

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462673

研究課題名(和文) マイクロアレイを用いたHPV関連頭頸部発癌と予後に関わるマイクロRNA異常解析

研究課題名(英文) Analysis of abnormal micro RNA expression associated with HPV-related head and neck carcinogenesis and prognosis using microarray.

研究代表者

石田 英一 (Ishida, Eiichi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：50644811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、欧米においてヒトパピローマウイルス(HPV)による中咽頭発癌の罹患率が上昇し、本邦においてもその重要度が増している。これを受けて中咽頭癌をはじめ内反性乳頭腫に合併した鼻副鼻腔癌、原発不明頭頸部癌など、本邦の幅広い頭頸部癌症例を対象にHPVの関与を解明した。また、中咽頭癌パラフィン検体から抽出したRNAを用いてマイクロRNAマイクロアレイを行い、本邦のHPV関連中咽頭癌に特徴的な発現変化を認めるマイクロRNAを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the prevalence of human papilloma virus (HPV)-related oropharyngeal cancer is increasing in European countries and the United States, and it is also becoming increasingly relevant in clinical practice in Japan. In response to this, we widely elucidated the association of HPV in Japanese head and neck cancer cases, such as oropharyngeal cancer and sinonasal cancer coexistent with inverted papilloma. In addition, as a result of the micro RNA microarray using extracted RNA from formalin-fixed paraffin-embedded oropharyngeal cancer specimens, we revealed micro-RNAs showing specific changes in expression in Japanese HPV-related oropharyngeal cancer cases. These could be implemented as a new prognostic or carcinogenic biomarker of HPV-related oropharyngeal cancer in the future.

研究分野：耳鼻咽喉科学、頭頸部外科学

キーワード：HPV ヒトパピローマウイルス 鼻副鼻腔内反性乳頭腫 鼻副鼻腔癌 原発不明頭頸部癌 中咽頭癌 マイクロRNA

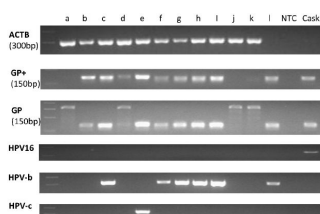
1. 研究開始当初の背景

2000 年以降、欧米を中心にヒトパピローマウイルス (HPV) による中咽頭発癌が注目されてきた。近年、アメリカでは 80%、スウェーデンでは 90% を超える高い HPV 陽性率が報告され、更に罹患率の上昇も認められるなど、世界各国で問題となってきた。その一方で、本邦での中咽頭癌の HPV 陽性率は 50% 程度と報告されているものの、疫学的側面としての時代推移や中咽頭癌以外の HPV 関連頭頸部癌頻度、型別の感染率や予後因子としての役割など不透明な点も多く、解明が望まれる。

2. 研究の目的

概要：上記背景を受けて本邦の HPV 関連頭頸部癌の解明のために 2 点にターゲットを絞った研究を申請した。1 つはパラフィン検体からの DNA 抽出と Genotyping を行うことで本邦の頭頸部癌症例における HPV 感染頻度の検討、2 つ目はマイクロ RNA のプロファイリングを行い、本邦の HPV 感染癌に特徴的なマイクロ RNA を網羅的に抽出し、診断マーカー、予後マーカーとしての役割を探求していくものである。

