

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10095

研究課題名(和文) ヒト唾液腺腫瘍におけるEpstein-Barr virusの関与

研究課題名(英文) Involvement of Epstein-Barr virus (EBV) in human salivary gland tumors

研究代表者

菊池 建太郎 (KIKUCHI, Kentaro)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：30349998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr virus (EBV) 感染とBurkittリンパ腫、鼻咽頭癌、胃癌、口腔癌などのリンパ系・上皮系組織の癌との関係が報告されている。しかし、EBVが唾液腺腫瘍に関連があるかは不明である。本研究では、唾液腺腫瘍へのEBVの関与を明らかにするために、合計188例のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて検討を行った。その結果、悪性腫瘍では、良性腫瘍に比較して、EBV潜伏感染ゲノムの検出率とその発現レベルが高い傾向にあることが示された。これらの結果は、唾液腺腫瘍の病態にEBV潜伏感染遺伝子が関与し、その発現が増加していることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、EBVが唾液腺腫瘍形成の1要因となる可能性が示唆されたことから、化学療法や放射線療法がほぼ無効である唾液腺悪性腫瘍の新たな治療法の開発に貢献でき意義あるものと考えられる。また、成人の90%以上に潜伏感染しているEBVの再活性化を阻止できれば、EBV感染唾液腺上皮細胞の癌化を抑制でき、これらEBVの再活性化因子(歯周病菌由来因子や免疫力低下など)を標的とした予防や新薬の開発にも繋がり社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：A relationship between Epstein-Barr virus (EBV) infection and cancer of lymphoid and epithelial tissues such as Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, gastric carcinoma, and oral cancer has been reported. However, it has remained uncertain whether EBV plays a role in tumorigenesis of salivary gland tissue. In the present study we detected the EBV genome and latent EBV gene expression in salivary gland tumors to clarify whether EBV is involved in tumorigenesis of the salivary gland. We examined 188 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. EBV genome and the level of expression of latent infection genes were higher in malignant tumors than in benign tumors of the salivary gland. These results suggest the involvement of EBV latent infection genes and their increased expression in the pathogenesis of salivary gland tumors.

研究分野：病理学

キーワード：Epstein-Barr virus (EBV) EBNA-2 LMP-1 EBER 唾液腺腫瘍 CD21 EphA2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV)は1964年にEpsteinらによって分離された癌原ウイルスで¹⁾、リンパ球系腫瘍のみならず、上皮系腫瘍においてもEBVが発癌に関連することが示されている。現にわれわれも口腔原発のEBV関連腫瘍に関する報告を行ってきた²⁻⁵⁾。しかし、唾液腺腫瘍におけるEBVの関与についての詳細な研究報告はほとんどみられず不明である。EBVは、乳幼児期に唾液を介して口腔粘膜や上咽頭粘膜から侵入し、CD21を介してB細胞に初感染する。この一時期に溶解感染様式をとって複製・増殖し、その後は潜伏感染状態に移行して宿主細胞内(メモリーB細胞)でウイルスゲノムが生涯にわたって維持されることになる⁶⁾。唾液腺組織に分布するメモリーB細胞は、形質細胞に分化する過程において溶解感染を誘導し、上皮細胞指向性を有するEBVを放出する。そして唾液腺導管上皮を介して唾液とともに口腔内に排泄されたEBVは口腔粘膜上皮に感染する。その後、溶解感染が再び誘導された場合には、B細胞指向性のEBVが産生され、唾液を介して新たな宿主内のB細胞へ感染するというライフサイクルを経ることが明らかにされている⁷⁾。唾液腺は口腔粘膜から陥入した上皮によって内腔が裏装されており、つねに分裂・再生を繰り返している。つまりその分布局在は明らかではないが組織幹細胞(不安定細胞)が存在していることになる。したがって、唾液腺の導管上皮細胞(幹細胞)にEBVが潜伏感染すると仮定したならば、加齢(老化)に伴い免疫力が衰えていくことでEBVゲノムの再活性化が生じ、唾液腺癌が発生したとしても不思議ではない。もし、EBV関連唾液腺癌が存在したならば、その発生や進展メカニズムを解明することで、新たな治療法の開発や予防法の確立に貢献でき意義あるものと考えられる。

2. 研究の目的

最近われわれは、口腔扁平上皮癌の発症にEBVが関与している可能性を報告した。口腔顎顔面領域の悪性腫瘍としては、口腔扁平上皮癌について唾液腺癌の頻度が高く、また良性の腺腫から腺癌へ悪性転化する症例にもしばしば遭遇する。EBVは唾液中に分泌されることは知られているが、唾液腺腫瘍発症への関与については不明である。そこで、本研究では、ヒト唾液腺腫瘍の発生にEBVが関与するの可否かを明らかにすることを目的とする。EBV関連唾液腺腫瘍が存在するとしたならば、外科的切除以外の放射線や化学療法の効果が望めない唾液腺悪性腫瘍に対して、EBVを標的とした新たな治療法の開発や発癌予防に貢献でき意義あるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ヒト唾液腺腫瘍におけるEBV潜伏感染ゲノムの検出とその発現について

材 料

唾液腺腫瘍の病理組織診断の確定した手術切除検体 188例のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた。対象は唾液腺の良性上皮性腫瘍 129例および悪性上皮性腫瘍 59例とした。陽性コントロールには加齢性EBV関連リンパ増殖症³⁾、EBV陽性粘膜皮膚科潰瘍⁴⁾、炎症性扁桃および反応性リンパ節のパラフィン包埋材料の他、Burkittリンパ腫の培養細胞株であるRaji cell(資源番号: IF0 50046, 細胞株名: Raji)を使用した。尚、本研究にあたっては、明海大学歯学部倫理委員会の承認を得た(承認番号: A1910号)。

方 法

・ Polymerase chain reaction (PCR)

DNA は、抽出キット (DEXPAT, タカラバイオ) を用いて、パラフィン切片 1 枚から抽出し、使用時まで -20 で保存した。PCR に使用した primer 配列を表 1 に示す。PCR は 95 で 5 分間変性させた後、94 ・ 30 秒、58 ・ 30 秒、72 ・ 1 分間を 1 サイクルとして 45 サイクル行い、その後 72 で 5 分間の鎖伸長反応を行った。増幅後、PCR 産物を 2% agarose gel 中で電気泳動し、増幅産物を ethidium bromide 染色で可視化した。陽性コントロールには、Burkitt リンパ腫由来の培養細胞株である Raji cell からの DNA 抽出物を用いた。

Target		Sequence (5' to 3')	Size
GAPDH	(F)	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138bp
	(R)	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	
EBNA-2	(F)	AGGCTGCCACCCCTGAGGAT	206bp
	(R)	GCCACCTGGCAGCCCTAAAG	
LMP-1	(F)	ACTGATGAACACCACCGA	160bp
	(R)	GTGCGCCTAGGTTTGGAGAG	

(表 1) Primer 配列

・ *In situ* hybridization (ISH)

EBV encoded small RNA (EBER) PNA Probe/FITC 標識 (DAKO, Glostrup, Denmark) および *in situ* hybridization detection Kit (DAKO) を用いて、パラフィン切片上での EBV 感染細胞を検出した。染色手順は取り扱い説明書に準じて行った。陽性コントロールには、主として加齢性 EBV 関連リンパ増殖症および炎症性扁桃のパラフィン切片を用いた。

・ Immunohistochemistry (IHC)

ホルマリン固定パラフィン包埋材料より薄切切片を作製し、通法にしたがい切片を脱パラフィン後、内因性のペルオキシダーゼ活性阻止のために 2% 過酸化水素 (H₂O₂) 加メタノール中に室温で 15 分間処理を行った。流水およびリン酸緩衝生理食塩水 [PBS: 0.01M phosphate buffered saline (pH7.4)] で洗浄後、非特異的反応を阻止するためにブロッキング溶液 (2% bovine serum albumin in PBS) を用い室温で 15 分間処理を行った。続いて各種一次抗体を 4 で一晩反応させ、PBS にて洗浄後、ペルオキシダーゼ標識された希釈済み二次抗体 [ヒストファインシンプルステイン MAX-P0 (ニチレイバイオサイエンス)] を 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、DAB 発色溶液 [0.05% 3, 3' -diaminebenzidine tetrahydrochloride, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.01% H₂O₂] に 10 分間浸して発色した。流水で洗浄後 Mayer のヘマトキシリン溶液で 30 ~ 60 秒間核染色を行った後、水洗、70 ~ 100% エタノールによる脱水、透徹を行い、封入後に光学顕微鏡下にて観察を行った。

・ 評価方法

PCR: PCR 増幅産物は肉眼で確認できるものを陽性と判定し、各種唾液腺腫瘍の組織型ごとに陽性率 (%) を算出し評価した。

ISH および IHC: 陽性コントロール切片での陽性局在および染色態度より、評価部位を細胞の核と胞体とした。さらに、染色強度を 0 ~ 3 の 4 段階に分け、核と胞体の染色強度の和を実質細胞あたりの total intensity とし、total intensity 0-1 を score 0、total intensity 2-3 を score 1、total intensity 4-6 を score 2 として評価した。最終的な intensity は score 0 と 1 を low grade、score 2 を high grade の 2 群に分けて検討を行った。

(2) ヒト唾液腺腫瘍における EBV 感染関連レセプター発現について

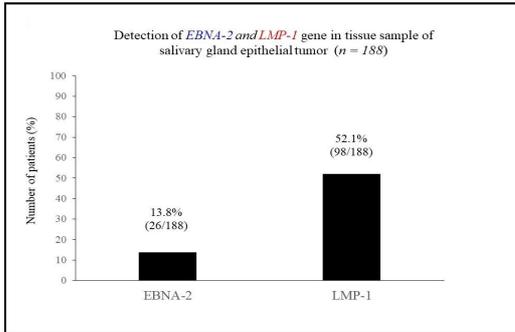
CD21 および EphA2 (Ephrin receptor A2)⁸⁾ レセプター発現について検討を行った。

4. 研究成果

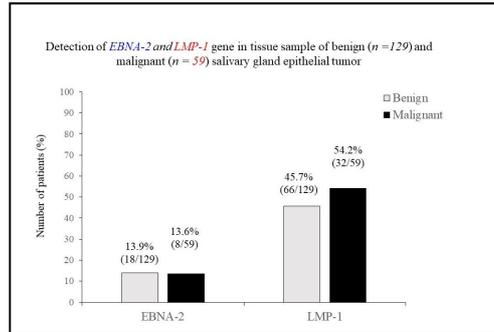
(1) ヒト唾液腺腫瘍における EBV 潜伏感染ゲノムの検出とその発現について

ヒト唾液腺腫瘍組織における EBNA-2 と LMP-1 遺伝子の検出

ヒト唾液腺腫瘍 188 症例の手術組織検体から DNA を抽出し、PCR 法にて EBV 潜伏感染ゲノム (EBNA-2, LMP-1) の検出を行った。その結果、EBNA-2 は陽性率 13.8% (26/188)、LMP-1 では 52.1% (98/188) と、LMP-1 の検出率が高かった (図 1)。良性腫瘍と悪性腫瘍の比較では、EBNA-2 (13.9%, 13.6%) と LMP-1 (45.7%, 54.2%) で、いずれも LMP-1 の陽性率が高値を示した (図 2)。



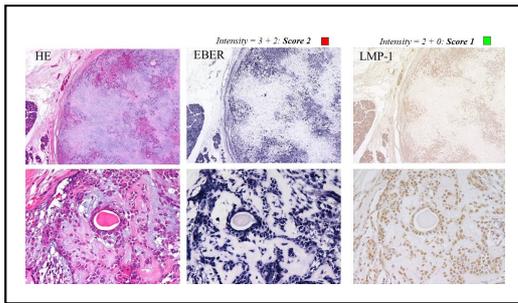
(図 1) 唾液腺腫瘍 188 症例



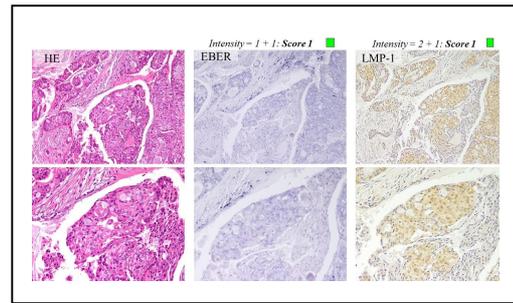
(図 2) 唾液腺の良性腫瘍と悪性腫瘍

ヒト唾液腺腫瘍における EBER および LMP-1 発現強度の検討

ヒト唾液腺腫瘍の腫瘍実質細胞における EBER と LMP-1 発現の有無について検討し、さらに、発現強度の低い Low-grade 症例と発現強度の高い High-grade 症例の 2 群に分けて検討を行った。その結果、唾液腺良性腫瘍 (図 3) ならびに悪性腫瘍 (図 4) において EBER と LMP-1 の発現が認められ、症例により種々の発現程度が示された。

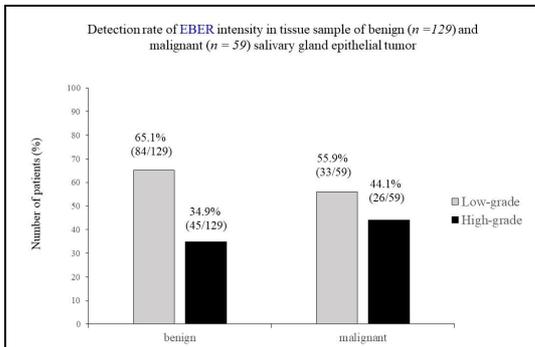


(図 3) 多形腺腫

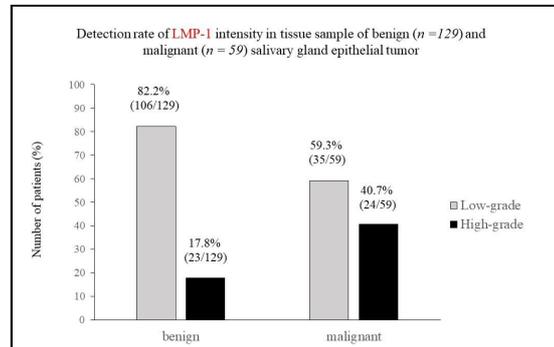


(図 4) 粘表皮癌

EBER および LMP-1 の High-grade (高発現症例) と Low-grade (低発現症例) 2 群の検討では、良性腫瘍に比較して悪性腫瘍において、EBER と LMP-1 の High-grade 症例が多い傾向にあることが示された (図 5, 図 6)。



(図 5) EBER : 高発現/低発現症例

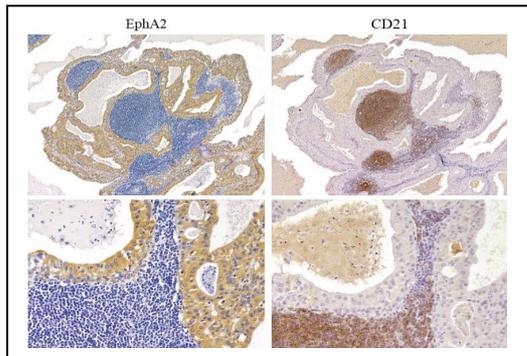


(図 6) LMP-1 : 高発現/低発現症例

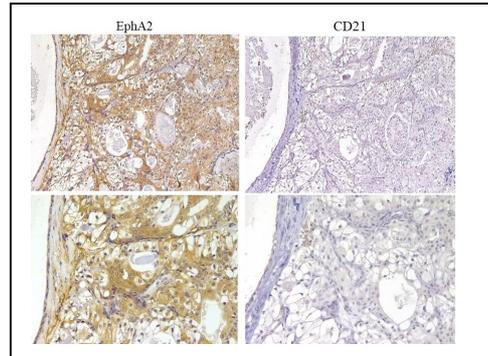
(2) ヒト唾液腺腫瘍における EBV 感染関連レセプター発現について

ヒト唾液腺腫瘍における CD21 および EphA2 の発現

ヒト唾液腺腫瘍の切除検体組織を用いて、腫瘍実質細胞に CD21 および EphA2 の質発現がみられるか否か検討を行った。その結果、188 例の唾液腺腫瘍の実質細胞に、EphA2 は多くの腫瘍型で発現がみられたが、CD21 の発現は腫瘍実質細胞に認められなかった (図 7 , 図 8)



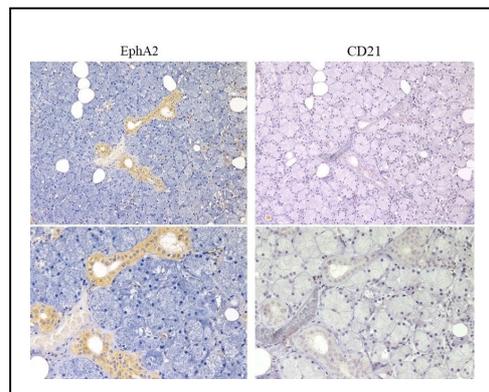
(図 7) Warthin 腫瘍



(図 8) 粘表皮癌

ヒト正常唾液腺組織における CD21 および EphA2 の発現

唾液腺腫瘍周囲に付随する正常唾液腺における CD21 および EphA2 発現について免疫組織化学的に検討を行った。その結果、EphA2 発現は形態的に正常な唾液腺の管腔細胞 (腺管上皮細胞) に陽性であったが、漿液性および粘液性腺房細胞には発現がみられなかった。さらに、正常唾液腺組織において腺房を含む管腔細胞に CD21 発現は確認できなかった (図 9)。



(図 9) 形態的に正常な耳下腺組織

引用文献

- 1) Epstein MA. et al., The Epstein-Barr virus. Springer-Verlag, Berlin, 1979, 1-22
- 2) Kikuchi K. et al., Methotrexate-Related Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated Lymphoproliferative Disorder—So-Called “Hodgkin-Like Lesion”—of the Oral Cavity in a Patient with Rheumatoid Arthritis. Hed Neck Pathol, 4, 305-311, 2010.
- 3) Kikuchi K. et al. A Case of Age-Related Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated B Cell Lymphoproliferative Disorder, so-called Polymorphous Subtype, of the Mandible, with a Review of the Literature. Head Neck Pathol, 7, 178-187, 2013.
- 4) Kikuchi K. et al. Overexpression of Activation-Induced Cytidine Deaminase in MTX- and Age-Related Epstein-Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders of the Head and Neck. J Oncol, 2015, 1-12, 2015.
- 5) Kikuchi K. et al. Detection of Epstein-Barr virus genome and latent infection gene expression in normal epithelia, epithelial dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. Tumour Biology, 2016.
- 6) Cohen, JI., Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med, 2000, 343:481-492.
- 7) Anagnostopoulos I. et al., Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. Blood, 1995, 85, 744-750.
- 8) Chen J. et al., Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. Nat Microbiol. 2018, 3, 172-180.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kikuchi K, Okamoto K, Okuyama A, Haruyama M, Kaneda T, Miyazaki Y, Ide F, Kusama K, Hoshino M, Nishimura M
2. 発表標題 Involvement of Epstein-Barr virus (EBV) in human salivary gland tumors
3. 学会等名 第111回 日本病理学会総会・学術大会, 兵庫県・神戸市, 2022年, 4月14日
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------