

論文の内容の要旨

論文題目 Epstein-Barr virus が幹細胞性に与える影響と発癌への関与

氏名 沼倉里枝

背景 Epstein-Barr virus (EBV) と悪性腫瘍との関連は以前より知られてきたが、EBV 感染による発癌のメカニズムの詳細については明らかになっていない。癌幹細胞仮説は、組織幹細胞のような幹細胞様細胞が癌においても存在し発癌に重要であると考えられる。これを受けて本研究では、EBV が幹細胞様細胞を誘導するという仮説を立て、胃粘膜発癌への関与と EBV 潜伏感染遺伝子 Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) の役割について検討を加えた。

結果 EBV 感染上皮細胞の幹細胞性 EBV 感染株は Akata 細胞株との共培養によって得られた。ヒト胃上皮細胞株 (GES1) の EBV 感染株 (GES1-EBV) のクローンのうち 2 種類 (#6, #8) を実験に用いた。U 底細胞低吸着プレートでの三次元培養で得られた spheroid 形態は胃上皮細胞株 (GES1) に比べて EBV 感染株 (GES1-EBV) で複雑性を増し、それは、フラクタル次元値による定量化でも示された。Spheroid 形態は血清の影響を受け、特に無血清培地での GES1-EBV の形態は SNU719 に類似していた。コラーゲンゲルを足場とするコロニー形成能は、一部の GES1-EBV クローン (GES1-EBV(#6)) で増加した。Spheroid mRNA 由来のマイクロアレイ発現解析では、多能性誘導遺伝子の発現増加が示唆された。

EBV 感染と CD44 Spheroid mRNA 由来のマイクロアレイ発現解析で、GES1-EBV で GES1 に対し 2 倍程度増加していた遺伝子の中に、CD44 が含まれていた。Pathway 解析では基質分解系経路に対する発現増加遺伝子のエンリッチメントとともに、CD44 と Metalloproteinases (MMPs) との関連性が示唆された。単回帰分析では CD44 と多能性誘導遺伝子 KLF4 との間の正の相関関係が明らかとなった。CD44 の alternative splicing variants の中で、CD44v6 は癌との密接な関連が報告されており、かつ、EBV 関連胃癌で高発現することが示唆されていた。GES1-EBV での CD44v6 発現は、mRNA と蛋白レ

ベルの双方で増加傾向にあり、GES1-EBV の spheroid 辺縁部に発現していることが免疫染色で示唆された。フローサイトメトリー二重染色で、EBV 関連胃癌細胞株 SNU719 における CD44v6 陽性細胞は陰性細胞と比較して CD133 発現の割合が高い傾向にあった。磁気細胞分離で得られた CD44v6 陽性細胞は陰性細胞よりも足場非依存性のコロニー形成能が高いことが示された。さらに、CD44v6 陽性細胞は、ヌードマウスへの皮下移植において、一部の個体で腫瘍を形成したが、陰性細胞では腫瘍形成がみられなかった。

LMP2A と Stemness Enrichment GES1-LMP2A では、GES1-EBV でみられたのと同様の spheroid 形態変化とコロニー形成能増加の所見が得られた。CD44v6 蛋白の細胞表面における発現はわずかであったが、GES1-FLAG に対し増加傾向がうかがわれた。トランスジェニックマウス (25 週齢)では、LMP2A と炎症関連遺伝子 (COX2/mPGES1:C2mE)を共発現させた LMP2A/C2mE マウスで、前胃-腺胃境界部から腺胃近位での腫瘍形成が確認され、CD44v6 発現は C2mE マウスよりも高い傾向にあることが示された。

結論 胃上皮細胞への EBV 感染に伴い、Spheroid 形態の変化やコロニー形成の増加、CD44v6 の発現増加などの変化がみられ、EBV 感染による癌幹細胞様細胞の誘導の可能性が示された。また、この誘導作用に LMP2A の関与があることが示唆され、さらに、炎症の存在で腫瘍形成を促進する可能性が考えられた。以上の結果は、EBV 感染からの胃粘膜発癌を支持するものと考えられた。