

Expressions of Epstein-Barr virus Related Factors and Angiogenic Factors in Nasopharyngeal Carcinomas

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9286

上咽頭癌における Epstein-Barr ウイルス関連因子および 血管新生因子の発現に関する研究

金沢大学医学部医学科耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 俊教授)

脇 坂 尚 宏

ホルマリン固定, パラフィン包埋した上咽頭癌原発巣生検標本31例 (扁平上皮癌1例, 分化型非角化癌22例, 未分化癌7例, 腺癌1例) を対象として, 上咽頭癌における血管新生と所属リンパ節転移との関連性について検討した。腫瘍内微小血管を免疫組織化学的に抗フォン・ウィルブランド因子 (von Willebrand factor, vWF) 抗体を用いて標識し, 光学顕微鏡下に200倍の視野で, 組織内で最も微小血管の多い部位についてその数を計測して, それを上咽頭癌における血管新生の指標とした。血管新生因子の内, 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) および形質変換増殖因子 (transforming growth factor, TGF) - α の発現について, 免疫組織化学法にて検索した。さらに, Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) と血管新生との関連性についても検索するため, EBV がコードする核内小RNA (EBV encoded small RNAs, EBERs) の発現を生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法により, また, 潜伏膜蛋白-1 (latent membrane protein-1, LMP-1) の発現を免疫組織化学法により検索した。腫瘍内微小血管数と, 所属リンパ節転移との間に有意な正の相関を認めた。bFGF, VEGF, TGF- α および LMP-1 の発現は, 腫瘍内血管数と有意な正の相関を示し, VEGF および TGF- α の発現は, 所属リンパ節転移とも有意な正の相関を示した。重回帰分析の結果, LMP-1 は, 上咽頭癌における微小血管数に最も影響を与える因子であった。以上の事より, 上咽頭癌のリンパ節転移において血管新生は重要な役割を果たしており, さらに, LMP-1 は上咽頭癌の血管新生に重要な役割を果たしている事が示唆された。

Key words nasopharyngeal carcinoma, angiogenesis, metastasis, Epstein-Barr virus related factors, angiogenic factors

血管新生 (angiogenesis) とは, 既存の血管から新しく毛細血管が形成される基礎的な過程である¹⁾。近年, 腫瘍の増殖, 転移と腫瘍血管新生との密接な関連性が明らかになって来ている。Folkman²⁾は, 血管新生を伴わない腫瘍は1-2mm³以上には増大せず, ところが血管新生が生じると急激に増大する事を示し, 腫瘍の増殖, 転移は血管新生に依存するという仮説を立てた。Lyng³⁾は, 腫瘍細胞の分裂率は毛細血管から離れるにつれて減少し, また, 血液供給が多い腫瘍では分裂率が高く, 低い腫瘍では壊死率が上がる事を示し, 腫瘍増殖は実際に血管新生に依存する事が判明した。Srivastava⁴⁾は, パラフィン包埋された皮膚悪性黒色腫標本を用いて, 免疫組織化学的方法により血管内皮細胞を標識し, 腫瘍内血管の数を計測して, 腫瘍の大きさおよび転移が腫瘍内血管数と相関する事を示し, ヒト悪性腫瘍の血管新生に関する研究に免疫組織化学的方法が有用である事を初めて示した。この様に, 免疫組織化学的に血管内皮細胞を標識する方法が考案されてから, パラフィンに包埋して保管されている標本を利用した研究が進められ, 乳癌⁵⁾, 脳腫瘍⁶⁾, 子宮頸癌⁷⁾, 大腸癌⁸⁾などで血管新生と臨床的背景因子

との関連性が明らかになってきている。腫瘍細胞が血管内皮細胞の増殖を刺激する事⁹⁾, さらにそれは腫瘍細胞から放出される因子による¹⁰⁾事が明らかとなり, Folkman²⁾は, その様な因子を腫瘍血管新生因子 (tumor-angiogenic factor) と名付けた。今日多くの腫瘍血管新生因子が分離同定されている¹¹⁾。

上咽頭癌とエプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の関連性については, Old¹²⁾が血清学的方法により初めて証明して以来, 免疫学的方法¹³⁾, 分子生物学的方法¹⁴⁾, 生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法¹⁵⁾によりほぼ明確になっている。上咽頭癌では他の頭頸部癌と比較して所属リンパ節に転移を来す割合が高く, 診断時には75%で既に転移を来している¹⁶⁾さらに, 上咽頭癌は粘膜下に浸潤性に発育する傾向を有し, 頸部リンパ節転移巣のみが顕在化している事も稀ではない。従って, 診断時にはすでに病期が進行している事が多く, その事が本疾患が予後不良である大きな要因となっている¹⁷⁾。

本研究では, 上咽頭癌の所属リンパ節転移は腫瘍内における血管新生の度合に依存するという仮説を立て, それを検証した。

平成8年11月29日受付, 平成9年1月10日受理

Abbreviations : bFGF, basic fibroblast growth factor; DAB, diaminobenzidine; EBER, EBV encoded small RNA; EBV, Epstein-Barr virus; EGFR, epidermal growth factor receptor; FGFR-1, fibroblast growth factor receptor-1; FITC, fluorescein isothiocyanate; Flk-1, fetal liver kinase-1; Flt-1, fms-like tyrosin kinase-1; ISH, *in situ* hybridization; LMP-1, latent membrane protein-1; KDR, kinase insert domain-containing receptor; PBS, phosphate-buffered saline; TGF- α ,

さらに血管新生を誘導する因子 (血管新生因子) の内、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) および形質変換増殖因子 (transforming growth factor, TGF) - α との関連性、EBV 関連因子である EBV がコードする核内小RNA (EBV encoded small RNAs, EBERs)、潜伏膜蛋白 (latent membrane protein, LMP) -1 との関連性についても検索した。

対象および方法

I. 対象

対象は、1977年6月から1996年5月まで、富山県立中央病院耳鼻咽喉科、石川県立中央病院耳鼻咽喉科、福井県立病院耳鼻咽喉科で上咽頭生検を施行され、上咽頭癌と判明した31例の腫瘍である。組織標本はいずれも10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋されていたもので、それぞれから厚さ4mmの切片を作成し、HE染色を行い病理組織学的に検討し、それに連続する切片をISH法、免疫組織化学法による検討に用いた。

II. 臨床背景因子についての検討

臨床病期分類は、国際癌連合 (Union Internationale Contre le Cancer, UICC) のTNM分類¹⁹⁾に従った。

III. 病理組織学的検討

1. 病理組織学的分類 (図1)

