主論文の要旨

A STING inhibitor suppresses EBV-induced B cell transformation and lymphomagenesis

（STING 阻害剤は EBV による B 細胞形質転換と
リンパ腫形成を抑制する）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
高次医用科学講座　臓器病態診断学分野
（指導：加留部　謙之輔　教授）
宮城 尚平

【緒言】

Epstein-Barr virus（EBV）は、ヘルペスウイルス科に属する DNA ウイルスで、人口の 90%以上に感染している普遍的なウイルスである。一方で腫瘍ウイルスとしても知られ、*in vitro* ではヒト B 細胞をリンパ芽球様細胞株（lymphoblastoid cell line, LCL）に形質転換する。臨床的には様々な悪性腫瘍の発生への関与が知られているが、特に臓器移植後に発症する EBV 関連リンパ増殖異常症（EBV-associated lymphoproliferative disorder, EBV-LPD）はしばしば致死的で、その発症病理の解明は重要な課題である。

Stimulator of interferon genes（STING）は、小胞体膜に局在する膜貫通タンパク質で、下流には TANK-binding kinase 1（TBK1）や Interferon regulatory factor 3（IRF3）が存在し、I 型インターフェロンや種々の炎症性サイトカイン産生に関わることが知られている。EBV は STING の機能を阻害することが示唆されているが、EBV-LPD の発症における STING の役割は未だ明らかではない。本研究ではその意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】

EBV-LPD モデルマウスに STING 阻害剤である C-176 を投与し、腫瘍形成および生存期間を検討した。同時に免疫染色、フローサイトメトリーでマウス腫瘍組織における STING 発現の有無を検討した。また、健常人由来末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）を用いて EBV による B 細胞形質転換における C-176 の効果を検討した。C-176 を投与した際の LCL の細胞増殖、STING の下流に位置する TBK1 のリン酸化、炎症性サイトカイン産生についても検討した。

次に、STING をノックダウンした T 細胞を樹立し、EBV を感染させた B 細胞と共培養することで、C-176 を投与した系と同様の表現型が得られるか検討した。

【結果】

EBV-LPD マウスは、重度免疫不全マウスに、EBV を感染させたヒト臍帯血由来単核細胞を腹腔内投与することによって樹立し、STING 阻害剤である C-176 を腹腔内投与した（Fig. 1A）。予想に反して C-176 投与によりマウスの生存期間は有意に延長し、体重変化も同様であった（Fig. 1BC）。また腹腔内腫瘍形成や脾腫も改善した（Fig. 1D）。一方でマウス血液中の EBV ゲノム定量では有意差を認めなかった（Fig. 1E）。組織学的には、マウス諸臓器での腫瘍浸潤は抑制された（Fig. 1F）。

次に、*in vitro* でも同様の表現型が得られるかを検討した。ヒト末梢血由来 primary B 細胞と LCL で STING の発現を検討したところ、LCL で STING の発現が認められた（Fig. 2A）。健常人由来 PBMC を用いて形質転換実験を行なったところ、C-176 投与によって形質転換効率が低下した（Fig. 2B）。一方で、C-176 は LCL の細胞増殖や ATP 代謝活性に影響を与えず（Fig. 2CD）、STING の下流で産生されるサイトカイン発現にも影響しなかった（Fig. 2E）。また STING の下流にある TBK1 のリン酸化に影響を与えなかった（Fig. 2F）。

EBV-LPD モデルマウスの腫瘍組織では、免疫染色によって STING の発現を認めた(Fig. 3A)。腫瘍組織の蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーによる解析では、LMP1 陽性細胞よりも CD3 陽性細胞で STING の発現が明らかであった(Fig. 3B-E)。

PBMC から単離した B 細胞に C-176 を反応させた場合は形質転換効率を低下させなかったが、T 細胞と共培養すると形質転換効率を低下させた(Fig. 4A)。さらにトランスウェルにより B 細胞と T 細胞間の直接的相互作用を阻害しても形質転換効率の低下が観察された(Fig. 4B)。

LCL で C-176 の STING 阻害効果が観察されなかったことから、ヒト primary T 細胞に異なる 2 つの STING 阻害剤(C176 及び H-151)を投与したところ、いずれも STING の下流にある TBK1 のリン酸化レベルを低下させた(Fig. 5AB)。また STING アゴニストである G10 を投与した実験では、primary T 細胞及び T 細胞由来のがん細胞株である Jurkat 細胞において TBK1 のリン酸化亢進がみられた(Fig. 5CD)。次に STING をノックダウンした T 細胞を樹立し(Fig. 5EF)、EBV を感染させた B 細胞と共培養を行なったが、C-176 でみられたような形質転換効率の低下はみられなかった(Fig. 5GH)。

【考察】

本研究では EBV-LPD の発症病理における STING の役割について、モデルマウスとヒト PBMC を用いた形質転換実験によって検討した。実験開始当初の予想に反して、C-176 を用いた STING の阻害は腫瘍形成を抑制した。このマウスモデルでの表現型は、*in vitro* における PBMC を用いた形質転換実験でも同様であった。一方でこれは B 細胞のみの実験系では観察されず、T 細胞と共培養したときに認めた。また B 細胞と T 細胞の直接的相互作用を阻害しても形質転換効率の低下がみられた。これらの結果から、STING は B 細胞と T 細胞間の液性因子を介した相互作用に働いていることが示唆された。

STING が LCL において高発現していることから、その増殖に与える影響について C-176 を用いて検討したが、リン酸化 TBK1 の発現レベルやサイトカイン産生に影響はみられず、細胞増殖にも影響しなかった。このことから、C-176 はむしろ T 細胞に発現している STING に作用したことが示唆された。T 細胞に STING 阻害剤を投与したところ、明瞭に STING の阻害効果が得られた。また STING をノックダウンした T 細胞株を樹立し、EBV 感染 B 細胞と共培養を行なったが、C-176 と同様の表現型は得られなかった。STING ノックダウン T 細胞株を樹立する過程で行なった CD3/28 受容体刺激により、T 細胞のサイトカイン放出に影響を与えたことがその理由と推測される。B 細胞形質転換に重要な液性因子については明らかでなく、今後詳細な検討が必要と考えられる。

【結語】

STING は EBV-LPD の発症過程において重要な役割を果たすことが示唆された。STING は B 細胞と T 細胞間の液性因子を介した相互作用に関与し、B 細胞形質転換や腫瘍形成に寄与することが示唆された。