

令和元年5月16日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20252

研究課題名(和文) 中咽頭癌における種々のウイルス検出とウイルス共感染が及ぼす臨床的意義

研究課題名(英文) Coinfection of tumor viruses in oropharyngeal cancer and its clinical relevance

研究代表者

吉田 真夏 (Yoshida, Manatsu)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60748812

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)：本研究では、中咽頭癌においてヒトパピローマウイルス(HPV)と他の腫瘍ウイルス、Epstein-Barrウイルス(EBV)あるいはメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)と共感染する症例の頻度を解析した。HPV16とEBVの共感染例は28%で認められたが、HPV16とMCPyVが同時に感染している症例はなかった。以上、EBVとHPV16の共感染が約3割の中咽頭癌症例で認められたが、このような症例がHPV単独感染例と比べて、予後に差異があるかについては現時点までの観察期間では明らかではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に、HPV陽性中咽頭癌患者は陰性患者に比べて、予後が良好で生存率が高いという特徴がある。しかしながら、HPV陽性中咽頭癌の中にも予後不良例は存在し、その全容は解明されていない。本研究では本邦における中咽頭癌症例において、HPVが他の腫瘍ウイルスと共感染する割合を調べた。これは腫瘍ウイルスの共感染が予後や治療抵抗性などの臨床的特徴に影響を与えている可能性を考えて行なわれた研究である。これまでの観察期間ではHPVとEBVの共感染が予後に関係することを示す明らかな結果は得られなかったが、引き続き長期的な観察が必要である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the coinfection of human papillomavirus (HPV) and other tumor viruses such as Epstein-Barr virus (EBV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in oropharyngeal cancer and to clarify its clinical relevance. HPV DNA was detected in 22 of 39 (56.4%) of patients with oropharyngeal cancer using quantitative real-time polymerase chain reaction. The prevalence of coinfection of HPV and EBV was 28.2% (11/39) and no cases infected with both EBV and MCPyV were found. There was no significant difference in prognosis between the group of patients carrying HPV only and the group with coinfection of HPV/EBV during this observation period. This study indicates that there is a need for further studies investigating the clinical significance of coinfection of tumor viruses in oropharyngeal cancer over a longer span of observation.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：中咽頭癌 ウイルス

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

1. 研究開始当初の背景

癌の中でも、微生物感染という明確な外因を基盤とする癌は癌全体の 20~25%も占める。その中で、約 15%は腫瘍ウイルスによって惹き起こされる。中咽頭扁平上皮癌の罹患率はここ数十年で大幅に上昇しており、この要因としてヒトパピローマウイルス(HPV)感染中咽頭癌の増加があげられる。このように、中咽頭癌の原因には大きく 2 つに分けられる。1 つはタバコや飲酒が関係する「HPV 陰性癌」で、もう 1 つは性行動によって感染し得る特定の型の HPV に起因する「HPV 陽性癌」である。HPV 陽性中咽頭癌患者は陰性患者に比べて、予後が良好で、生存率が高いという特徴がある。しかしながら、HPV 陽性中咽頭癌の中には少数ながら予後不良例が存在することがわかっているが、それを規定する因子の同定は十分になされておらず、HPV 陽性中咽頭癌病態の全容は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HPV と他の腫瘍ウイルスと共感染する中咽頭癌症例の頻度を解析し、HPV 陽性中咽頭癌の発生・進展の過程で他の腫瘍ウイルスとの共感染が協働因子(co-factor)として働く可能性を考え、それが HPV 陽性中咽頭癌の中での予後不良症例と関係するか否かを調べることである。ここで調べた腫瘍ウイルスは、Epstein-Barr ウイルス(EBV)とメルケル細胞ポリオマウイルス(Merkel cell polyomavirus: MCPyV)である。

EBV は上咽頭癌に関与する腫瘍ウイルスである。EBV 由来癌蛋白である LMP1 が発現され、腫瘍化に働く様々な細胞側遺伝子を活性化し、細胞の悪性形質獲得に関与する。本研究では中咽頭癌における HPV と EBV の共感染の検出率を調べた。

MCPyV は当初、皮膚癌の一種であるメルケル細胞癌より検出された新規腫瘍ウイルスである。ポリオマウイルス科では初の腫瘍ウイルスであるため、現在世界的に注目を集めている。子宮頸癌で HPV と MCPyV の共感染が少なからず認められるとの報告もあり、本研究では中咽頭癌における HPV と MCPyV の共感染の蔓延性についても調べた。

3. 研究の方法

(1) PCR 法によるウイルス検出

新鮮組織またはパラフィン包埋切片から、それぞれフェノール・クロロホルム法、Wax Free DNA Extraction kit (TrimGen) を用いて DNA を抽出した。

抽出した DNA 200 ng を用いて、PCR 法によって HPV、EBV、MCPyV を検出した。AmpliQ Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、サイクル数は 50 サイクルとした。

HPV 検出プライマーには、HPV L1 遺伝子領域を標的とする MY9/MY11 プライマーセットおよび GP5+/GP6+ プライマーセットを使用した。EBV 検出プライマーには、EBV BamW 領域を標的とする TC60/TC61 プライマーセットを用いた。MCPyV 検出プライマーには、MCPyV LT 遺伝子領域を標的とする LT1、LT3 の 2 種類のプライマーセットに加え、MCPyV VP1 遺伝子領域を標的とする VP1 プライマーセットを使用した。使用したプライマーの塩基配列を次表に示す。内部コントロールには β -グロビン遺伝子を用いた。

Target			Sequence (5'→3')
MCPyV	LT	1-F	TACAAGCACTCCACCAAAGC
		1-R	TCCAATTACAGCTGGCCTCT
		3-F	TTGTCTCGCCAGCATTGTAG
	VP1	3-R	ATATAGGGGCCTCGTCAACC
		F	TTTGCCAGCTTACAGTGTGG
		R	TGGATCTAGGCCCTGATTTTT
HPV	L1	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
		GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATT
	L1	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC
		MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
EBV	BamW	TC60	CCAGAGGTAAGTGGACTT
		TC61	GACCGGTGCCTTCTTAGG
β -globin		F	ACACAACCTGTGTTCAGTAGC
		R	CAACTTCATCCACGTTCCACC

HPV 検出用 (MY09/MY11, GP5+/GP6+) PCR プロトコール:

95°C 10 min, 50 cycles (95°C 15 s, 45°C 30s, 72°C 30s), 72°C 5min, 4°C ∞

その他ウイルス検出用 (MCPyV と EBV) と内部コントロール遺伝子 (β -globin) PCR プロトコール:

95°C 10 min, 50 cycles (95°C 15 s, 59°C 30s, 72°C 25s), 72°C 5min, 4°C ∞

(2) シークエンス法

上記 PCR 陽性例については、PCR 産物のダイレクトシークエンスによって配列を決定後、BLAST 検索によって各々のウイルスの確認と同定を行った。

PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics) で精製し、シークエンス反応は ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて行なった。シークエンサーとして 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) を使用した。

シークエンス PCR プロトコール:

96°C 1 min, 40 cycles (96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 2 min), 4°C ∞

(3) ウイルス定量

抽出した DNA 200ng を用いて、各ウイルス量を TaqMan gene expression master mix を用いて定量リアルタイム PCR 法で算出した。使用したプライマーの塩基配列を次表に示す。機器として Applied Biosystems™ StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムを使用した。標的ウイルス遺伝子は、HPV16 では E6 遺伝子、HPV18 では L1 遺伝子、EBV では LMP1 遺伝子、MCPyV では ST 遺伝子とした。Ct 値が 41 未満を示した場合、ウイルス陽性と判断した。内部コントロールには RNase P 遺伝子を用いた。

Target		Sequence (5'→3')	
MCPyV	ST	F	GCAAAAAAACTGTCTGACGTGG
		R	CCACCAGTCAAACTTTCCCA
		probe	FAM-TATCAGTGCTTTATTCTTTGGTTTGGATTTC-TAMRA
EBV	LMP1	F	GTTGATCTCCTTTGGCTCCTC
		R	GTGTCTGCCCTCGTTGG
		probe	FAM-TTGTTGAGGGTGCGGGAGGGAGTCATCGTGG-TAMRA
HPV16	E6	F	AGGACCCACAGGAGCGAC
		R	AGTCATATACCTCACGTCGCAGT
		probe	FAM-ATGCACAGAGCTGCAAACAA-TAMRA
HPV18	L1	F	GGTTCAGGCTGGATTGCG
		R	TACACGCACACGCTTGGC
		probe	FAM-TCGCAAACGTTCTGCTCC-TAMRA
RNase P		F	AGATTTGGACCTGCGAGCG
		R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
		probe	FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-TAMRA

定量的リアルタイム PCR プロトコール:

50°C 2 min, 95°C 10 min, 50 cycles (95°C 15 s, 60°C 1 min)

4. 研究成果

(1) 先ず初年度に、高知大学医学部附属病院で中咽頭癌と診断された症例における HPV 感染の検出率を調べた。サンプルは余剰生検材料を使用し、DNA を抽出後 PCR に供した。調べた中咽頭癌 24 例中 20 例 (83.3%) で HPV が検出された。HPV 感染量は、最大値 1417 copies/cell、最小値 0.0004 copies/cell、平均値 114 copies/cell、中央値 13.3 copies/cell であった。HPV 陰性中咽頭癌 4 例の全症例で喫煙歴 (現在もタバコを吸っている、あるいは過去に吸ったことがある) を有していたが、HPV 陽性例では 20 例中 13 例 (65.0%) で喫煙歴があった。アルコールを少しでも嗜む、あるいは全くのまないに分けた場合、HPV 陽性例の 60.0%、陰性例では全症例で飲酒歴があった。すなわち我々のデータからも HPV 陰性例は陽性例に比べて喫煙歴・飲酒歴ともに高い傾向にあることが確認された。

(2) 次に、HPV 感染の代用マーカーとして使われている p16 発現と PCR での HPV DNA 検出との相関について検討した。p16 発現は組織切片上での免疫組織染色法で検出した。調べた中咽頭癌 19 例で p16 の染色が施された。この中で PCR にて HPV 陽性と判断された 14 例の全症例で、p16 が染まっていた。HPV 陰性症例 5 例では p16 の陽性染色は 1 例のみであった。

(3) 平成 30 年度末までに中咽頭癌と診断された症例を加えて総計 39 症例について、EBV と MCPyV の検出率および HPV との共感染率を調べた。HPV は 39 例中 22 例 (56.4%) で検出さ

れた。その遺伝子型の内訳は HPV16 型が 21 例で、HPV18 型が 1 例であり、HPV 陽性中咽頭癌のほとんどは HPV16 型であった。EBV の検出率は 33.3% (13 例/39 例)、MCPyV の検出率は 7.7% (3 例/39 例)であった。2 種類の腫瘍ウイルスの共感染率については、HPV16 陽性かつ EBV 陽性例は 28.2% (11 例/39 例)、HPV16 陽性かつ MCPyV 陽性例は 0% (0 例/39 例)、EBV 陽性かつ MCPyV 陽性例は 0% (0 例/39 例)であった。HPV16、EBV、MCPyV の 3 種類の腫瘍ウイルスが同時に感染している症例はなかった。以上、HPV16 陽性中咽頭癌の約 3 割に EBV の共感染が認められたが、新規腫瘍ウイルスである MCPyV と HPV16 陽性中咽頭癌との関連性は低いと考えられた。

(4) EBV と HPV16 の共感染が約 28%の中咽頭癌症例で認められたが、このような症例が HPV 単独感染例と比べて、予後や治療反応性などの臨床的特徴に差異があるかについては現時点までの観察期間では明らかではなかった。しかし、最終的な結論を得るには長期的観察が必要である。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 13 件)

青井 二郎、山川 泰幸、吉田 真夏、兵頭 政光、初診時遠隔転移例における中下咽頭癌に対する局所根治治療の検討、第 29 回頭頸外科学会総会ならびに学術講演会、2019 年

山川 泰幸、吉田 真夏、青井 二郎、松本 宗一、弘瀬 かほり、兵頭 政光、当院における下咽頭癌と食道癌の重複症例の検討、第 29 回頭頸外科学会総会ならびに学術講演会、2019 年

吉田 真夏、山川 泰幸、青井 二郎、兵頭 政光、当科における喉頭癌 T3 症例の臨床的検討、第 29 回頭頸外科学会総会ならびに学術講演会、2019 年

吉田 真夏、青井 二郎、兵頭 政光、当科における下咽頭癌女性症例の臨床的検討、第 42 回日本頭頸部癌学会、2018 年

吉田 真夏、池永 弘之、兵頭 政光、当科における下咽頭癌症例の臨床的検討、第 41 回日本頭頸部癌学会、2018 年

吉田 真夏、伊藤 広明、小林 泰輔、兵頭 政光、当科における鼻副鼻腔悪性黒色腫症例の臨床的検討、第 28 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会、2018 年

吉田 真夏、小林 泰輔、兵頭 政光、当科における口腔癌を含む多重癌の臨床的検討、平成 29 年度日本耳鼻咽喉科学会高知県地方部会秋季学術集会、2017 年

吉田 真夏、兵頭 政光、当科における口腔癌を含む多重癌の臨床的検討、第 30 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会、2017 年

吉田 真夏、小林 泰輔、兵頭 政光、当科における頭頸部を含む多重癌症例の臨床的検討、日本耳鼻咽喉科学会第 42 回四国四県地方部会連合学会、2016 年

吉田 真夏、兵頭 政光、硝酸イソソルビドと芍薬甘草湯が奏功した食道機能異常による嚥下障害例、第 29 回日本口腔・咽頭科学会、2016 年

吉田 真夏、長尾 明日香、兵頭 政光、喉頭に発生した神経鞘腫の 1 例、第 78 回耳鼻咽喉科臨床科学、2016 年

芝 佑平、奥谷 文乃、伊藤 広明、吉田 真夏、谷口 佳代、泉谷 知明、前田 長正、兵頭 政光、嗅覚外来受診をきっかけに発見されたカルマン症候群の一例、日本耳鼻咽喉科学会第 42 回中国四国連合学会、2016 年

吉田 真夏、松本 宗一、兵頭 政光、当科における 80 歳以上の高齢者頭頸部癌診療の臨床的検討、第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_otrh/

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：大畑 雅典

ローマ字氏名：(DAIBATA, masanori)

研究協力者氏名：兵頭 政光

ローマ字氏名：(HYODO, masamitsu)

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。