

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462611

研究課題名(和文) DNAメチル化を指標としたヒト乳頭腫ウイルスによる発癌メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of carcinogenesis mechanism induced by human papillomavirus using DNA methylation as an indicator

研究代表者

Deng Zeyi (Deng, Zeyi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・外国人客員研究員

研究者番号：50723863

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)：本プロジェクトは、頭頸部癌におけるHPV-16ウイルスのメチル化率が低いことを明らかにした。しかし、症例によりウイルスのE2結合部位のメチル化が高頻度に見られ発癌過程を促進していると推定された。HPVメチレーション程度そのものは頭頸部癌の症例予後との関連がなかった。HPV陽性の頭頸部癌よりHPV陰性癌では、SMG-1 mRNA発現レベルが高いことが判明した。頭頸部癌の症例では、HPV感染を有する症例ではSMG-1 mRNA発現は低く、SMG-1 発現が放射線治療の感受性と相関することが明かとなった。喉頭乳頭腫ではHPV6のメチル化率が低かったことが判明した。三年間に7件の英文の論文を発表した。

研究成果の概要(英文)：In this project, it was demonstrated that long control region (LCR) of HPV-16 in HPV-16 positive head and neck cancer (HNC) is often hypomethylated, and hypermethylation status of E2-binding Sites of HPV-16 frequently contributes to carcinogenesis in HNC. The extent of HPV-DNA methylation is not associated to the prognosis of HNC. Compared to HPV-DNA positive HNC, the higher level of SMG-1 mRNA expression in HPV-DNA negative HNC was observed. Lower SMG-1 mRNA expression may be associated with radiotherapy sensitivity in HNC. In addition, our findings revealed that the LCR of HPV-6 is frequently hypomethylated in laryngeal papilloma. Seven papers in English have published during 3 years of the research period.

研究分野：耳鼻咽喉頭頸部外科学分野

キーワード：頭頸部癌 human papillomavirus 喉頭乳頭腫 Long control region DNAメチル化 SMG-1

1. 研究開始当初の背景

- (1) 頭頸部扁平上皮癌の発癌には喫煙と飲酒が大きく関与しているが、非喫煙・非飲酒者の頭頸部癌の中に、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)、特に HPV-16、HPV-18、が感染している症例があり、これらは HPV 関連癌と推定されている。子宮頸部では扁平上皮-円柱上皮移行部に HPV は感染するが、頭頸部領域では、扁桃や上咽頭、舌根などのリンパ組織が多い領域に感染するため、感染の成立から腫瘍化のステップが子宮頸癌と異なる可能性がある。
- (2) 感染したヒト乳頭腫ウイルス(HPV)はオンコプロテインである E6、E7 を産生することにより、宿主の細胞周期を破綻させ発癌へ導くとされる。HPV E2 蛋白は upstream regulatory region(URR または LCR と呼ばれる)にある E2 結合部位(E2BSs) に結合し early promoter の活動を制御することにより E6・E7 遺伝子発現を調整している。子宮頸癌では episomal HPV の poly-CpG サイトや L1 gene にメチル化が生じていることが発見された。CpG dinucleotides は DNA メチル化が生じやすい部位であるが、HPV の E2BSs には多くの CpG があり、この部位のメチル化が HPV 感染した子宮頸部の E6・E7 の発現を変化させている可能性が指摘された。しかし、頭頸部癌における E2BSs や promoter 領域のメチル化、メチル化と予後に関する報告はなく、検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究期間に、頭頸部癌細胞株、子宮頸癌細胞株、これまで蓄積している頭頸部癌臨床検体を用いて、HPV 感染、インテグレーション有無、感染ウイルス量別に、HPV ウイルスの E2 結合部位(E2BSs)のメチル化、SMG-1 プロモーター領域のメチル化を測定し、HPV 関連頭頸部癌の発癌機序を明らかにする。さらに、メチル化と疾患予後について解析し、予後推測に有用な因子を見つける。

3. 研究の方法

- (1) ヒトサンプルでの HPV ウイルスの検出
上咽頭癌、中咽頭癌、下咽頭癌、口腔癌、喉頭癌の病変組織から DNA を抽出し、PCR を行い HPV ウイルス DNA を検出する。検出された場合はさらに直接シーケンシングしてサブタイプを確認する。
- (2) HPV ゲノム、主に HPV-16 の LCR メチル化及び E6/E7 発現の検出
Bisulfite sequencing と methylation-specific PCR と用いて HPV-16 の LCR メチル化を測定する。次に、RT-PCR 法を用いて HPV-16 の E6/E7 mRNA を検出する。LCR メチル化と E6/E7 発現の関連を明らかにする。
- (3) HPV 感染部位と SMG-1 の発現部位の観察

(組織学的研究)リアルタイム PCR を使用して、SMG-1 の mRNA を定量する。また免疫組織化学を用いて、p16 の発現と SMG-1 の発現部位を観察して、HPV 感染との関連を明らかにする。最後に、これらの研究で得た SMG-1 及び HPV 状態などパラメーターと治療に対する反応・予後との相関を調査します。

4. 研究成果

本プロジェクトは、HPV 関連頭頸部癌の発癌機序を目指し、頭頸部癌細胞株 UM-SCC-47 と子宮頸癌細胞株 CaSki、SiHa 及び頭頸部癌臨床検体を用いて、頭頸部癌における HPV-16 ウイルスの E2 結合部位(E2BSs)のメチル化状態、E2BSs メチル化状態の変化と癌蛋白 E6、E7 及び細胞サイクルの関係、頭頸部癌と正常頭頸部組織の SMG-1 mRNA 発現について検討をした。さらに、喉頭乳頭腫の臨床検体を用いて、頭頸部癌及び喉頭乳頭腫における HPV-16 と HPV-6 ウイルスの E2 結合部位(E2BSs)のメチル化状態、integration site を調べて、E2BSs メチル化状態の変化及びウイルスの integration site と癌蛋白 E6、E7 の関係、E6、E7 の発癌蛋白 mRNA 発現、p16INK4a の発現、HPV DNA メチレーション程度の相関を解析した。

判明したことは、

- (1) E2BSs のメチル化：SiHa 細胞株ではメチル化率は低かったが、UM-SCC-47 細胞株では 79.8%、CaSki 細胞株では 90.0%のメチル化を示していた。HPV-16 陽性頭頸部癌、子宮頸癌では E2BSs のメチル化が高頻度、低頻度の二つタイプがあることが判明した。さらに HPV-DNA 陽性の頭頸部癌臨床検体でメチル化の状態を検討中である。
- (2) E2BSs の脱メチル化：5-aza-dc を用いて UM-SCC-47 細胞株と CaSki 細胞株の E2BSs を脱メチル化すると癌蛋白 E6、E7 の発現が低くなり、UM-SCC-47 と CaSki のアポトーシス率や G1 と G2/M の細胞は有意に増加した ($P < 0.05$)。対照的に E2BSs 低メチル化の SiHa 細胞株では脱メチル化を行っても上記の指標は変化しなかった。HPV ウイルスの LCR のメチル化状態、脱メチル化による E6、E7 の遺伝子発現、細胞サイクルとの関連について検討を行い有意の結果が得られ、国際誌に発表した。
- (3) 喉頭乳頭腫では HPV6 のメチル化率が低かったことが判明した。E2BSs では 5.2%のメチル化を示していた。全例サンプルでは HPV6 ウイルスの存在様式は episomal のみを認めた。HPV6 陽性喉頭乳頭腫では p16INK4a、pRb 及び p53 蛋白の発現率はそれぞれ 85.7%、42.9%及び 14.9%に認めた。以上の結果を国際誌に投稿中である。
- (4) HPV16-DNA 陽性の頭頸部癌臨床検体でメチル化の状態を検討すると、LCR のメチル化率が低いことを判明した。75%の検体では LCR が 10%以下のメチル化、その中で 23.8%の検体では URR が非メチル化を示した。E6、

E7 の発癌蛋白 mRNA 発現及び p16INK4a の発現は HPV DNA メチレーション程度との相関がなかった ($P > 0.05$)。HPV DNA メチレーション程度は頭頸部癌の症例予後と関連はなかった。

(5) 頭頸部癌 200 例以上の検体について HPV 検査 (感染有無, mRNA 発現, HPV 型判定) 及び p16INK4a (HPV 感染のサロゲートマーカー) の発現を既に実施して、国際誌に発表した。なお、副鼻腔の扁平上皮癌における p16INK4a のメチレーション程度と DNMT の発現の相関を解析した。

(6) HPV-DNA 陽性と陰性の頭頸部癌臨床検体で SMG-1 mRNA の発現を調べて、HPV-DNA 陽性の頭頸部癌より、HPV-DNA 陰性癌の SMG-1 mRNA 発現レベルが高かったこと ($P = 0.032$) を認めた。HPV 陽性と陰性の頭頸部癌では SMG-1 mRNA の発現 (SMG-1/GAPDH) の中位数はそれぞれ 0.24 及び 0.32 であった。E6, E7 の発癌蛋白 mRNA 発現は低レベル SMG-1 mRNA 発現との相関を認めた ($P < 0.05$)。頭頸部癌の症例では、HPV 感染を有する低レベル SMG-1 mRNA 発現は放射線治療の感受性と関連することが判明した。

我々は平成 26 年から平成 28 年までの三年間に、成果の公表として、7 件の英文の論文を発表した。もう 1 本を国際誌に投稿中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1 Maeda H, Deng Z, Ikegami T, Matayoshi S, Agena S, Kiyuna A, Yamashita Y, Uehara T, Ganaha A, Suzuki M. Branchiogenic carcinoma with high-risk-type human papillomavirus infection: A case report. *Oncol Lett*. 2016 Sep;12(3):2087-2091. 査読有、DOI: 10.3892/ol.2016.4907.

Yamashita Y, Uehara T, Hasegawa M, Deng Z, Matayoshi S, Kiyuna A, Kondo S, Maeda H, Ganaha A, Suzuki M. Squamous cell carcinoma antigen as a diagnostic marker of nasal inverted papilloma. *Am J Rhinol Allergy*. 2016 Mar;30(2):122-7. 査読有、DOI: 10.2500/ajra.2016.30.4287.

Zhang C, Deng Z, Chen Y, Suzuki M, Xie M. Is there a higher prevalence of human papillomavirus infection in Chinese laryngeal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2016 Feb; 273(2): 295-303. 査読有、DOI:10.1007/s00405-014-3345-3.

Zhang C, Deng Z, Pan X, Uehara T, Suzuki M, Xie M. Effects of Methylation Status of CpG Sites within the HPV16 Long Control Region on HPV16-Positive Head and Neck Cancer Cells. *PLoS One*.

2015 Oct 28;10(10):e0141245. 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0141245

Yamashita Y, Hasegawa M, Deng Z, Maeda H, Kondo S, Kiyuna A, Matayoshi S, Agena S, Uehara T, Kouzaki H, Shimizu T, Ikegami T, Ganaha A, Suzuki M. Human papillomavirus infection and immunohistochemical expression of cell cycle proteins pRb, p53, and p16(INK4a) in sinonasal diseases. *Infect Agent Cancer*. 2015 Aug 4;10:23. 査読有、DOI: 10.1186/s13027-015-0019-8.

Deng Z, Uehara T, Maeda H, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, Agena S, Pan X, Zhang C, Yamashita Y, Xie M, Suzuki M. Epstein-Barr Virus and Human Papillomavirus Infections and Genotype Distribution in Head and Neck Cancers. *PLoS One*; 2014, 11(9): e113702. DOI: 10.1371/journal.pone.0113702.

Deng Z, Hasegawa M, Aoki K, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, Uehara T, Agena S, Maeda H, Xie M, Suzuki M. A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 2014, 45:67-76. 査読有、DOI:10.3892/ijo.2014.2440.

〔学会発表〕(計 1 件)

Effects of Methylation Status of CpG Sites within the HPV16 Long Control Region on HPV16-Positive Head and Neck Cancer Cells. 中華医学会第十四回耳鼻咽喉頭頸部外科学総会, 2015 年 10 月 15 日~18 日, 中国杭州市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

Deng Zeyi (鄧澤義)

琉球大学・大学院医学研究科・助教 (客員研究員)

研究者番号 : 50723863

(2) 研究分担者

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

真栄田 裕行 (MAEDA Hiroyuki)

琉球大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：0064402

上原 貴行 (UEHARA Takayuki)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40264501