

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18247

研究課題名（和文）鶏卵モデルを用いた喉頭乳頭腫難治化要因の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism behind the occurrence of recurrent respiratory papillomatosis in the chorioallantoic membrane model.

研究代表者

中西 庸介（Nakanishi, Yosuke）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20623648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：研究の序盤においては、孵卵器を準備して、鶏卵の発育条件などの設定を行った。実際の喉頭乳頭腫患者の組織を鶏卵に移植する実験を施行した所、生着が確認された。鶏卵発育後にシドフォビル注入を行った所、すべての症例ではないが、一部(8検体中2検体)で腫瘍の消失を認めた。HPV-DNAのタイピングの解析では、手術症例では1例がHPV type11で他の症例はすべてHPV type6であった。腫瘍正着率と血管新生の程度と臨床像との相関については、今回の検討では明らかな相関を確認することが出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、腫瘍正着率と血管新生の程度と臨床像との明らかな相関を確認することは出来なかった。しかし、シドフォビル注入によって鶏卵に移植された喉頭乳頭腫の消失を認めた。HPV DNAの解析ではtype6が有意であり、HPV11との比較検討は出来なかった。以上のことから、腫瘍正着率と血管新生の程度との相関については定かではないものの、鶏卵モデルによって乳頭腫に対する抗腫瘍効果を同定し得る可能性が示された。今後は今回検討出来なかったペバシズマブを含め種々の薬剤を用いた検討が望まれる。

研究成果の概要（英文）：We set the conditions for the development of chicken eggs. The recurrent respiratory papillomatosis (RRP) tumor tissues were implanted on day 9 of the incubation and confirmed the adhesion to the experimental chorioallantoic membranes (CAM). Three days after the implantation, cidofovir was injected to the RRP tumor tissues. The two of eight RRP tumor tissues were disappeared. HPV DNA was detected in eight of eleven patients, comprising HPV11 in one case and HPV6 in 7 cases. The correlation of the adherence rate, the vascularization, and the clinical findings was not identified.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：喉頭乳頭腫 鶏卵モデル シドフォビル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喉頭乳頭腫は HPV の 6 型や 11 型が関与する、組織学的には良性の疾患である。一般に手術による切除が行われるが再発をくり返すことが多い。難治性の喉頭乳頭腫に対して手術治療に併用するさまざまな補助療法が行われているが、十分な治療成績には至っていない。申請者の所属講座では、抗ウイルス剤であるシドフォビルの局所投与による臨床試験を行っており、腫瘍縮小効果について報告した。

実臨床において、喉頭乳頭腫は喉頭ファイバーの narrow band imaging (NBI) で毛細血管が豊富に発達している事が確認されているが、同じ頭頸部の乳頭腫でも HPV の関与していない咽頭、副鼻腔の乳頭腫では喉頭に比して血管増生は乏しく、臨床的には治癒しやすい。喉頭乳頭腫と咽頭乳頭腫への HPV 感染率を検討した報告では、咽頭乳頭腫では 0/18 例 (0%) であり喉頭乳頭腫では 10/15 例 (66%) であった (Makiyama et al, 2012)。鼻腔乳頭腫においても HPV DNA の検出率が低いことが分かっており、腫瘍側の要因として HPV 感染と血管新生の誘導が喉頭乳頭腫の難治性という特徴的な病態を作り出していると考えた。また、インターフェロンや漢方薬における補剤の投与で再発抑制効果があることから喉頭乳頭腫難治化の要因として宿主の局所免疫の要因も関連していると考えられている (Gerein et al, 2005)。同じヘルペスウイルスである HSV の研究では、インターフェロンによってオートファジーが誘導され、HSV の分泌物によってオートファジーが阻害されることが分かっている (Tallóczy Z et al, 2002)。そこで、喉頭乳頭腫でもオートファジーの調節機構が難治化の要因になっていると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鶏卵モデルを用いた頭頸部乳頭腫難治化要因の解明である。難治化要因として腫瘍側の因子として血管新生、宿主側の因子としてオートファジーに着目して実験系を立てた。本研究では喉頭乳頭腫における HPV 感染と血管新生の程度、VEGF 発現レベルについて他部位の乳頭腫と比較検討することで喉頭乳頭腫の腫瘍側の難治性の要因として HPV 感染、血管新生が関与していることを *in vivo* モデルを用いて検証する。また、宿主側の要因としてオートファジー活性化および抑制による腫瘍増殖の変化を検証する。本研究の成果は、血管新生を標的とした薬剤と抗ウイルス剤との併用療法およびオートファジー調節による治療薬創出になると考えている。

3. 研究の方法

1) 頭頸部領域乳頭腫組織を移植した鶏卵モデルにおける腫瘍生着率、血管新生の程度の検討

検体の採取日に合わせて鶏の有精卵を 8 日間インキュベートする。その後、殻に穴を開け、「漿尿膜」上に細かく砕いた乳頭腫組織を乗せて、さらにインキュベートする。120 時間後 (5 日後) にも同様に写真を撮影し、24 時間後に比して増大傾向であれば生着したと判断する。血管新生の解析には、取り出した漿尿膜を顕微鏡で観察する。各部位の乳頭腫間で比較、統計学的に検討する。

2) 乳頭腫組織中の HPV DNA タイピング、コピー数および VEGF 発現の検討

乳頭腫組織の一部を DNA 解析用、一部をパラフィン切片用とする。キットを用いて、RT-PCR により HPV-DNA のコピー数を解析する。残りの組織をホルマリン固定後、パラフィン切片にした後、VEGF-A (rabbit-derived polyclonal antibody) を用いて免疫染色を行う。

3) 喉頭乳頭腫におけるHPV-DNAコピー数、腫瘍生着率および血管新生の程度と臨床像との相関についての検討

上記で得られた実験結果の内、喉頭乳頭腫について腫瘍生着の有無と各因子(血管新生 index、VEGF 発現の有無、HPV サブタイプ、HPV-DNA コピー数と実際の臨床像)との相関について検討を行う。臨床像の項目は、病変の進展度、過去の手術回数をを用いる。HPV-DNA コピー数や腫瘍生着率、血管新生 index、VEGF 発現の有無が臨床像と相関するかについて統計学的に解析する。

4) シドフォビルとベバシズマブのcombination therapyの治療効果の検討

臨床検体を採取の上、3分割にして、薬剤投与を行わないコントロール群、シドフォビルのみを投与する群、シドフォビルとベバシズマブを投与する群の3群に分けた。移植後3日目にシドフォビルを5mg/kgの量を、ベバシズマブは10mg/kgの量を血管内に注射する。判定は移植後7日目に行う。移植後3日目と7日目の腫瘍の(長径+短径)×1/2をの3日目と7日目の相対比を算出して3群間の腫瘍増殖率にて比較検討する。また、3日目、7日目の血管新生 index についても比較検討する。

5) オートファジー活性化剤および抑制剤の投与による腫瘍増殖、血管新生の比較検討

オートファジーを活性化剤イベルメクチンと阻害剤クロロキン投与による HPV-DNA コピー数の変化と血管新生の程度の変化について検証する。上記研究と同様移植後3日目に薬剤未投与群、イベルメクチン群とクロロキン群に分けて投与を行い、判定は移植後7日目に行う。オートファジーの指標として Beclin1 と Light chain 3 を腫瘍組織において免疫染色を行なって腫瘍増殖率を合わせて検討する。

4. 研究成果

1) 鶏卵の発育条件の設定を行った後に、実際の喉頭乳頭腫患者の組織を鶏卵に移植する実験を施行した所、生着及び血管新生が確認された。乳頭腫の組織量自体が少ないこともあり、一度に使用出来る検体(鶏卵)数が5から8個と比較が困難であった。咽頭乳頭腫では生着不良であり、血管新生の確認は出来なかった。

2) HPV-DNA のタイピングの解析では、手術症例11例では、8例で HPV が検出され、1例が HPV type11 で、その他はすべて HPV type6 であった。VEGF による免疫染色を行ったが、明らかな VEGF の発現は見られなかった。

3) 乳頭腫組織の生着率と血管新生、VEGF 発現の有無、HPV サブタイプ、HPV-DNA コピー数と実際の臨床像との相関について検討したが、明らかな相関は見られなかった。VEGF 発現がほとんど見られなかったことや HPV サブタイプ 11 の症例が1症例のみであったことなどが、比較検討を困難にした要因と考えられた。

4、5) 鶏卵発育後にシドフォビル注入を行った所、すべての症例ではないが、一部(8検体中2検体)で腫瘍の消失を認めた。シドフォビルの in vivo での効果は見られた。しかし、研究の進捗状況が遅れたため、ベバシズマブ投与を行う段階で本研究が終了となった。したがって、以後の検討は出来なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 中西庸介、吉崎智一	4. 巻 32
2. 論文標題 両側Ejinell法に口腔粘膜グラフトを併用しカニューレ抜去に成功した熱傷後声門後部癒着症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 喉頭科学会誌	6. 最初と最後の頁 184-188
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 Makita H, Kobayashi E, Hirai N, Komori T, Ueno T, Nakanishi Y, Endo K, Kondo S, Yoshizaki T	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of Head and Neck Cancer Treatments on Gonadal Function in Adolescent and Young Adult Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Practical Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 e7-r15
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 Dochi H, Kondo S, Komura S, Moriyama-Kita M, Komori T, Nanbo A, Sakaguchi M, Fukuyo M, Hamabe-Horiike T, Tanaka M, Mizokami H, Kano M, Kitagawa Y, Kobayashi E, Hirai N, Ueno T, Nakanishi Y, Endo K, Sugimoto H, Hanayama R, Kaneda A, Yoshizaki T	4. 巻 154
2. 論文標題 Peritumoral SPARC expression induced by exosomes from nasopharyngeal carcinoma infected Epstein-Barr virus: A poor prognostic marker	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 895-911
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 中西庸介、吉崎智一	4. 巻 33
2. 論文標題 喉頭気管乳頭腫への挑戦	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 頭頸部外科学会誌	6. 最初と最後の頁 139-142
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西庸介
2. 発表標題 喉頭気管乳頭腫への最前線
3. 学会等名 第33回日本喉頭科学会ならびに学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西庸介、吉崎智一
2. 発表標題 当科でELPSを施行した下咽頭癌症例における術後断端評価の検討
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西庸介、吉崎智一
2. 発表標題 手術加療にて音声改善を認めた陳旧性輪状軟骨骨折の1例
3. 学会等名 第72回日本気管食道科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西庸介、吉崎智一
2. 発表標題 当科における喉頭乳頭腫の手術症例
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西庸介、吉崎智一
2. 発表標題 当科における喉頭気管乳頭腫の治療～手術とシドフォピル治療～
3. 学会等名 第73回日本気管食道科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakanishi Y
2. 発表標題 Surgical Management for Obsolete Cricoid Fracture Following Blunt Trauma
3. 学会等名 13th East Asian Conference on Phonosurgery
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中西庸介、吉崎智一
2. 発表標題 喉頭癌における重複癌についての検討
3. 学会等名 第74回日本気管食道科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中西庸介、吉崎智一
2. 発表標題 喉頭癌における重複癌についての検討
3. 学会等名 第36回日本喉頭科学会
4. 発表年 2023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
---------	---------