

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16859

研究課題名（和文）ヒト乳頭腫ウイルス関連頭頸部癌の低酸素状態の分子機構に着目した低侵襲治療開発

研究課題名（英文）Development of minimally invasive therapy focusing on the molecular mechanism of hypoxia in human papilloma virus-related head and neck cancer

研究代表者

安慶名 信也（Agena, Shinya）

琉球大学・病院・講師

研究者番号：30593496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素状態下のHPV関連頭頸部癌の分子機構を解明し、それを応用した新規治療法の開発を最終目標としている。HPV陽性細胞株とHPV陰性細胞株を培養しHIF-1aの発現をWestern blotで確認したが、低酸素条件においてどちらの株においてもHIF-1aの発現を認めていたが有意差は認めなかった。またmTOR阻害剤に関しては低酸素条件下ではないが予備実験は完了しており、4種類のmTOR阻害剤を組み合わせ、WST-1assayで検討することでHIF-1aの関連タンパクである（AKT, S6K, 4E-BP）のリン酸化が抑制されており、それにより細胞増殖が抑制された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素状態下においてHPV陽性細胞株とHPV陰性細胞株においてもHIF-1aの発現を認めてはいるが有意差は認めなかった。よって酸素濃度変化（1%、21%）させてHIF-1aをノックダウンした場合の細胞増殖の程度と関連するタンパク質の発現を確認する必要がある。

またmTOR阻害剤によりHIF-1 の上流にある低酸素に関連する標的分子の抑制による細胞増殖抑制を見いだせたことにより、低酸素環境の状態でのHIF-1a関連タンパクや細胞増殖の評価をさらに検討することで将来的に低侵襲治療につなげていけるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：The ultimate goal of this study is to elucidate the molecular mechanism of HPV-associated head and neck cancer under hypoxic conditions and to develop a novel therapeutic approach based on this mechanism.

HIF-1a expression was confirmed by Western blotting in HPV-positive and HPV-negative cell lines, and HIF-1a expression was observed in both lines under hypoxic conditions, but there was no significant difference. Preliminary experiments with mTOR inhibitors were completed, although not under hypoxic conditions, and the WST-1assay using a combination of four mTOR inhibitors suggested that phosphorylation of HIF-1a-related proteins (AKT, S6K, 4E-BP) was suppressed, which may have inhibited cell proliferation. This may have inhibited cell proliferation.

研究分野：耳鼻咽喉科学関連

キーワード：HIF-1a HPV関連頭頸部癌 HPV陽性細胞株 HPV陰性細胞株 mTOR阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 関連中咽頭癌は、予後が良いことから治療強度を下げ、治療による副作用を減じる臨床研究 (de-escalation 試験) が国内外で進行している。本邦では HPV ワクチンの重篤な副反応から積極的な接種が行われなかったことから、今後さらに HPV 関連中咽頭癌の増加は続くと考えられる。さらに頻度は少ないが副鼻腔癌、喉頭癌、口腔癌に HPV 関連癌が存在することが報告され、予後が良いとされている。HPV 関連癌は比較的低年齢で発症することより低侵襲な治療開発は喫緊の課題である。一方で HPV 関連癌の中にも予後が悪い症例も一定数経験する。癌組織は低酸素状態にあり、低酸素状態と治療抵抗性が関連していることは明らかになっているが、HPV 関連頭頸部癌における低酸素状態下の分子機構は報告が少ない。本研究では低酸素状態下の HPV 関連癌の分子機構を解明し、予後に関連するバイオマーカーを探索することで、これを応用した新規治療法の開発を最終目標とする。

2. 研究の目的

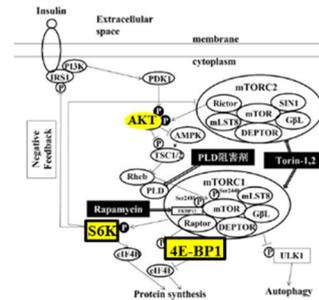
癌組織内では血管新生が増殖に追い付かず血管網が不完全な状態で、間質増殖による組織内圧の上昇が加わり、癌細胞巢の一部は低酸素状態にある。低酸素状態では種々のシグナル伝達系や遺伝子が活性化される。この中で中心的な役割を果たすものが低酸素誘導因子 (HIF) である。HIF は、 $\text{HIF-1}\alpha$ と $\text{HIF-1}\beta$ の 2 つのサブユニットが結合したヘテロ二量体であり、サブユニットとして HIF-1、HIF-2、HIF-3 が同定されている。HIF-1 は転写因子の一種であり、HIF-1 は通常の酸素濃度下ではユビキチン経路を介して速やかに分解されるが低酸素環境下では HIF-1 は分解されず安定化し、核内に移行して HIF-1 と結合することで転写因子として働く。低酸素状態下で、HIF は 60 以上の遺伝子 (血管新生、浸潤転移、代謝シフト、薬剤耐性など) に作用し、癌細胞は低酸素環境への適応と治療抵抗性を獲得する。HPV 陽性頭頸部癌細胞株または HPV 陰性株ではいずれも HIF-1 の発現を認めるがより HPV 陽性株において発現増強されることが報告 (Jennifer K, Oncotarget 52: 2017) されているが、HPV 感染と HIF-1 発現には関連がみられなかったとする報告も散見される (Hong A, Oral Oncol 49: 2012)。このように頭頸部癌では低酸素状態に起因する HIF-1 の高発現がみられるが、HPV 感染と HIF-1a の発現との関連は不明な点が多い。研究代表者は HIF に関する研究を続けており、HPV 非関連中・下咽頭癌 80 例 (進行癌) の HIF-1 発現と予後を解析したところ、HIF-1 高発現群は低発現群に比して 5 年粗生存率 ($p=0.033$) や 5 年無病生存率 ($p=0.015$) がともに有意に低い結果を得た。HPV 関連頭頸部癌における低酸素状態下の分子機構は不明の点が多く、本研究では低酸素状態下の HPV 関連癌の分子機構を解明し、これを応用した新規治療法の開発を最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株は SCC-4 (ヒト舌癌, HPV 陰性), SAS (ヒト舌癌, HPV 陰性), UMSCC-47 (ヒト口腔癌, HPV16 陽性), CaSki (子宮頸癌, HPV16 陽性), SiHa (子宮頸癌, HPV16 陽性), UPCI (ヒト舌根癌, HPV 陽性) を用いる。予備研究にてそれぞれの細胞株の HPV16 の感染ウイルス数や E2 (E6/E7 発現を調整する遺伝子) についてはすでに基礎解析を終了している。低酸素状態は 1% の酸素濃度に設定したインキュベーターを使用する。前研究では HPV 陽性株と HPV 陰性株を用いて低酸素条件を決めるために Real-time PCR を用いて HIF-1 の遺伝子発現

は確認できている。よって条件検討を行ったうえで細胞培養を行い HIF-1 の発現を Western blot で確認する。続けて HIF-1 をロックダウンすることで正常酸素下と低酸素下における HPV 陽性細胞株と HPV 陰性細胞株の増殖の程度と HIF-1 に関連したタンパク質の発現を検討する。

(2) 正常酸素下または低酸素下において HPV 陽性細胞株 (UM-SCC47) と HPV 陰性細胞株 (SAS) における mTOR 阻害剤を使用時の各関連タンパク質の発現を検討する。HIF-1a の上流にある PI3K/mTOR 経路における mTORC1 を選択的に阻害するテムスロリムス、エベロリムスを使用しまた mTORC1 と mTORC2 を同時に阻害する Torin1、Torin2 を使用することで、HIF-1a に関連する蛋白が抑制されるかどうかを検討する。

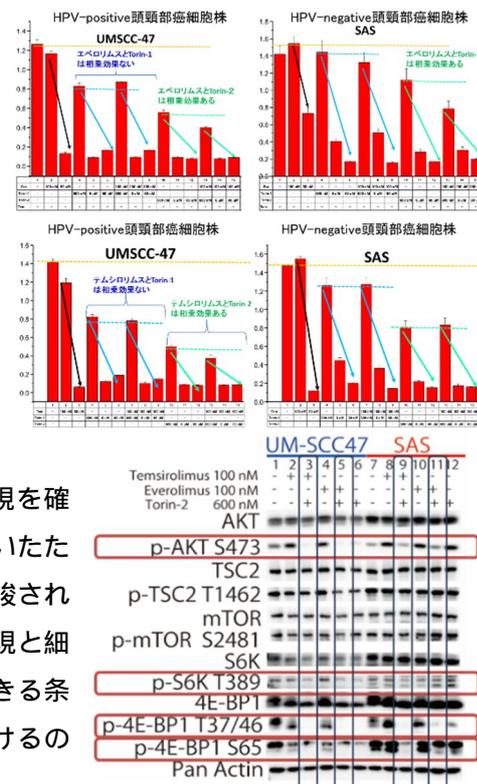


4. 研究成果

(1) HPV 陽性細胞株 (UMSCC-47、Caski、Siha、UPCI) と HPV 陰性細胞株 (Scc4、SAS) を用いて細胞培養し HIF-1a の発現を Western blot で確認したが、現時点で低酸素条件においてどちらの株においても HIF-1a の発現は認めているにもかかわらず有意差は認めなかった。HIF-1a の発現が微量あることから単純に HIF-1a の発現を評価する方法は困難であるのかと思われる。よって HIF-1a をロックダウンした場合の細胞増殖がどの程度なのかまたはその関連タンパク質 (E6/E7, Rb, p53, p21, Raptor, Rictor, AKT, S6K, 4EBP1, REDD-1) の発現がどのようになっているのか確認することにより低酸素状態における HIF-1a 発現との関連性を再評価していく必要がある。

(2) PI3K/mTOR 経路などの HIF-1 の上流にある低酸素に関連する標的分子を見いだすことには重要である。mTOR 阻害剤に関して低酸素条件下ではないが予備実験として 4 種類の mTOR 阻害剤を組み合わせ、WST-1 assay で検討することでテムスロリムスと Torin2 を組み合わせた場合に HPV 陽性株 (UMSCC-47) において、またエベロリムスと Torin2 を組み合わせた場合は HPV 陽性株 (UMSCC-47) と HPV 陰性株 (SAS) において相乗的に細胞増殖抑制効果が認められた。

この結果よりテムスロリムスまたはエベロリムスを Trin2 と組み合わせて使用した時のタンパク質の発現を確認すると AKT、S6K、4E-BP1 のリン酸化が抑制されていたため、その結果として細胞増殖が抑制された可能性が示唆された。この結果をふまえて低酸素条件にて HIF-1a の発現と細胞増殖の程度を比較検討し、効率よく細胞増殖抑制できる条件を見出すことで将来的に低侵襲治療につなげていけるのではないかと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------