

就任講演

EB-virus と細胞周期制御蛋白

高野 康雄

富山医科薬科大学医学部第1病理学講座

富山医科薬科大学医学部第1病理学講座教授にお招きいただきました高野康雄です。どうぞよろしくお願い致します。私は愛知県の豊橋市の出身で、大学と研修医・内科医時代は名古屋で過ごし、その後、内科医・病理医として長く東京近辺にいました。富山は人口が三十数万で街の真ん中を市電が通っており、街の雰囲気と富山の金沢に対する対抗心などを含めた人情は私の生まれ育った豊橋市とよく似た街です。豊橋は名古屋にいつも対抗心を持っているのですが。なにか故郷に帰ってきたような感じがします。さて、就任につきまして若干のご挨拶とともに私が今まで行ってきた研究の一端をご紹介させていただきます。私は今まで人体病理医として悪性腫瘍の病理組織診断の研鑽に多くの時間を費やしてきましたが、研究は主に悪性腫瘍の成立と進展・予後因子について研究してきました。その中で、本日はEpstein-Barr virus (EBV)が発癌過程で果たす役割と細胞周期制御蛋白が悪性腫瘍の進展・予後に果たす役割についての研究についてお話しします。ここでのお話の前半はEBVを、後半では細胞周期制御蛋白についてお話しします。

EBVはBurkittリンパ腫培養株から単離されたvirusで、herpes virusに属しており、社会に蔓延しており、われわれ日本人の成人はほぼ100%がEBVに感染しています。EBVはCD21をレセプターにしており、口腔から感染するのですが、殆どが不顕性感染であり、一度感染すると終生免疫ができます。EBVは唾液腺の中と十万個から百万個に1個の割合のBリンパ球に潜伏感染しています。EBV感染症として有名なのは伝染性単核球症ですが、その他にEBVはBリンパ球を不死

化させる作用をもっています。EBVがBリンパ球を不死化させるためにはEBVが産生するonco-proteinが必要です。onco-proteinにはEBNA1・2・3A・3CとLMP1・2A・2Bの7種類があります。EBVが人に誘導する悪性腫瘍で有名なものにはまず、Birkittリンパ腫があります。Birkittリンパ腫ではEBNA1のみが発現しています（EBVの悪性腫瘍における潜伏感染のタイプとしてLat Iと表現します）。次には、鼻咽腔の扁平上皮癌とHodgikinリンパ腫です。それらは悪性腫瘍ではEBNA1とLMP1, 2A, 2Bが発現しています（Lat II）。その他にはAIDS患者や大量の免疫抑制剤を投与した患者のように免疫機能が極度に低下した場合に悪性リンパ腫が発症しますが、そのような悪性リンパ腫の場合にはすべてのEBV関連onco-proteinが発現します（Lat III）。人のEBV関連悪性腫瘍は以上に挙げた悪性腫瘍ですが、その他に胃癌でもEBVが関連しています。これはどう言うことかと言いますと、特殊な胃癌（リンパ球浸潤を伴う髄様癌）では90%以上の症例にEBVが発見されますが、通常の胃癌でも約7%の症例でEBVが発見されます。EBV陽性胃癌でEBVが胃癌発癌過程に何らかの役割を果たしているのではないかと考え、以下の実験を行いました。用いた胃癌症例は合計で513例です。そのなかで33例（6.4%）にEBVが発見されました（図1）。EBV陽性胃癌では、組織型との間に特異的な関係はなく、SM癌が有意差を持って多く、噴門部にやや多発する傾向があり、リンパ管・静脈侵襲とリンパ節転移との間には関係はありませんでした。EBVの癌原性とEBV陽性胃癌との関連について検討するために、EBV陽性胃癌33例の検体から

図1 Clinico-pathological details of the gastric carcinomas (*M* male, *F* female, *well diff.* well differentiated, *Mod. diff.* moderately differentiated, *Poorly diff.* poorly differentiated, *m.m.* limited to within the mucosa, *s.m.* invasion of the mucosal muscle but not the proper muscle, *m.p.* invasion of the proper muscle but no penetration, *s.s.* invasion through the proper muscle but not reaching the serosa, *s.* invasion of the serosa)

	Total gastric carcinomas (513 cases)	EBV(+) gastric carcinomas (33 cases, 6.4%)
Age	60.95	60.27
M:F	367:146	28:5
Histology		
Well diff.	132	5 (3.8%)
Mod. diff.	113	9 (8.0%)
Poorly diff.	268	19 (7.1%)
Depth		
m.m.	129	5 (3.9%)
s.m.	111	13 (11.7%)
m.p.	49	2 (4.1%)
s.s., s.	224	13 (5.8%)
Location		
Cardia	66	7 (10.6%)
Body	254	17 (6.7%)
Antrum	193	9 (4.7%)
Vessel invasion		
(+)	207	15 (7.2%)
(-)	117	13 (11.1%)
Lymphatic invasion		
(+)	179	11 (6.1%)
(-)	145	17 (11.7%)

* $P=0.021$; ** $P=0.033$

DNAを抽出し、EBVの型とBamH1F遺伝子多型とLMP1遺伝子の一部欠損について検討しました。その結果を図2に示します。type Aは欧米および日本で多く発見される型であり、末梢血のリンパ球に潜伏感染しているEBVは97%がtype Aです。type Bは低開発国に多い型であり、type Aは癌原性が高いといわれます。これらの症例ではtype Bは1例のみでありました。BamH1F遺伝子多型については、1例のみがf variantでこの症例はtype Bの症例と一致していました。この症例は特殊なのかもしれません。LMP1遺伝子の遺伝子欠損は2例の欠損のない症例を除いて殆どの症例で見られました。このLMP1遺伝子欠損は3'側の30bpsの部分欠損を検索していき、この部分遺伝子欠損があるEBVは癌原性が強いといわれています。このように私の検索したEBV陽性胃癌の潜伏感染したEBVはほぼ均質なグループであると考えられました。これらのEBVを正常

図2 Summarized details of EBV-positive gastric carcinomas (*Mod.* moderately, *Poor.* poorly, *Well* well differentiated, *LEGC* lympho-epithelioma-like gastric carcinoma)

Case no.	Histological type	Cancer depth	EBV type	BamH1F RFLP	LMP-1 gene deletion
1	Mod.	m.	A	wt	+
2	Poor.	s.	A	wt	+
3	Mod.	s.m.	A	wt	+
4	Poor.	s.	A	ND	ND
5	Mod.	s.	ND	ND	ND
6	Mod.	s.m.	A	wt	ND
7	Poor.	s.	A	wt	ND
8	Poor.	s.m.	A	ND	+
9	Poor.	s.m.	A	wt	+
10	LEGC	m.p.	A	ND	ND
11	Mod.	s.m.	A	wt	+
12	Poor.	s.	A	wt	ND
13	Well	m.	B	f variant	wt
14	Poor.	s.m.	A	wt	+
15	Poor.	s.	ND	ND	+
16	Mod.	m.p.	ND	ND	ND
17	Mod.	s.m.	A	wt	+
18	Mod.	m.	ND	wt	ND
19	Well	s.m.	A	wt	+
20	Well	s.m.	ND	wt	ND
21	Mod.	s.m.	A	wt	+
22	Poor.	s.	A	wt	+
23	Well	m.p.	ND	wt	ND
24	Poor.	s.	ND	wt	ND
25	LEGC	s.	A	ND	ND
26	Poor.	s.m.	ND	wt	ND
27	Mod.	s.m.	A	wt	+
28	Well	m.	ND	ND	ND
29	Poor.	s.	A	wt	wt
30	Mod.	m.	A	wt	+
31	Poor.	s.m.	ND	ND	ND
32	Poor.	s.	ND	wt	ND
33	Poor.	s.	ND	wt	ND

