

原発性体腔液性リンパ腫細胞における小胞体ストレス応答
と NF- κ B シグナルに関する研究

2015 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

重見 善平

本学位論文の内容および結果の一部は、以下の論文を総括したものである。

- 1) Zenpei Shigemi, Yusuke Baba, Naoko Hara, Jumpei Matsuhira, Hiroki Kagawa, Tadashi Watanabe, and Masahiro Fujimuro : Effects of ER stress on unfolded protein responses, cell survival, and viral replication in primary effusion lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **469**, 565-572 (2016). [第 1 章]
- 2) Zenpei Shigemi, Yoshiki Furukawa, Kohei Hosokawa, Setsuya Minami, Jumpei Matsuhira, Shiori Nakata, Tadashi Watanabe, Hiroki Kagawa, Koji Nakagawa, Hiroshi Takeda, and Masahiro Fujimuro : Diallyl trisulfide induces apoptosis by suppressing NF- κ B signaling through destabilization of TRAF6 in primary effusion lymphoma. *Int. J. Oncol.*, **48**, 293-304 (2016). [第 3 章]

課程博士学位論文 内容の要旨

氏名（英字名）：重見 善平 (Shigemi Zenpei)

学位論文題目：原発性体腔液性リンパ腫細胞における小胞体ストレス応答と NF- κ B シグナルに関する研究

エイズ関連日和見腫瘍である原発性体腔液性リンパ腫 (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。感染者の免疫抑制時、KSHV は PEL やカポジ肉腫を発症する。特に PEL は既存の化学療法に耐性を示すことから、新規抗 PEL 薬の開発が焦眉の課題である。KSHV は、細胞内で潜伏感染と溶解感染の二つの感染様式を発現する。潜伏感染期、KSHV は LANA (the latency-associated nuclear antigen) 等のウイルス分子を発現し、NF- κ B、Akt、Erk、Wnt シグナルを活性化することで、細胞増殖と感染維持を行う。一方、小胞体 (endoplasmic reticulum ; ER) 内の新生タンパク質のホールディング時に生じる変性タンパク質は、細胞毒性 (ER ストレス) を示す。これに対し、細胞は UPR (unfolded protein response) を活性化し、ER の恒常性を維持する。しかし、ER ストレスが過剰である場合、UPR は細胞にアポトーシスを誘導する。正常細胞と比べて、ウイルス感染腫瘍細胞では、細胞増殖やウイルス複製に伴いタンパク質合成が亢進しており、より強い ER ストレスが生じている。このことから、本研究では二つの仮説を推論した。一つは、KSHV は細胞内の UPR を脱制御することで感染を維持するのではないかと。もう一つは、PEL 細胞にさらに ER ストレスを負荷することが新規抗 PEL 療法に成りうるのではないかと。これらの推論をもとに、潜伏と溶解感染期における、PEL 細胞内の UPR 挙動を解析した。また、ER ストレスを誘発する化合物として DAT (diallyl trisulfide) に着目し、潜伏感染期の PEL 細胞に対する殺細胞効果とその作用機序を解析した。

1. PEL 細胞内の UPR 脱制御機構

まず、KSHV 非感染細胞と潜伏感染期の PEL 細胞における UPR 関連遺伝子の発現や活性を解析した。その結果、KSHV 非感染細胞と比較して、UPR の IRE1 α と PERK の mRNA の発現が PEL 細胞では転写レベルで抑制されていた。また、HeLa 細胞への LANA の過剰発現により IRE1 α の mRNA 量が減少したことから、IRE1 α の発現抑制には LANA が関与することが示唆された。次に、未だ不明である IRE1 α と PERK の発現を制御するプロモーターや転写因子をレポーターアッセイにより解析した。その結果、IRE1 α のプロモーター内の ATF 結合配列を置換変異すると、レポーター活性が約 50% 低下した。さらに、ATF4 の過剰発現は IRE1 α のプロモーター活性と mRNA 発現を増強した。次に、PEL 細胞の増殖に対する ER ストレス誘導剤 (thapsigargin ; Tg) の影響を評価した結果、Tg は PEL 細胞に増殖抑制とアポトーシスを誘導した。一方、溶解感染期に誘導した PEL 細胞では、UPR の Bip や IRE1 α 、PERK の発現量が増加した。また、溶解感染期の PEL 細胞を Tg 処理すると、溶解感染遺伝子である RTA や K-bZIP の発現量とウイルス産生量が顕著に増加した。さらに、RTA が IRE1 α の、K-bZIP が PERK の発現量を増加させた。

潜伏感染期の PEL 細胞において、PERK と IRE1 α の発現が抑制されていたことから、KSHV が細胞内の UPR を阻害することが明らかとなった。先行研究より、LANA が ATF4 の機能を抑制することが報告されている。すなわち、KSHV は LANA を介して ATF4 の転写活性化能を阻害することで、IRE1 α の発現を抑制することが示唆された。また、Tg が PEL 細胞にアポトーシスを惹起したことから、KSHV は UPR のプロ・アポトーティックな活性を抑制することで、PEL 細胞の生存に寄与すると考えられる。一方、溶解感染期のウイルスタンパク質合成にともなう ER ストレスは、PEL 細胞内の UPR を活性化する。KSHV は活性化した UPR を利用し、溶解感染遺伝子の発現増強とウイルス産生を行うことが明らかとなった。さらに、KSHV は RTA や K-bZIP を介して PERK と IRE1 α の発現誘導、すなわち UPR を自らも活性化することで、自身のウイルス産生を更に加速させると考えられる。

本研究が明らかにした KSHV による UPR の脱制御機構は、KSHV の感染維持とウイルス生存戦略の発見と同義である。本研究結果は、UPR 活性化 (ER ストレス負荷) が、新規抗 PEL 療法になる可能性を示している。

2. DAT の PEL 細胞に対する抗腫瘍活性とその作用機序解析

DAT の投与は、KSHV 非感染細胞の増殖には影響しなかったことに対し、PEL 細胞に対して caspase-7, -9 活性化を伴うアポトーシスを誘導した。次に、DAT 処理細胞における UPR 挙動を解析した結果、DAT は KSHV 非感染細胞と PEL 細胞の両方に、UPR 関連遺伝子の発現と活性化を誘導した。すなわち、DAT による PEL 細胞特異的な殺細胞効果に、UPR 活性化は寄与しないことが明らかとなった。それゆえ、PEL 細胞内で恒常的に活性化しているシグナル伝達に対する DAT の影響を解析した。その結果、DAT は PEL 細胞特異的に NF- κ B 抑制因子 I κ B α の発現を増加させ、NF- κ B を阻害した。DAT による I κ B α 安定化の分子機序を詳細に解析した結果、DAT は IKK 複合体のキナーゼ活性に必須である IKK β のリン酸化を抑制した。さらに、興味深いことに、DAT は TRAF6 を不安定化し、この不安定化はプロテアソーム阻害剤 MG132 の共処理により減弱した。最後に、動物モデルにおける DAT の抗 PEL 活性を評価した。腹腔内に PEL 細胞を移植した免疫不全マウスに、DAT を 21 日間、隔日で腹腔内投与した。その結果、DAT 投与マウス群では、PEL 細胞に由来する腹腔内の腹水の蓄積と PEL 細胞の増殖、さらに脾臓の肥大が強く抑制された。

DAT はプロテアソーム依存的に TRAF6 を不安定化し、下流分子 IKK 複合体の IKK β のリン酸化阻害とキナーゼ活性阻害を引き起こす。その結果、I κ B α のリン酸化抑制と安定化を誘導し、転写因子 NF- κ B の核移行と活性を阻害することが本研究より明らかとなった。DAT は PEL 細胞内で恒常的に活性化している NF- κ B シグナルの阻害を介し、PEL 細胞特異的にアポトーシスを誘導したと考察される。通常、TRAF6 は分解とは無関係の poly-Ub 化を介して活性化する。しかし、DAT 処理によって、TRAF6 の poly-Ub 鎖の種類が変わり、プロテアソーム依存的に TRAF6 が分解されたと推測される。本研究結果より、TRAF6 不安定化という DAT の新規薬理活性、そして DAT が抗 PEL 薬のシードになる可能性が示された。

目次

略語表	1
序章	3
試薬類	6
第 1 章 PEL 細胞内の UPR 挙動解析	
1-1 はじめに	10
1-2 実験方法	
1-2-1 細胞培養	10
1-2-2 細胞からのゲノム DNA 抽出	10
1-2-3 プラスミド DNA	10
1-2-4 接着細胞への遺伝子導入	12
1-2-5 細胞増殖アッセイ	12
1-2-6 ウェスタンブロット解析	13
1-2-7 細胞分画法	14
1-2-8 RT-PCR 法による遺伝子発現解析	14
1-2-9 Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析	16
1-2-10 Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量	17
1-2-11 IRE1 α と PERK タンパク質の安定性試験	17
1-2-12 IRE1 α と PERK の mRNA 安定性試験	17
1-2-13 有意差検定について	18
1-2-14 CC ₅₀ 値の算出法について	18
1-3 結果	
1-3-1 潜伏感染期の PEL 細胞における IRE1 α と PERK の発現解析	19
1-3-2 潜伏感染期の PEL 細胞における転写レベルでの IRE1 α と PERK の発現解析	19
1-3-3 潜伏感染期の PEL 細胞における IRE1 α と PERK 経路の解析	22
1-3-4 ウイルスタンパク質 LANA による IRE1 α の発現抑制	24
1-3-5 潜伏感染期の PEL 細胞に対する ER ストレス誘導剤の殺細胞活性	26
1-3-6 溶解感染期の PEL 細胞における UPR 活性化	30
1-3-7 溶解感染期の PEL 細胞における LANA の発現減少	30
1-3-8 KSHV のウイルス産生に対する UPR 活性化の影響	30
1-4 考察	
1-4-1 複数の PEL 細胞株を用いて解析を実行したことにに関して	36
1-4-2 潜伏感染期の PEL 細胞内における UPR 脱制御に関して	36
1-4-3 溶解感染期の PEL 細胞内における UPR 脱制御に関して	38

1-5 小括 1	40
第 2 章 IRE1 α と PERK 遺伝子のプロモーター解析	
2-1 はじめに	42
2-2 実験方法	
2-2-1 発現プラスミド DNA	42
2-2-2 プロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミド DNA	42
2-2-3 置換変異レポータープラスミドの作製	43
2-2-4 プロモーター・ルシフェラーゼレポーター解析	43
2-2-5 Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析	46
2-2-6 ウェスタンブロット解析	46
2-3 結果	
2-3-1 レポータープラスミドを用いた IRE1 α 遺伝子のプロモーター解析	46
2-3-2 レポータープラスミドを用いた PERK 遺伝子のプロモーター解析	46
2-3-3 置換変異による IRE1 α と PERK 遺伝子のプロモーター解析	49
2-3-4 KSHV 溶解遺伝子による PERK プロモーターの活性化	49
2-4 考察	
2-4-1 IRE1 α に関して	52
2-4-2 PERK に関して	52
2-5 小括 2	53
第 3 章 DAT の抗 PEL 活性と作用機序解析	
3-1 はじめに	56
3-2 実験方法	
3-2-1 細胞培養	58
3-2-2 発現プラスミド DNA	58
3-2-3 浮遊細胞への遺伝子導入	58
3-2-4 PEL 細胞の増殖に対するジアリルスルフィド化合物の影響の解析	58
3-2-5 ウェスタンブロット解析	59
3-2-6 カスパーゼ活性の測定	59
3-2-7 RT-PCR 法による遺伝子発現解析	59
3-2-8 Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析	59
3-2-9 免疫染色法による局在解析	59
3-2-10 細胞分画法	60
3-2-11 ルシフェラーゼレポーター法による NF- κ B の転写活性化能の解析	60
3-2-12 免疫沈降法による相互作用解析	60
3-2-13 プロテアソーム活性の測定	60
3-2-14 TRAF6 のタンパク質安定性試験	60

3-2-15 Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量	61
3-2-16 PEL 移植マウスの作製	61
3-2-17 マウス組織からのゲノム DNA 抽出	61
3-3 結果	
3-3-1 DAT による PEL 細胞特異的な殺細胞効果	62
3-3-2 DAT による UPR の活性化	65
3-3-3 DAT による NF- κ B シグナルの抑制	65
3-3-4 DAT による I κ B α 安定化機構	68
3-3-5 DAT による IKK β リン酸化の阻害	70
3-3-6 DAT によるプロテアソーム依存的な TRAF6 不安定化	72
3-3-7 溶解感染期の PEL 細胞におけるウイルス粒子産生に対する DAT の影響	75
3-3-8 PEL 移植マウスにおける DAT の抗 PEL 活性	76
3-4 考察	80
3-5 小括 3	82
総括	83
謝辞	84
参考文献	85

略語表

ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ATF	Activating transcription factor
BD	BD Biosciences
BES	N, N-Bis (2-hydroxyethyl) -2-aminoethanesulfonic acid
BFA	Brefeldin A
Bip	Ig binding protein
CCK-8	Cell counting kit-8
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
DOC	Sodium deoxycholate
DAS	Diallyl sulfide
DAD	Diallyl disulfide
DAT	Diallyl trisulfide
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2	Eukaryotic Initiation Factor 2
ER	Endoplasmic Reticulum
FBS	Fetal Bovine Serum
FL	Full Length
Flip	FLICE-Inhibitory Protein
GA	Geldanamycin
GABP	GA binding protein
GPCR	G-protein coupled receptor
GRP	Glucose regulated protein
HHV	Human herpesvirus
HSV1	Herpes simplex virus 1
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IκBα	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

IKK	I κ B kinase
IL-1R	Interleukin-1 receptor
IRE1 α	Inositol-requiring enzyme1 α
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	IFN regulatory factor
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LANA	The latency-associated nuclear antigen
LPS	Lipopolysaccharide
MCA	4-methylcoumaryl-7-amide
2-ME	2-mercaptoethanol
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NEM	N-ethylemaleimide
NP-40	Nonidet P-40
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS-T	0.1% Tween20-PBS
PEL	Primary effusion lymphoma
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RT	Reverse transcription
Sal	Salbrinal
SB	Sodium butyrate
SC	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAK1	Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TAB2	TAK1 binding protein 2
Tg	Thapsigargin
TLR	Toll-like receptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated 6
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
Ub	Ubiquitin
UPR	Unfolded protein response
WT	Wild type
XBP1	X-box binding protein 1

序章

現在 8 種のヒトヘルペスウイルスが同定されているが、8 番目に発見された HHV-8 (human herpesvirus-8) は、EBV (epstein-barr virus) と同じ γ ヘルペスウイルスに分類され、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) と呼ばれる¹⁾。がんウイルスである KSHV は、エイズ日和見腫瘍であるカポジ肉腫 (KS) や原発性体腔液性リンパ腫 (primary effusion lymphoma; PEL) の原因ウイルスであり、その潜伏感染者の割合は、日本国内では 4%、北米では 10%、アフリカでは実に 50% 以上と報告されている^{2,3)}。KSHV は健常者に感染した場合、そのまま潜伏感染し、エピソード DNA として宿主細胞の核内に保持される (Fig. 1)。しかし、エイズ発症や臓器移植に伴う免疫抑制剤投与、つまり感染者の免疫抑制を引き金に、KSHV は KS や PEL を引き起こす。日本においても、HIV 感染者数や臓器移植者数が増加傾向にあることから、KSHV 疾患が将来深刻化する恐れがある。PEL は進行性の非ホジキンリンパ腫に分類され、心膜腔、胸腔、腹腔を含む体腔内にリンパ腫が悪性滲出し、息切れ、消化器系機能不全、胸痛等の臨床症状を引き起こす。一般的に、PEL に対する治療方針は、KS に対して有効な CHOP または R-CHOP 療法が採択されるが、PEL はこれらの療法に抵抗性を示すことが報告されている⁴⁾。1994 年の KSHV 発見から既に 20 年以上経過したが、PEL に対して有効な治療薬は未だ無いのが現状であり、新規抗 PEL 薬の開発が緊急課題である。

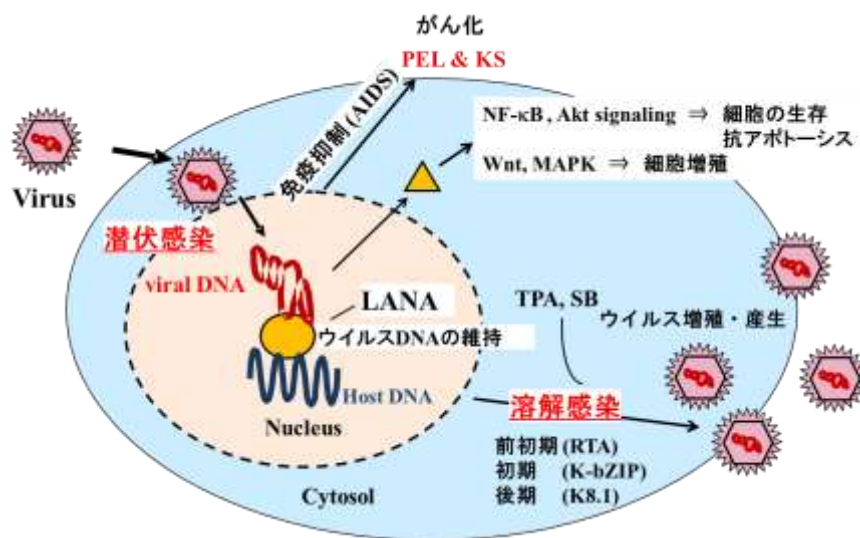


Fig. 1. KSHV の生活環

KSHV は潜伏感染と溶解感染の二つの感染様式を有し、溶解感染期は前初期、初期、後期の三つの時期に細分され、各時期特異的に発現するウイルス遺伝子が知られている。KSHV がコードする遺伝子の大半は溶解感染期に発現し、ウイルス粒子の組み立てと産生に関連する⁵⁾。特に、KSHV の ORF50 (open reading frame 50) がコードする RTA (the viral regulator of transcription activation) は、潜伏感染から溶解感染移行の引き金となる分子である。また、酸

化ストレスや低酸素条件、あるいは TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate) や SB (sodium butyrate) といった化学誘導剤等の種々の刺激によって、実験的に PEL 細胞を溶解感染に誘導できることが知られている⁵⁻⁸⁾。潜伏感染期の PEL 細胞において、KSHV は主に LANA (latency-associated nuclear antigen)、vFLIP (viral FADD-like interleukin-1-beta-converting enzyme/caspase 8-inhibitory protein)、vCyclin 等のウイルスタンパク質と microRNA を発現し、宿主細胞内のシグナル伝達を脱制御し、感染細胞の細胞増殖亢進と感染維持を行う。これまでに明らかにされた KSHV が標的とする細胞内シグナル伝達には、pRb-E2F^{9, 10)}、Wnt- β -catenin^{11, 12)}、Erk-MAPK¹³⁾、Akt^{14, 15)}、および NF- κ B¹⁶⁾ シグナルがあり、これらのシグナルは PEL 細胞内で恒常的に活性化している。また、これらのシグナル伝達の阻害剤が、PEL 細胞に対して細胞毒性を発揮したことから、上記シグナル伝達の恒常的活性化が PEL 細胞の生存に必須だと考えられている¹⁷⁻²⁰⁾。

一方、小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) は、新生タンパク質の立体構造形成 (フォールディング) やフォールディングに失敗した異常 (変性) タンパク質の排除を行うタンパク質品質管理の場である。ER 機能の処理能力を上回るタンパク質合成、ER 機能を障害する刺激、さらに ER 内の翻訳後修飾に関わる遺伝子の変異は、ER にストレス (ER 内での異常タンパク質の過剰蓄積) を誘導する。ER ストレス源には、細菌やウイルスの感染、紫外線照射、酸化ストレス、栄養飢餓、Tg (thapsigargin) 等の化合物が知られている²¹⁾。これらの ER ストレスに対し、細胞は自己の恒常性維持のため ER ストレス応答 (Unfolded protein response; UPR) を活性化する。活性化した UPR は、分子シャペロンの発現誘導を介した ER 内のフォールディング能増強、タンパク質合成抑制、そして異常タンパク質の分解 (ER-associated degradation; ERAD) を行うことで、ER ストレスを軽減する。しかし、UPR で処理できないほどの ER ストレスが細胞に負荷された場合、UPR はアポトーシスを誘導することが知られている。そのため、UPR は細胞の生存と恒常性維持に重要なストレス防御機構だと考えられている。UPR 概要を以下に模式図と共に示す (Fig. 2)²¹⁾。

UPR は ATF6 α (activating transcription factor 6 α)、PERK (protein kinase RNA-like ER kinase)、および IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α) を介した 3 経路から成り、通常 Bip/GRP78 (Ig binding protein/ glucose regulated protein 78 kDa) が結合することで不活性化されているが、ER ストレスが負荷されると、これら 3 分子から Bip が解離し、下流にシグナルが伝達される。ATF6 α 経路は主にシャペロンの発現誘導の機能を担うが、ER 膜上の ATF6 α はゴルジ体に小胞輸送された後、プロテアーゼによる切断を受け、活性化する。この活性化型の ATF6 は ERSE (ER stress response element) 配列を介して ER シャペロンである Bip や GRP94 の転写を活性化し、ER 内の変性タンパク質フォールディング能を増強し、小胞体ストレスを軽減する。PERK 経路は翻訳抑制とアポトーシス誘導の機能を担い、Bip 解離に伴い二量体化し、自己リン酸化することで活性化する。活性化した PERK は翻訳開始因子 eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) をリン酸化することで、細胞内の翻訳抑制を誘導するが、例外的に転写因子 ATF4 の翻訳は活性化する。核内に移行した ATF4 は CRE (cyclic adenosine monophosphate response element) 配列を介して、CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologues protein) の転写を活性化する。CHOP はプロアポトーシス遺伝子である PUMA (p53 upregulated modulator or apoptosis) や Bim

の転写を活性化し、抗アポトーシス遺伝子である Bcl-2 の転写を抑制することで、アポトーシスを誘導する²²⁻²⁴⁾。また、CHOP が転写活性化する GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible gene 34) は、PP1 α (protein phosphatase 1 α) を eIF2 α に引き寄せ、eIF2 α の脱リン酸化を誘導する。IRE1 α 経路は、主に ERAD とアポトーシス誘導の機能を担い、PERK 同様に二量体化し、自己リン酸化することで活性化する。活性化 IRE1 α は XBP1 (X-binding protein1) の未成熟型 mRNA をスプライシングし、XBP1 の成熟型 mRNA (sXBP1) の発現を誘導する。この sXBP1 は UPRE (UPR response element) 配列を介して、ERAD 関連遺伝子の転写を活性化し、ER 内に蓄積した変性タンパク質の分解を亢進する。一方、IRE1 α は TRAF2 (tumor necrosis factor receptor associated factor 2) を介して MAPKK の一種 Ask1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) を活性化し、その結果 Jnk (c-jun N-terminal kinase) が活性化し、最終的にアポトーシスを誘導する。

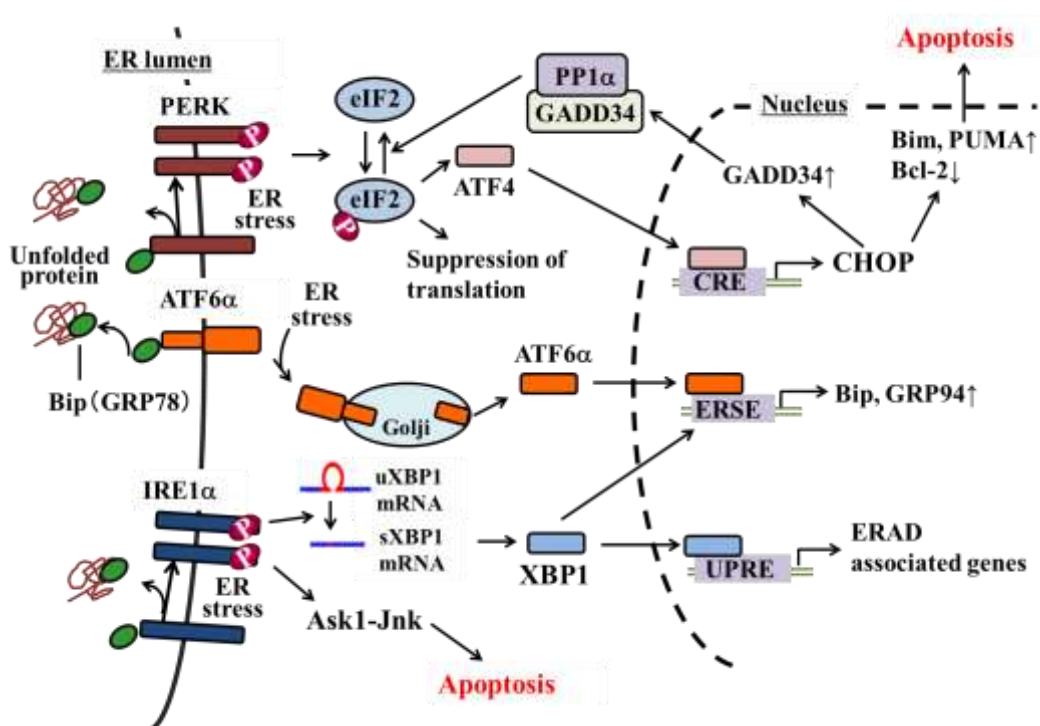


Fig. 2. UPR 模式図

ウイルス感染腫瘍細胞である PEL 細胞では、潜伏感染期における細胞増殖、溶解感染期におけるウイルス複製の各ステージにおいて、大量のウイルスタンパク質が合成される。それゆえ、PEL 細胞では、UPR を介した翻訳抑制やアポトーシスが誘導されるほどの強い ER ストレスが生じていると考えられる。このことから、KSHV が UPR を脱制御することで、感染維持やウイルス産生を行うと推論した。KSHV による UPR の脱制御には、以下の二つが想定される。一つは、ER シャペロンの発現亢進を介して、ER 内フォールディング能を増強することで、UPR が誘導する翻訳抑制やアポトーシスを KSHV が回避することである。もう一つは、翻訳抑制やアポトーシス機能を直接抑制することである。

本研究の第 1 章、第 2 章では、KSHV による UPR 脱制御の分子機構の解明を目的に、潜伏感染期と溶解感染期における PEL 細胞内の UPR 挙動解析をした。すなわち、UPR に焦点を

あてた PEL の新規疾患メカニズムの解析を行った。そして、第 3 章では、PEL 細胞の増殖を抑制し、殺細胞効果を有す化合物の探索とその作用機序解析を行った。

試薬類

試薬類

本研究で使用した試薬の購入先は以下の通りである。

各種制限酵素	TaKaRa
各種プライマー	ユーロフィンジェノミクス
Actinomycin D	Focus biomolecules
ANTI-FLAG M2 Affinity Gel	SIGMA-ALDRICH
Bay11-7082	SIGMA-ALDRICH
BFA (brefeldin A)	和光純薬
Caspase-Glo Assay kit	Promega
CCK-8 (cell counting kit-8)	Dojindo
DMEM (dulbecco's modified eagle's medium)	ナカライテスク
DAS (diallyl sulfide)	和光純薬
DAD (diallyl disulfide)	東京化成工業
DAT (diallyl trisulfide)	LKT Laboratories
DNase I	NEB
ECL TM (enhanced chemiluminescence)	GE Healthcare
Fluoromount-G	SouthernBiotech
GA (geldanamycin)	和光純薬
GoTaq Flexi DNA polymerase	Promega
Hoechst 33258 (以下、Hoechst とする)	Dojindo
Immobilon-P Transfer Membrane	MILLIPORE
KOD FX neo	TOYOBO
LB 培地	和光純薬
Luciferase assay reagent II	Promega
MG132	ペプチド研究所
Opti-MEM	GIBCO
Ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG)	東京化成工業
Passive lysis buffer	Promega
PEI (polyethylenimine)	コスモバイオ
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz
Proteinase K	ナカライテスク
ReverTra Ace qPCR RT Kit	TOYOBO
RNAiso Plus	TaKaRa

RPMI1640	ナカライテスク
Sal (salbrinal)	Focus Biomolecules
Salmon sperma DNA	BioDynamics Laboratory
SepaGene	EIDIA
S-protein beads agarose	Merck Millipore
SB (sodium butyrate)	東京化成工業
Suc leu-leu-val-tyr-MCA (4-methylcoumaryl-7-amide)	ペプチド研究所
Tg (thapsigargin)	Cayman Chemical
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	TOYOBO
T7-Tag Antibody agarose	Millipore
X-ray film	FUJI FILM

試薬調製

Actinomycin D、bay11-7082、BFA、DAS、DAD、DAT、GA、MG132、Sal、SB、Suc leu-leu-val-tyr-MCA、Tg は、全て DMSO (dimethylsulfoxide) に溶解した後、使用した。cycloheximide は、100% ethanol に溶解し、使用した

緩衝液

本研究で使用した緩衝液の組成は、以下の通りである。

2×BBS buffer

50 mM N, N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄ (pH7.0)

TE buffer

10 mM Tris-HCl (trishydroxymethylaminomethane-HCl) 、 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH8.0)

PBS (phosphate-buffered saline)

137.0 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄、1.4 mM NaH₂PO₄

PBS-T

137.0 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄、1.4 mM NaH₂PO₄、0.1% tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)

Transfer buffer

25 mM Tris、192 mM glycine、20% methanol

Z buffer

10 mM Na-phosphate buffer (pH7.5)、0.1 mM KCl、0.02 mM MgSO₄、0.4 mM 2-mercaptoethanol

2×SDS-PAGE sample buffer

2% SDS (sodium dodecyl sulfate)、80 mM Tris-HCl (pH6.8)、20% glycerol、 $1.2 \times 10^{-3}\%$ bromophenol blue、1% 2-mercaptoethanol

8×SDS-PAGE sample buffer

8% SDS、320 mM Tris-HCl (pH6.8)、80% glycerol、 $1.2 \times 10^{-3}\%$ bromophenol blue、4% 2-mercaptoethanol

Solution buffer

20 mM HEPES-NaOH (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-NaOH) (pH7.4)、0.25 M Sucrose、1 mM EDTA、

Fraction buffer

20 mM HEPES-NaOH (pH7.4)、3 mM MgCl₂、10 mM NaCl

IP buffer

20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% NP-40 (nonidet P-40)

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.1% SDS、0.5% DOC (sodium deoxycholate)、1% NP-40

Buffer A

50 mM Tris-HCl (pH7.6)、1mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、1% glycerol、1 mM DTT (dithiothreitol)、0.2 mM ATP (adenosine 5'-triphosphate)、0.2% NP-40

Buffer B

50 mM Tris-HCl pH7.8、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、2 mM ATP、0.1 mM Suc leu-leu-val-tyr-MCA

DNase I buffer

100 mM Tris-HCl pH7.6 at 25°C、25 mM MgCl₂、5 mM CaCl₂

TNE solution

150 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM EDTA

NTE solution

650 mM NaCl、 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、 10 mM EDTA

3M NaOAC

2 M CH_3COOH 、 4.97 M CH_3COONa

第1章 PEL 細胞内の UPR 挙動解析

1-1 はじめに

近年、ウイルス感染と UPR の強い相関が明らかとなってきた²⁵⁾。正常細胞と比較して、ウイルス感染細胞内では、大量のウイルスタンパク質が合成されるので、過度な ER ストレスが生じる。これに対して、HSV1 (herpes simplex virus1) や EBV、CMV (cytomegalovirus) といったヘルペスウイルスは UPR を脱制御することで、宿主細胞内の ER ストレスを軽減し、ウイルスの生存や増殖を行うことが明らかとなってきた^{26, 27)}。一方、これらのヘルペスウイルスに比べ、KSHV と UPR に関する知見は少ない²⁸⁻³³⁾。さらに、PERK-eIF2 α 経路を介した翻訳抑制によって、UPR が KSHV のウイルス産生を阻害する報告と³²⁾、UPR が RTA を含む溶解感染遺伝子の発現とウイルス産生を活性化する報告があり^{28, 29, 33)}、KSHV の溶解感染に対する UPR 活性化の影響は不明な点が多い。また、先行研究において、潜伏感染期の PEL 細胞における UPR の挙動解析は全くされていない。そこで、本章では、潜伏および溶解感染期の PEL 細胞における UPR 挙動を解析した。

1-2 実験方法

1-2-1 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、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で培養した。

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

KSHV 感染、EBV 感染 PEL 細胞: HBL6、および BC2

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、DG75、および BJAB

HeLa 細胞株は、10% FBS 含有 DMEM 培地を用いて、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で培養した。

1-2-2 細胞からのゲノム DNA 抽出

PBS で洗浄した細胞を TNE solution 10 mL、10% SDS 溶液 400 μ L、20 mg/mL proteinase K 溶液 100 μ L を加え、65°C、3 時間反応させた。次に、NTE solution 10 mL を加え転倒混和した後、phenol 抽出、phenol-chloroform 抽出、chloroform 抽出を各 1 回ずつ行い、回収した上清を ethanol 沈殿することで、ゲノム DNA を精製した。

1-2-3 プラスミド DNA

ヒト IRE1 α および PERK の発現プラスミド DNA は Addgene 社から購入し、そのプラスミド名と ID を以下に示す。

Name: IRE1 alpha-pcDNA3.EGFP (以下、IRE1 α pcDNA と略す) ID: 13009

Name: PERK1:PERK.WT.9E10.pcDNA (以下、PERK-WT pcDNA と略す) ID: 21814

Name: PERK2:PERK.K618A.9E10.pcDNA (以下、PERK-KA pcDNA と略す) ID: 21815

PERK-KA は、PERK の K618 を A に置換した変異体タンパク質で、キナーゼ活性欠損変異体タンパク質である。また、IRE1 α pcDNA を鋳型に、N 末側に 2 \times S-tag peptide を付加した形で哺乳類細胞発現ベクターpCIneo (Promega 社より購入) に、EcoRI/SalI サイトを利用してクローニングし、2S-IRE1 α を作製した。

KSHV が発現するウイルスタンパク質 LANA およびその欠損変異体タンパク質、vFLIP、vCyclin の発現プラスミド DNA は、当研究室の藤室雅弘教授が作製した。完全長 LANA (以下、DY52) および LANA 繰返し領域を欠損させた MF24、vFLIP および vCyclin をコードする遺伝子は、N 末端側に 3 \times T7 tag, または 2 \times S-tag peptide が付加された形でタンパク質が発現するように、pCIneo にクローニングされたプラスミド DNA である。また、LANA の欠損変異体タンパク質発現プラスミド DNA (MF44、MF68、MF69、MF70、MF81 および MF82) は、N 末端側に Flag-tag が付加された形で、タンパク質が発現するように、哺乳類細胞発現ベクターpSG5 (Stratagene 社より購入) にクローニングされたプラスミド DNA である。LANA-N と LANA-C は、LANA の N 末ドメイン (1-340 アミノ酸残基)と C 末ドメイン (936-1162 アミノ酸残基) 発現プラスミドであり、当研究室の藤室雅弘教授が作製した。N 末端に 2 \times S-tag peptide が付加された形でタンパク質が発現するように、pCIneo にクローニングされたプラスミド DNA である。KSHV の glycoprotein をコードする ORF8 (glycoprotein B; gB)、ORF22 (glycoprotein H; gH)、ORF39 (glycoprotein M; gM)、ORF47 (glycoprotein L; gL)、ORF53 (glycoprotein N; gN)、ORF51 (K8.1)、ORF68 は BCBL1 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型に、KOD FX neo を用いて PCR 法にて増幅した。PCR 反応液組成と条件は以下の通りである。ORF53 以外の増幅した PCR 産物は各種制限酵素サイトを利用して、N 末端側に 2 \times S-tag peptide が付加された形でタンパク質が発現するように、pCIneo にクローニングした。ORF53 は、C 末端側に 2 \times S-tag peptide が付加された形でタンパク質が発現するように、pCIneo にクローニングした。各遺伝子のプライマーセットとクローニングサイトを Table 1 に示す。また、完全長 gB と gH は発現効率が非常に低かったので、予測膜貫通領域 (transmembrane; TM) を欠損させた変異体タンパク質も作製した。作製したプラスミドはシーケンス解析を行い、変異がないことを確認した。

2 \times PCR buffer for KOD FX Neo	25 μ L	94 $^{\circ}$ C 2 min	} 33 cycles
2 mM dNTPs mix	10 μ L	98 $^{\circ}$ C 10 sec	
10 μ M sense primer	1.5 μ L	55 $^{\circ}$ C 1 min	
10 μ M antisense primer	1.5 μ L	68 $^{\circ}$ C 0.5 min/1 kb	
KOD FX Neo (enzyme)	1 μ L	4 $^{\circ}$ C 5 min	
Template DNA (20 ng)	2 μ L		
<u>Distilled sterilized water</u>	<u>9 μL</u>		
Total	50 μ L		

Table 1

KSHV の glycoprotein のクローニングに使用したプライマー

Name	Gene	Sense primer	Antisense Primer	Cloning site
ZS35	ORF8	5'-GGAAGAATTCATG ACTCCCAGGTCTAGA TTGGC-3'	5'-AACCCGGGTCACT CCCCCGTTTC-3'	EcoRI/SmaI
ZS68	ORF8 \triangle TM	5'-GGAAGAATTCATG ACTCCCAGGTCTAGA TTGGC-3'	5'-AACCCGGGTCAGC CACCCAGGTC-3'	EcoRI/SmaI
ZS33	ORF22	5'-AAACGCGTATGCA GGGTCTAGC-3'	5'-GGGTCTAGACTAAT AAAGGATGGAAAAC AGTC-3'	MluI/XbaI
ZS62	ORF22 \triangle TM	5'-AAACGCGTATGGC CACTGGCGC-3'	5'-GGGTCTAGACTAA CTGGCTGCGCGTCTT C-3'	MluI/XbaI
ZS37	ORF39	5'-AAGAATTCATGCG CGCTTCAAAG-3'	5'-AGGTCGACCTAAA TGAATATCATTTGCG-3 ,	EcoRI/SalI
ZS6	ORF47	5'-AAGAATTCATGGG GATCTTTGCG-3'	5'-AGGTCGACTTATTT TCCCTTTTGACC-3'	EcoRI/SalI
ZS5	ORF53	5'-AAGAATTCATGAC AGCGTCCAC-3'	5'-AAGTCGACTGCAT GGACCAC-3'	EcoRI/SalI
ZS36	ORF51	5'-AAACGCGTATGAG TTCCACACAG-3'	5'-AAGTCGACTTACA CTATGTAGGGTTTCTT ACG-3'	MluI/SalI
ZS41	ORF68	5'-AAACGCGTATGTTT GTTCCCTGG-3'	5'-AAGTCGACTCAAG CGTACAAGGTGAC-3 ,	MluI/SalI

1-2-4 接着細胞への遺伝子導入

接着細胞の場合、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。24-well plate の場合、1 well あたり、合わせて 40 μ L になるよう DNA 3 μ g と 2.5 M CaCl_2 水溶液 4 μ L と滅菌水をよく混合した。これに等量の 2 \times BBS buffer を加え、よく混合した後、室温で10分間インキュベートすることで、DNA 混合液を調製した。培養ディッシュ上で、20-30% コンフルエントに達した細胞に上記の DNA 混合液を加え、 CO_2 インキュベーター (35 $^\circ\text{C}$ 、3.5% CO_2) 内で一晩培養した。次に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、新しい培地に交換した後、さらに培養(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2) を続け、DNA 混合液を細胞に添加してから計 48 時間後に細胞を回収した。

1-2-5 細胞増殖アッセイ

5×10^4 cells/50 μ L/well となるよう細胞を 96 well-plate に播種し、培地を用いて種々の濃度に希釈した化合物溶液を等量加え、37 $^\circ\text{C}$ 、24 時間 CO_2 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 CCK-8 を 10 μ L 添加、混合し、3 時間培養後、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。

1-2-6 ウェスタンブロット解析

SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) を行った後、セミドライ方式を用いて、 1 cm^2 あたり 2 mA の電流を 60 分間通電することで PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜へ転写した。転写後の膜を PBS-T に溶解した 5% skim milk 溶液で 30 分間震盪することでブロッキングした後、ブロッキング溶液中にて、種々の濃度の一次抗体と室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS-T で室温 10 分間の洗浄を 4 回行い、PBS-T 中で 5000 倍に希釈した二次抗体と 1 時間反応させた。反応後、PBS-T で室温 10 分間の洗浄を 5 回行い、次いで PBS で室温 5 分間の洗浄を 3 回行った後、ECL を用いて化学発光させ、X 線フィルムに感光させた。本研究で使用した、各種抗体の使用濃度およびメーカーを記載する。

Anti-Caspase-3 rabbit polyclonal antibody	×1000	CST (Cell Signaling Technology)
Anti-Caspase-7 rabbit polyclonal antibody	×1000	CST
Anti-Caspase-8 rabbit polyclonal antibody	×500	CST
Anti-Caspase-9 rabbit polyclonal antibody	×500	CST
Anti-PARP rabbit polyclonal antibody	×1000	CST
Anti-β-Actin mouse monoclonal antibody	×10000	SC (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)
Anti-p21 ^{Cip1} mouse monoclonal antibody	×1000	BD (BD Biosciences)
Anti-Bip/GRP78 mouse monoclonal antibody	×5000	BD
Anti-IκBα mouse monoclonal antibody	×1000	BD
Anti-p65 mouse monoclonal antibody	×1000	BD
Anti-Histone H2B rabbit polyclonal antibody	×2000	SC
FK-2 mouse monoclonal antibody	×3000	当研究室の藤室雅弘教授が作製
Anti-Phospho-IκBα (Ser32/Ser36) rabbit polyclonal antibody	×1000	CST
Anti-FLAG mouse monoclonal antibody	×3000	SIGMA
T7-tag Antibody HRP Conjugate	×10000	Novagen (Merck Millipore)
Anti-S- probe rabbit polyclonal antibody	×3000	SC
Anti-Phospho-IKKα (Ser176)/IKKβ (Ser177) rabbit monoclonal antibody	×500	CST
Anti-myc mouse monoclonal antibody	×3000	Calbiochem (Merck Millipore)
Anti-TRAF6 rabbit polyclonal antibody	×200	SC
Anti-HA-tag mouse monoclonal antibody	×3000	Babco
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	BD
Anti-Erk1/2 mouse monoclonal antibody	×1000	BD
Anti-Phospho-Akt (Ser473) rabbit polyclonal antibody	×1000	CST
Anti-Phospho-Akt (Thr308) rabbit polyclonal antibody	×1000	CST
Anti-Akt rabbit polyclonal antibody	×1000	CST

HRP conjugate anti-mouse IgG	×5000	GE Healthcare
HRP conjugate anti-rabbit IgG	×5000	GE Healthcare
Anti-PERK mouse monoclonal antibody	×100	SC
Anti-IRE1 α mouse monoclonal antibody	×100	SC
Anti-ATF6 α rabbit polyclonal antibody	×200	SC
Anti-PCNA mouse monoclonal antibody	×5000	SC
Anti-p53 mouse monoclonal antibody	×2000	SC
Anti-K-bZIP mouse monoclonal antibody	×5000	SC

1-2-7 細胞分画法

細胞 (5×10^6 cells) を PBS で 3 回洗浄した後、400 μ L の solution buffer に懸濁し、27G の注射針を装着した 1 mL シリンジで、泡立たないように 5 回ピペッティングすることで、細胞をホモジナイズした。その後、3000 rpm、4°C、10 分間遠心し、上清を細胞質画分とした。また、得られた沈殿物に 400 μ L の fraction buffer を添加して、氷上で 10 分間インキュベートした。その後、終濃度 0.6% になるように NP-40 を加え、10 秒間ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、13000 rpm、4°C、20 秒間遠心し、沈殿物を回収した。Fraction buffer を添加する操作から再び繰り返し、得られた沈殿物を核画分とした。これらの画分を SDS-PAGE、ウェスタンブロット解析することで、目的とするタンパク質の局在を分析した。

1-2-8 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

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 (5×10^6 cells) を RNAiso plus 500 μ L と chloroform 100 μ L に溶解し、15000 rpm、4°C、5 分間遠心した。回収した上清 160 μ L に 2-propanol 400 μ L を加え、転倒混和した後、さらに 15000 rpm、4°C、15 分間遠心した。得られた RNA ペレットを氷冷した 70% ethanol でリンスし、乾燥させた後、滅菌水に溶解した。20 ng の RNA を鋳型に ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて、37°C、30 分間の逆転写反応を行った。1 サンプルあたりの反応液組成は、以下の通りである。次に、反応溶液 10 μ L に対し、TE buffer を 40 μ L 加えた cDNA 溶液を鋳型に GoTaq Flexi DNA polymerase と各遺伝子特異的プライマーセット (Table 2) を用いて PCR 反応を行った。1 サンプルあたりの PCR 反応液組成と条件を以下に示す。PCR 産物は 2.5% アガロースゲル電気泳動により単離し、ethidium bromide 染色することで、解析した。

逆転写反応液組成

5×RT Buffer	2 μ L
Primer Mix	0.5 μ L
RT Enzyme mix	0.5 μ L
Template RNA	2 μ L (20 ng)
<u>Distilled sterilized water</u>	<u>5 μL</u>
Total	10 μ L

RT-PCR 反応液組成および反応条件

5 × Green GoTaq Flexi buffer	4 μL		
25 mM MgCl ₂	2.4 μL	95°C	2 min
10 mM dNTPs mix	0.4 μL	95°C	30 sec
10 μM sense primer	1 μL	55°C	30 sec
10 μM antisense primer	1 μL	72°C	45 sec
DNA polymerase	0.1 μL	4°C	5 min
Template cDNA	2 μL		
Distilled sterilized water	9.1 μL		
Total	20 μL		

35 cycles

Table 2

RT-PCR に用いたプライマー

Gene	Sense primer	Antisense primer
ATF6α	5'-CTTTACTAGGCCACCGTC TCG-3'	5'-CAAATCCAACCTCCTCAG GAAC-3'
CHOP	5'-GGTACCTATGTTTCACCT CCTG-3'	5'-GAGCCGTTTCATTCTCTTC AGC-3'
GADD34	5'-CGAGGAAGAGGGAGTTG CTG-3'	5'-CTCCATCCTTCTCAGCTG CC-3'
GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	5'-TGACCACAGTCCATGCC ATC-3'	5'-GGGGAGATTCAGTGTGG TGG-3'
IKKα (IκB kinase α)	5'-AGACGTCAGGGAGACTT GATG-3'	5'-ACTGGATCCTACAAGAG AGCG-3'
IKKβ	5'-AGGTGCCATCCTCACCTT GC-3'	5'-AATGTCCACCTCACTCTT CTGCC-3'
IKKγ	5'-AGTTGCAGGTGGCCTAT CACC-3'	5'-CTCATGTCCTCGATCCTG GC-3'
IRE1α	5'-GGGTCTGAGGAAGGTGA TGC-3'	5'-CAGTGGGGTTTCATGGT GTC-3'
PERK	5'-TGAGACAGAGTTGCGAC CG-3'	5'-GCCAACACTGAAATTCC ACTTCTC-3'
TRAF6	5'-CAGGGGTATAGCTTGCCC TCAC-3'	5'-TGGAACGTGTGGATTCC CAG-3'
XBPI	5'-GTTGAGAACCAGGAGTT AAGACAG-3'	5'-CAGAGGGTATCTCAAGA CTAGG-3'

1-2-9 Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析

細胞からの RNA 抽出および cDNA 合成は、1-2-8 の項で示す方法と同様に行った。合成した cDNA 溶液を鋳型に、Table 3 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°C、1 分間変性させた後、95°C、15 秒間の熱変性と 60°C で 60 秒間の伸長を 40 サイクル行った。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 μ L
10 μ M sense primer	1 μ L
10 μ M antisense primer	1 μ L
Template DNA	2 μ L
Distilled sterilized water	6 μ L
Total	20 μ L

Table 3

Real-time RT-PCR に用いたプライマー

Gene	Sense primer	Antisense primer
ATF6 α	5'-GGAAGTCAGGGAGTGAGCTACA AG-3'	5'-AACCGCTCAACCTTCGAAATG-3'
Bip	5'-GGAATTCCTCCTGCTCCTCGT-3'	5'-CAGGTGTCAGGCGATTCTGG-3'
CHOP	5'-GCTCTGATTGACCGAATGGT-3'	5'-TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG-3'
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
I κ B α	5'-AGCTTTTGGTGTCTTGGGTG-3'	5'-CTGTTGACATCAGCCCCACAC-3'
IRE1 α	5'-GGCCTCGGGATTTTGGGAAGTAC- 3'	5'-TGCAAACCTCCATCCAGCGTT-3'
K8.1	5'-TCCACACAGATTCGCACAGA-3'	5'-AATGCGAACGATACGTGGGA-3'
K-bZIP	5'-AAGTCTCTTGGACAAGCTCGC-3'	5'-TGAGCATGGCAGATGTTCG-3'
PERK	5'-GCGCGGCAGGTCATTAGT-3'	5'-TGCTAAGGCTGGATGACACC-3'
RTA	5'-ATAATCCGAATGCACACATCTTCC ACCAC-3'	5'-TTCGTCGGCCTCTCGGACGAACT GA-3'
uXBP1	5'-ACTCAGACTACGTGCACCTC-3'	5'-GTCAATACCGCCAGAATCCA-3'
sXBP1	5'-CTGAGTCCGCAGCAGGTGCA-3'	5'-GGTCCAAGTTGTCCAGAATGCCC AA-3'

1-2-10 Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量

1×10^6 cells/4 mL/well で 6 well-plate に播種した BCBL1 細胞に、終濃度 3 mM の SB と種々の濃度に希釈した薬物を含む培地を等量 (4 mL) 加え、37°C で培養した。培養 48 時間後、3 mL の培地を 1400 rpm (300×g)、2 分間遠心し、上清を 2 mL 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、この培地上清 2 mL に対して、10×DNase I buffer 220 μ L と DNase I 10 μ L をよく混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。この反応は、操作中に破碎した細胞に由来するウイルス DNA (キャ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 95°C、5 分間加熱した後、0.5M EDTA-Na (pH8.0) 50 μ L、10% SDS 溶液 100 μ L、20 mg/mL proteinase K 溶液 10 μ L、および 1 mg/mL salmon sperma DNA 溶液 10 μ L を加え、56°C で 1 時間インキュベートすることで、培地上清中に含まれるウイルス粒子キャプシドタンパク質を分解した。また、salmon sperma DNA は、ethanol 沈殿の効率を上げるために加えた。反応後、phenol-chloroform 抽出と chloroform 抽出を各 1 回ずつ行い、サンプル中のタンパク質を変性、除去した。抽出液 1.5 mL に対して、氷冷した 100% ethanol 3 mL と 3 M NaOAc 150 μ L を加え、-80°C で 30 分間冷却した後、15000 rpm、4°C、30 分間遠心した。沈殿した DNA を氷冷した 70% ethanol で 1 回洗浄し、乾燥させた後、TE buffer 15 μ L に溶解した。このサンプル中に含まれるウイルス DNA を 1-2-9 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。また、 1×10^1 - 1×10^7 copies/ μ L に調製した pcDNA-RTA (Gao SJ. から恵与) を用いて、検量線を作成した³⁴⁾。

1-2-11 IRE1 α と PERK タンパク質の安定性試験

2S-IRE1 α と PERK-WT pcDNA を遺伝子導入した HeLa 細胞 (各 10cm² dish 4 枚) を PBS で 3 回洗浄した後、IP buffer (終濃度 1 mM DTT を含む) 4 mL に溶解し、超音波破碎した。次に、15000 rpm、4°C、5 分間の遠心を行い、上清を回収し、基質に用いた。また、 1×10^7 BCBL1 または Ramos 細胞を IP buffer (終濃度 1 mM DTT を含む) 1 mL にそれぞれ溶解し、上記と同様の操作を行い、酵素溶液を調製した。基質溶液 600 μ L に対して、酵素溶液 300 μ L を加え、37°C で 0、30、または 60 分間インキュベートした。反応後、速やかに 8×SDS-PAGE sample buffer 150 μ L を加え、95°C、5 分間加熱した。その後、各サンプル中の IRE1 α と PERK のタンパク質量をウェスタンブロットにより解析した。

1-2-12 IRE1 α と PERK の mRNA 安定性試験

1×10^6 cells の BC3、BCBL1、HBL6、および Ramos 細胞を RNA 合成 (転写) 阻害剤である actinomycin D (終濃度 5 μ g/mL) で、0-4 時間処理し、IRE1 α と PERK の mRNA 量を real-time RT-PCR 法を用いて、解析した。

1-2-13 有意差検定について

有意差検定は、最初に F 検定を行い、分散の検定を行った後、t 検定を行った。p 値が 0.05 未満の場合に、「有意差あり」と評価した。

1-2-14 CC₅₀ 値の算出法について

CC₅₀ (cytotoxic concentration that reduces cell viability by 50%) 値は、cell viability (細胞生存率) を 50% まで減少させる化合物の細胞毒性濃度である。CC₅₀ 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 潜伏感染期の PEL 細胞における IRE1 α と PERK の発現解析

PEL 細胞内の Bip、IRE1 α 、PERK、および ATF6 α の発現について、ウェスタンブロット法を用いて解析した。ウイルス非感染 (BJAB、Ramos、および DG75) 細胞と比較して、PEL (BC3、BCBL1、および HBL6) 細胞内では IRE1 α と PERK の発現量が顕著に減少していた (Fig. 3A)。また、ウイルス非感染細胞で観察された Tg 処理による IRE1 α と PERK の発現量増加も、3 種の PEL 細胞ではウェスタンブロット法では検出できなかった (Fig. 3A)。一方、Bip の発現や核内 ATF6 α の発現量については、PEL 細胞とウイルス非感染細胞間で、共通する差異は観察されなかった (Fig. 3A および B)。なお、細胞抽出液 (total cell lysate; TCL) を用いて ATF6 α の発現を解析した結果、非特異的バンドが非常に多く検出されたため (data not shown)、細胞を核と細胞質に分画し、ATF6 α の核内発現を解析した。

近年、IRE1 α がプロテアソームや細胞内プロテアーゼによって分解されることが報告されている^{35, 36)}。そこで、PERK と IRE1 α を遺伝子導入した HeLa 細胞から調製した抽出液を、BCBL1 または Ramos 細胞の抽出液と一定時間反応させ、PERK および IRE1 α のタンパク質量の変化を評価、比較した。その結果、IRE1 α は反応時間依存的にタンパク質量が減少したが、BCBL1 と Ramos 細胞の抽出液間で有意な差は認められなかった (Fig. 3C)。また、反応時間 60 分間において、PERK のタンパク質量は減少しなかった (Fig. 3C)。これらの結果から、PEL 細胞内で IRE1 α と PERK はタンパク質の分解が亢進しているのではなく、mRNA レベルで発現が抑制されていることが示唆された。

1-3-2 潜伏感染期の PEL 細胞における転写レベルでの IRE1 α と PERK の発現解析

PEL 細胞における IRE1 α と PERK の mRNA 発現を、RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、ウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞と比較して、PEL (BCBL1、JSC1、および HBL6) 細胞内では、IRE1 α と PERK の mRNA 量が減少していた (Fig. 4A)。また、BCBL1 細胞の IRE1 α と PERK の mRNA 量は、Ramos 細胞の 1/10 程度であった (Fig. 4B および C)。ATF6 α に関しては、ウェスタンブロットの結果と同様に、PEL 細胞とウイルス非感染細胞間で、有意な差異はなかった (Fig. 4A)。また、PEL 細胞を Tg 処理した時、IRE1 α と PERK の発現が増加した (Fig. 4A)。Tg は、ER に局在する Ca²⁺ 依存性 ATPase (ER Ca²⁺-ATPase) の阻害剤であり、ER ストレスを誘導する化合物として知られている。

次に、PEL 細胞内の IRE1 α と PERK の発現抑制が、転写阻害または mRNA の分解亢進のどちらに起因するかを解析した。転写阻害剤 actinomycin D を用いて、PEL 細胞内の IRE1 α と PERK の mRNA 量を解析した。全細胞種において、時間依存的な IRE1 α と PERK の mRNA 量の減少が観察されたが、PEL 細胞と Ramos 細胞間で mRNA 量の減少速度に関する一定の有意差は観察されなかった (Fig. 5A)。IRE1 α の安定性は、Ramos 細胞に比べ、BC3 および HBL6 細胞の方が高く、BCBL1 細胞は Ramos 細胞と同等であった (Fig. 5A)。また、PERK の安定性は、Ramos 細胞に対して BC3 および BCBL1 細胞が有意に低かったが、HBL6 細胞は Ramos 細胞と同等であった (Fig. 5A)。Actinomycin D 投与直後 (図中 0 時間) における Ramos 細胞の mRNA 量を 1.0 とした場合、PEL 細胞内の IRE1 α と PERK の mRNA の変化量は、Ramos 細胞

と比較して小さかった (Fig. 5B)。これらの結果から、PEL 細胞において、IRE1 α と PERK の mRNA 量の減少は、mRNA の分解亢進ではなく、転写レベルで発現が抑制されていることが明らかとなった。

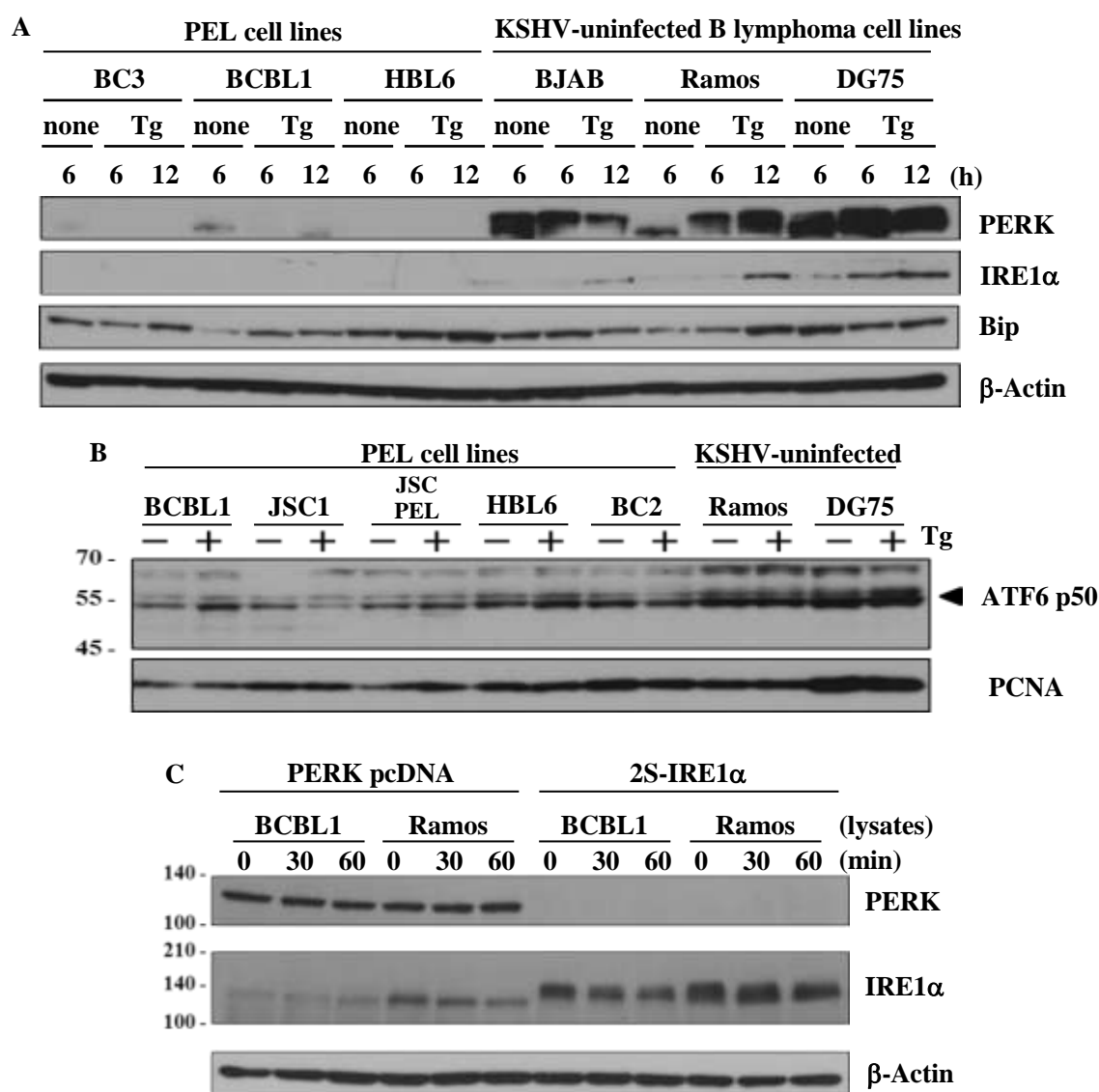


Fig. 3. PEL 細胞における IRE1 α と PERK の発現解析

- (A) PEL (BC3、BCBL1、および HBL6) 細胞とウイルス非感染 (BJAB、Ramos、および DG75) 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で、6 または 12 時間処理し、ウェスタンブロットを行った。図は参考文献 (37) の Fig. 1a を一部変更し、引用した。
- (B) PEL (BCBL1、JSC1、JSC-PEL、HBL6、および BC2) 細胞とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で 8 時間処理した後、核を分画し、ウェスタンブロットを行った。図は参考文献 (37) の Fig. 1b を一部変更し、引用した。
- (C) PERK pcDNA または 2S-IRE1 α を遺伝子導入した HeLa 細胞の抽出液と、BCBL1 または Ramos 細胞の抽出液を混合し、37°C で、0、30、および 60 分間インキュベート後、ウェスタンブロットを行った。図は参考文献 (37) の Fig. 2a を一部変更し、引用した。

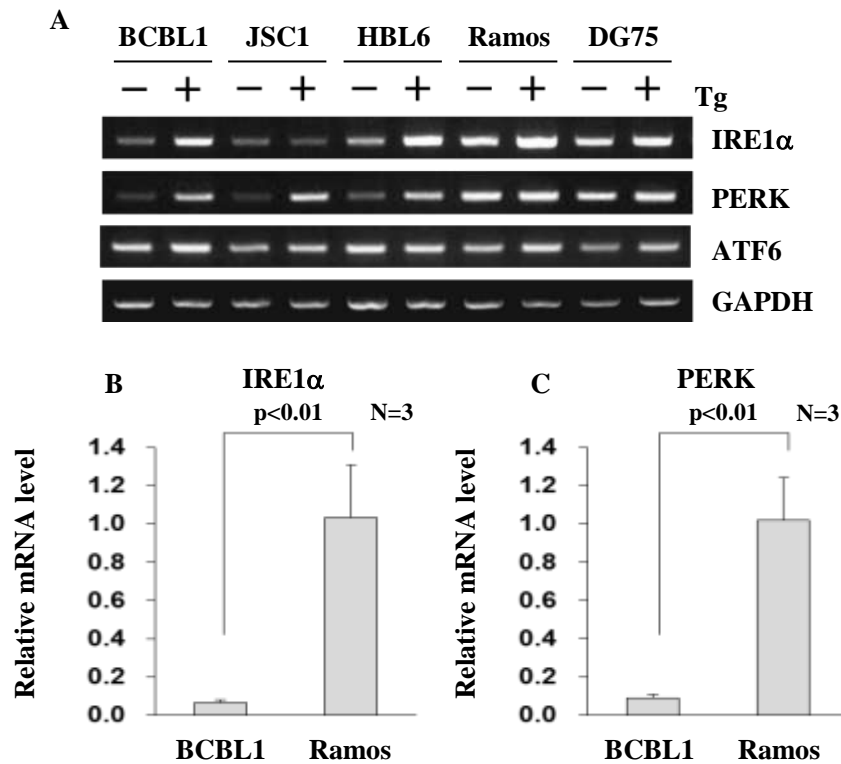


Fig. 4. PEL 細胞における IRE1α と PERK の mRNA の発現解析

(A) PEL (BCBL1、JSC1、および HBL6) 細胞とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で 4 時間処理し、RT-PCR 法を用いて IRE1α、PERK、および ATF6α の発現量を解析した。図は参考文献 (37) の Fig. 1c を一部変更し、引用した。

(B) (C) BCBL1 と Ramos 細胞内の IRE1α (B)、PERK (C) の mRNA 量を定量した。Ramos 細胞の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 1e を一部変更し、引用した。

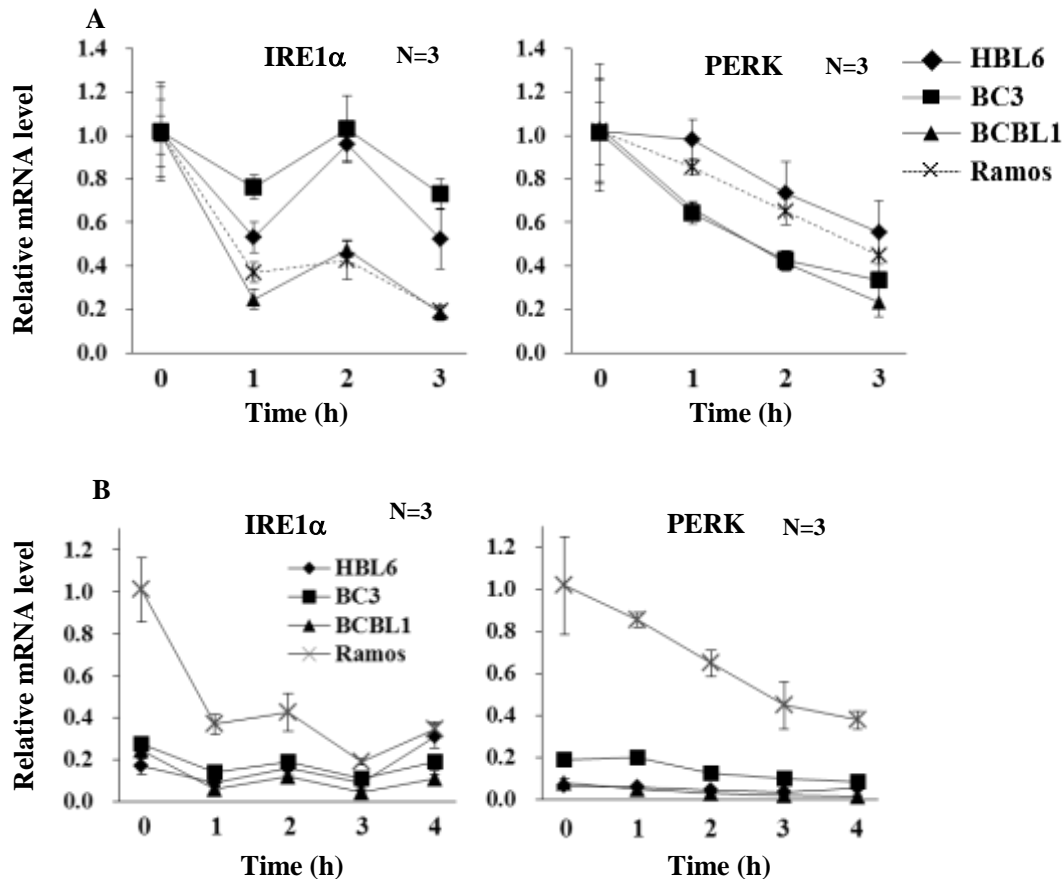


Fig. 5. PEL 細胞における IRE1α と PERK の mRNA 安定性試験

- (A) PEL (BC3、BCBL1、および HBL6) 細胞と Ramos 細胞を 5 mg/mL actinomycin D で 0-3 時間処理し、IRE1α (左図) と PERK (右図) の mRNA 量を定量することで、mRNA の安定性を解析した。Actinomycin D 投与直後 (図中 0 時間) における各細胞の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。
- (B) PEL (BC3、BCBL1、および HBL6) 細胞と Ramos 細胞を 5 mg/mL actinomycin D で 0-4 時間処理し、IRE1α (左図) と PERK (右図) の mRNA 量を定量することで、mRNA の安定性を解析した。Actinomycin D 投与直後 (図中 0 時間) における Ramos 細胞の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 2b を一部変更し、引用した。

1-3-3 潜伏感染期の PEL 細胞における IRE1α と PERK 経路の解析

PEL 細胞において、IRE1α と PERK の発現が減少していたことから、PERK 経路の下流に位置する転写因子 ATF4 の発現と、IRE1α が実行する XBP1 のスプライシングを解析した。細胞分画を行って、核内の ATF4 の発現を解析した結果、ウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞と比較して、PEL 細胞内の ATF4 の核内発現量は顕著に減少していた (Fig. 6A)。一方、BCBL1 細胞と Ramos 細胞間で uXBP1 の mRNA 量は同等であったが、BCBL1 細胞内の sXBP1

の mRNA 量は Ramos 細胞の約 30% であった (Fig. 6B および C)。BCBL1 細胞と Ramos 細胞共に、Tg 処理により uXBP1 と sXBP1 の発現誘導が確認されたが、Ramos 細胞の sXBP1 の発現誘導が、未処理時の約 8 倍であったことに対し、BCBL1 細胞では約 2.5 倍と低かった (Fig. 6D および E)。これらの結果は、PEL 細胞における IRE1 α と PERK の発現抑制を支持する。

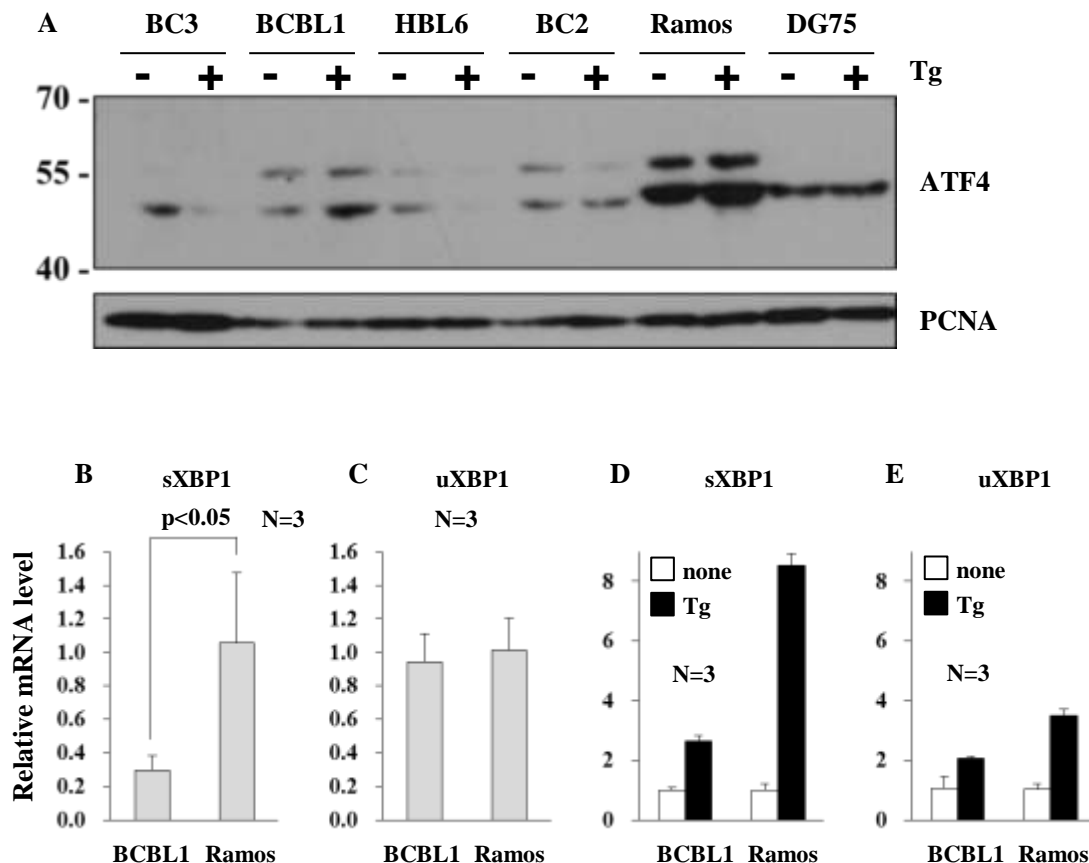


Fig. 6. PEL 細胞における XBP1 と ATF4 の発現解析

- (A) PEL (BC3、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で 8 時間処理し、分画した後、核内の ATF4 の発現量をウェスタンブロット法で解析した。
- (B) (C) BCBL1 と Ramos 細胞内の sXBP1 (B) と uXBP1 (C) の mRNA 量を real-time PCR 法により定量した。Ramos 細胞の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 1e を一部変更し、引用した。
- (D) (E) BCBL1 と Ramos 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で 4 時間処理し、sXBP1 (D) と uXBP1 (E) の mRNA 量を real-time PCR 法により定量した。各細胞の未処理の時の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 1d を一部変更し、引用した。

1-3-4 ウイルスタンパク質 LANA による IRE1 α の発現抑制

次に、IRE1 α と PERK の発現抑制因子の同定を試みた。潜伏感染時、PEL 細胞内で主に発現しているウイルスタンパク質は、LANA、vFLIP、および vCyclin の三つである。そこで、IRE1 α と PERK の mRNA の発現に対する、これらウイルスタンパク質の過剰発現による影響を解析した。なお、DY52 は完全長 LANA を、MF24 は LANA の繰返し領域 (330-927 アミノ酸残基) を欠損させた LANA タンパク質を発現するプラスミドであり、先行研究から MF24 は LANA の機能の大部分を有することが知られている¹²⁾。解析の結果、DY52、MF24、および vCyclin を遺伝子導入した HeLa 細胞において、IRE1 α の mRNA 発現がそれぞれ 25%、50%、および 40%減少した (Fig. 7A)。また、LANA による IRE1 α 発現減少のさらなる知見を得るため、LANA の両末端を短く欠損させた変異体タンパク質 MF44、MF68、MF69、MF70、MF81、および MF82 を用いて解析を行った。その結果、N 末端を欠損させた MF44、MF68、MF69、および MF70、ならびに C 末端を欠損させた MF81 および MF82 の全ての変異体タンパク質において、LANA による IRE1 α 発現減少効果が減弱した (Fig. 7D)。これらの結果から、LANA と vCyclin が IRE1 α の発現抑制に寄与することが示唆された。さらに、LANA の抑制機能に N 末端と C 末端の両端が必要であるが、330-927 アミノ酸残基の繰返し領域は必須ではないことが示された。一方、PERK の発現に対する各ウイルス遺伝子の顕著な抑制効果は検出されなかった (Fig. 7B)。

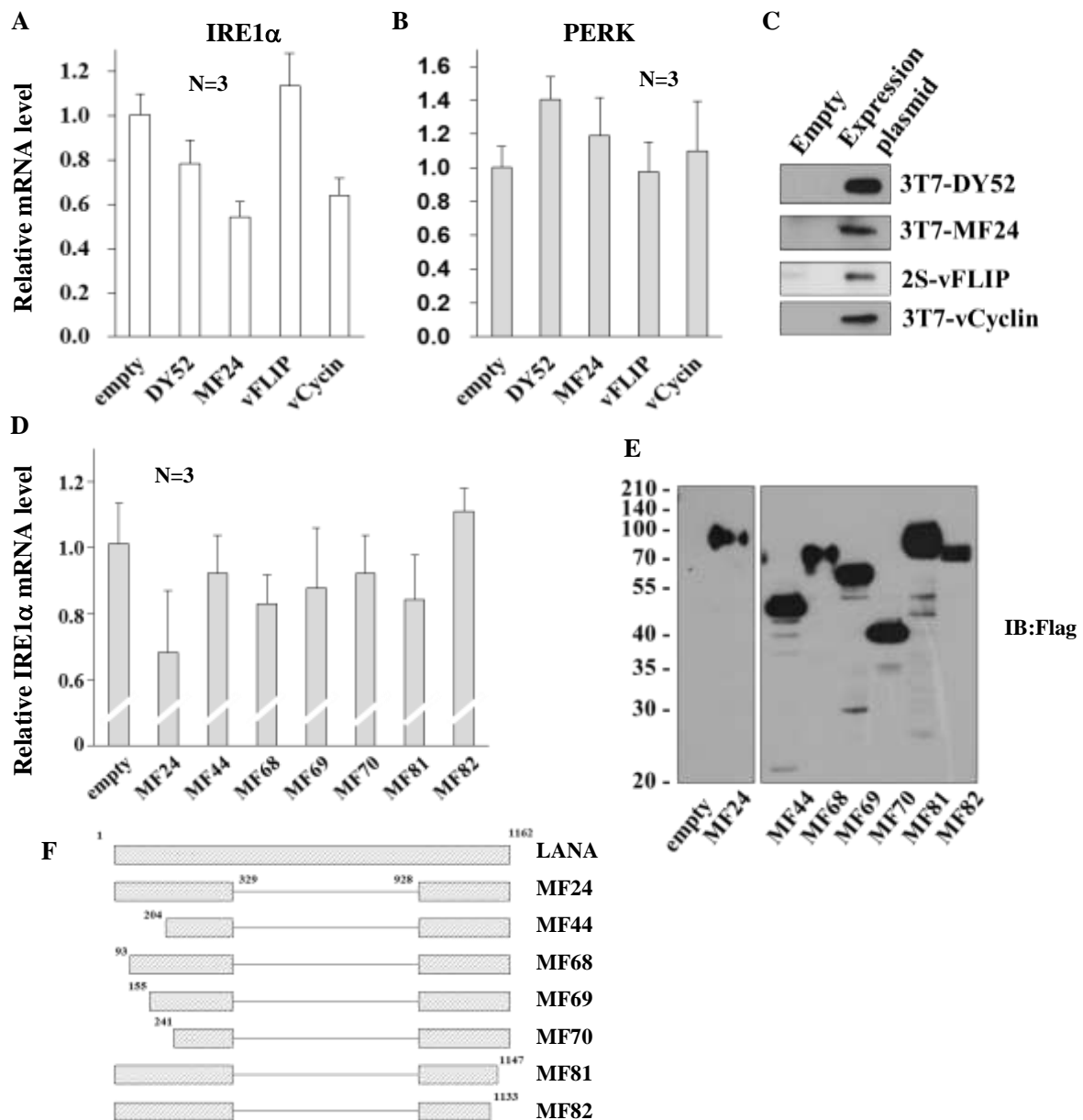


Fig. 7. IRE1α と PERK の mRNA 発現に対するウイルスタンパク質の影響

(A) (B) (C) Empty (pCIneo)、DY52、MF24、vFLIP、および vCyclin を遺伝子導入した HeLa 細胞内の IRE1α (A) と PERK (B) の mRNA 量を定量した。ベクターコントロールである Empty を遺伝子導入した時の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。また、各 effector タンパク質の発現をウェスタンブロット法で確認した (C)。(A) および(B) は、参考文献 (37) の Fig. 6a および b を一部変更し、引用した。

(D) (E) (F) Empty (SG5)、MF24、MF44、MF68、MF69、MF70、MF81、および MF82 を遺伝子導入した HeLa 細胞内の IRE1α mRNA 量を定量した。ベクターコントロールである Empty を遺伝子導入した時の mRNA 量を 1.0 とする相対値を示した。また、各変異体 LANA タンパク質の発現をウェスタンブロット法で確認した結果 (E) と模式図 (F)を示した。図は、参考文献 (37) の Supplemental Fig. S1 を一部変更し、引用した。

1-3-5 潜伏感染期の PEL 細胞に対する ER ストレス誘導剤の殺細胞活性

潜伏感染期の PEL 細胞の増殖に対する、ER ストレス誘導剤 (Tg、BFA、および Sal) の影響を評価した。Tg は ER Ca^{2+} -ATPase の阻害剤、BFA は ER-Golgi 間の小胞輸送阻害剤、Sal は eIF2 α 脱リン酸化阻害剤である。解析の結果、0.5 μM Tg および 50 ng/mL BFA は、KSHV 非感染 (BJAB、Ramos、DG75、および Raji) 細胞と比較して、PEL (BC3、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞の増殖を強く阻害した (Fig. 8A および B)。各リンパ腫細胞の Tg の CC_{50} 値は、PEL 細胞が約 20-490 nM であったことに対し、ウイルス非感染細胞はその 10 倍の約 5000 nM 以上であった (Table 4)。また、BFA の CC_{50} 値は、PEL 細胞が約 22-34 ng/mL であったことに対し、Ramos 細胞では 100 ng/mL 以上であった (Table 4)。また、75 μM の Sal は PEL 細胞の増殖をウイルス非感染細胞より強く阻害した。しかし、75 μM の Sal は PEL 細胞の増殖を約 40%阻害し、その阻害は 0.5 μM Tg や 50 ng/mL BFA よりも弱かった。さらに、100 μM の Sal は全てのリンパ腫株に対し、高い細胞毒性を示した (Fig. 8C)。一方、0.05 μM Tg と 50 μM Sal、または 10 ng/mL BFA と 50 μM Sal をそれぞれ共処理した時、各 ER ストレス誘導剤を単独処理した時 (0.05 μM Tg、50 μM Sal、および 10 ng/mL BFA) と比較して、BCBL1 細胞の増殖が強く抑制された (Fig. 9)。

次に、PEL 細胞内のアポトーシス誘導因子 CHOP の発現とカスパーゼの活性に対する、Tg と BFA の影響を解析した。その結果、Tg 処理した PEL (BC、BCBL1、および JSC1) 細胞では、CHOP の mRNA 量が増加し、さらに CHOP の標的遺伝子である GADD34 の mRNA 量も増加した (Fig. 10A)。また、Tg 処理した PEL 細胞では、カスパーゼ-3、-7、および-9 の活性化型断片が増加し、さらに PARP の切断断片も増加した (Fig. 10B)。同様に、BFA 処理した PEL 細胞においても、カスパーゼ-7 の活性化断片と PARP の切断が検出された (Fig. 10C)。一方、Tg 処理した Ramos 細胞では、CHOP と GADD34 の mRNA 量増加および、カスパーゼの活性化型断片の誘導は検出されなかった。以上の結果から、ER ストレス誘導剤が PEL 細胞特異的に CHOP とカスパーゼの活性化を介して、殺細胞活性を示すことが明らかとなった。

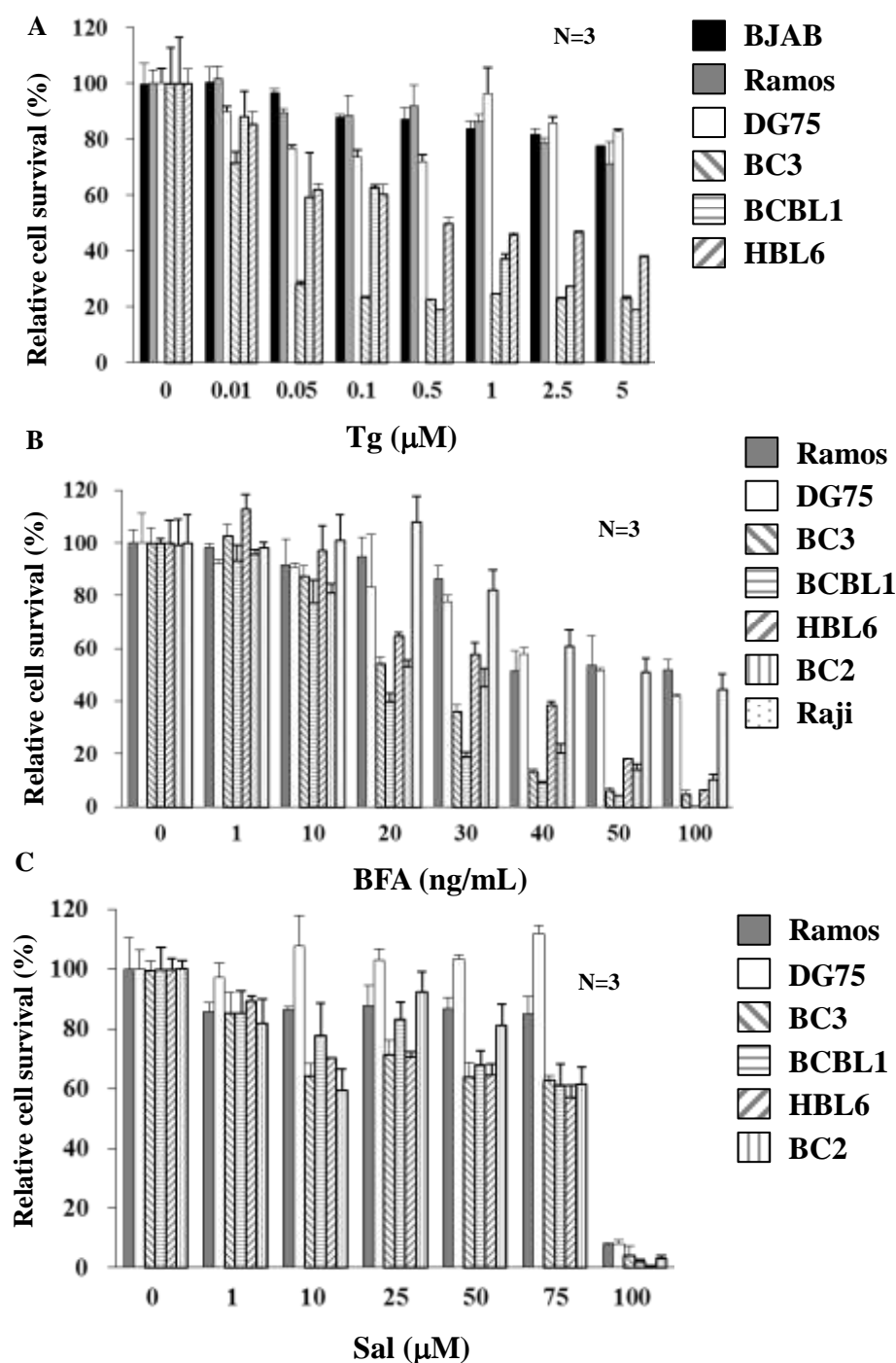


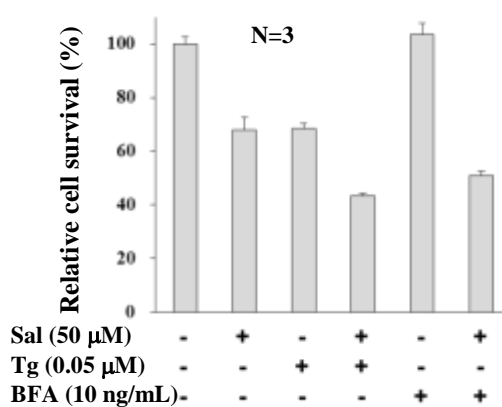
Fig. 8. PEL 細胞の増殖に対する ER ストレス誘導剤の影響

PEL (BC3、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞、EBV 感染リンパ腫 (Raji) 細胞、ならびにウイルス非感染リンパ腫 (BJAB、Ramos、および DG75) 細胞の計 8 種の細胞の培地に、種々の濃度の Tg (A)、BFA (B)、Sal (C) をそれぞれ添加して、添加 24 時間後の生細胞数を測定した。各細胞の薬物未処理の時の生細胞数を 100% とする相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 3a、b および d を一部変更し、引用した。

Table 4**B リンパ腫細胞に対する Tg と BFA の細胞毒性**

CC ₅₀	BC3	BCBL1	HBL6	BC2	BJAB	Ramos	DG75	Raji
Tg (nM)	22.3 ±2.1	160.2 ±4.9	489.5 ±51.0	n.d.	>5000	>5000	>5000	n.d.
BFA (ng/mL)	22.4 ±1.1	26.8 ±1.4	33.6 ±1.7	21.5 ±1.1	n.d.	>100	56.3 ±4.1	76.0 ±24.6

参考文献 (37) の Table 1 を一部変更し、引用した。Table 中の n.d. (not determined) は、未測定の状態である。

**Fig. 9. PEL 細胞の増殖に対する ER ストレス誘導剤併用の影響**

50 μM Sal、0.05 μM Tg、10 ng/mL BFA を含む培地中で、BCBL1 細胞を 24 時間培養し、生細胞数を測定した。未処理時の生細胞数を 100% とした相対値で示した。

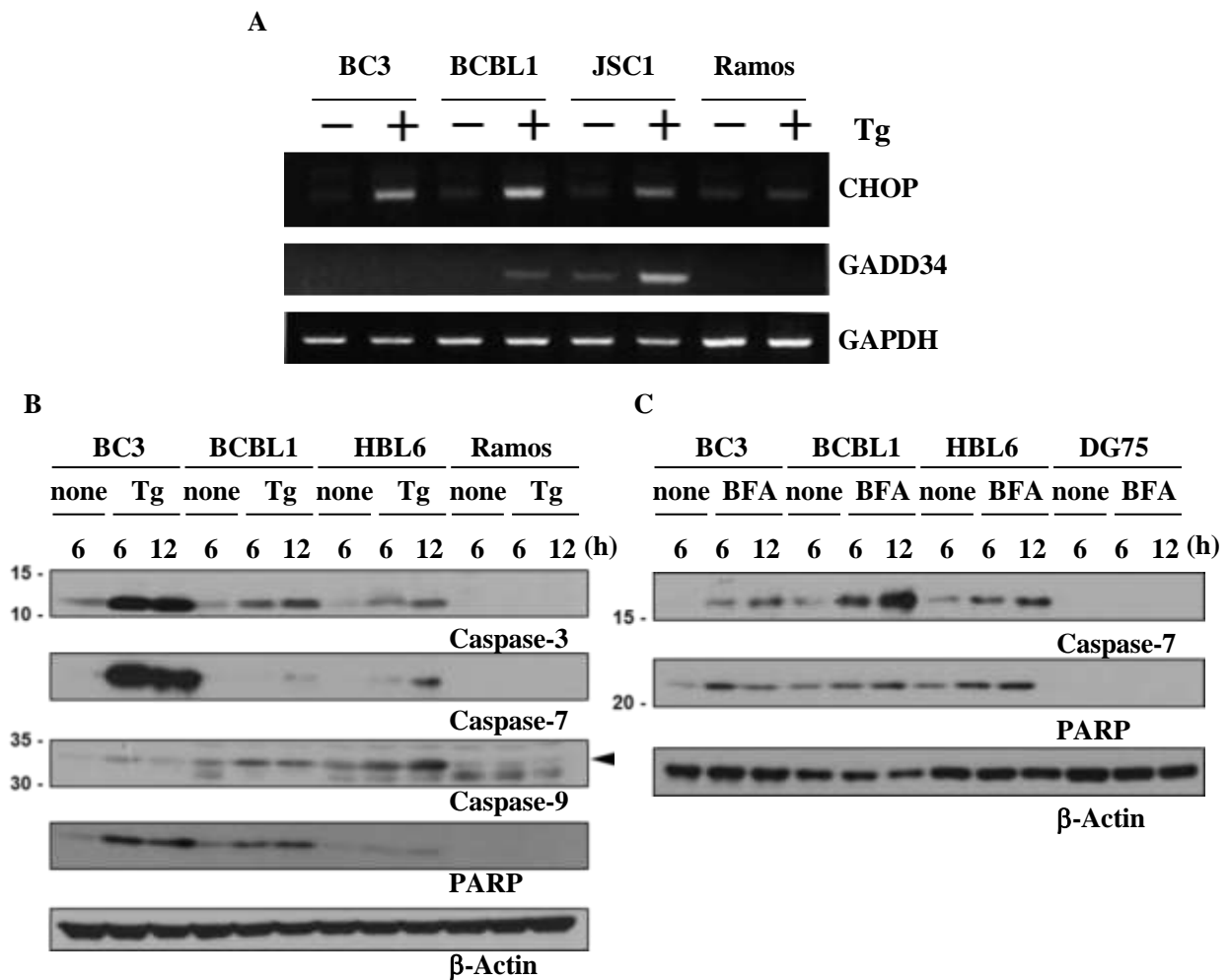


Fig. 10. CHOP の発現とカスパーゼの活性に対する ER ストレス誘導剤の影響

- (A) PEL (BC3、BCBL1、および JSC1) 細胞と Ramos 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で、4 時間処理し、RT-PCR 法を用いて CHOP と GADD34 の発現を解析した。図は参考文献 (37) の Fig. 3g を一部変更し、引用した。
- (B) PEL (BC3、BCBL1、および HBL6) 細胞と Ramos 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で、最大 12 時間処理し、ウェスタンブロットを行った。図は活性化型のカスパーゼおよび PARP の切断断片を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 3e を一部変更し、引用した。
- (C) PEL (BC3 および BCBL1) 細胞とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を 0 または 100 ng/mL BFA で、6 または 12 時間処理し、ウェスタンブロットを行った。図は活性化 (切断) 型のカスパーゼおよび PARP の切断断片を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 3f を一部変更し、引用した。

1-3-6 溶解感染期の PEL 細胞における UPR 活性化

潜伏感染期における、PEL 細胞内の UPR 挙動を解析し、IRE1 α と PERK 経路が阻害されていることを明らかにした。この結果により、溶解感染期の PEL 細胞における UPR 挙動についても解析を行った。PEL (BC3、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞、ならびにウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を 3 mM SB で最大 48 時間処理し、PEL 細胞を潜伏感染期から溶解感染期に移行させ、Bip の発現を解析した。SB はヒストン脱アセチル化酵素の阻害を介して KSHV の溶解感染遺伝子の発現を増強することで、PEL 細胞を溶解感染期に誘導することが知られている。解析の結果、SB 処理した全ての PEL 細胞において、Bip の発現が増加し、特に BC3 と BC2 細胞において顕著に Bip の発現が増加した (Fig. 11A)。また、同条件で細胞を処理した時、K-bZIP の発現が増加したことから、PEL 細胞が溶解感染期に誘導されていることが確認された (Fig. 12A)。一方、BCBL1 細胞を 3 mM SB で最大 48 時間処理した時、潜伏感染期に減少していた IRE1 α と PERK の mRNA 量が SB 処理時間依存的に増加した (Fig. 11B)。さらに、同様の解析を BC3、BC2、および Ramos 細胞で行った結果、SB 処理による IRE1 α と PERK の mRNA 量の増加が PEL 細胞において観察され、Ramos 細胞では観察されなかった (Fig. 11C)。ATF6 α に関しては、全細胞種において SB 処理による mRNA 量は大きく増加しなかった (Fig. 11C)。これらの結果から、溶解感染期の PEL 細胞内では、Bip、IRE1 α 、および PERK の発現増加を伴う UPR 活性化が誘導されることが明らかとなった。

1-3-7 溶解感染期の PEL 細胞における LANA の発現減少

1-3-4 において、潜伏感染期の PEL 細胞内で発現しているウイルスタンパク質 LANA が、IRE1 α の mRNA 量の減少に寄与することを明らかにした。この結果により、溶解感染期の PEL 細胞における LANA の発現を解析した。SB 未処理の時 (潜伏感染期) と比較して、3 mM SB で 24 時間処理した PEL (BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞において、LANA の発現量が減少した (Fig. 12A)。以前、当研究室では、LANA が細胞内プロテアーゼにより N 末端断片 (LANA-N)と C 末端断片 (LANA-C) に切断されることを発見している (un-published data)。そこで、IRE1 α の mRNA 発現に対する LANA-N および LANA-C の影響を解析した。その結果、LANA-N および LANA-C を遺伝子導入した HeLa 細胞において、IRE1 α の mRNA 量は約 1.3 倍に増加した (Fig. 12B)。しかし、これら LANA 断片による IRE1 α の mRNA の増加量は、SB 処理した PEL 細胞における増加量よりも小さかった (Fig. 11B および C)。この結果から、溶解感染期の PEL 細胞において、LANA の切断断片 (LANA-N および LANA-C) は、IRE1 α の mRNA 量増加に寄与しないことが示唆された。

1-3-8 KSHV のウイルス産生に対する UPR 活性化の影響

KSHV の溶解感染遺伝子発現やウイルス産生に対する、UPR 活性化 (ER ストレス誘導剤) の影響を解析した。3 mM SB と 5 nM Tg、または 3 mM SB と 1 ng/mL BFA で、BC3 細胞を 48 時間共処理し、培地中に産生された KSHV のウイルス DNA を定量した。なお、培地中に産生されたウイルス粒子を十分に検出するためには、3 mM SB で 36 時間以上 PEL 細胞を処理する必要がある (data not shown)。そのため、PEL 細胞の増殖を阻害しないことを意図して、

ER ストレス誘導剤の濃度は低濃度に設定した。その結果、SB 単独処理時と ER ストレス誘導剤 (Tg、BFA) 共処理時の間で、産生されたウイルス DNA 量に有意な差は認められなかった (Fig. 12D)。また、同様の実験を SB 未処理 (潜伏感染期の PEL 細胞) でも行ったが、未処理時と ER ストレス誘導剤処理時の間で、培地中のウイルス DNA 量に有意差は検出されなかった (Fig. 12D)。これらの結果から、使用した ER ストレス誘導剤の濃度が低過ぎたため、UPR の活性化が不十分であり、ウイルス産生量に変化が見られなかったと推測した。そこで、BC3 細胞を 3 mM SB で 45 時間処理した後、培地により高濃度の Tg を終濃度 0.2 μ M となるよう添加して更に 3 時間培養した。培養後、BC3 細胞内の溶解感染遺伝子 (RTA、K-bZIP、および K8.1) の mRNA 量と、培地中のウイルス DNA 量を測定した。なお、0.2 μ M Tg で 6 時間処理した時、カスパーゼの活性化断片が検出されたことから (Fig. 10B)、Tg 処理時間は 3 時間に設定した。その結果、SB 単独処理と比較して、0.2 μ M Tg 共処理により RTA、K-bZIP、および K8.1 の mRNA 量が増加した (Fig. 13A-C)。また、タンパク質レベルにおいても、Tg 共処理によって K-bZIP の発現量が増加した (Fig. 14)。さらに、ウイルス産生量も SB と Tg を共処理することで、SB 単独処理時よりも有意に増加し、溶解感染遺伝子の発現増加の結果と一致した (Fig. 13D)。

次に、UPR の活性化が溶解感染期移行の引き金となるか検証した。潜伏感染期の BC3 細胞を 0.2 μ M Tg で 3 時間前処理した後、薬物を含まない培地中で更に最大 24 時間培養を続け、溶解感染期移行の引き金となる RTA 遺伝子の mRNA 量を解析した (Fig. 13E)。また、同様に Tg で前処理した細胞を 3 mM SB を含む培地中で、一定時間培養し、RTA 遺伝子の mRNA 量を測定した (Fig. 13F)。その結果、Tg 単独処理した PEL 細胞 (Fig. 13E)、および Tg と SB を共処理した PEL 細胞において (Fig. 13F)、RTA の発現量に変化はなかった。これらの結果から、潜伏感染期の PEL 細胞において、UPR の活性化は溶解感染移行の引き金にならないことが示唆された。

先行研究より、HSV1 のウイルスタンパク質 glycoprotein B (gB) は、PERK との直接的な相互作用を介して PERK のキナーゼ活性を抑制することが報告されている⁴⁹⁾。そこで、PERK のリン酸化に対する KSHV の glycoprotein (gB、gH、gM、gL、gN、ORF51、および ORF68) の影響を解析した。その結果、KSHV の glycoprotein (gB、gH、gM、gL、gN、ORF51、および ORF68) を過剰発現させた HeLa 細胞において、PERK のリン酸化に対するこれら glycoprotein の顕著な影響は検出されなかった (Fig. 15)。

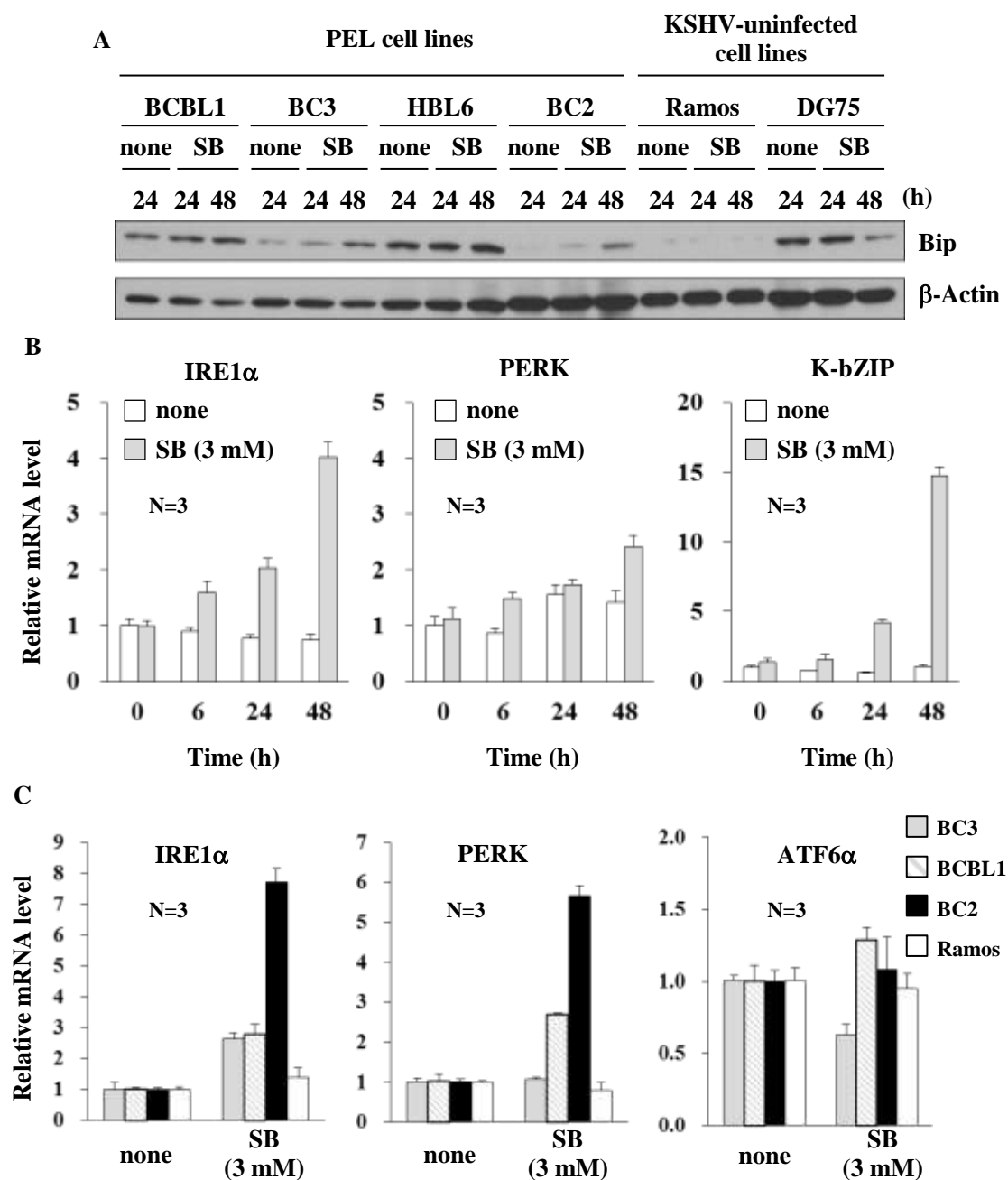


Fig. 11. 溶解感染期の PEL 細胞における UPR 活性化

- (A) PEL (BCBL1、BC3、HBL6、および BC2) 細胞とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を 0 または 3 mM SB で 24 または 48 時間処理し、ウェスタンブロット法にて Bip の発現量変化を解析した。図は参考文献 (37) の Fig. 4a を一部変更し、引用した。
- (B) BCBL1 細胞を 0 または 3 mM SB で最大 48 時間処理し、IRE1α、PERK、および K-bZIP の mRNA 量を定量した。0 時間における未処理の細胞の mRNA 量を 1.0 とした相対値で示した。
- (C) PEL (BCBL1、BC3、および BC2) 細胞と Ramos 細胞を 0 または 3 mM SB で 48 時間処理し、IRE1α、PERK、および ATF6α の mRNA 量を定量した。未処理の細胞の mRNA 量を 1.0 とした相対値で示した。

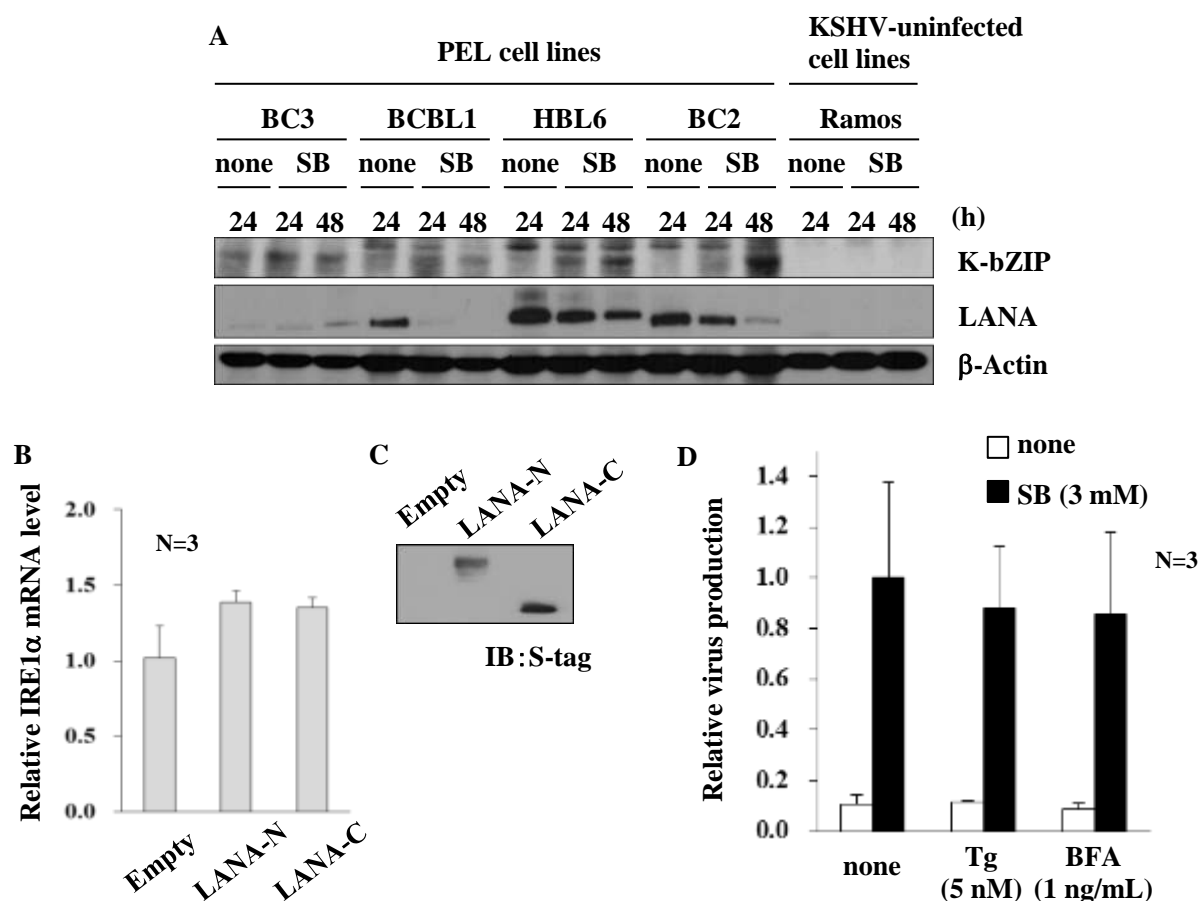


Fig. 12. IRE1αの mRNA 量に対する LANA 切断断片の影響

- (A) PEL (BC3、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞と Ramos 細胞を 0 または 3 mM SB で最大 48 時間処理し、ウェスタンブロット法にて K-bZIP と LANA の発現誘導を解析した。図は参考文献 (37) の Supplemental Fig. S2 を一部変更し、引用した。
- (B) Empty (pCIneo)、LANA-N、および LANA-C をそれぞれ遺伝子導入した HeLa 細胞内の IRE1α mRNA 量を定量した。Empty を遺伝子導入した細胞の mRNA 量を 1.0 とした相対値を示した。
- (C) HeLa 細胞に遺伝子導入した Empty (pCIneo)、LANA-N、および LANA-C の発現をウェスタンブロットにより確認した。
- (D) 通常培地または 3 mM SB を含む培地中で、BC3 細胞を 5 nM Tg または 1 ng/mL の BFA で 48 時間処理し、培地中に産生された KSHV ウイルス DNA を定量した。3 mM SB のみで処理した時の産生量を 1.0 とした相対値で示した。

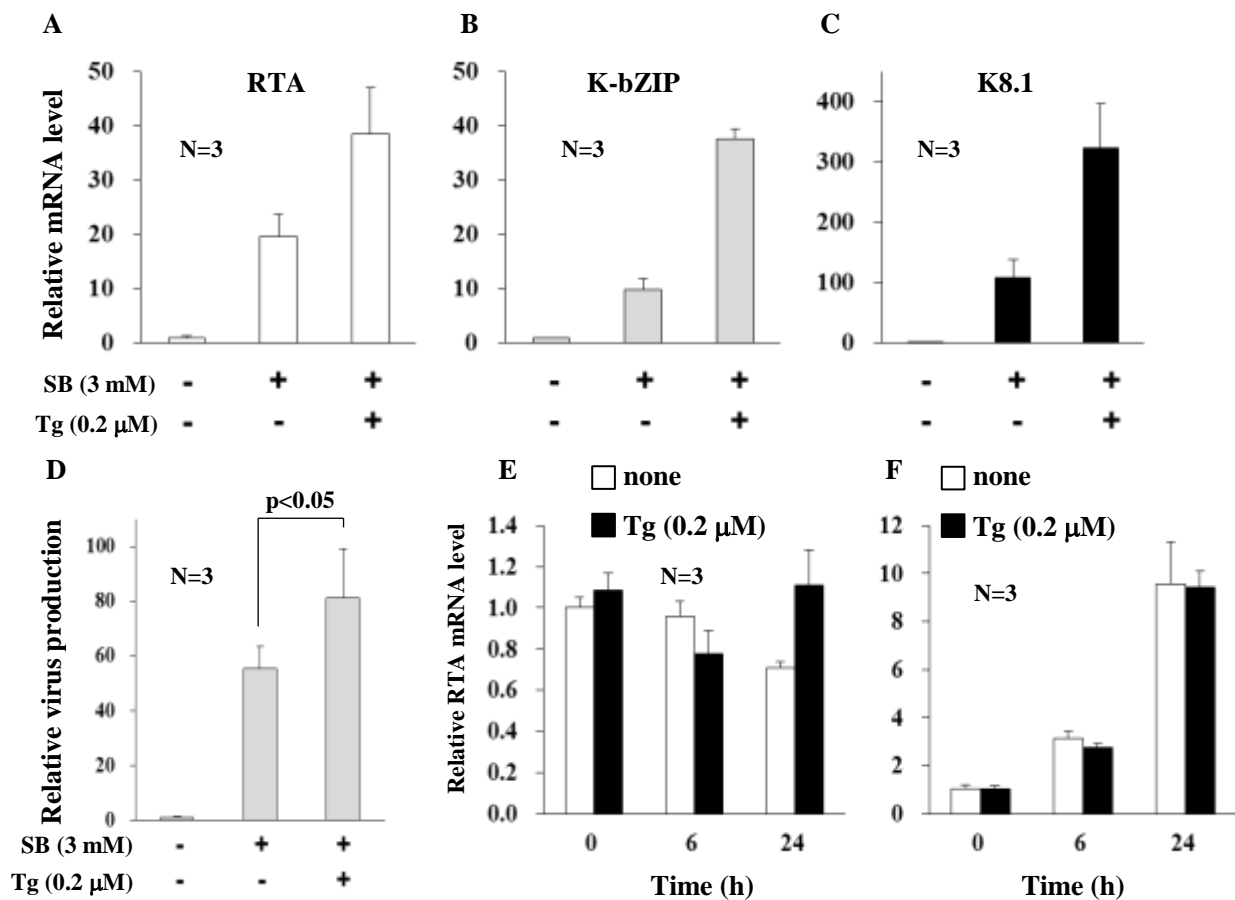


Fig. 13. KSHV のウイルス産生に対する ER ストレス誘導剤の影響

(A) (B) (C) 3 mM SB で 45 時間処理した BC3 細胞の培地中に 0.2 μ M Tg を添加して、さらに 3 時間培養した。培養後、RTA (A)、K-bZIP (B)、および K8.1 (C) の mRNA 量を定量した。未処理の時の mRNA 量を 1.0 とした、相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 4b-d を一部変更し、引用した。

(D) 3 mM SB で 45 時間処理した BC3 細胞の培地中に 0.2 μ M Tg を添加して、さらに 3 時間培養した。培養後、培地に産生された KSHV ウイルス DNA を定量した。未処理の時のウイルス量を 1.0 とした、相対値を示した。図は参考文献 (37) の Fig. 4e を一部変更し、引用した。

(E) BC3 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で 3 時間前処理した後、PBS で細胞を 1 回洗浄し、新しい培地に交換した。そして、0、6 および 24 時間後の RTA の mRNA 量を解析した。0 時間における未処理の細胞の mRNA 量を 1.0 とした相対値で示した。図は参考文献 (37) の Fig. 4f を一部変更し、引用した。

(F) BC3 細胞を 0 または 0.2 μ M Tg で 3 時間前処理した後、PBS で細胞を 1 回洗浄し、新しい培地に交換した。その後、3 mM SB を含む培地で細胞を培養し、0、6 および 24 時間後の RTA の mRNA 量を解析した。0 時間における未処理の細胞の mRNA 量を 1.0 とした相対値で示した。

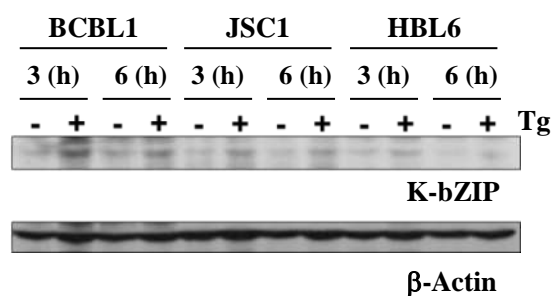


Fig. 14. 溶解感染期の PEL 細胞における K-bZIP の発現に対する Tg の影響

3 mM SB で 45 時間処理した BCBL1、JSC1、および HBL6 細胞の培地中に 0.2 μ M Tg を添加して、さらに最大 6 時間培養した。培養後、ウェスタンブロット法にて K-bZIP の発現誘導を解析した。図は参考文献 (37) の Supplemental Fig. S3 を一部変更し、引用した。

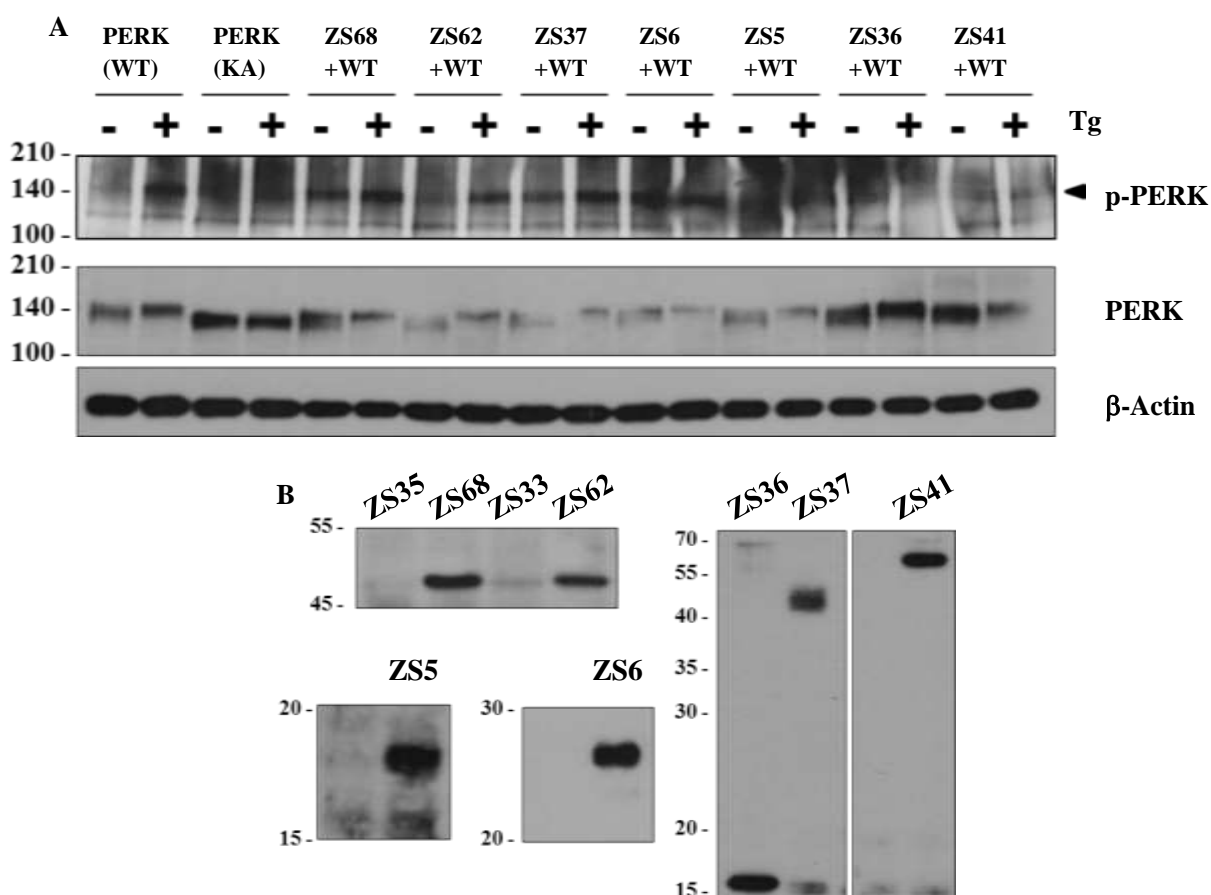


Fig. 15. PERK のリン酸化に対する KSHV の glycoprotein の影響

- (A) 各 KSHV の glycoprotein 発現プラスミドと PERK-WT (図中 WT) を遺伝子導入した HeLa 細胞を 0.2 μ M Tg で 3 時間処理し、PERK のリン酸化をウェスタンブロット法で解析した。また、コントロールとして PERK-WT または PERK-KA のみを遺伝子導入した。
- (B) 各 KSHV の glycoprotein 発現プラスミドを遺伝子導入した HeLa 細胞の抽出液を用いて、抗 S-tag 抗体でウェスタンブロットを行い、発現を解析した。

1-4 考察

1-4-1 複数の PEL 細胞株を用いて解析を実行したことに關して

本研究では、PEL 細胞とウイルス非感染細胞を複数種類用いて解析を行った。これらのリンパ腫株は、PEL または B 細胞性リンパ腫を発症した異なる患者から分離された臨床分離細胞株である。そのため、PEL 細胞を 1 種類のみ用いて解析した場合、解析の結果が患者の遺伝子背景に起因する可能性が大きくなる。また、KSHV は分化過程の B 細胞に感染し、感染直後に B 細胞の分化を停止させるため、各 PEL 細胞間で遺伝子発現が異なることが知られている。そのため、PEL の遺伝子背景の影響を小さくすることを目的に、複数種類の PEL 細胞株を用いて解析を行った。また、PEL 細胞間で遺伝子背景が異なるため、Tg 処理による ATF6 α および IRE1 α の発現増加、あるいは LANA の発現において、PEL 細胞間で同一の結果が得られなかったと考えられる (Figs. 3B、4A、および 12A)。一方、*in vitro* で解析する場合、PEL 細胞とウイルス非感染細胞の間で得られた結果を比較するより、KSHV をウイルス非感染細胞に感染させて解析を行うことが望ましい。しかし、*in vitro* で KSHV をウイルス非感染細胞に感染させて、PEL 細胞を作製する実験系は確立されていない。そのため、本研究では、ウイルス非感染細胞と比較しながら、複数種の PEL 細胞を用いて解析を行った。

1-4-2 潜伏感染期の PEL 細胞内における UPR 脱制御に關して

本研究より、潜伏感染期の PEL 細胞において、UPR の制御分子 IRE1 α と PERK の発現が mRNA レベルで抑制されていることが明らかとなった (Figs. 3 および 4)。PEL 細胞とウイルス非感染細胞の間に、これら遺伝子の mRNA の安定性に顕著な差がなかったことから (Fig. 5)、PEL 細胞内では IRE1 α と PERK の発現が転写レベルで抑制されていることが示唆された。また、これら分子の発現抑制と一致して、IRE1 α がスプライシングを介して活性化する sXBP1、および PERK の下流に位置する転写因子 ATF4 の発現も PEL 細胞において減少していた (Fig. 6)。これらの結果から、潜伏感染期、KSHV は転写阻害を介し IRE1 α と PERK の発現を抑制することで、PEL 細胞内の UPR の機能 (IRE1 α と PERK 経路) を阻害することが考察される。

本研究より、KSHV が発現するウイルスタンパク質 LANA が、IRE1 α を mRNA レベルで抑制することが示唆された (Fig. 7A)。これまでに、LANA は KSHV エピソームに結合し、その発現を安定化することが知られており、DNA 結合能を持つと考えられる³⁸⁾。しかし、LANA 自身が直接的に特定遺伝子のプロモーターに結合し、転写因子として細胞内の転写を調節する報告はほとんどない。むしろ、LANA は ATF4 や c-Jun をはじめとする細胞内転写因子と直接結合し、その活性を抑制または亢進することが報告されている^{39, 40)}。これらの知見から、LANA は IRE1 α と PERK の転写調節因子を阻害することで、これら 2 つの遺伝子の発現を抑制したと推測される。一方、Rajeev Kaul らは、MALDI-TOF MS による網羅的解析を実施し、LANA の N 末または C 末領域に結合する転写因子を報告している⁴¹⁾。IRE1 α と PERK の転写因子およびプロモーターに関する知見は全く報告されていないが、本研究では、転写因子結合配列予測プログラムを用いて、IRE1 α と PERK の予測プロモーター領域内に、これら転写因子結合配列が有るか否かを確認した結果、同定には至らなかった。この原因として、Rajeev Kaul らは全長 LANA ではなく、N 末端および C 末端の各ドメインタンパク質を用いて解析を

行っていることが考えられる。実際、LANA 変異体タンパク質を用いた解析から、IRE1 α の抑制には LANA タンパク質の両末端が必要であることが示されている (Fig. 7D)。これらの結果を考え併せると、LANA は自身の N 末端および C 末端領域の両端を介して、IRE1 α の転写因子または転写調節に関与する分子と相互作用し、それらの機能を阻害することで、転写を抑制したと推測される。

最近、マイクロアレイ解析から、cyclin D1 を過剰発現させることで、XBP1 のスプライシングが抑制されることが報告されている⁴²⁾。本研究では、PEL 細胞内で IRE1 α の発現と XBP1 のスプライシングが抑制されること (Figs. 4、5、および 6B-E)、そしてヒト cyclin D2 のウイルスホモログである vCyclin が IRE1 α の発現を mRNA レベルで抑制する可能性を明らかにしてきた (Fig. 7A)。これまでに cyclin D1 と D2、および vCyclin が、転写因子としての機能を有することは報告されていない。これらの結果を考え併せると、cyclin D1 と D2、および vCyclin が標的とする分子の中に、IRE1 α の発現を転写レベルで制御する分子が存在する可能性が考えられる。また、LANA と vCyclin が標的とする IRE1 α の発現を制御する転写因子は、それぞれ異なる可能性も考えられ、それゆえ細胞内では複数の転写因子が IRE1 α の発現を制御することが推測される。

細胞にウイルスが感染すると、タンパク質合成亢進に伴い ER ストレスが生じ、UPR が活性化することが知られている。活性化した UPR は、PERK-eIF2 α を介して翻訳阻害を誘導する。さらに、長期的に UPR が活性化すると、IRE1 α -Ask1-Jnk 経路と PERK-ATF4-CHOP 経路を介して、感染細胞にアポトーシスが誘導される。これらの UPR が誘導する翻訳阻害およびアポトーシス誘導は、ウイルスの感染維持と宿主細胞の生存に対して負に作用すると考えられる。これに対し、HSV1 や EBV、CMV 等のヒトヘルペスウイルスは、ウイルスタンパク質を介して、上記の UPR による細胞応答の活性化を抑制する^{26, 27, 36, 44-49)}。各ウイルスは、ER シャペロン Bip の発現誘導により ER 内フォールディング能を増強し^{27, 44, 45)}、eIF2 α 不活性化による翻訳阻害の誘導を抑制することで⁴⁶⁻⁴⁹⁾、ウイルスタンパク質の合成を亢進し、持続的な感染を達成する。しかしながら、KSHV は他のヘルペスウイルスとは大きく異なる分子機構を有することが明らかとなった。すなわち、KSHV は UPR の制御分子である IRE1 α と PERK の発現抑制を介して、UPR の機能を阻害することが、本研究結果より示された。また、KSHV が UPR の機能を阻害するため、潜伏感染期の PEL 細胞は ER ストレス誘導剤に対して、感受性が高くなる可能性が考察される。実際、ER ストレス誘導剤である Tg や BFA は、PEL 細胞の増殖を特異的に抑制した (Fig. 8A および B)。また、CHOP はミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することが知られている²²⁻²⁴⁾。本研究においても、Tg がアポトーシス誘導因子 CHOP とカスパーゼ-9 を活性化することで、PEL 細胞にアポトーシスを誘導した (Fig. 10)。これらの結果から、IRE1 α と PERK の発現抑制を介して、UPR が誘導する翻訳抑制とアポトーシスを阻害することが、PEL 細胞の生存に寄与することが示唆される。

Tg は PEL 細胞特異的に CHOP の発現を誘導したが (Fig. 9A)、Tg 処理した PEL 細胞において、CHOP の転写を制御する ATF4 の核内発現量は増加しなかった (Fig. 6A)。通常、CHOP の発現を誘導するのは PERK 経路の ATF4 であるが、ATF6 α も CHOP の転写を活性化することが報告されている⁵⁰⁾。本研究においても、Tg 処理した BCBL1、JSC-PEL および HBL6 細

胞において、ATF6 α の核内発現量が増加した (Fig. 3B)。これらの結果から、Tg は ATF6 α 経路の活性化を介して CHOP の発現を PEL 細胞に誘導した可能性が考えられる。

一方、Sal は PEL 細胞の増殖を抑制したが、Tg と BFA と比較して、その抑制効果と特異性は低かった (Fig. 8C)。UPR において、PERK によりリン酸化され、活性化した eIF2 α は ATF4、CHOP、GADD34 の順にシグナルを伝達するが、GADD34 によってネガティブフィードバック制御を受ける (Fig. 2)。すなわち、GADD34 は PP1 α を eIF2 α に引き寄せることで、eIF2 α を脱リン酸化し、その機能を不活性化するが、Sal はこの PP1 α の特異的阻害剤である⁵¹⁾。Tg と BFA は直接的に ER ストレスを誘導し、UPR 自体を活性化することに対し、Sal は活性化した UPR の抑制を阻害することで、ER ストレスを増強すると考えられる。この考えは、Sal が Tg と BFA の抗 PEL 活性を増強した結果からも支持される (Fig. 9)。また、PEL 細胞内では、PERK と ATF4 の発現が減少していたことから (Figs. 4 および 5A)、eIF2 α の活性が元々抑制されていると考えられる。それゆえ、eIF2 α の活性を抑制する Sal は、PEL 細胞に対する増殖抑制効果が Tg と BFA より低くなったと推論される。

1-4-3 溶解感染期の PEL 細胞内における UPR 脱制御に関して

潜伏感染期と比較して、溶解感染期はウイルス粒子産生に伴い、より大量のウイルスタンパク質が ER 内で合成され、そのことは強い ER ストレスと UPR 活性化を誘導することが推論される。本研究においても、SB で溶解感染期に誘導した PEL 細胞において、Bip の発現亢進が観察された (Fig. 11A)。また、潜伏感染期に抑制されていた IRE1 α と PERK も、溶解感染期に誘導した PEL 細胞において mRNA 量が増加したことから (Fig. 11B および C)、上述の推論は支持される。さらに、SB で溶解感染期に誘導した PEL 細胞において、LANA タンパク質の発現量が減少した (Fig. 12A)。これまでに当研究室では、過剰発現系を用いた解析から LANA が細胞内プロテアーゼにより N 末断片 (LANA-N)と C 末断片 (LANA-C) に切断されることを発見している (un-published)。また、最近の報告から、LANA がカスパーゼ-1 とカスパーゼ-3 によって、切断されることも明らかとなっている⁵²⁾。これらの知見から、SB 処理した PEL 細胞においても、カスパーゼにより LANA が切断され、LANA-N と LANA-C が生成している可能性が十分考えられる。それゆえ、IRE1 α の発現に対する LANA-N と LANA-C の影響を解析したが、LANA-N と LANA-C を遺伝子導入した HeLa 細胞では、IRE1 α の発現量は大きく増加しなかった (Fig. 12B)。これらの結果から、溶解感染期、ウイルスタンパク質の大量合成と LANA の発現量低下に伴い、それまで PEL 細胞内で抑制されていた UPR が活性化 (Bip、IRE1 α 、および PERK の発現が増加) すると考えられる。

先行研究において、グルコース飢餓が誘導する eIF2 α の活性化が、KSHV のウイルス産生を阻害することが報告されている³²⁾。この知見と Fig. 11B および C の結果を考え併せると、IRE1 α と PERK の発現誘導に伴い、翻訳抑制が宿主細胞内に誘導され、ウイルスタンパク質の合成阻害が起り、KSHV の溶解感染が阻害される可能性が推論された。この仮説を確かめるため、本研究では、KSHV の溶解感染遺伝子発現やウイルス産生に対する、ER ストレス誘導剤による UPR 活性化の影響を評価した。興味深いことに、予測に反して、溶解感染期の PEL 細胞に、Tg 処理による UPR 活性化を誘導すると、溶解感染遺伝子である RTA、K-bZIP、

および K8.1 の発現量が有意に増加した (Fig. 12A-C)。さらに、この結果と一致して、溶解感染期に誘導した PEL 細胞を Tg 処理すると、ウイルス産生量も増加した (Fig. 12D)。これに対して、潜伏感染期の PEL 細胞を Tg 処理した場合、RTA 遺伝子の Tg 依存的な発現量増加は観察されなかった (Fig. 12E および F)。これらの結果から、溶解感染期に活性化した UPR は、KSHV のウイルス産生を促進するが、UPR 活性化自体が潜伏感染から溶解感染移行の引き金にならないことが示唆される。先行研究において、*in vitro* の解析より、活性化した XBP1 (sXBP1) が RTA や Bip の転写を亢進することが既に報告されている²⁹⁾。また、PERK の標的分子である Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) が、RTA 遺伝子の発現を活性化することも報告されている^{53, 54)}。さらに、溶解感染遺伝子 ORF47-ORF46-ORF45 の翻訳産物もまた、Bip の発現を亢進することが明らかにされており³⁰⁾、これらの知見は本研究結果と矛盾しない。

一方、溶解感染期の PEL 細胞において、PERK の mRNA 発現量が増加したこと (Fig. 11B および C)、eIF2 α が活性化し、翻訳が抑制される可能性が考えられる。しかし、UPR の活性化 (SB と Tg の共処理) は、ウイルス産生を亢進したことから、KSHV が eIF2 α を標的とし、その機能を阻害する可能性が考えられる。先行研究より、HSV1 のウイルスタンパク質 glycoprotein B (gB) は、PERK との直接的な相互作用を介してキナーゼ活性を抑制し、eIF2 α を不活性化することが報告されている⁴⁹⁾。本研究においても、KSHV の glycoprotein (gB、gH、gM、gL、gN、ORF51、および ORF68) の PERK のリン酸化に対する影響を解析したが、顕著な影響は検出されなかった (Fig. 15)。UPR が誘導する eIF2 α の活性に関連する他の細胞内分子には PP1 α が知られている。KSHV は PP1 α を直接活性化することや、eIF2 α に PP1 α を引き寄せることで、eIF2 α を不活性化する可能性が考察される。

これらの知見と本研究結果から、以下のことが考察される。溶解感染期、ウイルスタンパク質の大量合成と LANA の発現量低下に伴い、それまで PEL 細胞内で抑制されていた UPR が活性化する。KSHV は、IRE1 α -XBP1 経路と PERK の活性化を介して、RTA 遺伝子の発現亢進や Bip によるフォールディング能を増強する。一方で、eIF2 α を不活性化することで、UPR が誘導する翻訳抑制を阻害する。すなわち、KSHV は活性化した UPR を巧みに利用することで、ウイルス産生を亢進させることが示唆される。また、HSV1 は感染初期において、速やかに UPR を抑制するが、感染後期には逆に UPR を活性化することが報告されている²⁶⁾。本研究結果より考察された KSHV の UPR 脱制御機構は、先行研究の HSV1 の機構とも一致する。

1-5 小括 1

本研究の第1章より、以下のことが明らかとなった (Figs. 16 および 17)。潜伏感染期の PEL 細胞において、IRE1 α と PERK の発現が転写レベルで抑制されることが明らかとなった。PERK に関しては、その詳細な機構は明らかにできなかったが、KSHV が発現するウイルスタンパク質 LANA と vCyclin が IRE1 α の転写レベルでの発現抑制に寄与する可能性が明らかとなった。KSHV は、IRE1 α と PERK の発現抑制を介して、これら UPR 分子が誘導する翻訳抑制やアポトーシスを回避することで、感染の維持を行う可能性が明らかとなった。また、ER ストレスを誘発して UPR を活性化する化合物が、PEL 細胞に対して殺細胞活性を有す可能性が示された。一方、溶解感染期の PEL 細胞内では、Bip、IRE1 α 、および PERK の発現量増加に伴い UPR が活性化する。溶解感染期の PEL 細胞において、活性化した UPR は、KSHV の溶解感染遺伝子の発現とウイルス産生を増強する。すなわち、溶解感染期の PEL 細胞において、KSHV はウイルス粒子産生に UPR を利用する可能性が示された。

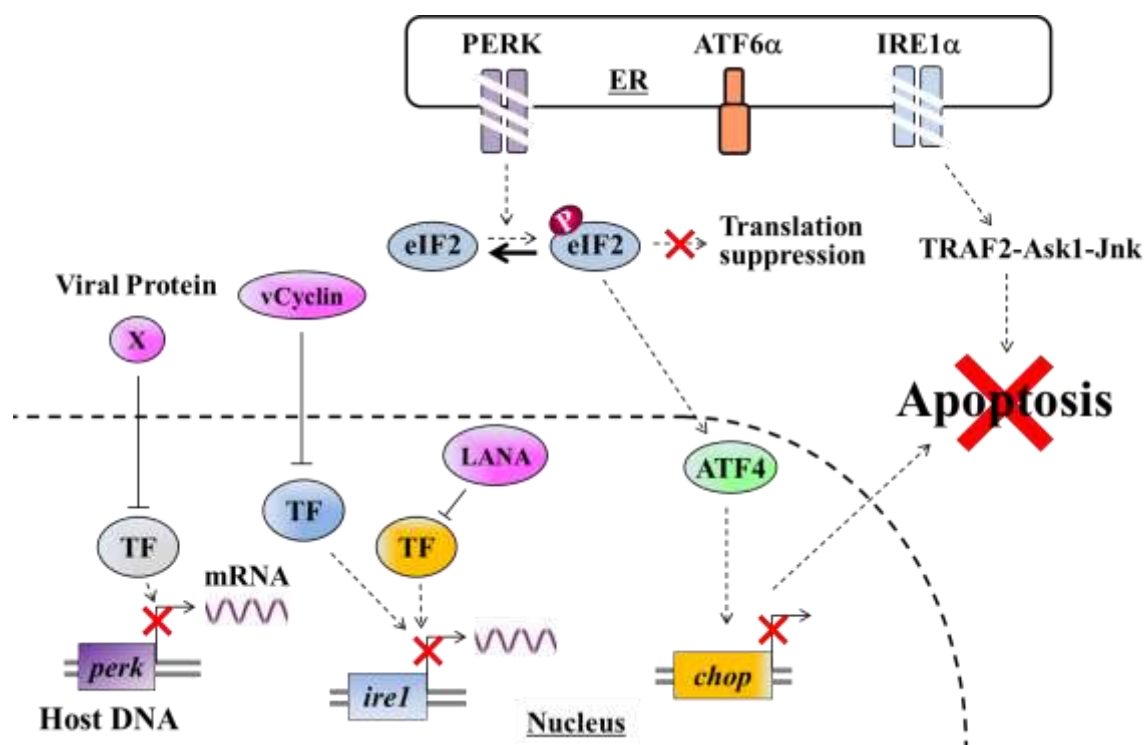


Fig. 16. 本研究より考察された潜伏感染期の PEL 細胞内の UPR 挙動

潜伏感染期の PEL 細胞における UPR 挙動の模式図を示した。図中の破線矢印は、PEL 細胞内で抑制されているシグナル伝達 (分子間相互作用) を、止線は阻害を示している。潜伏感染期の PEL 細胞内では、IRE1 α と PERK の発現量が減少しており、活性化した UPR が誘導する eIF2 α のリン酸化、CHOP の発現、および Jnk の活性化が抑制される。その結果、PEL 細胞内では、UPR により誘導される eIF2 α を介す翻訳抑制や、CHOP および Jnk を介すアポトーシスが抑制される。また、LANA と vCyclin が、IRE1 α の発現抑制 (mRNA 量の減少) に寄与する。

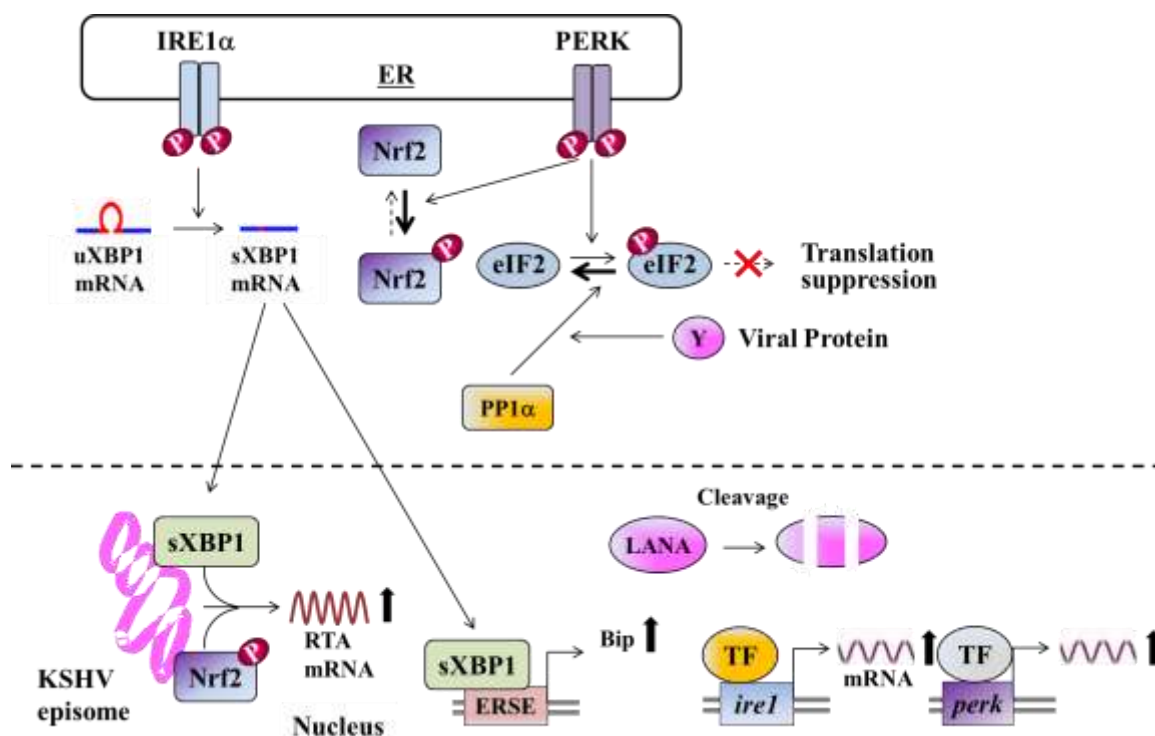


Fig. 17. 本研究より考察された溶解感染期の PEL 細胞内の UPR 挙動

溶解感染期の PEL 細胞における UPR 挙動の模式図を示した。図中の破線矢印は、PEL 細胞内で抑制されているシグナル伝達 (分子間相互作用) を示している。溶解感染期の PEL 細胞内では、潜伏感染期に発現が減少していた IRE1 α と PERK の mRNA 量および Bip の発現量の増加、すなわち UPR が活性化する。また、IRE1 α の mRNA 量の増加には、LANA の切断による発現量減少が寄与する。潜伏感染期よりも発現量が増加した IRE1 α によって、転写因子 XBP1 (図中 sXBP1) の発現が誘導される。XBP1 は、Bip の発現を誘導し、ウイルス産生に必要となるウイルスタンパク質の合成亢進に寄与する。また、潜伏感染期よりも発現量が増加した PERK によって、Nrf2 がリン酸化される。このリン酸化 Nrf2 と XBP1 は、溶解感染移行に必須である RTA の発現を誘導する。すなわち、溶解感染期の PEL 細胞において、活性化した UPR によって、KSHV の溶解感染遺伝子の発現とウイルス産生が亢進する。

第2章 IRE1 α と PERK 遺伝子のプロモーター解析

2-1 はじめに

潜伏感染期の PEL 細胞において、KSHV により IRE1 α と PERK が転写レベルで抑制されることが明らかとなった。しかし、LANA や vCyclin による IRE1 α 抑制の詳細な分子機構は未だ不明であり、また PERK に関しては抑制機能を担うウイルス分子が未同定である。その最大の原因として、IRE1 α と PERK の転写調節因子やプロモーター領域といった発現制御機構が不明であることが挙げられる。そこで、IRE1 α と PERK の発現抑制機構を解明することを目的に、IRE1 α と PERK の発現を制御するプロモーター領域の同定を試みた。

2-2 実験方法

2-2-1 発現プラスミド DNA

RTA と K-bZIP の発現プラスミド DNA (以下、Flag-RTA、Flag-K-bZIP と略す) は Gao SJ. らから恵与された³⁴⁾。これらプラスミド DNA は、N 末端側に 3 \times Flag-tag が付加された形でタンパク質が発現するように、哺乳類細胞発現ベクター pcDNA3.1 (invitrogen 社製) にクローニングされたプラスミド DNA である。ATF6 α の発現プラスミド p3 \times FLAG-ATF6 (以下 3F-ATF6 と略す) は、Addgene 社から購入した (plasmid ID: 11975)。

ATF4、GABP α (GA-binding protein alpha)、および GABP β の発現プラスミドは、以下の手順で作製した。最初に、1-2-8 項と同様の手順で、BCBL1 細胞から cDNA を調製した。この cDNA を鋳型に、1-2-2 項と同様の手順で、発現プラスミド ZS7 (ATF4 発現プラスミド)、ZS125 (GABP α 発現プラスミド)、および ZS127 (GABP β 発現プラスミド) を作製した。ZS7、ZS125、および ZS127 は、N 末端側に 2 \times S-tag peptide が付加された形でタンパク質が発現するように、pCIneo にクローニングした。以下に、使用したプライマーの情報を示す (Table 5)。

Table 5

ZS7、ZS125、ZS127 の作製に使用したプライマーおよびクローニングサイト

Plasmid name	Gene	Sense primer	Antisense primer	Cloning site
ZS7	ATF4	5'-GGGAATTCATGACCGA AATGAGCTTCC-3'	5'-AAGTCGACCTAGGGGA CCCTTTTC-3'	EcoRI/SalI
ZS125	GABP α	5'-AAACGCGTATGACTAA AAGAGAAGCAG-3'	5'-AAGTCGACTCAATTATC CTTTTCCG-3'	MluI/SalI
ZS127	GABP β	5'-AAACGCGTATGTCCCTG GTAGATTG-3'	5'-GGGTCGACTTAAACAG CTTCTTTATTAGTCTG-3'	MluI/SalI

2-2-2 プロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミド DNA

pGL3-IRE1 は、明治大学 吉田健一教授から恵与された⁵⁵⁾。pGL3-IRE1 は、ヒト IRE1 α の翻訳開始点より上流に位置する予測転写開始点 (transcription start site; TSS) を 0 として、下流 23 bp (+23 bp) から上流 974 bp (-974 bp) のプロモーター領域を pGL3 basic (Promega 社製) に、KpnI/BglII サイトを利用してクローニングされたプロモーター・ルシフェラーゼレポータープ

ラスミド DNA である。

ヒト PERK のプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミド DNA (以下、ZS20 とする) は、以下の手順で構築した。HeLa 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型に、PERK の TSS を 0 として +113 から -990 bp のプロモーター領域を PCR 法で増幅した。増幅したプロモーター領域は、pGL3 basic のルシフェラーゼ遺伝子 5' 上流に位置するマルチクローニングサイト内の KpnI/BglII サイトを利用してクローニングし、ZS20 を構築した。

また、pGL3-IRE1 と ZS20 を鋳型に、プロモーター領域を上流側から短くしたレポータープラスミドをそれぞれ作製した。使用したプライマーの塩基配列は、以下の Table 6 および 7 にそれぞれ示した。なお、各プライマーは、以下の遺伝子情報を元にデザインし、antisense primer は共通のものを使用した。

IRE1 α	GenBank accession number: AC025362
PERK	GenBank accession number: AC062029

2-2-3 置換変異レポータープラスミドの作製

ZS100、ZS101、および ZS102 は pGL3-IRE1 を、ZS97、ZS98、ZS99、および ZS49 は ZS20 を鋳型に KOD FX neo を用いて、PCR 反応を行うことで作製した。変異させた予測転写因子の結合配列の情報を Table 8 に、使用したプライマーの情報を Table 9 にそれぞれ示す。プライマー配列中の下線部で示した配列が、変異を入れた箇所である。PCR 後、反応溶液に 3 μ L の DpnI を添加し、37°C、1 時間反応させることで、残存した鋳型プラスミド DNA を分解した。この反応溶液 5 μ L を大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、50 μ g/mL ampicillin を含む LB 寒天培地上で 37°C、一晩培養した。得られたコロニーからプラスミド DNA を抽出し、その DNA 配列をシーケンス解析することで、目的の置換変異レポータープラスミドが作製できていることを確認した。なお、ZS102 および ZS49 は、上記操作一回では完全に置換変異できなかったため、PCR 反応からシーケンス解析までの操作を複数回行うことで、作製した。各プロモーター内の転写因子結合サイトの予測には、フリーソフト P-MATCH 1.0 を使用した。P-MATCH は、転写因子結合サイトライブラリー TRANSFAC の情報を基に、任意の塩基配列内にある転写因子結合配列を予測するプログラムである。また、PERK の転写因子開始点の予測には PEDB を使用した。PEDB は、ヒト、マウス遺伝子の予測プロモーター領域のデータベースである。

2-2-4 プロモーター・ルシフェラーゼ・レポーター解析

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- β -Gal プラスミド DNA (Promega 社から購入) を用いて、実験を行った。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、1 \times passive lysis buffer 150 μ L を加え、室温で 30 分間反応させることで、細胞抽出液を調製した。この細胞抽出液 40 μ L に対して、基質溶液である luciferase assay reagent II 20 μ L を加え、穏やかに 6 回ピペッティングすることで混合した後、ホタル・ルシフェラーゼの発光を 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 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した。細胞抽出液 10 μ L に対して、Z buffer 68 μ L と 4 mg/mL ONPG 水溶液 22 μ L をよく混合し、遮光して 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・ルシフェラーゼ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。

Table 6

IRE1 α プロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミド作製に使用したプライマー

Plasmid name	Sense primer	Antisense primer
ZS73	5'-AAGGTACCTCAACCCACCCACTCC-3'	
ZS14	5'-GGGGTACCAGGAAAAGGAAGAAA GGG-3'	
ZS71	5'-AAGGTACCAAGCCTCCGGTAGCTG-3'	
ZS72	5'-AAGGTACCGAGGCTTCTAGGCACC-3'	5'-GAAGATCTGCGGACGCAGAACTG ACTAG-3'
ZS15	5'-AAGGTACCCAGACGCTGGATGC-3'	
ZS74	5'-AAGGTACCACGCCCCTAGATTGGC-3'	
ZS116	5'-AAGGTACCACCCAGCGCTTATAGG G-3'	

Table 7

PERK プロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミド作製に使用したプライマー

Plasmid name	Sense primer	Antisense primer
ZS20	5'-AGGGTACCTGGGCAAAAGAGCAA G-3'	
ZS25	5'-GGGGTACCATTCTGTGACCAACCA G-3'	
ZS26	5'-GGGGTACCCAGACTGGATTGTCAC-3'	
ZS65	5'-AAGGTACCACCCTTCTACTTCTAG GGACC-3'	
ZS27	5'-GGGGTACCCTCCTTTAAGGTCGAC-3'	5'-GGAGATCTCCTATCTCGGACATCG C-3'
ZS66	5'-AAGGTACCAATCAAGAGGCAGTTA GCG-3'	
ZS67	5'-AAGGTACCCTTTGTGGGGCGAG-3'	
ZS28	5'-AAGGTACCTGAGCGCACCAATCAG-3'	
ZS29	5'-AAGGTACCTGGGAACATGGAGTGG-3'	

Table 8

pGL3-IRE1 と ZS20 のプロモーターに変異を入れた転写因子結合配列

プラスミド名	予測転写因子名	予測転写因子結合配列
ZS100	ATF	5'-TGACG-3'
ZS101	XBP1	5'-CACGT-3'
ZS102	GABP	5'-GGAAGAA-3'
ZS97	c-Rel	5'-ATTCC-3'
ZS98	AREB6 (Na, K-ATPase α 1 subunit gene positive regulatory element binding protein 6)	5'-CAGGT-3'
ZS99	GABP	5'-GGAAGAA-3'
ZS49	NF- κ B	5'-GGGAAGTCC-3'

Table 9

置換変異レポータープラスミド作製に使用したプライマー

プラスミド名	プライマーセット名	プライマー配列
ZS100	ZS100-sense primer	5'-CCCACTCCCTCCAACGAGTTGCTCGTCAGACCATCTCAAACCTTCACA-3'
	ZS100-antisense primer	5'-TGTGAAGTTTGAGATGGTCTGACGAGCAACTCGTTGGAGGGAGTGGG-3'
ZS101	ZS101-sense primer	5'-CATCTCAAACCTTCACATCCATGAAGGTCACATCAACGCACGTGAC-3'
	ZS101-antisense primer	5'-GTCACGTGCGTTGATGTGACCTTCATGGATGTGAAGTTTGAGATG-3'
ZS102	ZS102-sense primer 1	5'-AACTCCGCCCCGACCAATTTAAGCCGCGGCACCCAGCGCTT-3'
	ZS102-antisense primer 1	5'-AAGCGCTGGGTGCCGCGGCTTAAATTGGTCGGGGCGGAGTT-3'
	ZS102-sense primer 2	5'-AACTCCGCCCCGACCAATTTTTGCCGCGGCACCCAGCGCTT-3'
	ZS102-antisense primer 2	5'-AAGCGCTGGGTGCCGCGGCAAAAATTGGTCGGGGCGGAGTT-3'
ZS97	ZS97-sense primer	5'-GTTCAAATGCCTTGGCTGAACGGCGGAGTCTTCTCCACTCTGCCCTT-3'
	ZS97-antisense primer	5'-AAGGGCAGAGTGGAGAAGACTCCGCCGTTTCAGCCAAGGCATTTGAAC-3'
ZS98	ZS98-sense primer	5'-GGAAGTGTGAGCGCACCAATTGTAGAAAAAGACGTCGGGGGAAAGGC-3'
	ZS98-antisense primer	5'-GCCCTTCCCCGACGTCTTTTTCTACAATTGGTGCCTCATCAGTTCC-3'
ZS99	ZS99-sense primer	5'-TTCTCATTTGGTAATTGCGTCCTTCCAAGGGACGGGCCTCGAACGACG-3'
	ZS99-antisense primer	5'-CGTCGTTTCGAGGCCCGTCCCTTGGAAGGACGCAATTACCAATGAGAA-3'
ZS49	ZS49-sense primer 1	5'-GCGATGTTGACCACCAACCGAAGTCCACCTTCCCCAACAAGG-3'
	ZS49-antisense primer 1	5'-CCTTGTTGGGGAAGGTGGACTTCGGTTGGTGGTCAACATCGC-3'
	ZS49-sense primer 2	5'-GCGATGTTGACCACCAACCGGTATCCACCTTCCCCAACAAGG-3'
	ZS49-antisense primer 2	5'-CCTTGTTGGGGAAGGTGGATACCGGTTGGTGGTCAACATCGC-3'
	ZS49-sense primer 3	5'-GCGATGTTGACCACCAACCGGTAGGAACCTTCCCCAACAAGG-3'
	ZS49-antisense primer 3	5'-CCTTGTTGGGGAAGGTTCCTACCGGTTGGTGGTCAACATCGC-3'

2-2-5 Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析は、1-2-9 に示した手順と同様に行った。

2-2-6 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は、1-2-6 に示した手順と同様に行った。

2-3 結果

2-3-1 レポータープラスミドを用いた IRE1 α 遺伝子のプロモーター解析

pGL3-IRE1 と ZS73 を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、pGL3-IRE1 と ZS73 のレポーター活性はほぼ同等であった (Fig. 18B)。また、ZS14、ZS71、ZS72、および ZS15 のレポーター活性は同等であり、pGL3-IRE1 と比較すると、これらレポーターの活性は最大約 20%程度減少した (Fig. 18B)。P-MATCH を用いた解析から-815 から-265 bp のプロモーター領域内には、ATF、XBP1、c-Rel の結合サイトが予測され、c-Rel に関しては 6 箇所予測された (Fig. 18A)。ZS73、ZS14、ZS71、ZS72、および ZS15 間のレポーター活性がほぼ同等であったことから、c-Rel は pGL3-IRE1 のプロモーター活性に寄与しないことが示唆された。一方、ZS74 のレポーター活性は、pGL3-IRE1 のおよそ半分まで減少し、さらにプロモーター領域を短くした ZS116 ではレポーター活性が pGL3-IRE1 の 1/100 以下まで低下した (Fig. 18B)。これらの結果から、pGL3-IRE1 のプロモーター活性に、GABP 結合サイトを含む -264 から-38 bp の領域が寄与することが明らかとなった。

2-3-2 レポータープラスミドを用いた PERK 遺伝子のプロモーター解析

UPR やゴルジ体ストレス応答を含むオルガネラストレス応答に関与する遺伝子のプロモーター領域の多くは、TSS から上流 1 kb 以内にあることが報告されている^{55, 56)}。そのため、+113 から-990 bp の領域をクローニングし、PERK のプロモーター・レポータープラスミド ZS20 を構築した。クローニングしたプロモーター領域の中で、どの領域がレポーター活性に重要か明らかにするため、ZS20 のプロモーター領域を上流側から短くしたレポータープラスミドをそれぞれ作製し、評価した。その結果、ZS25、ZS26、ZS65、ZS66、ZS67、ZS28 間のレポーター活性は同等であり、これらのレポーター活性は ZS20 の約 40%まで減少した (Fig. 19B)。この結果から、-990 から-680 bp の領域内に PERK の発現を制御するプロモーターがある可能性が示された。また、-679 から-129 bp の領域は ZS20 のプロモーター活性に必須でないことが明らかとなった。一方、ZS28 からさらにプロモーター領域を短くした ZS29 は、ZS20 の 20%程度までと大きくレポーター活性が減少した (Fig. 19B)。すなわち、-129 から+30 bp の領域内にもまた、PERK の発現を制御するプロモーターがある可能性が示された。また、P-MATCH を用いた解析から、-990 から-680 bp と-129 から+30 bp の領域内には、c-Rel、AREB6、GABP、NF- κ B の結合サイトが予測された (Fig. 19A)。

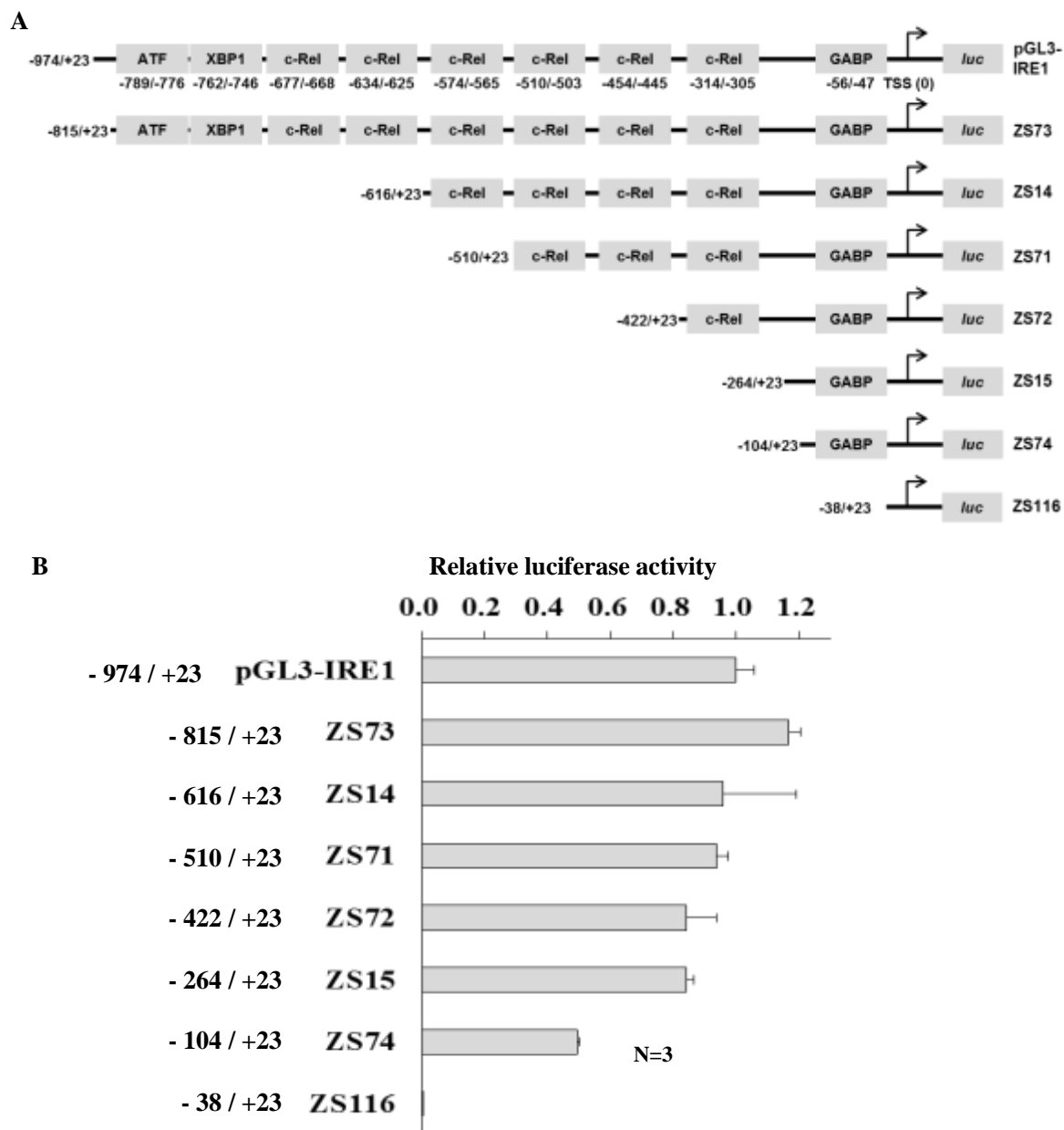


Fig. 18. IRE1αのプロモーター解析

(A) 転写開始点 (TSS) の位置を 0 として、作製した IRE1αのプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドの模式図を示した。予測転写因子結合サイトおよび、プラスミド名を示した。なお、図中の luc は luciferase 遺伝子を示す。

(B) HeLa 細胞に IRE1αのプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドと pSV-β-Gal を遺伝子導入し、ルシフェラーゼレポーター解析を行った。pGL3-IRE1 のレポーター活性を 1.0 とした相対値を示した。

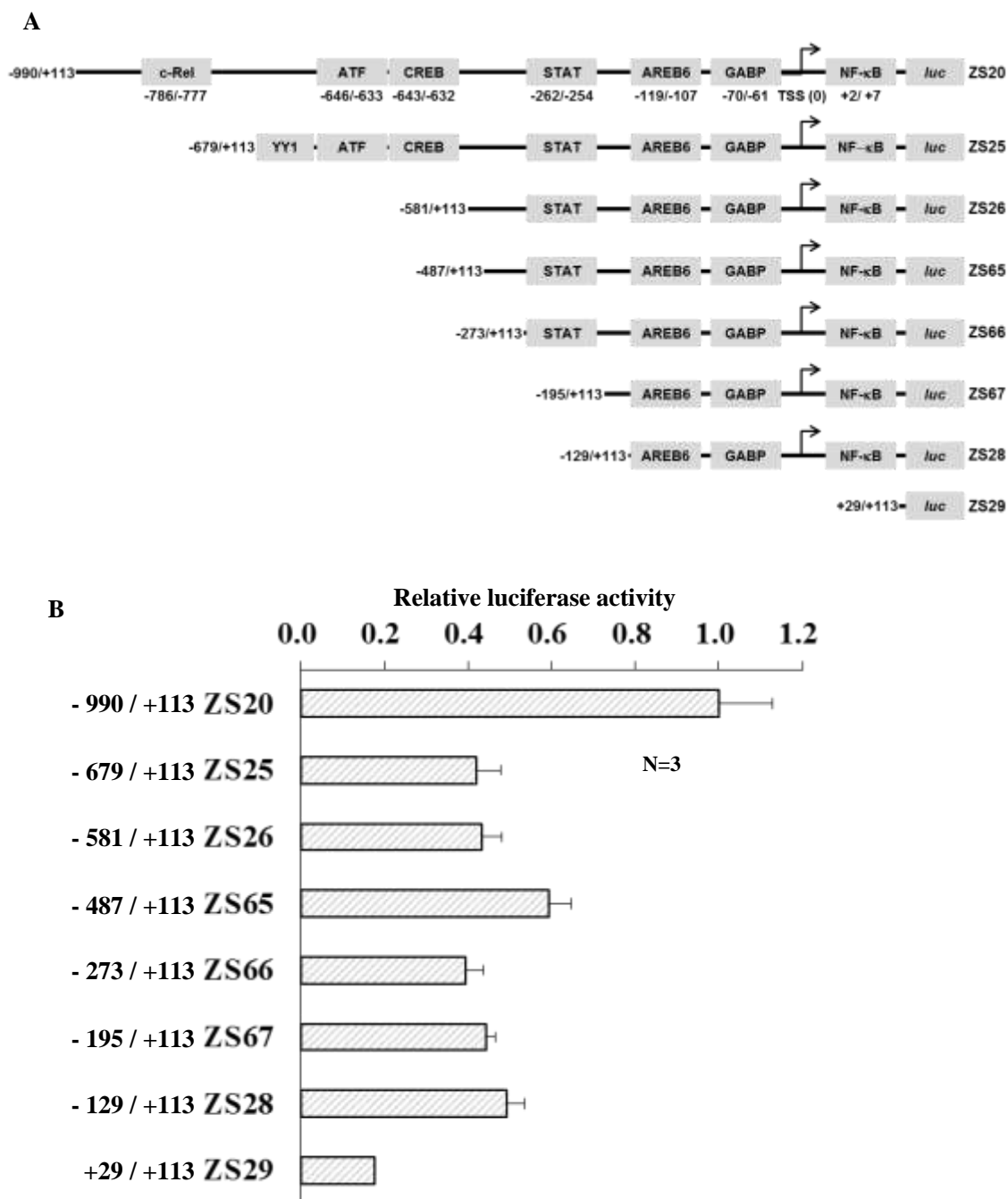


Fig. 19. PERK のプロモーター解析

(A) 転写開始点 (TSS) の位置を 0 として、作製した PERK のプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドの模式図を示した。予測転写因子結合サイトおよび、プラスミド名を示した。なお、図中の luc は luciferase 遺伝子を示す。

(B) HeLa 細胞に PERK のプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドと pSV-β-Gal を遺伝子導入し、ルシフェラーゼレポーター解析を行った。ZS20 のレポーター活性を 1.0 とした相対値を示した。

2-3-3 置換変異による IRE1 α と PERK 遺伝子のプロモーター解析

次に、IRE1 α のプロモーター活性に寄与する領域をより明確にするために、pGL3-IRE1 の ATF (-789/-776)、 XBP1 (-762/-746)、および GABP 結合配列 (-56/-47) をそれぞれ置換変異したレポーターZS100、 ZS101、 ZS102 を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、pGL3-IRE1 と比較して、ZS100 と ZS102 は活性が減少し、ZS101 は pGL3-IRE1 と活性が同等であった (Fig. 20A)。次に、pGL3-IRE1 のレポーター活性に対する、転写因子 ATF や GABP の効果を評価した。ATF ファミリーは、ATF1-6 や CREB (cyclic-AMP response element binding protein) といった数多くの転写因子から構成され、C 末領域に DNA 結合能を有す b-ZIP (basic leucine zipper) ドメインがあることが、共通特徴に挙げられる。本研究では、ヒト UPR の機能を担う ATF4 と ATF6 α に着目した。また、転写因子 GABP は GABP α と GABP β のヘテロ二量体から成り、HSV1 の前初期遺伝子のプロモーターにある GA モチーフへの結合を介し、転写を活性化することが報告されている⁵⁷⁾。本研究では、pGL3-IRE1 のプロモーター活性に対する、ATF4、ATF6 α 、GABP α 、および GABP β の影響を評価した結果、ATF4 を遺伝子導入した時、pGL3-IRE1 のレポーター活性をコントロール (empty) と比べて、約 2 倍増加させた (Fig. 20C)。一方、ATF6 α 、GABP α 、および GABP β は、pGL3-IRE1 のレポーター活性には影響を与えなかった (Fig. 20C)。また、ATF4 を遺伝子導入した HeLa 細胞内では、コントロール (empty) に対して IRE1 α mRNA 量が約 3 倍と有意に増加した (Fig. 20D)。これらの結果から、転写因子 ATF4 が IRE1 α の転写制御に寄与することが示唆された。

前述の結果から、-990 から-680 bp と-129 から+30 bp の領域に PERK のプロモーター活性を制御する配列がある可能性が示された (Fig. 19)。そこで、これら領域内の予測転写因子結合サイトである、c-Rel (-786/-777)、AREB6 (-119/-107)、GABP (-70/-61)、NF- κ B (+2/+7) の結合配列をそれぞれ置換変異したレポーターZS97、ZS98、ZS99、および ZS49 を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、作製した全ての置換変異レポーターの活性は、ZS20 と同等であり、これらの結合配列が ZS20 のプロモーター活性に必須でないことが明らかとなった (Fig. 20B)。

2-3-4 KSHV 溶解感染遺伝子による PERK プロモーターの活性化

溶解感染期の PEL 細胞において、IRE1 α と PERK の mRNA 量が増加したが (Fig. 11B および C)、これら遺伝子の発現亢進が KSHV の溶解感染遺伝子に起因するかは不明であった。そこで、溶解感染遺伝子の中で最も機能解析が進んでいる転写因子 RTA と K-bZIP を HeLa 細胞に遺伝子導入し、IRE1 α と PERK の mRNA 量を解析した。その結果、RTA を遺伝子導入した HeLa 細胞では IRE1 α が、K-bZIP を遺伝子導入した HeLa 細胞では IRE1 α と PERK の mRNA 量が増加した (Fig. 21A および B)。また、ZS20 を用いたレポーター解析においても、Fig. 21B の結果と同様に、K-bZIP を遺伝子導入した場合、ZS20 のプロモーター活性は、コントロール (empty) の約 3 倍増加した (Fig. 21E)。RTA を遺伝子導入した場合、ZS20 のプロモーター活性は、コントロール (empty) の約 1.3 倍増加した (Fig. 21E)。また、ZS20 のプロモーター領域を短くしたレポーターZS25、ZS26、ZS65、ZS27、ZS66、および ZS67 を用いて、同様の解析を行った結果、ZS66 において K-bZIP の遺伝子導入による PERK プロモーターの活性の増

加が約 1.6 倍まで低下した (Fig. 21F)。これらの結果から、K-bZIP が PERK のプロモーターを活性化し、その活性化には PERK の-385 から-274 bp の領域が寄与することが明らかとなった。

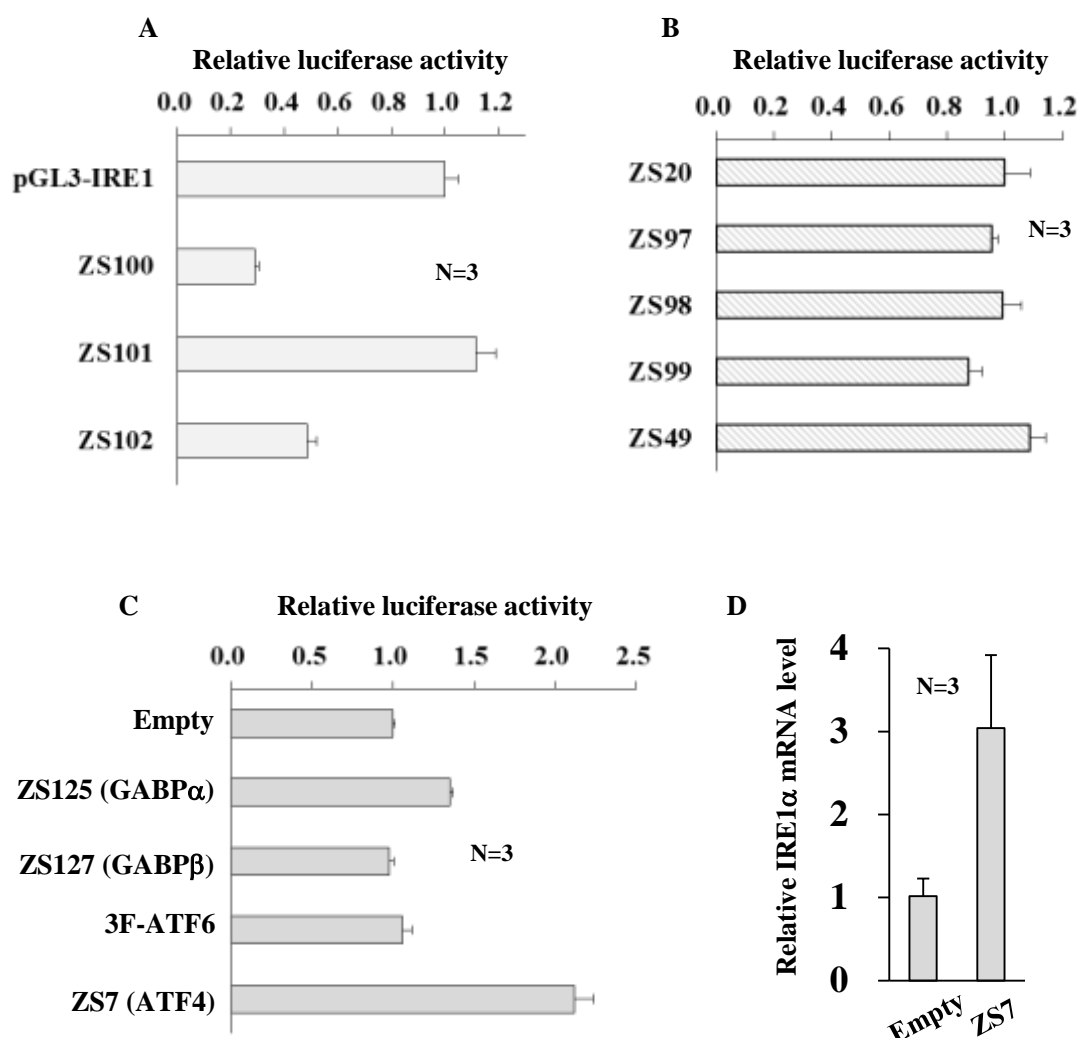


Fig. 20. 置換変異による IRE1α と PERK 遺伝子のプロモーター解析

- (A) (B) HeLa 細胞に IRE1α (A) および PERK (B) の各置換変異レポータープラスミドと pSV-β-Gal を遺伝子導入し、ルシフェラーゼレポーター解析を行った。(A) は pGL3-IRE1 の、(B) は ZS20 の活性を 1.0 とした相対値を示した。
- (C) レポータープラスミドに pGL3-IRE1 と pSV-β-Gal、エフェクター遺伝子に Empty (pCIneo)、ZS125、ZS127、3F-ATF6、および ZS7 を用いて、ルシフェラーゼレポーター解析を行った。Empty を遺伝子導入した時の活性を 1.0 とした相対値を示した。
- (D) Empty (pCIneo) または ZS7 を HeLa 細胞に遺伝子導入した後、細胞内の IRE1α の mRNA 量を解析した。

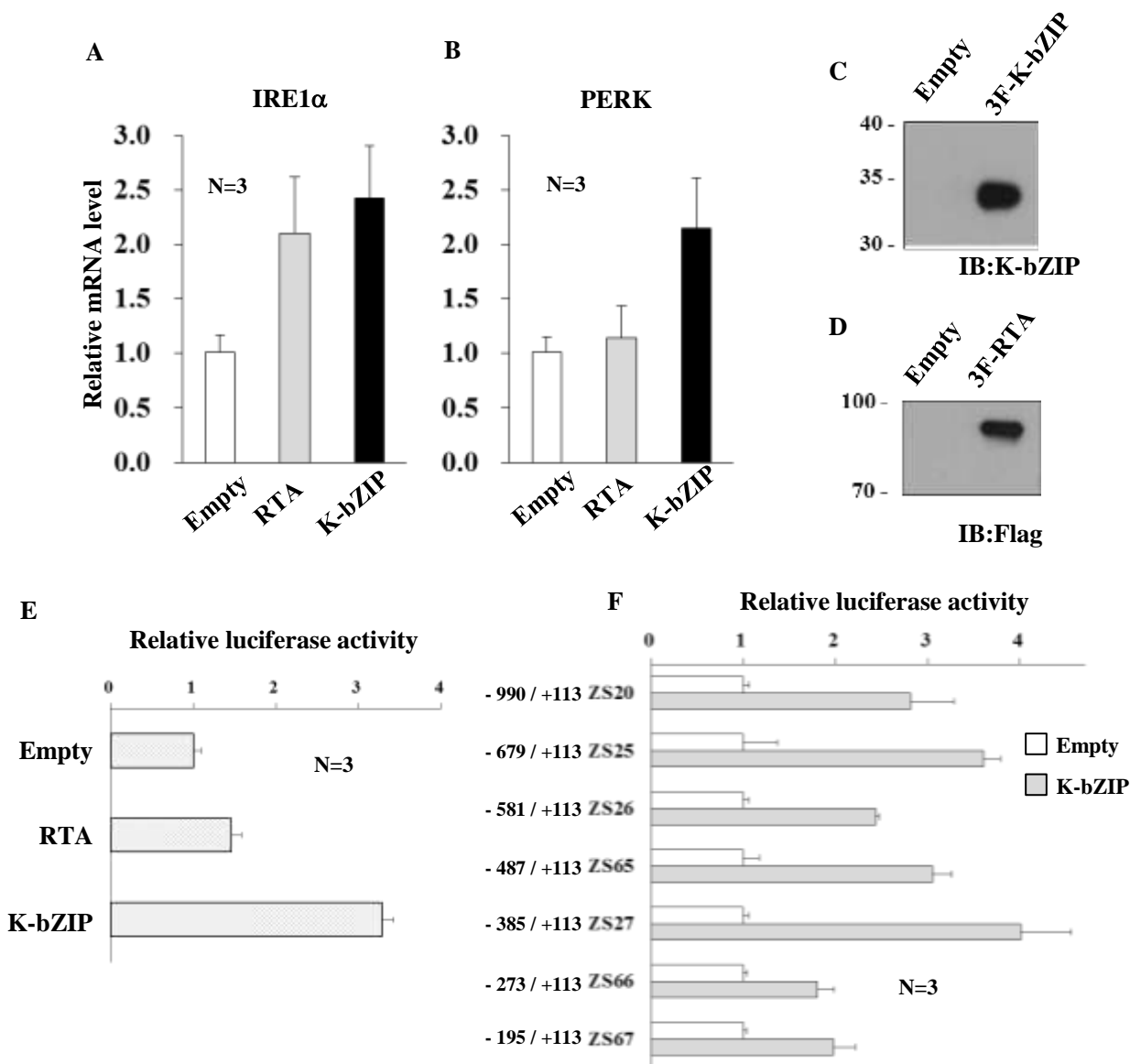


Fig. 21. IRE1αと PERK の転写に対する溶解感染遺伝子の影響

- (A) (B) Empty (pcDNA)、Flag-RTA、および Flag-K-bZIP を遺伝子導入した HeLa 細胞内の IRE1α (A) と PERK (B) の mRNA 量を定量した。Empty を遺伝子導入した細胞の mRNA 量を 1.0 とした相対値で示した。
- (C) (D) Empty (pcDNA)、Flag-RTA、および Flag-K-bZIP を遺伝子導入した HeLa 細胞の抽出液を用いてウェスタンブロットを行い、RTA と K-bZIP の発現を確認した。
- (E) ZS20 と Empty (pcDNA)、Flag-RTA、または Flag-K-bZIP を HeLa 細胞に遺伝子導入し、レポーター解析を行った。Empty のルシフェラーゼ活性を 1.0 とした相対値を示した。
- (F) レポータープラスミド (ZS20、ZS25、ZS26、ZS65、ZS27、ZS66、および ZS67)、pSV-β-Gal、エフェクタープラスミド (Empty (pcDNA) および Flag-K-bZIP) を HeLa 細胞に遺伝子導入し、レポーター解析を行った。Empty のルシフェラーゼ活性を 1.0 とした相対値を示した。

2-4 考察

2-4-1 IRE1 α のプロモーターに関して

本研究では、プロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて、IRE1 α のプロモーターを解析した結果、GABP 結合サイトを含む-264 から-38 bp の領域と ATF 結合サイト (-789/-776 bp) が、プロモーター活性に寄与すると示唆された (Figs. 18B および 20A)。GABP に関して、pGL3-IRE1 の GABP 結合サイトを置換変異した ZS102 のレポーター活性は大きく減少したが (Fig. 20A)、転写因子 GABP α と GABP β によって pGL3-IRE1 のプロモーターは活性化されなかった (Fig. 20C)。これらの結果から、IRE1 α 遺伝子プロモーター活性に、GABP 配列は必須ではなく、GABP 以外の-264 から-38 bp の領域内に、活性を制御する配列が存在する可能性が推測される。一方、転写因子 ATF4 が、IRE1 α のプロモーター活性化と IRE1 α の mRNA 発現を誘導した (Fig. 20C および D)。さらに、PEDB のデータベースから、ATF 結合サイトは IRE1 α プロモーターのヒトおよびマウス間保存領域 (-847 から-522 bp) 内に含まれることが確認された。本研究では、IRE1 α プロモーターに ATF4 が直接的に結合することを確認していないが、ATF4 が IRE1 α 遺伝子の転写制御に寄与することが示唆される。このことは、潜伏感染期の PEL 細胞において、IRE1 α の発現と ATF4 の核内発現の両方が抑制されていた結果と矛盾しない (Figs. 3-6)。先行研究において、KSHV が発現するウイルスタンパク質 LANA は、直接的な相互作用を介し ATF4 の転写活性化能を抑制することが報告されている⁴⁰⁾。さらに、本研究では、LANA が IRE1 α 遺伝子の転写を阻害する可能性も明らかにしている (Fig. 7A)。これらを考え併せると、潜伏感染期の PEL 細胞において、PERK の発現抑制と LANA によって、転写因子 ATF4 の発現と転写活性化能が阻害され、その結果、IRE1 α の転写、すなわち発現が抑制されることが推察される。また、本研究では、IRE1 α 遺伝子上流の-264 から-38 bp の領域が IRE1 α のプロモーターの活性に重要であることを示した (Fig. 18B)。この結果より、IRE1 α 遺伝子の発現を制御する転写因子には、ATF4 以外の分子が存在する可能性も考えられる。

ATF と XBP1 結合配列を含むプロモーター領域を欠損させた ZS14 と、ATF 結合配列のみを置換変異した ZS100 のレポーター活性は、同等または ZS100 の方が大きくなることが予測される。しかし、コントロール (pGL3-IRE1) に対するレポーター活性を比較した時、ZS14 より ZS100 の方が、大きくレポーター活性が減少した (Figs.18B および 20A)。本研究では、ATF 結合配列を置換変異したレポーターを ZS100 の 1 種類のみしか作製していない。しかしながら、上述の結果から、pGL3-IRE1 のプロモーターにおいて、ATF と XBP1 結合配列を除く-815 から-616 bp の領域内に、プロモーター活性を抑制する分子が結合する可能性が考えられる。この抑制分子の結合配列を ZS14 は欠損したため、ZS100 と比較して、レポーター活性が減少したことが推測される。

2-4-2 PERK のプロモーターに関して

PERK のプロモーター領域を短くしたプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて解析した結果、PERK 遺伝子上流-990 から-680 bp と-129 から+30 bp の領域が、PERK のプロモーター活性に重要であることが明らかとなった (Fig. 19B)。しかし、これら領

域内に予測された転写因子結合配列 (c-Rel、AREB6、GABP、および NF- κ B) を置換変異させても PERK のプロモーター活性は顕著に減少しなかった (Fig. 20B)。それゆえ、c-Rel、AREB6、GABP、および NF- κ B 結合配列を除く -990 から -680 bp と -129 から +30 bp の領域が、PERK のプロモーター活性に寄与することが示唆される。一方、塩基配列は完全に一致しないが、P-MATCH を用いた解析から、CREB (CRE-binding protein) 結合配列と 85% 以上の相同性を示すサイトが -990 から -680 bp の領域内に 6 箇所、-129 から +30 bp の領域内に 1 箇所それぞれ予測された (data not shown)。CREB タンパク質は、ER ストレスで発現が誘導される転写因子の一つである。また、Tg 処理した PEL 細胞において、PERK 遺伝子の mRNA 量が増加したと考え併せると (Fig. 4A)、これら CREB 結合配列が PERK のプロモーター活性を制御する可能性が考えられる。

溶解感染遺伝子 K-bZIP を発現させた HeLa 細胞内では、PERK の mRNA 量が増加した (Fig. 21B)。また、レポーター解析においても、K-bZIP は PERK のプロモーターを活性化した (Fig. 21E)。さらに、K-bZIP による PERK プロモーターの活性化が、ZS66 で減少したことから、-385 から -274 bp の領域を介して K-bZIP が転写を活性化する可能性が示された (Fig. 21F)。先行研究より、K-bZIP の DNA 結合配列は明らかにされている⁵⁸⁾。この知見から、ZS20 の -343 から -330 bp の位置に、K-bZIP 結合配列 5'-AAGTGAAAGTGGGA-3' と 93% の相同性を示す配列が有ることが確認され、このことは Fig. 21F の結果を支持する。すなわち、ZS20 の -343 から -330 bp の配列を介して K-bZIP が PERK のプロモーターを活性化することが考察される。さらに、本研究では SB 処理した PEL 細胞において、PERK と K-bZIP の mRNA 量が共に増加することを明らかにしている (Fig. 11B および C)。考え併せると、溶解感染期の PEL 細胞において、K-bZIP が PERK 遺伝子のプロモーターを介して、PERK の転写を活性化することが示唆される。一方、RTA と K-bZIP を発現させた HeLa 細胞内では、IRE1 α の mRNA 量も増加した (Fig. 21A)。PERK 同様に IRE1 α プロモーター内の塩基配列を解析した結果、pGL3-IRE1 のプロモーター内に、RTA や K-bZIP の結合配列と相同性を示す配列は認められなかった^{34, 58)}。しかし、IRE1 α 遺伝子の転写開始点から上流 1.7 kbp の位置に、K-bZIP の結合配列と 88% の相同性を示す配列が確認されたことから、K-bZIP が IRE1 α の転写を活性化する可能性が考えられる。

2-5 小括 2

本研究の第 1 章と第 2 章より考察された KSHV の UPR 脱制御の模式図を以下に示す (Figs. 22 および 23)。潜伏感染期の PEL 細胞において、IRE1 α と PERK の発現が転写レベルで抑制されることが明らかとなった。また、PERK に関して、詳細は明らかにできなかったが、KSHV が発現するウイルスタンパク質 LANA と vCyclin が IRE1 α の転写レベルでの発現抑制に寄与することが明らかとなった。さらに、LANA は ATF4 との結合を介して転写活性化能を阻害することで⁴⁰⁾、IRE1 α の発現を抑制することが示唆された。KSHV は、IRE1 α と PERK の発現抑制を介して、これら UPR 分子が誘導する翻訳抑制やアポトーシスを回避することで、感染の維持を行うことが考察される。一方、溶解感染期の PEL 細胞内では、Bip、IRE1 α 、および PERK の発現量増加に伴い UPR が活性化する。UPR が活性化する転写因子 XBP1 や Nrf2 は、溶解感染移行に必須である RTA の転写を亢進すると考えられる^{29, 53, 54)}。すなわち、KSHV は

活性化した UPR を利用し、溶解感染遺伝子の発現誘導とウイルス産生を亢進すると考えられる。また、活性化した XBP1 は、ER シャペロンである Bip の発現を誘導し、ウイルスタンパク質合成亢進に寄与すると考えられる。さらに、溶解感染遺伝子 RTA や K-bZIP により IRE1 α と PERK 遺伝子の転写が活性化されることが明らかとなった。すなわち、KSHV は、自らも UPR を活性化することで、自身のウイルス産生を更に加速させることが示唆された。

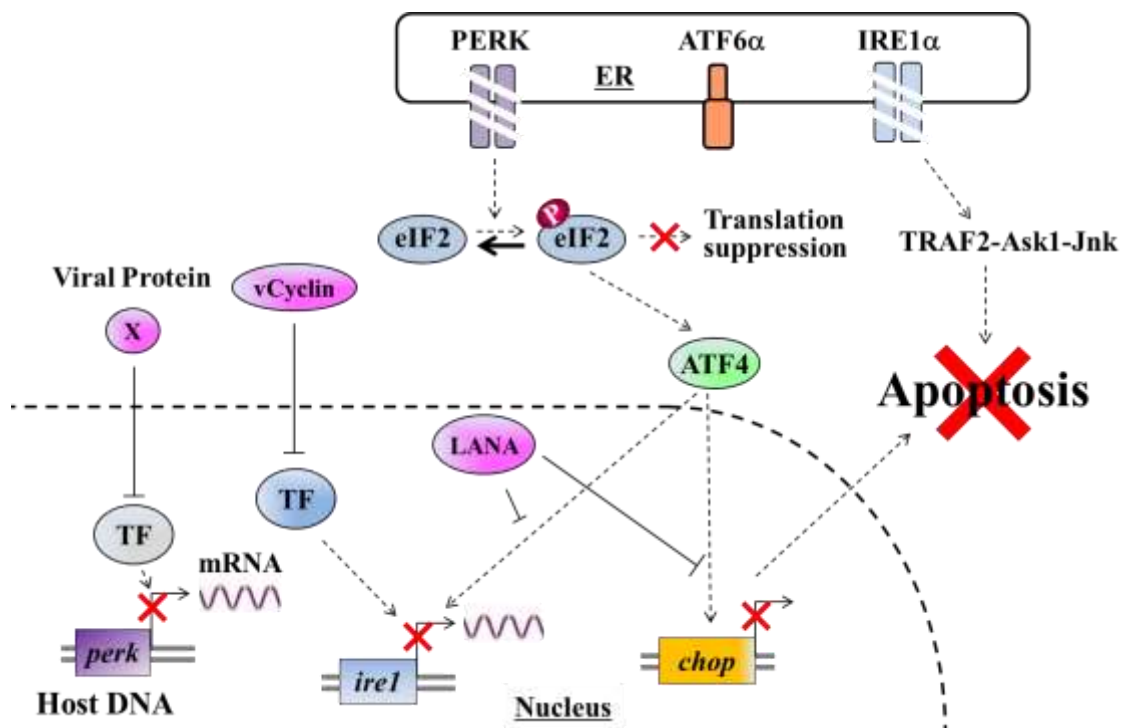


Fig. 22. 本研究より考察された潜伏感染期の PEL 細胞内の UPR 挙動

潜伏感染期の PEL 細胞における UPR 挙動の模式図を示した。図中の破線矢印は、PEL 細胞内で抑制されているシグナル伝達 (分子間相互作用) を、止線は阻害を示している。潜伏感染期の PEL 細胞内では、IRE1 α と PERK の発現量が減少しており、活性化した UPR が誘導する eIF2 α のリン酸化、CHOP の発現、および Jnk の活性化が抑制される。その結果、PEL 細胞内では、UPR により誘導される eIF2 α を介す翻訳抑制や、CHOP および Jnk を介すアポトーシスが抑制される。また、LANA と vCyclin が、IRE1 α の発現抑制 (mRNA 量の減少) に寄与する。特に、LANA は転写因子 ATF4 と直接相互作用し、その機能を阻害することで、IRE1 α および CHOP の発現を抑制する。

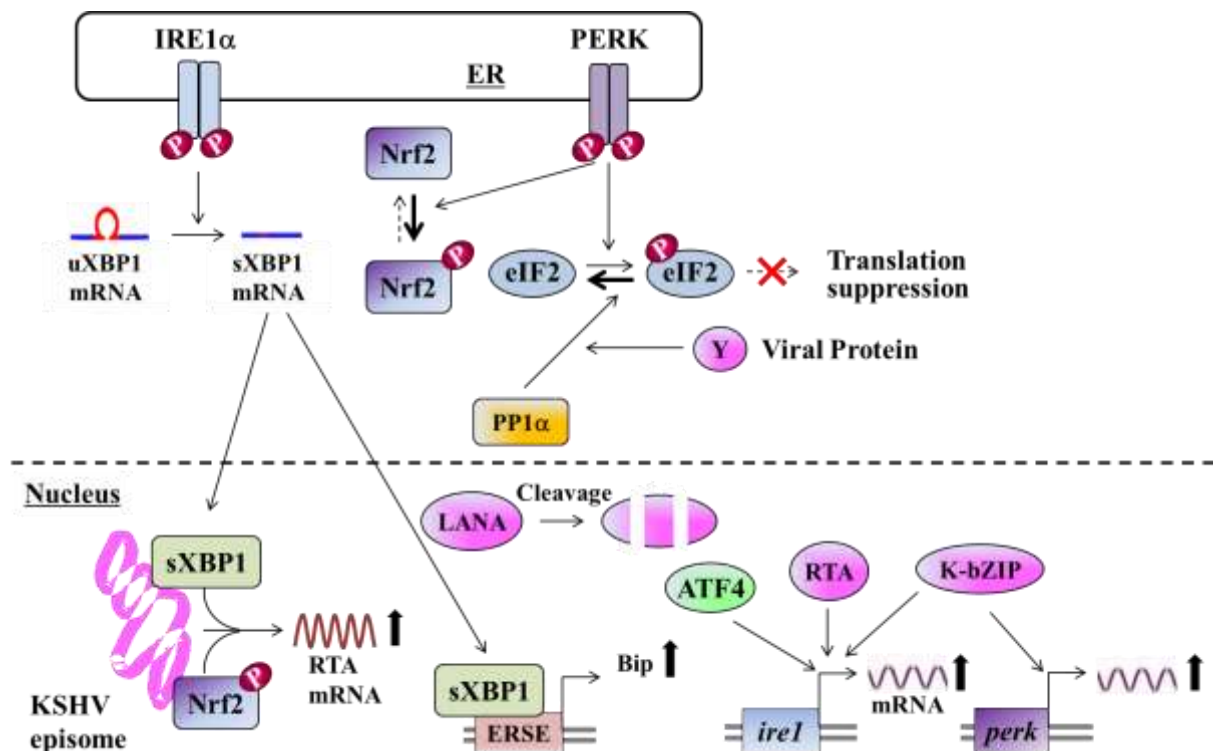


Fig. 23. 本研究より考察された溶解感染期の PEL 細胞内の UPR 挙動

溶解感染期の PEL 細胞における UPR 挙動の模式図を示した。図中の破線矢印は、PEL 細胞内で抑制されているシグナル伝達（分子間相互作用）を示している。溶解感染期の PEL 細胞内では、潜伏感染期に発現が減少していた IRE1α と PERK の mRNA 量および Bip の発現量の増加、すなわち UPR が活性化する。また、IRE1α の mRNA 量の増加には、LANA の切断による発現量減少が寄与する。溶解感染期の PEL 細胞内では、潜伏感染期よりも発現量が増加した IRE1α によって、転写因子 XBP1（図中 sXBP1）の発現が誘導される。XBP1 は、Bip の発現を誘導し、ウイルス産生に必要となるウイルスタンパク質の合成亢進に寄与する。また、潜伏感染期よりも発現量が増加した PERK によって、Nrf2 がリン酸化される。このリン酸化 Nrf2 と XBP1 は、溶解感染移行に必須である RTA の発現を誘導する。一方、RTA は IRE1α の発現を、K-bZIP は IRE1α および PERK の発現を誘導する。溶解感染期の PEL 細胞において、活性化した UPR によって、KSHV の溶解感染遺伝子の発現とウイルス産生が亢進する。さらに、KSHV は RTA や K-bZIP を介して IRE1α および PERK の発現を自らも誘導することで、KSHV のウイルス産生が加速される。

第3章 DATの抗PEL活性と作用機序解析

3-1 はじめに

本研究において、ER ストレス誘導剤 (Tg および BFA) が PEL 細胞に対して殺細胞活性を示すことが明らかとなった (Figs. 8 および 10)。これらの結果から、ER ストレスを誘発して UPR を活性化する化合物が、抗 PEL 活性を有すると考えられる。そこで、ER ストレスを誘発する化合物として、ニンニク (*Allium sativum* L) の含有成分である DAT (diallyl trisulfide) に着目した。DAT はジスルフィド結合開裂に伴い酸化ストレスを誘導し、UPR を活性化することで、基底細胞がんのアポトーシスを引き起こすことが報告されている⁵⁹⁻⁶²⁾。一方、ニンニク精油に含有される主なジアリルスルフィド化合物には、DAT の他に DAS (diallyl sulfide) と DAD (diallyl disulfide) が知られており、その含有比率は DAS が 6%、DAD が 30%、DAT が 40%である^{59, 63)}。また、ジアリルスルフィド化合物は様々な生物学的機能を有しており^{60, 61)}、Akt や Jnk、Erk 等の細胞内シグナル伝達に影響し^{64, 65)}、前立腺がんや肺がん、大腸がん、乳がん細胞に対して、抗がん活性を発揮する⁶⁵⁻⁶⁹⁾。とりわけ、最近の報告から、DAD と DAT が NF- κ B シグナル抑制を介し、抗炎症作用や抗がん活性を示すことが明らかとなった^{64, 66, 70)}。NF- κ B シグナルは、KSHV がコードするウイルスタンパク質 vFLIP、K15、vGPCR (G protein-coupled receptor)、K1、および K7 により活性化され^{14, 71-74)}、その活性化が PEL 細胞の生存と増殖、そしてウイルス複製に必須であることが報告されている^{17, 18)}。

PEL を含む KSHV 感染細胞内における NF- κ B シグナル概要を以下に模式図と共に示す (Fig. 24)⁷⁵⁾。転写因子 NF- κ B は、p65 (RelA) と p50 から成るヘテロ二量体で、通常、細胞質内で抑制因子 I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) が結合することで、不活性化されている。IL-1R (interleukin-1 receptor) や TLR (toll-like receptor) にリガンドが結合し、これら受容体が二量体化することで、NF- κ B シグナルは活性化される。細胞膜上の受容体にリガンドが結合すると、MyD88 (myeloid differentiation factor 88)、IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase 4)、および IRAK1 が受容体に引き寄せられ、IRAK4 が IRAK1 をリン酸化し、リン酸化 IRAK1 が Ub (ubiquitin) E3 ライゲースである TRAF6 と相互作用し、TRAF6 を活性化する。活性化した TRAF6 は、Ub 結合酵素 E2 (Ubc13 および Uev1A) と共に TRAF6 自身を K63 鎖 poly-Ub 化し、この poly-Ub 鎖に TAB2 (TAK1 binding protein 2) と TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1) から成る複合体が TAB2 を介して、IKK (I κ B kinase) 複合体が IKK γ (NEMO) を介して、それぞれ引き寄せられる。そして、TAK1 により IKK β の S180 がリン酸化されることで、IKK 複合体が活性化され、活性化した IKK 複合体は、I κ B α の S32 と S36 をリン酸化する。このリン酸化を引き金に I κ B α は、Ub E3 ライゲース-E2 複合体により K48 鎖 poly-Ub 化され、最終的に 26S プロテアソームにより分解される。この I κ B α の分解により、I κ B α から遊離した NF- κ B は核内に移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。一方、PEL を含む KSHV 感染細胞内において、KSHV が発現する複数のウイルスタンパク質によって、NF- κ B シグナルは活性化される。KSHV がコードする vFLIP は、TRAF2 を介して IKK γ に結合することで IKK 複合体を活性化し⁷¹⁾、K15 は TRAF1、2、および 3 を介して NF- κ B を活性化する⁷²⁾。また、K7 はユビキリンとの相互作用を介して I κ B α の分解を誘

導し、NF- κ B を活性化する⁷⁴⁾。K1⁷³⁾と vGPCR¹⁴⁾は、Akt を介し IKK 複合体を活性化することで、間接的に NF- κ B シグナルを活性化することが報告されている。

上述の知見から、DAT を含むジアリルスルフィド化合物が、抗 PEL 活性や抗 KSHV 活性を有す可能性は十分に高いと推論される。そこで、本研究の第 3 章では、ジアリルスルフィド化合物の PEL 細胞に対する増殖抑制効果とその作用機序の解明を目的に、研究を遂行した。

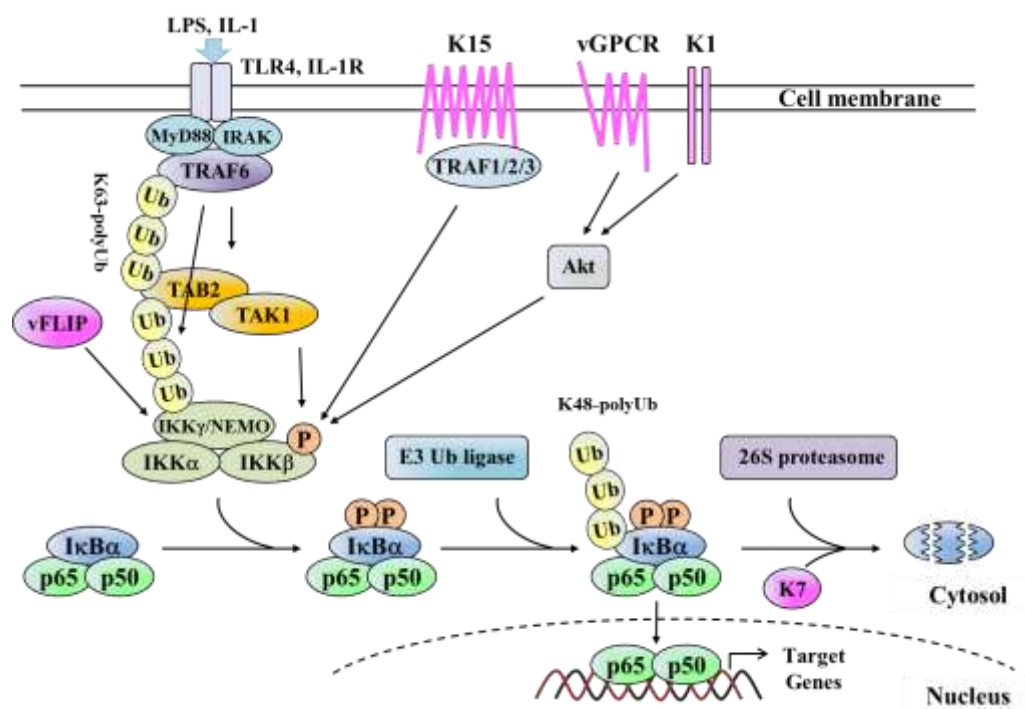


Fig. 24. KSHV 感染細胞内における NF- κ B シグナルの概要

図は、参考文献 (76) の Fig. 8 を一部変更し、引用した。

3-2 実験方法

3-2-1 細胞培養

ヒト TLR4 安定発現 HEK293 細胞株である 293/TLR4 細胞株 (InvivoGen 社から購入) は、10% FBS 含有 DMEM 培地を用いて、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で培養した。

3-2-2 発現プラスミド DNA

Ub (以下 myc-Ub)、IKK α (以下 Flag-IKK α)、IKK β (以下 T7-IKK β)、IKK γ (以下 S-IKK γ)、および TRAF6 (以下 T7-TRAF6) の発現プラスミド DNA は、北海道大学 中川宏治先生より恵与された。これら遺伝子は、N 末端側に myc-tag、3×T7 tag、3×Flag tag、2×S-tag peptide が付加された形でタンパク質が発現するように、pCIneo にクローニングされたプラスミド DNA である。

pRK5-HA-Ubiquitin-WT (plasmid ID: 17608、以下 WT-Ub)、pRK5-HA-Ubiquitin-K48 (plasmid ID: 17605、以下 K48-Ub)、および pRK5-HA-Ubiquitin-K63 (plasmid ID: 17606、以下 K63-Ub) は、Addgene 社から購入した。K48-Ub と K63-Ub は、ヒト Ub タンパク質の K48 または K63 以外の K 残基を R に置換した変異体タンパク質発現プラスミドである。

ZS124 は、T7-TRAF6 を鋳型に作製した、2×S-tag peptide が付加された形で TRAF6 が発現するように、pCIneo にクローニングしたプラスミド DNA である。

ZS93 は、ZS124 を鋳型に 2-2-3 項と同様の手法で作製した。ZS93 は、TRAF6 の C70 を A に置換した変異体タンパク質発現プラスミドである。ZS93 作製に使用したプライマーの配列情報を以下に示す (Table 10)。

Table 10

ZS93 作製に使用したプライマーの情報

Plasmid name	Sense primer	Antisense primer
ZS93	5'-TGGAAAGCAAGTATGAAGCCCC ATCTGCTTGATGGC-3'	5'-GCCATCAAGCAGATGGGGGCTTC ATACTTGCTTTCCA-3'

3-2-3 浮遊細胞への遺伝子導入

B 細胞への遺伝子導入は、PEI を用いて行った。DNA 3 μ g (3 μ L) と 1 mg/mL PEI 9 μ L (9 μ g) を Opti-MEM 50 μ L によく混合し、室温で 15 分間インキュベートして、DNA-PEI 混合液を調製した。1×10⁵ cells/500 μ L/well となるよう BC3 細胞を 24 well-plate に播種し、上述の DNA-PEI 混合液を加え、37°C で 6 時間、CO₂ インキュベーター内で培養した。次に、PBS で 2 回細胞を洗浄し、新しい培地に交換した後、さらに 24 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。

3-2-4 PEL 細胞の増殖に対するジアリルスルフィド化合物の影響の解析

PEL 細胞およびウイルス非感染細胞の増殖に対する各ジアリルスルフィド化合物 (DAS、

DAD、および DAT) の影響は、1-2-5 と同様の手順で、細胞増殖アッセイを行うことで解析した。また、解析で得られた cell viability 値から、CC₅₀ 値を 1-2-14 に示す計算式から算出した。

3-2-5 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は、1-2-6 に示した手順と同様に行った。

3-2-6 カスパーゼ活性の測定

カスパーゼ活性の測定には、Caspase-Glo assay キットを用いた。本キットは、二段階の反応を利用した測定システムであり、以下に簡単な原理を述べる。最初の反応は、各カスパーゼ（カスパーゼ-8 および-9）特異的なプロテアーゼ認識配列を付加した発光基質アミノルシフェリンと耐熱性ルシフェラーゼを含む Caspase-Glo Reagent を細胞抽出液に添加することで、細胞内カスパーゼにより基質が切断される反応である。二段階目の反応は、基質切断に伴い遊離したアミノルシフェリンが、耐熱性ルシフェラーゼにより触媒され、発光する反応である。この発光強度を測定することで、細胞内のカスパーゼ活性を測定する。

種々の濃度に希釈した薬物を含有する培地中で、 1×10^5 cells/mL/well の細胞を 24 well-plate で、一定時間培養した。培養後、細胞を回収および PBS にて洗浄した後、100 μ L の passive lysis buffer を加え、細胞を溶解した。得られた細胞抽出液 20 μ L と、キット付属の Caspase-Glo Reagent 20 μ L を混合し、マイクロプレートリーダーを用いて、発光強度を室温で 10 秒間の積算値として測定した。

3-2-7 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

RT-PCR 法による遺伝子発現解析は、1-2-8 に示した手順と同様に行った。

3-2-8 Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現解析は、1-2-9 に示した手順と同様に行った。

3-2-9 免疫染色法による局在解析

PBS にて再懸濁した細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下し、室温で乾燥させた後、-20℃ に冷した methanol に 1 時間浸漬することで、細胞を固定した。次に、スライドガラスを PBS で洗浄し、PBS で希釈した 3% FBS 溶液を細胞接着面に滴下し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、PBS で 3 回洗浄後、PBS で 200 倍に希釈した一次抗体液をスライドガラス上の細胞接着部に滴下し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 1 回、PBS で 3 回スライドガラスを洗浄した後、PBS で 500 倍希釈した二次抗体と 5000 倍希釈した hoechst を含む溶液を細胞接着面に滴下し、室温で 1 時間、遮光して反応させた。PBS-T で 1 回、PBS で 3 回スライドガラスを洗浄した。その後、細胞接着部に fluoromount-G 20 μ L を滴下し、カバーガラスにて細胞接着部を封入し、オリンパス社製の蛍光顕微鏡 (IX71) を使用して、観察した。

3-2-10 細胞分画法

細胞の分画は、1-2-7 に示した手順と同様に行った。

3-2-11 ルシフェラーゼレポーター法による NF- κ B の転写活性化の解析

転写因子 NF- κ B が特異的に結合する DNA 配列とルシフェラーゼ遺伝子を接続したレポータープラスミド pGL4.32 (Promega 社から購入) を用いて、NF- κ B の転写活性化に対する DAT の影響を 2-2-4 と同様の手順で解析した。

3-2-12 免疫沈降法による相互作用解析

細胞を冷却した PBS で 2 回洗浄した後、IP buffer [10 mM NEM (N-ethylmaleimide)、100 μ M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)、10 μ M MG132、および 1 mM DTT を含む] で細胞を懸濁し、超音波破碎した。得られた細胞破碎液から 15000 rpm、4°C、10 分間遠心することで不溶性画分を除去し、上清を回収した。1 サンプルあたり、ビーズボリューム 10 μ L の Protein A/G PLUS-Agarose を IP buffer で洗浄した後、抗体 2.5 μ g を含む IP buffer 100 μ L を加え、4°C、1 時間震盪することで、抗体をビーズに結合させた。その後、IP buffer で調製した 5% skim milk 溶液 1 mL を加え、さらに 4°C で 1 時間震盪し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ビーズを 1 mL の IP buffer で 2 回再懸濁することで、抗体ビーズを調製した。なお、S-protein agarose beads、T7-Tag Antibody agarose、および Anti-FLAG M2 affinity gel を用いて免疫沈降する際は、ブロッキング操作からビーズを調製した。上述の細胞破碎液から得た上清と調製したビーズを混合し、4°C で 2 時間震盪した後、1 mL の IP buffer で 5 回洗浄することで、目的タンパク質を精製した。この精製サンプルを SDS-PAGE、ウェスタンブロット法を用いて解析した。また、I κ B α と TRAF6 の poly-Ub 化を解析する場合、非共有結合を介したタンパク質間の相互作用をなくすため、IP buffer の代わりに RIPA buffer (10 mM NEM、100 μ M PMSF、10 μ M MG132、および 1 mM DTT を含む) を用いて、免疫沈降実験を行った。

3-2-13 プロテアソーム活性の測定

プロテアソーム活性の測定には、26S プロテアソーム特異的切断配列と蛍光基質 MCA (4-methylcoumaryl-7-amide) を有す合成ペプチド (Suc leu-leu-val-tyr-MCA) を基質に用いた。プロテアソームによる基質切断に伴い遊離した MCA の蛍光強度を測定することで、プロテアソームの活性を解析する実験手法である。1 \times 10⁶ 個の細胞を 400 μ L の buffer A に懸濁し、27G の注射針を装着した 1 mL シリンジを用いて、細胞を破碎した。その後、15000 rpm、4°C、5 分間遠心して得られた上清中のプロテアソーム活性を測定した。上清 5 μ L と buffer B 95 μ L を混合し、5 分間、37°C で反応させた。反応後、反応停止液として 10% SDS 溶液 100 μ L を加え、プレートリーダーを用いてサンプルの蛍光強度 (励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm) を測定した。

3-2-14 TRAF6 のタンパク質安定性試験

リン酸カルシウム法を用いて ZS124 または ZS93 を遺伝子導入した HeLa 細胞および

HEK293/TLR4 細胞の培地中に、終濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ タンパク質合成阻害剤 cycloheximide、終濃度 20 μM DAT、終濃度 10 μM MG132 を添加し、0、1、3、6 時間後に細胞を継時回収した後、SDS-PAGE、ウェスタンブロット法にて目的タンパク質の安定性を評価した。

3-2-15 Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量

Real-time PCR 法を用いたウイルス量の定量は、1-2-10 に示した手順と同様に行った。

3-2-16 PEL 移植マウスの作製

本実験のプロトコルおよび実施は、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「動物実験に関する指針」に従って、実行した。5 週齢のメス CB17 SCID マウス (CLEA Japan から購入) に、25G 注射針を装着した 1 mL シリンジを用いて 5×10^7 個の BCBL1 細胞を腹腔内に移植した。移植一週間後から、corn oil で希釈した DAT を 5 mg/kg body weight となるように、21 日間、腹腔内に隔日投与した。なお、コントロールマウス群は、溶媒である corn oil 20 μL を同様に投与した。また、薬物投与前にマウス体重を測定した。

3-2-17 マウス組織からのゲノム DNA 抽出

PBS で洗浄したマウス脾臓を乾熱滅菌したステンレス製メッシュとスパーテルを用いて濾した後、1-2-2 項で示す方法と同様に、ゲノム DNA を精製した。また、腹水中腫瘍からのゲノム DNA 抽出は、以下の通りである。回収したマウス腹水を 3000 rpm、4°C、1 分間遠心して得られた沈殿物から、SepaGene (EIDIA 社) を用いて、添付の標準手順書に従って、ゲノム DNA を精製した。抽出した DNA 中の KSHV ゲノム DNA 量を 1-2-10 項で記す real-time PCR 法を用いて、定量した。

3-3 結果

3-3-1 DAT による PEL 細胞特異的な殺細胞効果

最初に、B 細胞性リンパ腫細胞株の増殖に対する、各ジアリルスルフィド化合物 (DAS、DAD、および DAT) の阻害効果を評価した。各リンパ腫細胞を種々の濃度のジアリルスルフィド化合物を含む培地中で培養し、24 時間後の生細胞数を測定した。その結果、50 μM の DAS および DAD で細胞を処理した時、ウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞に比べ、PEL (BC、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞の生存率は、およそ 60% まで減少した (Fig. 25A および B)。一方、20 μM の DAT はウイルス非感染細胞の増殖には影響を与えず、PEL 細胞の増殖を特異的に抑制した (Fig. 25C)。また、各リンパ腫の DAT の CC_{50} 値は、PEL 細胞が約 15 μM であったことに対し、ウイルス非感染リンパ腫株はその 3 倍の約 45 μM であった (Table 11)。

次に、PEL 細胞内のカスパーゼの活性に対する DAT の影響を解析した。PEL (BC3 および BCBL1) 細胞と Ramos 細胞の計 3 種のリンパ腫株を 20 μM DAT で最大 12 時間処理し、各カスパーゼの活性化型断片の誘導を、ウェスタンブロット法にて解析した。その結果、DAT 処理した PEL 細胞において、カスパーゼ-3、-7 および-9 の活性化型断片が検出され、PARP の切断も検出された (Fig. 26A)。DAT 処理した Ramos 細胞内では、上述の分子の切断断片は検出されなかった。また、カスパーゼの活性化に加え、DAT 処理時間に依存して、細胞周期調節因子である p21^{Cip1} の発現量の増加が検出された (Fig. 26B)。

一方、ウェスタンブロット解析では、DAT 処理した PEL 細胞において、カスパーゼ-8 の活性化断片の増加は観察されなかった。そこで、カスパーゼ-8 および-9 に関する詳細な知見を得るため、ウェスタンブロット法より検出感度が高い Caspase-Glo Assay を行った。カスパーゼ-8 および-9 の活性化はアポトーシス誘導の初期の段階で起こるので、DAT の処理条件はウェスタンブロットよりも低濃度かつ短時間に設定した。具体的に、10 μM DAT を含む培地中で、BC3 細胞を 3 時間培養し、各カスパーゼのプロテアーゼ活性を測定した。その結果、未処理時と比較して、DAT 処理した BC3 細胞内のカスパーゼ-9 のプロテアーゼ活性は約 1.6 倍まで上昇したことに対し、カスパーゼ-8 は約 1.2 倍であり、カスパーゼ-8 の有意な活性化は検出されなかった (Fig. 26C)。以上の結果から、DAT は細胞周期の停止とカスパーゼ-9 経路を介すアポトーシスを誘導し、PEL 細胞特異的な殺細胞効果を発揮することが明らかとなった。

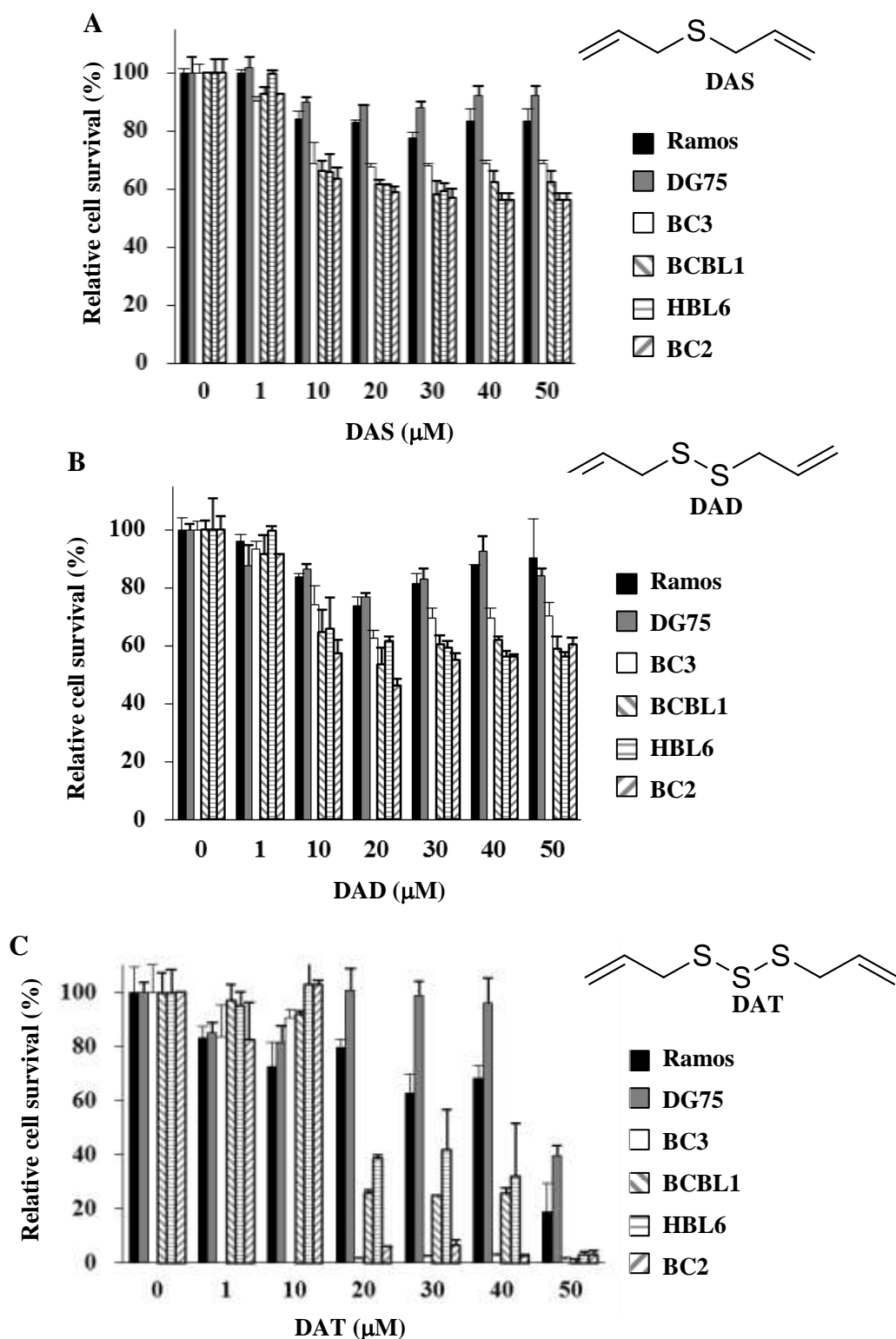


Fig. 25. PEL 細胞に対するジアリルスルフィド化合物の細胞毒性効果

図は参考文献 (76) の Fig. 1 を一部変更し、引用した。PEL (BC3、BCBL1、HBL6、および BC2) 細胞 とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞の計 6 種の細胞の培地に、種々の濃度の DAS (A)、DAD (B)、DAT (C) を添加して、24 時間後の生細胞数を測定した。各細胞の薬物未処理の時の生細胞数を 100% とする相対値を示した。測定標本数は 3 である。また、各グラフの上方に、各化合物の構造式を示した。

Table 11

B リンパ腫に対する DAT の細胞毒性効果

	BC3	BCBL1	HBL6	BC2	Ramos	DG75
CC ₅₀ (μM)	13.7 ± 0.8	15.4 ± 1.0	15.1 ± 0.6	14.6 ± 0.4	43.6 ± 1.4	47.9 ± 0.9

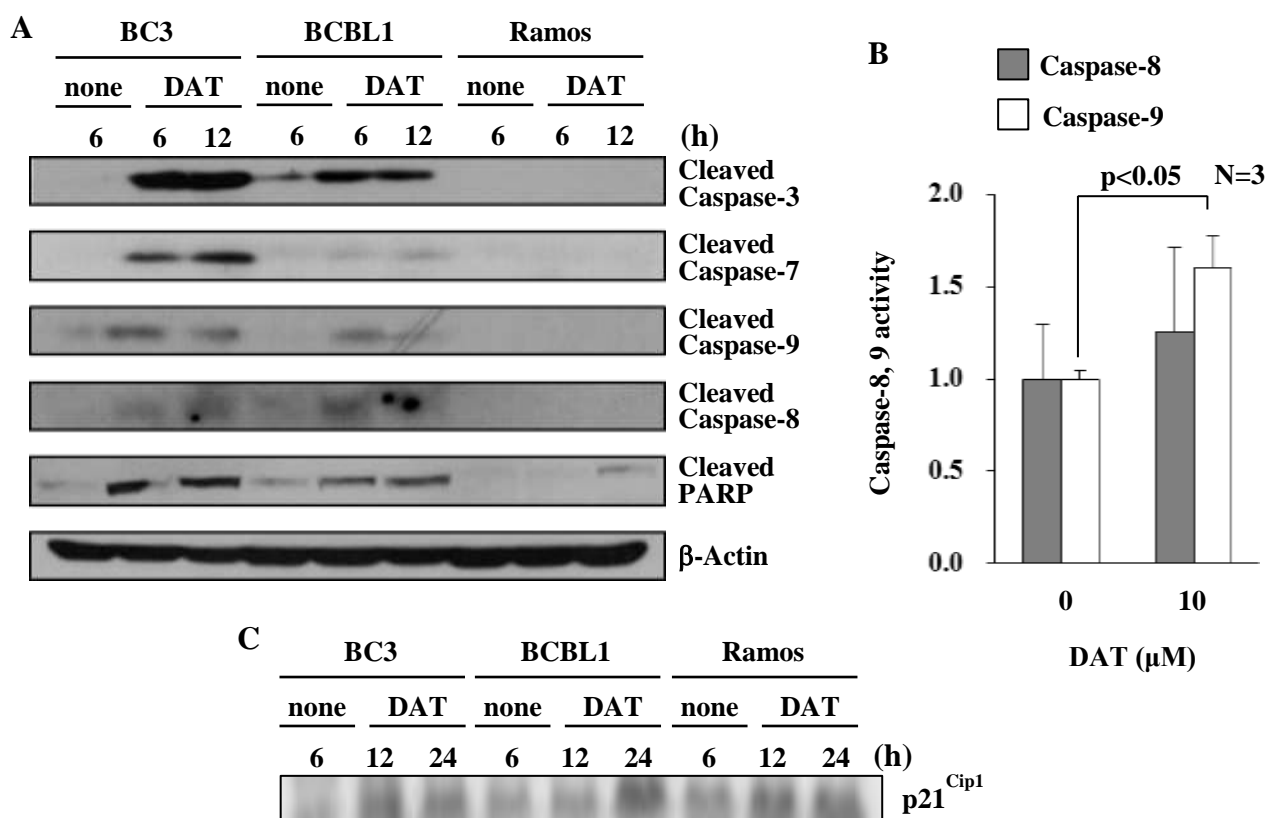


Fig. 26. DAT は PEL 細胞にアポトーシスを誘導する

- (A) 0 または 20 μM DAT で最大 12 時間処理した BC3、BCBL1、および Ramos 細胞内の各カスパーゼおよび PARP の切断を、ウェスタンブロット法にて解析した。図は、活性化型のカスパーゼ断片を示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 2A を一部変更し、引用した。
- (B) 0 または 10 μM DAT で 3 時間処理した BC3 細胞のカスパーゼ-8 および-9 の活性を、Caspase-Glo assay キットを用いて測定した。未処理の細胞の活性を 1.0 とした相対値で示している。図は、参考文献 (76) の Fig. 2B を一部変更し、引用した。
- (C) 0 または 10 μM DAT で最大 24 時間処理した BC3、BCBL1、および Ramos 細胞内の p21^{Cip1} 発現量をウェスタンブロット法で解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 2A を一部変更し、引用した。

3-3-2 DAT による UPR の活性化

次に、DAT が PEL 細胞特異的にアポトーシスを誘導する分子機構の解明を試みた。先行研究から、DAT は UPR を活性化し、がん細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている⁵⁹⁻⁶²⁾。それゆえ、UPR に対する DAT の影響を解析した。20 μ M DAT で、PEL (BC3 および HBL6) 細胞とウイルス非感染 (Ramos および DG75) 細胞を最大 12 時間処理し、Bip の発現をウェスタンブロット法で解析した。その結果、BC3 細胞において、DAT 処理依存的に Bip の発現が増加したが、他の細胞種では、DAT 処理依存的な Bip の発現誘導は検出されなかった (Fig. 27A)。

一方、アポトーシスを誘導する主な UPR 経路は、PERK と IRE1 α の 2 経路である。そのため、XBP1 のスプライシングや、CHOP および GADD34 の mRNA 発現に対する、DAT の影響を RT-PCR 法により解析した。20 μ M DAT で 6 時間細胞を処理した時、BC3 および DG75 細胞の両方において、CHOP および GADD34 の発現誘導と XBP1 のスプライシング (sXBP1) が観察された (Fig. 27B)。また、より定量性の高い real-time RT-PCR を用いて解析したが、BCBL1 および Ramos 細胞間で、DAT が誘導する CHOP の発現に大きな差異は認められなかった (Fig. 27C)。したがって、DAT はアポトーシス誘導分子 CHOP の転写を亢進するが、この UPR 活性化は、DAT の PEL 細胞特異的なアポトーシス誘導に寄与しないことが示唆された。そのため、既に報告のある PEL 細胞内の生存や細胞増殖に寄与するシグナル伝達に焦点をあて、解析を実行した。

3-3-3 DAT による NF- κ B シグナルの抑制

潜伏感染期の PEL 細胞内では、Erk、Akt、および NF- κ B シグナルが活性化しており、このことが PEL 細胞の生存や増殖に必須であることが知られている¹³⁻²⁰⁾。これらの知見から、DAT が上述のシグナル伝達を阻害することで、PEL 細胞にアポトーシスを誘導したと推論した。そこで、PEL (BC3、BCBL1、および HBL6) 細胞と Ramos 細胞を 10 μ M DAT で最大 24 時間処理し、Erk1/2、Akt、および I κ B α の発現やリン酸化 (活性化) に対する、DAT の影響を解析した。その結果、PEL 細胞において、DAT 処理時間依存的に NF- κ B シグナルの抑制因子 I κ B α の発現量が顕著に増加した (Fig. 28A)。PEL 細胞と比較して、DAT 処理した Ramos 細胞では、I κ B α の発現量増加は小さかった。また、real-time RT-PCR 法による解析の結果、DAT 処理による I κ B α mRNA 量の有意な変化は、BC3 および Ramos 細胞共に認められなかった (Fig. 28B)。これらの結果より、DAT は I κ B α をタンパク質レベルで安定化することが明らかとなった。

次に、DAT が NF- κ B シグナルの抑制因子 I κ B α を安定化したことから、転写因子 NF- κ B (p65) の細胞内局在と転写活性化に対する DAT の影響を免疫染色法、核分画法、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いて解析した。その結果、通常 BCBL1 細胞において、p65 は核内にドット状で観察されることに對し、DAT 処理した BCBL1 細胞内では p65 は核周辺の細胞質に局在していることが明らかとなった (Fig. 28C)。次に、細胞を分画し、p65 の核内発現量をウェスタンブロット法で解析した。その結果、Ramos 細胞と比較して、DAT 処理した BC3 および BCBL1 細胞において、p65 の核内発現量は大きく減少した (Fig. 28D)。また、同条件の

DAT 処理は、BC3、BCBL1 および Ramos 細胞全体 (total cell lysate; TCL) における p65 の発現量に影響を及ぼさなかった。さらに、転写因子 NF- κ B 特異的レポータープラスミドを用いた解析の結果、BC3 細胞において、DAT 処理濃度依存的にレポーター活性、すなわち NF- κ B の転写活性化が抑制された (Fig. 28E)。一方、Erk1/2 と Akt のリン酸化と発現に対する DAT の影響は、検出されなかった (Fig. 36A)。

これらの結果より、DAT は抑制因子 I κ B α の安定化を介して NF- κ B シグナルを阻害することが明らかとなった。次に、DAT による I κ B α 安定化機構の細胞内分子メカニズムを解析した。

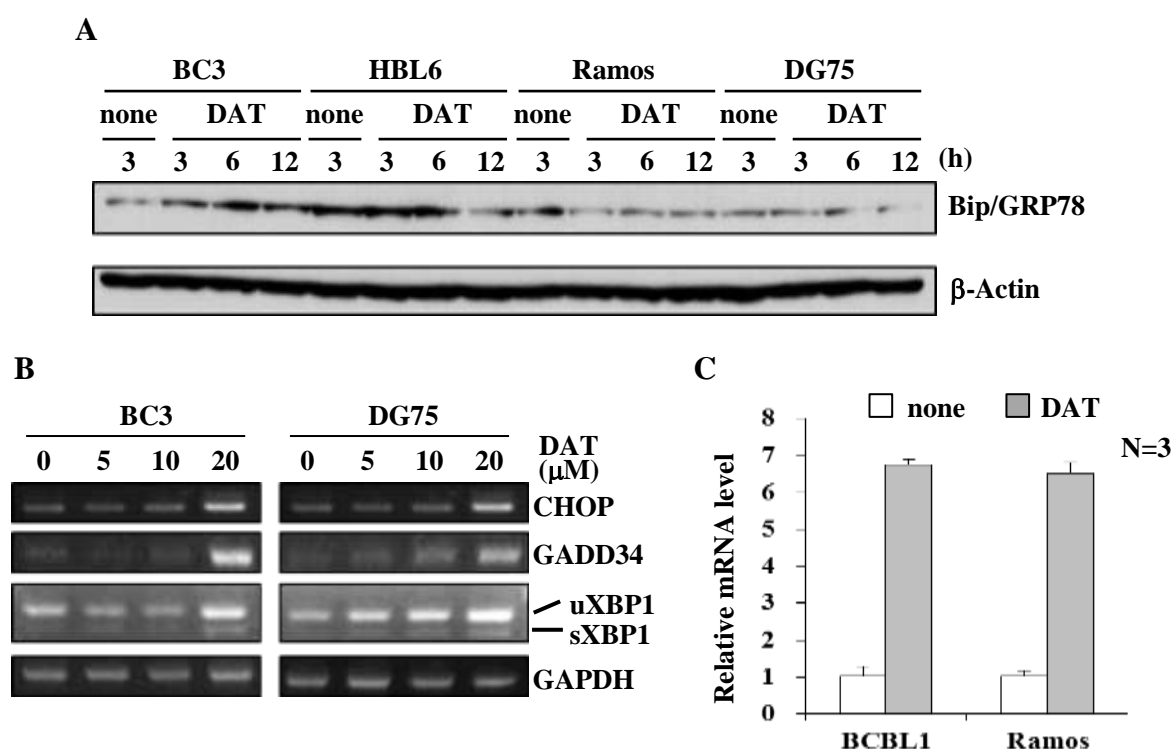


Fig. 27. DAT は UPR を活性化する

- (A) 0 または 20 μ M DAT で最大 12 時間処理した BC3、HBL6、Ramos、および DG75 細胞内の Bip の発現をウェスタンブロット法で解析した。
- (B) 最大 20 μ M DAT で 6 時間処理した BC3 および DG75 細胞における、CHOP、GADD34、および XBP1 の mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて解析した。
- (C) 0 または 20 μ M DAT で 6 時間処理した BC3 および Ramos 細胞における、CHOP の mRNA 量を解析した。各細胞の未処理時の mRNA 量を 1.0 とした相対値を示した。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。

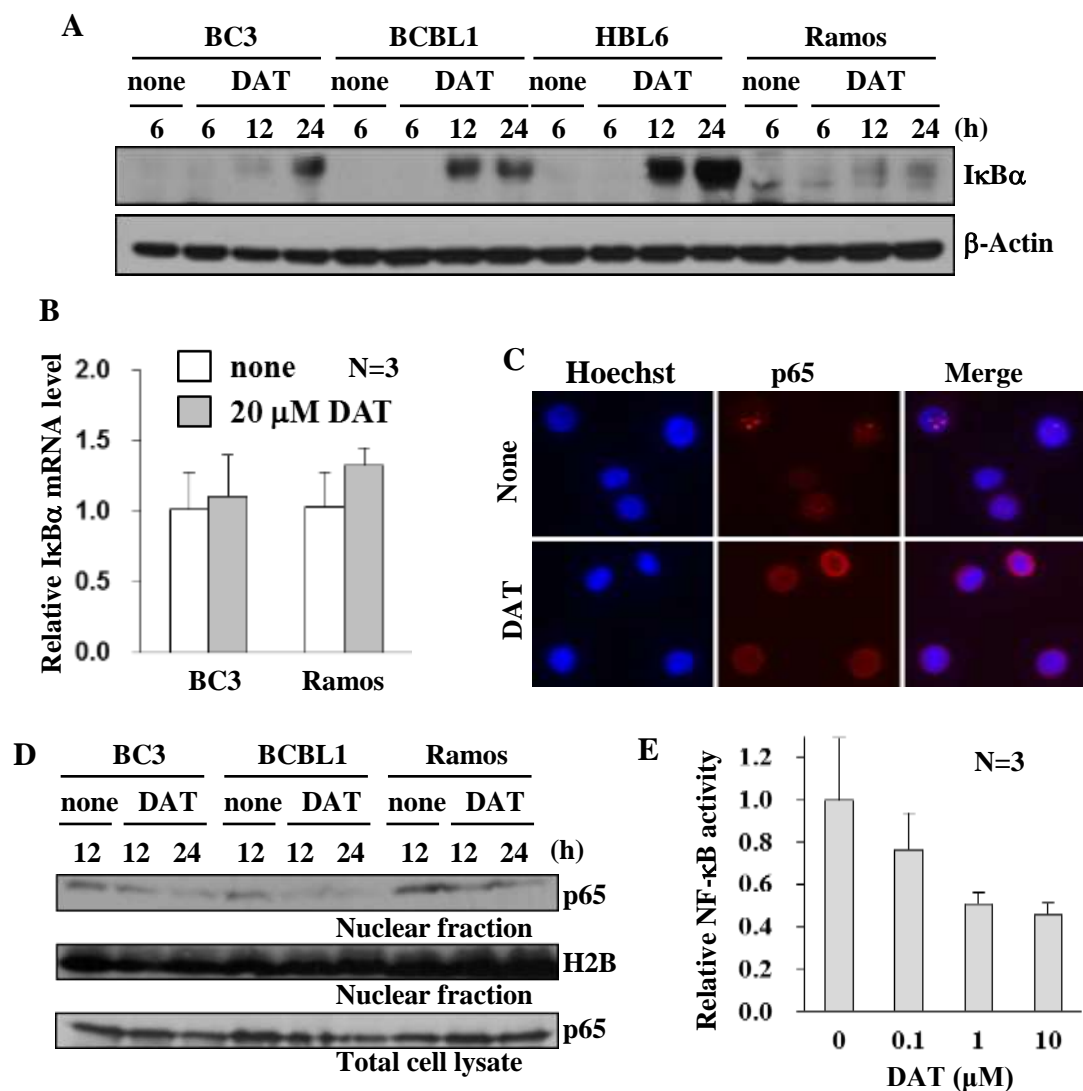


Fig. 28. DAT は NF-κB シグナルを阻害する

- (A) 0 または 10 μM DAT で最大 24 時間処理した BC3、BCBL1、HBL6、および Ramos 細胞における IκBα 発現量をウェスタンブロット法で解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 3A を一部変更し、引用した。
- (B) 0 または 20 μM DAT で 6 時間処理した BC3 および Ramos 細胞内の IκBα mRNA 量を定量した。未処理の時の mRNA 量を 1.0 とした相対値を示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 3B を一部変更し、引用した。
- (C) 0 または 10 μM DAT で 18 時間処理した BCBL1 細胞内の p65 の局在を免疫染色法にて解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 3C を一部変更し、引用した。
- (D) 0 または 10 μM DAT で最大 24 時間処理した BC3、BCBL1、および Ramos 細胞における p65 の核内発現量をウェスタンブロット法で解析した。図中の H2B は、ヒストン H2B である。図は、参考文献 (76) の Fig. 3D を一部変更し、引用した。
- (E) 最大 10 μM DAT で 6 時間処理した BCBL1 細胞における、NF-κB の転写活性をルシフェラーゼレポーター法で解析した。未処理の時の活性を 1.0 とした相対値を示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 3E を一部変更し、引用した。

3-3-4 DAT による I κ B α 安定化機構

I κ B α は、IKK 複合体によるリン酸化、Ub E3 ライゲースによる poly-Ub 化、そしてプロテアソームによる分解の 3 つの逐次段階によって、量的制御を受ける。DAT がこれらの逐次段階のどの段階に影響するかを解析した。最初に、I κ B α の poly-Ub 化に対する DAT の影響を、免疫沈降法を用いて解析した。DAT 処理、未処理の細胞の抽出液を用いて、抗 I κ B α 抗体を用いて免疫沈降した。その結果、未処理時と比較して、DAT 処理した BC3 および BCBL1 細胞の抽出液から沈降された I κ B α のタンパク質量は増加したため、I κ B α の poly-Ub 鎖を正確に評価できなかった (Fig. 29A)。そのため、DAT 処理後、細胞回収 6 時間前にプロテアソーム阻害剤 MG132 を培地に添加し、免疫沈降実験を行うことで、DAT の有無による I κ B α の沈降量差を解消した。なお、PEL 細胞に対して MG132 は高い細胞毒性を示すことが報告されている¹⁸⁾。そのため、BC3 細胞の増殖を抑制しないことを意図して、MG132 の濃度および処理時間を設定した (data not shown)。そして、FK-2 抗体 (poly-Ub 鎖認識抗体) を用いてウェスタンブロット解析を行い、I κ B α の poly-Ub 鎖量を、DAT 処理の有無で比較した。その結果、DAT 処理に依存した poly-Ub 鎖の顕著な量的変化は、検出できなかった (Fig. 29B)。

次に、プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する DAT の影響を解析した。その結果、未処理の細胞と比較して、DAT 処理した細胞において、プロテアソームの活性は約 20% 減少したが、MG132 処理時と比較すると、その減少程度は小さかった (Fig. 29C)。

最後に、I κ B α の S32 および S36 のリン酸化に対する DAT の影響をウェスタンブロットにより解析した。その結果、10 μ M DAT で 24 時間処理した BC3 細胞において、リン酸化 I κ B α (図中 p-I κ B α) が減少した (Fig. 29D)。また、IKK 複合体の特異的阻害剤 bay11-7082 で処理した BC3 細胞において、p-I κ B α が減少した (Fig. 29D)。さらに、PEL 細胞の増殖に対する、bay11-7082 の阻害効果を評価した結果、2 μ M の bay11-7082 は、ウイルス非感染 (BJAB) 細胞と比較して、BC3 細胞の増殖を強く阻害した (Fig. 29E)。

これらの結果より、DAT は I κ B α のリン酸化阻害を介して I κ B α を安定化することが明らかとなった。

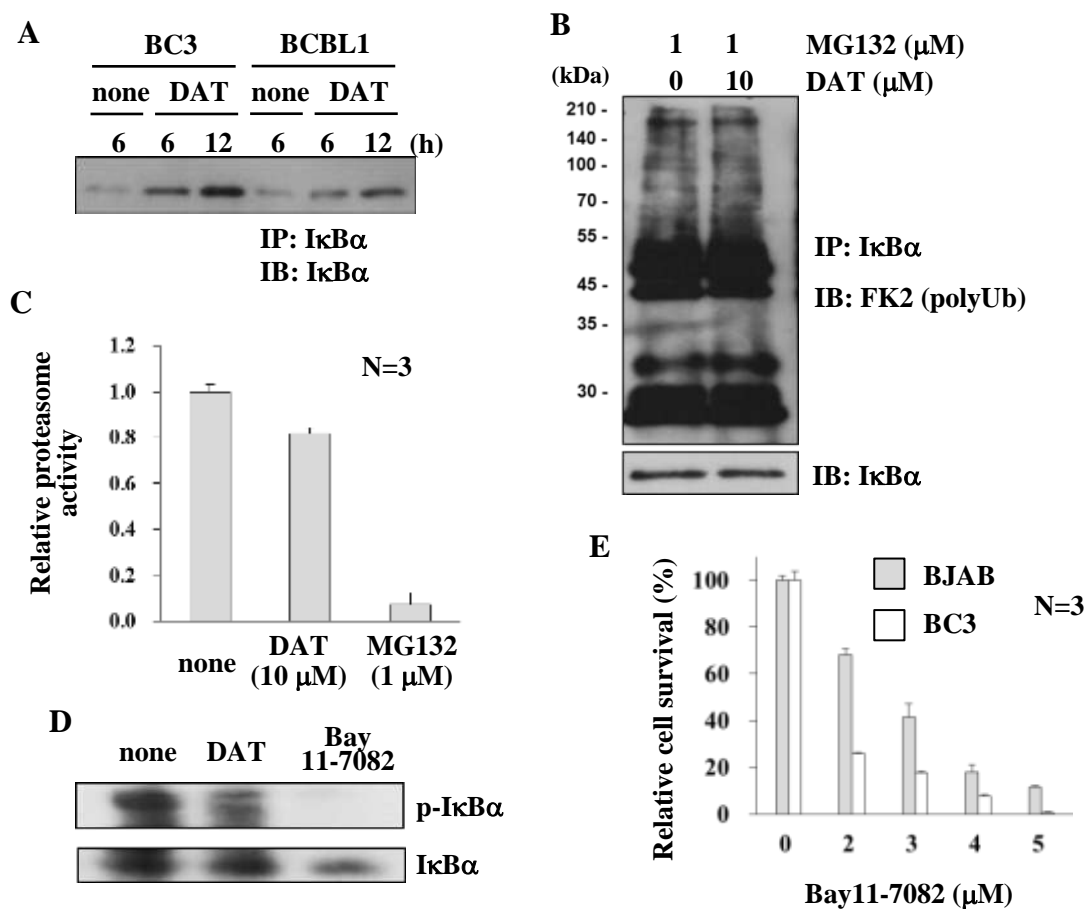


Fig. 29. DAT は IκBα のリン酸化を阻害する

- (A) 0 または 10 μM DAT で最大 12 時間処理した BC3 および BCBL1 細胞の抽出液を用いて、抗 IκBα 抗体で免疫沈降し、IκBα 抗体でウェスタンブロットを行った。図は、参考文献 (76) の Fig. 3E を一部変更し、引用した。
- (B) 0 または 10 μM DAT で 18 時間 BC3 細胞を処理した後、培地に 1 μM MG132 を添加し、更に 6 時間細胞を培養した。培養した細胞の抽出液を用いて、抗 IκBα 抗体で免疫沈降し、FK-2 抗体と抗 IκBα 抗体でウェスタンブロットを行った。図は、参考文献 (76) の Fig. 4A を一部変更し、引用した。
- (C) 0 または 10 μM DAT、および 1 μM MG132 で 24 時間処理した BC3 細胞内のプロテアソーム活性を測定した。未処理の時の活性を 100% とした相対値を示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 4B を一部変更し、引用した。
- (D) 0 または 10 μM DAT、0.2 μM bay11-7082 で 24 時間処理した BC3 細胞内のリン酸化 IκBα の発現量をウェスタンブロット法で解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 4C を一部変更し、引用した。
- (E) Bay11-7082 の細胞毒性を解析した。種々の濃度の bay11-7082 で、BC3 および BJAB 細胞を処理し、24 時間後の生細胞数を測定した。薬物未処理の時の生細胞数を 100% とする相対値を示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 4D を一部変更し、引用した。

3-3-5 DAT による IKK β リン酸化の阻害

DAT が IkB α のリン酸化を阻害することが明らかとなったので、IkB α をリン酸化するIKK複合体の構成分子 (IKK α 、IKK β 、および IKK γ) の発現、IKK 複合体の形成、IKK α および IKK β のリン酸化に対する DAT の影響を解析した。最初に、IKK α 、IKK β 、および IKK γ の発現に対する、DAT の影響を RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、BC3 および Ramos 細胞において、これら分子の mRNA 量に対する DAT の影響は観察されなかった (Fig. 30A)。また、IKK α 、IKK β 、および IKK γ の発現量に対する DAT の影響をウェスタンブロット法により解析したが、PEL 細胞内ではこれら分子の発現を検出できなかった (data not shown)。そのため、過剰発現系を用いて解析を行った。なお、B 細胞である PEL 細胞は遺伝子導入効率が低く、実験の安定性に欠けるため、接着 (HeLa または 293/TLR4) 細胞を用いて解析を進めた。

HeLa 細胞に異なる tag を付加した IKK α 、IKK β 、および IKK γ を遺伝子導入し、S-tag beads を用いて IKK γ を免疫沈降した後、各 tag 抗体を用いてウェスタンブロット解析することで、IKK の複合体形成に対する DAT の影響を評価した。しかし、DAT 処理の有無に関係なく、各 IKK 分子の沈降量における変化は検出できなかった (Fig. 30B)。次に、IKK 複合体の活性化に寄与する IKK α および IKK β のリン酸化に対する、DAT の影響を解析した。IKK α または IKK β を遺伝子導入した 293/TLR4 細胞を DAT と LPS (lipopolysaccharide) で処理し、抗リン酸化 IKK α/β 抗体でウェスタンブロットを行い、検出されたリン酸化 IKK α または IKK β を各条件間で比較した。また、IKK のリン酸化に対する DAT の影響をより検出しやすくすることを意図して、細胞種には 293/TLR4 細胞を用い、IKK のリン酸化の活性化因子 LPS 処理を行った。その結果、IKK β を遺伝子導入した 293/TLR4 細胞において、DAT 処理によりリン酸化 IKK β (図中 p-T7-IKK β) が減少した (Fig. 30D)。一方、IKK α を遺伝子導入した 293/TLR4 細胞では、元々 (未処理時) のリン酸化量 (図中 p-Flag-IKK α) が低く、DAT 処理による IKK α のリン酸化阻害は観察されなかった (Fig. 30C)。これらの結果から、DAT が IKK β のリン酸化を阻害することが明らかとなった。

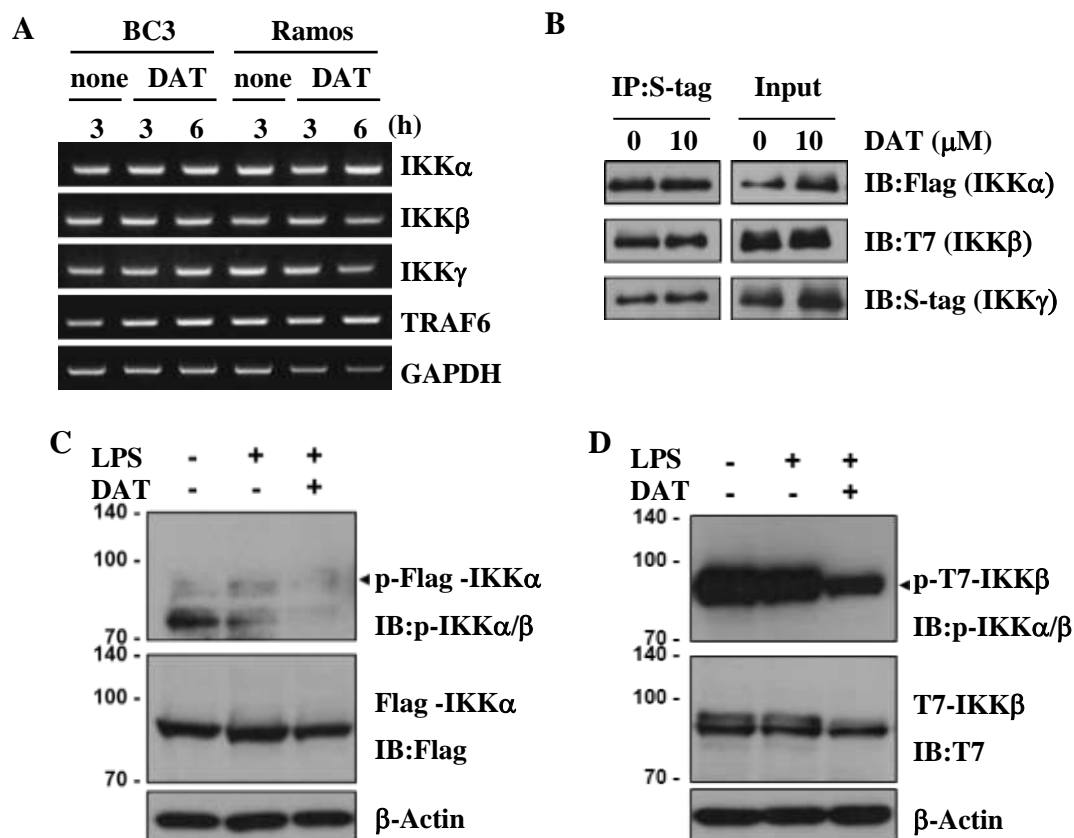


Fig. 30. DAT は IKKβ のリン酸化を阻害する

- (A) 0 または 20 μM DAT で最大 6 時間処理した BC3 および Ramos 細胞における IKKα、IKKβ、IKKγ、および TRAF6 の mRNA 量を RT-PCR 法にて解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 5A を一部変更し、引用した。
- (B) Flag-IKKα、T7-IKKβ、および S-IKKγ を遺伝子導入した HeLa 細胞を 0 または 10 μM DAT で 24 時間処理した。この細胞の抽出液を、S-protein beads を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロットすることで、IKK 複合体の多量体形成を解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 5B を一部変更し、引用した。
- (C) Flag-IKKα を遺伝子導入した 293/TLR4 細胞を 20 μM DAT、40 ng/mL LPS で 6 時間処理し、ウェスタンブロット法にて IKKα のリン酸化を解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 5C を一部変更し、引用した。
- (D) T7-IKKβ を遺伝子導入した 293/TLR4 細胞を 20 μM DAT、40 ng/mL LPS で 6 時間処理し、ウェスタンブロット法にて IKKβ のリン酸化を解析した。図は、参考文献 (75) の Fig. 5D を一部変更し、引用した。

3-3-6 DAT によるプロテアソーム依存的な TRAF6 の不安定化

NF- κ B シグナルにおいて、IKK リン酸化から上流の分子機構は完全に解明されていないが、TRAF6 と IKK γ の poly-Ub 鎖に引き寄せられ、活性化した TAB2-TAK1 複合体が IKK をリン酸化するモデルが提唱されている。そこで、IKK γ の poly-Ub 化や TAB2-TAK1 の複合体形成に対する DAT の影響を解析したが、これらに対して DAT は影響を及ぼさなかった (Fig. 36B および C)。次に、TRAF6 の poly-Ub 化に対する影響を解析するため、T7-TRAF6 を遺伝子導入した HeLa 細胞を DAT で処理し、T7-tag にて免疫沈降した。その結果、DAT 処理した細胞では、TRAF6 の免疫沈降量と発現量が大きく減少した (Fig. 31A)。また、TRAF6 の沈降量を各サンプル間で同じになるよう希釈して、TRAF6 の poly-Ub 化を解析したが、DAT 処理による顕著な影響は検出されなかった (Fig. 31B)。この結果に加え、DAT が TRAF6 の mRNA 量に影響しなかったことから (Fig. 31A)、TRAF6 の翻訳阻害、またはタンパク質の不安定化を DAT が引き起こす可能性が推察された。そこで、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide を用いて、DAT が TRAF6 を不安定化するか否かを解析した。TRAF6 を遺伝子導入した HeLa 細胞と 293/TLR4 細胞を DAT で 3 時間処理した時、未処理の細胞と比較して、DAT 処理した細胞では顕著に TRAF6 のタンパク質量が減少し、さらにこの減少はプロテアソーム特異的阻害剤 MG132 共処理により減弱した (Fig. 31C)。また、BCBL1 細胞においても、DAT により TRAF6 が不安定化され、その不安定化は MG132 共処理によって減弱した (Fig. 31D)。これらの結果から、DAT がプロテアソーム依存的に TRAF6 を不安定化することが明らかとなった。

TRAF6 の poly-Ub 化量に対する DAT の影響は検出されなかった (Fig. 31B)。この原因として、分解シグナルである K48 鎖 poly-Ub 化された TRAF6 が、プロテアソームにより速やかに分解されることが考えられた。そのため、TRAF6 と野生型 Ub (WT-Ub) を遺伝子導入した細胞を DAT と MG132 で共処理した後、免疫沈降法を用いて解析した。その結果、TRAF6 の poly-Ub 鎖量が、DAT 処理により顕著に増加した (Fig. 32A)。また、増加した poly-Ub 鎖が分解シグナルである K48 鎖と活性制御シグナルである K63 鎖のどちらに起因するか明らかにするため、WT-Ub の代わりに K48-Ub または K63-Ub をそれぞれ TRAF6 と一緒に遺伝子導入し、同様の解析を行った。しかしながら、K48-Ub と K63-Ub の両方において、TRAF6 は poly-Ub 化されたが、DAT 処理の有無によって poly-Ub 化量は有意に変化しなかった (Fig. 32A)。一方、TRAF6 の自己 poly-Ub 化活性に必須である C70 を A に置換した変異体タンパク質 ZS93 (C70A-TRAF6) の安定性を評価した結果⁷⁾、ZS93 は DAT 処理により不安定化しなかった (Fig. 32B)。さらに、DAT 未処理時、野生型の TRAF6 (ZS124) のタンパク質量は 6 時間で顕著に減少したが (Fig. 31C)、ZS93 のタンパク質量は減少しなかった (Fig. 32B)。

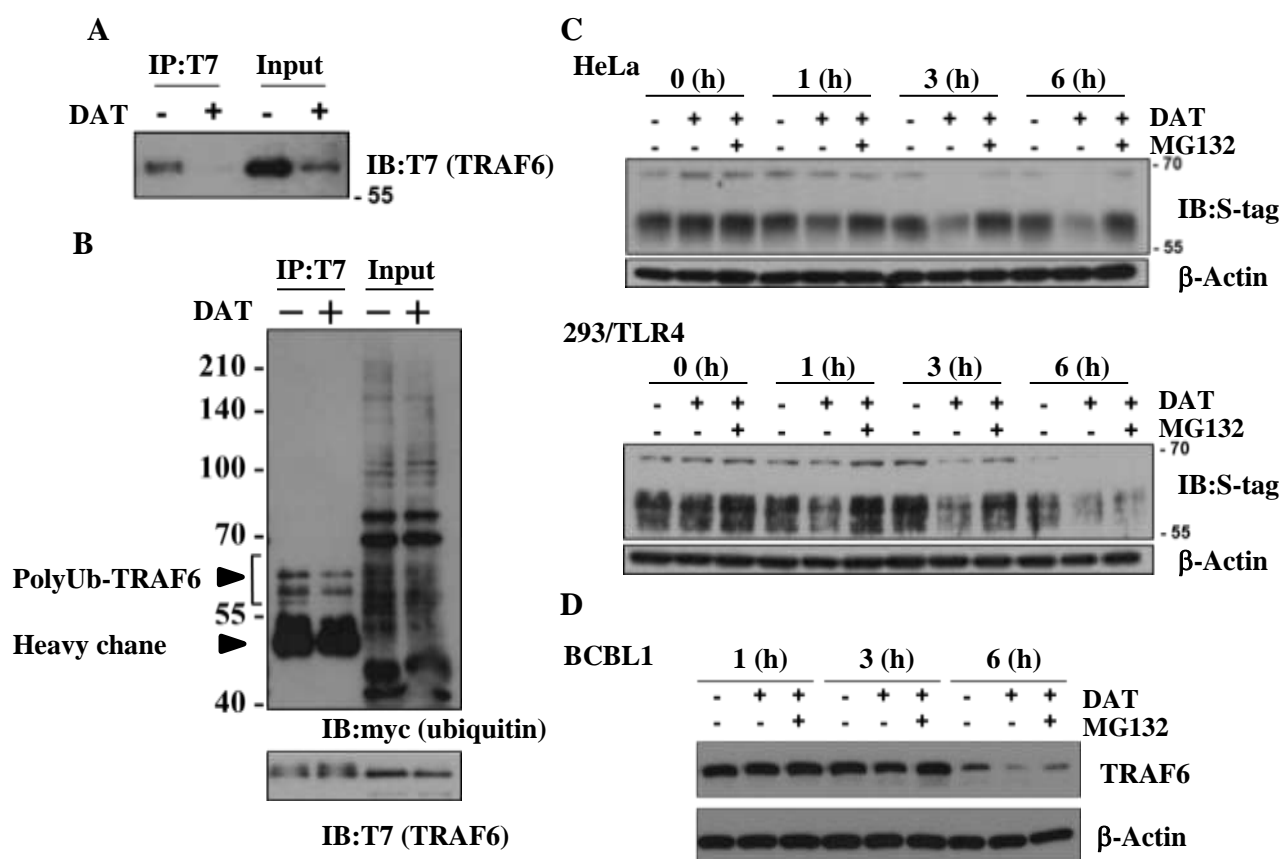


Fig. 31. DAT は TRAF6 を不安定化する

- (A) T7-TRAF6 を遺伝子導入した HeLa 細胞を 20 μ M DAT で 12 時間処理した後、T7-tag affinity beads を用いて免疫沈降し、抗 T7 抗体でウェスタンブロット解析を行った。図は、参考文献 (76) の Fig. 5E を一部変更し、引用した。
- (B) T7-TRAF6 と myc-Ub を遺伝子導入した HeLa 細胞を 20 μ M DAT で 12 時間処理した後、T7-tag affinity beads を用いて免疫沈降した。抗 myc 抗体を用いて、ウェスタンブロットすることで、TRAF6 の poly-Ub 化を解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 5E を一部変更し、引用した。
- (C) ZS124 (S-TRAF6) を遺伝子導入した HeLa 細胞 (上図)と 293/TLR4 細胞 (下図) を終濃度 25 μ g/mL cycloheximide を含む培地中で、20 μ M DAT、10 μ M MG132 で最大 6 時間処理した。抗 S-tag 抗体でウェスタンブロットを行うことで、TRAF6 の安定性を解析した。図は、参考文献 (76) の Fig. 5F を一部変更し、引用した。
- (D) 終濃度 25 μ g/mL cycloheximide を含む培地中で、BCBL1 細胞を 20 μ M DAT、10 μ M MG132 で最大 6 時間処理し、抗 TRAF6 抗体でウェスタンブロットを行った。

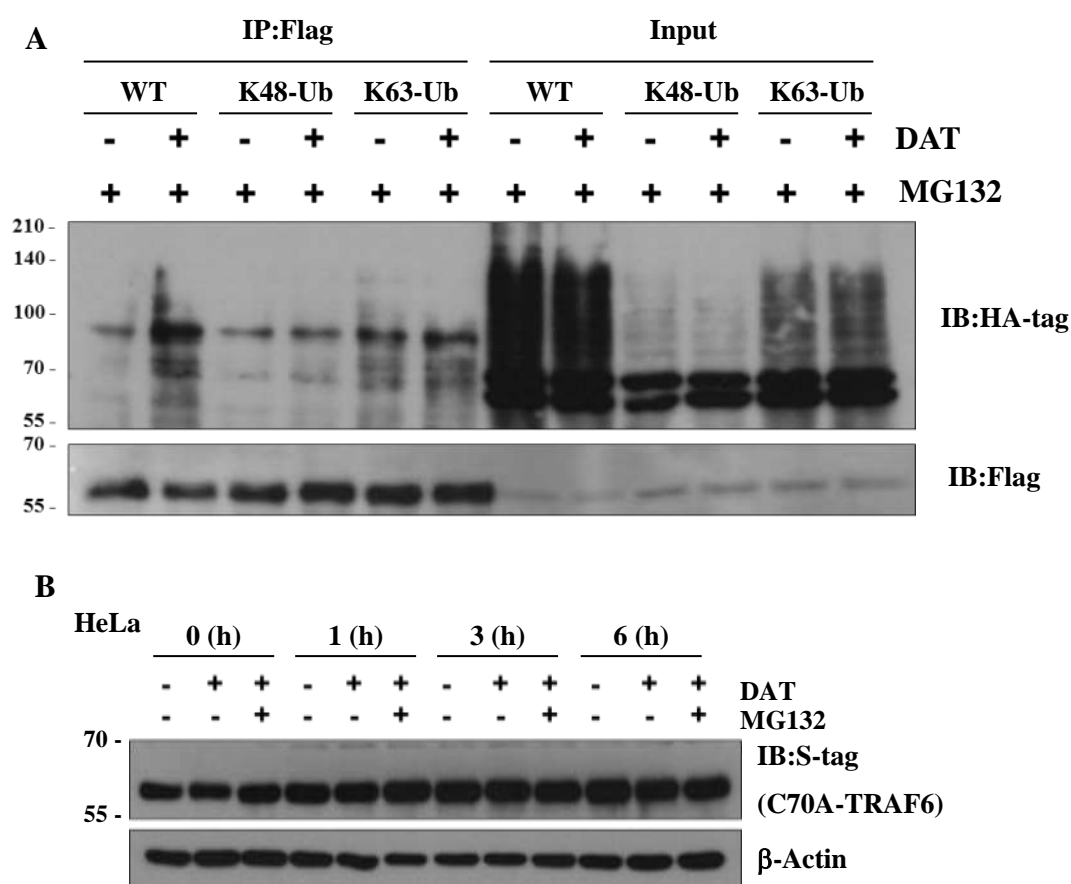


Fig. 32. DAT は TRAF6 の poly-Ub 化を亢進する

- (A) HA-WT-Ub、HA-K48-Ub、または HA-K63-Ub と Flag-TRAF6 を遺伝子導入した HeLa 細胞を 20 μ M DAT で 3 時間処理した後、Flag-tag affinity beads を用いて免疫沈降した。抗 HA 抗体を用いて、ウェスタンブロットすることで、TRAF6 の poly-Ub 化を解析した。
- (B) ZS93 (C70A-TRAF6) を遺伝子導入した HeLa 細胞を終濃度 25 μ g/mL cycloheximide を含む培地中で、20 μ M DAT、10 μ M MG132 で最大 6 時間処理した。抗 S-tag 抗体でウェスタンブロットを行うことで、TRAF6 変異体タンパク質の安定性を解析した。

3-3-7 溶解感染期の PEL 細胞におけるウイルス粒子産生に対する DAT の影響

先行研究から、KSHV の溶解感染移行やウイルス産生に NF- κ B シグナルが寄与することが知られている^{17, 18)}。そこで、KSHV のウイルス産生を阻害することが報告されている HSP90 (heat shock protein 90) 阻害剤 GA (geldanamycin) をコントロールに用いて¹⁷⁾、ウイルス産生に対する DAT の影響を解析した。なお、PEL 細胞の増殖に影響しないことを意図して、解析に使用した DAT の濃度は 1 μ M に設定し、解析を行った (Fig. 25C)。その結果、1 μ M DAT と SB を用いて BCBL1 細胞を共処理した時、コントロール (3 mM SB 単独処理) と比較して、培地中に産生されたウイルス DNA 量は約 80%減少し、その減少効果は GA と SB を用いて共処理した時とほぼ同等であった (Fig. 33A)。さらに、溶解感染遺伝子 RTA と K8.1 の mRNA 量に対する DAT の影響を解析した結果、DAT は SB が誘導する RTA と K8.1 の mRNA 発現を阻害した (Fig. 33B)。これらの結果から、DAT は KSHV のウイルス産生を阻害することが明らかとなった。

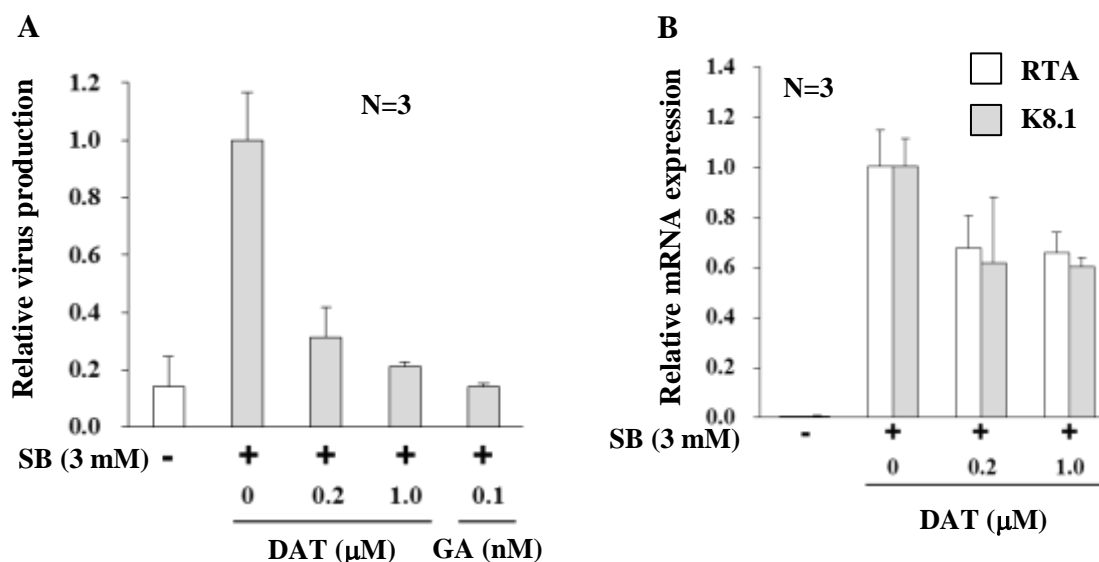


Fig. 33. DAT は KSHV のウイルス産生を阻害する

(A) 3 mM SB を含む培地中で、BCBL1 細胞を 0-1 μ M DAT または 0.1 nM GA で 48 時間処理した。培地中に産生された KSHV ゲノム DNA を定量した。3 mM SB で処理した時のウイルス産生量を 1.0 とした相対値を、図に示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 6A を一部変更し、引用した。

(B) 3 mM SB を含む培地で、BCBL1 を 0-1 μ M DAT で 48 時間処理し、溶解感染遺伝子 RTA と K8.1 の発現量を解析した。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。3 mM SB で処理した時の各遺伝子発現量を 1.0 とした相対値を、図に示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 6B を一部変更し、引用した。

3-3-8 PEL 移植マウスにおける DAT の抗 PEL 活性

動物モデルにおける DAT の抗 PEL 活性 (PEL や PEL 移植に伴う腫瘍の増殖を阻害すること) を評価した。PEL を SCID マウスの腹腔内に移植し、溶媒である corn oil を 21 日間投与したコントロールマウス群では、腹水蓄積に伴う腹部の膨大と体重増加、脾臓の肥大が観察され、以前の報告と一致する PEL 移植マウスを作製した (Figs. 34A-C、35A および B)⁷⁸⁻⁸⁰⁾。コントロールマウス群では体重増加が約 4 g、脾臓重量が約 0.13 g、腹水中腫瘍重量が約 0.4 g であるのに対し、DAT 投与マウス群では体重増加が約 1.5 g、脾臓重量が約 0.07 g、腹水中腫瘍重量が約 0.05 g であった (Figs. 34B、35A および B)。コントロールマウス群と比較して、DAT 投与マウス群では、腹部の膨大と体重増加、脾臓の肥大、腹水中の腫瘍重量が有意に減少した。なお、PEL を移植していない 6-7 週齢の通常 SCID マウス群の脾臓重量は、0.06 g (data not shown) であった。また、摘出した脾臓以外の臓器 (肝臓、腎臓、心臓、肺) を各マウス群間で剖検した結果、その外観にコントロールマウス群と DAT 投与マウス群間で差はなかった (Fig. 34C)。一方、real-time PCR と免疫染色法の解析結果により、腹水中の腫瘍から KSHV ゲノム DNA と KSHV タンパク質 LANA が検出され、脾臓からも KSHV ゲノム DNA が検出された (Fig. 35C-E)。さらに、腹水中の腫瘍および脾臓重量の結果と比例して、コントロールマウス群に比べ、DAT 投与マウス群では、腹水中の腫瘍と脾臓内の KSHV ゲノム DNA 量が大きく減少した (Fig. 35C および D)。これらの結果から、DAT は生体に毒性を発揮しない投与量で、動物モデルにおいても抗 PEL 活性を示すと考えられる。

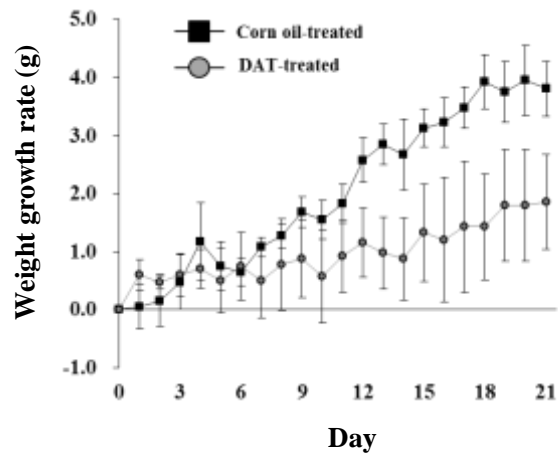
A



DAT-untreated
(Corn oil-treated)

DAT-treated

B



C

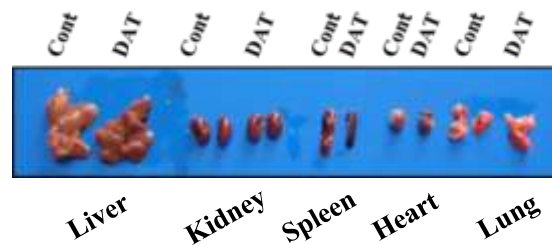


Fig. 34. PEL 移植マウスの体重増加と増加に対する DAT の影響

- (A) DAT 投与開始 21 日後のマウス外観写真。(左) コントロールマウス (corn oil 投与)、(右) DAT 投与マウス。図は、参考文献 (76) の Fig. 7A を一部変更し、引用した。
- (B) DAT 投与開始日を 0 日として、隔日でマウスの体重を測定した。各群マウス 4 匹の 0 日からの体重増減の平均値と標準偏差を示した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7B を一部変更し、引用した。
- (C) DAT 投与開始 21 日後に摘出したマウス臓器の外観写真。左から順に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺であり、各臓器の左側にコントロールマウス、右側に DAT 投与マウスの臓器を並べ、写真を撮影した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7C を一部変更し、引用した。

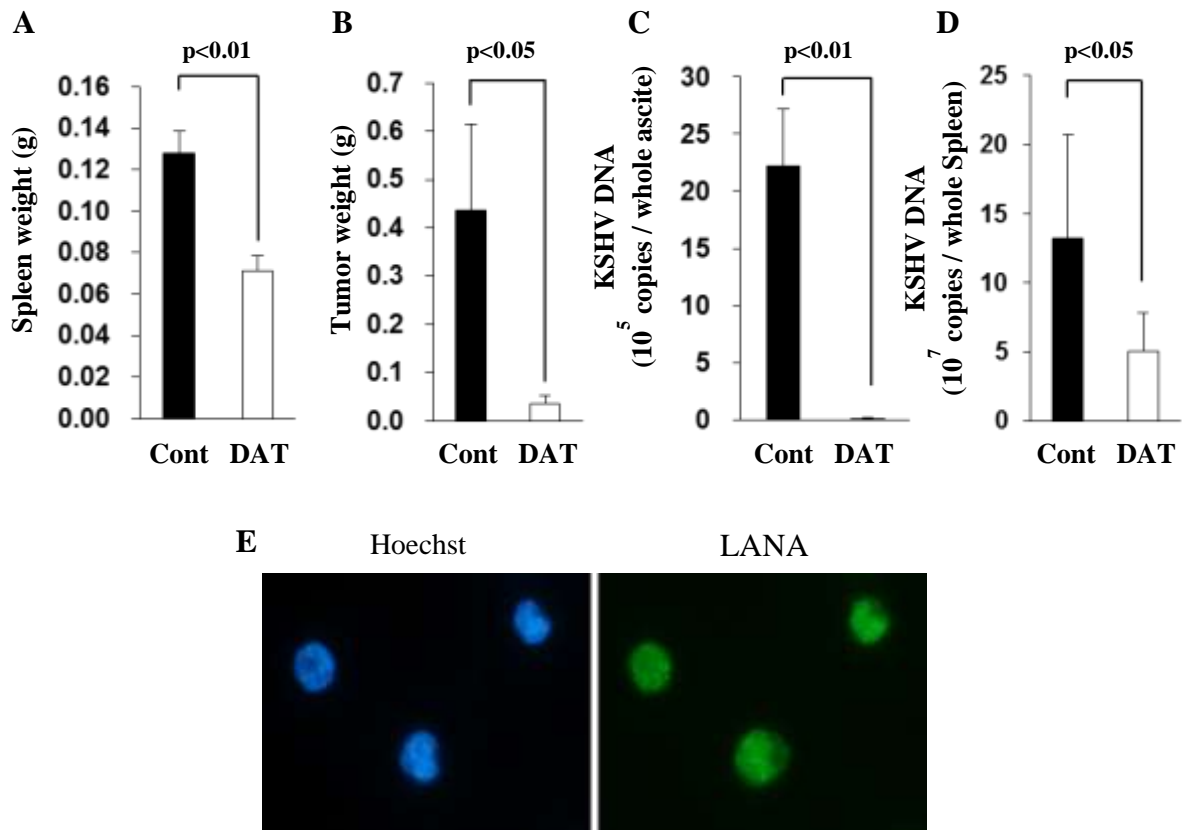


Fig. 35. PEL 移植マウスの腫瘍、脾臓に対する DAT の影響

- (A) DAT 投与開始 21 日後に摘出したマウス脾臓の重量を測定した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7D を一部変更し、引用した。
- (B) DAT 投与開始 21 日後に採取したマウス腹水中の腫瘍重量を測定した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7E を一部変更し、引用した。
- (C) マウス腹水由来腫瘍から抽出したゲノム DNA に含まれる KSHV ゲノム DNA を、real-time PCR 法で定量した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7F を一部変更し、引用した。
- (D) マウス脾臓から抽出したゲノム DNA に含まれる KSHV ゲノム DNA を、real-time PCR 法で定量した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7G を一部変更し、引用した。
- (E) マウス腹水由来腫瘍を、抗 LANA 抗体で免疫染色した。図は、参考文献 (76) の Fig. 7H を一部変更し、引用した。

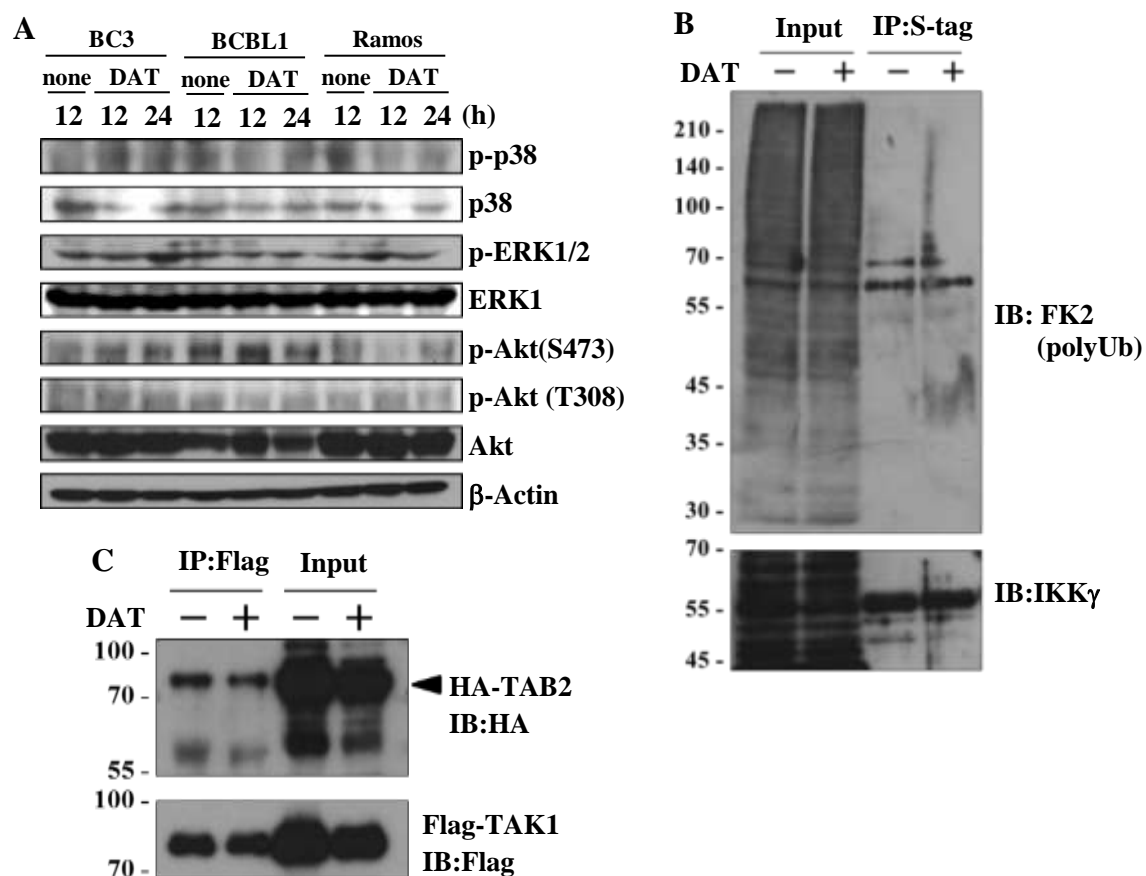


Fig. 36. DAT の各種シグナル伝達に対する DAT の影響

- (A) 0 または 10 μ M DAT で最大 24 時間処理した BC3、BCBL1、および Ramos 細胞内の p38、Akt、および Erk1/2 のリン酸化に対する DAT の影響をウェスタンブロット法にて解析した。
- (B) S-IKK γ を遺伝子導入した HeLa 細胞を 0 または 10 μ M DAT で 24 時間処理した後、S-protein beads を用いて免疫沈降し、FK-2 抗体でウェスタンブロットすることにより、IKK γ の poly-Ub 化を解析した。
- (C) HA-TAB2 と Flag-TAK1 を遺伝子導入した HeLa 細胞を 0 または 10 μ M DAT で 24 時間処理し、Flag-tag affinity beads を用いて免疫沈降した後、ウェスタンブロット法にて解析した。

3-4 考察

本研究では、3種のジアリルスルフィド化合物がBリンパ腫の細胞増殖を抑制し、DATのみ低濃度でPEL細胞特異的な増殖抑制効果を示すことを明らかにした (Fig. 25)。先行研究において、グリオブラストーマに対する細胞増殖抑制効果はDASとDADで同程度であり⁸¹⁾、本研究結果も同様に、Bリンパ腫に対するDASとDADの増殖抑制効果は同等であった (Fig. 25A および B)。また、他の研究グループの報告において、LPSが誘導するeNOS (endothelial nitric oxide synthase) のリン酸化の抑制に必要なDADとDATの濃度がそれぞれ200 μ Mと20 μ Mであった⁸²⁾。さらに、NF- κ Bシグナルを介した炎症応答に対しても、DATはDADより低濃度で抑制することから⁶⁴⁾、これらDADよりも低濃度で薬理作用を発揮するDATの報告は本研究結果と一致する (Fig. 25)。また、ジスルフィド結合の開裂に伴い生じるラジカルは、DATがthiylおよびperthiylラジカルの2種であることに對し、DADはthiylラジカルのみである (Fig. 37)⁶²⁾。この違いが、DATがDADやDASより低濃度で抗PEL活性を発揮した理由であると推測される。

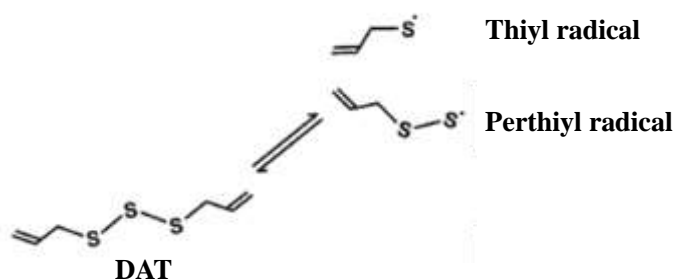


Fig. 37. DAT由来のラジカル

J. Nutr., 138, 2053-2057 (2008) から引用した⁶²⁾。

これまでに、様々なシグナル伝達の活性に影響することで、ジアリルスルフィド化合物が、がん細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている^{64-70, 81, 83, 84)}。DATを含むジアリルスルフィド化合物は、UPRを活性化することや、NF- κ B、Erk1/2、p38、Aktシグナルを抑制することが報告されているが、本研究では、DATはPEL細胞内のNF- κ Bシグナル抑制とUPR活性化を誘導した (Figs. 27 および 28)。潜伏感染期のPEL細胞内では、ウイルス非感染細胞と比較して、NF- κ Bシグナルが恒常的に活性化しており、その活性化がPEL細胞の生存と増殖に必須であることが知られている。それゆえ、ウイルス非感染細胞と比較して、DATはPEL細胞の増殖を特異的に抑制したと考察される。この考察は、NF- κ Bシグナルの特異的阻害剤bay11-7082が、PEL細胞特異的に増殖抑制効果を示した結果からも支持される (Fig. 29E)。また、KSHVが発現する複数のウイルスタンパク質が、NF- κ Bシグナルを活性化することが報告されている^{14, 71-74)}。特に、K7はユビキリンとの相互作用を介してI κ B α の分解を誘導し、NF- κ Bシグナルを活性化する⁷⁴⁾。それゆえ、PEL細胞において、顕著にDATによるI κ B α の安定化が検出されたと考えられる (Fig. 28A)。一方、DATはPEL細胞内の細胞周期停止因子p21^{Cip1}の発現と、カスパーゼ-3、-7、および-9の活性化を誘導した (Fig. 26)。これらの結果から、DATはNF- κ Bシグナルを抑制し、細胞周期停止とカスパーゼ-9経路を介したアポトーシ

スを誘導することで、PEL 特異的な殺細胞活性を発揮したと考えられる。

本研究より、DAT が TRAF6 を不安定化し、その不安定化がプロテアソーム阻害剤 MG132 により減弱することが明らかとなった (Fig. 31C)。また、TRAF6 と WT-Ub を遺伝子導入した細胞において、DAT 処理により TRAF6 の poly-Ub 化が亢進した (Fig. 32A)。最近、K48 poly-Ub 鎖を介して TRAF6 がプロテアソーム依存的に分解されることが報告されている⁸⁵⁾。さらに、TRAF6 の Ub ライゲース活性を欠損する C70A の変異は、DAT による TRAF6 の不安定化を抑制した (Fig. 32B)。本研究結果と考え併せると、DAT は TRAF6 自身による K48 鎖 poly-Ub 化を亢進し、プロテアソーム依存的な TRAF6 の分解を誘導することが示唆される。一方、K48-Ub と K63-Ub を用いた時、DAT による TRAF6 の poly-Ub 化亢進は消失した (Fig. 32A)。本研究では、K48 または K63 を除く Ub 内にある他 6 つの K 残基 (Ub 同士の共有結合残基) を R 残基に置換した変異 Ub (K48-Ub および K63-Ub) を用いたことに対し、先行研究では K48 または K63 のみを置換した変異体タンパク質を用いて解析を行っている⁸⁵⁾。本研究では、変異箇所が 6 残基と多く、そのことが Ub または poly-Ub 鎖全体のタンパク質構造と機能に影響し、DAT による TRAF6 の K48-Ub 鎖 poly-Ub 化亢進が観察されなかったと推測される。また、これまでに TRAF6 は K63 鎖 poly-Ub 化を介して主に質的制御を受けると考えられてきた。しかし、DAT 未処理時においても、野生型 TRAF6 に比べ、ZS93 はタンパク質安定性が向上した (Figs. 31C および 32B)。すなわち、細胞内において、TRAF6 は K48 鎖 poly-Ub 化を介して質的制御だけでなく、量的制御を受けることが示唆される。

先行研究より、DAT が I κ B α のリン酸化を阻害し、転写因子 NF- κ B の核移行と転写活性化を抑制することは明らかにされていたが^{64, 70)}、DAT が I κ B α のリン酸化を阻害する分子機序は不明であった。本研究結果より考察される DAT の NF- κ B シグナル阻害の分子モデルは、以下の通りである (Fig. 38)⁷⁶⁾。DAT により IKK 複合体の活性調節分子 TRAF6 がプロテアソーム依存的に不安定化し、IKK β のキナーゼ活性に重要な S180 のリン酸化が抑制される (Fig. 30D)。そのため、下流の I κ B α のリン酸化も抑制されることで (Fig. 29D)、I κ B α が安定化する (Fig. 28A)。抑制因子 I κ B α が安定化し、転写因子 NF- κ B の核移行が阻害され (Fig. 21C および D)、その転写活性化が抑制される (Fig. 28)。これらの分子機構によって、DAT が NF- κ B シグナルを阻害したと考えられる。

本研究より、DAT は PEL 細胞に対して殺細胞効果を発揮するだけでなく、KSHV のウイルス産生と溶解感染移行に必須である RTA 遺伝子の mRNA 発現も抑制することが明らかとなった (Fig. 33)。先行研究から、PEL 細胞の生存と KSHV のウイルス産生の両方に NF- κ B シグナルの活性が寄与することが分かっている^{17, 18)}。すなわち、溶解感染期において、DAT は NF- κ B シグナル阻害を介し RTA 遺伝子の発現、もしくはそれ以前の経路を抑制することで、KSHV のウイルス産生を阻害したことが示唆される。また、動物モデルを用いた解析においても、DAT は PEL の移植に伴う腹水の増加と腹腔内の腫瘍形成を抑制した (Figs. 34 および 35)。PEL 細胞を移植したマウスは脾臓が肥大し、またその脾臓から KSHV ゲノム DNA が検出された (Fig. 35A および D)。この結果から、腹腔内に移植した PEL 細胞が脾臓に浸潤し、転移したことによって、脾臓が肥大したことが推測される。この脾臓の肥大および腹水中の腫瘍形成を DAT は顕著に抑制した。これらの結果から、DAT は PEL や KSHV に対する治療

薬の新規シード化合物になる可能性が考えられる。

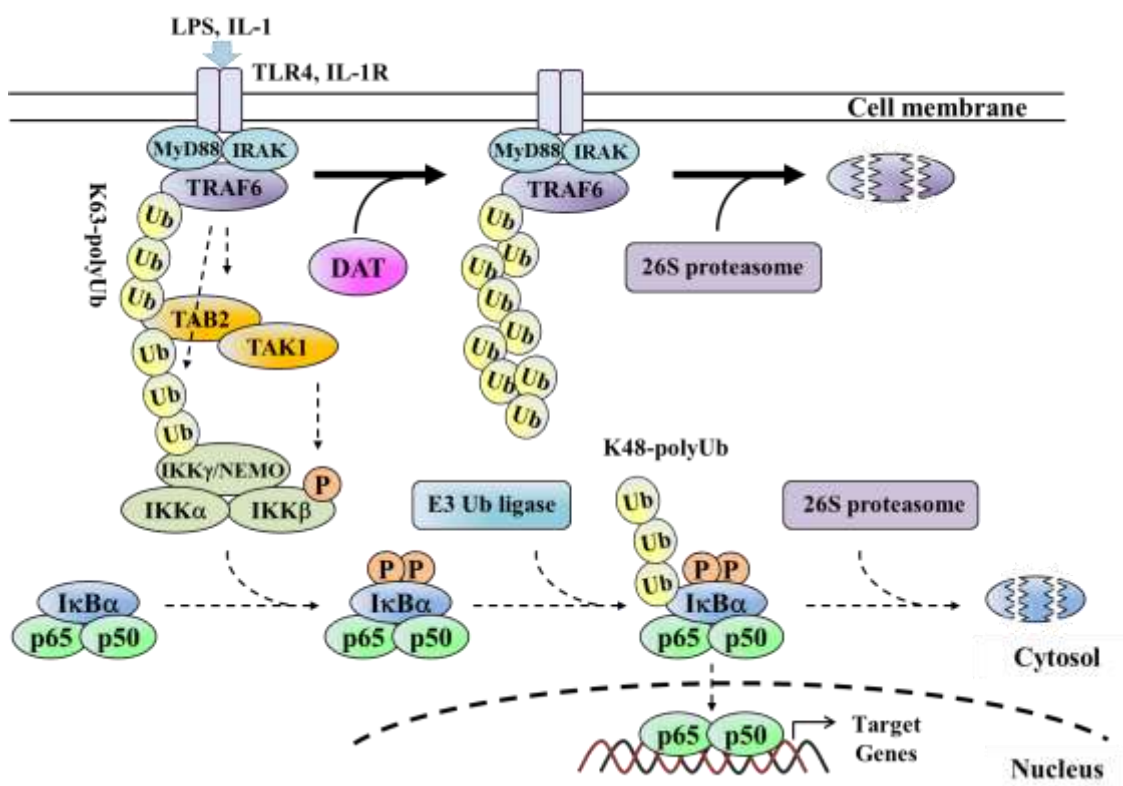


Fig. 38. DAT による NF-κB 阻害機構

図は、参考文献 (76) の Fig. 8 を一部変更し、引用した。

3-5 小括 3

本研究では、TRAF6 不安定化を介した NF-κB シグナルの阻害という DAT の新規薬理活性を明らかにした。そして、DAT が PEL と KSHV に対して、抗腫瘍活性とウイルス産生阻害活性を示すことを明らかにし、DAT が PEL や KSHV に対する治療薬の新規シード化合物になる可能性を示した。

総括

第1章より、潜伏感染期の PEL 細胞において、IRE1 α と PERK の mRNA の発現が抑制されていることが明らかとなった。また、IRE1 α の発現抑制には、ウイルスタンパク質 LANA と vCyclin が寄与することが明らかとなった。さらに、ER ストレスの誘発を介して UPR を活性化する化合物が、潜伏感染期の PEL 細胞の増殖を抑制し、PEL 細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。これらの結果から、潜伏感染期の PEL 細胞において、KSHV は IRE1 α と PERK の発現抑制を介して UPR が誘導する翻訳抑制とアポトーシスを回避し、潜伏感染の維持を行うことが考察された。また、上述の結果から、ER ストレスを誘発する化合物が、PEL の治療薬のシード化合物になることが考察された。

一方、溶解感染期の PEL 細胞において、潜伏感染期に抑制されていた IRE1 α と PERK の発現が増加、すなわち UPR が活性化することが明らかとなった。さらに、溶解感染期の PEL 細胞において、ER ストレス誘導剤 Tg が KSHV のウイルス産生を活性化することを明らかにした。これらの結果から、溶解感染期の PEL 細胞において、KSHV が活性化した UPR を利用してウイルス産生を行うことが考察された。

第2章において、IRE1 α 遺伝子の発現を制御する細胞内転写因子として ATF4 を同定した。この結果と先行研究の結果から、ウイルスタンパク質 LANA は ATF4 の転写活性化を阻害することで、IRE1 α の発現を抑制することが考察された。一方、溶解感染遺伝子 RTA および K-bZIP が IRE1 α の発現増加に寄与することと、K-bZIP が PERK の発現増加に寄与することを明らかにした。また、PERK のプロモーターを解析することで、K-bZIP による PERK の発現増加に寄与する配列を明らかにした。第1章および第2章の結果から考察された溶解感染期の PEL 細胞における UPR 挙動は、以下の通りである。溶解感染期、ウイルス粒子産生に伴い、ウイルスタンパク質が大量に合成され UPR が活性化する。KSHV は活性化した UPR を利用し、溶解感染遺伝子の発現誘導とウイルス産生を行う。さらに、KSHV は溶解感染遺伝子 RTA および K-bZIP を介して自らも UPR を活性化することで、ウイルス産生を加速させることが考察された。

第3章において、DAT が PEL 細胞内で恒常的に活性化している NF- κ B シグナルを阻害することで、PEL 細胞特異的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。本研究より、TRAF6 不安定化を介した NF- κ B シグナルの阻害という DAT の新規薬理活性が明らかとなった。また、DAT が溶解感染期の PEL 細胞におけるウイルス粒子産生を阻害することを明らかにした。これらの結果から、DAT が PEL や KSHV に対する治療薬の新規シード化合物になる可能性が示された。

本研究成果より、KSHV が活性化する NF- κ B シグナル、または KSHV が抑制する UPR が、PEL の治療ターゲットになる可能性が示された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始温かく御指導してくださっ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京都薬科大学大学院 薬学研究科 細胞生物学分野研究室の賀川裕貴助教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 薬学研究科 衛生化学分野研究室 長澤一樹教授、生化学分野研究室 中山祐治教授に、深く感謝いたします。

本研究第 2 章の遂行にあたり、レポータープラスミド DNA 等の実験材料を提供して下さいました明治大学 生命科学科 分子発生学研究室 吉田健一教授に御礼申し上げます。

本研究第 2 章のプロモーター解析にあたり、的確な助言をいただきました京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 細胞高分子化学研究室 佐上郁子教授、石畠純男准教授に御礼申し上げます。

本研究第 3 章の遂行にあたり、プラスミド DNA 等の実験材料を提供して下さいました北海道大学大学院 薬学研究院 臨床病態解析学研究室 武田宏司教授、中川宏治講師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心から深く感謝いたします。

2016 年 3 月

参考文献

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS., Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, **266**, 1865-1869 (1994).
2. Nishiwaki M, Fujimuro M, Teishikata Y, Inoue H, Sasajima H, Nakaso K, Nakashima K, Sadanari H, Yamamoto T, Fujiwara Y, Ogawa N, Yokosawa H., Epidemiology of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infections in peripheral blood leukocytes revealed by a multiplex PCR assay. *J. Med. Virol.*, **78**, 1635-1642 (2006).
3. Fujii T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Tadokoro K, Juji T, Iwamoto A., Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J. Med. Virol.*, **57**, 159-162 (1999).
4. Antar A, El Hajj H, Jabbour M, Khalifeh I, El-Merhi F, Mahfouz R, Bazarbachi A., Primary effusion lymphoma in an elderly patient effectively treated by lenalidomide: case report and review of literature. *Blood Cancer J.*, **4**, e190 (2014).
5. Krishnan HH, Naranatt PP, Smith MS, Zeng L, Bloomer C, Chandran B., Concurrent expression of latent and a limited number of lytic genes with immune modulation and antiapoptotic function by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus early during infection of primary endothelial and fibroblast cells and subsequent decline of lytic gene expression. *J. Virol.*, **78**, 3601-3620 (2004).
6. 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.*, **85**, 715-724 (2011).
7. Yu Y, Black JB, Goldsmith CS, Browning PJ, Bhalla K, Offermann MK., Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J. Gen. Virol.*, **80**, 83-90 (1999).
8. Cai Q, Lan K, Verma SC, Si H, Lin D, Robertson ES., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA interacts with HIF-1 alpha to upregulate RTA expression during hypoxia: Latency control under low oxygen conditions. *J. Virol.*, **80**, 7965-7975 (2006).
9. Duro D, Schulze A, Vogt B, Bartek J, Mittnacht S, Jansen-DP., Activation of cyclin A gene expression by the cyclin encoded by human herpesvirus-8. *J. Gen. Virol.*, **80**, 549-555 (1999).
10. Child ES, Mann DJ., Novel properties of the cyclin encoded by Human Herpesvirus 8 that facilitate exit from quiescence. *Oncogene*, **20**, 3311-3322 (2001).
11. Fujimuro M, Wu FY, ApRhys C, Kajumbula H, Young DB, Hayward GS, Hayward SD., A novel viral mechanism for dysregulation of β -catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat. Med.*, **9**, 300-306 (2003).
12. Fujimuro M, Hayward SD., The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus manipulates the activity of glycogen synthase kinase-3beta. *J. Virol.*, **77**, 8019-8030 (2003).
13. Liu J, Martin HJ, Liao G, Hayward SD., The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA

- protein stabilizes and activates c-Myc. *J. Virol.*, **81**, 10451-10459 (2007).
14. Cannon ML, Cesarman E., The KSHV G protein-coupled receptor signals via multiple pathways to induce transcription factor activation in primary effusion lymphoma cells. *Oncogene*, **23**, 514-523 (2004).
 15. Uddin S, Hussain AR, Al-Hussein KA, Manogaran PS, Wickrema A, Gutierrez MI, Bhatia KG., Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling promotes apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3102-3108 (2005).
 16. Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM., The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 13745-13751 (2002).
 17. Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M., The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 725-730 (2012).
 18. Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, Fujimuro M., Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **415**, 573-578 (2011).
 19. 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.*, **444**, 135-140 (2014).
 20. Watanabe T, Nakamura S, Ono T, Ui S, Yagi S, Kagawa H, Watanabe H, Ohe T, Mashino T, Fujimuro M., Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **451**, 93-100 (2014).
 21. Jäger R, Bertrand MJ, Gorman AM, Vandenabeele P, Samali A., The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol. Cell.*, **104**, 259-270 (2012).
 22. Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ., CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **299**, 236-243 (2010).
 23. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A., ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, **129**, 1337-1349 (2007).
 24. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ., Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1249-1259 (2001).
 25. Zhang L, Wang A., Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Front. Plant Sci.*, **3**, 293 (2012).
 26. Burnett HF, Audas TE, Liang G, Lu RR., Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection. *Cell Stress Chaperones*, **4**, 473-483 (2012).

27. Isler JA, Skalet AH, Alwine JC., Human Cytomegalovirus Activates and Regulates the Unfolded Protein Response. *J. Virol.*, **79**, 6890-6899 (2005).
28. Zoetewij JP, Moses AV, Rinderknecht AS, Davis DA, Overwijk WW, Yarchoan R, Orenstein JM, Blauvelt A., Targeted inhibition of calcineurin signaling blocks calcium -dependent reactivation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood*, **97**, 2374-2380 (2001).
29. Wilson SJ, Tsao EH, Webb BL, Ye H, Dalton-Griffin L, Tsantoulas C, Gale CV, Du MQ, Whitehouse A, Kellam P., X box binding protein XBP-1s transactivates the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) ORF50 promoter, linking plasma cell differentiation to KSHV reactivation from latency. *J. Virol.*, **81**, 13578-13586 (2007).
30. Chang PJ, Hung CH, Wang SS, Tsai PH, Shih YJ, Chen LY, Huang HY, Wei LH, Yen JB, Lin CL, Chen LW., Identification and characterization of two novel spliced genes located in the orf47-orf46-orf45 gene locus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.*, **88**, 10092-10109 (2014).
31. Chen D, Nicholas J., Promotion of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Procathepsin D by Human Herpesvirus 8-Encoded Viral Interleukin-6. *J. Virol.*, **89**, 7979-7990 (2015).
32. Leung HJ, Duran EM, Kurtoglu M, Andreansky S, Lampidis TJ, Mesri EA., Activation of the unfolded protein response by 2-deoxy-D-glucose inhibits Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and gene expression. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 5794-5803 (2012).
33. Hu D, Wang V, Yang M, Abdullah S, Davis DA, Uldrick TS, Polizzotto MN, Veeranna RP, Pittaluga S, Tosato G, Yarchoan R., Induction of Kaposi Sarcoma Herpesvirus-encoded Viral Interleukin-6 by X-Box Binding Protein-1. *J. Virol.*, **90**, 368-378 (2016).
34. Chen J, Ye F, Xie J, Kuhne K, Gao SJ., Genome-wide identification of binding sites for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein, RTA. *Virology*, **386**, 290-302 (2009).
35. Gao B, Lee SM, Chen A, Zhang J, Zhang DD, Kannan K, Ortmann RA, Fang D., Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis. *EMBO Rep.*, **9**, 480-485 (2008).
36. Stahl S, Burkhart JM, Hinte F, Tirosh B, Mohr H, Zahedi RP, Sickmann A, Ruzsics Z, Budt M, Brune W., Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003544 (2013).
37. Shigemi Z, Baba Y, Hara, Matsuihiro 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.*, **3**, 565-572 (2016).
38. Uppal T, Banerjee S, Sun Z, Verma SC, Robertson ES., KSHV LANA-the master regulator of KSHV latency. *Viruses*, **6**, 4961-4998 (2014).
39. An J, Sun Y, Rettig MB., Transcriptional coactivation of c-Jun by the KSHV-encoded LANA. *Blood*, **103**, 222-228 (2004).
40. 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.*, **81**, 2645-2652 (2000).
41. Kaul R, Verma SC, Robertson ES., Protein complexes associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA. *Virology*, **364**, 317-329 (2007).
 42. Bustany S, Cahu J, Guardiola P, Sola B., Cyclin D1 sensitizes myeloma cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating the unfolded protein response pathway. *BMC Cancer*, **15:262**, 1-12 (2015).
 43. Yan Y, Gao YY, Liu BQ, Niu XF, Zhuang Y, Wang HQ., Resveratrol-induced cytotoxicity in human Burkitt's lymphoma cells is coupled to the unfolded protein response. *BMC Cancer*, **10**, 445 (2010).
 44. Buchkovich NJ, Yu Y, Pierciey FJ Jr, Alwine JC., Human Cytomegalovirus Induces the Endoplasmic Reticulum Chaperone BiP through Increased Transcription and Activation of Translation by Using the BiP Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.*, **84**, 11479-11486 (2010).
 45. Shi-Chen Ou D, Lee SB, Chu CS, Chang LH, Chung BC, Juan LJ., Transcriptional activation of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 by HCMV IE1-72 protein. *Cell Res.*, **4**, 642-653 (2011).
 46. He B, Chou J, Liebermann DA, Hoffman B, Roizman B., The carboxyl terminus of the murine MyD116 gene substitutes for the corresponding domain of the gamma (1) 34.5 gene of herpes simplex virus to preclude the premature shutoff of total protein synthesis in infected human cells. *J. Virol.*, **70**, 84-90 (1996).
 47. Cassady KA, Gross M, Roizman B., The Second-Site Mutation in the Herpes Simplex Virus Recombinants Lacking the $\gamma_134.5$ Genes Precludes Shutoff of Protein Synthesis by Blocking the Phosphorylation of eIF-2 α . *J. Virol.*, **72**, 7005-7011 (1998).
 48. Poppers J, Mulvey M, Khoo D, Mohr I., Inhibition of PKR Activation by the Proline-Rich RNA binding Domain of the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein. *J. Virol.*, **74**, 11215-11221 (2000).
 49. Mulvey M, Arias C, Mohr I., Maintenance of Endoplasmic Reticulum (ER) Homeostasis in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells through the Association of a Viral Glycoprotein with PERK, a Cellular ER Stress Sensor. *J. Virol.*, **81**, 3377-3390 (2007).
 50. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K., ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6755-6767 (2000).
 51. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J., A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, **307**, 935-939 (2005).
 52. Davis DA, Naiman NE, Wang V, Shrestha P, Haque M, Hu D, Anagho HA, Carey RF, Davidoff KS, Yarchoan R., Identification of Caspase Cleavage Sites in KSHV Latency-Associated Nuclear Antigen and Their Effects on Caspase-Related Host Defense Responses. *PLoS Pathog.*, **11**, e1005064 (2015).

53. Gjyshi O, Bottero V, Veettil MV, Dutta S, Singh VV, Chikoti L, Chandran B., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces Nrf2 during de novo infection of endothelial cells to create a microenvironment conducive to infection. *PLoS Pathog.*, **10**, e1004460 (2014).
54. Gjyshi O, Roy A, Dutta S, Veettil MV, Dutta D, Chandran B., Activated Nrf2 Interacts with Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency Protein LANA-1 and Host Protein KAP1 To Mediate Global Lytic Gene Repression. *J. Virol.*, **89**, 7874-7892 (2015).
55. Takayanagi S, Fukuda R, Takeuchi Y, Tsukada S, Yoshida K., Gene regulatory network of unfolded protein response genes in endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress Chaperones*, **18**, 11-23 (2013).
56. Oku M, Tanakura S, Uemura A, Sohda M, Misumi Y, Taniguchi M, Wakabayashi S, Yoshida H., Novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.*, **36**, 1-12 (2011).
57. Vogel JL, Kristie TM., The novel coactivator C1 (HCF) coordinates multiprotein enhancer formation and mediates transcription activation by GABP. *EMBO J.*, **19**, 683-690 (2000).
58. Lefort S, Soucy-Faulkner A, Grandvaux N, Flamand L., Binding of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP to interferon-responsive factor 3 elements modulates antiviral gene expression. *J. Virol.*, **81**, 10950-10960 (2007).
59. Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG., Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfonates in commercial garlic products. *Planta. Med.*, **57**, 363-370 (1991).
60. Wang HC, Pao J, Lin SY, Sheen LY., Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1271**, 44-52 (2012).
61. Yi L, Su Q., Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food Chem. Toxicol.*, **57**, 362-370 (2013).
62. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR., Molecular transduction mechanisms of the redox network underlying the antiproliferative effects of allyl compounds from garlic. *J. Nutr.*, **138**, 2053-2057 (2008).
63. Calvo-Gómez O, Morales-López J, López MG., Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. *J. Chromatogr. A.*, **1036**, 91-93 (2004).
64. You S, Nakanishi E, Kuwata H, Chen J, Nakasone Y, He X, He J, Liu X, Zhang S, Zhang B, Hou DX., Inhibitory effects and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds on the production of inflammatory mediators. *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**, 2049-2060 (2013).
65. Shin DY, Kim GY, Hwang HJ, Kim WJ, Choi YH., Diallyl trisulfide-induced apoptosis of bladder cancer cells is caspase-dependent and regulated by PI3K/Akt and JNK pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **37**, 74-83 (2014).
66. Dasgupta P, Bandyopadhyay SS., Role of di-allyl disulfide, a garlic component in NF- κ B mediated transient G2-M phase arrest and apoptosis in human leukemic cell-lines. *Nutr. Cancer*, **65**, 611-622 (2013).
67. Chen M, Li B, Zhao X, Zuo H, He X, Li Z, Liu X, Chen L., Effect of diallyl trisulfide derivatives

- on the induction of apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **363**, 75-84 (2012).
68. Li W, Tian H, Li L, Li S, Yue W, Chen Z, Qi L, Hu W, Zhu Y, Hao B, Gao C, Si L, Gao F., Diallyl trisulfide induces apoptosis and inhibits proliferation of A549 cells in vitro and in vivo. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.*, **44**, 577-583 (2012).
 69. Yu CS, Huang AC, Lai KC, Huang YP, Lin MW, Yang JS, Chung JG., Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.*, **28**, 949-950 (2012).
 70. Lee HJ, Lee HG, Choi KS, Surh YJ, Na HK., Diallyl trisulfide suppresses dextran sodium sulfate-induced mouse colitis: NF- κ B and STAT3 as potential targets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **437**, 267-273 (2013).
 71. Matta H, Mazzacurati L, Schamus S, Yang T, Sun Q, Chaudhary PM., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) oncoprotein K13 bypasses TRAFs and directly interacts with the I κ B kinase complex to selectively activate NF- κ B without JNK activation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24858-24865 (2007).
 72. Hävemeier A, Gramolelli S, Pietrek M, Jochmann R, Stürzl M, Schulz TF., Activation of NF- κ B by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 protein involves recruitment of the NF- κ B-inducing kinase, I κ B kinases, and phosphorylation of p65. *J. Virol.*, **88**, 13161-13172 (2014).
 73. Prakash O, Swamy OR, Peng X, Tang ZY, Li L, Larson JE, Cohen JC, Gill J, Farr G, Wang S, Samaniego F., Activation of Src kinase Lyn by the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus K1 protein: implications for lymphomagenesis. *Blood*, **105**, 3987-3994 (2005).
 74. Feng P, Scott CW, Cho NH, Nakamura H, Chung YH, Monteiro MJ, Jung JU., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K7 protein targets a ubiquitin-like/ubiquitin-associated domain-containing protein to promote protein degradation. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 3938-48 (2004).
 75. Chen ZJ., Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.* **246**, 95-106 (2012).
 76. Shigemi Z, Furukawa Y, Hosokawa K, Minami S, Matsuhira J, Nakata S, Watanabe T, Kagawa H, Nakagawa K, Takeda H, Fujimuro M., Diallyl trisulfide induces apoptosis by suppressing NF- κ B signaling through destabilization of TRAF6 in primary effusion lymphoma. *Int. J. Oncol.*, **1**, 293-304 (2016).
 77. Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG., Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I κ B kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 4102-4112 (2007).
 78. Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N., Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci.*, **97**, 1381-1387 (2006).
 79. Takahashi-Makise N, Suzu S, Hiyoshi M, Ohsugi T, Katano H, Umezawa K, Okada S., Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF- κ B pathway. *Int. J. Cancer.*, **125**,

- 1464-1472 (2009).
80. Ishikawa C, Tanaka J, Katano H, Senba M, Mori N., Hippuristanol reduces the viability of primary effusion lymphoma cells both in vitro and in vivo. *Mar. Drugs*, **11**, 3410-3424 (2013).
 81. Das A, Banik NL, Ray SK., Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer*, **110**, 1083-1095 (2007).
 82. Lei YP, Liu CT, Sheen LY, Chen HW, Lii CK., Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, S42-S52 (2010).
 83. Chandra-Kuntal K, Lee J, Singh SV., Critical role for reactive oxygen species in apoptosis induction and cell migration inhibition by diallyl trisulfide, a cancer chemopreventive component of garlic. *Breast Cancer Res. Treat.*, **138**, 69-79 (2013).
 84. Wang HC, Hsieh SC, Yang JH, Lin SY, Sheen LY., Diallyl trisulfide induces apoptosis of human basal cell carcinoma cells via endoplasmic reticulum stress and the mitochondrial pathway. *Nutr. Cancer*, **64**, 770-780 (2012).
 85. Zeng KW, Liao LX, Lv HN, Song FJ, Yu Q, Dong X, Li J, Jiang Y, Tu PF., Natural small molecule FMHM inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by promoting TRAF6 degradation via K48-linked polyubiquitination. *Sci. Rep.*, **5:14715**, 1-15 (2015).