

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19406021  
 研究課題名（和文）中国南部のEBウイルス関連上咽頭癌発症と環境因子の修飾作用に関する分子疫学的研究  
 研究課題名（英文）Molecular epidemiology study on carcinogenic mechanism of Epstein-Barr-associated nasopharyngeal carcinoma and modification by environmental factors in southern China  
 研究代表者  
 村田 真理子（MURATA MARIKO）  
 三重大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：10171141

## 研究成果の概要（和文）：

Epstein-Barr ウィルス感染上咽頭癌(NPC)は中国南部における重要な健康問題である。我々は中国広西医科大学との共同研究により上咽頭癌患者の血清および生検試料を用いて酸化・ニトロ化ストレスによる DNA 損傷および発がん機構について検討した。二重蛍光免疫組織染色法により癌部に 8-nitroguanine および 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) の強い染色を認めた。また、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現を認め、IL-6 による EGFR および STAT3 の活性化を介した iNOS 発現が DNA 損傷を引き起こし、発がんに至ることが示唆された。血清 8-oxodG は対照群に比べ上咽頭癌患者で有意に高い値であった。NPC 培養細胞および上咽頭癌患者組織において Ras-related associated with diabetes (RRAD) のプロモーター領域の DNA メチル化異常を検出している。これらの知見は上咽頭癌発症予防対策に寄与すると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma (NPC) is an important health problem in southern China. We obtained serum and biopsy specimens of nasopharyngeal tissues from NPC patients in southern China. We performed double immunofluorescent staining to examine the formation of nitrative and oxidative DNA lesions (8-nitroguanine, and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)) in these specimens. DNA lesions were observed in cancer cells and inflammatory cells of NPC patients. Intensive immunoreactivity of iNOS was detected in the cytoplasm of cancer cells. Nuclear accumulation of EGFR and STAT3 activation by IL-6 may play the key role in iNOS expression and resultant DNA damage, leading to EBV-mediated NPC. The serum level of 8-oxodG in the NPC patients was significantly higher than that in the control. Promoter hypermethylation of Ras-related associated with diabetes (RRAD) was detected in all six NPC cell lines and most of primary NPC tissues. These findings may provide a strategy for preventing the development of NPC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：環境衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：中国南部、Epstein-Barr ウィルス、上咽頭癌、8-ニトログアニン、炎症

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr (EB) ウィルスは世界中のすべての人間集団で感染がみられ、成人では90%以上の感染率である。感染により生涯にわたるキャリア状態となり、悪性リンパ腫や上咽頭癌などのヒト腫瘍性疾患に関与している。EB ウィルス感染は国際がん研究機関 (IARC) によって「ヒトに対して発がん性がある (Group1)」と評価されている。しかし、ほとんどのヒトが感染しているにもかかわらず、悪性腫瘍の発生には地域特異性が認められている。アフリカではバーキットリンパ腫、中国南部地域では上咽頭癌の発生が多い。したがって、EB ウィルス感染に加えて、発がん過程において補助的因子が存在する可能性が強く示唆される。すなわち、地域に特異的な発がん促進作用を有する環境因子が存在し、これを解明することが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、中国南部地域における EB ウィルス感染による上咽頭癌発症の分子機構を明らかにし、予防対策を確立することにより、中国における重大な健康問題を解決しようとするものである。

## 3. 研究の方法

(1) 中国南部地域におけるフィールド調査：海外研究者とともに現地病院および広西医科大学医学研究センター上咽頭癌研究部の協力の下、インフォームド・コンセントの得られた EB ウィルス感染者および上咽頭癌患者を調査対象とし、病歴の聴取および EB ウィルス感染検査データ、生活歴を把握し、血液および尿を採取した。また、上咽頭癌患者からの咽頭生検・手術標本を得た。

(2) 生体試料中の 8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の検出：上咽頭粘膜標本における免

