

令和元年6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11242

研究課題名（和文）中咽頭癌発癌における口腔内マイクロバイオームの関与

研究課題名（英文）The Role of Oral Microbiome in Human Oropharyngeal Cancer

研究代表者

高橋 秀聡（Takahashi, Hideaki）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50727196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、様々な疾患の発生に口腔や腸内の細菌叢（マイクロバイオーム）が関与していることが明らかになってきた。この研究の目的はヒト乳頭腫ウイルス（human papillomavirus: HPV）関連中咽頭癌の発癌における口腔内マイクロバイオームの関与を検討することである。今回の研究期間内においては、マイクロバイオームの影響を詳細に解析するための予備実験として、新しい癌の進行度分類によるHPV関連中咽頭癌の予後の検討や、HPV関連中咽頭癌に特に発現している遺伝子やマイクロRNAの検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロバイオームは様々な疾患の発生や動態に影響を与えていることが分かってきており、中咽頭癌患者における口腔内マイクロバイオームの具体的な組成がどのようになっているかや、中咽頭癌の発生における口腔内マイクロバイオームの実際の関与の仕方が明らかになれば、口腔内の唾液採取だけから中咽頭癌のリスクを診断することや、中咽頭癌の新しい治療薬開発の手掛かりを見つけることが可能になる可能性がある。今回の研究成果として、HPV関連中咽頭癌の進行度分類や遺伝子に関して検討を行い、マイクロバイオーム解析のための素地を作った。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become clear that the bacterial flora (microbiome) in oral cavity or intestine is involved in the occurrence of various diseases. The purpose of this study is to investigate the involvement of oral microbiome in carcinogenesis of human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal cancer. As a preliminary experiment to analyze the effects of microbiome, we performed the prognostic examination of HPV-related oropharyngeal cancer by new cancer progression classification, and identified expression genes and microRNAs in HPV-related oropharyngeal cancer.

研究分野：腫瘍学

キーワード：中咽頭癌 ヒト乳頭腫ウイルス 口腔内マイクロバイオーム 発癌 ディスバイオーシス

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の発癌因子は喫煙、飲酒の他にウイルス感染が挙げられる。ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) は子宮頸癌の発症に関与することが知られているが、頭頸部においても特に扁桃原発の中咽頭癌発症に HPV 感染が深く関わっていることが明らかになった (Marur et al. *Lancet Oncol.* 2010)。世界的に喫煙率が減少するに伴って頭頸部癌全体の発症率は減少してきているにも関わらず、中咽頭癌は年々増加傾向である (Chaturvedi et al. *J Clin Oncol.* 2011)。

最近の研究から子宮頸癌を含む HPV 関連癌と HPV 関連中咽頭癌は発癌機構が全く異なることが分かってきた。子宮頸癌では前癌病変が認められるが、HPV 関連中咽頭癌では通常前癌病変は認めない。また HPV 感染による発癌は、HPV E6 タンパク質による p53 タンパク質の機能喪失や、HPV E7 タンパク質による Rb タンパク質の不活化が重要な発癌機構であると考えられてきたが、HPV 陽性頭頸部癌では E6/E7 mRNA を検出できる症例は 11 - 50%に限られる。更に、子宮頸癌では多くのハイリスク HPV で発癌への関与が認められている一方、HPV 関連中咽頭癌で検出される HPV はほぼ全て 16 型である。その他に、HPV 関連中咽頭癌は早期にリンパ節転移を起こすという特徴もあり、HPV 感染による中咽頭癌発癌は他癌と比較し非常にユニークである。我々の研究グループは中咽頭癌発癌の機序について、HPV のヒトゲノムへの組み込みとエピゲノム変化という視点から取り組んでいるが、その詳細は未だ明らかになっていない。

近年、ヒト生命現象がヒトゲノムの多様性だけでは説明できないことが明らかになってきており、同時に人体のあらゆる部位に存在する細菌叢 (マイクロバイオーーム) と様々な疾患との関連が明らかになっている。口腔や腸管、皮膚には多種多様な細菌が生存しているが、従来は細菌の役割を解析するために単離培養を行う必要があった。実際にはすべての細菌を培養するのは非常に困難であり、口腔を含むマイクロバイオーームの全貌は不明であった。そこで、マイクロバイオーームの解析においてメタゲノム解析が注目されている。これは培養という過程を経ずに細菌叢がもつゲノムをすべて抽出し、これらを網羅的に解析する手法で、細菌叢を構成する微生物の種類や量を測定するだけでなく、疾患の発生や進展に影響を及ぼしうる遺伝子産物を同定することが可能になると期待されている。発癌におけるマイクロバイオーームの関与は大腸癌の発癌に関して研究が進んでおり、細菌叢の異常 (ディスバイオーシス) による慢性炎症の助長 (NF- $\kappa$ B の活性化と CXCL8 の産生阻害) に関する *F. prausnitzii* の減少等)、バリア機構の破綻、DNA 損傷、腫瘍原性物質などに伴うものが報告されている (Schwabe & Jobin. *Nat Rev Cancer.* 2013)。頭頸部領域では、ファンコーニ貧血患者において特徴的に認められる *Mycoplasma salivarium* と口腔癌の関連性が示された (Henrich et al. *PLoS One.* 2014) ほか、リンパ節転移を有する口腔癌患者において、特徴的なマイクロバイオーームが構成されていることが報告された (Schmidt et al. *PLoS One.* 2014)。しかし、HPV 関連中咽頭癌の発癌と口腔内マイクロバイオーームの関連性を指摘した報告は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) 関連中咽頭癌の発癌における、口腔内マイクロバイオーームの関与を検討することである。具体的には、中咽頭癌患者及び非患者の口腔内の菌叢構造解析を実施し、1. HPV 感染のある中咽頭癌 (HPV 関連中咽頭癌) 群、2. HPV 感染のない中咽頭癌 (従来型中咽頭癌) 群、3. 非患者群の間で口腔内マイクロバイオーームの系統組成とその機能組成を比較する。これにより、HPV 感染のある中咽頭癌に特異的と考えられる口腔内マイクロバイオーーム組成とその機能を明らかにし、発癌機序の解明や新規創薬標的の探索研究へとつなげる。

## 3. 研究の方法

### 検体の採取

横浜市立大学附属病院で診断され初回治療予定である中咽頭癌患者を対象とし、治療開始前に唾液を採取した。コントロール群として頭頸部領域に悪性腫瘍の既往がなく、口腔内を含む耳鼻咽喉科領域に炎症性疾患を有さない当施設受診患者を対象とし唾液を採取した。

### 中咽頭癌症例の分類

中咽頭癌症例を HPV 関連中咽頭癌群と、HPV 感染のない従来型中咽頭癌群に分類した。またそれぞれの群を頸部リンパ節転移陽性群と陰性群に分類した。

HPV 感染の有無は、マウスモノクローナル抗体を用いて腫瘍組織における p16 の発現を免疫組織化学によって評価し判定した。p16 陽性は 70% 以上の腫瘍細胞における強力かつびまん性の核および細胞質が染色されることと定義し、当施設の複数名の病理診断専門医により判定された。

頸部リンパ節転移の有無は、超音波検査、コンピュータ断層撮影検査 (CT)、FDG PET-CT を用いて総合的に評価され、複数の耳鼻咽喉科専門医のカンファレンスによって判定した。

### **HPV 関連中咽頭癌の TNM 分類と予後予測に関する検討**

平成 29 年度に改訂された AJCC/UICC TNM 分類 第 8 版に基づき、当施設における HPV 関連中咽頭癌患者を後方視的に再分類し、新しい TNM 分類が HPV 関連中咽頭癌患者の転帰を予測できるかについて検討した。

2001 年 11 月から 2015 年 7 月の間に当施設で診断を受け、根治的放射線療法または放射線併用化学療法を受けた中咽頭癌患者 91 例を対象とした。すべての患者は身体検査、内視鏡検査、コンピュータ断層撮影検査 (CT)、磁気共鳴画像検査 (MRI)、FDG PET-CT を使用して病変を評価し、後方視的に第 7 版および第 8 版の AJCC/UICC TNM 病期分類に従って分類された。本計画は当該施設の倫理委員会によって審査され承認を受けた。

統計学的分析として、カイ二乗検定を用いた変数間の相関関係の分析、Kaplan-Meier 生存曲線と Wilcoxon log-rank 検定を用いた生存時間分析、ロジスティック回帰分析による単変量および多変量解析をそれぞれ行った。JMP ソフトウェア (version 12.2.0, SAS Institute Inc., Cary, US) および GraphPad Prism (version 6.05, GraphPad Software, San Diego, CA) を使用した。すべての解析において、 $P < 0.05$  を統計的に有意と見なした。

### **HPV 関連中咽頭癌に特異的に発現する遺伝子, microRNA の検討**

The Cancer Genome Atlas (TCGA) から頭頸部扁平上皮癌のプロジェクトのデータを入手した。臨床データを参照し原発巣が扁桃、舌根、中咽頭のものの中咽頭癌データセットとして抽出し、さらに HPV 感染状態のステータスを用いてそれらを HPV 関連中咽頭癌データセット、従来型中咽頭癌データセットに分類した。HPV 関連中咽頭癌データセット、従来型中咽頭癌データセットの RNA-seq, microRNA-seq のデータをそれぞれ比較して、従来型中咽頭癌と比較して HPV 関連中咽頭癌に特異的に発現している mRNA および microRNA を同定した。発現変動解析には R の limma パッケージ (version 3.40.2) を使用し、Benjamini-Hochberg (BH 法) 補正  $P < 0.05$  かつ  $\log_2$  Fold Change 絶対値  $> 1$  を有意と見なした。

## 4. 研究成果

### **中咽頭癌患者唾液検体の採取**

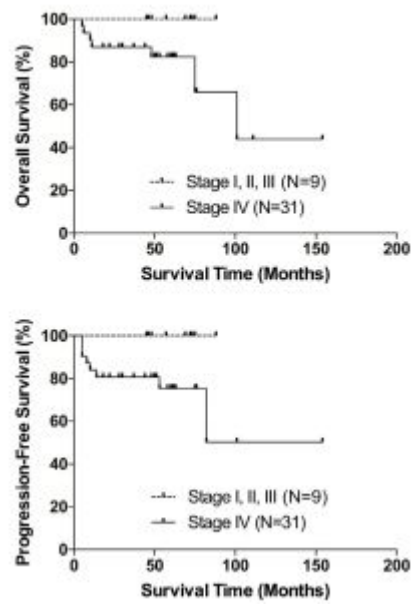
横浜市立大学附属病院で診断され初回治療予定である中咽頭癌患者を対象とし、治療開始前に唾液を採取した。研究計画では採取した唾液検体を用いて、16S リボソーム RNA 遺伝子を標的としたメタ 16S 解析を行い、マイクロバイオームの組成を解析する予定であったが、HPV 関連中咽頭癌群、従来型中咽頭癌群それぞれの検体数がマイクロバイオームの比較に必要と考えられる数に達せず、研究期間内においてマイクロバイオーム解析は実施できていない。

### **HPV 関連中咽頭癌の TNM 分類と予後予測に関する検討**

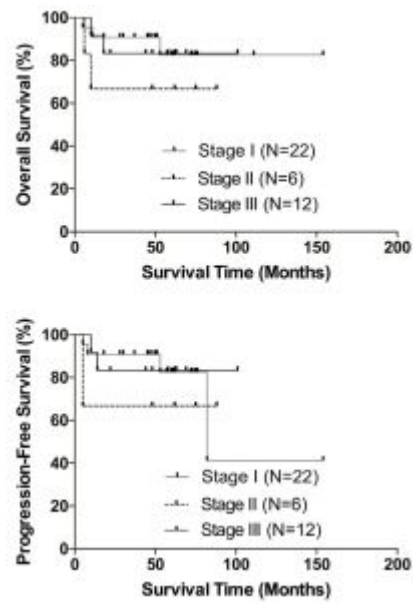
91 症例の中咽頭癌患者のうち、40 症例が HPV 陽性中咽頭癌、51 症例が従来型中咽頭癌であった。カイ二乗検定を用いた相関関係の検討では、HPV 感染状態の有無が N 因子と相関する (N0-1 vs N2-3) 傾向があることを示したが、その差は有意ではなかった ( $P = 0.091$ )。

生存時間分析では、第 7 版 AJCC/UICC TNM 分類を用いたもので、Stage I ~ III は Stage IV に比べて全生存率、無増悪生存期間とも予後が悪い傾向を示したが、いずれも有意差は認めなかった ( $P = 0.386$ ,  $P = 0.273$ )。第 8 版 AJCC/UICC TNM 分類を用いた分析では、全生存率、無増悪生存期間いずれにおいても Stage II が Stage I および III に比べて予後が悪い傾向を示した。また Stage I と Stage II ~ III を比較したが、全生存率、無増悪生存期間いずれも有意差は認めず ( $P = 0.517$ ,  $P = 0.792$ )、結論として AJCC/UICC TNM 分類 第 7 版、第 8 版とも我々の症例において中咽頭癌陽性患者の転帰を適切に予測することは出来なかった。

