

Epstein-Barr ウイルス再活性化検出系の確立とそれを用いた エストロゲンによるウイルス再活性化の検討

三 島 眞 代

東京医科大学微生物学講座
(指導: 水野文雄主任教授)

【要旨】 Epstein-Barr (以下 EB) ウイルスの再活性化は癌をはじめ様々な病態形成に関与していることが報告されているが、その詳細な再活性化の機序は不明である。BZLF1 ならびに BRLF1 は再活性化時の早期に発現するウイルス遺伝子であり、これらはウイルス複製開始起点 oriLyt 領域や様々な他のウイルス遺伝子の転写活性を促進させる際に重要な転写因子として作用することが知られている。著者は EB ウイルスの複製に必須な BZLF1 の遺伝子産物である ZEBRA を介した転写活性化能をより高感度に検出できる実験系を確立する為に、ウイルス活性化に必須な遺伝子プロモーターを組み込んだプラスミド DNA pZp-Luc、pRZ-Luc、pBHLF1-Luc、pBHRF1-Luc を構築し、種々の細胞株に導入後、各プロモーター活性の比較検討を行った。その結果、MCF-7、HeLa 細胞で ZEBRA 蛋白を介した pBHLF1-Luc、pBHRF1-Luc 活性の上昇が検出され、高感度な EB ウイルス再活性化実験モデルとしての有用性が確認できた。また、乳癌の発症ならびに病態に EB ウイルス再活性化の関与が報告されていることから、今回確立した検出系を用いエストロゲンの EB ウイルス再活性化に及ぼす影響を検討した結果、MCF-7 細胞においてエストロゲンは ZEBRA による pBHLF1-Luc、pBHRF1-Luc の転写活性を促進した。これらのことからエストロゲンは ZEBRA によるウイルスの活性化を促進させることで乳癌の成立に関与している可能性が示唆された。

はじめに

EB ウイルスはヘルペスウイルス科に属する 2 本鎖 DNA ウイルスであり、大半の成人は性差なく既感染者であり潜伏感染により終生維持される。EB ウイルスは唾液を介して口腔から体内に入り、口腔粘膜や咽頭粘膜、唾液線上皮細胞や付近のリンパ組織内の B 細胞に感染し終生体内で生息し続ける¹⁻³⁾。EB ウイルス感染細胞は不死化し増殖する能力を獲得するが、健常人では NK 細胞や EB ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞によりその増殖は抑制され EB ウイルスに対する特異免疫が成立する。しかしながら、免疫不全状態や種々の因子を介して EB ウイルス遺伝子の転写活性が

誘導され、ウイルス複製増殖が開始 (溶解感染) することにより様々な病態が形成されることが知られている²⁾。

EB ウイルスは宿主細胞からのシグナル伝達を受けて、前早期遺伝子 BZLF1 のプロモーターが活性化し、転写が誘導されることにより遺伝子産物である ZEBRA 蛋白が発現する。ZEBRA は、前早期、早期、後期遺伝子の発現を活性化し^{4,5)} 単独でウイルス複製状態を誘導できる蛋白であり⁶⁻¹¹⁾、EB ウイルスの活性化に必須であることが明らかにされている⁸⁾。更に ZEBRA はウイルスの複製だけでなく様々なウイルス遺伝子の発現にも作用し BRLF1 の遺伝子産物である Rta と協同してウイルスの複製に関与すると共に核酸

2004 年 4 月 26 日受付、2004 年 5 月 21 日受理

(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学微生物学講座 三島眞代)

キーワード: EB ウイルス、ZEBRA、BHLF1、BHRF1、エストロゲン

代謝に関与する早期遺伝子や、さらにウイルス粒子構成蛋白をコードする後期遺伝子の転写を活性化させることも報告されている¹²⁻¹⁵⁾。このように、ZEBRAは溶解感染を誘導するための重要な転写因子として標的遺伝子を活性化することが知られている。

従来 EB ウイルス再活性化の機構を解析した報告の多くは ZEBRA の当該遺伝子である BZLF1 遺伝子プロモーター活性を指標に行われてきたが、上皮細胞等の EB 陰性細胞ではその活性は弱く、検出感度も低いことから、様々な要因による EB ウイルス活性化を検出するのが困難であった。

このことから、著者は高感度な EB ウイルス活性化の検出系を確立するために ZEBRA の転写因子としてのウイルス活性化能を指標とし、その構造の詳細が明らかにされている標的遺伝子のプロモーター活性について比較検討を行った。前早期遺伝子 BZLF1 プロモーター (pZp-Luc)、BRLF1 を含む BZLF1 プロモーター (pRZ-Luc)、更に早期遺伝子 BHLF1、BHRF-1 プロモーター (pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc) の 4 種類のプロモーターを組み込んだコンストラクトを作製し、ヒト由来乳癌細胞株 MCF-7 細胞、ヒト由来子宮癌細胞株 HeLa 細胞、唾液腺導管上皮細胞株 HSG 細胞株に遺伝子導入を行ない、ZEBRA を介したウイルス再活性化の検出系の確立を試み、更にエストロゲンが EB ウイルス再活性化に関与している可能性を本研究で構築した検出系を用いて検討した。

研究材料および方法

1. プラスミドの構築

ルシフェラーゼレポーター遺伝子に EB ウイルス前早期遺伝子プロモーターを組み込んだコンストラクト、pZp-Luc (BZLF1 -221~+81 bp)、pRZ-Luc (BZLF1 -2400~+81)、更に pBHLF1-Luc (-1800~+1)、pBHRF1-Luc (-1800~+1) の 4 種類のプロラスミドを構築した。コンストラクトに使用した前早期遺伝子プロモーター領域は B95-8 株由来 DNA より PCR 法により増幅、合成した。鋳型に使用した DNA は B95-8 細胞 1×10^7 個より抽出の後、使用した。BZLF1 -221~+81 bp 領域増幅のためのプライマーとして Bz9 (5'-gcg gta ccg aca ctt ctg aaa act gcc tc-3') および Bz8 (5'-agc cat ggc aaa agc ttg tac aaa agg cac-3')、BZLF1 -2400~+81bp 領域増幅のためのプライマーとして LRZ3 (5'-gag gta ccc cag ctt taa gat ctt gg-3') および BZ8、BHLF1 プロモーター領域増幅の

ためのプライマーとして Lf1 (5'-ccc cat ggc aca ggc cta gg-3') および Lf2 (5'-tca agc ttg ttg aat agg cca tct tg-3')、BHRF1 プロモーター領域増幅のためのプライマーとして Rf1 (5'-ctc cat ggt tga ata ggc cat ctt gct c-3') および Rf2 (5'-cca aag ctt cag gcc tag ggg tcc agg g-3') を使用し行った。PCR 反応液 (1 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 μM dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), gelatin 200 mg/ml) に 2.5 U の Taq polymerase (タカラ, 京都) を加え温度の周期的変化を加えた。反応条件は 95°C 10 分間反応の後、95°C 1 分、56°C 30 秒、72°C 2 分のサイクルを 30 回繰り返す、その後 72°C 10 分間反応させた。得られた PCR 産物 20 μl を 2% 低融点アガロース ゲル電気泳動で分離した後にエチジウムブロマイド染色し、UV 下で確認後、切り出し Wizard DNA purification kit (Promega, WI, USA) で精製した。

次に PCR 産物を KpnI および NcoI にて消化後、pGL3 Basic vector (Promega) の KpnI-NcoI 部位に組み込んだ。プラスミドに各プロモーター領域が完全に保持されていることを Autoread Sequencing Kit (Pharmacia, Sweden) を用い、A.L.F. オートシクエンサー (Pharmacia) でその塩基配列を確認した。

また ZEBRA 発現用ベクター (pCMV-Z-iNeo) 作製のため ZEBRA cDNA を、B95-8 細胞由来 total RNA より BZ4 プライマー (5'-t agg ata tcc atg atg gac cca aac tcg ac-3') および LRZ2 プライマー (5'-aag cgg ccg cgg ttt caa taa cgg gag tta-3') を用い PCR 法により調製した。その後 PCR 産物は EcoRV、NotI による消化を行い、pIRES-Neo3 (Clontech, CA, USA) の EcoRV、NotI サイトに組み込んだ。ネガティブコントロールには ZEBRA のコード領域を含まない pIRES-Neo3 を用いた。

2. 細胞培養

MCF-7 (ヒト乳癌細胞株)、HSG (ヒト唾液腺導管上皮細胞株)、HeLa (ヒト子宮癌細胞株) 細胞は牛胎児血清 (fetal calf serum: FCS) を 10% 加えた MEM 培地 (10 μM HEPES, 100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin を含む) (GibcoBRL, NY, USA) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

3. 細胞への遺伝子導入

pZp-Luc, pRZ-Luc, pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc は HB101 もしくは JM109 competent cell (タカラ) に形質転換後、大量培養し、Endofree plasmid maxi kit (Qiagen, Germany) で調整し実験に使用した。遺伝子

導入は導入の24時間前に12-well Tissue culture plate (Becton Dickinson, NJ, USA) に 1×10^5 cells/well になるように調整した細胞を播種し、導入時に約50～70% コンフルエントの条件を満たしていることを確認した。次に、Lipofectamine 2000 用培地 Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen, CA, USA) 100 μ l を加えた滅菌チューブに Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 4 μ l 加え、室温で5分間静置後各プロモータープラスミド 0.1 μ g と ZEBRA expression vector である pCMV-Z-iNeo 1.5 μ g を混合させ、さらに20分間静置した後、このプラスミド DNA/リポソーム混合液を各 well に加え、37°C、5% CO₂ の環境下で24時間反応させた。導入終了後、DNA 混合液を含む培養液を除去し、PBS で洗浄後、各 well に無血清 MEM 培地 1 ml を添加し、各刺激を行った。更に24時間培養後、細胞溶解液調整後ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

4. エストロゲン及び各エストロゲン拮抗薬

エストロゲンは Wako (大阪) より、更に選択的エストロゲンレセプター作動薬である Tamoxifen active metabolite の 4-hydroxytamoxifen (以下 4-OHT)、Raloxifen は Sigma (USA) より、またエストロゲン受容体抑制物質の ICI18278 は Macclesfield (UK) より購入した。4-OHT, Raloxifen 及び ICI18278 はエタノールに溶解し、各活性は等量の溶媒を添加しこれを溶媒コントロールとして比較を行った。

5. ルシフェラーゼ assay

12 well plate に培養していた細胞を PBS で2回洗浄後、各 well に細胞溶解液 (Promega) を 100 μ l 添加し、室温で15分間放置後、細胞溶解液を回収し、12,000 rpm で2分間遠心し、上清を細胞抽出液として使用した。ルシフェラーゼ活性の測定は細胞抽出液 20 μ l に発光基質液 100 μ l (Promega) を加え、Lumat (Bio-Rad, CA, USA) にて5秒間の発光量 (RLU) を測定した。また同サンプルの蛋白定量を行い、単位蛋白量あたりのルシフェラーゼ活性 (RLU/100 μ g protein) を算出した。

6. 蛋白質の定量

細胞溶解液中の蛋白濃度は bicinchoninic acid (BCA) protein assay 法 (Pierce, IL, USA) により測定した。

7. Western blot 法

各細胞の蛋白抽出液に2×サンプルバッファー (500 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 2%

mercaptoethanol) を等量添加し、100°C で5分煮沸処理した。10% ポリアクリルアミド (Bio Rad) に各サンプルを蛋白量が等量になるように添加し、電気泳動を行い PVDF 膜 (Milipore, Mass, USA) に転写した。転写された PVDF 膜は5%の脱脂粉乳を含む Block Ace (大日本製薬、大阪) で室温1時間ブロッキングし、マウス抗 Estrogen receptor 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) で1時間反応させた。洗浄液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5% Block Ace, 0.1% Tween20) で10分、3回洗浄後、PVDF 膜はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で室温1時間反応させ再度洗浄液で10分、3回洗浄した。目的蛋白と結合した抗体は ECL 検出キット (Amersham, N.J., USA) で発光させ、それを X 線フィルムに数分間感光させて検出した。また、検出されたバンドは NIH image 1.6.2 を用い densitometric assay 法により tubulin によって正規化した蛋白量の定量を行った (エストロゲンレセプター α)/(tubulin)×100)。

8. 統計学的検索

ルシフェラーゼ活性の測定結果は平均±SE で表し、Student's *t* test を用い $p < 0.05$ にて有意とする。

結 果

1. ZEBRA 蛋白による各 EB ウイルス再活性化関連プロモーターの比較

MCF-7, HeLa, HSG 細胞に各プロモーターコンストラクトである pZp-Luc, pRZ-Luc (Fig. 1A), pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc (Fig. 1B) と共に ZEBRA 発現ベクターの pCMV-Z-iNeo を同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定後、各プロモーター活性を比較した。MCF-7 細胞では ZEBRA 非発現時と比べ ZEBRA 発現時に pZp-Luc は2倍、pRZ-Luc は3倍、pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc では約6倍活性が上昇し、ZEBRA 蛋白により有意な pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc 活性の増強が認められた (Fig. 2A)。HeLa 細胞では pZp-Luc, pRZ-Luc の活性は ZEBRA 発現時に約2倍、pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc の活性は約6倍増強した (Fig. 2B)。また、HSG 細胞では HeLa 細胞と同様に pZp-Luc, pRZ-Luc は約2倍、pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc は約4倍のプロモーター活性上昇がみられた (Fig. 2C)。以上の結果から、今回使用した MCF7, HeLa, HSG 細胞において、BHLF1、BHRF1 のプロモーターは ZEBRA 蛋白により高率に転写活性化されることが明らかとなり、EB ウイルス

