

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20236

研究課題名(和文)AIDと上咽頭癌

研究課題名(英文)AID and nasopharyngeal carcinoma

研究代表者

加納 亮(Kano, Makoto)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：00707557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：内因性突然変異誘導因子であるAID、APOBEC3はウイルス感染で誘導され、それらが誘導する突然変異によりウイルス発癌が起こると仮定し、上咽頭癌・中咽頭癌をウイルス感染の有無に分けて評価した。
EBV関連上咽頭癌においてAIDが、HPV関連中咽頭癌でAPOBEC3が発現していることが分かった。in vivoで中咽頭癌へのエストロゲン刺激でAPOBEC3が誘導されることが分かり、HPV関連中咽頭癌では、エストロゲン受容体が発現し、また予後良好に関わる可能性を認めた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesize that AID and APOBEC3, which is caused by viral infection, induce mutation in host genome and lead carcinogenesis. To clarify that, we evaluated the expression level of AID and APOBEC3 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and oropharyngeal carcinoma (OPC) depend on the presence of viral infection.
AID expression was more frequent in EBV-positive NPC than in EBV-negative NPC. APOBEC3 expression was more frequent in HPV-positive OPC than in HPV-negative OPC. Furthermore, in vivo study showed that APOBEC3A was induced by estrogen in OPC cell line. ER expression was associated with HPV positivity in OPC. In addition, ER was a prognostic factor in HPV-positive OPC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：中咽頭癌 HPV APOBEC3 上咽頭癌 EBV

1. 研究開始当初の背景

Epstein Barr Virus(EBV) は上咽頭癌の原因ウイルスである。EBV は B リンパ球、上皮細胞、NK/T 細胞への特異的な細胞指向性を示す。そして、感染により細胞に形質転換を引き起こし、不死化することが知られている。伝染性単核症などでは、B リンパ球が不死化されるが、それらの細胞は癌化されずに T 細胞により排除される。しかし、上咽頭癌においては、不死化された上皮細胞は排除されず、癌化に繋がる。この過程において EBV 感染細胞における遺伝子変異が重要ではないかと考える。

遺伝子変異を起こす酵素として、Activation-induced cytidine deaminase (AID)、apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3 (APOBEC3) の存在が挙げられる。

AID、APOBEC3 は DNA の Cytidine(C)脱アミノ活性を持ち、当初は免疫学の分野において発見された。B リンパ球に限局的に発現し、抗体遺伝子領域に特異的に作用し、体細胞突然変異(Somatic hypermutation : SHM)、クラススイッチの遺伝子再構成 (Class Switch Recombination : CSR) を誘導する。それによって、B リンパ球の産生する抗体の多様性を担っている。

一方、AID の発現調節機構が破綻し、B リンパ球外(胚中心外)で過剰発現を起こすと、正常ゲノムにも変異を引き起こし発癌が誘導される。この事は AID 強制発現マウスが悪性リンパ腫病変を合併することから見出され、近年ピロリ菌が発がんに寄与する胃癌、肝炎ウイルスが発癌に寄与する肝臓癌などの固形癌でも報告された。また慢性炎症やウイルス感染が AID を誘導すると考えられている。つまり、AID は免疫抗体多様性に関わり、抗ウイルス因子として働く可能性もあるが、異所性に過剰発現することで発癌因子にもなりえるという“二面性”を持つことが分かる。

APOBEC3 でも同様の知見があり、APOBEC3 が HPV 陽性子宮頸癌前癌病変において、HPV ウイルスゲノムに変異を蓄積し、発癌に寄与する可能性が報告され、また我々は APOBEC3 が発癌に必須である HPV ウイルスゲノムの宿主ゲノムへの取り込みを促進することを報告した。

以上、ウイルス発癌である上咽頭癌、中咽頭癌は AID、APOBEC3 などの内因性免疫因子との密接な関係があると考えられる。

2. 研究の目的

上咽頭癌における AID の発現を EBV の感染の有無でグループ分けして評価し、その臨床ステータスとの関連を評価する。

また EBV 感染により AID が誘導され、それにより遺伝子変異 (C to T、G to A) が蓄積されることを証明する。そして AID の共誘導因子を検討することを目的とした。

中咽頭癌における APOBEC3 の発現を HPV 感染の有無でグループ分けして評価し、その臨床ステータスとの関連を評価する。またその APOBEC3 誘導因子を検討することを目的とした。

上記が当初の予定であった。免疫染色による結果からは、予想通り、EBV 関連の上咽頭癌では EBV 非関連上咽頭癌と比較して、有意に AID の高発現を認めた。また、HPV 関連中咽頭癌では HPV 非関連中咽頭癌と比較して、有意に APOBEC3 の高発現を認めた。

しかし、EBV 関連上咽頭癌内における AID 発現の強度と臨床ステータスの間に有意な関係を見出すことはできなかった。また、当初予定していた、ヒト正常鼻咽腔上皮由来細胞株である NP96、AdAH に EBV を感染させる系を構築できず、EBV 感染によって AID が誘導されることを証明できなかった。

一方、HPV 関連中咽頭癌細胞株である vu147T を用いて、様々なサイトカイン刺激を行ったところ、エストロゲンによって APOBEC3A が有意に発現することが判明した。ここで、同じ HPV 発癌である子宮頸癌に目を向けると、HPV トランスジェニックマウスを用いた子宮頸癌モデルの解析から、重層扁平上皮組織の基底細胞における HPV ウイルスゲノムの発現に加えて、エストロゲンが子宮頸癌の発生・悪性化に寄与することが示唆されている。また臨床検体を用いた疫学的解析を通して、子宮頸癌には、正常子宮頸部上皮には認めないアロマトラーゼの発現が認められ、それに伴いエストロゲン受容体 (ER) の発現亢進することが判明している。このように子宮頸癌において、エストロゲンが一つのリスク因子として考えられているため、同じ HPV 発癌である中咽頭癌においてもエストロゲンが APOBEC3 と関与して、中咽頭癌の発癌・進展に関わっているのではないかと考え、中咽頭癌における HPV ステータス、エストロゲンが働くために必要なエストロゲン受容体 (ER)、APOBEC3 との関係を検討することとした。

3. 研究の方法

1) 中咽頭癌患者の組織検体を用いて、免疫組織化学法により、ER の発現を HPV 関連中咽頭癌および HPV 非関連中咽頭癌を比較して検討、またリアルタイム PCR によって ER の mRNA レベルを解析した。

2) HPV 関連中咽頭癌を ER の有無でグループ分けし、その予後を、Kaplan-Meier 法、Log-rank test、ロジスティック回帰分析で検討した。

3) 研究の目的後半に記載し中咽頭癌細胞株を用いた研究 ; HPV 陽性、ER 陽性の中咽頭癌細胞株である VU147T にエストロゲン暴露を行い、24 時間後、48 時間後の APOBEC3 の mRNA 発現量をリアルタイム

PCR 法により定量した。

4) 中咽頭癌生検組織を用いて、ER 陽性中咽頭癌と ER 陰性中咽頭癌患者における APOBEC3A の mRNA 発現を比較した。

4. 研究成果

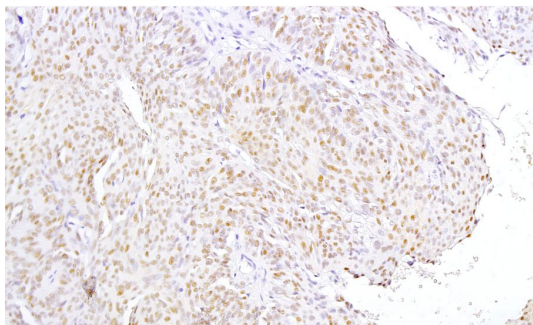
1) 中咽頭癌患者の組織検体を用いて、免疫組織化学染色による検討では、HPV 関連中咽頭癌において、HPV 非関連中咽頭癌と比較して、有意に ER が高発現していた。

また、リアルタイム PCR による mRNA レベルを解析でも、同様の結果が得られた。このことから HPV 関連中咽頭癌においても、子宮頸癌同様、HPV と ER との関与が考えられた。

(ER の免疫染色)

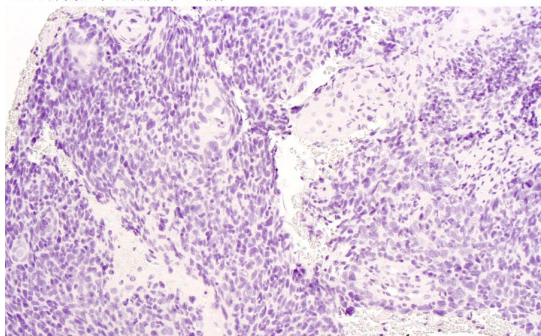
【HPV 関連中咽頭癌】

HPV 関連中咽頭癌 (200倍)



【HPV 非関連中咽頭癌】

HPV 非関連中咽頭癌 (200倍)



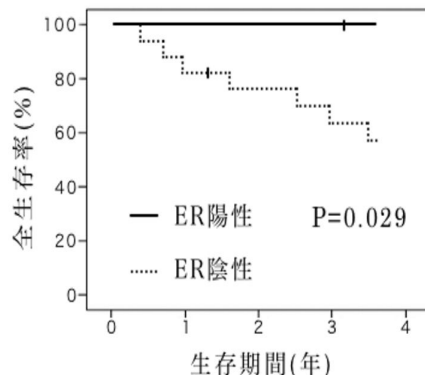
2) 中咽頭癌において、HPV 感染は独立した予後因子であり、予後良好な HPV 関連中咽頭癌に対して治療強度を下げた治療の妥当性の検討が進められている。そのためには適切なリスク分類が行われる必要がある。

また、乳癌において ER などのホルモンレセプターは予後良好因子であることは良く知られている。

上記をふまえ、HPV 関連中咽頭癌において、乳癌の様に ER が予後因子となるか検討した。

ER 陽性の HPV 関連中咽頭癌は、ER 陰性の HPV 関連中咽頭癌と比較して、全生存率は有意に延長することが判明した。

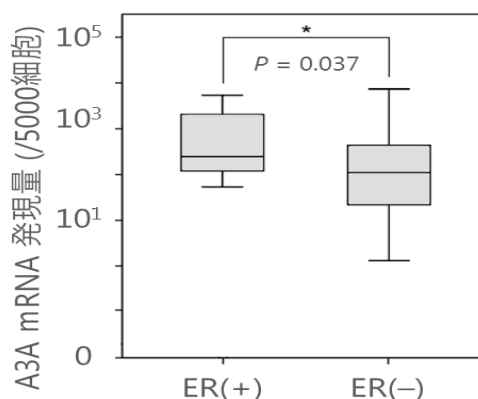
Kaplan-Meier 曲線



3,4) HPV 陽性、ER 陽性の中咽頭癌細胞株である VU147T にエストロゲン暴露を行い、24 時間後、48 時間後の APOBEC3 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。その結果、7 種類ある APOBEC3 のうち、APOBEC3A の発現量が有意に増加した。

中咽頭癌細胞株においてエストロゲン暴露は APOBEC3A を誘導することが判明した。エストロゲンが機能するためには ER が必要であるため、ER 陽性中咽頭癌ではエストロゲン暴露の結果、APOBEC3A が高発現していると考えられる。

そこで、中咽頭癌生検組織を用いて、ER 陽性中咽頭癌と ER 陰性中咽頭癌患者における APOBEC3A の mRNA 発現を比較したところ、ER 陽性中咽頭癌において APOBEC3A は有意に高発現することが判明した。



近年の報告で、APOBEC3A の発現によって、宿主 DNA 二重鎖切断が誘導され、遺伝子不安定性が誘導されることが報告された。エストロゲン暴露により、ER 陽性中咽頭癌において APOBEC3A が高発現し、遺伝子不安定性が誘導され、アポトーシスを引き起こすことが予後良好に繋がっていると仮説をたて、今後検討予定である。

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 1 件)

著者名：加納亮、近藤悟、吉崎智一
論文標題：HPV 関連中咽頭癌における内因性免疫 APOBEC3 とエストロゲン-エストロゲン受容体の予後との関係
雑誌名：耳鼻免疫アレルギー (JJIA0)
査読：有
巻：35
発行年：2017 年
ページ：279-282

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者：加納亮、近藤悟、高相裕司、上野貴雄、吉崎 智一
発表標題：HPV 関連中咽頭癌における内因性免疫 APOBEC3 とエストロゲン-エストロゲン受容体の予後との関係
学会等名：第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
発表年：2017 年

発表者：Makoto Kano, Satoru Kondo, Yoshiya Kasahara, and Tomokazu Yoshizaki.
発表標題：Estrogen receptor is a prognostic factor in Human papillomaviruses positive oropharyngeal cancers
学会等名：第 76 回日本癌学会
発表年：2017 年

〔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 なし

6. 研究組織
研究代表者
加納亮 (Kano Makoto)
金沢大学・附属病院・医員
研究者番号：00707557