

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18812

研究課題名(和文) 宿主リン酸化酵素阻害による喉頭乳頭腫の新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of the new treatment of the laryngeal papilloma by host phosphoenzyme inhibition

研究代表者

川瀬 友貴 (Tomotaka, Kawase)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：10761968

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)：本研究では次の3点を明らかにすることを目的としていた。(1)喉頭乳頭腫の patient-derived xenograftを作成する(2)喉頭乳頭腫の培養細胞モデルを作成する(3)宿主のリン酸化酵素阻害による喉頭乳頭腫の抑制  
手術により採取した喉頭乳頭腫組織を超免疫不全マウスに移植したが、腫瘍の生着に至らなかった。また乳頭腫組織をマトリゲルあるいはコラーゲンに包埋した状態で培養を試みたが、上皮細胞の成長が確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、目的としていた patient-derived xenograft の作成および培養細胞モデルの樹立には至らなかった。今後培養条件等を再検討し、引き続き研究をすすめる所存である。  
本研究を進めることで、難治性疾患である喉頭乳頭腫の治療について新展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It was intended to determine three points of the next in this study.(1) Making patient-derived xenograft of the laryngeal papilloma (2) Making the cultured cell model of the laryngeal papilloma (3) Suppression of the laryngeal papilloma by the phosphoenzyme inhibition of the host.

The laryngeal papilloma tissue which we obtained by surgery was transfused into a super immunodeficiency mouse, but did not lead to the survival of tumor. Also, we tried culture in the state that embedded a papilloma tissue to mark Rigel or collagen, but the growth of epithelial cells was not confirmed.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：喉頭乳頭腫 宿主リン酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

### < HPV 感染症としての喉頭乳頭腫 >

近年、一部の中咽頭癌と高リスク型 HPV との関連が示唆され、中咽頭癌における HPV 研究は今やホットトピックスである。一方、喉頭乳頭腫は低リスク型 HPV、とりわけ HPV6 と HPV11 が発症にかかわっているが、世界レベルで見ても基礎的研究はほとんど進んでいない。これは、高リスク型が発症原因の子宮頸癌と低リスク型が発症原因の肛門生殖器疣贅との関係に似ている。

### < 喉頭乳頭腫に対する既存の治療の限界 >

喉頭乳頭腫の治療は手術が標準的とされているが、その再発率の高さゆえ、根治よりも単に呼吸路の確保のために幾度の手術を余儀なくされることも少なくなく、手術間隔の延長をゴールとする見方もある。頻回の手術は患者のみならず、その家族にも大きな身体的・精神的な負担となる。また、ゴールの見えない治療は医療者側の精神的負担も大きい。良性腫瘍でありながら生命の危機に侵され、Quality of Life への影響も計り知れない。そのためインターフェロン投与などの補助療法が行われてきたが、決定的なものはない。本研究の指導者も実施の経験がある、抗ウイルス作用を持つ核酸類似体であるシドフォビルを局所注入する治療の有用性が欧米から報告されてきた。この治療は先進的で、欧米ではかなり行われてきたが、未承認薬の適応外使用に関するハードルが高まり、現在はあまり行われていない。

### < 喉頭乳頭腫の研究が進まないのは適切なモデルがないため >

喉頭乳頭腫は決して発症頻度の高い疾患ではない。しかし、近年では、多岐にわたる癌研究における希少癌に対する研究の重要性も指摘されている。とは言うものの、これまで喉頭乳頭腫は、まれに癌化は見られるが良性腫瘍であることから研究の対象とされにくかった。さらに、喉頭乳頭腫の基礎研究が遅れている最大の理由は、培養細胞、動物ともに適切なモデルが存在しないことである。したがって、喉頭乳頭腫に関する研究を大きく進展させるためにこれらのモデルを作成することは、意義があると考ええる。

### < 異なる視点からの抗ウイルス療法 >

欧米でよく用いられてきたシドフォビルの抗ウイルス作用は、ウイルス DNA 合成時にシドフォビルの活性体が dCTP の代替として取り込まれ、ウイルス DNA の複製を阻害することに基づく。このような核酸類似体はまだ開発の余地は残されているものの、この難治性の疾患に対して、異なる機序により抗ウイルス作用を発揮する有効な薬剤がないか、モデルマウスを作成することで調べることが可能になると考える。

## 2. 研究の目的

「新たな薬物療法」の視点から、難治性疾患である喉頭乳頭腫の、patient-derived xenograft モデル、および 培養細胞モデルを作成し、さらに 核酸類似体とは異なる新たな薬物療法の可能性を探索するため、本研究を立案した。

癌の研究においては、patient-derived xenograft 作成や、三次元培養による培養細胞の樹立は腫瘍特性の解明、抗癌剤感受性や新たな治療薬の開発等、近年非常に注目されている手法である。従来、培養細胞モデルの樹立が困難であった喉頭乳頭腫において、これらの手法を応用するという本研究の視点は独自のものである。また、一般に抗ウイルス療法はアシクロビルに代表されるように核酸類似体に着目されがちであり、喉頭乳頭腫でもシドフォビルがよく用いられてきたが、宿主リン酸化酵素の阻害によりウイルス DNA から mRNA への転写を阻害するという視点は喉頭乳頭腫においては独自のものであり、新たな治療薬を創出する発展性を有するものである。

## 3. 研究の方法

Patient-derived xenograft の作成では、手術により採取した喉頭乳頭腫組織を細切した後マトリゲルに懸濁し、超免疫不全マウスである NSG マウス (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) の皮下に移植する。12 週間観察し、腫瘍の生着が見られた場合、腫瘍を採取し同様の処置にて次代の NSG マウスに移植する。安定して継代により patient-derived xenograft モデルとして確立する。

培養細胞の樹立では、手術により採取した喉頭乳頭腫組織を細切した後に、マトリゲルあるいはコラーゲンに包埋した状態で培養する。培養液として、通常の DMEM 等の他に、ケラチノサイ

ト専用の培養液や、線維芽細胞によるフィーダーを設ける等の工夫も行う。上皮細胞の成長が確認されればゲルごと採取し、培養液に懸濁後さらに次代の培養を行う。

癌やウイルスの研究において、種々の CDK 阻害薬が利用可能である。Patient-derived xenograft では、マウスにこれらの CDK 阻害薬を投与し、また培養細胞モデルでは培養液にこれらの CDK 阻害薬を追加し、腫瘍あるいは細胞の増殖の抑制効果を確認する。さらに、腫瘍組織あるいは細胞から蛋白質を抽出し、ウェスタンブロットにより RNA ポリメラーゼ II の CTD のリン酸化についても併せて検証する。培養細胞ではフローサイトメトリーにより細胞周期への影響の有無についても確認する。ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーの実施にあたっては、予め喉頭乳頭腫以外の商業ベースで利用可能な既知の培養細胞を用いて、種々の CDK 阻害薬の効果を確認しておく。

#### 4 . 研究成果

本研究では次の 3 点を明らかにすることを目的としていた。(1)喉頭乳頭腫の patient-derived xenograft を作成する(2)喉頭乳頭腫の培養細胞モデルを作成する(3)宿主のリン酸化酵素阻害による喉頭乳頭腫の抑制  
手術により採取した喉頭乳頭腫組織を超免疫不全マウスに移植したが、腫瘍の生着に至らなかった。また乳頭腫組織をマトリゲルあるいはコラーゲンに包埋した状態で培養を試みたが、上皮細胞の成長が確認されなかった。

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

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