

令和 3 年 6 月 9 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：18K17030
研究課題名（和文）HPV関連口腔がんにおけるポリADPリボースポリメラーゼの治療感受性に対する役割

研究課題名（英文）Explore the role of poly ADP ribose polymerase on chemo-sensitivity in HPV-related oral cancer

研究代表者
上原 佳里奈（Uehara, Karina）
琉球大学・医学部・助教

研究者番号：30782594
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陽性口腔がんは予後良好であるが、その機序は不明である。HPV16型 E6遺伝子を発現した細胞はポリADPリボースポリメラーゼ（PARP）の発現が高く、ポリADPリボシル化を強く誘導することから、HPV陽性口腔がんの予後は、PARP発現及びポリADPリボシル化の程度が関連すると考えられる。口腔がんの病理組織標本を用いてHPV感染とPARP発現を比較したところ、HPV非感染群と比べ、high-risk HPV感染群でPARP発現が誘導されることが確認できた。しかし、in vitro では口腔がん細胞株によってPARP発現が異なり、HPV感染との関連及び治療感受性との関連は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトパピローマウイルス（HPV）陽性口腔がんは、DNA修復酵素として知られるポリADPリボースポリメラーゼ（PARP）発現を誘導することが明らかとなり、HPV感染とPARP発現の関連が示唆された。今回、PARP発現と治療感受性の直接的な関連を明らかにすることはできなかったが、PARP活性が口腔がんのHPV陽性マーカーとして臨床応用に発展できる可能性がある。また、病理組織標本を用いてHPV感染とPARP発現を比較する際に、HPV型の特定を行った。引き続き、口腔がんとHPV感染の解析を進めることで、口腔がんにおける予後不良のHPV型を特定することができ、臨床上有益なデータを提供できる。

研究成果の概要（英文）：Human papillomavirus (HPV) related oral cancer shows high chemo-sensitivity with better prognosis, but its mechanism remains uncertain. Mouse embryonic fibroblasts expressing HPV16 E6 upregulate poly ADP ribose polymerase (PARP) and induce poly ADP ribosylation. We hypothesized that PARP and poly ADP ribosylation is related with chemo-sensitivity in HPV-related oral cancer. We found high-risk HPV infection such as HPV16 or HPV18 increases PARP in oral cancer formalin-fixed paraffin-embedded samples, but the association between HPV infection and PARP, that between PARP and chemo-sensitivity was not observed in vitro. In this study, we suggest HPV infection may induce high PARP expression in oral cancer. Further analysis is needed to confirm what factor influences better prognosis in HPV-related oral cancer.

研究分野：細胞生物学・病理細胞学

キーワード：HPV PARP 口腔がん 治療感受性

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は、口腔がん発生の主因の一つとして考えられている。HPV は発がん性により high-risk HPV と low-risk HPV に分類されており、口腔がんでは主に high-risk HPV である 16 型や 18 型が検出されている。

近年では、口腔がん組織から low-risk HPV も検出されており、その数は増加傾向にあると報告されている (Lee et al. 2013)。low-risk HPV 陽性口腔がんは発がん性が低いにもかかわらず、化学療法の治療感受性が低く、予後不良である一方、発がん性の高い high-risk HPV 陽性口腔がんは治療感受性が高く、予後良好であると報告されている (Rautava et al. 2012)。「なぜ HPV 型によって予後が異なるのか」、その機序は未だ解明されていない。

近年では、新しい治療標的として、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) が注目されている。PARP は活性酸素や放射線により生じた DNA 一本鎖切断の修復に関わる酵素で、NAD⁺ を基質とし、標的タンパクにポリ ADP リボースを結合させる (ポリ ADP リボシル化反応)。HPV は恒常的に酸化ストレスを誘導することで DNA を損傷し、ウイルス DNA を宿主のゲノムに組みこむことが知られており、これが過剰な PARP 活性を誘導している可能性がある (右図)。申請者は、high-risk HPV 発現細胞において、low-risk HPV 発現細胞より PARP 活性が高く、強いポリ ADP リボシル化が起こることを確認している。PARP 活性の高いがん細胞では、過剰なポリ ADP リボシル化が起こり、ATP や NAD の消耗によって容易に細胞死へ陥ると報告されている (Agarwal et al. 2009)。これより、HPV 型による PARP 活性の違いが治療感受性に影響する可能性が考えられる。本研究により、口腔がんにおける PARP 活性と治療反応性の関連が明らかになれば、PARP 阻害剤を用いた新たな治療戦略により口腔がんの予後を改善できる可能性を秘めている。

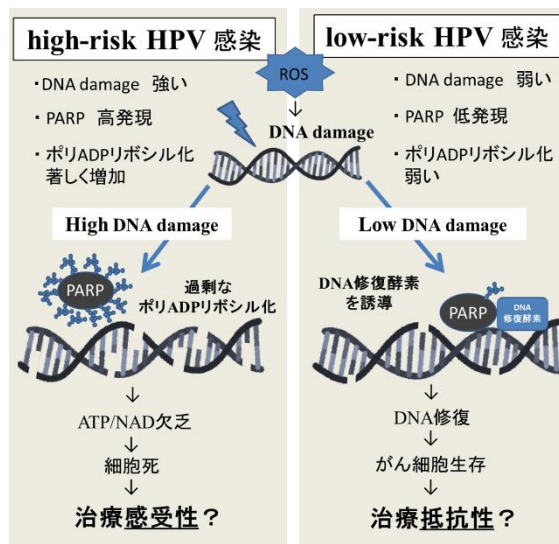


図. HPV 型による PARP 活性と治療感受性の仮説

2. 研究の目的

HPV 感染による PARP 活性化と治療感受性の関連を明らかにし、得られた知見を基に臨床応用への基盤を形成する。

目的 I. HPV 感染における酸化ストレスと PARP 活性の予後への影響

口腔がんの病理組織標本を用いて病期と治療法を揃えたうえで、以下の事を明らかにする。

- I-1. HPV 感染の有無や HPV 型と 5 年生存率の関連を明らかにする。
- I-2. HPV 感染の有無や HPV 型と PARP 活性の関連を明らかにする。
- I-3. PARP 活性と 5 年生存率の関連を明らかにする。

目的 II. PARP 阻害剤を用いた口腔がんの新たな治療戦略の基盤形成

HPV 陽性口腔がん細胞株と HPV 陰性口腔がん細胞株および、HPV 陰性口腔がん細胞に high-risk HPV E6/E7 や low-risk HPV E6/E7 を導入した細胞株を用いて、以下の事を明らかにする。

- II-1. PARP 活性とポリ ADP リボシル化を比較し、化学療法への反応性を検討する。
- II-2. PARP 阻害剤で処理し、化学療法への反応性を比較する。
- II-3. ノードマウスに接種し腫瘍を形成させ、化学療法のみ使用時と PARP 阻害剤と化学療法併用時の効果を比較する。

3. 研究の方法

実験 I. 口腔がん症例における HPV 型と予後の関連 (目的 I-1)

口腔がんの病理組織標本から DNA を抽出し、HPV type specific primer を用いた PCR により、HPV 陰性群、high-risk HPV 陽性群、low-risk HPV 陽性群の 3 つに分類する。臨床情報 (病期・治療内容・予後等) から各群の生存曲線を作製する。

沖縄県の口腔がんは HPV 感染率が高いことから (Tshako et al. 2000)、HPV 感染の予後に対する影響の検討に適しており、統計学的に有意なデータを得ることができる。

実験 II. 口腔がん症例の PARP 活性と予後の関連 (目的 I-2, 3)

口腔がんの病理組織標本を用い、酸化ストレス指標である 4-HNE と 8-OHdG、PARP、ポリ ADP リボースを免疫組織化学染色にて比較する。臨床的な指標 (病期・治療内容等) を揃えた上で、① HPV 陰性群と HPV 陽性群および、② high-risk HPV 陽性群と low-risk HPV 陽性群間で PARP の陽性率と 5 年生存率を比較する。

実験 III. 培養口腔がん細胞における PARP 活性と治療感受性の関連 (目的 II-1, 2)