病理組織学的分類は光学顕微鏡下に行い、世界保健機構

(World Health Organization, WHO) の上咽頭癌分類¹⁹⁾に従った。すなわち、上咽頭癌の組織型を角化の有無により二つに分け、1) 扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma, WHO-1と表記)、2) 非角化癌 (non-keratinizing carcinoma) とし、さらに非角化癌を分化度の相違により2) i) 分化型非角化癌 (differentiated non-keratinizing carcinoma, WHO-2と表記)、ii) 未分化癌 (undifferentiated carcinoma, WHO-3と表記) とした。ただし、実際の分類に当たっては、細胞集団の中で全体として角化層の認められるものを角化とし、単一細胞で細胞質が好酸性を示し角化傾向をうかがわせるものは角化とはしなかった。また非角化癌の内わずかでも扁平上皮への分化をうかがわせるものはWHO-2とし、全く分化傾向の認められないもののみをWHO-3とした。

2. ISH法によるEBERsの検索

ISH法は、Parkら²⁰⁾、室野²¹⁾の方法に準じてマイクロプローブシステム (MicroProbe™ system) (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) を用いて施行した。

まずキシレン (和光純薬、大阪) とヘモデ (Hemo De) (藤沢薬品、大阪) を1:3に混合した溶液で100℃2分、4回反応させ脱パラフィンを行った後、100%エタノールにて6回洗浄した。ついでペプシン (Biomed, Foster City, USA) にて100℃で2分30秒反応させた。フルオレスセイン・イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識EBV (EBER) オリゴヌクレオチド (DAKO, Glostrup, Denmark) をプローブとし、25倍に

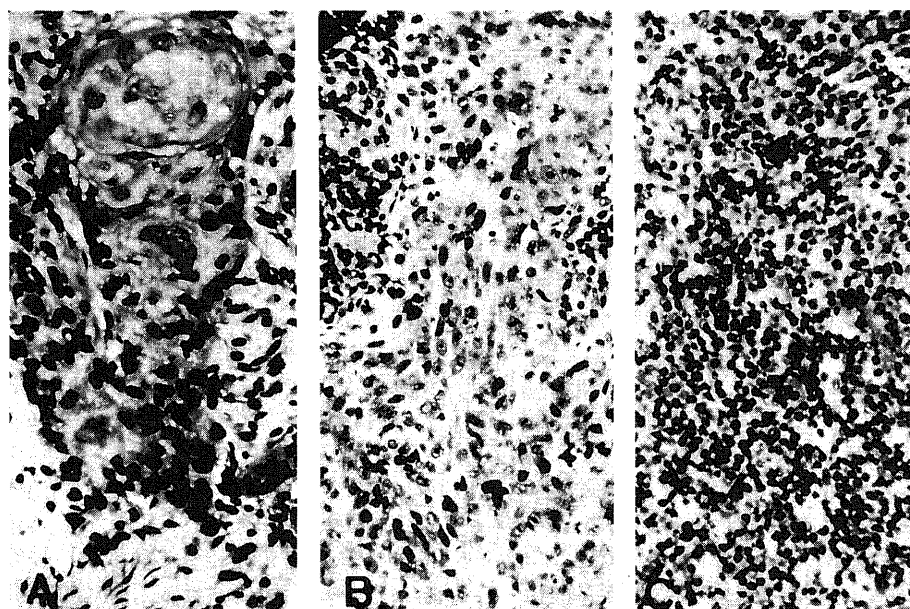


Fig. 1. Light microscopy of three histopathological types of nasopharyngeal carcinomas (HE stain, $\times 400$). (A) Squamous cell carcinoma (WHO-1). This type of nasopharyngeal carcinoma shows squamous differentiation with obvious keratin production and intercellular bridges. (B) Differentiated non-keratinizing carcinoma (WHO-2). This type of carcinoma has cells that show a maturation sequence and has little or no keratin production. The cells have fairly well-defined cell margins and show an arrangement that is stratified or paved. (C) Undifferentiated carcinoma (WHO-3). The tumor cells have oval or round vesicular nuclei and prominent nucleoli with indistinct cell margins. This type of carcinoma is heavily admixed with normal lymphocytes.

transforming growth factor- α ; TNF, tumor necrosis factor; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TRAF, TNFR-associated factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; vWF, von Willebrand factor; WHO, World Health Organization

希釈して、100℃で4分、80℃で6分、65℃で12分ハイブリダイゼーションを行った。アルカリフォスファターゼ標識抗FITC抗体 (50倍希釈, DAKO) を45℃で10分反応させた後、さらに、5-ブromo-4-クロロ-3-インドキシルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate) とニトロブルーテトラゾリウムクロライド (nitro blue tetrazolium chloride) を混合したBCIP/NBT (DAKO) を45℃で10分反応させ発色させた。メチルグリーンにて核染色を行い、型の如く脱水、透徹、封入し光学顕微鏡下の観察に用いた。

判定は定性的に陽性と陰性とに分類した。

3. 免疫組織化学法による検索

免疫組織化学法は、Hsuら²²⁾のアビジン・ビオチン染色 (avidin biotin peroxidase complex, ABC) 法に準じて行った。使用した一次抗体はすべて市販のもので、免疫動物、希釈倍数、特異性、トリプシン処理の有無、入手先は表1に示した。

まずパラフィン切片を型の如く脱パラフィン、親水化した後0.3%過酸化水素加メタノールにて30分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した。ホルマリン固定標本では、抗原性が低下する事があるため、適宜37℃、0.1%トリプシン (和光純薬) にて蛋白分解処理し抗原性の賦活化を行った。一次抗体を4℃で一晩反応させた後冷リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) で5分間、3回洗浄した。二次抗体としては、ビオチン化ウマ抗マウスIg G二次抗体 (X200, Vector Laboratories, Burlingame, USA) またはビオチン化ヤギ抗ウサギIg G二次抗体 (DAKO) を用い、室温で30分間反応させ、同様にPBSにて洗浄した。ついで、biotin-strept-avidin peroxidase complex (Strept ABC Complex) (DAKO) と30分間室温で反応させた後PBSで洗浄した。さらに、0.0006%過酸化水素加0.05%ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) (同仁化学研究所, 熊本) 溶液にて5分間もしくは10分間発色させた。核染色はメチルグリーンにて行い、型の如く脱水、透徹、封入し光学顕微鏡下の観察に用いた。

陽性対照組織として、抗フォン・ウィルブランド因子 (von Willebrand factor, vWF) 抗体、抗LMP-1抗体にはそれぞれ口蓋扁桃組織、上咽頭癌組織を用いた。さらに抗bFGF抗体、抗VEGF抗体、抗TGF- α 抗体の陽性対照としては、いずれも胎盤組織を用いた。胎盤標本については、金沢大学産科婦人科学講座井上 正樹教授の御好意により供与して頂いた。陰性対照としては、非免疫マウスIg G (DAKO) または、正常ヤギ血清 (DAKO) を用いた。

