

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18299

研究課題名（和文）HPV関連中咽頭癌におけるDNA損傷修復系と内因性免疫因子APOBEC3の発現

研究課題名（英文）Expression of DNA damage repair factors and APOBEC3 in HPV-associated oropharyngeal carcinoma

研究代表者

甲能 武幸（Kono, Takeyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90573410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HPV陽性中咽頭癌はATR・FA経路の因子と、その下流の相同修復因子の発現がHPV陰性中咽頭癌よりも有意に高く、DNA損傷も亢進していた。また、APOBEC3Bの発現も亢進し、両者は核内で共存していた。APOBEC因子の阻害でDNA損傷修復因子が減少し、DNA損傷修復因子の阻害でAPOBECの発現が低下した。逆に、DNA損傷の誘導でAPOBEC因子の発現が上昇した。即ち、HPV陽性頭頸部癌ではAPOBEC因子とDNA損傷修復因子が双方向に発現のトリガーとなる可能性が示唆された。HPV陽性中咽頭癌細胞では用量依存的にATR阻害剤投与による抗腫瘍効果の増強を認め、新規治療の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はHPV関連頭頸部癌におけるDNA損傷修復系因子とAPOBEC因子の発現について、そのトリガーとなりうる因子の解析を行い、新規治療標的の候補となりうる可能性を示した。DNA損傷修復経路の阻害剤併用により、既存のシスプラチンの抗腫瘍効果の上乗せが期待され、将来的には殺細胞性の抗がん剤の容量を軽減することで副作用のリスクを減らし安全な治療を実現するなどの効果も期待できるという点で、学術的、社会的に重要な意義のある成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：HPV-positive oropharyngeal cancer showed significantly higher expression of factors of the ATR and FA pathways and their downstream homologous repair factors than HPV-negative oropharyngeal cancer, and DNA damage was also increased. The expression of APOBEC3B was also increased, and both were co-localized in the nucleus; inhibition of APOBEC factors decreased DNA damage repair factors, and inhibition of DNA damage repair factors decreased APOBEC expression. Conversely, the induction of DNA damage increased the expression of APOBEC factors. In HPV-positive head and neck carcinoma cells, the dose-dependent enhancement of the anti-tumor effect by ATR inhibitor treatment was observed, suggesting the possibility of novel therapy.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：HPV 頭頸部癌 DNA損傷修復 APOBEC 新規治療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)関連頭頸部癌はシスプラチンを中心とした抗癌剤と放射線を併用した治療の反応が比較的良好だが、呼吸・嚥下・発声など、人間にとって必要不可欠な機能を司る頭頸部への侵襲の強い治療は著しく QOL を低下させることから、侵襲を軽減しうる補助療法の開発が必要である。また、現行の抗癌剤に抵抗性を示す症例も多く存在することから、治療効果の予測因子や難治症例に対する新たな治療の標的となりうる因子の探索が重要となる。そのために HPV の生活環や腫瘍化に至る分子生物学的機序の解明が必須だが、頭頸部領域では十分に検証されていない。

一方、子宮頸部領域においてはその一端が解明されつつあり、なかでも Laimins らは子宮頸癌の細胞株を用いて、宿主の DNA 損傷修復系のタンパクが HPV の生活環に参与することを証明した。具体的には、1 本鎖 DNA の損傷や複製フォークの停止により活性化される ATR 経路、2 本鎖切断により活性化される ATM 経路と、DNA 鎖間架橋の修復に参与する FA 経路が HPV の E6/E7 タンパクによって活性化され、これら経路の下流にある修復因子が選択的に HPV にリクルートされることにより、HPV ゲノムが維持・複製・増殖されることを明らかにした(図 1)[Moody, Laimins et al, 2009, 2017]。

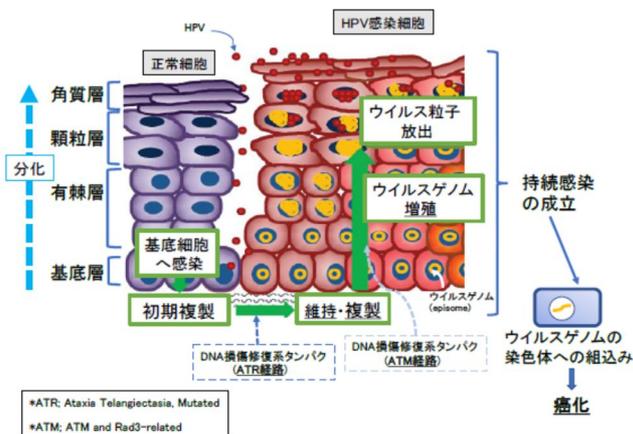


図 1 子宮頸部における HPV の生活環

また、内因性免疫因子である APOBEC3 が DNA 損傷に大きく関与しており、その結果引き起こされる変異によって HPV ゲノムの組み込みが生じやすくなり、癌化に至る機序も報告されている [Landry et al, 2011, Kondo et al, 2018]。

一方、近年 Zou らのグループは U2OS 細胞を用いた検討で、ATR 経路の阻害剤が抗癌剤の感受性を向上させる働きがあることを報告している [Buisson et al, 2018]。これらを背景に、HPV 陽性頭頸部癌においても DNA 損傷修復系や APOBEC3 などの因子が治療の標的となりうるのではと考えられ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

「HPV 関連中咽頭癌において、DNA 損傷修復系と APOBEC3 の発現レベルは変動するのか、そしてこれら因子の阻害は新規治療のターゲットとなりうるのか」を本課題の核心をなす「問い」とし、具体的に以下の 3 点を明らかにすることを目的としている。

HPV 陽性中咽頭癌細胞は HPV 陰性中咽頭癌細胞と比べて DNA 損傷修復系および APOBEC3 の発現レベルに違いがあるのか調べる。

APOBEC3 は DNA 損傷修復系の活性化に寄与するのか、あるいは DNA 損傷修復系が APOBEC3 の発現を亢進しうるのか、その機序について検討する。

HPV 関連中咽頭癌において、APOBEC3 や DNA 損傷修復系因子の阻害は抗腫瘍効果を示すか、あるいは既存のシスプラチンを中心とした抗癌剤や免疫チェックポイント阻害剤の効果を増幅しうるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 組織検体と HPV 検査

後方視的解析のためのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片組織は、全例で p16 免疫組織化学 (IHC) を行い、70%以上の強い染色が認められた場合に HPV 陽性と解釈した。また、DNA および mRNA in situ hybridization (ISH) による高リスク (HR) HPV 検査も全例で行った。

(2) 細胞株

頭頸部癌細胞株のうち HPV 陽性細胞株は UPCI:SCC090 および UPCI:SCC154 を用い、コントロールの HPV 陰性細胞株は SCC25 を用いた。UPCI 細胞株は、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、2mM L-グルタミンを添加した DMEM で培養した。SCC 細胞株は、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、ヒドロコルチゾンを添加した DMEM/F12 を用いて培養した。すべての細胞株は 37 で培養し、トリプシン処理により継代した。

(3) 免疫蛍光/免疫細胞化学

組織サンプルの切片は、キシレン、エタノールでの脱パラフィン化し、トリトン x-100 で透過処理した後に、クエン酸緩衝液で抗原除去を行った。正常ヤギ血清 (NGS) でブロックし、一

次抗体で4℃で一晩プローブした。トリトンx-100を含むPBSで3回洗浄した後、二次抗体を添加し、DAPIインキュベーションを行った。細胞株については、培地下で処理したカバースリップ上で細胞を増殖させ、4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後の透過処理、ブロッキング、一次抗体・二次抗体プローブは組織検体と同様のプロトコールを行った。

(4) ウェスタンブロット分析

RIPAバッファーで全細胞溶解液を抽出した。タンパク質濃度は、Bradford assayを用いて定量し、1ウェルあたり20μgのタンパク質溶解物をロードし、SDS-ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動により分離した。タンパク質をImmoblion-P、PVDF膜に移し、一次抗体と二次抗体でプローブした。プロットはECLを用いて現像し、Licor Odyssey FLイメージャーで可視化した。

(5) コメットアッセイ

細胞を低融点アガロースと合わせ、Comet Slide上に広げた。乾燥後、細胞を4℃で1時間溶解した。細胞を1x中性電気泳動バッファーに平衡化し、DNAを電気泳動スライドトレー上で21V、4℃で45分間分解した。DNAを沈殿させ、SYBR Goldで30分間染色した後、イメージングした。尾部モーメントは、オープンソースソフトウェアCometScore 2.0を用いて計算した。

(6) ノックダウン細胞作成

APOBEC3BとFANCD2を標的とするMission pLKO.1 shRNAを、pVSVGおよびpGag-Pol-Tat-Revとともに、50%コンフルエントの293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に培地を交換し、細胞をさらに24時間増殖させた。ウイルス上清を回収し、遠心フィルターを用いて濃縮した。レンチウイルス導入では、ウイルス粒子を標的細胞およびポリプレントインキュベートした。その後、ピューロマイシンを用いて細胞株を選択し、ノックダウンはウェスタンブロット分析で確認した。

(7) 統計解析

統計解析にはIBM SPSS Statics24ソフトウェアを使用し、2群間の比較は、対応のないスチューデントのt検定で行った。多群解析はKruskal-Wallis検定で行い、P値はHolm-Sidak法で調整した。0.05未満のP値は統計的に有意であるとみなした。

4. 研究成果

(1) HPV陽性頭頸部上皮細胞におけるDNA損傷修復系因子の発現

HPV関連頭頸部悪性腫瘍におけるDNA損傷修復因子のタンパク発現について評価するため、HPV陽性および陰性中咽頭癌の手術標本切片、細胞株を用いて両者を対比させながらWestern blotおよび免疫染色にて解析した。HPV陽性中咽頭癌はATRおよびFA経路の因子(pCHK1, FANCD2など)とその下流にある相同修復因子(BRCA1, RAD51, pSMC1)の発現がHPV陰性中咽頭癌よりも有意に高く、逆に子宮頸部とは異なりATM経路の因子(pCHK2)の発現はHPVの有無で有意差は認めなかった(図2A)。これらDNA損傷修復経路の活性化はDNA損傷に起因するものか評価するために、Comet assayでDNA損傷の程度を評価したところ、HPV陽性細胞で有意に損傷が生じていることが判明した(図2B)。

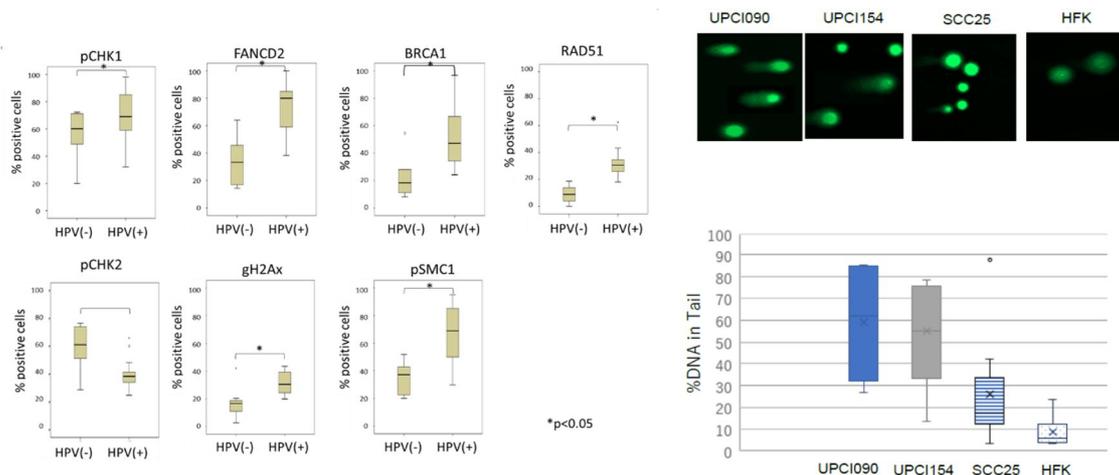


図2 HPV陽性or陰性中咽頭癌におけるDNA損傷修復経路因子の発現(A)とDNA損傷の評価(B)

(2) HPV陽性頭頸部上皮細胞におけるAPOBEC因子の発現

次にHPV陽性中咽頭癌におけるAPOBEC因子のタンパク発現について解析した。APOBECは11のサブタイプが存在するとされているが、先行研究から頭頸部癌と関係の深いとされるAPOBEC3Aと3Bを標的とした。APOBEC3Aに関してはHPVの有無によって有意な差は認めなかったが、APOBEC3Bの発現はHPV陽性中咽頭癌で有意に高く(図3A)、免疫染色にてDNA損傷修復系因子とAPOBEC3Bは癌細胞の核内で共在していることを確認した(図3B)。

このことから、頭頸部領域においては、ATRおよびFA経路とAPOBEC3BがHPVによる癌化に重

要な役割を持っている可能性が示唆された

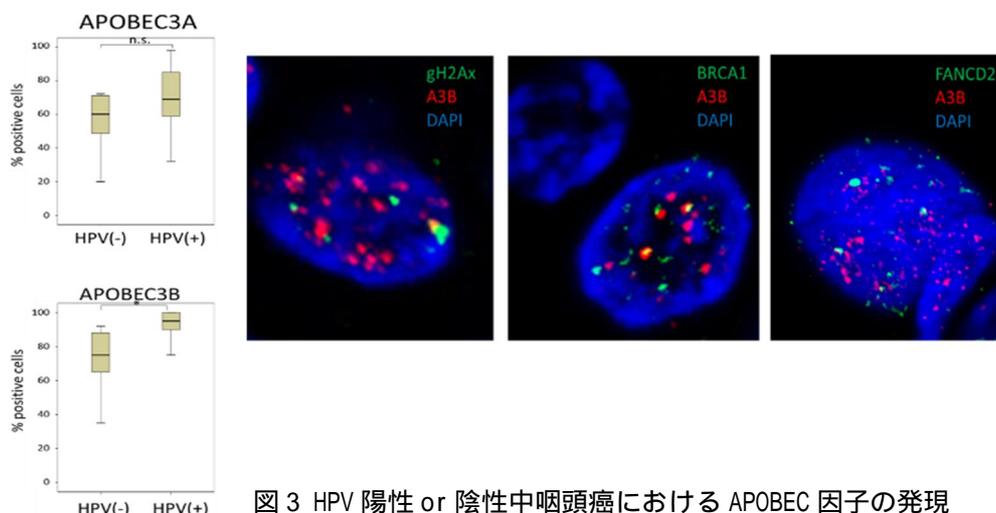


図3 HPV 陽性 or 陰性中咽頭癌における APOBEC 因子の発現

(3)DNA 損傷修復因子と APOBEC3 発現の相互関係

HPV 陽性頭頸部癌細胞において、APOBEC3B は DNA 損傷修復系の活性化に寄与するのか、あるいは DNA 損傷修復系が APOBEC3B の発現を亢進しうるのか検証した。まず、UPCI090 および UPCI154(HPV 陽性細胞)の APOBEC3B と FANCD2 のノックダウン細胞を shRNA にて作成した。APOBEC3B ノックダウン細胞ではDNA 損傷の程度が低下し、FANCD2の発現も低下した(図4A, B)。同様に、FANCD2 ノックダウン細胞では APOBEC3B の発現が低下した(図4C)。一方、UPCI090,154 細胞をシスプラチンで処理し、DNA 損傷を誘導すると、APOBEC3B の発現が上昇した(図4D, E)。このことから、APOBEC 因子と DNA 損傷修復経路の因子は双方向に発現のトリガーとなっている可能性が示唆された。

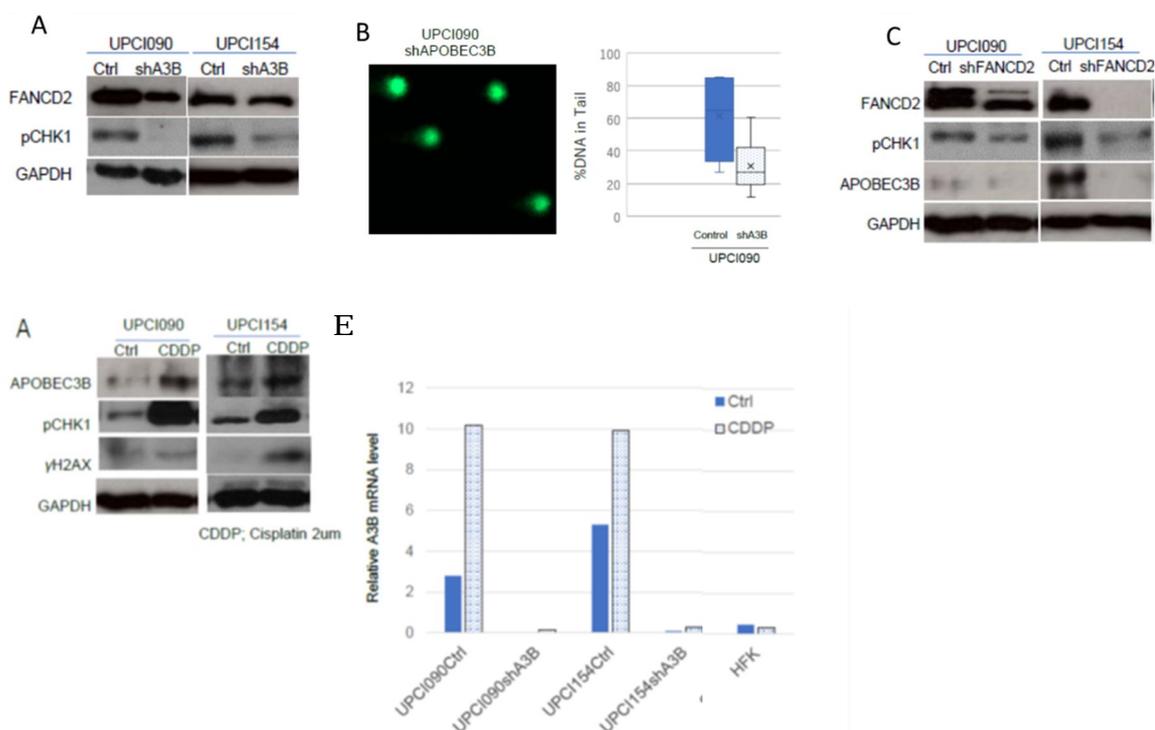


図4 HPV 陽性中咽頭癌細胞における DNA 損傷修復因子と APOBEC3 発現の相互関係

(4) HPV 関連中咽頭癌における APOBEC3 や DNA 損傷修復系因子の阻害は抗腫瘍効果

頭頸部癌における DNA 損傷修復系因子を標的とした治療の効果を検証するため、HPV 陽性中咽頭癌で発現が上昇していた ATR 経路および FA 経路の因子に着目し、まずは ATR 阻害剤の抗腫瘍効果を検証した。HPV 陰性中咽頭癌ではシスプラチン単独投与と比べ、ATR 阻害剤追加による抗腫瘍効果の上乗せは認められなかった。一方、HPV 陽性中咽頭癌細胞では用量依存的に有意に ATR 阻害剤投与による抗腫瘍効果の増強を認めた(図5A)。次に、HPV 陽性中咽頭癌の APOBEC3B ノックダウン細胞および FANCD2 ノックダウン細胞に対しシスプラチン投与を行い、

wild type の HPV 陽性中咽頭癌細胞への投与と比較して治療効果に差が生じるか検討した。その結果、いずれのノックダウン細胞も wild type より腫瘍増殖が制御されている傾向があったが、有意な差は認められなかった(図 5B)。

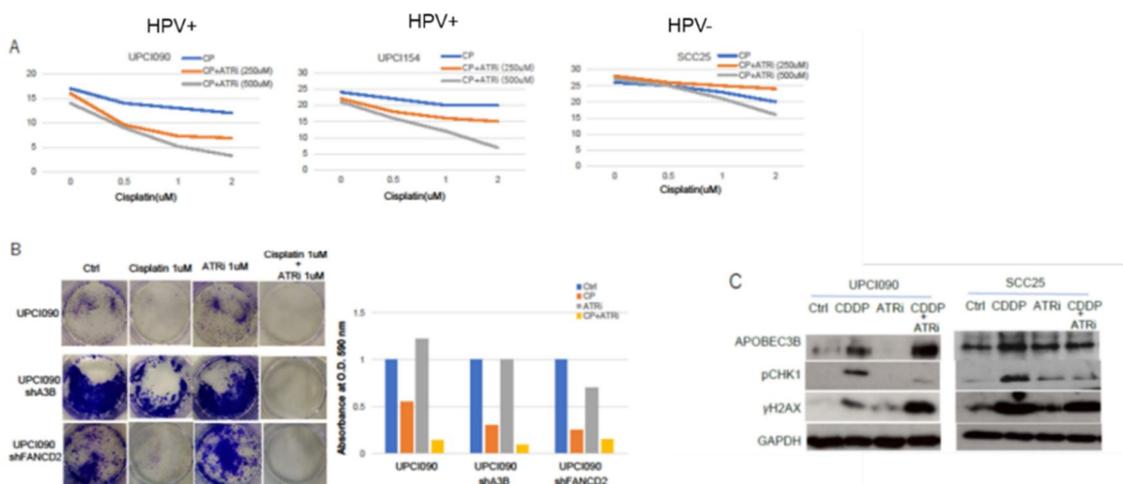


図 5 頭頸部癌細胞における DNA 損傷修復経路および APOBEC を標的とした治療の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kono T, Laimins LA	4. 巻 13
2. 論文標題 Genomic Instability and DNA Damage Repair Pathways Induced by Humn Papillomaviruses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1821-1832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13091821	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 該当する

1. 著者名 Kaminski P, Hong S, Kono T, Hoover P, Laimins L	4. 巻 12
2. 論文標題 Topoisomerase 2 induces DNA breaks to regulate human papillomavirus replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mbio	6. 最初と最後の頁 5-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00005-21	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 該当する

1. 著者名 Kono T, Hoover P, Poropatich K, Paunesku T, Mittal BB, Samant S, Laimins LA	4. 巻 547
2. 論文標題 Activation of DNA damage repair factors in HPV positive oropharyngeal cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 27-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2020.05.003.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 甲能武幸、小澤宏之
2. 発表標題 FANCD2 may serve as prognostic biomarker in HPV related oropharyngeal cancers
3. 学会等名 日本外科系連合
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲能武幸
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌におけるDNA損傷修復系因子の活性化と予後に関する検討
3. 学会等名 第31回日本頭頸部外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeyuki Kono, Hiroyuki Ozawa
2. 発表標題 FANCD2 may serve as prognostic biomarker in HPV related oropharyngeal cancers
3. 学会等名 AHNS 11th International Conference on Head and Neck Cancer (国際学会)
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
---------	---------