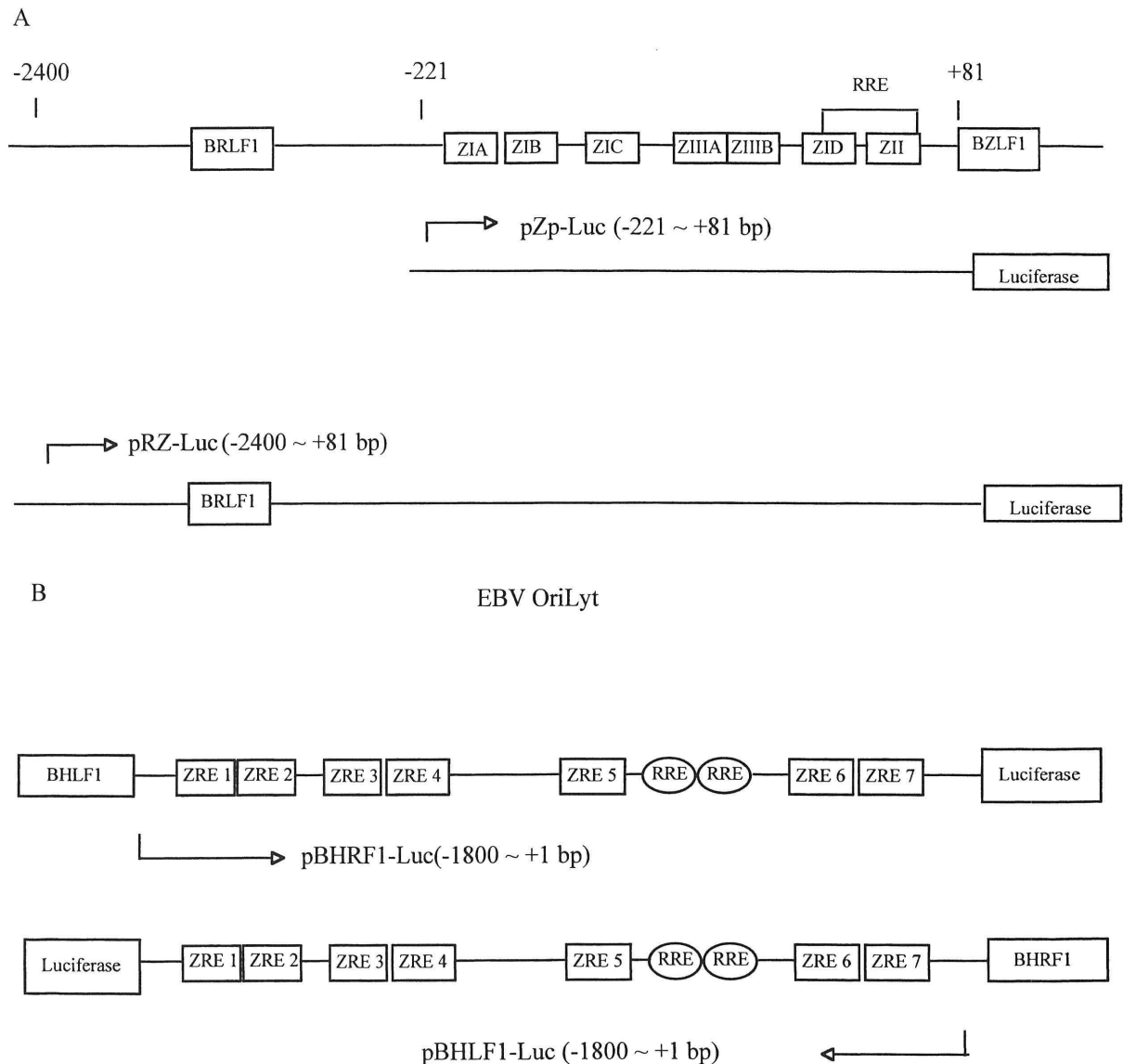


Fig. 1 Structures of the BZLF1 promoter region from -221 to +81 bp, and BRLF1 and BZLF1 promoter region from -2400 to +81 bp which were cloned into an upstream portion of the luciferase gene (pZp-Luc, pRZ-Luc). Through ZI to ZIII are for the ZEBRA binding sites, and RRE is for the Rta binding site for activation and leads to high-level BZLF1 transcription (A). EBV OriLyt structure and the construction of the lytic origin is flanked by two divergent genes of BHLF1 and BHRF1 promoter region from -1800~+1 bp which was cloned into an upstream portion of the luciferase gene (pBHLF1-Luc, and pBHRF1-Luc). The diagram shows the relative positions of the seven ZRE binding sites for ZEBRA, and two RRE binding sites for the Rta proteins (B).

再活性化に伴う ZEBRA のトランス活性を検索するうえで最も有用であると考えられ、以下の検討に供した。

2. エストロゲンの各 EB ウィルス再活性化関連プロモーターに及ぼす影響

乳癌と EB ウィルスの関連を検討する目的で、著者が構築した BHLF1 と BHRF1 遺伝子プロモーターを導入した乳癌細胞株 MCF-7 細胞においてエストロゲンによる各プロモーター活性を検討した。種々の濃度 ($1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-5}$ M) のエストロゲンを各細胞に添

加し、pZp-Luc, pRZ-Luc, pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc の活性を測定した結果、ZEBRA 非存在下ではいずれの細胞においてもエストロゲンによる各プロモーターへの影響はみられなかった。しかし、ZEBRA 存在下で MCF-7 細胞ではエストロゲン濃度依存的に pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc プロモーター活性の上昇がみられた。エストロゲン非添加と比較してエストロゲン 1×10^{-6} M 以上で pBHLF1-Luc の活性は有意に上昇し、 1×10^{-5} M では約 9 倍増強した。pBHRF1-Luc はエストロゲン 1×10^{-8} M 以上で有意に活性が増強

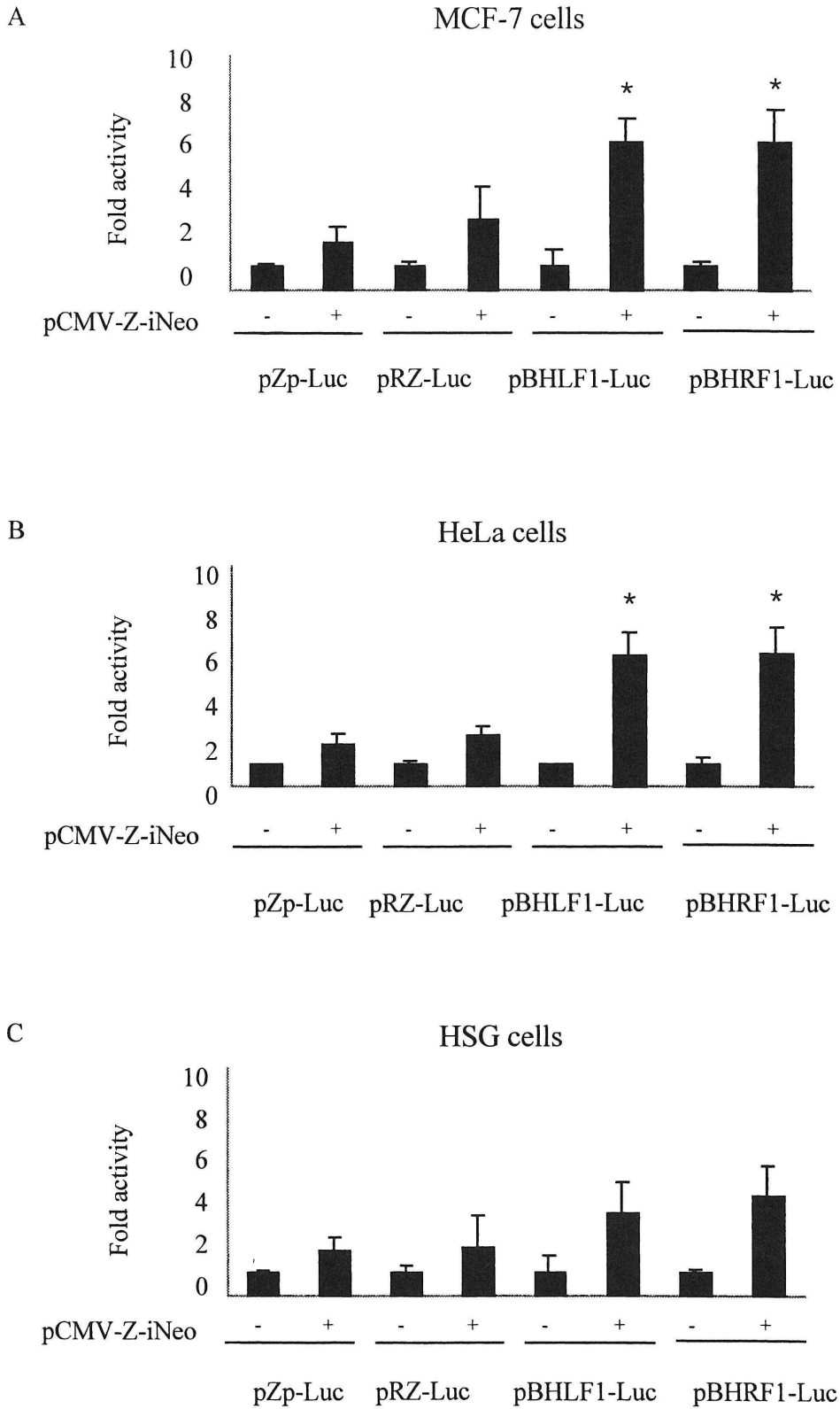


Fig. 2 Activation of pZp-Luc, pRZ-Luc, pBHLF1-Luc, and pBHRF1-Luc in EB virus-negative MCF-7 (A), HeLa (B), and HSG (C) cells with or without BZLF1 expression vector (pCMV-Z-iNeo). After incubation for 24 hr, the cells were harvested and luciferase activity was assayed. Bar graph illustrates fold activity. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; Student's t test. The error bars represents standard errors.

