

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16915

研究課題名(和文) ヒトパピローマウイルス陽性中咽頭癌の新しいバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Development of a novel biomarker for HPV-related oropharyngeal cancer

研究代表者

武本 憲彦 (Takemoto, Norihiko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20636485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：中咽頭癌のうちHPV-DNA (+) /p16 (+)、HPV-DNA (-) /p16 (+)、HPV-DNA (-) /p16 (-) の3つのタイプの遺伝子発現パターンを比較するため、それぞれの患者検体を用いてRNA-sequenceを施行したところ、HPV-DNA (+) /p16 (+) はHPV-DNA (-) /p16 (-) に比べてPI3K-AKT-mTOR pathwayにかかわる遺伝子と細胞障害性T細胞の活性化因子に關与する遺伝子が強く発現していたが、HPV-DNA (-) /p16 (+) とHPV-DNA (-) /p16 (-) の比較では差が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌の一般的なサロゲートマーカーであるp16免疫染色だけでは真のHPV関連癌を判別することは難しく、通常の臨床現場ではHPV-DNAやOncogeneを検出するモダリティを保持している施設はほとんどないのが現状であるため、真のHPV関連中咽頭癌を拾い切れておらず不要な治療強度内容の治療が施行されている。本解析で判明した発現分子はHPV-DNAの存在をより強く示すマーカーと考えられ、今回判明した分子は免疫染色で容易にシグナル判別が可能でありp16だけではなく本分子の発現強度を追加で免疫染色で解析することで真のHPV関連中咽頭癌の検出がさらなる精度を持って可能となると考える。

研究成果の概要(英文)：The expression genes were compared among 3 types oropharyngeal cancers ; HPV-DNA (+) /p16 (+)、HPV-DNA (-) /p16 (+) and HPV-DNA (-) /p16 (-) by using RNA-sequence. This analysis reveals that the genes involved with PI3K-AKT-mTOR pathway and effector Tcell activated factor expressed strongly in HPV-DNA (+) /p16 (+) samples as compared with those of HPV-DNA (-) /p16 (-) ,otherwise no difference detected between HPV-DNA (-) /p16 (+) and HPV-DNA (-) /p16 (-) samples.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：中咽頭癌 HPV p16 RNA-Sequence

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昨今、中咽頭癌は喫煙・飲酒により発生する HPV 陰性癌よりも、HPV の感染により発生する HPV 陽性癌の有病率が増加している(Friedman, et al. 2014 World J Clin Oncol)。HPV 陽性中咽頭癌は HPV の発癌遺伝子である E7 が癌抑制遺伝子の Rb を不活化することが発癌に関与しているが、その際、細胞周期調節因子 p16 タンパクが過発現されると言われている。そのため、p16 タンパクが HPV 陽性癌の代替マーカーとして汎用されている。

HPV 陽性癌と HPV 陰性癌は全く異なる特徴を呈し、HPV 陽性癌は HPV 陰性癌と比べ有意に予後が良好なことがメタアナリシスによって確立されている。その結果を受け、HPV 陽性癌では標準治療より治療強度を下げた低侵襲治療により、予後を悪化させることなく QOL を改善できると期待されている。現在、この仮説を検証するべく我々を含め複数のグループが低侵襲治療の臨床試験を進めている。

一方、HPV 陽性中咽頭癌の検出方法としては HPV ゲノム DNA の PCR もしくは p16 タンパクの免疫組織化学が汎用されている(Wang, et al. 2013 Cancer Sci)。低侵襲治療の臨床試験では免疫組織化学による p16 陽性を代替マーカーとして用いているものが数多くあるが、stage III/IV の HPV 陽性中咽頭癌に対して放射線単独治療を行った自験例では HPV-DNA 陰性 p16 陽性は HPV-DNA 陰性 p16 陰性と同様に HPV-DNA 陽性 p16 陽性よりも予後不良であった。このような HPV-DNA 陰性 p16 陽性という乖離例は 3-51% 存在するという報告があり(Lewis, et al. 2010 Am J Surg Pathol, Holzinger, et al. 2012 Cancer Res)、自験例と同様に予後不良であるということがメタアナリシスによって証明されている(Coordes, et al. 2016 Eur Arch Otorhinolaryngol)。以上から HPV-DNA 陰性 p16 陽性と HPV-DNA 陽性 p16 陽性を同列に扱うのは危険と考えられる。

p16 が過剰発現しうる理由としては HPV の E7 による Rb タンパクの不活性化だけではなく、ストレス負荷、炎症、老化と多岐にわたるといわれ、細胞周期調節因子である CDK4、CDK6 の変異によってもおこりうるという報告がある(Perrone, et al. 2011 Am J Surg Pathol)。これらから HPV 感染以外で p16 が過剰発現する原因分子が発見されうると考える。

また、HPV-DNA の PCR による検出は施設間によって実施不可能であることも少なくないため多施設共同研究には不向きな側面があり、多施設での大規模な臨床試験を進めるに当たり、免疫組織化学によって検出する p16 タンパクを補完するような予後予測能を持った候補分子を同定することが必要と考えられる。

HPV 陽性癌と他の頭頸部扁平上皮癌では遺伝子背景が大きく異なるが、HPV-DNA 陰性 p16 陽性例でも同様に遺伝子背景が異なっている可能性が高い。しかし、HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌の背景因子および p16 発現のメカニズムを解析した報告は未だない。

本研究は中咽頭癌における HPV-DNA 陰性 p16 陽性例と HPV-DNA 陽性 p16 陽性例とが遺伝子背景が異なることを証明し、HPV 感染以外の p16 発現に関与する分子を解明し p16 を補完する代替マーカーを同定することを目標とする。

### 2. 研究の目的

HPV 陽性中咽頭癌における human papillomavirus (HPV) の検出方法は HPV-DNA の PCR による検出または p16 タンパクの免疫組織化学の 2 つが代表的であるが、その結果が乖離する例が少なからず存在する。HPV 陽性中咽頭癌は HPV 陰性中咽頭癌と比べて予後良好であるが、HPV-DNA 陰性 p16 陽性の乖離例は予後が悪いことが分かっているため HPV 陽性中咽頭癌として同列に扱うのは危険である。

本研究は、(1) HPV-DNA 陰性 p16 陽性例と HPV-DNA 陽性 p16 陽性例とが遺伝子背景が異なることを証明する(2) HPV 感染以外による p16 タンパク過剰発現メカニズムを解明する(3) 真の HPV 陽性中咽頭癌を鑑別するための p16 を補完するバイオマーカーを同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体および HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌検体から抽出した mRNA を用いて RNAseq 法による網羅的な転写産物のスクリーニングを行う。RNAseq 法のスクリーニング結果に対してデータマイニングを行い、差異のあった領域がコードする分子群のうち p16 発現に関与する候補分子を絞り込み、同定した候補分子についてリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法により両群の検体における発現レベルを評価する。さらに p16 陽性中咽頭癌検体を用いて、候補分子の発現レベルを免疫組織化学により解析し、HPV-DNA 陽性率および予後と関連する分子を同定する。

### 4. 研究成果

研究開始時、当教室で凍結保存している中咽頭癌検体は HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌検体は 43 検体、HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌検体は 40 検体、HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体は 7 検体であった。合計 90 検体の RNA 抽出を行ったが、抽出 RNA のクオリティチェックをしたところ解析不可能の RNA が 50 検体あり、解析に耐えうる検体は 40 検体であると判断した。

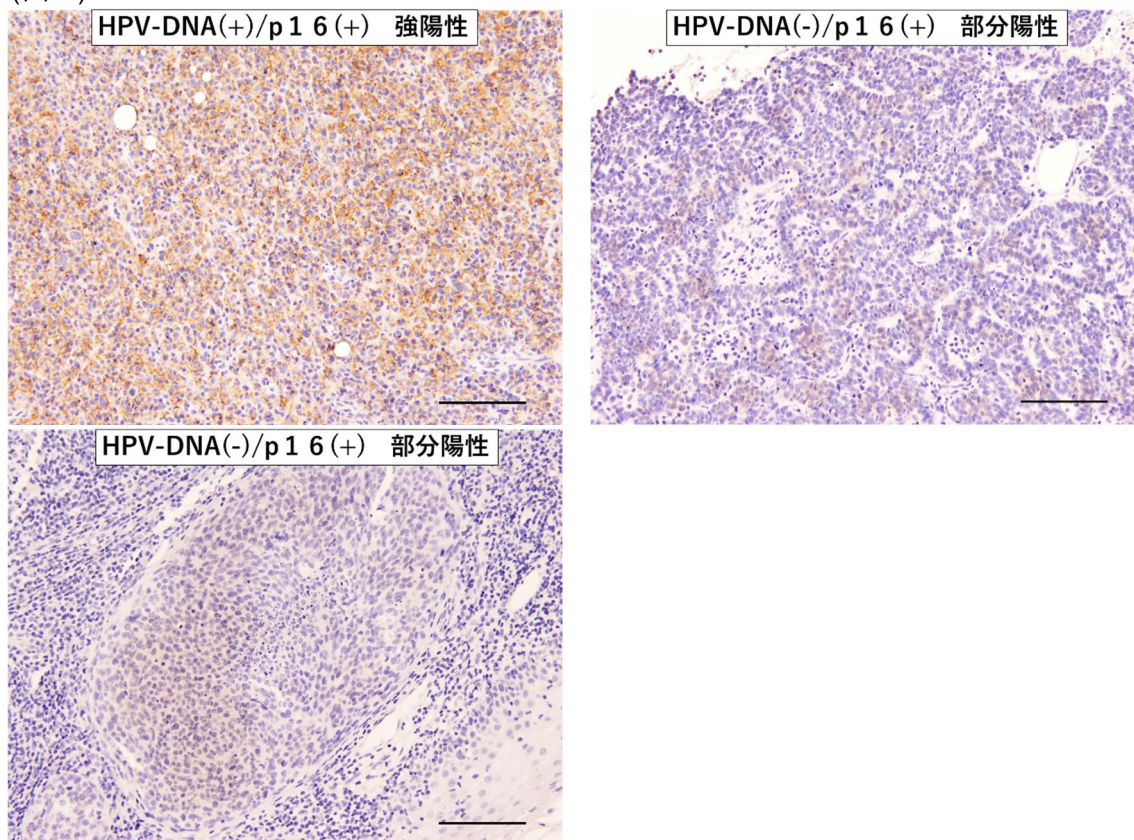
さらにこれら 40 検体に関して rRNA Depletion kit、Poly(A) mRNA Magnetic Isolation を用いて各々の検体の cDNA ライブラリーを作成した。ライブラリー化した内訳としては HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌検体は 21 検体、HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌検体は 15 検体、HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体は 4 検体であった。HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌検体と HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体を対象に RNA-seq を Macrogen 社に依頼し、次世代シーケンサーの platform として GS-FLX を使用した。シーケンスクオリティスコアが 10 未満の検体が 4 検体あり、HPV-

DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体が 1 検体含まれていた。また、残りの HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体 3 検体のうち、p16 蛋白のコード遺伝子である CDKN2A の発現が 1 検体は確認できず、リアルタイム PCR でも CDKN2A の発現は 2 検体にしか確認できなかったため、さらに症例検体を収集した。

抽出 RNA のクオリティチェックにより解析できると判断した検体は最終的には HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌検体は 14 検体、HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体は 4 検体、HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌検体 10 検体であった。これらを対象として Macrogen 社に先行で外注し RNA-seq を施行した。

HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌検体と HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌検体の比較では PI3K-AKT-mTOR pathway にかかわる遺伝子 72 遺伝子が 2fold 以上の発現差が認められたが、そのうち AKT 系シグナル遺伝子は HPV 陰性癌に発現上昇がみられたが mTOR 系のシグナルの遺伝子群は差異がなかった。これらの遺伝子の発現差は HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌検体と HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体の間では差異が認められなかった。このことより、両者の遺伝子背景が近いことを示唆すると考えられた。さらに HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌より HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌では CD70 というリンパ球のエフェクター機能を調節する遺伝子の発現が 2fold 以上認められた。CD70 は細胞障害性 T 細胞の活性化によっても発現上昇を認めることが報告されており、HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌のほうが HPV のウイルス抗原を share 抗原としてより T 細胞の活性化を強めていると考えられた。過去の HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌と HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌と HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌のラフィン検体をそれぞれ 10 検体ずつ用いて CD70 の免疫染色を行ったところ（図 1）、HPV-DNA 陽性 p16 陽性中咽頭癌は陽性検体が 6 検体に対し、HPV-DNA 陰性 p16 陽性中咽頭癌検体は 2 検体で強陽性であったが、残りの 8 検体は部分的陽性であった。しかし HPV-DNA 陰性 p16 陰性中咽頭癌検体では強陽性の検体は認めず、7 検体で部分的な陽性であった。

(図 1)



CD70 染色は p16 染色に加えて HPV-DNA 陽性/p16 陽性中咽頭癌の検出に有用なマーカーである可能性がある。さらに検体を増やして検討していく必要があるが、HPV-DNA 陽性/p16 陽性中咽頭癌の検出に対する CD70 の陽性率のカットオフ値を求め、感度特異度を決定していくことを今後検討している。

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
--	---------------------------	-----------------------	----