

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16896

研究課題名(和文) HPVによる喉頭乳頭腫形成機構：増殖制御と免疫回避システムからのアプローチ

研究課題名(英文) Mechanism of laryngeal papilloma formation by HPV: an approach from growth control and immune evasion system

研究代表者

池上 太郎 (Ikegami, Taro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00754409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HPV-6は9つの遺伝子を持つ。HPV-6感染・喉頭乳頭腫において、E4、E5aおよびE5bが全ウイルス遺伝子の発現の96%を占めていた。さらに、これら3遺伝子の発現は同期していた。さらにE4 遺伝子が最も発現していたことから、抗HPV-6E4抗体を作製し、E4タンパク質が乳頭腫内で主に発現することを証明した。以上より、喉頭乳頭腫の形成および維持にE4、E5aおよびE5bが重要な働きをすることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで喉頭乳頭腫においてHPV全遺伝子の発現および発現部位など詳細に調べられていなかった。本研究は、全遺伝子の発現プロファイルと発現部位を明らかにしたことより、喉頭乳頭腫におけるウイルスの動態の全体像を明らかにした。特に、E4、E5aおよびE5bが乳頭腫形成に重要な働きをしていることが示唆された。HPV-6 E4についてはこれまで抗体がなかったが、今回我々が世界で初めてモノクローナル抗体の作製にも成功した。今後、これらの成果をもとに治療法などの開発をして、臨床に還元していきたい。

研究成果の概要(英文)：HPV-6 has nine genes. In HPV-6-infected laryngeal papilloma, E4, E5a and E5b accounted for 96% of the total viral gene expression. Interestingly, these three genes were synchronously expressed in the same cells of laryngeal papillomas. Since the E4 gene was the most expressed, we produced an anti-HPV-6E4 antibody and proved that the E4 protein is the major expressed in papillomas. These results suggest that E4, E5a and E5b play an important role in the formation and maintenance of laryngeal papillomas.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科学

キーワード：喉頭乳頭腫 HPV-6 ヒトパピローマウイルス HPV in situ hybridization 抗体作製

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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 6 型または 11 型 (以下、HPV-6、HPV-11) が喉頭に感染することで形成される腫瘍で、多発性かつ再発性であり、難治性の疾患である。一般的に、喉頭乳頭腫において HPV-6 が最も主要なサブタイプで、HPV-11 は少ないことが知られる。HPV-6 および HPV-11 は 9 つの遺伝子 (E6、E7、E1、E2、E4、E5a、E5b、L2、L1) を持つ。HPV は扁平上皮細胞に感染し、細胞の分化に合わせて各ウイルス遺伝子を発現させている。一方、喉頭乳頭腫においては、HPV の各遺伝子の発現プロファイルから機能まで詳細はまだよくわかっていなかった。喉頭乳頭腫の治療法を確立するためには、ウイルスの遺伝子の分化に合わせた各ウイルス遺伝子の発現パターンなどの基本的な情報の集積が重要である。

### 2. 研究の目的

2010 年から 2018 年までの当科を受診した喉頭乳頭腫の患者は 16 名おり、そのうち HPV-6 が 13 名 (81.3%)、HPV-11 が 3 名 (18.7%) であり、HPV-6 が主要な HPV 型であった。そこで、本研究では最も喉頭乳頭腫で主要な HPV-6 に焦点を当て、9 つのウイルス遺伝子発現のプロファイルを調べ、さらに乳頭腫内における各遺伝子の発現の局在を明らかにすることを目的とした。その上で、最も発現の高い遺伝子に関してはさらに抗体を作製し、ウイルス mRNA が実際にタンパク質に翻訳されているかについても明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

