

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11394

研究課題名(和文) HPV関連中咽頭癌の高転移性をHPV E5シグナル伝達から解明する

研究課題名(英文) Role of HPV E5 signal transduction for metastatic potential of HPV-associated oropharyngeal cancer

研究代表者

室野 重之(Murono, Shigeyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20345622

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)：気道上皮細胞BEAS2BへのEBウイルス LMP1の形質導入ではケラチン5とE-カドヘリンの発現低下およびN-カドヘリンとsnailの発現上昇が見られ、上皮間葉移行を確認できた。一方、作成したHPV E5発現プラスミドによる形質導入は適切に施行できず、E5による上皮間葉以降の確認には至らなかった。臨床検体を用いた検討では、HPV感染の指標となるp16陽性中咽頭癌は陰性中咽頭癌よりも全生存率が有意に良好であった。p16陽性中咽頭癌において、節外浸潤を示唆するmatted nodesのある方がない方よりも有意に予後は不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌は非関連中咽頭癌よりも予後が良いことが知れ渡ってきた。一方、HPV関連中咽頭癌の中にも予後の不良な群が存在する。本研究では、matted nodesという節外浸潤を示唆するリンパ節、すなわち癌細胞の浸潤能、がHPV陽性中咽頭癌であっても予後不良の因子となることを見出した。HPV関連中咽頭癌は予後が良好なゆえ、治療強度の減弱化が世界的な関心となっているが、それが不適切な群が存在し、適切にそれを見出すことができることを示唆した本研究の意義は大きい。さらに、浸潤能をHPVのウイルス蛋白の視点から解明する試みはまだ研究途上であり、今後の本研究の発展が待たれるところである。

研究成果の概要(英文)：Introduction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 into airway epithelial BEAS2B cells caused down-regulation of keratin 5 and E-cadherin and up-regulation of N-cadherin and snail, suggesting induction of epithelial-mesenchymal transition. Unfortunately, introduction of HPV E5 into BEAS2B cells could not be performed properly. Therefore, whether E5 induces EMT or not could not be confirmed.

In the experiment using clinical samples and data, p16-positive, which was almost equal to HPV-positive, oropharyngeal cancer (OPC) showed significantly better overall survival than p16-negative OPC. Among p16-positive OPCs, cases with matted nodes showed significantly poorer overall survival than those without matted nodes. Matted nodes are supposed to indicate extranodal invasion, suggesting some metastatic potentials in HPV-positive OPC may contribute to poorer prognosis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：中咽頭癌 HPV E5 上皮間葉移行 リンパ節転移 matted nodes

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の原因はヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, HPV) であることは周知であるが、中咽頭癌の一部にも HPV が関与していることが判明した。米国では中咽頭癌における HPV 関連癌の割合は、1980 年代の 16% から 2000 年代初頭には 72% まで著増しており、中咽頭癌患者数は 2010 年の 1 万人弱から 2030 年には 1 万 6 千人へと著増し、子宮頸癌の患者、を上回るとの報告もある。日本においては 2008 年～2010 年に行われた調査により約 50% であることが判明しているが、米国の傾向を考慮すると、今後さらに上昇していくことが予想される。

このように疫学的にも注目される HPV 関連中咽頭癌であるが、喫煙・飲酒がリスク因子となる古典的な中咽頭癌とは異なった特徴を有していることから注目されている。最も特徴的なこととして、HPV 関連中咽頭癌は予後が良好であることが挙げられる。Ang の報告では、HPV 陽性の中咽頭癌の 3 年全生存率は 82%、3 年無増悪生存率は 74% である一方、HPV 陰性の中咽頭癌ではそれぞれ 57%、43% である (Ang KK, et al. N Engl J Med 2010)。これは、HPV 感染の代替マーカーとなる p16 免疫染色で層別した時も同様で、p16 陽性の中咽頭癌の 3 年全生存率は 84%、3 年無増悪生存率は 74% である一方、p16 陰性の中咽頭癌ではそれぞれ 51%、38% である (Ang KK, et al. N Engl J Med 2010)。

さらに、HPV 関連中咽頭癌は非関連中咽頭癌に比べて、若年者に多い、亜部位として扁桃や舌根が多い、N ステージが進行することが多い、性活動がリスク因子となる、重複癌少ないという臨床的な特徴もある (猪原, 日耳鼻 2013)。また、病理学的には、表層ではなく陰窩上皮に由来する、分化度が低い、リンパ球浸潤が多い、p53 遺伝子は野生型である、などの特徴も有している (猪原, 日耳鼻 2013)。この病理学的な特徴は臨床的な特徴にも反映されており、古典的な HPV 非関連中咽頭癌は口蓋扁桃の咽頭腔側から発生するため症状が出やすく見出しやすいが、HPV 関連中咽頭癌は扁桃の陰窩深くから発生するため症状が乏しいうえに早期の発見が困難である。また、陰窩深くに生じて見出しにくい早期の癌であっても、早期から高率に頸部リンパ節転移をきたす。これは、原発不明の頸部転移性癌の中に、後に中咽頭癌と判明する例が少なくないことにも裏付けられる。

2. 研究の目的

HPV 関連中咽頭癌は非関連中咽頭癌より予後が良いことから、世界的な関心は HPV 関連中咽頭癌の治療強度の減弱の適否に集中している。しかし、予後が良いにもかかわらず、N ステージ、すなわち頸部リンパ節転移が進行している、という一見矛盾した特徴を有している。そのため、予後が良くても頸部リンパ節転移が進行していれば、手術、化学放射線療法のいずれを主にしても治療は広範囲にわたり、その侵襲は決して軽くはない。それゆえ、HPV 関連中咽頭癌がなぜ高率に頸部リンパ節に転移しやすいのかを解明することは、低侵襲な治療を探索する礎となるものと考えられる。

先に述べた HPV 関連中咽頭癌と非関連中咽頭癌の違いの一つに、癌の分化度がある。HPV 関連中咽頭癌は角化傾向が乏しく卵円形・紡錘形の細胞形状、不明瞭な細胞境界などの組織学的な特徴を有している。このことから、HPV 関連中咽頭癌が頸部リンパ節に転移しやすいのは、HPV 感染による癌細胞のこのような組織学的な変化に由来するのではないかと推測された。

HPV 感染で発現するウイルス蛋白は E1, E2, E4, E5, E6, E7, およびカプシドを構成する L1, L2 に限られている。中でも、E6 は p53 蛋白を分解することにより、E7 は Rb 蛋白を分解することにより、発癌に寄与するとされ、多くの研究者により精力的に研究されてきた。一方、E5 蛋白は EGFR などのシグナル伝達路に関わることが報告されているが、明確な機能は明らかにされていない。

報告者はこれまで、Epstein-Barr ウイルス (EBV) が関連する上咽頭癌の高転移性に関する研究に従事し、EBV の癌蛋白である latent membrane protein 1 (LMP1) により様々な因子が転移を促進する方向に働くことを見出してきた。これらの多くは LMP1 のシグナル伝達路によるものであり、HPV 関連中咽頭癌においても、E5 蛋白によるシグナル伝達路が、先に述べた組織学的特徴とも関連し、頸部転移を促進するのではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) HPV E5 発現ベクターの作成

pcDNA3 プラスミドをベースに E5 発現プラスミドを作成する。

(2) BEAS2B 細胞への形質導入と上皮間葉移行

中咽頭の正常培養上皮細胞の入手は困難であり、同じく気道系の気管上皮細胞である BEAS2B 細胞を使用する。E5 発現プラスミドを形質導入し、形態観察に加え、上皮間葉移行の指標とな

る E-カドヘリン, ビメンチン, N-カドヘリン, フィブロネクチンの発現をリアルタイム RT-PCR により mRNA レベルで, ウェスタンブロットにより蛋白レベルで評価する。

(3) HPV16 陽性上皮細胞である Caski 細胞における細胞遊走能

E5 蛋白を発現していると考えられる HPV16 陽性の培養上皮細胞(子宮頸癌由来)である Caski 細胞を用いて, 細胞遊走能を検討する。E5 発現は RT-PCR により確認し, 細胞増殖は MTS アッセイにより評価する。細胞遊走能はスクラッチアッセイによる細胞移動面積の比で評価する。E5 が関連するか否かは, siRNA によるノックダウンで評価する。

(4) 中咽頭癌の臨床検体における p16 発現と予後の解析

HPV 関連中咽頭癌と非関連中咽頭癌の予後を比較する。p16 免疫染色を層別化因子とする。さらに, HPV 陽性 (p16 陽性) であっても予後の悪い例があり, 関連する臨床的な因子を見出す。喫煙と matted nodes を層別化因子の候補とする。特に matted nodes は節外浸潤を示唆することから, 浸潤・転移能と関連するものである。

(5) 中咽頭癌の臨床検体における G-CSF の発現と HPV の関連

HPV 陽性であるが急速に転移をきたした G-CSF 産生と考えられる中咽頭癌の 1 例を経験し, G-CSF が転移能に関与する可能性と, それが HPV により誘導される可能性を考えた。G-CSF に対する免疫染色を行い, 強発現, 中等度発現, 弱発現, 発現なし, に分類して発現を評価し, HPV (p16 免疫染色) との関連や, 臨床背景因子 (特に血液検査での白血球数) との関連を調べる。

4 . 研究成果

(1) HPV E5 発現ベクターの作成

本学細胞統合生理学講座の挟間博士 (教授), 吉江博士 (助教) にご助力を賜り, 赤色蛍光タンパク質 (RFP) を共発現する E5 発現プラスミドを作成した。

(2) BEAS2B 細胞への形質導入と上皮間葉移行

まず, BEAS2B 細胞が上皮間葉移行のポテンシャルを有しているかどうかを LMP1 の形質導入により評価した。BEAS2B 細胞への LMP1 の形質導入により, 紡錘状形態への変化が観察された。また, リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現の検討では, LMP1 発現 BEAS2B 細胞はコントロール BEAS2B 細胞に比べ, ケラチン 5 は 0.3 倍, E-カドヘリンは 0.6 倍, N-カドヘリンは 1.8 倍, Snail は 4.2 倍であり, 上皮間葉移行が誘導されているものと考えられた。

一方, E5 発現プラスミドの形質導入は試行するものの適切に遂行しえず, 本項の上皮間葉移行の確認には至らずであった。今後, 形質導入の条件を吟味して, 続けて検討していきたい。

(3) HPV16 陽性上皮細胞である Caski 細胞における細胞遊走能

Caski 細胞の E5 mRNA 発現は検討できなかった。また, siRNA 等による E5 ノックダウンによる細胞増殖能や細胞遊走能の評価も検討できなかった。これらについては, 今後さらに検討を進める予定である。ウイルス蛋白の発現調整に関与している可能性のあるヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を有するバルプロ酸による処理を行った。0.1mM, 0.5mM, 1mM, 2mM いずれのバルプロ酸濃度においても Caski 細胞の増殖曲線に変化はなかった。一方, 遊走能の評価としてのスクラッチアッセイでは, 0.0mM (対照) に比べ, 0.5mM では 1.3 倍, 2.0mM では 1.4 倍の遊走能を示した。これは想定した結果とは逆の結果であり, その意義については今後さらに検討を進める予定である。

(4) 中咽頭癌の臨床検体における p16 発現と予後の解析

福島県立医科大学で治療を行った中咽頭癌 97 例について, 免疫染色での p16 を層別化因子として 5 年全生存率について解析したところ, p16 陽性の 37 例では 88% であったのに対し, p16 陰性の 60 例では 52% であり, 有意差を認めた ($p < 0.05$)。さらに, 喫煙の有無も層別化因子に加えると, p16 陽性・喫煙なしの 13 例では 100%, p16 陽性・喫煙ありの 21 例では 79%, p16 陰性・喫煙ありの 53 例では 53% であり, 有意差を認めた ($p < 0.05$)。なお, p16 陰性・喫煙なしの症例はなく, 10 例は喫煙に関するデータがなく除外した。

一方, p16 陽性中咽頭癌において喫煙以外に予後に影響する因子を探索したところ, matted nodes を見出した。Matted nodes は, 間に脂肪組織のない 3 個の隣接するリンパ節のことをいい, 高度の節外浸潤を示唆するものである。先に述べた p16 陽性の中咽頭癌 37 例はいずれも頸部リンパ節転移を認めており, 5 年全生存率は matted nodes のない 29 例では 96% であるのに対し, matted nodes のある 8 例では 46% であり, 有意差を認めた ($p < 0.01$)。

(5) 中咽頭癌の臨床検体における G-CSF の発現と HPV との関連

88 例において G-CSF 免疫染色を行い, 強発現をスコア 3, 中等度発現をスコア 2, 弱発現をスコア 1, 発現なしをスコア 0 として評価した。暫定での評価になるが, p16 陽性では平均スコア 0.45 (± 0.77), p16 陰性では平均スコア 0.68 (± 1.00) であり, p16 の発現による G-CSF の発

現に差は見られなかった ($p=0.35$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室野重之
2. 発表標題 ウイルスからみた耳鼻咽喉科の腫瘍
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会福井県地方部会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室野重之
2. 発表標題 性感感染症と咽頭癌：新たなリスク因子としてのHPV
3. 学会等名 第478回福島医学会学術研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林徹郎，鈴木政博，仲江川雄太，川瀬友貴，室野重之
2. 発表標題 当科における中咽頭癌の治療成績の検討
3. 学会等名 第29回日本頭頸部外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室野重之
2. 発表標題 増えている中咽頭癌
3. 学会等名 第34回日本性感感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------