイルス関連疾患患者由来 EBウイルス遺伝子 における CTL エピトープ配列の検討

長 峯 正 泰 坂 東 伸 幸 高 原 幹

荻 野 武 原 淵 保 明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Analysis of the Epstein-Barr Virus (EBV) Cytotoxic T cell Epitopes in EBV Associated Diseases

Masayoshi NAGAMINE, Nobuyuki BANDO, Miki TAKAHARA, Takeshi OGINO, Yasuaki HARABUCHI

Department of Otolaryngology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

EBV oncogenes, latent membrane protein 1 (LMP-1) and LMP-2a, are expressed in tumor cells in nasopharyngeal carcinoma and nasal NK/T cell lymphoma (NNKTL). Some studies have defined cytotoxic T lymphocytes (CTL) target epitopes within the LMPs of EBV. In the present study, we determined the LMP-1 and -2a sequences of 7 NNKTLs by PCR direct sequencing and amino acid variations of the CTL epitopes were identified by comparison with some prototype sequences. Although mutation within these epitopes may provide an advantage in protecting tumor cells from the EBV-specific CTL response, in this study, there was no special amino acid change in CTL epitopes of the 7 NNKTLs. We revealed that most of these epitopes are highly conserved among the tumor cells in eastern Asian patients. These findings may be based on geographical character.

はじめに

Epstein-Barr ウイルス (EBウイルス) は大部分の成人においてに潜伏感染を生じる一方、バーキットリンパ腫や、上咽頭癌、NK/T 細胞リンパ腫など多くの疾患と関連していることが解明されているウイルスである^{1,2)}。今回、我々は鼻性NK/T 細胞リンパ腫を中心に EB ウイルスが発現する蛋白において細胞障害性 T 細胞のエピトープとなる配列に関し、比較検討し

たので報告する。

対象と方法

対象は、NK/T 細胞リンパ腫と診断された 7 例で、はじめにそれぞれの凍結組織からキット (QIAamp DNA mini kit (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan)) を使用し DNA を回収した。次に EB ウイルスが感染した際、宿主の細胞膜上に発現を認める蛋白 Latent membrane

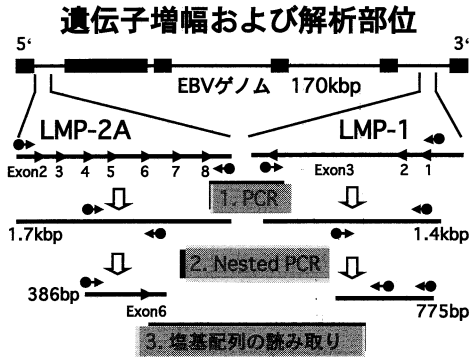


Fig. 1 Schematic illustration of LMP-1 and -2A regions of EBV.

Table 1 The sequences and coordinates of PCR primers.

Transcript	sequence(5'-3')	B95-8 genomic coordinates
LMP1	CTTTCCTCAATGCCTTGCT	169514 - 169495
	TCCCAAGTAAATGGAGGAGAGTCA	168091 - 168114
LMP2	ATAGTGTCTCTAAAATTTAA	1712 - 1693
	TGCTCTATTCCACCTTACT	11 - 30

protein (LMP) に関し、その遺伝子領域を PCR 法にて増幅した (Fig. 1)。LMP-1 遺伝子は3つの Exon からなっており、これらすべてを含むよう設計した1組みのプライマー (Table 1) で PCR を施行し約 1.4kb の増幅産物を得ている。一回の PCR でバンドが検出されないものには、Nested PCR を施行した。ついで塩基配列の決定はこれらの増幅産物を用い、ABI 310 (Applied Biosystems) によっておこなった。

LMP-2A 遺伝子についても同様にプライマーを設計 (Table 1)、PCR 法にて増幅産物を得たのち、LMP-2A 遺伝子の Exon6 領域を中心に塩基配列の読み取りをおこなった。

得られた塩基配列からさらにアミノ酸配列を決定、これまでに報告のある各種株と比較した。

結 果

Fig. 2 上段右側には LMP1 の模式図を示しており、この LMP1 アミノ酸配列中、細胞障害性 T 細胞によって認識されるとされているエピトープ配列を Fig. 2 上段左側に示してい

結果：LMP-1のT細胞エピトープ

Khanna et al. 1998. Eur. J. Immuno. 28
 Leen et al. 2001. J. Virol. 75
 Duraiswamy et al. 2003. J. Virol. 77

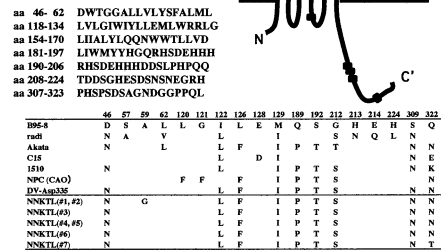


Fig. 2 Comparison of the amino acid sequences of LMP-1.

結果：LMP-2AのT細胞エピトープ

Lee et al. 1997. J. Immuno. 158
 Lee et al. 1993. J. Virol. 67
 Lautscham et al. 2003. J. Virol. 77

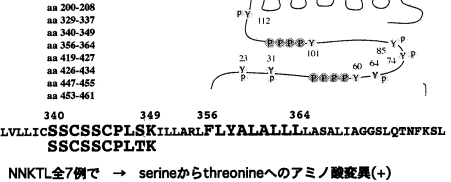


Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences of LMP-2A.

る³⁻⁵⁾。これらのエピトープにおいて、基準株として報告の多い、B95-8株、Radi株を参考に、国内のバーキットリンパ腫由来である Akata 株、アフリカの上咽頭癌患者由来株である C15 株、台湾の上咽頭癌由来株である 1510 株、中国北部の上咽頭癌由来株である CAO 株、香港の上咽頭癌由来株 DV-Asp335 株と、当科の NK/T 細胞リンパ腫 7 株を比較している⁶⁻⁹⁾。

NK/T 細胞リンパ腫 7 株はそのアミノ酸配列から5つのグループに分類されたが、これまでの報告にあるエピトープ領域に限ってみると、唯一 59 番目のアミノ酸が7株中2株でアランではなくグアニンとなっている多型を認め、それ以外はすべて一致していた。他の株との比較では東アジア由来の Akata, 1510, CAO, DV-Asp335 株が、NK/T 細胞リンパ腫由来の

株と近似していた。

Fig. 3 上段右側には497アミノ酸からなる細胞膜12回貫通型のLMP2Aのモデルを示す。このLMP2Aアミノ酸配列中、細胞障害性T細胞によって認識されるとされているエピトープ配列をFig. 3 上段左側に示している¹⁰⁻¹²⁾。このうち我々はLMP2A遺伝子中、Exon6を中心に塩基配列、およびアミノ酸配列を決定している。2ヶ所のエピトープ部分、アミノ酸340~349番および356~364番の配列を決定したところ、NK/T細胞リンパ腫7症例はすべて同一のアミノ酸配列を呈していた。しかしながら348番目のアミノ酸は、B95-8株においてはセリンであり、NK/T細胞リンパ腫ではスレオニンであった。

考 察

EBウイルス関連腫瘍である鼻性NK/T細胞リンパ腫や上咽頭癌ではEBV潜伏遺伝子のひとつであるLMP-1、-2Aの発現が認められ、これらの中にはいくつかの細胞障害性T細胞の標的エピトープが同定されている。エピトープには多くの遺伝子多型を有する部位や保存性の高い部位が報告されており、変異と病態発生の関連性、エピトープを標的とした治療の可能性が示唆されている。そこで今回我々は、当科において治療を行った鼻性NK/T細胞リンパ腫および健常人より、ウイルスDNAを回収、PCR法にて対象とする遺伝子領域を増幅し、LMP-1、-2Aに関して、PCR direct sequencingを施行、両遺伝子塩基配列を決定し、これまでに報告のある細胞障害性T細胞によって認識されるLMP-1、-2A上のエピトープ配列に関して解析、検討した。

LMP-1におけるエピトープについては、東アジア由来のAkata, 1510, CAO, DV-Asp335株の配列が、NK/T細胞リンパ腫由来の株の配列と近似していた。またエピトープ配列は、アジアの健常人由来のアミノ酸配列の報告とひ

かくしても多くは、Akata株やNK/T細胞リンパ腫などに認められるものと同じ配列であった。

当初は、エピトープ領域でのアミノ酸変異が存在することで、宿主の免疫から回避するといったメカニズムも推測されたが、今回得られた結果からはエピトープ領域のアミノ酸配列に関しては疾患に特異的なアミノ酸配列といったものは示すことが出来ず、むしろ地域性を反映してよく保存されていると考えた。

LMP2Aにおいて検討した2ヶ所のエピトープの配列は、我々の症例間ではすべて一致しており、LMP1同様よく保存されていた。LMP2A遺伝子のエピトープ配列中、348番目のアミノ酸は、B95-8株においてはセリンであり、われわれのNK/T細胞リンパ腫症例ではスレオニンであった。同様の報告が国内のEBウイルス陽性胃癌症例におけるTanakaらの報告でなされている¹³⁾。この点に関しアミノ酸の変異と病態発生の関連性が考えられたが、LMP1同様、アジアでの地域性を反映している可能性も考えられた。今後はEBウイルス関連疾患において、これらよく保存されているエピトープを標的とした免疫療法の可能性も考えられた。

参 考 文 献

- 1) Lawrence S Young and Paul G Murray: Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22: 5108-5121, 2003.
- 2) Harabuchi Y., et al: Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335: 128-30, 1990.
- 3) Khanna R., et al: Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1): evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by

- LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 28 (2): 451-8, 1998.
- 4) Leen A., et al: Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4 (+) T-helper 1 responses. *J Virol.* 75(18): 8649-59, 2001.
- 5) Duraiswamy J. et al: Ex vivo analysis of T-cell responses to Epstein-Barr virus-encoded oncogene latent membrane protein 1 reveals highly conserved epitope sequences in virus isolates from diverse geographic regions. *J Virol.* 77 (13): 7401-10, 2003.
- 6) Shimizu N., et al: 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 (9): 6069-73, 1994.
- 7) Hu LF, et al: Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol.* 72: 2399-409, 1991.
- 8) Chen ML, et al: Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene* 7 (11): 2131-40, 1992.
- 9) Leung SY, et al: Prevalence of mutations and 30-bp deletion in the C-terminal region of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene in reactive lymphoid tissue and non-nasopharyngeal EBV-associated carcinomas in Hong Kong Chinese. *Int J Cancer* 72 (2): 225-30, 1997.
- 10) Lee SP, et al: HLA A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2. *J Virol.* 67 (12): 7428-35, 1993.
- 11) Lee SP, et al: Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: a potential target for CTL-based tumor therapy. *J Immunol.* 158 (7): 3325-34, 1997.
- 12) Lautscham G., et al: Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *J Virol.* 77 (4): 2757-61, 2003.
- 13) Tanaka M., et al: Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP2A gene in gastric carcinoma in Japan. *Virus Genes* 19 (2):103-11, 1999.

連絡先：長峯 正泰

〒078-8510

旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1 番 1 号

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

TEL 0166-68-2554 FAX 0166-68-2559