財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008年　2月　28日

財団法人　日 中 医 学 協 会　御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：　研 究 報 告 書

受給者氏名：馬　寧　㊞

所属機関名：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

所 属 部 署：発生発達医学講座 機能解剖学分野　職名：准教授

所　在　地：〒770-8503　徳島県徳島市蔵本町３－１８－１５

電話：088-633-7052　内線：

１．助 成 金 額　：　1,000,000　円

２．研 究 テ ー マ

中国南部のEBウイルス関連上咽頭癌発症におけるiNOS依存性DNA損傷との関係

３．成 果 の 概 要（100字程度）

Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染は上咽頭癌やリンパ腫の重要な原因であり、中国東南部などで発生頻度が高い。本研究では、中国東南部の上咽頭癌患者の組織標本を用いて、8-ニトログアニン生成およびその分子機構について解析した。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。以上の結果から、EBV 感染により炎症細胞より咽頭上皮における iNOS 発現を誘導してニトロ化 DNA 損傷を起こし、発がんをもたらすと考えられる。

※発 表 論 文 等

Ma N, Kwanishi M, Hiraku Y, Murata M, Huang GW, Huang YJ, Luo DZ, Mo WG, Fukui Y, Kawanishi S.
Reactive nitrogen spcies-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGRF experssion.
International Journal of Cancer. 2008 in press.

４．研 究 組 織

日本側研究者氏名：馬　寧　職名：准教授

所属機関：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　部署：発生発達医学講座・機能解剖学分野

中国側研究者氏名：黄　光武　職名：教授

所属機関：広西医科大学附属第一病院　部署：耳鼻咽頭科

２００７年度　調査・共同研究助成報告

―日中医学協会助成事業―

中国南部のEBウイルス関連上咽頭癌発症におけるiNOS依存性DNA損傷との関係

日本側研究者代表　馬　寧
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
発生発達医学講座・機能解剖学分野　准教授
中国側研究者代表　黄光武
広西医科大学耳鼻咽喉科　教授

要旨

Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染は上咽頭癌やリンパ腫の重要な原因であり、上咽頭癌は中国東南部などで発生頻度が高い。感染・炎症関連発がんにおいては、炎症細胞および上皮細胞などから生成される活性酸素・窒素種によるDNA損傷が重要な役割を果たすと考えられる。8-ニトログアニンとは、活性窒素種により生成される変異誘発性ニトロ化核酸塩基である。本研究では、中国東南部の上咽頭癌患者の組織標本を用いて、8-ニトログアニン生成およびその分子機構について解析した。広西医科大学附属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。8-ニトログアニン生成は上咽頭癌の腫瘍細胞およびEBV感染を伴う咽頭炎患者の粘膜上皮で強く観察されたが、EBV感染を有しない咽頭炎患者の粘膜上皮では染色性は弱かった。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。以上の結果から、EBV感染に炎症細胞よりiNOS発現を誘導してニトロ化DNA損傷を起こし、発がんをもたらすと考えられる。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点は非常に意義深い。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。

Key Words
Epstein-Barr **ウイルス、上咽頭癌、8-ニトログアニン、DNA 損傷、発癌**

緒言

一般的に、慢性感染症が発がんに関与していることが推定されている。しかし、炎症による発がんの分子機構は未だ明らかでない。EBウイルスはバーキットリンパ腫、上咽頭癌との関連から、ヒトがんウイルス１号として注目を浴びた。EBウイルスはすべての人種に広く蔓延しており、大部分のヒトは成人に達するまでにEBウイルスの感染を受け、終生保持し続けることが明らかになっている。中国南方地域においては、EBウイルスの感染率が極めて高く、同時に上咽頭癌の発生率が異常に高いことが知られている。この地方では、上咽頭癌の発生率は25-50/100,000に達し、40-50歳の男性に多発する[1,2]。全癌の第四位が上咽頭癌である。疫学的に、EBウイルスの感染と上咽頭癌の発生率の密接な関与が示唆されている[3]。また、上咽頭癌が中国人に多いことから、遺伝的素因の上にウイルス発癌が加わっている可能性がある。EBウイルスだけで腫瘍化できるのか、細胞遺伝子の異常がむしろ重要ではないのか、といったことに関しては多くの研究が行われたが、現在まだ不明である。

ウイルス感染症においては、iNOSの誘導が認められ、過剰に産生されるNOはスーパーオキシナイトラ

イトなど活性酸化窒素種に変換されることにより、酸化・ニトロ化ストレスのメディエータとして機能し、細胞傷害や組織障害をもたらすことが報告されている。この NO と活性酸素によって生じる過酸化亜硝酸(NO_2^-)によって、DNA や RNA がニトロ化され、核酸塩基である 8-ニトログアニンが生成される。また、活性酸素によって誘導される 8-oxodG は、酸化的な DNA 損傷のマーカーであると考えられる。よって、iNOS と 8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の発現を調べることは、炎症関連の発癌において重要であると考えられる[4,5,6,7]。EB ウイルスの感染による上咽頭癌は、ウイルス感染による発がん機構の分子疫学的研究のモデルとして適していると考えられる。そこで本研究では、上咽頭癌の粘膜上皮でも上記のようなことが起こっているのではないかと推測し、きわめて高感度で特異性の高い抗 8-ニトログアニン抗体を用いた免疫組織化学染色によって、上咽頭癌患者の上咽頭粘膜組織における 8-ニトログアニンの局在を観察し、EB ウイルス慢性感染における細胞損傷の iNOS 依存性、さらには EB ウイルス感染による上咽頭癌発症の分子機構を明らかにすることを目的とする。

対象と方法

中国南方地域病院（広西医科大学附属病院）耳鼻咽喉科の入院および外来患者の上咽頭癌と慢性上咽頭炎患者の咽頭粘膜組織病理標本を使用した。咽頭粘膜組織病理標本は 4% フォルマリンで固定し、パラフィンで包埋した厚さ 6 μm の切片。これらの患者のうち、上咽頭癌患者は 19 人(男 10 例、女 9 例、44.7 ± 7.9 歳)。慢性上咽頭炎の患者は、7 人(男 5 例、女 2 例、46.0 ± 13.7 歳)であった。すべての患者において、EB ウイルス抗体が 1:40 以上検出され、EB ウイルスの感染を確認した。また、EB ウイルス小分子 RNA（EBV encoded small RNA, EBER）を標的とした in situ hybridization 法（DAKO 製 EBER ISH detection kit)を用いて患者咽頭粘膜組織においてウイルスの存在が検索された。対照として、EB ウイルス抗体陰性の慢性上咽頭炎の患者は 6 人(男 6 例、42.3 ± 7.3 歳)を使用した。この研究は中国広西医科大学倫理委員会にて承認された。

8-ニトログアニンに対する抗体の作成

8-ニトログアノシンと結合させるキャリア蛋白として、牛血清アルブミンの代わりにウサギにとって抗原性のないウサギ血清アルブミンを使用し、これにアルデヒドを介して結合させた 8-ニトログアノシン－RSA 複合物を反復注射したウサギから、血液を採取し抗血清を得る。そして、8-ニトログアニンを結合させた affinity カラムを用意し、抗血清中に含まれる 8-ニトログアニン抗体を吸着させる。カラムに吸着した 8-ニトログアニン抗体を elution buffer で溶出して、分光度計で吸光値を測定した。この精製抗体の特異性を Dot-immunobinding assay で検討したところ特異性が高いことが確認された[8]。抗 8-oxodG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン)モノクローナル抗体は日本老化制御研究所製品を使用した。抗 iNOS（inducible nitric oxide synthase）モノクローナル抗体は Sigma Chemical 社製品を使用した。

組織化学染色: EB ウイルス感染による上咽頭粘膜組織の病理変化について調べるためにヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。

免疫蛍光二重染色法: 厚さ 6μm の切片の脱パラフィン親水処理を行った後、抗 8-ニトログアニン抗体と抗 8-oxodG モノクローナル抗体或いは抗 iNOS モノクローナル抗体を 48 時間反応させた。二次抗体として goat anti-rabbit IgG Alexa 594 in PBS と goat anti-mouse IgG Alexa 488 in PBS を加え反応させた。これを共焦点レーザー顕微鏡で観察し、撮影した。また、各標本の染色陽性細胞数は 2 人の解剖病理学者により採点し、(-) 陰性；(+) 25%以下の陽性細胞数；(++) 25-50%陽性細胞数；(+++) 50-75%陽性細胞数；(++++) 75%以上の陽性細胞数。医学統計法は chi-square test を用い、$P<0.05$ は統計的有意な差を認められる。

結果

上咽頭癌における病理組織所見

上咽頭癌標本の HE 染色においては、粘膜固有層に腫瘍細胞が上皮性の構造を残しながら増生し、また

炎症細胞の浸潤が認められる。分泌腺の周囲にも腫瘍細胞と炎症細胞の浸潤が認められる。腫瘍細胞は、大量の異型性の強い細胞からなり、リンパ球に混じって、びまん性に増生像がみられる。

上咽頭癌における 8-ニトログアニンと 8-oxodG および iNOS の局在

上咽頭癌の患者の標本において、8-ニトログアニンと 8-oxodG の蛍光二重染色を行った。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。粘膜層においては、粘膜上皮に 8-ニトログアニンの存在が認められ、特に基底層において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、上咽頭癌癌細胞に 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。上咽頭癌の咽頭腺では、咽頭腺の周辺に大量な炎症細胞の浸潤があり、8-ニトログアニンと 8-oxodG の強い免疫反応が観察された(Fig.1)。EB ウイルスに感染した炎症細胞においても強い免疫反応が認められ、他方、EB ウイルスに感染していない炎症細胞では、8-ニトログアニンと 8-oxodG の発現が弱く、両者を比較するとその差は明らかであった。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(Table 1)。

考察

本研究では EB ウイルスに感染された上咽頭癌患者の 8-ニトログアニンの発現を明らかにした。上咽頭癌の標本では、8-ニトログアニンと 8-oxodG は同じ細胞の中に存在しているということが確認された。8-oxodG は主に DNA の中で産生され、8-ニトログアニンは DNA と RNA の両方において産生される。一方、iNOS は、上咽頭癌の癌細胞と炎症細胞に見られ、8-ニトログアニンと共存していることが証明された。このことから、上咽頭癌癌細胞と炎症細胞において、iNOS が NO 産生の供給源になっていると考えられる。

一酸化窒素合成酵素である NOS には、3 つのアイソザイムが存在し、内皮細胞由来の内皮型 NOS(eNOS)、非アドレナリン非コリン性ニューロン由来の神経型 NOS (nNOS)、マクロファージやグリア細胞由来の誘導型 NOS (iNOS)に分類されている。Jayasurya 氏は[9]、上咽頭癌組織がＥＢウイルスに感染されている状態では、炎症細胞と腫瘍細胞に iNOS の局在が認められることを確認し、NO の供給源になっているという可能を示唆した。さらに、iNOS の発現がアポトーシス細胞の発現と高い相関関係があることを証明した。細胞が炎症を起こすと、iNOS が誘導され、NO が産生される。この NO と活性酸素によって生じる過酸化亜硝酸 ($ONOO^-$) によって、DNA や RNA のグアニン塩基がニトロ化されることで、8-ニトログアニンが生成され、この化学修飾を受けた核酸塩基は、細胞分裂によって遺伝子を複製する際に脱プリン部位を生成する。この脱プリン部位は DNA 複製時に A と対合しやすいため、翻訳の間違いを引き起こし、本来 G-C の対であった部分が、分裂とともに T-A の対に置き換えられた遺伝子の突然変異を引き起こすと言われている[10]。このことにより、細胞は遺伝子突然変異またはアポトーシスに至る。

H.pylori 感染では除菌により、C 型肝炎ではインターフェロン治療により、8-ニトログアニンの産生が抑制されることも明らかにした[11, 12]。これらの結果は、8-ニトログアニンが、発癌が起こる前に炎症関連発癌リスクを評価できる新しい指標として、発癌の予防に応用し得ることを示している。さらに 8-ニトログアニンは炎症関連疾患の治療効果の判定にも応用できると考える。様々な感染による炎症を介して、細胞の遺伝子損傷をもたらし、発癌を起こす分子機構を今後さらに解析することにより、炎症関連発癌の有効な予防法および治療法の開発につながることが期待される[13]。

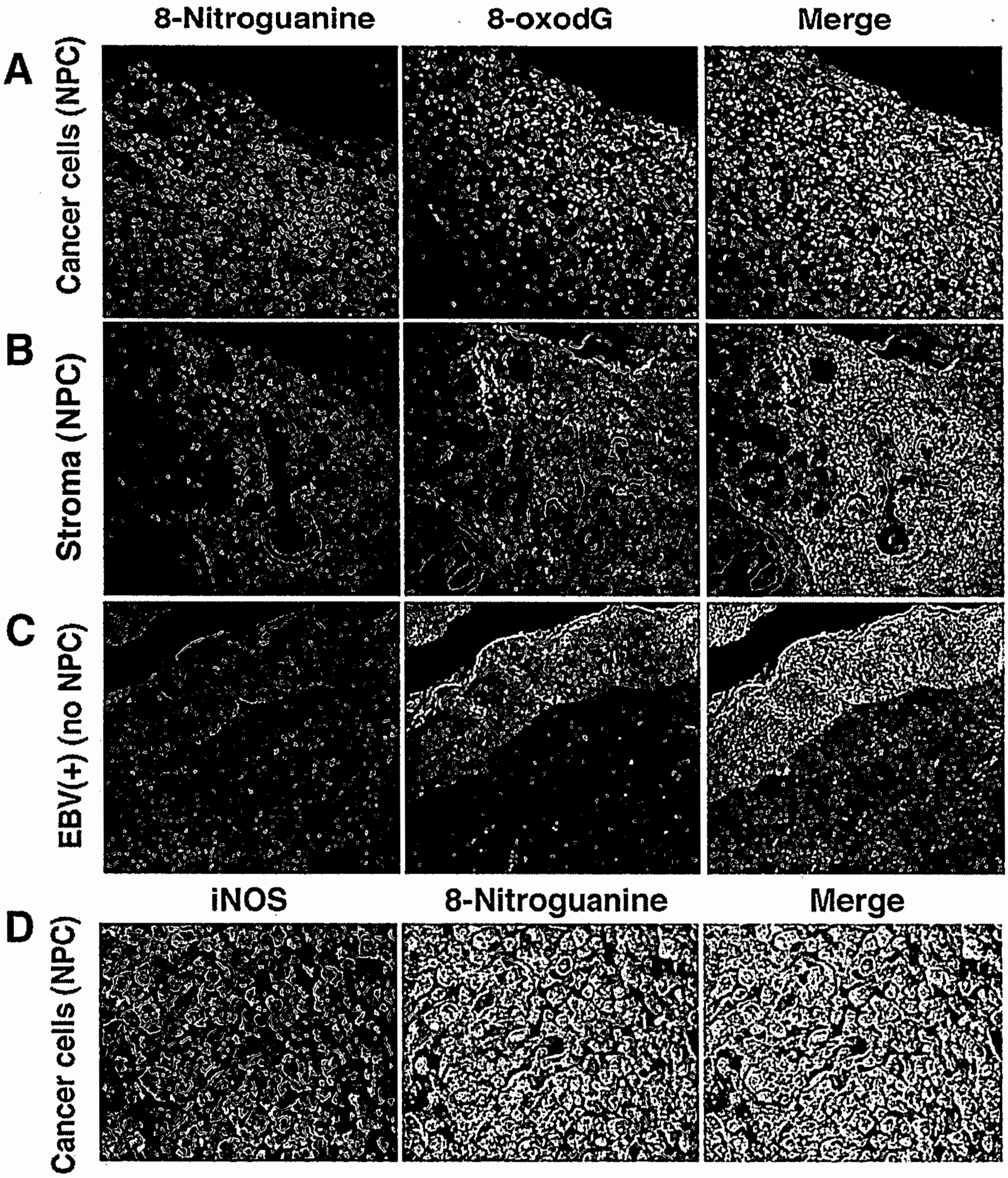

Fig1(A-C): 8-ニトログアニンと 8-oxodG の蛍光二重染色である。咽頭粘膜において免疫反応が起きていることがわかる。特に基底層には強い免疫反応が観察された。上咽頭癌細胞において、強い 8-ニトログアニンと 8-oxodG の免疫反応が観察された。粘膜下層では、大量な炎症細胞に強い 8-ニトログアニンの免疫反応が観察された。咽頭腺の周辺に大量の炎症細胞の浸潤があり、それらの細胞には 8-ニトログアニンと 8-oxodG の強い免疫反応が観察された。腺細胞の核には、8-ニトログアニンの発現を認めた。上咽頭の炎症において EBV(+)の炎症細胞は 8-ニトログアニン、8-oxodG 共に、強い免疫反応が見られた。

Fig1(D): 8-ニトログアニンと iNOS の蛍光二重染色である。上咽頭癌細胞では 8-ニトログアニンと iNOS の発現を観察された。

Table 1. Immunoreactivity grading of nitrative and oxidative DNA damage and the expression of iNOS among NPC and nasopharyngitis patients

8-Nitroguanine

Immuno-re activity grading	EB(-)	EB(+)	EB(+)NPC
-	6	0	0
+	0	1	1
++	0	2	1
+++	0	4	6
++++	0	0	11
P	Overall : 0.00000*		
	0.00464*		
	0.00005*		
		0.04874*	

8-oxodG

Immuno-re activity grading	EB(-)	EB(+)	EB(+)NPC
-	6	0	0
+	0	0	1
++	0	7	3
+++	0	0	15
++++	0	0	0
P	Overall : 0.00000*		
	0.00231*		
	0.00002*		
		0.00047*	

iNOS

Immuno-re activity grading	EB(-)	EB(+)	EB(+)NPC
-	5	0	1
+	1	0	2
++	0	7	0
+++	0	0	16
++++	0	0	0
P	Overall : 0.00000*		
	0.0015*		
	0.00023*		
		0.00001*	
	0.00464*		
	0.00214*		
		0.00812*	

参考文献

1. Jeannel D, Bouvier G, Huber A. Nasopharyngeal carcinoma:an epidemiological approach to carcinogenesis. Cancer Surv. 1999;33:125-55.
2. McDermott AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma. Clin. Otolaryngol. Allied Sci. 2001;26:82-92.
3. IARC Working Group. Epstein-Barr virus IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 70 Lyon: IARC Press, 1997:47-373.
4. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. J. Clin. Invest. 2003;112:1887-94.
5. Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I et al. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003;100:143-8.
6. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. Nat. Rev. Cancer 2003;3:276-85

7. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. Arch. Biochem. Biophys. 2003;417:3-11.
8. Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P, Kawanishi S. Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. Nitric Oxide 2004;11:175-83.
9. Jayasurya A, Dheen ST, Yap WM, Tan NG, Ng YK, Bay BH. Inducible nitric oxide synthase and bcl-2 expression in nasopharyngeal cancer: correlation with outcome of patients after radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003 Jul 1;56(3):837-45.
10. Lorb LA, Preston BD. Mutagensesis by apurinic/apyrimidinic sites. Annu Rev Genet 1986; 20:201-30.
11. Ma N, Adachi Y, Hiraku Y, Horiki N, Horiike S, Imoto I, Pinlaor S, Murata M, Semba R, Kawanishi S. Accumulation of 8-nitroguanine in human gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection. Biochem Biophys Res Commun 2004;319:506-10.
12. Horiike S, Kawanishi S, Kaito M, Ma N, Tanaka H, Fujita N, Iwasa M, Kobayashi Y, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Wang J, Adachi Y. Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. J Hepatol 2005;43:403-10.
13. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory disease in relation to inflammation-related carcinogenesis. Biol Chem 2006;387:365-72.

注：　本研究は、２００８年　≪International Journal of Cancer≫に掲載予定。

作成日：　２００８年２月２０日