

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20813

研究課題名(和文) HPV関連中咽頭癌特有なEGFRパスウェイの解明

研究課題名(英文) Study of the EGFR pathway characteristic of HPV-related oropharyngeal cancer

研究代表者

鈴木 陽 (Suzuki, Yo)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10912975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、HPV関連中咽頭癌(以下、HPV-OPC)におけるEGFRパスウェイ異常の解明を目的とし、HPV-OPCにおけるEGFRタンパク・mRNA発現量の変化やその機序を追及し、EGFR下流パスウェイへの影響も明らかとすることを目的とした。中咽頭癌においてEGFR蛋白低発現はHPV関連癌にのみみられる事象であり、それらはEGFR遺伝子promoterメチル化・HPV-type16感染・virus genome E6の発現量と関連しており、非角化型の病理組織像と有意に関連していたが、遺伝子の変異/増幅/欠失などはみられず、その他の臨床病理像や予後には関与していなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌(HPV-OPC)では他の頭頸部癌と同様に抗上皮成長因子受容体(EGFR)薬であるセツキシマブ(EGFRモノクローナル抗体)が化学療法に使用されるが、これまでセツキシマブの治療効果予測因子として臨床的に確立されたものはない。HPV-OPCではセツキシマブの効果が乏しい症例も多く、治療薬の選択法を確立する必要があった。HPV-OPCではEGFR蛋白発現は低下傾向があり、更にウイルスゲノムやpromoter領域のメチル化に関連がみられた。これらを更に解明していくことで抗EGFR薬の治療効果予測因子や、HPV-OPC独自の治療法の重要なデータを提供することが可能となると考える。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to detect relating factors and clinicopathological impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein expression in HPV related oropharyngeal carcinoma (HPV-OPC), studying gene amplification/loss, gene point mutations, validating EGFR mRNA and promoter methylation of EGFR. In addition, the viral genome load of human papillomavirus type 16 (HPV16)-E5, -E6, and -E7 were evaluated. The decreased EGFR protein expression was more frequent in HPV-OPC than in nHPV-OPC and was related to EGFR methylation, infection of HPV16, and the viral genome load of HPV16-E6, but not to gene amplification/loss or the point mutation of EGFR. Clinicopathologically, it was related to the tumor histology of non-keratinizing SCC.

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) 上皮成長因子受容体(EGFR) HPVウイルスゲノム

## 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感染に起因する中咽頭癌(以下、HPV 中咽頭癌)は中咽頭癌の約半数を占め、喫煙や飲酒をリスク因子とする他の中咽頭癌 (以下、他中咽頭癌)とは臨床像が異なる(若年者好発、予後良好等)。HPV 中咽頭癌では他の中咽頭癌と同様に抗上皮成長因子受容体(EGFR)薬であるセツキシマブ(EGFR モノクローナル抗体)が化学療法に使用されることが多いが、これまでのセツキシマブの治療効果予測因子としては EGFR 変異型となる EGFR の発現が報告されたり[Sok J.C. et al. Clin Cancer Res, 2006]、その他多くの検討はされているものの未だ臨床的に確立されたものはない。HPV 中咽頭癌ではセツキシマブの効果の乏しい症例も多く、皮膚障害・間質性肺炎などの副作用も強いいため、その治療効果予測因子を見出し、治療薬の選択法を確立する必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、HPV 中咽頭癌における EGFR パスウェイ異常の解明である。HPV 中咽頭癌における EGFR タンパク・mRNA 発現量の変化やその機序をさらに追及し、EGFR 下流パスウェイへの影響も明らかとする。他中咽頭癌との違いを解明することで、HPV 中咽頭癌における抗 EGFR 薬の治療効果予測因子の確立を目指す。本研究の結果は、HPV 中咽頭癌独自の治療法の重要なデータを提供し、新たな治療戦略の道を切り開くことが期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、HPV 中咽頭癌において EGFR 経路の各因子の動態を解析し、また、その他の癌関連パスウェイ動態を網羅的に解析することを予定した。以前の研究者の研究に則り、症例数を増やして再度 EGFR 蛋白の発現量の変化とそれに寄与する因子を解明しつつ、EGFR 経路因子の動態に強い関連を示す、1 ウイルスゲノムと EGFR 蛋白発現量との関係性 2 リン酸化抗体を用いた PI3K-Akt 経路因子の免疫染色による評価を予定した。

