

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01062

研究課題名(和文) ヒトパピローマウイルス関連中咽頭癌の自然史の解明

研究課題名(英文) Natural history of HPV-related oropharyngeal cancer

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) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルス(HPV)関連中咽頭癌は高リスク型HPVの感染により発生するが、その自然史やHPV感染のメカニズムは全く解明されていない。本研究では、SLC25A17がHPV感染に関与することを明らかにするとともに、HPVの咽頭感染を認める健常者の一部では含嗽検体中にHPV mRNAを認め、前癌病変が潜在する可能性を示した。また、HPV中咽頭癌に特徴的なHLAを明らかにした。更に、circulating tumor HPV DNA (ctHPVDNA)がHPV関連中咽頭癌の非常に鋭敏なバイオマーカーであり、治療効果のモニタリングや治療後の再発サーベイランスに有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌のリスクが高い健常者を対象に含嗽検体のHPV mRNAを評価する検診を行い、HPV mRNAを認める場合には扁桃摘出を行うことによってHPV関連中咽頭癌の発生を予防することが可能となる。HPV関連中咽頭癌が漸増する一方でHPVワクチンの接種が進まない本邦においてその意義は高い。また、HPV関連中咽頭癌は化学放射線療法で加療されることが多いが後遺症が問題となる。治療中のctHPVDNAのクリアランスプロファイルによって治療強度を調整することにより、後遺症を軽減しつつ良好な予後を維持することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Human papillomavirus (HPV) infects the oropharynx and drive the carcinogenesis, while the mechanism of HPV infection and the natural history of HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) remain unknown. We found that SLC25A17 was involved in HPV infection. We also found that HPV mRNA was detectable in oral rinses of cancer-free subjects, who might have HPV-related pre-cancer in the oropharynx. We further found human leukocyte antigen polymorphism that was associated with HPV-related OPSCC. We established circulating tumor HPV DNA (ctHPVDNA) as a very sensitive biomarker of HPV-related OPSCC. ctHPVDNA was useful in monitoring treatment response and surveying disease recurrence.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：中咽頭癌 ヒトパピローマウイルス 前癌病変 HLA マイクロバイオーム リキッドバイオプシー ctHPVDNA

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の原因として知られる HPV は中咽頭にも感染し HPV 関連中咽頭癌を惹起する。子宮頸部に HPV が持続感染すると軽度異形成 (cervical intraepithelial neoplasia 1, CIN1)、中等度異形成 (CIN2)、高度異形成・上皮内癌 (CIN3) と呼ばれる一連の前癌病変を経て、約 10 年の経過で浸潤癌が発生する (子宮頸癌の自然史)。子宮頸癌ではヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 多型により発癌リスクが異なること、子宮頸部のマイクロバイオームが発癌過程に関与することが明らかとなっている。一方、HPV 関連中咽頭癌の自然史は全く未解明であり、前癌病変の存在すら証明されていない。HPV は直接検体を採取することが不可能な扁桃陰窩に感染し、その部位で病変が進行するためである。また、HPV のレセプター (細胞侵入機構) は子宮頸癌においても未解明のままである。HPV 関連中咽頭癌は世界的に増加傾向にあるが、本邦では HPV ワクチンの接種が進んでいない。即ち、HPV 関連中咽頭癌の一次予防は困難な状況である。そこで、二次予防としての早期発見が重要であり、そのためには HPV 関連中咽頭癌の前癌病変の存在を明らかにして自然史を解明するとともに、バイオマーカーを確立することが求められる。また、三次予防として治療後の後遺症の予防、即ち cancer survivor の QOL の向上が必要である。HPV 関連中咽頭癌の標準治療は化学放射線同時併用療法、あるいは手術 + 術後照射であるが、治療後に QOL が著しく低下する。HPV 関連中咽頭癌の予後は一般に良好であり、患者は長期間にわたり QOL の低下に苦しめられる。そこで、三次予防のためには低侵襲治療の開発が必要であるが、そのためには低侵襲治療の対象となる患者を選別するための、即ち個別化治療の指標となるバイオマーカーが不可欠である。

2. 研究の目的

本研究は、HPV 関連中咽頭癌の自然史の解明を目指して HPV レセプターの同定に取り組むとともに、前癌病変の存在を証明する。また、治療の個別化や再発サーベイランスに有用なバイオマーカーを確立する。更に、HPV 関連中咽頭癌のリスクと関連する HLA を解明するとともに、発癌過程に関与する口腔内マイクロバイオームを解明する。

(1) HPV レセプターの同定

HPV 研究を行う上で、native HPV は in vivo あるいは器官培養でしか作製や培養ができないため virus-like particles (VLPs) や感染性のある pseudovirion (PsV) を合成し代用する必要がある。まずは細胞に効率よく感染し、感染状態を GFP や FACS で評価でき、なおかつ感染細胞を negative selection できる PsV を作製する。そして PsV と CRISPR-Cas9 システムを用いてゲノムワイドなスクリーニング法を確立し、HPV 感染に関わる遺伝子を同定し HPV レセプター (細胞侵入機構) を明らかにする。レセプターが同定できれば、更に扁桃や子宮頸部における臓器特異的な発現を検証し、HPV レセプターと PsV が結合する立体構造を明らかにする。

(2) HPV 関連中咽頭癌の前癌病変の同定とバイオマーカーの確立

咽頭 HPV 感染を認め更に含嗽検体中に HPV mRNA が検出される扁桃摘出患者において HPV 関連前癌病変が検出されるか検討する。また、治療前の ctHPVDNA レベルが病勢と相関するか解析し、ctHPVDNA を指標とした HPV 関連中咽頭癌の早期発見が可能か検討する。更に、(化

学)放射線療法で加療する HPV 関連中咽頭癌患者の ctHPVDNA の治療中のクリアランスプロファイルと治療効果の相関について解析するとともに、根治治療後に ctHPVDNA をモニタリングすることにより再発の早期発見が可能となるか検討する。

(3) HPV 関連中咽頭癌の発生に關与する口腔内マイクロバイオームの解明

ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) によって、HPV 関連中咽頭癌患者に特異的なゲノム変異を同定する。また、口腔微生物叢のメタゲノム解析、唾液のトランスクリプトームを解析し、HPV 関連中咽頭癌患者に特異的な各要素を同定する。更にこれらのオミクス情報を統合し、HPV 関連中咽頭癌の自然史における宿主の免疫能やマイクロバイオームの働きを解明する。将来的には口腔内環境への介入による発癌予防法の開発や前癌病変のバイオマーカーとなる菌種や代謝産物の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) HPV レセプターの同定

PsV の作製と感染実験：カプシドを構成する HPV16 の L1 と L2 を含むプラスミドと、感染を確認するための GFP、感染細胞をガンシクロビルで negative selection するために delta TK (herpes simplex virus thymidine kinase) を入れたレポータープラスミドを作製した。dTK を発現した細胞はガンシクロビルが作用すると細胞の DNA 合成を阻害しアポトーシスによる細胞死へ導くことを利用した。これらのプラスミドを用いて PsV を作製し、できた PsV が実際に細胞へ感染することを GFP で確認、FACS で定量的に評価した。また感染細胞にガンシクロビルを投与すると細胞が死滅することを確認した。

ゲノムワイドな CRISPR-Cas9 によるスクリーニング：PsV に感染性の高かった 293FT 細胞で Cas9 発現細胞株を作製し、それに全遺伝子を対象とした約 9 万種類の gRNA を含んだレンチウイルス CRISPR gRNA ライブラリーを感染させることで、細胞 1 個につき 1 種類の遺伝子がノックアウトされた細胞集団を作製する。これを PsV に暴露し、PsV に感染した細胞をガンシクロビルで死滅させ PsV に感染しなかった細胞を選別する。レンチウイルス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し、どの遺伝子をノックアウトすると PsV 感染を阻害するのか、即ち HPV 感染に關与する遺伝子を同定した。PsV で感染させガンシクロビルで非感染細胞を選別するという行程を 5 サイクル行うことで候補遺伝子を絞り込んだ。

候補遺伝子の確認実験：候補遺伝子 (SLC25A17) に対する gRNA を 2 種類用意した。293FT 細胞と子宮頸癌の細胞株である HeLa 細胞にそれぞれ Cas9 を発現させた細胞を作製し、2 種類の gRNA をそれぞれトランスフェクションし SLC25A17 をノックダウンさせた。そこへ PsV を感染させ感染率が低下するかどうか確認した。

(2) HPV 関連中咽頭癌の前癌病変の同定とバイオマーカーの確立

前癌病変：大阪大学およびその関連病院で扁桃摘出手術を受ける患者を対象に、含嗽検体を採取して HPV DNA の有無およびタイピングを GENOSEARCH HPV31 (医学生物学研究所) で解析し咽頭 HPV 感染を評価する。咽頭 HPV 感染を認めた患者については入院時に改めて含嗽検体を採取して持続感染の有無について評価するとともに、HPV mRNA の有無をアプティマ

HPV アッセイ（ホロジックジャパン）で評価する。咽頭 HPV 感染を認めた患者の摘出扁桃から連続薄切切片を作製し、HE 染色および p16 免疫組織化学を行って前癌病変を検索する。

バイオマーカー：HPV 関連中咽頭癌および HPV 非関連中咽頭癌について治療前ベースラインで血液検体を採取し ctHPVDNA をデジタル PCR を用いて絶対定量する。含嗽検体を採取し oral HPV DNA を GENOSEARCH HPV31 で、oral HPV mRNA をアプティマ HPV アッセイで定性的に評価する。感度・特異度について ctHPVDNA と oral test を比較検討する。また、治療前ベースラインの metabolic tumor volume を FDG-PET/CT データから算出するとともに、TNM 分類に基づく anatomic tumor burden と併せて ctHPVDNA と相関するか検討する。尚、ctHPVDNA については全ての高リスク型 HPV ではなく HPV16 に限定して解析する。

放射線療法で加療する HPV 関連中咽頭癌において 10 Gy 終了毎に、そして治療終了後 3 ヶ月の治療効果判定時、経過観察の受診時に経時的に ctHPVDNA を定量し、治療中のクリアランスプロファイルと治療効果の相関について解析する。また、根治治療後の ctHPVDNA モニタリングは手術症例についても行い、ctHPVDNA が再発を早期に同定する上で有用かどうか検討する。

（3）HPV 関連中咽頭癌の発生に關与する口腔内マイクロバイオームの解明

大阪大学、大阪国際がんセンター、国立がん研究センター中央病院、愛知県がんセンターで病理組織学的所見により中咽頭癌と診断された約 400 名の患者の血液、組織検体を収集した。対象とするコントロール群はバイオバンク・ジャパン・プロジェクト（BBJ）の参加者のうち、他の悪性新生物や HLA 領域に關連する疾患を有さない集団を選択した。末梢血単核細胞から DNA を抽出後、マイクロアレイを用いて、ジェノタイピングを施行、個々の遺伝子変異情報を取得した。これらの情報に genotype imputation 及び HLA imputation と HLA 領域の Fine mapping を施行し、全ゲノム領域のゲノム情報及び HLA 領域の遺伝子型とアミノ酸のデータを得た。HPV 関連中咽頭癌、HPV 非関連頭頸部癌、コントロール群の 3 群において、GWAS および HLA 解析を施行し、それぞれを比較した。口腔微生物叢解析に關しては、メタゲノム解析を施行する上でヒト由来のゲノムを効率よく除去する方法を検証した。現在、HPV 関連中咽頭癌、HPV 非関連頭頸部癌、コントロール群の 3 群を対象に唾液サンプルの収集を進めている。

4．研究成果

（1）HPV レセプターの同定

GFP と dTK を含んだ新たな HPV の PsV を開発し、ヒト細胞に感染すること、感染細胞をガンシクロビルで死滅させ非感染細胞を選別できることを確認した。次いで、PsV と CRISPR gRNA ライブラリーを用いたスクリーニング方法を確立し、RNA-seq の解析によって SLC25A17 と SAMHD1 の 2 種類の候補遺伝子を同定した。SLC25A17 はペルオキシソーム膜蛋白質 PMP34 をコードしており、SAMHD1 はデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）をデオキシリボヌクレオチドと三リン酸に加水分解する酵素をコードしている。ヌクレオチド代謝が HPV 感染経路に關与している可能性は低いため、今回のスクリーニングの結果からは膜蛋白と關連する SLC25A17 が HPV 感染に關与している可能性があること示唆された。293FT 細胞では 2 種類の SLC25A17 に対する gRNA とともにコントロール gRNA と比較し感染率が低下した。HeLa 細胞

においてもコントロール gRNA に対し、2 つの gRNA とも感染率が低下した。また、293FT 細胞も HeLa 細胞もコントロール gRNA をトランスフェクションした細胞より SLC25A17 の gRNA をトランスフェクションした細胞での SLC25A17 の mRNA の発現レベルは相対的に低下していた。このように gRNA がこの実験において有効であることが確認できた。これらの確認実験の結果、SLC25A17 は HPV の感染経路に関与していることが示唆された。以上より、HPV のレセプターは同定できなかったが、HPV の感染経路は一様ではなく、SLC25A17 が関わる経路もその一つであることが示唆された。

(2) HPV 関連中咽頭癌の前癌病変の同定とバイオマーカーの確立

前癌病変：扁桃摘出患者 1,188 例の術前に採前含嗽検体において、高リスク型 HPV DNA が 32 例で検出され、うち 3 例で HPV16 DNA が検出された。5 例で高リスク型 HPV mRNA が検出され、うち 1 例で HPV16 mRNA が検出された。高リスク型 HPV 咽頭感染を認めた 32 例の摘出扁桃は、前癌病変を同定するために保管している。前癌病変の同定のために摘出扁桃の薄切連続切片の作製が必要であり、その作製条件の最適化を行った。今後順次解析を行う。

バイオマーカー：ctHPVDNA が HPV 関連中咽頭癌の同定において非常に感度および特異度が高いこと、ctHPVDNA のレベルは tumor burden と密接に相関していることを明らかにした。また、ctHPVDNA は含嗽検体中の oral HPV DNA や oral HPV mRNA と比較して高感度であり、特に T0 HPV 関連中咽頭癌（TNM 第 7 版では TX 原発不明癌に相当）においては oral test より圧倒的に高感度であることを明らかにした。更に、効果判定時の ctHPVDNA の有無、即ち molecular response は、FDG-PET/CT に基づく metabolic response よりも有意に予後と関連することを明らかにした。放射線治療中の ctHPVDNA のクリアランスプロファイルを解析し、治療の進行に伴い ctHPVDNA が同定できる症例が減少すること、ctHPVDNA が同定できる症例において遺残・再発を来す症例が占める割合が治療の進行に伴い増加し、治療晩期では 100% に達することを明らかにした。治療終了後の再発サーバイランスにおいて、画像検査により再発が臨床的に証明されるずっと以前から ctHPVDNA が検出されることを明らかにした。また、手術症例においては、転移リンパ節に節外浸潤を認める際には術後 ctHPVDNA は術前と比べ減少するものの消失せず、術後放射線療法後に消失することを明らかにした。即ち、ctHPVDNA の治療中モニタリングにより治療強度の最適化・個別化治療を成し得ること、そして治療後モニタリングにより再発の早期発見・介入による予後の改善を成し得ることを明らかにした。

(3) HPV 関連中咽頭癌の発生に関与する口腔内マイクロバイオームの解明

HPV 関連中咽頭癌とコントロール間の比較において、HLA 領域に有意差のある遺伝子型、またはアミノ酸が同定された。他のコホート間の比較では有意なものは同定されなかった。同定された型は子宮頸癌ではアジア諸国より報告があるが、中咽頭癌の GWAS 及び HLA 解析では未報告のものであった。また、これらのうち HPV 陽性中咽頭癌のリスクを下げる HLA 型に関して、HPV に結合性の強いペプチドを多く有することを明らかにした。今後は、これら GWAS の知見に口腔微生物叢のメタゲノム・メタボローム解析の結果を統合し、マルチオミクス解析によって、HPV 関連中咽頭癌の自然史における関連因子の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Hidenori Tanaka, Norihiko Takemoto, Masafumi Horie, Erina Takai, Takahito Fukusumi, Motoyuki Suzuki, Hiroataka Eguchi, Sho Komukai, Mitsuaki Tatsumi, Fumiaki Isohashi, Kazuhiko Ogawa, Shinichi Yachida, Hidenori Inohara | 4. 巻 148 |
| 2. 論文標題 Circulating tumor HPV DNA complements PET-CT in guiding management after radiotherapy in HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Int J Cancer | 6. 最初と最後の頁 995-1005 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33287 | 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 Hidenori Tanaka, Motoyuki Suzuk, Norihiko Takemoto, Takahito Fukusumi, Hiroataka Eguchi, Erina Takai, Haruka Kanai, Mitsuaki Tatsumi, Masafumi Horie, Yukinori Takenaka, Shinichi Yachida, Hidenori Inohara | 4. 巻 150 |
| 2. 論文標題 Performance of oral HPV DNA, oral HPV mRNA and circulating tumor HPV DNA in the detection of HPV-related oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Int J Cancer | 6. 最初と最後の頁 174-186 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33798 | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Rie Ito, Koji Kitamura, Hidenori Inohara, Kosuke Yusa, Yasufumi Kaneda, Keisuke Nimura | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Peroxisomal membrane protein PMP34 is involved in the human papillomavirus infection pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Front Virol | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fviro.2022.870922. | 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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidenori Tanaka, Hidenori Inohara |
| 2. 発表標題 Diagnostic performance of oral HPV DNA, oral HPV mRNA, and circulating tumor HPV DNA for HPV-related oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary |
| 3. 学会等名 34th International Papillomavirus Conference（国際学会） |
| 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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 森井 英一 (Morii Eiichi) (10283772) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 谷内田 真一 (Yachida Shinichi) (20359920) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 岡田 随象 (Okada Yukinori) (70727411) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 二村 圭祐 (Nimura Keisuke) (00462713) | 大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401) | |

| | 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 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 田中 秀憲 (Tanaka Hidenori) | | |
| 研究協力者 | 伊藤 理恵 (Ito Rie) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|------------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 岸川 敏博 (Kishikawa Toshihiro) | | |
| 研究協力者 | 佐々 暢垂 (Sasa Noa) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |