

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463118

研究課題名(和文) 口腔癌の発生・浸潤・転移メカニズムにおけるEBVと歯周病の関与

研究課題名(英文) Involvement of EBV and periodontal disease in the development, invasion and metastasis of oral cancer

研究代表者

菊池 建太郎 (Kikuchi, Kentaro)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：30349998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔癌の発症におけるEBVの関与を明らかにする目的で、EBV感染ゲノムならびにその発現について検討を行った。合計333例のホルマリン固定パラフィン包埋組織材料、正常粘膜(n=30)、炎症性歯肉(n=32)、炎症性扁桃(n=17)、上皮異形成(n=83)、口腔扁平上皮癌(n=150)および鼻咽頭癌(n=21)を用いた。その結果、癌に前駆する高度の上皮異形成においてEBV感染ゲノム(EBNA-2、LMP-1)が高率に検出されること、さらにEBERやLMP-1の発現強度が高い傾向にあることから、口腔扁平上皮癌の発生要因の一つとしてEBVが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study we detected the EBV genome and latent EBV gene expression in normal mucosal epithelia, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma (OSCC) to clarify whether EBV is involved in carcinogenesis of the oral cavity. We examined 333 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples (morphologically normal oral mucosa 30 samples, gingivitis 32, tonsillitis 17, oral epithelial dysplasia 83, OSCC 150 and NPC 21). EBV latent infection genes (EBNA-2, LMP-1) were detected not only in OSCC but also in severe epithelial dysplasia, mild to moderate epithelial dysplasia, gingivitis and normal mucosa. Furthermore, the intensity of EBV latent infection gene expression (EBER, LMP-1) was significantly higher in severe epithelial dysplasia than in OSCC. These results suggest that EBV latent infection genes and their increased expression in severe epithelial dysplasia might play an important role in the dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity.

研究分野：病理学

キーワード：Epstein-Barr virus (EBV) EBNA-2 LMP-1 EBER OSCC Epithelial dysplasia Periodontitis

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) はアフリカの
小児に多発するパーキットリンパ腫の培養
細胞から 1964 年に Epstein らによって分離
見出されたウイルスである¹⁾。EBV はヒトヘル
ペスウイルスの1つで、ヘルペス亜科に
分類される。約 170kb の二本鎖 DNA ウイルス
であり、約 80 個の遺伝子をコードしている。
このうち EBV-determined nuclear
antigen-1 (EBNA-1) はウイルスの自己複製
に必要であり、EBNA-2 および latent
infection membrane protein-1 (LMP-1)は感
染細胞のトランスフォーム能をもつとされ
ている。EBV は人類のほとんどが成人に至る
までに感染する最も普遍的なウイルスの一
つで、初感染の一時期に溶解感染様式をとり
複製・増殖し、その後は潜伏感染状態に移行
してウイルスゲノムが宿主細胞内に生涯維
持されることになる²⁾。ヒト腫瘍においては、
Burkitt リンパ腫、Hodgkin リンパ腫および
上咽頭癌などの悪性腫瘍の発生に EBV が深く
関わっていることが知られている。しかしな
がら、口腔癌と EBV との関連性について述べ
た報告はほとんどみられず不明である。EBV
の侵入門戸は口腔や上咽頭粘膜であり、CD21
を介し最終的に B 細胞に潜伏感染すると考え
られている。しかし近年では、上皮細胞、T
細胞、NK 細胞、単球/マクロファージ、平滑
筋細胞、内皮細胞などさらに広範囲であるこ
とが明らかにされている³⁾。口腔粘膜は重層
扁平上皮で被覆されおり、つねに分裂・再生
を繰り返している。つまりその分布局は明
らかではないが組織幹細胞が存在している
ことになる。したがって、口腔の扁平上皮細
胞(幹細胞)に EBV が潜伏感染すると仮定す
るならば、加齢(老化)に伴って様々な発癌
修飾因子の蓄積に加えて、免疫力が衰えてい
くことで EBV ゲノムの再活性化が生じ、口腔
癌が発生したとしても不思議ではない。残念
ながら、現時点で EBV 関連口腔癌の発生メカ

ニズムについては詳細な知見がない。口腔に
は舌癌と歯肉癌が最も多くみられるが、舌で
は舌側縁部に歯肉では臼歯部に高頻度に癌
が生じる。これらの粘膜部は歯周病の好発部
位と一致あるいは接している場所であり、歯
周病の何らかの影響をつねに受ける位置関
係にある。歯周ポケット内のプラーク中には
多くの EBV-DNA が存在することが示され、さ
らに歯周病菌(*P. gingivalis*)が産生する酪
酸がヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤と
して作用し、潜伏感染状態にある EBV を再活
性化することが報告されている⁴⁾。

このような学術的背景から、口腔癌、EBV、
歯周病、三者の関連性があるものと推測でき
る。EBV が口腔粘膜上皮にも潜伏感染すると
仮定したならば、加齢とともに歯周病が進行
し細菌由来の因子によって EBV が再活性化さ
れて口腔癌が生じる経路があっても不思議
ではない。もし、EBV 関連口腔癌が存在する
としたならば、EBV による口腔癌の発生・浸
潤・転移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

EBV とヒト発癌に関しては、悪性リンパ腫、
上咽頭癌および胃癌の報告があるが、口腔癌
と EBV との関連性を報告したものはほとんど
なく、歯周病との関連性も不明である。そこ
で、本研究ではヒト口腔癌の発生・浸潤・転
移メカニズムにおける EBV と歯周病の関与を
明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) in vivo における検討

材 料

病理組織診断の確定した生検または手術
切除検体 333 症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、鼻咽頭癌 21
例、口腔扁平上皮癌 150 例、上皮異形成(軽
度 22 例、中等度 43 例、高度 18 例) 83 例、
炎症性歯肉 32 例、炎症性扁桃 17 例、形態的

に正常に近似する口腔粘膜上皮 30 例（歯肉 15 例、舌 15 例）とした。陽性コントロールとして、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:IFO 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 A1321 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	
alpha tubulin	(F) ATGGAGCCCTGAATGTTGAC	158bp
	(R) CTCAAAGCAAGCATTGGTGA	
EBNA-2	(F) AGGCTGCCACCCCTGAGGAT	206bp
	(R) GCCACCTGGCAGCCCTAAAG	
LMP-1	(F) ACTGATGAACACCACCACGA	160bp
	(R) GTGCGCTAGGTTTTGAGAG	

(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、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)

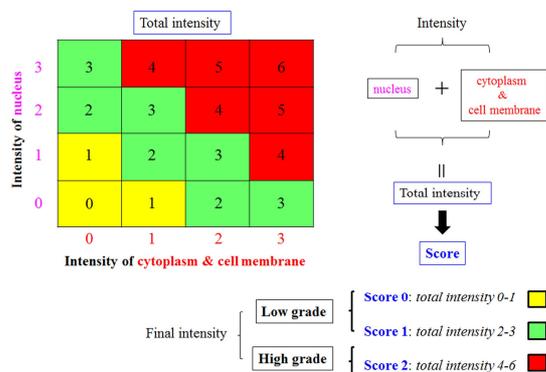
ホルマリン固定パラフィン包埋材料より薄切切片を作製し、poly-L-lysine coating slide に貼付後、通法にしたがい切片を Hemo-De(ファルマ)にて脱パラフィン後、内因性のペルオキシダーゼ活性阻止のために 2% 過酸化水素 (H₂O₂) 加メタノール中に室温で 15 分間処理を行った。流水およびリン酸緩衝生理食塩水 [PBS: 0.01M phosphate buffered saline (pH7.4)] で洗浄後、非特異的反応を阻止するためにブロッキング溶液 (2% bovine serum albumin in PBS) を用い室温で 15 分間処理を行った。続いて各種一次抗体を 4℃ で一晚反応させ、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、各種病態ごとに陽性率 (%) で評価した。

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 (図 1)。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。



(図1) 発現強度の評価方法

(2) in vitro における検討

各種の口腔癌細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22)、上咽頭癌細胞株(KB)、正常ヒト口腔ケラチノサイト(HOK)における EBV 遺伝子(EBNA-2, LMP-1, EBER)およびタンパク質発現について歯周病菌由来の酪酸との関連性を含め検討した。

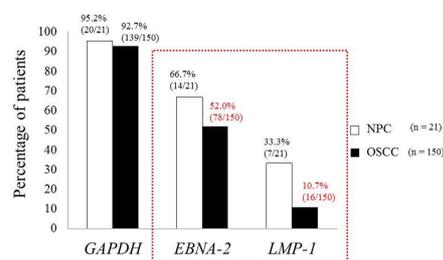
4. 研究成果

(1) in vivo

病巣部組織環境下における EBNA-2 および LMP-1 感染ゲノムの検出

鼻咽頭癌(NPC)21 例の組織検体における glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の検出率は 95.2%とほぼ良好で、EBNA-2 および LMP-1 の検出率は、それぞれ 66.7%および 33.3%であった。口腔扁平上皮癌(OSCC)150 例における GAPDH、EBNA-2 および LMP-1 の検出率は、92.7%、52.0%および 10.7%であった。鼻咽頭癌に比較して、口腔扁平上皮癌における EBNA-2 および LMP-1 の検出率は低い傾向にあることが示されたが、癌の原発巣局所において EBV 感染環境下にあることが明らかとなった(図2)。その他、口腔扁平上皮癌、上皮異形成、炎症性歯肉、形態的に正常に近似する口腔粘膜(歯肉、舌)での PCR の結果を図3に示す。