#### (1) 中咽頭癌症例の EGFR 発現量についての検討

2004 年から 2019 年にかけて順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学講座で手術され、病理診断で扁平上皮癌と診断された中咽頭癌症例全 74 症例を対象とした。p16INK4A および EGFR の免疫組織化学染色(IHC)にて HPV 関連/非関連中咽頭癌を分類し、それぞれに対し EGFR 蛋白発現を高発現/弱発現/陰性に分類した。EGFR 遺伝子に対し蛍光免疫染色法(FISH法)、Sanger 法、methylation specific PCR を用いた分子生物学的検討を行い、さらに HPV ウイルスゲノム E5, E6, E7 の定量 PCR を行うことで HPV16 型関連中咽頭癌症例を抽出し、各ウイルスゲノム量と EGFR 蛋白発現との関係性を検討した。

#### (2) 培養細胞を用いた EGFR 下流パスウェイの活性化状態評価

HPV 感染扁平上皮癌細胞株(CaSki)と HPV 陰性扁平上皮癌細胞株(C33a)を用いる。申請者のこれまでの研究成果より、ウイルスゲノム E6 の過剰発現状態に関連し、EGFR 下流因子の活性化や、ウイルスゲノム E5 の相対的減少が見られる可能性があるとの仮説(図参照)に基づき、特に E6 の過剰発現系を作成し、EGFR-MAPK 経路、EGFR-PI3K 経路の各下流因子に着目した下記の解析を予定した。

HPV ウイルス感染特異的なシグナル伝達系の同定

上記の 2 つの培養細胞、E6 過剰発現系に対してリン酸化アレイを行い、リン酸化の状態を調べることから、HPV ウイルス感染に伴い活性化されるシグナル伝達系を同定するとともに、他のウイルスゲノム(特に E5)発現量との関連を調べる。

網羅的遺伝子発現解析

理化学研究所との共同研究として、CAGE 法(Cap Analysis of Gene Expression 法)による網羅的遺伝子発現解析を行い、有意に活性化の示唆されるシグナル伝達経路を絞り込む。バイオインフォマティクスおよびシグナル伝達経路との関連解析は、KEGG pathway と紐づいた解析ソフトを用いる。

#### (3) ヒト組織での活性化シグナル経路の検証と株化細胞での治療標的の探索

活性化シグナル経路の検証

ヒト中咽頭癌手術症例、ホルマリン固定パラフィン包埋切片(FFPE)を用い、上記 12 で同定した因子を検証する。シグナル伝達系はリン酸化/非リン酸化抗体を用いた免疫染色と定量 PCR で行う。

各種阻害剤による抗腫瘍効果の判定

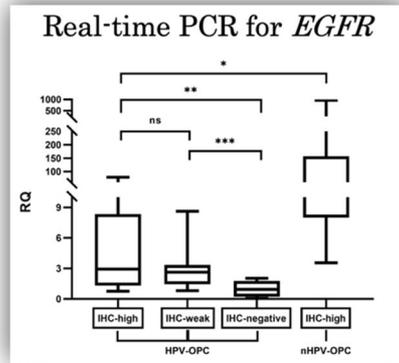
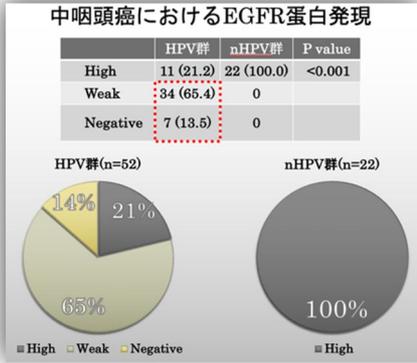
上記樹立細胞株を用いて、腫瘍発生に中心的な役割を果たしていると考えられるシグナル伝達経路をブロックすることで抗腫瘍効果を判定し、効果的な分子治療標的となる可能性を探る。

### 4. 研究成果

中咽頭癌全 74 症例のうち、ヒトパピローマウイルス(HPV)関連中咽頭癌(HPV-OPC)は 52 例、HPV 非関連中咽頭癌(nHPV-OPC)は 22 例であった。