疫組織染色法により、8-ニトログアニン、iNOS および 8-oxodG の咽頭粘膜組織における局在を観察した。血清を用いて HPLC に連結した電気化学検出器 (HPLC-ECD) により 8-oxodG を定量した。

(3) EB ウィルス感染状況、DNA 損傷塩基および炎症関連物質への環境因子の影響解析：EB ウィルス感染状況 (抗 EB ウィルス抗体価) と各種検体中の酸化・ニトロ化 DNA 損傷量による炎症動態との関連性を解析した。

## 4. 研究成果

中国南部の大学病院を受診した上咽頭炎患者および上咽頭癌患者の生検・手術標本を得て免疫組織化学染色を行い、8-ニトログアニンおよび酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxodG の生成部位を解析した。上咽頭癌の患者の標本において、腫瘍細胞と浸潤している炎症細胞に 8-ニトログアニンと 8-oxodG の強い免疫反応が観察された。8-ニトログアニンと iNOS の蛍光二重染色では、癌細胞に 8-ニトログアニンと iNOS の発現がみられ、これらが共存していることが確認された。粘膜下層の大量な炎症細胞には強い 8-ニトログアニンの免疫反応が観察された。8-ニトログアニンの染色性は、EBV 感染のない咽頭炎、EBV 感染を伴う咽頭炎、上咽頭癌の順に強くなり、統計学的に有意な差を認めた。8-oxodG、iNOS についても同様の傾向を認めた。本研究で、8-ニトログアニン生成が EBV 感染による炎症から発がんに至る過程で有意に増加することを示した。8-ニトログアニンは種々の感染・炎症関連発がんのリスクを早期に評価する有効なバイオマーカーになりうると期待される (*Int J Cancer*, 2008)。

血清を用いて酸化ストレス指標である 8-oxodG、炎症性サイトカイン IL-6 および EBV 感染マーカーとして EBV-viral capsid

antigen (VCA)-IgA および EBV-early antigen (EA)-IgG を ELISA キットにより測定した。生検標本より DNA および RNA を抽出し、DNA メチル化特異的 PCR(MSP) および遺伝子発現解析および免疫染色を行った。免疫組織染色法により、癌部で酸化的 DNA 損傷塩基 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) およびニトロ化 DNA 損傷塩基 8-nitroguanine が強く染色され、iNOS の発現を確認し、また、癌患者での血清 8-OHdG の上昇を明らかにした(*Med Oncol*, 2010)。さらに、上咽頭癌患者では血清 IL-6、EBV-VCA-IgA および EBV-EA-IgG のいずれもが他の患者に比べ有意に高かった。上咽頭癌培養細胞および上咽頭癌患者生検標本において、新しいがん抑制遺伝子候補として Ras-related associated with diabetes (RRAD) のメチル化異常および発現低下を認めた。RRAD ががん抑制遺伝子である可能性が示唆された。

以上より、炎症を介した活性酸素種や活性窒素種による DNA 損傷および DNA メチル化異常が EV ウィルスによる上咽頭癌発症に関与することが明らかとなった。

#### 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 48 件)

1. Huang Y-J., Zhang B-B., Ma N., Murata M., Tang A-z., Huang G-W. Nitratative and oxidative DNA damage as potential survival biomarkers for nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol.* (in press).(2010) 査読有
2. Hiraku Y., Kawanishi S., Ichinose T., Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.* (in press)(2010) 査読有
3. Watanabe C., Egami T., Midorikawa K., Hiraku Y., Oikawa S., Kawanishi S., Murata M., DNA damage and estrogenic activity induced by the environmental pollutant 2-nitrotoluene and its metabolite. *Environ. Health Prev. Med.* (in press)(2010) 査読有
4. Hiraku Y., Formation of 8-nitroguanine, a nitratative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance, *Environ. Health Prev. Med.* (in press).(2010) 査読有
5. Minata M, Harada KH, KärrMa N. A, Hitomi T, Hirokawa M, Murata M., Gonzalez FJ, Koizumi A. Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha in Hepatobiliary Injury Induced by Ammonium Perfluorooctanoate in Mouse Liver. *Ind Health.* 48(1):96-107. (2010) 査読有
6. Hiraku Y., Kawanishi S., Prognostic significance of nitratative DNA damage in infection- and inflammation-related carcinogenesis, In: *Nitric Oxide and Cancer: Prognosis, Prevention and Therapy*, Springer, New York, NY, USA (in press). (2010) 査読有
7. Hiraku Y., Kawanishi S., Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitratative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis, *Methods. Mol. Biol.* 512:3-3. (2009) 査読有
8. Oikawa S., Yamada T, Minohata T, Kobayashi H, Furukawa A, Tada-Oikawa S, Hiraku Y., Murata M., Kikuchi M, Yamashita T. Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.*46:1472-1477. (2009) 査読有

9. Kobayashi H, Fukuhara K, Tada-Oikawa S, Yada Y, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The mechanisms of oxidative DNA damage and apoptosis induced by norsalsolinol, an endogenous tetrahydroisoquinoline derivative associated with Parkinson's disease. *J Neurochem*. 108(2):397-407. (2009) 査読有
10. Ma N., Kawanishi M, Hiraku Y, Murata M, Huang GW, Huang Y, Luo DZ, Mo WG, Fukui Y, Kawanishi S. Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression. *Int J Cancer*. 122(11):2517-25. (2008) 査読有
11. Thanan R., Murata M, Pinlaor S, Sithithaworn P, Khuntikeo N, Tangkanakul W, Hiraku Y, Oikawa S, Yongvanit P, Kawanishi S. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and the effect of anti-parasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17(3):518-24. (2008) 査読有
12. Tada-Oikawa S, Kato T, Kuribayashi K, Nishino K, Murata M, Kawanishi S. Critical role of hydrogen peroxide in the differential susceptibility of Th1 and Th2 cells to tributyltin-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 75(2):552-61. (2008) 査読有
13. Ma N., Kawanishi M, Hiraku Y, Murata M, Huang GW, Huang Y, Luo DZ, Mo WG, Fukui Y, Kawanishi Y: Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression. *International Journal of Cancer*, 122(11):2517-25 (2008) 査読有
14. Hoki Y, Murata M, Hiraku Y, Ma N., Matsumine A, Uchida A, Kawanishi S. 8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of malignant fibrous histiocytoma, a model of inflammation-related cancer. *Oncol Rep*. 8(5):1165-9. (2007) 査読有
15. Hiraku Y, Tabata T, Ma N., Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with huMa N. papilloma virus infection. *Cancer Sci*. 98(7):964-72. (2007) 査読有
16. Hoki Y, Hiraku Y, Ma N., Murata M, Matsumine A, Nagahama M, Shintani K, Uchida A, Kawanishi S. iNOS-dependent DNA damage in patients with malignant fibrous histiocytoma in relation to prognosis. *Cancer Sci*. 98(2):163-8. (2007) 査読有
17. Hiraku Y, Tabata T, Ma N., Murata M, Ding X, Kawanishi S: Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with huMa N. papilloma virus infection. *Cancer Science*. 98(7):249-257 (2007) 査読有
- [学会発表] (計 69 件)
1. Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi, Takamichi Ichinose, Mariko Murata, The role of iNOS-mediated DNA damage in inflammation-related carcinogenesis, 4th International Conference on Oxidative/Nitrosative Stress and

- Disease, New York, USA, 2009年10月28-30日
2. 翠川裕、中村哲、翠川薫、村田真理子、ブアバン・スーシボン、ラオスにおける生活習慣病の現状と有害金属汚染について、第50回日本熱帯医学会大会総会、沖縄市、2009年10月22日-23日
  3. Raynoo Thanan, Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Identification of protein carbonyls in liver tissues of patients with liver fluke-induced cholangiocarcinoma, 第68回日本癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
  4. Yingxi Mo, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata, Hypermethylation of RRAD promoter in nasopharyngeal carcinoma., 第68回日本癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
  5. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma and Shosuke Kawanishi, Nitrate and oxidative DNA damage via chronic inflammation by liver fluke infection; in relation to cholangiocarcinoma development. Fifth International Conference Biology, The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Austria, August 24-28, 2008
  6. Yusuke Hiraku, Mariko Murata, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Formation of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in patients infected with oncogenic viruses, HPV and EBV, The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Austria, August 24-28, 2008
  7. 村田真理子, 感染症および関連発がんにおける酸化ストレスの役割, 第79回日本衛生学会総会、酸化ストレス連携研究会ミニシンポジウム、2009年3月29日-4月1日、東京
  8. 翠川薫、Bouavanh Southivong、翠川裕、中村 哲、村田真理子、東南アジアにおける生活習慣病の現状と有害金属汚染について、第79回日本衛生学会学術総会、2009年3月29日-4月1日、東京
  9. Zhe Zhang, Guang-wu Huang, Libo Yan, Xiaoying Zhou, Yingxi Mo, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata, Hypermethylation of *UCHL1* promoter in nasopharyngeal carcinoma, 第8回分子予防環境医学研究会2009年1月23日-24日、東京
  10. 平工雄介、村田真理子、川西正祐, Formation of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in patients with EBV-associated nasopharyngeal carcinoma, 第79回日本癌学会総会、名古屋市、2008年10月28-30日
  11. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kiyoshi Fukuhara, and Shosuke Kawanishi, Oxidative DNA damage induced by a metabolite of tamoxifen, an anti-breast cancer drug; in relation to carcinogenicity. 第79回日本癌学会総会、2008年10月28-30日、名古屋.
  12. 平工雄介、馬 寧、村田真理子、Guang-Wu Huang, Yuanjiao Huang, Dian-Zhong Luo, Wei-Guang Mo、川西正祐, EB ウイルス感染による上咽頭癌患者におけるニトロ化DNA損傷, 第8回日本NO学会学術集会、2008年5月9-10日、仙台市
  13. 村田真理子、平工雄介、及川伸二、川西正祐, タイ肝吸虫感染者および胆管癌患

者における酸化ストレスマーカー  
8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine の有  
用性の検討,第 78 回日本衛生学会総会、  
2008 年 3 月 28-31 日、熊本市

14. Kimiko Ito , Mariko Murata, Dietary supplementation with coenzyme Q 10 decreases urinary level of 8-hydroxydeoxyguanosine in healthy subjects, Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The Japanese Environmental Mutagen Society, 2007 年 11 月 29-30 日、北九州市
15. Shiko Takeuchi, Mariko Murata, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi, Formation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by nitric oxide (NO) and superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The Japanese Environmental Mutagen Society, November 28-30, Kitakyushu, Japan
16. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa and Shosuke Kawanishi, Ma Nganese enhances oxidative damage to cellular and isolated DNA induced by a coffee polyphenol, chlorogenic acid, European Meeting 2007 of the Society for Free Radical Research, 2007年10月10-13日, Portugal.
17. 村田真理子、古川絢子、平工雄介、及川伸二、川西正祐, プロテオーム解析によるタイ肝吸虫関連胆管癌における cytokeratin 19 の検出,第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3-5 日 横浜

[図書] (計 2 件)

1. 村田哲也、村田真理子、第 1 章 がんの生物学、腫瘍薬学 (川西正祐、他 編)、

南山堂、1-14 (2010)

2. 谷口アキ、村田真理子、第 5 章 子どもの病気とその予防、子どもの保健-理論と実践-、日本小児医事出版社、第 6 版、139-208 (2010)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 真理子 (MURATA MARIKO)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10171141

### (2) 研究分担者

及川 伸二 (OIKAWA SHINJI)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10277006

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)  
三重大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：30324510

馬 寧 (MA NEI)  
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授  
研究者番号：30263015