

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

森田 亮

専攻分野：内科学

コース：消化器・肝臓内科

指導教授：伊東 文生

主論文の題目：

Suppressive Effects of EB Virus Infection on HER2 Expression in Gastric Cancer Cells

(胃癌細胞における EB ウイルス感染の HER2 発現に対する抑制効果)

共著者：

Yasutaka Sukawa, Hiroyuki Yamamoto, Yoshihito Yoshida, Ritsuko Oikawa, Yasumasa Matsuo, Tadateru Maehata, Katsuhiko Nosh, Yoshiyuki Watanabe, Hiroshi Yasuda, Fumio Itoh

緒言

癌に対する分子標的治療の進歩は目覚ましく、胃癌では、増殖因子受容体 HER2 の過剰発現症例に対する抗 HER2 抗体 (トラスツズマブ) が用いられる。しかし、HER2 遺伝子増幅と蛋白質過剰発現の乖離などもみられ、トラスツズマブの真の適応判定は容易ではない。HER2 過剰発現陽性胃癌の特徴づけが重要であり、分化型胃癌に HER2 過剰発現が多い事などが報告されている。一方、全ての胃癌の 10%にみられる EB ウイルス (EBV) 陽性胃癌では、HER2 過剰発現が極めてまれであることが注目されるが、詳細は明らかになっていない。

本研究では、胃癌細胞株における HER2 発現に対する EBV 感染の影響を明らかにすることとした。

方法・対象

HER2 発現陽性の胃癌細胞株 JRST を用いた。

JRST を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養液で培養した。バーキットリンパ腫細胞株である Akata 細胞との細胞-細胞接着法により、JRST に EBV を導入した。ネオマイシンを加えた培養により、EBV 導入細胞 (JRST-EBV) の選択を行った。ネオマイシン耐性遺伝子のみを導入した細胞株を JRST-Neo とした。

EBNA1 発現は、アセトン・メタノール固定後、免疫蛍光染色により解析した。細胞株から total RNA を抽出し、Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1)、latent membrane protein 2A (LMP2A)、BamHI-A rightward reading frame 0 (BARF0)、Epstein-Barr virus-encoded RNA 1 (EBER1) 発現を RT-PCR で解析した。HER2、PathScan Multiplex Western Cocktail 1、v-Akt murine thymoma viral oncogene (Akt)、extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)、phosphatase and tensin homologue (PTEN)、アクチンに対する抗体を用いてウェスタンブロットを解析した。細胞増殖実験は、MTT アッセイにより行った。細胞運動実験は、スクラッチアッセイにより行った。トラスツズマブに対する感受性試験は、カススペース 3 アッセイによるアポトーシス解析とスクラッチアッセイにより行った。統計はノンパラメトリック検定を用いた。

なお上記項目中、RT-PCR、ウェスタンブロット解析のみを聖マリアンナ医科大学で行った。

結果

EBV 発現 JRST 胃癌細胞株 (JRST-EBV) を樹立した。JRST-EBV の RT-PCR 解析において、EBNA1、LMP2A、BARF0、EBER1 発現を認めた。また、免疫蛍光染色により EBER1 発現を認めた。

HER2 mRNA 発現は、JRST-EBV と JRST-Neo で有意な差を認めなかった (相対発現 0.96 vs 0.97)。一方、HER2 蛋白質発現解析では、JRST-Neo に比べ、JRST-EBV において、発現が低下していた。さらに、免疫蛍光染色による解析で同様の結果が得られた。

HER2 シグナル分子の解析では、JRST-Neo に比べ、JRST-EBV において、リン酸化 mitogen-activated protein kinase (MAPK) およびリン酸化 Akt の発現が低下していた。

細胞増殖実験では、JRST-Neo に比べ、JRST-EBV において増殖能が有意に低下していた (3.21 vs 1.86, $P < 0.01$)。細胞運動実験でも、JRST-EBV において運動能が有意に低下していた (216 mm vs 316 mm, P

= 0.03)。

トラスツズマブ処理に対するアポトーシスは、JRST-Neo に比べ、JRST-EBV において、有意に低下していた (1.82 vs 1.27, $P = 0.03$)。JRST-Neo では、トラスツズマブ処理で細胞運動能の低下を認めた (131.10 mm vs 75.05 mm) が、JRST-EBV では認めなかった (65.55 mm vs 68.41 mm)。

考察

EBNA1、LMP2A、BARF0、EBER1 発現を認めたことから、ヒト EBV 陽性胃癌でみられる 1 型発現を示していると考えられた。

EBV 発現は、HER2 mRNA 発現に影響を与えなかったが、蛋白質レベルで HER2 発現を減弱させた。ToGA 試験では、ヒト胃癌組織の検討で、HER2 遺伝子増幅を認めた症例の 22% で HER2 蛋白質の過剰発現を認めていない。HER2 遺伝子増幅と蛋白質発現の乖離に EBV 感染が関わっている可能性が考えられた。

HER2 蛋白質発現低下に伴い、細胞増殖や抗アポトーシスに関わるリン酸化 MAPK およびリン酸化 Akt の発現が低下していた。これらに基づき、機能的意義の解析では、EBV 発現により JRST の細胞増殖能や運動能が有意に低下した。HER2 シグナルの抑制が、関与している可能性が考えられるが、EBV 発現の影響は、他にも考えられるため、さらなる解析が必要である。

JRST-EBV では、トラスツズマブの抗腫瘍効果の減弱を認めた。HER2 蛋白質発現低下だけの影響によるものかどうか今後の検討課題である。

胃癌細胞株において、EBV 発現が、HER2 発現および腫瘍増殖に抑制的な役割を示すことを明らかにした。EBV 陽性胃癌で HER2 過剰発現が極めてまれであることの分子機構の解明までには至らないが、興味深い研究結果である。本研究の成果をもとに、今後、個々の患者に最適な個別化分子標的治療の開発が期待できる。

結論

胃癌細胞株において、EBV 発現が、HER2 発現および腫瘍増殖に抑制的な役割を示すことを明らかにした。