第7版 AJCC/UICC TNM 分類



第8版 AJCC/UICC TNM 分類

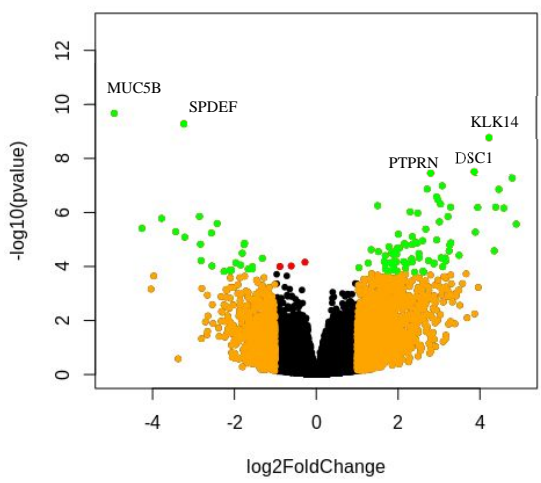


**HPV 関連中咽頭癌に特異的に発現する遺伝子, microRNA の検討**

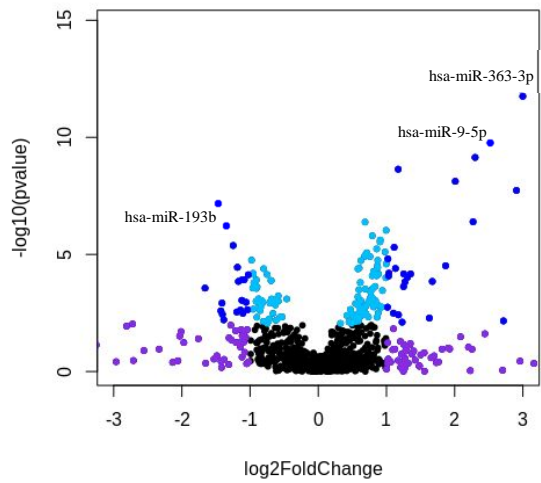
TCGA から入手した頭頸部扁平上皮癌プロジェクトのデータのうち, RNA-seq, miRNA-seq をともに施行された中咽頭癌症例は 70 名であり, HPV 陽性中咽頭癌が 45 名, 従来型中咽頭癌が 25 名であった. 発現変動解析では HPV 陽性中咽頭癌は従来型中咽頭癌に比して, 78 個の mRNA と 26 個の miRNA が有意に発現亢進しており, 25 個の mRNA と 20 個の miRNA が有意に発現抑制されていた. 発現変動解析の結果の概略を Volcano plot にて下図に示す.

HPV 関連中咽頭癌において特異的に発現している mRNA, miRNA の機能について代表的なものとして, 例えば KLK14 は前立腺癌において発現亢進しており, 細胞周囲のネットワークに関与し前立腺がんの播種に寄与している可能性が示唆されている (Reid JC et al. *Am. J. Cancer. Res.* 2017). また同様に, 例えば has-miR-363-3p は, 胃癌, 非小細胞性肺癌, 肝細胞癌, 直腸癌, 骨肉腫等幅広い癌腫において癌抑制 miRNA として機能することが報告されている.

mRNA Volcano plot



miRNA Volcano Plot



**今後の展望**

今回の研究期間においては採取できた検体数に限りがありマイクロバイオームの解析には至らなかったものの, 従来型の中咽頭癌に比した HPV 関連中咽頭癌の特徴について, TNM 分類による予後予測や遺伝子発現の観点から検討を行った. HPV 関連中咽頭癌の TNM 分類は, 改訂された第 8 版 AJCC/UICC TNM 分類を用いた場合でも, 我々の症例において適切な予後予測を行うことが出来なかった. HPV 関連中咽頭癌の適切な予後予測には旧来的な悪性腫瘍の評価法と異なるバイオマーカーが必要になる可能性が示唆され, その候補の一つとしてマイクロバイオームの解析を継続していく予定である. 遺伝子発現に関する検討では, HPV 関連中咽頭癌が従来型中咽頭癌に比して有している特異的な発現変動遺伝子, 発現変動 miRNA が特定されたが, 例えば細胞周囲のネットワークに関連し前立腺癌の播種に寄与している可能性が示唆される

KLK14 の発現が亢進しており、一方で癌抑制 miRNA として広く言われている has-miR-363-3p の発現は抑制されている等、HPV 関連中咽頭癌の特徴的な病態を表すような種々の候補が挙げられた。これらの解析と今後予定しているマイクロバイオームの解析を組み合わせることにより、HPV 関連中咽頭癌のさらなる病態解明や、詳細な細分化とリスク予測、ひいては将来的に個別化医療の発展に貢献できるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

**Sano Daisuke**, Yabuki Kenichiro, Arai Yasuhiro, Tanabe Teruhiko, Chiba Yoshihiro, Nishimura Goshi, **Takahashi Hideaki**, Yamanaka Shoji, Oridate Nobuhiko, The applicability of new TNM classification for humanpapilloma virus-related oropharyngeal cancer in the 8th edition of the AJCC/UICC TNM staging system in Japan: A single-centre study, *Auris Nasus Larynx*, 査読有, 45 巻, 2018 年, 558-565  
DOI: 10.1016/j.anl.2017.07.010

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐野 大佑

ローマ字氏名：Sano Daisuke

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 10620990

※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、研究者個人に帰属されます。