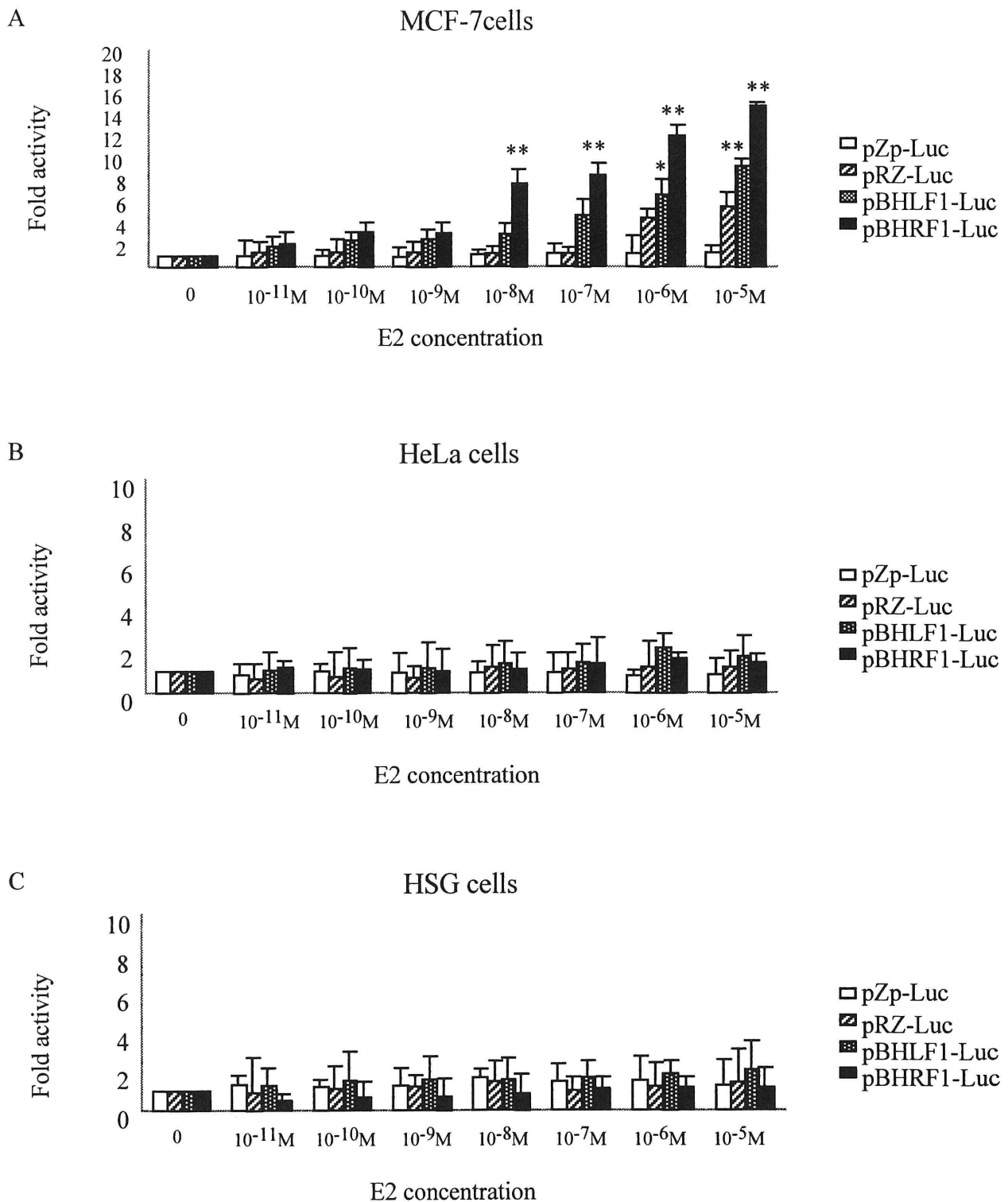


Fig. 3 Luciferase assay of the BZLF1, BZRF1, BHLF1, BHRF1 promoter activities in MCF-7 (A), HeLa (B), and HSG (C) cells stimulated with estrogen after transfection with ZEBRA expression vector (pCMV-Z-iNeo). Cells were harvested 24 hr later, and the cell extracts were assayed for luciferase activity. The results shown are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; Student's t test. The error bars represents standard errors.

し、 1×10^{-5} M 添加時に最も強い活性化がみられエストロゲン非添加に比べ約 15 倍増強した。しかし、pZp-Luc の活性はエストロゲン存在下と非存在下では差

がみられず、pRZ-Luc ではエストロゲン濃度が 1×10^{-5} M で約 5 倍のプロモーター活性がみられたが、有意差は認められなかった (Fig. 3A)。Hela, HSG 細胞

ともに高濃度のエストロゲン (1×10^{-5} M) によっても pZp-Luc, pRZ-Luc, pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc 各プロモーター活性の変化は認められなかった (Fig. 3B, 3C)。

3. 各細胞におけるエストロゲンレセプター量の検討

MCF-7, HeLa, HSG 細胞でのエストロゲンによる各プロモーターの活性化作用の相異がエストロゲンレセプターの発現量に依存しているかを検討するため、Western blot 法により各細胞におけるエストロゲンレセプター量の比較を行った。その結果、MCF-7, HeLa, HSG 細胞ともにエストロゲンレセプターの発現が認められ、MCF-7 細胞で最も強い発現が認められた (Fig. 4)。

4. エストロゲン拮抗薬による BHLF1 及び BHRF1 プロモーター活性の抑制

MCF-7 細胞において 1×10^{-5} M のエストロゲンにより上昇した BHLF1 及び BHRF1 プロモーター活性が、エストロゲンレセプターを介しているか否かを明らかにする為に、エストロゲン拮抗薬である 4-OHT、Raloxifen 及び ICI182780 を用いて、各プロモーター活

性を測定し検討した。始めにエストロゲン拮抗薬単独の作用を確認するために pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc を導入した MCF-7 細胞に種々の濃度 (1×10^{-11} ~ 1×10^{-6} M) で各エストロゲン拮抗薬 4-OHT, Raloxifen, ICI182780 を添加し、それぞれのプロモーター活性を測定した。その結果、 1×10^{-7} M の 4-OHT 添加時の活性は溶媒のみ添加時と比較して約 7~8 倍増強した (Fig. 5A)。同様に 1×10^{-6} M の Raloxifen 処理時では約 8 倍の活性増強がみられたが (Fig. 5B)、ICI182780 処理によるプロモーター活性の差は認められなかった (Fig. 5C)。次に 4-OHT (1×10^{-9} M)、Raloxifen (1×10^{-9} M)、ICI182780 (1×10^{-9} M) をエストロゲンと同時に MCF-7 細胞に添加し、各ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、エストロゲンにより増強された pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc 活性は 4-OHT, Raloxifen により約 75% 抑制され、ICI182780 では約 90% 抑制された (Fig. 6A, 6B)。MCF-7 細胞において著者が構築した EB ウイルス複製時の転写実験モデル pBHLF1-Luc, pBHRF1-Luc はエストロゲンにより活性化されるが、その活性はエストロゲン拮抗薬である 4-OHT、Raloxifen、及び ICI182780 により有意に抑制された。

考 察

1. 高感度な EB ウイルス活性化検出系の確立

EB ウイルスは他のヘルペスウイルスと同様、通常宿主細胞内に潜伏感染しており、様々な刺激により活性化する。EB ウイルスの主な感染標的細胞は B 細胞であるが、その他にも T 細胞、NK 細胞、及び上皮細胞への感染も認められ、これらの感染細胞は EB ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞を始めとする免疫監視機構により増殖が抑制されている。しかし、宿主の免疫能が低下した時に感染細胞の異常増殖と EB ウイルス再活性化が誘導される。EB ウイルス再活性化が発症、及び病態の悪性化に関与していることが報告されている疾患として、慢性活動性 EB ウイルス感染症、血球貪食症候群、日和見リンパ腫、またシェーグレン症候群、慢性関節リウマチなどの膠原病が知られており、更に種々の悪性腫瘍への関与を示す報告が多数ある¹⁶⁻²⁶⁾。しかしながら、生体内での EB ウイルスの再活性化機構、またそれに係わる因子と多様な病態形成への関連についてまだ不明な点が多い。

前早期遺伝子の一つである BZLF1 は単独で EB ウイルスの再活性化を誘導できる転写因子、ZEBRA 蛋白をコードしている。ZEBRA 蛋白は bZip ファミ

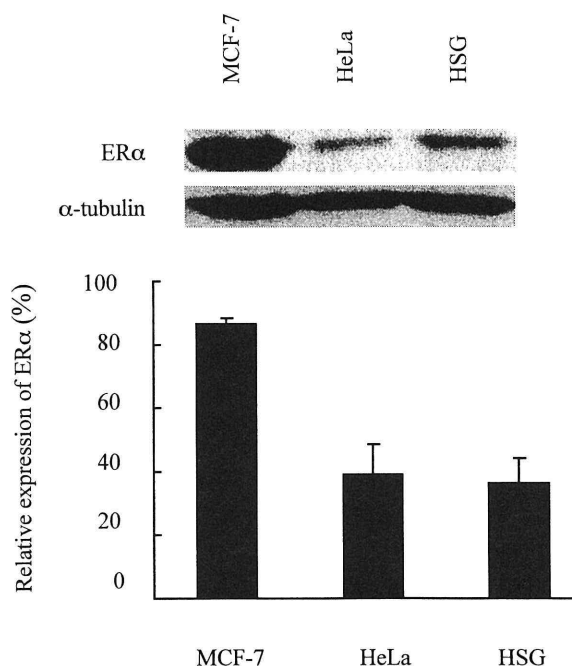


Fig. 4 The expression level of ER α in MCF-7, HeLa, and HSG cells was determined by western blot analysis. ER α bands were quantified by densitometric analysis. Tubulin was used for normalizing the amount of protein loaded. The results were calculated and the amount of ER α was expressed as the relative amount. The results shown are representative of three independent experiments.

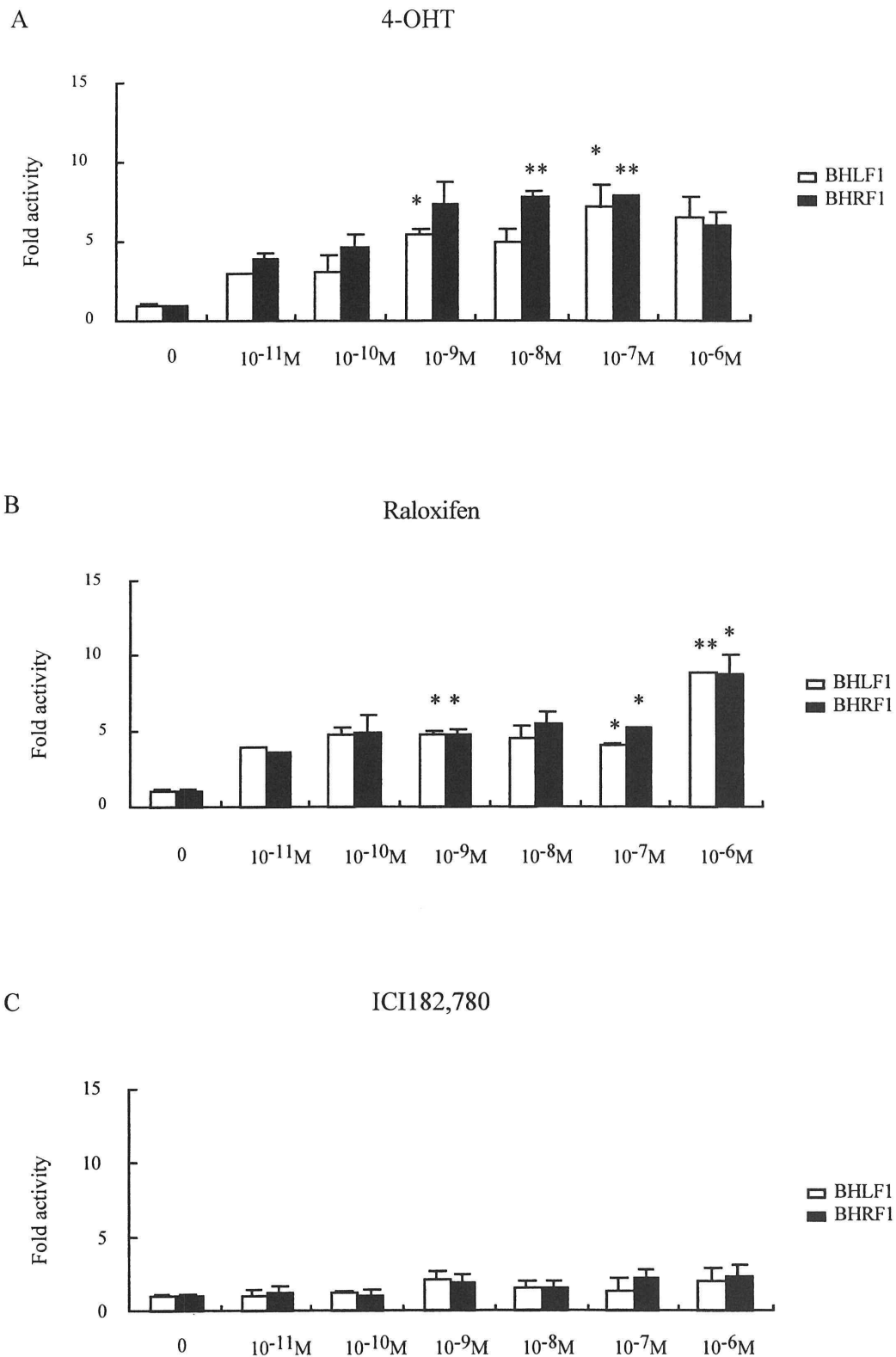


Fig. 5 Effect of the selective estrogen receptor modulators, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) (A), Raloxifen (B), and selective estrogen receptor downregulator, ICI18278 (C) in MCF-7 cells after transfected with pBHLF1-Luc or pBHRF1-Luc and ZEBRA expression vector (pCMV-Z-iNeo). Cells were harvested 24 hr later, and the cell extracts were assayed for luciferase activity. The results shown are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; Student's t test. The error bars represents standard errors.

