

# 博士論文

中咽頭扁平上皮癌とパピローマウイルス  
関連因子に関する臨床病理学的検討

齊 藤 祐 毅

# 内容

I 要旨.....	2
II 序文.....	3
1 中咽頭扁平上皮癌について.....	3
2 HPV 陽性中咽頭癌の発癌機構、HPV の検出方法.....	5
3 p16 と腫瘍細胞における発現について.....	8
4 HPV 陽性中咽頭癌の臨床的特徴.....	9
III 目的.....	11
IV 方法.....	11
V 結果.....	19
1 本検討症例の治療法.....	19
2 p16 の免疫染色の結果と臨床的検討.....	21
3 p16 と生存解析、治療法別粗生存率について.....	28
4 飲酒、喫煙と生存解析.....	31
5 予後因子の検討とリスク層別化.....	34
6 ISH-HPV の陽性所見と臨床指標.....	38
7 p16 陽性腫瘍と ISH-HPV 陽性腫瘍の比較.....	41
8 p16 陽性、HPV 陰性腫瘍の定義と予後.....	41
VI 考察.....	55
VII 謝辞.....	62
VIII 引用文献.....	63

## I 要旨

当科における中咽頭扁平上皮癌治療例 173 例を対象に、p16 の免疫組織学的検討および In situ hybridization および PCR を用いヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の検出を行い、HPV 陽性腫瘍と HPV 非関連腫瘍の臨床背景因子、重複癌の有無、予後について解析した。HPV 陽性腫瘍は、HPV 非関連腫瘍と比較し、大量飲酒者、喫煙者のいずれも少なかった。同時性重複癌は大量飲酒者に多く、異時性重複癌は HPV 非関連腫瘍、およびリンパ節転移を認めない腫瘍に多かった。HPV 陽性腫瘍のほとんどに p16 の発現を認め、p16 の発現および非飲酒は独立した予後良好因子であった。このことから、p16 の過剰発現や大量飲酒歴という簡便なバイオマーカーは本邦中咽頭扁平上皮癌の予後因子と考えられた。

## II 序文

### 1 中咽頭扁平上皮癌について

頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)は世界において6番目に多い癌腫(1)と考えられている。その発癌要因と頻度については地域差、民族差が知られている。例えば上咽頭癌は中国南東部、台湾に多く、口腔癌はインドに多く報告されている(2)。日本人および東アジア人は2型アルデヒド脱水素酵素(aldehyde dehydrogenase 2:ALDH2)のGlu487Lys 遺伝子多型を有している頻度が40%(3)と報告されており、この遺伝子多形をヘテロに持つ場合、ALDH2はアルコールの代謝の活性は正常型のALDH2の代謝の活性と比較し6.25%までに低下し、代謝されないアセトアルデヒドにより食道扁平上皮癌および咽頭扁平上皮癌の発生リスクをともに高める(4)と考えられている。

中咽頭は側壁、上壁、後壁、前壁の4部位から構成され、嚥下、音声に重要な役割を果たしている。中咽頭に生じる癌腫の9割は扁平上皮癌であり、その治療は手術、放射線、化学療法のいずれか、あるいはその組み合わせによって行われることが多い。中咽頭癌の手術方法としてはT1、T2の早期癌であれば経口腔的なアプローチによる切除による低侵襲な治療が可能であるが、T3、T4の進行癌であれば切除後に遊離組織皮弁による再建術が必要とされ、手術時間が長時間にわたるのみならず、術後の嚥下機能の低下に悩まされることも多い。中咽頭癌は放射線治療も積極的に選択されて

いるが、放射線照射野も広範囲に及び、晩期合併症である嚥下障害、味覚低下、口腔乾燥も決して無視できるものではない。患者個々の病態に応じた治療選択、またその治療における有害事象を避ける工夫が求められている。

頭頸部癌の治療終了後の経過観察においては根治治療による有害事象の評価、癌腫の再発の有無はもちろん重要であるが、それに加えて頭頸部癌に特徴的な重複癌の評価が必要である。頭頸部臓器および食道には field cancerization という概念(5)が提唱されている。すなわち、発癌リスク因子である飲酒、喫煙は頭頸部および食道の粘膜に広範囲に影響を与え、前癌病変を生じさせ、根治治療後に食道あるいは頭頸部粘膜に重複癌が生じる、というものである。中咽頭癌は頭頸部癌の中でも他領域の頭頸部癌や食道癌の重複が多い部位として知られており、1992 年の本邦からの報告(6)では重複癌の発生頻度は中咽頭癌、上咽頭癌、下咽頭癌、喉頭癌でそれぞれ O/E 比が 3.17、2.01、2.16、1.10 と報告されていた。

今世紀に入ってから欧米において中咽頭癌と HPV の関連が次々と(7) (8)報告され、中咽頭癌のリスクファクターは酒、タバコから HPV によるウイルス発癌へと劇的に変化を遂げ、HPV 陽性中咽頭癌の急激な増加傾向(9)とその良好な予後は非常に注目された(10)。HPV 陽性中咽頭癌は予後のみならず、重複癌の発生頻度やその部位も異なる(11)と報告されている。HPV 陽性中咽頭癌の発症はオーラルセックスパートナーの数が多の場合有意に増加する(7)ことが知られている。米国の報告では HPV 陽性

中咽頭癌の総数は急激に増加しており、近い将来に子宮頸癌の総数を上回ると推計されている(9)。また HPV 陽性中咽頭癌は白人男性に多く、女性やアフリカ系黒人男性に少ない(7)という特徴があり、その発生誘因に性差や民族的な因子が考えられている。本邦における中咽頭癌と HPV との関与については頻度、予後についてもまとまった報告は少なく、アジアにおける HPV 陽性中咽頭癌の実情は未だ明らかになっていないのが現状である。

## 2 HPV 陽性中咽頭癌の発癌機構、HPV の検出方法

HPV ウィルスは 1983 年に Harald zur Hansen 博士らによって子宮頸癌との因果関係が発見された(12)。その後の追試や大規模調査から、子宮頸癌は HPV 感染によって発症することが確立され(13)、HPV は子宮頸癌の原因ウィルスとして認識されている。

HPV は小さい二本鎖 DNA ウィルスである。ゲノムは、初期の構造遺伝子 (E1-E8) と後期構造遺伝子 (L1 と L2) に分かれ、E6 および E7 は癌遺伝子である(14)。HPV には様々なサブタイプが知られており、それぞれが引き起こす疾患が異なると考えられている。HPV サブタイプのうち 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 は子宮頸癌と(15)、6,11 は再発性喉頭乳頭腫と(16)、1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 60, 63, 65 は尋常性疣贅と(17)関連があると知られているなど様々なサブタイプが報告されているが、このうち最も癌化に関連しているのは HPV-16 である。

子宮頸癌における HPV の発癌機構の報告は多い。HPV が感染したのち、変異の蓄積が癌化につながると考えられおり、HPV が感染してから発癌するまでに 10 年ほどの期間があると想定されている(18)。癌化に寄与する HPV の癌遺伝子は E6 および E7 であり、この癌遺伝子の発現と宿主免疫系との複雑な相互作用や、HPV 感染上皮にさらにエピジェネティックな変異が加わった結果、子宮頸癌が発癌すると考えられている。HPV 感染による異形成の初期には HPV ゲノムは episome 状態で保持されているが、感染が持続すると宿主の DNA に integrate することがある。Integrate されることで、E6,E7 蛋白はそれぞれ活性が高まると考えられており、E6 関連蛋白はユビキチン・プロテアソーム系を阻害して p53 を阻害し、E7 蛋白は E2F 転写因子を阻害し、pRb の不活性化、サイクリン依存性キナーゼインヒビター p16 の過剰発現を引き起こしていく。HPV が最初に感染する上皮は子宮の場合移行帯とよばれる場所で扁平上皮の基底細胞に起こるとされている(18)。基底細胞の HPV が持続感染の状態になり、その後基底細胞から上皮の剥離とともに多数のウィルス粒子を放出して感染を広げると想定されている。中咽頭癌の場合には、HPV が最初に感染する部位として扁桃組織の陰窩が想定されている(19)。このため、HPV 陽性中咽頭癌は初期には表面の粘膜からは視診では発見しづらい(20)。加えて扁桃陰窩は咽頭収縮筋と近く、この付近に豊富なリンパ流が存在しているため、HPV 陽性中咽頭癌は早期にリンパ節転移を来しやすいとも考えられている。

中咽頭癌における HPV を検索する方法として、HPV-DNA の In situ hybridization (ISH) (21) や Polymerase chain reaction (PCR) (22)、リアルタイム PCR によるウィルス量検索(23)、E6 と E7 に対する血清抗体の PCR(24)、E6/E7 mRNA の検出(25)等様々な方法が挙げられる。また上述した HPV 発癌の過程で生じる p16 の過剰発現は HPV 陽性中咽頭癌の代理マーカーとして用いられている(26)。各検査にはそれぞれ利点欠点があり、感度と特異性は異なる。凍結標本からの非定量 HPV-DNA PCR は一般に感度の点ではゴールドスタンダードと考えられている(22)が、一般臨床応用するためには凍結標本が必要であること、およびコストの問題があり、また検出された HPV が癌化の driver として働いているかどうかは厳密には区別することができない。ISH-HPV は組織において HPV の局在を示すことができ、HPV が組織内に発現していることを可視化できる(21)が、この手法には感度が低いという問題がある。p16 の免疫染色はもっとも簡便で、臨床応用には適しているが、ISH-HPV との間に 10-20 %の不一致がある(26)とされている。この不一致の腫瘍では HPV とは無関係に pRb の経路が破壊され、結果的に p16 過剰発現となっている可能性が考えられている。したがって、HPV 陽性中咽頭癌の検査法は単独では限界があり、検査同士の組み合わせによるアルゴリズムが議論されている。

### 3 p16 と腫瘍細胞における発現について

p16 はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子の一種であり、9p21 の INK4a/ARF 領域にコードされている。p16 は CDK4 または CDK6 に結合して複合体を形成し、その機能を阻害する。この CDK4 または CDK6 は Rb ファミリーをリン酸化することで活性化させ、その標的因子である E2F を介して G1 期から S 期へ細胞分裂周期を進める作用がある。CDK を阻害する p16 は結果的に E2F を抑制し細胞周期を止めることになるため、p16 は癌抑制遺伝子として機能している。分裂寿命に達した細胞 (27) 等で p16 の発現が著しく上昇し、不可逆的な細胞の増殖停止が起こることが知られている。

ヒトの癌細胞において p16 は遺伝子変異やプロモーターのメチル化によって不活化されていることが多いと報告されている。その一方で p16 が高発現している腫瘍の報告も知られており、子宮頸癌、肛門癌、中咽頭癌等の HPV 関連癌の報告が中心である。HPV 関連癌においては、HPV による癌遺伝子 E7 が Rb 蛋白を不活化することによって、ポジティブフィードバックがかかり、代償性に p16 が高発現すると考えられている。一方、HPV 非関連癌における p16 の発現についても報告があり、何らかの原因による Rb 蛋白の不活化がその要因と考えられているが、未だ不明な点が多い(28)。

## 4 HPV 陽性中咽頭癌の臨床的特徴

欧米の報告によると HPV 陽性中咽頭癌のほとんどは前壁および側壁の扁桃組織に生じている。HPV 陽性中咽頭癌は HPV 陰性中咽頭癌と比較して概ね 10 歳若く、男性に多く、病理組織学的に低分化、非角化腫瘍が特徴である。また、飲酒、喫煙のリスクファクターを有していない症例が多い。そのため、頭頸部および食道での重複癌が少ない(29)。HPV 陽性中咽頭癌は HPV 陰性中咽頭癌と比較して原発巣が小さいうちから頸部リンパ節転移が多く、そのリンパ節は多発し、嚢胞性転移を呈することが多いことが知られている(30)。リンパ節転移を来した進行した段階で発見されることが多いにもかかわらず、HPV 陽性中咽頭癌は手術、放射線治療や化学療法に対する感受性が非常によく、また臨床的な予後も良いことが知られている。HPV 陽性中咽頭癌の予後について決定づけた臨床試験は RTOG0129 試験である(26)。この試験では、III 期と IV 期 HNSCC (遠隔転移なし) で 743 人の患者を、CDDP 併用の加速分別放射線療法または CDDP 併用の標準放射線療法の 2 群に無作為に割り付けられた。この研究の本来の結果は、これらの両群において Overall Survival (OS) および Progression-Free Survival (PFS) を比較することであったが、両群間に有意差はみられなかった。しかし、中咽頭癌 (N = 433) の患者に ISH-HPV を行い、63.8% が陽性であり、HPV 陰性腫瘍と比較して OS, PFS ともに大幅に改善されていた。局所再発は ISH-HPV 陽性患者で有

意に低かったが、遠隔転移に有意差は認められなかった。多変量解析では、HPV 陽性患者は死亡リスクが 58%も減少していた。この報告においては、HPV 陽性患者、陰性患者のリスク要因以外に喫煙歴、転移リンパ節のステージのリスクも加え、再帰分割分析 (Recursive Partitioning Analysis) を用い、中咽頭癌において死亡リスクを層別化している(26)。

### Ⅲ 目的

本邦の中咽頭癌が欧米と同様に HPV との関連があるのか、関連があるとすればその頻度、経時的な変化、および予後や臨床所見にいかなる影響を来しているのかを当科中咽頭癌根治治療例をもとに後ろ向きに研究し明らかにすること。尚、本研究の実施は、東京大学医学部附属病院倫理委員会(2847,2904)にて承認されている。

### Ⅳ 方法

#### ・対象

2000年1月から2011年12月までに東京大学医学部附属病院にて根治治療をおこなった中咽頭癌患者は193例であった。そのうち、治療前生検標本が入手困難な20症例を除いた173例について、p16の病理組織学的検討を行い、年齢、性別、飲酒歴、喫煙歴、腫瘍の亜部位、T分類、N分類、Stage分類との臨床的な比較を行った。173例のうち、根治治療を行ったのは155例であった。155例のうち、生存例で観察期間が2年未満の31症例を除き、124例に対して生存解析を行った。また、2004年から2012年までの根治治療例150例に対してISH-HPVによるHPVの検索を行い、重複癌の有無、p16陽性症例との比較検討を行った。さらに、p16陽性、ISH-HPV陰性という乖

離がみられる症例が少なからず認められることから、p16 陽性症例に対して PCR を加え、p16 陽性、HPV 陰性腫瘍と p16 陽性、HPV 陽性腫瘍との臨床的な予後との解析を加えた。

p16 は 16kDa の分子量であり、156 個のアミノ酸から構成されている。p16 に対して市販されている抗体のクローンは H-156、JC8、F-12、E6H4 の 4 種類が知られている。このうち、ウェスタンブロット等、他の手法によって子宮頸癌に対して確立した抗体とみなされているのが E6H4 である(31)。他の 3 種のクローンに関しても E6H4 をポジティブコントロールとして比較した報告(32)があり、JC8 は H-156 および F-12 と異なり E6H4 とほぼ同様の染色をするとされている。これらの報告から p16 に対して免疫染色を行う場合には E6H4 や JC8 を用いることは妥当であると考えられ、本検討では JC8 を用いた。パラフィン包埋切片標本から ISH により HPV を検出する市販されているキットは DAKO 社からの GenpointHPV キットと Zytomed 社からの ZytoFastHPV キットが知られている。子宮頸癌の組織における検討として、両者を比較した結果、いずれのキットも検出力が優れているが、DAKO 社のキットの方がより感度が高いという報告(33)があった。よって本検討では DAKO 社による GenpointHPV キットを用いた。

•p16 の免疫染色の方法

各症例のパラフィン包埋切片は放射線治療あるいは化学療法が行われる前の生検、あるいは切除標本で、東京大学病理学教室に保存されている標本を利用した。4  $\mu$  m の厚さで薄切し、キシレンとエタノールで脱パラフィンを行った後、S1700 (DAKO Japan) で 120°C、20 分のオートクレーブ操作により賦活化を行った。過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った後、一次抗体として p16 マウスモノクローナル抗体 (1:100) (JC8, Santa Cruz 社 sc-56330) を用い、ヒストファインシンプルシステム MAX-PO(M)を二次抗体として用いた。ヘマトキシリンで核染色を行った。腫瘍細胞の 70%以上が p16 の染色陽性となっている癌腫を p16 が陽性と判定した(34)。

・ISH-HPV の方法

各症例のパラフィン包埋標本を 4 $\mu$  の厚さで薄切し、脱パラフィンを行った。S1700 (DAKO Japan )にて 95°C、40 分のオートクレーブ処置により賦活化を行った。プロテナーゼ K により消化酵素処理を行った後、過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ因子のブロッキングを行った。組織を乾燥後、GenPoint HPV プローブ (HPV ハイリスク type 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 のカクテルプローブ)を摘出したのち、95°Cでディネーチャー5 分、そののちハイブリダイゼーションを 37°Cで 16 時間行った。プローブを Stringent Wash Solution にて 48°C、30 分洗浄したのち、GenPoint System を用いて一次抗体、ビオチン標識タイラマイド、二次酵素試薬の反応を行った後、DAB で発色させた。十分に水洗後、ヘマトキシリンにより対比染色を行い色出した。腫瘍細胞の細胞核に点状の染色がみられる癌腫を HPV 陽性と判定した。上記の作業については Dako 社の GenPoint HPV in situ hybridization の染色手順に従った。

・PCR の方法

p16 陽性症例のパラフィン包埋標本を 10  $\mu$  の厚さで薄切し、病理学的に扁平上皮癌と診断されている部位をメスにて切り出しを行った。キシレンにて溶解し混和後 2 分間遠心分離し、上澄みを除去した。残留しているキシレンをエタノールでサンプルから除去したのち、Buffer ATL と Proteinase K を添加し、56°C で一晩インキュベートした。そののち Buffer AL、Buffer AW1、Buffer AW2 で順に DNA を抽出し、最終的に DNA を Buffer ATE で溶出した。以上の処理はキアゲン社の QIA amp DNA FFPE キットを用いた。PCR 反応のための試薬は Quanti Tect SYBR Green PCR キット (キアゲン社) を用い、プライマーとしては HPV-16 ウィルスの E6 をターゲットとした 5' -GAACTGCAATGTTTCAGGACCC-3' および 5' -ATATACCTCACGTCGCAGTAACTGTT-3' を用いた。PCR の条件は 50°C で 2 分、95°C で 15 分加熱したのち、94°C を 15 秒および 60°C を 15 秒行うサイクルを 50 回行った。今回はリアルタイム PCR を行い、増幅した E6 遺伝子がプラトーに達したものを陽性と判定した。

#### ・飲酒量、喫煙量の評価

東京大学耳鼻咽喉科腫瘍外来初診時の問診票をもとに飲酒、喫煙の定量的評価を行った。喫煙量に関しては一日喫煙量×年数÷20 のいわゆる pack-year を、飲酒量については問診上の酒の種類毎に飲酒量をエタノール換算量に換算し、一週間あたりの飲酒量をエタノール換算し、年数を乗し定量的評価を行った。そのうえで喫煙者を20 pack-year(一日箱×年)以上(34)と、飲酒者を一日エタノール×年で450g年以上と(7)定義した。また、定量評価方法として SAKE index (一日日本酒一合と飲酒期間の積)を用いた。

#### ・重複癌の評価

中咽頭癌は重複癌が多いことが知られているため、当科では根治治療前に頸胸部のCT、および上部消化管内視鏡はほぼ全例で行っていた。FDG-PETについては保険適応の問題もあり、症例ごとに判断されていた。中咽頭癌と診断された時期の前後6か月以内に指摘された他臓器の固形癌を同時性重複癌と定義(35)した。それ以外の時期に指摘された他臓器の固形癌を異時性重複癌と定義した。中咽頭と隣接した

部位の癌腫が中咽頭癌治療後に生じた場合には中咽頭癌の再発とみなし、重複癌には含めなかった。

#### ・統計解析方法

生存解析のエンドポイントは粗生存とした。患者背景因子の群間比較に関しては定性的データに対してはカイ二乗検定、またはフィッシャーの確率確定検定を行い、定量的データに対してはスチューデントの  $t$  検定あるいはマンホイットニーの  $U$  検定を行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、生存曲線の 2 群間の検定にはログランク法を用いた。生存率の比較に関しては生存例で 2 年以下の経過観察期間の症例に関しては生存率の比較対象からは除外して行った。多変量解析に対しては時間因子を考慮しない場合多重ロジスティック回帰分析を行い、時間因子を考慮する場合に Cox のハザードモデルを用いた。投入する変数は overfitting を避けるためにイベント発生数の 10 分の 1 以下の変数とした。発生イベントが 30 以下の場合には変数選択の方法としてステップワイズ法を用いた。その場合には投入する変数は常に 2 以下とし、変数選択の基準として  $p < 0.15$  を用いた。生じたモデルに対してカットオフ値を定める方法として、ROC 分析法を用いた。予後因子モデルを作成する方法として、回帰分割分析法を用いた。統計解析ソフトは Microsoft Excel 2010、そのパッケージソフトとしてエクセル統計 2010、スタットフレックス ver 6.0、R (version 2.15.2) および Epi,

および party パッケージアプリケーションを用いた。

## V 結果

### 1 本検討症例の治療法

根治治療例の治療法であるが、10 年以上にわたる後ろ向き検討のため、様々な治療が行われていた。主に原発巣に対する治療につき、T 分類別に表 1 に示す。

T1-2 の局所限局例 91 症例に対しては手術療法が 39 例、単独放射線療法が 36 例、放射線化学療法が 16 例に行われていた。放射線化学療法が行われた症例のほとんどは腫瘍体積が比較的大きいと判断された T2 症例、あるいは前壁癌症例に対して行われていた。

T3-4 の局所進行 64 症例に対しては手術療法が 19 例、手術療法および術後放射線療法が 4 例、単独放射線療法が 11 例、放射線化学療法が 30 例に行われていた。2009 年から当科では根治目的の手術および放射線療法に先立ってドセタキセル、シスプラチン、5-FU による導入化学療法を施行し、その治療効果に応じて手術、あるいは放射線療法を選択していた。導入化学療法後の治療方法を主な治療として手術、あるいは放射線治療の群にそれぞれ含めた。当科では 2011 年に至るまで、HPV の検査は施行されていなかったため、本稿検討症例は HPV 因子による治療選択の振り分けは行われていなかった症例群である。

表 1 検討症例の原発腫瘍に対する治療法

---

<u>T1-2 (91 例)</u>	
手術	39 例
放射線療法	36 例
化学放射線療法	16 例
<u>T3-4 (64 例)</u>	
手術	19 例
手術、術後放射線療法	4 例
放射線療法	11 例
化学放射線療法	30 例
先行頸部郭清施行	19 例
導入化学療法施行例	25 例

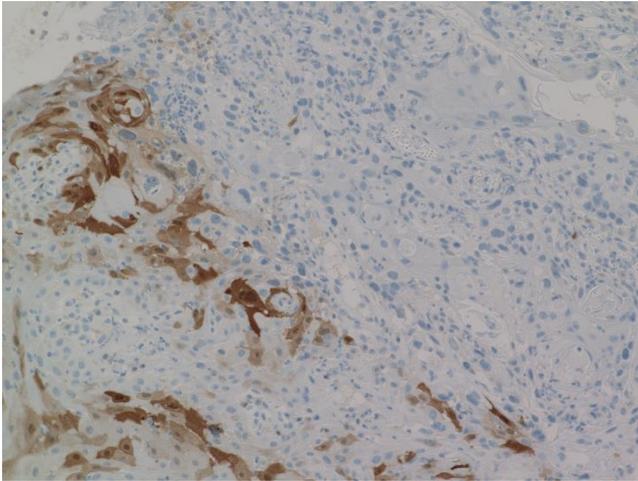
---

## 2 p16 の免疫染色の結果と臨床的検討

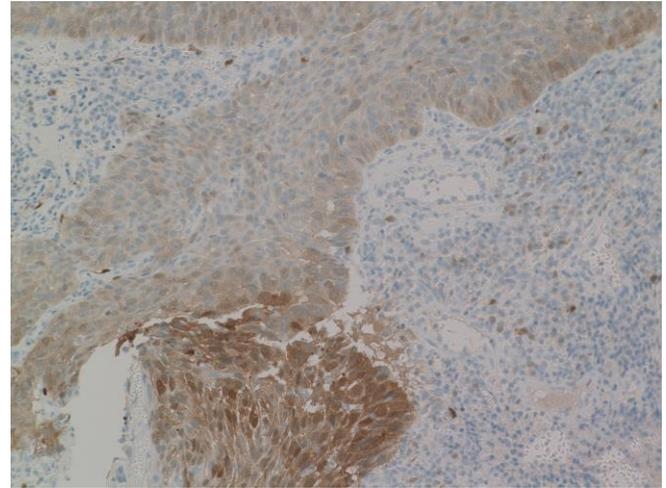
表 2 に病理組織学的な分化度と p16 陽性細胞が癌細胞に占める割合を示す。また、代表的な p16 陽性腫瘍の組織像を図 1 に示す。今回検討した標本のほとんどが生検標本のため、分化度まで診断されなかった症例が 60 例と多くを占めていた。p16 の陽性細胞が癌腫に占める割合は、腫瘍細胞の 70% 以上とそのほとんどがびまん性かつ強い染色を示す腫瘍が多かった。腫瘍の一部のみに p16 の陽性細胞を占める症例はごく一部であった。今回の検討では、腫瘍がびまん性に (>70%) 強く染色を示す症例を p16 陽性中咽頭癌と定義(34)し、173 症例のうち、51 例 (29.4%) が p16 陽性腫瘍であった。特筆すべきは、分化度が判定されていた 113 症例のうち、高分化扁平上皮癌は 37 症例に認めたが、うち p16 陽性腫瘍は 1 例のみであったことである。その一方で低分化扁平上皮癌、および中等度分化扁平上皮癌 76 例のうち、p16 陽性は 34% であった。

表 2 p16 免疫組織化学の結果と扁平上皮癌の分化度との関連

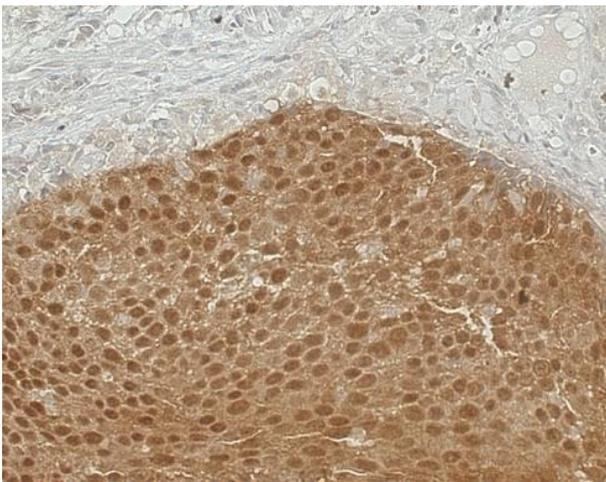
分化度	p16 陽性癌細胞が癌細胞に占める割合			
	0-5%	5-50%	50-70%	70%以上
判定せず	30	3	3	24
低分化	19	0	3	7
中等度分化	27	0	1	19
高分化	33	3	0	1
計	109	6	7	51



a)5-50%の腫瘍細胞が p16 陽性



b)50-70%の腫瘍細胞が p16 陽性



c)腫瘍細胞の 70%以上が p16 陽性

図1 p16 陽性腫瘍の代表的な組織像

腫瘍細胞における p16 陽性像が a)5-50%, b)50-70%, c)70%以上と判定したもの。本稿  
検討では c)の 70%以上の陽性を p16 陽性と定義した。

表 3 に p16 陽性腫瘍と中咽頭の亜部位に対する分布を示す。p16 陽性腫瘍のうちほとんど(94%)が側壁および前壁に生じていた。今回の検討では中咽頭後壁に p16 陽性腫瘍は存在していなかった。側壁、前壁が多い傾向にあったが p16 陽性腫瘍の頻度に統計学的有意差は認めなかった。

図 2 に p16 陽性腫瘍の頻度と年代との関連について示す。2000 年から 2012 年に至るまで、p16 陰性腫瘍はコンスタントに存在しているのに対して、p16 陽性腫瘍は 2004 年頃から増加していた。2000 年から 2003 年までの 4 年間に受診した中咽頭癌のうち、p16 陽性腫瘍の占める割合は 15% (33 例中 5 例)であったのに対して、2008 年から 2011 年までに受診した中咽頭癌のうち p16 陽性腫瘍の占める割合は 33%(74 例中 24 例)であり、p16 陽性腫瘍は有意に増加していた( $p = 0.049$ )。

表 4 に p16 陽性腫瘍と臨床指標(TNM 分類、性差、年齢)との関連を示す。今回の検討症例のなかではいずれの項目についても有意差は得られなかった。p16 陽性腫瘍は T4 症例が少なく、また N2 症例が多い傾向にあり、このため StageIV 症例が多い傾向にあった。また、p16 陰性症例と比較して女性が多い傾向にあると考えられた。年齢の中央値に関して有意差は認められなかった。

表 3 p16 陽性と中咽頭扁平上皮癌の亜部位との関連

亜部位	p16 陽性	p16 陰性	計
側壁	34 (34%)	67 (66%)	101
前壁	14 (29%)	35 (71%)	49
上壁	3 (23%)	13 (77%)	16
後壁	0 (0%)	7 (100%)	7
計	51(30%)	122 (70%)	173

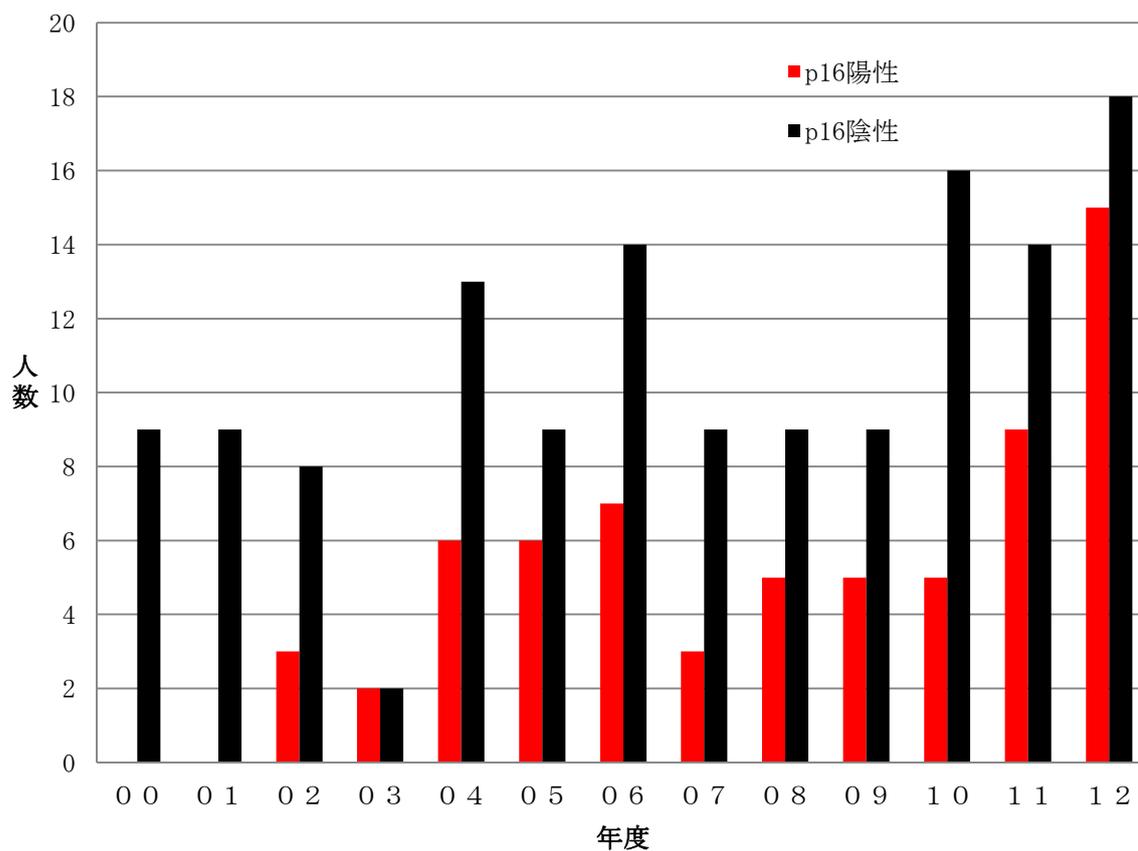


図2 p16 陽性扁平上皮癌の年代推移

2000年から2002年はp16陽性腫瘍は殆ど認められなかったが、時代を追って増加し、2012年には中咽頭扁平上皮癌の40%近くがp16陽性腫瘍であった。

表 4 p16 と臨床指標 (性別、年齢、Stage)

		p16 陽性	p16 陰性
男性		43	113
女性		8	9
年齢	(最小-最大)	36-81	21-86
	(中央値)	66	62
T 分類	cT1	6	19
	cT2	24	48
	cT3	18	31
	cT4	3	24
N 分類	cN0	14	38
	cN1	5	16
	cN2	29	59
	cN3	3	9
Stage	Stage I	1	10
	Stage II	7	16
	Stage III	11	20
	Stage IV	33	75

### 3 p16 と生存解析、治療法別粗生存率について

図 3 に p16 陽性腫瘍と p16 陰性腫瘍の粗生存率をエンドポイントとした Kaplan-Meier 法による生存曲線を示す。p16 陽性腫瘍の 3 年生存率は 82.9%、p16 陰性腫瘍の 3 年生存率は 47.2%と、p16 陽性腫瘍は p16 陰性腫瘍に比較して有意に予後良好であった。Log-rank 法による生存率の両群比較でも有意差を認めた ( $p=0.002$ )。

p16 陽性腫瘍 11 例が死亡していたが、その死因は原発巣が 2 例 (18%)、頸部リンパ節転移が 2 例 (18%)、遠隔転移が 4 例 (36%)、他病死が 3 例 (27%) であった。p16 陰性腫瘍 47 例が死亡していたが、その死因は原発巣が 18 例 (38%)、頸部リンパ節転移が 13 例 (28%)、遠隔転移が 9 例 (19%)、他病死が 7 例 (15%) であった。

表 5 に中咽頭癌の治療法である、手術(+術後放射線療法)、放射線化学療法、単独放射線療法における治療ごとの 3 年生存率、および Log-rank 法による両群間の生存率の比較を示す。いずれの治療法についても p16 陽性腫瘍は p16 陰性腫瘍に比較して良好な予後を示す傾向にあったが、特に放射線療法において有意差をもって予後良好であった。Log-rank 法による有意差が得られたのは単独放射線療法群であった (3 年生存率 p16 陽性例 92.9%、p16 陰性症例 44.9%)。

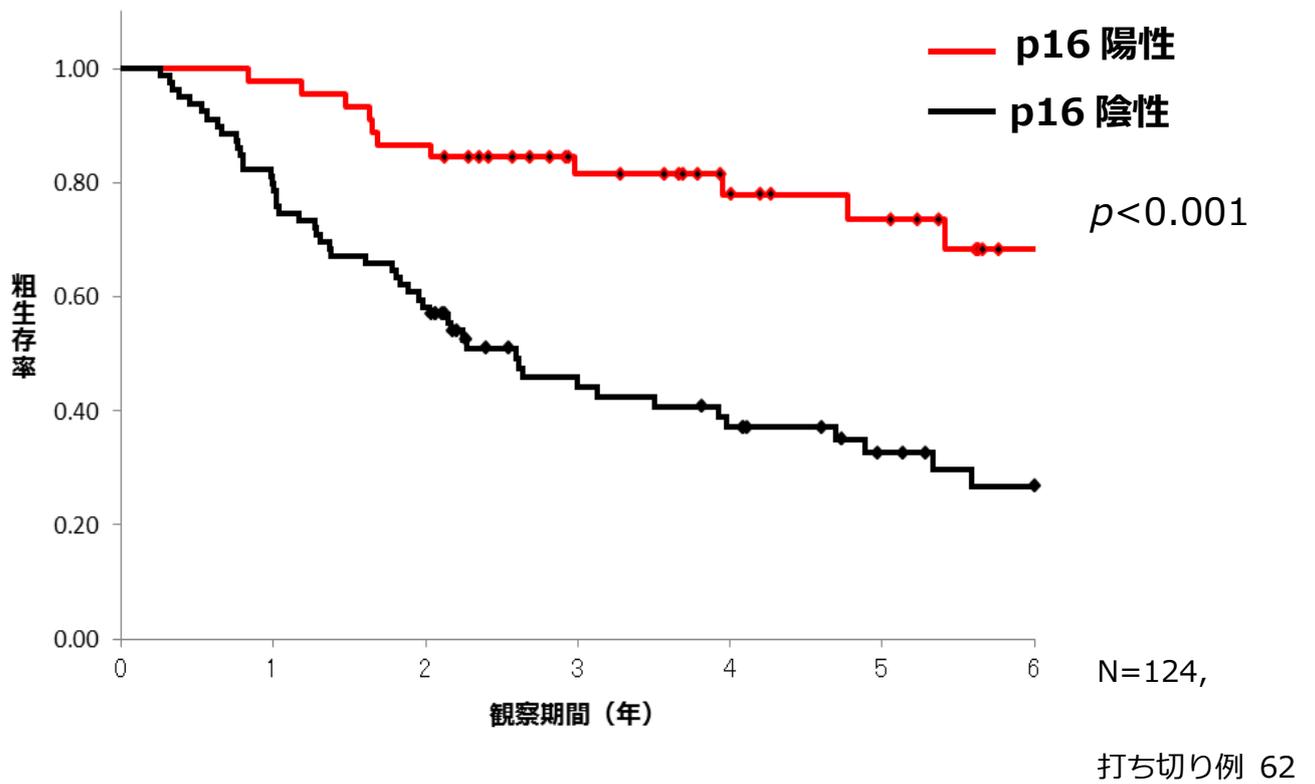


図3 p16 陽性中咽頭扁平上皮癌とp16 陰性中咽頭扁平上皮癌の生存曲線

p16 陽性腫瘍は p16 陰性腫瘍と比較して予後良好であった。

表 5 治療法別 p16 陽性/p16 陰性中咽頭癌の生存率の比較

治療法	p16	3年生存率(%)	95%信頼区間	p値
手術(+術後照射)	陽性 (11 例)	72.0	44-99	0.12
	陰性 (39 例)	48.6	32-65	
化学放射線療法	陽性 (12 例)	83.3	62-100	0.12
	陰性 (27 例)	47.3	28-66	
放射線療法	陽性 (14 例)	92.9	79-100	0.0018
	陰性 (21 例)	44.9	22-68	

## 4 飲酒、喫煙と生存解析

飲酒、喫煙を東京大学耳鼻咽喉科の問診表、病歴から定量化し、4 群間に分けることで生存曲線の比較を行った。

図 4 に喫煙と予後についての比較を示す。非喫煙群(18 例)、pack-year20 未満の群(10 例)、20 以上 50 未満の群(52 例)、50 以上の群(44 例)の 4 群に分けたところ、何れの群間にも有意差は認めなかった。

図 5 に飲酒量と予後についての比較を示す。一日エタノール量を飲酒年で乗じた積算量において、非飲酒および機会飲酒群 (29 例)、400g 以下 (28 例)、400~1200g (11 例)、1200g 以上 (56 例)の 4 群に分けたところ、非飲酒群がほか 3 群に対して予後良好であった。

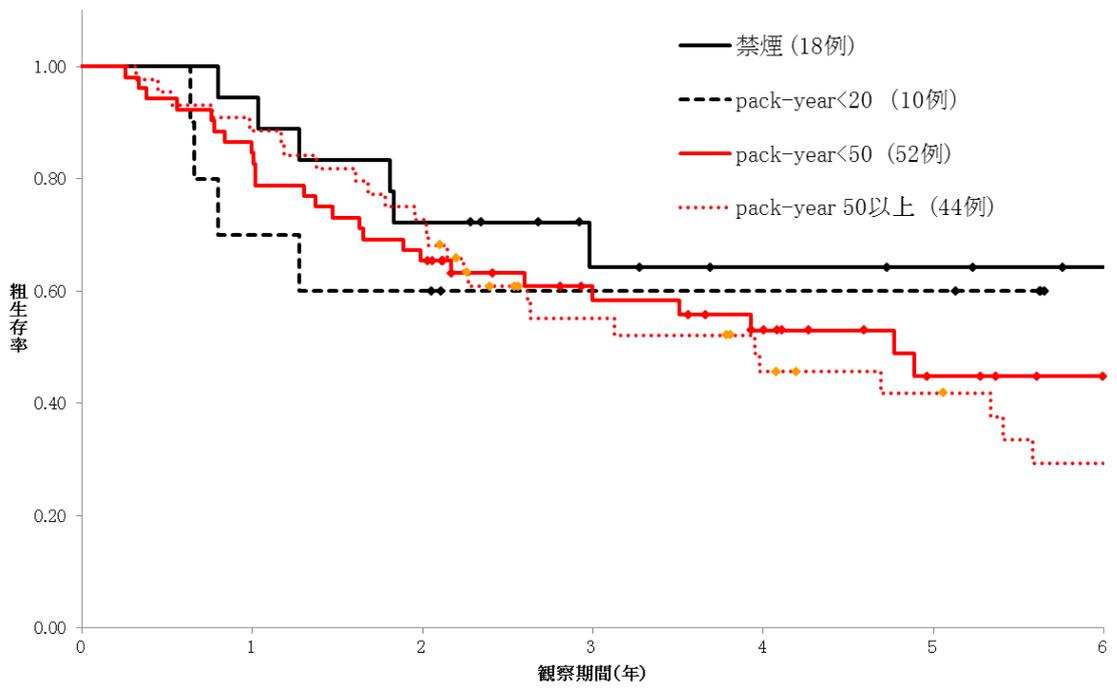


図 4 喫煙と粗生存曲線

喫煙量による生存成績の有意差は認められなかった。

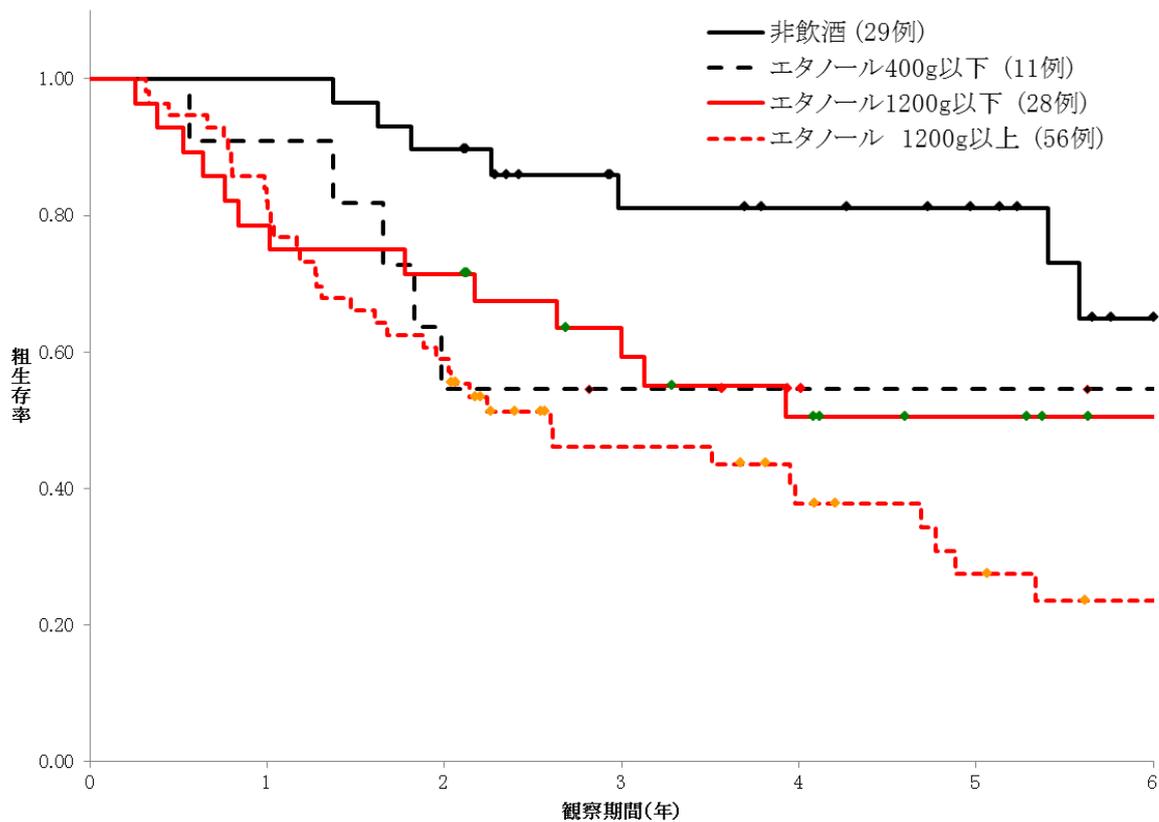


図 5 飲酒と粗生存曲線

習慣飲酒者は非飲酒者と比較して予後不良であった。

## 5 予後因子の検討とリスク層別化

多変量解析に投入する因子として、TNM 分類のうち T4 と T1-3、N1-3 と N0、Stage3-4 と Stage1-2 の因子の 3 つ、および p16 陽性腫瘍、喫煙者、飲酒者を変数として Cox のハザードモデルの多変量解析を行った(表 6)。この結果、p16 陽性および飲酒者の因子がともに有意な因子と導き出され、TNM 分類を凌駕した予後因子であった。それぞれのハザード比は 0.34 および 2.88 であった。

この解析結果から、今回の 124 症例に対しての予後リスク層別化を回帰分割分析を用いて行った。多変量解析で有意であった p16 陽性および大量飲酒という因子を用いたところ、まず 124 症例のうち p16 陽性、陰性によりカテゴリー化が行われ、次いで p16 陰性症例に対して大量飲酒の有無の有無によりカテゴリー化が行われた(図 6)。すなわち、本検討症例は p16 陽性および p16 陰性、大量飲酒なしの低リスク群、p16 陰性、大量飲酒ありの高リスク群の 2 群のリスク層別化が可能であった(図 7)。

表6 Cox のハザードモデルを用いた粗生存に対する p16、Stage、T 分類、  
N 分類、喫煙、飲酒の予後因子の検討

変数	ハザード比	95% 信頼区間	<i>p</i> 値
p16 陽性 (vs 陰性)	0.34	0.16–0.70	0.003
Stage III–IV (vs I–II)	1.16	0.42–3.17	0.778
T 分類 cT4 (vs cT1–3)	1.05	0.54–2.04	0.894
N 分類 cN1–3 (vs cN0)	1.44	0.61–3.40	0.400
喫煙 (vs 非喫煙)	1.15	0.58–2.28	0.700
飲酒 (vs 非飲酒)	2.88	1.19–6.95	0.019

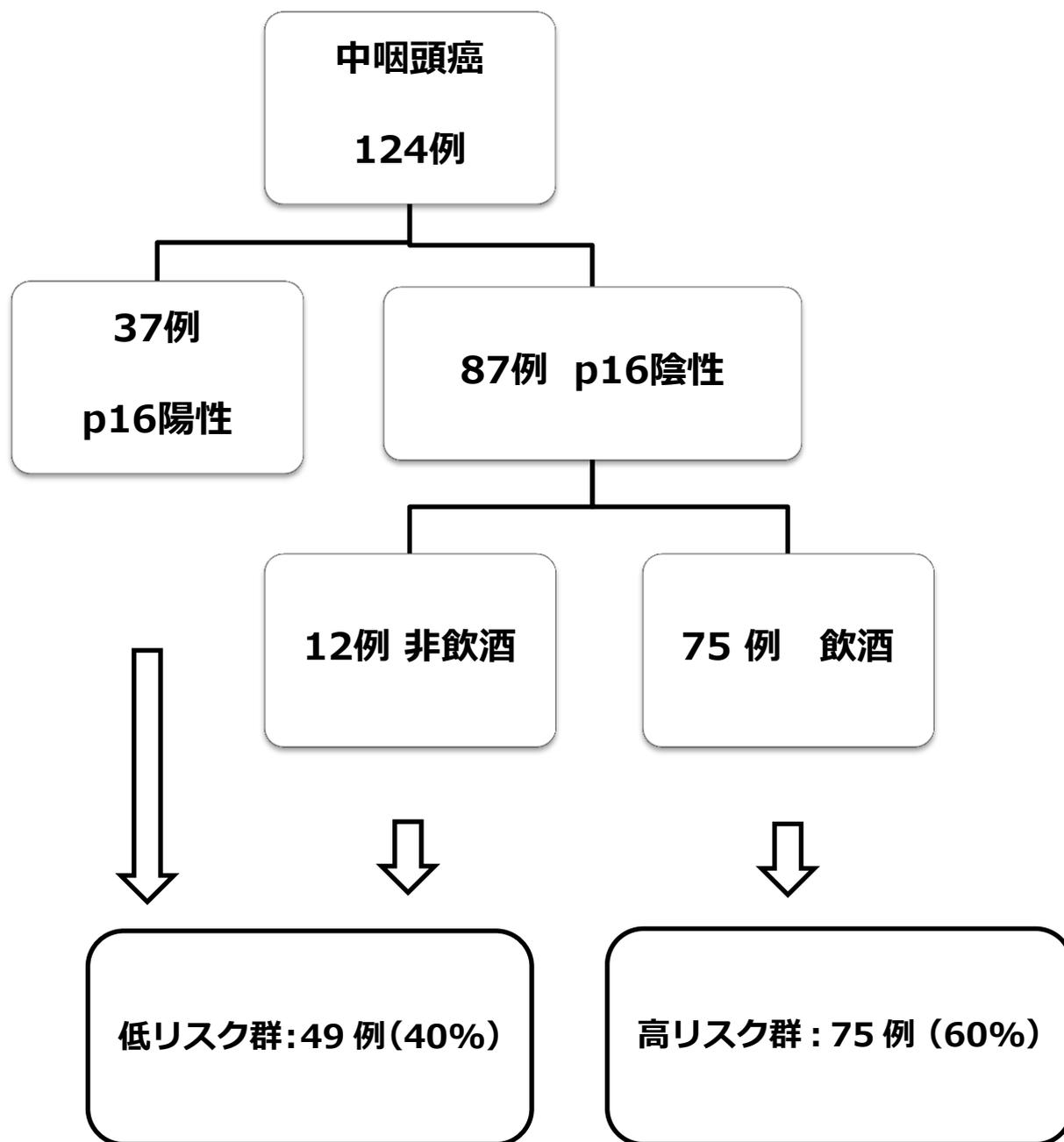


図 6 再帰分割分析による 124 例の中咽頭癌のリスク分類

p16 および飲酒歴によって予後リスクを 2 つに分割できた。

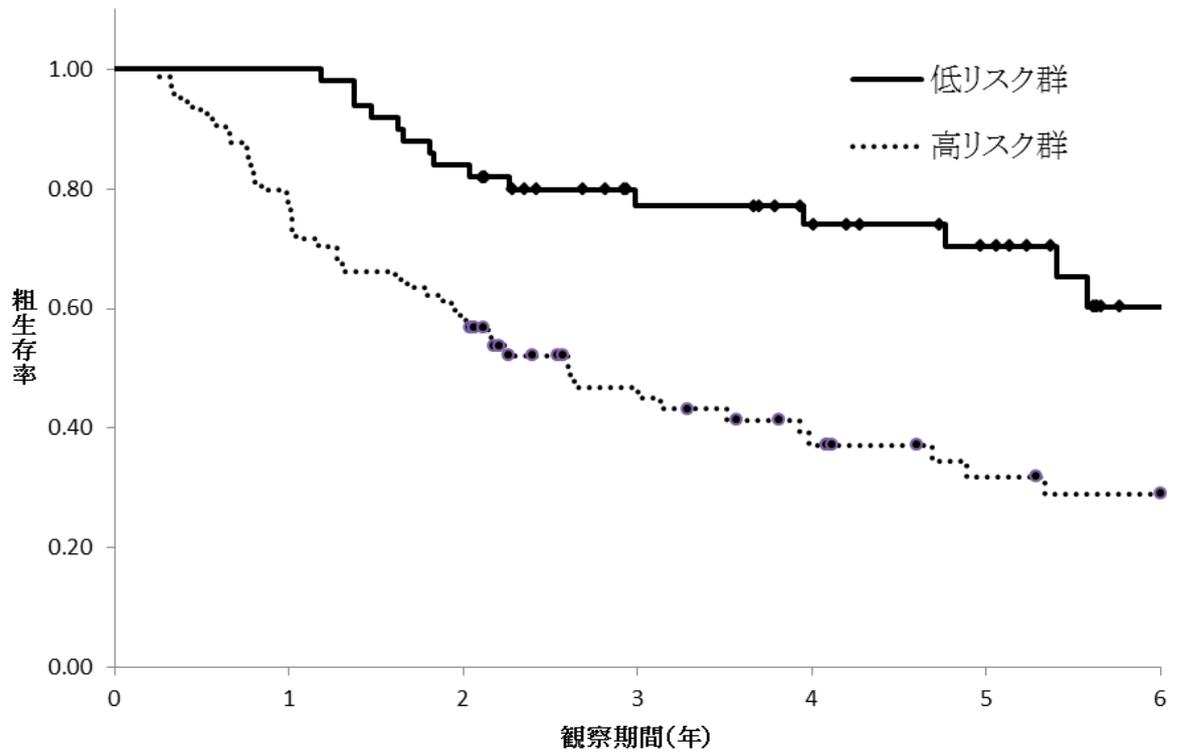


図7 低リスク群、高リスク群別の粗生存曲線

p16、飲酒群によるリスク分類による粗生存の比較を示す。

## 6 ISH-HPV の陽性所見と臨床指標

表 7 に 2004 年から 2012 年までの中咽頭扁平上皮癌 150 例に施行した ISH-HPV の結果について示す。図 8 に代表的な ISH-HPV 陽性像を示す。

検討症例のうち、31.3%(150 例中 47 例)で ISH-HPV において核内に点状の染色が認められ、HPV ウィルスが腫瘍内の核内に取り込まれ、腫瘍細胞内に発現している HPV 陽性腫瘍と考えられた。HPV 陽性腫瘍と HPV 陰性腫瘍との比較において HPV 陽性腫瘍は非喫煙、非飲酒の生活歴を有する症例が多く、N2-3 の多発リンパ節転移を有する症例が多い一方で T4 症例が少なかった。また女性が多い傾向にあったが年齢については HPV 陰性症例と明らかな差は認めなかった。また、高分化癌で HPV 陽性所見が得られたのは 47 症例中 1 例のみであった。

表 7 ISH-HPV 陽性腫瘍と ISH-HPV 陰性腫瘍の臨床指標の比較

		ISH-HPV		<i>p</i> 値
		陽性	陰性	
性別	男性	37	93	0.05
	女性	10	10	
年齢	(最小-最大)	36-82	21-90	0.60
	(中央値)	64	64	
T 分類	cT1-3	41	84	0.05
	cT4	3	19	
N 分類	cN0-1	18	55	0.05
	cN2-3	30	48	
喫煙	非喫煙	18	16	0.0020
	喫煙	30	87	
飲酒	非飲酒	25	27	0.0013
	飲酒	23	76	
分化度	高分化	1	18	0.0029
	低～中等度分化	47	85	

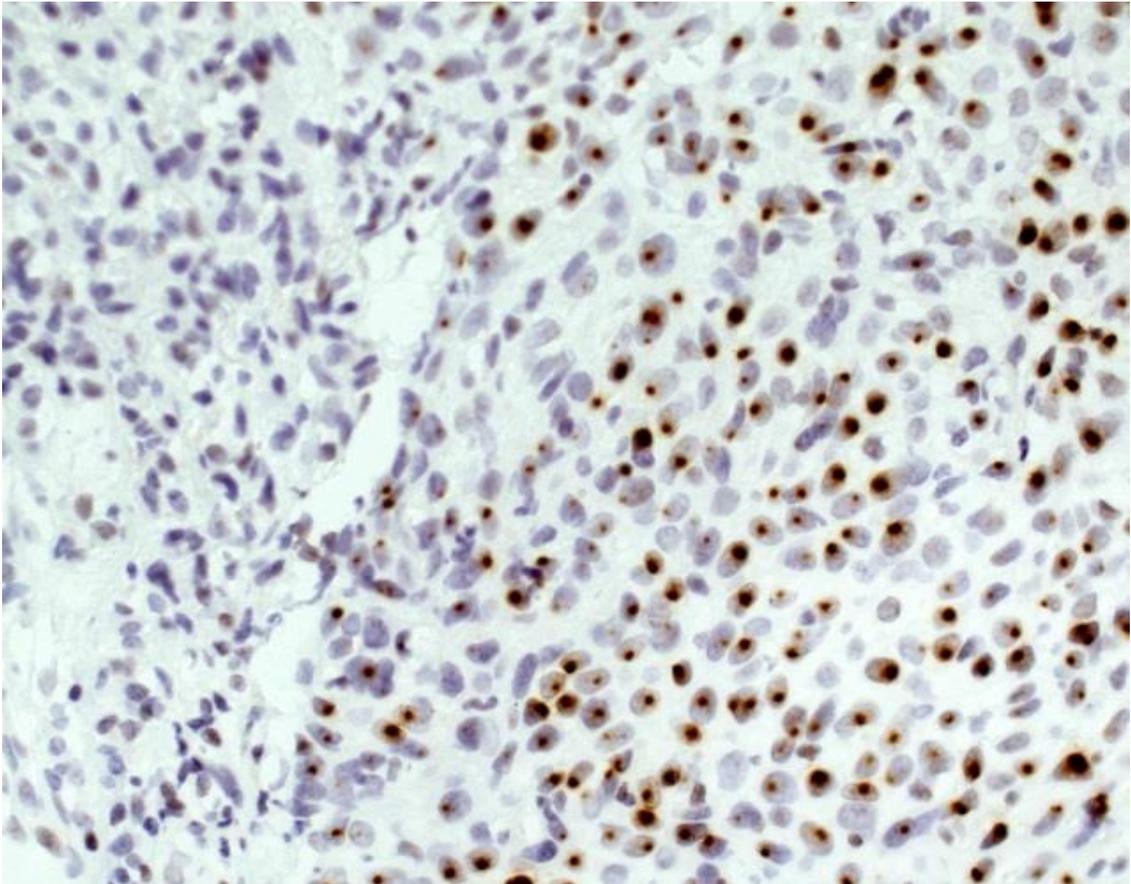


図 8 代表的な ISH-HPV 陽性像

腫瘍細胞の核に点状の染色を示す所見を HPV 陽性所見とした。

## 7 p16 陽性腫瘍と ISH-HPV 陽性腫瘍の比較

表 8 に 2004 年から 2012 年の根治治療 150 症例のうち、ISH-HPV による HPV の有無と p16 の免疫染色の有無に関する関連を示す。p16 陽性症例はこの対象期間において 58 例の陽性腫瘍を認めたが、うち ISH-HPV における HPV 陽性腫瘍は 44 例であり、14 例(24%)が ISH-HPV 陰性腫瘍であった。ISH-HPV の陽性所見を HPV 陽性と考えたところ、p16 の感度、特異度、偽陽性率はそれぞれ 94%、86%、24%と考えられた。

## 8 p16 陽性、HPV 陰性腫瘍の定義と予後

図 9 に real-time PCR による HPV-16 E6 陽性例を示す。p16 陽性 58 例のうち、55 例に対して PCR を行ったところ、45 例が PCR 陽性症例であった。ISH-HPV あるいは PCR のいずれかが陽性であった腫瘍を HPV 陽性と定義したところ、48 例が p16 陽性 HPV 陽性、10 例が p16 陽性 HPV 陰性症例、3 例が p16 陰性 HPV 陽性、89 例が p16 陰性 HPV 陰性腫瘍と考えられた(図 10)。図 11 にそれぞれの 4 群間の Kaplan-Meier 法による生存曲線を示す。3 年生存率は p16 陽性 HPV 陽性、p16 陽性 HPV 陰性、p16 陰性群それぞれが 80.9%、90%、52.6%であった。p16 陰性 HPV 陽性腫瘍は症例数が少なく、解析対象からは除外した。p16 陽性 HPV 陰性群は p16 陰性 HPV 陰性群に比較しても有意に良好な生存率を示していた。

表 8 p16 陽性腫瘍と ISH-HPV 陽性腫瘍との直接比較

	ISH-HPV 陽性	ISH-HPV 陰性
p16 陽性	44	14
p16 陰性	3	89

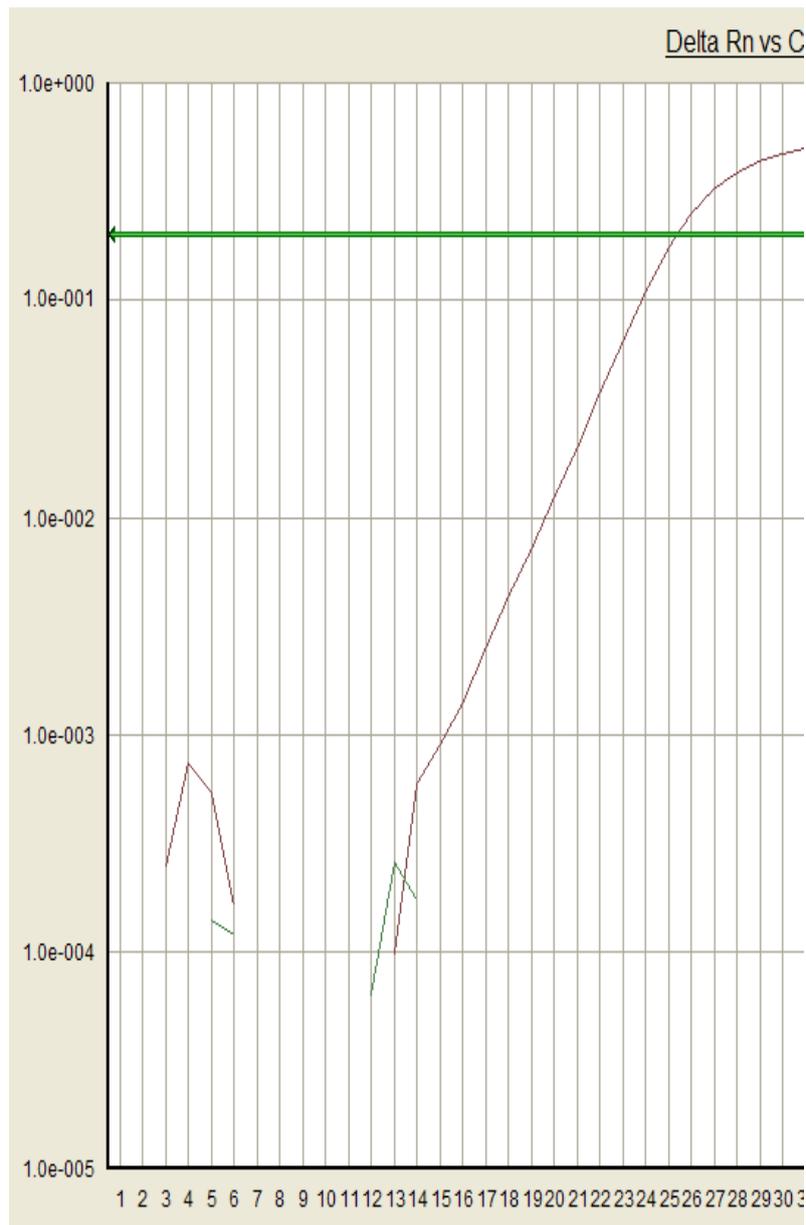


図 9 real-time PCR による HPV-16E6 遺伝子の陽性所見

グラフの横軸が PCR の回数、縦軸が色素強度をプロットしている。HPV16-E6 は 26 回の PCR まで線形に増幅している。

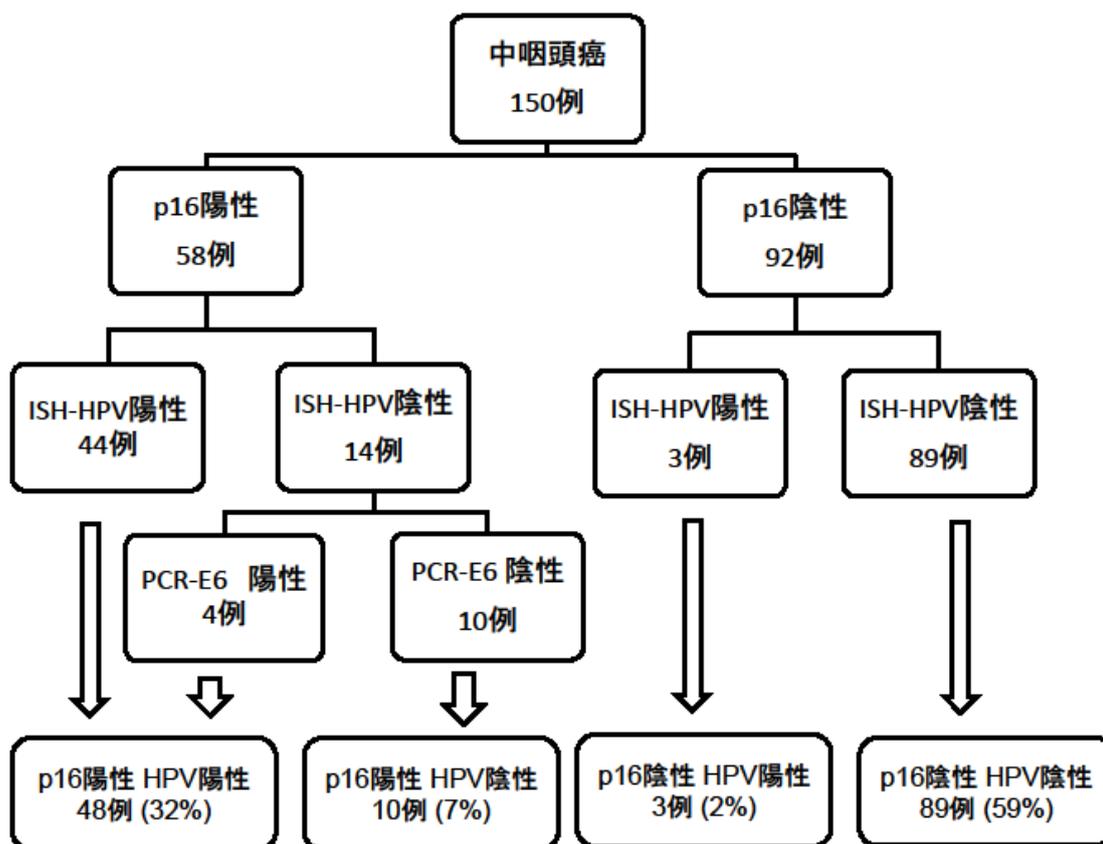


図 10 p16 陽性、HPV 陰性腫瘍の定義

ISH-HPV および PCR-E6 の結果から、p16 陽性 HPV 陰性腫瘍および p16 陰性 HPV 陽性腫瘍を定義した。150 例中 10 例 (7%) が p16 陽性 HPV 陰性腫瘍、3 例 (2%) が p16 陰性 HPV 陽性腫瘍であった。

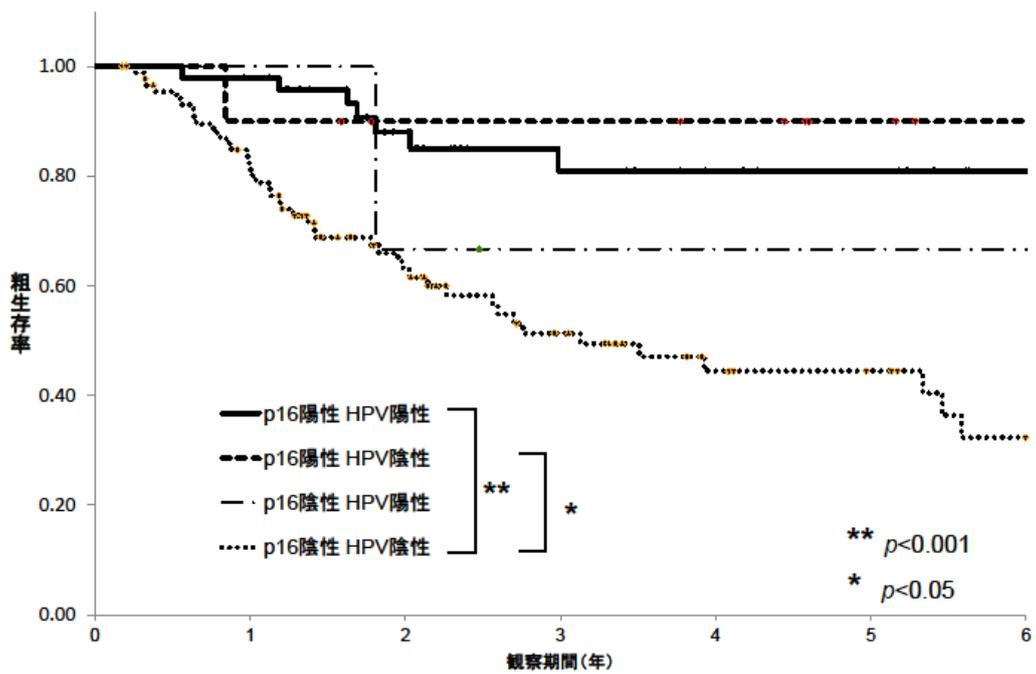


図 11 p16 陽性 HPV 陰性腫瘍の粗生存率

p16 陽性 HPV 陰性腫瘍は p16 陰性腫瘍と比較して予後良好であった

## 9 重複癌の頻度、および重複癌のリスク因子について

表 9 および表 10 に中咽頭癌の重複癌の有無と臨床指標について示す。2004 年から 2012 年までの根治治療を施行した 150 例のうち、同時性重複癌は 14%(150 例中 21 例)に、異時性重複癌は 20.7%(150 例中 31 例)に認めた。同時性重複癌の部位は頻度が多い順に食道癌 10 例、食道以外の消化器癌 4 例、頭頸部癌および肺癌が 3 例、泌尿器科領域が 1 例であった。異時性重複癌の部位は頻度が多い順に食道癌および食道以外の消化器癌がともに 10 例、頭頸部癌が 9 例、泌尿器科領域が 5 例、肺癌が 2 例であった(一部の症例は複数の異時性重複癌が生じている)。中咽頭癌の立場からみて重複癌が生じた症例群と生じなかった症例群を比較した。

同時性重複癌においては性差、年齢、喫煙量、進行 T 分類、N 分類、HPV 陽性、については単変量解析において有意差は認めなかったが、飲酒量については飲酒量が多いほど有意差をもって同時性重複癌の発生頻度が高まっていた( $p=0.0027$ )。

表 9 同時性重複癌の有無と臨床指標

		同時性重複癌		<i>p</i> 値
		あり	なし	
性別	男性	17	115	0.48
	女性	4	16	
年齢	(最小-最大)	57-81	21-90	0.63
	(中央値)	63	64	
T 分類	cT1-2	13	78	0.90
	cT3-4	8	51	
N 分類	cN0	6	44	0.62
	cN1-3	15	85	
喫煙 (pack-years)	(最小-最大)	0-129	0-170	0.28
	(中央値)	40	36.7	
飲酒 (SAKE index)	(最小-最大)	0-222	0-296	0.0027
	(中央値)	67	30	
ISH-HPV	陽性	6	41	0.97
	陰性	15	88	

表 10 異時性重複癌の有無と臨床指標

		異時性重複癌		p 値
		あり	なし	
性別	男性	28	103	0.89
	女性	4	16	
年齢	(最小-最大)	45-80	21-90	0.84
	(中央値)	63	65	
T 分類	cT1-2	19	72	0.93
	cT3-4	12	47	
N 分類	cN0	17	33	0.04
	cN1-3	14	86	
喫煙 (pack-years)	(最小-最大)	0-129	1-170	0.10
	(中央値)	40	30	
飲酒 (SAKE index)	(最小-最大)	0-178	0-296	0.28
	(中央値)	59	29	
ISH-HPV	陽性	3	44	0.0035
	陰性	28	75	

異時性重複癌においては性差、年齢、喫煙量、飲酒量、進行 T 分類については単変量解析において有意差は認められなかったが、進行 N 因子および HPV 因子については N 因子が小さいほど、および HPV 因子が認められないほど異時性重複癌の発生頻度が高まった(それぞれ  $p=0.04$ 、 $p=0.0035$ )。

同時性重複癌のリスク因子に対してステップワイズ法による変数選択を行った多重ロジスティック回帰分析を行ったところ、変数は最終的に飲酒量と性差が選択され、飲酒量の  $p$  値が 0.0022 であった(表 11)。本検討において飲酒量は連続変数として解析したため、同時性重複癌発症に対する飲酒量のカットオフ値をも求めるべく ROC 解析を用いたところ、積算エタノール量で 1600g (図では 800drinks) であった(図 12)。すなわちエタノール換算一日 40g を 40 年以上飲酒している大量飲酒者が対象となり、このカットオフ値における同時性重複癌発生の感度は 71.4%、特異度は 68.5%、陽性的中率は 26.8%、陰性的中率は 93.7%であった。

異時性重複癌に対して同様にステップワイズ法による変数選択を行った多重ロジスティック回帰分析を行ったところ、変数は最終的に HPV 因子と N 因子が選択され、それぞれの  $p$  値が 0.0014 と 0.028 であった(表 12)。この 2 つの因子をもとに回帰分割分析を施行したところ、異時性重複癌のリスク因子として 3 群が規定でき、HPV 陽性腫瘍が低リスク群 (8.5%:47 例中 4 例が異時性重複癌発症)、HPV 陰性腫瘍のうち N 分類 1-3 が中間リスク群 (16.9%:65 例中 11 例が異時性重複癌発症)、HPV 陰性かつ N0 腫瘍が高リスク群 (44.7%:38 例中 17 例が異時性重複癌発症)とリスク層別化が可能であった(図 13)。

表 11 ロジスティック回帰分析による同時性重複癌のリスク因子

変数	オッズ比	95% 信頼区 間	<i>p</i> 値
飲酒量 (Sake-index)	1.014	1.005-1.022	0.002
男性 (vs 女性)	2.97	0.81-10.95	0.102

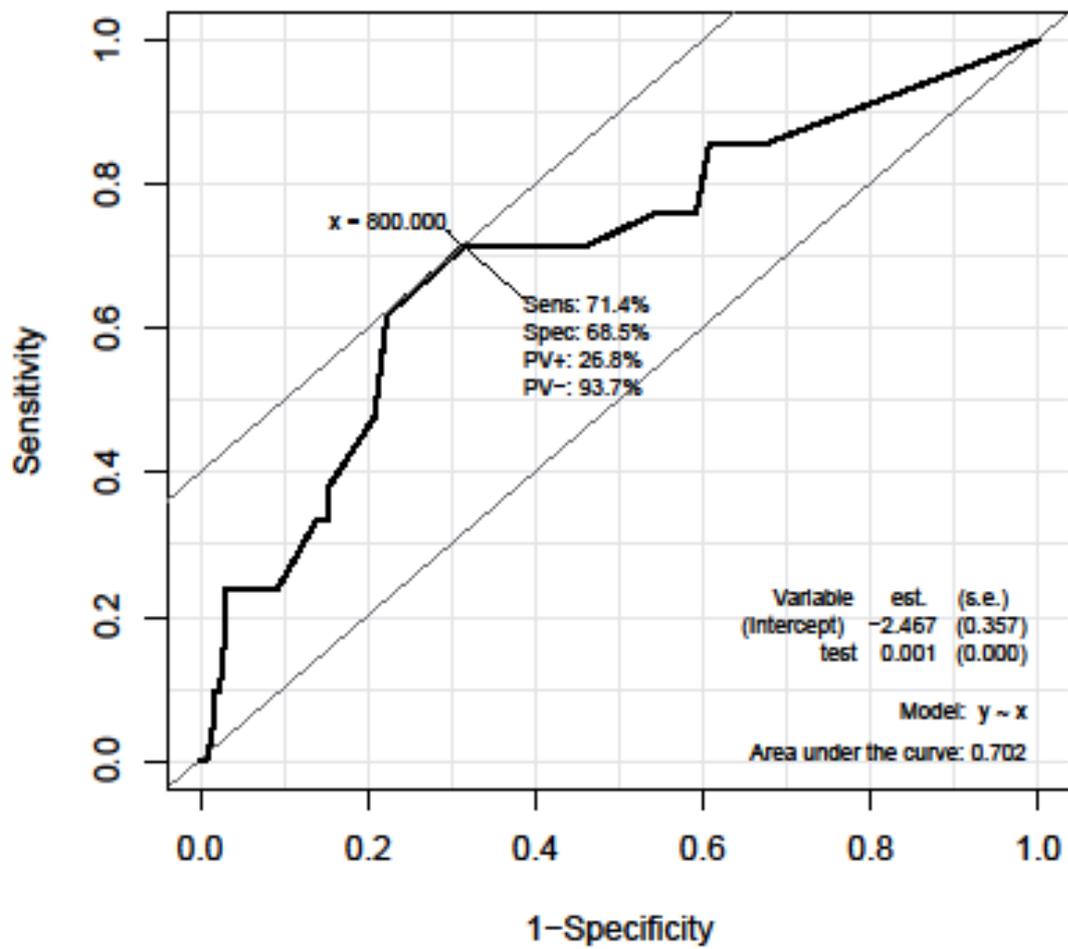


図 12 ROC 曲線による同時性重複癌と飲酒量のカットオフ値の検討

表 12 ロジスティック回帰分析による異時性重複癌のリスク因子

変数	オッズ比	95% 信頼区間	<i>p</i> 値
ISH-HPV 陽性	0.206	0.0600-0.727	0.001
cN	0.6161	0.400-0.948	0.028

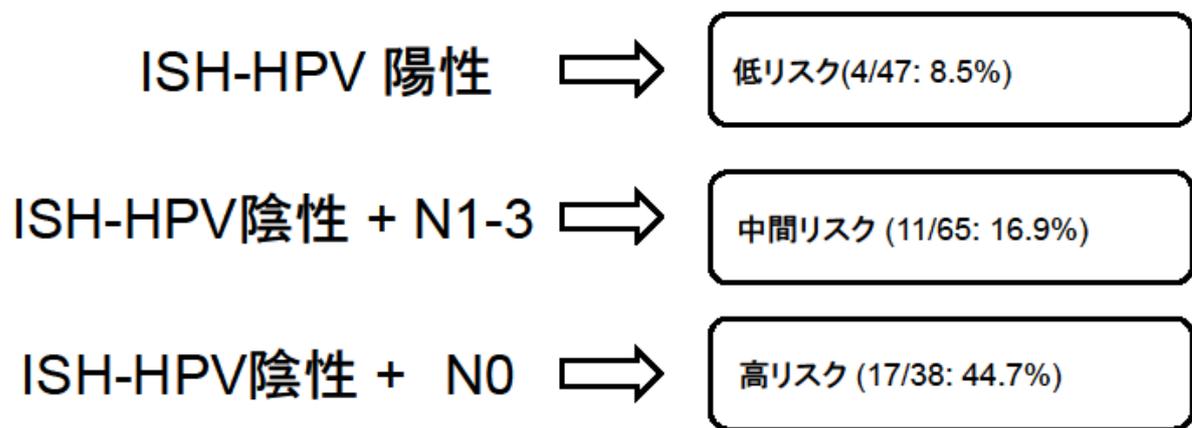


図 13 再帰分割分析による異時性重複癌のリスク分類

## VI 考察

本論文では当院での中咽頭癌症例の HPV 関連因子を網羅的に 13 年にわたって検索し、欧米と同様に HPV 陽性中咽頭癌の頻度が増加していること、HPV 陽性中咽頭癌の予後がよいこと、HPV の検索方法として p16 の免疫染色が臨床上きわめて有用であること、飲酒歴が中咽頭癌の予後リスクや重複癌リスクとなることを明らかにした。また、p16 陽性症例のうち、HPV 陰性症例が一定の確率で存在しているが、p16 陽性、HPV 陰性症例は p16 陰性例と比較して臨床的な予後は良好であり、一般臨床において p16 陽性症例による予後リスクの層別化は妥当な選択枝であることも示した。

現在、中咽頭扁平上皮癌において HPV 因子は最も強力なバイオマーカーとして認識されている(36)。ただし HPV 因子の有無によって治療選択までは行われておらず、中咽頭癌の予後を規定するバイオマーカーと考えられている。また、HPV 因子として何を検索するのかについては明確な基準はなく報告によって様々である。現在欧米で行われている中咽頭扁平上皮癌に対する前向き多施設臨床研究では CDDP 併用放射線療法と cetuximab 併用放射線療法をランダム化している RTOG1016 試験、経口切除後の術後放射線療法をランダム化している ECOG 3301、経口切除と CDDP 併用放射線療法をランダム化している ECOG 3311 が知られているが、いずれも HPV 因子は p16 の免疫染色で代用しており、実臨床では簡便な検索方法である p16 の免疫染

色で層別化していく報告が多い。

p16 免疫染色の陽性を定めるカットオフ値は定まっていなかったが、El-Naggar らは (37) 1) 腫瘍細胞のほとんどを強く p16 に染色している症例で、2) 低分化扁平上皮癌に限り、p16 免疫染色のみで HPV 因子の代用としてよく、p16 免疫染色が弱い症例、あるいは高分化扁平上皮癌では HPV 因子を検索することを推奨している。本論文では p16 陽性の条件は腫瘍細胞の 70%以上が染色される腫瘍を陽性と判定しており、および分化度についても高分化扁平上皮癌で陽性となる所見はまれであった。腫瘍細胞の細胞質が染色され、核が染まらない p16 陽性である腫瘍については予後が悪い (38)という報告もあるため、p16 免疫染色は簡便で臨床応用しやすいが、実際に臨床応用するにあたっては腫瘍細胞における陽性細胞の割合や核が染色されているか、という点については留意すべきと考えられた。

本邦における HPV 陽性中咽頭癌の頻度は Maruyama, Yasui ら(39)の 34.4%という報告や Hama ら(40)の 50.3%という報告がある。また他東アジアにおいては韓国からは 49.5%という報告(41)や、香港からは 29%という報告(42)が挙げられ、欧米での 70%近い頻度と比較して東アジアにおいては低い頻度が報告されている。HPV 陽性中咽頭癌のリスクとして性生活、とりわけオーラルセックスのパートナー数が知られている(7)。欧米とアジアでの性習慣の違いが HPV 陽性中咽頭癌の頻度の違いとして現れているこ

とは想像に難くないが、その一方でアフリカ系アメリカ人は HPV 陽性中咽頭癌の頻度が少ないとも報告(43)されている。本論文では HPV 陽性中咽頭癌の頻度が経時的に増加傾向にあることから、本邦でも HPV 陽性中咽頭癌の頻度が増加していると示唆され、HPV 陽性中咽頭癌の頻度の人種差が与える影響や、本邦において HPV 陽性中咽頭癌がどこまで増加するかも今後検討していきたい。

多変量解析によって、予後に対して p16 免疫染色と飲酒量が独立した予後因子であり、TNM Stage 分類を凌駕していた。また、同時性重複癌に対して飲酒歴が、異時性重複癌に対して HPV 陰性因子と N0 因子がそれぞれ独立したリスクであった。予後因子に飲酒歴が含まれることは欧米からの報告では非常に少なく(44)、喫煙歴による層別化がゴールドスタンダードとなっている(26)。飲酒と喫煙は同時にリスクファクターとなりやすいものであるが、頭頸部癌のリスクとして両者を区別した報告(45)によると、喫煙は用量依存的に頭頸部癌のリスクとなりうるのに対して飲酒は大量飲酒 (drink-year > 50) で初めて頭頸部癌のリスクとなり、その亜部位として中咽頭、および下咽頭癌に限られるとされている。ただしこの報告には日本をはじめ東アジア人は対象になっていない。東アジア人特有の ALDH2 遺伝子多形は咽頭癌、食道癌の強いリスクとなることは広く知られており(4, 46)、本論文においても飲酒は喫煙よりも予後および重複癌に強い影響を与えたことから、欧米での知見そのものをあてはめるのではなく、人種差を踏まえて日本人でのエビデンスを今後発信していく必要性を認識させられた。

中咽頭癌における重複癌リスクは同時性重複癌では大量飲酒歴、異時性重複癌では HPV 陰性と N0 症例であり、重複癌で多いのは食道癌と胃癌であった。本邦においては内視鏡の技術革新が目覚ましく、悪性腫瘍であっても早期発見であれば食道、胃においては内視鏡的治療が可能である。また、中下咽頭においても早期癌であれば Endoscopic Mucosal Resection (ESD)、Endoscopic Laryngo-pharyngeal Surgery (ELPS)、Transoral Video-assisted surgery (TOVS) 等に代表される、内視鏡的切除術が可能となっている。今回同定された HPV 陰性中咽頭癌、N0 中咽頭癌等の高リスク症例は中咽頭癌の治療後もより積極的に上部消化管内視鏡を中心とした重複癌スクリーニングを行うべきと考えられた。

異時性重複癌におけるリスクとして HPV 因子がもっとも強い因子として挙げられたことは、Field Cancerization によって生じる HPV 陰性中咽頭癌と HPV 感染によって生じる HPV 陽性中咽頭癌は重複癌の発生リスクにおいても振る舞いがまったく異なることを示した。それよりも弱い因子として、N0 因子が重複癌のリスクとなった。この理由として以下の 2 点が考えられる。第一に、本稿では重複癌の検討においては HPV 因子として ISH-HPV を用いていたが、HPV の検索法として ISH-HPV は高い特異度に比較して感度が低い検査であるため、いくつかの HPV 陽性中咽頭癌は本検討で陰性となっている可能性がある。したがってリンパ節転移を来しやすい HPV 陽性中咽頭癌が ISH-HPV 陰性中咽頭癌の中に含まれてしまい、この場合 N0 中咽頭癌が HPV 陰性中

咽頭癌の代理マーカーとなった可能性がある。第二に、N0 中咽頭癌とN+中咽頭癌のうち、N0 中咽頭癌の方に表在性の癌がより多く入っていた可能性がある。中下咽頭の表在癌の報告は内視鏡の技術が進んだ本邦で特に報告が多い(47)が、表在癌の多くはN0 であり、また多発することも多い。このためN0 中咽頭癌に多く重複癌が生じていたと考えられる。表在癌症例のほとんどは飲酒者であり、また ALDH2 遺伝子多形は咽喉頭表在癌と食道癌の重複癌のリスクとなるという報告(48)もあり、中咽頭癌症例における ALDH2 遺伝子多形の検索は今後頭頸部癌の重複癌リスクにおける検討課題と考えられた。

HPV 陽性中咽頭癌の予後がよい決定的な原因は明らかではないが、近年、分子生物学的な報告が非常に多い。頭頸部癌において TP53 の disruptive mutation が生じている症例は生じていない症例と比較して予後が悪いという報告(49)があるが、HPV 陽性中咽頭癌のほとんどに TP53 の遺伝子変異が生じていない(50) (51)ことから、HPV 陽性中咽頭癌の予後がよい原因の一つとして TP53 の遺伝子変異が生じていないことが考えられている。その一方で HPV 陽性中咽頭癌はこれまでの頭頸部扁平上皮癌と異なり、PIK3CA 系の driver 変異を伴うことが多い(52)ことも報告され、今後、PIK3CA 経路をターゲットとした分子標的薬の開発も行われる可能性がある。

臨床的な観点からは、HPV 陽性中咽頭癌は原発巣、および頸部リンパ節の局所制

御の良さが目立つ。頭頸部癌の治療開発として、これまでは局所制御を向上させることを目的に、非手術治療では過分割照射や化学放射線療法、手術療法では拡大切除が図られ、局所制御は向上してきた。しかしながら、その一方で化学放射線療法の晩期有害事象が生じ、長期予後は必ずしもよくないことも報告されるようになってきており(53)、現時点の治療において HPV 陽性中咽頭癌の局所制御がすでに良好であることを考えると、HPV 陽性中咽頭癌に対しては晩期有害事象を避けるために局所に対する治療方針の強度を下げる、すなわち化学放射線療法を回避して放射線治療単独とする、不必要な拡大切除を避ける、等の治療方針が有効であると考えられる。また、HPV 陰性中咽頭癌と比較すると、HPV 陽性中咽頭癌の遠隔転移率は有意差がない(26)と考えられている。また遠隔転移の場所も HPV 陰性中咽頭癌と比較して脳をはじめとして多彩な場所に転移し、遠隔転移が生じてからの予後についても長期予後が期待できる、という報告(54)もある。したがって今後 HPV 陽性中咽頭癌の治療戦略を考えていくにあたり、遠隔転移高リスク群を選定していく方向性が考えられている。現在のところ遠隔転移高リスク群と想定されているのは癒合した大きい頸部転移リンパ節が生じている群(55)や健側頸部リンパ節転移例(56)が考えられている。頭頸部癌治療戦略のうち、局所制御には寄与しないものの、遠隔転移率を減少させる治療方法として、導入化学療法(57)があげられる。現在当科では HPV 陽性中咽頭癌に対して導入化学療法後、腫瘍の縮小程度にあわせて経口的腫瘍切除あるいは単純放射線療法による

治療を行っているが、良好な局所制御と遠隔転移の予防を行いうる治療として、今後の症例集積が待たれる。

## VII 謝辞

本研究は筆者が東京大学医学部付属病院耳鼻咽喉科で臨床の傍らに行った研究成果をまとめたものである。

東京大学医学部付属病院耳鼻咽喉科教授 山唄 達也先生、准教授 朝蔭 孝宏先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、この遂行にあたって終始ご指導を頂いた。ここに深謝の意を表す。東京大学医学部付属病院人体病理部の深山正久先生、牛久哲男先生には免疫染色、In situ hybridization の方法、解釈法につき大変貴重なご指導を頂いた。東京大学医学部付属病院 耳鼻咽喉科の蝦原康宏先生、吉田昌史先生、坂本幸士先生、安藤瑞生先生、小村豪先生、小林謙也先生には研究遂行にあたり日々適切な助言、ご指導を頂いた。パラフィン包埋標本の切り出し、プレパラート準備に当たっては東京大学耳鼻咽喉科学教室の露崎敦子様、In situ hybridization の実験手法については東京大学医学部付属病院人体病理部の佐久間慶様に丁寧なご指導を頂いた。他、多数の協力者があって初めてこの研究成果を得られたものとする。ここに感謝の意を表す。

帰宅が遅くなることも多い中、温かく見守ってくれた家族(三津代、祐太郎、広毅)に心から感謝申し上げます。

## VIII 引用文献

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(14):2137-50.
2. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*. 2009;21(3):194-200.
3. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Human genetics*. 1992;88(3):344-6.
4. Asakage T, Yokoyama A, Haneda T, Yamazaki M, Muto M, Yokoyama T, Kato H, Igaki H, Tsujinaka T, Kumagai Y, Yokoyama M, Omori T, Watanabe H. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(4):865-74.
5. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963-8.
6. Teshima T, Inoue T, Chatani M, Hata K, Hiyama T, Ikeda H, Murayama S. Incidence of other primary cancers in 1,569 patients with pharyngolaryngeal cancer and treated with radiation therapy. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft* 1992;168(4):213-8.
7. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;356(19):1944-56.
8. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M, Liu FF. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6213-21.
9. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(32):4294-301.
10. Scudellari M. HPV: Sex, cancer and a virus. *Nature*. 2013;503(7476):330-2.
11. Jain KS, Sikora AG, Baxi SS, Morris LG. Synchronous cancers in patients with head and

neck cancer: risks in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Cancer*. 2013;119(10):1832-7.

12. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(12):3812-5.

13. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(12):958-64.

14. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer surveys*. 1992;12:197-217.

15. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer*. 2007;121(3):621-32.

16. Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *The Laryngoscope*. 2008;118(7):1236-47.

17. Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2009;7(5):453-66.

18. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(1):11-22.

19. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5694-9.

20. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, Lee MJ, Kim JM, Choi EC, Cho NH. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *International journal of cancer*. 2007;120(7):1418-25.

21. Lizard G, Demares-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. *Diagnostic cytopathology*. 2001;24(2):112-6.

22. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *International journal of cancer*. 2007;121(11):2465-72.

23. Cohen MA, Basha SR, Reichenbach DK, Robertson E, Sewell DA. Increased viral load

correlates with improved survival in HPV-16-associated tonsil carcinoma patients. *Acta oto-laryngologica*. 2008;128(5):583-9.

24. Liang C, Marsit CJ, McClean MD, Nelson HH, Christensen BC, Haddad RI, Clark JR, Wein RO, Grillone GA, Houseman EA, Halec G, Waterboer T, Pawlita M, Krane JF, Kelsey KT. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2012;72(19):5004-13.

25. Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G, Benner A, Pawlita M, Bosch FX. Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer research*. 2012;72(19):4993-5003.

26. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363(1):24-35.

27. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 2002;109(3):335-46.

28. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, Ramon y Cajal S. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30(18):2087-97.

29. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):57-81.

30. Goldenberg D, Begum S, Westra WH, Khan Z, Sciubba J, Pai SI, Califano JA, Tufano RP, Koch WM. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head & Neck*. 2008;30(7):898-903.

31. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International journal of cancer*. 2001;92(2):276-84.

32. Sawicka M, Pawlikowski J, Wilson S, Ferdinando D, Wu H, Adams PD, Gunn DA, Parish W. The specificity and patterns of staining in human cells and tissues of p16INK4a antibodies demonstrate variant antigen binding. *PloS one*. 2013;8(1):e53313.

33. Montag M, Blankenstein TJ, Shabani N, Bruning A, Mylonas I. Evaluation of two commercialised in situ hybridisation assays for detecting HPV-DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2011;284(4):999-1005.

34. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma:

sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(19):6262-71.

35. Weichert KA, Schumrick D. Multiple malignancies in patients with primary carcinomas of the head and neck. *The Laryngoscope*. 1979;89(6 Pt 1):988-91.

36. Rainsbury JW, Ahmed W, Williams HK, Roberts S, Paleri V, Mehanna H. Prognostic biomarkers of survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Head & Neck*. 2013;35(7):1048-55.

37. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head & neck*. 2012;34(4):459-61.

38. Zhao N, Ang MK, Yin XY, Patel MR, Fritchie K, Thorne L, Muldrew KL, Hayward MC, Sun W, Wilkerson MD, Chera BS, Hackman T, Zanation AM, Grilley-Olson JE, Couch ME, Shockley WW, Weissler MC, Shores CG, Funkhouser WK, Olshan AF, Hayes DN. Different cellular p16(INK4a) localisation may signal different survival outcomes in head and neck cancer. *British journal of cancer*. 2012;107(3):482-90.

39. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, Todo T, Hongyo T, Inohara H. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer science*. 2014;105(4):409-17.

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

41. Park WS, Ryu J, Cho KH, Choi MK, Moon SH, Yun T, Chun BS, Lee GK, Ahn HJ, Lee JH, Vermeer P, Jung YS. Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas in Korea: use of G1 cycle markers as new prognosticators. *Head & Neck*. 2012;34(10):1408-17.

42. Li W, Tran N, Lee SC, O'Brien CJ, Tse GM, Scolyer RA, Hong A, Milross C, Yu KH, Rose BR. New evidence for geographic variation in the role of human papillomavirus in tonsillar carcinogenesis. *Pathology*. 2007;39(2):217-22.

43. Worsham MJ, Stephen JK, Chen KM, Mahan M, Schweitzer V, Havard S, Divine G. Improved survival with HPV among African Americans with oropharyngeal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(9):2486-92.

44. Broglie MA, Soltermann A, Rohrbach D, Haile SR, Pawlita M, Studer G, Huber GF, Moch H, Stoeckli SJ. Impact of p16, p53, smoking, and alcohol on survival in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with primary intensity-modulated

chemoradiation. *Head & Neck*. 2013;35(12):1698-706.

45. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(10):777-89.

46. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Makuuchi H, Higuchi S, Matsushita S, Yoshino K, Maruyama K, Nakano M, Ishii H. Multiple primary esophageal and concurrent upper aerodigestive tract cancer and the aldehyde dehydrogenase-2 genotype of Japanese alcoholics. *Cancer*. 1996;77(10):1986-90.

47. Muto M, Minashi K, Yano T, Saito Y, Oda I, Nonaka S, Omori T, Sugiura H, Goda K, Kaise M, Inoue H, Ishikawa H, Ochiai A, Shimoda T, Watanabe H, Tajiri H, Saito D. Early detection of superficial squamous cell carcinoma in the head and neck region and esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(9):1566-72.

48. Katada C, Muto M, Nakayama M, Tanabe S, Higuchi K, Sasaki T, Azuma M, Ishido K, Katada N, Yamashita K, Nemoto M, Shibata T, Masaki T, Okamoto M, Koizumi W. Risk of superficial squamous cell carcinoma developing in the head and neck region in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2012;122(6):1291-6.

49. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. 2007;357(25):2552-61.

50. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortés ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareño C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011;333(6046):1157-60.

51. Lechner M, Frampton GM, Fenton T, Feber A, Palmer G, Jay A, Pillay N, Forster M, Cronin MT, Lipson D, Miller VA, Brennan TA, Henderson S, Vaz F, O'Flynn P, Kalavrezos N, Yelensky R, Beck S, Stephens PJ, Boshoff C. Targeted next-generation sequencing of head

and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV-tumors. *Genome medicine*. 2013;5(5):49.

52. Nichols AC, Palma DA, Chow W, Tan S, Rajakumar C, Rizzo G, Fung K, Kwan K, Wehrli B, Winquist E, Koropatnick J, Mymryk JS, Yoo J, Barrett JW. High frequency of activating PIK3CA mutations in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*. 2013;139(6):617-22.

53. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Thorstad W, Wagner H, Ensley JF, Cooper JS. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(7):845-52.

54. Huang SH, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Hope A, Massey C, Waldron JN, Kim J, Bayley AJ, Cummings B, Cho BC, Ringash J, Dawson LA, Siu LL, Chen E, Irish J, Gullane P, Hui A, Liu FF, Shen X, Xu W, O'Sullivan B. Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV-related oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2013;49(1):79-85.

55. Spector ME, Gallagher KK, Light E, Ibrahim M, Chanowski EJ, Moyer JS, Prince ME, Wolf GT, Bradford CR, Cordell K, McHugh JB, Carey T, Worden FP, Eisbruch A, Chepeha DB; University of Michigan Head Neck Specialized Program of Research Excellence (SPORE) Program. Matted nodes: poor prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV and EGFR status. *Head & Neck*. 2012;34(12):1727-33.

56. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Kim J, Ringash J, Bayley A, Dawson LA, Hope A, Cho J, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Hui A, Liu FF, Chen E, Xu W. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(5):543-50.

57. Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J; MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2009;92(1):4-14.