

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09361

研究課題名(和文) HPV関連中咽頭癌に対するリスク評価に基づいた低侵襲治療の開発

研究課題名(英文) Development of minimally invasive treatment based on risk assessment for HPV-mediated oropharyngeal carcinomas

研究代表者

家根 旦有 (YANE, Katsunari)

近畿大学・奈良病院・教授

研究者番号：40220199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：14施設から2014年5月から2016年3月までの期間に、Stage / 中咽頭癌80例を集め、HPVの感染の有無および次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行った。HPVをPCRにて解析した結果は、中咽頭癌80例中HPV陽性は56例、HPV陰性は24例であった。HPVのgenotypeはHPV16型49例、HPV35型3例、HPV58型2例、HPV31型1例、HPV33型1例であった。次世代シーケンサーにて遺伝子解析した結果は、HPV陽性のうちPIK3CAの変異が最も多く12例、次いでFGFR3が5例、PTENが4例であった。HPV陰性ではTP53の変異が最も多く11例であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中咽頭癌は増加傾向にあり、その増加原因がHPV感染によるHPV陽性中咽頭癌の増加が一因と考えられている。HPV陽性中咽頭癌はHPV陰性中咽頭癌に比べて予後が良好であることからHPV感染の有無を判別することは治療方針を決定するにおいて重要な判断材料となる。今回の研究で次世代シーケンサーを用いてHPV感染の有無による遺伝子変異について解析したところ、HPV陽性中咽頭癌はPIK3CA遺伝子変異が多く、HPV陰性中咽頭癌はTP53遺伝子変異が多い結果であった。これらの遺伝子変異の特徴を考慮してより低侵襲の治療を開発することが重要と考えている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 80 fresh frozen samples using next generation sequencing. The samples were obtained in patients with previously untreated stage / oropharyngeal squamous cell carcinoma who underwent multidisciplinary therapy at 14 Japanese hospitals from May 2014 to March 2016.

Among 80 samples, HPV(+) OPSCC was 56 cases and HPV(-) OPSCC was 24 cases. Among HPV(+)OPSCC, HPV16 was 49 cases, HPV35 was 3 cases, HPV58 was 2 cases, HPV31 was 1 case and HPV33 was 1 case respectively. In HPV(+) samples, PIK3CA was the most common genomic alteration (12, 21.4%), the second one was FGFR3 (5, 8.9%) and the third one was PTEN(4, 7.1%). In HPV(-) samples, TP53 (11, 45.8%) was most frequently altered.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：中咽頭癌 HPV 次世代シーケンサー 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

HPV 関連中咽頭癌は従来の喫煙・飲酒で発症する HPV 非関連中咽頭癌とは異なり、化学療法や放射線療法の効果は良好で、HPV 非関連中咽頭癌と比較して予後は良好である。しかし、たとえ HPV 関連中咽頭癌であったとしても喫煙・飲酒が治療効果に影響し、喫煙・飲酒例の予後は不良と報告されている。2017 年に TNM 分類は新しく改訂され、中咽頭癌は HPV 関連中咽頭癌と HPV 非関連中咽頭癌の 2 つに大きく分類されることになり、HPV 関連中咽頭癌は予後良好な群として扱われるようになった。この新しい TNM 分類の改訂に伴い、HPV 関連中咽頭癌は従来の中咽頭癌に対する治療方法とは異なり、侵襲を抑え根治を目指すことが必要と考えられている。現在世界では HPV 関連中咽頭癌に対する「低侵襲治療」の臨床試験が数多く進められているが、喫煙・飲酒などのリスク因子についての詳細な検討はなされていない。本邦においては 2014 年に頭頸部癌基礎研究会 (Japan Cooperative Study Group for Basic Research in Head and Neck Cancer : JCSG-BRHNC) が中心となって中咽頭癌と HPV の関連に関する全国規模の調査が行われた。その結果、HPV 関連中咽頭癌の予後は HPV 非関連中咽頭癌と比較して良好であること、喫煙歴、飲酒歴が少ない患者層であることが報告された。しかし、中咽頭癌における喫煙・飲酒などのリスク因子について遺伝子レベルでの解析は行われていないのが現状である。本邦における HPV 関連中咽頭癌の年次推移による動向を知り、予後の良い HPV 関連中咽頭癌に対する「低侵襲治療」を開発するために、多施設共同研究による中咽頭癌の遺伝子解析が重要と考えている。

2. 研究の目的

近年、世界的に中咽頭癌は増加傾向にあり、その原因として HPV との関連が (D' Souza G, *et al.* N Engl J Med 356:1944-56, 2007) 報告され、中咽頭癌の発癌には従来の酒、タバコに加えて HPV が関与していることが明らかになった。さらに HPV 関連中咽頭癌は HPV 非関連中咽頭癌と比べて予後が良好であることから、これまでの酒・タバコ発癌とはまったく生物学的に異なることが知られている。本邦においても 2010 年頃から中咽頭癌と HPV の関連に関する報告が相次ぎ、全国規模の報告として、JCSG-BRHNC が中心となり 21 施設より 157 症例を集積して解析が行われた。その結果、HPV 関連中咽頭癌の発生頻度は 50.3%で、その予後は HPV 非関連中咽頭癌と比較して良好であること、喫煙歴、飲酒歴が少ない患者層であることが報告され (Hama T, *et al.* Oncology. 87:173-82, 2014)、現在では中咽頭癌において HPV 因子は最も強力な予後予測因子とみなされている (Kang H, *et al.* Nat Rev Clin Oncol 12:11-26, 2015)。

しかし、HPV 関連中咽頭癌のなかには喫煙歴、飲酒歴のある症例も多く認め、必ずしも HPV 感染のみで発癌したのではなく、喫煙・飲酒の影響が及んでいることが推察される。しかし、喫煙・飲酒の評価については問診等で喫煙歴、飲酒歴を調査する方法しかなく、飲酒に関してはアルコールの種類や飲み方にも多様性があり、的確に飲酒のリスクを評価する方法は困難と思われる。さらに日本人では約半数がアセトアルデヒド脱水素酵素 2 型 (ALDH2) に変異があり、その判別も容易ではない。以上のことから、単純に中咽頭癌を HPV 感染の有無で治療方法の選択をおこなうことは危険であり、喫煙・飲酒のリスク因子を客観的に評価する方法が望まれている。そこで本研究では HPV 関連中咽頭癌における喫煙・飲酒の影響を遺伝子レベルで解析し、「低侵襲治療」を選択する指標を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

2014 年 5 月から 2016 年 3 月までに新たに III/IVA/IVB 期の中咽頭扁平上皮癌 (oropharyngeal squamous cell carcinoma : OPSCC) と診断された患者を JCSG-BRHNC に登録した。患者は 20 歳以上、performance status 0-2 で、多剤併用療法 (主に化学放射線療法) を受けた患者であった。JCSG-BRHNC のメンバーである日本の 14 病院から、合計 80 人の患者が組み入れられた。本研究は各施設の倫理委員会の承認を得ており、全患者から文書によるインフォームドコンセントを得た。

・DNA 抽出と HPV 型の確認

新鮮凍結検体から株式会社 SRL により新鮮凍結検体からゲノム DNA を抽出した。DNA サンプルは、Takara Human Papillomavirus Typing Set (Takara Bio Inc., #6603) および Human Papillomavirus PCR Detection Set (Takara Bio Inc., #6602) を用いて、東京医療センターで PCR 法により分析された。Human Papillomavirus PCR Typing Set は、HPV 型特異的 PCR を用いて広範囲の HPV 型を同定するために設計されている。HPV の E6 および E7 相同領域 (228-268 bp) を増幅するように設計された 2 対のコンセンサスプライマーを使用する。悪性の HPV16、-18、-31、-33、-35、-52b および -58 型は HPVpU-1M/HPVpU-2R プライマーペアを用いて増幅され、良性の HPV6 および -11 型は HPVpU-31B/HPVpU-2R プライマーペアを用いて増幅される。制限酵素 Acc I、Afa I、Ava I、Ava II および Bgl II が PCR 産物を分解し、続いてアガロースゲル電気泳動が、常在 HPV 型の同定に用いられた。ヒトパピローマウイルス PCR 検出セットは、ウイルス DNA の増幅による HPV16、-18 および -33 の検出用に設計されたプライマーを使用した。このセットには、HPV16、-18 および -33 の E6 領域の特異的増幅プライマーが含まれている。増幅産物

のサイズは、HPV16 および-18 で 140bp、HPV33 で 141bp である。高リスク HPV DNA 型 (16 型、-18 型、-26 型、-31 型、-33 型、-35 型、-52 型、-58 型) が検出された検体を HPV 陽性とした。ホルマリン固定パラフィン包埋標本は、東京医療センターで p16 の免疫組織化学検査 (Roche Tissue Diagnostics Inc) を行い、75%以上の染色を示したサンプルを HPV 陽性とした。

・次世代シーケンス

Ion AmpliSeq™Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、次世代シーケンス (Next-generation Sequencing:NGS) を実施した。Ion AmpliSeq™Cancer Hotspot Panel v2 は、50 の癌遺伝子および癌抑制遺伝子から約 2,800 の COSMIC 変異をカバーする 207 のアンプリコンを増幅するように設計されている (abl1, akt1, alk, apc, atm, braf, cdh1, cdkn2a, csflr, ctnnb1, egfr, erbb2, erbb4, ezh2, fbxw7, fgfr1, fgfr2, fgfr3, flt3, gnall, gnaq, gnas, hnfla, hras, idh1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL)。

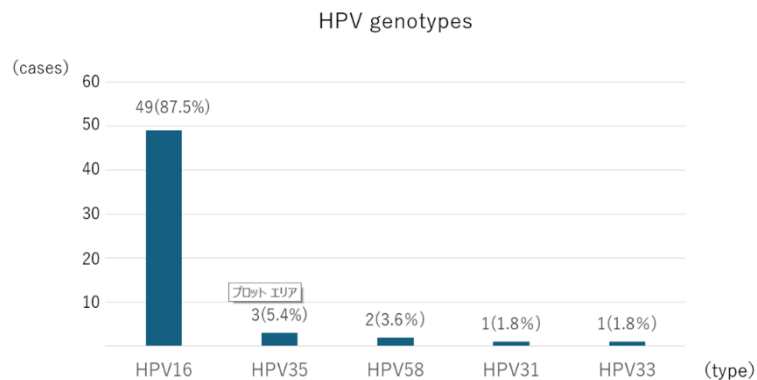
ライブラリー調製のために、DNA は Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 および Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 を用いて PCR による多重増幅を行った。PCR 産物を Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit (Thermo Fisher Scientific) にライゲーションし、Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて精製した。精製したライブラリーを保存し、Ion Proton™ System、Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit、Ion PI™ Chip Kit v3 (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて塩基配列を決定した。DNA シークエンシングデータは、Torrent Suite™ Software v.4.4 プログラム (Thermo Fisher Scientific) を使用してアクセスした。生殖細胞系列変異は Human Genetic Variation Database (<https://www.hgvd.genome.med.kyoto-u.ac.jp>) を用いて除外した。

4. 研究成果

・HPV 型と患者の特徴

80 例中、HPV が検出されたのは 56 例 (70%) であった。HPV の有無にかかわらず、OPSCC は女性よりも男性に多かった。HPV 陽性 (+) OPSCC 症例では、HPV16 が 49 例 (87.5%)、HPV35 が 3 例 (5.4%)、HPV58 が 2 例 (3.6%)、HPV31 が 1 例 (1.8%)、HPV33 が 1 例 (1.8%) であった。HPV (+) OPSCC 群では、腫瘍の亜部位が扁桃であったのは 48 例 (85.7%)、扁桃でなかったのは 8 例 (14.3%)、HPV 陰性 (-) OPSCC 症例では、亜部位が扁桃であったのは 11 例、扁桃でなかったのは 13 例であった (p<0.0002)。一次治療については、HPV (+) OPSCC 群で 54 例 (96.4%)、HPV (-) 群で 16 例 (66.7%)

に CR を認めた (p<0.0002)。飲酒者は HPV (+) OPSCC 群で 37 例 (66.1%)、非飲酒者は 19 例 (33.9%)、HPV (-) OPSCC 群で 23 例 (95.8%)、1 例 (4.2%) であった (p<0.0048)。喫煙歴と HPV の有無は統計学的有意性を示さなかった。アルコール摂取と HPV の状態には有意な関係があり、HPV (-) OPSCC 群ではアルコール摂取者の割合が高かった (p<0.001)。



・変異プロファイリング

80 検体について、NGS を用いて 50 のがん関連遺伝子のゲノム変化を検出した。HPV (+) OPSCC 群で最も多く検出された変異は、PIK3CA (12, 21.4%)、FGFR2 (5, 8.9%)、PTEN (4, 7.1%)、FBXW7 (3, 5.4%)、AKT1 (2, 3.6%) であった。HPV (-) OPSCC では、TP53 (11, 45.8%) と PI3KCA (2, 8.3%) に最も一般的な変異が同定された。HPV (+) OPSCC と HPV (-) OPSCC では、TP53 の変異率にのみ有意差が認められた。HPV (+) OPSCC 群では、PIK3CA の E81K (3 例)、E542K (2 例)、E545K (6 例)、H1047L (1 例) に変異を認めた。HPV (-) OPSCC 群では、H1047L (2 例) のみに変異が同定された。

・生存成績

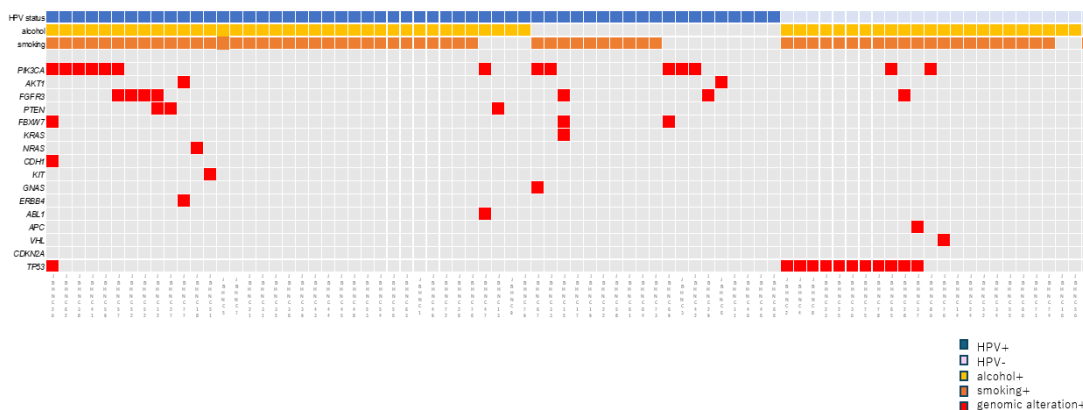
3 年 OS 率は、HPV (+) OPSCC 群で 91.4%、HPV (-) OPSCC 群で 36.8% であった (log-rank 検定 p<0.001)。HPV (-) OPSCC は HPV (+) OPSCC よりも OS が有意に不良であった (HR: 13.7, 95% CI: 4.39-42.5, p<0.001)。3 年 DFS 率は HPV (+) 患者で 86.5%、HPV (-) 患者で 36.8% であった (log-rank 検定 p<0.001)。HPV (-) 患者の OS は HPV (+) 患者より有意に不良であった (HR: 8.25, 95%CI: 3.23-21.1, p<0.001)。HPV (+) OPSCC の 3 年 OS 率は、野生型 (WT)-PIK3CA 患者で 95.7%、変異型 PIK3CA (PIK3CAmut) 患者で 76.4% であった (ログランク検定 NS)。単変量解析では、WT-PIK3CA 患者と PIK3CAmut 患者の OS に有意差はなかった (HR: 3.79, 95%CI: 0.53-26.9, p=0.18)。HPV (+) OPSCC において、3 年 DSF 率は WT-PIK3CA 患者で 91.4%、

変異 PIK3CAmut 患者で 69.4%であった (log-rank 検定で NS)。単変量解析では、WT-PIK3CA 患者と PIK3CAmut 患者の OS に有意差はなかった (HR : 3.79、95%CI : 0.53-26.9、p=0.18)。

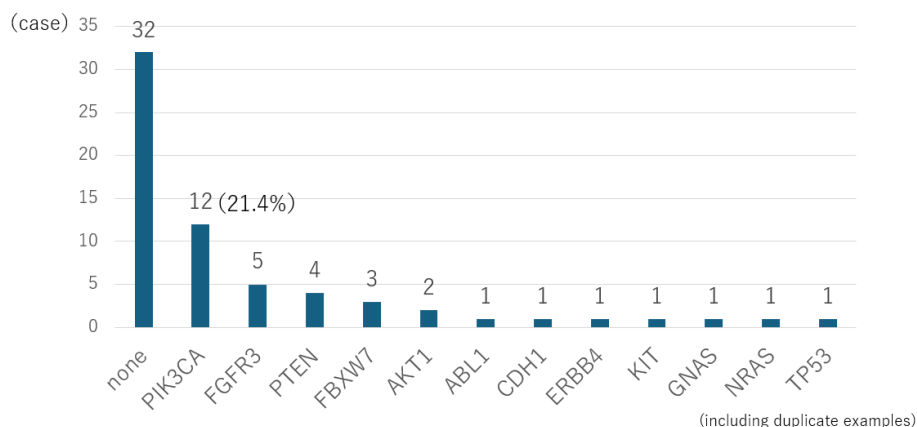
・考察

今回の結果から、日本における HPV が及ぼす中咽頭がん罹患率および再発率への影響は、欧米と顕著な差はないことが示唆された。また、我々の NGS データも、諸外国の研究で以前に報告されたのと同じ傾向を示した。これらの結果からは、日本における中咽頭癌のゲノム変化は、諸外国における中咽頭癌のゲノム変化と変わらないことを示している。また、HPV (+) OPSCC では TP53 変異の割合が低く、PIK3CA 変異の割合が高いことも明らかになった。HPV の状態に応じて異なる治療が推奨される可能性がある。さらに、我が国は HPV ワクチン接種率が低く、HPV (+) OPSCC の罹患率が増加する可能性が高いため、HPV (+) OPSCC のワクチンによる予防が必要と考える。

Mutation profiling

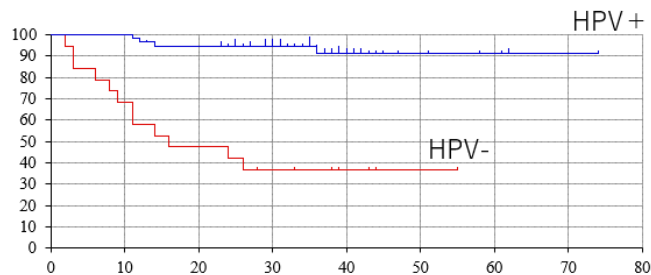


genomic alterations HPV (+)



3-year overall survival (OS) rates HPV(-) vs HPV(+)

HPV(-) 36.8% vs HPV(+) 91.4%



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yuki Saito, Ryuichi Hayashi, Katsunari Yane , et al	4. 巻 126(18)
2. 論文標題 Optimization of therapeutic strategy for p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: Multi-institutional observational study based on the national head and neck cancer registry of Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 4177-4187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.33062	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 家根旦有	4. 巻 92(5)
2. 論文標題 中咽頭腫瘍	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 耳喉頭頸	6. 最初と最後の頁 271-275
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 家根旦有	4. 巻 122
2. 論文標題 頭頸部癌におけるp16の意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日耳鼻	6. 最初と最後の頁 1164-1165
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 家根旦有	4. 巻 28(1)
2. 論文標題 HPV関連中咽頭癌の新TNM分類について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 9-14
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 家根 旦有	4. 巻 45(7)
2. 論文標題 AJCC/UICC TNM病期分類システムの現状と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 1042-1045
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 家根 旦有	4. 巻 44(3)
2. 論文標題 新TNM分類 (第8版) の改定点と問題点	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 頭頸部癌	6. 最初と最後の頁 253-257
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 中咽頭癌とHPV感染
3. 学会等名 第 58 回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 喉頭乳頭腫、HPV関連中咽頭癌
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 家根旦有
2. 発表標題 頭頸部がん治療の現状と問題点
3. 学会等名 第 57 回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家根旦有
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌後方視的観察研究・登録結果
3. 学会等名 第31回日本喉頭科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家根旦有
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌後方視的観察研究・登録結果
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家根旦有
2. 発表標題 AMED「HPV関連中咽頭癌の治療最適化に関する研究」について
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌の研究報告
3. 学会等名 第35回奈良県頭頸部腫瘍研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたHPV陽性およびHPV陰性中咽頭癌の遺伝子解析
3. 学会等名 第42回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 「中咽頭癌を考える」HPV関連中咽頭癌の新TNM分類について
3. 学会等名 第28回日本頭頸部外科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 「AMED研究：頭頸部癌領域」-HPV関連中咽頭癌の治療最適化に関する研究
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 「新TNM分類（第8版）の改定点と問題点」-中咽頭癌の改定点と問題点
3. 学会等名 第42回日本頭頸部癌学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 家根 旦有
2. 発表標題 悪性腫瘍全国登録を活用したエビデンスの創出 登録説明会 「HPV関連中咽頭癌の後方視的観察」
3. 学会等名 第42回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	西尾 和人 (Nishio Kazuto) (10208134)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	
研究分担者	坂井 和子 (Sakai Kazuko) (20580559)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	
研究分担者	藤井 正人 (Fujii Masato) (70129633)	独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・その他部局等・研究員 (82643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------