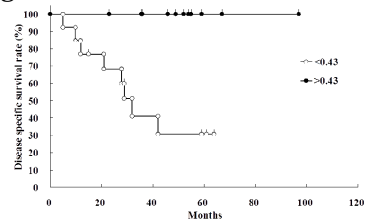
(1) 頭頸部がんは頭頸部領域における多臓器に発生する癌の総称であるが、治療は生命予後の改善とともに発声機能、咀嚼嚥下機能、聴覚・嗅覚・味覚などの感覚機能に代表される QOL の維持が非常に重要となる。その治療は、従来発生部位・ステージにより決定されてきたが、近年その発癌要因に着目したオーダーメイド医療の実現が大きなトピックになっている。特に喫煙、飲酒が発癌要因といわれてきた中咽頭癌において、近年アメリカなどを中心にヒトパピローマウイルス (HPV) による発癌が注目され、HPV 関連中咽頭癌研究は各国で積極的に展開されている。我々のグループは Johns Hopkins University, Division of Head and Neck Cancer Research との共同研究の中で頭頸部癌における HPV に関する研究を行っており、共同研究の実績として Hybrid capture2 法が子宮頸癌と同様に中咽頭癌の HPV 感染の有無を調べるのに適していること、中咽頭癌治療後の肺扁平上皮癌患者において、HPV は肺転移腫瘍にも確認され、原発性肺癌か転移性肺癌かの診断に有用であること、鼻副鼻腔扁平上皮癌患者において、HPV16 以外の高リスク型 HPV が感染していることなどを世界に先駆けて報告し、その一部はすでに論文発表されている (付図 1 参照)。



付図 1 アメリカ鼻副鼻腔癌における HPV タイピング

しかし一方で、本邦での感染頻度は約 50% 程度と報告されているものの、時代推移による感染頻度の上昇率や中咽頭癌以外の HPV 関連頭頸部癌頻度などまだまだ不明な点が多い。また、HPV16 型が多い欧米に対し、子宮頸癌の HPV 感染率をみても本邦の症例は変化に富んでおり、型別の感染率を詳細に見ている報告もない。さらには欧米における報告を見ると、HPV 関連癌は p53 が野生型であり、HPV 感染は予後良好化因子である一方で、HPV 感染癌においても予後不良である症例もあり不明点も多い。

近年、蛋白翻訳量の調節機構としてマイクロ RNA の存在が明らかとなり (Lee Cell 75(3):843,1993) 細胞の増殖、分化、アポトーシスと密接に関わっており、この点から、癌細胞の表現系に重要な働きを持っていると予測される。我々も has-miR-34a が、鼻副鼻腔扁平上皮癌のシスプラチン感受性マーカーであることを世界で始めて報告した (Ogawa 2012、付図 2)。



付図 2 本邦鼻副鼻腔癌における miR-34a 発現別疾患特異的生存率

そこで今回、本邦の HPV 関連頭頸部癌のさらなる発展のため、具体的にはトランスレショナルリサーチにターゲットを絞り、患者検体を用いた研究を申請したい。本研究では、研究目標を 2 つ設定し、1、凍結検体またはパラフィン検体からの DNA の抽出と各種 PCR 法、Direct Sequencing 法、免疫染色法などを用い、HPV 感染の有無、Genotyping を行っていき、本邦の感染率をはじめ、発癌因子研究のほか、欧米で提唱されている予後良好化因子としての側面を本邦の検体を用いても検討していく。例として、原発不明頸腫などをターゲットとし、予後良好化因子のみならず、原発不明頸腫の原発巣予測マーカーに HPV がなりうるか、HPV 関連中咽頭癌の治療後肺扁平上皮癌に対し、HPV を検索することで原発性肺癌なのか転移性肺癌なのかといった臨床診断の向上の礎となる研究を行っていきたい。2、HPV 関連癌の更なる予後規定バイオマーカーの検出のため、マイクロ RNA マイクロアレイを行い、特徴的な発現変化を示すマイクロ RNA を抽出し、定量 PCR 法による確認実験の後、その下流である遺伝子候補の蛋白発現を行い、抽出されたマイクロ RNA が HPV 関連中咽頭癌のバイオマーカーになりうるか検討していきたい。

(2) 本研究では、まず、パラフィンブロック

臨床検体を用い、時代別、部位の HPV 感染率を検討していく。付図 2 にあるように欧米においても HPV16 以外の頭頸部癌も見つかっており、本邦の子宮頸癌の型の多彩さからいっても新発見となる可能性がある。さらに、マイクロ RNA マイクロアレイを行い、HPV 感染ごとのマイクロ RNA プロファイリングを作成し、HPV 発がんマイクロ RNA、予後マーカーマイクロ RNA などを探っていく。次に、このプロファイリングの妥当性の評価を行った後に、最終的には原発不明頭頸部癌などにターゲットを絞り、穿刺吸引細胞標本や血清、唾液を用いた治療前診断の可能性を探っていくトランスレーショナルリサーチである。また、この研究を発展させ、細胞株を利用したマイクロ RNA 強制発現、RNAi により *in vitro*、さらに *in vivo* での増殖、転移能の評価を行う。

(3) HPV 研究は本邦においても鼻副鼻腔内向性乳頭腫や喉頭乳頭腫などで古くから行われており、低リスク型の HPV6,11 や高リスク型でも HPV16 は乳頭腫からの悪性化などに関わるといった報告は存在する。しかしその一方で、それらの報告の中でも HPV 感染不明の症例は多数存在しており、昨今の HPV 関連中咽頭癌の多数の報告を見ても、HPV 研究はこれからさらに発展していく状況である。HPV 関連癌は性感染症の側面を持っているため、本邦での HPV 関連頭頸部癌を細かく調査することは、その後の啓蒙活動、がん予防にも多いに役立つと思われる。幸いにして子宮頸癌ワクチンの臨床使用も可能となっている現在、世界的に問題となっている本研究のもたらす成果は国内外を問わず重要なものになる。

また、前述した我々の has-miR-34a の報告を含め頭頸部癌を含めた固形癌におけるマイクロ RNA プロファイリングは、発がん要因、予後予測因子として広く研究が行われている。HPV 感染マーカーとして p16 が知られており、HPV 関連癌は p53 が野生型であるなどの病理学的特長はすでに知られているが、その一方で喫煙者の HPV 関連頭頸部癌は非喫煙者と比較しても予後不良であるなどの報告もあり、HPV 感染のみが絶対的な予後良好化因子であるとは言い切れない。マイクロ RNA プロファイリングは、既存の予後規定バイオマーカーを越えるマーカーであるとの報告も多々あり、本邦における HPV 関連頭頸部癌研究に付随するテーマとして独創的であると考えられる。また、得られた新規マーカー RNA 群は、今後の頭頸部癌診断、治療のオーダーメイド化へ大きく寄与し、新治療開発へ大きく寄与するものと考えられる。さらに、RNAi は、その臨床応用を含め、現在非常に注目されている手法であり、抗癌剤耐性化遺伝子の knock down により抗癌剤応答の増強を認めた研究も報告されている (Bartz 2006, Materna 2006)。頭頸部癌は体

表に近い粘膜上皮から発生することを考えても、RNA oligo 導入の方法は variation が多くと考えられ、本研究成果はインパクトの強い結果となりうる。

3. 研究の方法

概要：パラフィン検体から DNA 抽出をし、頭頸部癌の組織別、HPV 型別の HPV 感染率を調査する。中咽頭癌においては年代別の感染率の調査もあわせて行う。その一方で、パラフィン検体からのマイクロ RNA 抽出とマイクロアレイを行い、HPV 感染タイプ別のマイクロ RNA プロファイリングを行う。定量 PCR 法による確認実験とその上流、下流のパスウェイ解析を行ったうえで、*in vitro* で強制発現、RNAi を用いた増殖能、浸潤能、転移能の評価実験を行う。更に、原発不明頭頸部癌などにおける原発巣マーカーとしての臨床応用の可能性を探る実験を行うとともに、*in vitro* での実験を続け、さらには、その実験結果を解析した上で耐性解除候補遺伝子については、mouse を用いた *in vivo* での耐性解除の研究を行う。

(1) FFPE 検体からの DNA、RNA 抽出、Human miRNA マイクロアレイ キット採取済みの頭頸部癌パラフィン検体からの DNA 抽出を行い、PCR 法で HPV タイピングを行う。HPV 感染が確認できた頭頸部癌についてはパラフィンまたは凍結標本からの RNA 抽出とマイクロ RNA 発現の測定を行う。マイクロアレイの結果により得られた候補マイクロ RNA につき、以下の実験を行う。

(2) Real time PCR

各マイクロ RNA 特異的 primer と蛍光 probe を購入し、定量的 PCR を行い発現量を検討する。さらに、発現変化が確認されたマイクロ RNA につき、下流蛋白について以下の実験を行う。

(3) Immunoblotting

特異的抗ヒト抗体を用い、ECL Detection Reagent (Amersham Biosciences K.K.) と LAS 1000 Plus with a Science Lab 99 Image Gauge (Fuji Photo Film, Minamiashigara, Japan) にて可視化し、下流の発現をみる。

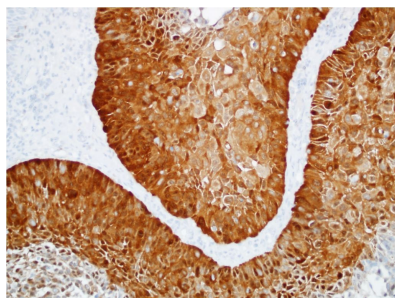
(4) マイクロ RNA (前駆体または阻害体) を lipofection 法にて遺伝子導入、MTT assay による増殖能の解析、マトリゲルを用いた浸潤能の解析。候補マイクロ RNA の導入は、作成されている miRNA precursor, inhibitor を購入し、Oligofectamine (Invitrogen) にて細胞内に導入する。

(5) *In vitro* での上記実験 4、5 を行い、関与が示された遺伝子群において、*in vivo* での

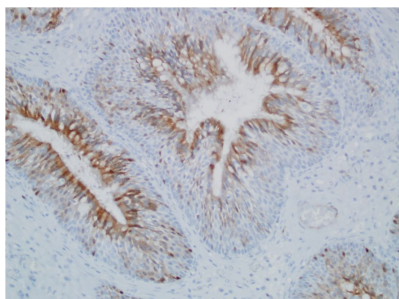
実験を行い、将来の臨床化の可能性を探る。候補遺伝子が確定された場合、血清、唾液、穿刺吸引細胞サンプルを用い、real timePCR法による検討を行い、実現可能なマーカーであるか検討を行う。

4. 研究成果

(1) 鼻副鼻腔内反性乳頭腫と扁平上皮癌 (SCC) 合併例における HPV の関与を検討した。SCC および内反性乳頭腫単独症例を比較対象としてパラフィン検体を用いて p16 免疫染色 (IHC)、DNA in situ hybridization (ISH)、PCR、direct sequencing による HPV 検索の検討を重ねた結果、43 例の鼻副鼻腔疾患症例において十分な検討が行えた。p16 は SCC の 25%、内反性乳頭腫合併 SCC の 40% で陽性である一方、内反性乳頭腫における陽性例は見られなかった (付図 3、4 参照)。PCR では SCC の 50%、内反性乳頭腫合併 SCC の 80%、内反性乳頭腫の 55.6% に HPV の存在が証明され、HPV タイピングでは SCC および内反性乳頭腫合併 SCC では半数が type 16 陽性である一方、内反性乳頭腫に type 16 は認めなかった。以上から、高リスク型 HPV である type 16 が鼻副鼻腔腫瘍の悪性転化に関与する可能性が示唆された。その一方で HPV 関連中咽頭癌に比し、鼻副鼻腔腫瘍検体では PCR や DNA-ISH での HPV 検出が不安定で難しいことや、p16-IHC と HPV 陽性鼻副鼻腔癌との相関が弱いことなどから、鼻副鼻腔癌症例における p16 や HPV 関連癌の臨床的意義解釈には更なる検討が必要と考えられた。



付図 3 p16-IHC 陽性鼻副鼻腔癌

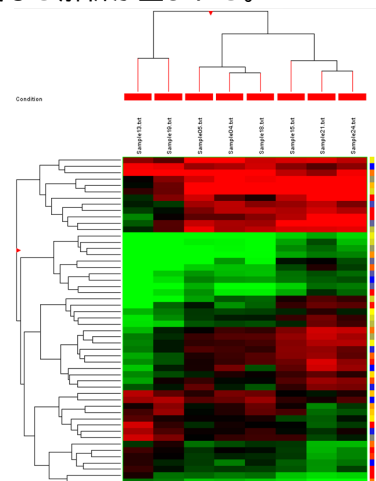


付図 4 内反性乳頭腫における p16-IHC

(2) 原発不明頸部癌症例で導入化学療法や化学放射線療法などを先行せずに、初回治療として口蓋扁桃摘出術による組織検査を行い

えたものは 12 例あり、その内 7 例 (58.3%) は口蓋扁桃に原発巣を認め最終的に中咽頭癌と診断された。組織型は SCC が 6 例、Nasopharyngeal cancer (NPC) が 1 例であった。この 7 例中、5 例のみが病理標本を用いた追加検討が可能であったが、5 例いずれも p16-IHC 陽性かつ PCR にて HPV の存在が確認され、HPV 関連中咽頭癌と診断した。以上より、原発不明癌と診断される中咽頭癌症例は HPV 関連癌である可能性が高いことが示唆され、これは HPV が扁桃陰窩の奥の基底膜に感染することから口蓋扁桃表層ではなく深部に好発し、原発が確認しにくいことが主な原因と考えられた。原発不明癌の日常診療においては扁桃の視診のみでなく触診にて深部の硬結を確認することや、Positron emission tomography (PET)、MRI などの画像モダリティによる扁桃部の評価が肝要と考えられた。

(3) 中咽頭癌のパラフィン検体から抽出した RNA を用いてマイクロ RNA マイクロアレイを行い、特に HPV 感染有無別にマイクロ RNA プロファイリングを施行した。その結果、HPV 関連中咽頭癌に特異的な発現変化を認めるマイクロ RNA を最終的に 8 個を抽出した (付図 5 参照)。これらは定量 PCR においてその発現を確認した。HPV 陽性咽頭癌細胞株ならびに陰性細胞株を用い、マイクロ RNA 前駆体および阻害体の遺伝子導入により細胞増殖能や表面分子マーカーなどの表現系に影響しうるマイクロ RNA を探したが、現時点では有意な結果を得るには至らなかった。しかし、本研究を申請して間もなく、欧州より HPV 関連中咽頭癌を対象とした質の高いマイクロ RNA マイクロアレイ解析結果が報告され (Lajer, 2012) 我々が得たマイクロ RNA リストと多くの重複を認め、有力なリストと考えられる一方、異なるものについては地域ないし人種特異的な変化の可能性があり、日本ひいてはアジアにおけるデータとして価値のあるものと考えられた。今後、更なる解析が望まれる。



付図 5 マイクロアレイデータのクラスタリング

(4) 近年、悪性黒色腫や肺癌などで次々に臨床応用され、各種固形癌における役割解明の需要が急激に高まりつつある免疫チェックポイント分子にも注目し、HPV 関連中咽頭癌および非関連癌との間で発現パターンや発現率の差を検討した。その結果、本邦の検体においては欧米からの報告と異なった傾向が確認され、今後、地域や人種差を考慮した臨床適用判断が必要となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Peng S, Mattox A, Best SR, Barbu AM, Burns JA, Akpeng B, Jeang J, Yang B, Ishida E, Hung CF, Wu TC, Pai SI. Identification of the murine H-2D(b) and human HLA-A*0201 MHC class I-restricted HPV6 E7-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 Mar;65(3):261-71. doi: 10.1007/s00262-016-1793-x. 査読有

Nakano T, Saiki Y, Kudo C, Hirayama A, Mizuguchi Y, Fujiwara S, Soga T, Sunamura M, Matsumura N, Motoi F, Unno M, Horii A. Acquisition of chemoresistance to gemcitabine is induced by a loss-of-function missense mutation of DCK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Sep 4;464(4):1084-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.080. 査読有

Begum S, Hayashi M, Ogawa T, Jaboune FJ, Brait M, Izumchenko E, Tabak S, Ahrendt SA, Westra WH, Koch W, Sidransky D, Hoque MO. An integrated genome-wide approach to discover deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer: Clinical significance of miR-23b-3p deregulation. *Sci Rep.* 2015 Aug 28;5:13236. doi: 10.1038/srep13236. 査読有