腫瘍内血管数の計測にはまず、10倍の視野下に抗vWF抗体

で標識された血管が腫瘍内で最も多いと思われる部位を設定し、200倍の視野の下で一視野内の血管の数を計測して、それを血管新生の指標とした。ただし、血管数の計測に当たり炎症部位は除外した。また、血管内皮細胞が一群として染色されたもので、他の群とは明らかに区別されるものは、その一群を単一の血管として計測した。形態上、腫瘍内血管が分岐しているものについても単一の血管として計測した。

LMP-1については定性的に、腫瘍細胞の一部でも特異的免疫反応性が見られたものを陽性、全く特異的免疫反応性が認められないものを陰性とした。

bFGF, VEGFおよびTGF- α については、一つの切片における免疫反応陽性細胞の多寡を、全腫瘍細胞に対して免疫反応陽性の腫瘍細胞の割合が最も多いと思われる3カ所について光学顕微鏡で200倍の視野下に全腫瘍細胞に対する免疫反応陽性細胞の比を算出し、さらに3カ所の平均値を算出してそれに100を乗じて百分率で示し、その腫瘍組織における腫瘍細胞の免疫反応陽性率とした。免疫反応陽性率について以下の様なスコアを与え表現した。すなわち免疫反応陽性率が、0%以上10%未満のものをスコア0、10%以上20%未満のものをスコア1、20%以上30%未満のものをスコア2、30%以上40%未満のものにはスコア3、の様に示し順次0から9までのスコアを与え、さらに免疫反応陽性率が100%のものにはスコア10を与えた。

IV. 統計学的処理

TNM分類については、T因子をT1, T2, T3, T4とし、N病期をN0, N1, N2a, N2b, N2c, N3とし、M病期をM0, M1として、実際の統計学的処理にあたっては、順序変数として扱った。増殖因子については、前述のスコアを順序変数として扱った。さらに、微小血管数は間隔変数として扱い、EBERs, LMP-1の発現の有無についてはそれぞれを名義変数として扱った。

名義変数から成る二因子間の検定で、期待値がすべて5以上のものではカイ二乗 (χ^2) 検定を用い、期待値が5未満のものを含むものではFisherの直接確率計算法による検定を用いた。名義変数から成る二群間における連続変数 (順序変数もしくは間隔変数) の有意差の検定にはMann-Whitney U検定を用いた。連続変数からなる二因子間の相関については、Spearmanの順位相関係数で示した。さらに、微小血管数に影響を及ぼす因子として、LMP-1, bFGF, VEGF, TGF- α について重回帰分析を行った。ただし重回帰分析にあたりLMP-1については、陰性例に0、陽性例に1を与えてダミー変数として処理した。いずれも、危険率 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

Table 1. List of used primary antibodies

Antibody against	Dilution	Trypsinization	Source
LMP-1 (monoclonal)	1 : 50	+	DAKO, Denmark
vWF (polyclonal)	1 : 200	+	DAKO, Denmark
bFGF* (polyclonal)	1 : 100	+	Calbiochem, USA
VEGF† (polyclonal)	1 : 200	+	Santa Cruz Biotechnology, USA
TGF- α (monoclonal)	1 : 100	-	Calbiochem, USA

monoclonal, monoclonal antibody is derived from a mouse; polyclonal, polyclonal antibody is derived from a rabbit; +, trypsinization was performed; -, trypsinization was not performed; *, anti bFGF antibody is specific for 18kDa protein; †, anti VEGF antibody reacts with the 121, 165 and 189 amino acid splice variants of VEGF.

また、WHO-1もしくは腺癌はそれぞれ1例ずつであったため、それらについては各組織型間の関連について、統計学的検討は行わなかった。

成 績

I. 病理組織学的分類

上咽頭癌原発巣生検標本31例の内訳は、WHO-1が1例(3.2%)、WHO-2が22例(71.0%)、WHO-3が7例(22.6%)、腺癌が1例(3.2%)であった。

II. 染色像、および各病理組織型との関連

1. vWF

血管内皮細胞が特異的に染色され、微小血管数の計測が可能であった。微小血管は主に腫瘍間質に存在しており、WHO-2では胞巣を取り囲み(図2)、またWHO-3では散在する傾向を認めた(図3)。

2. EBERs

EBERsが陽性の腫瘍組織では、ほぼ全ての腫瘍細胞の核に一致して染色が認められた(図4)。

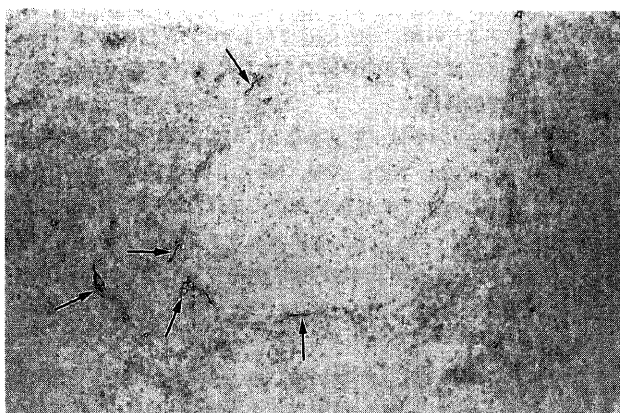


Fig. 2. Immunohistochemical staining for von Willebrand factor antigen in differentiated non-keratinizing carcinoma (WHO-2) (counterstained with methyl green, $\times 200$). Microvessels highlighted by staining endothelial cells are shown to localize at the tumor stroma encircling each of tumor cell nest ($\rightarrow$).

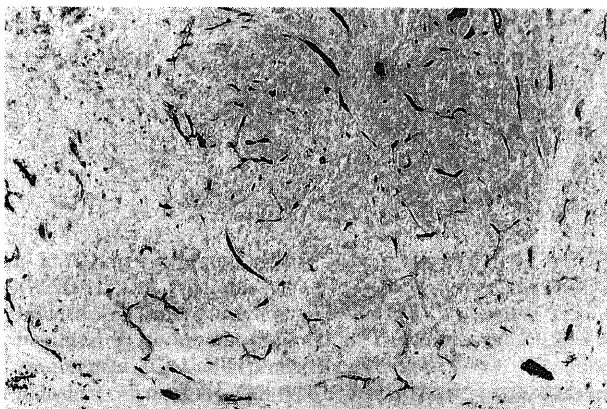


Fig. 3. Immunohistochemical staining for von Willebrand factor in undifferentiated carcinoma (WHO-3) (counterstained with methyl green, $\times 200$). Microvessels highlighted by staining endothelial cells exhibit no pattern relating vessel location to tumor cells in contrast to that of WHO-2.

