

令和元年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11290

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるHPV-16E6遺伝子による癌幹細胞形質の獲得機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of acquiring cancer stem cell-like characteristics related with HPV-16 E6 gene in oral squamous cell carcinomas

研究代表者

杉山 勝 (Sugiyama, Masaru)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：70187681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：健康者94名の口腔含嗽および咽頭含嗽サンプルを用いて、PCR法にてHPV16 DNAの検出を行った。その結果、HPV16陽性率は、咽頭含嗽サンプルでは28.7%、口腔含嗽サンプルでは16.0%で、咽頭含嗽サンプルでHPV16 DNA陽性率が高いことが明らかとなった。また、口腔含嗽サンプルでは、HPV16 DNA陽性率は女性と比べて男性において有意に高いことが明らかとなった。健康者のHPVの口腔内感染を調査した疫学研究を収集し、HPV感染のリスクファクターを同定するためメタ解析を行った。その結果、性行動と喫煙が口腔のHPV感染における重要な危険因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咽頭含嗽サンプルが口腔含嗽サンプルよりもHPV16 DNA陽性率が高い理由として、中咽頭の組織学的特徴の関与が考えられた。また、口腔内の衛生環境とHPV感染には密接な関連があり、口腔衛生状態を良好に保つことは、口腔のHPV感染を予防するために重要であると考えられる。HPV関連口腔癌の予防を科学的根拠に基づいて行うために、HPV DNA陽性口腔癌におけるHPVの役割を明確にする必要があり、口腔HPV感染の基礎および臨床的研究の推進が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Oral rinse and gargle samples obtained from 94 healthy individuals were tested for HPV16 DNA by PCR. The percentage of HPV16-positive cases was higher in the gargle (28.7%) as compared to the oral rinse (16.0%) samples. In the oral rinse samples, males showed a significantly higher rate of HPV16 than females. To identify the risk factors for oral HPV infection, we performed systematic review and meta-analysis of studies reporting the prevalence of oral HPV infection in healthy individuals. Sexual behavior and smoking were importantly related to oral HPV infection in healthy individuals.

研究分野：口腔外科学、口腔保健学

キーワード：HPV リスクファクター 口腔癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は、口腔内における正常粘膜、上皮異形成症および口腔扁平上皮癌組織を用いて、HPV16 DNA の検出を行ったところ、癌に移行した上皮異形成症の 82%において HPV16 DNA が検出された(Sugiyama et al. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003). この結果から、口腔内において HPV16 は上皮異形成症から扁平上皮癌に移行する段階で、癌化を促進する重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、口腔扁平上皮癌例(66 例)における HPV16 感染と予後との関係を検討したところ、HPV16 陽性でリンパ節転移のない例では、5 年生存率が 94% と最も高く、一方で HPV16 陰性でリンパ節転移を伴う例では、5 年生存率が 25% と最も低かった(Sugiyama et al. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2007). このことから、HPV16 が口腔扁平上皮癌患者の予後因子であることが明らかとなった。

また、HPV16 E6 蛋白は p53 と結合することにより p53 の細胞周期制御機能を喪失させることが知られているが、口腔癌における悪性化機構への関与は不明な点が多い。我々は、HPV16 E7 oncogene の発現が、細胞周期の進行を制御する Cdc25A の過剰発現と相関していることを明らかとした(Bhawal and Sugiyama et al. *Virchows Arch*, 2007)。さらに、HPV16 E6 は 14-3-3 sigma を抑制することにより、細胞周期の進行を制御することが示唆された(Bhawal and Sugiyama et al. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008)。このことから、HPV16 が口腔扁平上皮癌細胞の細胞周期制御の異常に関与することが示唆された。

#### 2. 研究の目的

扁平上皮癌細胞における HPV16 癌遺伝子 (E6/E7) と癌幹細胞形質の関係を明らかにする目的で、HPV16 陽性扁平上皮癌細胞株を用いて、癌幹細胞マーカーである CD44 および ALDH1 の発現を検討し、自己複製能等の性状を解析する。

健常者における口腔の HPV16 DNA の陽性率と、臨床病理学的指標との関連性を明らかにする。さらに口腔の HPV16 感染の危険因子を明らかにすることを目的とする。

口腔扁平上皮癌患者の口腔含嗽サンプルを用いて、HPV16 DNA の陽性率を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

HPV16 陽性扁平上皮癌細胞を用いて、CD44 および ALDH1 発現やスフィアコロニー形成能を検討した。HPV16 E6 siRNA ノックダウンを行い、自己複製能の変化について検討した。

健常者および口腔癌患者から得られた口腔含嗽および咽頭含嗽サンプルを用いて、HPV16 DNA の発現を PCR 法にて検討した。また、DNA ハイブリダイゼーション法により HPV 遺伝子型の解析を行った。ヒト内在性 レトロウイルス遺伝子である ERV-3 の pol-env-3'LTR 領域 (1728bp) を pUC57 ベクターの 5'-HindIII/3'-PstI サイトへ挿入し、ERV-3 の発現を Real time PCR 法にて検出し、ERV-3 のコピー数の検量線を作成した。検量線を用いて、ERV-3 のコピー数からサンプルに含まれるヒト細胞数を測定した。1 サンプルあたりの細胞数を約 10,000 個になるよう調整し、HPV16 E6 領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、HPV16 DNA の検出を行った。さらに、リアルタイム PCR 法にて、HPV16 DNA copy 数の検索を 1 サンプルあたりの細胞数を約 10,000 個になるよう調整し、HPV16 E6 領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、HPV16 DNA の検出を行った。また HPV16 陽性例では、HPV16 L1 領域のシーケンス解析を行った。

2012 年 1 月から 2015 年 6 月までに PubMed に発表された、健常者における口腔の HPV 感染について調査した疫学研究を収集しメタ解析を行い、HPV 感染の危険因子の検索を行った。

#### 4. 研究成果

**HPV16 E6/E7 蛋白質発現と癌幹細胞形質との関係**

HPV16陽性扁平上皮癌細胞の癌幹細胞形質を明らかにするため、HPV16 E6/E7蛋白質陽性の扁平上皮癌細胞Caskiを用いて検討を行い、コントロール細胞としてHPV陰性のHTB-31細胞を用いた。また、癌幹細胞形質を検討するため、スフィアアッセイを行った。その結果、Caski細胞は多くの球状コロニーの形成を示したが、HTB-31細胞はコロニーの形成を示さなかった。また、球状コロニーを形成した細胞は、蛍光免疫染色にて癌幹細胞マーカーのCD44及びALDH1の高発現を示した。さらに、Caski細胞のスフィアコロニー形成はE6/E7 siRNA knockdownにより抑制されたことから、コロニー形成にはE6/E7が重要な役割を持つ可能性が示唆された。

#### 健常者の口腔および咽頭含嗽サンプルを用いた口腔内 HPV16 DNA の検出

94人の健常者から得られた、口腔含嗽および咽頭含嗽サンプルを用いて、HPV16 DNAをPCR法にて検索した。その結果、HPV16陽性率は、咽頭含嗽サンプルでは28.7%、口腔含嗽サンプルでは16.0%で、咽頭含嗽サンプルでHPV16陽性率が高いことが明らかとなった。また、口腔含嗽サンプルでは、HPV16陽性率は女性と比べて男性において有意に高いことが明らかとなった。さらに、咽頭含嗽サンプルでのHPV16陽性例では、口腔サンプルでのHPV16陽性例と比較して、HPV16のコピー数が有意に増加していた (Shigeishi and Sugiyama. *J Appl Oral Sci*, 2016)。

#### 口腔内 HPV 感染のリスクファクターの検索

健常者の HPV の口腔内感染を調査した疫学研究を収集し、HPV 感染のリスクファクターを同定するためメタ解析を行った。その結果、性行動と喫煙が口腔 HPV 感染におけるリスクファクターであることが明らかとなった(Shigeishi and Sugiyama. *J Clin Med Res*, 2016)。さらに、最新の疫学研究や基礎的研究の結果をもとに、口腔の HPV 感染の危険因子や、口腔癌における HPV 陽性率および HPV 陽性口腔癌の分子生物学的特徴について検討した。その結果、口腔癌における HPV DNA の陽性率は 6.0~27.5%で、高リスク型 HPV の中では、HPV16 が高い陽性率を示した。口腔癌では、E6, E7 mRNA の陽性率は子宮頸癌と比較して低いため、HPV 関連口腔癌(口腔の HPV 感染が原因で生じる口腔癌)では、E6, E7 の安定高発現を介さない悪性形質の獲得機構の存在が示唆された(重石英生, 杉山 勝, *口腔衛生学会雑誌*, 2017)。

#### 口腔癌患者における口腔内 HPV16 DNA の検出

口腔癌患者得られた口腔含嗽サンプルを用いて、HPV16 DNA を PCR 法にて検索した。その結果、HPV16 DNA は、13 例中 6 例で確認されたが、HPV16 陽性率と臨床病理学的指標との有意な相関関係は認めなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA copy number in oral rinse samples from oral cavity cancer patients. Hideo Shigeishi, Sho Yokoyama, Kouji Ohta, Masaaki Takechi, Masaru Sugiyama. *Translational Research in Oral Oncology*. 3: 1–5, 2018. (査読あり)
- 2) High HPV16 E6 viral load in the oral cavity is associated with an increased number of bacteria: A preliminary study. Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, Takechi M. *Biomed Rep*. 8(1): 59-64, 2018. (査読あり)

- 3) Human Papillomavirus (HPV) 感染と口腔癌の関係について—最近の研究から— (総説) 重石英生, 杉山 勝, 口腔衛生学会雑誌, 67 巻, 3 号 p. 149-159, 2017. (査読あり)
- 4) Higher prevalence and gene amplification of HPV16 in oropharynx as compared to oral cavity. Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Rahman MZ, Takechi M. J Appl Oral Sci. 24(4):397-403, 2016. (査読あり)
- 5) Risk factors for oral human papillomavirus infection in healthy individuals: A systematic review and meta-analysis. Shigeishi H, Sugiyama M. J Clin Med Res. 8(10):721-729, 2016. (査読あり)
- 6) Snail-induced CD44high cells in HNSCC with high ABC transporter capacity exhibit potent resistance to cisplatin and docetaxel. Hashikata M, Shigeishi H, Okui G, Yamamoto K, Tobiume K, Seino S, Uetsuki R, Kato H, Ishioka Y, Ono S, Ohta K, Higashikawa K, Sugiyama M, Takechi M. Int J Clin Exp Pathol. 9(8):7908-7918, 2016. (査読あり)
- 7) CD44high /ALDH1high head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3β-dependent cancer stem cell properties. Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Ono S, Simasue H, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M. J Oral Pathol Med. 45(3):180-188, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 口腔含嗽サンプルを用いた Human Papillomavirus (HPV) DNA の陽性率の検討 . 重石英生, 太田 耕司, 東川晃一郎, 武知正晃, 杉山 勝.第 47 回日本口腔外科学会中国四国支部学術集会, 2018 年 6 月 17 日, 岡山.
2. 口腔 HPV 感染の危険因子および HPV 陽性口腔癌の分子生物学的特徴 . 重石英生, 太田耕司 杉山 勝.第 67 回日本口腔衛生学会・総会, 2018 年 5 月 19 日, 札幌.
3. 口腔の HPV 感染の危険因子および HPV 陽性口腔癌の臨床病理学的特徴について . 重石 英生, 杉山 勝. 第 26 回日本口腔感染症学会総会・学術大会, 2017 年 11 月 12 日, 豊橋.
4. 口腔の HPV 感染の危険因子および HPV 陽性口腔癌の臨床病理学的特徴 - 最近の研究から - . 重石 英生, 杉山 勝. 太田 耕司, 東川 晃一郎, 武知 正晃. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 21 日, 京都.
5. 口腔と中咽頭における HPV16 感染のリスクファクターの検索. 重石 英生 杉山 勝, 太田 耕司, 西 裕美, 武知 正晃. 第 26 回日本産業衛生学会全国協議会, 2016 年 9 月 8 日, 京都.
6. 口腔の HPV 感染とその危険因子の検索 . 重石 英生, 杉山 勝. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会, 2017 年 6 月 1 日, 山形.
7. Association of clinicopathological factors with HPV16 infection in oral cavity and oropharynx. Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Nishi H, Takechi M. 第 27 回日本臨床口腔病理学会, 2016 年 08 月 12 日, 広島.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：重石 英生  
ローマ字氏名：（ SHIGEISHI HIDEO ）  
所属研究機関名：広島大学  
部局名：医歯薬保健学研究科（歯）  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：90397943

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。