

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09635

研究課題名(和文) 喉頭乳頭腫形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of laryngeal papilloma formation

研究代表者

池上 太郎 (Ikegami, Taro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00754409

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)：HPV-11感染乳頭腫におけるウイルスDNA量、9つの遺伝子発現量、各ウイルス遺伝子の乳頭腫内での局在を明らかにした。さらに最も発現していたE4がタンパク質に翻訳されて機能しているのが明らかにするため、抗体を作製した。その結果、乳頭腫においてE4が発現する細胞は構造が破壊されており、細胞の核内には子ウイルスで満たされていた。このことから、E4が子ウイルスの維持、放出に関与することが示唆された。鼻副鼻腔における内反性乳頭腫(IP)におけるHPV感染の有無および上皮成長因子受容体(EGFR)のエクソン20の変異が関係するのかが調べた。IPからSCCへの悪性転化には高リスク型HPVの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV-11関連乳頭腫においてHPV-6と同様にE4、E5a、E5bの3遺伝子の発現が約9割を占めていることを明らかにした。我々が開発した抗HPV-6抗体と抗HPV-11E4抗体はHPV-6E4とHPV-11E4を識別でき、交差反応性のない優れた抗体である。内反性乳頭腫(IP)においてEGFRのエクソン20の領域のinframe insertionが鍵となっていること、IPからSCCへの悪性転化に一部に高リスク型HPVが関与する可能性を示した。さらにde novo SNSCCの約3割においては高リスク型HPVががん化に関与する可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We determined the amount of viral DNA in HPV-11-infected papilloma, the expression of nine viral genes, and the localization of each gene within the papilloma. In addition, we generated an antibody against HPV-11 E4 protein to clarify whether E4, the most expressed gene, is translated into a protein and functions. The results showed that the cells expressing E4 protein in papilloma were structurally disrupted, and the nuclei of the cells were filled with progeny viruses, suggesting that E4 is involved in maintaining and releasing progeny viruses. In addition, we investigated whether HPV infection and mutations in exon 20 of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene are associated with inverted papilloma (IP) formation, suggesting that high-risk HPV is involved in malignant transformation from IP to SCC, but that inframe insertion in exon 20 of EGFR gene is related to IP formation.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科学

キーワード：喉頭乳頭腫 内反性乳頭腫 E4 HPV-6 HPV-11 EGFR ヒトパピローマウイルス IP

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HPV-6 および HPV-11 は声帯や子宮頸部に感染し、それぞれ喉頭乳頭腫（乳頭腫）、尖圭コンジローマといった良性腫瘍を形成する。HPV は上皮の基底細胞に感染し、ウイルスの各遺伝子が細胞分化に合わせて発現し、宿主の DNA 合成やタンパク質合成を利用しながら子ウイルスの合成を行う。ただ本来は宿主から異物として認識され、免疫系によって感染細胞は排除されてしまうため、HPV は宿主の抗原提示機構などを無効化していると考えられている。そのようなことで最終的に子ウイルスを宿主から放出する。一方、HPV-6 および HPV-11 ではウイルスの各遺伝子の発現などの基礎的知見がなく、乳頭腫形成における HPV の挙動は不明であった。このような背景から、現在まで乳頭腫の決定的な治療法はない。研究代表者はこれまで HPV-6 感染・乳頭腫 21 検体を用いて、ウイルスの 9 つの遺伝子 (E6、E7、E1、E2、E4、E5a、E5b、L2、L1) をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。その結果、HPV-6 において E4、E5a および E5b が全ウイルス遺伝子の発現の 96% を占め、さらに RNA-in situ hybridization (ISH) 法を確立し、この 3 遺伝子が有棘細胞の上層から顆粒細胞層の細胞で発現することを発見した。また同じ細胞層でウイルス DNA の合成がされていた (Ikegami et al., *Microorganisms*, 2021)。以上より、E4、E5a および E5b が発現する細胞においてウイルス DNA の合成が行われることが示唆された。そこで、本研究では、(1) HPV-11 の乳頭腫においてもウイルス遺伝子の発現に明らかにし、さらに、(2) 喉頭領域外の乳頭腫鼻副鼻腔における内反性乳頭腫 (IP) の HPV 感染を明らかにする。また IP を調べる際、比較のため鼻副鼻腔癌の HPV 感染も明らかにする。

2. 研究の目的

HPV-11 感染乳頭腫におけるウイルス DNA 量、HPV-11 の 9 つの遺伝子 (E6、E7、E1、E2、E4、E5a、E5b、L2、L1) 発現量、各ウイルス遺伝子の乳頭腫内での局在を明らかにする。さらに最も発現していた E4 mRNA がタンパク質に翻訳されて機能しているのか明らかにする。IP の研究では、HPV 感染の有無を明らかにし、さらに IP の形成に上皮成長因子受容体 (EGFR) のエクソン 20 の変異が関係するのか明らかにし、EGFR のリン酸化領域も明らかにする。

3. 研究の方法

HPV-11 感染喉頭乳頭腫 3 名、HPV-11 感染上咽頭乳頭腫 1 名、HPV-11 感染鼻腔乳頭腫 1 名を用いて、ウイルス DNA 量、HPV-11 の 9 つの遺伝子 (E6、E7、E1、E2、E4、E5a、E5b、L2、L1) 発現量を Real-time PCR 法で調べた。つづいて、RNA in situ hybridization 法を用いて、各遺伝子の乳頭腫内での局在を調べた。さらに最も発現していた E4 mRNA がタンパク質に翻訳されて機能しているのか明らかにするため、大腸菌で HPV-11 E4 タンパク質を作製し、ウサギに免疫をし、抗体を作製し、ウエスタンブロットおよび免疫染色法で抗体の評価をした。IP の研究では、IP20 例、IP+鼻副鼻腔癌 (IP+SCC)7 例、鼻副鼻腔癌 (de novo SNSCC) 20 例を用いて、HPV 感染の有無、ウイルス DNA 量、HPV DNA in situ hybridization、p16 免疫染色、さらに上皮成長因子受容体 (EGFR) のエクソン 20 の変異の有無と EGFR のリン酸化領域を調べた。

4. 研究成果

HPV-11 感染・乳頭腫

HPV-11 感染・乳頭腫 (喉頭乳頭腫 3 例、上咽頭乳頭腫 1 例、鼻腔乳頭腫 1 例) においてウイルス DNA 量は 84 ~ 642111 copies/ng DNA と症例ごとに大きな差があった。しかし HPV-6 感染・乳頭腫と同様に、E4、E5a および E5b の 3 遺伝子が全ウイルス遺伝子発現の 88% を占めていた (図 1)。E4、E5a、E5b mRNA の局在は乳頭腫内の中層から上層にかけて発現していた (図 2)。作製したウサギの Anti-HPV-11E4 抗体

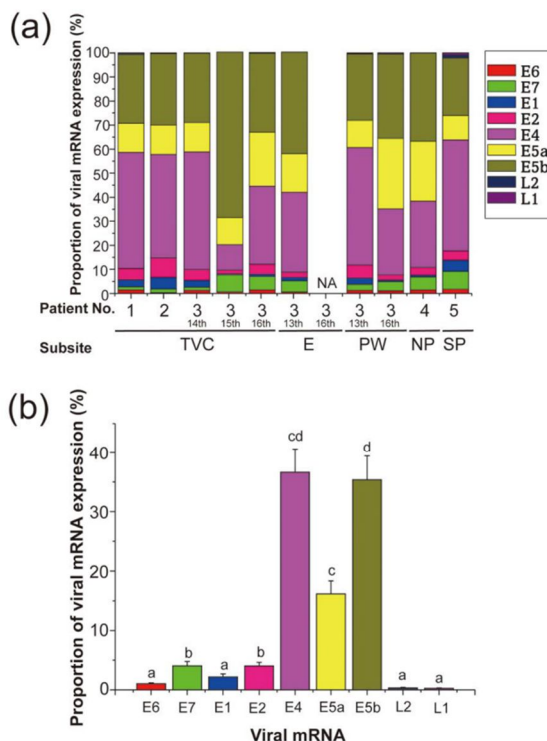


図 1 HPV-11 関連乳頭腫における HPV 遺伝子の発現割合。E, epiglottis; NA, not available; NP, nasopharyngeal papilloma; PW, posterior wall of the hypopharynx; SP, septal exophytic papilloma; TVC, true vocal cord.

はウエスタンブロットおよび免疫染色で使用可能であり、HPV-11 感染乳頭腫内でタンパク質として翻訳、機能していることが明らかとなった(図3C)。以上の研究は、国際誌 *Viruses* に発表した。さらに浜松医科大学山田智史先生との共同研究により、E4 が発現する細胞内の核内で子ウイルスが作られていることが明らかとなった(Yamada, Itoh, and Ikegami et al., *Scientific Reports* 2023)。E4 が子ウイルスの維持や放出などに関与していることが示唆された(図4)。

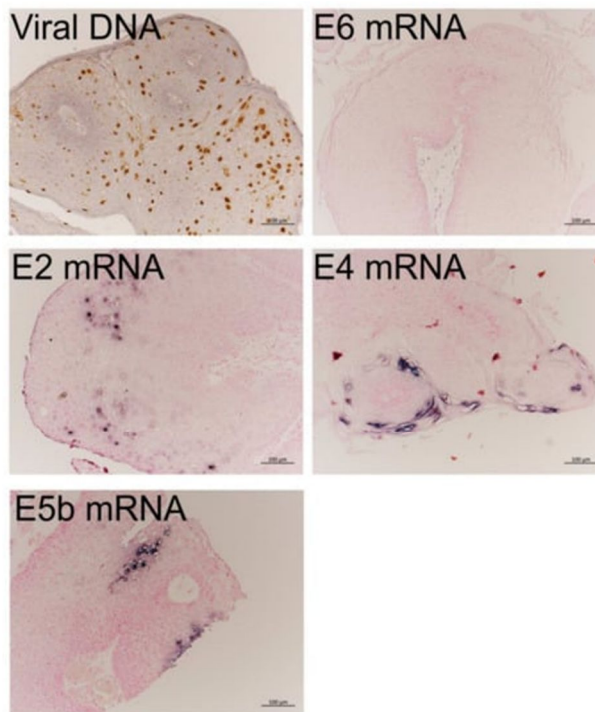


図2 HPV-11関連乳頭腫における乳頭腫内のHPV遺伝子の発現部位

鼻副鼻腔における内反性乳頭腫 (IP) の HPV 感染

IP 20 例中、5 例で HPV 陽性となった：高リスク型 3 例 (HPV-16、2 例； HPV-33、1 例) 低リスク型 2 例 (HPV-6、1 例； HPV-11、1 例)。しかし、ウイルス DNA 量はリアルタイム PCR では検出限界以下、p16 免疫染色陰性であった。

IP+SCC 7 例中、4 例で HPV が陽性となった：高リスク型 3 例 (HPV-16、1 例； HPV-18、1 例； HPV-33、1 例)。そのうち 2 例でウイルス DNA 量は 30.5 ~ 2628

copies/ng DNA あり、p16 免疫染色が陽性となった (陽性は腫瘍の 70% 以上染色されたもの)。またこの 2 例は HPV ゲノム DNA が宿主ゲノム DNA に組み込まれていた。

de novo SNSCC 20 例中、7 例で HPV 陽性であった：すべて高リスク型であった (HPV-16、4 例； HPV-33、1 例、HPV 型不明、2 例)。HPV 型不明は high risk type HPV DNA-ISH により決定した。ウイルス DNA 量は 0.7 ~ 1630004 copies/ng DNA であった。そのうち 5 例において p16 免疫染色で腫瘍の 7 割以上が陽性になった。

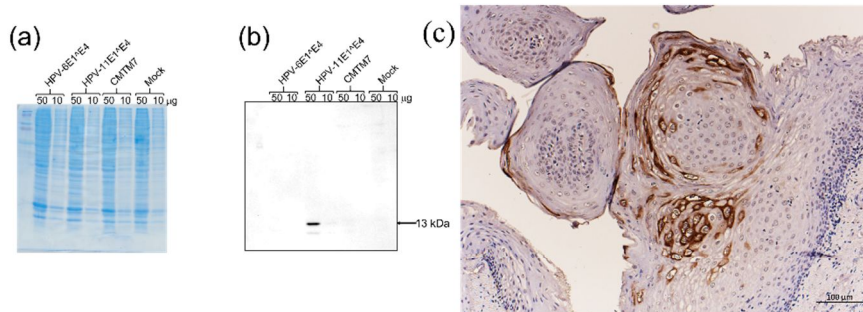


図3 ウサギで作製したAnti-HPV-11E4抗体をウエスタンブロットで評価した (a、b)。さらにHPV-11関連喉頭乳頭腫において免疫染色 (c) を行った。E4が発現する細胞は構造が破壊され、もろくなっていた。

これらの結果から、IP の形成には HPV が関与しないことが示唆された。一方、IP+SCC では 28.5% (7 例中 2 例) で高リスク型 HPV が高発現しており、IP から SCC への悪性転化に関与している可能性が高い。そして、de novo SNSCC では 25% (20 例中 5 例) で高リスク型 HPV が高発現しており、de novo SNSCC の形成に関与することが示唆された。以上の研究は、国際誌 *Journal of Personalized Medicine* に発表した。

鼻副鼻腔における内反性乳頭腫 (IP) の EGFR 遺伝子のエクソン 20 の領域の変異

IP 20 例において、9 例 (45%) で EGFR 遺伝子のエクソン 20 の領域に数アミノ酸が挿入される inframe insertion が見られた。一方、IP+SCC 7 例においては 2 例 (28.5%) で inframe insertion が見られた。しかし、de novo SNSCC 20 例においては見られなかった。このことから、IP の形成に EGFR 遺伝子のエクソン 20 の inframe insertion が鍵となっていることが示唆された。非小細胞性肺がんなどでは EGFR のエクソン 20 に inframe insertion が起こると、EGFR がリガンド無しの状態でも EGFR のシグナル伝達が亢進することが報告されている。このことから、さらに IP や IP+SCC において inframe insertion で EGFR がリン酸化されて亢進状態になっている可能性があると考え、ウエスタンブロットで調べた。その結果、IP の 1 例、

IP+SCC の 2 例において EGFR の 768 番目から 770 番目の SVD が挿入された症例において、EGFR の 845 番目のアミノ酸のチロシンのリン酸化が亢進されていた。以上より、鼻副鼻腔において粘膜の細胞の EGFR 遺伝子のエクソン 20 の領域への inframe insertion が起こると、チロシンキナーゼによる EGFR のリン酸化が亢進、AKT/mTOR 経路が活性化し、その結果 IP が形成されていくのかもしれない。しかしながら、IP の 55% はエクソン 20 領域に変異がないことから、その他の要因によっても IP が形成されていると考えられた。以上の研究は、国際誌 Journal of Personalized Medicine に発表した。

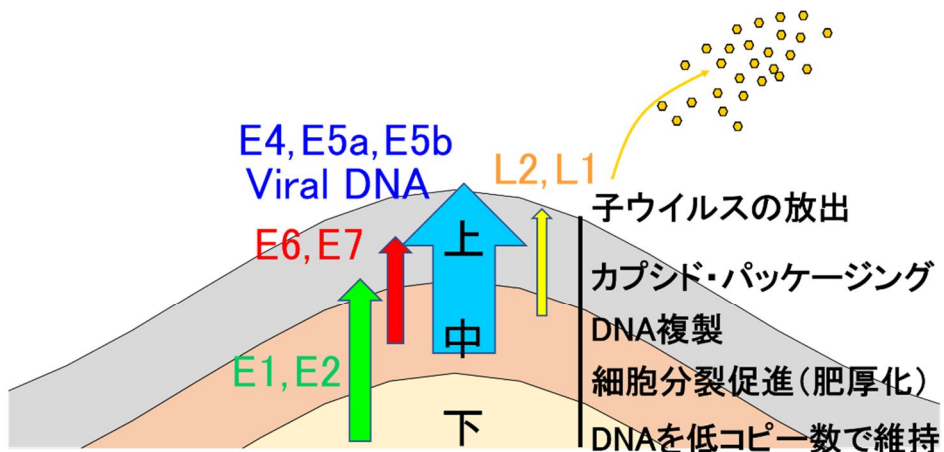


図4 HPVの各遺伝子の発現領域と役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hirakawa Hitoshi, Ikegami Taro, Kise Norimoto, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Agena Shinya, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio	4. 巻 13
2. 論文標題 Human Papillomavirus Infection and EGFR Exon 20 Insertions in Sinonasal Inverted Papilloma and Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 657 ~ 657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13040657	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 Yamada Satoshi, Itoh Toshiya, Ikegami Taro, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Nakanishi Hiroshi, Ishikawa Ryuji, Kita Junya, Nakamura Yuki, Takizawa Yoshinori, Okamura Jun, Noda Yoshihiro, Iwashita Toshihide, Hariyama Takahiko, Suzuki Mikio, Misawa Kiyoshi, Kawasaki Hideya	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between human papillomavirus particle production and the severity of recurrent respiratory papillomatosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32486-8	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 Ikegami Taro, Kise Norimoto, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Suzuki Mikio, Tsukahara Narutoshi, Murakami Akikazu, Kiyuna Asanori, Agena Shinya, Tanaka Katsunori, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Ganaha Akira, Maeda Hiroyuki, Hirakawa Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Antibodies against HPV-6 and HPV-11 for the Study of Laryngeal Papilloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2024 ~ 2024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13102024	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 池上 太郎, 喜友名 朝則, 喜瀬 乗基, 鈴木 幹男	4. 巻 33
2. 論文標題 喉頭乳頭腫におけるHPVの時空間的遺伝子発現	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 喉頭	6. 最初と最後の頁 69 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5426/larynx.33.69	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 Agena S, Hirakawa H, Ikegami T, Kinjyo H, Kise N, Maeda H, Uezato J, Kondo S, Kiyuna A, Yamashita Y, Hasegawa N, Suzuki M, Ganaha A	4. 巻 135
2. 論文標題 Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 expression in advanced pharyngeal cancer without human papillomavirus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Laryngology & Otology	6. 最初と最後の頁 625 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0022215121001468	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 平川 仁、池上 太郎、當山 昌那、鈴木 幹男	4. 巻 61
2. 論文標題 副鼻腔内反性乳頭腫と副鼻腔癌の基礎と臨床	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Bika Gakkai Kaishi (Japanese Journal of Rhinology)	6. 最初と最後の頁 179 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7248/jjrhi.61.179	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 Hirakawa Hitoshi, Ikegami Taro, Toyama Masatomo, Ooshiro Yurika, Higa Tomoyo, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Kise Norimoto, Yamashita Yukashi, Suzuki Mikio	4. 巻 13
2. 論文標題 Prospective Analysis of Squamous Cell Carcinoma Antigen-1 and -2 for Diagnosing Sinonasal Inverted Papilloma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2721 ~ 2721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm13092721	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 Tanaka Katsunori, Hirakawa Hitoshi, Suzuki Mikio, Higa Teruyuki, Agena Shinya, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Toyama Masatomo, Higa Tomoyo, Kinjyo Hidetoshi, Kise Norimoto, Kondo Shunsuke, Maeda Hiroyuki, Ikegami Taro	4. 巻 30
2. 論文標題 Biomarkers for Predicting Anti-Programmed Cell Death-1 Antibody Treatment Effects in Head and Neck Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 5409 ~ 5424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol30060410	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 Ide Kentaro, Kawano Toshihiro, Shirakawa Jumpei, Ntege Edward, Miyamoto Sho, Ikegami Taro, Sunami Hiroshi, Suzuki Mikio, Shimizu Yusuke, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Exploring stage-specific embryonic antigen 3 involvement in oral cancer progression and as a potential target for taxane-based chemotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8619	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池上太郎
2. 発表標題 喉頭気管乳頭腫の基礎
3. 学会等名 第73回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋美羽, 仲村理栄, 上原和子, 池上太郎, 鈴木幹男
2. 発表標題 ハイリスク型ヒトパピローマウイルスE6遺伝子のスプライシングサイトの同定
3. 学会等名 第73回日本気管食道科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 克典, 池上 太郎, 平川 仁, 真栄田 裕行, 安慶名 信也, 上里 迅, 金城 秀俊, 鈴木 幹男
2. 発表標題 EP-HMRGを用いた頭頸部癌術中イメージング
3. 学会等名 頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 俊輔, 池上 太郎, 鈴木 幹男
2. 発表標題 HPV関連頭頸部癌における標的分子の探索
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安慶名 信也, 金城 秀俊, 上里 迅, 田中 克典, 平川 仁, 真栄田 裕行, 長谷川 成海, 池上 太郎, 鈴木 幹男
2. 発表標題 HPV非関連進行咽頭癌におけるHIF-1 発現と予後
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川 仁, 池上 太郎, 當山 昌那, 鈴木 幹男
2. 発表標題 鼻副鼻腔内反性乳頭腫の基礎と臨床
3. 学会等名 第 60 回日本鼻科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 智史, 三澤 清, 池上 太郎, 今井 篤志, 望月 大極, 山口 裕貴, 瀧澤 義徳, 細川 誠二, 鈴木 幹男, 峯田 周幸
2. 発表標題 ナノスーツ法を用いた頭頸部乳頭腫組織の検討
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

琉球大学：再発性呼吸器乳頭腫症の新規病態の解明 ～重症度評価、新規治療法へ期待～
<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/43535/>
日本の研究.com：再発性呼吸器乳頭腫症の新規病態の解明 ～重症度評価、新規治療法へ期待～
<https://research-er.jp/articles/view/120879>
医学科学生が第73回日本気管食道科学会総会・学術講演会の医学生・研修医セッションで最優秀演題賞を受賞
<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/39354/>

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