

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791974

研究課題名（和文） HPV 遺伝子導入口腔扁平上皮癌細胞の放射線化学療法に対する感受性について

研究課題名（英文） The sensibility of chemoradiotherapy in oral squamous cell carcinoma cells transfected with HPV-E6/E7 gene

研究代表者

石橋 美樹（ISHIBASHI MIKI）

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号：40412051

研究成果の概要（和文）：本研究は、HPV 陽性口腔扁平上皮癌細胞の放射線化学療法に対する感受性について解析する目的で行った。具体的には、口腔病変における正確な HPV 検出感染率を求め、さらに、HPV 陽性細胞と陰性細胞について免疫組織化学的（p16^{INK4a}、p53、CD4、CD8、CD68、CD1a、Ctrl）に検討した。その結果、口腔病変における HPV 検出率は 22.4% であり、HPV の有無による免疫染色結果との有意な相関も認められなかった。HPV 陽性細胞の化学療法感受性については今回検索したマーカー以外の他の要因が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the sensibility of chemoradiotherapy in HPV-positive oral squamous cell carcinomas. Briefly, we evaluated the frequency of HPV infection in oral lesions, and p16^{INK4a}、p53、CD4、CD8、CD68、CD1a Ctrl were immunohistochemically examined in order to evaluate its correlation with HPV infection. In oral lesions, the total HPV-positive rate was 22.4%. We did not find significant correlation immunohistochemically with HPV infection. The sensibility of chemoradiotherapy in HPV-positive cases depend on , suggesting the involvement of other factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、HPV、治療感受性、分子生物学

1. 研究開始当初の背景

HPV には 100 種類以上の型があり、これらの中で、16 型や 18 型などの粘膜指向性の高リスク型 HPV は、子宮頸癌の他にも肛門周囲癌、陰茎癌からも検出されており、ヒトの全がんの 5% 強において強い因果関係が示唆されている。その癌化メカニズムとしては、高

リスク型 HPV の E6 蛋白質、E7 蛋白質が感染細胞内で p53 と pRb を不活化して、遺伝子修復機構に異常を誘発し、癌化を引き起こすと考えられている。

口腔扁平上皮癌の発生には喫煙と飲酒が主な要因であることが分かっており、喫煙率の低下により喫煙が原因の口腔扁平上皮癌

は減少している。しかしながら、一方で、非喫煙、55歳以下、女性の口腔扁平上皮癌患者が増加しており、その原因として高リスク型 HPV との関与が注目されている。

しかしながら、現在まで、口腔扁平上皮癌における HPV の検出率は論文によりかなりばらつきがあり、HPV との関わりについては不確かな部分が多い。

そこで申請者は、まず、HPV の関与が明らかかな子宮頸部の前癌病変および扁平上皮癌を HPV 感染の陽性コントロールとして用い、口腔前癌病変と扁平上皮癌の臨床検体について HPV 検出率について評価を行った。

さらに、多くの癌では、ミスセンス変異による癌抑制遺伝子産物 p53 の異常により p53 の核内異常蓄積がおこるが、子宮頸癌では HPV による癌化過程で E6 蛋白質により p53 の分解が促進されると考えられている。そこで、p53 の異常蓄積を検討して、子宮頸部と口腔の発癌における p53 遺伝子のミスセンス変異の割合を検討した。また、HPV は子宮頸部に長期感染を引き起こしやすいことから、子宮頸部と口腔における免疫応答の違いが想定される。そこで、子宮頸部病変と口腔病変における免疫担当細胞について免疫染色を行い、両者の免疫応答の違いを検討した。

また、HPV が検出された口腔扁平上皮癌患者は化学療法と放射線療法による治療効果が高く、また、ウイルス量の多い口腔扁平上皮癌のほうがウイルス量の少ない口腔扁平上皮癌に比べて良好な予後を示すという報告もある。in vitro による検討では、HPV 陽性子宮頸部扁平上皮癌細胞の方が HPV 陰性扁平上皮癌細胞より化学療法・放射線療法に対する効果が低いという報告があり、HPV が検出される扁平上皮癌の中でも、子宮と口腔では化学療法・放射線療法に対する反応が異なることが推察される。そこで、化学療法の効果の違いについて明らかにするため、細胞内への Pt 取り込みを調整するタンパク発現 (Ctrl) について検討した。

2. 研究の目的

HPV 感染と化学療法の効果に関与する詳細なメカニズムについてはいまだ不確かな部分が多い。そこで、本研究では、HPV 検出口腔扁平上皮癌細胞の化学療法に対する感受性について明らかにし、特にその中で、HPV 陽性細胞と HPV 陰性細胞におけるプラチナ (Pt) 系抗癌剤の細胞内への取り込み機構について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

研究対象として、1995 年から 2008 年までの間に、切除した前癌病変 57 例と扁平上皮癌 50 例について、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて検討を行った HPV 感染の陽性指標として生検ないし手術を行った子宮頸部前癌病変 19 例と扁平上皮癌 10 例を用いた。HPV 感染の陰性コントロールとして、手術にて切除された筋組織を使用した。

(2) HPV 感染率に関する検討

①コンセンサスプライマーを用いた PCR

各パラフィンブロックから AquaPure Genomic DNA Isolation Kit® (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) にて DNA を抽出した。HPV-DNA の検出には、HPV ゲノムの L1 領域に対するコンセンサスプライマーである My09/My11 と Gp5+/Gp6+ の 2 種類のプライマーを用いた。ハイリスク型 HPV を含む 25 種類の HPV が検出可能とされている。PCR の反応には、My09/My11 に対しては 57°C、1 分間のアニーリング、Gp5+/Gp6+ に対しては 44°C 2 分間のアニーリングで、それぞれ 40 サイクルの増幅反応を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色して UV トランスイルミネーターで検出した。

②HPV typing 法

標識プライマーで PCR 増幅した HPV-DNA をとらえて発光させるマイクロアレイシステム (GeneSQUARE®, KURABO, Osaka, Japan) を用い検討した。この方法により、13 の高リスク型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) を含む 23 種類の HPV 型の検出が可能である。抽出した DNA について、これらの HPV 型に対する特異的なプライマーを用いて PCR を行った後、各 HPV に対するプローブの付いたマイクロアレイにアプライしてハイブリダイゼーションを行い (65°C、1 時間)、マイクロアレイスキャナーにて蛍光強度を測定した。

各プライマーは L1、L2、E2、E6、E7 領域などに設計されており、コンセンサスプライマーである My09/My11 と Gp5+/Gp6+ では増幅されない領域が含まれていることから、HPV 検出の判定にはコンセンサスプライマーを用いた PCR 法と、HPV typing 法のいずれかで検出されたものを陽性とした。

(3) p16^{INK4a}、p53、免疫担当細胞 (CD4・CD8・CD68・CD1a) について免疫組織化学的検討

p16^{INK4a} は CINtec Histology Kit® (mouse monoclonal antibody: clone E6H4, mtm laboratories, Heidelberg, Germany) を使用した。

p53 に対するモノクローナル抗体 (mouse

monoclonal antibody: clone D0-7, 1:200, Dako Cytomation, Denmark) を使用した。陽性細胞率と染色強度によるスコア値により評価した。核の対比染色にはヘマトキシリンを用いた。陽性細胞数は5段階評価(0: ≤5%, 1: 5-25%, 2: 25-50%, 3: 50-75%, 4: ≥75%)、染色強度は3段階評価(1: 弱陽性、2: 中等度陽性、3: 強陽性)を行い、その積をスコア値とした。

ヘルパーT細胞のマーカーとして抗CD4抗体(mouse monoclonal antibody: clone 4B12, 1:80, Novocastra, UK)、キラーT細胞のマーカーとして抗CD8抗体(mouse monoclonal antibody: clone 1A5, 1:40, Novocastra, UK)、マクロファージのマーカーとして抗CD68抗体(mouse monoclonal antibody; clone PG-M1, prediluted, Dako Cytomation, Denmark)、ランゲルハンス細胞のマーカーとして抗CD1a抗体(mouse monoclonal antibody: clone O10: prediluted, Dako Cytomation, Denmark)を用いて ENVISION 法にて染色し、核の対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

(4) HPVの有無による Ctr1 発現についての検討

上記より HPV 遺伝子を有する口腔扁平上皮癌を PCR 法にて同定し、その中から陽性、陰性症例を抽出した。各症例について抗 Ctr1 抗体を用い、免疫組織化学的に検討した。また、放射線化学療法を施行した症例と手術単独症例についても各 10 例抽出し、それぞれ抗 Ctr1 抗体を用い、免疫組織化学的に検討し、発現の差について比較検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床的検討

本研究では前癌病変 57 例と扁平上皮癌 50 例の口腔病変を対象として研究を行なった。前癌病変 57 例中、低異形成群(軽度異形成-中等度異形成)は 28 例、高異形成群(高度異形成-上皮内癌)は 29 例であった。患者は 12 歳から 81 歳まで(平均年齢 59.2 歳)の男性 57 名、女性 50 名であった。

一方、HPV 感染の陽性指標として用いた子宮頸部病変 29 症例は前癌病変 19 例と扁平上皮癌 10 例からなり、前癌病変 19 例中、低異形成群は 9 例、高異形成群は 10 例であった。

(2) HPV 感染率について

① コンセンサスプライマーを用いた PCR

子宮頸部病変において、My09/My11 と Gp5+/Gp6+ のコンセンサスプライマーの組み合わせを用いた。その結果、子宮頸部における HPV 陽性率は 96.6% (28/29) であり、この HPV 検出法の妥当性が確認できた。

一方、口腔病変では、低異形成群において 28 例中 6 例 (21.4%) に、高異形成群において

29 例中 3 例 (10.3%) に、そして扁平上皮癌において 50 例中 6 例 (12.0%) に HPV-DNA が検出された。従って、口腔病変全体における平均 HPV 陽性率は 14.0% (15/107) であった。

② HPV typing 法

子宮頸部病変では、29 例中 24 例 (82.8%) に HPV が検出された。内訳は 16 型が最も多く (41.4%)、次いで 58 型 (37.9%)、31 型 (20.7%) が検出された。また、重複感染が 13 例に認められた。一方、口腔病変では、低異形成群 28 例中 3 例 (10.7%)、高異形成群 29 例中 3 例 (10.3%)、そして扁平上皮癌 50 例中 3 例 (6.0%) に HPV が検出され、型別内訳は 16 型 1 例、31 型 5 例、58 型 3 例、61 型 3 例であり、重複感染は扁平上皮癌 1 例に認められた。以上、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法と HPV typing 法で得られた結果から、子宮頸部病変全体における平均 HPV 陽性率は 96.6% であった。一方、口腔病変の HPV 陽性率は、低異形成群において 32.1%、高異形成群において 20.7%、扁平上皮癌において 18.0% であり、口腔病変全体における HPV 陽性率の平均は 22.4% であった。

(3) p16^{INK4a}、p53、免疫担当細胞 (CD4・CD8・CD68・CD1a) について

子宮頸部の前癌病変や扁平上皮癌における p16^{INK4a} 発現は、HPV 感染の指標となっている。HPV 陽性率との関連については、子宮頸部病変 29 例中 26 例で p16^{INK4a} と HPV がいずれも陽性であった (一致率: 89.7%)。

一方、口腔病変では、p16^{INK4a} と HPV がいずれも陽性であったものは、低異形成群 3 例 (10.7%)、高異形成群 1 例 (3.4%)、扁平上皮癌 2 例 (4.0%) で、口腔病変全体における平均は 5.6% で、p16^{INK4a} 発現と HPV 陽性率との間に有意な相関は認められなかった (p=0.631)。また、HPV 陽性例と陰性例の間で、p16^{INK4a} の染色強度に明らかな違いは認められなかった。

p53 陽性反応をスコア値で算出したところ、子宮頸部病変では平均値は 0.2 であった。一方、口腔病変では、口腔病変全体における平均値は 3.2 となり、子宮頸部病変より有意に高いスコア値を示した。

子宮頸部病変と口腔病変において、HPV 検出率に差がみられた要因の一つとして、子宮と口腔の粘膜上皮における免疫応答の違いが関与しているのではないかと考え、子宮と口腔の粘膜上皮における免疫担当細胞数を検討した。子宮頸部病変と口腔病変の間に有意な差は認められなかった。

(4) HPVの有無による Ctr1 発現についての検討

Ctrl 抗体陽性反応について検討したが、子宮頸部病変と口腔病変の間で有意な差は認められなかった。口腔病変についても、HPV 陽性症例と HPV 陰性症例間での有意な差は認められなかった。放射線化学療法を施行した症例と手術単独症例についても各 10 例抽出し、検討したところ、化学療法を施行した症例について Ctrl 抗体陽性細胞数がやや少ない傾向が認められたが、有意な差はなかった。

本研究では、口腔病変における正確な HPV 検出感染率を (22.4%) 求めることができたが、子宮頸部病変 (96.6%) に比較して低く、また、p16^{INK4a} 免疫染色結果との有意な相関も認められなかった。HPV 感染が口腔前癌病変と扁平上皮癌の発生に密接に関与するとは考えにくい、p16^{INK4a} 陽性かつ HPV 陽性を示した症例が少数認められ、HPV が関与する口腔癌発生の可能性も示唆される。また化学療法を施行した症例で Ctrl 抗体陽性細胞数がやや少ない傾向が観察できたので、HPV が検出される子宮頸部扁平上皮癌と口腔扁平上皮癌に対する化学療法の効果の違いについてさらに検討をすすめたい。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control: Ishibashi M, Kishino M, Morii E, Ogawa Y, Aozasa K, Kogo M, Toyosawa S. Int J Clin Oncol. 16(6):646-53 2011、査読あり

②下顎骨に発生したエナメル上皮線維肉腫の 1 例: 美馬孝至, 鏡内肇, 横田祐介, 石橋美樹, 石井庄一郎, 岸野万伸. 日本口腔外科学会雑誌 57 巻 2 号: 78-82、2011、査読あり

③Central odontogenic fibroma of the maxilla: a case report with immunohistochemical study: Kishino Mitsunobu, Ishibashi Miki, Koizumi Hidehiko, Sato Sunao, Murakami Shumei, Ogawa Yuzo, Kogo Mikiyoko, Toyosawa Satoru. Oral Medicine & Pathology 14 巻 1:29-32, 2010、査読あり

[学会発表] (計 9 件)

①口腔多発癌と膀胱癌の同時性重複癌の 1 例: 石橋美樹, 住岡 聡、石本俊介、石井庄一郎、美馬孝至, 第 30 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 埼玉、2012 年 1 月 26 日～27 日

②上顎歯肉に再発した悪性リンパ腫の 1 例: 石橋美樹, 住岡聡, 横田祐介, 美馬孝至 第 56 回日本口腔外科学会総会、大阪、2011 年 10 月 21 日～23 日

③NTT 西日本大阪病院歯科口腔外科における外科矯正手術症例の臨床統計的観察: 住岡聡, 石橋美樹, 横田祐介, 増田智丈, 美馬孝至. 第 56 回日本口腔外科学会総会 大阪、2011 年 10 月 21 日～23 日

④口唇裂・口蓋裂に伴う上顎骨裂成長に対する上顎骨前方部骨延長術 (MASDO) についての臨床的検討: 牛村彩子、原田丈司、相川友直、石濱孝二、樋口将隆、永谷俊介、奥野恵実、山本奈緒、木田久美子、田中 輝、程 壮樹、田中 晋、石橋美樹、飯田征二、古郷幹彦. 第 42 回日本口腔外科学会近畿地方会 大阪、2012 年 6 月 25 日

⑤口唇裂・口蓋裂に伴う上顎骨劣成長に対する上顎骨前方部骨延長術 (MASDO) の検討: 原田丈司、相川友直、石濱孝二、樋口将隆、牛村彩子、田中晋、石橋美樹、永谷俊介、奥野恵実、山本奈穂、木田久美子、田中輝、程壮樹、飯田征二、古郷幹彦. 第 21 回日本顎変形症学会総会、東京、2011 年 6 月 16 日～17 日

⑥口腔扁平上皮癌における詳細な頸部リンパ節転移部位の検討: 住岡聡, 大倉正也, 相川友直, 田中徳昭, 沢井奈津子, 徳宮元富, 石橋美樹, 古郷幹彦. 第 56 回日本口腔外科学会総会、千葉、2010 年 10 月 16 日～18 日

⑦オトガイ下引き抜き法による挿管を行い顎矯正手術を行った外鼻欠損の 1 例: 石橋美樹, 相川友直, 田中晋, 磯村恵美子, 古郷幹彦, 飯田征二. 第 20 回日本顎変形症学会総会、札幌、2010 年 6 月 15 日～16 日

⑧Hybrid 型延長装置を用いて側方回転を伴う上顎骨前方部の骨延長術を行った唇顎口蓋裂症例: 田中晋, 飯田征二, 相川友直, 石橋美樹, 阿部早苗, 古郷幹彦. 第 34 回日本口蓋裂学会、東京、2010 年 5 月 27 日～28 日

⑨含歯性嚢胞から発生したと考えられる顎骨中心性扁平上皮癌の 1 例: 岸野万伸、相川友直、石橋美樹、村上秀明、福田康夫、豊澤悟. 第 49 回日本病理学会近畿支部学術集会、大阪、2010 年 5 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 美樹 (ISHIBASHI MIKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号：40412051