

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462598

研究課題名(和文) ヒト乳頭腫ウイルスシグナル伝達に着目した喉頭乳頭腫に対する新規治療の開発

研究課題名(英文) Therapeutic approach to recurrent respiratory papillomatosis from the perspective of signal transduction of human papillomavirus

研究代表者

室野 重之 (Murono, Shigeyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20345622

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)：ヒトパピローマウイルス(HPV)が関連する難治性の疾患である喉頭乳頭腫の研究モデルを作成するため、培養細胞の樹立を試みた。乳頭腫組織から腫瘍細胞の生着を認めたが、継代することは困難であった。一方、新たな治療の探索のため、腫瘍細胞における免疫染色で、腫瘍のfibrovascular coreにある血管の周囲に血管新生因子である血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を確認した。VEGFは血管構造が明らかとなる以前のfibrovascular core様構造箇所に発現していることも確認され、抗VEGF療法の可能性がうかがわれた。

研究成果の概要(英文)：Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is a refractory human papillomavirus (HPV)-associated disease. We tried to establish a tissue culture model of RRP. We confirmed growth of tumor cells in the primary tissue culture. However, continuing growth of those cells could not be achieved in following passage. On the other hand, immunohistochemistry was also performed to investigate a factor for a novel therapy. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was observed around fibrovascular cores of RRP. VEGF was observed in cores without an obvious vascular structure. Therefore, anti-VEGF antibody therapy can be a candidate for a novel therapy of RRP.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：喉頭乳頭腫 HPV VEGF

1. 研究開始当初の背景

喉頭乳頭腫はヒトパピローマウイルス (HPV) が関連する良性腫瘍であるが、再発率の極めて高い難治性の疾患であり、臨床的には悪性と言ってもよい疾患である。治療はレーザー手術が標準的とされているが、その再発率の高さゆえ、根治よりも単に呼吸路の確保のために幾度の手術を余儀なくされることも少なくない。種々の補助療法が試みられ、インターフェロン投与などの報告もあるが、エビデンスには乏しく満足のいく効果は得られていない。近年では、欧米において抗ウイルス薬であるシドフォビル[®]の局所投与の有効性が示されており、研究者らも施行の経験があるが、未承認薬であることなど使用にあたってのハードルが高い。

このような背景により、喉頭乳頭腫に対する新たな補助療法の開発が望まれるが、世界レベルで見ても喉頭乳頭腫と HPV に関する基礎的研究はほとんど進んでいない。

研究者らはこれまで、エプスタイン・バーウイルス (EBV) 関連腫瘍である上咽頭癌の発癌および転移能亢進のメカニズムについて、EBV の癌蛋白である潜伏膜蛋白 (LMP) 1 のシグナル伝達に着目して解明に取り組み、それを利用した薬物療法の可能性について研究し、報告してきた (Murono S, et al. Cancer Res 2000. Murono S, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001.)。

そこで、ウイルス関連腫瘍におけるこれまでの研究から、喉頭乳頭腫においても、シグナル伝達に着目して従来にない視点から実現可能性の高い新たな治療を開発することが可能であろうと推測し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

(1) 喉頭乳頭腫の培養細胞モデルを作成できるか?

喉頭乳頭腫の培養細胞モデルの報告はわずかしか見られない。本研究では、喉頭粘膜の基底細胞に感染するという HPV の特徴を考慮し、基底膜成分であるマトリゲルもしくはコラーゲンを足場とした細胞培養環境を作成することにより、喉頭乳頭腫組織からの初代培養を試み、さらには継代による細胞株としての樹立を第一の目的とする。

(2) 上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナル系は活性化されているか?

近年注目されている HPV 関連の中咽頭癌では、高リスク型 HPV が関与し、HPV は宿主 DNA に組み込まれた形態 (直線構造) となっているが、喉頭乳頭腫における低リスク型 HPV は宿主 DNA に組み込まれずエピソーム (環状構造) として存在している。

HPV 関連中咽頭癌では上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現はむしろ低下していると言われているが、喉頭乳頭腫においては高リスク型と異なるシグナル伝達系であることも予想される。本研究では、乳頭腫細胞における EGFR およびリン酸化 EGFR の発現を

検証し、抗 EGFR 抗体および EGFR チロシンキナーゼ阻害薬を使用して乳頭腫細胞の増殖が抑制されるか検証する。

(3) 喉頭乳頭腫組織における発現は?