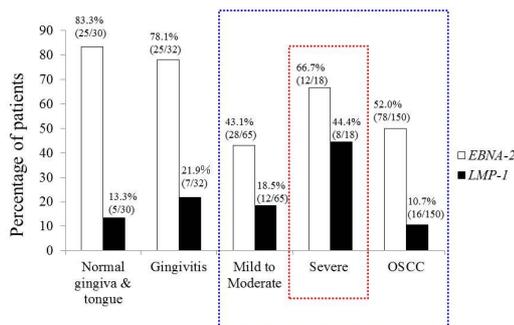
Comparison between EBV latent infected gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and oral squamous cell carcinoma (OSCC)



(図2) NPC と OSCC との比較

EBNA-2 および LMP-1 の検出率は、軽度上皮異形成 22 例で 22.7%および 45.5%、中等度上皮異形成 44 例で 53.5%および 4.7%、高度上皮異形成 18 例で 66.7%および 44.4%、炎症性歯肉 32 例で 78.1%および 21.9%、形態的に正常に近似する歯肉粘膜 15 例で 71.3%および 33.3%、形態的に正常に近似する舌粘膜 15 例で 93.3%および 13.3%であった。癌に前駆する高度の上皮異形成において EBNA-2 と LMP-1 の検出率が高いことが分かった。

Detection rate of EBV latent infected gene in the normal, inflamed, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma tissues

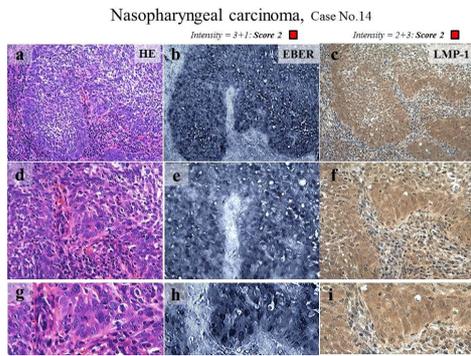


(図3) EBNA-2 および LMP-1 の検出率

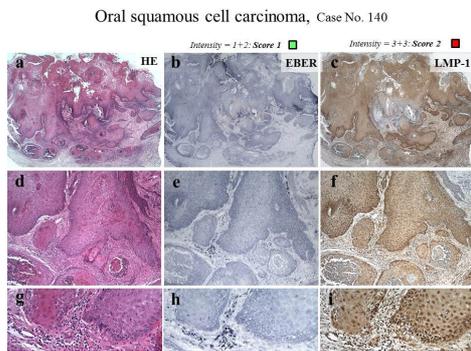
病巣部実質細胞における EBER および LMP-1 発現

鼻咽頭癌症例における EBER および LMP-1 の発現は多くの症例で認められ、実質細胞の核および細胞質に強い陽性反応がみられ、score も比較的高い傾向にあることが分かった(図4)。口腔扁平上皮癌症例においても EBER および LMP-1 の発現が認められる症例があることが分かった。腫瘍浸潤胞巣辺縁の実質細胞の核や細胞質にやや強く陽性反応が認められる傾向にあり、EBER と LMP-1 の染色

分布もほぼ類似していた (図5)



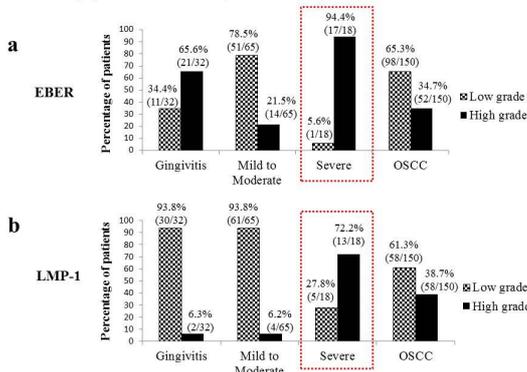
(図4) 鼻咽頭癌 (NPC)



(図5) 口腔扁平上皮癌 (OSCC)

鼻咽頭癌と口腔扁平上皮癌における EBV と LMP-1 の染色強度を比較してみると、いずれも鼻咽頭癌に high grade 症例が多いことが示された。その他、各種病変における EBV および LMP-1 の染色強度を low grade と high grade の二群に分けて検討してみると、口腔扁平上皮癌に前駆する高度上皮異形成において high grade 症例が多い傾向が示された (図6)。

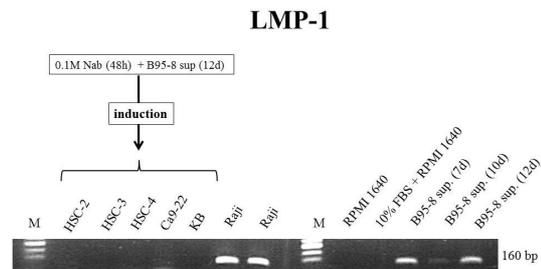
Detection rate of EBV and LMP-1 in the inflamed, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma tissues



(図6) EBV (a)および LMP-1 (b)

(2) in vitro

各種の口腔癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22)、上咽頭癌細胞株 (KB)、正常ヒト口腔ケラチノサイト (HOK) における EBV 遺伝子 (EBNA-2, LMP-1, EBV) およびタンパク質発現を検討した。PCR 法および免疫染色で EBV 遺伝子やタンパク質発現は検出できなかった。そこで EBV を各種培養細胞に感染させることを試みた。B95-8 細胞の培養上清中に EBV が産生されることを PCR 法で確認した (図7)。



(図7) LMP-1 の検出 (PCR)

この B95-8 細胞の培養上清を各種培養細胞に 48 時間作用させたところ HSC-4 のごく一部に EBV 陽性細胞がみられた。また、歯周病菌が産生する酪酸と B95-8 細胞の培養上清とを混合し、各種培養細胞に作用させたところ同様に HSC-4 のごく一部の細胞に EBV 陽性像がみられた。CD21 発現に関しては酪酸単独作用で HSC-3 および HSC-4 のごく一部に陽性像がみられた。しかしながら、これらの in vitro のデータは再現性を得るには至っていない。以上の結果からは、EBV、口腔癌および歯周病との関連性が示唆されるが、さらなる証拠を得るためには EBV 感染培養株 (ヒト口腔癌) の樹立が必要であると考えられた。

引用文献

- Epstein MA. *et al.*, Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma, *Lancet*, Vol. 1, 1964, 702-703
- Cohen JI, Epstein-Barr virus infection, *N Engl J Med*, Vol. 343, 2000, 481-492
- Okano M, Gross TG, Advanced therapeutic and prophylactic strategies for Epstein-Barr virus infection in immunocompromised

patients, Expert Rev Anti Infect Ther, vol. 5, 2007, 403-413

Dawson DR. *et al.*, Real-time polymerase chain reaction to determine the prevalence and copy number of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in subgingival plaque at individual healthy and periodontal disease sites, J Periodontol, Vol. 80, 2009, 1133-1140

Imai K. *et al.*, The periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. Biochimie, Vol. 94, 839-846

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, Vol. 7, 2013, 178-87

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 2 件)

Kikuchi K, Noguchi Y, de Rivera MW, Hoshino M, Sakashita H, Yamada T, Inoue H, Miyazaki Y, Nozaki T, González-López BS, Ide F, Kusama K, Detection of Epstein-Barr virus genome and latent infection gene expression in normal epithelia, epithelial dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. Tumor Biology, 査読有, Vol. 37, No. 3, 2016, 3389-404
DOI: 10.1007/s13277-015-4167-7

宮崎祐司、菊池建太郎、草間薫: 特集: 口腔環境と全身疾患の関係 ~ 口腔微生物とがん ~ , Bio Industry, 査読無, 32 巻, 2015, 38-45

〔学会発表〕(計 1 件)

Kikuchi K, Inoue H, Ide F, Kusama K,

Involvement of Epstein-Barr virus (EBV) in squamous cell carcinoma. 第 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 北海道・札幌, 2015 年 7 月 31 日

〔図書〕(計 1 件)

菊池建太郎, 宮崎裕司, 草間薫 他, シーエムシー出版, 口腔微生物と“がん”腸内細菌・口腔細菌と全身疾患, 2015, pp.135-143

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 建太郎 (KIKUCHI Kentaro)
明海大学・歯学部・病態診断治療学講座病理学分野・准教授
研究者番号: 30349998

(3) 連携研究者

草間 薫 (KUSAMA Kaoru)
明海大学・歯学部・病態診断治療学講座病理学分野・教授
研究者番号: 20130479

坂下 英明 (SAKASHITA Hideaki)
明海大学・歯学部・病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学 2 分野・教授
研究者番号: 10178551

宮崎 裕司 (MIYAZAKI Yuji)
明海大学・歯学部・病態診断治療学講座病理学分野・助教
研究者番号: 40526547

山田 勉 (YAMADA Tsutomu)
日本大学・医学部・病態病理学系人体病理学分野・講師
研究者番号: 40182539

井出 文雄 (IDE Fumio)
明海大学・歯学部・病態診断治療学講座病理学分野・臨床教授
研究者番号: 50147617

(4) 研究協力者

井上 八ルミ (INOUE Harumi)