

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293367

研究課題名(和文) 代償性増殖による上咽頭癌発癌機構の解明と治療戦略

研究課題名(英文) Analysis for the role of cell competition in the tumorigenesis and treatment strategy of nasopharyngeal carcinoma

研究代表者

吉崎 智一 (Yoshizaki, Tomokazu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70262582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞競合に敗れた細胞の間隙を埋める代償性増殖について上咽頭癌の発癌機構における細胞競合を中心に解析した。上咽頭癌組織において癌細胞ではなく周囲の正常細胞が細胞競合の敗者となりつつアポトーシス抵抗性因子SPARCを発現していることが判明した。さらに、上咽頭癌の原因ウイルス Epstein-Barr ウイルスのがん遺伝子LMP1は前癌病変から発現される。LMP1はエクソソームにHIF1 内包量を増加させることで腫瘍微小環境を変化させることを解明した。この結果は上咽頭癌発癌初期からエクソソームにより周辺へ分泌される物質が細胞競合を増強することで周囲への浸潤、さらには転移能を増強させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Compensative growth is a concept that neighboring cell competes each other, and the winner cells in cell competition, without invasive property, take place of the looser cells. We analysed the role of cell competition in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). SPARC is anti-apoptotic factor that is usually expressed in the cell competition looser cells. In NPC tumor tissue, SPARC expression is observed in the tumor surrounding cells. LMP1 is a primary oncogene encoded by Epstein-Barr virus, a causative agent of NPC. We find LMP1 increase the exosome-mediated delivery of HIF1 . Modulation of microenvironment via exosome may play some role in the regulation of cell competition, especially at the initial carcinogenic stage of NPC, and thus, upregulate invasion and metastatic potential of NPC in the early stage.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：上咽頭癌 EBウイルス LMP1 エクソソーム 腫瘍微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌は Epstein-Barr ウイルス (EBV) が発癌に関与するユニークな癌である。申請者はこの EBV による上咽頭組織発癌機構について継続的に研究を進めている。

細胞はさまざまな因子を放出、受容することで、細胞の増殖や分化、運動、形態変化、そして、細胞死などを、時空間的に制御している。近年、このような細胞間シグナルは生細胞からだけでなく死細胞、とくにネクローシスで死んだ細胞から放出される炎症惹起物質 (インフラマソーム) は、がん・感染症・アレルギーをはじめとする様々な疾患における炎症病態の形成に関与する。現在非常にホットな研究シーンである。

一方で、アポトーシスに陥った細胞から放出された増殖因子が周囲に存在する細胞の増殖を促進し、欠損した組織の間隙を埋める現象が観察された。この現象を代償性増殖という。アポトーシスのスイッチがオンとなったのちに実際に細胞が死ぬまでの間はその細胞は周囲に増殖因子を供給し続ける。本申請で焦点を当てた死にゆく細胞からは様々なメッセージが発信され、周囲の細胞動態に影響を及ぼすことが判明した。申請者は前回申請テーマ「内因性免疫による上咽頭癌発癌機構の解明」に関する研究を遂行する過程で本来ウイルス感染細胞内に発現する EBV がコードする小 RNA である EBER s が癌周囲の正常細胞に発現することを発見した。さらに、細胞競合現象の視点から遂行中の研究成果から、上咽頭癌組織において癌細胞ではなく周囲の正常細胞が細胞競合の敗者 (loser) となりつつアポトーシス抵抗性因子 SPARC を発現していることが判明した。

## 2. 研究の目的

開始当初のこの分野の最新の報告ならびに申請者らの予備データから得られる作業仮説を以下に示す。

1) EBV 陽性上咽頭癌細胞と周囲の正常細胞の

間で細胞競合が起こる。

2) 上咽頭癌細胞からエクソゾーム活性化により EBER s が周辺細胞に分泌される。

3) その他の EBV 遺伝子発現がエクソソームによる細胞間交流を活性化する。

4) そして EBV 陽性細胞の増殖を有利な方向に導く。

本研究の目的は、この仮説を臨床サンプルと上咽頭癌および咽頭細胞株を用いて検証する。そしてゾーン形成機序としての EBV 遺伝子産物の役割とゾーンの細胞で起こっている細胞死プロセスに関する分子機構について解明する。さらには、抗腫瘍的に作用する薬剤やウイルス複製サイクルを抑制する化合物が代償性増殖に及ぼす影響とその結果、上咽頭癌発癌進展機構に及ぼす影響を解明し、新規治療法の開発を模索する。さらにウイルス関連癌として、そして同じ咽頭組織の癌として注目される中咽頭癌についてヒトパピローマウイルス (HPV) 感染と SPARC 発現の意義を検証する。ことである。

成果の項にも示す通り、途中で得られた研究結果から上咽頭癌発癌過程における代償性増殖の関与、さらには微小環境の制御における EBV 遺伝子発現の役割について明らかにすることを目的として研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

上記の目的について検討するために以下の方法で研究を遂行した。

1) 上咽頭癌組織標本を用いて癌周囲の正常細胞における EBER s 発現・CD63 を指標としたエクソゾーム分布・SPARC 発現の評価を行い、エクソゾームによる癌細胞と正常細胞のクロストークの頻度を評価する。

2) EBV 感染細胞から放出される増殖因子ならびにその分泌を活性化する EBV 遺伝子ならびにその経路を同定し、その阻害剤により、正常細胞の代償性増殖を促進して癌細胞の駆逐の可能性を検討する。

3) EBV 感染細胞に加え、HPV 感染細胞と正常

細胞における細胞競合について SPARC 発現を指標として観察し、中咽頭癌治療への応用の可能性を探る。

#### 4 . 研究成果

EBERs 陽性の上咽頭癌 90 例において正常細胞の SPARC 発現が有意に増強している一方で EBERs 陰性の上咽頭 14 例では正常細胞と癌細胞における SPARC 発現に差がないことが判明した。そして、上咽頭癌で発現する EBV 遺伝子産物のうち上述の EBERs がエクソソームで分泌されることが判明した。さらに当初の死にゆく細胞が周囲の細胞とコンタクトをとる手段として注目したエクソソームの研究から EBV 癌遺伝子である LMP1 がエクソソームによる HIF1 分泌を促進すること、それにより、LMP1 発現細胞周囲の微小環境における血管新生を増強し上咽頭癌細胞が生存増殖可能な環境を構築することが示唆された。この成果から LMP1 によるエクソソームを介した微小環境の制御に関する研究へと方向をシフトしていった。その結果、LMP1 は上咽頭上皮細胞に EBV が感染し、潜伏感染に移行すると初期の段階で発現することから、上咽頭癌では早期からエクソソームによる微小環境の制御が起こり、代償性増殖、さらには浸潤転移能を早期から獲得することが示唆された。

また、中咽頭癌における SPARC 発現は HPV 感染の有無にかかわらず予後不良のマーカであることが判明した。今後はオートファジーや内因性免疫と細胞競合現象の関連性についての研究を展開する。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1, Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Nakanishi Y, Ishikawa K, Komori T, Moriyama-Kita M, Endo K, Muro S, Wang Z, Kitamura K, Nishiyama T, Yamaguchi K, Shigenobu S,