HPV 感染による PARP 活性化と治療感受性を検討するため、① HPV 陽性口腔扁平上皮がん細胞株と HPV 陰性口腔扁平上皮がん細胞株および、② HPV 陰性口腔がん細胞に high-risk HPV E6/E7 や low-risk HPV E6/E7 を導入した細胞株を用いて以下の実験を行う。Western blotting にて PARP 発現量とポリ ADP リボシル化を比較し、ELISA にて PARP の酵素活性を測定する。代表的な抗がん剤であるシスプラチンを投与し、各細胞株の生存率を MTT assay で比較する。さらに、PARP 阻害剤と抗がん剤併用時による各細胞株の生存率も検討し、PARP 阻害剤の有無によって治療反応性を比較する。

4. 研究成果

口腔がん症例における HPV 型と予後の関連

口腔癌の病理組織標本から抽出した DNA を用いて HPV 感染の有無と HPV 型を特定し、HPV 感染群と HPV 非感染群で DNA damage および PARP 発現を比較した。沖縄県の口腔癌症例の約 70% (108/146 例) で HPV 感染が確認でき、そのうち high-risk HPV 感染が 96 例 (88.9%)、low-risk HPV 感染が 6 例 (5.6%)、high-risk HPV と low-risk HPV の重感染が 6 例 (5.6%) であった。HPV 感染群と HPV 非感染群で DNA damage の程度に差は無く、Stage I~II 症例の HPV 感染群、特に high-risk HPV 感染群で有意に高い PARP 発現が確認できた。HPV 感染による PARP 発現の上昇が、治療感受性と関連する可能性が示唆される。

口腔がん症例の PARP 活性と予後の関連

HPV 感染と PARP 発現の関連を明らかにするため、培養細胞を用いた in vitro の解析を行った。HPV 陽性口腔癌細胞株 (UMSCC47, UCPISCC090) と HPV 陰性口腔癌細胞株 (HSC-2, SAS) における PARP 発現レベルは多様であり、in vitro での HPV 感染と PARP 発現の直接の相関は見られなかった。

また、PARP の下流経路を比較するため、DNA damage response の解析を行い、HPV 感染と治療感受性の関連について検討を行った。ATM, ATR, ChK1, ChK2 の発現レベルは、PARP 発現と同様に、細胞株によって異なり、シスプラチンを用いた治療感受性の検討においても差は見られなかった。今回の結果から、HPV 感染口腔がんは PARP 発現が高い傾向にあることが明らかとなったが、PARP 発現と治療感受性に直接的な関連はみられなかった。そのため、当初予定していた in vivo での PARP 活性と治療感受性の検討には至らず、課題が残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Karina Uehara, Yasuka Tanabe, Shintaro Hirota, Saki Higa, Zensei Toyoda, Kiyoto Kurima, Shinichiro Kina, Toshiyuki Nakasone, Akira Arasaki and Takao Kinjo	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Co-expression of low-risk HPV E6/E7 and EBV LMP-1 leads to precancerous lesions by DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC cancer	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-08397-0	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 Tamanaha-Nakasone Ayumi, Uehara Karina, Tanabe Yasuka, Ishikawa Haruna, Yamakawa Natsuko, Toyoda Zensei, Kurima Kiyoto, Kina Shinichiro, Tsuneki Masayuki, Okubo Yuko, Yamaguchi Sayaka, Utsumi Daisuke, Takahashi Kenzo, Arakawa Hirofumi, Arasaki Akira, Kinjo Takao	4. 巻 9
2. 論文標題 K1 gene transformation activities in AIDS-related and classic type Kaposi 's sarcoma: Correlation with clinical presentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-019-42763-0	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原佳里奈、喜名振一郎、新崎章、金城貴夫
2. 発表標題 AIDS関連型カポジ肉腫と古典型カポジ肉腫由来KSHV K1遺伝子の形質転換能と臨床像の関連
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原佳里奈、喜名振一郎、新崎章、金城貴夫
2. 発表標題 口腔がんにおけるlow-risk HPV E6とEBV LMP-1の二重発現細胞を用いた形質転換能の比較
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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