

学位授与番号	医博甲第1532号
学位授与年月日	平成14年3月22日
氏名	任 慶 春
学位論文題目	EB ウイルス膜蛋白質 LMP1 による IL-8 誘導と上咽頭癌血管新生に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 古 川 仞 副 査 教 授 向 田 直 史 教 授 市 村 宏

内容の要旨及び審査の結果の要旨

上咽頭癌 (NPC) における血管新生誘導機構に対する Epstein-Barr ウイルス (EBV) 遺伝子の関与について検討した。上咽頭癌原発巣生検標本 37 例を対象として、抗フォン・ウィルブランド因子 (vWF) 抗体を用いた免疫組織化学染色により腫瘍組織の微小血管内皮細胞を染色、微小血管数を計測し、腫瘍血管新生の指標とした。同じ標本において EBV がコードする膜蛋白質 (LMP1) への抗体および血管新生促進因子であるインターロイキン (interleukin, IL) -8 への抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。発現の陽性率をスコア化し、発現の相関性を回帰分析を行ったところ、腫瘍微小血管数と LMP1 の発現 ($r=0.605$, $P<0.0001$)、及び IL-8 ($r=0.449$, $P=0.0053$) の発現との間に有意な正の相関を認めた。さらに、LMP1 の発現と IL-8 の発現との間にも有意な正の相関も認めた ($r=0.712$, $P<0.0001$)。また、NPC のモデルである NPC-KT 細胞から限界希釈法を用いて、EBV 陽性クローンおよび陰性クローンを分離し、IL-8 の発現の差を検討した。RT-PCR 法により EBV 陽性クローンにおける IL-8 の発現は陰性クローンに比較して増加していることが判明した。さらに、IL-8 プロモーターのルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL₃-IL-8) を EBV 陽性クローンおよび陰性クローンに形質導入し、ルシフェラーゼアッセイで調べたところ、EBV 陽性クローンにおける IL-8 プロモーター活性は陰性クローンにおける IL-8 プロモーター活性より 8 倍上昇していることが判明した。EBV の遺伝子産物のどれが IL-8 を誘導するかを調べるため、pcDNA3 ベクター (陰性コントロール)、EBV 核抗原 (EBV-determined nuclear antigen, EBNA) 1 を含む pCEP4 ベクター、EBV 核内小 RNA (EBV encoded small RNAs, EBERs) および LMP1 の発現プラスミドそれぞれを pGL₃-IL-8 プラスミドと共に細胞に発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。LMP1 による IL-8 プロモーターの活性は 293 細胞で、ベクターコントロールの 12 倍、EBV 陰性 NPC-KT 細胞クローンで、ベクターコントロールの 20 倍増加していた。一方、pcDNA3 ベクター、EBNA1 および EBERs の発現では IL-8 プロモーターの活性化がおこらなかった。さらに、IL-8 プロモーターの上流にある NF- κ B 結合領域および AP-1 結合領域の変異体を作製し、それぞれを LMP1 と共に C33A 細胞に導入し、LMP1 の作用ドメインをルシフェラーゼアッセイにより検討した。NF- κ B 結合領域の変異体では IL-8 プロモーターの活性は完全に阻害され、AP-1 領域の変異体では IL-8 プロモーター活性は部分的に阻害された。以上の結果から、上咽頭癌において EBV にコードされる LMP1 が IL-8 の発現を誘導して血管新生を誘導すること、そして LMP1 による IL-8 誘導には IL-8 プロモーター上流の NF- κ B 結合領域が必要不可欠であることが示唆された。

本研究は EB ウイルス膜蛋白質 LMP1 による IL-8 誘導と上咽頭癌血管新生について明らかにしたものであり、上咽頭癌の浸潤・転移機構の解明に役立つ価値ある論文と評価された。