

## 論文の内容の要旨

論文題目 **EBウイルス関連胃癌におけるLMP-2Aの関与についての病理学的検討**

氏名 市村 香代子

Epstein-Barr virus (EB ウイルス)はヒトがんウイルスの一つであり、初感染後ウイルス抗原を発現しない潜伏感染状態で維持される。EB ウイルス関連胃癌では、発現する遺伝子は EBNA-1, LMP-2A, EBER-1, EBER-2, BARF0 に限られているが、このうち、LMP-2A は PI3K/Akt 経路を活性化して細胞増殖促進やアポトーシス抑制に関与し、NF $\kappa$ B 経路を介した Survivin 発現亢進や、Stat3 活性化を介した DNMT1 発現上昇と DNA メチル化など、様々な方法で癌化に関与するとされている。我々の研究室では、LMP-2A が胃粘膜で発現するトランスジェニックマウス (LMP-2A マウス) を用いて、生体において LMP-2A 発現により腫瘍の発生や増殖が促されるか検討したが、8%の胃癌発生率に留まり、背景の炎症の不在が発生率の低さの一因ではないかと考えられた。

炎症時に発現が誘導される Cox2 (cyclooxygenase-2) やその産生物である PGE2 (prostaglandin E2) は、消化管をはじめ様々な癌で発癌を促進することが明らかになっている。マウス胃粘膜で PGE2 が発現誘導された K19-C2mE (C2mE) マウスと、Wnt1 シグナルが活性化された K19- Wnt1 (Wnt) マウスとの交配で得られた K19-C2mE/Wnt1 マウス (= Gan マウス) では 100%の確率で胃癌が発生し、炎症性胃癌モデルマウスとして広く使用されている。

本研究では EB ウイルス関連胃癌における LMP-2A の関与を検討するため、(1)炎症性胃癌モデルマウスである Gan マウスと LMP-2A が胃粘膜で発現する LMP-2A マウスとの交配により得られた、LMP-2A と PGE2 や Wnt1 を様々な組み合わせで発現する各種トランスジェニックマウスの胃粘膜を観察し、生体における LMP-2A の造腫瘍性 (tumorigenicity) について検討した。(2)さらにこれらのトランスジェニックマウスの胃粘膜を用いて LMP-2A が腫瘍発生・腫瘍増殖に関与するメカニズムについて検討を加えた。

### (1) LMP-2A 発現トランスジェニックマウスの解剖と胃粘膜の観察による LMP-2A の造腫瘍能の検討

Gan マウスと LMP-2A マウスを交配させ、得られたマウス 171 匹のうち 106 匹を生後 25 週で解剖し、胃のパラフィン固定標本を作製、HE 染色を施行して Genotype 間で所見を比較

した。内訳は LMP-2A/Gan マウス 23 匹、Gan マウス 21 匹、LMP-2A/C2mE マウス 21 匹、C2mE マウス 18 匹、LMP-2A/Wnt マウス 4 匹、Wnt マウス 6 匹、LMP-2A マウス 9 匹、WT4 匹である。また、LMP-2A/Gan マウスと Gan マウス、LMP-2A/C2mE マウスと C2mE マウスの同腹仔のペア（LMP-2A/Gan マウス 10 匹と Gan マウス 10 匹で 13 対、LMP-2A/C2mE マウス 8 匹と C2mE マウス 10 匹で 14 対）については免疫組織化学的染色（CD45, CD45R, F4/80, TFF2, Ki67）を施行し、陽性細胞数や陽性面積について同腹仔間で比較した。

まず、異型上皮の増殖からなる Dysplasia 病変を、その構造異型や細胞異型に基づいて Dysplasia グレード 0-4 までに分類する基準を作成し（グレード 0 : Dysplasia なし、グレード 1 : 軽度の異型腺管が局所的に見られる病変 グレード 2 : ヒトでいう Adenoma や Low grade dysplasia 相当の細胞異型や、やや複雑な腺管構造を呈する病変 グレード 3 : ヒトでいう上皮内癌や High grade dysplasia 相当の細胞異型や高度の構造異型を呈する病変 グレード 4 : 浸潤癌）Dysplasia グレード 2 以上を腫瘍性病変に相当するとして「腫瘍」と定義した。この基準に基づき、各個体における Dysplasia を評価し（本研究では浸潤癌は見られなかった）、腫瘍の発生率と腫瘍部の大きさ（最大断面における腫瘍部の断面積）を求めたところ、LMP-2A/C2mE マウスでは C2mE マウスと比較して発生率が有意に上昇した（C2mE マウス: 27.8%、LMP-2A/C2mE マウス: 66.6%）。また Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスではいずれもほとんどの症例に腫瘍が発生した（95.2-100%）が、LMP-2A/Gan マウスのほうが発生した腫瘍が有意に大きかった。このため、LMP-2A には造腫瘍能および腫瘍増殖促進能があると考えられた。

腫瘍の背景となる隆起性病変部は、C2mE マウスよりも LMP-2A/C2mE マウスで、また Gan マウスよりも LMP-2A/Gan マウスで有意に大きかった。また、免疫組織化学的染色による検討では、隆起性病変部におけるリンパ球・マクロファージなどの炎症細胞浸潤（CD45, CD45R, F4/80）や SPEM（TFF2）に相当する粘液細胞化生は、C2mE マウスよりも LMP-2A/C2mE マウスで高度に認められ、こうした周囲粘膜の変化や炎症細胞浸潤が、腫瘍発生と何らかの関わりをもつことが示唆された。

