

## 論文内容の要旨

論文題目 EB ウイルス関連胃癌の分子生物学的・病理学的検討・胃癌細胞を用いた EB ウイルスによる細胞死抑制

指導教員 深山正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 日野るみ

<序論> Epstein-Barr virus (EB ウイルス) は、1964年バーキットリンパ腫の癌細胞中から発見され、ヒトから分離された初めてののがんウイルスとして注目された。1980年代後半からバーキットリンパ腫、上咽頭癌以外の癌と EB ウイルスとの関連が次々と報告された。1990年以降、PCR (polymerase chain reaction)法、さらに *in situ* hybridization (ISH)法による検索により、EB ウイルスが一部の胃癌の中に存在する事が証明され、EB ウイルス関連胃癌として注目されるようになった。各国での報告によると、EB ウイルス関連胃癌は胃癌全体の5~18%とされている。本邦でも胃癌全体の約10%にEB ウイルスが関連していると報告されており、年間約5000例発生していると推定されている。

EB ウイルス関連胃癌は一般の胃癌と比較して、男性に多く、噴門部から体上部の胃底腺領域に多い。癌および周囲にリンパ球浸潤が多いことを反映し、内視鏡的には表面が陥凹、境界不明瞭で分厚い病変が多い。組織学的にEB ウイルス関連胃癌は、低分化ないし中分化

型腺癌の組織像をとり、リンパ球浸潤を伴う症例が多い。この様にEBウイルス胃癌は、胃癌の中でも臨床的・病理学的に特異な一群を形成しており、そのその発癌機構、癌維持機構、悪性化に独自のものがあることが予想される。しかし、EBウイルスの胃上皮細胞への進入経路、発癌機構、癌維持機構、悪性化などに関して、詳細はあまり解明されておらず、分子生物学的検討の余地が多く残されている。

<目的>本研究では、EBウイルス関連胃癌でのEBウイルスの役割を明らかにすべく、培養細胞株を用いて検索した。EBウイルスの感染の有無での胃癌細胞株の生物学的検討をすることにより、EBウイルスが胃癌細胞株に及ぼす影響を検討した。その生物学的検討から得られた結果をもとに、分子生物学的検討、病理組織学的検討を加え、EBウイルスの胃癌における役割を解明しようと試みた。

<材料と方法>材料として、ヒト胃癌細胞株6種(MKN-1, MKN-7, MKN-74, NU-GC-3, TMK1, AGS)と、それらのEBウイルス持続感染株を用いた。手術材料として、東京大学医学部附属病院で外科的に切除されたEBウイルス関連胃癌27例、EBウイルス非関連胃癌90例、計117例を用いた。生物学的検索方法としては、MTT法、TUNEL法、wounding assay、matrigel invasion assayを用いた。その結果をもとに、さらに網羅的遺伝子発現解析、western blotting、quantitative real time RT-PCR、EBウイルス関連蛋白発現細胞株での検索、RNAi、免疫組織化学的染色、methylation specific PCR(MSP)法を用いて検討した。

<結果>生物学的検討結果として、定常状態の培養条件(FCS10%)では、EBウイルス持続感染細胞と元細胞株との間に有意な違いがなかった。しかし、FCS濃度を減少させ、特にFCS0%では、EBウイルス持続感染細胞と元の細胞株との間に顕著な違いが出現した。MTT法では、FCS0%条件(serum deprivation状態)下で、MKN-1, AGS, NU-GC-3においてEBウイルス持続感染細胞の方が、元の細胞株より有意に増殖率が高かった(各P=0.0447, 0.0339, <0.0001)。TUNEL法で、MKN-1, TMK1においてEBウイルス持続感染細胞の方

が元細胞株より有意に陽性細胞が少なかった(各  $P=0.0033, 0.0151$ )。Wounding assay では、MKN-1、MKN-7、NU-GC-3 において、EB ウイルス持続感染細胞の方が元の細胞株より細胞の伸び出しが有意に大きかった(各  $P=0.0323, 0.0480, 0.0031$ )。

生物学的検討において、EB ウイルス持続感染細胞が元の細胞株に対して、低栄養条件下で、増殖能、移動能が亢進し、抗アポトーシス現象を有意に生じていたが、6種の胃癌細胞株の中で、その3点ともすべてに有意差を示していたのは、MKN-1であった。そこでMKN-1について、低栄養条件(FCS0%)で96時間培養した状態のものについてAffymetrix社のGeneChip(網羅的遺伝子発現解析)によって解析した。抗アポトーシス関連遺伝子で、EB ウイルス持続感染細胞が元の細胞株と比較して、有意に発現が多かった遺伝子の中で特に*survivin*についてさらに分子生物学的に検索した。GeneChipにおける*survivin*の結果は、quantitative real time RT-PCRにおいても再現性が確認された。さらに*survivin*に対するsiRNAでEB ウイルス持続感染細胞における*survivin*発現を抑制することで、TUNEL陽性細胞の数が格段に増加し、ほとんど元細胞株と同じような状態にまでなった。Survivinを発現させる責任遺伝子はEB ウイルスの潜伏感染type Iに関連した遺伝子(EBNA1, EBER1, BARF0)の中では明らかにならなかった。手術切除検体を用いた免疫組織化学的検索において、進行癌では、EB ウイルス関連胃癌が陰性胃癌に対して、*survivin*の陽性率が有意に高かった( $P=0.0307$ )。

