

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18725

研究課題名（和文）EBウイルス関連microRNAによる上咽頭癌治療後の予後推定法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for predicting prognosis after treatment of nasopharyngeal carcinoma using EB virus-related microRNA

研究代表者

青木 由宇（AOKI, Yoshitaka）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00837172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：EBV関連上咽頭癌細胞から産生されるmiRNAであるBamHI A rightward transcript miRNA（BART miRNA）は44種類ある。EBER陽性上咽頭癌患者血清からBART miRNAsの定量を行った結果、miR-BART17-5pが最も多く産生された。今後も症例や再発時の血清を精査するなどして、上咽頭癌の早期発見に最も有用なマーカーの検討を重ねる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上咽頭癌は初発診断時には70%の症例でリンパ節転移を来しており、また、解剖学的な理由により手術が困難なのが特徴であるため、今後上咽頭がんにおける血液採取などにより、がん細胞由来の物質を調査することで再発病変を早期にとらえることが可能になるための一助となる。

研究成果の概要（英文）：There are 44 types of Bam HI A rightward transcript miRNA (BART miRNA), which is a miRNA produced by EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells. When BART miRNAs were quantified from serum of EBER-positive nasopharyngeal carcinoma patients, miR-BART17-5p was found to be the most abundant. It is necessary to continue to investigate the most useful marker for early detection of nasopharyngeal carcinoma by closely examining serum from cases and recurrences.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：BART miRNA EBV 上咽頭癌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)

上咽頭癌は初発診断時には **70%**の症例でリンパ節転移を来しており、また、解剖学的な理由により手術が困難なのが特徴で、化学療法や放射線療法に感受性が良好なため化学放射線療法が第一選択となる。

### (2)

上咽頭がんはほとんどの症例で **Epstein-Barr Virus (EBV)** が発がんに関与しているとされており、**EB** ウイルス関連上咽頭がん細胞から産生される **miRNA** である **BamHI A rightward transcript miRNA (BART miRNA)** は **44** 種類確認されている。

### (3)

これまで最も鋭敏な血中バイオマーカーとされてきた **EBV-DNA** コピー数は腫瘍の体積と相関するため、腫瘍が微小な場合は **EBV-DNA** コピー数定量法の感度が下がるという欠点がある。また、保険収載されている **EBV** 抗体価測定法では、がん完治後も陽性が持続することが少なく特異度が低いとされ、いずれも早期での再発・再燃の有無の評価は困難と考えられた。

### (4)

そこで、必ずしも腫瘍体積と相関せずに、がん細胞から活動的に産生される **miRNA** を見出すことに着目した。**EBV** がコードする **44** 種類の **BART miRNA** から、腫瘍の体積によらず多量に患者血中に存在するものを見だせれば、上咽頭がん患者の微小な腫瘍の残存・再発病変を早期にとらえることが可能となると考えた。

## 2. 研究の目的

**BART miRNAs** は生きた癌細胞から活動的に産生されるため、**EBV** がコードする **44** 種類の **BART miRNAs** から腫瘍体積によらず多量に患者血中に存在するものを見出せれば、上咽頭癌患者の微小な腫瘍の残存・再発病変を早期に捉えることが可能となり、補助化学療法の適用や早期の再発の診断が可能になる。

## 3. 研究の方法

### (1)

**EBV** 陽性上咽頭癌細胞株 (**C666.1**, **NPC-KT**) と **EBV** 陰性上咽頭癌細胞株 (**CNE2**)を確立する。それぞれの上咽頭癌親細胞と抗癌剤耐性上咽頭癌細胞株から分泌される **EBV-DNA (BamHI-W 断片)** と **44** 種類の **BART miRNAs** を定量する。

### (2)

定量の結果、耐性株から多く産生・分泌される **BART miRNA** を選択し、増加する機序や分泌メカニズムを解明する。

### (3)

各 **BART miRNA** について、上咽頭癌治療前後の患者血中コピー数を定量する。応募者の施設で保管されている血漿サンプルのうち治療後の経過が明確な上咽頭癌患者(完全寛解例・残存再発例)、健康者の、**EBV-DNA (BamHI-W 断片)** および各 **BART miRNAs** のコピー数を定量する。

## 4. 研究成果

### (1)

システム構築するにあたり、**EBV** 陽性上咽頭癌細胞株(**C666.1**, **NPC-KT**)と **EBV** 陰性上咽頭癌細胞株(**CNE2**)から **Bam HI W 領域 DNA** のプラスミドの作成と **miRNAs** の抽出を行った。**miRNAs** は作成後その都度逆転写反応と **PCR** を行った。**EBV** 陽性上咽頭癌細胞株と **EBV** 陰性上咽頭癌細胞株からそれぞれ **44** 種類の **BART miRNAs** と **BHRF1(Bam HI fragment H rightward open reading frame 1) miRNAs** を定量した。

### (2)

**Bam HI W 領域 DNA** は **EBV** 陽性上咽頭癌細胞株のみ大量に検出された。**BHRF1 miRNAs** は **EBV** 陽性上咽頭癌細胞株・**EBV** 陰性上咽頭癌細胞株とも検出されなかったが、**BART miRNAs** はすべての種類において **EBV** 陽性上咽頭癌細胞株で検出された。

( 3 )

それぞれの抗癌剤耐性上咽頭癌細胞株でも、**BART miRNAs** はほぼすべての種類において **EBV** 陽性上咽頭癌細胞株で検出された。特に **miR-BART17-5p** は大量に産生されていた。

( 4 )

**EBER** 陽性上咽頭癌患者とコントロール血清で **BART miRNAs** を定量し、血清ですべての **BART miRNAs** が検出された。しかし今回使用したパネルが高価なものであり合計で数名しか施行できなかったため、統計的な検討は困難であった。

今回は **44** 種類すべての **BART miRNAs** を統計学的な検討は困難であった。治療前の診断は **EBV-RNA** が有用で、治療後の **miR-BART17-5p** が予後を予測するとの報告がある。より安価で検査できるキットを開発し上咽頭癌患者の **44** 種類すべての **miRNAs** を精査することで症例を重ね、さらなる検討が必要と言える。今後の展望としては、治療後の予後予測マーカーを確立し、再発の早期発見と早期治療、予後改善に寄与すると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshitaka Aoki
2. 発表標題 Epstein-Barr viruses (EBV) infection is prevalent in adenoid and palatine tonsils of adults and children
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 由宇
2. 発表標題 頸部の排膿と抗菌薬で軽快したBezold膿瘍の経験
3. 学会等名 第83回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木由宇
2. 発表標題 縦隔内リンパ節転移を伴う甲状腺乳頭癌の経験
3. 学会等名 第81回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木由宇
2. 発表標題 当院における唾液腺導管癌の臨床的検討
3. 学会等名 第32回口腔咽頭科学会
4. 発表年 2019年

1．発表者名 青木由宇
2．発表標題 オーバーラップ症候群に発生した耳下腺膿瘍とそれに伴う菌血症の1例
3．学会等名 第7回感染症エアロゾル学会
4．発表年 2019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
---------	---------