3. LMP-1

LMP-1が陽性の腫瘍組織では、一部の腫瘍細胞の細胞膜および細胞質の両者、もしくは細胞膜のみに一致して免疫反応性を認めた(図5)。

4. bFGF

bFGFは主に腫瘍細胞質に一致して認められ(図6)、一部の腫瘍組織では腫瘍細胞核にも免疫反応性を認めた(図7)。

5. VEGF

VEGFは主に腫瘍細胞質に一致して認められ、腫瘍細胞が胞巣を形成するものでは、胞巣周辺部の腫瘍細胞で中心部の腫瘍細胞よりも免疫反応性が強い傾向があった(図8)。壊死部周辺の染色像は様々で、特に一定した傾向は認めなかった。

6. TGF- α

TGF- α は、腫瘍細胞質に一致して認められた(図9)。

III. 微小血管数、EBV関連因子、血管新生因子の発現と各病理組織型の関連

1. 微小血管数

微小血管数と各病理組織型の間には関連を認めなかった。



Fig. 4. *In situ* hybridization for Epstein-Barr virus encoded small RNAs (EBERs) in nasopharyngeal carcinoma (counterstained with methyl green, $\times 100$). Positive reaction is located exclusively in the nuclei of almost all the tumor cells.

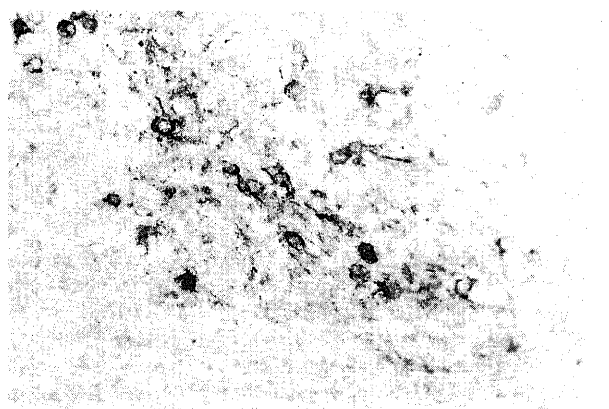


Fig. 5. Immunohistochemical staining for Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in nasopharyngeal carcinoma (counterstained with methyl green, $\times 200$). Immunoreactivity is present in some of the tumor cells with membrane-associated staining patterns.

2. EBERs

EBERsは、WHO-2で22例中16例 (72.7%), WHO-3で7例中6例 (85.7%) で、陽性であったが、WHO-1および腺癌ではいずれも陰性であった。EBERsの発現の有無は、各病理組織型間で有意な関連性を認めなかった。

3. LMP-1

LMP-1は31例中8例 (25.8%) で陽性であり、各組織型別では、WHO-2では22例中7例 (31.8%), WHO-3では7例中1例 (14.3%) で陽性であったが、WHO-1および腺癌ではいずれも陰性であった。LMP-1の発現の有無は、各組織型間で有意な関連性を認めなかった。

4. bFGF, VEGF, TGF- α

bFGF, VEGF, TGF- α の発現はいずれも、各病理組織型間で有意な関連性を認めなかった。

Ⅳ. 微小血管数とT, N, M因子との相関

微小血管数はN因子との有意な正の相関を認めた (Spearmanの順位相関係数は0.40, $p=0.0297$) が、他の因子とは相関を認めなかった。

Ⅴ. EBV関連因子の発現とT, N, M因子との関連

EBERsが陰性例 (平均順位は、19.17) では、陽性例 (平均順

位は、14.71) よりも有意にM因子が進行していた ($p=0.0328$, Mann-Whitney U検定)。その他の因子とEBERsの陽性率の間には有意な関連性を認めなかった。

LMP-1の発現の有無は、いずれの因子間でも有意差を認めなかった。

Ⅵ. 血管新生因子の発現とT, N, M因子との相関 (表2)

VEGFの発現 ($p=0.0155$), TGF- α の発現 ($p=0.0472$) は、いずれもN因子との間に有意な正の相関を認めたが、他の因子との間には相関を認めなかった。

Ⅶ. 微小血管数とEBV関連因子の発現との関連 (表3)

LMP-1陽性群では、陰性群と比較して、有意に微小血管数が多く認められた ($p=0.0157$)。

微小血管数とEBERsの発現の有無の間には関連を認めなかった。

Ⅷ. 微小血管数と血管新生因子の発現との相関

微小血管数は、bFGF (Spearmanの順位相関係数は0.40, $p=0.0305$), VEGF (Spearmanの順位相関係数は0.40, $p=0.0286$), TGF- α (Spearmanの順位相関係数は0.57, $p=0.0020$) の発現との間にそれぞれ有意な正の相関を認めた。

Ⅸ. EBERsとLMP-1との関連

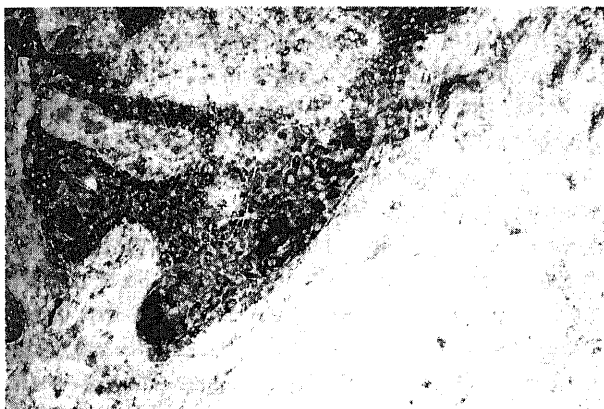


Fig. 6. Immunohistochemical staining for basic fibroblast growth factor (bFGF) in nasopharyngeal carcinoma (counterstained with methyl green, $\times 200$). Immunoreactivity is present in the cytoplasm of tumor cells.

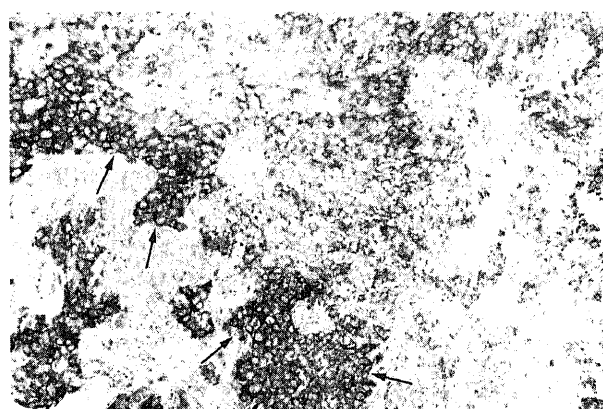


Fig. 8. Immunohistochemical staining for VEGF in infiltrating nasopharyngeal carcinoma (counterstained with methyl green, $\times 200$). Strong VEGF staining intensity is seen at the periphery of the invasive tumor nest ($\rightarrow$).

