

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18259

研究課題名（和文）腫瘍関連神経と癌微小環境の相互作用によるHPV関連中咽頭癌発癌機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of HPV-associated oropharyngeal tumor carcinogenesis through the interaction between tumor-associated nerves and the cancer microenvironment.

研究代表者

波多野 孝（HATANO, Takashi）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：40807583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年癌微小環境における癌細胞と神経細胞の相互作用が癌の進展や薬剤耐性に関連することが明らかになってきた。本研究の目的は、HPV関連中咽頭癌発癌機構における癌微小環境と腫瘍関連神経との相互作用の詳細を明らかにすることである。今回の研究期間内においては、腫瘍関連神経新生へ関わる micro RNAの絞り込みを行うとともに、腫瘍関連神経の研究を行う素地として、神経浸潤と関わるオルガノイドモデルの作製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌微小環境における癌細胞と神経細胞の相互作用が癌の進展や薬剤耐性に関連することが明らかになってきており、HPV関連中咽頭癌における癌微小環境と腫瘍関連神経との相互作用の詳細が明らかになれば、HPV関連中咽頭癌の発癌機構の解明や予後不良因子の同定へ寄与することとなり、HPVの有無により分けられている中咽頭癌の分類をより詳細に層別化することが可能となる可能性がある。今回の研究成果として、今後のオルガノイドモデル作製の成果は今後の中咽頭癌オルガノイドモデル作製の素地となり、研究をすすめる技術的基盤となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has become clear that the interaction between cancer cells and neurons in the cancer microenvironment is associated with cancer progression and drug resistance. The purpose of this study is to elucidate the details of the interaction between the cancer microenvironment and tumor-associated nerves in HPV-associated oropharyngeal cancer carcinogenesis. During the period of this study, we narrowed down the microRNAs involved in tumor-associated neurogenesis and established a salivary gland adenoid cystic carcinoma organoid model associated with nerve invasion as a basis for studying tumor-associated neurogenesis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：中咽頭癌 ヒト乳頭腫ウイルス オルガノイド 腫瘍関連神経 癌微小環境 唾液腺腫瘍

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 感染を主因とする HPV 関連中咽頭癌の罹患数は著しく増加傾向を示している。喫煙、飲酒を主因する従来型 (HPV 陰性) の中咽頭癌と比較して化学放射線治療に対する感受性が高く、HPV 陰性の従来型の中咽頭癌と比べ予後が良好である。そのため、2018 年に改訂された頭頸部癌取り扱い規約においても中咽頭癌は HPV 感染の有無により大きく異なる病期分類となった。しかしながら、HPV 関連中咽頭癌の中にも予後不良な経過をたどる症例は依然として存在しており、その原因は明らかではない。申請者らは、これまでに HPV 関連頭頸部癌に対して次世代シーケンサーを用いた解析にターゲット濃縮手法を組み合わせた独自の手法を用いて、ヒトゲノムに対する HPV の全組み込み部位を詳細に解析してきた。更に、これらのゲノム解析だけでなく、組み込み部位近傍の HPV 組み込みに伴うエピゲノム変化についても詳細に解析を行うことで、HPV 関連頭頸部癌で起きているエピゲノム変化が発癌機構につながる可能性があることを報告した (Hatano T et al. Int J Cancer. 2017)。

一方で、近年癌微小環境における癌細胞と神経細胞の相互作用が癌の進展や薬剤耐性に関連することが明らかになってきている。申請者らはこれまでに頭頸部癌と腫瘍関連神経について研究を進めてきた。しかしながら、HPV 関連中咽頭癌発癌機構における癌微小環境と腫瘍関連神経との相互作用の詳細は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、HPV 関連中咽頭癌発癌機構における癌微小環境と腫瘍関連神経との相互作用の詳細を明らかにすることである。具体的には 1. HPV 関連中咽頭癌由来エクソソームによる腫瘍関連神経新生の評価、2. エクソソーム中の腫瘍関連神経新生へ関わる micro RNA の同定、3. HPV 関連中咽頭癌オルガノイドモデルを作製し、同定した micro RNA が新生した神経へ及ぼす影響、およびそれに伴い HPV 関連中咽頭癌オルガノイドモデルを用いた増殖促進能の評価を行うことである。

### 3. 研究の方法

・ HPV 関連頭頸部癌細胞株由来エクソソームを用いた腫瘍関連神経新生の評価、および神経新生に関与する micro RNA の絞り込み

HPV 関連頭頸部癌細胞株の培養上清より超遠心によってエクソソームを抽出し、抽出したエクソソーム中の腫瘍関連神経新生へ関与する micro RNA を RNA sequencing により絞り込みを行った。

・ HPV 関連中咽頭癌オルガノイドモデルの作製のための技術基盤の確立

HPV 関連中咽頭癌手術検体を用いた初代培養とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびヒト間葉系幹細胞 (hMSC) と共に三次元共培養し、複数系の初代ヒト HPV 関連中咽頭癌オルガノイドを作製する。続いて上記で絞り込みを行った micro RNA (miR-X) を miR mimic で強制発現させた細胞、または antagomiR で発現を低下させた細胞を作製し、それらのオルガノイドとマウス神経節共培養による神経軸索新生の変化を測定する。今回の研究期間では、中咽頭癌オルガノイドモデル作製の前段階として、神経浸潤と関連があり、かつ細胞株の存在していない唾液腺腺様嚢胞癌を用いてオルガノイドモデル、および PDX モデルの作製を行うこととした。インフォームドコンセントを得た上で外科的に切除された 7 例の腺様嚢胞癌腫瘍検体を採取し、マトリゲルを用いてヒト由来唾液腺腺様嚢胞癌オルガノイドの作製、および NSG マウスを用いて患者由来異種移植片 (PDX) モデルの作製を行った。さらに、作製した PDX モデルより PDX 由来腺様嚢胞癌オルガノイドの作製を行った。

・ 作製した各モデルの特性解析および薬剤感受性試験

それぞれのモデルを特性解析 (免疫組織化学、RT-PCR、STR) により比較すること、および短期培養を行った PDX 由来唾液腺腺様嚢胞癌オルガノイドを用いた薬剤感受性試験を行った。

### 4. 研究成果

・ HPV 関連頭頸部癌細胞株由来エクソソームを用いた腫瘍関連神経新生に関与する micro RNA の絞り込みを行っている。

・ オルガノイドモデルおよび PDX モデルの作製

7 例中 5 例はオルガノイド培養が可能であった。また PDX モデルは 7 例中 4 例で樹立可能であった。PDX 由来オルガノイドを NSG マウスの顎下腺に同所性移植した結果、マウスは腫瘍を形成し、免疫組織化学や RT-PCR、STR によって原発腫瘍と比較し、組織学的・遺伝子学的に同一性が高いことを確認した (図 1)。さらに、短期培養した PDX 由来オルガノイドを用いて薬剤感受性試験を行い、シスプラチン、レゴラフェニブ、レンパチニブの IC50 を算出し、これまでのシスプラチ

ンへの感受性の報告に矛盾しない結果であることを確認した。

・今後の展望

今回の研究期間においては神経新生とかかわる micro RNA の絞り込み、および今後腫瘍関連神経の研究を行う素地として神経浸潤とかかわるオルガノイドモデルの作製を行った。今後現在作製したオルガノイドモデルを今後の中咽頭癌モデルへ応用するとともに、薬効評価の実験系へ使用すべく条件検討を継続している。

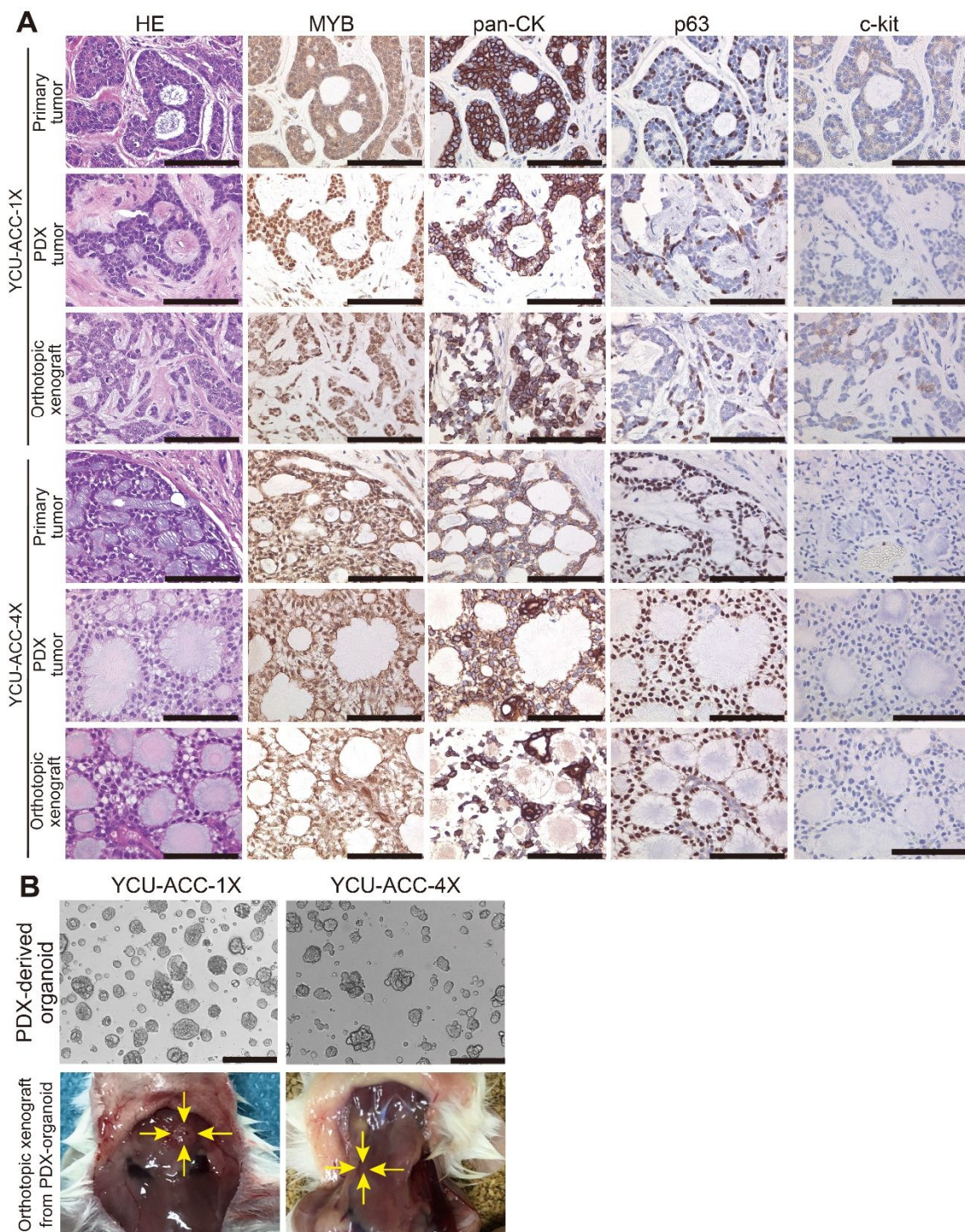


図1 .A , ヒト唾液腺腺様嚢胞癌の原発腫瘍 ( primary tumor ) , 患者由来異種移植片 ( PDX tumor ) , PDX 由来オルガノイドを移植した同所性異種移植片 ( Orthotopic xenograft ) . B , PDX 由来 ACC オルガノイドの顕微鏡画像 ( 上段 ) と PDX 由来 ACC オルガノイド用いて作成した同所性異種移植片像 ( 下段 ) .

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hatano T, Sano D, Takahashi H, Oridate N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pathogenic Role of Immune Evasion and Integration of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms.	6. 最初と最後の頁 891-891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9050891.	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 Takada K, Aizawa Y, Sano D, Okuda R, Sekine K, Ueno Y, Yamanaka S, Aoyama J, Sato K, Kuwahara T, Hatano T, Takahashi H, Arai Y, Nishimura G, Taniguchi H, Oridate N.	4. 巻 148
2. 論文標題 Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Cancer.	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33315. Epub 2020 Oct 7.	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 Hyakusoku H, Sawakuma K, Sano D, Takahashi H, Hatano T, Sato K, Isono Y, Shimada S, Takada K, Kuwahara T, Aizawa Y, Oridate N.	4. 巻 41
2. 論文標題 FosL1 Regulates Regional Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Promoting Cell Migration, Invasion, and Proliferation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 3317-3326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15119.	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 Nishimura G, Sano D, Arai Y, Takahashi H, Hatano T, Kitani Y, Takada K, Wada T, Hiiragi Y, Oridate N.	4. 巻 26
2. 論文標題 Validation of the risk factors for primary control of early T-stage laryngeal, oropharyngeal, and hypopharyngeal squamous cell carcinoma by transoral surgery: a prospective observational study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 1995-2003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-021-01992-y. Epub 2021 Jul 21.	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 高田 顕太郎, 波多野 孝, 荒井 康裕, 西村 剛志, 折館 伸彦	4. 巻 36
2. 論文標題 めずらしい腫瘍に対するアプローチ 病理がめずらしい 肉腫	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 1499-1502
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 -

1. 著者名 佐野 大佑, 波多野 孝, 折館 伸彦	4. 巻 30
2. 論文標題 経口的ロボット手術の導入 横浜市立大学における初期経験	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 139-140
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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 波多野 孝, 佐野 大佑, 高橋 秀聡, 折館 伸彦
2. 発表標題 ウイルス感染と頭頸部腫瘍 HPV関連中咽頭癌発癌におけるHPVの免疫逃避機構および組み込み機構の役割
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野 孝, 高橋 秀聡, 佐野 大佑
2. 発表標題 根治治療としてCRTを施行した中咽頭扁平上皮癌症例の予後予測におけるF-NLRの有用性
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 秀聡, 佐野 大佑, 波多野 孝, 佐藤 要, 桑原 達, 相沢 圭洋, 青山 準, 折館 伸彦
2. 発表標題 癌細胞のp53喪失は癌微小環境における神経の成長と再プログラムを通じて癌の進展を促す
3. 学会等名 日本癌学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野 大佑, 波多野 孝, 高橋 秀聡, 西村 剛志, 折館 伸彦
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌における再発、転移病変腫瘍径のニボルマブ治療効果予測に対する有用性について
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会学術総会・学術講演会
4. 発表年 2020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