## (2) LMP-2A 発現トランスジェニックマウスの胃粘膜を用いた LMP-2A の造腫瘍性メカニズムの検討

解剖の結果、LMP-2A には造腫瘍能および腫瘍増殖促進能があると考えられたため、解剖時に採取した各種トランスジェニックマウスの胃粘膜（Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部粘膜と周囲体部腺粘膜）から蛋白質を抽出し、Western blotting や抗体アレイにより

LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部で上昇するシグナルを検索し、LMP-2A が腫瘍発生・腫瘍増殖に関わるメカニズムについて検討した。

まず、LMP-2A/C2mE マウスにおいて、Wnt1 が発現する Gan マウスと同様の腫瘍ができたことから、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部で Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が亢進している可能性を考え、WT マウスおよび C2mE マウスの体部腺粘膜、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの腫瘍部粘膜を用いて、 $\beta$ -catenin と非リン酸化型  $\beta$ -catenin の Western blotting を施行した (3 グループについて施行、うち 2 グループは同腹仔群)。結果、LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍部では、Gan マウス腫瘍部と同等の非リン酸化型  $\beta$ -catenin の亢進が認められた。また、WT マウス体部腺粘膜 (n=2)、および C2mE マウス (n=2)、LMP-2A/C2mE マウス (n=4)、Gan マウス (n=4) の腫瘍部と周囲体部腺粘膜を用いて Genotype 毎に施行した Western blotting では、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部において周囲体部腺粘膜よりも非リン酸化型  $\beta$ -catenin が有意に発現亢進していた。

さらに、同様に WT マウス体部腺粘膜 (n=2)、および C2mE マウス (n=2)、LMP-2A/C2mE マウス (n=3)、Gan マウス (n=3) の腫瘍部と周囲体部腺粘膜を用いて、Genotype 毎に Akt とリン酸化 Akt、MTA1、GSK3 $\beta$  とリン酸化 GSK3 $\beta$ 、Stat3 とリン酸化 Stat3、P70S6K とリン酸化 P70S6K、Erk (P42/44MAPK) とリン酸化 Erk について Western blotting を施行したところ、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部と Gan マウス腫瘍部でリン酸化 Akt が、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部で MTA1、リン酸化 Stat3 が、周囲体部腺粘膜と比較して有意に発現亢進していた。また WT マウス体部腺粘膜、および C2mE マウス、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスの腫瘍部 (各 1 例ずつ) に対して行った抗体アレイの結果、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部では EGFR と ErbB2 のリン酸化が、他のマウスと比較して顕著であり、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部と Gan マウス腫瘍部では共通して ErbB3 のリン酸化亢進が見られた。そのため、引き続き EGFR とリン酸化 EGFR について、WT マウス体部腺粘膜 (n=2)、および C2mE マウス (n=2)、LMP-2A/C2mE マウス (n=3)、Gan マウスの腫瘍部 (n=3) と周囲体部腺粘膜を用いて Western blotting を施行した結果、LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍粘膜では周囲体部腺粘膜と比較して、EGFR とリン酸化 EGFR が発現亢進する傾向が見られ、EGFR が過剰発現している可能性が示唆された。

以上の結果から、LMP-2A の造腫瘍性には Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の亢進が関与しており、その背後には LMP-2A による直接の、もしくは EGFR を介した、PI3K/Akt 経路の活性化と MTA1 の発現亢進や Stat3 の活性化が関連しているというモデルが考えられた。

本研究は、LMP-2A が発現する胃粘膜では腫瘍の発生・増殖が促進されること、またその背景として炎症の存在が重要であることを、実際に生体を用いて示した点に意義がある。また、こうした LMP-2A の造腫瘍性には Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の亢進、および PI3K/Akt 経路の活性化と MTA1 の発現亢進、Stat3 の活性化などが関与している可能性を示した。EB ウイルスは LMP-2A により細胞内シグナル分子を活性化することで発癌に寄与していると考えられているが、本研究の結果からは EB ウイルス関連胃癌においても、LMP-2A によって細胞内シグナルの異常がもたらされることが、腫瘍発生の一因となる可能性が示された。本研究では 25 週で解剖したトランスジェニックマウスに発生した胃腫瘍に対して検討を行ったが、その肉眼像・組織像はヒトの胃癌とは異なる部分もあり、結果をそのままヒトに当てはめることには議論が残る。今後は、さらに時間経過を追って腫瘍の進展を観察することや、実際に EB ウイルス関連胃癌の検体を用いて、LMP-2A の発現や本研究で検討した各種シグナルの発現について検討を進める必要がある。

また、本研究において、LMP-2A の造腫瘍能には背景の炎症が重要ということが判明したが、なぜ炎症があると LMP-2A の造腫瘍性が発揮されるのか、そのメカニズムについては追及できなかったため、今後は炎症細胞や腫瘍が産生するサイトカインとの相互作用について分子生物学的な手法も加えて検討していく必要がある。