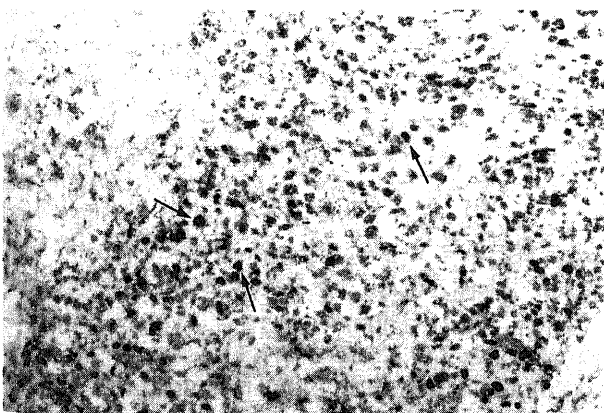


Fig. 7. Immunohistochemical staining for bFGF in nasopharyngeal carcinoma (counterstained with methyl green, $\times 200$). Immunoreactivities are present in the cytoplasm and nuclei ($\rightarrow$) of the tumor cells.



Fig. 9. Immunohistochemical staining for transforming growth factor- α (TGF- α) in nasopharyngeal carcinoma (counterstained with methyl green, $\times 200$). The tumor cells express immunoreactive TGF- α in their cytoplasm.

Table 2. Correlations between angiogenic factors, and T, N and M factors

Angiogenic factors	Spearman's rank correlation coefficient		
	T factor	N factor	M factor
bFGF	0.30	0.17	0.03
TGF- α	-0.26	0.36*	-0.03
VEGF	0.33	0.44*	-0.19

* $p < 0.05$ (Spearman's rank correlation test).

Table 3. Correlations between expression of EBV-related factors and microvessel counts

EBV-related factors	Expressions	Mean rank of microvessel counts
EBERs	Positive	17.98
	Negative	11.17
LMP-1	Positive	22.69
	Negative	13.67

* $p < 0.05$ (Mann Whitney U test).

Table 4. Correlations between expression of angiogenic factors

Angiogenic factors	Spearman's rank correlation coefficient	
	TGF- α	VEGF
bFGF	0.55*	0.51*
TGF- α		0.44*

* $p < 0.05$ (Spearman's rank correlation test).

Table 5. Independent variables in multiple regression analysis

Titles of independent variables	Mean score (SD)
LMP-1	0.26 (0.45)
bFGF	6.85 (2.84)
VEGF	7.281 (2.82)
TGF- α	6.31 (2.81)

Mean value of microvessel counts, dependent variable, is 57.61 (SD, 49.63).

Table 6. Results of multiple regression analysis between independent variables and microvessel counts

Titles of independent variables	Standard regression coefficient
LMP-1	0.401*
bFGF	0.313
VEGF	0.106
TGF- α	0.167

Multiple correlation coefficient is 0.61 ($p = 0.0138$).* $p < 0.05$ (multiple regression analysis).

LMP-1はEBERs陽性の22例中8例(36.4%)で陽性であった。EBERsが陰性のものは、すべてLMP-1も陰性であった。

X. EBV関連因子の発現と血管新生因子の発現との関連

EBV関連因子の発現の有無と血管新生因子の発現との間には関連性を認めなかった。

XI. 血管新生因子の発現相互の関連性(表4)

bFGF, TGF- α およびVEGF間では、それぞれ相互に有意な正の相関を認めた。

XII. 重回帰分析(表5, 6)

LMP-1が、微小血管数に最も影響を与える因子であり、かつ、統計的に唯一有意であった(標準回帰係数=0.401, $p = 0.0292$)。重相関係数は0.610 ($p = 0.0138$)であった。

考 察

近年、腫瘍血管新生とリンパ節転移との関連が明らかになって来ている⁵⁾²⁰⁾。Smithら²⁰⁾はウサギ角膜にインディア・インクを注入し、角膜に血管新生が始まるまではインクは角膜にとどまるが、血管新生後に初めて同側のリンパ節にインクが移行した事より、血管新生がリンパ節転移に深く関与する事を示した。

本研究では腫瘍血管新生すなわち微小血管数とN因子の進行度との間に有意な正の相関を認め、上咽頭癌における腫瘍血管新生とリンパ節転移との関連性が示唆された。一方、Roychowdhuryら²⁰⁾は、微小血管数計測による上咽頭癌における同様の研究を行ったが、微小血管計測数とN因子の間には有意な相関は認めず、本研究とは異なった結果となった。彼らの研究ではWHO-1が47%を占めたのに対し、本研究のそれはわずか3%であった事、WHO-2および3はWHO-1と比較して初期からリンパ節転移を来す事¹⁰⁾より、対象の病理組織型の分布の相違がこの様な異なった結果となった理由として考えられる。本研究では腫瘍内微小血管数とM因子との間には関連性を認めなかった。TNM分類は診断時のもので、仮に遠隔転移があっても直径が1 mm以下であれば、臨床上的検出は不可能である。剖検によるM因子についての報告をまとめると²⁰⁾、遠隔転移は87%で認められ、本研究の13%とは大きな隔たりがある。本研究で血管新生とM病期について関連性を認めなかった事は、診断時において全例で遠隔転移を正確に検出する事が極めて困難であるためと考えられる。

bFGF蛋白は極めてヘパリン親和性の高いポリペプチドであり、mRNAの選択的切断により分子量が18 kDa, 22 kDa, 22.5 kDa, 24 kDaの4種類が同定されている²⁷⁾²⁸⁾。bFGF蛋白はN末端付近に分泌のためのシグナル配列をもたないが、それでも低分子量型bFGF(18 kDa)は細胞外に分泌され、細胞表面受容体を介して作用すると考えられている。この様な分泌機構については、未だ明らかではないが、細胞表面または細胞外基質の硫酸化多糖に結合して細胞外に出て、ヘパリン(heparin)分解酵素やプラスミン(plasmin)の様な酵素によって遊離されるという機序が考えられている²⁹⁾。本研究では、抗bFGF抗体として低分子量型と特異的に反応するものを使用した。

bFGF蛋白は、中胚葉および神経外胚葉由来の細胞においてDNA合成能、増殖能を持ち、血管内皮細胞に対してはその増殖を誘導し、内皮細胞の運動性、遊走、分化に関与する³⁰⁾。この様なbFGFの血管新生作用は、腫瘍組織においても証明されている³¹⁾³²⁾。本研究では、bFGFの発現と腫瘍組織内微小血管数

の間に有意な正の相関を認めたことより、bFGFは上咽頭癌における血管新生に重要な役割を果たしている事が示唆された。Janotら³⁰⁾は頭頸部扁平上皮癌におけるbFGFと血管新生との関連性について調べたが、bFGFの発現と腫瘍血管新生との間に関連性を認めなかった。しかし、彼らの対象とした頭頸部扁平上皮癌には上咽頭癌は含まれず、本研究の結果とは必ずしも矛盾しない。

上咽頭癌における血管新生とbFGFの関連性が示唆されたにもかかわらず、本研究ではbFGFの発現とN因子の進展との間には相関を認めなかった。Chenら³⁰⁾は上咽頭癌培養細胞において、bFGFがFGFR-1を介して自己分泌機構により腫瘍細胞の増殖を抑制する事を示した。つまり上咽頭癌においては、bFGFは血管新生を誘導する事によりリンパ節転移を促進するが、一方で腫瘍細胞の増殖を抑制する事によりリンパ節転移を抑制する事から、リンパ節転移は両者の拮抗関係により成立する可能性が示唆される。さらにFGFR-1はbFGFと結合後、核に輸送される事が知られている³⁵⁾。本研究において検出した低分子量型bFGFが腫瘍細胞核においても免疫反応性を有した事は、FGFR-1に結合後、核に輸送されたbFGFを検出した可能性を示しており、Chenらが述べた様にbFGFが腫瘍細胞により分泌され、それがFGFR-1への結合を介して腫瘍細胞に作用している事と矛盾しない。

VEGF蛋白は、腫瘍腹水中から初めて単離された分子量34-45kDaの糖蛋白で、その分裂増殖活性は血管内皮細胞に特異的である³⁶⁾³⁷⁾。VEGFの受容体である胎児肝活性化因子-1 (fetal liver kinase-1, Flk-1)/活性化因子挿入領域含有受容体 (kinase insert domain-containing receptor, KDR) およびfms様チロシン活性化因子-1 (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1) は、ともに血管内皮細胞に特異的に発現している³⁸⁾³⁹⁾。VEGFは血管の透過性を亢進させる事も知られており、別名血管透過性因子 (vascular permeability factor, VPF) と呼ばれている。VEGFのmRNAの選択的切断により四種類のmRNAが存在する事が判明しており、それぞれが121, 165, 189および206のアミノ酸から成るポリペプチド (polypeptide) をコードしており、その主なものは121, 165, 189アミノ酸型である⁴⁰⁾。

VEGFの発現と悪性腫瘍との関連性については、子宮頸癌⁷⁾、大腸癌⁸⁾、脳腫瘍⁹⁾、乳癌¹¹⁾などで指摘されている。VEGFは腫瘍組織中で血管新生を誘導し間接的に腫瘍増殖を促進するが、腫瘍の増殖、変異には直接的には影響を与えない⁴²⁾⁴³⁾。本研究では、VEGFの発現は微小血管数およびN因子との間に有意な正の相関を認めた。さらにVEGFの発現は胞巣中心部よりも周辺部で強く、腫瘍内微小血管は、腫瘍胞巣を取り囲む様に存在する傾向を認めた。以上の事よりVEGFは、上咽頭癌において血管新生を介して腫瘍のリンパ節転移に寄与している事が示唆された。

VEGFの発現を誘導する因子として、組織の虚血の関与が指摘されている⁴⁴⁾。実際にVEGFの発現は、虚血状態にある腫瘍壊死組織周辺で増強している事が報告されている⁴⁵⁾。本研究では、腫瘍の壊死部とVEGFの発現には一定の傾向は認められなかった。上咽頭癌におけるVEGFの発現に関しては虚血の関与よりも、むしろ上咽頭癌そのものの腫瘍特性である事が示唆された。

TGF- α は分子量5.5kDaのポリペプチドである。TGF- α は、表皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)

への結合能を指標として同定された⁴⁶⁾。この様なリガンド (ligand) と受容体の発現により、腫瘍細胞が自己分泌刺激により増殖する事は多くの悪性腫瘍で明らかになっている^{46) 48)}。TGF- α は血管新生にも深く関与する事が知られており、血管内皮細胞の増殖、遊走および血管の管腔形成に関与する事が判明している^{49) 50)}。本研究では腫瘍細胞におけるTGF- α の発現と微小血管数およびN因子との間に有意な正の相関を認め、TGF- α が上咽頭癌の血管新生およびリンパ節転移に関与している事が示唆された。

近年、血管新生能を有する各因子間による相互の発現誘導が明らかになって来ている⁵²⁾⁵³⁾。本研究においては、bFGF、TGF- α 、VEGFの発現に有意な正の相関関係を認め、上咽頭癌においてもその様な相互誘導系が存在する可能性が示唆される。

EBERsは、EBV遺伝子にコードされるポリA鎖の無い低分子量のRNAで、EBER 1とEBER 2の二種類存在する⁵⁴⁾。1細胞当たり 10^7 個と最も豊富なEBV遺伝子転写産物であり、さらにホルマリン固定パラフィン包埋標本においても安定であるためホルマリン固定標本を利用したISHによるEBERsの検出が可能となった。EBERsは蛋白をコードせず、その機能は不明であるが、EBVの存在検出のための有用な指標とする事が出来る⁵⁵⁾。本研究ではEBERsの発現率は、WHO-2で72.7%、WHO-3で85.7%であり、各病理型におけるEBVの密接な関連性が示唆された。しかし、腫瘍細胞におけるEBERsの発現と微小血管数およびN因子との間には関連を認めなかった。この事から上咽頭癌において、EBERsの発現と血管新生およびリンパ節転移との関連性は否定的である。本研究ではEBERs陰性群で陽性群よりも有意にM因子が進行していた。しかし、前述の様に診断時に遠隔転移を検出する事は困難であり、EBERsの発現とM因子との関連については今後長期的な症例観察を含む検討を要する。

LMP-1はEBV関連膜蛋白の一つで、386個のアミノ酸から成る6回膜貫通型膜蛋白である⁵⁶⁾⁵⁷⁾。LMP-1遺伝子は、単独でラット培養線維芽細胞株に腫瘍原性形質変換を起こす事が出来る⁵⁸⁾。さらにLMP-1は、ヒト上皮細胞の分化を抑制する事⁵⁹⁾、Bリンパ球においてbcl-2の発現を誘導しアポトーシス (apoptosis) の回避により細胞を不死化する事⁶⁰⁾が知られている。これらの事よりLMP-1は細胞の腫瘍化、形態変化と密接な関連性を持つと考えられている。本研究ではLMP-1が発現している腫瘍では微小血管数は有意に多かった事より、LMP-1は上咽頭癌における腫瘍化や分化に影響を及ぼす以外に、血管新生誘導能を持つ可能性が示唆された。また、重回帰分析によりLMP-1は本研究で検索した他の増殖因子以上に血管新生に寄与していることより、LMP-1は上咽頭癌における血管新生において重要な役割を果たしており、EBVがLMP-1の発現を介して、上咽頭癌における血管新生に密接に関与している事が示唆された。LMP-1は膜関連蛋白である⁵⁶⁾ため、LMP-1が直接的に血管内皮細胞の増殖を刺激するとは考えにくく、むしろLMP-1が、増殖因子受容体の様な細胞膜に局在する何らかの因子の発現を介して、もしくはその下流の情報伝達系を介して腫瘍細胞における血管新生因子の合成を刺激して腫瘍組織における血管新生を誘導しているものと思われる。Millerら⁶¹⁾はLMP-1がEGFRの発現を転写レベルで活性化する事を示した。上咽頭癌はリンパ球浸潤が著しく血管透過性に富んだ腫瘍であると考えられる

事¹⁹⁾, TGF- α および VEGF の両者を発現している事で, 乾癬と類似している⁵²⁾. しかし, 本研究では, TGF- α と VEGF の発現は有意な正の相関を示したが, TGF- α および VEGF の発現はいずれも LMP-1 の発現の有無とは関連性を認めず, 乾癬で認める様な TGF- α および EGFR の発現を介した VEGF の発現誘導機構の存在は否定的である. 近年 LMP-1 が, 腫瘍壊死因子受容体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 族の細胞内領域に会合する TNFR 関連因子 (TNFR- α associated factor, TRAF) 族の蛋白と結合する事が判明した⁶²⁾. LMP-1 の C 末端細胞質領域の最初の 44 アミノ酸は, TRAF3 と直接会合する事が出来, また TRAF1 とは間接的に結合する事が出来る⁶³⁾. さらに TRAF3 は, TNFR 族の一つである TNFR I と結合して細胞の増殖を促進し⁶⁴⁾, また同じく TNFR 族である CD40 と結合して核因子- κ B の誘導などにより⁶⁵⁾, 細胞の増殖を活性化する. また一方で, LMP-1 の TRAF3 への会合が, TRAF3 と細胞死領域を有する TNFR II⁶⁴⁾ への結合と拮抗し, アポトーシスを回避する事が出来るとも考えられている. この様に, LMP-1 は腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) による刺激無しで TNFR の情報伝達系を利用して細胞の増殖を活性化する事が出来る⁶⁶⁾. 血管新生因子についても LMP-1 による TNFR 族情報伝達経路の活性化により, 本研究で検索した以外のものの発現が増強している可能性は有り得る. しかし, 現時点では LMP-1 による EGFR 以外の増殖因子受容体の発現誘導や血管新生因子の誘導を証明した報告は無い. 今後 LMP-1 を介した血管新生因子の発現機構について解明する必要がある.

結 論

上咽頭癌の原発巣 31 例について, 免疫組織化学法により腫瘍内微小血管数の計測, および LMP-1, bFGF, VEGF, TGF- α の発現について検索を行い, さらに ISH 法により EBERs の発現を検索して以下の結論を得た.

1. 腫瘍内微小血管数と N 病期とは有意な正の相関を示し, 上咽頭癌の所属リンパ節転移における血管新生の密接な関与が示唆された.

2. bFGF, VEGF, TGF- α はいずれも腫瘍内微小血管数と有意な正の相関を示した事より, これらの因子はいずれも上咽頭癌での血管新生において重要な役割を果たしている事が示唆された.

3. LMP-1 が陽性の腫瘍では, 陰性の腫瘍よりも有意に腫瘍内微小血管数が多く認められた. 一方, EBV の存在の有無の指標とした EBERs の発現の有無は, 腫瘍内微小血管数の多寡とは関連性を認めなかった. これらの事より EBV は LMP-1 の発現を介して, 上咽頭癌における血管新生に関与している事が示唆された.

4. 重回帰分析により LMP-1 が腫瘍内微小血管数に最も影響を与える因子であった事より, LMP-1 は, 上咽頭癌の血管新生において重要な役割を果たしている可能性が示唆された.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師古川 俊教授に深謝の意を表するとともに, 始終, 直接の御指導を賜りました耳鼻咽喉科教室 慶華留学生に深謝致します. また, 貴重な御助言, 御協力を賜りました第一病理学講座中西 功夫教授, 河原 栄講師, 耳鼻咽喉科教室吉崎 智一助手に心より感謝致します. 貴重な標本を提供して頂きました富山県立中央病院臨床病理科三輪 淳夫部長, 同病院

耳鼻咽喉科北川 和久部長, 石川県立中央病院病理科車谷 宏部長, 同病院耳鼻咽喉科徳田 紀久夫部長, 木村 恭之医長, 福井県立病院耳鼻咽喉科嘉藤 秀章医長に厚く御礼申し上げます. 最後に本研究の遂行に当たりご協力を頂きました耳鼻咽喉科教室西村 俊郎助手ならびに教室の皆様, 第一病理学教室の皆様に心より感謝致します.

文 献

- 1) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934, 1992
- 2) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* 285: 1182-1186, 1971
- 3) Lyng H, Skretting A, Rofstad EK. Blood flow in six human melanoma xenograft lines with different growth characteristics. *Cancer Res* 52: 584-592, 1992
- 4) Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 1205-1209, 1986
- 5) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastases-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 6) Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 55: 1189-1193, 1995
- 7) Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorack HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 87: 1237-1245, 1995
- 8) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascularendothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968, 1995
- 9) Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest* 15: 464-478, 1966
- 10) Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41: 111-124, 1968
- 11) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 12) Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF, de Harven E, Geering G, Williamson B, Clifford P. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1699-1704, 1966
- 13) Fahraeus R, Hu LF, Ernberg I, Finke J, Rowe M, Klein G, Falk K, Nilsson E, Yadav M, Busson P, Tursz T, Kallin B. Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 42: 329-338, 1988
- 14) Chang Y, Tyan YS, Liu ST, Tsai MS, Pao CC. Detection of Epstein-Barr virus DNA sequences in nasopharyngeal carcinoma cells by enzymatic DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28: 2398-2402, 1990
- 15) Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-

- encoded small RNAs by *in situ* hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9006-9010, 1986
- 16) Hsu MM, Tu SM. Nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. Clinical manifestation and results of therapy. Cancer 52: 362-368, 1983
 - 17) Peretz CA, Devineni VR, Marcial-Vega V, Marks JE, Simpson JR, Kucik N. Carcinoma of the nasopharynx: factors affecting prognosis. Int J Rad Oncol Biol Phys 23: 271-280, 1992
 - 18) UICC: Pharynx. In P Hermanek, LH Sobin (eds), TNM Classification of Malignant Tumours, 4th ed, p19-22, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1987
 - 19) Shanmugaratnam K. Histological Typing of the Upper Respiratory Tract and Ear, 2nd ed, p32-34, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1991
 - 20) Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ. Automated molecular pathology: one hour *in situ* DNA hybridization. J Histotechnol 14: 219-229, 1991
 - 21) 室野重之. 上咽頭癌における Epstein-Barr ウィルス遺伝子産物および p53 蛋白, bcl-2 蛋白の発現に関する研究. 十全医会誌 105: 187-202, 1996
 - 22) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. J Histochem Cytochem 29: 577-580, 1981
 - 23) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. Lancet 340: 145-146, 1992
 - 24) Smith SS, Basu PK. Mast cells in corneal immune reaction. Can J Ophthalmol 5: 175-183, 1970
 - 25) Roychowdhury DF, Tseng A, Fu KK, Weinberg V, Weidner N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and C-erbB2 expression. Cancer 77: 1419-1426, 1996
 - 26) Cvitkovic E, Bachouchi M, Armand JP. Nasopharyngeal carcinoma. Biology, natural history, and therapeutic implications. Hematol Oncol Clin North Am 5: 821-838, 1991
 - 27) Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murry J, Klagsbrun. Heparin affinity: purification of tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223: 1296-1299, 1984
 - 28) Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (bFGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6507-6511, 1985
 - 29) Vlodavsky I, Bar-Shavit R, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Fuks Z. Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? Trends Biochem Sci 16: 268-271, 1991
 - 30) Potgens AJG, Westphal HR, de Waal RMW, Ruiter DJ. The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. Biol Chem Hoppe-Seyler 376: 57-70, 1995
 - 31) Schultz-Hector S, Haghighyegh S. β -fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation. Cancer Res 53: 1444-1449, 1993
 - 32) Tannock IA. Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. Cancer Res 30: 2470-2476, 1970
 - 33) Janot F, El-Naggar AK, Morrison RS, Liu TJ, Taylor DL, Clayman GL. Expression of basic fibroblast growth factor in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with degree of histologic differentiation. Int J Cancer 64: 117-123, 1995
 - 34) Chen JK, Chao HH, Yang VC. Inhibition of the growth of a human nasopharyngeal carcinoma cell line by bFGF is mediated via FGFR-1. FASEB J 9: 1211-1219, 1995
 - 35) Zhan X, Hu X, Friedman S, Maciag T. Analysis of endogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells. Biochem Biophys Res Commun 188: 982-991, 1992
 - 36) Senger DR, Galli S, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219: 983-985, 1983
 - 37) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161: 851-858, 1989
 - 38) Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7533-7537, 1993
 - 39) Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. Proc Natl Acad Sci USA 90: 8915-8919, 1993
 - 40) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 146: 1029-1039, 1995
 - 41) Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. Cancer Res 56: 2013-2016, 1996
 - 42) Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillet N, Philips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. Nature 362: 841-844, 1993
 - 43) Ferrara N, Winer J, Burton T, Rowland A, Siegel M, Philips HS, Terrell T, Keller GA, Levinson AD. Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells. J Clin Invest 91: 160-170, 1993
 - 44) Schweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced hypoxia may mediate hypoxia-initiated

angiogenesis. *Nature* 359: 843-845, 1992

- 45) Patridge M, Green MR, Langdon JD, Feldman M. Production of TGF- α and TGF- β by altered keratinocytes, skin and oral squamous cell carcinomas-potential autocrine regulation of normal and malignant epithelial cell production. *Br J Cancer* 60: 542-548, 1989
- 46) Lin C, Woo A, Tsao MS. Expression of transforming growth factor- α in primary human colon and lung carcinoma. *Br J Cancer* 62: 425-429, 1990
- 47) Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara F. Epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 48: 137-141, 1988
- 48) Sainsbury JRC, Farndon JR. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1: 1398-1402, 1987
- 49) Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232: 1250-1253, 1986
- 50) Ito K, Ryuto M, Ushio S, Ono M, Sugeno A, Kuraoka A, Shibata Y, Kuwano M. Expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor couples with development of capillary network by human microvascular endothelial cells on matrigel. *J Cell Physiol*: 1995
- 51) Okamura K, Morimoto A, Hamanaka R, Ono M, Kohno K, Kuwano M. A model system for tumor angiogenesis: involvement of transforming growth factor- α in tube formation of human microvascular endothelial cells induced by esophageal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1471-1479, 1992
- 52) Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 180: 1141-1146, 1994
- 53) Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J. Neurosurg* 82: 864-873, 1995
- 54) Henderson EE. Physicochemical-viral synergism during Epstein-Barr virus infection: a review. *J Natl Cancer Inst* 80: 476-

483, 1988

- 55) Chao TY, Chow KC, Chang JY, Wang CC, Tsao TY, Harn HJ, Chi KH. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs as a marker for metastatic undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 78: 24-29, 1996
- 56) Fennewald S, van Santen V, Kieff E. Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J Virol* 51: 411-419, 1984
- 57) Leibowitz D, Wang D, Kieff E. Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* 58: 233-237, 1986
- 58) Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43: 831-840, 1985
- 59) Dawson CW, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* 344: 777-780, 1990
- 60) Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65: 1107-1115, 1991
- 61) Miller WE, Earp HS, Raab-Traub N. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 69: 4390-4398, 1995
- 62) Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP-1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80: 389-399, 1995
- 63) Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 15: 406-411, 1994
- 64) Tartaglia LA, Rothe M, Fu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73: 213-216, 1993

Expressions of Epstein-Barr virus Related Factors and Angiogenic Factors in Nasopharyngeal Carcinomas

Naohiro Wakisaka, Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Jusen Med Soc., 106, 105 — 115 (1997)

Key words nasopharyngeal carcinoma, angiogenesis, metastasis, Epstein-Barr virus related factors, angiogenic factors

Abstract

The present study was performed to examine the role of angiogenesis on metastasis in primary nasopharyngeal carcinomas. Formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens were obtained from 31 primary nasopharyngeal carcinomas comprising of one squamous cell carcinoma, 22 differentiated non-keratinizing carcinomas, 7 undifferentiated carcinomas and one adenocarcinoma. Intratumoral microvessels were highlighted by staining endothelial cells for von Willebrand factor (vWF) by immunohistochemistry. The microvessels were counted (per 200 × field) in the most active area of angiogenesis in light microscopy, as an index of angiogenesis in nasopharyngeal carcinomas. The specimens were also studied regarding the expressions of angiogenic factors including basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and transforming growth factor- α (TGF- α). In addition, the specimens were studied regarding the expressions of Epstein-Barr virus encoded small RNAs (EBERs) with in situ hybridization and that of latent membrane protein-1 (LMP-1) by immunohistochemistry to examine the role of Epstein-Barr virus on angiogenesis. The microvessel counts correlated positively and significantly with the grade of regional lymphnode metastases. The expression of bFGF, VEGF, TGF- α and LMP-1 showed significant and positive correlation with the microvessel counts, and the expression of VEGF and TGF- α also correlated significantly with the grade of regional lymphnode metastases. Multiple regression analysis showed that the expression of LMP-1 is the most important factor that affects the microvessel counts in nasopharyngeal carcinoma. These results suggest that angiogenesis plays a critical role in the development of regional lymphnode metastases in nasopharyngeal carcinoma. Furthermore, LMP-1 plays a key role in angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma.