

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592535

研究課題名(和文) 遺伝子多型、ウイルス感染及び腫瘍の生物学的活性に基づく頭頸部癌の治療効果予測

研究課題名(英文) Prediction of head and neck cancer prognosis based on genetic polymorphism, viral infection, and biomarkers

研究代表者

鈴木 幹男 (SUZUKI, Mikio)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00226557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌治療効果を治療前に予測する目的で研究を行い、以下の結果を得た。1) 遺伝子多型：アルコール代謝(ADH1B, ALDH2)、たばこ有害物質(CYP1A10, GST)に関わる遺伝子多型を解析し、MspI mutation, I462V mutationのvariant alleleを持つ場合中咽頭癌の発癌リスクが上昇する。2) ヒト乳頭腫ウイルス感染(HPV)：約30%に感染しておりヒト遺伝子への進入が75%にみられる。HPV関連癌は中咽頭以外でも予後が良好である。3) 腫瘍の生物学的活性：低酸素細胞に特徴的なHIF-1、糖代謝に関するGLUT1は頭頸部癌で高発現している。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to predict head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) prognosis before treatment start. The following results were obtained. 1) Gene polymorphism related to alcohol metabolism (ADH1B, ALDH2) and tobacco toxic substances metabolism (CYP1A1, GST) was investigated. The variant allele of I462V mutation in Msp was significantly correlated to carcinoma occurrence of mesopharyngeal carcinoma. 2) Human papillomavirus (HPV) infection was observed in approximately 30% of HNSCC. Of HNSCC with HPV infection, 75% demonstrated HPV integration to the host genome. HPV-related HNSCC prognosis is significantly better than HPV-unrelated HNSCC. 3) Biological activity of tumor: HIF-1 alpha and GLUT1 is highly expressed in HNSCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 ヒト乳頭腫ウイルス 生物学的活性 低酸素性細胞 アルコール 喫煙 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域は嚥下、咀嚼、音声、呼吸、顔貌など QOL と直結する部位であり、頭頸部癌治療では QOL 維持を重視し化学放射線療法 (CCRT) が行われることが増加している。しかし、CCRT は長期経過後に治療による合併症が多く発生するため、初期治療の選択は極めて重要である。発癌・治療予後を考える上で重要な因子に関する報告がこれまで多数行われてきたが、これらの因子間の相関、治療への反応・予後についての報告は頭頸部領域では極めて少ない。そこで以下に示す因子と臨床的パラメータとの相関を統計学的に検討し、頭頸部癌の治療選択に役立てる本研究を想起した。

1) 生活習慣 (飲酒、喫煙) に関する遺伝子多型

疫学調査から飲酒と喫煙が頭頸部癌リスクを上昇させることが報告されている。アジア人では ADH1B: *1/*1 で中等度以上の飲酒者は発癌リスクが高く、中・大量飲酒者で ADH1C: *1/*2, *2/*2 を持つものは ADH1C: *1/*1 よりも口腔、中・下咽頭癌になるリスクが高まる。ALDH2: *1/*2 の多型を持つ飲酒者では発癌リスクが高まるとされる。喫煙に関して Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) 遺伝子は arylhydrocarbon hydroxylase 活性を持つ酵素をコード化しており、この酵素による aryl epoxides 生成は喫煙による多環芳香族炭水化物 (PAH) の代謝の最初のステップである。本酵素活性が高い多型の場合発癌リスクが高まる。Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) は多環芳香族炭水化物を含む外因性化合物の代謝産物である疎水性求電子を解毒する作用をもつ。酵素活性が低い多型の場合、発癌リスクが高まる。SYP1A1, GSTM1 についての報告ではこれらの酵素活性と発癌の関係は癌腫や報告者により一致しないが、喉頭癌では発癌リスクが高まるとの報告がある。

2) ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 感染

喫煙、過度の飲酒の生活習慣がない中咽頭癌が増加しており、HPV-16 感染が証明される。これらの症例では P53 低下、RB 経路の不活化、P16 の増加がみられる。HPV-16 陽性中咽頭癌は放射線化学療法に良好に反応し予後が良いことが報告されている。また HPV 陽性でも Brinkman Index が 400 以上では 400 未満の症例と比較して予後が悪いことが報告されている。

3) 腫瘍の生物学的活性 (HIF-1, GLUT1)

頭頸部癌では細胞内酸素分圧が少ない症例が多いが、その酸素濃度は Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) 発現の程度と相関することが報告されている。放射線治療では低酸素細胞は通常の細胞よりも放射線治療効果が低く、HIF-1 の発現が高いものは手術治療を優先する方がよいと推察される。腫瘍の活性を表す指標として Glucose transport protein 1 (GLUT1) が報告されており、高度に発現例では予後が悪い。

1)~3)の項目間の交絡、予後との相関については未だ十分解明されていない。

2. 研究の目的

頭頸部癌の罹患率は全癌の約 5% を占め、近年増加傾向にある。頭頸部癌では同じ頭頸部領域、食道に重複癌が多いことから、過度の飲酒・喫煙など発癌要因に曝露される field cancerization が想定されている。これらの生活習慣に基づく発癌への影響は個々の遺伝子多型により異なることがわかってきた。

また生活習慣以外にもヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 感染が中咽頭癌で発癌に關与することが明らかになりつつある。さらに予後と関連する腫瘍側の因子として、腫瘍内の低酸素細胞の存在やグルコース取り込み能が報告されている。頭頸部癌治療では可能な限り QOL を維持した最適な治療法を選択するために上記のような多くの因子を加味する必要があるが、これまでこれらの因子を包括的に調査し、異なる因子間の相関や臨床データと比較検討した報告は見当たらない。本研究では、頭頸部癌患者の生活習慣に関連した遺伝子多型、ウイルス感染、腫瘍の生物学的活性 (腫瘍内低酸素状態、グルコース取り込み能) を明らかにし、この測定パラメータと臨床パラメータ (導入化学療法への反応、放射線治療への反応、粗生存率、重複癌発生) の相関を検討し、頭頸部癌の初期治療の選択に役立てることを目標とする。

3. 研究の方法

本研究に同意を得た頭頸部癌症例を対象とし、血液サンプル、組織標本 (生検、手術) を採取する。遺伝子多型解析では対照が必要であり、がんの既往がなく同意が得られた耳鼻咽喉科手術例から年齢、性別をマッチさせ血液を採取する。臨床データとして、性、年齢、TNM 分類、腫瘍分化度、飲酒量、喫煙量、PET 検査での原発巣の治療前後 SUVmax、3 年粗生存率、放射線治療への反応、重複癌発生を前向きに調査し、ファイル化し集積する。研究サンプルは連結可能匿名化を行い、対応表は研究代表者が管理する。血液サンプルから DNA 抽出を、組織サンプルは一旦凍結保存した上で DNA 抽出、mRNA 抽出、RT 反応にて cDNA 作成、タンパク抽出を行う。組織サンプル採取した部位はパラフィン固定ブロックとして保存する。以上の準備をした上で、1) 生活習慣に関する遺伝子多型、2) HPV ウイルス感染、3) 腫瘍の生物学的活性を測定し、解析ソフト SPSS を用いて臨床データと研究データの相関を多変量解析、ログランク検定などを適宜行い、研究項目間の交絡因子、予後改善に寄与する因子を見いだす。

4. 研究成果

1) 生活習慣 (飲酒、喫煙) に関する遺伝子多型

ADH1B, ALDH2, CYP1A1, GST の遺伝多型を頭頸部癌患者 194 例、コントロール群 68 例について解析を行った。アルコール代謝に關与する遺伝子多型では ADH1B, ALDH2 について解析をおこなった。

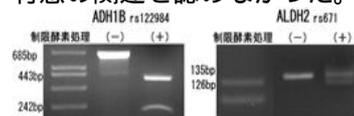
1-1) アルコール代謝に関する遺伝子多型

1-1-1) ADH1B

ロジスティック多重解析を行い、ADH1B 2/2 (高活性型) を持つ飲酒者ではオッズ比 10 で下咽頭癌になりやすいことがわかった。中咽頭癌では有意の関連を認めなかった。

1-1-2) ALDH2

頭頸部癌、対照とも ALDH2 2/2 型 (低活性型) はほとんどみられなかった。ロジスティック多重解析を行い、ALDH2 1/2 (比較的的低活性型) を持つ飲酒者ではオッズ比 17.44 で下咽頭癌になりやすいことがわかった。中咽頭癌では有意の関連を認めなかった。



1-2) 喫煙に関する遺伝子多型

1-2-1) CYP1A1

CYP1A1*2A, CYP1A1*2C の解析を行った。ロジスティック多重解析では CYP1A1*2A C/C 型をもつ喫煙者ではオッズ比 15.8 で、下咽頭癌になりやすいことが判明した。同様にオッズ比 12.3 で中咽頭癌になりやすいことが判明した。CYP1A1*2C と下咽頭癌には有意の傾向を認めなかったが、CYP1A1*2C を持つ喫煙者ではオッズ比 27.0 で中咽頭癌になりやすいことがわかった。

1-2-2) GST-M1, T1, P1

ロジスティック多重解析では GST-M1, T1, P1 と下咽頭癌では有意の関連を認めなかった。

2) HPV 感染

頭頸部癌新鮮凍結標本から DNA を抽出し、PCR 法を用いて、頭頸部癌に感染している HPV を解析した。

2-1) 頭頸部癌の部位と HPV 感染

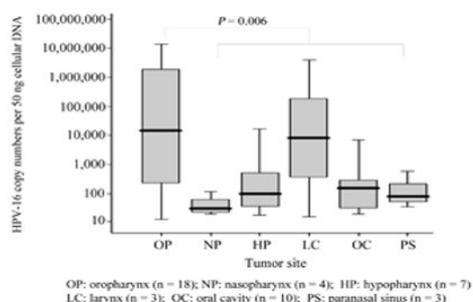
頭頸部癌 154 例中、上咽頭 33.3%、中咽頭 52.3%、下咽頭 12.7%、喉頭 16.7%、口腔 34.6%、鼻副鼻腔 30.0% に HPV 感染がみられた。特に、中咽頭の扁桃癌では約 70% に HPV 感染が見られた。また、アジア地域の中で沖縄は HPV 関連癌が多いことが、他の研究との比較で判明した。

2-2) 感染している HPV 型について

PCR 法 (consensus primer を用いた autonested PCR) で HPV 感染が同定された症例の HPV 型を direct sequence 法を用いて同定した。HPV-16 が 80% 以上を占め、頭頸部癌と子宮頸癌では感染しているウイルス型が異なることが判明した。

2-3) HPV ウイルス量

HPV-16 陽性頭頸部癌を用いて、real-time PCR にて感染している HPV ウイルス量を測定した。図に示すように、中咽頭癌 (OP) で極めてウイルス量が多いことがわかった。

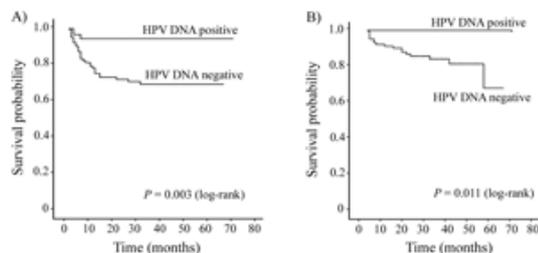


2-4) インテグレーションについて

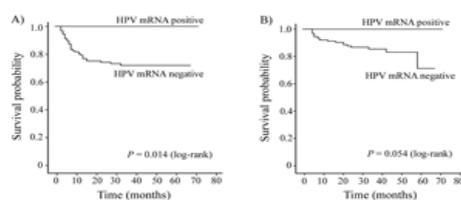
HPV 陽性頭頸部癌を用いて、real-time PCR 法を用いてインテグレーション有無を調べた。HPV ウイルスの E2 は宿主のゲノムに取り込まれる際に消失することを利用して、E2 と E6 の比を用いて計測した。HPV は部位によらず、約 75% でインテグレーションを示していた。このことから、ウイルス量が少なくても発癌に関わっていることが示唆された。

2-5) HPV 感染と予後

頭頸部癌症例について HPV 関連癌と非関連癌に分けて、治療予後を調査した。



上図 (A) は中咽頭癌、(B) 全頭頸部癌の無再発生存率を示している。ログランク検定にていずれも有意に HPV DNA 陽性癌で予後がよいことが判明した。



次に HPV E6/E7mRNA 発現と予後を検討した。上図 (A) は中咽頭癌、(B) 全頭頸部癌の無再発生存率を示している。中咽頭癌では有意に mRNA 発現が見られるもので予後が良好であった。全頭頸部癌では有意ではないが予後が良い傾向を示した。

以上の結果から、HPV が中咽頭癌を中心として感染しており、発癌機序、予後、治療反応性に関与することが判明した。

3) 腫瘍の生物学的活性

RT-PCR を用いた検討では、頭頸部癌細胞はほとんどの例で HIF-1、GLUT1 は高発現を示した。このため、化学放射線同時併用療法 (CCRT) にて治療を行った中咽頭・下咽頭癌症例を対象に、治療後 2-3 ヶ月で計画的頸部郭清術を行い、HIF-1、GLUT1 発現を免疫染色を用いて検討した。原病死した 5 例中 4 例 (80%) で治療前原発組織における HIF-1 は高度に発現していた。更にこの 5 例中 3 例 (60%) は頸部リンパ節転移は治療にかかわらず腫瘍残存を認め、転移残存リンパ節でも HIF-1 が陽性であった。この所見から、治療前の原発巣の HIF-1 発現が疾患予後に関係すると推定された。低酸素性細胞は放射線感受性が低く、このような症例では手術治療を組み入れた治療計画が望ましいと考えられた。また、PET-CT、HPV 感染の有無を含めた中咽頭癌の検討では、HPV 陰性で CCRT 前に Metabolic Tumor Volume 値 (SUV 値を 3 以上の領域に設定) が大きい症例、CCRT 後に SUVmax が大きい症例では有意に腫瘍が残存していた。

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 8 件)

Deng Z, Suzuki M, et al, Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma, Head Neck 査読

有, 35, 2013, 800-808

DOI: 10.1002/hed.23034

鈴木幹男、頭頸部腫瘍とヒトパピローマウイルス、癌と化学療法、査読なし、40、2013、861-866

Deng Z, Suzuki M, et al, Prognostic value of human papillomavirus and squamous cell carcinoma antigen in head and neck squamous cell carcinoma, Cancer Sci, 査読有, 103, 2012, 2127-2134

DOI: 10.1111/cas.12009

Suzuki M, et al: Squamous cell carcinoma antigen production in nasal inverted papilloma, Am J Rhinol Allergy, 査読有, 26, 2012, 365-370

DOI: 10.2500/ajra.2012.26.3797

Hasegawa M, Suzuki M, et al, Human papillomavirus load and physical status in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma, Rhinology, 査読有, 50, 2012, 87-94

DOI: 10.4193/Rhino11.106

渡嘉敷光紘、鈴木幹男、他、喉頭腫瘍におけるヒト乳頭腫ウイルス感染について、喉頭、査読有、24、2012、103-108

鈴木幹男、長谷川昌宏、鼻副鼻腔内反性乳頭腫の診断と治療 扁平上皮癌抗原とヒト乳頭腫ウイルス感染を中心に、耳鼻臨床、査読なし、105、2012、705-716

Deng Z, Suzuki M, et al, Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan, Eur Arch Otorhinolaryngol 査読有 268, 2011, 1625-31

DOI: 10.1007/s00405-011-1515-0

〔学会発表〕(計 8 件)

Suzuki M, et al

Human papillomavirus load and physical status in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. Eurogin 2013, November 3-6, Florence, Italy

Deng Z, Suzuki M, et al: Prognostic value of human papillomavirus and squamous cell carcinoma antigen in head and neck squamous cell carcinoma. Eurogin 2013, November 3-6, Florence, Italy

Hasegawa M, Suzuki M, et al

Indication of planned neck dissection for oropharyngeal squamous cell carcinoma by positron emission tomography and human papillomavirus infection. Eurogin 2013, November 3-6, Florence, Italy

鈴木幹男

鼻副鼻腔腫瘍と HPV. 日本耳鼻咽喉科学会総会, 2013.5.15-18, 札幌

Deng Z, Suzuki M, et al

Detection and Prognostic Value of Human Papillomavirus in Head and Neck Squamous cell Carcinoma. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, December 8-9, 2011, Kobe, Japan

Deng Z, Suzuki M

Detection and Prognostic Value of Human Papillomavirus in Head Neck Cancer. 27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 18-22, 2011, Berlin, Germany

Suzuki M, et al

Viral load, physical status, and E6/7 mRNA

expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. Eurogin May 8-11, 2011, Lisbon, Portugal

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ

<http://ent-ryukyu.jp/>(琉球大学耳鼻咽喉・頭頸部外科)

<http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/category/research-brief>(琉球大学医学部研究概要)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木幹男 (SUZUKI, Mikio)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00226557

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: