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

加納 亮, 近藤 悟, 吉崎 智一

金沢大学医薬保健研究域医学系耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

近年, ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) は, 中咽頭癌の発癌ウイルスとして注目されている。しかし, 中咽頭癌における HPV による発癌機構は不明である。子宮頸癌では, HPV 遺伝子発現マウスにエストロゲンを投与することで子宮頸癌が誘導され, エストロゲン受容体 (ER) の抑制により発癌が成立しないことが分かっている。また, 内因性免疫因子の一つで抗ウイルス作用を持つ APOBEC3 は, HPV のウイルスゲノムに変異を誘導蓄積し, 子宮頸癌の発癌に関与することが報告されている。そして, APOBEC3 はエストロゲン-エストロゲン受容体と関連性があることも知られ, HPV による発癌には HPV・エストロゲン-ER・APOBEC3 の三者が関連することが示唆される。

我々は, 中咽頭癌において HPV と ER の関連性を解析し, APOBEC3 が関与するかを検討した。中咽頭癌の生検組織を, 免疫組織化学染色, リアルタイム PCR の各手法を用い, HPV の有無による ER の発現量, ER と APOBEC3 発現量の関係, ER の有無による予後の解析を行った。HPV 関連中咽頭癌組織において, HPV 非関連中咽頭癌組織と比較して, 有意に ER の発現が増加していた。また HPV 関連中咽頭癌において, ER 陽性は予後良好因子であった。ER 陽性中咽頭癌において, ER 陰性中咽頭癌と比較して, APOBEC3A が高発現していた。

HPV 関連中咽頭癌とエストロゲン-ER 経路は関連があり, ER は予後因子となる。

キーワード: ヒト乳頭腫ウイルス, エストロゲン, エストロゲン受容体, APOBEC3A, 予後

略語: HPV, human papillomavirus; ER, Estrogen receptor; APOBEC, apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide; AID, Activation-induced cytidine deaminase

1. はじめに

近年, ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) は, 中咽頭癌の発癌ウイルスとして注目されている^{1,2)}。HPV 関連中咽頭癌はアメリカや北欧を中心に世界的に増加していることが指摘されており³⁾, 全国規模の多施設共同研究を通して, 本邦においても約 50% が HPV 関連中咽頭癌であることが判明している⁴⁾。HPV 関連中咽頭癌と, 従来の飲酒・喫煙で発症した HPV 非関連中咽頭癌では生物学的に全く異なるものであり, その臨床像も大きく異なるため, HPV 関連中咽頭癌のメカニズムの解析は急務である⁵⁾。

HPV は 1983 年に zur Hausen らによって子宮頸癌組織から

クローニングされ, 以来, 多くの研究が蓄積されている⁶⁾。そのため, HPV 関連中咽頭癌について検討するにあたり, 子宮頸癌での知見を参照することは重要である。

子宮頸癌, 中咽頭癌ともに HPV に感染すると必ずしも発癌にいたるわけではないため, 環境因子や宿主因子などのリスク因子が必要であると予想される。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た⁷⁾。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た⁸⁾。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^{9,10)}。

しかし, エストロゲンをそのまま HPV 関連中咽頭癌におけるリスク因子として考えるのは注意を要する。なぜなら中咽頭癌は男性に多い癌であり, 女性に発生する子宮頸

2017 年 6 月 22 日受稿, 2017 年 8 月 21 日受理

別冊請求先: 加納 亮

〒920-8640 石川県金沢市宝町 13-1

金沢大学医薬保健研究域医学系耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

TEL: 076-265-2413, FAX: 076-234-4265

E-mail: makoto-kano@med.kanazawa-u.ac.jp

癌と違い、女性ホルモンであるエストロゲンの影響を受けにくいことが予想されるからだ。

我々はまず、正常口蓋扁桃における ER の発現率を検討したところ、性差なく ER の発現を認めた（未発表データ）。また、エストロゲンは女性に比べると発現量は劣るが、男性にも検出される。エストロゲン以外に、性差を超え ER に働く物質として、内分泌かく乱物質が知られている。内分泌かく乱物質は近年増加傾向であり、エストロゲン類似作用を持ち、ホルモン受容体を介して生物の発生や分化に影響を及ぼすと考えられている¹¹⁾。このようにエストロゲン作用を持つ内分泌かく乱物質が増加していることと HPV 関連中咽頭癌が増加していることに関連があるのではないかと考え、エストロゲンと HPV 関連中咽頭癌の関係に着目した。

HPV 関連中咽頭癌は口蓋扁桃に好発することが知られている¹²⁾。扁桃には、自然免疫や獲得免疫以外に内因性免疫が存在する。内因性免疫とは、原始的な免疫機構であり、ウシやネズミ、ネコとは乳類全般に共通に保存されており、ウイルスの侵入に対して即座に免疫反応する。内因性免疫の代表的な構成因子として、AID, APOBEC を含むシチジン脱アミノ化酵素が挙げられる。この機構は本来、ウイルスを代表する病原体の感染から宿主を守るために細胞に備わっている免疫防御機構である。しかし、近年、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¹³⁾、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¹⁴⁾。

また別の報告では、B リンパ球細胞株において APOBEC3 によってエストロゲンが誘導されることが分かった¹⁵⁾。

我々はこれらの知見を基に、HPV・エストロゲン-ER・APOBEC3 の三者が関連すると仮説をたて、いくつかの検討を行った。

2. HPV 関連中咽頭癌組織において、HPV 非関連中咽頭癌組織と比べ、ER の発現が高い

子宮頸癌の発癌・悪性化において、HPV 感染、エストロゲンやアロマターゼが関与し、その結果 ER が発現していることは先述の通りである。我々は、同様の現象が HPV 関連中咽頭癌で起こっていると仮定し、中咽頭癌における ER の発現を評価した。

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したところ、有意に HPV 関連中咽頭癌において ER が高発現していた（図 1）。これに加え中咽頭癌生検組織を用い、リアルタイム PCR によって ER の mRNA レベルを解析したが、同様の結果を得られた。また、HPV 関連中咽頭癌において ER の発現に性差を認めなかった。

この事から 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。

3. HPV 関連中咽頭癌患者において、ER は予後良好因子

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¹⁶⁾。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¹⁷⁾。

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（図 2）。

図 1 (a) HPV 関連中咽頭癌（200 倍）、(b) HPV 非関連中咽頭癌（200 倍）

図2 Kaplan-Meier 曲線

図3 HPV陽性中咽頭癌において、ERの有無によるAPOBEC3Aの発現量の比較

4. 中咽頭癌において、エストロゲン暴露によってAPOBEC3Aの発現が誘導される

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(図3)。

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¹⁵⁾。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可能性が考えられる。

図4 仮説：ER陽性中咽頭癌がなぜ予後良好因子となるか

5. まとめ

我々は、HPV陽性中咽頭癌組織においてERが高発現しており、予後良好に関わることを示した。そして、エストロゲン暴露により誘導されるAPOBEC3Aは、ER陽性中咽頭癌で有意に高発現しており、予後良好と関与している可能性を示した(図4)。

近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場を受け、neoantigen(新生抗原)が注目されている¹⁸⁾。neoantigenとは、がんゲノムに突然変異が発生することにより、生成される特異的なタンパク質のことであり、宿主免疫により排除される標的となる。つまり、変異数の多さが、neoantigenになりうるタンパク質の多さに繋がると考えられる。ER陽性中咽頭癌ではAPOBEC3によって高頻度変異が誘導されることで、neoantigenが増加し、宿主免疫から排除されるという機序も考えられる。この点は今後の検討課題であるが、免疫チェックポイント阻害剤の適切な対象選択に繋がることを期待したい。

またHPV関連中咽頭癌において、既存のTNM分類は予後を正確に反映していないことから、新たなステージ分類やリスク分類の必要性が提唱されている。リスク因子として、喫煙や飲酒が挙げられることが多いが、今回の検討では、ERもその一つとなることが示唆された。今後も症例数を増やし、検討していく予定である。

本論文の要旨は第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(2017年4月、旭川)において、奨励賞応募演題として発表した。

本論文に関して、開示すべき利害相反状態は存在しない。

文 献

- 1) Mork J, Lie AK, et al. Human papillomavirus infection as a risk

- factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1125–31.
- 2) Chaturvedi AK, Anderson WF, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013; 31: 4550–9.
 - 3) Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006; 11: 2286–302.
 - 4) Hama T, Tokumaru Y, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a multicenter study in Japan. *Oncology*. 2014; 87(3): 173–82.
 - 5) Gillison ML, Koch WM, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9): 709–20.
 - 6) zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9): 690–8.
 - 7) Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 2490–5.
 - 8) Nair HB, Luthra R, et al. Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer Res*. 2005; 65: 11164–73.
 - 9) Arbeit JM, Howley PM, et al. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(7): 2930–5.
 - 10) Chung SH, Franceschi S, et al. Estrogen and ER α : culprits in cervical cancer? *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(8): 504–11.
 - 11) Nishikawa J, Mamiya S, et al. Effect of suspected endocrine disruptors on various kinds of nuclear hormone receptors. *J Environ Biol*. 2003; 3(1): 37–42.
 - 12) Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet*. 2004; 363(9420): 1488–9.
 - 13) Vartanian JP, Guétard D, et al. Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science*. 2008; 320: 230–3.
 - 14) Kondo S, Wakae K, et al. APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers. *Oncogene*. 2017; 36(12): 1687–97.
 - 15) Pauklin S, Sernández IV, et al. Estrogen directly activates AID transcription and function. *J Exp Med*. 2009; 206(1): 99–111.
 - 16) Ang KK, Harris J, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363(1): 24–35.
 - 17) Fisher B, Redmond C, et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients: Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol*. 1988; 6(7): 1076–87.
 - 18) Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015; 348(6230): 56–61.

Relationship between APOBEC3 expression and Estrogen-Estrogen receptor and prognosis in HPV-related oropharyngeal cancers

Makoto Kano, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki

Division of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

ABSTRACT

Human papillomaviruses (HPV) have been identified as a causative agent of oropharyngeal cancers (OPCs). Although it is not clear how HPV develop OPCs, in cervical cancers, some studies have suggested that estrogen and its receptors promote cervical cancer in HPV transgenic mouse models. In other studies the apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3 (APOBEC3) was induced with estrogen.

We found higher Estrogen Receptor (ER) expression in the biopsy samples of the HPV-positive OPCs than those of HPV-negative OPCs by using immunohistochemical staining and Real-time PCR. ER indicated a favorable prognostic in the HPV-positive OPCs. Furthermore, APOBEC3 mRNA expression was significantly higher in the ER-positive OPCs than in the ER-negative OPCs.

These findings suggest the relationship between APOBEC3 expression and Estrogen-Estrogen receptor and prognosis in HPV-related oropharyngeal cancers.

Key words: HPV, Estrogen, Estrogen receptor, APOBEC3A, prognosis