Maejima R, Iijima K, Koike T, Ara N, Uno K, Hatta W, Ogawa T, Watanabe K, Katori Y, Shimosegawa T. Endoscopic balloon dilatation for pharyngo-upper esophageal stricture after treatment of head and neck cancer. *Dig Endosc.* 2015 Mar;27(3):310-6. doi: 10.1111/den.12345. 査読有

Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F, Ravi R, Sidransky D, Keidar M, Trink B. Cold

atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2014 Oct;34(4):941-6. doi: 10.3892/ijmm.2014.1849. 査読有

Smith DF, Maleki Z, Coughlan D, Gooi Z, Akpeng B, Ogawa T, Bishop JA, Frick KD, Agrawal N, Gourin CG, Ha PK, Koch WM, Richmon JD, Westra WH, Pai SI. Human papillomavirus status of head and neck cancer as determined in cytologic specimens using the hybrid-capture 2 assay. *Oral Oncol.* 2014 Jun;50(6):600-4. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.02.011. 査読有

Imai T, Matsuura K, Asada Y, Sagai S, Katagiri K, Ishida E, Saito D, Sadayasu R, Wada H, Saijo S. Effect of HMB/Arg/Gln on the prevention of radiation dermatitis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2014 May;44(5):422-7. doi: 10.1093/jjco/hyu027. 査読有

Chen N, Sato D, Saiki Y, Sunamura M, Fukushima S, Horii A. S100A4 is frequently overexpressed in lung cancer cells and promotes cell growth and cell motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 May 9;447(3):459-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.025. 査読有

Saiki Y, Horii A. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathol Int.* 2014 Jan;64(1):10-9. doi: 10.1111/pin.12114. Review. 査読有

Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K, Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushima S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A. Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 8;441(1):102-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.010. Epub 2013 Oct 14. 査読有

Tsukamoto N, Egawa S, Akada M, Abe K, Saiki Y, Kaneko N, Yokoyama S, Shima K, Yamamura A, Motoi F, Abe H, Hayashi H, Ishida K, Moriya T, Tabata T, Kondo E, Kanai N, Gu Z, Sunamura M, Unno M, Horii A. The expression of S100A4 in human pancreatic cancer is associated with invasion. *Pancreas.* 2013 Aug; 42(6):1027-33. doi: 10.1097/MPA.0b013e31828804e7. 査読有

Bishop JA, Ogawa T, Stelow EB, Moskaluk CA, Koch WM, Pai SI, Westra WH. Human papillomavirus-related carcinoma with adenoid cystic-like features: a peculiar variant of head and neck cancer restricted to the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol.* 2013 Jun;37(6):836-44. doi: 10.1097/PAS.0b013e31827b1cd6. 査読有

Nomura K, Ogawa T, Sugawara M, Honkura Y, Oshima H, Arakawa K, Oshima T, Katori Y. Association between septal deviation and sinonasal papilloma. *Tohoku J Exp Med.* 2013; 231(4): 315-9. https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/231/4/231_315/_article, 査読有

〔学会発表〕(計2件)

Takenori Ogawa, Eiichi Ishida, Kenjiro Higashi, Yuriko Saiki, Shun Sagai, Ayako Nakanome, Akira Okoshi, Masayuki Shirakura, Yukio Katori, Akira Horii. The roll of Human papilloma virus type 16 associated with malignant transformation of sinonasal squamous cell carcinoma. World Skull Base 2016 (国際学会) 2016年6月14~17日、Osaka international convention center, Osaka

小川武則、野村和弘、荒川一弥、石田英一、中目垂矢子、東賢二郎、石井亮、嵯峨井俊、香取幸夫、鼻副鼻腔乳頭腫由来癌の臨床像、第27回日本頭蓋低外科学会、2015年7月9~10日、名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 英一 (ISHIDA, Eiichi)
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・
非常勤講師
研究者番号: 50644811

(2)研究分担者

小川 武則 (TAKENORI, Ogawa)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 50375060

堀井 明 (HORII, Akira)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授

研究者番号: 40249983

齋木 由利子 (SAIKI, Yuriko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教

研究者番号: 80311223