

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20192

研究課題名(和文) HPV陽性中咽頭癌におけるウイルス発癌機構へのAIDの関与

研究課題名(英文) Association between activation induced cytidine deaminase and HPV positive oropharyngeal carcinogenesis

研究代表者

中西 庸介(Nakanishi, Yosuke)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20623648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： HPV陽性中咽頭癌の組織では陰性に比してA3A, A3C, A3F, A3Hが高い傾向があった。HPV陽性喉頭乳頭腫では一部でAPOBEC3F発現を認めたものの他はAPOBEC発現は認められなかった。中咽頭癌細胞株ではqPCRで検討の結果、A3B, A3Cが高い傾向であった。咽頭細胞株へのHPV遺伝子導入については、トランスフェクション効率が悪く、安定した細胞株を樹立する事が出来ず研究が進まなかった。今回の結果から中咽頭癌で強く発現を認めたAPOBEC familyを同定した。また、喉頭乳頭腫に関しては正常細胞に潜伏するべく宿主の免疫応答を回避する機構が働いているかもしれない事が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We found that the expression of the apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide (APOBEC) 3A, C, F, and H was higher in HPV positive oropharyngeal cancer (OPC) tissues than HPV negative OPC tissues. However, only the A3F was expressed in HPV positive laryngeal papilloma. We failed in conducting the transduction of the HPV gene into oropharyngeal cancer cell line because of low transduction efficiency. We identified APOBEC family highly expressed in oropharyngeal cancer, It was suggested that laryngeal papilloma avoided the host immune response.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：中咽頭癌 喉頭乳頭腫 APOBEC family

1. 研究開始当初の背景

HPV 陰性中咽頭癌に比べて HPV 陽性中咽頭癌は化学放射線治療に対する反応が良好であり、予後良好である事が分かってから HPV のバイオマーカーとしての意義がクローニングが低リスク型 HPV では integration が生じず episomal form のまま感染が維持されるのかについては全く解明されていない。ただ、HPV integration の際にはまず HPV ウィルスゲノムおよび宿主の二本鎖 DNA 切断が必須である事が少なくとも推察される。

近年、細胞自身に備わったウィルス排除免疫機構として内因性免疫が注目されており、申請者は Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide (APOBEC) に着目した。これまでヒトでは 11 種類(1、2、3A、3B、3C、3DE、3F、3G、3H、4、AID) の APOBEC 蛋白が知られている。DNA や RNA の塩基であるシトシンからアミノ基を取ることによってウラシルを作るデアミナーゼ酵素活性を持つ。これらの内、抗ウィルス活性を発現するのは APOBEC3 のみである。一方で Activation induced cytidine deaminase (AID) は APOBEC ファミリーの中で唯一の DNA 二本鎖切断酵素であり、B 細胞における免疫グロブリンのクラススイッチ組み替えと体細胞突然変異を同時に起こす酵素として知られている。申請者は口腔癌における AID の発現に関する研究を行い、AID は口腔癌の initiation に関与しズアップされている。一方でウィルス発癌機構は未解明である。とりわけ、発癌の第一条件である宿主のゲノムへの組み込み (integration) がどのようにして起こるのか、さらには、なぜ高リスク型 HPV ではこの integration が生じている事を 2013 年に報告した。AID は当初は B 細胞のみに発現するとされていたが、消化器系の固形癌において AID が異所性発現すること、および癌化を誘導することが明らかにされてきた。AID の生理的役割は遺伝子変異作用により抗体遺伝子の多様性を生み出す事であり、TNF- や TGF- をはじめとした炎症性サイトカインにより誘導される。この AID は二本鎖 DNA へのデアミネーション活性も有しており、DNA 二本鎖切断作用を持つ。申請者は中咽頭において HPV ウィルスの宿主ゲノムへの integration の際に二本鎖 DNA 切断時に AID を含む APOBEC family が関与している可能性について着目した。中咽頭は子宮頸部と同様に HPV ウィルス感染者が全て発癌する訳ではない。細胞性免疫原性が弱い HPV を効率的に排除するには細胞内に潜伏感染しているウィルスを排除する内因性免疫システムが重要な役割を果たしていることは容易に想像される。その際に、一定の確率でウィルス DNA を切断するシステムが宿主 DNA の切断や変異も誘導することで癌化へと進むことが推察される。

2. 研究の目的

中咽頭癌臨床検体において APOBEC 発現と HPV-E2 領域へ APOBEC 特異的な C to T または G to A 変異が導入されていることを検証する。咽頭細胞株に HPV の E6、E7 遺伝子をトランスフェクションし、APOBEC および AID 発現を検証する。そして、すでに塩基配列が判明している HPV-E2 領域発現ベクターを同時に形質導入し、E2 へ APOBEC 特異的な C to T または G to A 変異が導入されることを検証する。咽頭細胞への HPV integration は AID により誘導されるかを検証する。本研究では、咽頭細胞株において AID を強制発現させた後に DNA 二本鎖切断の指標である H2AX の発現を検討する。また、H2AX 発現と integration との関連を統計学的に検討する。

3. 研究の方法

- 1) 中咽頭癌パラフィン標本より AID および APOBEC 発現と HPV-E2 領域の変異の関連を検証する。
- 2) HPV-16 positive の咽頭癌細胞株において AID を含めた APOBEC family のプロファイリングを行う。
- 3) 咽頭上皮細胞株 NP69 に HPV-6 および HPV-16 の E6、E7 遺伝子をトランスフェクションし、AID、APOBEC の発現を検討する。
- 4) HPV 陽性および陰性中咽頭癌、HPV 陽性および陰性喉頭乳頭腫における APOBEC ならびに AID 発現をパラフィン切片を用いて免疫組織学的に検討する。この実験により、高リスク型 HPV 感染検体と低リスク型 HPV 感染検体における APOBEC、AID の発現様式の差異により integration に必要な APOBEC ファミリー発現パターン解明への手がかりとする。
- 5) 咽頭細胞株および中咽頭癌細胞株に AID 発現ベクターを導入し、DNA 二本鎖切断について検討を行う。

4. 研究成果

- 1) HPV 陽性中咽頭癌の組織では陰性に比して A3A、A3C、A3F、A3H が高い傾向があった。E2 変異についてはダイレクトシーケンシングではターゲットとなる範囲が広い為に変異の有無の評価が出来なかった。その為、3D-PCR assay を用いて検討を行った。しかし、温度勾配による PCR のバンドが適切な位置に出現しなかった。コンタミネーションの可能性を考えたが原因は不明であった。
- 2) HPV positive 咽頭癌細胞株として SCC090 と VU147T を用いて RT-qPCR を行った。AID 発現は両者共に見られなかった。APOBEC family では両者において A3B、A3C の上昇を認めた。
- 3) 中咽頭癌細胞株 SCC090 を培養の後、HPV-16 の E6、E7 遺伝子を PCR にて増幅後、分離した。これを GFP 発現ベクターに

サブクローニングした後、咽頭上皮細胞株 NP69 ヘトランスフェクションを行った。しかし、トランスフェクション効率が不良な為か GFP 発現ベクターのみをトランスフェクションした細胞株も GFP 発現は不良であった。この実験系を断念した。

4) HPV 陽性中咽頭癌の組織では陰性に比して A3A, A3C, A3F, A3H が高い傾向があった。HPV 陽性喉頭乳頭腫では一部で APOBEC3F 発現を認めたものの他は APOBEC 発現は認められなかった。

5) 咽頭上皮細胞株は NP69 を、中咽頭癌細胞株は HPV16 陽性である SCC090、VU147T を用いた。これらの細胞株に AID 発現ベクターをトランスフェクションしたがトランスフェクション効率が不良であった為に AID 安定発現クローンの樹立を行う事が出来なかった。したがって、H2AX 発現の評価を行う事を断念した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1 Yoshida H, Muro S, Ueno T, Nakanishi Y, Tsuji A, Hatano M, Endo K, Kondo S, Sugimoto H, Wakisaka N, Yoshizaki T, Acta Otolaryngol, 査読有、2017、4(17)、pp. 1-5

2 Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Nakanishi Y, Ishikawa K, Komori T, Moriyama-Kita M, Endo K, Muro S, Wang Z, Kitamura K, Nishiyama T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Muramatsu M, Yoshizaki T, Oncogene, 2017, 査読有、4(36)、pp.1687-97

3 Seishima N, Kondo S, Wakisaka N, Kobayashi E, Imoto T, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Muro S, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Yoshizaki T, J Med Virol, 2017, 査読有、4(89)、pp.1088-95

4 Nakanishi Y, Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Ishikawa K, Yoshizaki T, Cancer Metastasis Rev, 2017, 査読有、4(36)、pp.435-447

[学会発表](計13件)

1 発表者名 中西庸介、吉崎智一
演題名：Clicking larynx の2症例
学会名：第30回日本喉頭科学会
発表日：2018/3/1-2

発表場所：高知

2 発表者名 Nakanishi Y, Yoshizaki T
演題名：Lenvatinib therapy for advanced thyroid cancer

学会名：2nd Congress of Asia Pacific Society of Thyroid Surgery

発表日：2017/11/1-3

発表場所：那覇

3 発表者名 中西庸介、室野重之、吉崎智一
演題名：早期声門癌における救済治療症例の検討

学会名：第79回耳鼻咽喉科臨床学会

発表日：2017/7/6-7

発表場所：下関

4 発表者名 中西庸介、吉崎智一

演題名：当科における局所進行喉頭癌の臨床検討

学会名：第118回日本耳鼻咽喉科学会

発表日：2017/5/17-20

発表場所：広島

5 発表者名 中西庸介、吉崎智一

演題名：当科における局所進行喉頭癌の臨床検討

学会名：第29回日本喉頭科学会

発表日：2017/4/6-7

発表場所：盛岡

6 発表者名 中西庸介、室野重之、吉崎智一

演題名：2度の手術を要した Clicking larynx の1例

学会名：第27回日本頭頸部外科学会

発表日：2017/2/2

発表場所：東京

7 発表者名 中西庸介、室野重之、吉崎智一

演題名：早期声門癌における救済治療症例の検討

学会名：第68回日本気管食道学会

発表日：2016/11/17

発表場所：東京

8 発表者名 中西庸介、遠藤一平、近藤悟、脇坂尚宏、室野重之、吉崎智一

演題名：当科における経口的下咽頭腫瘍切除術の検討

学会名：第40回日本頭頸部癌学会

発表日：2016/6/9

発表場所：東京

9 発表者名 Nakanishi Y, Muro S, Yoshizaki T

演題名：Endoscopic laryngo-pharyngeal surgery (ELPS) for hypopharyngeal cancer

学会名：19th WCB/WCBE

発表日：2016/5/8

発表場所：Florence

10 発表者名 中西庸介、室野重之、吉崎智一

演題名：2度の手術を要した Clicking larynx の1例

学会名：第28回日本喉頭科学会

発表日：2016/3/3-4

発表場所：大阪

11 発表者名 中西庸介、室野重之、吉崎智一

演題名：同一耳下腺内に発生した重複悪性主要の一例

学会名：第26回日本頭頸部外科学会

発表日：2016/1/28-29

発表場所：名古屋

12 発表者名 Nakanishi Y, Wakisaka N, Muro S, Yoshizaki T

演題名：HPV status determine the efficacy

of adjuvant chemotherapy with S-1, an oral fluorouracil prodrug, in oropharyngeal cancer

学会名：30th International HPV conference

発表日：2015/9/17-21

発表場所：Lisbon

13 発表者名 中西庸介、室野重之、吉崎智一
演題名：早期声門癌における救済治療症例の検討

学会名：第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会

発表日：2015/6/25-26

発表場所：浜松

脇坂 尚宏 (WAKISAKA, Naohiro)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70377414

近藤 悟 (KONDO, Satoru)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：70436822

遠藤 一平 (ENDO, Kazuhira)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30547154

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

金沢大学耳鼻咽喉科頭頸部外科ホームページ URL：

<http://otolaryngol.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 庸介 (NAKANISHI, Yosuke)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20623648

(2)研究分担者

該当なし

研究者番号：

(3)連携研究者

吉崎 智一 (YOSHIZAKI, Tomokazu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70262582

(4)研究協力者