

氏名	もり たかこ 森 多佳子
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第52号
学位授与年月日	平成18年 3月10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	Functional role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on cell growth and lytic cycle of Epstein-Barr virus in the Burkitt's lymphoma cell line. P3HR-1 (バーキットリンパ腫細胞株 P3HR-1 の細胞増殖と溶解感染における PI3-K/Akt 経路の役割)
学位論文審査委員	(主査) 箸本英吉 (副査) 林 真 一 西連寺剛

学位論文の内容の要旨

EBウイルス (Epstein-Barr virus; EBV) は90%以上の成人に不顕性感染しているが、一方、伝染性単核球症やバーキットリンパ腫 (Burkitt's lymphoma; BL)、胃癌、上咽頭癌などの悪性腫瘍への関与が知られている。EBV は潜伏感染と溶解感染の二つの異なる生活環を持ち、潜伏状態から溶解感染 (EBV 再活性化) への移行は EBV 前初期遺伝子 BZLF1 タンパク質 ZEBRA および BRLF1 タンパク質 Rta によって制御されている。ZEBRA と Rta は相互的に下流のウイルス遺伝子発現を活性化し、初期タンパク質 (early antigen; EA)、後期タンパク質 (viral capsid antigen; VCA) が合成され、最終的にウイルス粒子が産生される。生体膜に存在するイノシトールリン脂質の3位をリン酸化する酵素ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase; PI3-K)/Akt 経路は細胞増殖、生存、アポトーシスなどの細胞応答の調節に関わり、癌化およびその悪性増殖化に関与するシグナルを伝達することが知られている。

本研究は、BL細胞株、特に P3HR-1 細胞の増殖および EBV 再活性化における PI3-K/Akt 経路の役割について解析した。

材料と方法

EBV 陽性 BL 細胞株 (Raji, P3HR-1, Akata, Daudi)、および EBV 陰性 BL 細胞株 (Ramos, BJAB) を血清 10% 添加、非添加 RPMI1640 培地にて 48 時間培養後、ウェスタンブロット法で Akt のリン酸化を抗リン酸化 Akt 抗体で調べた。P3HR-1 細胞を血清添加および非添加培地にて 3 日間培養し、経時的に Akt のリン酸化と細胞増殖をウェスタンブロット法、および MTT アッ

セイ法にて調べた。P3HR-1 細胞を PI3-K 特異的阻害剤 LY294002 で処理し、Akt リン酸化状態と細胞増殖の変化をウェスタンブロット法、および MTT アッセイ法で調べた。EBV 再活性化への影響を調べるため、LY294002 処理後 24 時間の ZEBRA、Rta および EA の発現をウェスタンブロット法で、VCA を蛍光抗体法で、前初期遺伝子 BRLF1(Rta)の発現を RT-PCR-Southern 法で解析した。

結 果

P3HR-1、Akata、Daudi、BJAB 細胞において Akt の恒常的リン酸化が見られたが、Raji および Ramos 細胞では見られなかった。P3HR-1 細胞における Akt のリン酸化の度合は極めて強く、血清非存在下においても Akt の強いリン酸化が見られた。一方、BJAB、Akata、Daudi 細胞における Akt リン酸化は、血清非存在下では顕著に低かった。P3HR-1 細胞は 3 日間の培養期間において、血清非存在下でも存在下と同様の増殖能を示し、Akt のリン酸化状態も同様であった。PI3-K 特異的阻害剤である LY294002 は、Akt リン酸化を濃度依存的に抑制した。また LY294002 は P3HR-1 細胞で自然に発現している EBV の再活性化を抑制した。LY294002 により ZEBRA の発現は抑制されないが、Rta 及び EA の発現は濃度に依存して抑制され、VCA の発現も著しい減少が見られた。Rta mRNA の発現は LY294002 により濃度依存的に抑制された。

考 察

PI3-K/Akt 経路の活性化は個々の BL 細胞株間において違いが見られた。PI3-K/Akt 経路活性化は培地中の血清に依存するが、P3HR-1 細胞では血清非依存性であった。P3HR-1 細胞では PI3-K/Akt 経路が細胞増殖と EBV 再活性化において促進的に機能していることが明らかとなった。PI3-K 特異的阻害剤である LY294002 は、ZEBRA の発現は抑制せず、Rta mRNA の発現を阻止していた。Akt のリン酸化モチーフが ZEBRA に存在することから、Akt の EBV タンパク質の標的基質は ZEBRA であり、ZEBRA のリン酸化を制御することで Rta の発現を促進することが示唆された。LY294002 が P3HR-1 細胞株の細胞増殖と EBV 再活性化の両方を抑制することから、PI3-K/Akt 経路がそれら EBV 関連疾患の治療における分子標的になることが示唆された。

結 論

本研究により、P3HR-1 細胞における Akt の恒常的なリン酸化と、細胞増殖および自然な EBV 再活性化における PI3K/Akt 経路の促進的役割が初めて明らかにされた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は各種のバーキットリンパ腫(Burkitt's lymphoma; BL)細胞株における PI3-K/Akt 活性化を調べ、Akt リン酸化が BL 細胞株によって異なることを見出し、特に強度の Akt リン酸

化を認めた P3HR-1 細胞の増殖および自然な EBV 再活性化における PI3-K/Akt 経路の役割を検討した。P3HR-1 細胞は、血清添加培地および非添加培地において細胞増殖および恒常的 Akt リン酸化がほぼ同程度に見られた。PI3-K 特異的阻害剤である LY294002 は Akt リン酸化、細胞増殖および EBV 再活性化を抑制したことから、PI3-K/Akt 経路が P3HR-1 細胞の増殖および EBV 再活性化を促進的に調節していることが示唆された。本論文は EBV 陽性 BL 細胞株 P3HR-1 の恒常的な Akt のリン酸化と EBV 再活性化における PI3-K/Akt 経路の関与を初めて明らかにしたものであり、EBV 潜伏、再活性化、そして発がん機構においてその学術的水準を高めたものと認める。