

氏名(生年月日) **しげみ ぜん べい** **重見善平** (1986年7月22日)

学位の種類 博士(薬科学)

学位記番号 博薬科 第5号

学位授与の日付 2016年3月19日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 (主査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 長澤 一樹

論文内容の要旨

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。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。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。本研究成果は、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。

審査の結果の要旨

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は、エイズ関連のカポジ肉腫や原発性体腔液性リンパ腫(PEL)において高頻度に検出されることから、これら腫瘍の原因ウイルスとして認識されている。ドキ

ソルビシンが有効なカポジ肉腫と比べ、PELはCHOP等の化学療法に耐性を示すことから、PELを標的とした抗腫瘍薬の開発が期待されている。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。B細胞性の非ホジキンリンパ腫であるPELでは、KSHVは潜伏感染しており、エピゾームDNAとして核内で保持され、細胞増殖と感染維持に関与する少数のウイルス分子を発現する。小胞体(ER)内の新生タンパク質のホールディング時に生じる異常(変性)タンパク質は、ERストレスとなり細胞に毒性を示す。そこで、細胞はUPR(unfolded protein response)を活性化し、翻訳抑制とERシャペロン合成を誘導し、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、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞では、ウイルス複製や細胞増殖にともな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と考えられている。

申請者は、KSHVによるPEL細胞内のUPRの利用と破綻の仕組み(第1章)、UPRの実行因子IRE1aとPERKの発現制御(第2章)、ERストレス誘発剤DAT(diallyl trisulfide)のPEL細胞に対する殺細胞効果とその作用機序(第3章)に関する研究を実施し、以下の知見を明らかにした。

第1章 PEL細胞内のUPR脱制御機構

KSHVは宿主UPRをどのような仕組みで利用するのか、また、その生物学的意義の解明を行った。その結果、潜伏感染期のPEL細胞において、UPRの実行因子であるIRE1aとPERKのmRNAの発現が抑制されていること、さらに、IRE1aの発現抑制にはKSHVが発現するLANAとvCyclinが関与した。さらに、タプシガルジンによるERストレスの負荷は、PEL細胞へのUPR活性化を介したアポトーシスを惹起することを見出した。これらの結果から、PEL細胞において、KSHVはIRE1a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示された。

一方、PEL細胞を溶解感染期に移行させると、抑制されていたIRE1aとPERKの発現が増加し、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ストレス誘導がKSHVのウイルス産生を促進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示された。

第2章 IRE1aとPERK遺伝子のプロモーター解析

UPRの実行因子であるIRE1aとPERKの発現制御は未だ明らかにされていない。そこで、これら分子の転写活性化に関わるプロモーター配列の同定を行った。その結果、IRE1a遺伝子の上流-789から-776bpのATF結合配列と、PERK遺伝子の上流-990から-680bpと-129から+30bpがプロモーター領域である可能性が示された。さらに、IRE1a発現の転写因子としてATF4を同定した。一方で、KSHVが溶解感染初期に発現するRTAとK-bZIPがIRE1aとPERKの転写活性化に寄与することも見出した。

第3章 DATの抗PEL活性とその作用機序解析

DATはPEL細胞内のUPR活性化だけでなく、TRAF6不安定化を介したNF- κ Bシグナルの阻害により、PEL細胞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DATの新規薬理活性、すなわち、TRAF6不安定化を介したNF- κ B抑制を見出した。また、DATは溶解感染期のPEL細胞におけるKSHV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に対する治療薬の候補化合物になる可能性が示された。

本研究により、潜伏感染期のPEL細胞では、KSHVは宿主UPRの抑制によりアポトーシスを回避し、感染を維持する。一方、溶解感染期のPEL細胞では、ウイルス産生にともないUPRが活性化するが、

KSHV は活性化した UPR を利用して溶解感染遺伝子の発現とウイルス産生を亢進させる。さらに、KSHV の溶解感染遺伝子産物 RTA と K-bZIP は UPR を増強し、ウイルス産生を加速させることが示された。また、DAT 等の複数の新規 PEL 治療薬の候補化合物を見出した。

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