

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06256・19K21350

研究課題名（和文）扁桃組織におけるmultifocalなヒトパピローマウイルス感染に関する研究

研究課題名（英文）Study on multifocal human papillomavirus infection in tonsils

研究代表者

鈴木 俊彦（Suzuki, Toshihiko）

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：30822895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトパピローマウイルス（HPV）関連中咽頭癌において罹患扁桃以外の扁桃組織におけるHPV感染を調べるために、auto-nested PCRを用いてHPVのDNAの検出を試みたが検出が困難であった。今後、異なる方法でPCRを行うことを検討している。また、非癌患者の摘出した口蓋扁桃におけるHPV感染を調べるため、PCRが困難だったことから、HPV感染の代替マーカーであるp16免疫染色を79症例で行い、全て陰性であった。PCRの検出方法が確立したら、p16免疫染色した検体でPCRを行い、比較検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV 関連中咽頭癌の非癌扁桃組織におけるHPV 感染率を知ることで、HPV がmultifocal に感染し第二のプライマリー、第三のプライマリーを生じる可能性を考察することができ、今後のHPV関連中咽頭癌の治療戦略の上で非常に重要なこととなりえる。また、非癌患者の摘出口蓋扁桃におけるHPV 感染を知ることで口蓋扁桃へのHPV 感染の年齢層別の特徴を見いだすことや、患者背景因子や嗜好歴などを比較することができ、口蓋扁桃へのHPV 感染のリスク因子を考察することができる。さらにp16 免疫染色と対比することにより、oncogenic なHPV 感染が生じ得るのかも検討できる。

研究成果の概要（英文）：We tried to detect HPV DNA using auto-nested PCR to investigate HPV infection in tonsillar tissues other than affected tonsils in human papillomavirus (HPV) -related oropharyngeal cancer, but it was difficult to detect. We are considering to perform PCR by different methods. To examine HPV infection in the isolated palatine tonsils of non-cancer patients, p16 immunostaining, a surrogate marker for HPV infection, was performed in 79 cases because PCR was difficult, and all were negative. Once the PCR detection method is established, PCR will be performed on the p16 immunostained sample for comparison.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ヒトパピローマウイルス（HPV） 扁桃 PCR p16

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)には100以上のサブタイプがある。HPV6やHPV11などの低リスク型とHPV16やHPV18などの高リスク型があり、古典的には、低リスク型HPVと尖圭コンジローマの関連が、ハイリスク型HPVと子宮頸癌の関連が知られてきた。近年、高リスク型HPVと中咽頭癌の関連が判明し、その臨床的・基礎的研究はホットトピックとなっている。子宮頸癌に関連するハイリスク型HPVはHPV16、HPV18、HPV45、HPV58が多いとされ、HPV16が約半数と言われている。一方、中咽頭癌においてはHPV16が約9割を占めている。中咽頭癌を含む頭頸部癌は古典的に飲酒・喫煙がリスクファクターとされてきて、いくつかの領域にまたがって広く同時性・異時性に発癌することが特徴で、field cancerizationとして注目を集めてきた。一方、HPV関連中咽頭癌は喫煙や飲酒との関連は乏しく、field cancerizationも見られないとされるのが一般の認識である。

2. 研究の目的

子宮頸部とは異なり、咽頭にはワルダイエル輪と呼ばれるリンパ組織が非連続性に存在し、代表的なものとして、中咽頭には左右口蓋扁桃と舌根扁桃、上咽頭には咽頭扁桃が挙げられる。Field cancerizationは少ないとされるが、これらの扁桃にmultifocalにHPVが感染し、同時性もしくは異時性にHPV関連中咽頭癌あるいはHPV関連上咽頭癌を発症する可能性があるのか研究することを目的とする。

本研究は2つのPARTから構成される。

(1) HPV関連中咽頭癌の罹患扁桃以外の扁桃組織におけるHPV感染を検索する。これは、HPV関連中咽頭癌におけるmultifocalなHPV感染の可能性を評価することを目的としている。

(2) 両側口蓋扁桃摘出術を実施された非癌患者の摘出口蓋扁桃におけるHPV感染を検索する。これは、小児から成人までの幅広い年齢層での口蓋扁桃におけるHPV感染率を把握することを目的としている。さらに、HPV感染の代替マーカーであるp16免疫染色も実施し、特にHPVを検出し得た症例における発現との関連も検討する。

3. 研究の方法

本研究では、GP5+/GP6+プライマーセットを用いて2回(1回目は35サイクル、2回目は20サイクル)のPCRを行うauto-nestedPCRをHPVDNAの検出に用いる。auto-nestedPCRの実施により、単回のPCRに比べて少なくとも 10^2 オーダーで検出能が向上し、優れた検出感度で新たなデータを創出・確立することができる。

(1) HPV関連中咽頭癌の罹患扁桃以外の扁桃組織におけるHPV感染について

中咽頭癌の診断時に、側壁癌(扁桃癌)であれば、患側口蓋扁桃、健側口蓋扁桃、咽頭扁桃から、前壁癌(舌根癌)であれば、右口蓋扁桃、左口蓋扁桃、咽頭扁桃から、ブラシを用いて擦過検体を採取し、検体は液状細胞診用保存液中に保存する。罹患扁桃以外の扁桃組織の検体としては、擦過検体よりも組織の方が望ましいと推測され、その点が本研究のlimitationとなる。しかし、非癌口蓋扁桃の摘出術や多発癌の疑われない状況でのランダム生検は倫理的に好ましくなく、摘出口蓋扁桃組織や生検組織を利用できる機会はほとんどないと思われるため、本研究では擦過検体を利用する。

(2) 非癌患者の摘出口蓋扁桃におけるHPV感染とp16発現

種々の理由で口蓋扁桃摘出術を受けた非癌患者の摘出口蓋扁桃を用い、HPVDNAを抽出し

GP5+/GP6+プライマーセットを用いて auto-nested PCR を行い、HPV DNA を検出する。この際、左右の口蓋扁桃のそれぞれについて実施する。あわせて p16 免疫染色も実施し PCR の結果と対比する。これにより、口蓋扁桃への HPV 感染の年齢層別の特徴を見いだすことができる。さらに、患者背景因子や嗜好歴との比較により、口蓋扁桃への HPV 感染のリスク因子を考察することができる。さらに p16 免疫染色と対比することにより、oncogenic な HPV 感染が生じ得るのか考察することができる。

4 . 研究成果

(1) HPV 関連中咽頭癌の罹患扁桃以外の扁桃組織における HPV 感染について

auto-nested PCR を行ったところ、陰性対照の PCR にて予想されないバンドが出現したため、試薬や反応条件を改めて実験を行ったが結果は変わらず、auto-nested PCR による DNA の検出は困難であった。そこで代用の方法として、リアルタイム PCR を用いた HPV DNA の検出を試みている。扁桃組織から採取した検体から HPV DNA の定量的に測定し、プラスミドを標準サンプルとして作成した標準曲線と比較する。PCR による検出が確立できるように実験を進めていく。また、標本採取・標本収集についても目標数まで達しておらず、他病院との連携も検討している。

(2) 非癌患者の摘出口蓋扁桃における HPV 感染と p16 発現

非癌患者の摘出口蓋扁桃における HPV 感染と p16 発現については、PCR が困難であったため、非癌患者の摘出口蓋扁桃の p16 免疫染色のみを行った。癌以外の疾患にて口蓋扁桃摘出術を行った 79 症例の口蓋扁桃に対して p16 免疫染色を行った。男女比は男性 39 例、女性 39 例であり、年齢別では 1～10 歳：33 例、11～20 歳：14 例、21～30 歳：16 例、31～40 歳：6 例、41～50 歳：6 例、51～60 歳：2 例、61～70 歳：1 例であった。手術診断は習慣性扁桃炎：25 例、扁桃肥大：36 例、病巣感染症：18 例 (IgA：14 例、皮膚疾患：4 例) であった。全ての検体で p16 免疫染色は陰性であった。PCR による HPV DNA の検出方法が確立したら、p16 免疫染色した検体についても PCR を行い、検出されるかどうか確認する予定である。

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