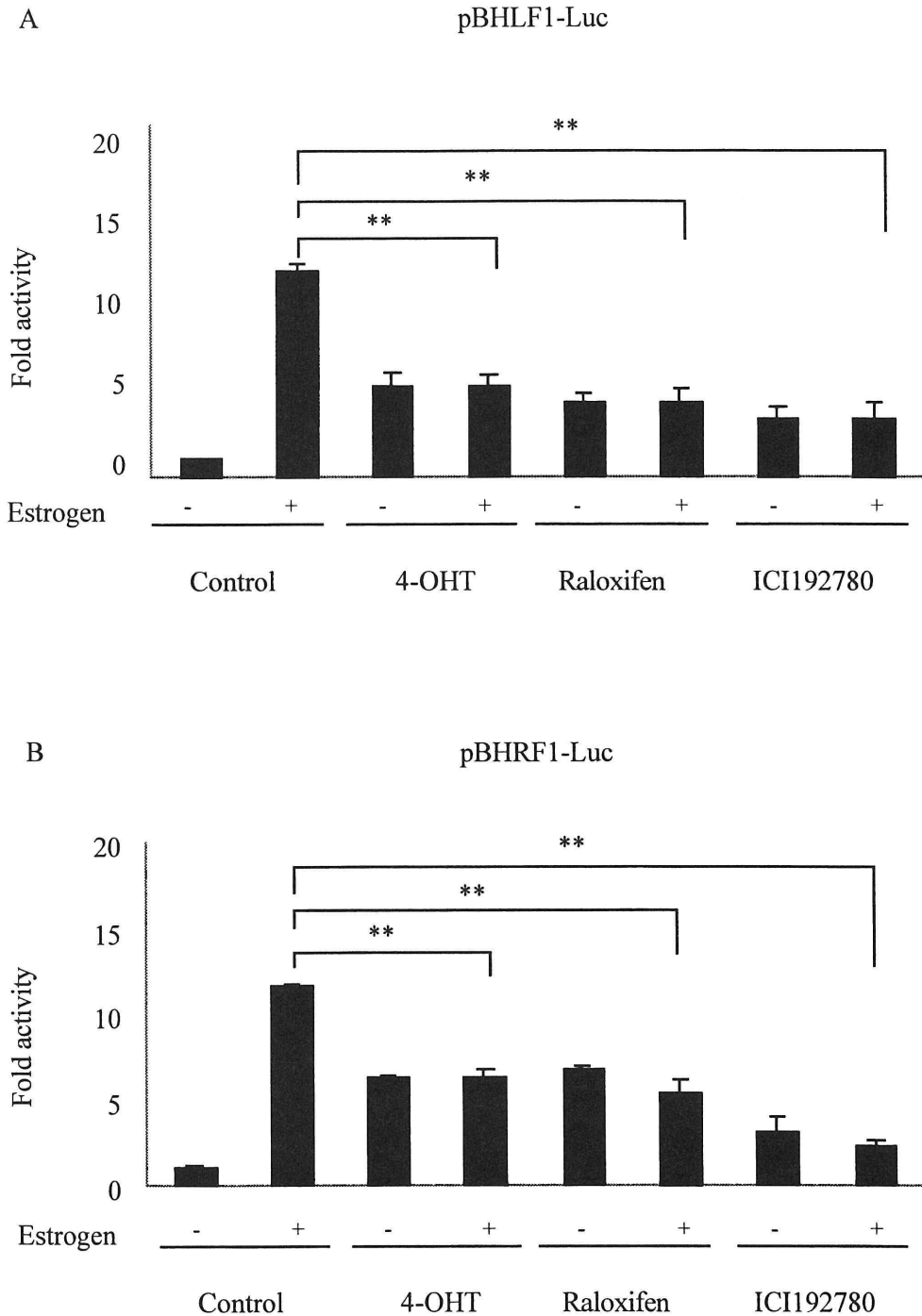


Fig. 6 Effect of the selective estrogen receptor modulators, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), Raloxifen, and selective estrogen receptor downregulator, ICI18278 on BHLF1 (A) and BHRF1 (B) promoter activation in MCF-7 cells transfected with ZEBRA expression vector (pCMV-Z-iNeo). MCF-7 cells were treated with 4-OHT (1×10^{-9} M), Raloxifen (1×10^{-9} M), and ICI18278 (1×10^{-9} M), in the presence or not presence of estrogen. Cells were harvested 24 hr later, and the cell extracts were assayed for luciferase activity. The results shown are representative of three independent experiments. $**p < 0.001$; Student's *t* test. The error bars represents standard errors.

リーに属する転写因子であり、ホモダイマーを形成してDNA上のAp1領域及びAp1-like BZLF1-responsive elements (ZREs) に結合し、標的遺伝子の転写を活性化させる^{27,28}。今回著者が構築したpZp-Luc, pRZ-LucはBRLF1及びBZLF1のプロモーターであ

るRpとZpより構成され、これらのプロモーター領域にはZREが含まれる^{29,30}。両プロモーター上に存在するZREにZEBRAが結合することで自己活性化が誘導され、再活性化が強固なものとなる²⁹。pZp-LucはZpのみを有するのに対し、pRZ-LucはZpおよび

Rp を含み (Fig. 1)、MCF-7 細胞において pRZ-Luc で pZp-Luc に比較して強い活性が認められたのは、ZEBRA が結合する両プロモーター上の ZRE の数の違いによるものと考えられる。再活性化時のウイルスの複製はウイルス複製開始起点 (oriLyt) から始まり、ZEBRA が oriLyt の 7 個ある ZRE 領域に結合することが、その機能発現に必須である^{13,31})。また、BHLF1、BHRF1 はそれぞれ oriLyt の両端に位置し、ウイルス複製時にこれらの遺伝子も同時に転写される³²⁻³⁴)。MCF7, HeLa, HSG 細胞において、pBHLF1-Luc および pBHRF1-Luc の活性は予想通り pZp-Luc、pRZ-Luc に比べ高い活性が認められ、EB ウイルス再活性化時の ZEBRA による転写活性化能を高感度に検出できる系として確立できた。

2. エストロゲンレセプターを介したエストロゲンの EB ウイルス再活性化に及ぼす影響

EB ウイルスはヒト癌ウイルスとしてよく知られており、それらの癌細胞には EB ウイルス遺伝子及び EB ウイルス潜伏感染期の遺伝子産物が存在し、癌化あるいは癌の維持に EB ウイルスが関与していることが考えられている。最近ではヒト乳癌細胞において再活性化時にみられる ZEBRA 蛋白の発現が認められたことが報告された^{24,35-37})。また、EB ウイルス関連の悪性リンパ腫が乳腺組織で認められたり³⁸)、EB ウイルスが乳汁中に検出されるなど³⁹)、乳腺、特に腺房細胞に EB ウイルスが感染している可能性は高い。その進入経路は上皮細胞特異的な受容体を介するか、感染したリンパ球との細胞同士の接触によるものと推測される。一方、乳癌の発症に女性ホルモンが関与している可能性は古くから知られ、その治療には一般的にエストロゲンレセプター抑制剤が使われている。今回著者は、乳癌細胞、子宮癌細胞、唾液腺導管上皮細胞でのエストロゲンによる各 EB ウイルス遺伝子プロモーターへの影響を検討し、乳癌細胞でエストロゲン濃度依存的に BHLF1、BHRF1 プロモーター活性の上昇がみられる事を明らかにした。この結果から、乳癌細胞内ではエストロゲンにより ZEBRA の転写活性が容易に誘導されることが示唆された。また、それぞれの細胞内のエストロゲンレセプター量を確認したところ、MCF-7 細胞で一番強い発現がみられた。このことから、今回の乳癌細胞特異的にみられた ZEBRA 蛋白の転写活性化作用がエストロゲンレセプターを介する可能性が推測された。

エストロゲンレセプターは乳癌の治療及び予防の

重要な標的分子である⁴⁰)。エストロゲンレセプター作動薬 (selective estrogen receptor modulator, SERM) はエストロゲンレセプターに結合し、組織特異的にエストロゲン様あるいは抗エストロゲン様の作用を示す化合物で、代表的なものに今回使用した 4-OHT と Raloxifen があり、実際に乳癌の治療および予防に用いられている⁴¹)。4-OHT と Raloxifen は乳癌細胞内で標的遺伝子のプロモーターに転写抑制共役因子をリクルートすることによりその抗エストロゲン作用を発揮する⁴¹)。また 4-OHT, Raloxifen などの SERM は単独でエストロゲン非存在下で transforming growth factor β (TGF- β) などのエストロゲン応答遺伝子を誘導することが報告されており⁴²)、これらの作用の違いは各プロモーター上にリクルートされる転写共役因子の量的、質的な差が要因であると考えられている。一方、ICI182780 はエストロゲンレセプターに結合後、レセプター構造変化異常を引き起こしエストロゲンレセプターの DNA 結合が不可能な状態に誘導しすることで抗エストロゲン様活性を発揮する^{40,43})。MCF-7 細胞を用いた今回の検討では高濃度の 4-OHT, Raloxifen 単独で ZEBRA による BHLF1 及び BHRF1 プロモーター活性の上昇が認められた (Fig. 5) が、これは 4-OHT, Raloxifen により BHLF1 及び BHRF1 プロモーター上にリクルートされる転写共役因子の量的、質的な差が要因の一つであると考えられる。また前述した様に 4-OHT, Raloxifen は TGF- β を誘導し、更に TGF- β は EB ウイルス再活性化を誘導することが報告されている⁴⁴) 事から、本研究において SERM 単独添加時に認められた BHLF1 及び BHRF1 プロモーター活性の上昇は、TGF- β 発現を介した作用である可能性も考えられる。一方、エストロゲンによる BHLF1 及び BHRF1 プロモーター活性増強は 4-OHT, Raloxifen および ICI182780 により各々の化合物単独添加レベルまで抑制され、4-OHT, Raloxifen, ICI182780 はエストロゲン拮抗薬として作用した。このことより乳癌細胞内でエストロゲンはエストロゲンレセプターを介して直接的または間接的に ZEBRA 蛋白による BHLF1, BHRF1 プロモーターの活性化を促進し、EB ウイルスの活性化に関与していることが示唆された。

エストロゲンレセプターは核内受容体ファミリーの一員として知られ、リガンド結合後のエストロゲンレセプターは標的遺伝子の転写を制御することが知られている。標的遺伝子の転写はリガンド結合したエ

ストロゲンレセプターによる標的遺伝子プロモーターへの転写共役因子群のリクルートと、それに伴う基本転写装置への情報伝達により制御されることも明らかにされている^{41,45}。リガンド結合したエストロゲンレセプターはステロイドレセプターコアクチベータ (steroid receptor coactivator, SRC) と結合し、クロマチン構造を変化させるヒストンアセチル化酵素 (histone acetyl-transferases, 以下 HAT) である CREB-binding protein (以下 CBP) をリクルートすることで転写を活性化させる⁴⁶。一方、ZEBRA は潜伏感染状態の EB ウイルスの染色体のクロマチン構造を変化させることで EB ウイルスの複製および転写活性化能を発揮する^{6,47}。さらに、ZEBRA はエストロゲンレセプター同様 CBP をリクルートしその HAT 活性を促進させることが報告されている^{48,49}。これら従来の知見と今回の著者の検討から、エストロゲンが結合したエストロゲンレセプターは再活性化時の EB ウイルス遺伝子のプロモーターに直接結合するか、ZEBRA と結合することで間接的にプロモーター上に結合し、CBP 等の転写共役因子のリクルート、活性化を促進し、BHLF1 ならびに BHRF1 プロモーターのクロマチン構造を変化させ転写を増強させた可能性が考えられる。

今回の結果から、エストロゲンは単独で EB ウイルスを活性化する作用はないものの、一旦 ZEBRA が発現され再活性化が惹起された後の反応を促進させることで、EB ウイルスを介した乳癌の発症、維持に関与している可能性が考えられた。また、EB ウイルス関連乳癌へのエストロゲン抑制剤治療の効果の一部はエストロゲンによる EB ウイルス再活性化を抑制することによる可能性を示唆した。今後、このようなエストロゲンによる EB ウイルス活性化の現象が組織特異的なものなのか詳細な機序を分子レベルで明らかにしていく予定である。

結 論

1. MCF-7, HeLa, HSG 細胞において、EB ウイルス早期遺伝子の BHLF1, BHRF1 プロモーターを標的とした ZEBRA の転写活性化能を指標とすることで、EB ウイルス活性化の検出系を確立した。

2. MCF-7, HeLa, HSG 細胞においてエストロゲンによる BHLF1, BHRF1 プロモーター活性を検討したところ MCF-7 細胞でエストロゲン濃度依存的に ZEBRA による BHLF1, BHRF1 プロモーター活性の

上昇が認められた。

3. MCF-7 細胞でエストロゲンにより促進された BHLF1, BHRF1 プロモーター活性はエストロゲン拮抗薬により抑制された。

謝 辞

本研究に際し懇篤な御指導、御校閲を賜りました東京医科大学微生物学講座水野文雄主任教授に深謝致します。

文 献

- 1) Miller G: Epstein-Barr virus, Biology, pathogenesis and medical aspects. In *Virology* (Fields B Ned) 2nd ed, Raven Press, New York, 1921-1958, 1990
- 2) Kieff E: Epstein-Barr virus and its replication. In *Virology* (Fields BN, Knipe DM, Howley PM ed) 3rd ed, Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 2343-2396, 1996
- 3) Rickinson AB, Kieff E: Epstein-Barr virus. In *Virology* (Fields BN, Knipe DM, Howley PM ed) 3rd ed, Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 2397-2446, 1996
- 4) Holley-Guthrie EA, Quinlivan EB, Mar EC, Kenney S: The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol* **64**: 3753-3759, 1990
- 5) Quinlivan EB, Holley-Guthrie EA, Norris M, Gutsch D, Bachenheimer SL, Kenney SC: Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res* **21**: 1999-2007, 1993
- 6) Countryman J, Miller G: Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4085-4089, 1985
- 7) Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Daillie J, Sergeant A: Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J* **5**: 3243-3249, 1986
- 8) Takada K, Shimizu N, Sakuma S, Ono Y: Trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* **57**: 1016-1022, 1986
- 9) Grogan E, Jenson H, Countryman J, Heston L, Gradoville L, Miller G: Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1332-1336, 1987