<考察>生物学的検討結果から、EB ウイルス持続感染胃癌細胞では、低栄養条件下で元の細胞株より優位に増殖し、移動し、アポトーシス抵抗性を生じることがわかった。この違いについて明らかにすることは、胃癌におけるEB ウイルスのこれまであまり分かっていない役割を解明する手がかりになると考えた。特にアポトーシス抵抗性については、これまで報告されているEB ウイルス関連胃癌の手術検体を用いたアポトーシスに関する結果、すなわち、EB ウイルス関連胃癌は陰性胃癌に対してアポトーシスが有意に低率であるという結果をよく再現していると考え、その機構解明を重要な課題としてさらに本研究を進めていっ

た。SurvivinはIAP familyの一つで、抗アポトーシス効果をもつ代表的な遺伝子である。GeneChip や quantitative real time RTPCR で、EB ウイルス持続感染細胞と元細胞株間において survivin 発現の差がみられており、serum deprivation 72~96 時間では、EB ウイルス持続感染細胞は元細胞に対して 12~25 倍の発現の差を生じた。このことから、EB ウイルス持続感染細胞における serum deprivation 誘導性アポトーシスへの抵抗性に関して、survivin はかなり重要な位置を占めることが予想された。RNAi で survivin を抑制した時にみられた、EB ウイルス持続感染胃癌細胞でのアポトーシス抵抗性の減少は、survivin とアポトーシスの関係を明らかにしただけでなく、MKN-1 の EB ウイルス持続感染胃癌細胞株において survivin は抗アポトーシス作用の中心的役割を果たしていると考えられた。さらにこのことは、survivin の発現が高値である EB ウイルス関連胃癌に survivin を標的とした治療の可能性を示した。Survivin は腫瘍特異的に発現していることから、すでに他の腫瘍において、治療に向けての研究が精力的に進んでいる。現段階では、抗 survivin 効果を期待して、オリゴヌクレオチドや細胞周期を阻害する flavopiridol を用いた治療が、アメリカの臨床試験 phase I または II の段階まできている。EB ウイルス関連胃癌にもこれらの治療法が応用できる可能性がある。Survivin の発現に関わる EB ウイルス関連蛋白および RNA の検索では、EBNA1, BARF0, EBER1 の 3 者とも serum deprivation 条件下での survivin の発現には関与していないという結果になった。EB ウイルス関連腫瘍である鼻咽頭癌で、ウイルス蛋白である LMP1 が survivin の発現を制御しているという報告もみられる。しかし、EB ウイルス関連胃癌では LMP1 は発現しない潜伏感染状態 Latency I をとり、本研究で用いた EB ウイルス胃癌細胞株である MKN-1 においても LMP1 の発現は見られなかった。Survivin の発現に関する機構の解明が課題となった。EB ウイルス関連蛋白手術切除検体を用いた免疫組織化学的検索から、EB ウイルス関連胃癌の進行に survivin の発現が関連していることが予想された。

<まとめ> 生物学的検討において、EB ウイルス持続感染細胞株が元の細胞株に対して

serum deprivation 条件下で、増殖能、移動能が亢進し、アポトーシス抵抗性を生じていることが分かった。アポトーシス抵抗性についてさらに分子生物学的に検索した。Serum deprivation 条件下、元細胞での survivin の発現は減少していくのに対し、EB ウイルス持続感染細胞は survivin の発現が維持されていた。結果として、EB ウイルス持続感染細胞株と元細胞株間で、survivin の発現に有意な差がみられた。RNAi で survivin を抑制した時にアポトーシス陽性細胞数の増加がみられた。手術切除検体を用いた免疫組織化学的検索では、進行癌に関して、EB ウイルス関連胃癌が陰性胃癌に対して、survivin の発現頻度が有意に高かった。このことや、前述の培養細胞を用いた研究から、EB ウイルス関連胃癌の進行または悪性化に survivin の発現が強く関係していると考えられた。また、EB ウイルス関連胃癌の中で進行癌が survivin を標的とした治療の対象となりうると考えられた。今後はこの治療の可能性を追求するほか、EB ウイルス関連胃癌での survivin の発現に関する機構の解明が課題と考えている。