

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390396

研究課題名(和文) 内因性免疫によるEBV感染制御機構と上咽頭癌発癌機構に関する研究

研究課題名(英文) The role of intrinsic immunity for EBV-mediated nasopharyngeal carcinogenesis

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) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：内因性免疫は細胞自身に備った防御機構で細胞に侵入したウイルスに変異を導入して不活化する。上咽頭癌はEpstein-Barr ウイルス、中咽頭癌はヒトパピローマウイルスが発がんに関与する。そこで上、中咽頭癌における内因性免疫因子の発現とウイルスへの変異導入頻度を中心に検索したところ、内因性免疫因子の一つであるAPOBEC3G発現がいずれの癌でも亢進していることが判明した。また、HPVのE2領域における変異導入を検索したところ、APOBEC3Gに特異的な様式の変異が挿入されていた。以上から、内因性免疫因子、とくにAPOBEC3G発現はHPVによる中咽頭癌発癌に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intrinsic immunity, including APOBEC family, is a defense system inherent to a cell itself. Viral oncogenesis by EBV, HPV has been a matter of issue these days. We identified that APOBEC3G was overexpressed in both EBV-positive nasopharyngeal cancer and HPV-positive oropharyngeal cancer tissues. Moreover, APOBEC specific G to A, C to T mutations were frequently detected in HPV-E2 region. These results suggest that intrinsic immunity, especially, APOBEC3G, is associated with HPV-mediated oropharyngeal oncogenesis.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：上咽頭癌 Epstein-Barr ウイルス 内因性免疫 中咽頭癌 ヒトパピローマウイルス APOBEC

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は上咽頭癌、鼻性 NK/T リンパ腫などの原因ウイルスである。申請者は上咽頭癌の特徴である高転移性は EBV 遺伝子 LMP1 による上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchial transition, EMT) 活性化が本体であること (PNAS 1998, PNAS 2001, Cancer Res, 2005, Cancer Res 2007, Oncogene 2009, etc.) として、免疫監視機構、特に細胞障害性 T 細胞 (CTL) によって認識され排除されるはずの上咽頭癌細胞の免疫エスケープ機構を解明してきた (Cancer Sci 2005, Blood 2009, etc.)。本申請では我々耳鼻科医を始め、世界中の EBV 研究者や上咽頭癌研究者が解答を見出していない以下の点にアプローチする。それは、「なぜ EBV が癌を形成するのは上咽頭なのか？」である。

すなわち、Waldayer 扁桃輪は細菌やウイルスなど外来微生物を取り込み自然免疫や獲得免疫系を活性化する扁桃リンパ装置である。これらの扁桃組織の大多数を占める構成成分は B リンパ球である。EBV は唾液を介して感染する。EBV レセプター CD21 を発現する細胞は B リンパ球である。上皮や T リンパ球はこの CD21 を発現していない。EBV は B リンパ球に潜伏感染し、散発的に再活性化しウイルスを放出する。一方で、癌が発生するのは唾液と接触する口蓋扁桃や舌根扁桃ではなく、唾液と関連が薄い上咽頭 (咽頭扁桃) である。おなじ扁桃輪にあって何が異なるのであろうか？普通に考えれば侵入門戸となる口蓋扁桃に癌が発生するはずであるが、なぜ、上咽頭なのか？ EBV に対する反応を規定する因子の発現は口蓋扁桃と咽頭扁桃では異なるか？それにより、「なぜ、EBV は口蓋扁桃 (中咽頭癌) ではなく咽頭扁桃 (上咽頭癌) に癌を形成するのであろうか？」は説明が可能か？となる。

すなわち、EBV 発癌の上咽頭トロピズムに対する解答を得るために、本申請では 2 つの

現象について焦点を絞り研究を進めた。

咽頭扁桃と口蓋扁桃上皮における EBV に対する反応を i) ウイルスの感染性, ii) 感染後の持続潜伏感染維持の可能性, iii) EBV 複製サイクルの誘導性, iv) 内因性免疫因子の発現, について検討し、上皮細胞の EBV に対する局所応答特異性と内因性免疫の関係を明らかにする。

また、近年急増中のヒトパピローマウイルス (HPV) による中咽頭癌発癌と対比させることで各々のウイルスと扁桃組織における内因性免疫の関連性について検討を進めることが必要である。

## 2. 研究の目的

EBV の組織トロピズムおよび発癌機構を分子レベルで解明する足がかりとして、咽頭扁桃と口蓋扁桃における上皮および B リンパ球の EBV 感受性について、近年の HIV 研究によりクローズアップされた内因性免疫という新しい免疫学的概念に基づいて解析する。また、近年増加している HPV による中咽頭癌と対比して内因性免疫の関連を解明する。

## 3. 研究の方法

### Waldayer 扁桃輪における EBV および HPV 感染状況の再評価と内因性免疫因子発現の検討

1) EBV のレセプターは B 細胞表面に発現する CD21 である。1990 年代の報告では CD21 は上皮, T リンパ球で発現しないとされる。まず口蓋および咽頭扁桃における EBV 感染細胞と感染様式、さらに、APOBEC ファミリーのうち村松博士から抗体を供与された AID, APOBEC3G 発現を幼少時・青年・40 代以降の 3 群に分けてデータ解析を行った。

i) ウイルスが感染細胞内で増殖し、感染細胞が溶解する溶解感染 (EBV 遺伝子 BZLF が発現)。ii) ウイルスが感染細胞内で潜伏感染しており、感染細胞と共存する潜伏感染 (EBV 転写産物 EBERs, LMP1 が発現)。iii) AID, APOBEC3G, に対する免疫組織化学法にて EBV 陽性細胞の分画と感染状態、さらに APOBEC 発現をスコア化する。そして、サンプル全体および同一個体での咽頭扁桃・口蓋扁

