

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 13 日現在

機関番号：14401  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K20202  
研究課題名(和文) 網羅的タンパク解析によるヒトパピローマウイルス陽性中咽頭癌の治療抵抗性因子の同定  
  
研究課題名(英文) Elucidating a factor of the therapy resistance of HPV related oropharyngeal cancer by using comprehensive analysis  
  
研究代表者  
武本 憲彦 (Takemoto, Norihiko)  
  
大阪大学・医学系研究科・助教  
  
研究者番号：20636485  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HPV陽性中咽頭癌の治療抵抗因子を探るため、HPV陽性中咽頭癌細胞株の放射線耐性化による発現遺伝子とHPV陽性中咽頭癌患者検体のマウス移植による発現遺伝子をマイクロアレイを用いて比較解析を行った。耐性化、マウス移植後において共通してAKTシグナルが増強していたがmTORシグナルは増強していなかった。AKTシグナルに治療抵抗因子が存在しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the factor of therapy resistance of HPV related oropharyngeal carcinoma(HPV-OPC), expression gene in HPV-OPC cell line with radioresistance and in patient with HPV-OPC derived xenograft model mouse were compared and analyzed using microarray. Although the AKT signal was intensified in common after tolerance for radiotherapy and mouse transplantation, the mTOR signal was not enhanced. It seemed that a therapeutic resistance factor could exist in the AKT signal.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：中咽頭癌 ヒトパピローマウイルス 治療抵抗因子

## 1. 研究開始当初の背景

中咽頭癌は HPV の感染により発生する HPV 陽性癌、喫煙・飲酒により発生する HPV 陰性癌に大別され、HPV 陽性癌と HPV 陰性癌は全く異なる特徴を呈する。例えば我々は、HPV 陽性癌では p53 遺伝子変異が稀で、特に p53 の機能がロックアウトされる disruptive 変異は全く認められないのに対し、HPV 陰性癌では p53 変異が高頻度に認められること (Maruyama, et al. 2014 Cancer Sci)、HPV 陽性癌は嚢胞性頸部リンパ節転移を来しやすいこと (Yasui, et al. 2014 PLoSOne)、を明らかにしてきた。また、HPV 陽性癌は HPV 陰性癌と比べ有意に予後が良好なことがメタアナリシスによって確立されたことを受け、HPV 陽性癌では標準治療より治療強度を下げた低侵襲治療により、予後を悪化させることなく QOL を改善できると期待されている。現在、この仮説を検証するべく、国内では我々のグループが、海外では複数のグループが低侵襲治療の臨床試験を進めている。一方、HPV 陽性癌の一部は予後不良であり、喫煙歴が予後不良因子とされている。しかし、喫煙歴は多くの癌に共通した予後不良因子であり、HPV 陽性癌に固有の予後不良因子、即ち治療抵抗性関連分子は明らかになっていない。近年、HPV 陽性癌は本邦を含め世界的に急速に増加しており、難治例の鑑別・治療法の確立は急務である。

癌幹細胞は治療抵抗性に深く関与すると考えられている。癌幹細胞性を検証する手技は、NOD/SCID マウスでの腫瘍形成能、非接着条件でのスフェア形成能、などがあるが、中でも NOD/SCID マウスでの腫瘍形成能、が最も重要な形質と考えられている。一方、外科的に摘出した腫瘍 (F0) を NOD/SCID マウスに移植した場合、F0 と初代生着腫瘍 (F1) の間では遺伝子の発現パターンが大きく変化するが、F1 と以後の継代腫瘍 (F2, F3, F4, ...) の間ではその変化は非常に少ないことが知られている (図 1)。即ち、F0/F1 間で発現が変化する分子は癌幹細胞性に関連している、換言すれば治療抵抗性関連分子の候補と予想される。マウス皮下移植というストレス環境下で生存・増殖する腫瘍細胞は、放射線治療というストレス環境下で遺残する腫瘍細胞と類似した形質を有すると考えられる。我々はこの点に着目し、F0/F1 間のタンパク質の変化を網羅的に解析することにより治療抵抗性関連因子を同定できると着想した。そして下咽頭癌移植モデルを用い、治療抵抗性関連分子の候補として糖の腫瘍細胞内への取り込みを司る glucose transporter-1 (GLUT1) を同定した。更に、GLUT1 の発現を抑制すると糖代謝が低下し、癌細胞の増殖能が著明に低下すること、放射線感受性が増大すること、また、これらは低酸素下においても同様に観察されることを明らかにした (論文準備中)。一方我々は、

化学放射線療法で加療した喉頭・下咽頭癌において、<sup>18</sup>F-FDG PET/CT に基づいて算出される原発巣の腫瘍体積、即ち、原発巣の中で糖代謝活性の高い部分の腫瘍体積 (metabolic tumor volume, MTV) が大きいほど局所制御が不良であることを明らかにした (Hanamoto, et al. 2014 Cancer Med)。更に、原発巣の MTV は粗生存率・喉頭温生存率と高い相関を示し、TNM 分類よりも極めて優れた予後因子であることを明らかにした (論文投稿中)。GLUT1 の発現が強いと腫瘍の糖代謝が亢進することから、これらの結果は、我々の実験系により治療抵抗性関連分子が同定できることを示している。

HPV 陽性癌は他の頭頸部扁平上皮癌と異なり、進行例であっても一般に原発巣は小さく、転移リンパ節は前述したように嚢胞性であることが少なくない。更に、我々は MTV は HPV 陽性癌の予後因子とならないことを明らかにしている (Hanamoto, et al. 2014 Cancer Med)。また、HPV 陽性癌の発育は HPV 陰性癌に比べて緩徐であり、代謝への要求度が低いと考えられる。こうしたことは、HPV 陽性癌では糖代謝が治療標的とならない可能性を示唆するものである。一方、p53 変異の有無に代表されるように HPV 陽性癌と他の頭頸部扁平上皮癌ではゲノム背景が大きく異なる。従って、HPV 陽性癌に固有の治療抵抗性関連分子が存在するものと考えられるが、本研究ではその治療抵抗性関連分子を解明することを目指とする。

## 2. 研究の目的

本研究は、今後症例数が急増すると予想されるヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, HPV) 陽性中咽頭癌の治療抵抗性を規定する分子を同定することを目的とする。その方法として、HPV 陽性中咽頭癌を NOD/SCID マウスへ皮下移植し、移植前後の腫瘍で発現が変化する分子を治療抵抗性分子の候補として網羅的タンパク解析により同定する。ついで、HPV 陽性癌細胞株を用いて候補分子の遺伝子を改変して表現型変化を観察し、さらに低侵襲治療の臨床試験を行った HPV 陽性中咽頭癌の検体を用いて、候補分子の発現と治療効果の関係を解析し、治療抵抗性と相関する分子を選定し最終的に治療抵抗性分子として決定する。

## 3. 研究の方法

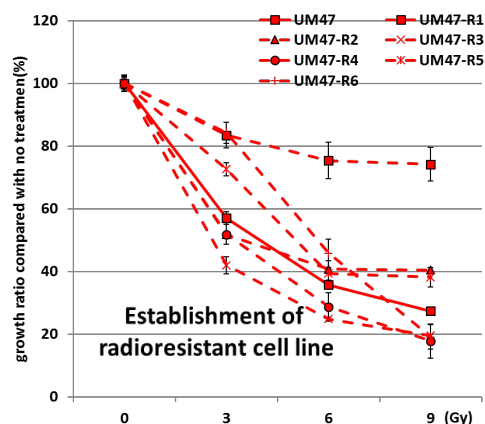
HPV 陽性中咽頭癌の手術摘出した原発巣あるいは生検検体 (F0 腫瘍) を NOD/SCID マウスに皮下移植し移植腫瘍 (F1 腫瘍) を樹立する。F0/F1 腫瘍間で発現に変化があるタンパクを iTRAQ 法による網羅的タンパク解析によりスクリーニングし治療抵抗性候補分子とする。次いで、治療抵抗性候補分子の発現レベルが F0/F1 腫瘍間で実際に異なることを Western blotting 法および定量的リアルタイム PCR 法により確認する。更に候補分子を HPV 陽性中咽頭癌培養細胞でロックアウトおよび

び強制発現を行い放射線感受性の変化を確認する。更に一連の治療抵抗性候補分子の発現レベルを放射線単独療法で加療した HPV 陽性中咽頭癌サンプルを対象として免疫組織化学により解析し、一次治療効果あるいは予後と相関する分子を治療抵抗性分子として決定する。

#### 4. 研究成果

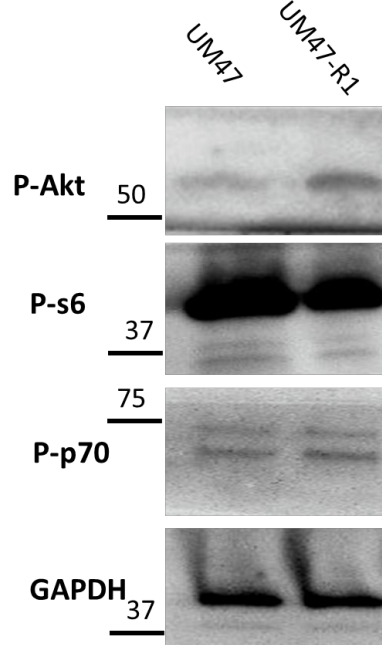
HPV 陽性中咽頭癌未治療新鮮 (F0) 検体とそれらから樹立したマウス移植 (F1) 検体を 3 ペアを用いて iTRAQ 法によるプロテオーム解析を行った結果、共通して上昇するのはいずれも分裂増加に關与する核内タンパクのみで膜タンパクや signal pathway に關与する細胞質内タンパクは発現増加が認められなかった。今回の検討では 2 倍以上発現上昇が確認されたタンパク数は各ペアで 661 種類、57 種類、24 種類とペア間での差異があり、組織における heterogeneity が起因すると考えられ、正確な共通発現因子検出は困難と考えられた。そこで F0F1 で変化する因子は放射線抵抗性細胞株と野生株でも共通して発現変化しうると考え、細胞株をニュートラルサンプルとして加え検討した。

HPV 陽性中咽頭癌細胞株 UMSCC47 を用いて 2Gy を毎日 1 回合計照射量 70Gy にし、照射後に生存するコロニーをピックアップし、放射線耐性株を樹立した。



UMSCC47 の放射線耐性株と野生株をニュートラルサンプルに置き、F1 検体と F0 検体の 3 ペアと合わせて合計 8 検体をプロテオーム解析とマイクロアレイ解析に用いた。タンパク抽出でうまくいかずタンパク量が不足したためプロテオーム解析はできなかった。マイクロアレイ解析の結果、4 ペアで共通して発現上昇した遺伝子は 1049 認められた。さらにその中から PI3K-AKT-mTOR pathway 内において 4 ペアで共通した変化があった遺伝子は 98 遺伝子認められた。治療抵抗因子を携えていると考えられる F1 検体と放射線耐性株サンプルでは AKT 依存的なシグナルである FOXO や MDM2 などが上昇していたが、mTOR シグナルである s6 や p70 のシグナル増強は認めなかった。

#### alteration of Akt/mTOR pathway in radioresistant HPV-OPC cell



放射線耐性株と野生株を用いてウェスタンブロットで検証したところ耐性株になると AKT リン酸化増強を認めたが、mTOR シグナルである s6 や p70 のシグナル増強は認めなかった。また放射線耐性株では AKT 阻害剤のほうが mTOR 阻害剤より増殖抑制効果が強かった。HPV 中咽頭癌は治療抵抗性を獲得すると AKT independent から AKT dependendni シフトしていくことが考えられた。

#### 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)

Transaminase Activity Predicts Survival in Patients with Head and Neck Cancer. Takenaka Y, Takemoto N, Yasui T, Yamamoto Y, Uno A, Miyabe H, Ashida N, Shimizu K, Nakahara S, Hanamoto A, Fukusumi T, Michiba T, Cho H, Yamamoto M, Inohara H PLOS one. 2016 Oct 5.

Leucine-rich -2-glycoprotein promotes TGF 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines.

Takemoto N, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Ohkawara T, Takahashi T, Nomura S, Inohara H, Naka T Oncotarget Vol16, No13 11009-11022 Feb 12, 2015

Prognostic significance of body mass index before treatment for head and neck cancer.

Takenaka Y, Takemoto N, Nakahara S,

Yamamoto Y, Yasui T, Hanamoto A, Fukusumi T, Michiba T, Cho H, Yamamoto M, Inohara H.

Head Neck. 2014 Jun 2.

Prognostic factors of peripheral facial palsy: multivariate analysis followed by receiver operating characteristic and Kaplan-Meier analyses.

Takemoto N, Horii A, Sakata Y, Inohara H. Otol Neurotol. 2011 Aug;32(6):1031-6.

〔学会発表〕(計 4 件)

Takemoto N, Takenaka Y, Inohara H

“Treatment outcome of olfactory neuroblastoma in our institute”

World skull base 2016, June 2016, Osaka, Japan

Takemoto N, Serada S, Naka T

“Leucine-rich -2-glycoprotein promotes TGF  $\beta$ 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines”

The AACR Annual Meeting, April 2015, Philadelphia, USA

Takemoto N, Serada S, Naka T

“Leucine-rich -2-glycoprotein promotes TGF  $\beta$ 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines”

The 4th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, November 2014, Melbourne, Australia

Takemoto N

“Combination of glucose uptake inhibition and radiation make synergistic inhibitory effect for head and neck squamous cell carcinoma”

5<sup>th</sup> World congress International Federation of Head and Neck Oncologic Societies July 2014, New York, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武本 憲彦 (TAKEMOTO Norihiko)

大阪大学大学院医学系研究科

耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教

研究者番号：20636485