

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462700

研究課題名(和文) HPV陽性頭頸部癌におけるDNAメチル化を指標とした発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) DNA methylation in HPV-positive head and neck cancer

研究代表者

徳丸 裕 (Tokumaru, Yutaka)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・聴覚平衡覚研究部・医師

研究者番号：60245579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト乳頭腫ウイルス(human papillomavirus: HPV)は、子宮頸癌や頭頸部癌などの発癌に関与している。特に欧米では若年層の性活動の活発化、多様化により、HPV関連の頭頸部癌が著明な増加傾向を示している。本邦においても、HPV関連の頭頸部癌が増加すると予想され、HPV感染の持つ意味合いはますます重要になってくると考えられる。本研究では、これまでの頭頸部癌とは生物学的に異なった腫瘍であるHPV陽性頭頸部癌を対象に、ジェネティックおよびエピジェネティックな解析を行い、DNAメチル化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The human papillomavirus (HPV) is detected in a subset of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), especially dominant in the tumor of oropharynx. These HPV-positive HNSCCs are less commonly associated with smoking and alcohol exposure, suggesting a pattern of genetic and epigenetic alterations is quite distinct from that of HPV-negative tumors. The p53 tumor suppressor gene plays a critical role in key pathway involving apoptosis and cell cycle control. In addition, DNA promoter hypermethylation is a common feature of human cancers such as p16 methylation. The objective of this study was to clarify the relationship between HPV infection and TP53 mutations, p16 hypermethylation in HNSCC. HPV infection correlated inversely with not only TP53 mutation but also p16 methylation in HNSCC. HPV associated HNSCC has a molecular profile that is distinct from non-HPV HNSCC, suggesting novel treatment strategies should be needed for those tumors.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部癌

キーワード：ヒト乳頭腫ウイルス 頭頸部癌 中咽頭癌

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) は、約 8000 塩基対の環状 DNA からなる小型 DNA ウイルスで、パピロマウイルス科として分類されている。HPV は発癌との関わりによりハイリスク型とローリスク型の HPV に分類されるが、ハイリスク型 HPV は子宮頸癌を始め、頭頸部癌の発癌にも関与している。米国では喫煙率の低下とともに頭頸部癌は減少傾向にあるが、HPV 関連の中咽頭癌は著明な増加傾向を示しており、欧米においては HPV が中咽頭癌の発生に関与する最大の因子であるといえる。その背景には、若い世代を中心とした性活動の多様化、活発化が関連していると考えられる。

我々が行った本邦での多施設共同研究 (徳丸裕、他 頭頸部癌、2011) では、中咽頭癌 156 例の約 52.6% が HPV 陽性であり、これまでの報告と比較し明らかに高い感染率を示していた。本邦においても、今後、欧米の流れを追従し、HPV 関連頭頸部癌が増加すると予想され、頭頸部癌における HPV 感染の意味合いはますます重要になってくると考えられる。

HPV 陽性の頭頸部癌は陰性例と比較し、さまざまな臨床上的特徴がある。例えば、HPV 陽性頭頸部癌は中咽頭、とくに口蓋扁桃や舌根扁桃から発生することがほとんどである。また病理学的には角化傾向が少なく分化度の低い、いわゆる basaloid 様の病理所見を示す。またこれまでの頭頸部癌患者の多くは、heavy smoker や heavy drinker であったが、HPV 陽性頭頸部癌患者は非喫煙者、非飲酒者であることが多いとされている。治療効果の面では、HPV 陽性頭頸部癌は化学療法、放射線治療に良く反応し、予後が良好である。我々の行った多施設共同研究においても、HPV 陽性頭頸部癌は同様な傾向を示した。つまり HPV 陽性頭頸部癌においては、従来の頭頸部癌とは生物学的に異なり、新たな発癌メカニズムが働いていることが示唆される。

また我々はこれまで DNA メチル化を含むエピジェネティックな変化に注目し、頭頸部癌における新規癌抑制遺伝子や発癌メカニズムの同定、解明を試みた (Tokumaru Y, et al. Clin Cancer Res 2004, Tokumaru Y, et al. Int J Cancer 2008)。癌の発生においてジェネティックな変異が重要な役割を果たしていることはいうまでもないが、エピジェネティックな変異もまた重要な発癌メカニズムの一つになっている。特にプロモーター領域の異常 DNA メチル化は多くの癌種において報告されており、癌抑制遺伝子、もしくは癌抑制に関わる pathway の発現抑制にプロモーター領域の異常 DNA メチル化が深く関与していると考えられる (徳丸裕 他、日耳鼻 2005)。またマイクロアレイを用いた網羅的な解析により、頭頸部癌における新規癌

抑制遺伝子を同定し (Tokumaru Y, et al. Cancer Res 2004) 特に PGP9.5 は頭頸部癌細胞株で明らかな増殖抑制効果を示し、また正常部と比較し癌部において、有意に DNA メチル化が生じていた。DNA メチル化は頭頸部の発癌メカニズムにおいて重要な働きをしていると考えられる。

### 2. 研究の目的

ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) は、子宮頸癌や頭頸部癌などの発癌に関与している。特に欧米では若年層の性活動の活発化、多様化により、HPV 関連の頭頸部癌が著明な増加傾向を示している。本邦においても、欧米の流れを追従し HPV 関連の頭頸部癌が増加すると予想され、HPV 感染の持つ意味合いはますます重要になってくると考えられる。一方、HPV 陽性頭頸部癌は非喫煙者、非飲酒者に多く、従来の頭頸部癌とは異なる臨床像を呈している。つまり HPV による独自の発癌メカニズムが働いていることが示唆される。我々はこれまで DNA メチル化を含むエピジェネティックな変化に注目し、頭頸部癌における新規の発癌メカニズムの同定、解明を試みてきた。本研究では、これまでの頭頸部癌とは生物学的に異なった腫瘍である HPV 陽性頭頸部癌を対象に、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現を解析し、ジェネティックおよびエピジェネティックに検討することによって、その発癌メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 中・下咽頭癌、喉頭癌について HPV および TP53 遺伝子の解析を行い、予後との関連を検討する。対象は当科にて化学放射線療法を施行した病期、の中・下咽頭、喉頭扁平上皮癌 67 例 (下咽頭癌 31 例、中咽頭癌 20 例、喉頭癌 16 例) である。手術もしくは生検にて採取された検体は、速やかに -80 度で保存し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は  $\beta$ -globin 領域に対する PCR を施行し、増幅を確認したのちに HPV の検出を行った。

(2) HPV の検出とタイピングは PCR Human Papillomavirus Detection Set および PCR Human Papillomavirus Typing Set (共にタカラバイオ株式会社) を用いた。方法の詳細は各キットの取扱説明書に譲るが、Detection set では HPV 16、18、および 33 型をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行い、HPV を検出した。また Typing Set ではまず HPV の E6 と E7 を含む領域 (228 ~ 268 bp) をコンセンサスプライマーにて増幅した。増幅された DNA フラグメントは数種類の制限酵素で処理し、その電気泳動パターンにより HPV のタイ

プを判別した。高リスクHPVであるタイプ16, 18, 31, 33, 35, 52, 58および低リスクHPVであるタイプ6, 11の合計9種類のHPVが検出可能である。

得られたHPV感染の情報はT, N分類、喫煙、飲酒の有無など臨床の各種データとの関連を検討した。また頭頸部癌を始め多くの固形腫瘍でその変異が指摘されているp53遺伝子についても検討を行った。

International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 Mutation Databaseのプロトコールに従ってDirect sequencingを行い、エクソン2から11を解析の対象とした。解析ソフトはSeqScape software (Applied Biosystems)を用い、遺伝子変異のValidationにはIARC TP53 Mutation DatabaseおよびHuman Gene Mutation Database (HGMD)のデータを使用した。統計学的検討はSPSSソフトウェア(エス・ピー・エス・エス株式会社)を用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(3) 頭頸部扁平上皮癌細胞株(3種類)1X106個をT-75フラスコに播き、その24時間後に実験を開始する。培地を交換後、demethylation agentである5-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza-dC) (0.2もしくは2  $\mu$ M)単独もしくはhistone deacetylase (HDAC) inhibitorであるtrichostatin A (TSA) (300 nM)をともに加え、5日間の培養を行う。培地は3日後に交換し、同量のHDACもしくはTSAを加える。この環境下での培養により、細胞株で生じている遺伝子のメチル化をはずすことが可能となる。処理をしていないmock細胞株と処理済み細胞株それぞれからRNeasy kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、プロトコールにそってマイクロアレイ(GeneChip Human Genome Array, Affymetrix)とハイブリダイズさせる。データ解析は付属のMicroarray Suite Softwareを用い、mockと比べ5Aza-dCもしくはTSA処理併用により発現が有意に上昇している遺伝子をピックアップする。またこれとは別に頭頸部癌の手術検体から癌部および十分な距離を置いた周辺の非癌部(corresponding normal tissue)からサンプルを採取し、同様にRNAを抽出する。癌部、非癌部それぞれで遺伝子発現解析を行う。

(4) メチル化のアレイデータ、および手術検体を用いた遺伝子発現のデータを得ることができる。これらのデータをcombineすることにより目的の遺伝子を絞っていくわけであるが、まず候補になる遺伝子は5Aza-dC処理により発現が大きく増加し、かつ非癌部で発現があり、癌部で発現が抑制されている遺伝子と考えられる。具体的には本研究において検討する5種類すべての頭頸部扁平上皮癌において5Aza-dCにより共通に発現が増強する遺伝子群を選択する。これらの遺伝

子はもっともプライオリティの高いものとなるが、これらの遺伝子群のデータと発現プロファイルのデータの合わせ、非癌部で発現がありかつ癌部での発現が抑制されている遺伝子に絞り込む。この時点での絞り込まれた遺伝子の数によるが、場合によっては5種類中4種類、もしくは3種類の細胞において増強が見られる遺伝子群も2番目、3番目に重要な遺伝子群であり、これらの遺伝子群についても発現プロファイルデータと合わせ、絞込みの対象とする。

すでに癌遺伝子もしくはoncogenicなパスウェイとの関連が報告されている遺伝子は除外される。また明らかに癌との関連が否定されているものも除かれる。残った遺伝子のそれぞれについてプロモーター領域もしくはプロモーター領域と想定される5'領域のCpGをチェックし、いわゆるCpGアイランドの相当するような多くのCG配列の有無を調べる。ここで明らかなCpGが無い場合にはそれらの遺伝子は除外するべきと考える。最終的には各遺伝子についてRT-PCRをおこない、頭頸部癌細胞株において5Aza-dC処理により発現が確実に増強していることを確認する。また同時に実際の頭頸部癌手術サンプルでの各遺伝子のメチル化をbisulfite処理したDNAのsequenceを調べることにより確認し、新規のメチル化により発現が抑制されている癌抑制遺伝子を同定できると考えている。

#### 4. 研究成果

(1) ハイリスクHPVは11例(16.4%)で検出され、すべて中咽頭癌であった。またp53の遺伝子変異は41例(61.2%)に認められ、部位別では下咽頭癌で21例(67.7%)、中咽頭癌で8例(40.0%)、喉頭癌で12例(75.0%)に認められた。予後との関連では、HPV陽性群、TP53 wild type群、TP53 mutant群の順で良好であった。

(2) マイクロアレイの解析では、複数のメチル化遺伝子が同定された。TIG1遺伝子はすべての細胞株でメチル化されていた。臨床検体では、50例中31例(62%)にメチル化を認めた。また末梢血からのDNA解析では癌患者群では、55例中30例(54%)にメチル化が認められたが、健常者の血液においては8例(25%)でのみ軽度のメチル化が検出された。頭頸部扁平上皮癌においてTIG1遺伝子のメチル化が重要な働きをしている可能性が示唆された。頭頸部癌患者の末梢血においてもTIG1遺伝子のメチル化が検出され、molecular markerとしての役割が期待できると考えられた。

(3) Cyclin A1遺伝子はメチル化の頻度は細胞株によって様々であったが、頭頸部癌、食道癌で高い傾向が見られた。メチル化の有無とmRNAの発現は関連していた。原発巣の

検討では、頭頸部癌、膀胱癌においてより高い頻度でメチル化が認められた。また頭頸部癌患者の血液から抽出したDNAにはメチル化はほとんど認められなかった。

また頭頸部癌の発癌リスクファクターである喫煙については、喫煙状態と遺伝子メチル化の関連を検討した。各遺伝子のメチル化頻度は喫煙状態ごとにさまざまであったが、Smoker および Ex-smoker においてより高頻度にメチル化が認められ、喫煙によるDNAメチル化の誘発が示唆された。

(4) PGP(Protein Gene Product) 9.5 は、ヒトの神経細胞由来のコピキチンC末端加水分解酵素であるが、細胞内物質の分解・調節を行うシグナルタンパクと考えられ、最近では神経疾患との関連も示唆されている。我々は遺伝子の網羅的な検討から、この PGP9.5 が頭頸部癌において異常DNAメチル化されていることを発見した。頭頸部癌における PGP9.5 メチル化の意義について、臨床検体および細胞株を用いて検討したところ、臨床検体では、72例中46例(64%)にメチル化を認め、正常コントロール群は非メチル化であった。また頭頸部扁平上皮癌細胞株においては8種類中6種がメチル化されていた。

(5) 中咽頭癌の解析では、50%にHPVが検出された。HPVのタイピングの結果はタイプ16が7例、タイプ33が1例であった。年齢、性別であるが、HPV陽性中咽頭癌の年齢は中央値が73歳で、64歳から77歳にわたっていた。またHPV陰性中咽頭癌は中央値75歳で58歳から88歳であった。性別はともに男性6例、女性2例であり、年齢、性別についてはHPV感染の有無で差は認められなかった。

HPV感染の有無と腫瘍の亜部位との関係をもてみると、HPV感染との強い相関が指摘されている口蓋扁桃や舌根とそれ以外の亜部位(後壁、軟口蓋、喉頭蓋谷、口蓋弓)で比較した場合、HPV陽性中咽頭癌は口蓋扁桃7例、舌根1例であったが、陰性症例は口蓋扁桃1例、舌根2例で、それ以外は後壁、軟口蓋であった。これまでの報告と同様、口蓋扁桃と舌根がHPV感染と強い関連があることが示された。

喫煙状態との関連を見ると、HPV陽性症例は非喫煙者が6例、喫煙者もしくは過去の喫煙者が2例であったが、HPV陰性症例では非喫煙者が1例、喫煙者もしくは過去の喫煙者が7例であった。HPV陽性症例は有意に非喫煙者が多い傾向が認められた。またHPV感染の有無とT分類、N分類、病期分類との関連は認められなかった。

次に癌抑制遺伝子であるp53遺伝子の変異について解析を行った。シーケンス解析が不可能であった中咽頭癌2例を除く69症例を対象としたが、41例(59%)に遺伝子変異が検出された。中咽頭癌に限定すると14例中、

8例(57%)に変異を認めた。HPV感染とp53遺伝子変異の関連を検討すると、HPV陽性症例では6例中1例のみに変異を認めたが、HPV陰性症例では8例中7例に変異を認めた。つまりHPV陽性症例では有意にp53の遺伝子変異の頻度が低かった。

#### 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 2件)

Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. Habu N, Imanishi Y, Kameyama K, Shimoda M, Tokumaru Y, Sakamoto K, Fujii R, Shigetomi S, Otsuka K, Sato Y, Watanabe Y, Ozawa H, Tomita T, Fujii M, Ogawa K. BMC Cancer. 2015 Oct 19;15:730. doi: 10.1186/s12885-015-1732-9.

Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a multicenter study in Japan. Hama T, Tokumaru Y, Fujii M, Yane K, Okami K, Kato K, Masuda M, Mineta H, Nakashima T, Sugasawa M, Sakihama N, Yoshizaki T, Hanazawa T, Kato H, Hirano S, Imanishi Y, Kuratomi Y, Otsuki N, Ota I, Sugimoto T, Suzuki S. Oncology. 2014;87(3):173-82. doi: 10.1159/000360991.

[学会発表](計 2件)

徳丸 裕、藤井正人 シンポジウム化学放射線療法の現状と役割化学放射線療法における救済手術の役割 第37回日本頭頸部癌学会 2013年6月13日~14日 新宿京王プラザホテル

徳丸 裕、南修司郎、進藤彰人、山本修子、木戸口正典、藤井正人 頭頸部癌、期症例におけるHPV感染およびTP53変異を指標にした genetic classification の試み 2013年5月16日~18日 ロイトン札幌

[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：

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

徳丸 裕 (TOKUMARU Yutaka)  
独立行政法人国立病院機構・東京医療センタ  
ー臨床研究センター・聴覚平衡覚研究部・医  
師  
研究者番号：60245579

##### (2) 研究分担者

藤井 正人 (FUJII Masato)  
独立行政法人国立病院機構・東京医療センタ  
ー臨床研究センター・聴覚平衡覚研究部・医  
師  
研究者番号：70129633

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )