

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18390456

研究課題名 (和文) EB ウイルス活性化による遺伝子発現変化と上咽頭組織がん化に関する研究

研究課題名 (英文) EBV gene expression profile which is affected by virus reactivation and oncogenesis of nasopharyngeal carcinoma.

研究代表者

吉崎 智一 (Tomokazu Yoshizaki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70262582

研究成果の概要 (和文)：

ウイルス増殖活性化と癌化の関連について検討した。

- 1) EBERs はプロテインキナーゼRを阻害して細胞増殖能を促進する
- 2) ウイルス複製サイクル誘導により、細胞死に至る
- 3) 脱メチル化およびアセチル化、いずれの処理によってもLMP1、EBV複製は誘導されない
- 4) ウイルス複製により脱メチル化がおこり、複製直後のEBV感染細胞内のLMP1発現は複製誘導前よりも増加する  
以上より、EBVLMP1発現は上咽頭がん発癌過程に密接に関与する。しかし、一度がん化した後はがん細胞に影響を及ぼさないことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

A Cohort study in Taiwan revealed that an elevated serum EBV titer was a risk factor for developing NPC. Thus, it is reasonable to track down the relationship of viral reactivation and nasopharyngeal carcinogenesis. The fruits of this study were;

- 1) EBERs upregulate proliferation via inhibition of PKR.
- 2) Induction of viral reactivation in NPC-KT cell resulted in cell lysis.
- 3) Both demethylation and acetylation agents induced inactivated human gene expression such as p16. However, neither agent induced silenced LMP-1.
- 4) Sodium butylate treatment induced viral production, and demethylation of LMP-1 promoter lesion, resulted in faint increase of LMP-1 expression.

In conclusion, LMP-1 expression is closely associated with NPC initiation. However, in clinically progressed NPC, EBV gene expression affects a little behavior of the tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 2,000,000  | 600,000   | 2,600,000  |
| 2007年度 | 4,100,000  | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 2008年度 | 4,100,000  | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 2009年度 | 4,100,000  | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

研究分野：医歯薬学→耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：癌，上咽頭癌，Epstein-Barr ウイルス，LMP1，ウイルス複製，メチル化

1. 研究開始当初の背景

1) 上咽頭がん発がんには Epstein-Barr ウイルス (EBV) が関与する。2) EBV は世界中普遍的に成人の B リンパ球内に潜伏感染している。3) B リンパ球では EBNA-1 という核抗原しか発現していない。しかし、上咽頭がん早期病変では 100% に EBV がん遺伝子 LMP-1 が発現している (N Engl J Med 1995)。4) 血中 EBV-DNA が多い、すなわち、ウイルス複製が亢進しているヒトは将来上咽頭がんを発症しやすい (New Engl J Med 2004)

では、発がんの鍵を握る EBV 遺伝子 LMP-1 の発現はどのように調節されているのであろうか？

一般的に、ウイルスが増殖するときには感染細胞はがん化するどころか死ぬ。そこで、ウイルス複製サイクルの活性化と上咽頭がん発がんの関連性を合理的に説明する仮説が必要である。

2. 研究の目的

「潜伏持続感染する EBV では不活化されている LMP-1 発現はウイルス複製再活性化により産生された EBV では LMP-1 発現も活性化される。

親細胞ではなく、細胞外に放出された複製ウイルスに新規に感染した細胞が LMP-1 により「がん化する」を検証すること

3. 研究の方法

I. ウイルス複製サイクル誘導前と後の細胞中のウイルス DNA を抽出する。

i) ゲノム DNA を重亜硫酸で処理する。この操作によりメチル化された C (シトシン) はそのまま、メチル化されていない C は U (ウラシル) に変換される。この変換されたウラシルは PCR の鋳型としては T (チミン) として認識されるようになる。

ii) そして、LMP-1 読み取り枠塩基配列について、プロモーターおよび蛋白コード領域を挟み、メチル化修飾を受ける可能性がある CpG 配列を含むプライマーをデザインする。すなわち、シトシンとチミンを PCR プライマーに認識させ、PCR 産物の有無でメチル化 DNA および非メチル化 DNA の有無を判別するメチル化特異的 PCR 法を行う。