Muramatsu M, Yoshizaki T, APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers., *Oncogene*, 査読有、36、12、2017、1687-1697、doi: 10.1038/onc.2016.335.  
2, Seishima N, Kondo S, Wakisaka N, Kobayashi E, Imoto T, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Muro S, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Yoshizaki T, EBV infection is prevalent in the adenoid and palatine tonsils in adults., *J Med Virol*, 査読有、89、6、2017、1088-1095、doi: 10.1002/jmv.24737.  
3, Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Muro S, Nakamura H, Yoshizaki T, The influence of human papillomavirus on nasopharyngeal carcinoma in Japan, *Auris Nasus Larynx*, 査読有、44、3、2017、327-332、doi: 10.1016/j.anl.2016.07.015.  
4, Wakisaka N, Hirai N, Kondo S, Aga M, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Muro S, Yoshizaki T, T-status and an oral fluoropyrimidine, S-1, adjuvant chemotherapy are prognostic factors in reduced-RADPLAT for resectable hypopharyngeal cancer, *Acta Otolaryngol*, 査読有、136、8、2016、834-840、doi: 10.3109/00016489.2016.1157728.  
5, 脇坂尚宏、平井信行、近藤悟、吉崎智一、EBV 関連バイオマーカーによる上咽頭癌の治療効果・予後判定、耳鼻と臨床、査読有、61、補冊、2015、S66-S71  
6, Wakisaka N, Hasegawa Y, Yoshimoto S, Miura K, Shiotani A, Yokoyama J, Sugawara M, Moriyama-Kita M, Endo K, Yoshizaki T, Primary tumor-secreted lymphangiogenic factors induce pre-metastatic lymphovascular niche formation at sentinel lymph nodes in oral squamous cell

carcinoma, PLoS One、査読有、10、12、2015、  
e0144056、doi:

10.1371/journal.pone.0144056.

7, Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Kita M,  
Sawada-Kitamura S, Endo K, Tsuji A,  
Nakanish Y, Murono S, Yoshizaki T,  
Induction of epithelial-mesenchymal  
transition and loss of podoplanin  
expression are associated with  
progression of lymph node metastases in  
human papillomavirus-related

oropharyngeal carcinoma、Histopathol、査  
読有、66、6、2015、771-780、doi:  
10.1111/his.12496.

8, Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Kita M,  
Endo K, Tsuji A, Murono S, Muramatsu M,  
Yoshizaki T, HPV status determines the  
efficacy of adjuvant chemotherapy with S-1,  
an oral fluorouracil prodrug, in  
oropharyngeal cancer、Ann Otol Rhinol  
Laryngol、査読有、124、5、2015、400-406、  
doi: 10.1177/0003489414560434.

〔学会発表〕(計 7 件)

1, Yoshizaki T, Aga T, Aga M, Tsuji A, Kondo S,  
Endo K, Involvement of beclin 1 in the  
survival of nasopharyngeal carcinoma cells  
under chemotherapeutic pressure、17th  
International Symposium on EBV and  
associated diseases、2016 年、Zurich,  
Switzerland

2, Yoshizaki T, Kaneda M, Yagi-Nakanishi  
S, Ozaki F, Kondo S, Analysis of olfactory  
dysfunction in IgG4-related disease、ISIAN  
2016、2016 年、Stockholm, Sweden

3, Yoshizaki T, Murono S, Wakisaka N, Hirai  
N, Yoshida S, Laryngeal preservation and  
function after Modified RADPLAT for  
advanced laryngeal carcinoma、19th  
WCB/WCBE、2016 年、Florence, Italy

4, Yoshizaki T, Kondo S, Nakanishi Y, The

expression of APOBEC3A associates with  
human papillomavirus genome integration  
in oropharyngeal carcinomas、30th  
International HPV Conference、2015 年、  
Lisbon, Portugal

5, Yoshizaki T, Role of Epstein-Barr virus  
and alternating chemoradiotherapy in  
nasopharyngeal carcinoma、3rd Congress of  
European ORL-HNS、2015 年、Praque, Czech

6, Yoshizaki T, Kondo S, Aga M, Kano M,  
Role of Epstein-Barr virus and alternating  
chemoradiotherapy in nasopharyngeal  
carcinoma、7th International Symposium on  
Nasopharyngeal Carcinoma、2015 年、  
Yogyakarta, Indonesia

7, Yoshizaki T, Wakisaka N, Endo K,  
Kasahara Y, Role of Epstein-Barr virus in  
the alternating chemoradiotherapy for the  
patients with advanced nasopharyngeal  
carcinoma、IFHNOS 5th World Congress and  
AHNS Annual meeting、2014 年、New York, USA

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉崎 智一 (YOSHIZAKI Tomokazu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70262582

(2)研究分担者

脇坂 尚宏 (WAKISAKA Naohiro)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70377414

近藤 悟 (KONDO Satoru)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：70436822

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )