

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17015037

研究課題名（和文）：アジア太平洋地域におけるHPV関連がんなどの比較疫学研究

研究課題名（英文）：Epidemiological study of HPV-related cancers in Asia-Pacific region

研究代表者

秋葉 澄伯 (AKIBA SUMINORI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50145554

研究成果の概要（和文）：

近年、食道や肺など、子宮頸部以外の臓器のがんにおいても HPV ゲノムの検出が報告されており、これらのがんにおける HPV の役割が注目されている。本研究では、HPV を中心としたウイルス関連がん・非関連がんの疫学的、臨床病理学的、ウイルス学的、分子生物学的な比較・検討を行って、放射線を含むさまざまな環境要因、生活習慣、ウイルス、遺伝子的背景の相互作用が発癌に与える影響に関する知見を得ようとするものである。

食道がん、肺がん、乳がんにおける HPV の検出率には地域や組織型による頻度の差があったものの、いずれの臓器においても 10-30%前後の症例で HPV ゲノムが検出され、そのほとんどが高リスク型の HPV16 であった。また、ほとんどの HPV16 陽性症例において HPV ゲノムが宿主 DNA に組み込まれていることが確認されたが、ウイルスのコピー数は極めて少なく、細胞あたり 0.1 前後であった。これらの結果から、食道、肺、乳腺の発がん過程における HPV の役割は子宮頸がんとは異なる可能性がある。

一方我々は、gefitinib 治療への反応が良い肺腺がん症例において HPV 陽性率が非常に高いことや、自然放射線の高い地域では高リスク型 HPV の検出率や細胞あたりの HPV コピー数が高いという結果も得ており、宿主要因や他の環境要因との相互作用の解明が今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：

Detection of human papillomavirus (HPV), a widely-accepted risk factor of cervical cancer, has been reported in other types of carcinomas including cancers of the esophagus and the lung. To clarify the effects of interactions among environmental factors including radiation exposure and lifestyles, viral factors, and genetic factors on carcinogenesis, this study examine epidemiological, clinic-pathological, viral, and molecular biological features of virus (mainly HPV)-related cancers in comparison with those of non-virus-related cancers.

HPV genome was detected in 10-30% of carcinomas of the esophagus, the lung, and the breast, and its detection rate varied by regions and histological type of tumors. The most frequent genotype was high-risk type of HPV-16 in all sites of tumors. Although real-time PCR analysis indicated the presence of integrated-form of viral DNA in most of HPV-16-positive specimens, the estimated viral load was significantly lower (around 0.1 copy per cell) than that of cervical cancers. These results suggested that the role of HPV in carcinogenesis differ between these organs and cervix.

On the other hand, we observed the high frequency of HPV-positive cases among gefitinib-responsive lung adenocarcinomas, and the high frequency of high-risk types of HPV and high viral load in cancers in a high background radiation area. Further investigations are warranted to examine HPV interactions with genetic and other environmental factors.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	10,800,000	0	10,800,000
2006年度	10,900,000	0	10,900,000
2007年度	10,900,000	0	10,900,000
2008年度	9,800,000	0	9,800,000
2009年度	9,800,000	0	9,800,000
総計	52,200,000	0	52,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：疫学、癌、ウイルス、環境要因、遺伝的背景

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトパピローマウイルス (HPV) は、これまで以上に悪性腫瘍発生に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。特に女性の子宮頸部がんの殆どで HPV が病因論的な役割を果たすと考えられている一方、いまだアジア・太平洋地域の多くの地域では十分な検討が行われてはいない。また、世界各国で子宮頸部癌死亡率が減少している中、アジア・太平洋地域の一部では未だ高い子宮頸部がんリスクが報告されており、その原因の解明が待たれている。