iii) EBV 複製サイクル誘導によるウイルスゲノムメチル化状態の変化について解析する。

この実験系により宿主細胞内で高度メチル

化を受けていたEBVは複製サイクル誘導により脱メチル化が起こる可能性を検討する。

つづいて脱メチル化がLMP-1遺伝子発現を誘導する可能性について検討する

iv) 1) の実験においてメチル化状態が解析できている細胞クローンを脱メチル化剤である 5' -アザシチジンで処理する。

v) 5' -アザシチジン処理前後の細胞におけるLMP-1発現量の変化をRT-PCR法を用いて検討する。

vi) 5' -アザシチジン処理前後の細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍塊の形成能とLMP-1発現が相関するかを検討する。

#### 4. 研究成果

EBVLMP 1 のプロモーターはメチル化を受けていること、アザシチジンなどの一般的な脱メチル化剤では転写活性が不活化されたLMP1プロモーターを活性することはできなことが判明した。一方で潜伏感染細胞におけるEBV再活性化は脱メチルを起こしやすいことが判明した。

以上より、EBV複製サイクルの活性化が上咽頭癌発癌に促進的に働く機序の少なくとも一部は説明可能であることが判明した。

#### 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 24 件)

1) Murono S, Yoshizaki T. (他 4 名、6 番目)

An extremely rare case of large Delphian node metastasis preceding primary laryngeal cancer. *Auris Nasus Larynx* (in press) 査読有

2) Ito M, Hatano M, Yoshizaki T. (3 番目)

Prognostic factors for squamous cell carcinoma of the temporal bone: extensive bone involvement or extensive soft tissue involvement? *Acta Otolaryngol* (in press) 査読有

3) Wakisaka N, Yoshizaki T.

(他 4 名、6 番目)

A solitary fibrous tumor arising in the parapharyngeal space, with MRI and FDG-PET findings. *Auris Nasus Larynx* (in press) 査読有

4) Uramoto N, Furukawa M, Yoshizaki T.

(3 番目)

Malignant phosphaturic mesenchymal tumor, mixed connective tissue variant of the tongue. *Auris Nasus Larynx* (in press) 査読有

5) Uramoto N, Furukawa M, Yoshizaki T.

(3 番目)

Malignant phosphaturic mesenchymal tumor, mixed connective tissue variant of the tongue. *Auris Nasus Larynx* 36:104-5, 2009. 査読有

6) Wakisaka N, Yoshizaki T.

(他 4 名、6 番目)

A solitary fibrous tumor arising in the parapharyngeal space, with MRI and FDG-PET findings. *Auris Nasus Larynx* 36:367-71, 2009. 査読有

7) Endo K, Yoshizaki T. (他 7 名、6 番目)

Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration. *Oncogene* 8:1725-35, 2009. 査読有

8) Smith C, Yoshizaki T. (他 5 名、5 番目)

Discerning regulation of cis- and trans-presentation of CD8+ T-cell epitopes by EBV-encoded oncogene LMP-1 through self-aggregation. *Blood* 11;113:6148-52, 2009. 査読有

9) Yoshizaki T. (他 8 名、1 番目)

Concurrent intra-arterial chemotherapy and radiotherapy for advanced laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 118:172-8, 2009. 査読有

10) Tsuji A, Yoshizaki T. (他 4 名、6 番目)

Induction of receptor for advanced glycation end products by EBV latent membrane protein 1 and its correlation with angiogenesis and cervical lymph

- node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res. 14:5368-75, 2008. 査読有
- 11) Nakashima M, Yoshizaki T.  
(他 5 名、7 番目)  
Impact of MDM2 Single Nucleotide Polymorphism on Tumor Onset in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Acta Otolaryngologica 128:808-13, 2008. 査読有
- 12) Shimizu Y, Kondo S, Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. (5 番目)  
A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer. Auris Nasus Larynx 35:381-9, 2008. 査読有
- 13) Yoshizaki T, Furukawa M.  
(他 6 名、1 番目)  
Treatment of locally recurrent Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma using the anti-viral agent cidofovir. J Med Virol. 80:879-82, 2008. 査読有
- 14) Wakisaka N, Murono S, Kondo S, Furukawa M, Yoshizaki T. (5 番目)  
Post-operative pharyngocutaneous fistula after laryngectomy. Auris Nasus Larynx 35:203-8, 2008. 査読有
- 15) Yoshizaki T, Furukawa M.  
(他 8 名、1 番目)  
Intra-arterial chemotherapy less intensive than RADPLAT with concurrent radiotherapy for resectable advanced head and neck squamous cell carcinoma: a prospective study. Ann Otol Rhinol Laryngol 116:754-61, 2007. 査読有
- 16) Horikawa T, Yoshizaki T.  
(他 5 名、4 番目)  
Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res 67:1970-8, 2007. 査読有
- 17) Kondo S, Yoshizaki T. (他 7 名、2 番目)  
MUC1 induced by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Causes Dissociation of Cell-Matrix Interaction and Cellular Invasiveness via STAT Signaling. J Virol 81:1554-62, 2007. 査読有
- 18) Yoshizaki T, Furukawa M.  
(他 6 名、1 番目)  
Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in nasopharyngeal carcinoma. Auris Nasus Larynx 34:73-8, 2007. 査読有
- 19) Kondo S, Yoshizaki T. (他 6 名、3 番目)  
EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells. Cancer Res 66:9870-7, 2006. 査読有
- 20) Wakisaka N, Murono S, Minato H, Furukawa M, Yoshizaki T. (5 番目)  
A case report: Epstein-Barr virus-associated undifferentiated carcinoma of the tongue base. Auris Nasus Larynx 33:487-91, 2006. 査読有
- 21) Endo K, Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. (4 番目)  
Prognostic value of cell motility activation factors in patients with tongue squamous cell carcinoma. Hum Pathol 37:1111-6, 2006. 査読有
- 22) Wakisaka N, Miwa T, Yoshizaki T, Furukawa M. (3 番目)  
Cricoid ossification mimicking an impacted foreign body. J Laryngol Otol 120:1-3, 2006. 査読有
- 23) Terayama N, Yoshizaki T.  
(他 8 名、9 番目)  
Feeding Artery of Laryngeal and Hypopharyngeal Cancers: Role of the Superior Thyroid Artery in Superselective Intraarterial Chemotherapy. Cardiovasc Intervent Radiol 29:536-43, 2006. 査読有

24) Ahmad M, Yoshizaki T. (他 4 名、4 番目)  
Cleavage of Amyloid- $\beta$  Precursor  
Protein (APP) by Membrane-Type Matrix  
Metalloproteinases. J Biochem  
139:517-26, 2006. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 吉崎 智一 (喉頭乳頭腫に対するシドフ  
ォビル注入について), 第 60 回日本気管食道  
科学会, 2008 年 11 月 6 日, 熊本県立劇場 (熊  
本県)
- ② 吉崎智一, 塚谷才明, 室野重之, 脇坂尚  
宏, 近藤悟, 三輪高喜, 古川 亙 (動注化学療  
法による上顎癌治療成績-CDDP 投与量との  
関連について), 第 31 回日本頭頸部癌学会,  
2007 年 6 月 13 日, パシフィコ横浜 (神奈川  
県)
- ③ 吉崎 智一, 古川 亙 (遊離皮弁による  
再建部に再発した頭頸部癌に対する動注化  
学療法), 第 69 回耳鼻咽喉科臨床学会, 2007  
年 7 月 6 日, 品川プリンスホテル, エグゼク  
ティブタワー (東京都)
- ④ 吉崎智一, 清水良憲, 古川 亙 (EB ウイル  
ス RNA・EBER s 発現と感染細胞形質転換能),  
第 24 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会,  
2006 年 3 月 2 日, 鳥羽国際ホテル (三重県)

## 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) 連携研究者

室野 重之 (MURONO SHIGEYUKI)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号: 20345622

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