

学位論文の要旨

氏名 LIU YUXIN

学位論文名 Exploring the Anti-EBV Potential of Suberoylanilide Hydroxamic Acid: Induction of Apoptosis in Infected Cells Through Suppressing BART Gene Expression and Inducing Lytic Infection

発表雑誌名 Virology
(巻, 初頁～終頁, 年) (in press)

著者名 Yuxin Liu, Aung Phyo Wai, Yuichi Iida, Tumurgan Zolzaya, Shunpei Okada, Hisashi Iizasa, Hironori Yoshiyama

論文内容の要旨

INTRODUCTION

Epstein-Barr virus (EBV) is associated with various cancers, including Burkitt lymphoma, natural killer/T-cell lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, and EBV-associated gastric cancer (EBVaGC). In these EBV positive tumors, EBV persistently infects cells and expresses limited number of viral genes as latent infection. However, drugs targeting EBV-positive tumors have yet to be developed. Among the approximately 10 latent EBV genes, *Bam*HI A Rightward Transcript (BART) miRNAs are consistently expressed regardless of the type of latency. BART microRNAs (miRNAs) constitute a cluster of 40 miRNAs located in the BART region of the genome. These BART miRNAs are known to play roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis induction, immune evasion, and so on. In addition, BART miRNAs suppress EBV lytic infection, which induces apoptosis. In this study, we searched for drugs that suppress BART gene promoter activity and investigated their effects.

MATERIALS AND METHODS

A vector containing the secretory NanoLuc gene inserted downstream of the BART gene promoter was introduced into cells, and a stable expression line was established. The established cells were treated with a drug library, and NanoLuc activity was measured. EBV-positive cells were treated with drugs that reduced enzyme activity, and the expression level of BART miRNA was measured by RT-qPCR. Additionally, the cell proliferation ability of EBV-positive cells was examined using the CCK-8 assay. Cell apoptosis was analyzed by FACS. Furthermore, the expression of apoptosis-inducing genes targeted by BART miRNA was examined by RT-qPCR and Western blot. These experiments were also performed in cells infected with an EBV strain lacking the lytic infection gene BZLF1 (BZLF1-KO).

RESULTS AND DISCUSSION

We identified suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), an inhibitor of histone deacetylase enzymes (HDAC), as an agent that suppresses BART promoter activity and transcription of BART miRNAs. SAHA treatment demonstrated a more pronounced inhibition of cell proliferation in EBV-positive gastric cancer cells compared to EBV-negative cells, affecting both p53 wild-type and mutant gastric epithelial cells. SAHA treatment enhanced lytic infection in wild-type EBV-infected cells, while also enhancing cell death in EBV BZLF1-KO-infected cells. It reduced BART gene expression by 85% and increased the expression of proapoptotic factors targeted by BART miRNAs. Treatment of EBV-positive cells with SAHA activated caspase 3. A similar phenomenon was observed in cells infected with EBV BZLF1-KO. These findings suggest that SAHA not only induces lytic infection but also leads to cell death by suppressing BART miRNA transcription and promoting the apoptotic program.

We demonstrated a remarkable similarity in both the half maximal inhibitory concentration

(IC₅₀) value and the capacity to induce apoptosis between wild-type EBV- and EBV BZLF1-KO-infected cells when exposed to SAHA. However, SAHA enhanced apoptosis independently of EBV lytic infection. Furthermore, the rate of apoptosis in SAHA-treated both EBV-infected cells and EBV BZLF1-KO-infected cells was similar, so we believe that the anti-EBV effect of SAHA is likely mediated by the decrease in BART miRNA expression. Consequently, SAHA not only triggers cell death in EBV-positive cells through lytic infection, but also amplifies apoptosis through suppressing the expression of BART miRNAs. Variants of EBV lacking various viral lytic genes have been associated with numerous instances of lymphomas and epithelial cancers.

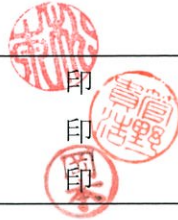
Consequently, SAHA is anticipated to exhibit potent antitumor effects against EBV-associated cancers in which it is difficult to induce apoptosis solely through inducing lytic infection.

CONCLUSION

This study demonstrated that the HDAC inhibitor SAHA induces cell death in EBV-positive cells both with and without leading to lytic infection. SAHA was also shown to have efficacy in p53 mutant EBV-positive gastric cancer cells. Given that certain EBV-related tumors lack p53 mutations and are infected with an EBV strain that never exhibits lytic infection, this drug could be effective for the treatment of various EBV-associated cancers.

論文審査及び最終試験又は学力の確認の結果の要旨

①・乙	氏名	Liu Yuxin
学位論文名	Exploring the Anti-EBV Potential of Suberoylanilide Hydroxamic Acid: Induction of Apoptosis in Infected Cells Through Suppressing BART Gene Expression and Inducing Lytic Infection	
学位論文審査委員	主査	松本 健一
	副査	管野 貴浩
	副査	岡本 貴行



論文審査の結果の要旨

多くの成人はエプスタイン・バーウイルス（EBV）に不顕性感染している。しかし、一部の感染者はバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、胃がんや上咽頭がん等のウイルス陽性腫瘍を発症する。これまでのところ、EBV感染を予防するワクチンや、EBV陽性腫瘍を特異的に標的とする薬剤は開発されていない。本研究では、EBV陽性腫瘍を特異的に標的とする薬剤の探索を目指し、*Bam*HI A Rightward Transcript (BART) miRNAsに注目した。BART miRNAs は全ての EBV 陽性腫瘍で発現し、ウイルスの溶解感染や宿主細胞のアポトーシスを抑制することが知られている。しかしBART miRNAsは40種もあり、その多くは機能が重複している。そこで、申請者は全てのBART miRNAsの発現を制御する遺伝子プロモーター領域に着目した。BART miRNAsの遺伝子プロモーター領域の下流に分泌型NanoLuc遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を作製し、1,226種類ものFDA承認薬を用いて、各薬剤に対するBART miRNAs遺伝子のプロモーター活性を調べた。その結果、プロモーター活性を促進する薬剤26種、一方抑制する薬剤3種を同定した。同定した薬剤の一つの、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤・スベロイルアニリドヒドロキサム酸（SAHA）は、BART miRNAsプロモーター活性とBART miRNAsの転写を抑制することが明らかとなった。またSAHAは、腫瘍抑制因子であるp53非依存的にEBV感染細胞の細胞増殖を抑制することが明らかとなった。さらにSAHAは、EBV感染細胞の溶解感染を促進し、溶解感染非依存的にEBV感染細胞のアポトーシスを促進することが明らかとなった。次に、SAHAによるEBV感染細胞におけるアポトーシス促進機構を調べたところ、SAHA処理により、EBV感染細胞においてBART miRNAsの転写を抑制し、その結果、BART miRNAsの標的遺伝子であるアポトーシス促進遺伝子の発現が亢進されることが明らかとなった。以上の結果よりSAHAは、溶解感染を促進するだけでなく、BART miRNAs 転写を抑制することにより、EBV感染細胞のアポトーシスを促進させることが明らかとなった。BART miRNAsの発現は腫瘍のみならず、重症の伝染性単核球症や、慢性活動性EBV感染症などの難治性疾患でも認められる。SAHA及びSAHAに関連した薬剤は、EBV関連疾患全般に有用な可能性が示唆された。

最終試験又は学力の確認の結果の要旨

申請者は、EBVのBART miRNAsの転写を抑制するHDAC阻害剤の一つのSAHAを見出し、EBV感染細胞におけるSAHAによるアポトーシス促進の分子機序を明らかにした。本研究は新たなEBV感染治療薬の開発に繋がる重要な研究であり、審査時の質疑応答も適切で関連知識も豊富なことから、学位授与に値すると判断した。

(主査 松本健一)

EBV感染に関連し、BART miRNAは溶解感染とアポトーシスを抑制する。申請者は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤SAHAがBARTプロモーターとmiRNA転写を抑制し、EBV陽性細胞の増殖を強く抑制することで、BART遺伝子発現を減少させ、アポトーシスを促進させることを明らかとした。これにより、SAHAはEBV陽性腫瘍の治療に有望である可能性を示唆した。周辺知識も豊富であり、学位授与に相応しいと判断した。

(副査 管野貴浩)

申請者は、BART miRNAのプロモーター活性を指標として、ライブラリからSAHAを同定した。さらに、SAHAがEBV感染細胞におけるアポトーシスを促進する作用メカニズムを明らかにするなど、EBV関連疾患に対する有用性を示す優れた研究である。豊富な関連知識を備え、質疑応答も的確であり、学位授与に値すると判断した。

(副査 岡本貴行)

(備考) 要旨は、それぞれ400字程度とする。