まず 9 つのウイルス遺伝子発現量を測定するために HPV-6 の全ての遺伝子をクローニングし、リアルタイム PCR 法を用いた絶対量の測定系を確立し、測定をした。また喉頭乳頭腫内におけるウイルス量として、ウイルス DNA のコピー数についても同様の系で測定した。つづいて、発現の高い遺伝子と発現の低い遺伝子について喉頭乳頭腫内での局在を明らかにするため、RNA *in situ* hybridization 法を確立し、調べた。またウイルス DNA の局在についても DNA *in situ* hybridization 法で調べた。さらに発現の高い 3 つのウイルス遺伝子については、蛍光 RNA *in situ* hybridization を行い、共発現しているのか、調べた。抗体作製は、ウイルスタンパク質を大腸菌で発現させ、これを抗原タンパク質として用いた。つづいて、琉球大学免疫学・寄生虫学講座の村上明一先生が樹立したアルパカ VHH ファージライブラリーから ELISA で特異的にウイルスタンパク質に結合する抗体クローンを取得した。さらに HEK293T 細胞でウイルス遺伝子をトランスフェクションし、ウイルスタンパク質を発現させ、ウエスタンブロットを行い、より特異的にウイルスタンパク質に結合する抗体クローンを選別した。最後に、得られた抗体クローンを用いて、HPV-6 感染喉頭乳頭腫および HPV-11 感染喉頭乳頭腫の組織切片上で免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

HPV-6 感染・喉頭乳頭腫において 9 つのウイルス遺伝子 (E6、E7、E1、E2、E4、E5a、E5b、L2、L1) のうち、E4 遺伝子が最も高く発現しており、つづいて E5b、E5a の順で高く発現していた (図 1)。一方、この 3 遺伝子に比べ、E6、E7、E1、E2、L2 および L1 の発現は有意に低かった (図 1)。さらに、再発している 1 名患者でウイルス mRNA の発現とウイルス DNA 量を 80 ヶ月間調べたところ、ウイルス mRNA 量とウイルス DNA 量はパラレルに変動していた (図 2)。さらにウイルス DNA 量とウイルス mRNA 量の相関を 10 名の患者で調べたところ、ウイルス DNA 量と有意に正の相関があったのは、E5a mRNA と L2 mRNA であった。また有意差が出なかったが、E1 mRNA と L1 mRNA も正の相関を示す傾向があった。L1 と L2 はウイルスカプシドを構成するタンパク質であり、E1 はウイルス DNA の増幅に関わる DNA ヘリカーゼであることから、これらがウイルス DNA 量と同期する点は妥当な結果であった。一方、E5a はまだ機能がよくわかっていないが、他のハイリスク型 HPV などウイルス DNA の合成に関わる

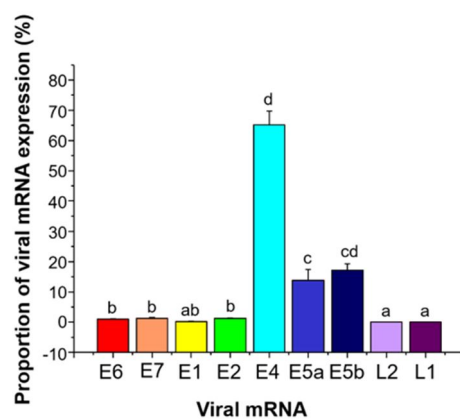


図1 HPV-6の9つの遺伝子の発現の割合。E4、E5aおよびE5bが全遺伝子の中で約96%を占める。

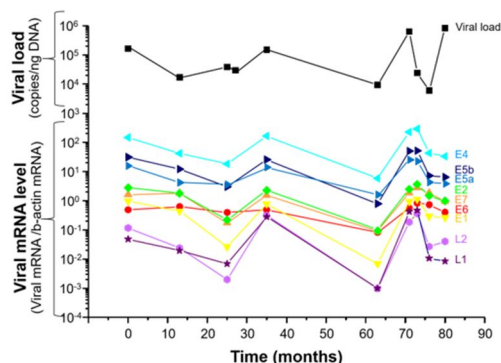


図2 80ヶ月間再発をした喉頭乳頭腫におけるウイルスDNA量とウイルスmRNA量の変動。ウイルスDNA量とウイルスmRNA量はパラレルに変動している。

ことが示されている。これらのことから、E5a はウイルス DNA の合成に関与していると予想された。つづいて RNA *in situ* hybridization 法を用いて発現の高かった E4、E5a および E5b の 3 遺伝子と発現の低かった E6 遺伝子および E2 遺伝子の発現局在を調べた。その結果、E4、E5a および E5b の 3 遺伝子は中間層から上層にかけて細胞質で強く発現していた (図 3C-E)。一方、E6 は中間層から上層の核で弱く発現しており、E2 は下層から上層の核で発現していた (図 3A、B)。さらに、HPV DNA に対する *in situ* hybridization を行ったところ、HPV DNA は中層から上層にかけて局在しており、中層から上層でウイルス DNA の合成が行われていることが明らかとなった (図 3F)。つづいて、E4、E5a および E5b が同じ細胞層で発現していたことから、同一の細胞で発現しているか明らかにするため、蛍光 RNA *in situ* hybridization を行ったところ、E4、E5a および E5b の 3 遺伝子は同一の細胞で発現していた (図 4)。最後に、最も発現の高かった E4 に対する抗体を作製するため、アルパカ VHH ファージライブラリーから抗体候補のクローンを 4 つ取得した。さらに HPV-6E4 および HPV-11E4 の発現ベクターを作製し、HEK293T 細胞へトランスフェクションし、HPV-6E4 タンパク質と HPV-11E4 タンパク質を発現させ、4 種類のクローン抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。その結果、4 つのクローンのうち、1 つが HPV-6E4 のみに結合した。つづいて、このクローン抗体を用いて HPV-6 感染喉頭乳頭腫および HPV-11 感染喉頭乳頭腫の組織切片で免疫染色を行ったところ、HPV-6 感染喉頭乳頭腫のみで染色された (図 5A)。染色個所は、E4 RNA *in situ* hybridization でシグナルが得られた個所と一致していた (図 3)。以上より、HPV-6 感染・喉頭乳頭腫において E4 遺伝子が最も発現し、E4 はタンパク質までに翻訳されていることが明らかとなった。E4 はウイルスの放出に関与することが、他の HPV サブタイプなどの研究で示唆されており、実際今回 E4 の発現する細胞は空胞状になっており、一部細胞の形態が壊れていた (図 4A) ことから、ウイルスの放出に関わっていると考えられた。さらに E4 は E5a および E5b と同期して発現しており、この 3 遺伝子の発現が最も高いことから、喉頭乳頭腫の形成や維持 (持続感染) などに関与している可能性が高い。今後、E4、E5a および E5b の機能を解明することで、乳頭腫の新たな治療法を開発できると考えられる。

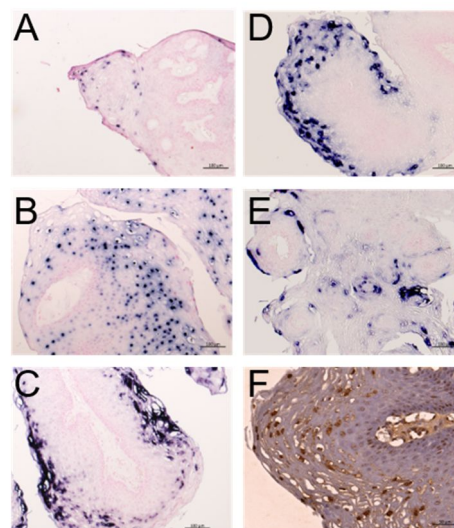


図3 HPV RNA *in situ* hybridization (A-E) および HPV DNA *in situ* hybridization (F)。E6 mRNA (A)、E2 mRNA (B)、E4 mRNA (C)、E5a mRNA (D)、E5b mRNA (E)。

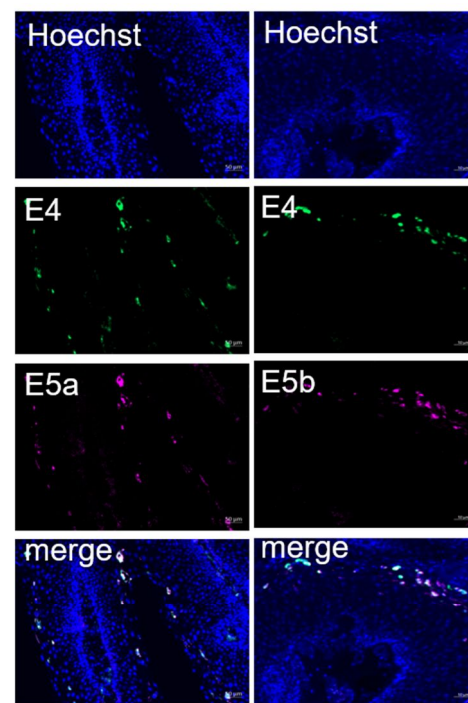


図4 蛍光 HPV RNA *in situ* hybridization。E4 および E5a は同一の細胞で発現しており、E4 および E5b は同一の細胞で発現している。以上より、E4、E5a および E5b は同一の細胞で発現する。

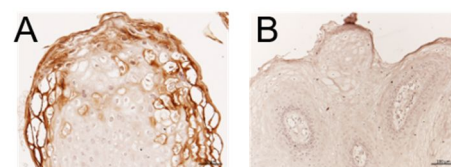


図5 作製した抗 HPV-6E4 抗体を用いた喉頭乳頭腫組織切片の免疫染色 (A、B)。HPV-6 感染・乳頭腫 (A)、HPV-11 感染・乳頭腫。抗体は、HPV-6E4 のみに結合した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ikegami Taro, Hirakawa Hitoshi, Tsukahara Narutoshi, Murakami Akikazu, Kise Norimoto, Kiyuna Asanori, Kosugi Takayoshi, Agena Shinya, Kinjyo Hidetoshi, Hasegawa Narumi, Touyama Masatomo, Kondo Shunsuke, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio, Ganaha Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Coordinated Expression of HPV-6 Genes with Predominant E4 and E5 Expression in Laryngeal Papilloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9030520	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 Kondo Shunsuke, Hirakawa Hitoshi, Ikegami Taro, Uehara Takayuki, Agena Shinya, Uezato Jin, Kinjyo Hidetoshi, Kise Noritomo, Yamashita Yukashi, Tanaka Katsunori, Hasegawa Narumi, Kiyuna Asanori, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio, Ganaha Akira	4. 巻 21
2. 論文標題 Raptor and rictor expression in patients with human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-07794-9	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 Agena S, Hirakawa H, Ikegami T, Kinjyo H, Kise N, Maeda M, Uezato J, Kondo S, Kiyuna A, Yamashita Y, Hasegawa N, Suzuki M, Ganaha A	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 expression in advanced pharyngeal cancer without human papillomavirus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Laryngology and Otology	6. 最初と最後の頁 -
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 HIRAKAWA HITOSHI, IKEGAMI TARO, AZECHI SATOE, AGENA SHINYA, UEZATO JIN, KINJYO HIDETOSHI, YAMASHITA YUKASHI, KIYUNA ASANORI, TANAKA KATSUNORI, KONDO SHUNSUKE, MAEDA HIROYUKI, SUZUKI MIKIO, GANAHA AKIRA	4. 巻 40
2. 論文標題 Induction Chemotherapy in Hypopharyngeal Cancer: Influence of DNA Repair Gene Polymorphisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3277-3285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.14310	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 Badruzzaman M, Ikegami T, Amin AKMR, Shahjahan Md	4. 巻 526
2. 論文標題 Melatonin inhibits reproductive activity through changes of serotonergic activity in the brain of freshwater catfish ( <i>Mystus cavasius</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquaculture.2020.735378	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 該当する

1. 著者名 疇地里衣, 平川仁, 池上太郎, 長谷川成海, 山下懐, 安慶名信也, 上原貴行, 田中克典, 上里迅, 真栄田裕行, 鈴木幹男	4. 巻 66
2. 論文標題 下咽頭癌におけるDNA修復酵素遺伝子多型と発癌についての検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 耳鼻と臨床	6. 最初と最後の頁 35-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11334/jibi.66.2_35	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 Hirakawa H, Ikegami T, Azechi S, Agena S, Uezato J, Kinjyo H, Yamashita Y, Tanaka K, Kondo S, Maeda H, Suzuki M, Gahana A	4. 巻 277
2. 論文標題 ERCC1 C8092A polymorphism predicts fair survival outcome in Japanese patients with pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Archives of Oto-Rhino-Laryngology	6. 最初と最後の頁 601-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00405-019-05731-y	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 金城秀俊, 山下懐, 池上太郎, 嘉陽祐紀, 上里迅, 安慶名信也, 上原貴行, 平川仁, 真栄田裕行, 鈴木幹男	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) 10.5981/jjhnc.45.397	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 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 1~9
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 該当する

1. 著者名 Haramura Takashi, Ikegami Taro, Wong Marty, Takei Yoshio	4. 巻 36
2. 論文標題 Preparatory mechanisms for salinity tolerance in two congeneric anuran species inhabiting distinct osmotic habitat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 215-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs180091	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 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 該当する

1. 著者名 Yamashita Yukashi, Ikegami Taro, Suzuki Mikio, Hirakawa Hitoshi, Maeda Hiroyuki, Yamada Satoshi, Deng Zeyi, Kondo Shunsuke, Kinjyo Hidetoshi, Kiyuna Asanori, Agena Shinya, Uehara Takayuki, Ganaha Akira	4. 巻 15
2. 論文標題 Hypopharyngeal cancer risk in Japanese: Genetic polymorphisms related to the metabolism of alcohol- and tobacco-associated carcinogens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 556-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jcrt.JCRT_980_17	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池上太郎, 喜友名朝則, 喜瀬乗基, 鈴木幹男
2. 発表標題 喉頭乳頭腫におけるHPVの時空間的遺伝子発現
3. 学会等名 第33回日本喉頭科学会総会ならびに学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上太郎
2. 発表標題 ヒトパピローマウイルス関連腫瘍診断薬の開発
3. 学会等名 BioJapan2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川仁, 池上太郎, 安慶名信也, 仲吉博紀, 島袋拓也, 鈴木幹男
2. 発表標題 エナジーデバイスの距離と組織の温度上昇の検討
3. 学会等名 第21回耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Badruzzaman M, Ikegami T, Amin AKMR, Shahjahan Md
2. 発表標題 Effects of day-length and melatonin on reproductive activity via changes of serotonergic activity in the brain of catfish <i>Mystus cavasius</i>
3. 学会等名 6th International Conference on Fisheries and Aquaculture 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上太郎、長谷川成海、喜友名朝則、鈴木幹男
2. 発表標題 HPV-6感染・喉頭乳頭腫における初期遺伝子および後期遺伝子の発現プロファイルとその局在
3. 学会等名 第3回日本HPV研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikegami Taro, Hasegawa Narumi, Maeda Kazutoshi, Kiyuna Asanori, Suzuki Mikio
2. 発表標題 Expression profiles and the localization of early and late genes in HPV-6-infected laryngeal papillomas
3. 学会等名 32nd International Papillomavirus Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池上太郎、上原貴行、平川 仁、真栄田裕行、鈴木幹男
2. 発表標題 側頸嚢胞におけるハイリスク型・ヒトパピローマウイルス-16の感染
3. 学会等名 第36回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

琉球大学 大学院医学研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座  
<https://ent-ryukyu.jp/>



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

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