

氏名(生年月日) ^{もり} ^{ぐち} ^み ^{さと}
森 口 美 里 (1992年11月8日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第205号

学位授与の日付 2021年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 カプサイシンによるMAPKシグナル抑制とATF4翻訳促進を介した原発性
体腔液性リンパ腫細胞の増殖抑制

論文審査委員 (主査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 加藤 伸一

(副査) 教授 西口 工司

論文内容の要旨

序章

原発性体腔液性リンパ腫(PEL)はエイズ関連リンパ腫の一つであり、大細胞型B細胞腫瘍である。PELの標準治療として、ドキソルビシンとビンクリスチン、シクロフォスファミド、プレドニゾロンの併用療法が行われているが予後が悪く、新規治療薬の開発が求められている。PELはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)の感染により引き起こされる。KSHVはγ-ヘルペスウイルス亜科に属する2本鎖DNAウイルスである。KSHVはエイズ発症や免疫抑制剤の投与により宿主が免疫不全状態に陥るとPELや血管内皮由来腫瘍のカポジ肉腫、リンパ増殖性疾患であるキャッスルマン病(MCD)を引き起こす。潜伏感染期のKSHVはLANAやv-FLIP、v-Cyclinなど少数のウイルスタンパク質を発現し、ERKやp38MAPK、Wnt、NF-κB、JAK-STATシグナルおよびIL-6やIL-10、VEGF-Aなどのサイトカイン産生を活性化させる。KSHVはこれら細胞内シグナルやサイトカイン産生の脱制御により宿主細胞の不死化や増殖を引き起こし、悪性形質を維持させる。一方、サイトカインやホルボールエステルなどの刺激によりKSHV感染細胞は溶解感染期に移行し、K-bZIPやRTAなどウイルス性転写因子を発現する。これらウイルス性転写因子はウイルスタンパク質合成やウイルスゲノム複製を開始させる。

カプサイシンは*Capsicum annuum* L.などトウガラシ属の果実に含まれる辛味成分であり、神経障害性疼痛の抑制に用いられている。カプサイシンはカルシウム(Ca²⁺)チャネルTRPV1活性化作用に加え、WntやNF-κBシグナルの抑制など多彩な細胞内シグナルに影響を及ぼすことが報告されている。本研究では植物由来化合物の多様な薬理作用に着目し、各種植物由来化合物のPEL細胞に対する増殖抑制効果を評価した。その中でカプサイシンが増殖抑制効果を示したため、その作用機序を解析した。

第1章 カプサイシンによるPEL増殖阻害とERKおよびp38MAPKシグナルの抑制

増殖抑制効果の解析にはKSHV感染PEL細胞株(BCBL1、BC2、BC3、HBL6、JSC1)および比較対象としてKSHV非感染Bリンパ細胞株(Ramos、Raji、DG75)を用いた。各細胞培養液へのカプサイシン添加は、KSHV非感染細胞に比べPELの増殖を抑制した。次に、カプサイシン処理したPEL細胞をSCIDマウスの腹腔に移植し、カプサイシンのPEL増殖抑制効果を評価した。その結果、カプサイシン処理は溶媒(DMSO)処理に比べマウス腹腔内でのPEL細胞の増殖を抑制した。

カプサイシンは KSHV 感染により活性化あるいは抑制される細胞内シグナルを標的にしていると推察し、KSHV 感染により脱制御される Wnt、NF- κ B、JAK-STAT、MAPK などのシグナルについて解析した。その結果、カプサイシンは ERK と p38 MAPK のリン酸化を抑制し、ERK シグナルと p38 MAPK シグナルの特異的阻害剤がカプサイシン同様に PEL の増殖を抑制した。KSHV は IL-6 や IL-10、VEGF-A など一部のサイトカイン産生を増加させ、PEL の増殖に利用する。また、KSHV 感染は ERK や p38 MAPK シグナルを活性化させ、IL-6 産生量を増加させることが報告されている。そこで、IL-6 と IL-10、VEGF-A の mRNA 発現量を調べた結果、カプサイシンは IL-10 と VEGF-A の産生は抑制しなかったが、IL-6 の mRNA 発現を抑制した。また、ERK シグナルと p38 MAPK シグナルの特異的阻害剤はカプサイシンと同様に IL-6 の mRNA 発現を抑制し、IL-6 中和抗体は PEL の増殖を抑制した。以上の結果から、カプサイシンは ERK シグナルと p38 MAPK シグナルの阻害を通して IL-6 の発現も抑制し、PEL 増殖を抑制すると考えられる。

PEL 増殖抑制効果を示す化合物には KSHV の溶解感染誘導能を持つものもある。そこで、カプサイシン処理が新規ウイルス産生に影響するか否か解析した。その結果、カプサイシン処理は KSHV 溶解感染を誘導しなかった。以上の結果から、カプサイシンは新規のウイルス産生を伴わずに PEL 増殖を抑制することが示唆された。

第2章 カプサイシンによる ATF4-CHOP 経路の活性化

先行研究により PEL 細胞では小胞体ストレス応答の一部が抑制されており、小胞体ストレス応答誘導剤が PEL 細胞の増殖を抑制することが明らかとなっている。そこで、カプサイシンが小胞体ストレス応答を活性化するか否か RT-リアルタイム PCR 法で解析を行った。その結果、小胞体ストレス応答により発現上昇する BiP や XBP1 のスプライシング亢進は見られなかったが、アポトーシスを促進する転写因子 CHOP や、CHOP により転写が促進されるアポトーシス誘導性 Bcl ファミリーの PUMA 発現が増加した。哺乳動物細胞の CHOP 発現制御は主に転写因子 ATF6 と ATF4 を介して行われる。ATF6 は II 型の膜貫通タンパク質で小胞体膜上に存在し、小胞体ストレスを感知するとゴルジ体に移行してプロテアーゼ S1P と S2P により切断され、細胞質側の断片が転写因子として働く。一方で、ATF4 は非ストレス下では mRNA は豊富に存在するが翻訳がほとんど行われず、アミノ酸飢餓や酸化ストレス、小胞体ストレスなどのストレスにより細胞内タンパク質の翻訳が低下すると ATF4 の翻訳が促進すると考えられている。カプサイシン処理では ATF6 が結合するプロモーターの転写活性化は見られなかった。一方で、カプサイシン処理は ATF4 タンパク質の発現を増加させた。また、翻訳阻害剤シクロヘキシミドはカプサイシン処理による ATF4 タンパク質の発現を阻害したが、転写阻害剤アクチノマイシンでは阻害されなかった。以上の結果より、ATF4-CHOP 経路の活性化はカプサイシンによる PEL 増殖抑制のメカニズムの一つと考えられる。

総括

本研究により、カプサイシンが PEL 細胞の増殖を抑制し、その作用機序は KSHV 感染により活性化される ERK と p38 MAPK シグナルの抑制および IL-6 発現低下であることが明らかとなった。さらに、カプサイシン処理は ATF4 翻訳を促進し、アポトーシス促進性転写因子 CHOP の発現を誘導することが明らかとなった。

以上の結果から、カプサイシンは KSHV 感染が脱制御する細胞内シグナルを是正し、またストレス応答を惹起することで PEL 細胞特異的な増殖抑制効果を示すと考えられる。本研究によりカプサイシンが持つ PEL 増殖抑制機構の一端が明らかとなった。

審査の結果の要旨

《緒言》

原発性体腔液性リンパ腫（PEL）はエイズ関連リンパ腫の一つであり、B細胞性リンパ腫である。現行の抗がん剤併用療法は予後が悪く、PELに対する新規治療薬の開発が求められている。また、PELはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）の感染により引き起こされる。KSHVはγ-ヘルペスウイルス亜科に属するDNAウイルスである。カプサイシンはトウガラシ属の果実に含まれる辛味成分であり、神経障害性疼痛の抑制に用いられている。カプサイシンはカルシウムチャンネルTRPV1活性化作用に加え、細胞内シグナルに影響を及ぼすことが報告されている。本研究ではカプサイシンがPEL細胞に対する増殖抑制効果を示すこと、さらにその作用機序を明らかにした。

《審査結果の要旨》

第1章では、カプサイシンによるPEL細胞の増殖阻害と、その増殖阻害がカプサイシンによるPEL細胞内のERKおよびp38 MAPKシグナルの抑制に起因していることを明らかにした。細胞培養液へのカプサイシン添加は、KSHV非感染B細胞株に比べPEL細胞株の増殖を有意に抑制することを見出した。さらに、カプサイシン処理はPEL細胞内で活性化しているERKとp38 MAPKシグナル経路を抑制した。KSHVはPEL細胞のERKやp38 MAPKシグナルを活性化することでPEL細胞にIL-6産生を促し、オートクライン的にIL-6はPEL細胞の増殖を亢進することが報告されている。そこで、カプサイシンによるPEL細胞でのサイトカイン発現への影響を解析した結果、カプサイシン処理はIL-6の発現を抑制した。また、ERKシグナルとp38 MAPKシグナルの特異的阻害剤はカプサイシンと同様にIL-6の発現とPEL細胞の増殖を抑制した。また、IL-6中和抗体はPELの増殖を抑制した。

第2章では、カプサイシンはPEL細胞内のATF4-CHOP経路の活性化することでPEL細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。先行研究により、小胞体ストレス誘導剤がPEL細胞の増殖を抑制することが報告されている。そこで、カプサイシンが小胞体ストレス応答を惹起するか否かを解析した。その結果、カプサイシンはPEL細胞内の転写因子CHOPと、CHOPの標的遺伝子であるアポトーシス誘導性BclファミリーPUMAの発現を増加させた。CHOPの遺伝子発現は転写因子ATF6とATF4を介して行われることから、カプサイシン処理がATF6とATF4へ与える影響を解析した。その結果、カプサイシンはATF6には影響をおよぼさず、ATF4タンパク質の翻訳を亢進した。

なお、副査と主査からのコメントと質疑に対して、申請者は本論文に補足説明や新たな考察を加える、適切な表現への訂正、過大解釈や過大表現の訂正、詳細な実験条件を追記する等により、本論文を適切に修正した。

《結論》

本研究により、カプサイシンがPEL細胞の増殖を抑制し、その作用機序はカプサイシンによるERKとp38 MAPKシグナルの抑制およびIL-6発現低下であることが明らかとなった。さらに、カプサイシンはATF4翻訳促進によるCHOPの発現とアポトーシスを誘導することが明らかとなった。これらの研究成果は、PELのみならずKSHV関連腫瘍を標的とした抗腫瘍薬開発に貢献するものであると言える。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。