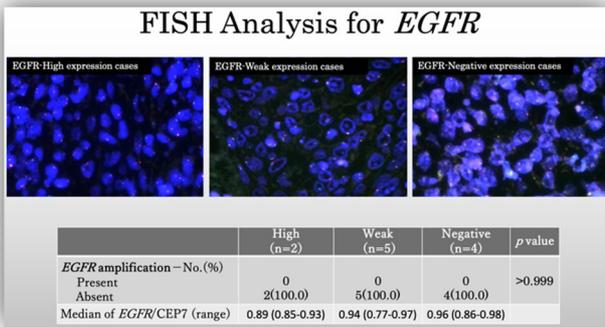
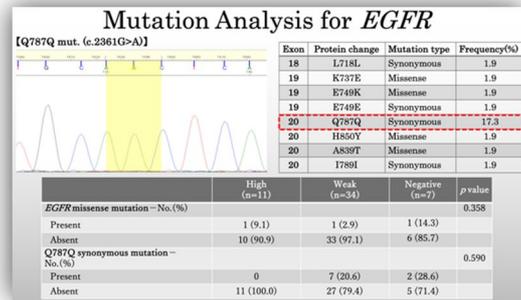
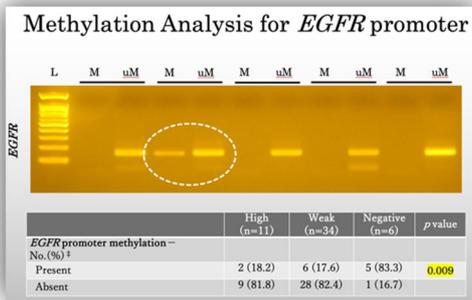
(1) EGFR 蛋白の発現量

nHPV-OPC 症例全症例で EGFR 蛋白は高発現(100%)であったことに対し、HPV-OPC 症例では高発現(21.2%)、弱発現(65.4%)、陰性(13.5%)を示した (p<0.01)。Real-time PCR においても同様な結果となった。



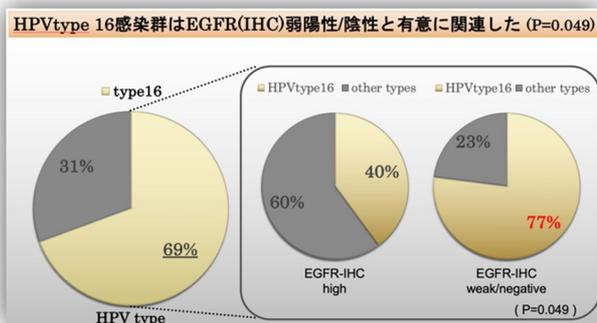
(2) EGFR 蛋白発現に寄与する分子メカニズムの解明

HPV-OPC において EGFR 弱発現/陰性群は EGFR 遺伝子のプロモーター領域メチル化に有意に関連していたが (p=0.009)、遺伝子増幅/喪失や EGFR 点突然変異とは関連を認めなかった。



(3) ウィルスタイプおよびウィルスゲノムの関与の検討

HPV16 型 E6/E7 の定量 PCR により HPV-OPC 全 52 例のうち HPV16 型関連中咽頭癌 (HPV16-OPC) 34 例が抽出され、EGFR 弱発現/陰性は HPV16-OPC の症例で高頻度に見られた (p=0.049)。また同群において EGFR 弱陽性/陰性症例は HPV16-E6 高発現との有意な関連を示した (p=0.019)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kojima Takashi, Suzuki Yo, Ohba Shinichi, Matsumoto Fumihiko	4. 巻 115
2. 論文標題 A Case of CASTLE that Was Difficult to Diagnose Preoperatively	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Practica Oto-Rhino-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 693 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5631/jibirin.115.693	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 Yokota Jun-Ichi, Suzuki Yo, Inoshita Ayako, Inomata Atsuko	4. 巻 81
2. 論文標題 Epstein-Barr virus (EBV)-associated cerebellar ataxia after surgery for suprasellar tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 148 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3757/jser.81.148	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 Kojima Takashi, Matsumoto Fumihiko, Suzuki Yo, Sakyo Airi, Kojima Masataka, Fujimaki Mitsuhsa, Ohba Shinichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Comparison of different methods for evaluating the relationship between facial nerve and benign parotid tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 SAGE Open Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/20503121221132357	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 Inoshita Ayako, Sata Naoko, Ohba Shinichi, Suzuki Yo, Ito Shin, Shiroshita Nanako, Kawana Fusae, Kasai Takatoshi, Higo Ryuzaburo, Ikeda Katsuhisa, Matsumoto Fumihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of radiotherapy for head and neck cancer on obstructive sleep apnea: a prospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Palliative Medicine	6. 最初と最後の頁 2631 ~ 2640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/apm-22-267	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 Inoshita Ayako, Matsumoto Fumihiko, Ohba Shinichi, Sata Naoko, Matsuoka Rina, Suzuki Yo, Ito Shin, Koiwai Hiroko, Shiroshita Nanako, Kasai Takatoshi, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 49
2. 論文標題 Severe obstructive sleep apnea after concurrent chemoradiotherapy for laryngeal and hypopharyngeal cancer managed by CPAP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.05.003	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 Suzuki Yo, Fukumura Yuki, Asahina Miki, Fujimaki Mitsuhsa, Ohba Shinichi, Matsumoto Fumihiko, Kurahayashi Isao, Yao Takashi, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 15
2. 論文標題 EGFR Protein Expression Relates with Tumor Histology, Methylation Status of EGFR and HPV16 E6 Viral Load in Oropharyngeal Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Head and Neck Pathology	6. 最初と最後の頁 743 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12105-020-01261-w	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 Inoshita Ayako, Matsumoto Fumihiko, Ohba Shinichi, Sata Naoko, Matsuoka Rina, Suzuki Yo, Ito Shin, Koiwai Hiroko, Shiroshita Nanako, Kasai Takatoshi, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Severe obstructive sleep apnea after concurrent chemoradiotherapy for laryngeal and hypopharyngeal cancer managed by CPAP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.05.003	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 Anzai Takashi, Baba Akira, Ito Shin, Suzuki Yo, Tajima Shori, Hara Satoshi, Takata Yusuke, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 2021
2. 論文標題 A Case of Aspiration Pneumonia Caused by Cerebrospinal Fluid Leaks Associated with Delayed Identification of Iatrogenic Skull Base Injury during Endoscopic Sinus Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/5532194	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木陽, 松本 文彦, 石川 数馬, 荒井 慎平, 小島 崇史, 大峽 慎一
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌における免疫チェックポイント阻害薬がもたらす生存率への影響
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島 崇史, 鈴木 陽, 大峽 慎一, 松本 文彦
2. 発表標題 p16陽性中咽頭癌の手術治療に対する検討
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大峽 慎一, 鈴木 陽, 小島 崇史, 藤巻 充寿, 松本 文彦
2. 発表標題 併存疾患を伴う高齢者頭頸部進行癌手術症例の検討
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井下 綾子, 鈴木 陽, 石水 瑛理奈, 松本 文彦
2. 発表標題 小児閉塞性睡眠時無呼吸症の咽頭手術前後における口腔機能の検討
3. 学会等名 第35回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島崇史, 鈴木陽, 大峽慎一, 松本文彦
2. 発表標題 顎下部からの急激な出血をきたした神経線維腫症の一例
3. 学会等名 第35回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 陽, 井下 綾子, 須田 翔子, 内藤 亮, 葛西 隆敏
2. 発表標題 コロナ禍おける生活様式の変化がCPAP使用者の睡眠・生活習慣へ及ぼす影響の検討
3. 学会等名 日本睡眠学会第47回定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 陽, 福村 由紀, 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 松本 文彦, 池田 勝久
2. 発表標題 中咽頭癌におけるEGFR蛋白発現には腫瘍組織像、EGFRメチル化状態、HPV16型E6ゲノム量が関与する
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 藤巻 充寿, 松本 文彦, 小島 崇, 鈴木 陽, 大峽 慎一, 池田 勝久
2. 発表標題 当科における中咽頭後壁癌の臨床病理学的検討
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 久保 怜子, 松本 文彦, 左京 愛莉, 小島 崇史, 鈴木 陽, 小島 雅貴, 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 池田 勝久
2. 発表標題 術後病理にて悪性腫瘍であることが判明した耳下腺癌の検討
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 小島 崇史, 松本 文彦, 鈴木 陽, 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 池田 勝久
2. 発表標題 耳下腺良性腫瘍における腫瘍局在診断法の検討
3. 学会等名 第34回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井下 綾子, 佐田 直子, 鈴木 陽, 大峽 慎一, 松本 文彦, 池田 勝久
2. 発表標題 頭頸部癌治療前後における閉塞性睡眠時無呼吸症併発の検討
3. 学会等名 第46回日本睡眠学会定期学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------