培養細胞モデルで検証する EGFR およびリン酸化 EGFR の発現につき、手術により採取した喉頭乳頭腫組織における発現を検証する。

また、臨床においては、喉頭内視鏡による観察で乳頭状の個々の小腫瘍塊の中央に毛細血管がのびている特徴的な所見を認める。そのため、喉頭乳頭腫組織における血管新生因子の発現についても検証する。

(4) うがい液からの HPV DNA 検出

付随研究として、喉頭乳頭腫の新規治療の開発の一助となるよう、うがい液から HPV DNA の検出が可能かも検討する。

3. 研究の方法

(1) 喉頭乳頭腫の培養細胞モデルの作成

培養細胞モデルの作成にあたり、3つの条件を設定して、手術により採取し細切した組織を培養シャーレに密着させた。培養シャーレに細切組織を直接置き、培養液で被覆した。培養シャーレに細切組織を直接置き、コラーゲンゲルで覆った後に培養液で被覆した。細切組織を培養シャーレ中でコラーゲンゲル内に包埋し、培養液で被覆した。腫瘍塊からの細胞の増殖を倒立顕微鏡下に観察し、これらの中から最適のものを選定し、培養モデル作成条件とする。初代培養の後に、トリプシンを用いて細胞をはがし、継代を試みる。

(2) 上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現とシグナル伝達系の評価

確立された培養細胞モデルを用いて EGFR シグナル伝達系の活性化を検証する。培養細胞を回収し、ウェスタンブロットにより EGFR, リン酸化 EGFR の発現を検討する。さらに下流のシグナル伝達系においてもウェスタンブロットにより発現を検証する。

さらに、種々の癌において臨床でも使用されている抗 EGFR 抗体 (セツキシマブ) および EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (ゲフィチニブ, エルロチニブ) を培養液に追加することにより、乳頭腫の増殖が抑制されるか検証する。

(3) 喉頭乳頭腫組織における発現

手術により採取したパラフィン包埋検体から薄切標本を作成し、EGFR, リン酸化 EGFR, EGFR 下流のシグナル伝達因子、血管内皮増殖因子 (VEGF) や誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) などの血管新生因子の発現を免疫組織化学染色により検討する。

(4) うがい液からの HPV DNA 検出

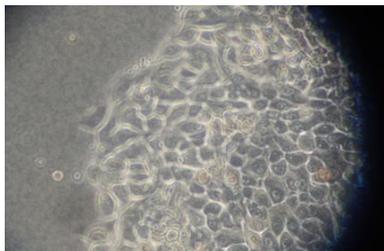
喉頭乳頭腫患者のうがい液を採取し、遠心後に細胞を回収する。別に口蓋扁桃の擦過検体も採取し、細胞を回収する。それぞれより DNA を抽出し、 β -グロビンに対する PCR が陽性の検体において、多くのサブタイプのある

HPV を普遍的に検出することが示されている GP5+/GP6+プライマーを用いた PCR を行い、HPV DNA の検出を行う。

4. 研究成果

(1) 喉頭乳頭腫の培養細胞モデルの作成

培養細胞モデルの作成にあたっての3つの条件の結果は、乳頭腫細胞の増殖を認めなかった、細切組織の周囲に上皮細胞の増殖を認め乳頭腫細胞と考えられた、乳頭腫細胞の増殖を認めなかった、であった。したがって、喉頭乳頭腫組織からの初代培養ではの方法が適切と考えられた



【図1】の方法により観察された喉頭乳頭腫細胞と考えられる上皮細胞。

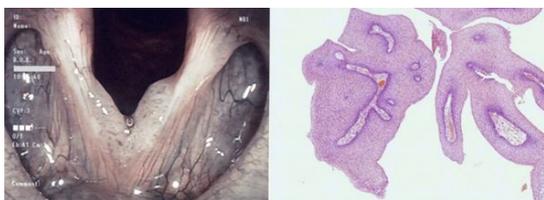
続いて、コラゲナーゼにより被覆したコラーゲンを分解した後、トリプシンを用いて増殖した細胞をはがし、新たにシャーレに培養を開始した。乳頭腫と思われる細胞の増殖を認めたため、さらにトリプシンではがした後、種々の研究目的のため分注して増殖を試みたが、それ以降の増殖は確認されなかった。

(2) 上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナル系は活性化

(1)の結果のとおり、分注後の増殖が確認されず、EGFRの発現やEGFRシグナル伝達系の評価は不可に終わった。

(3) 喉頭乳頭腫組織における発現

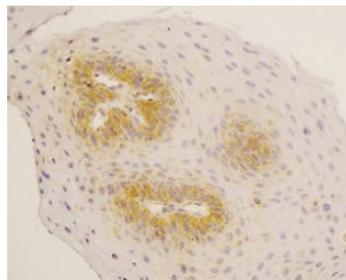
喉頭内視鏡における狭帯域光観察 (NBI) では、乳頭状の個々の小腫瘍塊は厚みのある上皮細胞層の表れとして白色調に観察され、さらにそれぞれの中央にのびる毛細血管が点状あるいはループ状に茶色く観察される特徴的所見が得られた。これは、肥厚した重層扁平上皮を構成する腫瘍細胞とその中心の線維血管束 (fibrovascular core) という組織レベルでの特徴を反映するものと考えられた。



【図2】(左) NBI内視鏡による喉頭乳頭腫の観察。(右) 喉頭乳頭腫のHE染色像。

また、免疫組織化学染色では、全例においてVEGFの発現をfibrovascular core周囲に認めた。さらに興味深いことに、fibrovascular core様の組織構築を示すが毛

