

審査の結果の要旨

氏名 沼倉里枝

本研究は、癌幹細胞仮説の観点から、Epstein-Barr virus (EBV) が胃上皮に対して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ものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。
2. Type 1 コラーゲンを足場とする colony formation assay では、GES1-EBV のクローン株のうち、GES1-EBV (#6) で GES1 に対し有意なコロニー数の増加がみられた。
3. GES1、GES1-EBV の spheroid 由来 mRNA に対するマイクロアレイ発現解析では、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。Reactome 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。
4. RT-qPCR と Western Blot で、GES1-EBV での CD44v6 発現は増加傾向にあることがわかった。また、CD44v6 は 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。
5. 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。
6. EBV 潜伏感染遺伝子 LMP2A を lipofection 法によりプラスミド導入した GES1 細胞株 (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。

7. 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。LMP2A/C2mE マウスでは他のトランスジェニックマウスに比べて組織学的炎症の頻度が高い傾向がうかがわれた。

以上、本論文は EBV 感染胃上皮細胞株での幹細胞性の変化と CD44v6 発現を検討することにより、EBV 感染による幹細胞様細胞の誘導、ならびに、発癌に関与する可能性を見出した。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。本研究は、EBV 感染からの胃粘膜発癌を支持するものであり、EBV 関連胃癌の発癌機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。