

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18320

研究課題名（和文）上咽頭癌発癌をEBウイルス癌蛋白LMP1発現細胞の細胞競合から解明する

研究課題名（英文）Nasopharyngeal carcinogenesis elucidated by cell competition for cells expressing LMP1 of EB virus oncoprotein.

研究代表者

池田 雅一（Ikeda, Masakazu）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40707486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：上咽頭癌はその発癌の始まりは単一のEBウイルス感染細胞が癌化すると推測されているが、癌化した単一のEBウイルス感染細胞が増殖して上咽頭癌発生へと変化していくのかというメカニズムは解明されていなかった。正常な上咽頭上皮細胞と模したBEAS2B細胞にEBウイルスの癌蛋白である潜伏膜蛋白1（LMP-1）を形質導入し、上咽頭癌細胞を模したLMP1BEAS2B細胞を作成した。BEAS2B細胞とLMP1BEAS2B細胞を98:2の細胞数割合で共培養を行ったところ、LMP1BEAS2B細胞はBEAS2B細胞に囲まれて所々で集簇して増殖していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BEAS2B細胞とLMP1BEAS2B細胞を共培養を行うことで、LMP1BEAS2B細胞が集簇して増殖していたことは癌細胞同士が近接して存在する場合に細胞競合によって癌細胞が増殖できる条件であると予想される。上咽頭癌発癌の初期のメカニズム解明につながる可能性が期待される結果であり、さらに癌細胞が増殖する条件を検証することによって上咽頭癌発癌のメカニズム解明に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Nasopharyngeal carcinogenesis is assumed to begin when a single EB virus-infected cell becomes cancerous, but the mechanism by which a single EB virus-infected cell that has become cancerous proliferates and transforms into nasopharyngeal carcinogenesis has not been elucidated. We generated LMP1BEAS2B cells by transfecting BEAS2B cells, which mimic normal nasopharyngeal epithelial cells, with latent membrane protein 1 (LMP-1), an EB virus oncoprotein, and co-cultured BEAS2B cells with LMP1BEAS2B cells at a 98:2 cell number ratio, LMP1BEAS2B cells were surrounded by BEAS2B cells, which clustered and proliferated in places.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：上咽頭癌 LMP1

1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌はその発癌に Epstein-Barr ウイルス (EBV) が関与している。上咽頭癌における EBV 感染は潜伏感染であり、EBV のモノクロナリティが示されていることから単一の EBV 感染細胞が癌化していると推測される。しかし、どのように単一の EBV 感染細胞が上咽頭癌発生へと変化していくのかというメカニズムは解明されていない。日本における上咽頭癌の頻度は高くはないものの、中国南部や東南アジアなど日本の 100 倍に迫る発症頻度の地域もあり、本研究は単に国内にとどまらず世界的な意義を有する。また、II 型潜伏感染様式をとる EBV 関連腫瘍は上咽頭癌のみならず、ホジキンリンパ腫や鼻性 NK/T 細胞リンパ腫などもあり、広く展開が可能な点でも創造性を有している。EBV による発癌の初めの一步が解明されれば、正常細胞による癌細胞の攻撃という、新たな治療戦略を探索するための礎となることが期待される。

LMP1 を正常線維芽細胞へ形質導入すると形質転換し造腫瘍能を獲得することが 1990 年に報告された。以降 LMP1 は精力的に研究されてきており、NF- κ B や AP-1 などの転写因子を介してシグナル伝達路を活性化することなどが判明した。その結果、LMP1 は細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) (Yoshizaki et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. Murono et al. Cancer Res, 2000.) や血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) (Murono et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2001.) の産生を促進し、上咽頭癌の高転移性に関与することも判明した。これらは発癌というよりも LMP1 が転移能を促進することを示したものであったが、さらに、LMP1 により癌幹細胞様形質が獲得される (Kondo et al. J Virol, 2011.) ことも判明し、これは上咽頭癌発癌メカニズム解明の根幹に近づくものであった。

EBV による上咽頭癌発癌の最初のステップである、EBV に感染した 1 つの細胞が正常細胞の中でどのように増殖していくのかは、解明されていない。EBV の癌蛋白である LMP1 に注目し、LMP1 発現細胞が非発現細胞の中でどのように増殖するのか、あるいは排除される場合には増殖のためどのような条件が必要であるのかの解明を通して上咽頭癌の起源を知るべく、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、EBV の癌蛋白である潜伏膜蛋白 1 (LMP1) を発現した上皮細胞が、周囲の LMP1 を発現しない上皮細胞とどのように競合することで発癌を来すのか、また宿主側にどのような条件が必要とされるのか、を解明することを目的とした。本研究により EBV による発癌の初めの一步が解明されれば、正常細胞による癌細胞の攻撃という新たな治療戦略を探索するための礎となることが期待された。LMP1 の発現の有無のみが細胞の競合を経て癌化に関与するのか、LMP1 の発現に先行する宿主側の変化が LMP1 発現に加えて必要であるのか、その変化は LMP1 を発現する細胞のみに必要なのか周囲の LMP1 非発現細胞にも必要なのか、について解明する。

EBV に感染した 1 つの細胞がモノクローナルに増殖するためには、その細胞が周囲の EBV 非感染細胞と競合し、それに打ち勝ち増殖する必要がある。この現象を解明するためには、EBV による発癌の中心的役割を担うのは LMP1 であるので、【1】LMP1 発現細胞は非発現細胞の中で競合に打ち勝ち増殖していくのか排除されるのか【2】増殖していく場合、LMP1 発現細胞が非発現細胞に打ち勝つはどのようなメカニズムか【3】排除される場合、非発現細胞はどのようなメカニズムで LMP1 発現細胞を排除するのか、について調査を必要とした。

また、EBV の感染こそが上咽頭癌の発癌の最初のステップであると考えられていたが、EBV の感染が見られない軽度異型病変に染色体 3p の Loss of heterozygosity (LOH) を認めたという報告 (Chan, 2000) もあり、EBV 感染に先行する宿主細胞側の変化も必要となる可能性もある。したがって、先の【1】LMP1 発現細胞は非発現細胞の中で競合に打ち勝ち増殖していくのか排除されるのか、において LMP1 発現細胞が非発現細胞の中から排除されるのであれば、【4】LMP1 発現に先立ち宿主側にどのような変化があれば LMP1 発現細胞は非発現細胞の中で排除されずに増殖できるのか、さらに【5】この先行する宿主側の変化が LMP1 発現細胞のみに生じた時に LMP1 発現細胞が増殖できるのか、周囲の細胞も含めて変化が生じている時でも LMP1 発現細胞が増殖できるのか、についての調査を必要とした。

3. 研究の方法

研究に適切な上咽頭上皮細胞は入手が極めて困難であったため、本研究では上咽頭上皮細胞の代替として気道上皮細胞として気管支上皮の BEAS2B 細胞を利用した。LMP1BEAS1B 細胞および BEAS2B 細胞は FBS を添加した High glucose DMEM 溶液中で維持培養を行った。継代培養は dish が 90% confluent を目安に 4-5 日程度でトリプシンを用いて実施した。

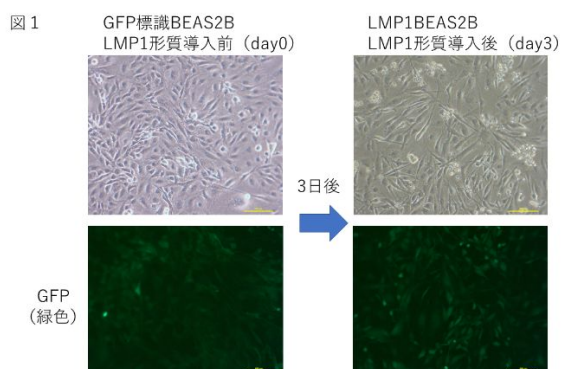
蛍光蛋白 GFP を標識した BEAS2B 細胞を維持・継代培養を行い、蛍光蛋白が安定して発現していることを確認する。GFP 標識 BEAS2B 細胞を 6 穴ポリプロピレンディッシュで 1 日培養を行って接着させ、FBS を添加していない Low glucose DMEM に培養液を変更して、LMP1 発現プラスミドを Lipofectamine3000 (Invitrogen) を用いて形質導入を行って LMP1 発現 BEAS2B 細胞 (LMP1BEAS2B) を作成する。LMP1 の形質導入後に 2 日程度静置してから観察を行い、LMP1 発現

BEAS2B 細胞が形態的に紡錘形に変化していることで形態的に腫瘍化（間葉移行）していることと、蛍光顕微鏡で GFP が標識されていることを確認する。この蛍光蛋白 GFP で標識された LMP1 発現細胞は LMP1BEAS2B とし、上咽頭癌細胞を模した細胞とする。

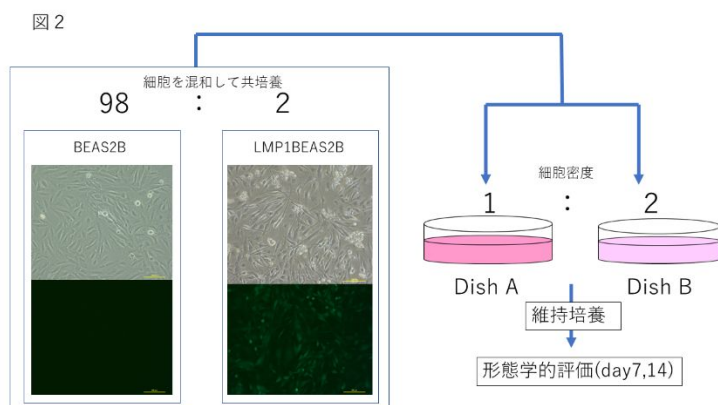
蛍光蛋白 GFP で標識されない LMP1 非発現細胞は BEAS2B と LMP1BEAS2B を 99:2 の比率で共培養し、発癌に至った LMP1BEAS2B 細胞が正常細胞に囲まれている状態の上咽頭癌発癌初期モデルを作成する。この共培養を継続することで LMP1BEAS2B と BEAS2B の細胞競合によって、LMP1BEAS2B が増殖をするのか淘汰され消失していくのかについてその条件を調査する。増殖していくのであれば LMP1BEAS2B が形態的にどのように BEAS2B に打ち勝って増殖していくのかを経時的に観察する。排除されるのであれば LMP1BEAS2B が排除される条件を調査する。

4. 研究成果

(1) 蛍光蛋白 GFP で緑色に標識した BEAS2B 細胞に LMP1 を形質導入し、LMP1 発現 BEAS2B 細胞を作成した。LMP1 発現 BEAS2B 細胞は培養 2 日目に細胞の形状が紡錘形に変形しており、LMP1 を形質導入したことで間葉移行を来したと判断した。(図 1)

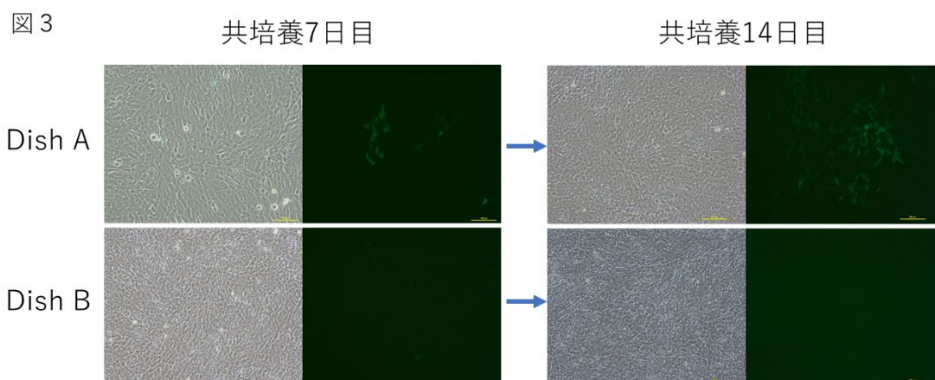


(2) BEAS2B 細胞 : LMP1 発現 BEAS2B 細胞 = 98 : 2 の比率で共培養を行った。細胞密度は Dish A:Dish B = 1 : 2 の割合とした。それぞれ培養開始後 7 日目と 14 日目で蛍光顕微鏡を用いて LMP1 発現 BEAS2B 細胞の状態を観察し、肉眼的に細胞競合を評価した。(図 2)



Dish A は培養開始後 7 日目で LMP1 発現 BEAS2B 細胞が所々に集簇して増殖し、14 日目では細胞の増殖は進んでいた。Dish B は培養開始後 7 日目で LMP1 発現 BEAS2B 細胞の増殖は認められなく、14 日目では LMP1 発現 BEAS2B 細胞は細胞数の減少を認めた。(図 3)

細胞密度が低い Dish A では LMP1BEAS2B 細胞の増殖が認められたという結果からは、間葉変化（癌化）した細胞が近接して複数存在できる環境下では周囲の正常細胞との細胞競合に於いて淘汰されずに増殖することができた可能性が推測された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------