

氏名	ジェン カイ ユ Jen Kai Yu
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第418号
学位授与の日付	平成16年9月22日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
博士論文名	Mutational events in LMP1 gene in salivary gland lymphoepithelial carcinomas (唾液腺リンパ上皮性癌感染 EBV の LMP1 遺伝子変異)
論文審査委員	主査 教授 朔 敬 副査 教授 星野悦郎 " 教授 織田公光

博士論文の要旨

【緒言】

唾液腺のリンパ間質をともなう未分化癌、リンパ上皮性癌 lymphoepithelial carcinoma (LEC) は中国に多発し、特異的にエプスタイン・バーウィルス (EBV) の感染があることが判明している。中国国内では、EBV 関連鼻咽頭癌の流行地域としてられる東南部のほかに沿海地域や内陸部にも発生するが、それらの発生頻度には明らかに地理的偏りがある。したがって、本癌腫発生には、宿主側の遺伝的および環境的背景とともに感染 EBV 側の形質が関与している可能性も否定できない。そこで、EBV の遺伝子のうち LMP1 遺伝子のがん原遺伝子とみなされていて感染細胞の細胞膜に発現することが判明していたことと、外科材料の保存パラフィン包埋標本から DNA を効率よく回収することができてその DNA 標本をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増幅する技術が確立されてきたことと背景があったので、本研究では、唾液腺リンパ上皮性癌の感染 EBV の性状を解析する手始めとして、まず LMP1 遺伝子の構造を解析することを計画した。

【材料と方法】

症例は、中国および台湾、ロシアの唾液腺リンパ上皮性癌 63 症例で、患者平均年齢は 42 才、男女差はみられなかった。これらの症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本をもちいて以下の実験をおこなった。(1) 免疫組織化学: 5 μm 厚の連続切片を作製し、通法どおり脱パラフィン後、0.2%トリプシンで 37℃、20 分で処理したのち、抗 LMP1 遺伝子産物抗体と Envision 法にて免疫組織化学的染色

をおこなった。(2) EBV *LMP1* 遺伝子塩基配列決定：上記リンパ上皮性癌のパラフィン切片から DNA をフェノール法によって抽出し、DNA 定量後 *LMP1* 遺伝子の C 末端側断片 (233 bp、コドン 309~365) についてプライマーを設計して、PCR 増幅をおこなった。PCR は、アニール化温度は 60℃、35 サイクルでおこなった。PCR 産物は精製後、サーモシークナーゼ反応により直接シーケンス法をおこない、塩基配列を確定した。

【結果と考察】

LMP1 遺伝子産物の免疫染色の結果、陽性癌細胞は検索症例のうち 31 例、50%の症例でみいだされた。陽性反応は癌細胞のみに、細胞質周辺を中心に細胞質内に局在していた。この陽性率は従前の鼻咽頭 LEC における検索結果とほぼ一致していた。すべての症例で検出されなかったのは、固定包埋等の標本作製操作の影響も否定されない。いっぽう、同一試料をもちいた PCR 実験では、すべての症例で、*LMP1* 遺伝子 C 末端断片が増幅された。したがって、遺伝子産物よりも遺伝子の保存が良好であるか、あるいは蛋白質発現が必ずしもともなっていないかの両方の可能性が示唆された。PCR 増幅産物の分子量は 233 bp を予測してプライマー設計をおこなっていたが、実際には症例によって 203 bp と 233 bp との二種の産物がえられた。それらの塩基配列の決定をこころみたところ、40 症例で増幅域の完全長を確認できた。その結果、二種の PCR 産物はコドン 343 - 352 相当部の 30 塩基の欠失によることが判明した。したがって、唾液腺 LEC に感染している EBV にはこの欠失を指標にするかぎり二系統があることが判明した。そこで、これらの欠失の有無による症例分布を検討したところ 30 bp 欠失症例の 80%以上は中国の広州、成都の鼻咽頭癌流行地域でみいだされ、上海その他の地域ではごく少数であり、台湾がその中間であるという結果がえられた。この 30 bp 欠失は鼻咽頭癌でも知られており、この欠失は同癌腫に特異的で腫瘍原性があることを示唆する機能的実験結果も発表されていた。しかしながら、本研究において 40 症例という多数例で解析したかぎり、この 30 bp 欠失は LEC 腫瘍原性というよりも、地理的変異とみなしたほうが妥当であることが明らかであった。30 bp 欠失以外にも、症例をこえて共通する点突然変異がみいだされたが、それらはコドン 322、331、334、335、338、339、342、344、355 等であり、これらはすでに鼻咽頭癌で報告されているものと共通していた。したがって、30 bp 欠失以外の C 末端部変異が LEC 腫瘍原性に関与している可能性を検討する必要があることが明らかになった。

審査結果の要旨

唾液腺のリンパ性間質をともなう未分化癌、リンパ上皮性癌 lymphoepithelial carcinoma (LEC)は、中国に多発し、特異的にエプスタイン・バーウイルス (EBV) の感染があることが判明している。中国国内では、EBV 関連鼻咽頭癌の流行地域として知られる東南部のほかに沿海地域や内陸部にも発生するが、それらの発生頻度には明らかに地理的偏りがある。したがって、本癌腫発生には、宿主側の遺伝的および環境的背景とともに感染 EBV 側の形質が関与している可能性も否定できないようである。そこで、申請者ジェン・カイユは、EBV の遺伝子のうち *LMP1* 遺伝子のがん原遺伝子とみなされていて感染細胞の細胞膜に発現することが判明していたことと、外科材料の保存パラフィン包埋標本から DNA を効率よく回収することができてその DNA 標本をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増幅する技術が確立されてきた背景を利用して、唾液腺リンパ上皮性癌の感染 EBV の性状を解析する手始めとして、まず *LMP1* 遺伝子の構造を解析することを計画したという。

LMP1 遺伝子産物の免疫組織化学の結果、陽性癌細胞を検索症例のうち 31 例、50% の症例でみいだしている。陽性反応は癌細胞のみに、細胞質周辺を中心に細胞質内に局在しており、この陽性率は従前の鼻咽頭 LEC における検索結果とほぼ一致していたとしている。すべての症例で検出されなかったのは、固定包埋等の標本作製操作の影響も否定されないという。いっぽう、同一試料をもちいた PCR 実験では、すべての症例で、*LMP1* 遺伝子 C 末端断片が増幅された。したがって、遺伝子産物よりも遺伝子の保存が良好であるか、あるいは蛋白質発現が必ずしもともなっていないかの両方の可能性を示唆している。PCR 増幅産物の分子量は 233 bp を予測してプライマー設計をおこなったが、実際には症例によって 203 bp と 233 bp との二種の産物をえている。そこで、それらの塩基配列の決定をこころみたところ、40 症例で増幅域の完全長の確認に成功した。その結果、二種の PCR 産物はコドン 343 - 352 相当部の 30 塩基の欠失によることを証明している。したがって、唾液腺 LEC に感染している EBV にはこの欠失を指標にするかぎり二系統があることを明らかにしたわけである。そこで、これらの欠失の有無による症例分布を検討したところ 30 bp 欠失症例の 80%以上は中国の広州、成都の鼻咽頭癌流行地域でみいだされ、上海その他の地域ではごく少数であり、台湾がその中間であるという結果をえたという。この 30 bp 欠失は鼻咽頭癌でも知られており、この欠失は同癌腫に特異的で腫瘍原性があることを示唆する機能的実験結果も発表されていた。しかしながら、本研究において 40 症例という多数例で解析したかぎり、この 30 bp 欠失は LEC 腫瘍原性というよりも、地理的変異とみなしたほうが妥当であることを明らかにしている。30 bp 欠失以外にも、症例をこえて共通する点突然変異をみいだしているが、それらはコドン 322、331、334、335、338、339、342、344、355 等であり、これらはす

でに鼻咽頭癌で報告されているものと共通していたという。したがって、30 bp 欠失以外の C 末端部変異が LEC 腫瘍原性に関与している可能性を検討する必要があることが明らかにしえた。

以上のとおり、本研究は唾液腺原発のリンパ上皮性癌に感染する EBV の *LMP1* 遺伝子多様性を、世界ではじめて多数症例をもちいた広範な解析によって明らかにした。従来腫瘍原性として指摘されてきた遺伝子欠失は流行地域特異的な地理的多様性のひとつであり、今回発見されたこれ以外の変異についてもそれらの機能解析をすすめる必要があるという新たな研究展開の方向性を開拓したものと見える。申請者が提案しているとおり、本研究では、*LMP1* 遺伝子の変異がその機能にどのように影響しているかはなお不明のままである。したがって、今後同遺伝子変異の病理学的意義を解明するには、試験管内においてこれらの変異体ウィルスの機能実験を実施していく必要があるし、流行地域および非流行地域間で、健康人に感染している EBV の比較解析を進めていくことで、地理的遺伝子多様性と真の腫瘍原性としての変異との相違を判別していく必要がある。

したがって、本研究は申請者による *LMP1* 遺伝子変異の多様性に関する新しい発見をもとに同遺伝子研究の視点を転換する必要性を明らかにした研究として貴重であるので、この点において学位論文としての価値をみとめる。