

【総説】

第二回 金沢大学十全医学賞受賞論文

論文 「上咽頭がん高転移性の分子機構—Epstein-Barr ウイルス遺伝子発現との関連—」
 Analysis of molecular mechanism for highly metastatic feature of nasopharyngeal carcinoma.—association of Epstein-Barr virus gene expression—

金沢大学大学院医学系研究科感覚運動病態学 (耳鼻咽喉科学)

吉崎 智一 (よしざき ともかず)

はじめに

転移はがん患者の生命予後に直結する悪性腫瘍に特異的な現象である。転移は細胞間接着低下, 間質破壊, 運動能亢進, 血管新生誘導などの一連のステップからなる複雑な生体内反応の結果, 原発巣とは不連続な臓器において増殖する腫瘍の出現である。この現象は, これら一連のステップが転移促進的に働くことにより増強される。すなわち, がんが高転移性となるためには, これら一連のステップすべてが活性化される必要がある。

上咽頭がんはEpstein-Barr ウイルス (EBV) との病因論的関連が認められるユニークながんである。上咽頭がんの臨床的特徴は, 原発巣が無症状のうちから高率に頸部リンパ節に転移巣を形成することである。本研究のスタートは, 筆者が研修医時代に「なぜ上咽頭がんは他の頭頸部がんとちがって, こんなに早期から転移してくるのだろうか。」と疑問を持ったことから始まった。次に転機となったのは, バーキットリンパ腫の患者を診察したときであった。そのとき前述の疑問は「なぜ同じEBV関連腫瘍なのに, バーキットリンパ腫は原発巣がこんなに大きくなるのだろうか。」に変わっていった。

I. 上咽頭がんとバーキットリンパ腫のEBV遺伝子発現パターン

そこで, 上咽頭がんとバーキットリンパ腫ではEBV遺伝子発現が異なるのではないかと考えた。両者の遺伝子発現を比較したところ, EBV膜蛋白をコードするLMPがバーキットリンパ腫では発現しないが, 上咽頭がんでは発現していることが判明した(図1)。LMP2はウイルスの潜伏感染状態を保持することがメインファンクションとされていたのに対して, LMP1は形質転換能を持つがん遺伝子である。そこで, このLMP1発現が上咽頭がん高転移性の鍵を握ると当たりをつけた。

II. LMP1は転移の各ステップにどのような影響を与えたか。

このLMP1発現が上咽頭がんの高転移性に関与するとの仮説を立て, これら転移の各ステップにおいてLMP1はどのように作用するのかを順に検討した。

1) 間質破壊:

a) MMP9

IV型コラーゲンは基底膜の主成分である。臨床的に「がん」となるためにはこの基底膜の破壊は必須のステップである。そして, この基底膜の破壊能と腫瘍の転移能はさまざまながんにおいて相関することが報告されている。そこでまず, 基底膜の主成分IV型コラーゲンを特異的に分解するマトリックスメタロ

プロテアーゼ2および9 (MMP2, MMP9) に対するLMP1の影響を検討した。

各種EBV感染細胞におけるLMP1発現とMMP2およびMMP9の発現をウエスタンブロットおよびゼラチンザイモグラフィで検討したところ, LMP1発現とMMP9発現に非常に明確な相関が見られた(図2)。

そこで, EBV陰性細胞にLMP1を発現させたところ, MMP9が誘導されることが判明した。LMP1のMMP2発現に対する影響は観察されなかった(図3)。

さらに, ゲルシフトアッセイおよびCATアッセイによりLMP1は, 細胞性転写因子NF- κ BおよびAP-1を活性化してMMP9を転写レベルで誘導することが判明した¹。(図4, 5)。

LMP1は腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) II型受容体と類似の細胞内シグナル活性化機構を有する。LMP1は386アミノ酸からなり, CTAR1, CTAR2という細胞内シグナル活性化領域をもつ。これらの細胞内領域は各種のTNF関連活性化因子 (TNF Related Activation Factors, TRAFs) と相互作用を持つ。そして, CTAR1, CTAR2はおのおの独立して相加的にMMP9プロモーターを活性化することが判明した²。

b) MMP1

I型コラーゲンは間質の主成分である。MMP1は膜型MMPとともにI型コラーゲンを特異的に分解し転移促進的に作用する。そのため, がん細胞のMMP1発現レベルはそのがんの転移能と相関する。LMP1はNF- κ BおよびAP-1に加え細胞性転写因子ets-1を活性化する。そのなかでとくにets-1の活性化が転写レベルでのMMP1発現促進に重要な因子である。MMP1のプロモーター領域-1607に1G/2G SNPが存在し, 2G型はets-1結合領域を形成する。1G/1G遺伝子型を有する上咽頭がん患者においてMMP1発現は1G/2G, 2G/2G型にくらべ, 有意に低下していること, また, 有意に予後がよいことが判明した³。

2) 細胞接着および運動能:

MDCK細胞にLMP1を形質導入すると, MDCK細胞を肝細胞増殖因子 (hepatocellular Growth Factor, HGF) で処理したときと類似した性質へと形質転換がおこる。すなわち, コラーゲン管腔内で管腔形成能を発揮するようになる(図6)。さらに, LMP1発現によりMDCK細胞は細胞間の接着が低下し運動能が亢進する(図7)。このLMP1による運動能亢進の鍵となる細胞性因子はEts-1である。MDCK細胞にLMP1を導入するとEts-1が誘導される。一方で, 運動能亢進はEts-1を阻害すると抑制

EBV遺伝子発現

	核内抗原 (EBNA)						潜伏膜タンパク (LMP)	
	1	2	3A	3B	3C	LP	1	2
バーキットリンパ腫	+	-	-	-	-	-	-	+
上咽頭がん	+	-	-	-	-	-	+	-
日和見リンパ腫	+	+	+	+	+	+	+	+

図1. 各種EBV関連腫瘍におけるEBV遺伝子発現パターンの比較

バーキットリンパ腫由来細胞株のEBV遺伝子発現

細胞株	EBNA						LMP		MMP9
	1	2	3A	3B	3C	LP	1	2	
SAV1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PJHR-1	+	-	+	+	+	+	-	-	-
SAV III	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B95-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JUJeye	+	+	+	+	+	+	+	+	+

図2. 各種バーキットリンパ腫由来細胞株におけるEBV遺伝子発現の比較. 生体においてはEBNA1とLMP2に限局されるバーキットリンパ腫におけるEBV遺伝子発現は継代培養中にさまざまな遺伝子発現パターンを取る.

LMP1によるMMP9誘導と浸潤指数の変化

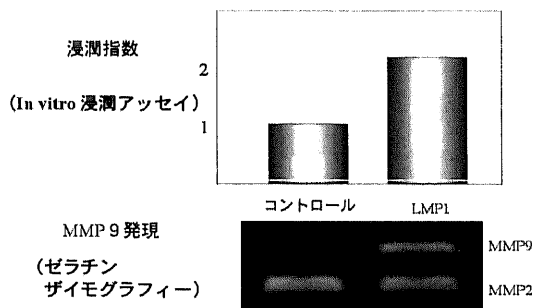


図3. 子宮頸癌由来C33A細胞にLMP1を形質導入すると、マトリゲルを通過する細胞のコロニー数が2.2倍となる。また、MMP-2発現量は増加しないがMMP9発現量は劇的に増加する。

LMP1による転写因子の誘導

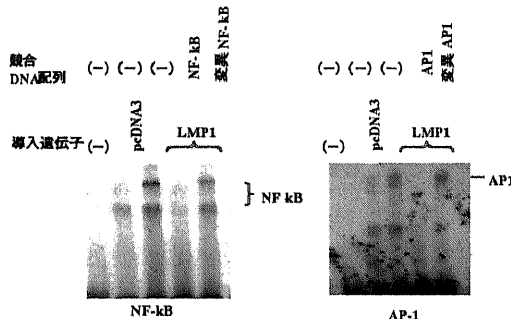


図4. ゲルシフトアッセイ. C33A細胞にLMP1を導入するとP³²標識NF-KBおよびAP-1結合配列結合物質が誘導される. この複合体は過剰の非標識プローブ投与により抑制される. (文献1より)

MMP9プロモーター変異と転写活性化能

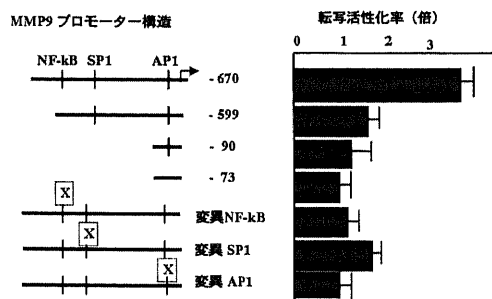


図5. CATアッセイによるMMP9プロモーター領域転写因子結合領域の評価. TATA box近傍のAP-1結合領域の欠失配列や変異を導入した配列ではLMP1によるMMP9転写誘導は廃絶する. (文献1より)

LMP1導入MDCK細胞における運動能の亢進

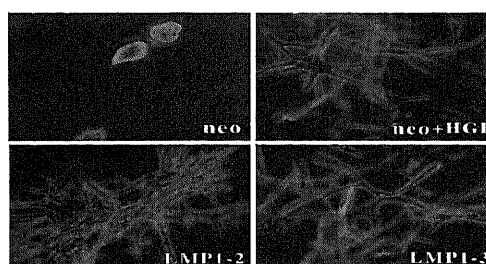


図6. コラーゲンゲル内3次元培養. neo; neomycin耐性遺伝子導入MDCK細胞. neo+HGF; neomycin導入細胞をHGF処理したところ、管腔形成をするようになる. LMP1-2, LMP1-3; LMP1を導入した2種類のMDCK細胞. HGF処理したと同様の管腔形成を認めるようになる. (文献4より)

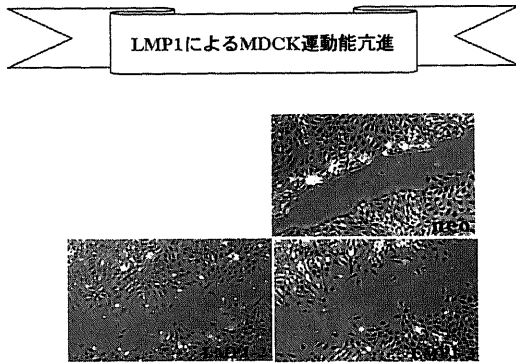


図7. Wound migration アッセイ. 培養シャーレの底面に溝を設け、辺縁からの細胞の運動を比較すると、LMP1導入クローンLMP 1-2とLMP 1-3はいずれも運動性が亢進している(培養8時間後). (文献4より)

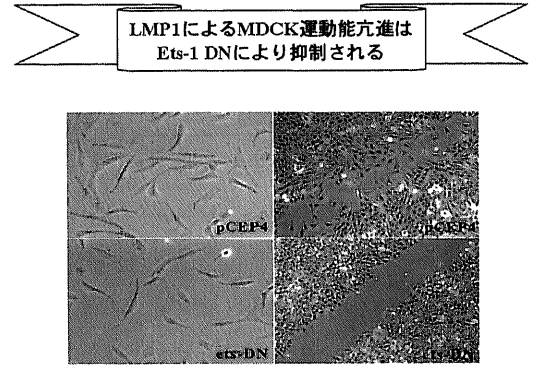


図8. 図7の細胞にEts-1の転写活性化領域を欠失したプラスミドを導入し、Ets-1を抑制すると(Ets-DN)細胞の運動能は低下する. しかし、溝の辺縁は滑らかでなく、細胞の接着性は低下したままであることが観察される. (文献4より)