子宮頸部がんのリスク要因として喫煙が重要な役割を果たすことは以前より知られており、HPV との相互作用を明らかにする必要がある。他の環境要因については、インドの高自然放射線地域での調査結果の予備的検討で子宮頸部がんが増加している可能性が示されており、これは動物実験で放射線曝露による DNA 損傷の修復過程 (p53 依存性の修復機序など) が HPV の腫瘍蛋白により修飾されるとの報告と相俟って、HPV の腫瘍蛋白と放射線との相乗作用の可能性を示唆するものである。しかし、原爆被爆者では子宮頸部がんの増加は明確になっておらず、さらに検討が必要である。

また近年、子宮頸部がん以外にも、陰茎がん、口腔・咽頭がん、喉頭がんの発生においても HPV は重要な役割を果たすことが明らかになり、最近では食道癌、肺がんとの関連も疑われている。食道がんの特徴の一つは他のがんに比べても罹患率が地域により大きく異なることである。これまで、その原因として喫煙・飲酒、食習慣が考えられてきたが、最

近、食道がん罹患率の高い地域において HPV との関連が強いことが指摘されており、これが事実とすると生活習慣と HPV との相乗作用を検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、自然放射線の高い地域を含む幾つかの地域で、HPV を中心としたウイルス関連がん・非関連がんの疫学的、臨床病理学的、ウイルス学的、分子生物学的な比較・検討を行って、放射線を含むさまざまな環境要因、生活習慣、ウイルス、遺伝子の背景の相互作用が発癌に与える影響に関する知見を得ようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### HPV

#### 1) 対象地域・集団

インドでは、すでに 40 万人のコホートを対象にした面接調査が共同研究者により実施されており、対象地域では腫瘍登録も行われているので、これらの地域を対象とした。この中には、高自然放射線地域に居住する住民も含まれている。

また、中国 (中国北部陝西省またはその近接地域、南部の広東省)、イラン北部の対象地域は高自然放射線地域であるが、同時に近接する食道がん高リスク地域を含んでいることより、対象とした。

その他に、日本、パキスタン、南米チリなどの国のがん症例も対象とした。

#### 2) HPV の検索・タイピング等

パラフィン包埋標本のがん組織（子宮頸がん、食道がん、口腔がん、肺がん、乳がん）から抽出したDNA検体を用いて、PCR法にてHPVゲノムの検索を行った。HPV陽性例については、INNO-LiPA HPV Genotyping キット（Innogenetics社、ベルギー）および型特異的プライマーを用いて、HPVの型の判定を行った。

さらにHPV-16陽性例においては、リアルタイムPCR法により、HPVのコピー数を定量した。HPVゲノムが宿主ゲノムに組み込まれる際にE2遺伝子が失われることが多いことを利用し、HPV16-E2とE6のコピー数の比を求めることによりHPVゲノムが宿主ゲノムに組み込まれているか否かを検討した。

HPV16-E6領域の塩基配列解析を行い、HPV16 variantの地理的・臓器別分布を解析した。

### 3) がん関連蛋白の解析

免疫組織化学染色法により、p53、p16、pRb などのがん関連蛋白の発現を調べた。

### 4) 生活習慣など、その他の環境要因の調査

インドの対象者については、すでにコホート研究で生活習慣等は把握されている。

中国とパキスタンで上部消化管がんを中心とした患者・対照研究を行い、質問票を用いた生活習慣などの調査を行った。

### 5) 臨床予後など

日本の肺がん、乳がんについては、がんの進行度や治療経過など予後に関する情報を医療記録などから得て、HPV陽性例と陰性例との比較を行った。

## Epstein-Barr Virus (EBV)

### 1) EBV 関連胃がんから検出される EBV 多型の検討

南米チリとコロンビアのEBV関連胃がん症例を対象とし、がん組織から検出されたEBVの多型(EBNA3、BamHI-W1、BamHI-F、XhoI restriction site)をPCR-RFLP法または型特異的プライマーを用いて解析した。また、チリとコロンビアの健常人からうがい液を採取し、うがい液から検出されたEBVについても同様の検討を行い、EBV多型分布を胃がん症例の分布と比較した。

さらにLMP-2A領域を中心とした塩基配列解析を行った。

### 2) EBV 関連胃がんにおける表現型の検討

日本、南米コロンビアの胃がん病理標本組織を用いて、ムチン(MUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6、Cdx2)などの発現を免疫組織化学染色法を用いて調べ、表現型(胃型、腸型、null型)の判定を行った。EBV関連胃がんとはEBV非関連胃がんにおけるphenotypeの分布を比較検討した。

## 4. 研究成果

### 高自然放射線地域における HPV 陽性例の頻度

インドの高自然放射線地域から収集した口腔、食道、子宮頸部のがん組織と対照地域から得られた口腔、食道、子宮頸部のがん組織を用いて HPV 検出率および HPV genotype の比較を行ったところ、上部消化管がんの高リスク型 HPV の検出率および子宮頸がんにおける細胞辺りの HPV コピー数とも高自然放射線地域で高いという結果が得られた。また、基礎的な調査として生活習慣や環境放射線とがんとの関連を検討し、環境放射線とがん、男性のBidi喫煙と肺がん(Jayalekshmi et al. 2008)、女性の噛みタバコと口腔癌の関連(Jayalekshmi et al. 2009)の定量的評価を行った。

### 食道がん

中国、日本、パキスタンおよび南米チリとコロンビアの食道扁平上皮がん症例を対象に検討したところ、同一の方法を用いても HPV 検出率は地域により大きく異なることが示された。食道癌リスクの高い中国・甘粛省では半数以上の症例から高リスクの HPV を検出した(Shuyama et al. 2007)が、リスクの低い山東省(中国)や日本(鹿児島)では6-15%と HPV 頻度は低かった。また、南米のチリ、コロンビアの食道癌でも比較的高頻度(13-19%)に検出された(Castillo et al. 2006)。

HPV16 が最も多く検出されたタイプであり、殆どの HPV16 陽性例において、HPV が細胞 DNA に組み込まれていることを示す結果を得たが、細胞当たりの HPV コピー数は平均 0.1 程度で、子宮頸がんを観察されるコピー数(100-1000)と比べると著しく少なかった。

南米の食道がんとは子宮頸がんから検出された HPV16-E6 の塩基配列を比較したが、子宮頸がんは European lineage、食道がんは Asia American variant であり、食道癌から検出された HPV16 は性器由来でない可能性が示唆された。

HPV16 陽性の食道癌では、p16 の陽性率が高い傾向が認められたものの、p53 や pRb の発現との関連は認められなかった。

### 口腔がん

日本、パキスタン、コロンビアの口腔がん症例について検討したところ、いずれの地域でも HPV 陽性率は 40-60%と高く、有意な地域差は認められなかった。

殆どの HPV 陽性例において HPV16 が検出された。コピー数は扁桃がんでは細胞あたり 17.8 と比較的高いコピー数であったが、その他の部位の口腔がんでは 0.1 前後であった。

HPV ゲノムの有無と p53, p16 および pRb 発現との関連は認められなかった。

### 肺がん

日本、南米チリの肺がん症例を中心に検討を行った。チリの肺癌では、腺癌(3%)よりも扁平上皮癌(43%)に多く高リスク型の HPV が検出され (Aguayo et al. 2007)、一方日本では、腺癌における高リスク型 HPV 検出頻度は 30%、扁平上皮癌では 7%と、組織型別の頻度が異なっていた (Baba et al. 2010)。

最も多く検出された型は HPV16 であり、殆どの HPV16 陽性例でウイルスゲノムが細胞 DNA に組み込まれていることが示されたが、食道がん同様に HPV のコピー数は非常に少なかった。HPV16 陽性の肺腺がんでは、子宮頸がん報告されている結果と同様、p16 陽性率が高かった。

興味深いことに日本の症例においては、gefitinib 治療への反応が良い症例の HPV 陽性率が 75%と非常に高いのに対し、治療反応が悪い症例において HPV 陽性例は確認されなかった (Baba et al. 2010)。

### 乳がん

日本、パキスタン、メキシコ、南米チリの乳がん症例について検討を行ったところ、HPV 検出率に地域差を認めた。パキスタンが 28%と最も高く、チリが 9%で最も低かった。またメキシコも 13%と低い傾向であった。

一方、細胞当たりのコピー数は、チリやメキシコの症例においてやや高い傾向を認めたが、それでも平均 0.6 程度であった。

日本の乳がん症例においては、erbB2 やホルモン受容体の発現、がんの大きさや進行度、出産歴等との関連を検討したが、有意な関連は認めなかった (Khan et al. 2008)。

また国際がん研究機関との共同研究で、母乳または初乳中の HPV ゲノムの検索を行ったが、高リスク型 HPV は検出されなかった (Cazzaniga et al. 2009)。

### EBV 関連胃がん

南米チリとコロンビアを対象とした解析結果では、EBV 関連胃がん組織と健常人うがい液から検出される EBV の多型に明確な違いを認め、胃がん症例では BamHI-W1 領域が type i で、Xho-I+の多型が有意に多いことを明らかとした (Corvalan et al. 2006)。

また、EBV 関連胃癌の表現型は殆どが、null 型 (胃型・腸型のいずれでもない) か、胃型であった (Hirano et al. 2007)。

### 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 20 件)

1. Koriyama C, Akiba S, Shimaoka S, Itoh T, Akiyama S, Eizuru Y. Frequent expression of thymidine phosphorylase in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma of diffuse-type. *Anticancer Research*, 2010 (in press). 査読有
2. Baba M, Castillo A, Koriyama C, Yanagi M, Matsumoto H, Natsugoe S, Shuyama KY, Khan N, Higashi M, Itoh T, Eizuru Y, Aikou T, Akiba S. Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. *Oncology Reports*, 23(4): 1085-1092, 2010. 査読有
3. Cazzaniga M, Gheit T, Casadio C, Khan N, Macis D, Valenti F, Miller MJ, Sylla BS, Akiba S, Bonanni B, Decensi A, Veronesi U, Tommasino M. Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 114(3):599-605, 2009.. 査読有
4. Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Science.* 99(2): 195-201, 2008. 査読有
5. Khan NA, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, Higashi M, Sagara Y, Yoshinaka H, Tsuji T, Natsugoe S, Douchi T, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *British Journal of Cancer* 99(3): 408-414, 2008. 査読有
6. Abdirad A, Ghaderi-Sohi S, Shuyama K, Koriyama C, Nadimi-Barforoosh H, Emami S, Mosavi-Jarrahi A, Nahvijou A, Akiba S. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: a report from Iran in the last four decades. *Diagn Pathol* 2007 Jul 15; 2(1):25. 査読有
7. Koriyama C, Akiba S, Itoh T, Sueyoshi K, Minakami Y, Corvalan A, Yonezawa S, Eizuru Y. E-cadherin and beta-catenin

- expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and their prognostic significance. *World J Gastroenterol.* 13(29), 3925-31, 2007. 査読有
8. Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer.* 97(1), 85-91, 2007. 査読有
  9. Shuyama K, Castillo A, Aguayo F, Sun Q, Khan N, Koriyama C, Akiba S. Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in China. *Br J Cancer.* 96 (10), 1554-1559, 2007. 査読有
  10. Hirano N, Tsukamoto T, Mizoshita T, Koriyama C, Akiba S, Campos F, Carrasquilla G, Carrascal E, Cao X, Toyoda T, Ban H, Miki K, Tatematsu M. Down regulation of gastric and intestinal phenotypic expression in Epstein-Barr virus-associated stomach cancers. *Histol Histopathol.* 22 (6), 641-649, 2007. 査読有
  11. Cabrera ME, Eizuru Y, Itoh T, Koriyama C, Tashiro Y, Ding S, Rey S, Akiba S, Coravalan A. Nasal natural killer/T-cell lymphoma and its association with type "I"/Xhol loss strain Epstein-Barr virus in Chile. *J Clin Pathol.* 60 (6), 656-660, 2007. 査読有
  12. . Campos FI, Koriyama C, Akiba S, Carrasquilla G, Serra M, Carrascal E, Itoh T, Minakami Y, Eizuru Y. Environmental factors related to gastric cancer associated with Epstein-Barr virus in Colombia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 7 (4), 633-637, 2006. 査読有
  13. Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Torres M, Carrascal E, Corvalan A, Roblero JP, Naquira C, Palma M, Backhouse C, Argandona J, Itoh T, Shuyama K, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in Colombia and Chile. *World J Gastroenterol.* 12 (38), 6188-6192, 2006. 査読有
  14. Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera-Goepfert R, Carrascal E, Klinge G, Sanchez J, Eizuru Y. Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncology Reports.* 15(4), 883-888, 2006. 査読有
  15. Corvalan A, Ding S, Koriyama C, Carrascal E, Carrasquilla G, Backhouse C, Urzua L, Argandona J, Palma M, Eizuru Y, Akiba S. Association of a distinctive strain of Epstein-Barr virus with gastric cancer. *Int. J. Cancer.* 118(7), 1736-1742, 2006. 査読有
- 他 5 件 (いずれも査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
1. Koriyama C, Baba M, Castillo A, Yanagi M, Matsumoto H, Eizuru Y, Akiba S, et al. Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 1-3, 2009.
  2. Aguayo F, Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, et al. Human papillomavirus-16 (HPV-16) detected in squamous cell lung cancer. AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research. Washington DC, US, November 16-19, 2008.
  3. Khan N, Koriyama C, Akiba S, et al. Identification of humanpapillomavirus DNA sequences in female breast carcinomas in Japan. NCRI Cancer Conference, Birmingham, UK, October 5-8, 2008.
  4. Koriyama C, Akiba S, Higashi M, Campos F, Sueyoshi K, Yonezawa S, Eizuru Y. Clinico-pathological features and prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. The 8th International Conference of Anticancer Research, Kos, Greece, October 17-22, 2008.
  5. Khan N, Koriyama C, Castillo A, Shuyama K, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus DNA sequences in breast carcinomas in Japan and Pakistan. Second JCA-AACR Special Joint Conference, Hyogo, Japan, July 14-16, 2008
  6. 郡山千早、秋葉澄伯、Noureen Khan. 非生殖系臓器のがんにおけるヒトパピローマウイルスの役割、がん予防大会 (福岡 2008 年 5 月 22-23 日) .
  7. Akiba S, Castillo A, Khan N, Koriyama C. Human papillomavirus in high and low risk areas of esophageal squamous cell carcinoma in China. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 3-5, 2007.
  8. Castillo A, Koriyama C, Yanagi M, Eizuru T, Akiba S, et al. Human papillomavirus

type 16 variants in esophageal and lung cancer: an international study. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 3-5, 2007.

9. Koriyama C, Eizuru Y, Akiba S, et al. Gastric and intestinal mucin expressions in Epstein-Barr virus- associated gastric carcinoma. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 3-5, 2007.
10. Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, et al. Distribution of Epstein-Barr virus (EBV) strains in EBV-associated gastric cancers. 4<sup>th</sup> APOCP Regional Conference, Nagoya, Japan, January 20, 2006.

他 7 件

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

秋葉 澄伯 (AKIBA SUMINORI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 50145554

##### (2) 研究分担者

栄鶴 義人 (EIDURU YOSHITO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 00041351

杉原 一正 (SUGIHARA KAZUMASA)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 00117516

吉永 光裕 (YOSHINAGA MITSUHIRO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 00221672

北島 信一 (KITAJIMA SHINICHI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 30347116

郡山 千早 (KORIYAMA CHIHAYA)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号 : 30274814

柳 正和 (YANAGI MASAKAZU)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助

教

研究者番号 : 50347100

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

Castillo Andres, Noreen Khan, Karem Shuyama, Francisco Aguayo, Muhamad Anwar: Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Massimo Tommasino: International Agency for Research on Cancer, France