

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11390

研究課題名(和文) ヒト乳頭腫ウイルス関連頭頸部癌の診断及び予後に関与するバイオマーカーの解明

研究課題名(英文) Biomarker in relation to diagnosis and prognosis in patients with HPV-related head and neck cancer

研究代表者

鈴木 幹男 (Suzuki, Mikio)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00226557

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)：本研究は、ヒト乳頭腫ウイルス関連頭頸部癌(HPV癌)の診断及び予後のリスク分類に寄与することを目標とし、臨床病期分類やde-escalation試験における症例選択、HPV関連癌の新規治療法開発につなげるものである。以下の結果を得た。1. HPV癌の診断には、p16免疫染色とHPVDNA PCRの両者が陽性であることが重要である。2. HPV癌は予後がよいが、喫煙、飲酒の生活習慣、高齢発症の症例ではHPV非関連癌と同様に予後が悪い。3. 予後不良例のバイオマーカーとしてIGF1-R, HIF1- α が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト乳頭腫ウイルス関連頭頸部癌の診断方法を確立した。また生活習慣との関連を明らかにすることにより、生活習慣への指導を適切におこなうことができる。またバイオマーカーを見いだすことができたため、バイオマーカーの制御によるより低侵襲な治療法開発への糸口を発見した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to contribute the diagnosis and risk classification of human papillomavirus (HPV) related head and neck cancer. The major achievements of the present study are as follows, The 8th edition of the AJCC staging manual reflects the prognosis of OPSCC using p16 immunoreactivity for the detection of HPV-mediated OPSCC. The discordance between p16 overexpression and the presence of HPV DNA in relation to survival outcome should be clarified to design a de-escalation study. Laryngeal cancer (LC) patients with HPV infection and high levels of p16 expression might have an improved survival outcome; however, it is necessary to recruit additional LC cases with HPV infection to determine the definitive characteristics of HPV-mediated LC and estimate survival outcome. These results may contribute to the development of a useful method for selecting patients with a potentially fair response to treatment and ensure laryngeal preservation.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ヒト乳頭腫ウイルス 頭頸部癌 予後 生活習慣 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HPV 関連中咽頭癌の予後が良いことが北米,ヨーロッパでの多施設共同前向き試験により初めて報告された (ECOG2399 trial, Fakhry et al, J Natl Cancer Inst, 2008)。RT0G-0129 trial の後ろ向き解析では中咽頭癌を HPV 感染 (in situ hybridization 法, ISH 法), 喫煙, 頸部リンパ節転移により低 (HPV 陽性, 10 pack-year 以下), 中, 高リスクに分類し, 低リスク群では 3 年粗生存率が 93% と報告された (Ang et al, N Engl J Med, 2010)。また HPV, N 分類, T 分類を用いてリスク分類を行い, HPV 陽性, N0-2c, T1-3 を低リスク群とする報告もみられる (O' Sullivan et al, J Clin Oncol, 2013)。2016 年 TNM 分類第 8 版に向けて HPV 感染を加味した中咽頭癌の新ステージ分類が提案された (O' Sullivan et al, Lancet Oncol, 2016)。しかし, HPV 同定方法 (PCR 法, ISH 法, p16 染色, 他) については統一されていない。局所コントロールは HPV 関連中咽頭癌では良好であるが, 遠隔転移率については HPV 陰性癌と大きな差がないことも別途報告されている (O' Sullivan et al, J Clin Oncol, 2015)。持続的な HPV ウイルス感染が生じるとウイルス蛋白 (E6, E7) が産生される。これにより p53, pRb が不活化され細胞周期が変化し癌化へ進行する。pRb が不活化されると p16 発現が上昇するため p16 は HPV 感染のサーゲートマーカーとされる。しかし, 頭頸部神経内分泌癌, 鼻副鼻腔乳頭腫では HPV 感染とは関係なく p16 発現がみられることが報告されている (Alos et al, Virchows Arch, 2016, Yamashita, Suzuki et al, Infect Agent Cancer, 2015)。HPV 感染の証明は PCR 法, ISH 法による HPV DNA の検出または p16 免疫染色により行われる。しかし, 上述のように癌化へは E6, E7 の産生が必要であるが, HPV DNA, p16 の結果は E6, E7 産生の直接的な証明ではない。我々は先行研究で E6/E7 mRNA 発現と HPV DNA, p16 発現との相関を調査した。その結果 HPV DNA と p16 の一致率は 80% しかなく, mRNA 発現を予測するには両検査が必要であることを報告した (感度 94.4%, 特異度 91.4%; Deng, Suzuki et al, Int J Oncol, 2014)。さらに欧米からも同様の報告がみられるようになってきた (Larsen et al, BJC, 2014; Bhatia, et al, J Clin Oncol, 2015)。これらの研究は腫瘍組織から HPV DNA が検出されても, HPV が癌化に直接関係している例 (真の HPV 関連癌) と Bystander として腫瘍組織に感染している例があることを示している。また研究代表者が参加した国際共同研究では HPV 感染に人種差があることが分かってきた (Ragin, Suzuki, et al, Carcinogenesis 2017)。中咽頭癌での HPV16, 18 陽性, p16 陽性の頻度に関して, 白人では HPV 陽性例が多いが, アジア人では少ない。また喫煙率でも, 白人では非喫煙者, 禁煙者に HPV 感染が多いが, アジア人ではその傾向が低いことが判明した。喫煙, 飲酒による発癌には, 摂取量に加え代謝に関与する遺伝子多型が大きく関わっていることが報告されている (IARC monograph, 2004)。この遺伝子多型には人種差が報告されており, HPV 関連中咽頭癌の予後推定に重要である。

2. 研究の目的

本研究は, HPV 関連頭頸部癌の診断及び予後のリスク分類に寄与することを目標とする。さらに本研究成果は臨床病期分類や de-escalation 試験における症例選択, HPV 関連癌の新規治療法開発につながる可能性を持つ。

3. 研究の方法

上記目的のため, 4 つの研究を実施した。

研究 1: HPV 関連頭頸部癌診断の再検討

頭頸部癌新鮮凍結標本を用いて HPV DNA PCR 法, p16 免疫染色, HPV DNA ISH 法, E6/E7 mRNA 発現, mRNA ISH 法を行い相互の検査結果の相関を明らかにし, E6/E7 mRNA 発現と最も相関する検査法の組み合わせを明らかにする。

研究 2: HPV 関連頭頸部癌の予後不良例と予後良好例の臨床的解析

新鮮凍結標本のある例に加えて, 研究 1 で確立した方法に基づいて, パラフィンブロックがある過去の症例を加え HPV 陰性頭頸部癌例, HPV 陽性頭頸部癌予後不良例 (治療後局所再発, 遠隔転移)・予後良好例の 3 群に分け, それぞれの臨床像, 生活習慣 (飲酒量, 喫煙量), アルコール, 喫煙に関連する遺伝子多型の差を明らかにする。

研究 3: HPV 関連癌予後不良例におけるバイオマーカー検索

頭頸部癌の予後に関連すると報告されている p53 変異, mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met), CD44, epidermal growth factor receptor (EGFR), insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1-R), vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現等が HPV 関連頭頸部癌の予後不良例の抽出に有効であるかを検討する。

研究 4: 進行中咽頭癌における HPV 感染に基づく計画的頸部郭清術に関する前向き試験 (UMIN00018108) 研究 1~4 により, HPV 関連頭頸部癌の中で予後良好例・不良例 (局所再発, 遠隔転移) を治療開始前に診断できるアルゴリズムを作成する。さらに現在進行中の臨床試験の中間解析でこの診断システムの妥当性を検証する。

4. 研究成果

研究 1: HPV 関連頭頸部癌診断の再検討

中咽頭癌, 喉頭癌に関する解析を中心に行った。中咽頭癌 100 例では p16 陽性例は 34 例, 陰性例 (75% 未満) は 66 例であった。HPV DNA PCR 法で陽性例は全例で高リスク型 HPV が検出さ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

れた。一方陰性例では14例(21.2%)に高リスク型HPVが検出された。このことから、PCR法によりHPV DNAが検出されても、必ずしもHPV関連癌とは言えないことが判明した。HPV L1領域が欠損して、宿主にウイルスゲノムが取り込まれた場合、通常のPCR法で検出されない可能性があるため、HPV DNA PCR法陰性かつp16陽性例は、再度HPV16 E2, E6の2種類のプライマーを用いてPCRを行った。これにて、通常のHPV DNA PCR法陰性かつp16陽性の1例に、HPV16感染が確認された。この一連の研究結果から、HPV関連中咽頭癌の診断には、p16免疫染色とHPV DNA PCRの両方を行うと、一番信頼性が高くなると判断された(発表論文2, 6, 7)。さらにp16陽性例のウイルス量は平均 13.33×10^5 copy/50ng genomic DNAであり、p16陰性例のウイルス量91と比較して極めて高いことが判明した。このことは、中咽頭癌では少量のHPV感染を持つ例(Bystander)がかなり多いことを示している(発表論文6)。

喉頭癌88例の解析では、8年粗生存率は80.7%であった。中咽頭と同様にHPV DNA PCR/HPV DNA in situ hybridization法とp16免疫染色を行いHPV関連喉頭癌について調査をおこなった。この結果、両検査が陽性のものは5例(5.7%)であった。5例中3例はPCR法では陰性であったが、DNA in situ hybridization法では陽性であった。喉頭癌は小腫瘍の場合、PCR用に十分な検体量が採取できないことがあり、このような場合ではin situ hybridization法の方が信頼性は高いと推察された。HPV関連喉頭癌は、進行癌であっても予後がよいことから、機能温存治療の適応になると想定された(発表論文1, 6, 7)。

研究2: HPV関連頭頸部癌の予後不良例と予後良好例の臨床的解析

中咽頭癌100例の5年粗生存率は73.0%であったが、p16陽性例では93.9%、陰性例では62.2%であった。喫煙、アルコール摂取と予後との関連を調査すると、p16陽性例でも40箱・年以上の喫煙者では有意に予後が悪くなることが判明した。p16陽性の死亡例を調査すると、過度の飲酒、高齢発症が死亡リスクとなっていた(発表論文9)。

研究3: HPV関連癌予後不良例におけるバイオマーカー検索

HPV関連癌の予後不良を示す因子として、p53変異, mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met), CD44, epidermal growth factor receptor (EGFR), insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1-R), vascular endothelial growth factor (VEGF)発現等を考え調査したが、HPV関連癌の予後が極めてよいため、十分な検体数が得られず有意の結果はなかった。しかし、HIF-1、mTOR経路活性化については明らかな差を認め、国際誌に投稿中である。

研究4: 進行中咽頭癌におけるHPV感染に基づく計画的頸部郭清術に関する前向き試験(UMIN00018108)症例を登録し継続観察中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kiyuna Asanori, Ikegami Taro, Uehara Takayuki, Hirakawa Hitoshi, Agena Shinya, Uezato Jin, Kondo Shunsuke, Yamashita Yukashi, Deng Zeyi, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio, Ganaha Akira	4. 巻 14
2. 論文標題 High-risk type human papillomavirus infection and p16 expression in laryngeal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infectious Agents and Cancer	6. 最初と最後の頁 2019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13027-019-0224-y	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 Yamashita Yukashi, Ikegami Taro, Hirakawa Hitoshi, Uehara Takayuki, Deng Zeyi, Agena Shinya, Uezato Jin, Kondo Shunsuke, Kiyuna Asanori, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio, Ganaha Akira	4. 巻 276
2. 論文標題 Staging and prognosis of oropharyngeal carcinoma according to the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual in human papillomavirus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Archives of Oto-Rhino-Laryngology	6. 最初と最後の頁 827 ~ 836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00405-018-05263-x	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, Uehara Takayuki, Deng Zeyi, Kondo Shunsuke, Maeda Hiroyuki, Kiyuna Asanori, Agena Shinya, Hirakawa Hitoshi, Yamashita Yukashi, Ganaha Akira, Suzuki Mikio	4. 巻 16
2. 論文標題 Detection of human papillomavirus in branchial cleft cysts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1571-1578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.8827	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 Deng Zeyi, Ikegami Taro, Kiyuna Asanori, Zhang Chunlin, Zhang Tao, Matayoshi Sen, Uehara Takayuki, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio, Ganaha Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Methylation of CpG sites in the upstream regulatory region, physical status and mRNA expression of HPV-6 in adult-onset laryngeal papilloma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 85368 ~ 85377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.19898	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、Hanai Nobuhiro、Suzuki Hidenori、Nishikawa Daisuke、Matayoshi Sen、Hasegawa Yasuhisa、Suzuki Mikio	4. 巻 47
2. 論文標題 Prognostic importance of pathological response to neoadjuvant chemotherapy followed by definitive surgery in advanced oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1038 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyx097	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 金城秀俊、鈴木幹男、他	4. 巻 45
2. 論文標題 HPV関連中咽頭癌 (p16陽性) 死亡例の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 頭頸部癌	6. 最初と最後の頁 397 - 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木幹男	4. 巻 112
2. 論文標題 頭頸部のヒト乳頭腫ウイルス感染	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科臨床	6. 最初と最後の頁 633 - 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木幹男	4. 巻 122
2. 論文標題 頸部腫瘍の診察におけるピットフォール 良性疾患を中心に	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 1490 - 1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木幹男	4. 巻 122
2. 論文標題 乳頭腫ウイルスをめぐる諸問題 中咽頭癌、喉頭癌について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 862 - 867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 屋島福太郎、池上太郎、鈴木幹男
2. 発表標題 頭頸部腫瘍における グルタミルトランスフェラーゼ1とジペプチジルペプチターゼ-4の発現
3. 学会等名 琉球医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木幹男
2. 発表標題 乳頭腫ウイルスをめぐる諸問題 ヒト乳頭腫ウイルス感染の診断に関する問題
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金城秀俊、他
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌 (p16陽性) 死亡例の検討
3. 学会等名 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下 懐、鈴木 幹男
2. 発表標題 中咽頭癌103例におけるAmerican Joint Committee on Cancer 8th Editionの病期分類と予後の検討
3. 学会等名 日本頭頸部癌学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>琉球大学医学部耳鼻咽喉科 https://ent-ryukyu.jp/</p>
--

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
研究分担者	池上 太郎 (Taro IKEGAMI) (00754409)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	
研究分担者	真栄田 裕行 (Hiroyuki MAEDA) (40264501)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (18001)	