

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16947

研究課題名(和文) HPV関連中咽頭癌における新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapy for HPV-related oropharyngeal cancer

研究代表者

藤巻 充寿 (FUJIMAKI, MITSUHISA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10514490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中咽頭癌(OPC)にヒトパピローマウイルス(HPV)の関与が見られることが発見され、OPCの予後マーカーとして有力な研究対象となった。本研究では(1) OPCのSurrogate markerであるp16発現との一致を以て、特異的な組織像の予後因子としての有用性が示された。(2) OPCにおける細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮分化に関連する解析を行い、EGFRの特異的な発現態度の存在を確認した。EGFR発現の予後因子としての可能性が示された。EGFRのメチル化はEGFR蛋白発現調整との関与が認められ、非分化癌においてもPromoter領域のメチル化が寄与する傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の欧米化に伴い、本邦でも中咽頭癌の増加は社会問題となりうる。既知の報告とは異なり、中咽頭癌に対して遺伝子的な裏付けに基づいた病理組織学的検討に加え、より臨床的な検討も行うことで、がん治療の進歩に寄与し得る研究である。

研究成果の概要(英文)：The involvement of human papillomavirus (HPV) in oropharyngeal cancer (OPC) was discovered, and it became a promising research target as a prognostic marker for OPC. In this study, (1) Consistent with the expression of p16, a surrogate marker of OPC, was shown to be useful as a prognostic factor for specific histology. (2) The analysis related to the cell cycle/tumor suppressor gene/epithelial differentiation in OPC was performed to confirm the existence of a specific EGFR expression attitude. The possibility of EGFR expression as a prognostic factor was shown. Methylation of EGFR was associated with regulation of EGFR protein expression, and the methylation of the Promoter region tended to contribute to non-differentiated cancer.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：中咽頭癌 ヒトパピローマウイルス p16蛋白 EGFR 次世代シーケンス メチル化

※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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

学術的背景: 中咽頭癌 (Oropharyngeal carcinoma, 以下 OPC) は全世界的に増加傾向にある。近年、OPC の約 50% に高リスクヒトパピローマウイルス (HPV) がその発癌に関与していることが報告された。HPV の予後因子としての重要性が注目されている。

中咽頭癌は集学的治療が標準的治療となるが、その精密な診断は病理組織学的所見に委ねられ、悪性度に伴う adjuvant therapy の必要性、予後因子はその所見に左右される。 OPC の大半症例は特徴的な所見を有し、病理診断は容易とされてきた。しかし、組織学的亜型や高悪性度例などの疑診例、また頸部リンパ節転移で発見され、原発巣が確定し得ない、所謂「原発不明癌」の中には口蓋扁桃や舌根扁桃に発生した OPC が転移したものもあり、これら症例は特徴的な組織像を有さず、確定診断に到達し得ず、また原発巣の検索に苦慮することが多い。**また、OPC の予後因子、悪性度分類には未だ明確な指標は示されておらず、より特異的な手法の確立が急務である。**

本研究者は JS Lewis ら [Histopathology 2012] により報告された特異的組織所見を用いたパラフィン切片からの HPV 検出法を確立し、当院で OPC の HPV 関与「**確定**」「**疑診**」例に対し、特異的組織所見の有無の検討を行った。これまで**我がグループは当科で初期治療を行った OPC66 例に対し、特異的組織所見の抽出を行い、報告した (Fujimaki M, Fukumura Y, et al. Diag Pathol, 2013)。**

また、**原発不明癌症例についても特異的組織所見の抽出を行い、日常診療に取り入れている。**

2. 研究の目的

予備研究において我々は 2004 年から 2012 年までに当院にて生検もしくは手術が施行された 66 症例を対象に HPV の検索を行った。その結果、特異的組織所見陽性例は 31 例 (47%) に確認し得た。全例ホルマリン固定パラフィン包埋切片より H-E 染色にて特異的組織所見の抽出を行った。頭頸部癌の予後因子としてリンパ節転移の制御は最重要事項である。後ろ向き検討において陽性例 31 例中、28 例が N2b 症例であり、全例において初期治療で CR が得られたことが確認できた。

これまでの検討では特異的組織所見の抽出が診断医の主観的である点、また症例数が少ない点が今後改善すべき点と考えられた。それらを踏まえ、(1)「**疑診**」例も含め、OPC 症例に対し、上記の既知の特異的組織所見を確認、特異的組織所見陽性症例の病理組織像をさらに抽出し、客観的データを収集する。また、他施設間で対象症例の増加を図る(2)「**確定**」・「**疑診**」例の臨床データを解析する。過去の症例に対する、後ろ向き検討および、新規症例に対し前向き検討を平行して行う。(2)組織学的「**HPV 関連確定群**」の内、HPV in situ hybridization 陰性、HPV-PCR 陰性例に対し、5'RACE 法を用いて未知領域のクローニングを行い、新たな fusion partner を発見・確認する。(3)特異的組織所見陽性群、細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉系分化に関連する蛋白発現、RNA 解析を行い、今後の MEC 分子標的治療の根拠となるデータを集積するとともに融合遺伝子下流の制御機構データを集積する。本研究の特色:これまでに本邦で 1 施設、欧米において 2 施設で OPC の特異的組織所見抽出が行われてきたが、対象は「**確定**」例のみであった。本研究においては「**疑診**」例の検討を行うことにより病理診断精度を向上させるとともに予後因子としての指標を確立し、日常診療・治療法の選択に応用する。また、その他遺伝子変異等の網羅的解析、予後マーカー解析を行い、OPC の遺伝子異常とその制御機構を明らかにするとともに、分子標的治療開発の突破口となる。

3. 研究の方法

研究の対象は 2004 年から 2015 年までに当院で初期治療を行った中咽頭原発扁平上皮癌 110 例とした。中咽頭癌(OPC)、原発不明癌頸部リンパ節転移で、ヒトから手術的に採取された病理組織標本(パラフィンブロック)を用い、(1)特異的組織所見の客観的かつ詳細な評価、(2)頭頸部外科医による患者背景調査、(3) PCR および In situ hybridization による High risk HPV の評価(4)High risk HPV 陽性群と陰性群の病理組織像の比較検討、PCR 陰性例/ 特異的組織所見陽性例の 5'RACE 法による、新たな原因遺伝子の検索(5)細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉分化関連因子の免疫組織学的検討および定量的 RT-PCR を行う。

4. 研究成果

(1) 特異的組織型の分類(平成 29 年)

Cherock らの報告に準じて Conventional SCC を Keratinizing squamous cell carcinoma (KSCC)、Nonkeratinizing squamous cell carcinoma(NKSCC)、Hybrid squamous cell carcinoma (HSCC)の 3 群に分類した。結果、KSCC50 例、NKSCC36 例、HSCC24 例に分類された。

(2) 患者背景(平成 29 年)

対象となった 110 例の臨床背景は以下の通りであった。

年齢;60 歳以下 29 例・61 歳以上 81 例、性別;男性 81 例・女性 29 例、喫煙歴;≤10 pack-year37 例・10 pack-year< 73 例、飲酒歴;Never 34 例・Ever/Current 76 例、T 分類;T1-2 55 例・T3-4 55 例、N 分類;N0-2a 41 例・N2b-3 69 例、亜部位;側壁 74 例・前壁 25 例・後壁 8 例・上壁 3 例であった。

上記に加えて p 16 免疫組織化学染色(p16IHC);p16+ 57 例・p16- 53 例そして組織型 KSCC50 例、NKSCC36 例、HSCC24 例の各因子について Log-rank 検定を行った。そこで p16IHC と T 分類は単変量解析、多変量解析共に統計学的有意性を認めた。組織型分類は単変量解析のみ有意性が示された。

(3) PCR 法および In situ hybridization 法による HPV 遺伝子の確認(平成 29～30 年)

① パラフィン固定検体より DNA を抽出し、TaKaRa Bio HPV detection kit(TaKaRa Bio Inc)を使用し、HPV Type 16/18/33 E6 蛋白に対する DNA-PCR を行った。

Type16;55 例、Type18;0 例、HPV- ; 55 例という結果となった。

② パラフィン固定検体より HPV type16/18 に対する Probe (Gen point system, DAKO) を用いて In situ hybridization を施行した。HPV+; 54 例、HPV-; 56 例という結果となった。

p16IHC、P C R、In situ hybridization の 3 法では若干の乖離が生じた。p16IHC は中咽頭癌の Surrogate marker と位置付けられており、今後の検討は p16 の染色性で判定することと定めた。

(4) 細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉分化関連因子の免疫組織学的検討および定量的 RT-PCR(平成 30 年)

免疫組織化学での EGF、Cyclin D1、Cyclin D2、beta-catenin、p53、p16、E-cadherin の発現/予後/融合遺伝子型との比較検討を行った。結果、統計学的な有意性は示されないものの、EGFR の発現が比較的目立つ傾向となった。さらに免疫組織化学染色において EGFR はより低分化な組織型で染色性が低下する傾向を認めた。

(5) HPV 関連中咽頭癌における EGFR 蛋白発現についての検討(令和1年)

2019 年度は HPV 関連中咽頭癌における EGFR 発現について解析した。対象症例は手術検体に限定し 2004 年から 2019 年までに当院で手術を行った 52 例を対象とした。

① 組織型分類の再検討

対象 52 例の手術標本より組織型分類の再検討を行った。分類は KSCC/NKSCC/Poorly differentiated SCC/Basaloid SCC/Papillary SCC の 5 項目に分類した。結果 KSCC:17 例、NKSCC:10 例、Poorly differentiated SCC:16 例、Basaloid SCC:2 例、Papillary SCC:6 例となった。

② EGFR 蛋白に対する免疫組織化学染色

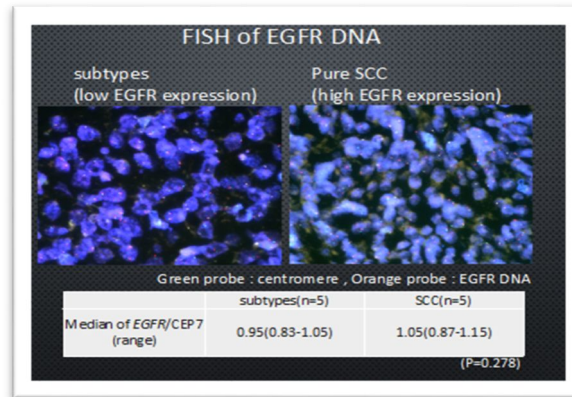
腫瘍部位を選択的に検討するため Micro dissection を行った。EGFR に対する免疫染色では細胞膜に 50%以上発現したものを高発現と定義した。分化癌は他の組織亜型と比較し有意に EGFR の発現が高いことが示された。

③ Real time PCR を用いた EGFR 発現解析

本検討でも腫瘍部位を選択的に検討するため Micro dissection を行った。同部位より Real time PCR を行った結果、IHC における低発現部位において有意に EGFR の発現低下を確認した。

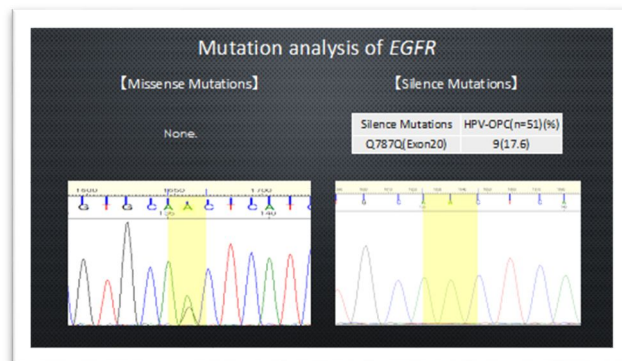
④ FISH を用いた EGFR 遺伝子の増幅

Micro dissection を行った標本から FISH を行った。EGFR 蛋白の発現態度に関わらず遺伝子増幅はみられなかった。



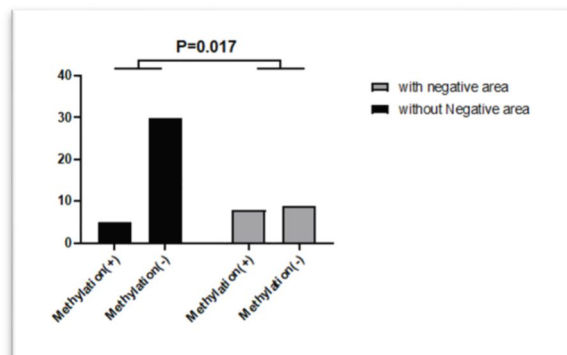
⑤ Sanger 法による EGFR mutation の確認

Sanger 法を用いて EGFR 遺伝子変異解析を行った。Missense Mutation は認めず、Silence Mutation のみが認められた。



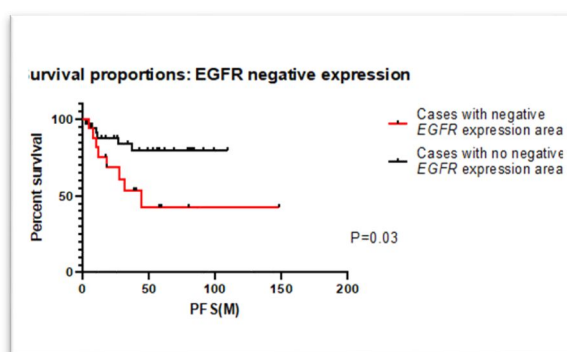
⑥ PCR による EGFR のメチル化解析

メチル化解析として Methylation specific PCR を行った。IHC にて低発現領域を多く含む症例においてメチル化が有意に高頻度に行き起きていることが示された。Promotor 領域のメチル化が優位に関与していることが示された。



⑦ 予後解析

EGFR 発現の低い領域を有する症例は有意に無増悪生存率 (Progression free survival ;PFS) が低下することが示された。



(6) 総括

これまでの検討において EGFR 蛋白発現に Epi-genetic 機構 (メチル化) との関与を認めた。EGFR 発現の予後因子としての可能性が示された。EGFR のメチル化は EGFR 蛋白発現調整との関与が認められ、非分化癌においても Promoter 領域のメチル化が寄与する傾向が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tajima S, Anzai T, Matsuoka R, Okada H, Ide T, Fujimaki M, Kaya S, Ito S, Ikeda K.	4. 巻 2018
2. 論文標題 Parapharyngeal Abscesses Caused by Group G Streptococcus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Rep Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/7307290.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤巻 充寿
2. 発表標題 下咽頭癌に対する経口切除の工夫：腹腔鏡手術Deviceの積極的な活用
3. 学会等名 第79回日本耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤巻 充寿
2. 発表標題 導入化学療法後に手術を施行した進行中咽頭癌に対する臨床病理学的検討
3. 学会等名 第41回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 池田 勝久
2. 発表標題 副咽頭間隙良性腫瘍に対する経口切除術の経験
3. 学会等名 第80回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 陽, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 藤巻 光寿, 池田 勝久
2. 発表標題 Nivolumabによる自己免疫疾患関連有害事象として水疱性類天疱瘡を発症した1例
3. 学会等名 第42回頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 池田 勝久
2. 発表標題 根治治療として手術を施行したp16陽性中咽頭癌の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第42回頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大峽 慎一, 藤巻 充寿, 小島 雅貴, 鈴木 陽, 横山 純吉, 池田 勝久
2. 発表標題 当科における耳下腺癌の検討 術前診断の重要性
3. 学会等名 第42回頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 充寿
2. 発表標題 副咽頭間隙腫瘍に対する経口切除の経験
3. 学会等名 第28回日本頭頸部外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 充寿
2. 発表標題 当科における下咽頭進行癌における導入化学療法の有効性の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤巻充寿, 大峽慎一, 小島雅貴, 池田勝久
2. 発表標題 当科における未分化癌に対するレンパチニブ使用経験
3. 学会等名 第81回日本耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳川瑛久, 大峽慎一, 小島雅貴, 藤巻充寿, 池田勝久
2. 発表標題 異時性に発生したHPV関連中咽頭重複癌の1例
3. 学会等名 第81回日本耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤巻 充寿
2. 発表標題 HPV関連扁桃癌とHPV関連舌根部癌の異時的発生を認めた2例
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----