図3 EBV genotype, BamH1F RFLP and LMP-1 gene deletion of lymphocytes in normal gastric mucosa, lymphoma cell lines of SCID (severe combined immunodeficiency) mice and non-Hodgkin lymphomas

	EBV type A/B	BamH1F RFLP f/F	LMP1 gene deletion (+)/(-)
Lymphocytes in normal gastric mucosa	15/1	0/16	14/1
Lymphomas of SCID mouse	6/0	0/6	6/0
Non-Hodgkin lymphomas	16/0	0/16	16/0

胃粘膜のリンパ球、EBV陽性SCIDマウスリンパ腫、EBV陽性non-Hodgkinリンパ腫のEBVと比較検討した結果が図3です。これに示しますように、胃癌で発見されたEBVはほぼ日本に蔓延しているEBVあるいは他の悪性腫瘍で発見されるEBVと同一であり、特に胃癌で発見されたEBVは癌原性が強いとは言えない結果でありました。このように胃癌ではEBVの発癌作用の解明には決

定的なものが発見できなかった結果だったので、次にはEBVが発癌過程に密接に関与したと思われるEBV陽性SCIDマウスリンパ腫継代株を用いて検討しました。SCIDマウスに悪性リンパ腫を植え付けていきますと、かなりの確率で継代株ができます。そのできた継代株のうち数%にもともと宿主のリンパ腫細胞にEBVがない悪性リンパ腫であってもEBV陽性リンパ腫株が出来ることがあります。先ほど述べましたように人のBリンパ球の十万個から百万個に1個の割合でEBV感染細胞がmemory cellのような格好で血液の中を循環しています。それで人の悪性リンパ腫をSCIDマウスに植え付けた時に偶然にまじり込んだEBV感染Bリンパ球がAIDS関連リンパ腫のようできるだろうと推測されます。そのEBV陽性のリンパ腫5例とSCIDマウスで継代培養されたBリンパ腫6例とを遺伝子学的に比較検討することによってEBVが発癌過程にどのように関連しているかということ細胞周期制御蛋白の視点から検討しました。これら5例のEBV陽性リンパ腫は先ほど述べましたonco-proteinがすべて発現しています。また免疫グロブリン遺伝子の再構成でリンパ腫細胞のモノクロナリティもあります。EBVのモノクロナリティについてもすべて検索してあり、全てのEBVがモノクロナールであります。EBV陽性リンパ腫とEBV陰性リンパ腫の細胞周期制御蛋白を免疫組織化学で検討した結果を図4に

示します。EBV陽性リンパ腫とEBV陰性リンパ腫ではcyclin D2とCDK4に関して顕著な差が見られます。EBV陽性リンパ腫ではcyclin D2はすべて核に陽性でありまして、EBV陰性リンパ腫では半数が全く存在しないか細胞質のみに存在することです。CDK4についてはEBV陽性がすべて核と細胞質に発現しており、EBV陰性リンパ腫では半数のみが核と細胞質に発現しています。cyclin D2とCDK4は両者が結合したときのみに細胞周期を増殖の方向に回転させます。即ち、細胞周期をG1期からS期へ移行させる作用があります。また、G1 cyclin (G1期に発現するcyclin: cyclin D1, 2, 3, E) はp21に直接に制御されています。p21はG1 cyclinとそれに対応するCDKおよびPCNAと結合し4量体を形成し、細胞回転がS期に入るのを抑制しています。p21が大量に発現していると細胞増殖を抑制しているということになります。図5がこの研究のすべてを物語ります。EBV陽性とEBV陰性のリンパ腫ではcyclin D1とcyclin Eではp21が全てと結合しており、細胞増殖を負の方向にコントロールしているのがよく分かります。cyclin D2はEBV陽性リンパ腫ではp21と結合しておらず、p21の抑制から外れた格好になっています。EBV陰性リンパ腫では約3分の1がp21のコントロールを受けています。従って、EBV陽性リンパ腫ではcyclin D2の経路によって細胞増殖が行われているということが分

図4 - POSITIVITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF G1 CYCLINS IN EBV(+)(-) SCID MOUSE LYMPHOMAS

Case	EBV(+)					EBV(-)					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6
CCND1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCND2	N	N	N	N	N	-	-	-	C	C	C
CCNE	N	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-
CDK2	-	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C
CDK4	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	-

-, Negative; EBV, Epstein-Barr virus; C, positive for cytoplasm; N, positive for nuclear; NC, positive for nuclear and cytoplasm; SCID, severe combined immune deficiency.

TABLE III - POSITIVITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF G1 CYCLINS IN 13 HUMAN B CELL LYMPHOMAS

Case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CCND1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCND2	-	N	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-
CCNE	N	-	C	C	C	-	C	C	-	-	-	N	N
CDK2	NC	N	NC	N	N	N	N	C	C	C	C	N	N
CDK4	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

-, Negative; C, positive for cytoplasm; N, positive for nuclear; NC, positive for nuclear and cytoplasm.

EB-virus と細胞周期制御蛋白

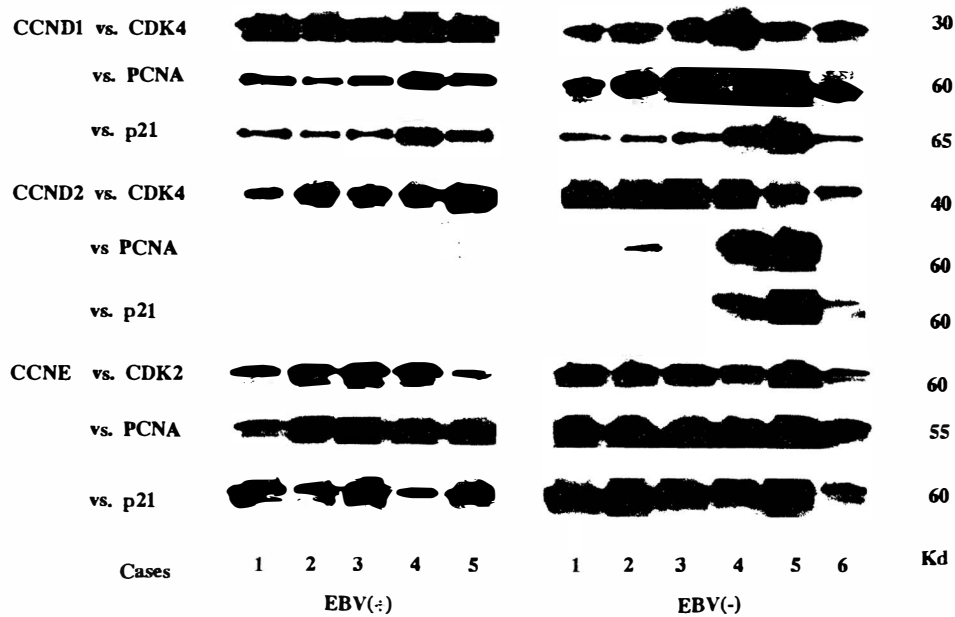


図5 - Immunoprecipitation of *CCND1/CCND2/CCNE* vs. *CDK2* or *CDK4/PCNA/p21* in Epstein-Barr virus (EBV)(+)(-) severe combined immune deficiency (SCID) mouse lymphoma lines. In EBV(+) SCID cases, clear bands are visible for *CCND2* vs. *CDK4*, but not for *CCND2* vs. *PCNA*, *p21*. On the other hand, bands can be seen for *CCND2/CCNE* vs. *CDK2* or *CDK4/PCNA/p21*. In EBV(-) SCID mouse lymphomas, clear bands are consistently present except for *CCND2* vs. *PCNA* (cases 1, 3, 6) and *CCND2* vs. *p21* (cases 1, 2, 3).

図6 Data for CCND1, CCND2, CCNE, CDK2, and CDK4 Overexpression with Respect to Clinicopathological Findings

	CCND1(+)	CCND2(+)	CCNE(+)	CDK2(+)	CDK4(+)	Total
Cases	56	89	79	115	125	260
Sex (M/F)	42/14	64/25	54/25	79/36	82/43	167/93
Age	63.1	63.2 b	63.4 e	61.2	60.3	60.9
Histology						
Well	20	39	33	42	35	78
Mod.	7	20 c	15 f	22 h	18	42
Por.	29	30	31	51	72	140
Depth						
m.	13	12	13	28	18	50
s.m.	17	18	25 g	28	30	58
m.p.	4	15	13	13	13	32
s.	22	44	28	46	64	120
L.N.						
(+)	17 a	46	34	52	63	119
(-)	38	42	44	60	60	137
V.						
(+)	20	46 d	26	40	58 i	98
(-)	36	43	53	75	67	162

M, male; F, female; Well, well-differentiated adenocarcinoma; Mod., moderately differentiated adenocarcinoma; Por., poorly differentiated adenocarcinoma; m., limited to the mucosa; s.m., invading within the submucosa; m.p., invading the proper muscle; s., invading beyond the proper muscle; LN.(+), lymph node metastasis present; LN.(-), lymph node metastasis absent; V.(+), vessel invasion present; V.(-), vessel invasion absent. a, $P = 0.0009$; b, $P = 0.0251$; c, $P < 0.0001$; d, $P = 0.0008$; e, $P = 0.0296$; f, $P = 0.0058$; g, $P = 0.0256$; h, $P = 0.0234$; i, $P = 0.0053$; j, $P = 0.0001$; k, $P = 0.0014$; l, $P = 0.0057$.

かります。EBVはcyclin D2の活性と密接な係わり合いがあることが文献的にも発表されておりますので、EBVが関係することによってcyclin D2が細胞増殖を正の方向に誘導していると言うのが結論です。EBVと発癌の関係についてはもっと複雑な機構があることは明白であり、本日ここで言うていることはその中のほんの一部であることを申し添えます。

次に、260例の胃癌症例を用いてG1 cyclin発現

とp27発現が胃癌の進展・予後に与える影響について免疫組織学的・細胞生物学的に検討しました（今回の報告会では細胞生物学的データは省略します）。この研究の発想の背景は、G1 cyclin発現とp27発現とがいろいろな悪性腫瘍の進展・予後に関係している報告が多くあります。それで胃癌では本当にそうであろうかと調べてみたのです。もし、本当にそうであれば内視鏡生検をした時点でその患者さんの胃癌の進展の程度と予後がある

図7 Comparison of CCND2 (+) Cytoplasmic Staining and CCND2 (+) Nuclear Staining with Respect to Clinicopathological Data

	CCND2(+):Cyto.	CCND2(+):Nuc.
Cases	68	21
Sex	49/19	15/6
Age	62.6	65.3
Histology		
Well	25	14
Mod.	18 a	2 e
Por.	25	5
Depth		
m.	8	4
s.m.	8 b	10 f
m.p.	14	1
s.	38	6
L.N.		
(+)	43 c	3 g
(-)	24	18
V.		
(+)	42 d	4 h
(-)	26	17

Cyto., cytoplasmic staining; Nuc., nuclear staining. a, $P = 0.0020$; b, $P = 0.0026$; c, $P = 0.0007$; d, $P < 0.0001$; e, $P = 0.0006$; f, $P = 0.0274$; g, $P = 0.0020$; h, $P = 0.0659$.

程度予測がつくことになります。但し、われわれは病理組織学的にその患者さんの胃癌の進展・予後についてある程度の予測はつきます。従って、胃癌の進展・予後を判断するのに強力な補助手段を捜そうと言うようなことでこの研究を始めました。図6はこの研究に用いた症例の臨床病理学的なデータとG1 cyclin・CDK発現との関係を示しものです。cyclin D1, 2はCDK4とcyclin EはCDK2と結合することにより細胞周期をG1期からS期へと回転させます。ここで注目して欲しいのはcyclin D2が陽性の89症例です。その内訳を図7に示します。89症例の内、68症例が細胞質に陽性であり、21症例が核に陽性でした。cyclin, CDKともに核内蛋白であり（合成されるのは細胞質ですが）、核内においてその作用が完遂されるのですが、cyclin D2はある特殊な条件下では細胞質

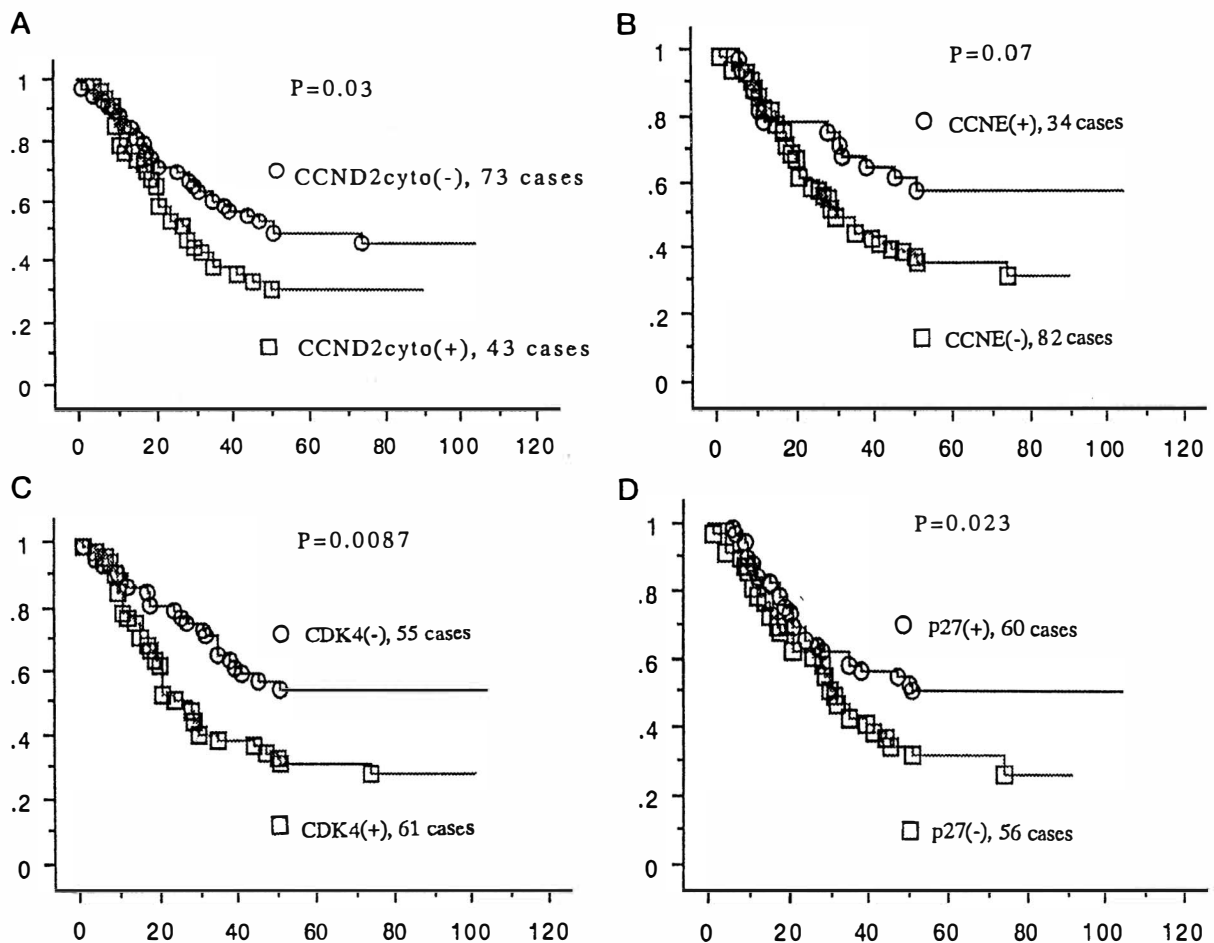


図8 A-D: Kaplan-Meier survival curves with comparisons of CCND2 (+) versus (-) (A); CCNE (+) versus (-) (B); CDK4 (+) versus (-) (C); p27 (+) versus (-) (D) in lymph node metastatic cases.

EB-virus と細胞周期制御蛋白

図9 p27 Labeling Indices with Respect to Clinicopathological Data

	p27 labeling indices (mean \pm SE)	P values
Histology		
Well	55.8 \pm 2.9	<0.0001
Mod.	38.2 \pm 3.8	
Por.	37.4 \pm 2.1	
Depth		
m.	57 \pm 3	<0.0001
s.m.	51.1 \pm 3.4	
m.p.	33.8 \pm 4.1	
s.	35.7 \pm 2.4	
L.N.		
(+)	37.1 \pm 2.4	0.0004
(-)	48.7 \pm 2.2	
V.		
(+)	36.3 \pm 2.5	0.0013
(-)	47.1 \pm 2.1	

に局在することがあります。その特殊な条件下にある症例が68例あったことになります。図8は進行胃癌に限ってcyclin D2細胞質発現, cyclin E発現, CDK4発現とp27発現と予後との関係をKaplan-Meier survival curveで検討したものです。cyclin D2では細胞質陽性群, cyclin Eでは陰性群, CDK4では陽性群, p27では陰性群が予後不良でした。これらは今までに報告された結果と若干異なります。cyclin D1, E発現は予後不良因子であるとの報告が多いのですが, cyclin D1発現(図8には載っていません)は予後とは関係なく, cyclin E発現は逆の結果でした。胃癌でのCDK4発現の報告は今までになく, cyclin D2細胞質発現については全悪性腫瘍で初めての報告です。今後, cyclin D2の細胞質内発現について更

図10 Results of Univariate Survival Analysis for CCND2, CCNE, CDK4, and p27

	Total	Invasive	Lymph node metastasis (+)
CCND2	0.003	0.0035	0.024
CCND2 (cyto.)	0.002	0.004	0.03
CCNE	0.016	0.03	0.07*
CDK4	0.01	0.05	0.0087
p27	0.0002	0.003	0.023

*, not an independent prognostic factor. All remainders are independent prognostic factors proved by multivariate analysis.

に検討を進めていく予定です。p27はp21と同様に細胞増殖を抑制する蛋白です。p27は正常細胞にも高頻度に発現しており, 腫瘍細胞にも発現します。腫瘍細胞では一般的に低悪性度ほどp21発現が高く, 高度悪性度ほどp21発現は低いとされています。図9はp27の免疫組織学的標識率と胃癌症例の臨床病理学的データとを比較検討したものです。p27標識率が高いものほど, 1) 組織学的には高分化型であり, 2) 深達度は浅くなり, 3) リンパ節転移は少なくなり, 4) 静脈浸襲も少なくなっています。さて, これらの胃癌の進展・予後因子を単変量解析したものが図10です。これをもとに多変量解析をしますと, cyclin D2細胞質内発現とp27発現が独立した予後因子であることが判りました。今後はこれらの結果を臨床病理学的に活用し, 臨床科の諸先生方に役立つ病院病理部を作っていきたいと思っています。どうかこれからも宜しくお願い致します。