

機関番号：13301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592012
 研究課題名（和文） 抗癌剤による EB ウイルス複製サイクル誘導を利用したあらたな上咽頭癌治療の開発
 研究課題名（英文） New therapeutic approach for nasopharyngeal carcinoma using induction of Epstein-Barr virus lytic cycle by anti-cancer chemotherapy
 研究代表者
 室野 重之（MURONO SHIGEYUKI）
 金沢大学・附属病院・講師
 研究者番号：20345622

研究成果の概要（和文）：EB ウイルス陽性上皮細胞を抗癌剤である CDDP で処理することにより、EB ウイルスの潜伏感染から複製サイクルへのスイッチを担う BZLF1 蛋白の発現をウェスタンブロットにより検出した。CDDP によるアポトーシスは認めなかった。CDDP を用いた化学療法を施行された上咽頭癌症例では、化学療法後の組織における組織学的治療効果はグレード 0 もしくは 1 であった。免疫染色による BZLF1 蛋白の検出は適切に施行しえなかった。

研究成果の概要（英文）：Treatment of Epstein-Barr virus-positive epithelial cell lines with CDDP, one of anti-cancer drugs, induced BZLF1 protein, which play an important role in switching latent EBV infection to lytic cycle. No clear induction of apoptosis by the drug was observed. In the biopsy specimens taken from post-chemotherapy nasopharyngeal carcinoma patients, histological effect of chemotherapy was grade 0 or 1. On the other hand, immunohistochemistry for BZLF1 could not be properly performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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，抗癌剤，EB ウイルス，複製サイクル，ガンシクロビル

1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌はその発癌に EB ウイルスが密接に関連していることは周知である。上咽頭癌の癌細胞には EB ウイルスが潜伏感染している。EB ウイルスの潜伏感染で発現する発現する遺伝子は限られており、EB ウイルス核抗原 1（EBNA1）と潜伏膜蛋白 1 および 2（LMP1 および LMP2）である。上咽頭癌は早期に転移を来しやすい癌であり、我々は、LMP 1 が細胞外基質分解酵素（MMP-9）を

誘導すること、血管新生因子（VEGF や FGF-2）の産生を増強すること、細胞運動能を亢進させること、上皮間葉転換により細胞接着能を低下させること、などを示し、上咽頭癌の転移抑制への分子標的治療の可能性を示唆してきた。

EB ウイルス潜伏感染で発現する遺伝子は限られるが、なかでも EBNA1 はウイルスを潜伏感染状態に維持するために必須の蛋白質であることが判明している。したがって、

以前より EB ウイルス関連腫瘍に対して、EBNA1 に対する抗体の使用、あるいは EBNA1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの形質導入などの手法による、EB ウイルスを標的とした治療法が *in vitro* で試みられてきた。しかしながら臨床応用にいたる成果は得られていないのが現状である。

一方、*in vitro* では EB ウイルスの潜伏感染した細胞をフォルボールエステル (TPA など) で処理すると、潜伏感染からウイルス複製サイクルへスイッチすることが知られている。複製サイクルが完了すると感染細胞は溶解に至るため、複製サイクルへの誘導が治療法として着目されてきた。ウイルス複製サイクルへのスイッチは、ウイルス前初期蛋白である BZLF1 もしくは BRLF1 によるため、BZLF1 発現ウイルスベクターによる遺伝子治療の可能性なども探られてきたが、やはり臨床応用に至る成果は得られていない。したがって、上咽頭癌の、EB ウイルスとの関連というユニークさを治療へ応用するために、新たな視点による治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、「抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) および 5-フルオロウラシル (5-FU) を用いて上咽頭癌細胞 EB ウイルスを潜伏感染から複製サイクルへ誘導すること、さらに複製サイクルで発現するウイルス由来リン酸化酵素の働きにより同時に投与したガンシクロビルをリン酸化し活性型へ変換すること、その結果ウイルス DNA 合成酵素のみならず宿主 DNA 合成酵素の働きをも阻害し宿主である癌細胞を死へ導くこと、に着目したあらたな上咽頭癌治療を開発すること」を目的とし、その達成のために以下の 3 点の解明を目的とした。

- (1) 抗癌剤により上咽頭癌に潜伏感染状態の EB ウイルスを複製サイクルに誘導できるか？

上咽頭癌細胞を抗癌剤である CDDP ならびに 5-FU で処理することにより、EB ウイルス複製サイクルにおいて発現される蛋白質、すなわち BZLF1 など、の発現を検討する。そのためには培養細胞を使用する。

- (2) 抗癌剤と同時にガンシクロビルを投与することにより相乗効果が得られるか？

ガンシクロビルはヘルペスウイルス感染に対して臨床的に用いられている薬剤である。単純ヘルペスウイルス感染症ではウイルスにより HSV-tk (チミジンキナーゼ) が発現されているため、ガンシクロビルはリン酸化され活性型となる。その結果、ウイルス DNA 合成酵素を阻害するのみではなく、宿主 DNA 合成酵素も阻害するため、宿主細胞 (ウイルス感染細胞) を死へと誘導する。EB ウイル

スにおいては、ウイルス由来リン酸化酵素 BGLF4 は潜伏感染で *h* 発現されず、複製サイクルで発現されることが知られている。したがって上咽頭癌細胞を CDDP もしくは 5-FU の抗癌剤のみで処理した場合、ならびにガンシクロビルのみで処理した場合に比べ、抗癌剤+ガンシクロビルによる処理の場合の殺細胞効果が相乗的に得られるか検証する。

- (3) 上咽頭癌における抗癌剤による化学療法において複製サイクルの指標となる蛋白質は検出されるか？

当科における上咽頭癌治療は、CDDP と 5-FU による化学療法を先行させ、その後二者線治療と化学療法をくりかえるプロトコルとなっている。第 1 コース目の化学療法の前後での上咽頭癌生検組織において、EB ウイルス複製サイクルにおいて発現される BZLF1 蛋白質の発現を検討することにより、*in vitro* でのデータが生体においても反映されるか検証する。

3. 研究の方法

研究は培養細胞を用いるものと、実際の上咽頭癌の治療を施行された症例の生検組織を用いるものの二項から構成した。

- (1) 培養細胞を用いるもの

EB ウイルス陽性上皮細胞を使用した。当初予定した NPC-KT 細胞ではなく、C666-1 細胞を使用した。細胞を抗癌剤である CDDP もしくは 5-FU にて処理し、細胞増殖能を評価した。CDDP の濃度は $1\mu\text{g/ml}$ を基本とし、 $2\mu\text{g/ml}$ まで高めた。5-FU の濃度は $5\mu\text{g/ml}$ を基本とした。細胞増殖能は、抗癌剤による処理後 72 時間の時点で、トリパンブルー染色を行い viable な細胞数を測定して求めた。処理後 96 時間の時点で細胞を回収し、cell lysate を作成した後、EB ウイルス複製サイクルにおいて発現される蛋白質、すなわち BZLF1 蛋白や BMRF1 蛋白の発現をウェスタンブロット法により検討した。

- (2) 上咽頭癌生検組織を用いるもの

5-FU および CDDP による全身化学療法を 1 コース施行された後に採取された上咽頭癌組織を用いた。当科でのプロトコルでは 5-FU を 800mg/m^2 で 1 日目から 5 日目までの 120 時間持続点滴投与、CDDP を 50mg/m^2 で 6 日目から 7 日目までの 48 時間持続投与、とした。8 日目に上咽頭癌組織を採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋の後に薄切した。ヘマトキシリ・エオジン染色により、組織学的治療効果のグレード分類を行った。アポトーシスの評価は濃縮する核の形態により行った。さらに、抗 BZLF1 抗体および抗 BMRF1 抗体を用いた免疫染色により、これらの蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

培養細胞を用いた研究では、EB ウイルス陽性上皮細胞を1種類使用した。細胞を1 μ g/ml および2 μ g/ml の CDDP および対照として生理食塩水で処理した。処理後72時間でのトリパンプルー染色による viable な細胞は、CDDP1 μ g/ml では対象と同等であり細胞増殖に影響はないと思われた。一方、CDDP2 μ g/ml では対象の約80%であり、若干の細胞増殖の低下がうかがわれた。細胞増殖に大きな変化を認めなかった。また、アポトーシスの誘導も大きな違いを認めなかった。DNA断片化などの検討は行っていないが、細胞形態からは各の濃縮も見られ、アポトーシスの関与もうかがわれた。

ウェスタンブロットでは対照群において BZLF1 蛋白は検出されなかったが、CDDP 処理群では1 μ g/ml、2 μ g/ml のいずれにおいても BZLF1 蛋白を検出した。この結果より、EB ウイルス陽性上皮細胞では抗癌剤である CDDP により、EB ウイルスの潜伏感染から複製サイクルへと誘導されることが示唆された。同様に、5-FU 処理群においてもウェスタンブロットにより BZLF1 蛋白を検出し、抗癌剤である5-FUによっても EB ウイルスの潜伏感染から複製サイクルへ誘導されることが示唆された。ガンシクロビルと抗癌剤の併用による BZLF1 蛋白の発現も解析する予定であったが、研究期間内に遂行できなかった。

一方、上咽頭癌組織を用いた研究では、治療開始前および5-FU800 mg/m²を5日間＋CDDP50 mg/m²を2日間からなる全身化学療法を施行後に採取した組織11例を使用した。ヘマトキシリン・エオジン染色では全標本において、アポトーシスに特徴的とされる濃縮した核の像はわずかに散見される程度であった。したがって、これらの抗癌剤により積極的にアポトーシスが誘導されていることは示唆されなかった。

化学療法後の組織における組織学的治療効果は7例においてグレード0、4例においてグレード1であった。したがって、抗癌剤による、アポトーシスの誘導ではない直接的な殺細胞効果も明らかではなかった。これは培養細胞における細胞増殖の結果に矛盾しないと思われた。

BZLF1 蛋白および BMRF1 蛋白 (EA-D) に対する免疫染色を試み、その発現を検討したが、適切な陽性コントロールがなく、発現を適切に評価しえなかった。培養細胞で得られた結果を実際の上咽頭が組織で検証する重要な内容であるが、本研究では達しえなかった。

培養細胞を用いた研究では、ウェスタンブロットにより、BZLF1 蛋白のみではなく、同じく複製サイクルの誘導に必須とされる BRLF1 蛋白、さらに複製サイクルの誘導のみではなく複製サイクルが進んでいることを

示すための BMRF1 蛋白 (EA-D) の検出が必要と思われた。

上咽頭癌組織を用いた研究では、BZLF1 蛋白に対する免疫染色を確立し、培養細胞で得られた結果を検証するシステムを確立することが必要であると思われた。しかしながら、EB ウイルス関連腫瘍では EB ウイルスは潜伏感染状態であるため、BZLF1 や BMRF1 のような複製サイクルで発現される蛋白質に対する陽性コントロールの選択が困難であることが予想される。AIDS 患者に発症する oral hairy leukoplakia では BZLF1 蛋白が発現することが報告されており、適切な陽性コントロールになり得ることが期待されるが、現実的にはこの標本を入手することも困難であると思われる。

上咽頭癌組織の研究からは、臨床で使用される化学療法の1コースでは組織学的治療効果は目立ったものではなかった。したがって、ガンシクロビル併用による相乗効果の検証が必要であると思われた。これは培養細胞による研究で検証されうると思われる。さらに、ガンシクロビルはヘルペスウイルス感染症に臨床で使用されている薬剤であり、抗癌剤と併用する臨床試験を視野に入れて動物実験へと発展させる必要がある。

さらに、ガンシクロビル以外に、抗癌剤との併用により相乗的に EB ウイルス複製サイクルを誘導する薬剤の探索が望まれる。その薬剤が実際に臨床で使用されうるのであればあるほど、本システムを用いた臨床研究を実施することが可能であると思われる。現在候補となりうる薬剤を一種類同定しており、本研究と同様に検証を進めていく予定である。

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6件)

- ① Yoshizaki T, Ito M, Murono S, Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma, *Auris Nasus Larynx*, in press (2011), 査読あり
- ② Horikawa T, Yoshizaki T, Kondo S, Furukawa M, Kaizaki Y, Pagano JS, Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma, *British Journal of Cancer*, 104 (2011), 1160-1167, 査読あり
- ③ 室野重之, 吉崎智一, EB ウイルスに着目した上咽頭癌の診断と治療, 耳鼻と臨床,

- 56 (2010), S39-S43, 査読あり
- ④ Murono S, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T, Treatment of nasopharyngeal carcinoma: Treatment management and future view of Epstein-Barr virus-targeting treatment, *Current Cancer Therapy Reviews*, 5 (2009) 170-177, 査読あり
- ⑤ Endo K, Kondo S, Shackelford J, Horikawa T, Kitagawa N, Yoshizaki T, Furukawa M, Zen Y, Pagano JS, Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration, *Oncogene*, 28 (2009), 1725-1735, 査読あり
- ⑥ Tsuji A, Wakisaka N, Kondo S, Murono S, Furukawa M, Yoshizaki T, 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, *Clinical Cancer Research*, 14 (2008), 5368-5375, 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ① 加藤理紗, 遠藤一平, 近藤 悟, 脇坂尚宏, 室野重之, 吉崎智一, 当科における上咽頭癌症例の検討, 第34回日本頭頸部癌学会, 2010年6月11日, 京王プラザホテル(東京都)
- ② 近藤 悟, 北川典子, 広田京子, 脇坂尚宏, 遠藤一平, 室野重之, 吉崎智一, EBVにより上咽頭癌幹細胞は誘導されるか - 第二報 -, 第34回日本頭頸部癌学会, 2010年6月11日, 京王プラザホテル(東京都)
- ③ 広田京子, 脇坂尚宏, 近藤 悟, 室野重之, 吉崎智一, 舌癌のリンパ管新生に関する免疫組織学的研究, 第34回日本頭頸部癌学会, 2010年6月10日, 京王プラザホテル(東京都)
- ④ 近藤 悟, 脇坂尚宏, 遠藤一平, 室野重之, 吉崎智一, EBVにより上咽頭癌幹細胞は誘導されるか - 第一報 -, 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会, 2010年5月20日, 仙台国際センター(宮城県)
- ⑤ 室野重之, 吉崎智一, EBウイルスに着目した上咽頭癌の診断と治療, 第15回頭頸部癌化学療法研究会, 2010年3月6日, ホテルセントラーザ博多(福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室野 重之 (MURONO SHIGEYUKI)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号: 20345622

(2) 連携研究者

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

脇坂 尚宏 (WAKISAKA NAOHIRO)
金沢大学・附属病院・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