細血管の管腔を明らかに確認しえない箇所においても、VEGFの発現を認めた。これは、毛細血管構築に先立ってVEGFが発現することを示唆し、喉頭乳頭腫における血管新生を示しているものと思われた。



【図3】喉頭乳頭腫におけるVEGF発現。

さらに、VEGFの誘導因子とも考えられるシクロオキシゲナーゼ (COX)-2はVEGFの発現に一致するように観察され、VEGF誘導に寄与するものと推測された。一方、血管新生作用の知られているiNOSの発現はVEGFに比べると弱いものの、観察された。

(4) うがい液からのHPV DNA 検出

全検体でβ-グロブリンは陽性であった。先行研究により、DNA量の微小な検体においては、GP5+/GP6+プライマーを用いたPCRによるHPV DNA検出は、同一プライマーを用いてPCRを2回行う (auto-nested PCR) ことにより、少なくとも10²オーダーで検出感度が高まることを見出した。したがって、うがい液、口蓋扁桃擦過検体ともにauto-nested PCRにより評価した。

喉頭乳頭腫患者7例から検体を採取した。うがい液では5例においてHPV DNAを検出したが、口蓋扁桃擦過検体には検出しなかった。うがい液中のHPV DNA検出は喉頭乳頭腫において病勢を反映するマーカーとしての有用性がうかがわれた。

PC	乳頭腫1	乳頭腫2	乳頭腫3	乳頭腫4	乳頭腫5	乳頭腫6	乳頭腫7	NC
うがい液	+	+	+	+	+	+	+	-
扁桃擦過検体	-	-	-	-	-	-	-	-

【図4】喉頭乳頭腫症例のうがい液および口蓋扁桃擦過検体からのHPV DNA 検出。

なお、本研究期間中の2016年に研究代表者の所属機関変更が生じたため、研究環境の整備ならびに倫理委員会への新たな申請等に時間を要し、当該年度の進捗に大きな遅延を生じた。

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4件)

Murono S, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Yoshida H, Yoshizaki T. Trends in the management of recurrent respiratory papillomatosis in Japan. *Auris Nasus Larynx* 42: 218-220, 2015. 査読有. Doi: 10.1016/j.anl.2014.10.006.

Yoshida H, Murono S, Ueno T, Nakanishi Y, Tsuji A, Hatano M, Endo K, Kondo S, Sugimoto H, Wakisaka N, Yoshida H, Yoshizaki T. Usefulness of human papillomavirus detection in oral rinse as a biomarker of oropharyngeal cancer. Acta Otolaryngol, in press. 査読有 . Doi: 10.1080/00016489.2016.1274426. Murono S, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Yoshida H, Yoshizaki T. Intralesional cidofovir injection for recurrent respiratory papillomatosis in Japan. Auris Nasus Larynx 43: 541-545, 2016. 査読有 . Doi: 10.1016/j.anl.2016.01.005. Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Nakanishi Y, Ishikawa K, Komori T, Moriyama-Kita M, Endo K, Murono S, Wang Z, Kitamura K, Nishiyama T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Muramatsu M, Yoshizaki T. APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers. Oncogene 36: 1687-1697, 2017. 査読有 . Doi: 10/1038/onc.2016.335.

〔学会発表〕(計5件)

室野重之, 吉崎智一. NBI 内視鏡による喉頭乳頭腫の観察. 第66回日本気管食道科学会 2014年11月13日~14日. 高知. Shigeyuki Murono, Yosuke Nakanishi, Tomokazu Yoshizaki. Angiogenic factors in recurrent respiratory papillomatosis. 30th International Papillomavirus Conference. September 17-21, 2015. Lisbon, Portugal. Shigeyuki Murono, Yosuke Nakanishi, Tomokazu Yoshizaki. Angiogenic factors in recurrent respiratory papillomatosis. 19th World Congress for Bronchoesophagology. May 5-11, 2016. Florence, Italy. 室野重之, 中西庸介, 辻 亮, 遠藤一平, 近藤 悟, 脇坂尚宏, 吉崎智一. 喉頭乳頭腫における VEGF-A の発現. 第117回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2016年5月19日~21日. 名古屋. 室野重之, 上野貴雄, 中西庸介, 辻 亮, 遠藤一平, 近藤 悟, 脇坂尚宏, 吉崎智一. うがい液 HPV 検出の中咽頭癌バイオマーカーとしての可能性. 第40回日本頭頸部外科学会. 2016年6月9日~10日. さいたま.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等はなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室野 重之 (MURONO, Shigeyuki)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20345622

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉崎 智一 (YOSHIZAKI, Tomokazu)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 70262582

脇坂 尚宏 (WAKISAKA, Naohiro)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 70377414

近藤 悟 (KONDO, Satoru)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号: 70436822

(4) 研究協力者

なし