

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

2020 年度

京都薬科大学大学院 博士課程学位論文

【薬学】細胞生物学分野

森口 美里

## 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程：薬学専攻博士課程

氏名（英字名）：森口美里（Misato Moriguchi）

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

### 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 $\gamma$ -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 p38 MAPK、Wnt、NF- $\kappa$ B、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( $\text{Ca}^{2+}$ )チャネル TRPV1 活性化作用に加え、Wnt や NF- $\kappa$ B 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 p38 MAPK 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- $\kappa$ 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を解析した。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を 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 の翻訳が促進され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。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可済みである。

1. Moriguchi M, Watanabe T, Kadota A, Fujimuro M. Capsaicin induces apoptosis in KSHV-positive primary effusion lymphoma by suppressing ERK and p38 MAPK signaling and IL-6 expression. *Front. Oncol.* **2019**, 9, 83, doi: 10.3389/fonc.2019.00083.

2. Moriguchi M, Watanabe

T, Fujimuro M. Capsaicin induces ATF4 translation with upregulation of CHOP, GADD34 and PUMA. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432

## 目次

略語	
試薬と社名	
序論	1
第 1 章	
カプサイシンによる PEL 増殖阻害と ERK および p38 MAPK シグナルの抑制	5
1-1. はじめに	5
1-2. 材料と方法	7
1-2-1. 試薬調整	8
1-2-2. 細胞培養	8
1-2-3. 細胞増殖アッセイ	8
1-2-4. 軟寒天コロニー形成アッセイ	8
1-2-5. 細胞内 Ca <sup>2+</sup> 量変化の測定	9
1-2-6. ウェスタンブロット解析	9
1-2-7. 細胞分画	11
1-2-8. Total RNA 抽出と逆転写反応	12
1-2-9. リアルタイム PCR 法	12
1-2-10. Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量	13
1-2-11. 動物実験	13
1-2-12. 蛍光抗体染色による KSHV タンパク質の検出	13
1-2-13. 統計処理	14
1-2-14. CC <sub>50</sub> 値の算出法	14
1-3. 結果	15
1-3-1. カプサイシンによる PEL 細胞の増殖阻害	15
1-3-2. B リンパ腫の TRPV1 発現状態とカプサイシン処理による細胞内 Ca <sup>2+</sup> 量の解析	18
1-3-3. カプサイシンによる ERK リン酸化の抑制	21
1-3-4. カプサイシンによる p38 MAPK リン酸化の抑制	23
1-3-5. カプサイシンによる IL-6 の発現抑制	25
1-3-6. カプサイシン処理が KSHV 溶解感染期におよぼす影響	29
1-4. 考察	30
1-5. 小括	36
第 2 章	
カプサイシンによる ATF4-CHOP 経路の活性化	37
2-1. はじめに	37
2-2. 材料と方法	38
2-2-1. 試薬調整と抗体	38
2-2-2. 細胞の継代	38

2-2-3. ウェスタンブロット解析	39
2-2-4. カスパーゼのタンパク質切断活性測定	39
2-2-5. RT-PCR 法による遺伝子発現解析	39
2-2-6. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)	40
2-2-7. レポーターアッセイ	40
2-2-8. プラスミド	42
2-2-9. プラスミド精製	42
2-2-10. 統計処理	42
2-3. 結果	43
2-3-1. カプサイシン処理による PEL 細胞のアポトーシス誘導	43
2-3-2. カプサイシン処理による CHOP 発現上昇	45
2-3-3. カプサイシン処理による ATF4 翻訳促進	45
2-3-4. カプサイシン処理によるアポトーシス誘導性 Bcl ファミリーの PUMA 発現増加	49
2-3-5. カプサイシン処理の小胞体ストレス応答への影響	49
2-4. 考察	52
2-5. 小括	55
総括	56
謝辞	57
引用文献	58

## 略語

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ANOVA	Analyses of variance
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ATF	Activating transcription factor
ART	antiretroviral therapy
BD	BD Biosciences
BES	N, N-Bis (2-hydroxyethyl) -2-aminoethanesulfonic acid
Bip	Ig binding protein
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein homologues protein
CHX	Cycloheximide
CMV	cytomegalovirus
CST	Cell Signaling Technology
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNase	Deoxy ribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2	Eukaryotic Initiation Factor 2
ER	Endoplasmic Reticulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FLIP	FLICE-Inhibitory Protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
GRP	Glucose regulated protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HHV	Human herpesvirus
HRP	horseradish peroxidase
HSV	Herpes simplex virus
IgG	Immunoglobulin G
I $\kappa$ B $\alpha$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	interleukin
KS	Kaposi's sarcoma
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

LANA	The latency-associated nuclear antigen
MAPK	mitogen-activated protein kinase
2-ME	2-mercaptoethanol
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS-T	0.1% Tween20-PBS
PEL	Primary effusion lymphoma
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RT	Reverse transcription
NaB	Sodium butyrate
SC	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tg	Thapsigargin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
TRPV1	Transient receptor potential V1
UPR	Unfolded protein response
VEGF	endothelial growth factor
XBP1	X-box binding protein 1

試薬

Ampicillin  
 Anti-mouse antibody HRP  
 APS  
 BES  
 CaCl<sub>2</sub>  
 Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution  
 Caspase Glo™ Reagent  
 Cycloheximide  
 DMEM  
 DMSO  
 EDTA  
 Fura-2 AM Calcium Kit

社名

ナカライテスク  
 GE ヘルスケア  
 ナカライテスク  
 同仁化学研究所  
 ナカライテスク  
 東洋紡  
 Promega  
 富士フィルム和光純薬  
 ナカライテスク  
 富士フィルム和光純薬  
 ナカライテスク  
 Dojindo



HBSS (+) without Phenol Red	富士フィルム和光純薬
HCl	富士フィルム和光純薬
Histopaque®-1083	Sigma-Aldrich
LB 培地	ナカライテスク
NaCl	ナカライテスク
NaOH	ナカライテスク
Pepstatin	ナカライテスク
PMSF	ナカライテスク
PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
RNase	ナカライテスク
RPMI1640	ナカライテスク
SDS	ナカライテスク
TEMED	ナカライテスク
Tris	ナカライテスク
Triton X-100	ナカライテスク
Trypsin	ナカライテスク
Tween-20	ナカライテスク
アクチノマイシン	ナカライテスク
イソプロパノール	富士フィルム和光純薬
エタノール	ナカライテスク
エチジウムブロマイド	ナカライテスク
カプサイシン	富士フィルム和光純薬
クロロホルム	富士フィルム和光純薬
酢酸	ナカライテスク
酢酸カリウム	ナカライテスク
制限酵素類	タカラバイオ
ニトロセルロース膜	富士フィルム和光純薬
メタノール	富士フィルム和光純薬
2-メルカプトエタノール	富士フィルム和光純薬

## 序論

2019年のHIV感染者は世界中で3800万人にのぼり<sup>1)</sup>、我が国でも1400人の感染者が報告されている<sup>2)</sup>。エイズ関連死は2005年の170万人から70万人と減少傾向にあり<sup>1)</sup>、抗レトロウイルス療法(ART)によりエイズ発症を防ぐことでHIVとの共存が可能となりつつある。一方で、HIV感染症の根治療法は未だ確立されておらず、世界経済悪化による薬価高騰<sup>1)</sup>や災害など不測の事態によるART中断のリスク<sup>3)</sup>も存在することから、エイズ関連死を防ぐためにはエイズ関連疾患の病態解明や治療薬開発を継続しなければならない。

Table.1 世界のエイズ感染者の年次推移<sup>1)</sup>

	2000	2005	2010	2015
HIV 陽性者	2400 万人	2730 万人	3070 万人	3490 万人
HIV 新規感染者	270 万人	240 万人	210 万人	190 万人
エイズによる死亡	140 万人	170 万人	110 万人	83 万人
ART を受けている人	59 万人	200 万人	780 万人	1720 万人

	2016	2017	2018	2019
HIV 陽性者	3570 万人	3650 万人	3730 万人	3800 万人
HIV 新規感染者	180 万人	180 万人	170 万人	170 万人
エイズによる死亡	80 万人	76 万人	73 万人	69 万人
ART を受けている人	1930 万人	2150 万人	2310 万人	2540 万人

原発性体腔液性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma; PEL)はエイズ発症に伴う大細胞型 B 細胞性腫瘍で、滲出液中に存在する<sup>4,5)</sup>。エイズ関連リンパ腫の数%を占める稀な疾患であるが、無治療の生存期間の中央値は数ヶ月と急激な臨床経過をたどる<sup>6)</sup>。呼吸困難や腹部膨満など胸水や腹水、心嚢水の貯留による症状を呈し、発症部位は胸水が多く、腫瘍細胞は原発した体腔に局在することが多い<sup>6)</sup>。また、発症者の約半数は血管内皮腫であるカポジ肉腫 (KS)との合併症が見られる<sup>6)</sup>。CD45 陽性であるが CD19、CD79a などの汎 B 細胞マーカーや細胞表面と細胞質の免疫グロブリンは陰性であり、CD20 も陰性であることが多い<sup>6)</sup>。標準治療としてシクロフォスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンを併用する CHOP 療法<sup>7,8)</sup>、あるいは CD20 陽性の場合にはリツキシマブを組み合わせた R-CHOP 療法が行われている<sup>9)</sup>。しかし、その 1 年生存率は約 40%と予後が悪く<sup>8)</sup>、新規 PEL 治療薬の開発が求められている。そこで、本研究では新規 PEL 治療薬の探索を目的として研究を行った。

PEL はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV)感染により引き起こされる。KSHV はエイズに合併した KS から発見されたヒトヘルペスウイ

ルスである<sup>10)</sup>。8番目に見つかったヒトヘルペスウイルスということで、8型ヒトヘルペスウイルス (Human herpesvirus-8; HHV8)とも呼ばれる。ヒトヘルペスウイルスの名称と分類をTable 2に示す<sup>11)</sup>。KSHVはバーキットリンパ腫の原因ウイルスEBVと同様に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。単純ヘルペスウイルスなど他のヘルペスウイルスについては日本人ではほとんどの健常成人が既感染であるのに対し、KSHVの健常者への既感染割合はアフリカ諸国で40-50%、我が国では5%以下と地域によって大きく異なる<sup>11)</sup>。

Table.2 ヒトヘルペスウイルスの名称と分類<sup>11)</sup>

型	亜科	和名	英文名 (略語)	関連疾患	日本の陽性率 (健常者)
1	α	単純ヘルペスウイルス-1	Herpes simplex virus-1 (HSV-1)	口唇ヘルペスなど	30-80%
2	α	単純ヘルペスウイルス-2	Herpes simplex virus-2	性器ヘルペスなど	30-80%
3	α	水痘・带状疱疹ウイルス	Varicella-zoster virus	水痘、带状疱疹	>95%
4	γ	エプスタイン・バーウイルス	Epstein-Barr virus	バーキットリンパ腫、胃癌など	>95%
5	β	サイトメガロウイルス	Cytomegarovirus (CMV)	肺炎、結膜炎、副腎炎、消化性潰瘍など	>90-70%
6	β	ヒトヘルペスウイルス-6	Human herpesvirus-6 (HHV-6)	突発性発疹	>95%
7	β	ヒトヘルペスウイルス-7	Human herpesvirus-7 (HHV-7)	突発性発疹	>95%
8	γ	ヒトヘルペスウイルス-8 もしくは カポジ肉腫関連 ヘルペスウイルス	Human herpesvirus-8 (HHV-8) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)	KS PEL キャッスルマン病	<5%

KSHVは他のヘルペスウイルスと同様に初感染後は深刻な疾患を引き起こさず潜伏感染期に移行し、Latency-associated nuclear antigen (LANA)を介してKSHVゲノムと宿主ゲノムをつなぎとめることで細胞分裂時に娘細胞へKSHVゲノムを分配する<sup>12)</sup>。そして、数十年あるいは

生涯に渡って宿主細胞に KSHV ゲノムを保持させる。そして、宿主がエイズ発症や臓器移植に伴う免疫抑制剤の使用により免疫不全状態に陥ると PEL や KS、リンパ増殖性疾患のキャッスルマン病といった疾患を引き起こす。KSHV は全長約 170kpb の遺伝子を持ち、約 90 の Open reading frame (ORF)を持つ (Figure 1)<sup>13)</sup>。KSHV は DNA 合成やカプシド、スパイクタンパク質といった構造タンパク質などウイルス産生に必要な遺伝子に加え、細胞増殖、アポトーシス、免疫シグナルに関与するヒト遺伝子のホモログを有している。KSHV はヒト B 細胞に潜伏感染し、LANA<sup>14)</sup>や viral FADD-like interleukin-1-beta-converting enzyme/caspase-8-inhibitory protein (vFLIP)、vCyclin、K12 など少数のウイルスタンパク質を発現し<sup>15-17)</sup> Wnt や JAK-STAT、NF-κB、Akt、ERK、p38 MAPK シグナルなどの活性化<sup>18-27)</sup> や interelukin-6 (IL-6)、IL-10、vascular endothelial growth factor (VEGF)などサイトカイン産生の亢進<sup>23, 26, 28-30)</sup> により宿主細胞の生存と増殖を促進させる (Figure 2)。

また、がん抑制因子 p 53 の機能抑制<sup>31, 32)</sup>やアポトーシス抑制<sup>15, 33)</sup>により細胞を不死化させる。

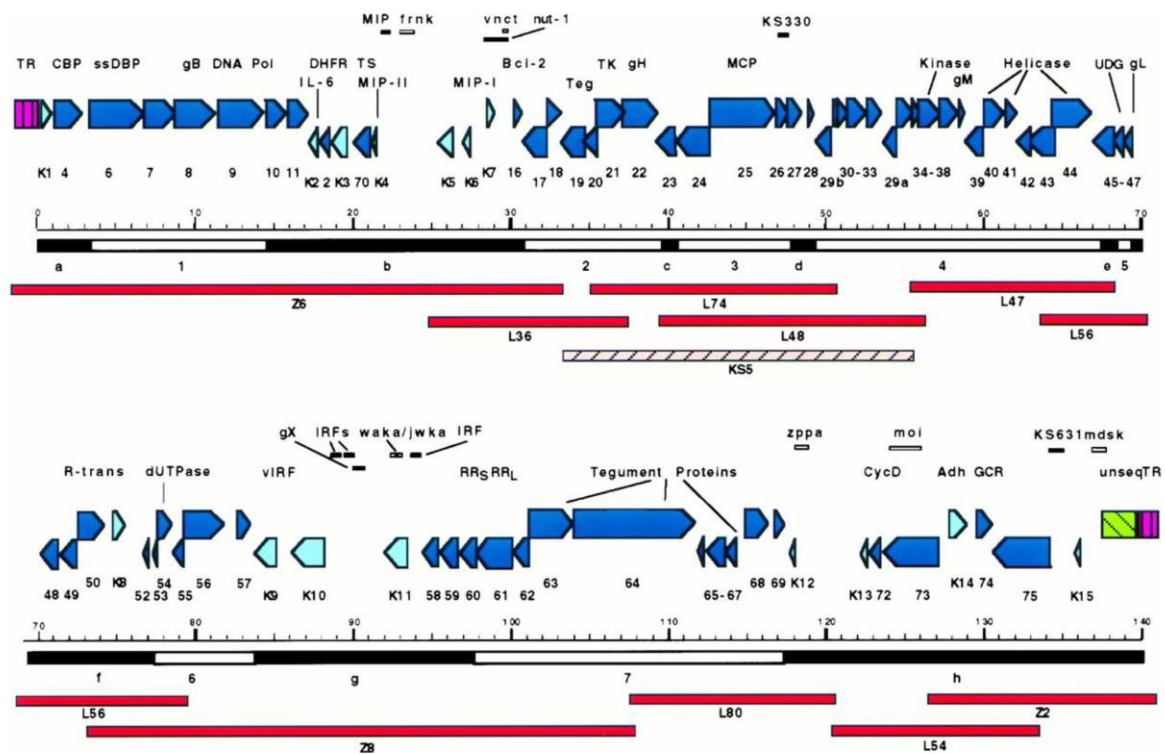


Figure 1 KSHV のゲノム情報

各 ORF の配向性は矢印の方向で示されている。リスザルヘルペスウイルスのホモログ ORF はダークブルー、ホモログでない ORF はライトブルーで着色されている。kb マーカー下の数字が割り当てられた部位はヘルペスウイルスにおいて保存された領域で、アルファベットが割り当てられた部位は保存されていない領域を示している。その下の赤いバーは配列決定時に用いられたベクターを示している。

図は、Russo J.J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1996, 93, の Fig. 1 を引用した<sup>13)</sup>。

潜伏感染期の KSHV は少数のウイルスタンパク質のみを発現するが<sup>34)</sup>、溶解感染期に移行するとウイルス性転写因子 RTA<sup>35-37)</sup>や K-bZIP<sup>37-39)</sup>を発現させ、ゲノム複製や viral IL-6 (vIL-6)<sup>37, 40, 41)</sup>、viral G protein-coupled receptor (vGPCR)<sup>37, 42)</sup>など溶解感染期遺伝子の発現を開始させる。

本研究のテーマである新規 PEL 治療薬探索にあたって、植物由来化合物に着目した。その理由は、近年植物から多彩な薬理作用を持つ低分子化合物が見出されており、植物由来化合物をリード化合物とした抗腫瘍薬開発も活発に行われているためである。新規 PEL 治療薬の候補として選定した 21 種類の植物由来化合物のうち唐辛子の辛味成分カプサイシンがユニークな薬理作用を示すことを見出した。そこで、本研究ではカプサイシンによる PEL 細胞の増殖抑制効果とその作用機序の解析を行った。

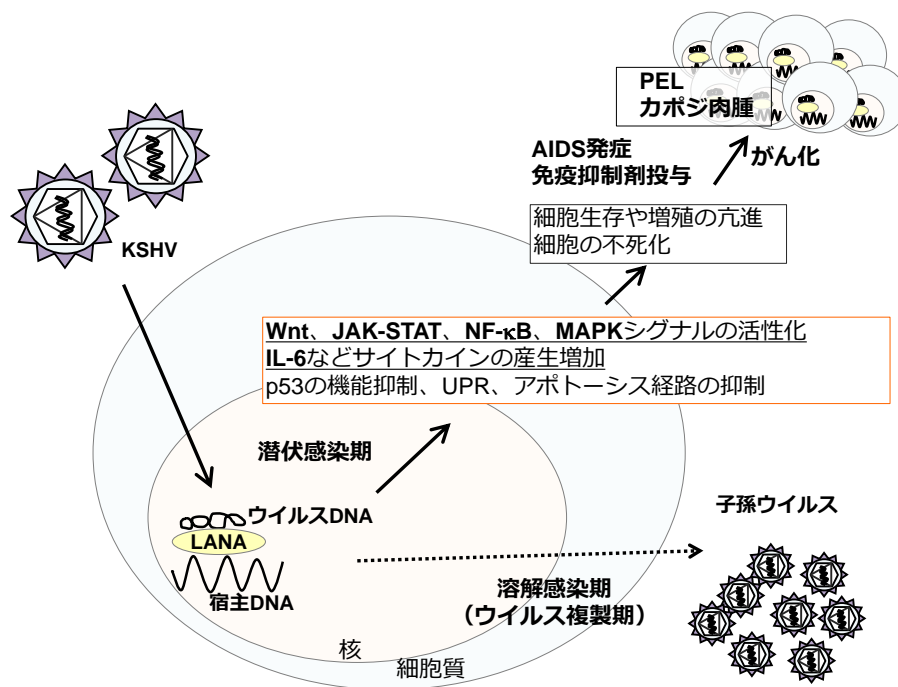


Figure 2 KSHV の生活環と PEL 発症機構

## 第1章 カプサイシンによる PEL 増殖阻害と ERK および p38 MAPK シ

### グナルの抑制

#### 1-1. はじめに

新規 PEL 治療薬の探索にあたって、本研究では植物由来低分子化合物に着目した。その理由は、近年植物由来の低分子化合物が多彩な薬理作用を示すことが報告されており、DNA トポイソメラーゼ I 阻害薬イリノテカン<sup>43)</sup>や DNA トポイソメラーゼ II 阻害薬エトポシド<sup>44)</sup>、微小管重合阻害薬ビンクリスチン<sup>45)</sup>、微小管脱重合阻害薬パクリタキセル<sup>46)</sup>など、植物由来化合物を基にして多様な薬理作用をもつ抗腫瘍薬が開発されているためである。新規 PEL 治療薬の候補化合物を選ぶにあたって、植物由来化合物の中でも KSHV と同じヘルペスウイルス属である HSV や EBV の阻害効果、KSHV 感染により活性化され PEL 増殖を促進する Wnt や JAK-STAT、NF- $\kappa$ B、Akt、MAPK シグナル阻害効果が報告されている化合物 21 種類を検討した (Table 3)。その中で唐辛子の辛味成分であるカプサイシンがユニークな薬理作用を示すことを見出したため、本研究ではカプサイシンに焦点を当てた。

Table. 3 新規 PEL 治療薬の候補として検討した化合物

主な含有植物	化合物名	先行研究により報告されている作用
ダイズ	ダイゼイン	NF-κB シグナル抑制 <sup>52)</sup>
	ダイジン	ダイズ胚軸抽出物による EBV 溶解感染移行阻害 <sup>53)</sup>
	ゲニステイン	HSV-1 ウイルス産生抑制 NF-κB シグナル抑制 <sup>52, 54, 55)</sup>
緑茶	(-)-エピガロカテキン	没食子酸エピガロカテキンによる HSV-1 不活化作用 <sup>56)</sup> と EBV 溶解感染移行阻害 <sup>57)</sup>
	(-)-エピカテキン	
	(-)-没食子酸エピカテキン	
コーヒー	クロロゲン酸	NF-κB、MAPK シグナル抑制 <sup>58)</sup>
	カフェイン酸	HSV-1 ウイルス産生抑制 <sup>59)</sup>
	ニコチン酸 (ビタミン B3)	ニコチン酸を含む栄養剤摂取による 唾液中 HHV-6 と HHV-7 数減少 <sup>60)</sup>
ローズマリー	カルノソール	NF-κB シグナル阻害 <sup>61)</sup>
	カルノシン酸	NF-κB シグナル抑制 <sup>62)</sup> Akt シグナル抑制 <sup>63)</sup>
	ロスマリン酸	NF-κB シグナル抑制 <sup>64)</sup>
タバコ	ノルニコチン ミオスミン トリゴネリン	タバコ水抽出物による HSV-1 増殖抑制 <sup>65)</sup>
五味子	シザンドリン	NF-κB シグナル抑制 <sup>66)</sup> JAK-STAT シグナル抑制 <sup>66)</sup>
	ゴミシン	NF-κB シグナル抑制 <sup>67)</sup>
唐辛子	カプサイシン	NF-κB シグナル抑制 <sup>51)</sup> JAK-STAT シグナル抑制 <sup>50)</sup> Wnt シグナル抑制 <sup>50)</sup>
ジャスミン	メチルジャスモン酸	MAPKK リン酸化抑制 <sup>68)</sup>
タマネギ	ケルセチン	NF-κB シグナル抑制 <sup>69, 70)</sup>
レモンバーム	p-クマル酸	レモンバーム水抽出物による HSV 吸着抑制 <sup>71, 72)</sup>

カプサイシンは唐辛子 (*Capsicum annuum* L.)などトウガラシ属の果実に多く見られるアルカロイドである。カプサイシンの構造を Figure 3 に示す。カプサイシンは感覚神経に存在する6回膜貫通型陽イオンチャネルの Transient receptor potential (TRP) V1 を活性化することで辛味や痛みを伝達することが知られている<sup>47)</sup>。一方で、カプサイシンは知覚神経を脱感作することで神経障害性疼痛の緩和に用いられている<sup>48,49)</sup>。また、カプサイシンは TRPV1 活性化作用に加え、Wnt<sup>50)</sup>や JAK-STAT<sup>50)</sup>、NF- $\kappa$ B<sup>51)</sup>シグナルの抑制など様々な細胞内シグナル調節作用が報告されている。本章ではカプサイシンの PEL 増殖抑制果およびその作用機序について解析を行った。

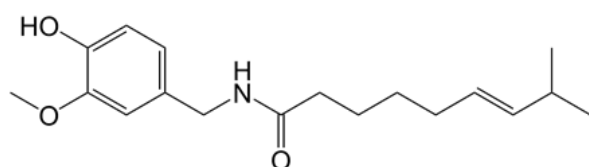


Figure 3 カプサイシンの構造

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 試薬調整

カプサイシンと U0126、SB203580 は DMSO に溶解し、-20°C で保存した。

抗体は以下に示す

Anti- $\beta$ -Actin mouse monoclonal antibody		×4000	SC
Anti- $\beta$ -Catenin mouse monoclonal antibody		×1000	BD
Anti-Bip/GRP78 mouse monoclonal antibody		×5000	BD
Anti-HSP90 mouse monoclonal antibody		×1000	BD
Anti-IL-6 mouse monoclonal antibody		×1000	BD
Anti-I $\kappa$ B $\alpha$ mouse monoclonal antibody		×1000	BD
Tyr705-phospho-STAT3 rabbit polyclonal antibody		×1000	CST
Anti-stat3 mouse monoclonal antibody		×1000	BD
Ser217/221-phospho-MEK1/2		×1000	CST
Anti-LANA rabbit polyclonal antibody	×500	当研究室の藤室雅弘教授が作製	
Anti-Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) mouse monoclonal antibody		×500	BD
Anti-p38 mouse monoclonal antibody		×500	BD
Anti-Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) mouse monoclonal antibody		×500	CST
Anti-Erk1/2 mouse monoclonal antibody		×1000	BD
Anti-Histone H2A rabbit polyclonal antibody		×1000	CST



Ser380-phospho-p90RSK	×500	CST
HRP conjugate anti-mouse IgG	×5000	GE Healthcare
HRP conjugate anti-rabbit IgG	×5000	GE Healthcare

### 1-2-2. 細胞培養

下記の B 細胞性リンパ腫株 (浮遊細胞) は、10% FBS (fetal bovine serum) 含有 RPMI1640 培地を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。継代時はピペッティングにより懸濁し、5-10%を新たな培地に懸濁した。

KSHV 感染、EBV 非感染 PEL 細胞: BCBL1、BC3 および JSC1

KSHV 感染、EBV 感染 PEL 細胞: BC2 および HBL6

EBV 感染 B 細胞性リンパ腫: Raji

ウイルス非感染 B 細胞性リンパ腫: Ramos および DG75

マウス末梢血単核球 (PBMC)は ddY マウスより採取した。麻酔下のマウス四肢を固定して胸部を切開し、ヘパリン溶液で濡らした G29 針付きシリンジを用いて心臓より全血を採取した。採取した血液をヒストパック-1083 にて遠心分離し、得られた PBMC 画分を PBS で 2 回洗浄して直ちに実験に用いた。培地は 30 %FBS と 100 U/mL のペニシリン、100 µg/mL のストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地を用いた。

### 1-2-3. 細胞増殖アッセイ

$4 \times 10^4$  cells/50 µL/well となるよう細胞を 96 well-plate に播種し、2 時間後に各濃度の化合物溶液を 50 µL/well の培地に希釈して加え、37°C、24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養後、水溶性 tetrazolium 塩 WST-8 を発色試薬として用いた生存細胞数測定試薬 (ナカライテスク)を 10 µL 添加、混合し、450 nm (参照波長 620 nm) における吸光度を測定することで、生細胞数を評価した。溶媒処理細胞の生存率を 100%として薬物処理時の生存率を算出した。

### 1-2-4. 軟寒天コロニー形成アッセイ

10%寒天溶液をオートクレーブにより溶解し、20%FBS 含有 RPMI1640 培地で 1%に希釈して 55°Cで保温した。12 well-plate に下層として 0.5%寒天と各濃度の化合物を含む培地を流し入れ、固まるまで室温で静置した。さらに上層として 0.35%寒天と各濃度の化合物を含む培地に  $5 \times 10^3$  cells/well の BCBL1 細胞を懸濁して流し入れ、熱ショックを和らげるため 4°Cで 5 分静置した。その後 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。1 週間後、黒色下敷き上に plate を置き、立体顕微鏡 (Olympus SZ61)で撮影して 1 視野当りのコロニー数を計測した。

#### 1-2-5. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 量変化の測定

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量変化の測定は  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Fura-2 AM を用いて行った。Fura-2 AM はカルシウム指示薬である Fura-2 のエステル体であり、細胞内のエステラーゼによりエステル基が除かれることで細胞外へ Fura-2 が漏れ出しにくくなる。エステル結合は血清中のエステラーゼにより分解される恐れがあるため、 $5 \times 10^4$  cells/well の細胞を  $\text{Ca}^{2+}$  含有 Hank's balanced salt solution (HBSS) で洗浄して用いた。洗浄後の細胞を  $5 \mu\text{M}$  の Fura-2 AM と 0.05% の Pluronic F-127 含有 HBSS で 30 分処理した。Fura-2 AM 懸濁液の粒子径が大きいと細胞への取り込みが低下する。Pluronic F-127 などの界面活性剤を添加することで Fura-2 AM の粒子径が小さくなり細胞への取り込みが改善するため、本研究では Pluronic F-127 を添加した。Fura-2 AM で処理した後、細胞に取り込まれていない Fura-2 AM を除くために HBSS で洗浄して新たな HBSS に懸濁し、 $150 \mu\text{M}$  のカプサイシン添加後ただちに測定を行った。Fura-2 は  $\text{Ca}^{2+}$  と結合すると励起光の波長が  $380 \text{ nm}$  から  $340 \text{ nm}$  へシフトし、励起光  $380 \text{ nm}$  の蛍光が低下する。そのため、励起光  $340 \text{ nm}$  / 蛍光  $510 \text{ nm}$  および励起光  $380 \text{ nm}$  / 蛍光  $510 \text{ nm}$  をマルチプレートリーダーで測定し、 $510 \text{ nm}$  の蛍光(励起光  $340 \text{ nm}$  / 励起光  $380 \text{ nm}$ ) で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量変化を算出した。

#### 1-2-6. ウェスタンブロット解析

##### a) サンプル調製

$10 \text{ cm}$  ディッシュに播種した細胞をピペッティングにより懸濁して  $15 \text{ mL}$  ファルコンチューブに回収した。回収した細胞を  $x300 \text{ g}$  で 5 分遠心し、細胞ペレットを PBS で 1 回洗浄した。洗浄した細胞ペレットをそのまま溶解するとタンパク質の抽出効率が悪くなるため、ボルテックスミキサーにより細胞ペレットを崩してから  $4 \times \text{SDS}$  サンプルバッファー ( $0.5 \text{ mM}$  フッ化 Na と  $0.5 \text{ mM}$   $\beta$ -glycerophosphate、 $0.1 \text{ mM}$  PMSF を含む) を処理し細胞を溶解させ 15 秒間超音波処理した。2~5%  $\beta$ -メルカプトエタノールをセルライセートに加え、その後  $95^\circ\text{C}$  で 5 分間煮沸しウェスタンブロット用サンプルとし、使用するまで  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

##### b) ウェスタンブロット法

抽出した細胞溶解液を 6-15% ポリアクリルアミドゲルに添加し、SDS 泳動バッファーを用いて  $40\sim 50 \text{ mA}$  の定電流で SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis) を行なった。SDS-PAGE し終えたゲルをウェット方式 ( $80 \text{ V}$  の定電流) で 2~3 時間ニトロセルロース膜へ転写した。転写されたニトロセルロース膜を 5% スキムミルク含有 PBST で 30 分間振盪させることでブロッキングした後、PBS-T に希釈した 1 次抗体とニトロセルロース膜を室温で 1~2 時間または  $4^\circ\text{C}$  で 15~18 時間反応させた。その後その膜を 0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) で 30 分間洗浄し、HRP 結合 2 次抗体溶液をニトロセルロース膜に浸し室温で 1 時間反応させた。その膜を再び PBS-T で 1 時間以上洗浄した。最後にニトロセルロース膜を ECL (Enhanced chemiluminescence) 溶液処理することで化学発光させ X 線フィルムに最大 30 分間感光させた。反応が悪い時には Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution を用いて抗体を希釈した。ポリアクリルアミドゲル、SDS

泳動バッファー、トランスファーバッファー、PBS、PBS-T の組成は以下に記す。バンド定量は ImageJ software を用いて解析した。

<6-15%ポリアクリルアミドゲル>

Running gel

30 % アクリルアミド 2.5 mL

1.5 M Tris/HCl (pH8.8) 2.5 mL

Mili Q 2.32-5.32mL

10 % SDS 100  $\mu$ L

APS 50  $\mu$ L

---

Total 10 mL

Stacking gel

30 % アクリルアミドゲル 1.66 mL

0.5 M Tris/HCl (pH6.8) 2.5 mL

Mili Q 5.62 mL

10 % SDS 100  $\mu$ L

APS 50  $\mu$ L

---

Total 10 mL

以上の組成で混ぜた後、TEMED を 30  $\mu$ L ずつ running gel と stacking gel に加えてポリアクリルアミドゲルを作製した。

<SDS 泳動バッファー>

25 mM Tris

192 mM グリシン

0.1 % SDS

---

<トランスファーバッファー>

25 mM Tris

192 mM グリシン

20 % メタノール

---

<PBS>

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

<PBS-T>

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.1 % Tween-20

#### 1-2-7. 細胞分画

2.5x 10<sup>5</sup> cell/200 μL の BC3 細胞を等張バッファーに懸濁し、29G 針付きシリンジで 5 回通して 2800 rpm、4°C で 10 分遠心し、回収した上清を細胞質画分 1 とした。次にペレットを低張バッファーに懸濁して 15 分氷上で静置し、2800 rpm、4°C で 10 分遠心して回収した上清を細胞質画分 2、沈殿物を核画分とした。等張バッファーと低張バッファーの組成を以下に示す。

<等張バッファー>

250 mM Sucrose

1 mM EDTA

20 mM HEPES

0.25 mM PMSF

1 μM pepstatin A

<低張バッファー>

20mM HEPES (pH 7.8)

3mM MgCl<sub>2</sub>

10mM NaCl

0.5% NP-40

0.25 mM PMSF

1 μM pepstatin A

#### 1-2-8. Total RNA 抽出と逆転写反応

細胞からの RNA 抽出は phenol 含有 RNA 抽出試薬 RNAiso Plus を、逆転写反応による cDNA 合成には ReverTra Ace qPCR RT Kit を使用した。PBS で 1 回洗浄した細胞を RNAiso plus 500  $\mu$ L と chloroform 100  $\mu$ L に溶解し、15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心した。回収した上清 160  $\mu$ L に 2-propanol 400  $\mu$ L を加え、転倒混和した後、さらに 15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心した。得られた RNA ペレットを氷冷した 70% ethanol で洗浄し、乾燥させた後滅菌水に溶解した。予想される mRNA 発現量を考慮して 40-400ng の RNA を鋳型に ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて、37 $^{\circ}$ C、30 分間の逆転写反応を行った。反応後の cDNA 溶液に DW 20  $\mu$ L を加え、PCR 反応の鋳型とした。

##### 逆転写反応液組成

5 $\times$ RT Buffer	2 $\mu$ L
Primer Mix	0.5 $\mu$ L
RT Enzyme mix	0.5 $\mu$ L
Template RNA	2 $\mu$ L (40-400 ng)
<u>Distilled sterilized water</u>	<u>5 <math>\mu</math>L</u>
Total	10 $\mu$ L

#### 1-2-9. リアルタイム PCR 法

1-2-8 で合成した cDNA 溶液を PCR 反応の鋳型とした。Table 4 に示す各遺伝子特異的プライマーセットを用いて、サンプル中の遺伝子発現量を real-time PCR 法により解析した。Real-time PCR による定量は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて行い、PCR 反応条件は 95 $^{\circ}$ C、1 分間変性させた後、95 $^{\circ}$ C、15 秒間の熱変性と 60 秒間の伸長を 40 サイクル行った。伸長反応の温度はプライマーの T<sub>m</sub> 値-5 $^{\circ}$ Cで行った。1 サンプルあたりの PCR 反応液組成は以下の通りである。なお、GAPDH を内部標準として用い、各遺伝子の発現量を比較定量法にて算出した。

##### Real-time PCR 反応液組成

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	10 $\mu$ L
10 $\mu$ M sense primer	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M antisense primer	1 $\mu$ L
Template DNA	2 $\mu$ L
<u>Distilled sterilized water</u>	<u>6 <math>\mu</math>L</u>
Total	20 $\mu$ L

Table.4 Real-time RT-PCR に用いたプライマー

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
TRPV1	GCTCAGCCCGAGGAAGTTTATC	GCGGCAGGACTCTTGAAGAC
IL-6	GGCTGAAAAAGATGGATGCTTC	TTTCTGCAGGAACTGGATCAG
IL-10	TCCCTGTGAAAACAAGAGCAAG'	ATAGAGTCGCCACCCTGATG'
VEGF-A	CACTGAGGAGTCCAACATCAC	GGTCTGCATTACATTTGTTGTG
vIL-6	GGTCGGTTCACCTGCTGGTATC	ATGCCGGTACGGTAACAGAG
GAPDH	TGACCACAGTCCATGCCATC	GGGGAGATTCAAGTGTGGTGG
ORF-50	ATAATCCGAATGCACACATCTCCACCAC	TTCGTCGGCCTCTCGGACGAAACTGA

#### 1-2-10. Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量

1 × 10<sup>6</sup> cells/4 mL/well で 6 well-plate に播種した BCBL1 細胞に、終濃度 3 mM の NaB と種々の濃度に希釈した薬物を含有する培地を等量 (4 mL) 加え、37°C で培養した。培養 48 時間後、250 μL の培地を 1400 rpm (300 × g)、2 分間遠心し、上清を 220 μL 回収した。培地中に産生されたウイルス粒子中の DNA を精製するため、10× DNase I buffer 22 μL と DNase I 4 U をよく混合し、37°C で 10 分インキュベートした。この反応は、操作中に破砕した細胞に由来するウイルス DNA (カプシドタンパク質に包まれておらず、粒子を形成していないウイルス DNA) を分解除去するために行った。次に、DNase を不活性化するために反応溶液を 0.5M EDTA-Na (pH8.0) 2 μL 添加し、75°C、10 分間加熱した後、QIAamp DNA Blood Mini kit でウイルス DNA を精製し、滅菌水 50 μL に溶解した。このサンプル中に含まれるウイルス DNA を 1-2-8 項により定量した。Real-time PCR による定量は、Table 3 に記す KSHV がコードする遺伝子 RTA 特異的プライマーセットを用いて行った。

#### 1-2-11. 動物実験

動物実験は、京都薬科大学動物実験委員会により承認され、京都薬科大学「動物事件に関する指針」に従って実行した。5 週齢の C.B-17 IcrHsd-Prkcd SCID マウス (オス) は清水実験材料より購入し、輸送や環境変化によるストレスを緩和するために 1 週間飼育してから実験に使用した。マウスを無作為に 4 匹ずつ 2 グループに分け、カプサイシン 250 μM もしくは溶媒で 6 時間前処理した BCBL1 細胞 3.5 × 10<sup>6</sup> 個を 200 μL の PBS に懸濁し、22G 注射針を用いてマウス腹腔内に移植した。

#### 1-2-12. 蛍光抗体染色による KSHV タンパク質の検出

マウス腹腔より回収した細胞を PBS に懸濁し、10 穴高撥水性印刷スライドガラス上に乗せ、余剰な懸濁液を回収した。風乾にて水分を蒸発させたのち 4°C に冷やした 4% パラホルムアルデヒドにより 10 分間室温で細胞を固定した。固定した細胞を常温の PBS で 2 回洗浄後、PBS

に懸濁した 0.25% Triton-X 100 により 10 分間室温で透過処理し、PBS で 2 回洗浄した。抗体の非特異反応を防ぐため、PBS-T に懸濁した 1% bovine serum albumin を透過処理した細胞に加え 30 分間室温でブロッキングした。ブロッキングした細胞を PBS で 2 回洗浄し 1 次抗体を 1 時間室温で処理し、PBS で 2 回洗浄した。Alexa fluor 488 標識ヤギ抗ラビット抗体を二次抗体として使用し、PBS-T に希釈した抗体溶液を 1 次抗体処理した細胞に室温 1 時間で反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、核標識入り封入剤である Fluoro-KEEPER with DAPI を細胞へ添加し、気泡が入らないようカバーガラスをかけて固定した。染色した細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

#### 1-2-13. 統計処理

2 群間の比較は Student の t 検定 (両側検定)を用いて統計解析を実行した。3 群以上の比較は分散分析法として ANOVA を用い、検定には Dunnett 検定を用いて統計解析を実行した。統計解析ソフトは GraphPad Prism7 を使用した。得られた実験結果は平均値±標準偏差で表示した。危険値 5%以下を有意差有りとした。

#### 1-2-14. CC<sub>50</sub> 値の算出法

CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration of cell viability) 値は、cell viability (細胞生存率)を 50%まで減少させる化合物の濃度である。CC<sub>50</sub> 値は、cell viability が 50%より大きい化合物濃度 (以下、A)、cell viability が 50%より小さい化合物濃度 (以下、B)、およびそれら化合物濃度における cell viability 値 (以下、C および D) を用いて、以下の計算式より算出した。

A および B: cell viability 50%を挟む化合物濃度  
化合物濃度は A > B とする。

C: B での cell viability

D: A での cell viability

$$E = (\text{LOG} (A/B) (50 - C)/(D - C) + \text{LOG} (B))$$

$$\text{CC}_{50} = 10^E$$

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. カプサイシンによる PEL 細胞の増殖阻害

カプサイシンが PEL 細胞の増殖を阻害するか調べるため、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) を用いて実験を行った。各 B リンパ腫細胞を種々の濃度のカプサイシンを含む培地中で 24 時間培養した後、生細胞数を測定した。その結果を Figure 4A に示す。JSC1 細胞は 50  $\mu\text{M}$ 、BCBL1 と HBL6 細胞は 100  $\mu\text{M}$ 、BC2 と BC3 細胞は 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシン処理により、溶媒処理時と比較して有意に細胞生存率が低下した (BCBL1  $p=0.0008$ , BC2  $p=0.0001$ , BC3  $p<0.0001$ , HBL6  $p<0.0001$ , JSC1  $p<0.0001$ )。200  $\mu\text{M}$  以下の濃度では KSHV 非感染細胞株 Ramos、DG75、Raji では有意な細胞生存率の低下は見られなかった。一方で、200  $\mu\text{M}$  以上のカプサイシン処理は KSHV 非感染細胞と PEL 細胞のいずれも溶媒処理時と比較して細胞生存率を有意に低下させた。各 B リンパ腫の 24 時間後生存率におけるカプサイシンの  $\text{CC}_{50}$  は、KSHV 非感染 B リンパ腫の Ramos 細胞が 182.6  $\mu\text{M}$ 、DG75 細胞が 207.6  $\mu\text{M}$ 、Raji1 細胞が 82.6  $\mu\text{M}$ 、KSHV 感染細胞の BCBL1 細胞が 147.6  $\mu\text{M}$ 、BC2 細胞が 150.6  $\mu\text{M}$ 、BC3 細胞が 114.2  $\mu\text{M}$ 、HBL6 細胞が 116.4  $\mu\text{M}$ 、JSC1 細胞が 90.3  $\mu\text{M}$  であった (Table 5)。本研究で比較対象として用いた KSHV 非感染 B リンパ腫は腫瘍細胞である。そこで、カプサイシンが正常細胞の生存率に影響をおよぼすか否か解析することを目的として ddY マウスから採取した末梢血単核球細胞 (PBMC) をカプサイシンで処理し、24 時間後に細胞生存率を測定した。その結果、カプサイシンはマウス PBMC の生存率にはほとんど影響しなかった (Figure 4B)。次に、カプサイシン処理が PEL 細胞の足場非依存的な増殖におよぼす影響を調べた。軟寒天コロニー形成アッセイにより BCBL1 細胞を各濃度のカプサイシンで 1 週間処理した結果、120  $\mu\text{M}$  以上のカプサイシン処理は溶媒処理時と比較して BCBL1 細胞のコロニー形成を抑制した (120-180  $\mu\text{M}$ ,  $p<0.0001$ , Figure 4C, D)。

Table.5 カプサイシン処理による B リンパ腫細胞の  $\text{CC}_{50}$

	Ramos	DG75	Raji	BCBL1	BC2	BC3	HBL6	JSC1
$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	182.6	207.6	182.6	147.6	150.6	114.2	116.4	90.3

表は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83 の Table.2 を一部改変して引用した。



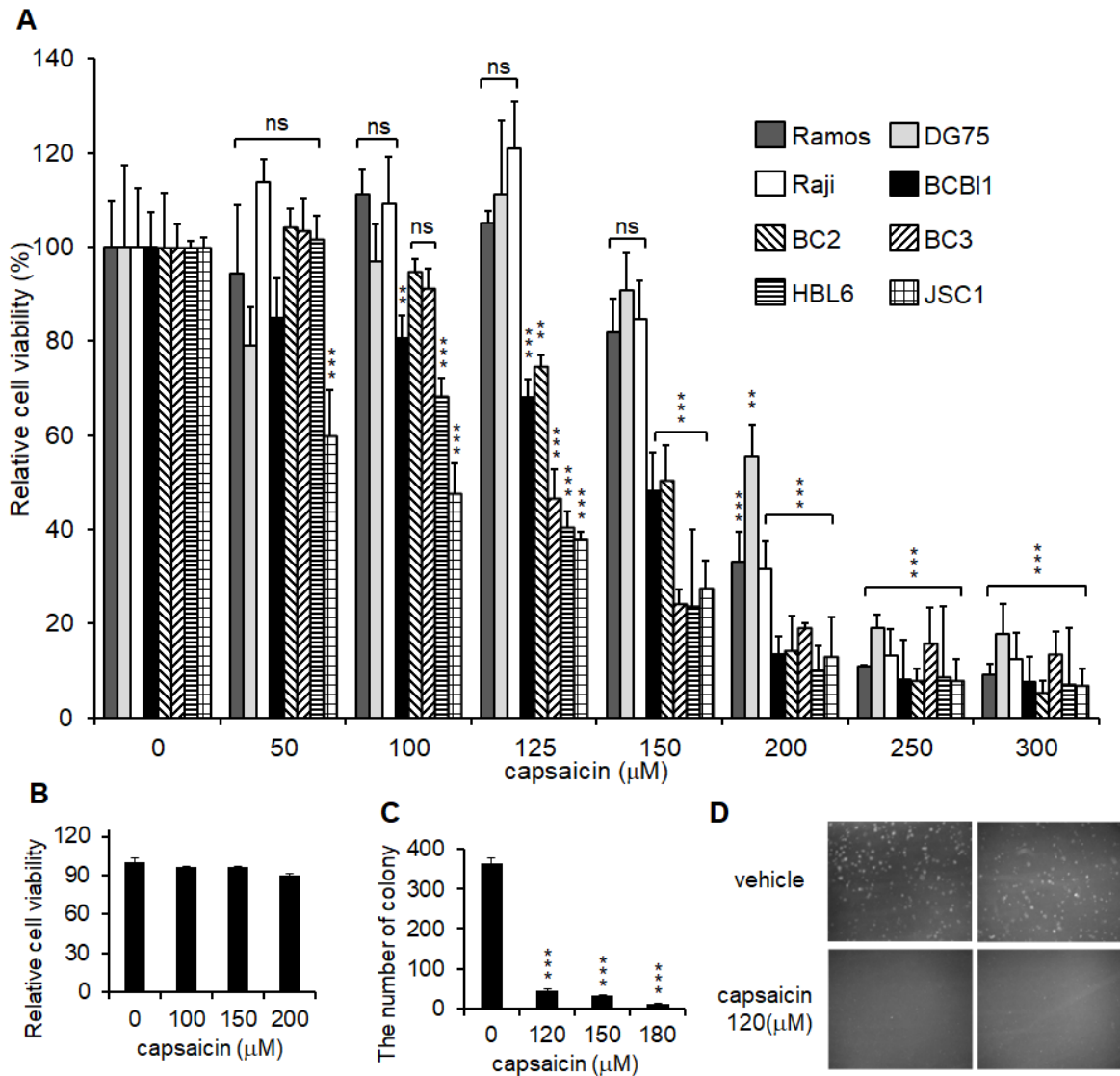


Figure 4 カプサイシンによる PEL 細胞の増殖抑制効果

A) PEL 細胞(BCBL1 と BC2, BC3, HBL6, JSC1)および KSHV 非感染細胞(Ramos と DG75, Raji)を各濃度のカプサイシンで処理し、24 時間後に細胞生存率を測定して溶媒処理時の細胞生存率を 100% とした。棒グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。\*\*は  $p<0.001$ 、\*\*\*は  $p<0.0001$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

B) マウス PBMC を各濃度のカプサイシンで処理し、24 時間後に細胞生存率を測定した。

C, D) BCBL1 細胞を用いて各濃度のカプサイシンを用いて軟寒天コロニー形成アッセイを行った。C) は 1 視野当りのコロニー数である。\*\*\*は  $p<0.0001$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。D) はコロニーの顕微鏡写真である。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig.1 を一部改変して引用した。

カプサイシンは PEL 細胞の増殖を有意に抑制したため、カプサイシンの PEL 細胞増殖抑制効果について個体レベルで解析した。しかし、マウス腹腔へのカプサイシン投与は局所刺激性が強く困難であったため、予め 250  $\mu\text{M}$  のカプサイシンもしくは溶媒で 6 時間処理した BCBL1 細胞をマウスに移植し、21 日後に腹腔内腫瘍量を測定した (Figure 5)。Table 5 より PEL 細胞は 90.3-150.6  $\mu\text{M}$  のカプサイシン処理時に未処理時と比較して生存率が 50% と大きく低下した。細胞生存率が大きく低下する条件下では細胞増殖抑制だけでなく細胞死も起きていると推察される。KSHV 感染細胞と比較して PEL 細胞の生存率が低下するカプサイシンの濃度はおよそ 100-150  $\mu\text{M}$  の範囲であり、この濃度のカプサイシンで 24 時間処理した場合はマウス腹腔への移植前に PEL 細胞が死滅する可能性が高い。そこで、移植前に PEL 細胞死が生じることを避けるため、 $\text{CC}_{50}$  より高濃度のカプサイシンで PEL 細胞を短時間処理した後にマウス腹腔へ移植した。マウスの腹腔にカプサイシン処理した細胞を移植した結果、カプサイシン未処理の BCBL1 細胞を移植したマウスでは腹部膨張が観察され、カプサイシン処理では腹部膨張は観察されなかった (Figure 5A)。また、カプサイシン処理は溶媒処理と比較してマウス体重増加を抑制した ( $p=0.0003$ , Figure 5B)。また、カプサイシン処理は 21 日後の腹腔内腫瘍量を有意に抑制した (Figure 5C)。腹腔内から回収した腫瘍が KSHV 感染細胞であることを確認するため、KSHV タンパク質の LANA に対する免疫染色を行った。その結果、回収した腫瘍は LANA 陽性、すなわち KSHV 感染細胞であった (Figure 5D)。

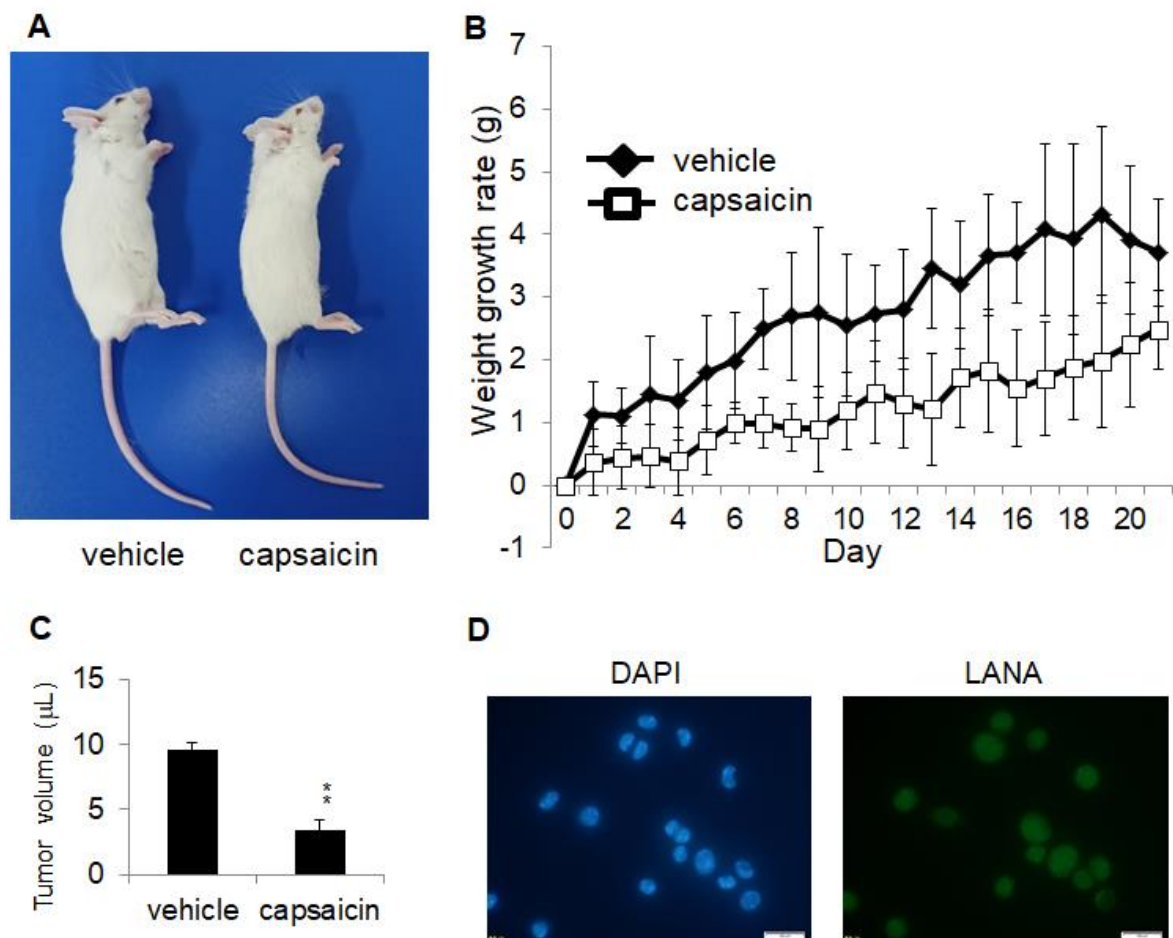


Figure 5 カプサイシン処理による生体内での PEL 細胞増殖抑制

250  $\mu\text{M}$  のカプサイシンもしくは溶媒で 6 時間処理した BCBL1 細胞を SCID マウスの腹腔に移植し、21 日後にマウス腹腔内の腫瘍を測定した。

A) 溶媒処理もしくはカプサイシン処理細胞を移植し 21 日後のマウスの外観を示した。

B) 移植日を 0 日とした時のマウス体重増加量を測定した。黒菱形、白四角はそれぞれ溶媒処理群、カプサイシン処理群を示している。グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。

C) 21 日後の腹腔内腫瘍を回収し、その体積を測定した。棒グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。\*\*は  $p < 0.001$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

D) 溶媒処理群の腹腔内腫瘍について KSHV タンパク質 (LANA) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83. の Fig. 7 を引用した。

### 1-3-2. B リンパ腫の TRPV1 発現とカプサイシン処理による PEL 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 量の解析

1-3-1 ではカプサイシン処理による PEL 細胞の増殖抑制効果が示されたため、その作用機序の解析を試みた。カプサイシンは TRPV1 の活性化作用を持つ化合物であり、細胞への過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  流入は細胞死を引き起こすことが報告されている<sup>73, 74)</sup>。そこで、B リンパ腫における TRPV1 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した (Figure 6A)。TRPV1 発現細胞として HEK293 細胞をコントロールとして用いた。その結果、HEK293 細胞と比較して KSHV 非感染細胞 (Ramos、Raji、BJAB) と PEL 細胞 (BCBL1、BC2、BC3、HBL6、JSC1) では TRPV1 mRNA 量が少なく、B リンパ細胞株の中で最も TRPV1 発現量が多い PEL 細胞の BC2 細胞でも TRPV1 発現量は HEK293 細胞の半分程度であった。また、カプサイシン処理が PEL 細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすか否か、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の Fura2-AM を用いて測定した (Figure 6B)。150  $\mu\text{M}$  のカプサイシン処理により HEK293 細胞ではわずかな細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量の増加が観察されたが、KSHV 非感染細胞 (Ramos、Raji) および PEL 細胞 (BCBL1、BC3) では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量の増加は観察されなかった。

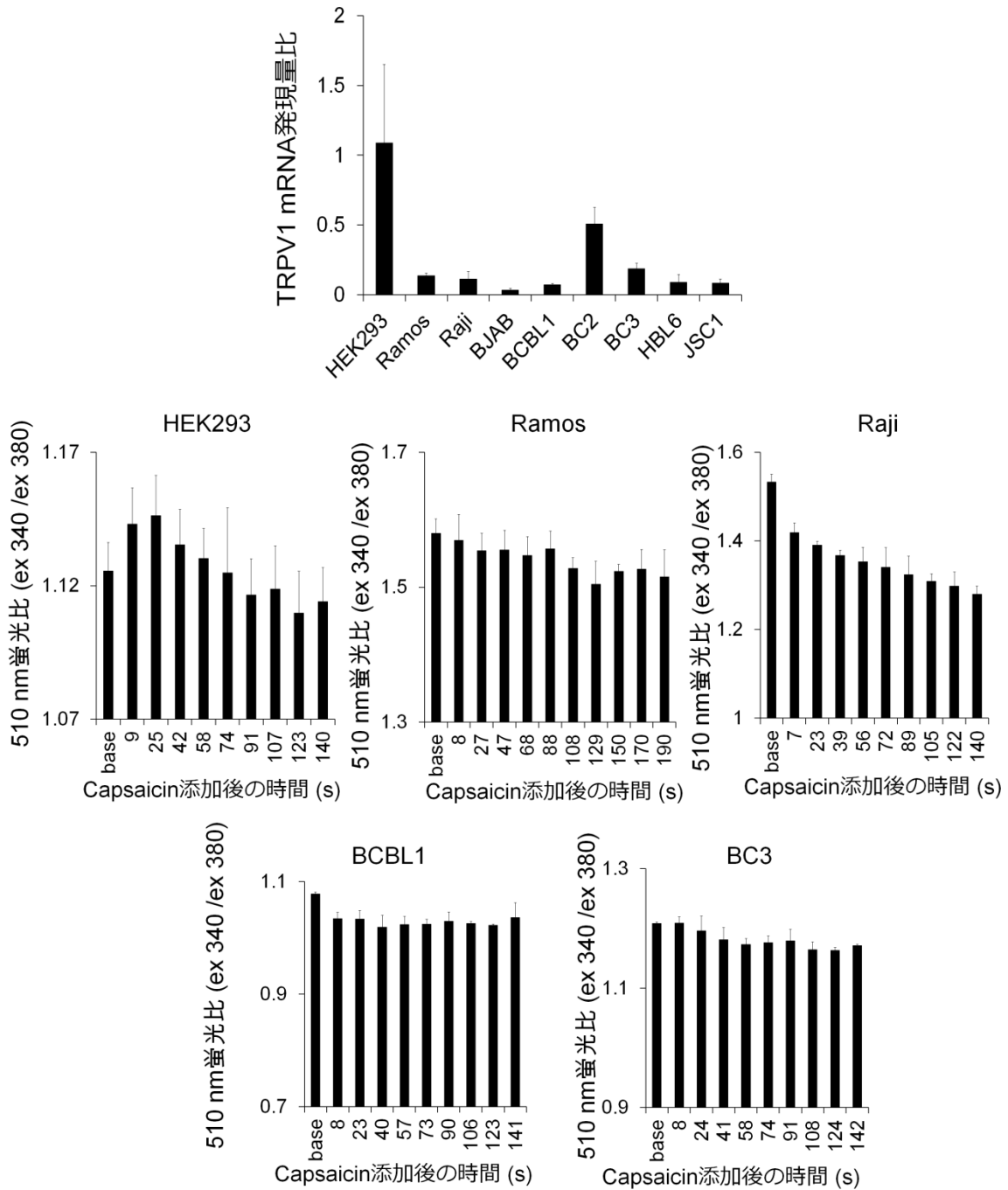


Figure 6 B リンパ腫における TRPV1 発現量とカプサイシン処理による PEL 細胞内 Ca<sup>2+</sup>量変化

A) B リンパ腫における TRPV1 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。HEK293 は TRPV1 発現のポジティブコントロールとして用いた。棒グラフは平均値±SD で表している。

B) 150 μM のカプサイシン処理による細胞内 Ca<sup>2+</sup>量を Ca<sup>2+</sup>指示薬 Fura2-AM を用いて測定した。base はカプサイシン処理前の細胞内 Ca<sup>2+</sup>量を示した。棒グラフは平均値±SD で表している。

### 1-3-3. カプサイシンによる ERK リン酸化の抑制

1-3-2 より Fura-2 AM を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  の検出系ではカプサイシン処理による B リンパ腫細胞への  $Ca^{2+}$  流入が認められなかった。一方で、1-3-1 においてカプサイシンは KSHV 非感染細胞およびマウス PBMC と比較して PEL 細胞の増殖を抑制したことから、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すると推察した。そこで次に、KSHV 感染により活性化される Wnt や NF- $\kappa$ B、JAK-STAT シグナル及び KSHV 感染により抑制される小胞体ストレス応答 (UPR) に関わる分子のタンパク質発現量について、カプサイシン処理による影響をウェスタンブロット法により解析した。150  $\mu$ M のカプサイシンで 6、12、24 時間処理した KSHV 非感染細胞(Ramos、DG75)および PEL 細胞(BCBL1、BC3、JSC1)のタンパク質発現量を解析した (Figure 7)。カプサイシン未処理時において、KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75)と比較して PEL 細胞 (BCBL1、BC3、JSC1)では STAT3 (Y705)リン酸化の亢進と  $\beta$ -catenin の増加が見られた。この結果は先行研究と合致しており、PEL 細胞内では JAK-STAT や Wnt シグナルが亢進していると考えられる。一方で、PEL 細胞では I $\kappa$ B $\alpha$  分解促進による NF- $\kappa$ B 経路の活性化も報告されているが、本研究では NF- $\kappa$ B や I $\kappa$ B $\alpha$  の発現量は KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75)と PEL 細胞 (BCBL1、BC3、JSC1)で顕著な差は見られなかった。経時的カプサイシン処理では  $\beta$ -Catenin や p65 NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$ 、小胞体ストレスにより増加する BiP の発現量については KSHV 非感染細胞(Ramos、DG75)と PEL 細胞 (BCBL1、BC3、JSC1)のいずれも顕著な増減は見られなかった。STAT3 (Y705)リン酸化については KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75)では検出されなかったが、PEL 細胞 (BCBL1、BC3、JSC1)では 12 時間後をピークとして一過的に亢進し、24 時間後では 12 時間後と比較して減少に転じた。

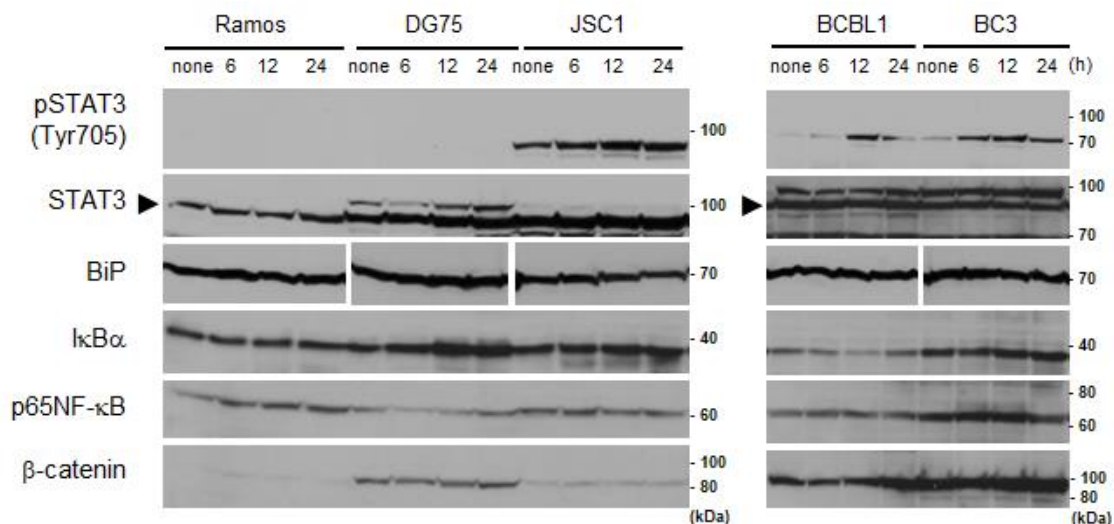


Figure 7 カプサイシン処理による KSHV 脱制御シグナルへの影響

KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75)と PEL 細胞 (JSC1、BCBL1、BC3)を 150  $\mu$ M のカプサイシンで処理し、抗リン酸化 STAT3(Y705)、STAT3、BiP、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65NF $\kappa$ B、 $\beta$ -catenin 抗体で検出した。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83. の Fig. 3B と Fig. S1A を一部改変して引用した。

また、KSHV 感染による恒常的な活性化が知られている MAPK シグナル関連分子についてもウェスタンブロット法で解析した。カプサイシン未処理時では KSHV 非感染細胞の Ramos、Raji 細胞と比較して PEL 細胞の BCBL1、BC3、HBL6、JSC1 細胞では ERK リン酸化が亢進していた。ERK1 と ERK2 は分子量に違いがあり、ERK1 は 44 kDa、ERK2 は 42 kDa であることから ERK1/2 ブロットの上側のバンドが ERK1、下側のバンドが ERK2 と考えられる。PEL 細胞の中でも JSC1 細胞では ERK1 と ERK2 のどちらもリン酸化が強く亢進していた。BCBL1 細胞では ERK1 リン酸化が強く亢進していた。HBL6 と BC3 細胞では ERK2 リン酸化が亢進していた。KSHV 非感染細胞の DG75 細胞では他の非感染細胞と比較して ERK1 リン酸化が亢進していたが、PEL 細胞の中で最もリン酸化度合いの弱い BC3 細胞と同程度であった。150  $\mu$ M のカプサイシンで 6、12、24 時間処理した結果、KSHV 非感染細胞の Ramos 細胞はカプサイシン処理にかかわらず、ERK リン酸化が検出されなかった。Raji 細胞はカプサイシン処理 12 時間後にわずかに ERK2 リン酸化が亢進した。KSHV 非感染細胞の DG75 細胞と PEL 細胞の BCBL1、BC3、HBL6、JSC1 細胞ではカプサイシン処理 6 時間後から ERK リン酸化抑制が見られた。一方で、ERK の上流キナーゼである MEK のリン酸化はカプサイシン未処理時で KSHV 非感染細胞と PEL 細胞の両方で検出され、JSC1 と Raji 細胞では特に強くリン酸化されていた。カプサイシン処理時については、ERK リン酸化抑制が生じる処理後 6 時間の時点で MEK リン酸化の抑制は見られなかった。

経時的カプサイシン処理により PEL 細胞において ERK リン酸化の抑制が見られたため、今度は PEL 細胞の BCBL1 と BC3 細胞を 40、80、120  $\mu$ M のカプサイシンで 24 時間処理した。その結果 BCBL1 と BC3 細胞のどちらにおいても ERK のリン酸化が抑制された(Figure 8B)。カプサイシン処理 0 時間において、Figure 8A と合致して BC3 細胞と比較して BCBL1 細胞では ERK が強くリン酸化されていた。BCBL1 細胞は 80  $\mu$ M、BC3 細胞は 40 $\mu$ M から ERK リン酸化が減少した。また、カプサイシン処理による ERK リン酸化抑制が ERK より下流のシグナル伝達を抑制することを確認するため、ERK によりリン酸化される p90RSK のリン酸化状態を解析した。その結果、カプサイシン処理は p90RSK のリン酸化を BCBL1 と BC3 細胞のいずれの細胞でも抑制した (Figure 8B)。

さらに、ERK シグナル阻害が PEL 細胞の生存率低下を引き起こすことを確認するために ERK シグナルの特異的阻害剤である U0126 を KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75、Raji) と KSHV 感染細胞 (BCB1、BC3) に処理し、24 時間後に細胞生存率を測定した。その結果、U0126 処理により KSHV 非感染細胞の Ramos と Raji 細胞および PEL 細胞の BCBL1 と BC3 細胞では細胞生存率が有意に低下した (Ramos  $p=0.0002$ , Raji  $p=0.0002$ , BCBL1  $p=0.001$ , BC3  $p=0.0001$ )。DG75 細胞は U0126 処理による細胞生存率の低下は見られなかった。

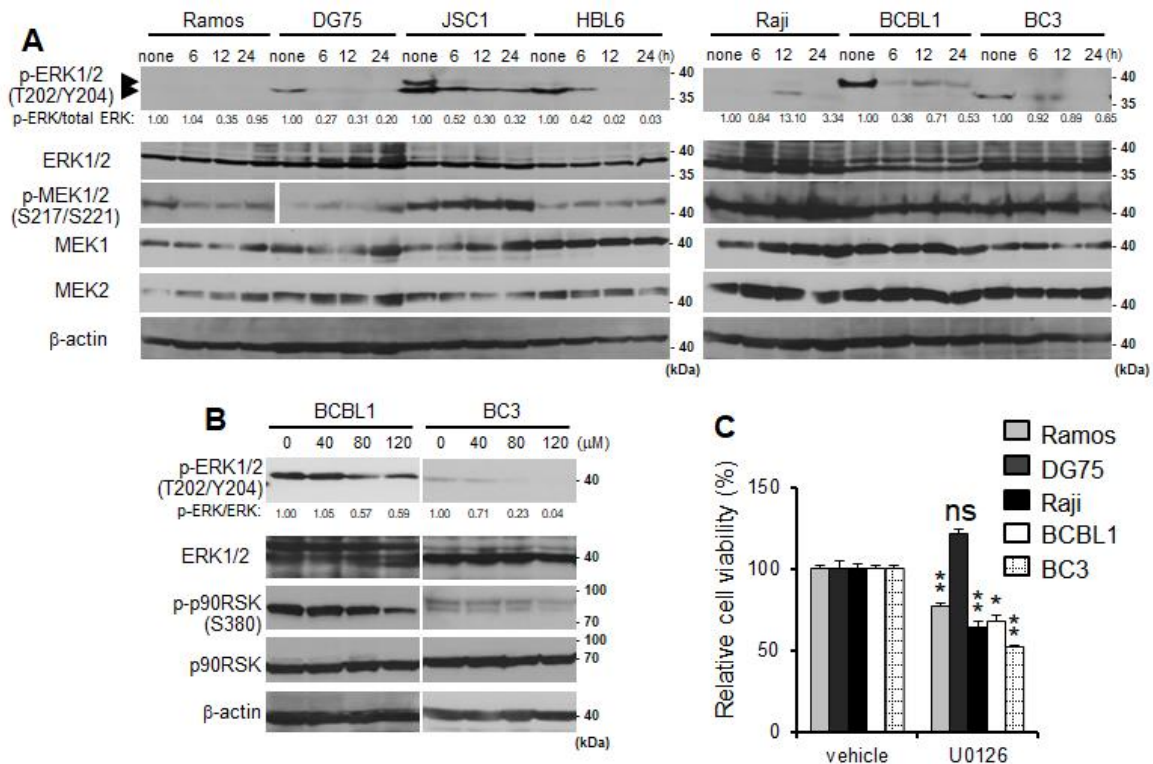


Figure 8 カプサイシン処理による ERK リン酸化の抑制

A) KSHV 非感染細胞(Ramos、 DG75、 Raji)と PEL 細胞(BCBL1、 BC3、 HBL6、 JSC1)を 150  $\mu$ M のカプサイシンで処理し、抗リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204)、ERK1/2、リン酸化 MEK1/2 (S217/S221) MEK1、MEK2、 $\beta$ -actin 抗体で検出した。

B) PEL 細胞(BCBL1、BC3)を各濃度のカプサイシンで 12 時間処理し、抗リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204)、ERK1/2、リン酸化 p90RSK (S380)、p90RSK、 $\beta$ -actin 抗体で検出した。

C) KSHV 非感染細胞(Ramos、 DG75、 Raji)と PEL 細胞(BCBL1、 BC3)を 100  $\mu$ M の U0126 で 24 時間処理し、細胞生存率を測定した。棒グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。\*は  $p < 0.01$ 、\*\*は  $p < 0.001$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig. 3 を一部改変して引用した。

#### 1-3-4. カプサイシンによる p38 MAPK リン酸化の抑制

カプサイシンが ERK リン酸化を抑制したため、ERK と同じく MAPK ファミリーに属する p38 MAPK リン酸化がカプサイシン処理により抑制されるか否か解析を行った。150  $\mu$ M のカプサイシンで 6、12、24 時間処理した KSHV 非感染細胞 (Ramos、 DG75、 Raji)および KSHV 感染 PEL 細胞 (BCBL1、 BC2、 BC3、 HBL6、 JSC1)を処理した。カプサイシン未処理時において、KSHV 非感染細胞と PEL 細胞のどちらでも p38 MAPK リン酸化は検出され、KSHV 非感染細胞と PEL 細胞でリン酸化状態に差はほとんど見られなかった。カプサイシン経時処理は KSHV 非感染細胞と PEL 細胞のどちらにおいても処理後 6 時間から p38 MAPK リン



酸化が抑制された。p38 MAPK リン酸化はカプサイシン処理により HBL6 細胞において最も抑制された。また、40、80、120  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 24 時間処理した BCBL1 と BC3 細胞においても p38 MAPK のリン酸化抑制が見られた (Figure 9B)。ERK シグナルと同様に p38 MAPK シグナル抑制が PEL 細胞増殖を抑制することを確認するため、p38 MAPK シグナルの特異的阻害剤である SB203580 を KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75、Raji) と KSHV 感染細胞 (BCBL1、BC3) に処理し、24 時間後に細胞生存率を測定した。その結果、SB203580 処理により KSHV 非感染細胞の Ramos と Raji 細胞および PEL 細胞の BCBL1 と BC3 細胞では細胞生存率が有意に低下した (Ramos  $p < 0.0001$ , Raji  $p < 0.0001$ , BCBL1  $p = 0.0002$ , BC3  $p = 0.0122$ )。DG75 細胞は SB203580 処理による細胞生存率の低下は見られなかった。

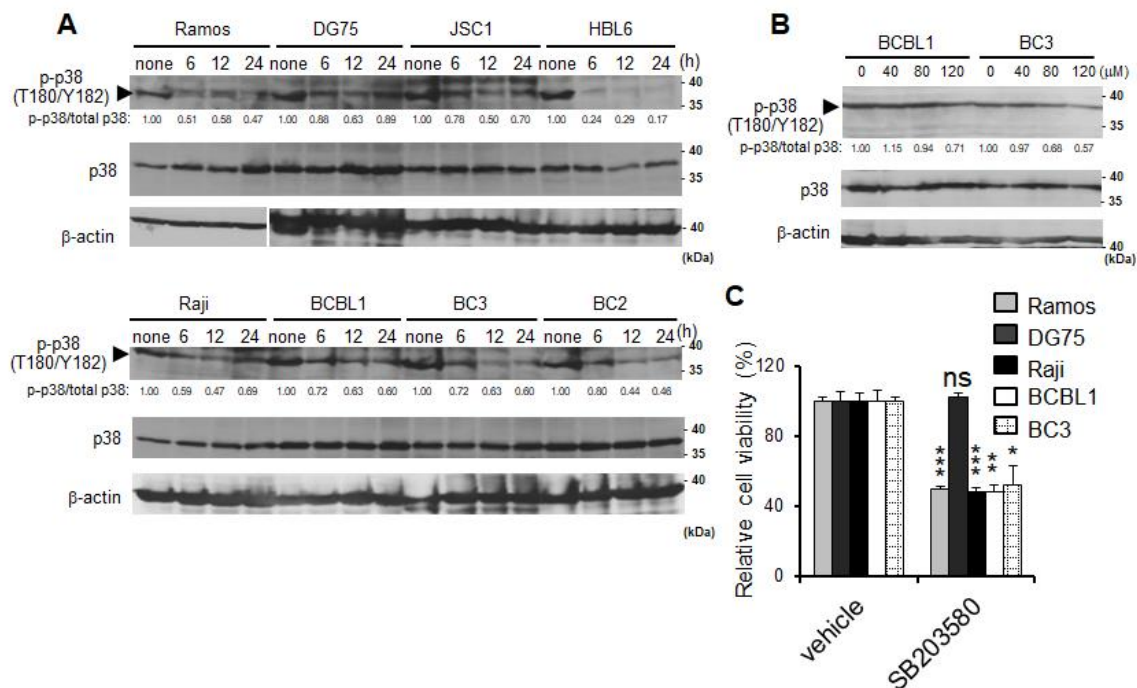


Figure 9 カプサイシン処理による p38 MAPK リン酸化の抑制

- A) KSHV 非感染細胞(Ramos、DG75、Raji)と PEL 細胞(BCBL1、BC2、BC3、HBL6、JSC1)を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで処理し、抗リン酸化 p38 MAPK (T180/Y182)、p38 MAPK、 $\beta$ -actin 抗体で検出した。
- B) PEL 細胞(BCBL1、BC3)を各濃度のカプサイシンで 12 時間処理し抗リン酸化 p38 MAPK (T180/Y182)、p38 MAPK、 $\beta$ -actin 抗体で検出した。
- C) KSHV 非感染細胞(Ramos、DG75、Raji)と PEL 細胞(BCBL1、BC3)を 100  $\mu\text{M}$  の SB203580 で 24 時間処理し、細胞生存率を測定した。棒グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。\*は  $p < 0.01$ 、\*\*は  $p < 0.001$ 、\*\*\*は  $p < 0.0001$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig. 4 を引用した。

#### 1-3-5. カプサイシンによる IL-6 の発現抑制

PEL 細胞では IL-6 などのサイトカイン産生が亢進しており、PEL 増殖を促進することが明らかとなっている。また KSHV 感染時に MAPK の活性化を介して IL-6 の産生が増加することが報告されている<sup>75)</sup>。そこで、PEL 細胞で増加する報告があるサイトカイン IL-6 と IL-10、VEGF-A の発現量について KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75、Raji) と PEL 細胞 (BCBL1、BC2、BC3、HBL6、JSC1) における発現量を RT-リアルタイム PCR 法により解析し、Ramos 細胞における各サイトカインの発現量を 1 として示した (Figure 10)。VEGF-A については、Ramos 細胞と比較して KSHV 非感染細胞の DG75 細胞 と PEL 細胞の BC2、JSC1 細胞において mRNA 発現量が有意に増加していたが、BCBL1、BC3、HBL6 細胞における発現量は Ramos と同程度あるいは少なかった (DG75  $p=0.0007$ , BC2  $p<0.0001$ , JSC1  $p<0.0001$ )。IL-10 については、Ramos 細胞と比較して BCBL1、BC2、JSC1 細胞において発現量が有意に増加していた。また、BC3、HBL6 細胞についてもいずれの KSHV 非感染細胞よりも発現量が多かった (BCBL1  $p=0.002$ , BC2  $p=0.001$ , JSC1  $p=0.001$ )。IL-6 については、Ramos 細胞と比較して BC2、HBL6 細胞において有意に発現量が増加していた (BC2  $p=0.0169$ , HBL6  $p<0.0001$ )。また、BCBL1、BC3、JSC1 細胞についても KSHV 非感染細胞と比較して 10 倍以上の発現増加が見られた。次に、カプサイシン処理がサイトカイン発現に及ぼす影響を解析するため、KSHV 非感染細胞 (DG75、Raji) および PEL 細胞 (BCBL1、BC3) をカプサイシン処理して各サイトカインの発現量を解析した。その結果、VEGF-A についてはカプサイシン処理により DG75、Raji、BC3 細胞において有意に発現量が増加した (DG75  $p=0.0480$ , Raji  $p=0.0055$ , BC3  $p=0.0014$ )。BCBL1 細胞についても発現量増加が見られた。IL-10 については、DG75、Raji、BCBL1 細胞で発現量がわずかに増加したが、BC3 細胞においては変化しなかった。IL-6 については DG75、BCBL1、BC3 細胞において有意に低下し (DG75  $p=0.0464$ , BCBL1  $p=0.0008$ , BC3  $p=0.0083$ )、未処理時と比較した低下度合いは DG75、BCBL1、BC3 細胞に顕著な差はなかった。Raji 細胞においては有意な減少は見られなかった (Figure 10B)。

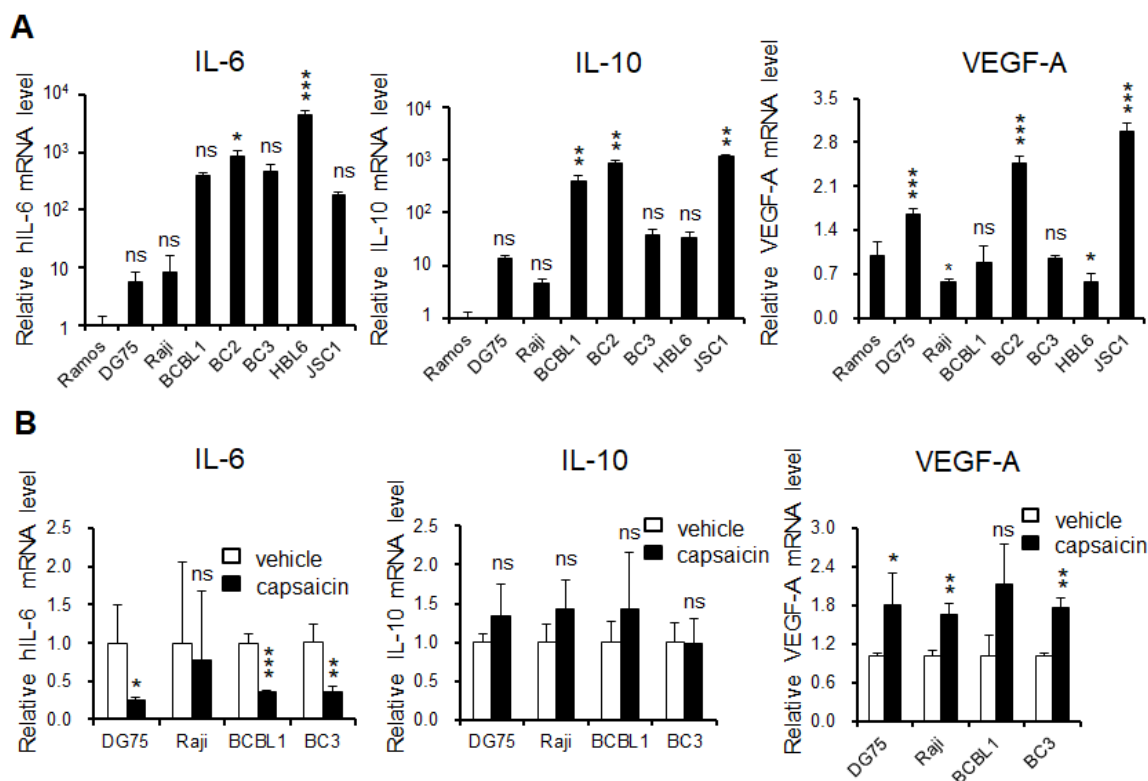


Figure 10 B リンパ腫におけるサイトカイン発現量とカプサイシン処理による IL-6 mRNA 量の減少  
 A) 未処理の B リンパ腫細胞における IL-6 と IL-10、VEGF-A 発現量を Ramos 細胞における発現量を 1 として示した。棒グラフは平均値±SD で表している。\*は p<0.05、\*\*は p<0.01、\*\*\*は p<0.001 を表している。  
 B) 150 μM のカプサイシンで各細胞を 3 時間処理し、各サイトカインの mRNA 量を測定した棒グラフは平均値+SD で表している。棒グラフは平均値±SD で表している。\*は p<0.05、\*\*は p<0.01、\*\*\*は p<0.001 を表しており、溶媒処理した値と比較した。  
 図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig. 5 を引用した。

また、IL-6 中和抗体の培養培地中への添加は KSHV 非感染細胞(Ramos、Raji)と PEL 細胞 (BCBL1、BC3)のいずれの細胞増殖も有意に抑制した (Ramos p=0.0009, Raji p<0.0001, BCBL1 p=0.0232, BC3 p=0.0008, Figure 11A)。

カプサイシンは ERK と p38 MAPK シグナルを抑制した。PEL 細胞における IL-6 産生増加には MAPK シグナル活性化が関与することが報告されている。そこで、これらシグナルの阻害が PEL 細胞における IL-6 産生を抑制するか確認するため、PEL 細胞 (BCBL1)を ERK シグナルあるいは p38 MAPK シグナルの特異的阻害剤 (U0126 と SB203580)で処理した (Figure 11B)。その結果、ERK と p38 MAPK シグナル阻害剤はどちらもカプサイシンと同様に IL-6 の発現を有意に抑制した (U0126 p=0.0002, SB203580 p<0.0001)。

PEL 細胞における IL-6 産生増加には MAPK シグナルのほかに、NF-κB<sup>76)</sup>と JAK-STAT<sup>77)</sup>シ

グナルの関与が報告されている。カプサイシン処理は p65 NF- $\kappa$ B 減少や NF- $\kappa$ B 核内を阻害する I $\kappa$ B $\alpha$ 増加、STAT3 (Y705)リン酸化抑制は引き起こさなかった(Figure 7)。しかし、カプサイシンがこれらのシグナルに影響しないことをさらに確かめるため、p65 NF- $\kappa$ B と STAT3 の核内量を解析した。PEL 細胞 (BC3)を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 11 時間処理し、核と細胞質を分画した。その結果、カプサイシンは、p65 NF- $\kappa$ B と STAT3 の核内量を減少させなかった (Figure 11C)。

KSHV はヒトの IL-6 と約 25%の相同性を持つ vIL-6 をコードしている。そこで、カプサイシン処理が vIL-6 発現量に及ぼす影響を解析するため、PEL 細胞 (BCBL1)をカプサイシンで処理し、vIL-6 発現量を解析した。しかし、カプサイシン処理は vIL-6 発現量を減少させなかった (Figure 11D)。

培地中への IL-6 添加による B リンパ細胞の増殖促進<sup>78)</sup>が報告されていることから、B リンパ腫の増殖を促進するか否か確かめるために KSHV 非感染細胞 (Ramos、DG75、Raji)と PEL 細胞 (BCBL1、BC2、BC3、HBL6、JSC1)の培養培地中に IL-6 を添加した。しかし、KSHV 非感染細胞と PEL 細胞のどちらにおいても増殖促進は見られなかった (Figure 12)。

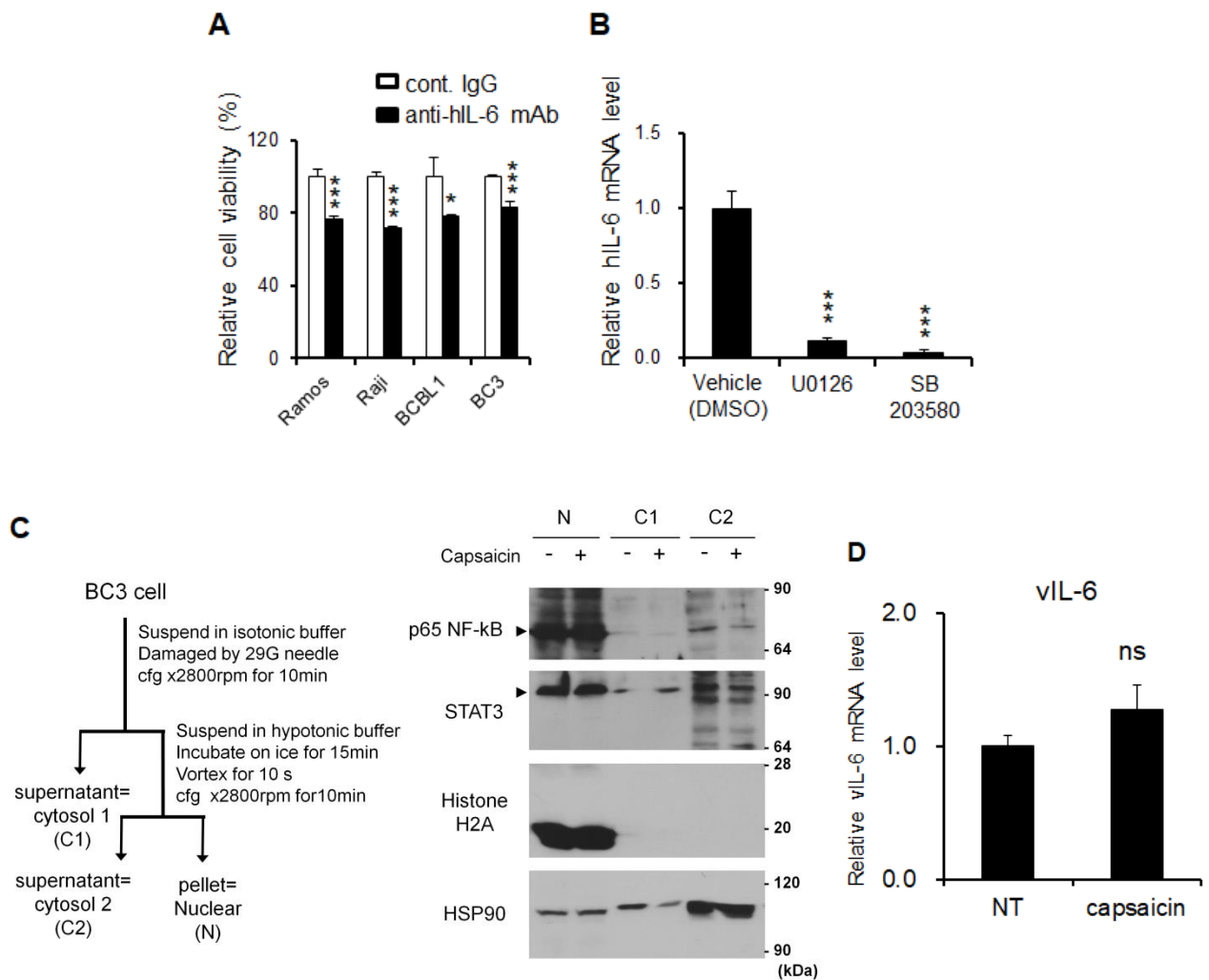


Figure 11 IL-6 中和抗体による B 細胞の生存率低下と MAPK シグナル阻害による IL-6 発現抑制

A) 細胞を新鮮な培地に懸濁し、培養培地中に 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の IL-6 中和抗体もしくはコントロール IgG を添加して 24 時間後に細胞生存率を測定した。棒グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。\*は  $p<0.05$ 、\*\*\*は  $p<0.001$  を表しており、コントロール IgG で処理した値と比較した。

B) BCBL1 細胞を 100  $\mu\text{M}$  の ERK シグナル阻害剤 (U0126)もしくは p38 MAPK 阻害剤(SB203580)で 3 時間処理し、IL-6 の mRNA 量を測定した。棒グラフは平均値 $\pm$ SD で表している。\*\*\*は  $p<0.001$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

C) 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 11 時間処理した BC3 細胞を分画し、核画分と細胞質画分を抗 STAT3、p65 NF- $\kappa$ B、Histone H2A、HSP90 抗体で検出した。Histone H2A は核の、HSP90 は細胞質のマーカーとして用いた。

D) BCBL1 細胞を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 3 時間処理し、vIL-6 mRNA 量を測定した。

図の A, B, D は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig. 6A, B、Fig. S3 を引用した。

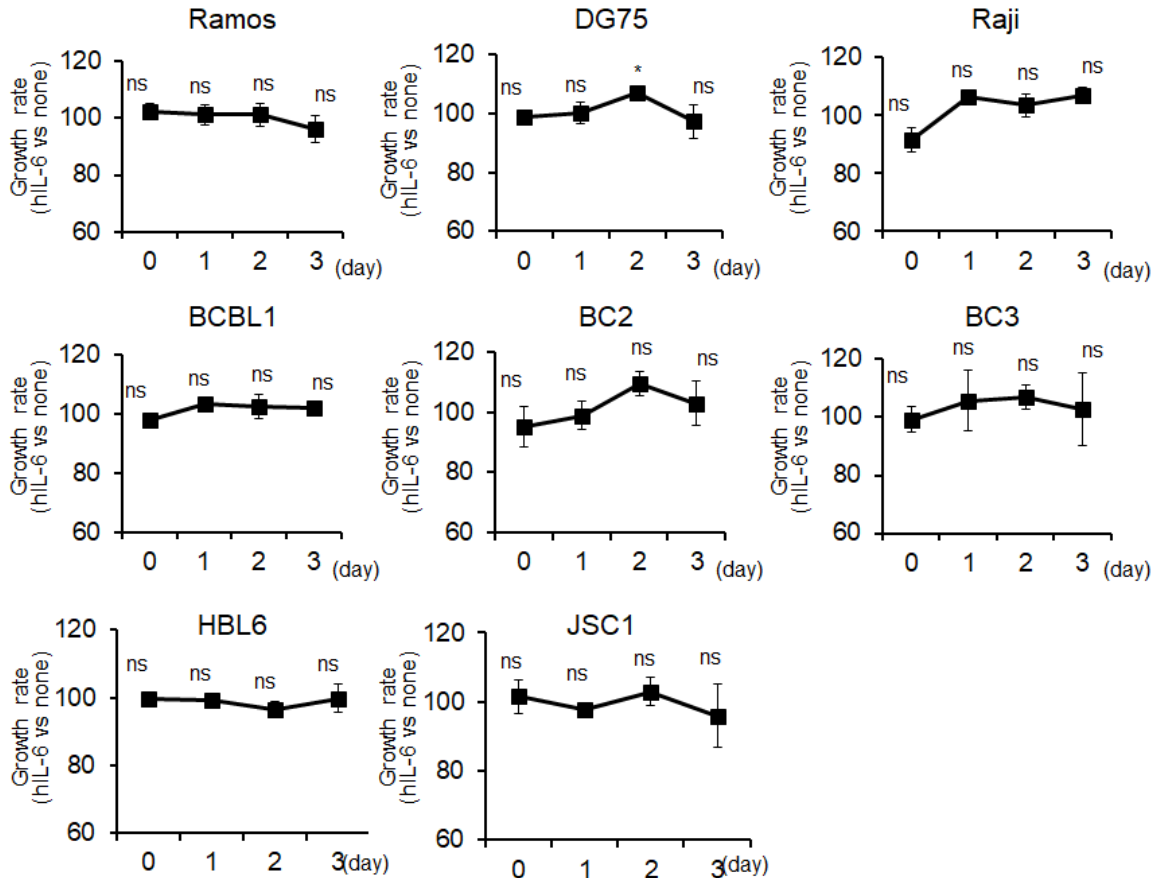


Figure 12 B リンパ腫の増殖に対する組み換え型 IL-6 の影響

$1 \times 10^4$  cells を 10% FBS を含む新鮮な RPMI1640 培地に懸濁し、培養培地中に 10 ng/ mL の組み換え型 IL-6 を添加して 0、24、48、72 時間後に細胞生存率を測定した。グラフは平均値  $\pm$  SD で表している。  
\*は  $p < 0.05$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83. の Fig. S2 を引用した。

### 1-3-6. カプサイシン処理が KSHV 溶解感染期におよぼす影響

PEL 細胞死を誘導する化合物の中には KSHV 溶解感染期を誘導するものも存在し<sup>79-81)</sup>、溶解感染期の誘導は新規 KSHV 感染のリスクを伴う。そこで、カプサイシンが溶解感染期を誘導するか否か明らかにするため、カプサイシン処理した PEL 細胞 (BCBL1) の培養培地中ウイルス量を測定した (Figure 13)。その結果、PEL 細胞死を引き起こす 150  $\mu$ M のカプサイシン処理は溶解感染期を誘導しなかった。また、カプサイシンが溶解感染期以降を阻害するか調べるため、KSHV 溶解感染誘導作用のあるヒストン脱ユビキチン化酵素阻害剤 sodium butyrate (NaB) と PEL 細胞の生存率に影響しない濃度のカプサイシン (40  $\mu$ M) を共処理した。しかし、カプサイシンは NaB により増加したウイルス産生を低下させなかった。

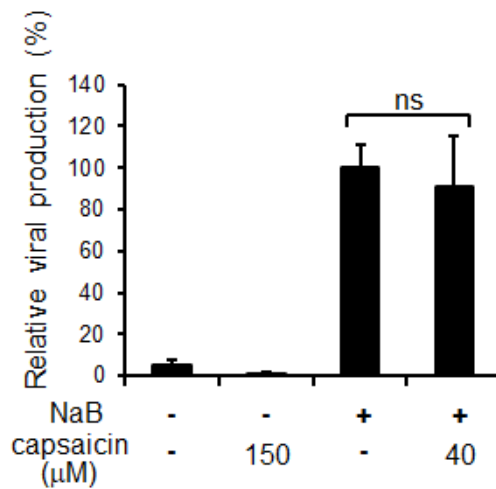


Figure 13 カプサイシン処理が KSHV 溶解感染期に及ぼす影響

BCBL1 細胞をカプサイシンと 3 mM の NaB で処理し、48 時間後に培養上清中のカプシドに包まれたウイルスゲノム量を測定した。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig. 6C を引用した。

#### 1-4. 考察

本章ではカプサイシンが ERK と p38 MAPK シグナルを抑制し、IL-6 発現を抑制することで PEL 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。

カプサイシンは 100-150 μM の範囲で KSHV 非感染細胞と比較して PEL 細胞の増殖を抑制した。一方で、200 μM を超えると KSHV 非感染細胞と PEL 細胞両方の生存率を低下させた。すなわち、200 μM 以上のカプサイシンは非特異的な細胞障害を引き起こすと推察される

カプサイシンが培養 PEL 細胞の増殖抑制効果を示したため、生体内での PEL 増殖も抑制するか否か PEL 移植担がんマウスモデルによる解析を試みた。しかし、カプサイシンは痛みや灼熱感を引き起こすことから、マウス腹腔への投与が困難であった。そこでカプサイシンで処理した PEL 細胞をマウス腹腔に移植してマウス腹腔内での PEL 細胞増殖が抑制されるか否か解析した結果、カプサイシン処理はマウス腹腔内での PEL 増殖を抑制した。移植前のカプサイシン処理が 21 日間に渡って PEL 増殖を抑制するとは考えにくいため、移植直後の腹腔への PEL 定着量の差によるものではないかと推察される。移植後 1 日目から 21 日目にかけてカプサイシン処理群と溶媒処理群の体重増加量の差が大きく開くことはなかった。この理由としては、PEL 移植によるマウスの体調悪化がマウス自身の体重減少や腫瘍成長速度の低下を引き起こしたと推察される。実際に溶媒処理群の体重は移植後 19 日目から減少に転じており、19 日以前からマウスの健康状態が悪化していたのではないかと考えられる。

トウガラシ抽出物はマウスへの発がん促進作用が報告されており<sup>82)</sup>、カプサイシンの変異

原性<sup>83</sup>や発がん作用<sup>84</sup>、トウガラシ摂取の疫学調査による大腸がん<sup>85</sup>や胃がん<sup>86</sup>リスクの増加が報告されている。また、カプサイシン含有量の多いトウガラシの摂取により可逆性脳血管攣縮症候群が引き起こされるという報告もある<sup>87</sup>。可逆性脳血管攣縮症候群は複数の局所的な脳血管狭窄と突然の激しい頭痛を特徴とし、血管作動薬の服用<sup>88</sup>や産褥期<sup>88</sup>、過剰なカテコールアミン<sup>89</sup>、重篤な高血圧<sup>90</sup>などが誘発要因と考えられている。一方で、カプサイシン処理による腫瘍増殖抑制効果やアポトーシス誘導<sup>49, 50, 91</sup>、トウガラシ摂取による死亡率や心血管疾患<sup>92</sup>、慢性腎疾患<sup>93</sup>のリスク低下が報告されている。カプサイシンを含むトウガラシ属の果実は香辛料として数百年に渡って世界中で使用されてきた歴史があり、低用量のカプサイシン摂取は安全性が高いと推察されるが、高用量のカプサイシン摂取は刺激性や安全性の懸念も存在することから、実用可能な PEL 治療薬開発にはカプサイシン誘導体の検討が必要である。

カプサイシンによる PEL 増殖抑制効果の作用機序解析にあたって、カプサイシンは TRPV1 活性化作用を持ち過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  流入は細胞死を引き起こすことから TRPV1 がカプサイシン処理による PEL 増殖抑制効果に關与する可能性は高いと考えた。そこで TRPV1 mRNA 量を解析したが、KSHV 非感染細胞と PEL 細胞の両細胞において TRPV1 発現量は低かった。カプサイシン処理による B リンパ腫細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  流入検出も試みたが、本研究の実験系では検出できなかった。哺乳動物細胞の TRPV1 は数十 nM~数 $\mu\text{M}$  のカプサイシン処理で活性化され  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす<sup>94, 95</sup>が、カプサイシンの PEL 細胞に対する  $\text{CC}_{50}$  は 90  $\mu\text{M}$  以上であった。また、先行研究により報告されている細胞内シグナルの活性化や抑制を介したカプサイシンの腫瘍抑制効果は数十~数百 $\mu\text{M}$  と高濃度で発揮されることが多い<sup>49, 50, 86, 96</sup>。カプサイシンは脂溶性が高い化合物であることから、カプサイシンが細胞膜を透過して細胞内で作用する可能性も十分に考えられる。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  は細胞周期や増殖、アポトーシスなど様々な細胞内イベントに關与する細胞内伝達物質である<sup>97-99</sup>。また、B リンパ腫での TRPV1 発現は少ないことから、TRPV1 を介した B 細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  流入は他の臓器由来細胞より高用量のカプサイシンを必要とする可能性も考えられる。PEL 細胞や KSHV 感染における TRPV1 発現変化や機能制御の研究報告は存在せず、カプサイシンによる PEL 増殖抑制効果への TRPV1 と  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの關与は否定できないため、今後の研究による解明が待たれる。

多くのがんでは p53<sup>100-102</sup> や KRAS<sup>103, 104</sup>、BRAF<sup>105, 106</sup>、BRCA<sup>107, 108</sup>、HER2<sup>109, 110</sup> など細胞増殖促進や細胞死抑制に關与する分子の遺伝子変異により細胞内シグナルに異常が起こることによって引き起こされると考えられている。一方で PEL 細胞は KSHV 感染が原因であり、KSHV が発現するウイルスタンパク質が細胞内シグナルを脱制御することで引き起こされる<sup>111, 112</sup> (Figure 14)。例えば、LANA は C 末端領域を介して p53 と結合し、p53 の転写活性と感染細胞のアポトーシスを抑制する<sup>31</sup>。また、LANA は C 末端領域を介して GSK3 $\beta$  と結合して細胞質から核内へ移動させ、GSK3 $\beta$  による $\beta$ -Catenin リン酸化を阻害することで $\beta$ -Catenin を安定化させ、Wnt 経路を活性化させる<sup>18</sup>。v-Cyclin はヒト Cyclin D2 と 53% の相同性を持ち、CDK6



と結合して pRb の過リン酸化を引き起こすことで E2F を活性化させ、G1 期から S 期へ細胞周期を進める<sup>16)</sup>。v-FLIP は Fas と結合し、Fas によるカスパーゼ-8 活性化を阻害することでアポトーシスを抑制する<sup>15)</sup>。また、v-FLIP は IKK 複合体の内 IKK $\gamma$  と相互作用することで I $\kappa$ B $\alpha$  分解を促進することで NF- $\kappa$ B 経路を活性化させる<sup>21)</sup>。上記以外にも様々な KSHV タンパク質による細胞増殖促進や細胞死抑制が報告されており<sup>113-117)</sup>、KSHV による宿主細胞の乗っ取りが PEL 細胞やカポジ肉腫といった KSHV 関連腫瘍の発症機構と考えられている。ERK や JAK-STAT、Wnt シグナルなど生存や増殖を促進するシグナルは様々ながんで活性化していることが報告されている。しかし、カプサイシン未処理時において、ERK リン酸化や STAT3 リン酸化、 $\beta$ -catenin 発現は KSHV 非感染リンパ腫と比較して PEL 細胞で高い傾向であった (Figure 7, 8A)。すなわち、PEL 細胞の生存や増殖はこれらシグナルに依存しているため KSHV 感染により活性化されるシグナルの阻害剤は PEL 特異的な治療薬となり得ると推察される。

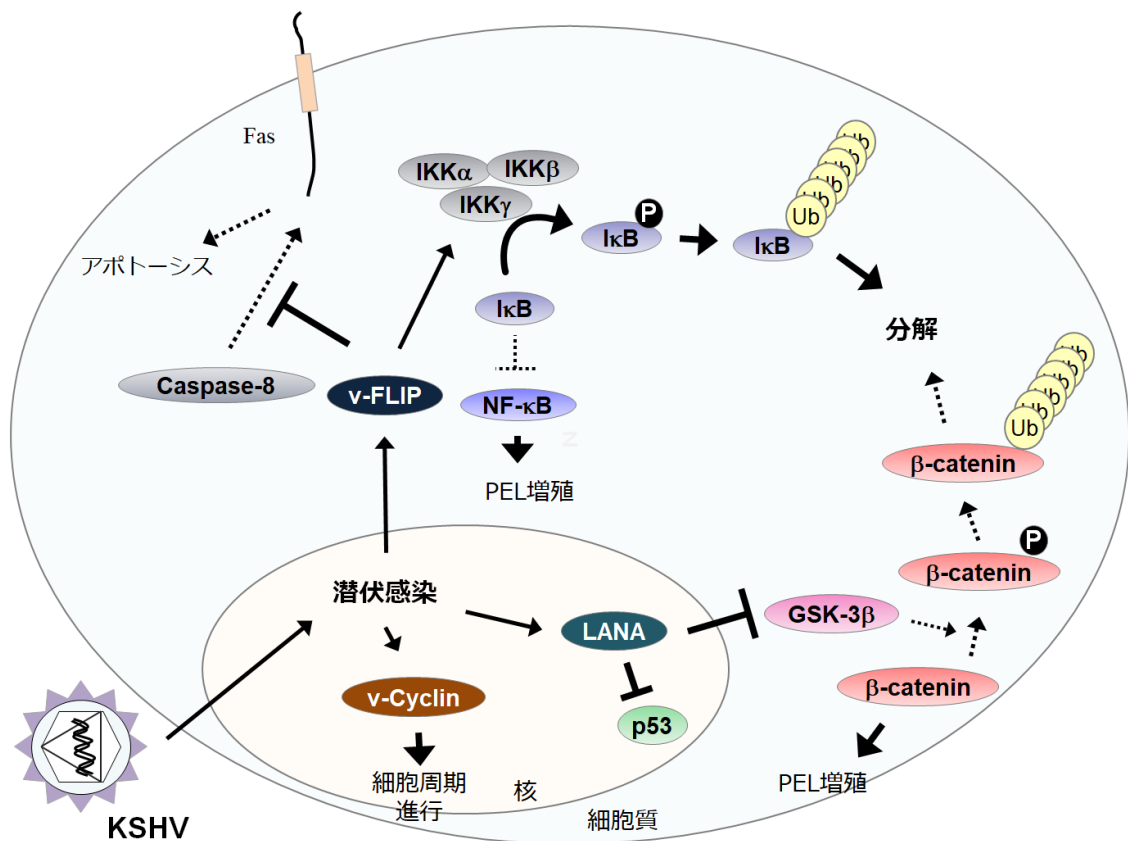


Figure 14 KSHV 潜伏感染時に脱制御されるシグナル伝達

本章においてカプサイシンは PEL 細胞における ERK リン酸化を抑制した。ERK シグナルは細胞の生存や増殖、分化に関わる古典的 MAPK であり、成長因子や細胞接着などの刺激により活性化される<sup>118)</sup>。また、ERK シグナルは KSHV 初期感染の成立<sup>119, 120)</sup>や溶解感染時に活

活性化される<sup>121, 122)</sup>ほか PEL 細胞において恒常的に活性化されており<sup>27)</sup>、vGPCR<sup>123, 124)</sup>や K15<sup>24)</sup>、kaposin A<sup>125)</sup>など様々な KSHV タンパク質により活性化されることが報告されている。ERK シグナルは正常細胞の生存にも関与するシグナルであるが、トラメチニブなど ERK シグナル阻害薬が悪性黒色腫の治療に使用されているように ERK シグナル阻害作用を持つ化合物は本シグナルが活性化している悪性腫瘍の治療薬となる可能性は高い。ERK シグナル阻害を介した PEL 増殖抑制効果を示す化合物も報告されており<sup>126, 127)</sup>、ERK シグナルは PEL 治療の標的となり得ると推察される。カプサイシンは ERK リン酸化を抑制したことから、PEL 細胞で恒常的に活性化されている ERK シグナルを抑制することで PEL 特異的な細胞増殖抑制効果を示すと考えられる。

ERK1 と ERK2 は 85%と高い相同性を持つが、PEL 細胞における ERK1/2 リン酸化状態は細胞株ごとに大きく異なっていた。KSHV 感染と ERK の各アイソフォームの関係はほとんど研究されていないが、ERK1 のみが強力に活性化されていた BCBL1 細胞が PEL 細胞の中でもカプサイシンに抵抗性を示したことから PEL 細胞の生存や増殖促進は主に ERK2 によって担われているのかもしれない。

ERK シグナル特異的阻害剤 U0126 処理は PEL 細胞だけでなく Ramos や Raji 細胞といった KSHV 非感染細胞の生存率も低下させた。その理由としては、200  $\mu\text{M}$  以上のカプサイシンは U0126 と同様に KSHV 非感染細胞の生存率も低下させることから 100-150  $\mu\text{M}$  のカプサイシン処理による ERK シグナル阻害は U0126 処理よりも穏やかなのではないかと推察される。ERK は正常細胞からがん細胞まで様々な細胞の生存や増殖に関与するが、PEL 細胞では KSHV 非感染細胞と比較して ERK シグナルが強力に活性化されているため穏やかな ERK シグナル阻害でも細胞生存率の低下が引き起こされると考えられる。

カプサイシン処理による ERK シグナル阻害の詳細な作用メカニズムとしては、カプサイシンは ERK のリン酸化を抑制したが、MEK のリン酸化は抑制しなかった。すなわち、カプサイシンは MEK から ERK をリン酸化する過程、あるいは MEK 以外の ERK リン酸化酵素を阻害することで ERK シグナルを抑制すると推察される。本研究の過程で放射性同位体と精製 ERK、精製 MEK を用いた *in vitro* キナーゼアッセイも試みた。しかし、ERK の精製抗体が変性状態の ERK を強く認識するため低変性条件では精製量が少なく、カプサイシン未処理状態で MEK による ERK リン酸化が検出できなかった。そのため、カプサイシンによる ERK リン酸化抑制の作用点は明らかになっていない。

カプサイシンは ERK に加え p38 MAPK のリン酸化も抑制した。p38 MAPK は成長因子や細胞ストレスにより活性化され、ストレス応答や炎症反応、増殖など多様な転写因子の発現を促進する<sup>118)</sup>。p38 MAPK は B リンパ細胞性腫瘍など一部の腫瘍で活性化しており<sup>128)</sup>、p38 MAPK 阻害ががん細胞の増殖を抑制することが報告されている<sup>129)</sup>。本研究で用いた KSHV 非感染細胞と PEL 細胞ではカプサイシン未処理時における p38 MAPK リン酸化、すなわち活性化状態に顕著な違いはなかった。また、カプサイシン処理は KSHV 感染細胞と PEL 細胞のどちらにおいても p38 MAPK リン酸化を抑制し、p38 MAPK 特異的阻害剤の SB203580 処理

は PEL 細胞のみでなく KSHV 非感染細胞である Ramos と Raji 細胞の生存率を低下させた。p38 MAPK は細胞増殖シグナルに関与しており<sup>130)</sup>、強力な p38 MAPK シグナル抑制は様々な細胞に毒性を示すことが予想される。

カプサイシン処理が PEL 特異的な細胞増殖抑制効果を示した理由としては、KSHV がコードする様々なウイルスが p38 MAPK 活性化や機能制御を介して PEL 増殖シグナル活性化<sup>75, 124)</sup>やウイルス産生亢進<sup>120, 122)</sup>、初感染促進<sup>120)</sup>を引き起こすことが報告されており、カプサイシン処理による p38 MAPK リン酸化の抑制が結果的にウイルスタンパク質の機能を阻害したためではないかと考えられる。例えば、KSHV がコードする Kaposin B は p38 MAPK の活性化作用に加え、p38 MAPK および p38 MAPK の標的分子 MK2 と相互作用し、p38 MAPK による MK2 リン酸化を促進する<sup>117)</sup>。リン酸化された MK2 は IL-6 mRNA を安定化させ、PEL 細胞の増殖を促進すると考えられている。ウイルスタンパク質の機能発現に p38 MAPK の機能が必要であるため、カプサイシンによる p38 MAPK リン酸化阻害とその結果として引き起こされるウイルスタンパク質の機能阻害が PEL 特異的な細胞増殖抑制効果を示したと推察される。

カプサイシン処理は PEL 細胞での IL-6 産生を低下させた。KSHV 感染によりヒトの IL-6 産生量が増加するメカニズムとして NF- $\kappa$ B と JAK-STAT<sup>77)</sup>、MAPK シグナル活性化<sup>75)</sup>が報告されている。カプサイシン処理は MAPK である ERK と p38 MAPK リン酸化、すなわち活性化を抑制したが、NF- $\kappa$ B の発現量や核内量には影響を及ぼさなかった。STAT3 Y705 リン酸化は一時的に活性化された。カプサイシンによる STAT3 Y705 リン酸化亢進のメカニズムは i) LIF や IL-11 など STAT3 Y705 リン酸化を引き起こす別のサイトカインの関与や ii) ヒトの IL-6 減少に伴う vIL-6 の IL-6R への結合促進の 2 つが考えられる。i) については JAK-STAT シグナル活性化や STAT3 Y705 リン酸化は LIF<sup>131)</sup>、IL-11<sup>132)</sup>、IL-27<sup>133)</sup>、IL-2<sup>134)</sup> など、IL-6 以外のサイトカインによっても誘導されることが知られている。KSHV はサイトカイン産生や免疫関連シグナルを制御することが報告されており、カプサイシン処理による炎症惹起<sup>135)</sup>が報告されている。そのため、カプサイシン処理した PEL 細胞で各サイトカインの産生量や比率に変化があっても不思議ではない。また ii) については、KSHV はヒトの IL-6 と約 25% の相同性をもつ vIL-6 をコードしている<sup>19)</sup>。ヒト IL-6 は下流シグナルを活性化する際、IL-6 受容体と結合したのち gp130 と会合して JAK-STAT シグナルを活性化させ、STAT3 Y705 リン酸化を引き起こす。一方で vIL-6 は gp130 単独でも JAK-STAT シグナルを活性化させるが、IL-6 受容体存在下ではより強力に JAK-STAT シグナルを活性化することが報告されている<sup>136)</sup>。そのため、カプサイシンがヒト IL-6 発現を低下させるとフリーの IL-6 受容体が増えることにより vIL-6 が IL-6 受容体と結合しやすくなり、一時的な STAT3 Y705 リン酸化を引き起こされるのではないかと推察される。STAT3 は IL-10<sup>137)</sup>や VEGF<sup>138)</sup>産生に関与する報告があるため、カプサイシンによる IL-10 と VEGF-A 発現亢進は STAT3 (Y705)リン酸化亢進によるものかもしれない。カプサイシン処理による STAT3 リン酸化抑制を介した PEL 細胞増殖抑制効果も報告されている<sup>139)</sup>が、本研究との結果の違いは細胞培養やカプサイシン処理条件の違いによるものと考えられる。

カプサイシンや ERK シグナル阻害剤 U0126、p38 MAPK シグナル阻害剤 SB203580 処理は KSHV 非感染細胞間あるいは PEL 細胞間でも感受性に差が見られた。DG75 細胞は本研究で用いた B リンパ腫の中でこれら化合物に最も抵抗性を示し、U0126 と B203580 処理でも生存率は低下しなかった。DG75 細胞では白血病や骨髄腫に見られる t(8;14)(q24;q32)転座、すなわちがん原遺伝子である Myc 遺伝子の転座と IgG 遺伝子への結合が生じている<sup>140)</sup>。従って、Myc の過剰発現が細胞がん化に大きく寄与していると推察される。Myc は ERK や p38 MAPK など MAPK ファミリーにより活性化されることが知られているが、DG75 は遺伝子変異により Myc が過剰発現していることからカプサイシンや U0126、SB203580 への感受性が低いのではないかと考えられる。また、JSC1 細胞は本研究で用いた B リンパ腫細胞株の中でカプサイシンに最も高い感受性を示した。宿主細胞に感染した KSHV のほとんどは潜伏感染状態にあり、LANA や v-FLIP など限られた潜伏感染期ウイルスタンパク質のみを発現して細胞がん化を引き起こす<sup>141)</sup>。しかし、複数の溶解感染期ウイルスタンパク質が MAPK シグナル活性化を介した細胞増殖促進作用を発揮することが報告されており<sup>23, 24, 27)</sup>、特に JSC1 は PEL 細胞の中でも溶解感染期ウイルスタンパク質の発現量が多い細胞であると報告されている<sup>142)</sup>。JSC1 はウイルスタンパク質の発現プロファイルが他の PEL 細胞と異なり強力な ERK シグナル活性化などが生じるため、PEL 細胞の中でもカプサイシンへの感受性が高いのではないかと考えられる。他の細胞においてもウイルスタンパク質発現量や遺伝的背景の違いがカプサイシン処理に対する感受性の違いに影響すると推察される。

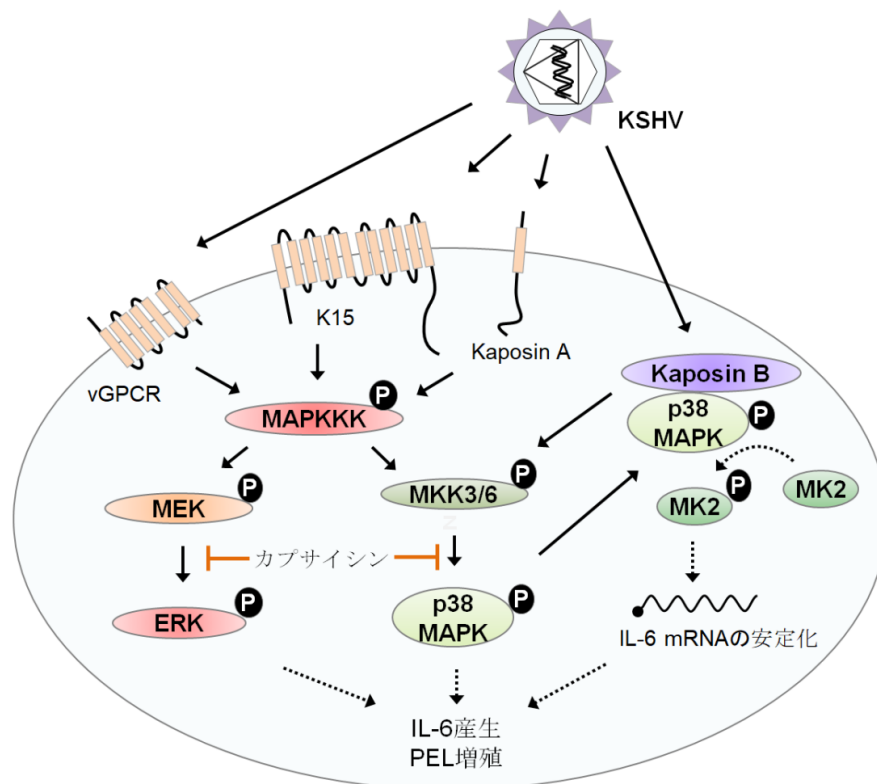


Figure 15 KSHV 感染による MAPK シグナルの活性化とカプサイシンによる抑制

IL-6 は PEL 細胞の増殖に必要であり<sup>28)</sup>、抗 IL-6R 抗体は PEL 細胞の増殖を抑制することが報告されている<sup>143)</sup>。一方で、IL-6 中和抗体や PEL 培養培地中の IL-6 添加は PEL の増殖への影響が小さいことも知られている<sup>30)</sup>。本研究でも IL-6 中和抗体による PEL 増殖抑制は限定的であった。その理由としては、PEL 培養培地中の IL-6 量が非常に多く、中和抗体が足りない可能性が考えられる。また、本研究では IL-6 の培養培地中の添加は PEL 細胞の増殖を促進しなかったが、PEL 細胞自身が産生する IL-6 のみで PEL 増殖に必要な IL-6 量を賄えるのかもしれない。あるいは、IL-6 は PEL 細胞の増殖に寄与するが、PEL 細胞の増殖は IL-6 以外の増殖シグナルに強く依存している可能性も考えられる。一方で、炎症性サイトカインである IL-6 の高発現はがんの予後不良因子として報告されている<sup>144, 145)</sup>ため PEL においても予後不良因子である可能性があり、カプサイシンによる IL-6 発現抑制効果は PEL 患者の予後改善に役立つかもしれない。KSHV はヒトの IL-6 と約 25% の相同性を持つ vIL-6 を持つが、vIL-6 は主に KSHV 溶解感染期に発現する<sup>37, 146)</sup>。PEL や KS の多くは KSHV が潜伏感染状態にあり、数% のみが感染に移行すると考えられている。vIL-6 の中和抗体が PEL 増殖を抑制する報告もあるが<sup>30)</sup>、PEL 培養培地中の vIL-6 量に関する報告は少なく、KSHV がほとんど潜伏感染状態にある PEL 細胞への vIL-6 の影響は不明な点も多い。カプサイシンは vIL-6 発現には影響しなかったことから、カプサイシンによる PEL 細胞の増殖抑制には vIL-6 は関与しないものと考えられる。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 NaB<sup>80)</sup>や小胞体ストレス誘導作用を持つタプシガルジン (Tg)<sup>81)</sup>など PEL 増殖抑制効果を持つ化合物には KSHV 溶解感染期を誘導する物も報告されている。溶解感染期の誘導は新規ウイルス粒子の産生、すなわち新規 KSHV 感染のリスクを高めることからカプサイシンが KSHV 溶解感染を伴わず PEL の増殖を抑制することは PEL 治療において新規感染のリスクを伴わないという点で利点大きい。そのため、カプサイシンは優れた PEL 治療薬のリード化合物となり得ると考えられる。

#### 1-5. 小括

本章ではカプサイシンが ERK と p38 MAPK シグナルを抑制することで IL-6 発現を抑制し、PEL 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。カプサイシンが PEL 治療薬のリード化合物となる可能性が示された。

## 第2章 カプサイシンによる ATF4-CHOP 経路の活性化

### 2-1. はじめに

白金製剤であるシスプラチン<sup>147)</sup>や DNA アルキル化剤シクロフォスファミド<sup>148)</sup>など、DNA と直接相互作用する抗腫瘍薬は DNA 複製阻害や DNA 損傷応答を誘導することで細胞死を引き起こす。一方で、プロテアーゼ阻害薬ボルテゾミブ<sup>149, 150)</sup>やチロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブ<sup>151)</sup>など DNA に直接作用しない抗腫瘍薬によるがん細胞のアポトーシス誘導も報告されている。第1章においてカプサイシン処理が MAPK シグナル阻害を介して PEL 細胞増殖を抑制することを明らかにしたが、カプサイシン処理による PEL 細胞の増殖抑制機構にアポトーシスが関与する可能性も検討する必要がある。

ATF4 と CHOP はともに酸化ストレスや小胞体ストレス、栄養飢餓、紫外線などの細胞ストレスにより増加することが報告されている転写因子である<sup>152)</sup>。ATF4 は腫瘍組織での増加<sup>153)</sup>や、発生<sup>154)</sup>、概日リズム<sup>155)</sup>の形成関与に加え、アポトーシス誘導に関与することが報告されている<sup>153)</sup>。ATF4 と CHOP の増加機構を Figure 16 に示す。細胞が特定のストレスを検知すると翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$ がリン酸化され、翻訳開始因子複合体形成が抑制されることで新規タンパク質合成が低下する。新規タンパク質合成が抑制されると ATF4 の翻訳は促進され、CHOP や GADD34 などのストレス応答因子発現を促進する。CHOP は強制発現細胞においてアポトーシスが誘導される<sup>156, 157)</sup>ことや CHOP 欠損によりアポトーシスが抑制される<sup>158)</sup>ことが報告されていることからアポトーシス促進性の転写因子と考えられている。CHOP によるアポトーシス誘導機構には不明な点も多いが、PUMA<sup>159)</sup>や Bim<sup>160)</sup>といったアポトーシス促進性の Bcl ファミリー発現増加が CHOP によるアポトーシス誘導機構の一つであると考えられている。

第1章ではカプサイシン処理による PEL 増殖抑制効果とそのメカニズムを解析した。その過程でカプサイシン処理がアポトーシス関連分子の活性化や CHOP と ATF4 増加を誘導することを見出したため、本章ではカプサイシン処理による PEL 細胞のアポトーシス誘導機構について解析を行った。

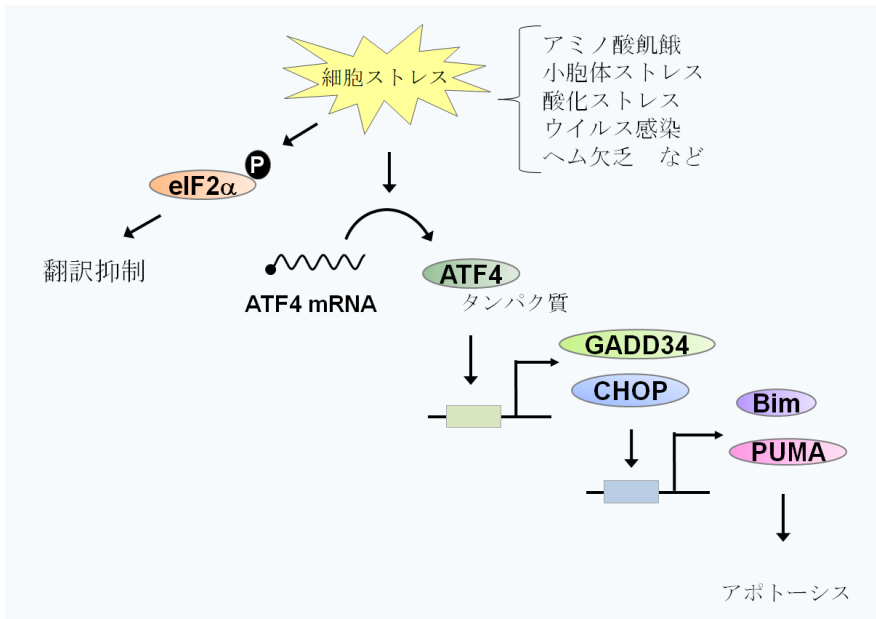


Figure 16 ATF-CHOP 経路の概要

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 試薬調整と抗体

アクチノマイシン D とシクロヘキシミド (CHX)、タプシガルジン (Tg) は DMSO に溶解し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

抗体は以下に記す。

Anti- $\beta$ -Actin mouse monoclonal antibody	$\times 4000$	SC
Anti-cleaved Caspase-3 rabbit polyclonal antibody	$\times 1000$	CST
Anti-Caspase-7 mouse monoclonal antibody	$\times 1000$	BD
Anti-cleaved Caspase-9 rabbit polyclonal antibody	$\times 500$	CST
Anti-cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (9541)	$\times 1000$	CST
Anti-ATF4 rabbit polyclonal antibody	$\times 1000$	SC
Anti-Cyclin D1 rabbit polyclonal antibody	$\times 1000$	SC

### 2-2-2. 細胞の継代

HeLa 細胞は 10% FBS 含有 DMEM を使い、5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  の条件下で培養した。細胞の継代のため、コンフルエントになった細胞を 1.25 mM EDTA 含有 5% トリプシン溶液で処理し、5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  の条件下でインキュベートした。細胞剥離後、DMEM 培地を加えてトリプシン消化反応を止めた。細胞懸濁液を 15 mL チューブに回収し、1,500 rpm、2 分間室温で遠心して細胞を沈降させ、上清を捨てた。再び DMEM 培地で懸濁し、ディッシュまたは

プレートに播種した。

### 2-3. ウェスタンブロット解析

第1章の1-2-6と同様の方法で行った。

### 2-2-4. カスパーゼのタンパク質切断活性測定

各カスパーゼのタンパク質分解活性は Caspase-Glo assay キットを用いて測定した。カスパーゼ Glo assay キットの原理を下記に示す。カスパーゼ Glo assay キットの反応溶液は、ルシフェラーゼおよび各カスパーゼにより特異的に切断される配列ペプチドを結合したルシフェリンを含有する細胞溶解液である。この反応溶液を細胞に添加することで、細胞に活性化したカスパーゼが含まれている場合はルシフェリンに結合したカスパーゼ基質の切断とルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化が連続的に生じる。生じた酸化型ルシフェリン由来の発光を測定することで各カスパーゼのプロテアーゼ活性を測定する。本研究では  $4 \times 10^5$  cells/mL の細胞を 150  $\mu$ M のカプサイシンで処理し、25  $\mu$ L の細胞懸濁液を等量のカスパーゼ Glo assay キットの反応溶液と混合し、マルチプレートリーダーで発光強度を測定した。溶媒処理細胞の発光強度を 1.0 として薬物処理時の活性を算出した。

### 2-2-5. RT-PCR 法による遺伝子発現解析

第1章の1-2-8と同様の方法で行った。使用したプライマーを Table 6 に示す。

Table.6 Real-time RT-PCR に用いたプライマー

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
CHOP	GCTCTGATTGACCGAATGGT	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
ATF4	CCCTCCAACAACAGCAAGGA	ACCCAACAGGGCATCCAAG
GADD34	GAGGGCAGGGAAGTCAATTT	TCCTCCCCTGGGTTCTTATC
uXBP1	ACTCAGACTACGTGCACCTC	GTCAATACCGCCAGAATCCA
Bim	CAGATATGCGCCCAGAGATATG	ACCATTCGTGGGTGGTCTTC
PUMA	ACCTCAACGCACAGTACGAGC	GTAAGGGCAGGAGTCCCATG
sXBP1	CTGAGTCCGCAGCAGGTGCA	GGTCCAAGTTGTCCAGAATGCCAA
ATF6	GGAACTCAGGGAGTGAGCTACAAG	AACCGCTCAACCTTCGAAATG
BiP	GGAATTCCTCCTGCTCCTCGT	CAGGTGTCAGGCGATTCTGG
GRP94	TGATCAGAGACATGCTTCGACG	CTGACCGAAGCGTTGCTGT
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTTCGT	GACAAGCTTCCCCTTCTCAG



#### 2-2-6. 培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション)

トランスフェクション直前に培地を新しい DMEM 培地に交換し、リン酸カルシウム法を用いてプラスミド DNA を細胞に遺伝子導入した。12 well plate にトランスフェクションを行う場合、総容量を 45  $\mu\text{L}$  になるように 3  $\mu\text{g}$  の DNA と DW をよく混合した。その溶液に 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  水溶液を 5  $\mu\text{L}$  加えボルテックスで混合した。さらにその溶液に等量の 50  $\mu\text{L}$  の 2xBBS バッファーを加えボルテックスでよく混合した後、30°C で 10-20 分間反応させることで、トランスフェクション溶液を調製した。80%コンフルエントに達した細胞に上記のトランスフェクション溶液を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター (35°C、3.5% CO<sub>2</sub>) 内で一晩培養した。次に、新しい培地に交換した後、さらに培養 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を続け、12 時間後に化合物処理を行った。以下に培養サイズによるトランスフェクション溶液の調整方法と 2xBBS バッファーの組成を記載する。

##### <培養サイズ別トランスフェクション溶液の組成>

培養サイズ	細胞数	培地量	最大 DNA 量	DNA+DW 量
6 well プレート	2.5 x 10 <sup>6</sup> cells/well	2 mL	5 $\mu\text{g}$	90 $\mu\text{L}$
12 well プレート	5.0 x 10 <sup>5</sup> cells/well	1 mL	2.5 $\mu\text{g}$	45 $\mu\text{L}$
24 well プレート	2.5 x 10 <sup>5</sup> cells/well	0.5 mL	1.25 $\mu\text{g}$	22.5 $\mu\text{L}$

##### 培養サイズ 2.5 M $\text{CaCl}_2$ 2xBBS バッファー 総量

6 well プレート	10 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
12 well プレート	5 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
24 well プレート	2.5 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

##### <2xBBS バッファー>

50 mM BES  
280 mM NaCl  
1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### 2-2-7. レポーターアッセイ

プロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミド DNA と、内部標準として pSV- $\beta$ -Gal プラスミド DNA を用いて、実験を行った。6-24 well-plate 上でリン酸カルシウム法により、各レポータープラスミド DNA を遺伝子導入した細胞を、氷冷した PBS で 2 回洗浄した後、cold lysis buffer 100-500  $\mu\text{L}$  を加えて -80 で凍結し、融解して半解凍状態 10 秒間ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。細胞溶液を 15000 rpm、5 分、4°C で遠心し、回収した上清を細

胞抽出液とした。この細胞抽出液 20  $\mu$ L に対して、buffer A を 20  $\mu$ L を加え室温で 15 分静置した。室温に調整したサンプルとホタル・ルシフェリンを含む buffer B を穏やかに 3 回ピペッティングすることで混合した後、ホタル・ルシフェリンの発光を 5 秒間の積算値として測定した。次に、細胞数と遺伝子導入効率の差異により生じるサンプル間の誤差を補正するため、下記の手順で $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した。細胞抽出液 10  $\mu$ L に対して、1x Z buffer 68  $\mu$ L と 4 mg /mL ONPG 水溶液 22  $\mu$ L をよく混合し、37°C で 30 分間反応させた後、420 nm (参照波長 600 nm) における吸光度を測定した。各サンプルのホタル・ルシフェリンの発光強度値を吸光測定値で割ることで、補正したレポーター活性値を算出した。

cold lysis buffer と buffer A、 buffer B、 1x Z buffer の組成を以下に示す。

<cold lysis buffer>

50 mM Tris (pH 7.8)

1 mM DTT

0.05%

Np-40 \_\_\_\_\_

<Buffer A>

25 mM Glycylglycine

5 mM KCl

15mM MgSO<sup>4</sup>

4mM EGTA (pH 7.8)

5mM ATP \_\_\_\_\_

<Buffer B>

25mg D-Luciferin potassium

Buffer A 78.5 mL \_\_\_\_\_

<1x Z buffer>

10 mM Na-phosphate buffer (pH7.5)

0.1 mM KCl

0.02 mM MgSO<sub>4</sub>

0.4 mM 2-mercaptoethanol \_\_\_\_\_

#### 2-2-8. プラスミド

5つの ATF6 (N 末端)結合配列が組み込まれた p5xATF6-pGL3 は Addgene より購入した。  
pGL3-CHOP と pGL3-BiP は明治大学 吉田健一教授から恵与された。  
pSV-β-Gal プラスミド DNA は Promega 社から購入した。

#### 2-2-9. プラスミド精製

プラスミド精製は PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit を用いて添付プロトコル通りに行い、プラスミドを精製した。精製したプラスミドは 1x TE バッファーに溶解して使用した。  
1x TE バッファーの組成を以下に示す。

<1x TE buffer>

10 mM Tris-HCl (trishydroxymethylaminomethane-HCl)

1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH8.0)

#### 2-2-10. 統計処理

1-2-13 と同様の方法で行った。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. カプサイシン処理による PEL 細胞のアポトーシス誘導

カプサイシン処理が PEL 細胞のアポトーシスを誘導するか否か、カスパーゼ Glo アッセイによりカスパーゼのプロテアーゼ活性を測定することで解析した (Figure 17A)。KSHV 非感染細胞 (Ramos) と PEL 細胞 (BC3 細胞) を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 5 時間処理した結果、カプサイシンは Ramos 細胞内のカスパーゼを活性化させなかった。一方で、カプサイシンは BC3 細胞においてはカスパーゼ-8 のプロテアーゼ活性には影響しなかったが、カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3/7 のプロテアーゼ活性を有意に亢進させた (カスパーゼ-9  $p=0.024$ , カスパーゼ-3/7  $p=0.002$ )。また、カプサイシン処理した細胞におけるカスパーゼの活性化型切断断片の検出をウェスタンブロット法で試みた。KSHV 非感染細胞 (DG75) と PEL 細胞 (BC3、HBL6、JSC1) を各濃度のカプサイシンで 12 時間処理した結果、DG75 ではカスパーゼ-7 の切断断片は検出されなかったが、BC3、HBL6、JSC1 ではカスパーゼ-7 の切断断片が増加した。BC3 細胞は 50  $\mu\text{M}$ 、HBL6 と JSC1 細胞は 100  $\mu\text{M}$  から増加した。さらに、カスパーゼにより切断を受ける PARP の切断断片も BC3 と JSC1 細胞では 100  $\mu\text{M}$ 、HBL6 細胞では 125  $\mu\text{M}$  から増加した (Figure 17B)。また、KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC3、HBL6、JSC1) を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 6、12、24 時間処理した結果、Raji 細胞ではカスパーゼ-3 の切断断片は検出されず、24 時間処理でカスパーゼ-9 の切断断片がわずかに増加した。一方で、BC3、HBL6、JSC1 細胞では 6 時間後からカスパーゼ-3、カスパーゼ-9 の両方の切断断片が増加した (Figure 17C)。以上の結果より、カプサイシンは内因性アポトーシス経路を活性化させて PEL 細胞のアポトーシスを誘導すると考えられる。

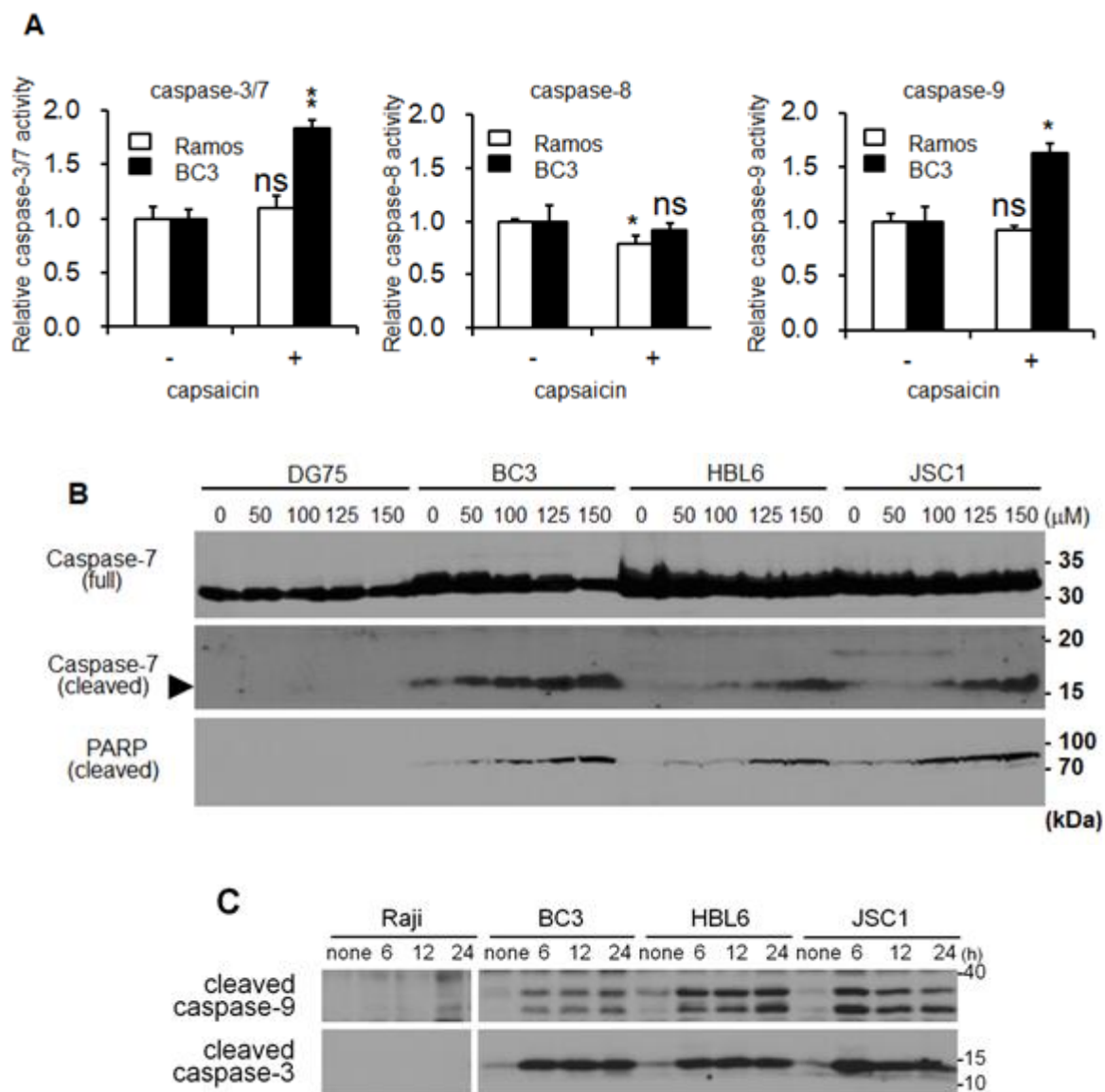


Figure 17

A) KSHV 非感染細胞 (Ramos)と PEL 細胞 (BC3)を 150 μM のカプサイシンで 5 時間処理してカスパーゼのプロテアーゼ活性を測定し、未処理時の発光量を 1 として示した。グラフは平均値±SD で表している。\* は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.005$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

B) KSHV 非感染細胞 (DG75)と PEL 細胞 (JSC1、HBL6、BC3)をカプサイシンで 12 時間処理し、抗 Caspase-7、切断型 PARP 抗体で検出した。

C) KSHV 非感染細胞(Raji)と PEL 細胞 (JSC1、HBL6、BC3)を 150 μM のカプサイシンで処理し、抗切断型 Caspase-9、切断型 Caspase-3 抗体で検出した。

図は、*Front. Oncol.* **2019**,19, 83.の Fig. 2 と *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432.の Fig. 2 を一部改変して引用した。

### 2-3-2. カプサイシン処理による CHOP 発現上昇

第1章においてカプサイシンによる PEL 増殖抑制の作用機序を解析する過程で、細胞増殖抑制やアポトーシスを誘導するストレス応答についても解析した。その結果、内因性アポトーシス誘導に関与する転写因子 CHOP 発現をカプサイシンが増加させることを見出した (Figure 18A)。KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC2、BC3、HBL6、JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 3 時間処理し、CHOP の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析したところ、KSHV 非感染細胞と PEL 細胞の両細胞において CHOP 発現が有意に増加した (Raji  $p=0.0014$ , BC2  $p=0.0002$ , BC3  $p=0.0004$ , HBL6  $p=0.0018$ , JSC1  $p=0.0047$ )。カプサイシン処理による CHOP 発現は KSHV 非感染細胞の Raji 細胞が最も低く、JSC1 細胞が最も高かった。転写因子 CHOP は小胞体ストレスなど細胞ストレスにより発現が増加し<sup>161, 162</sup>、アポトーシス誘導性 Bcl ファミリーの PUMA<sup>159</sup> や Bim<sup>160</sup> などアポトーシス関連因子発現を促進する。カプサイシン処理による CHOP 発現上昇は PEL 細胞で多い傾向にあったが、KSHV 非感染細胞の Raji 細胞でも CHOP 増加が認められた。そこで、カプサイシンは細胞株に関わらず CHOP 発現を誘導するのではないかと考え、カプサイシン処理が CHOP 遺伝子の転写を活性化させるか否かレポーターアッセイで解析を行った。CHOP 遺伝子上流配列を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを HeLa 細胞に導入し、カプサイシンで処理した (Figure 18B)。その結果、カプサイシンは CHOP 遺伝子上流のプロモーター活性を亢進させた ( $p=0.0048$ )。Tg は小胞体ストレス誘導作用を持つ化合物であり、CHOP 発現のポジティブコントロールとして用いた。

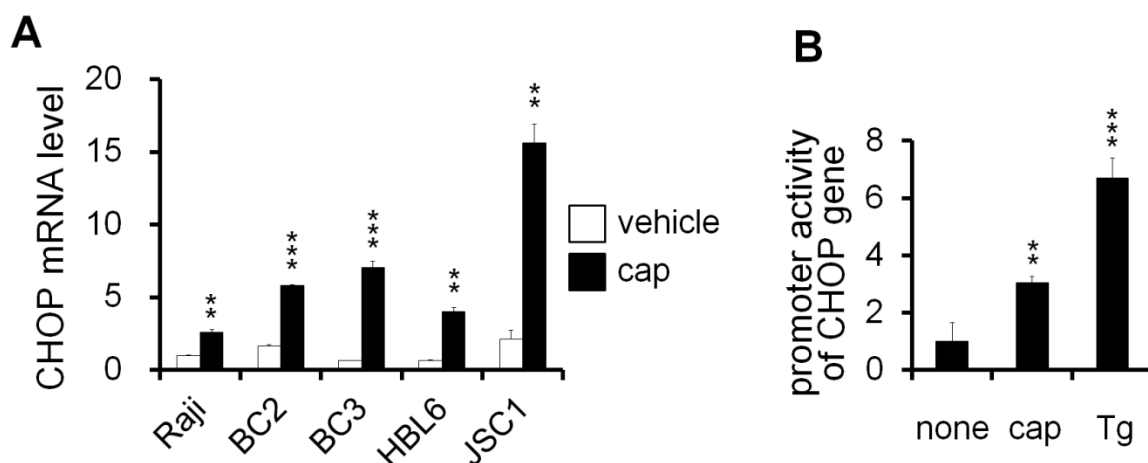


Figure 18 カプサイシンによる CHOP 発現誘導

A) KSHV 非感染細胞 (Raji)と PEL 細胞 (BC2 と BC3、HBL6、JSC1)を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで処理して 3 時間後に mRNA を回収してリアルタイム PCR 法により解析し、溶媒処理時の Raji 細胞における発現量を 1 として示した。\*\*は  $p < 0.005$ 、\*\*\*は  $p < 0.0005$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

B) CHOP 遺伝子上流配列を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドをリン酸カルシウム法で HeLa 細胞に導入し、150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 12 時間処理してルシフェラーゼアッセイを行った。発光量を b-Gal アッセイの値で補正し、溶媒処理時の値を 1 として示した。\*\*は  $p < 0.005$ 、\*\*\*は  $p < 0.0005$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

図は、*Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432.の Fig. 1A、B より一部改変して引用した。

### 2-3-3. カプサイシン処理による ATF4 翻訳促進

カプサイシン処理は CHOP 発現を促進したため、次に CHOP 発現に関わる転写因子の解析を試みた。CHOP 発現を促進する転写因子として、ATF4 に着目した。ATF4 は発生<sup>154</sup>)や概日リズム形成<sup>155</sup>)に関わるほか、アミノ酸飢餓<sup>163</sup>)や小胞体ストレス<sup>164</sup>)、グルコース飢餓<sup>165</sup>)、ウイルス感染<sup>166</sup>)、ヘム欠乏<sup>167</sup>)など様々な細胞ストレスにより増加するストレス応答タンパク質であり CHOP 発現を誘導することが知られている。そこで、カプサイシンが ATF4 量を増加させるか否か解析を行った。KSHV 非感染細胞 (Raji)と PEL 細胞 (BC3、HBL6、JSC1)を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 6、12、24 時間処理して ATF4 タンパク質量を解析した (Figure 19A)。その結果、BC3 ではカプサイシン処理 6 時間後から ATF4 が増加し、24 時間後に減少した。HBL6 細胞では 6 時間後から 24 時間後まで ATF4 が増加した状態が続いた。JSC1 細胞では 6 時間後に増加し、12 時間後には減少した。Raji 細胞では 6 時間後にわずかな ATF4 増加が見られた。

カプサイシン処理で ATF4 増加が見られたため、CHOP と同様に ATF4 により転写活性化される GADD34 発現も解析した。KSHV 非感染細胞 (Raji)と PEL 細胞 (BC2、BC3、HBL6、JSC1)を 150  $\mu\text{M}$  のカプサイシンで 3 時間処理し、CHOP の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、CHOP と同様に KSHV 非感染細胞と PEL 細胞のどちらにおいても

有意に GADD34 が増加した (Raji p=0.0044, BC2 p=0.0023, BC3 p=0.0033, HBL6 p=0.0003, JSC1 p=0.0012)。JSC1 細胞において増加量が最も多く、Raji 細胞において増加量が最も少なかった。

カプサイシン処理による ATF4 増加が明らかとなったため、ATF4 増加のメカニズムを明らかにすることを目的としてカプサイシン処理により ATF4 mRNA 量が増加するか否か解析した (Figure 19B)。KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC2, BC3, HBL6, JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 3 時間処理し、ATF4 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、Raji と BC3 細胞では有意な ATF4 mRNA 量の増加が見られたが、溶媒処理と比較して増加量は 1.5 倍以下と少なかった (Raji p=0.0122, BC3 p=0.0411)。BC2, HBL6, JSC1 細胞では有意な増加は見られなかった。以上の結果より、カプサイシンは ATF4 タンパク質を増加させるが ATF4 の顕著な転写活性化は引き起こさないことが示された。

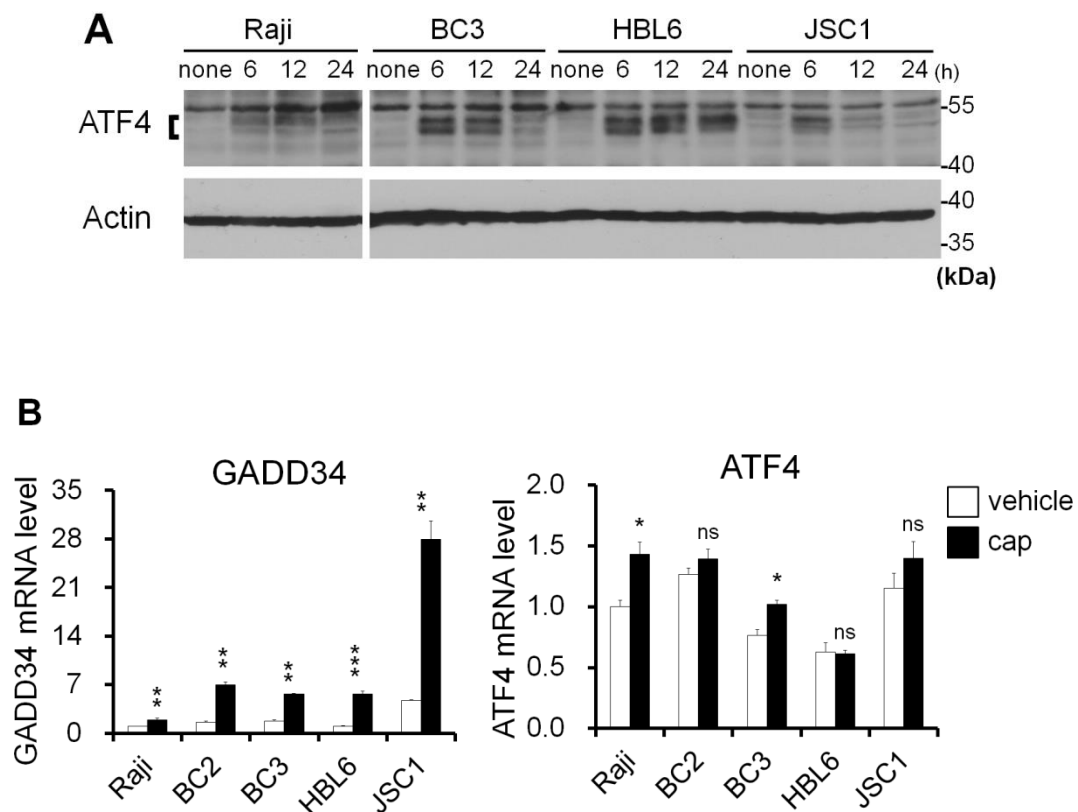


Figure 19 カプサイシン処理による ATF4 タンパク質増加

A) KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC3, HBL6, JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで処理し、抗 ATF4、 $\beta$ -actin 抗体で検出した。

B) KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC2, BC3, HBL6, JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 3 時間処理して回収した RNA をリアルタイム PCR 法で解析し、溶媒処理時の Raji 細胞における発現量を 1 として示した。\*は p<0.05、\*\*は p<0.005、\*\*\*は p<0.0005 を表しており、溶媒処理した値と比較した。図は、*Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432. の Fig. 1A、Fig. 2B を一部改変して引用した。



ATF4 は非ストレス存在下では mRNA は豊富に存在するが転写はほとんど行われておらず、細胞ストレスにより翻訳が促進されることが知られている。一方で、ATF4 転写亢進による発現増加<sup>154)</sup>やユビキチン・プロテアソーム系による ATF4 タンパク質の分解<sup>168)</sup>も報告されている。そこで最初に、カプサイシン処理による ATF4 タンパク増加が転写促進か翻訳促進のどちらによるものかを明らかにするために転写阻害作用を持つアクチノマイシン D と翻訳阻害作用を持つシクロヘキシミド (CHX)を用いて実験を行った。アクチノマイシン D もしくは CHX で 5 分間前処理した PEL 細胞 (HBL6)をカプサイシン処理し、ATF4 増加が抑制されるか解析した (Figure 20A)。その結果、アクチノマイシン D 処理ではカプサイシン処理による ATF4 増加は抑制されなかったが、CHX 処理により ATF4 増加は抑制された。以上の結果から、カプサイシンは転写ではなく翻訳の過程を促進することで ATF4 を増加させると考えられる。

また、カプサイシン処理による ATF4 タンパク質安定性への影響も解析した (Figure 20B)。無刺激状態では細胞内 ATF4 量が少ないことから、HBL6 細胞をカプサイシンで 6 時間処理して ATF4 を発現させた。その後 30 分間 CHX 処理して新規タンパク質合成を阻害し、細胞を洗浄して新たにカプサイシンもしくは溶媒で経時的に処理し、ATF4 タンパク質を検出した。その結果、カプサイシン処理に関わらず ATF4 は 2 時間以内に速やかに分解された。すなわち、カプサイシン処理にかかわらず ATF4 タンパク質の半減期は短いと考えられる。以上の結果から、カプサイシンは ATF4 の翻訳を促進することが示唆された。

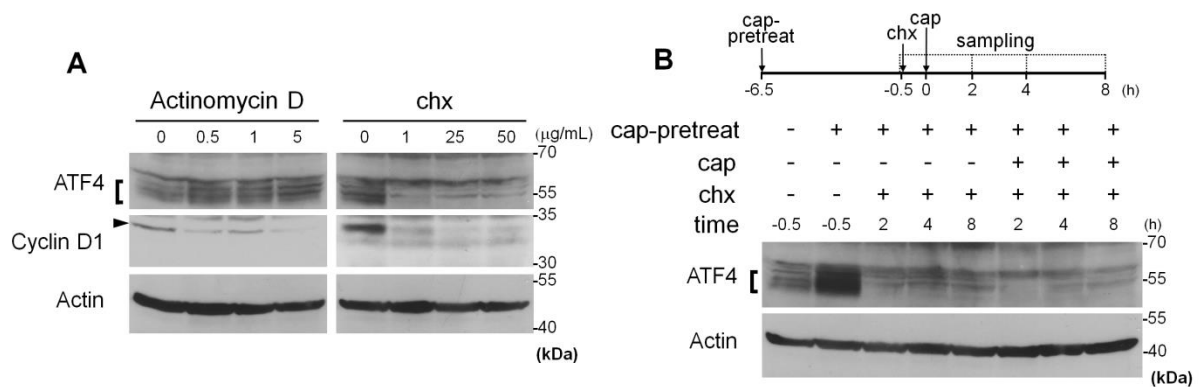


Figure 20 カプサイシン処理による ATF4 の翻訳促進

A) カプサイシンが ATF4 発現と翻訳に及ぼす影響を解析した。HBL6 細胞をアクチノマイシン D もしくは CHX で 5 分処理し、PBS で 1 回洗浄したのち 150 μM のカプサイシンで処理した。6 時間後に細胞を回収し、抗 ATF4 抗体、Cyclin D1、β-actin 抗体で検出した。

B) カプサイシンが ATF4 タンパク質の安定性に及ぼす影響を解析した。未処理細胞での ATF4 発現量が少ないため HBL6 細胞をカプサイシンで 6 時間前処理し、PBS で洗浄した。その後 50 μg/mL の CHX で 30 分処理した。2、4、8 時間後に細胞を回収し、抗 ATF4、β-actin 抗体で検出した。

図は、*Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432.の Fig.2C、D を引用した。

#### 2-3-4. カプサイシン処理によるアポトーシス誘導性 Bcl ファミリー-PUMA 発現増加

これまでの結果によりカプサイシンによる ATF4 翻訳促進と CHOP 発現増加が示された。そこで次に CHOP の下流でアポトーシス誘導に関与する分子としてアポトーシス誘導性 Bcl ファミリーの発現を解析した (Figure 21)。KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC2、BC3、HBL6、JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 3 時間処理し、Bim と PUMA の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。カプサイシン未処理時において Bim は Raji 細胞と比較して PEL 細胞において発現が抑制されていた。カプサイシン処理では Raji、BC2、BC3、JSC1 細胞において有意な増加が見られた (Raji p=0.0013, BC2 p=0.0028, BC3 p=0.0488, JSC1 p=0.0048)。しかし、Raji と BC3 細胞における増加量は 1.5 倍以下と少なかった。カプサイシン未処理時における PEL 細胞での PUMA 発現量は Raji 細胞と同等あるいはやや少なかった。一方で、カプサイシン処理により BC2、BC3、HBL6、JSC1 細胞において有意な PUMA 発現増加が見られた (BC2 p=0.0038, BC3 p=0.0031, HBL6 p=0.0003, JSC1 p=0.0004)。Raji 細胞においては有意な増加は見られず、増加量も PEL 細胞と比較して少なかった。

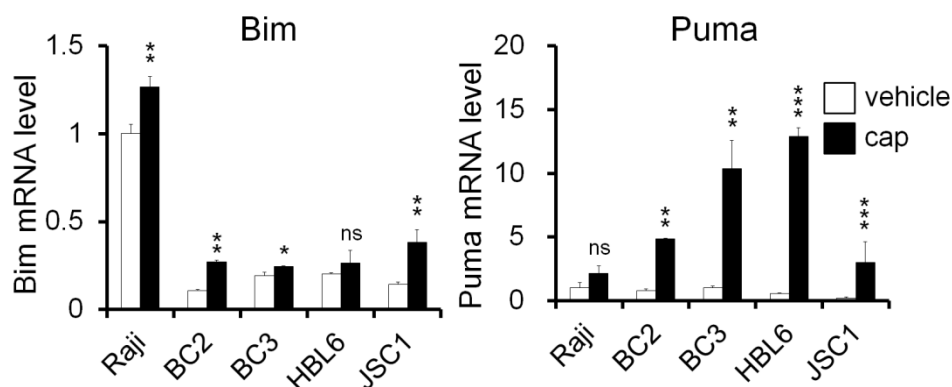


Figure 21 カプサイシン処理によるアポトーシス誘導性 Bcl ファミリーの PUMA 発現増加

KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC2、BC3、HBL6、JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 12 時間処理し、RNA を回収してリアルタイム PCR 法で解析した。溶媒処理時の Raji 細胞における発現量を 1 として示した。\*は p<0.05、\*\*は p<0.005、\*\*\*は p<0.0005 を表しており、溶媒処理した値と比較した。

図は、*Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432. の Fig.1C を一部改変して引用した。

#### 2-3-5. カプサイシンによる小胞体ストレス応答への影響

ATF4 翻訳促進や CHOP 発現増加を引き起こす細胞ストレスとして、小胞体ストレス応答 (UPR) が広く知られている<sup>169)</sup>。また、KSHV 潜伏感染による UPR の抑制と小胞体ストレス誘

導剤による PEL 細胞のアポトーシス誘導が先行研究により報告されている<sup>81)</sup>。そこで、カプサイシンが UPR を惹起するか否かリアルタイム PCR 法により UPR 関連分子の変化を解析した (Figure 22)。KSHV 非感染細胞 (Raji) と PEL 細胞 (BC2、BC3、HBL6、JSC1) を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 3 時間処理し、UPR 関連分子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、JSC1 細胞において ATF6 の有意な発現増加が見られたが、他の細胞において BiP や GRP94、ATF6 の発現増加は見られなかった。また、小胞体ストレスが負荷されると XBP1 のスプライシングが亢進し、スプライシングを受けた XBP1 はシャペロンなどのストレス応答分子の発現を増加させることが知られている。unspliced XBP1 (uXBP1) は BC2 のみで有意に増加し、spliced XBP1 (sXBP1) は BC2、BC3、HBL6 において有意に増加した。uXBP1 量に対する sXBP1 量比の増加、すなわち XBP1 スプライシング亢進は HBL6 においてのみわずかに見られた (Figure 22A)。2-3-3 では CHOP の上流因子として ATF4 増加を見出したが、CHOP 発現は膜タンパク質 ATF6 から切り離された N 末端 (ATF6 (N)) によっても増加することが知られている<sup>169)</sup>。2-3-2 よりカプサイシン処理による CHOP 遺伝子上流の転写活性化は HeLa 細胞でも見られたため、ATF6 結合配列や BiP 遺伝子上流配列を組み込んだプラスミドを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。しかし、ATFF6 結合配列と BiP 遺伝子上流のどちらもカプサイシン処理による転写活性化は見られなかった (Figure 22B)。Tg は小胞体ストレス誘導作用を持つ化合物であり、BiP 発現と ATF6 転写活性のポジティブコントロールとして用いた。以上の結果より、カプサイシン処理は HBL6 や JSC1 といった一部の PEL 細胞において UPR をわずかに活性化させるか、あるいはほとんど影響しないと考えられる。

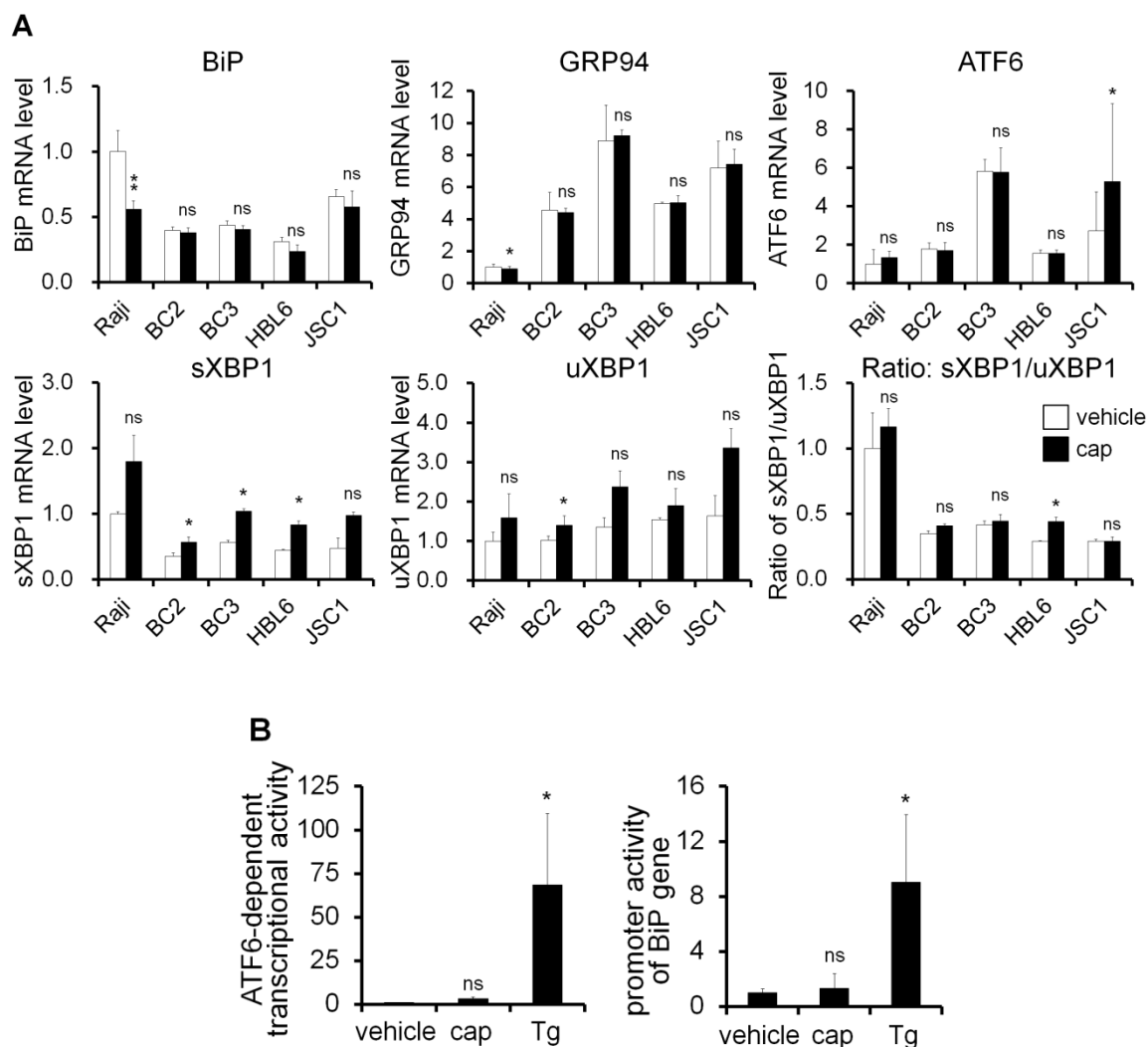


Figure 22 カプサイシン処理が UPR 関連節へおよぼす影響

A) KSHV 非感染細胞 (Raji)と PEL 細胞 (BC2、BC3、HBL6、JSC1)を 150  $\mu$ M のカプサイシンで 3 時間処理し、RNA を回収してリアルタイム PCR 法で解析した。溶媒処理時の Raji 細胞における発現量を 1 として示した。\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.005$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

B) ATF6 結合配列や BiP 遺伝子上流配列を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドをリン酸カルシウム法で HeLa 細胞に導入し、150  $\mu$ M のカプサイシンで 12 時間処理してルシフェラーゼアッセイを行った。発光量を b-Gal アッセイの値で補正し、溶媒処理時を 1 として示した。\*\*は  $p < 0.005$ 、\*\*\*は  $p < 0.0005$  を表しており、溶媒処理した値と比較した。

図は、*Biol. Pharm. Bull.* **2019**, 42, 1428-1432.の Fig.1A、Fig. 2A より一部改変して引用した。

## 2-4. 考察

カプサイシンは PEL 細胞のアポトーシスを誘導し、ATF4 タンパク質の増加と CHOP、PUMA 発現を誘導した。第 1 章ではカプサイシン処理による ERK と p38 MAPK シグナルの抑制を明らかにした。ERK や Akt など増殖と生存を促進する細胞内シグナルは Bcl ファミリーやカスパーゼなどアポトーシス関連分子の発現や機能抑制により細胞死を抑制することが報告されている<sup>170-172)</sup>。また、MEK や Rafなどを標的とした抗腫瘍薬は細胞周期を停止させるだけでなくアポトーシスを誘導することも報告されている<sup>172, 173)</sup>。そのため、ERK シグナル抑制はカプサイシンによる PEL 細胞のアポトーシス誘導に関与する可能性がある。

がんは遺伝子変異による DNA 損傷応答抑制や増殖シグナル活性化に加え、増殖亢進による低酸素<sup>174)</sup>、栄養飢餓<sup>175)</sup>、タンパク質合成量増加<sup>176)</sup>など細胞内外の環境変化に適応するため多様な細胞内シグナルを変化させる。これら細胞内シグナルの変化はがんの生存と増殖に重要である一方で、がん細胞が低分子化合物や放射線、酸化ストレスや小胞体ストレスなどの細胞ストレスといった刺激に高い感受性を示す要因と考えられている。実際に、タンパク質合成を行う小胞体や栄養素の代謝を担うミトコンドリアの働きを阻害する化合物や活性酸素を発生させる化合物によりがん細胞死を誘導することが報告されている<sup>177-179)</sup>。すなわち、がん細胞内のシグナル変化の研究や、がん細胞特異的にストレス応答を惹起する化合物の探索とその作用機序解析はがん治療の発展において重要な意義を持つ。PEL 細胞は KSHV 感染により引き起こされる B リンパ腫であり、バーキットリンパ腫などにみられる p53 遺伝子変異や Myc、Bcl-2 遺伝子の転座などは確認されないことも多い<sup>6)</sup>。一方で、PEL 細胞内では潜伏感染期ウイルスタンパク質による細胞内シグナルの脱制御、細胞がん化やウイルスタンパク質発現による細胞内タンパク合成量増加、ウイルスゲノムの複製と維持による核酸合成量の増加など、様々な細胞内環境の変化が生じていると推察される。小胞体ストレス<sup>81, 180)</sup>や酸化ストレス誘導剤<sup>181, 182)</sup>などのストレス誘導剤による PEL 細胞のアポトーシス誘導が報告されていることから、KSHV 関連腫瘍は特定の細胞ストレスに脆弱である可能性が考えられる。

ATF4 は腫瘍組織での増加<sup>153)</sup>や、発生<sup>154)</sup>、概日リズム<sup>155)</sup>の形成関与が報告されている。一方で ATF4 はグルコース欠乏やアミノ酸飢餓、RNA ウイルス感染、小胞体ストレス、ヘム欠乏など様々なストレスにより増加する転写因子であり、アポトーシス誘導に関与することが報告されている<sup>152)</sup>。ストレス非存在下の B リンパ腫においては本研究の結果より ATF4 タンパク質はほとんど発現していないと思われる。KSHV と ATF4 の関連は少数の報告があり、KSHV 初感染時や溶解感染の前初期遺伝子 RTA 発現により ATF4 は転写活性化され、細胞内ウイルスゲノム量増加や血管新生促進を引き起こす<sup>183)</sup>。一方で、LANA は ATF4 と結合してその転写活性を抑制することが報告されている<sup>184)</sup>。LANA は KSHV 潜伏感染細胞内で強く発現しており<sup>14)</sup>、LANA の機能は KSHV 潜伏感染維持や宿主生存、増殖に重要であることが知られている<sup>185)</sup>。そのため、初感染成立時は KSHV による宿主細胞の乗っ取りが完了していないため ATF4 増加によるウイルスゲノム産生量増加の利点が大きいと、感染成立、すなわち潜伏感染への移行が完了すると宿主細胞の生存を図るために LANA が ATF4 機能を抑制す

ると推察される。カプサイシン処理により KSHV 非感染リンパ腫と比較して PEL 細胞で ATF4 翻訳が促進される理由は不明である。しかし、カプサイシンは KSHV が潜伏感染している PEL 細胞内で ATF4 を増加させ KSHV 感染によるシグナル制御を解除することで PEL 細胞のアポトーシスを誘導すると考えられる (Figure 23)。

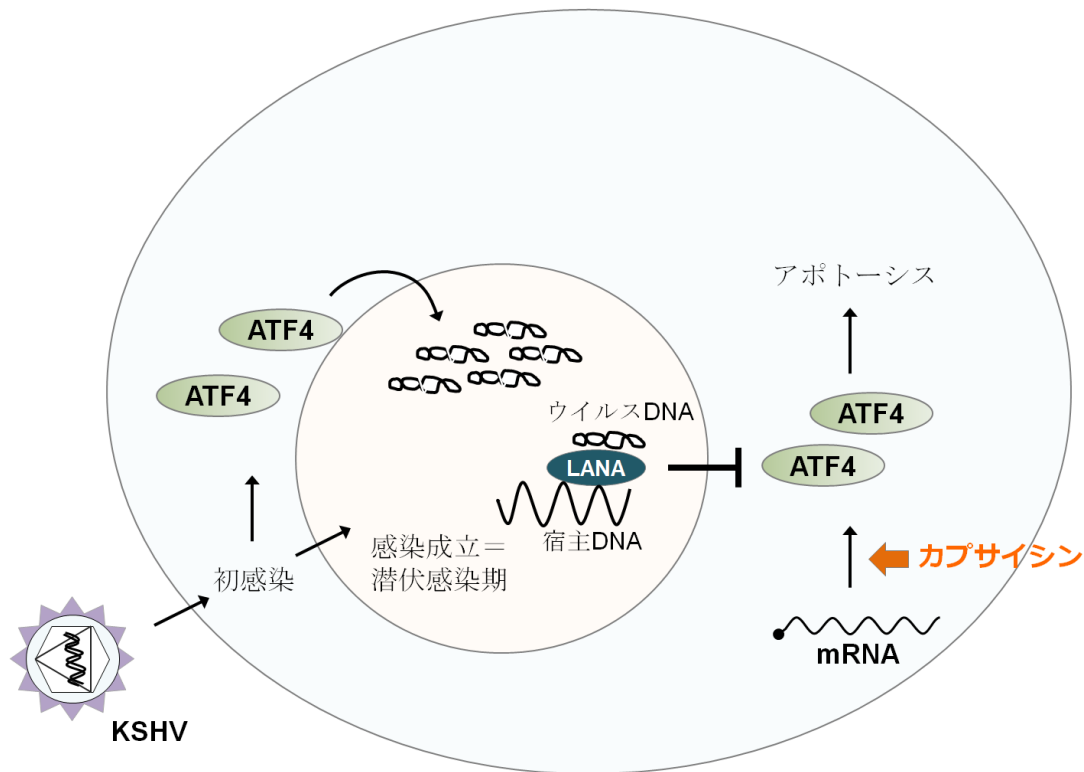


Figure 23 KSHV 感染における ATF4 の役割

ATF4 増加や CHOP 発現によるアポトーシスを引き起こす細胞ストレスとして、小胞体ストレスが知られている<sup>169)</sup>。小胞体ストレスは分泌タンパク質の合成場である小胞体内腔の恒常性破綻により不良タンパク質が蓄積することで生じる。小胞体ストレスに対する細胞応答として小胞体ストレス応答 (UPR) が存在し、シャペロンタンパク質の増加や新規タンパク質合成抑制、不良タンパク質の分解亢進を誘導する。また、ストレスが深刻であればアポトーシスを誘導する。UPR の概要を Figure 24 に示す。小胞体ストレスのセンサー分子として IRE1、PERK、ATF6 が非常によく知られている。先行研究により PEL 細胞において IRE1 と PERK 発現が抑制されており<sup>81)</sup>、小胞体ストレス誘導剤は CHOP 発現を増加させて PEL 細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。PEL 細胞における UPR 抑制やカプサイシンによる UPR 惹起が報告されていることから、本研究でも当初はカプサイシンが UPR を誘導して PEL 細胞死を誘導するのではないかと考えた。しかし、カプサイシン処理は JSC1 細胞における ATF6 発現増加と HBL6 における XBP1 スプライシング亢進を除いて ATF4 下流以外の UPR 関連分子を変化させなかった。HBL6 と JSC1 細胞は PEL 細胞の中でもカプサイシンへの感受

性が高いため、UPR 活性化の有無が PEL 細胞間での感受性の違いを引き起こす可能性が考えられる。一方で、第 1 章よりカプサイシンは KSHV 溶解感染に影響しないことが明らかとなったが、小胞体ストレス誘導剤が KSHV 溶解感染を促進することが報告されている<sup>8)</sup>。そのため、カプサイシンは一部の PEL 細胞においてわずかに UPR を活性化するか、あるいはほとんど影響しないと推察される。しかし、UPR によるアポトーシス誘導は PERK 活性化による ATF4 翻訳促進と CHOP 発現が重要な意義を持つと考えられていることから、ATF4 と下流因子の活性化が PEL 細胞のアポトーシス誘導に参与する可能性は高い。

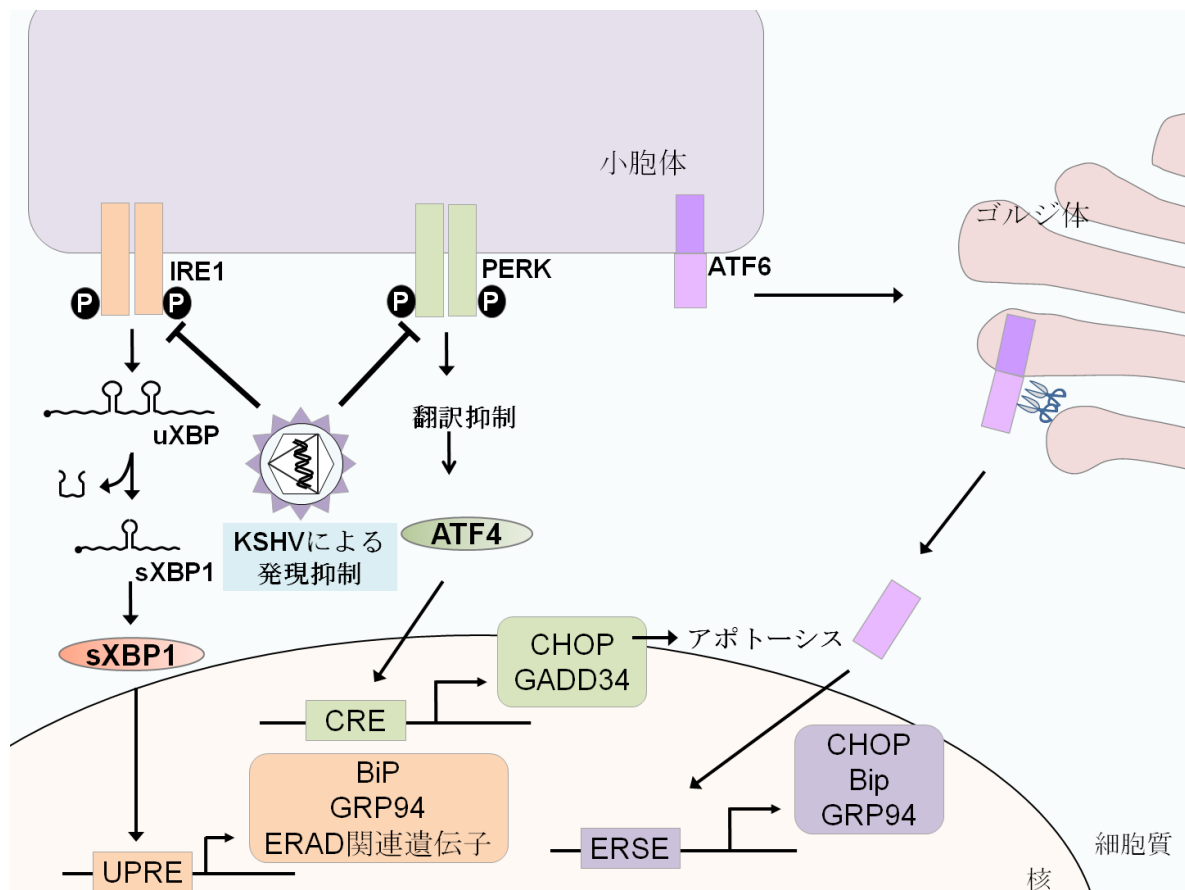


Figure 24 UPR の概要と KSHV による UPR 抑制

カプサイシン処理 PEL 細胞のアポトーシスを誘導したが、CHOP 発現増加は KSHV 非感染細胞と PEL 細胞のどちらの細胞でも見られた。CHOP はアポトーシス促進性の転写因子と考えられているが、CHOP によるアポトーシス誘導機構には未だ不明な点が多い。しかし、CHOP の強制発現がアポトーシスを誘導する報告があること<sup>156, 157)</sup>から非ストレス存在下と比較してストレス負荷時の CHOP 発現増加量がアポトーシス誘導に参与する可能性が考えられる。CHOP 発現の有意な増加は PEL 細胞のみでなく Raji 細胞でも見られた。また、HeLa 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにおいてもカプサイシン処理は CHOP 上流プロモーターからの転写を活性化させたことから、カプサイシンは細胞株に関係なくある程度の CHOP 発現増加を引き起こすことが示された。KSHV 非感染細胞の Raji 細胞とカプサイシン処理時の PEL 細胞では HBL6 において最も CHOP 発現量が少なく、Raji 細胞における発現量よりわずかに

多い程度であった。しかし HBL6 は未処理時の CHOP 発現量が Raji 細胞と比較して少なく、未処理時と比較した CHOP 発現の増加量は Raji 細胞と比較して PEL 細胞のほうが多かった。従って、未処理時と比較してカプサイシン処理による CHOP 増加量が多いことが PEL 細胞特異的なアポトーシスを誘導の要因ではないかと推察される。

第 1 章でカプサイシンの PEL に対する  $CC_{50}$  を求めたが、PEL 細胞の中でもカプサイシンへの感受性の違いは大きく、JSC1 や HBL6 細胞が高い感受性を示した。JSC1 と HBL6 細胞は UPR 関連分子のわずかな活性化が見られることから、カプサイシンによる PEL 増殖抑制効果には MAPK 抑制や ATF4 と CHOP 増加以外のメカニズムが存在する可能性は否定できない。また、ATF4 や CHOP など bZIP 構造をもつ転写因子は bZIP 構造を介してホモあるいはヘテロ 2 量体を形成し、2 量体を形成する相手により転写活性が変化することが報告されている<sup>186)</sup>。bZIP 構造をもつ転写因子は ATF1-7 や C/EBP  $\alpha$ - $\gamma$ 、ERK や p38 MAPK 下流で活性化される c-fos や c-myc など多数の転写因子が存在し、細胞内の bZIP 構成比の違いが PEL 細胞の感受性の違いに影響している可能性が考えられる。

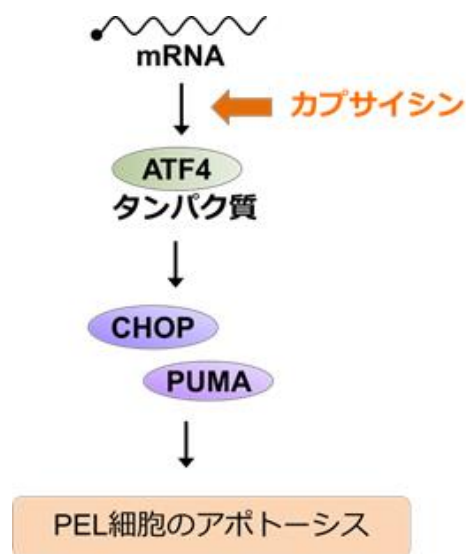


Figure 24 カプサイシンによる ATF4 翻訳促進と CHOP、PUMA 発現

## 2-5. 小括

カプサイシン処理は PEL 細胞のアポトーシスを誘導した。そのメカニズムとして、カプサイシン処理はストレス応答性転写因子 ATF4 の翻訳を促進し、その下流分子でアポトーシス誘導に関与する CHOP と PUMA 発現を増加させることを明らかにした。



## 総括

本研究では、予後不良の B 細胞性リンパ腫である PEL の新規治療薬開発を目的とし、カプサイシンの PEL 増殖に及ぼす影響を解析した。

第 1 章ではカプサイシン処理が PEL 細胞に対して 100-150  $\mu\text{M}$ 、KSHV 非感染細胞に対して 200  $\mu\text{M}$  の濃度で有意な細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。また、予めカプサイシン処理した PEL 細胞を用いたマウス移植モデルでは溶媒処理群と比較して腫瘍増加量が有意に抑制された。カプサイシンによる PEL 細胞の増殖抑制のメカニズム解析を行ったが、カプサイシン処理は KSHV 感染による活性化が報告されている NF- $\kappa\text{B}$  や Wnt シグナル、UPR に関わる分子の発現量を変化させなかった。また、PEL 細胞において STAT3 Y705 のリン酸化を亢進させた。一方で、カプサイシン処理は PEL 細胞において活性化している ERK リン酸化を抑制し、ERK シグナル特異的阻害剤の U0126 処理は PEL 細胞の生存率を低下させた。また、カプサイシン処理はウイルスタンパク質による PEL 細胞増殖シグナル活性化や KSHV ウイルス粒子産生に関与する p38 MAPK リン酸化を抑制し、p38 MAPK 特異的阻害剤の SB203580 処理は PEL 細胞の生存率を低下させた。さらに、カプサイシン処理は PEL 細胞において IL-6 mRNA 発現を抑制し、U0126 処理と SB203580 処理のどちらも PEL 細胞での IL-6 mRNA 発現を抑制した。また、IL-6 中和抗体は PEL 細胞と KSHV 非感染細胞の両方の生存率を低下させた。カプサイシン処理は KSHV 溶解感染期を誘導せず、NaB による溶解感染誘導の阻害効果も示さなかった。第 1 章ではカプサイシンが PEL 細胞の増殖や KSHV ウウイルスタンパク質の機能発現に関与する ERK と p38 MAPK シグナルを抑制し、IL-6 産生を抑制することで PEL 増殖を抑制することを明らかにした。すなわち、カプサイシンは KSHV 感染により活性化されるシグナルやウイルスタンパク質の機能発現に必要なシグナルを抑制することで PEL 増殖を抑制したと考えられる。

第 2 章においてカプサイシン処理は ATF4 翻訳を促進し、ATF4 増加量は KSHV 非感染細胞と比較して PEL 細胞で多いことを見出した。また、カプサイシン処理は ATF4 mRNA 発現や ATF4 タンパク質の安定性にほとんど影響しなかった。カプサイシン処理は ATF4 により発現が増加する CHOP と GADD34、PUMA の mRNA 発現を増加させた。ATF4 と同様にカプサイシン処理による増加量は KSHV 非感染細胞と比較して PEL 細胞で多いことを明らかにした。カプサイシン処理は PEL 細胞においてカスパーゼ-9、カスパーゼ-3、カスパーゼ-7 の活性化を引き起こし、PEL 細胞のアポトーシスを誘導した。カプサイシン処理は一部の PEL 細胞において UPR 関連因子をわずかに活性化させた。PEL 細胞による ATF4 翻訳促進には UPR 以外のストレス応答経路が関与する可能性が示された。第 2 章ではカプサイシン処理がストレス応答性転写因子である ATF4 翻訳促進し CHOP や PUMA の発現増加を引き起こして PEL 細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。すなわち、カプサイシンはストレス応答を惹起することで PEL 細胞死を誘導したと考えられる。

以上の結果より、カプサイシンは新規 PEL 治療薬のリード化合物となることが示された。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、丁寧かつ的確な助言をくださいました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室 藤室雅弘教授に心から深く感謝いたします。

本研究の内容に関して、的確な助言及び多大なる御協力下さいました琉球大学 医学研究科 渡部匡史講師に心から御礼申し上げます。

本研究の内容に関して、的確な助言及び多大なる御協力下さいました京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室 関根勇一講師に心から御礼申し上げます。

本論文を審査して下さいました京都薬科大学大学院 薬物治療学分野研究室 加藤 伸一教授  
ならびに臨床薬学分野研究室 西口 工司教授に、深く感謝いたします。

本研究第 1 章の遂行にあたり、動物実験の手技をご指導いただきました 京都薬科大学大学院 統合薬科学系 西村周泰助教に御礼申し上げます。

最後に、本大学院への進学に理解および支援してくれた両親に、そして温かく見守ってくださった細胞生物学分野研究室の皆様心から深く感謝いたします。

2021 年 3 月

## 引用文献

- 1) Global HIV & AIDS statistics-2020 fact sheet, 2020, UNAIDS. [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf) (accessed January, 22, 2021).
- 2) Reiwa gannen (2019) AIDS hassyodouko-gaiyo-, AIDS Prevention Information Network. <https://api-net.jfap.or.jp/status/japan/data/2019/nenpo/r01gaiyo.pdf> (accessed January, 19, 2021).
- 3) Sato M.; Abe K.; Ito T.; Sue H.; Yamamoto Y. Recognition of Problems in AIDS Care Hospitals Pharmacy through the Great East Japan Earthquake. *J. AIDS Res.*, **2014**, 16, 105-109
- 4) Said J.; Cesarman E. Primary Effusion Lymphoma. In *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4th edition; World Health Organization Classification of tumours; Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W., Eds.; International Agency for Research on Cancer, Lyon, **2008**, pp260-261.
- 5) Ministry of Health, Labour and Welfare (Japanes), AIDS taisaku kenkyuuigyoku. *AIDS ni gappei suru Kaposi's sarcoma touno HHV-8 kanrenshikkan ni okeru shindan to chiryou no tebiki*, 2nd edition; Tokyo, **2014**, 35-38.
- 6) Nador R.G.; Cesarman E.; Chadburn A.; Dawson D.B.; Ansari M.Q.; Sald J.; Knowles D.M. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood*, **1996**, 88, 645-56.
- 7) Simonelli C.; Spina M.; Cinelli R.; Talamini R.; Tedeschi R.; Gloghini A.; Vaccher E.; Carbone A.; Tirelli U. Clinical features and outcome of primary effusion lymphoma in HIV-infected patients: a single-institution study. *J. Clin. Oncol.*, **2003**, 21, 3948-54.
- 8) Boulanger E.; Gérard L.; Gabarre J.; Molina J.M.; Rapp C.; Abino J.F.; Cadranel J.; Chevret S.; Oksenhendler E. Prognostic factors and outcome of human herpesvirus 8-associated primary effusion lymphoma in patients with AIDS. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, 23, 4372-80.
- 9) Pérez C.L.; Rudoy S. Anti-CD20 monoclonal antibody treatment of human herpesvirus 8-associated, body cavity-based lymphoma with an unusual phenotype in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, **2001**, 8, 993-6.
- 10) Chang Y.; Cesarman E.; Pessin M.S.; Lee F.; Culpepper J.; Knowles D.M.; Moore P.S. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, **1994**, 266, 1865-9.
- 11) Ministry of Health, Labour and Welfare (Japanes), AIDS taisaku kenkyuuigyoku. *AIDS ni gappei suru Kaposi's sarcoma touno HHV-8 kanrenshikkan ni okeru shindan to tiryoku no tebiki*, 2nd edition; Tokyo, **2014**, 1-8.
- 12) Ballestas M.E.; Chatis P.A.; Kaye K.M. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*. **1999**, 284, 641-4.
- 13) Russo J.J.; Bohenzky R.A.; Chien M.C.; Chen J.; Yan M.; Maddalena D.; Parry J.P.; Peruzzi

- D.; Edelman I.S.; Chang Y.; Moore P.S. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1996**, 93, 14862-7.
- 14) Rainbow L., Platt G.M., Simpson G.R., Sarid R., Gao S.J.; Stoiber H.; Herrington C.S.; Moore P.S.; Schulz T.F. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J. Virol.*, **1997**, 71, 5915-21.
  - 15) Thome M.; Schneider P.; Hofmann K.; Fickenscher H.; Meinel E.; Neipel F.; Mattmann C.; Burns K.; Bodmer J.L.; Schröter M.; Scaffidi C.; Krammer P.H.; Peter M.E.; Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, **1997**, 386, 517-21.
  - 16) Li M.; Lee H.; Yoon D.W.; Albrecht J.C.; Fleckenstein B.; Neipel F.; Jung J.U. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J. Virol.*, **1997**, 71, 1984-91.
  - 17) Muralidhar S.; Pumfery A.M.; Hassani M.; Sadaie M.R.; Kishishita M.; Brady J.N.; Doniger J.; Medveczky P.; Rosenthal L.J. Identification of (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene. *J. Virol.*, **1998**, 72, 4980-8.
  - 18) Fujimuro M.; Wu F.Y.; ApRhys C.; Kajumbula H.; Young D.B.; Hayward G.S.; Hayward S.D. A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat. Med.*, **2003**, 9, 300-6.
  - 19) Molden J.; Chang Y.; You Y.; Moore P.S.; Goldsmith M.A. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 19625-31.
  - 20) Aoki Y.; Feldman G.M.; Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*, **2003**, 101, 1535-42.
  - 21) Chaudhary P.; Jasmin A.; Eby M.T.; Hood L. Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene*, **1999**, 18, 5738-46.
  - 22) Keller S.; Schattner E.J.; Cesarman E. Inhibition of NF-kappaB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood*, **2000**, 96, 2537-42.
  - 23) Cannon M.; Philpott N.J.; Cesarman E. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor has broad signaling effects in primary effusion lymphoma cells. *J. Virol.*, **2003** 77, 57-67.
  - 24) Brinkmann M.M.; Glenn M.; Rainbow L.; Kieser A.; Henke-Gendo C.; Schulz T.F. Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein. *J. Virol.*, **2003**, 77, 9346-58.
  - 25) Montaner S., Sodhi A., Pece S., Mesri E.A., Gutkind J.S. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. *Cancer Res.*, **2001**, 61, 641-8.
  - 26) Uddin S.; Hussain A.R.; Al-Hussein K.A.; Manogaran P.S.; Wickrema A.; Gutierrez M.I.;

- Bhatia K.G. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling promotes apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 3102-8.
- 27) Akula S.; Ford P.W.; Whitman A.G.; Hamden K.E.; Bryan B.A.; Cook P.P.; McCubrey J.A. B-Raf-dependent expression of vascular endothelial growth factor-A in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-infected human B cells. *Blood*, **2005**, 105, 4516-22.
- 28) Asou H.; Said J.W.; Yang R.; Munker R.; Park D.J.; Kamada N.; Koeffler H.P. Mechanisms of growth control of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus-associated primary effusion lymphoma cells. *Blood*, **1998**, 91, 2475-81.
- 29) Drexler H.G.; Meyer C.; Gaidano G.; Carbone A. Constitutive cytokine production by primary effusion (body cavity-based) lymphoma-derived cell lines. *Leukemia*, **1999**, 13, 634-40.
- 30) Jones K.D.; Aoki Y.; Chang Y.; Moore P.S.; Yarchoan R.; Tosato G. Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells. *Blood*, **1999**, 94, 2871-9.
- 31) Friberg J. Jr.; Kong W.; Hottiger M.O.; Nabel G.J. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*, **1999**, 402, 889-94.
- 32) Rivas C.; Thlick A.E.; Parravicini C.; Moore P.S.; Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J. Virol.*, **2001**, 75, 429-38.
- 33) Cheng E.H.; Nicholas J.; Bellows D.S.; Hayward G.S.; Guo H.G.; Reitz M.S.; Hardwick J.M. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1997**, 94, 690-4.
- 34) Zhong W.; Wang H.; Herndier B.; Ganem D. Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1996**, 93, 6641-6.
- 35) Sun R.; Lin S.F.; Gradoville L.; Yuan Y.; Zhu F.; Miller G. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, 95, 10866-71.
- 36) Lukac D.M.; Renne R.; Kirshner J.R.; Ganem D. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*, **1998**, 252, 304-12.
- 37) Sun R.; Lin S.F.; Staskus K.; Gradoville L.; Grogan E.; Haase A.; Miller G. Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J. Virol.*, **1999**, 73, 2232-42.
- 38) Lin S.F.; Robinson D.R.; Miller G.; Kung H.J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a bZIP protein with homology to BZLF1 of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **1999**, 73, 1909-17.
- 39) Gruffat H.; Portes-Sentis S.; Sergeant A.; Manet E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) encodes a homologue of the Epstein-Barr virus bZip protein EB1. *J.*

- Gen. Virol.*, **1999**, 80, 557-561.
- 40) Neipel F.; Albrecht J.C.; Ensser A.; Huang Y.Q.; Li J.J.; Friedman-Kien A.E.; Fleckenstein B. Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J. Virol.*, **1997**, 71, 839-42.
  - 41) Nicholas J.; Ruvolo V.R.; Burns W.H.; Sandford G.; Wan X.; Ciuffo D.; Hendrickson S.B.; Guo H.G.; Hayward G.S.; Reitz M.S. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat/ Med.*, **1997**, 3, 3287-92.
  - 42) Guo H.G.; Browning P.; Nicholas J.; Hayward G.S.; Tschachler E.; Jiang Y.W.; Sadowska M.; Raffeld M.; Colombini S.; Gallo R.C.; Reitz M.S. Jr. Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma. *Virology*, **1997**, 228, 371-8.
  - 43) Nitta K.; Yokokura T.; Sawada S.; Kunimoto T.; Tanaka T.; Uehara N.; Baba H.; Takeuchi M.; Miyasaka T.; Mutai M. Antitumor activity of new derivatives of camptothecin. *Gan To Kagaku Ryoho*, **1987**, 14, 850-7.
  - 44) Nissen N.I.; Larsen V.; Pedersen H.; Thomsen K. Phase I clinical trial of a new antitumor agent, 4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene- $\beta$ -D-glucopyranoside) (NSC-141540; VP-16-213). *Cancer Chemother. Rep.*, **1972**, 56, 769-77.
  - 45) Bohannon R.A.; Miller D.G.; Diamond H.D. Vincristine in the treatment of lymphomas and leukemias. *Cancer Res.*, **1963**, 23, 613-21.
  - 46) Schiff P.B.; Horwitz S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1980**, 77, 1561-5.
  - 47) Caterina M.J.; Schumacher M.A.; Tominaga M.; Rosen T.A.; Levine J.D.; Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **1997**, 389, 816-24.
  - 48) Bernstein J.E.; Bickers D.R.; Dahl M.V.; Roshal J.Y. Treatment of chronic postherpetic neuralgia with topical capsaicin. A preliminary study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1987**, 17, 93-6.
  - 49) Brederson J.D.; Kym P.R.; Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur. J. Pharmacol.*, **2013**, 716, 61-76
  - 50) Pramanik K.C.; Fofaria N.M.; Gupta P.; Ranjan A.; Kim S.H.; Srivastava S.K. Inhibition of  $\beta$ -catenin signaling suppresses pancreatic tumor growth by disrupting nuclear  $\beta$ -catenin/TCF-1 complex: critical role of STAT-3. *Oncotarget*, **2015**, 6, 11561-74.
  - 51) Chen M.; Xiao C.; Jiang W.; Yang W.; Qin Q.; Tan Q.; Lian B.; Liang Z.; Wei C. Capsaicin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Breast Cancer by Down-Regulating FBI-1-Mediated NF-kappaB Pathway. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2021**, 15, 125-140.
  - 52) Valachovicova T.; Slivova V.; Bergman H.; Shuherk J.; Sliva D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways. *Int. J. Oncol.*, **2004**, 25, 1389-95.
  - 53) Zaizen Y.; Tokuda H.; Nishino H.; Takeshita M. Inhibitory effect of soybean hypocotyls on

- Epstein-Barr virus early antigen induction and skin tumor promotion. *Cancer Lett.*, **1997**, 121, 53-7.
- 54) Yura Y.; Yoshida H.; Sato M. Inhibition of herpes simplex virus replication by genistein, an inhibitor of protein-tyrosine kinase. *Arch. Virol.*, **1993**, 132, 451-61.
- 55) Argenta D.F.; Silva I.T.; Bassani V.L.; Koester L.S.; Teixeira H.F.; Simões C.M. Antiherpes evaluation of soybean isoflavonoids. *Arch. Virol.*, **2015**, 160, 2335-42.
- 56) Isaacs C.E.; Wen G.Y.; Xu W.; Jia J.H.; Rohan L.; Corbo C.; Di Maggio V.; Jenkins E.C. Jr.; Hillier S. Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2008**, 52, 962-70.
- 57) Chang L.K.; Wei T.T.; Chiu Y.F.; Tung C.P.; Chuang J.Y.; Hung S.K.; Li C.; Liu S.T. Inhibition of Epstein-Barr virus lytic cycle by (-)-epigallocatechin gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 301, 1062-8.
- 58) Feng R.; Lu Y.; Bowman L.L.; Qian Y.; Castranova V.; Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 27888-95.
- 59) Ikeda K.; Tsujimoto K.; Uozaki M.; Nishide M.; Suzuki Y.; Koyama A.H.; Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int. J. Mol. Med.*, **2011**, 28, 595-8.
- 60) Fukuda S.; Koyama H.; Kondo K.; Fujii H.; Hirayama Y.; Tabata T.; Okamura M.; Yamakawa T.; Okada S.; Hirata S.; Kiyama H.; Kajimoto O.; Watanabe Y.; Inaba M.; Nishizawa Y. Effects of nutritional supplementation on fatigue, and autonomic and immune dysfunction in patients with end-stage renal disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *PLoS One*, **2015**, 10, e0119578.
- 61) Lo A.H.; Liang Y.C.; Lin-Shiau S.Y.; Ho C.T.; Lin J.K. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, **2002**, 23, 983-91.
- 62) Kar S.; Palit S.; Ball W.B.; Das P.K. Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF-kappaB signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis*, **2012**, 17, 735-47.
- 63) Wang R.; Cong W.H.; Guo G.; Li X.X.; Chen X.L.; Yu X.N.; Li H. Synergism between carnosic acid and arsenic trioxide on induction of acute myeloid leukemia cell apoptosis is associated with modulation of PTEN/Akt signaling pathway. *Chin. J. Integr. Med.*, **2012**, 18, 934-41.
- 64) Kim H.K.; Lee J.J.; Lee J.S.; Park Y.M.; Yoon T.R. Rosmarinic acid down-regulates the LPS-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) via the MAPK pathway in bone-marrow derived dendritic cells. *Mol. Cells.*, **2008**, 26, 583-9.
- 65) Hirsch J.M.; Svennerholm B.; Vahlne A. Inhibition of herpes simplex virus replication by

- tobacco extracts. *Cancer Res.*, **1984**, 44, 1991-7.
- 66) Song F.; Zeng K.; Liao L.; Yu Q.; Tu P.; Wang X. Schizandrin A Inhibits Microglia-Mediated Neuroninflammation through Inhibiting TRAF6-NF-kappaB and Jak2-Stat3 Signaling Pathways. *PLoS One*, **2016**, 11, e0149991.
- 67) Waiwut P.; Shin M.S.; Inujima A.; Zhou Y.; Koizumi K.; Saiki I.; Sakurai H. Gomisin N enhances TNF-alpha-induced apoptosis via inhibition of the NF-kappaB and EGFR survival pathways. *Mol. Cell. Biochem.*, **2011**, 350, 169-75.
- 68) Klippel S.; Jakubikova J.; Delmore J.; Ooi M.; McMillin D.; Kastritis E.; Laubach J.; Richardson P.G.; Anderson K.C.; Mitsiades C.S. Methyljasmonate displays in vitro and in vivo activity against multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.*, **2012**, 159, 340-51.
- 69) Sato M.; Miyazaki T.; Kambe F.; Maeda K.; Seo H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells. *J. Rheumatol.*, **1997**, 24, 1680-4.
- 70) Ishikawa Y.; Sugiyama H.; Stylianou E.; Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor-kappaB. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **1999**, 10, 2290-6.
- 71) Astani A.; Reichling J.; Schnitzler P. Melissa officinalis extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy.*, **2012**, 58, 70-7.
- 72) Astani A.; Navid M.H.; Schnitzler P. Attachment and penetration of acyclovir-resistant herpes simplex virus are inhibited by Melissa officinalis extract. *Phytother. Res.*, **2014**, 28, 1547-52.
- 73) Zhong Q.; Roumeliotis T.I.; Kozik Z.; Cepeda-Molero M.; Fernández L.Á.; Shenoy A.R.; Bakal C.; Frankel G.; Choudhary J.S. Clustering of Tir during enteropathogenic E. coli infection triggers calcium influx-dependent pyroptosis in intestinal epithelial cells. *PLoS Biol.*, **2020**, 18, e3000986.
- 74) Tregnago C.; Da Ros A.; Porcù E.; Benetton M.; Simonato M.; Simula L.; Borella G.; Polato K.; Minuzzo S.; Borile G.; Cogo P.; Campello S.; Massi A.; Romagnoli R.; Buldini B.; Locatelli F.; Pigazzi M. Thioridazine requires calcium influx to induce MLL-AF6-rearranged AML cell death. *Blood Adv.*, **2020**, 4, 4417-4429.
- 75) Xie J.; Pan H.; Yoo S.; Gao S.J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Virol.*, **2005**, 79, 15027-37.
- 76) An J.; Sun Y.; Sun R.; Rettig M.B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoded vFLIP induces cellular IL-6 expression: the role of the NF-kappaB and JNK/AP1 pathways. *Oncogene*, **2003**, 22, 3371-85
- 77) Santarelli R.; Gonnella R.; Di Giovenale G.; Cuomo L.; Capobianchi A.; Granato M.; Gentile G.; Faggioni A.; Cirone M. STAT3 activation by KSHV correlates with IL-10, IL-6 and IL-23 release and an autophagic block in dendritic cells. *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 4241.



- 78) Tosato G.; Seamon K.B.; Goldman N.D.; Sehgal P.B.; May L.T.; Washington G.C.; Jones K.D.; Pike S.E. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science*, **1988**, 239, 502-4.
- 79) Miller G.; Heston L.; Grogan E.; Gradoville L.; Rigsby M.; Sun R.; Shedd D.; Kushnaryov V.M.; Grossberg S.; Chang Y. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J. Virol.*, **1997**, 71, 314-24.
- 80) Yu Y.; Black J.B.; Goldsmith C.S.; Browning P.J.; Bhalla K.; Offermann M.K. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J. Gen. Virol.*, **1999**, 80, 83-90.
- 81) Shigemi Z, Baba Y, Hara N, Matsuhira J, Kagawa H, Watanabe T, Fujimuro M. Effects of ER stress on unfolded protein responses, cell survival, and viral replication in primary effusion lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2016**, 469, 565-72.
- 82) Agrawal R.C.; Wiessler M.; Hecker E.; Bhide S.V. Tumour-promoting effect of chilli extract in BALB/c mice. *Int. J. Cancer*, **1986**, 38, 689-95.
- 83) Toth B.; Rogan E.; Walker B. Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers. *Anticancer Res.*, **1984**, 4, 117-9.
- 84) Nagabhushan M.; Bhide S.V. Nonmutagenicity of curcumin and its antimutagenic action versus chili and capsaicin. *Nutr. Cancer*, **1986**, 201-10.
- 85) López-Carrillo L.; Hernández Avila M.; Dubrow R. Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.*, **1994**, 139, 263-71.
- 86) Yang Y.; Zhang J.; Weiss N.S.; Guo L.; Zhang L.; Jiang Y.; Yang Y. The consumption of chili peppers and the risk of colorectal cancer: a matched case-control study. *World J. Surg. Oncol.*, **2019**, 17, 71.
- 87) Taylor C.A.; Kelly B.M.; Todd A Nichols T.A. Fear the reaper: reversible cerebrovascular vasoconstriction syndrome after hot pepper ingestion. *Radiol. Case Rep.*, **2020**, 15, 641-643.
- 88) Robert T.; Kawkabani Marchini A.; Oumarou G.; Uské A. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome identification of prognostic factors. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **2013**, 115, 2351-7.
- 89) Madhok J.; Kloosterboer A.; Venkatasubramanian C.; Mihm F.G. Catecholamine-induced cerebral vasospasm and multifocal infarctions in pheochromocytoma. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Rep.*, **2020**, 2020, 20-0078.
- 90) Manning L.; Robinson T.G.; Anderson C.S. Control of blood pressure in hypertensive neurological emergencies. *Curr. Hypertens. Rep.*, **2014**, 16, 436.
- 91) Pramanik K.C.; Boreddy S.R.; Srivastava S.K. Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, **2011**, 6, e20151.
- 92) Bonaccio M.; Di Castelnuovo A.; Costanzo S.; Ruggiero E.; De Curtis A.; Persichillo M.;

- Tabolacci C.; Facchiano F.; Cerletti C.; Donati M.B.; de Gaetano G.; Iacoviello L. Moli-sani Study Investigators. Chili Pepper Consumption and Mortality in Italian Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2019**, 4, 3139-3149.
- 93) Shi Z.; Zhang M.; Liu J. Chili Intake Is Inversely Associated with Chronic Kidney Disease among Adults: A Population-Based Study. *Nutrients*, **2019**, 11, 2949.
- 94) Heblinski M.; Santiago M.; Fletcher C.; Stuart J.; Connor M.; McGregor I.S.; Arnold J.C. Terpenoids Commonly Found in Cannabis sativa Do Not Modulate the Actions of Phytocannabinoids or Endocannabinoids on TRPA1 and TRPV1 Channels. *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2020**, 5, 305-317.
- 95) Luo H.; Saubamea B.; Chasseigneaux S.; Cochois V.; Smirnova M.; Glacial F.; Perrière N.; Chaves C.; Cisternino S.; Declèves X. Molecular and Functional Study of Transient Receptor Potential Vanilloid 1-4 at the Rat and Human Blood-Brain Barrier Reveals Interspecies Differences. *Front. Cell Dev. Biol.*, **2020**, 8, 578514.
- 96) Nibret E.; Krstin S.; Wink M. In vitro anti-proliferative activity of selected nutraceutical compounds in human cancer cell lines. *BMC Res. Notes*, **2021**, 14, 18.
- 97) Bruce J.I.E. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*, **2018**, 69, 28–36.
- 98) Machaca K. Ca<sup>2+</sup> signaling, genes and the cell cycle. *Cell Calcium*, **2011**, 49, 323–330.
- 99) Patergnani S.; Danese A.; Bouhamida E.; Aguiari G.; Previati M.; Pinton P.; Giorgi C. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 8323.
- 100) Baker S.J.; Fearon E.R.; Nigro J.M.; Hamilton S.R.; Preisinger A.C.; Jessup J.M.; vanTuinen P.; Ledbetter D.H.; Barker D.F.; Nakamura Y.; White R.; Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **1989**, 244, 217-21.
- 101) Nigro J.M.; Baker S.J.; Preisinger A.C.; Jessup J.M.; Hosteller R.; Cleary K.; Signer S.H.; Davidson N.; Baylin S.; Devilee P.; Glover T.; Collins F.S.; Weslon A.; Modali R.; Harris C.C.; Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **1989**, 342, 705-8.
- 102) Harris C.C. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ. Health Perspect*, **1996**, 104 Suppl 3,435-9.
- 103) Santos E.; Martin-Zanca D.; Reddy E.P.; Pierotti M.A.; Della Porta G.; Barbacid M. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science*, **1984** 223, 661-4.
- 104) Balmain A. Transforming ras oncogenes and multistage carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, **1985**, 51, 1-7.
- 105) Davies H.; Bignell G.R.; Cox C.; Stephens P.; Edkins S.; Clegg S.; Teague J.; Woffendin H.; Garnett M.J.; Bottomley W.; Davis N.; Dicks E.; Ewing R.; Floyd Y.; Gray K.; Hall S.; Hawes

- R.; Hughes J.; Kosmidou V.; Menzies A.; Mould C.; Parker A.; Stevens C.; Watt S.; Hooper S.; Wilson R.; Jayatilake H.; Gusterson B.A.; Cooper C.; Shipley J.; Hargrave D.; Pritchard-Jones K.; Maitland N.; Chenevix-Trench G.; Riggins G.J.; Bigner D.D.; Palmieri G.; Cossu A.; Flanagan A.; Nicholson A.; Ho J.W.; Leung S.Y.; Yuen S.T.; Weber B.L.; Seigler H.F.; Darrow T.L.; Paterson H.; Marais R.; Marshall C.J.; Wooster R.; Stratton M.R.; Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer *Nature*, **2002**, 417, 949-54.
- 106)Sridhar S.S.; Hedley D.; Siu L.L. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, 4, 677-85.
- 107)Robson M.; Rajan P.; Rosen P.P.; Gilewski T.; Hirschaut Y.; Pressman P.; Haas B.; Norton L.; Offit K. BRCA-associated breast cancer: absence of a characteristic immunophenotype. *Cancer Res.*, **1998**, 58, 1839-42.
- 108)Scully R. Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res.*, **2000**, 2, 324-30.
- 109)Tal M.; Wetzler M.; Josefberg Z.; Deutch A.; Gutman M.; Assaf D.; Kris R.; Shiloh Y.; Givol D.; Schlessinger J. Sporadic amplification of the HER2/neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissues. *Cancer Res.*, **1988**, 48, 1517-20.
- 110)Moasser M.M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, **2007**, 26, 6469-87.
- 111)Wen KW, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett.*, **2010**, 289, 140-50.
- 112)Greene W.; Kuhne K.; Ye F.; Chen J.; Zhou F.; Lei X.; Gao S.J. Molecular biology of KSHV in relation to AIDS-associated oncogenesis. *Cancer Treat Res.*, **2007**, 133, 69-127.
- 113)Sarid R.; Sato T.; Bohenzky R.A.; Russo J.J.; Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat. Med.*, **1997**, 3, 293-8.
- 114)Lee H.; Guo J.; Li M.; Choi J.K.; DeMaria M.; Rosenzweig M.; Jung J.U. Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Mol. Cell Biol.*, **1998**, 18, 5219-28.
- 115)Tomlinson C.C.; Damania B. The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. *J. Virol.*, **2004**, 78, 1918-27.
- 116)Means R.E.; Ishido S.; Alvarez X.; Jung J.U. Multiple endocytic trafficking pathways of MHC class I molecules induced by a Herpesvirus protein. *EMBO J.*, **2002**, 21, 1638-49.
- 117)McCormick C.; Ganem D. The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science*, **2005**, 307, 739-41.
- 118)Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **2001**, 410, 37-40.
- 119)Sharma-Walia N.; Krishnan H.H.; Naranatt P.P.; Zeng L.; Smith M.S.; Chandran B. ERK1/2 and MEK1/2 induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) Searly during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection. *J. Virol.*, **2005**, 9, 10308-29.

- 120)Pan H.; Xie J.; Ye F.; Gao S.J. Modulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and replication by MEK/ERK, JNK, and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways during primary infection. *J. Virol.*, **2006**, 80, 5371-82.
- 121)Cohen A.; Brodie C.; Sarid R. An essential role of ERK signalling in TPA-induced reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Gen. Virol.*, **2006**, 87, 795-802.
- 122)Xie J.; Ajibade A.O.; Ye F.; Kuhne K.; Gao S.J. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency requires MEK/ERK, JNK and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Virology*, **2008**, 371, 139-54.
- 123)Smit M.J.; Verzijl D.; Casarosa P.; Navis M.; Timmerman H.; Leurs R. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor ORF74 constitutively activates p44/p42 MAPK and Akt via G(i) and phospholipase C-dependent signaling pathways. *J. Virol.*, **2002**, 76, 1744-52.
- 124)Sodhi A.; Montaner S.; Patel V.; Zohar M.; Bais C.; Mesri E.A.; Gutkind J.S. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.*, **2000**, 60, 4873-80.
- 125)Kliche S.; Nagel W.; Kremmer E.; Atzler C.; Ege A.; Knorr T.; Koszinowski U.; Kolanus W.; Haas J. Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1. *Mol. Cell*, **2001**, 7, 833-43.
- 126)Wakao K.; Watanabe T.; Takadama T.; Ui S.; Shigemi Z.; Kagawa H.; Higashi C.; Ohga R.; Taira T.; Fujimuro M. Sangivamycin induces apoptosis by suppressing Erk signaling in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, 444, 135-40.
- 127)Baba Y.; Shigemi Z.; Hara N.; Moriguchi M.; Ikeda M.; Watanabe T.; Fujimuro M. Arctigenin induces the apoptosis of primary effusion lymphoma cells under conditions of glucose deprivation. *Int. J. Oncol.*, **2018**, 52, 505-517.
- 128)Ogasawara T.; Yasuyama M.; Kawachi K. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in B-cell lymphoproliferative disorders. *Int. J. Hematol.*, **2003**, 77, 364-70.
- 129)Junttila M.R.; Ala-Aho R.; Jokilehto T.; Peltonen J.; Kallajoki M.; Grenman R.; Jaakkola P.; Westermarck J.; Kähäri V.M. p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, **2007**, 26, 5267-79.
- 130)Tibbles L.A.; Woodgett J.R. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol. Life Sci.*, **1999**, 55, 1230-54.
- 131)Boulton T.G.; Zhong Z.; Wen Z.; Darnell J.E. Jr.; Stahl N.; Yancopoulos G.D. STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1995**, 92, 6915-9.
- 132)Weich N.S.; Wang A.; Fitzgerald M.; Neben T.Y.; Donaldson D.; Giannotti J.; Yetz-Aldape J.;

- Leven R.M.; Turner K.J. Recombinant human interleukin-11 directly promotes megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, **1997**, 90, 3893-902.
- 133) Larousserie F.; Charlot P.; Bardel E.; Froger J.; Kastelein R.A.; Devergne O. Differential effects of IL-27 on human B cell subsets. *J. Immunol.*, **2006**, 176, 5890-7.
- 134) Johnston J.A.; Bacon C.M.; Finbloom D.S.; Rees R.C.; Kaplan D.; Shibuya K.; Ortaldo J.R.; Gupta S.; Chen Y.Q.; Giri J.D. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1995**, 92, 8705-9.
- 135) Chahl J.S.; Chahl L.A. The role of prostaglandins in chemically induced inflammation. *Br. J. Exp. Pathol.*, **1976**, 57, 689-95.
- 136) Wan X.; Wang H.; Nicholas J. Human herpesvirus 8 interleukin-6 (vIL-6) signals through gp130 but has structural and receptor-binding properties distinct from those of human IL-6. *J. Virol.*, **1999**, 73, 8268-78.
- 137) Benkhart E.M.; Siedlar M.; Wedel A.; Werner T.; Ziegler-Heitbrock H.W. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunol.*, **2000**, 165, 1612-7.
- 138) Funamoto M.; Fujio Y.; Kunisada K.; Negoro S.; Tone E.; Osugi T.; Hirota H.; Izumi M.; Yoshizaki K.; Walsh K.; Kishimoto T.; Yamauchi-Takahara K. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 10561-6.
- 139) Granato M.; Gilardini Montani M.S.; Filardi M.; Faggioni A.; Cirone M. Capsaicin triggers immunogenic PEL cell death, stimulates DCs and reverts PEL-induced immune suppression. *Oncotarget*, **2015**, 6, 29543-54.
- 140) Gabay C.; Ben-Bassat H.; Schlesinger M.; Laskov R. Somatic mutations and intraclonal variations in the rearranged V $\kappa$  genes of B-non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Eur J Haematol*, 1999, 63, 180-91.
- 141) Jenner R.G.; Albà M.M.; Boshoff C.; Kellam P. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J. Virol.*, **2001**, 75, 891-902.
- 142) Cannon J.S.; Ciufu D.; Hawkins A.L.; Griffin C.A.; Borowitz M.J.; Hayward G.S.; Ambinder R.F. A new primary effusion lymphoma-derived cell line yields a highly infectious Kaposi's sarcoma herpesvirus-containing supernatant. *J. Virol.*, **2000**, 74, 10187-93.
- 143) Goto H.; Kudo E.; Kariya R.; Taura M.; Katano H.; Okada S. Targeting VEGF and interleukin-6 for controlling malignant effusion of primary effusion lymphoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2015**, 141, 465-74.
- 144) Rong Q.; Gao Y.; Cai Q.; Wang X.; Bai B.; Ping L.; He H.; Rao H.; Zhang Y.; Li Z.; Cai Q.; Jiang W.; Huang H. High IL-6 expression in the tumor microenvironment is associated with poor prognosis of patients with extranodal natural / killer T-cell lymphoma (ENKTL). *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2021**, 4, 1-7.
- 145) Heichler C.; Scheibe K.; Schmied A.; Geppert C.I.; Schmid B.; Wirtz S.; Thoma O.M.; Kramer V.; Waldner M.J.; Büttner C.; Farin H.F.; Pešić M.; Knieling F.; Merkel S.;

- Grüneboom A.; Gunzer M.; Grützmann R.; Rose-John S.; Koralov S.B.; Kollias G.; Vieth M.; Hartmann A.; Greten F.R.; Neurath M.F.; Neufert C. STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis. *Gut.*, **2020**, 69, 1269-1282.
- 146) Deng H.; Song M.J.; Chu J.T.; Sun R. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J. Virol.*, **2002**, 76, 8252-64.
- 147) Sorenson C.M.; Barry M.A.; Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, 82, 749-55.
- 148) Meyn R.E.; Stephens L.C.; Hunter N.R.; Milas L. Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1994**, 33, 410-4.
- 149) Pei X.Y.; Dai Y.; Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia*, **2003**, 17, 2036-45.
- 150) Pahler J.C.; Ruiz S.; Niemer I.; Calvert L.R.; Andreeff M.; Keating M.; Faderl S.; McConkey D.J. Effects of the proteasome inhibitor, bortezomib, on apoptosis in isolated lymphocytes obtained from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, 9, 4570-7.
- 151) Johnson F.M.; Saigal B.; Talpaz M.; Donato N.J. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 6924-32.
- 152) Wek R.C.; Jiang H.-Y.; Anthony T.G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.*, **2006**, 34, 7-11.
- 153) Ameri K.; Lewis C.E.; Raida M.; Sowter H.; Hai T.; Harris A.L. Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood*, **2004**, 103, 1876-82.
- 154) Masuoka H.C.; Townes T.M. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood*, **2002**, 99, 736-745.
- 155) Koyanagi S.; Hamdan A.M.; Horiguchi M.; Kusunose N.; Okamoto A.; Matsunaga N.; Ohdo S. cAMP-response element (CRE)-mediated transcription by activating transcription factor-4 (ATF4) is essential for circadian expression of the Period2 gene. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 32416-23.
- 156) Friedman A.D. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. *Cancer Res.*, **1996**, 56, 3250-6.
- 157) Matsumoto M.; Minami M.; Takeda K.; Sakao Y.; Akira S. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett.*, **1996**, 395, 143-7.

- 158)Zinszner H.; Kuroda M.; Wang X.; Batchvarova N.; Lightfoot R.T.; Remotti H.; Stevens J.L.; Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.*, **1998**, 12, 982-95.
- 159)Cazanave S.C.; Elmi N.A.; Akazawa Y.; Bronk S.F.; Mott J.L.; Gores G.J. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2010**, 99, G236-43
- 160)Puthalakath H.; O'Reilly L.A.; Gunn P.; Lee L.; Kelly P.N.; Huntington N.D.; Hughes P.D.; Michalak E.M.; McKimm-Breschkin J.; Motoyama N.; Gotoh T.; Akira S.; Bouillet P.; Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, **2007**, 129, 1337-49.
- 161)Eymin B.; Dubrez L.; Allouche M.; Solary E. Increased gadd153 messenger RNA level is associated with apoptosis in human leukemic cells treated with etoposide. *Cancer Res.*, **1997**, 57, 686-95.
- 162)Tajiri S.; Oyadomari S.; Yano S.; Morioka M.; Gotoh T.; Hamada J.I.; Ushio Y.; Mori M. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.*, **2004**, 11, 403-15.
- 163)Siu F.; Bain P.J.; LeBlanc-Chaffin R.; Chen H.; Kilberg M.S. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 24120-7.
- 164)Ma Y.; Brewer J.W.; Diehl J.A.; Hendershot L.M. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 318, 1351-65.
- 165)Flores-Diaz M.; Higuera J.C.; Florin I.; Okada T.; Pollesello P.; Bergman T.; Thelestam M.; Mori K.; Alape-Giron A. A cellular UDP-glucose deficiency causes overexpression of glucose/oxygen-regulated proteins independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 21724-31.
- 166)Shimazawa M.; Ito Y.; Inokuchi Y.; Hara H. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2007**, 48, 3729-36.
- 167)Suragani R.N.; Zachariah R.S.; Velazquez J.G.; Liu S.; Sun C.W.; Townes T.M.; Chen J.J. Heme-regulated eIF2alpha kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood*, **2012**, 119, 5276-84.
- 168)Lassot I.; Ségéral E.; Berlioz-Torrent C.; Durand H.; Groussin L.; Hai T.; Benarous R.; Margottin-Goguet F. ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Mol. Cell Biol.*, **2001**, 21, 2192-202.
- 169)Pavitt G.D.; Ron D. New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2012**, 4, a012278.
- 170)Scheid M.P.; Duronio V. Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and

- activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, 95, 7439-44.
- 171)Tan Y.; Ruan H.; Demeter M.R.; Comb M.J. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 34859-67.
- 172)Cardone M.H.; Roy N.; Stennicke H.R.; Salvesen G.S.; Franke T.F.; Stanbridge E.; Frisch S.; Reed J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **1998**, 282, 1318-21.
- 173)Yamaguchi T.; Kakefuda R.; Tajima N.; Sowa Y.; Sakai T. Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol.*, **2011**, 39, 23-31.
- 174)Emami Nejad A.; Najafgholian S.; Rostami A.; Sistani A.; Shojaeifar S.; Esparvarinha M.; Nedaeinia R.; Haghjooy Javanmard S.; Taherian M.; Ahmadi M.; Salehi R.; Sadeghi B.; Manian M. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.*, **2021**, 21, 62.
- 175)Kuo M.T.; Savaraj N.; Feun L.G. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *Oncotarget.*, **2010**, 1, 246-51.
- 176)Wu L.; Chou M.; Zhu S. Unfolded Protein Response and Cancer. *Discoveries (Craiova)*, **2014**, 2, e10.
- 177)Wang M.; Law M.E.; Castellano R.K.; Law B.K. The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2018**, 127, 66-79.
- 178)García-Heredia J.M.; Carnero A. Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance. *Cells*, **2020**, 9, 1693.
- 179)Castaldo S.A.; Freitas J.R.; Conchinha N.V.; Madureira P.A. The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2016**, 2016, 8413032.
- 180)Shigemi Z.; Manabe K.; Hara N.; Baba Y.; Hosokawa K.; Kagawa H.; Watanabe T.; Fujimuro M. Methylseleninic acid and sodium selenite induce severe ER stress and subsequent apoptosis through UPR activation in PEL cells. *Chem. Biol. Interact.*, **2017**, 266, 28-37.
- 181)Li X.; Feng J.; Sun R. Oxidative stress induces reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and death of primary effusion lymphoma cells. *J. Virol.*, **2011**, 85, 715-24.
- 182)Strepel N.; Nusser M.; Neidig A.; Brenner-Weiss G.; Overhage J. The Oxidative Stress Agent Hypochlorite Stimulates c-di-GMP Synthesis and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.*, **2017**, 8, 2311.
- 183)Caselli E.; Benedetti S.; Grigolato J.; Caruso A.; Di Luca D. Activating transcription factor 4 (ATF4) is upregulated by human herpesvirus 8 infection, increases virus replication and promotes proangiogenic properties. *Arch. Virol.*, **2012**, 157, 63-74.
- 184)Lim C.; Sohn H.; Gwack Y.; Choe J. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) binds ATF4/CREB2 and inhibits its transcriptional activation activity. *J. Gen. Virol.*, **2000**, 81, 2645-2652.



- 185) Verma S.C.; Robertson E.S. Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2003**, 222, 155-63.
- 186) Wortel I.M.N.; van der Meer L.T.; Kilberg M.S.; van Leeuwen F.N. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2017**, 28, 794-806.