- 10) Rooney CM, Rowe DT, Ragot T, Farrell PJ : The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol* **63** : 3109-3116, 1989
- 11) Gradoville L, Grogan E, Taylor N, Miller G : Differences in the extent of activation of Epstein-Barr virus replicative gene expression among four nonproducer cell lines stably transformed by oriP/BZLF1 plasmids. *Virology* **178** : 345-354, 1990
- 12) Askovic S, Baumann R : Activation domain requirements for disruption of Epstein-Barr virus latency by ZEBRA. *J Virol* **71** : 6547-6554, 1997
- 13) Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD : Replication of Epstein-Barr virus oriLyt : lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol* **69** : 2998-3006, 1995
- 14) Sarisky RT, Gao Z, Lieberman PM, Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD : A replication function associated with the activation domain of the Epstein-Barr virus Zta transactivator. *J Virol* **70** : 8340-8347, 1996
- 15) Schepers A, Pich D, Mankertz J, Hammerschmidt W : cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* **67** : 4237-4245, 1993
- 16) Burkitt DP : Classics in oncology. A sarcoma involving the jaws in African children. *CA Cancer J Clin* **22** : 345-355, 1972
- 17) Serraino D, Pezzotti P, Dorrucchi M, Alliegro MB, Sinicco A, Rezza G : Cancer incidence in a cohort of human immunodeficiency virus seroconverters. HIV Italian Seroconversion Study Group. *Cancer* **79** : 1004-1008, 1997
- 18) O'Grady J, Stewart S, Elton RA, Krajewski AS : Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease and site of origin of tumour. *Lancet* **343** : 265-266, 1994
- 19) Shibata D, Weiss LM : Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* **140** : 769-774, 1992
- 20) 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
- 21) Golden HD, Chang RS, Prescott W, Simpson E, Cooper TY : Leukocyte-transforming agent : prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. *J Infect Dis* **127** : 471-473, 1973
- 22) Lemon SM, Hutt LM, Shaw JE, Li JL, Pagano JS : Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis. *Nature* **268** : 268-270, 1977
- 23) Sixbey JW, Yao QY : Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* **255** : 1578-1580, 1992
- 24) Xue SA, Lampert IA, Haldane JS, Bridger JE, Griffin BE : Epstein-Barr virus gene expression in human breast cancer : protagonist or passenger? *Br J Cancer* **89** : 113-119, 2003
- 25) Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, Joab I : Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* **91** : 1376-1381, 1999
- 26) Chu JS, Chen CC, Chang KJ : In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett* **124** : 53-57, 1998
- 27) Chang YN, Dong DL, Hayward GS, Hayward SD : The Epstein-Barr virus Zta transactivator : a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol* **64** : 3358-3369, 1990
- 28) Lieberman PM, Berk AJ : In vitro transcriptional activation, dimerization, and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J Virol* **64** : 2560-2568, 1990
- 29) Flemington E, Speck SH : Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* **64** : 1227-1232, 1990
- 30) Sinclair AJ, Brimmell M, Shanahan F, Farrell PJ : Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol* **65** : 2237-2244, 1991
- 31) Schepers A, Pich D, Hammerschmidt W : A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *Embo J* **12** : 3921-3929, 1993
- 32) Chevallier-Greco A, Gruffat H, Manet E, Calender A, Sergeant A : The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains : domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *J Virol* **63** : 615-623, 1989
- 33) Cox MA, Leahy J, Hardwick JM : An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J Virol* **64** : 313-321, 1990
- 34) Gruffat H, Moreno N, Sergeant A : The Epstein-Barr virus (EBV) ORI_{lyt} enhancer is not B-cell specific and does not respond synergistically to the EBV transcription factors R and Z. *J Virol* **64** : 2810-2818, 1990
- 35) Chien YC, Chen JY, Liu MY, Yang HI, Hsu MM, Chen CJ, Yang CS : Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med* **345** : 1877-1882, 2001
- 36) Hoshikawa Y, Satoh Y, Murakami M, Maeta M, Kaibara N, Ito H, Kurata T, Sairenji T : Evidence

- of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J Med Virol* **66**: 351-359, 2002
- 37) Huang J, Chen H, Hutt-Fletcher L, Ambinder RF, Hayward SD: Lytic viral replication as a contributor to the detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *J Virol* **77**: 13267-13274, 2003
- 38) Koulibaly M, Diallo SB, Wann AR, Diallo MB, Charlotte F, Le Charpentier Y: Apparently isolated case of African Burkitt lymphoma localized in the breast. *Ann Pathol* **18**: 237-238, 1998
- 39) Junker AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L: Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci* **302**: 220-223, 1991
- 40) Pearce ST, Liu H, Jordan VC: Modulation of estrogen receptor alpha function and stability by tamoxifen and a critical amino acid (Asp-538) in helix 12. *J Biol Chem* **278**: 7630-7638, 2003
- 41) Shang Y, Brown M: Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* **295**: 2465-2468, 2002
- 42) Chen H, Tritton TR, Kenny N, Asher M, Chiu JF: Tamoxifen induces TGF- β 1 activity and apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells in vitro. *J Cell Biochem* **61**: 9-17, 1996
- 43) Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S, Marshall C, Dowsett M: Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *J Biol Chem* **278**: 30458-30468, 2003
- 44) Fukuda M, Kurosaki W, Yanagihara K, Kuratsune H, Sairenji T: A mechanism in Epstein-Barr virus oncogenesis: inhibition of transforming growth factor-beta 1-mediated induction of MAPK/p21 by LMP1. *Virology* **302**: 310-320, 2002
- 45) Glass CK, Rosenfeld MG: The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**: 121-141, 2000
- 46) Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**: 194-198, 1997
- 47) Miller G: The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* **161**: 833-844, 1990
- 48) Deng Z, Chen CJ, Chamberlin M, Lu F, Blobel GA, Speicher D, Cirillo LA, Zaret KS, Lieberman PM: The CBP bromodomain and nucleosome targeting are required for Zta-directed nucleosome acetylation and transcription activation. *Mol Cell Biol* **23**: 2633-2644, 2003
- 49) Deng Z, Chen CJ, Zerby D, Delecluse HJ, Lieberman PM: Identification of acidic and aromatic residues in the Zta activation domain essential for Epstein-Barr virus reactivation. *J Virol* **75**: 10334-10347, 2001

Analysis of Epstein-Barr virus replication with ZEBRA transactivator by estrogen

Masayo MISHIMA

Department of Microbiology, Tokyo Medical University
(Director: Prof. Fumio MIZUNO)

Abstract

The Epstein-Barr (EB) virus is a ubiquitous human herpes virus and has the ability to establish latent, life-long infections. EB virus reactivation is associated with lymphoid and epithelial cell malignancies. Disruption of EB virus latency is mediated through the activation of the viral immediate-early proteins ZEBRA, BZLF1 gene product, and Rta, BRLF1 gene product, and both proteins are the transcriptional activators of several viral promoters including the lytic replication origin, OriLyt. To evaluate the most sensitive EB virus activated cell model, we constructed the plasmid DNA BZLF1 promoter fusion construct (pZp-Luc), BZLF1 and BRLF1 promoter fusion construct (pRZ-Luc), BHLF1 promoter fusion construct (pBHLF1-Luc), and BHRF1 promoter fusion construct (pBHRF1-Luc) containing a luciferase coding sequence which were linked to the down-stream of each promoter, and transfected each promoter into the MCF-7, HeLa, HSG cells. Then we established MCF-7, using the pBHLF1-Luc and pBHRF1-Luc construct, as a highly sensitive EB virus activated cell model in the presence of ZEBRA protein.

EB virus may be a cofactor in the development of different malignancies including human breast cancer. Moreover, it is already known that estrogen plays an important role in the progression of the breast cancer. In this study, we investigated whether estrogen affects the process of viral activation, using our EB reactivated model MCF-7. The results showed that estrogen induced pBHLF1-Luc and pBHRF1-Luc promoter activity in the EB reactivated model MCF-7 in the presence of ZEBRA. We concluded that estrogen might contribute to the progression of the breast cancer through induction of the EB virus reactivation with ZEBRA as the transcriptional activator.

<Key words> Epstein-Barr virus, ZEBRA, BHLF1, BHRF1, Estrogen