桃の EBV 陽性細胞分画ならびに APOBEC ファミリー発現の関連性について検討した。iv) 中咽頭癌における HPV 陽性率をハイブリッドキャプチャー法で検出し、HPV 陽性癌と陰性癌における APOBEC ファミリー発現を検討した。

2) 咽頭・口蓋扁桃における APOBEC ファミリー発現プロファイルを解析した。この実験により、内因性免疫の違いを明らかにした。

### **上咽頭癌および中咽頭癌における APOBEC 発現と遺伝子変異挿入の解析**

上咽頭癌および非上咽頭癌生検組織ならびに中咽頭癌および非中咽頭癌生検標本における APOBEC ファミリー遺伝子発現を RP-PCR で定量した。そして、EBV および HPV 中に APOBEC に特異的な G to T, C to A 変異導入頻度を 3D-PCR で定量した。そして、その定量の妥当性を次世代シーケンサーで検証した。

#### 4. 研究成果

1) 上咽頭癌を除いて、咽頭扁桃・口蓋扁桃の EBV 陽性細胞は非常に少ないことを確認した。また、非癌組織においては咽頭扁桃・口蓋扁桃いずれにおいても B リンパ球を中心に APOBEC 発現が認められたが APOBEC ファミリー発現量に明らかな差を認めなかった。

2) 上咽頭癌組織における EBV 遺伝子のうち EBNA1 および LMP1 に低頻度ではあるが APOBEC 特異的な変異が導入されていることが判明した。

3) 中咽頭癌組織において HPV 遺伝子の E2 領域に高頻度に APOBEC 特異的な変異が導入されていることが判明した。

4) 中咽頭癌において APOBEC ファミリーのうち、APOBEC3、とくに APOBEC3A, APOBEC3G 発現が上記の HPV E2 領域における APOBEC 特異的な変異、すなわち、G to T, C to A 導入頻度と有意に相関した。

以上のことから、APOBEC ファミリー発現は上咽頭癌における EBV 遺伝子への変異導入にも一定の働きをしていること、中咽頭癌においてはさらに高率に HPV 遺伝子に変異を導入し

ていることが判明した。今後、引き続き、APOBEC ファミリー発現が癌化に対して促進的に働いているのか、抑制的に働いているのか、継続的に研究を進めてゆく必要がある。

#### 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) Wakisaka N, Hirota K, Kondo S, Sawada-Kitamura S, Endo K, Murono S, Yoshizaki T、Induction of

lymphangiogenesis through vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor receptor 3 axis and its correlation with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma.、

Oral Oncol.、査読有、48、8、2013、703-708

2) Yoshizaki T, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Endo K, Sugimoto H, Nakanishi S, Tsuji A, Ito M.、Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma.、Cancer Lett.、査読有、337、1、2013、1-7

3) Endo K, Ueno T, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Ito M, Kataoka K, Kato Y, Yoshizaki T、Tumor-targeted chemotherapy with the nanopolymer-based drug NC-6004 for oral squamous cell carcinoma.、Cancer Sci.、査読有、104、3、2013、369-374

4) 吉崎智一、上咽頭癌診断治療の進歩 - EB ウイルス発見から半世紀間の歩み、日本耳鼻咽喉科学会会報、査読有、116、2013、1175-1184

5) 吉崎智一、特集 図でみる免疫学の ABC 腫瘍と免疫 腫瘍に関する免疫療法、モノクローナル抗体療法、JOHNS、査読有、29、2013、465-468

6) Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Murono S, Yoshizaki T、Adjuvant chemotherapy with an oral fluoropyrimidine, S-1, following reduced RADPLAT in advanced laryngeal cancer.、Ann Otol Rhinol Laryngol.、査読有、121、8、2012、555-562

7) Yoshizaki T, Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma, Auris Nasus Larynx, 査読有、39、2012、137-144

8) 吉崎智一、上咽頭癌とEBM、JOHNS、査読無、28、2012、202-204

〔学会発表〕(計5件)

1) 吉崎智一、パネルディスカッション：咽頭癌診断治療のパラダイムシフト、第26回日本口腔・咽頭科学会、2013年9月12日～2013年9月13日、名古屋

2) Yoshizaki T, Symposium: Superselective intra-arterial chemoradiotherapy for hypopharyngeal cancer, 5th Eurasian Head and Neck Cancer Conference, 2013年7月25日～2013年7月28日、St.

Petersburg, Russian

3) Yoshizaki T, Wakisaka N, Murono S, Endo K, Tsuji A, Fuwa N, Alternating chemoradiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma.

-prospective multicenter phase study-, 6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma, 2013年6月20日～2013年6月22日、Istanbul, Turkey

4) Yoshizaki T, Factors that affect an efficacy of superselective intraarterial chemoradiotherapy for maxillary sinus cancer, 24th Congress of the European Rhinologic Society 31st International Symposium of Infection & Allergy, 2012年6月17日～2012年6月21日、Toulouse, France

5) 吉崎智一、側頭骨悪性腫瘍頭頸部癌とアレルギー疾患の関連について、第21回日本耳科学会(パネリスト/招待講演)、2011年11月24日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市

〔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：

出願年月日：

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

杉本 寿史 (SUGIMOTO Hisashi)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：20547179

脇坂 尚宏 (WAKISAKA Naohiro)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：70377414

近藤 悟 (KONDO Satoru)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70436822

遠藤 一平 (ENDO Kazuhira)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30547154

(3) 連携研究者

該当なし