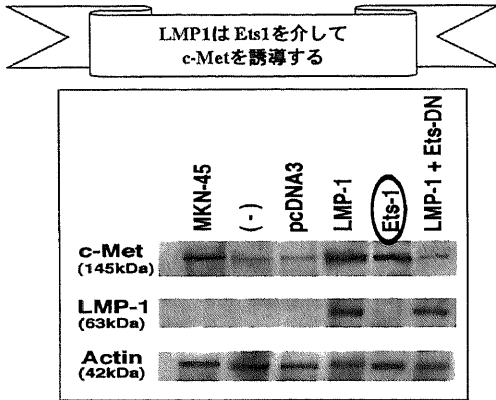


図9. LMP1によるc-Met蛋白誘導の検討. (ウエスタンブロット). MKN-45; 胃癌由来培養細胞株. C-Metの陽性コントロール. (文献5より)

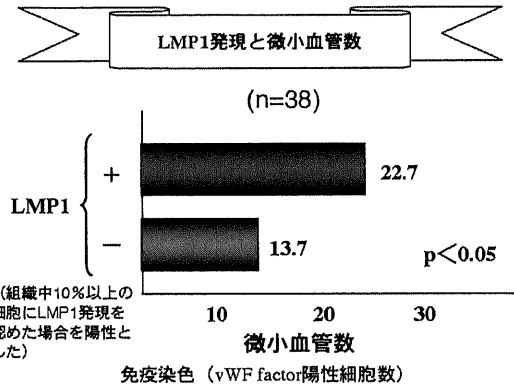


図10. 上咽頭がん組織におけるLMP1蛋白の発現と微小血管数. LMP1陽性群に有意に多くの血管新生を認める.

		p 値	
		金沢大学	台湾大学
微小血管数 vs.	LMP1	0.016	0.0003
	bFGF	0.031	0.0309
	VEGF	0.029	0.0467
	IL8	ND	0.0428

(ND:施行せず)

図11. 金沢大学および国立台湾大学における微小血管数と血管新生因子およびLMP1発現の関連性. bFGF;塩基性線維芽細胞増殖因子, VEGF;血管内皮増殖因子, IL8;インターロイキン8. いずれも有意な相関関係を認める.

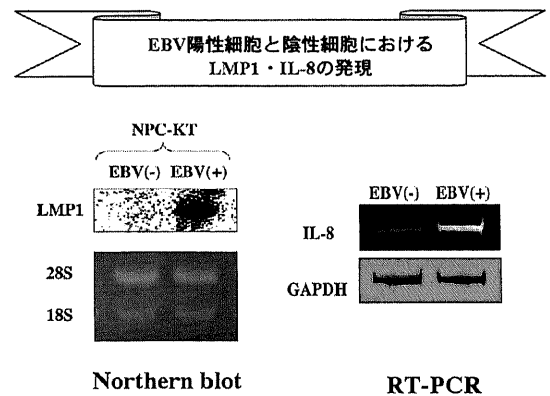


図12. EBV陽性クローンと陰性クローンにおけるIL-8の発現(RT-PCR法). (文献10より)

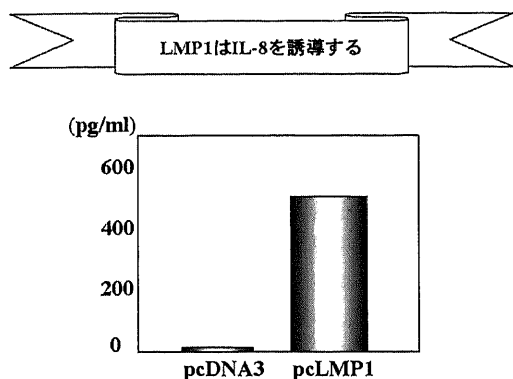


図13. 293T細胞にLMP1発現ベクターを導入すると、IL8が誘導される。(ELISA法)。pcDNA3; コントロールベクター。(文献6より)

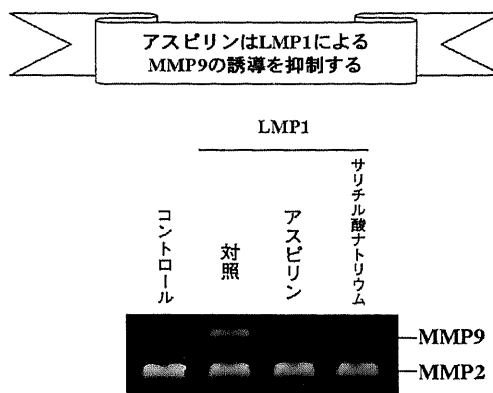


図14. LMP1を形質導入したC33AではMMP9が誘導される(レーン「対照」)。MMP9はアスピリンやサリチル酸ナトリウム処理により誘導されなくなる。(ゼラチンゼイモグラフィー)。(文献7より)

アスピリンはLMP1によるNF-kBおよびAP1の活性化を抑制する

アスピリンがLMP1によるMMP9の誘導を抑制(ヌードマウス移植腫瘍)

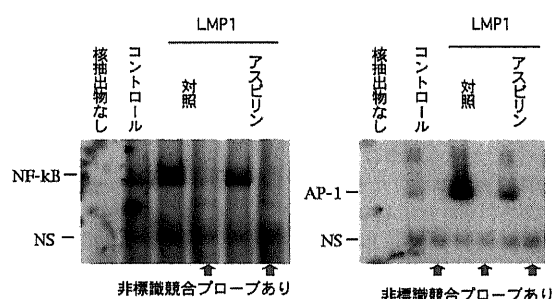


図15. LMP1形質導入C33Aの核抽出液内の P^{32} 標識NF-kBおよびAP-1結合配列結合物質は過剰の非標識プローブ投与により抑制される。アスピリン投与では対照では2本認められるNF-kBのバンドのうち異動度の遅い方の複合体が消失している。AP-1では一つの複合体のバンド濃度が低下している。(文献7より)

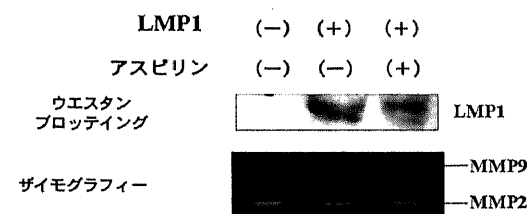


図16. LMP1発現C33A細胞をヌードマウス皮下に移植しアスピリンを投与したところMMP2発現は変化しなかったが、MMP9発現は低下した。(文献7より)

されるが細胞間接着は低下したままである⁴(図8)。

つづいて、上咽頭がん組織におけるLMP1発現とEts-1発現、さらに、細胞運動性を促進させるHGFの受容体c-Metの発現と頸部リンパ節転移の関係を検討したところ、これらの蛋白発現は互いに相関傾向にあること、また、いずれの発現もリンパ節転移と相関傾向にあること、そして、MDCK細胞においてはLMP1はEts-1を誘導してc-Metの発現を促進することが判明した。(図9)。すなわち、LMP1はEts-1活性化により直接的に細胞骨格の運動性を亢進させるほかに、HGF受容体発現を促進してHGFによる運動能亢進作用に対する感受性を増強すると考えられる⁵。

3) 血管新生

血管新生は腫瘍の転移能のみでなく増殖能とも密接に関連する現象である。上咽頭がん組織において、LMP1蛋白発現は微小血管密度と相関することが判明した(図10)。この現象は上咽頭がん非多発地帯である日本だけでなく、多発地帯である台湾

においても同様の傾向が見られた(図11)。そこで、代表的血管新生因子である血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic-fibroblast growth factor, bFGF)、インターロイキン8(interleukin-8, IL-8)発現との関連を免疫組織化学的に調べた。その結果、VEGF、bFGFとは有意ではないが相関傾向がみられ、IL-8とは有意に相関した⁶(それぞれ $P=0.118$, $0.1.4$, 0.0001)。つづいてLMP1による血管新生促進作用についてこれらの血管新生促進因子誘導機構を解析した。

a) VEGF

LMP1によるVEGF誘導機構は少なくとも2経路存在する。ひとつは、サイクロオキシゲナーゼ2(cyclooxygenase-2, COX-2)を活性化してVEGF産生を促進する経路である⁷。そして、もうひとつは低酸素誘導因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)を活性化してVEGFを誘導する経路である⁸。いずれも、VEGF産生を転写レベルで誘導する。いずれの経路もNF-

κ Bが主たる調節因子であることが判明した。

b) bFGF

LMP1によるbFGF誘導機構はi) おもにNF- κ Bを活性化してbFGF産生を転写レベルで促進する。ii) 細胞内で産生されたbFGFは粗面小胞体・ゴルジ装置経由とNa/K ATPase経路を経由して細胞外へ分泌される。LMP1はこれらのいずれの経路も活性化してbFGFの細胞外分泌を促進する。の2種類の分子機構があることが判明した⁹。

c) IL-8

IL-8は上咽頭がん組織標本を用いた検討でLMP1発現と最も強い相関関係が認められた血管新生因子である。上咽頭がんモデル細胞NPC-KTからEBV陽性クローンと陰性クローンを単離してIL-8発現を比較した。その結果、EBV陽性クローンはEBV陰性クローンに比べIL-8発現が亢進していることが判明した(図12)。EBV陽性クローンで発現しているEBV遺伝子はEBV核抗原1 (EBV associated nuclear antigen1, EBNA1) EBVがコードする小RNA (EBV-encoded RNAs, EBERs) およびLMP1である。そこで、LMP1のみでなく、これらのEBV遺伝子産物によるIL-8誘導も検討した。EBV陰性クローンにEBNA1, EBERs, およびLMP1発現プラスミドを導入したところ、EBNA1, EBERsを導入した細胞ではIL-8転写誘導は認められなかったがLMP1導入細胞では顕著なIL-8転写誘導が認められた¹⁰。また、腎上皮由来293T細胞にLMP1を導入したところIL-8蛋白が誘導された(図13)。このLMP1によるIL-8転写活性化はNF- κ B活性化を介して誘導されることが判明した⁵。

以上の研究から、

EBVが潜伏感染状態の腫瘍ではLMP1発現により、細胞間接着低下、細胞外基質分解、細胞運動能亢進、血管新生促進、と腫瘍の転移に必要なステップすべてにおいて、転移促進の方向に誘導される。

すなわち、EBVはいずれの感染様式においても上咽頭がんの高転移性に寄与するとの結論に至った。

では、上咽頭がんの転移を抑制するための方策は何か得られたのであろうか。ひとつはLMP1から下流のシグナル伝達経路を遮断する方法。もうひとつは、LMP1発現を抑制する方法である。もちろん、Ets-1の変異体導入などのいわゆる遺伝子治療に近い実験系で、運動能の抑制は可能である。しかし、臨床応用を視野に入れた場合には現実味に乏しい。そこで、現在市販されている薬剤および今後日本でも認可が期待される薬剤による転移抑制効果について検討を進めた。

4) アスピリン

COX-2阻害作用による抗腫瘍効果が注目されていたアスピリンであるが、NF- κ BやAP-1などの転写因子に対する抑制効果を有することに着目し、LMP1による転移関連因子誘導に対する抑制効果を検討した。その結果、アスピリンはLMP1によるMMP9誘導を転写レベルで抑制した(図14,15)。そして、in vitro浸潤アッセイで、LMP1による浸潤能促進を抑制した。さらに、ヌードマウスに移植したLMP1導入細胞におけるMMP9発現を抑制した¹¹(図16)。

5) シドフォビル

シドフォビルはアシクロビル耐性ヘルペスウイルスに対しても有効な核酸アナログ系抗ウイルス剤である。ヌードマウスに移植した上咽頭がん由来細胞株C15にシドフォビルを注入するとC15は肉眼的消失に至った。また、EBV感染細胞をシド

フォビルで処理するとLMP1発現が減少すること、リボヌクレオチド還元酵素阻害剤と相加的な抗腫瘍効果を発揮すること、そして、放射線感受性が増大することが報告されている¹²。これまで2例の再発性上咽頭がん患者に対してシドフォビルを投与した。肉眼的には腫瘍の増大を抑制する程度の効果は認められたものの腫瘍縮小といえほどの効果は認められなかった。しかし、投与前後の組織を比較したところ、注入部において間質へ浸潤している腫瘍細胞の減少が認められた。詳細な作用機序、より効果的な投与方法の開発については今後の課題である。

おわりに

本総説では、上咽頭がんの転移機構とEBVがん遺伝子LMP1の関連性についてこれまでの研究成果を中心に概説した。病態の観察という臨床医の視点から始まった研究テーマである。近年やっと「なぜ早期から転移するのか」から「どうすれば転移を抑制できるのか」に研究のパラダイムをシフトさせることができた。実臨床への応用で成果を挙げるまでにはまだまだ道程は長い。しかし、転移関連因子も含めた分子標的治療薬の開発は日進月歩であり、この分野からは目が離せない。一方で、ほとんどのヒトには終生潜伏感染に終わるEBVが、なにがきっかけで、がん細胞を作るのかというウイルスによる発がん機構はまったく霧の中である。多くのウイルス学者がこの難題に挑んでいるが、もしかしたら、その大きなヒントは臨床的観察から発見できるかもしれない。

謝 辞

第二回金沢大学十全医学賞受賞にあたり、本賞の運営に携わっておられます皆様へ厚く御礼申し上げます。本研究遂行にあたり、絶え間なく御指導御助言を賜りました恩師金沢大学大学院医学系研究科感覚運動病態学教授古川健博士および金沢大学がん研究所細胞機能統御講座教授佐藤博博士に深謝いたします。また、これまで共に歩んできてくれた金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室腫瘍グループの諸兄に深甚なる感謝の意を表すとともに、多大なる御協力をいただきました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座の皆様へ厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano J. The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3621-3626, 1998
- 2) Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, WE., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, JS., Raab-Traub, N. Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr 1 C terminal activation region 1 and 2. *J Virol* 73:5548-5555, 1999
- 3) Kondo S, Wakisaka N, Schell MJ, Horikawa T, Sheen TS, Sato H, Furukawa M, Pagano JS, Yoshizaki T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces the matrix metalloproteinase-1 promoter via an Ets binding site formed by a single nucleotide polymorphism: Enhanced susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 115:368-376, 2005
- 4) Kim KR, Yoshizaki T, Miyamori H, Hasegawa K, Horikawa T, Furukawa M, Harada S, Seiki M., Sato H. Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. *Oncogene* 19:1764-1771, 2000
- 5) Horikawa T, Takeshita H, Sheen TS, Sato H, Furukawa M,

- Yoshizaki T. c-Met proto-oncogene is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and correlates with cervical lymphnode metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Am J Pathol* 159:27-33, 2001
- 6) Yoshizaki T, Horikawa T, Ren Q, Wakisaka N, Takeshita H, Sheen TS, Lee SY, Sato H, Furukawa M. Induction of interleukin-8 by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and its correlation with angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1946-1951, 2001
- 7) Muroso S, Inoue H, Tanabe T, Joab I, Yoshizaki T, Furukawa M, Pagano JS. Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6905-6910, 2001
- 8) Wakisaka N, Kondo S, Yoshizaki T, Muroso S, Furukawa M, Pagano JS. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Synthesis of Hypoxia-Inducible Factor 1{alpha} *Mol Cell Biol* 24:5223-5234, 2004
- 9) Wakisaka N, Muroso S, Yoshizaki T, Furukawa M, Pagano JS. Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces and causes release of fibroblast growth factor-2. *Cancer Res* 62:6337-6344, 2002
- 10) Ren Q, Sato H, Muroso S, Furukawa M, Yoshizaki T. Epstein-Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein 1 Induces Interleukin-8 through the Nuclear Factor-kappaB Signaling Pathway in EBV-Infected Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line. *Laryngoscope* 114:855-859, 2004
- 11) Muroso S, Yoshizaki T, Sato H, Takeshita H, Furukawa M, Pagano JS. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Res* 60:2555-2561, 2000
- 12) Wakisaka N, Yoshizaki T, Raab-Traub N, Pagano JS. Ribonucleotide reductase inhibitors enhance cidofovir-induced apoptosis in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma xenografts. *Int J Cancer* 116:640-645, 2005