

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 (2005.05) 23巻1号:159～162.

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, 原渕保明

タイトル

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

著者名

○長峯 正泰、坂東 伸幸、高原幹、荻野武、原渕 保明

所属

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

連絡先

〒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

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 protein (LMP)に関し、その遺伝子領域をPCR法にて増幅した(図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(表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(表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

図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図2上段左側に示している^{4, 5, 6)}。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^{7, 8, 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株でアラニ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。

図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

ープ配列を図3上段左側に示している^{10, 11, 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 において検討しえた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.

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

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

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

Table 1. The sequences and coordinates of PCR primers.

欧文抄録

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.

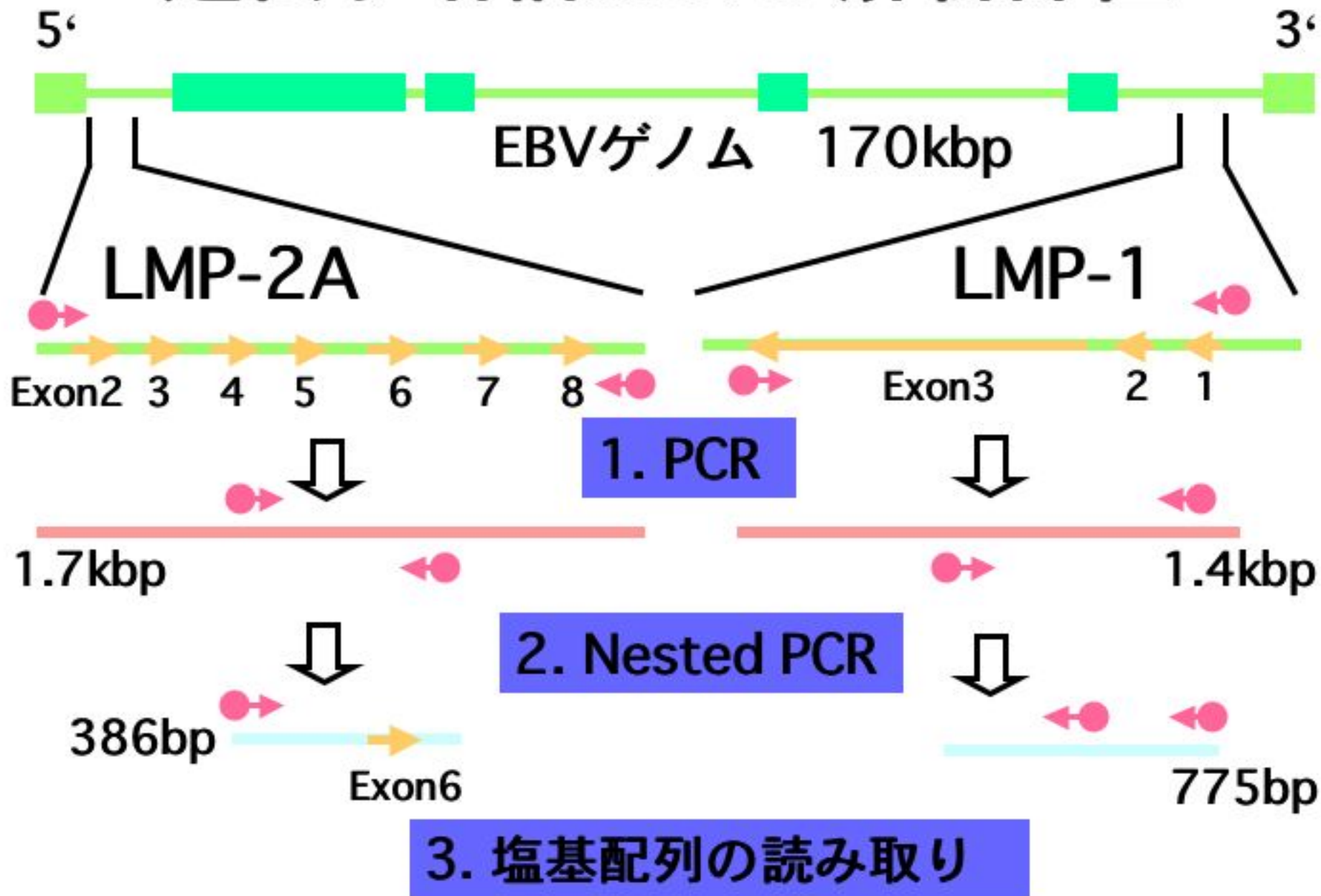
和文抄録

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、原渕 保明
旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

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。今回我々は、鼻性NK/T細胞リンパ腫7症例より、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。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、東アジア由来の株の配列は、われわれのNK/T細胞リンパ腫由来の株の配列と近似しており、むしろ地域性を反映してよく保存されていると考えた。

遺伝子増幅および解析部位

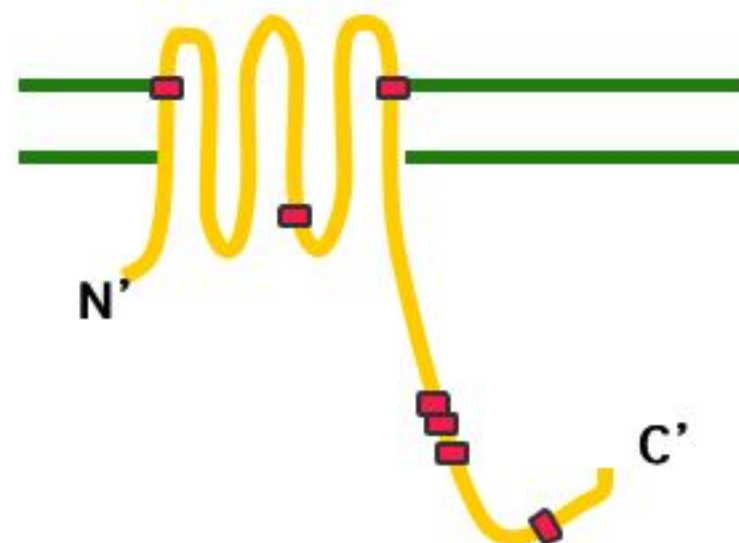


結果：LMP-1のT細胞エピトープ

Khanna *et al.* 1998. *Eur. J. Immuno.* 28

Leen *et al.* 2001. *J. Virol.* 75

Duraiswamy *et al.* 2003. *J. Virol.* 77



aa 46- 62	DWTGGALLVLYSFALML
aa 118-134	LVLGIWIYLLLEMLWRRLG
aa 154-170	LIHALYLQQNWWTLLVD
aa 181-197	LIWMYYHGQRHS DEHHH
aa 190-206	RHSDEHHHDDSLPHPQQ
aa 208-224	TDDSGHESDSNSNEGRH
aa 307-323	PHSPSDSAGNDGGPPQL

	46	57	59	62	120	121	122	126	128	129	189	192	212	213	214	224	309	322
B95-8	D	S	A	L	L	G	I	L	E	M	Q	S	G	H	E	H	S	Q
radi	N	A		V			L			I			S	N	Q	L	N	
Akata	N			L			L	F		I	P	T	T				N	N
C15							L		D	I							N	E
1510	N						L			I	P	T	S				N	K
NPC (CAO)					F	F		F		I	P	T	S					N
DV-Asp335	N						L	F		I	P	T	S				N	N
NNKTL(#1, #2)	N		G				L	F		I	P	T	S				N	N
NNKTL(#3)	N						L	F		I	P	T	S				N	N
NNKTL(#4, #5)	N						L	F		I	P	T	S				N	N
NNKTL(#6)	N						L	F		I	P	T	S				N	N
NNKTL(#7)	N						L	F		I	P	T	S				N	T

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

aa 200-208

aa 329-337

aa 340-349

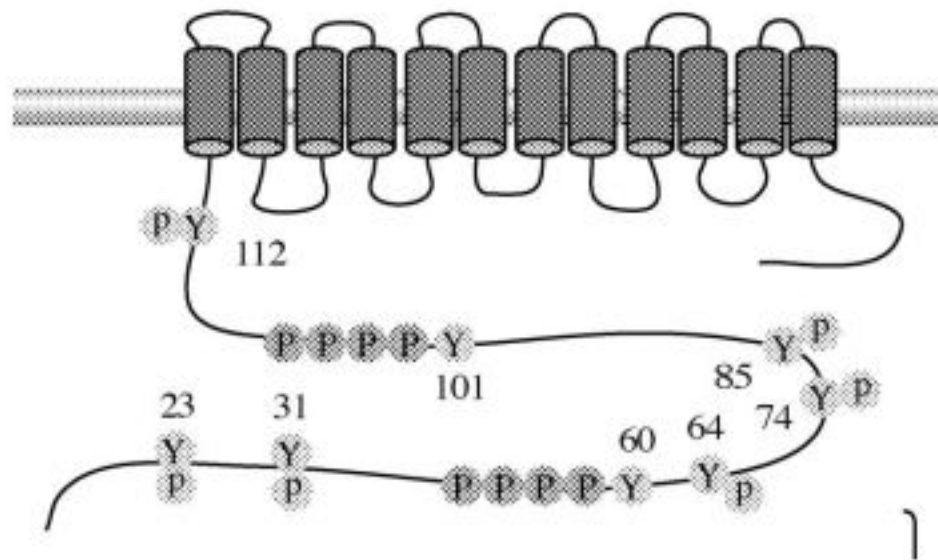
aa 356-364

aa 419-427

aa 426-434

aa 447-455

aa 453-461



340

349

356

364

LVLLIC**SSC**SSCPL**S**KILLARLFLYALALLLASALIAGGSLQTNFKSL
SSCSSCPL**T**K

NNKTL全7例で → serineからthreonineへのアミノ酸変異(+)

Table 1. The sequences and coordinates of PCR primers.

Transcript	sequence (5'-3')	B95-8 genomic coordinates
LMP1	CTTTCCTCAACTGCCTTGCT	169514 - 169495
	TCCCAGTAAATGGAGGGAGAGTCA	168091 - 168114
LMP2	ATAGTGTCTCTAAAATTTAA	1712 - 1693
	TTGCTCTATTCACCCTTACT	11 - 30