

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09791

研究課題名(和文) HPV16 陽性口腔扁平上皮癌における遺伝子メチル化を介した悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Study on malignant transformation through DNA methylation in HPV16-positive oral squamous cell carcinoma

研究代表者

杉山 勝 (SUGIYAMA, Masaru)

広島大学・医系科学研究科(歯)・名誉教授

研究者番号：70187681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： HPV16 E6/E7陽性口腔扁平上皮癌細胞(UM-SCC-104)のスフィアコロニー形成はE6/E7 siRNA ノックダウンにより抑制され、幹細胞マーカー(Oct4, Nanog, ALDH1)のmRNA発現も有意に減少した。 HPV16陽性口腔癌では、陰性口腔癌と比較して、CD44遺伝子のメチル化陽性例が多かった。 HPV16 DNAの陽性者では特徴的な口腔内細菌叢を持つことが示唆された。また、HPV16 DNAの陽性率と歯周ポケット測定時の出血との間に有意な関連を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV16陽性口腔扁平上皮癌細胞の幹細胞性の維持には、E6/E7遺伝子が重要な役割を持つことが示唆された。また、HPV DNAが宿主ゲノムに結合している子宮頸癌細胞とは異なり、UM-SCC-104細胞中ではHPV16 DNAがエピゾームとして存在しているにも関わらず、E6/E7 siRNA ノックダウンにより幹細胞性が低下した。このことは、存在様式に関わらず、HPV DNAが細胞の悪性化に関与していることを示唆している。 HPV16 DNA がCD44のメチル化に関与している可能性が示唆された。 歯周病とHPV感染との関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In HPV16 E6/E7-positive oral squamous cell carcinoma cell line (UM-SCC-104), E6/E7 siRNA knockdown significantly reduced sphere colony formation ability and mRNA expression of stem cell markers (Oct4, Nanog, ALDH1). Methylation of CD44 gene was detected more frequently in HPV16-positive oral cancer than in HPV16-negative oral cancer. Characteristic oral bacterial flora was found in the subjects with HPV16 DNA. Additionally, there was a significant relationship between the presence of HPV16 DNA and bleeding during periodontal probing.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HPV16 癌幹細胞 口腔癌 歯周病 歯周病原細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らのこれまでの研究成果により、

- (1) 性行動や喫煙が口腔における HPV16 感染の重要なリスクファクターであることが明らかとなった(文献)。
- (2) HPV16 の感染が口腔上皮異形成の癌化のみならず、口腔扁平上皮癌患者の予後予測に関与することが明らかとなった(文献、)。
- (3) HPV16 E6 陽性扁平上皮癌細胞では、E6 が癌幹細胞形質の維持に関与することが示唆された(文献)。

以上の結果から、HPV16 感染が口腔扁平上皮癌細胞の発生や悪性化の獲得機構において重要な役割を有する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでの成果をさらに発展させ、口腔扁平上皮癌における HPV16 DNA による遺伝子発現の制御機構を解明し、HPV 陽性口腔癌細胞における個々の遺伝子産物の機能を検討し、HPV16 による特異的な悪性化機構を明らかにする。

- (1) HPV16 DNA 陽性の口腔癌細胞の高度悪性化獲得機構を明らかとする。
- (2) 口腔扁平上皮癌において、核内エピゾームとして存在する HPV16 DNA による epigenetic な遺伝子発現の制御機構を明らかにする。
- (3) HPV16 DNA 陽性率と CD44 のメチル化が、口腔癌の検出マーカーとなり得るかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) HPV16 E6/E7 陽性口腔扁平上皮癌細胞 (UM-SCC-104) における HPV16 E6/E7 knockdown の影響

HPV16 陽性口腔扁平上皮癌細胞の癌幹細胞形質を明らかにするため、HPV16 E6/E7 陽性の口腔扁平上皮癌細胞に、HPV16 E6/E7 siRNA 発現ベクターを導入し、スフィアコロニー形成能について検討した。また、幹細胞マーカーである Oct4, Nanog, ALDH1 の mRNA 発現についても、リアルタイム PCR 法で検討した。

- (2) HPV16 DNA 陽性口腔癌細胞におけるメチル化解析

Bisulfate sequence 解析を行って、HPV16 DNA 陽性口腔癌細胞のプロモーター領域において、特異的にメチル化されている部位を同定する。

- (3) HPV16 陽性者における口腔細菌叢の検討

大学病院を受診した患者 (60 歳以上の女性) から口腔うがい液を採取し、口腔細菌叢について検討した。その後、口腔の HPV16 DNA と歯周病との関係について検討した。

4 . 研究成果

(1) HPV16 E6/E7 発現と癌幹細胞形質との関係

HPV16 E6/E7 陽性口腔扁平上皮癌細胞 (UM-SCC-104) のスフィアコロニー形成は E6/E7 siRNA knockdown により抑制された。さらに、幹細胞マーカーである、Oct4, Nanog, ALDH1 の mRNA 発現は、E6/E7 siRNA knockdown により有意に減少した。このことから、HPV16 陽性口腔扁平上皮癌細胞の幹細胞性の維持には、E6/E7 が重要な役割を持つことが示唆された。また、HPV DNA が宿主ゲノムに integrate されている子宮頸癌細胞とは異なり、UM-SCC-104 細胞中では HPV16 が episomal DNA として存在しているにも関わらず、E6/E7 siRNA knockdown により幹細胞性が低下した。このことは、HPV DNA の存在様式に関わらず、HPV が細胞の悪性化に関与していることを示唆している。

(2) DNA メチル化解析

HPV16 陽性口腔癌では、陰性口腔癌と比較して、CD44 のメチル化陽性例が多いことから、HPV16 DNA が CD44 のメチル化に関与している可能性が示唆されたが、CD44 以外で特異的にメチル化されている遺伝子群については明らかに出来なかった。今後は、HPV16 陽性口腔癌において CD44 以外の遺伝子のメチル化についてさらに検討する必要がある。

(3) HPV16 E6/E7 発現と口腔内細菌叢との関係

口腔内細菌叢の解析を行った結果、HPV16 DNA の陽性例では陰性例と比較して、*Porphyromonas* 属の割合が有意に高く、HPV16 DNA の陽性例では特徴的な口腔内細菌叢を持つことが示唆された。また、HPV16 DNA の陽性率と歯周ポケットのプロビング時の出血との間に有意な関連を認めた。

< 引用文献 >

Shigeishi H, Sugiyama M. Risk factors for oral human papillomavirus infection in healthy individuals: A systematic review and meta-analysis. J Clin Med Res , 8, 2016, 721-9.

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 95, 2003, 594-600.

Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, Higashikawa K, Kamata N. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. Br J Oral Maxillofac Surg, 45, 2007, 116-22.

Zhang M, Kumar B, Piao L, Xie X, Schmitt A, Arradaza N, Cippola M, Old M, Agrawal A, Ozer E, Schuller DE, Teknos TN, Pan Q. Elevated intrinsic cancer stem cell population in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. Cancer, 120, 2014, 992-1001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigeishi H, Murodumi H, Ohta K, Sugiyama M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Detection of HPV16 E6 DNA in periodontal pockets of middle-aged and older people.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Sci Int	6. 最初と最後の頁 50-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osi2.1079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigeishi H, Su CY, Kaneyasu Y, Matsumura M, Nakamura M, Ishikawa M, Saito A, Ohta K, Sugiyama M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Association of oral HPV16 infection with periodontal inflammation and the oral microbiome in older Japanese women.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2020.9598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Relationship between the prevalence of oral human papillomavirus DNA and periodontal disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2021.1416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, Takechi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 High HPV16 E6 viral load in the oral cavity is associated with an increased number of bacteria: A preliminary study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2017.1025. Epub 2017 Nov 29.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeishi H, Yokoyama S, Ohta K, Takechi M, Sugiyama M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA copy number in oral rinse samples from oral cavity cancer patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Research in Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 重石 英生, 中村 真梨子, 杉山 勝, 太田 耕司
2. 発表標題 口腔のHPV16感染と歯周病原細菌との関係
3. 学会等名 第104回広島大学歯学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideo Shigeishi, Masaru Sugiyama, Kouji Ohta
2. 発表標題 Association between oral HPV prevalence and smoking in people without oral cancer
3. 学会等名 15th Annual Conference of the International Society for the Prevention of Tobacco Induced Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重石 英生, 杉山 勝, 太田 耕司
2. 発表標題 口腔のHPV16と口腔衛生状態および歯周病原細菌との関係
3. 学会等名 第28回日本口腔感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideo Shigeishi, Cheng-Yih Su, Yoshino Kaneyasu, Mari Matsumura, Mariko Nakamura, Momoko Ishikawa, Ayumi Saito, Kouji Ohta, Masaru Sugiyama
2. 発表標題 The association between oral HPV16 infection and oral health status in Japanese female aged 60 years and over
3. 学会等名 第52回広島大学歯学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重石 英生, 太田 耕司, 杉山 勝.
2. 発表標題 口腔HPV感染の危険因子およびHPV陽性口腔癌の分子生物学的特徴
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重石 英生、太田 耕司、東川 晃一郎、武知 正晃、杉山 勝.
2. 発表標題 口腔含嗽サンプルを用いたHuman Papillomavirus (HPV) DNAの陽性率の検討.
3. 学会等名 第47回(公社)日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2018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
研究 分 担 者	重石 英生	広島大学・医系科学研究科(歯)・講師	
	(SHIGEISHI Hideo)		
	(90397943)	(15401)	

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
---------	---------