

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02681

研究課題名(和文) ヒトパピローマウイルス陽性中咽頭癌の撲滅に向けた包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive study for control of human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma

研究代表者

猪原 秀典 (Inohara, Hidenori)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00273657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルス(HPV)関連中咽頭癌は世界的に増加傾向にあり、咽頭HPV感染が発癌の原因となる。本研究では、本邦における咽頭HPV感染率は5.7%(95%信頼区間、3.9-8.3)であること、咽頭HPV感染は女性よりも男性に多く、活発な性行動によりリスクが増大することを明らかにした。更に、循環血液中のHPV DNAのコピー数がHPV関連中咽頭癌の有用なバイオマーカーとなることを明らかにした。現在はHPV関連中咽頭癌のモデル動物を開発中である。また、HPV関連中咽頭癌の基礎研究で汎用される細胞株や抗体における問題点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咽頭洗浄により含嗽では検出できない咽頭HPV感染を検出できることが明らかとなった。含嗽により咽頭HPV感染が予防できる可能性が示唆された。これは特に性行為後の含嗽を推奨する根拠となり得るものである。更に、HPV関連中咽頭癌患者の循環血液中のHPV DNAを経時的にモニタリングすることにより、一次治療後の遺残や再発の早期発見が可能となり、予後の向上に寄与する可能性が示唆された。また、HPV関連中咽頭癌培養細胞株を用いた過去の論文内容の解釈、今後の研究計画の立案に注意喚起を促すこととなった。

研究成果の概要(英文)：Human papillomavirus (HPV) is a causative factor for a subset of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC), and the incidence of HPV-related OPSCC is increasing. We found that the overall prevalence of oral HPV infection in Japan was 5.7% (95% confidence interval, 3.8-9.3). Men had a significantly higher prevalence than women, and infection increased with number of sexual partners. We also found that HPV circulating tumor DNA could be a useful biomarker of HPV-related OPSCC. Additionally, we revealed problems with respect to HPV-related OPSCC cell lines and commercially available anti-E6/E7 antibodies. A mouse model for HPV-related OPSCC is currently under development.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：ヒトパピローマウイルス 中咽頭癌 咽頭感染 リキッドバイオプシー トランスジェニックマウス

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

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, HPV) の感染により HPV 陽関連中咽頭癌が発生する。本邦における咽頭 HPV 感染率は全く報告されていない。一般に咽頭 HPV 感染は、含嗽により扁桃陰窩から HPV 感染細胞を剥離・回収して HPV DNA を解析することにより行われる。しかし、含嗽では HPV 感染細胞を十分に剥離することができないため、より効率的に HPV 感染細胞を剥離する手技の確立が求められる。

(2) HPV 関連中咽頭癌は HPV 非関連中咽頭癌と比べ、放射線や抗癌剤に対する感受性が高く予後良好であるが、一部は予後不良である。しかし、放射線感受性を規定する分子は不明であることから、その解明とともに、新規治療法の開発や動物モデルの開発が待たれる。

(3) Liquid biopsy として HPV の circulating tumor DNA (ctDNA) を評価する手技が確立されていない。また、HPV ctDNA の臨床的意義は確立されていないが、HPV 関連中咽頭癌のバイオマーカーとなる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 咽頭 HPV 感染の評価法の確立と本邦における咽頭 HPV 感染率：含嗽で細胞回収後に、更に咽頭洗浄を行って細胞を回収すると、含嗽単独と比べ HPV DNA の同定効率が向上することを検証する。また、本邦における咽頭 HPV 感染率とその相関する因子を明らかにする。

(2) HPV 関連中咽頭癌動物モデルの開発：HPV16 E7 と変異型 PIK3CA のダブルトランスジェニックマウスを作製する。

(3) 放射線感受性因子の解明と E6/E7 標的治療の開発：HPV16 関連中咽頭癌培養細胞株を用いて放射線感受性を規定する分子を明らかにする。また、E6/E7 を標的とした治療の有用性を明らかにする。

(4) Liquid biopsy の有用性の評価：循環血液中の HPV ctDNA を定量し、HPV DNA のコピー数が病態と相関することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大阪府下の病院に勤務する医療従事者の健康人 434 名を対象に、含嗽+咽頭洗浄により含嗽単独と比較して、咽頭 HPV 検出率が向上するか検証する。更に、HPV DNA の検出法として、GENOSEARCH HPV31 と nested PCR + direct sequencing の有用性を比較する。また、対象者に性活動を含めたアンケート調査を行い、咽頭 HPV 感染と相関する因子を明らかにする。尚、(株)モリタ製作所(京都市)に依頼して歯科洗浄機を改良した咽頭洗浄機を作製した。

(2) HPV16 E7 のトランスジェニックマウス、および PIK3CA 変異ノックインマウスを作製する。これらを交配してダブルトランスジェニックマウスを作製し、HPV 陽性中咽頭癌の動物モデルとして有用であることを明らかにする。

(3) HPV 関連中咽頭癌培養細胞株および HPV 非関連中咽頭癌培養細胞株にプール型レンチウイルス shRNA ライブラリーを感染させ、放射線を照射してアポトーシスを誘導する。生存した細胞を回収し、レンチウイルスベクターに挿入されたバーコード部分を次世代シーケンサーで解読すると、細胞に導入され放射線抵抗性を付与した shRNA、即ち、shRNA によるノックダウンで放射線感受性の喪失を惹起した遺伝子が明らかになる。この一群の遺伝子の中で HPV 関連細胞株に特異的に共通して認められる遺伝子が、HPV 関連中咽頭癌の放射線感受性を規定する候補となる。また、HPV 関連中咽頭癌培養細胞放射線耐性株、その親株の E6/E7 を CRISPR/Cas9 を用いて不活化すると、悪性度が低下し放射線感受性が亢進することを確認する。次いで、上記で開発した動物モデルを用い E6/E7 標的治療の有用性を明らかにする。

(4) p16 陽性且つ HPV16 DNA 陽性中咽頭癌患者を対象に、血漿中の HPV16 E6/E7 ctDNA のコピー数をデジタル PCR により絶対定量する。治療前のコピー数が病期と相関するか検討する。また、放射線療法後のコピー数が、FDE-PET/CT によるレスポンス評価や予後と相関するか検討する。

4. 研究成果

(1) 咽頭 HPV 感染の評価法の確立と本邦における咽頭 HPV 感染率

健康人 435 名を対象とした解析となった。HPV DNA を nested PCR で検出した場合、含嗽単独における咽頭 HPV 感染率は 3.9% (95%信頼区間、2.5-6.2)、咽頭高リスク型 HPV 感染率は 3.4% (95%信頼区間、2.1-5.6) で、含嗽+咽頭洗浄における咽頭 HPV 感染率は 4.8% (95%信頼区間、3.2-7.3)、咽頭高リスク型 HPV 感染率は 3.9% (95%信頼区間、2.5-6.2) であった。HPV 全体では咽頭洗浄を追加することにより有意な上昇が認められたが ($P < 0.05$)、高リスク型 HPV では上昇は有意ではなかった ($P = 0.15$)。一方、HPV DNA を GENOSEARCH HPV31 で検出した場合、含嗽単独における咽頭 HPV 感染率は 3.9% (95%信頼区間、2.5-6.2)、咽頭高リスク型 HPV 感染率は 3.4% (95%信頼区間、2.1-5.6) で、含嗽+咽頭洗浄における咽頭 HPV 感染率は 5.3% (95%信頼区間、3.5-7.8)、咽頭高リスク型 HPV 感染率は 4.4% (95%信頼区間、3.0-6.7) であった。HPV 全体 ($P = 0.01$) においても高リスク型 HPV ($P < 0.05$) においても、咽頭洗浄を追加することにより有意な上昇が認められた。これらのことから、咽頭洗浄により含嗽単独では剥離できなかった扁桃陰窩の HPV 感染細胞が剥離・回収され、含嗽+咽頭洗浄は含嗽単独と比較して咽頭 HPV 感染の検出を向上させることが示された。

含嗽単独における nested PCR + sequencing と GENOSEARCH HPV31 の一致率は 99.0% であった。含嗽 + 咽頭洗浄における一致率は 98.7% であった。含嗽単独においても含嗽 + 咽頭洗浄においても、nested PCR + sequencing で検出できるにもかかわらず GENOSEARCH HPV31 で検出できない例が 2 例あったが、この 2 例の genotype はいずれも GENOSEARCH HPV31 がカバーしていないものであった。一方、GENOSEARCH HPV31 のみで検出可能な例が含嗽単独では 2 例、含嗽 + 咽頭洗浄では 4 例あった。更に、HPV 重複感染は GENOSEARCH HPV31 でのみ同定可能であった。これらのことから、GENOSEARCH HPV31 の咽頭 HPV 検出効率は nested PCR + sequencing と比較して同等以上であり、GENOSEARCH HPV31 はその手技の容易性から、咽頭 HPV 感染のハイスループット解析に有用であることが示された。

含嗽+咽頭洗浄における nested PCR + sequencing と GENOSEARCH HPV31 の結果を統合すると、本邦における咽頭 HPV 感染率は 5.7% (95%信頼区間、3.9-8.3) となり、欧米からの報告と同等であった。一方、従来の報告では含嗽単独検体を用いていたこと、本邦における含嗽単独における咽頭 HPV 感染率は 3.9% (95%信頼区間、2.5-6.2) であることから、本邦の咽頭 HPV 感染率は欧米と比較して若干低いのが実態であると考えられた。また、HPV 関連中咽頭癌の主たる原因となる HPV16 の咽頭感染率は含嗽単独では 1.1% (95%信頼区間、0.5-2.7) と欧米からの報告と同等であったが、含嗽+咽頭洗浄では 1.4% (95%信頼区間、0.6-3.0) であった。461 名の別コホートについても検討したが、同等の結果であった。

咽頭 HPV 感染は年齢・喫煙歴と相関を認めなかったが、男性では 8.3% (95%信頼区間、5.4-12.4)、女性では 2.6% (95%信頼区間、0.1-5.9) であり、女性より男性で優位に高かった ($P=0.02$)。また、咽頭 HPV 感染は性活動と有意な相関を認めた。生涯の sex パートナー数が 0~5 人の場合の咽頭 HPV 感染率は 2.8% (95%信頼区間、1.4-5.6) であるのに対し、21 人以上の場合は 23.8% (95%信頼区間、13.5-38.5) であり、オッズ比 10.9 (95%信頼区間、3.9-30.6) ($P<0.001$) であった。

(2) HPV 関連中咽頭癌動物モデルの開発

HPV16 E7 トランスジェニックマウスの作製: K14 (サイトケラチン 14) のプロモーターが挿入されている pG3Z-K14 ベクターに、HPV16 E7 遺伝子を発現させるべく、人工合成した E6(TTL)E7 配列を pG3Z-K14 に挿入した K14HPVE6(TTL)E7 ベクターを作製した。K14HPVE6(TTL)E7 ベクターを FVBn マウスの受精卵前核にマイクロインジェクションを行い、F0 マウスを 3 匹得た。F0 マウスと野生型マウスを掛け合わせた F1 マウス中、ヘテロマウスは雌雄 5 匹ずつ得られた。最長 24 週齢であるが現在までにヘテロマウスに特に表現型は確認されていない。現在ホモマウスを得るべく交配を継続中である。

PIK3CA 変異ノックインマウスの作製: FVBn マウスをバックグラウンドとして PIK3CA exon9 に E542K, Glu Lys 変異個体を得るため CRISPR を用いた。CRISPR によりターゲット部位を切断後、DNA 修復時に oligo DNA がノックインされることで、GAA→AAA point mutation が惹起されるよう CRISPR gRNA と oligo DNA を設計した。15 匹の産仔を認めたがほぼ胎生致死であり、死産個体の尾を採取できた 4 匹についてシーケンスを確認したが、目的の E542K 変異は認められなかった。1 匹だけ生存個体が得られたが、E542K 変異は持たなかったが挿入した oligo DNA 配列の一部を確認できた。現在までに死産個体も含め E542K 変異は確認できていないため E542K 変異マウスが胎生致死であるかどうかは不明であり、CRISPR による遺伝子改変操作が致死的な影響を与えている可能性も考えられる。しかし、生存産仔 1 匹得られたことから目的の変異を持ち且つ生存し得る個体が得られる可能性があり、現在も遺伝子導入溶液の濃度や gRNA のターゲット部を変更し、oligo DNA の長さを調整しながらノックインマウスを作製中である。

(3) 放射線感受性因子の解明と E6/E7 標的治療の開発

HPV 関連中咽頭癌培養細胞株 (UM-SCC-047 および UM-SCC-104) における E6/E7 の発現を CRISPR/Cas9 でノックアウトし、E6/E7 タンパクを市販され入手可能な全ての抗体を用い Western blotting で評価したところ、タンパクの発現が確認できなかった。このことから、HPV 関連中咽頭癌培養細胞株が E6/E7 タンパクを発現していない可能性、抗体が不良の可能性が考えられた。

そこで、E6/E7 遺伝子に PA tag を付けた発現ベクターを 293FT 細胞株に導入し E6/E7 を強制発現させた。Western blotting を行ったところ、抗 PA tag 抗体は E6/E7 を認識した。一方、抗 E6 抗体は E6 を認識しなかった。抗 E7 抗体は一部のものが E7 を認識した。免疫蛍光染色を行ったところ同様の結果であった。

以上のことから、有効な抗 E6 抗体が存在しないこと、HPV 関連中咽頭癌培養細胞株は E7 を発現しないことが明らかとなった。子宮頸癌の代表的な培養細胞株である Caski についても併せて検討したところ同様の結果であった。こうした結果はこれまで in vitro 実験系で汎用されてきた HPV 関連細胞株が実際には E7 を発現していない、また E6 については評価不能であることを示している驚愕の結果であり、過去の論文内容の解釈に警鐘を鳴らすものである。また同時に、HPV 関連中咽頭癌培養細胞株を用いて E6/E7 標的治療について検討することは困難であることを示すものであり、その検討は断念したが、今回の結果は今後の HPV 関連細胞株を用いた in vitro 実験において極めて有用な情報である。

(4) Liquid biopsy の有用性の評価

HPV16 ctDNA コピー数をデジタル PCR で絶対定量する条件を最適化した。HPV16 DNA 陽性中咽頭癌では HPV16 ctDNA を検出したが (26 例中、T1N0M0 の 1 例を除く 25 例で検出) 他の高リスク型 HPV DNA 陽性中咽頭癌、HPV DNA 陰性中咽頭癌では HPV16 ctDNA は全く検出しなかった。これらのことから、HPV16 ctDNA の極めて高い感度と特異度が証明された。

p16 陽性/HPV16 DNA 陽性中咽頭癌におけるベースラインの HPV16 ctDNA について検討したところ、原発巣のみ (TanyN0M0)、頸部リンパ節転移あり (TanyN+M0)、遠隔転移あり (TanyNanyM1) の順に有意にコピー数が増加していた ($P=0.07$) (図 1)。また、ベースラインの FDG-PET/CT データから計測する糖代謝活性の高い腫瘍体積 (metabolic tumor volume, MTV) とベースラインの HPV16 ctDNA コピー数の相関について解析したところ、両者は有意な正の相関を示した ($P=0.004$, $R^2=0.39$) (図 2)。これらのことから、HPV ctDNA コピー数は HPV 関連中咽頭癌の病勢と相関することが示された。

根治的放射線療法を行った p16 陽性/HPV16 DNA 陽性中咽頭癌について、治療終了後 3 ヶ月時点での FDG-PET/CT 所見および HPV16 ctDNA コピー数と遺残・再発の相関について検討した。FDG の集積を認めない 15 例中 13 例で HPV16 ctDNA は 0 コピーであったが、2 例で HPV16 ctDNA を認めた。前者の 13 例では再発を認めなかったが、後者の 2 例では後に再発を来した。一方、5 例に FDG の集積を認め、その 2 例で HPV16 ctDNA は 0 コピーであったが、3 例で HPV16 ctDNA を認めた。前者の 2 例では遺残ならびに再発を認めなかったが、後者の 3 例では遺残を認めた。こうしたことから、HPV ctDNA は治療効果を判定する上で FDG-PET/CT よりも極めて優れていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

但し、現在 3 件の論文 (咽頭 HPV 感染、抗 HPV E6/E7 抗体、liquid biopsy) を準備中。

[学会発表] (計 3 件)

Tanaka H, Inohara H. Plasma HPV cell-free DNA and HPV-related HNSCC. European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia, 2018.

猪原秀典. 咽頭におけるヒトパピローマウイルス感染の検出 含嗽による細胞回収と咽頭洗浄による細胞回収の比較. 第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2017.

Inohara H. Novel approach to detect oral HPV infection. COLLEGIUM Oto-Rhinolaryngologicum Amicitiae Sacrum, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 森下 竜一

ローマ字氏名: Morishita Ryuichi

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 医学系研究科

職名: 寄附講座教授

研究者番号 (8 桁): 40291439

研究分担者氏名: 藤堂 剛

ローマ字氏名: Todo Takeshi

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター

職名: 招へい教授

研究者番号 (8 桁): 90163948

研究分担者氏名: 大野 ゆう子

ローマ字氏名: Ohno Yuko

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 医学系研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60183026

研究分担者氏名: 真下 知士

ローマ字氏名: Mashimo Tomoji

所属研究機関名: 大阪大学

部局名：医学系研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：80397554

(2)研究協力者

研究協力者氏名：曹 弘規
ローマ字氏名：Cho Hironori

研究協力者氏名：岸川 敏博
ローマ字氏名：Kishikawa Toshihiro

研究協力者氏名：山本 雅司
ローマ字氏名：Yamamoto Masashi

研究協力者氏名：常田 裕子
ローマ字氏名：Tokita Yuko

図 1.

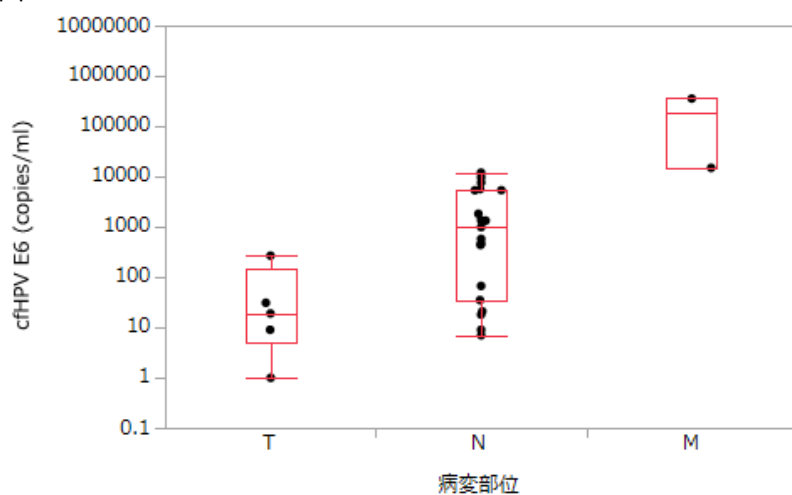
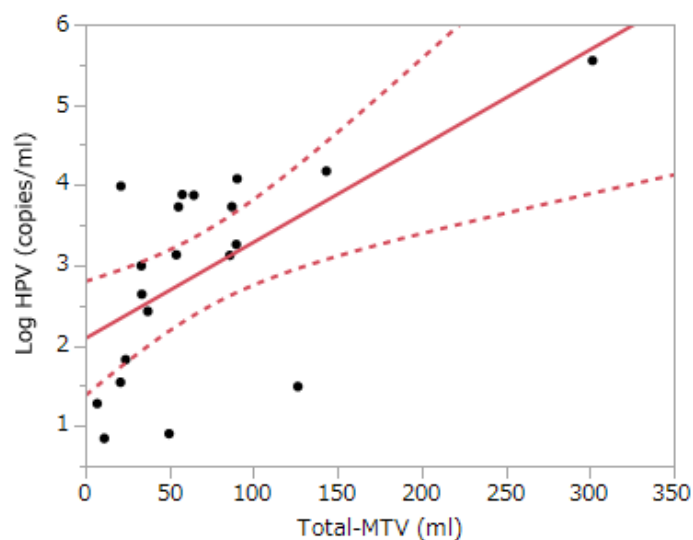


図 2.



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。