

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390433

研究課題名（和文） 上咽頭がんをはじめとする EBV 関連腫瘍における Siah1 の分子生物学的解析

研究課題名（英文） Molecular biological analysis of Siah1 in EBV related tumor including nasopharyngeal cancer

研究代表者

古川 侑 (FURUKAWA MITSURU)

金沢大学・副学長

研究者番号：40092803

研究成果の概要（和文）：上咽頭癌の原因蛋白であるEBV-LMP1は上皮系細胞においてSeven in absentia human homolog (Siah) 1を介し、低酸素誘導因子1 α (HIF1 α)を安定化する。ところがバーキットリンパ腫浮遊細胞系においてはLMP1によってSiah1は減少する。すなわちEBV-LMP1による上皮系および非上皮系におけるSiah1発現調節は未解明である。本研究ではEBV関連腫瘍におけるSiah1の機能を検討して発癌臓器ごとに異なるEBV関連腫瘍の生物学的特性との関連性の解明を目的とした。EBV関連腫瘍組織においてLMP1, Siah1, HIF1 α 、各種血管新生因子、癌抑制遺伝子の免疫組織学的検査をおこなったところ、上咽頭癌においてのみLMP1とVEGFやHIF1 α 、Siah1の因子には相関する傾向がみられた。他の鼻性NK/Tリンパ腫やホジキンリンパ腫では相関関係は認めなかった。臨床的パラメーターの解析において、上咽頭がん患者ではSiah1はその発現頻度は病期進行度があがれば高い傾向にあり、LMP1の発現は必ずしも病期進行度とは比例しなかった。LMP1導入上咽頭細胞を低酸素環境に暴露するとLMP1単独発現よりも高いSiah1とHIF1 α の発現を認めた。そのため、LMP1、低酸素自身による誘導いずれにもSiah1は関与していることが判明した。またLMP1発現上咽頭上皮細胞をヌードマウス皮下に移植モデルにおいても同様の現象を認めた。このことから生体内では上咽頭癌が増殖する際にはLMP1の信号のみならず生体環境が形成する低酸素環境自身が腫瘍の形成に深く関与している事が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We have shown that EBV-LMP1 that induced nasopharyngeal cancer (NPC), stabilizes HIF1 α via Siah1 in nasopharyngeal epithelial cells. However LMP1 downregulates Siah1 in Burkitt lymphoma cell lines. In this study, we examined Siah1 function in various EBV-related tumors. We investigated expression of LMP1, HIF1 α , and Siah1 by immunohistochemistry. Finally we found that the expression of Siah1 was correlated with LMP1 strongly in NPC. However there was no correlation in other EBV-related tumors. Since we hypothesize not only LMP1 inducible stimulation but hypoxia condition itself also affects HIF1- α expressions in NPC tissues, we investigated with LMP1 expressed nasopharyngeal cell lines with or without hypoxia stimulation with hypoxia chamber. Synergistic effect of hypoxic conditions and LMP1 expression increased their HIF1 α expression in vitro and in vivo using immunodeficient mice. The crosstalk of hypoxia and LMP1 expression may be a key of understanding EBV-related tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：頭頸部腫瘍学・ウイルス学

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：上咽頭癌、バーキットリンパ腫、浸潤、転移、Siah1

1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌は高転移性の癌でありその転移にはEpstein-Barr virus (EBV) が関与する。我々はEBV癌蛋白LMP1がいかんして発癌を誘導し転移を促進するかを報告してきた。最近我々はこのLMP1が低酸素誘導因子1 α (HIF1 α)を誘導し最終的には血管新生を誘導することを報告した。その機序はショウジョウバエの光覚受容体発生に必要とされる蛋白Seven in absentiaのヒト相同体Seven in absentia human homolog (Siah) 1を介しHIF1 α の安定化に寄与する事である。申請者らはこれに繋がる一連の研究の中で、このLMP1がショウジョウバエの光覚受容体発生に必要とされる蛋白Seven in absentiaのヒト相同体Seven in absentia human homolog (Siah) 1に着目した。最終的にはLMP1によって安定化されるSiah1が間接的にHIF1 α の安定化に寄与する事を突き止めた。世界的なコンセンサスは癌組織/細胞において、Siah1はその発現を低下させることで癌浸潤能を高めるのではないかとされてきた。しかし申請者らは癌蛋白LMP1によって発現が増加することを発見した。又、バーキットリンパ腫浮遊細胞系において、LMP1はSiah1の発現量を減少する。Siah1の発現上昇は上咽頭癌を始めとする接着細胞系、つまり上皮系においてのみ起こっていることである。EBV-LMP1による上皮系ならびに非上皮系におけるSiah1発現調節は未解明である。

2. 研究の目的

EBV 関連腫瘍における Siah1 の機能を検討して発癌臓器ごとに異なる EBV 関連腫瘍の生物学的特性との関連性の解明が目的である。

- 1) 上咽頭癌組織および鼻性NK/T細胞腫、ホジキン病でLMP1, Siah1あるいはSiah1に調節されているとされる HIF1 α や β カテニン, DCCなどの発現量を確認、実際の転移能や生命予後に関する影響を明らかにする。
- 2) LMP1によるSiah1の誘導が低酸素環境下でどのように変化するかを検討する。
- 3) LMP1発現上咽頭細胞の免疫不全マウス内において低酸素環境による変化がないかを検討する。

3. 研究の方法

1) EBV関連腫瘍患者のLMP1/Siah1関連因子の組織発現と臨床的パラメーターの解析：最初にEBV関連腫瘍と考えられている上咽頭がん、ホジキン病、鼻性NK/Tリンパ腫の生検パラフィンブロックを用いて、LMP1, Siah1, HIF1 α 、VEGFなどの血管新生因子、DCCおよびp53（癌抑制遺伝子）カドヘリンの免疫組織学的検査を行う。

また、LMP1陽性時陰性時におけるSiah1の陽性率をみる。最終的にはヒト上咽頭癌組織においてLMP1, Siah1とその関連蛋白についてその発現を検討、臨床パラメーターと比較検討し臨床的にはいかなる影響をもっているかを検討する。

2) LMP1導入上咽頭細胞の分子生物学的検討：LMP1発現プラスミドを上咽頭上皮不死化細胞にトランスフェクションにて導入しその後コントロール細胞とウェスタンブロット法を用いて検討を行う。また低酸素自身によるSiah1の誘導の関連性を検討するため低酸素チェンバーによる低酸素化を行った後にウェスタンブロット法により低酸素誘導因子の発現に相乗効果がみられるかを検討する。

3) LMP1陽性細胞のマウス移植下における分子生物学的解析：レトロウイルス法でLMP1を強制発現させた正常上咽頭細胞をヌードマウス皮下に移植後4週間で腫瘍を採取した。採取12時間前に低酸素の指標となるピモニダゾールを尾静脈より投与する。

4. 研究成果

1) EBV関連腫瘍患者のLMP1/Siah1関連因子の組織発現と臨床的パラメーターの解析：LMP1, Siah1, HIF1 α 、VEGFなどの血管新生因子、DCCおよびp53（癌抑制遺伝子）カドヘリンの免疫組織学的検査をおこなったところ上咽頭癌においてのみLMP1とVEGFやHIF1 α 、Siah1の因子には相関する傾向がみられた。他の鼻性NK/Tリンパ腫やホジキンリンパ腫では相関関係は認めなかった。

臨床的パラメーターの解析において、上咽頭がん患者ではSiah1はその発現頻度は病期進行度があがれば高い傾向にあった。LMP1の発現は必ずしも病期進行度とは比例しなかつ

た。

2) LMP1導入上咽頭細胞の分子生物学的検討：低酸素環境とLMP1発現の間には相乗的な効果を認め二つの刺激によってSiah1もHIF1 α もその発現レベルが上昇した。逆にSiah1の阻害プラスミドを共発現したところ、これらの低酸素誘導因子の発現増強は低下したため、LMP1による誘導、低酸素自身による誘導いずれにもSiah1は関与していることが判明した。

3) LMP1発現細胞の免疫不全マウスへの移植：コントロール細胞およびLMP1発現上咽頭上皮細胞をヌードマウス皮下に移植、4週間経過し腫瘍が形成されることを確認した。低酸素領域およびHIF1 α 陽性領域は比較的類似する部位が染色された。低酸素領域とSiah1,あるいはLMP1とSiah1は同一癌細胞内に染色陽性像を認めたため、マウスを用いた系列でも上記の仮説が証明された。このことから生体内では上咽頭癌が増殖する際にはLMP1の信号のみならず生体環境が形成する低酸素環境自身が腫瘍の形成に深く関与している事が示唆された。

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9件)

①Murono S, Hirota K, Kondo S, Furukawa M. (他2名, 5番目) An extremely rare case of large Delphian node metastasis preceding primary laryngeal cancer.

Auris Nasus Larynx. 36:614-617, 2009, 査読有

②Endo K, Kondo S, Furukawa M (他6名, 番目) Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration

Oncogene. 28: 1725-1735 2009, 査読有

③Tsuji A, Wakisaka N, Kondo S, Furukawa M (他2名, 5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

④Wakisaka N, Kondo S, Furukawa M. (他2名, 5番目) A solitary fibrous tumor arising in the parapharyngeal space, with MRI and FDG-PET finding.

Auris Nasus Larynx 36: 367-71 2008, 査読有

⑤Nakashima M, Kondo S, Furukawa M. (他4名, 6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

⑥Shimizu Y, Kondo S, Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. (4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

⑦Yoshizaki T, Wakisaka N, Kondo S, Furukawa M (他4名, 8番目) Treatment of locally recurrent Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma using anti-viral agent cidfovir.

J Med Virol. 80:879-82, 2008, 査読有

⑧Wakisaka N, Murono S, Kondo S, Furukawa M, Yoshizaki T. (4番目) Post-operative pharyngocutaneous fistula after laryngectomy

Auris Nasus Larynx 35:203-8 2008, 査読有

⑨Yoshizaki T, Wakisaka N, Murono S, Kondo S, Furukawa M (他5名, 10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

[学会発表] (計6件)

①近藤 悟、脇坂 尚宏、古川 侃ら Epstein Barr ウイルス LMP1 による上皮系細胞における癌前駆細胞形質の誘導、第 69 回日本癌学会、2010 年 9 月 23 日、(大阪)

②脇坂尚宏、古川侃ら 頭頸部癌における動注化学療法と放射線療法の同時併用療法後の TS-1 補助化学療法の有効性に関する検討、第 33 回頭頸部癌学会、2009 年 6 月 12 日、(北海道)

③室野重之、近藤 悟、脇坂尚宏、吉崎智一、古川 侃 T3 喉頭癌に対する超選択的動注化学療法後の声帯可動性、第 32 回日本頭頸部癌学会、2008 年 6 月 12 日、(東京)

④室野 重之, 吉崎 智一, 古川 亙
T1 声門癌の再発に対するレーザー手術、第
60 回日本気管食道科学会、2008 年 6 月 7 日、
(熊本)

⑤近藤 悟, 脇坂 尚宏, 室野 重之, 吉崎
智一, 古川 亙
上咽頭細胞における EBV-LMP1 による MUC1 お
よび抗細胞接着作用の誘導 第 31 回日本頭
頸部癌学会、2007 年 6 月 14 日、(神奈川)

⑥堀川 利之, 吉崎 智一, 古川 亙
EBV-LMP1 による上皮間葉移行、Twist の誘導
および上咽頭癌転移への関与 第 20 回日本口
腔・咽頭科学会、2007 年 6 月 7 日、(愛知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 亙 (FURUKAWA MITSURU)
金沢大学・副学長
研究者番号：40092803

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

吉崎 智一 (YOSHIKAZI TOMOKAZU)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70262582

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・医学系・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