上咽頭癌における EBER-1 核内小 RNA の検索

室野 重之・吉崎 智一・古川 侃

Detection of EBER-1 in Nasopharyngeal Carcinoma

Shigeyuki Muro, Tomokazu Yoshizaki and Mitsuru Furukawa

(School of Medicine, Kanazawa University)

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is closely related with Epstein-Barr virus (EBV). In latent EBV-infection of cells, EBV-encoded small RNAs (EBERs) are abundantly expressed, approximately 10^7 copies per cell. We examined the detection of EBER-1 which is one of two EBERs using the in situ hybridization method in 5 cases of formalin-fixed, paraffin-embedded NPC tissues. Specimens consisted of 5 primary nasopharyngeal carcinoma tissues (NP), 3 metastatic cervical lymph nodes (MCL) and 1 non-metastatic cervical lymph node. EBER-1 expression was strongly demonstrated in 4 of 5 NP and 2 of 3 MCL. Positive signals were only shown within the nuclei of tumor cells. Anti-EBV antibody titer was investigated in 3 cases, 2 EBER-1 positive cases and 1 negative case. The titer, especially against VCA-IgA and EA-IgA, was high in the 2 EBER-1 positive cases and low in the negative case. Thus, in situ hybridization with an EBER-1 probe is a sensitive and specific method of detecting EBV in formalin-fixed, paraffin-embedded NPC tissues.

Key words : nasopharyngeal carcinoma, Epstein-Barr virus, EBER-1, in situ hybridization

はじめに

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は、ほとんどの成人に持続感染の形で存在するヒトヘルペスウイルスであるが、悪性リンパ腫をはじめとするリンパ球増殖性疾患や固形癌への関与も一部では考えられている。固形癌においては、上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) との関連が、血清抗 EBV 抗体価の上昇などの血清免疫学的手法¹⁾²⁾、サザンブロット法やポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) による腫瘍組織における EBV-DNA の証明などの分子生物学的方法³⁾、latent membrane protein (LMP) や EBV nuclear antigen (EBNA) など EBV 関連蛋白に対する免疫ブロット法⁴⁾、EBV-DNA に対する生体内局所ハイブリダイゼーション (in situ hybridization, ISH)⁵⁾ などにより明らかになった。今回我々は、EBV にコードされる核内小 RNA (EBV-encoded small nuclear RNAs,

EBERs) のうち EBER-1 に対する ISH を行い、上咽頭癌組織、頸部リンパ節のパラフィン切片からの検出率、およびその組織内での局在、血清抗 EBV 抗体価との関連について検討した。

対象および方法

1. 対 象

1987年から1994年の間に国立金沢病院耳鼻咽喉科にて NPC と診断された患者 5 例の上咽頭および頸部リンパ節の生検組織を対象とした。組織はいずれも、ホルマリン固定、パラフィン包埋されたものであった。病理組織像は世界保健機構 (World Health Organization, WHO) の上咽頭癌分類⁶⁾に従った。

2. 方 法

Park ら⁷⁾の方法に準じて、Code-On Immuno/DNA Slide Stainer (Instrumentation Laboratory, Lexington)

を用いて行った。厚さ $5\mu\text{m}$ の切片を作成し、スライドガラスには Probe-On Plus (Fisher Scientific Co, Pittsburgh) を用いた。Clearing agent (リモネンとキシレンよりなる) を用いて 100°C にて切片よりパラフィンを除去し、続けて 100% アルコールにて洗浄した。ペプシン処理は 100°C 、2分20秒行った。プローブには Fluorescein-Conjugated EBV (EBER) Oligonucleotides (DAKO, Glostrup) を用い、 100°C で $2\text{分} \times 2$ 、 80°C で 6分、 65°C で 12分ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、 $2 \times \text{SSC}$ にて 3度行った。アルカリフォスファターゼ標識抗 FITC 抗体 (DAKO) を 45°C で 10分反応させた後、発色試薬として naphthol AS MX phosphate (Sigma Chemical Co, St. Louis) と fast red TR salt (AMRESCO, Solon) を混合した NASFRTR を 45°C で 10分反応させた。核染色はヘマトキシリンにて行った。封入には Crystal/Mount (Bio-media Corp, Foster City) を用いた。

結 果

表 1 に症例と結果を示す。5 例の組織型は、WHO 2 型(非角化癌)が症例 1, 症例 3, 症例 5 の 3 例, WHO 3 型(未分化癌)が症例 2, 症例 4 の 2 例であり, WHO 1 型(扁平上皮癌)はみられなかった。5 例中症例 1, 症例 3, 症例 4, 症例 5 の 4 例では上咽頭癌組織において腫瘍細胞の核に一致して EBER-1 のシグナルを認めた(図 1)。症例 2 の上咽頭癌組織では陰性であった。頸部リンパ節は症例 2, 症例 4, 症例 5 の 3 例で生検されており, 症例 4, 症例 5 では原発巣と同様に頸部転移リン

図 1 上咽頭癌組織における ISH 法による EBER-1 の検出。腫瘍細胞の核に一致して赤色の陽性シグナルを認める。(×400)

パ節の腫瘍細胞の核に一致して陽性であった(図 2)。症例 4 において摘出された非転移性頸部リンパ節は陰性であった。症例 2 は原発巣と同様に頸部転移リンパ節においても陰性を示した。なお、血清抗 EBV 抗体価は症例 1, 症例 2, 症例 4 において測定されており, 症例 1, 症例 4 では抗 VCA-IgA 抗体価, 抗 EA-IgA 抗体価とも陽性であったが, 症例 2 ではともに陰性であった。

考 察

上咽頭癌(NPC)は、中国南部において好発し、その発生率は10万人あたり20人に達する⁸⁾。本邦における発生頻度は高くないが、耳鼻咽喉科領域の悪性腫瘍のなか

表 1 上咽頭癌症例の患者背景と EBER-1 の検出および血清抗 EBV 抗体価

症例	年齢	性	部 位	組織型	腫瘍	EBER-1	VCA			EA			EBNA
							IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	
1	84	男	上咽頭	WHO-2	+	+	1280	40	<10	80	40	<10	<10
2	68	男	上咽頭	WHO-3	+	—	NSR	<10	<10	<10	<10	<10	NSR
			頸部リンパ節		+	—							
3	62	男	上咽頭	WHO-2	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	59	男	上咽頭	WHO-3	+	+	1280	160	<10	160	40	20	160
			頸部リンパ節		+	+							
			頸部リンパ節		—	—							
5	65	男	上咽頭	WHO-2	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			頸部リンパ節		+	+							

NSR：非特異反応のため測定不能 ND：施行せず

図2 上咽頭癌頸部転移リンパ節におけるISH法によるEBER-1の検出。

腫瘍細胞の核に一致して赤色の陽性シグナルを認める。
(×400)

でも最も予後の悪いものの1つであり、5年生存率は30～50%とする報告⁹⁾¹⁰⁾が多い。NPCの病理組織学的分類は統一した見解がなかったが、WHO分類が発表されて以来、扁平上皮癌(WHO 1型)、非角化癌(WHO 2型)、未分化癌(WHO 3型)の3型に分けるこの分類が広く用いられている。扁平上皮癌は角化傾向のみられる高度から中等度の分化癌である。非角化癌は角化傾向がなく、乳頭状形態を伴う索状構造を呈する。未分化癌は角化がなく細胞質の境界のはっきりしない比較的大型の細胞よりなる。杉本ら¹¹⁾は、WHO 1型が19%、WHO 2型が45%、WHO 3型が36%であると報告している。

EBVは、1964年にEpsteinら¹²⁾によりバーキットリンパ腫培養細胞中に発見されたヘルペスウイルス科に属するウイルスで、最初のヒト腫瘍関連DNAウイルスである。EBVは他のヘルペスウイルス同様潜伏感染を特徴としており、EBV抗体保有率は2～3歳で70～80%に達し、成人ではほぼ100%である。このようにヒトへの普遍性を持つ一方で、*in vitro*でBリンパ球の無限増殖を引き起こす不死化作用も有し、造腫瘍性と関連づけられている。しかし発癌に至るには免疫低下、遺伝素因、環境因子などの発癌リスク因子の介在が必要である。バーキットリンパ腫の他にも、NPC¹³⁾、リンパ上皮腫型の唾液腺癌¹⁴⁾、胸腺癌¹⁵⁾、胃癌¹⁶⁾、ホジキン病¹⁷⁾などにおいて、EBVの関与が明らかとなってきた。NPCとEBVの関連は、血清免疫学的にviral capsid antigen (VCA)やearly antigen (EA)に対するIgGやIgA値が

健康人や他の頭頸部悪性腫瘍患者に比較して上昇している¹⁾²⁾こと、分子生物学的にサザンブロット法やPCR法により上咽頭癌組織からEBV-DNAが証明される³⁾¹⁸⁾¹⁹⁾こと、EBV感染腫瘍細胞のモノクローナリティすなわち一個のEBV感染細胞が腫瘍性に増殖していることが証明される²⁰⁾こと、免疫ブロット法によりlatent membrane protein (LMP)やEBV nuclear antigen (EBNA)が上咽頭癌組織より証明される⁴⁾²¹⁾こと、ISH法により腫瘍細胞内にEBV-DNAが証明される⁵⁾²²⁾こと、などにより明確である。

EBERsはEBVがコードするpoly A鎖のない短いRNAで、EBER-1とEBER-2の2種類あり、それぞれ166および172ヌクレオチドからなる。両者とも潜伏感染細胞あたり 10^7 個と大量に産生されているがその働きは現状では定かではない。また、潜伏感染細胞では核内蛋白と結合しているためRNaseの作用を受けにくく安定である。この豊富な発現と安定性ゆえ、EBERsに対するプローブを用いたISHによりパラフィン切片でも安定して高感度にEBVを検出することができる²³⁾。Raab-Traubら³⁾はサザンブロット法によりNPCでは全例にEBVが検出されるが、そのコピー数はWHO 3型では平均約50コピーであるが、WHO 1型では極端に少ないことを報告しており、Akaoら²⁴⁾もPCRを用いて同様の報告をしている。佐藤ら²⁵⁾は、組織型にかかわらず全NPC症例において、ISHにより腫瘍細胞の核に一致してEBER-1のシグナルがみられるが、WHO 1型で弱く、WHO 3型で強い傾向を示すと報告している。また、Wuら²⁶⁾も頸部転移リンパ節を含めてNPC全例にEBER-1のシグナルがみられると報告している。一方、EBVのIR1領域をプローブとしたDNA-DNAのISHでは、WHO 1型では陰性を示すという報告²⁷⁾もあるが、佐藤ら²⁵⁾は、これはWHO 1型のコピー数が検出感度以下であったためと指摘している。

今回の我々の検討では、WHO 1型の症例はなかったが、WHO 3型の1例(症例2)を除いては、上咽頭癌組織および頸部転移リンパ節において、腫瘍細胞の核に一致してEBER-1の強いシグナルが得られた。この局在は、ハイブリダイズされた腫瘍細胞の核内にEBVゲノムが存在することを示しており、EBER-1を用いたISHにより、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本から高感度にEBV感染細胞を証明できることも示している。中川²⁸⁾は、頸部リンパ節の穿刺吸引細胞診(fine

needle aspiration biopsy, FNAB) から得られた微小組織より PCR を用いて EBV-DNA の検出を行い, 原発巣不明頸部リンパ節転移癌症例の原発巣の検索に対する有用性を述べているが, 生検リンパ節における EBER-1 を用いた ISH も有用であると考えられる. さらに, FNAB により得られる微小組織における有用性については今後の検討課題である.

今回, 上咽頭癌組織でも頸部転移リンパ節でも陰性を示した 1 例(症例 2)もあった. この症例の血清中抗 EBV 抗体価をみると, 抗 VCA-IgA 抗体価, 抗 EA-IgA 抗体価とも陰性であり, 血清学的には EBV との関連は示されなかった. このため, 固定・包埋の過程でこの RNA が破壊されてしまった可能性は低いと思われ, EBER-1 の発現が少なく検出できなかった可能性, EBV と関連のない NPC の可能性などが考えられる. 今後さらに, PCR およびサザンブロット法による EBV-DNA についての検討, 潜伏ウイルスゲノムが発現する膜蛋白である LMP に対する抗体を用いた免疫組織化学的検討により, EBV との関連を追及していく必要があると思われる.

結 語

1. EBER-1 を用いた in situ hybridization により, ホルマリン固定, パラフィン包埋上咽頭癌組織および頸部転移リンパ節における EBV 感染細胞の同定を試み, その局在について検討した.

2. 上咽頭癌組織 5 例中 4 例で, 頸部転移リンパ節 3 例中 2 例で, 腫瘍細胞の核に一致して EBER-1 のシグナルを認めた.

3. EBER-1 を用いた in situ hybridization の結果は, 血清免疫学的検査の結果に一致し, EBV の検出における本法の有用性がうかがわれた.

4. 上咽頭癌組織および頸部転移リンパ節で陰性を示した 1 例については, EBV-DNA の有無, あるいは LMP など他の EBV のマーカーを用いて検討する必要があると思われた.

文 献

- 1) 犬山征夫, 斎藤成司, 小津雷助, 他: 頭頸部悪性腫瘍における抗 EB ウイルス抗体価. 日耳鼻 78: 729~737, 1975.
- 2) Henle G and Henle W: Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 17: 1~7, 1976.
- 3) Raab-Traub N, Flynn K, Pearson G, et al: The differentiated form of nasopharyngeal carcinoma contains Epstein-Barr virus DNA. Int J Cancer 39: 25~29, 1987.
- 4) Fahraeus R, Fu HL, Ernberg I, et al: Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 42: 329~338, 1988.
- 5) Lung ML, Chan KH, Lam WP, et al: In situ detection of Epstein-Barr virus markers in nasopharyngeal carcinoma patients. Oncology 46: 310~317, 1989.
- 6) Shanmugaratnam K and Sobin L: Histological typing of upper respiratory tract tumours. Geneva: WHO 19: 32~33, 1978.
- 7) Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ, et al: Automated molecular pathology; one hour in situ DNA hybridization. J Histotechnol 14: 219~229, 1991.
- 8) Dickson RI: Nasopharyngeal carcinoma; an evaluation of 209 patients. Laryngoscope 91: 333~354, 1981.
- 9) 井上俊彦: 頭頸部癌に対する放射線治療 一喉頭癌・上咽頭癌を中心に一. 癌と化学療法 18: 2077~2082, 1991.
- 10) 藤井 守, 平川勝洋, 鈴木 衛, 他: 上咽頭癌の臨床的観察 一当科15年間の集計一. 耳鼻臨床 補72: 43~50, 1994.
- 11) 杉本卓矢, 上村卓也, 橋本 洋: 上咽頭癌の臨床病理学的検討. 耳鼻 39: 967~975, 1993.
- 12) Epstein MA, Achong BG and Barr YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1: 702~703, 1964.
- 13) Zur Hausen H, Shulte-Holthausen H, Klein G, et al: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 228: 1056~1058, 1970.
- 14) Gallo O, Santucci M, Calzolari A, et al: Epstein-Barr virus (EBV) infection and undifferentiated carcinoma of the parotid gland in Caucasian patients. Acta Otolaryngol (Stockh) 114: 572~575, 1994.
- 15) 藤井文士: 胸腺癌. 最新医学 49: 1987~1992, 1994.
- 16) 山元紀子, 伊東哲彦: EBV と胃癌. 最新医学 49: 1966~1970, 1994.
- 17) Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al: Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med 320: 502~506, 1989.
- 18) Chang YS, Tyna YS, Liu ST, et al: Detection of Epstein-Barr Virus DNA sequences in nasopharyngeal carcinoma cells by enzymatic DNA amplification. J Clin Microbiol 28: 2398~2402, 1990.
- 19) Walter MA, Menarguez-Palanca J, Peiper SC: Epstein-Barr virus detection in neck metastases by polymerase chain reaction. Laryngoscope 102: 481~485, 1992.

- 20) Raab-Traub N and Flynn K : The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* **47** : 883~889, 1986.
- 21) Young LS, Dawson CW, Clark H, et al : Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* **69** : 1051~1065, 1988.
- 22) Weiss LM, Movahed LA, Butler AE, et al : Analysis of lymphoepithelioma and lymphoepithelioma-like carcinomas for Epstein-Barr viral genomes by in situ hybridization. *Am J Surg Pathol* **13** : 625~631, 1989.
- 23) Glickman JN, Howe JG and Steitz JA : Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* **62** : 902~911, 1988.
- 24) Akao I, Sato Y, Mukai K, et al : Detection of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of nasopharyngeal carcinoma using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Laryngoscope* **101** : 279~283, 1991.
- 25) 佐藤雄一, 佐藤紅緒, 亀谷 徹 : 上咽頭癌における EBV. *最新医学* **49** : 1935~1941, 1994.
- 26) Wu TC, Mann RB, Epstein JI, et al : Abundant expression of EBER-1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. *Am J Pathol* **138** : 1461~1469, 1991.
- 27) Niedobitek G, Hansmann ML, Herbst H, et al : Epstein-Barr virus and carcinoma; undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. *J Pathol* **165** : 17~24, 1991.
- 28) 中川士郎 : 上咽頭癌頸部転移リンパ節の分子生物学的診断法に関する研究. *十全医会誌* **103** : 265~275, 1994.

(別刷請求先: 室野重之
〒920 金沢市宝町13-1
金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室)