

国際交流助成（海外渡航）

研究テーマ：ウイルス関連頭頸部癌のバイオマーカー探索

氏名：齊藤 祐毅

所属：東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科

渡航先：カリフォルニア州立大学サンディエゴ校 Moors 癌センター

背景・研究目的・方法

頭頸部扁平上皮癌の患者の多くは多量飲酒、喫煙の生活習慣をもつ高齢者であったが、近年飲酒、喫煙の生活習慣を持たない患者が急増している。その原因として、ヒトパピローマウイルス (HPV) の関与が広く知られるようになった。HPV 関連頭頸部癌は特に中咽頭癌で多く、扁桃陰窩が発生母地であり、HPV 感染から長時間を経て発癌に至ると考えられている。HPV 関連中咽頭癌は 40 - 60 歳の壮年男性に多く、米国では特に急増しており近い症例 HPV 関連悪性腫瘍として広く知られている子宮頸癌の総数を上回ると見込まれている。HPV 関連中咽頭癌は HPV 非関連中咽頭癌に対して放射線感受性が高く、化学放射線治

療に奏効することが多いが、その一方で2割程度に予後不良群が存在する。HPV 関連頭頸部癌は働き盛りの年齢が好発年齢であるので、社会的損失も大きい。そこで頭頸部扁平上皮癌の早期発見、治療評価に対して、HPV 関連癌に特化したバイオマーカー開発が求められている。

今回、上記助成を受けて2017年7月より渡米し、カリフォルニア州立大学頭頸部腫瘍科のカリファノ教授の元、HPV 関連頭頸部癌に対するバイオマーカー探索の研究に従事した。

カリファノ教授らのグループは先行研究で HPV 関連中咽頭癌の治療前の血液、あるいは唾液からの HPV 検出例が有意に予後不良群であることを見いだしていたが、HPV 検出のゴールドスタンダードである PCR 法に必要なプライマーは子宮頸癌における HPV 検出法として開発された20年以上前からアップデートされていなかった。これまでのプライマーは遺伝子サイズも大きく、また検出感度も十分ではないことが知られていたため、我々は近年急速に進歩した次世代シーケンス法によるゲノムデータを用いて、より適切な HPV 検出を目的とするプライマー作成に取り組んだ。

結果

まず過去の HPV 関連頭頸部癌における HPV16 リード数を、HPV16 の塩基配列を鋳型として並べ直すことから始めた。40 症例のデータは HPV16 の 1-

7906 番まで様々な波形ととっていたが、そのうち 31 症例においては遺伝子 E5 および L2 領域においてピークを示した (図 1)。また、HPV16 の癌遺伝子として知られる E6 および E7 の領域も多くの症例において発現していたが、そのうち E1 の一部において、今回の 40 症例のほとんどが発現している領域を見いだした (図 2)。本検討において、HPV16 のうち、単に癌遺伝子に注目して E6 あるいは E7 に対するプライマーを作成するよりもより効率的に HPV16 を検出可能な領域が存在することを示唆された。

本ゲノムデータを元にプライマー、プローブをデザインし、HPV 関連細胞株である Caski の DNA をポジティブコントロール、正常人の DNA をネガティブコントロールとして PCR 法およびリアルタイム PCR 法を用いて、検出感度が HPV ゲノム 30 コピー以下のプライマーを探索した。

本探索の結果、6 種類の新たなプライマー、プローブを新たな候補と挙げる事ができ、また PCR の増幅効率においても満足できる (増幅効率：90-110) 結果であったため、HPV 関連頭頸部癌のうち低腫瘍量における検出効率に関して研究を進めた。それぞれの症例におけるリアルタイム PCR 法における検出閾値を測定したところ、既存の E6 および E7 のプライマーの検出閾値を上回る結果を見せた (図 3)。また、低腫瘍量のみならず、唾液からの HPV 検出を試みたところ、また既存のプライマーよりも検出閾値、および HPV コピー数もとも

に上回る結果を示した（図4）。

以上の結果は遺伝子情報を元にこれまでよりもより適切なプライマーを見いだし、また実際に既存の検出感度、検出閾値を上回る結果を見せている。現在、他コホートでの HPV 検出、他検体での感度、特異度を再確認しているが、本研究により、HPV 関連頭頸部癌における新たなバイオマーカーの提唱が可能になるのではと考えている。

今後は本研究で提唱されたプライマー、プローブをもとに多施設の臨床検体において感度、特異度を明らかにし、頭頸部癌に特化したよりよいプライマー・プローブセットを確立する予定である。留学期間中のため、本研究は現在も進行している。従って記載内容はこれまでの研究の進捗状況にとどまる。残された留学期間を有効に活用し、研究成果をより充実したものにできるべく務めていきたいと考えている。

謝辞：留学にあたり、助成いただきました公益財団法人中山人間科学振興財団の皆様には厚く御礼申し上げます。また、留学期間中にご指導を賜りましたカリフォルニア州立大学サンディエゴ校 Joseph Califano 教授、留学前よりご指導を賜りました東京大学医学部耳鼻咽喉科 山嵜達也教授をはじめ医局の先生の皆様、そして何より一緒に渡米し、日々異国の地でサポートしていただいた家族にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

図 1

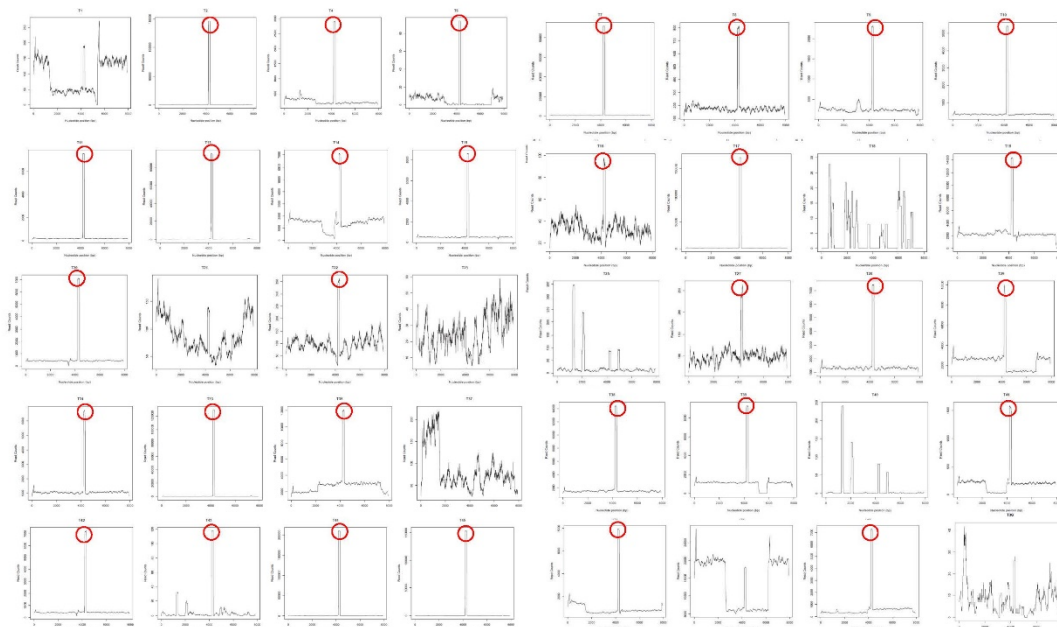


図 2

Minimum Read Counts (N = 40)

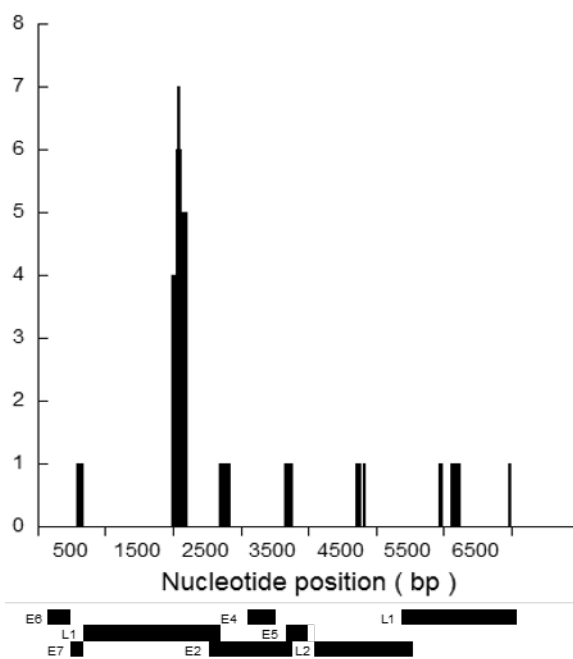


図 3

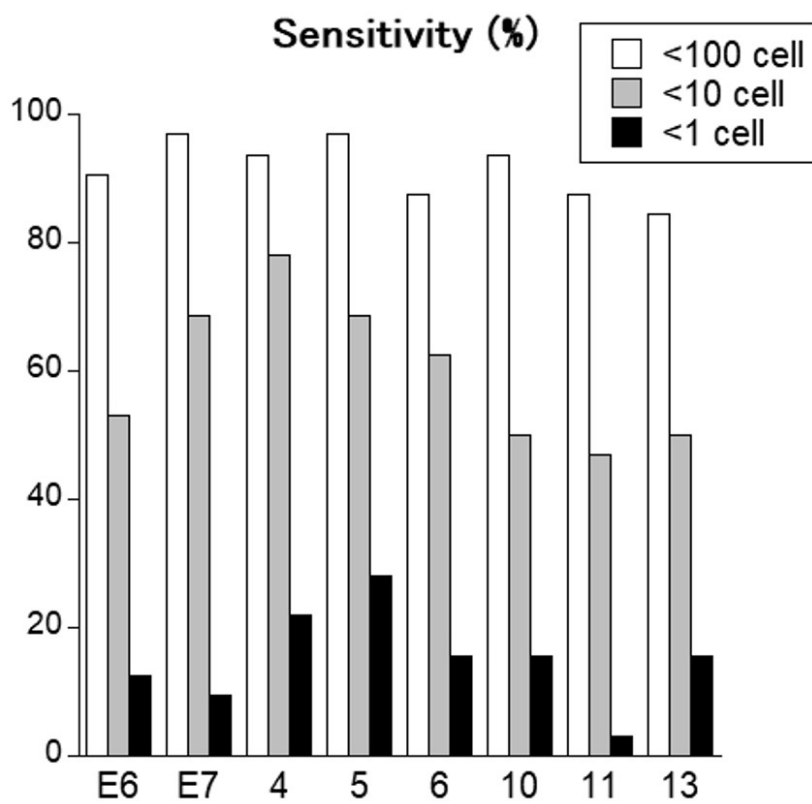


図 4

