

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18712

研究課題名（和文）新規領域のPCRを用いた日本における発がん性ヒトパピローマウイルス感染の実態解明

研究課題名（英文）Elucidating the Reality of Oncogenic Human Papillomavirus Infections in Japan Using Novel PCR

研究代表者

坂本 人一（Sakamoto, Jinichi）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：00735350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：HPV陰性癌とHPV多重感染癌の実態調査のために、HPV陰性癌とされた16症例と多重型HPV感染癌の9症例をマクロダイセクションと発癌に必須な新規PCR法で解析を行った。その結果、すべての多重型感染の原因HPVを特定した。また、HPV陰性癌の約半数はHPVが陽性であった。結果の乖離を認めた症例ではE1、E2遺伝子が部分あるいは全欠失しており、これらの症例ではHPV-DNAが高頻度にインテグレーションしている可能性が示唆された。インテグレート型HPVはエピソーマル型と比べてDNAのコピー数が少ないことがわかっており、乖離の原因としてはHPV検出アッセイの検出感度が関係していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、HPV陰性とされたがんがHPV陽性であることを明らかにし、多重感染癌の中でも単一のHPVが癌化に寄与していることを示した。HPV偽陰性だった症例の多くは、HPVゲノムのインテグレーションが高率にみられたことは新たな知見であり、遺伝子の欠失とDNAのインテグレーションががんの進展と関係していることが示唆された。HPV単独検診や併用検診についての議論が日本でも出ているが、今後のスクリーニング法を議論するうえで、より検査感度の高いアッセイの開発が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：For the survey on the actual conditions of HPV-negative cancers and HPV multiple infected cancers, analysis was conducted on 16 cases of HPV-negative cancer and 9 cases of multiple HPV infected cancer using macrodissection and a newly developed PCR method. As a result, the causative HPV for all cases of multiple infections was identified. Additionally, approximately half of the HPV-negative cancers were found to be HPV-positive. In cases showing discrepancies in the results, partial or complete loss of E1 and E2 genes was observed, suggesting a high frequency of HPV-DNA integration in these cases. Integrated HPV is known to have fewer copies of DNA compared to episomal types, and it was considered that the detection sensitivity of the HPV detection assay may be related to the cause of discrepancies.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：HPV 子宮頸癌 PCR インテグレーション

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌はヒトパピローマウイルス(以下 HPV)の長期感染の結果、前がん病変を経て発症することがわかっている。しかしながら、癌の原因になる HPV 型は複数存在しており、国や地域によって癌の原因になりやすい HPV 型の分布は異なる。現在、HPV ワクチンと子宮頸がん検診によって多くの子宮頸癌が予防できると考えられている。前述のとおり、子宮頸癌の原因となるハイリスク型 HPV の分布は国によって異なるため、日本における HPV ワクチンの効果や HPV スクリーニングテストの効果を調べる必要があった。どの HPV 型をワクチンや HPV テストのターゲットにするかどうかは、とても重要な問題であるため、我々は前研究で日本の子宮頸癌から単独感染として検出された HPV 型を解析してその分布を発表した。しかし、子宮頸癌の 1 割は複数の HPV 型が検出される多重型 HPV 感染癌であり、また、同じく 1 割は HPV が検出されない癌であった。これらの癌の原因となった HPV 型不明であり、既存の報告やアッセイでの解析は困難であった。

## 2. 研究の目的

日本の子宮頸癌死亡数減少の戦略を立てる上で HPV ワクチンの有効性や既存の HPV テストの有効性を検討する必要がある。そのためには、多重型 HPV 感染癌の中の真のハイリスク HPV 型の同定ならびに HPV 陰性癌が本当に HPV 陰性であるのかどうかを調査する必要がある。日本における正確なハイリスク型 HPV の分布を明らかにするためには、多重型感染の中でどのウイルスが発がんの原因ウイルスなのか、陰性癌に本当にウイルスが存在しないかを調査する必要があると考えた。

## 3. 研究の方法

それらの癌の原因 HPV 型を明らかにするために、マイクロダイセクション法により癌とそれ以外の組織を同定して、それぞれのがん組織のみを切り出して DNA を検出したうえで、それぞれの癌から単独の HPV 型を検出した。HPV タイピング法は、既存の方法ではなく新規に開発した uniplex E6/E7 法を用いた。Uniplex E6/E7 法は発がんに必要な E6/E7 遺伝子をベースにした PCR 法であり、既存のアッセイに比べて高感度であるため、少ない DNA コピー数でも検出可能な方法である。液状検体を用いた L1 ベースのアッセイ(Genosearch-31)により、複数のハイリスク型 HPV が検出された症例と、HPV DNA が検出されなかった症例を病理マッピング法による選択的 DNA 抽出と E6/E7 ベースの好感度 PCR 法によって再解析を行った。

## 4. 研究成果

377 例の浸潤癌症例のうち、前回の研究で複数の HPV タイプが陽性だった 9 例、HPV が陰性だった 16 例、および単一の HPV タイプが陽性だった 48 例(コントロール群)の計 73 例の適格標本をマイクロダイセクション法によって DNA を抽出した。すべてのハイリスク型 HPV タイプを検出するために高感度アッセイである uniplex E6/E7PCR 法を用いて HPV タイピングを行った。HPV タイピングの結果は 73 例中 52 例で一致が確認された。残りの 21 例のうち、15 例は結果が不一致であり、6 例は部分一致であった。前研究において、L1 プライマーの PCR 法で HPV DNA が検出されなかった 16 例中 8 例(50%)の検体サンプルから今回新たに HPV DNA が検出され、そのうち 6 例で HPV16、2 例で HPV67 が陽性だった。以前に HPV6 および HPV53 が陽性だった 2 つのサンプルは HPV 陰性であった。また、複数の HPV タイプが陽性だった 9 例すべてで、癌組織から単一の HPV のみが検出された。合計で 63 例のがん組織から単一の HPV が検出された。HPV16 および HPV18 は扁平上皮癌(SCC)および腺がん(ADC)で検出された。-5(HPV82)、-6(HPV56) および -9(HPV31/52/67) HPV タイプは SCC で検出され、-7(HPV59/68)タイプは ADC および腺扁平上皮癌(ADSCC)で検出された。これらの発見は、異なる HPV タイプが異なる組織学的不安を誘発する可能性を示唆している。さらに、すべての SCC および通常型 ADC の 11 例中 10 例でハイリスク型 HPV が陽性であり、これらの癌および関連する前がん病変の検出のために HPV スクリーニングが有用であることを支持している。さらに、結果の乖離の原因を調べるためにそれぞれの HPV DNA の遺伝子領域が検出されるかどうか調べたところ、今回結果の不一致を認めた 13 症例すべてで L1 遺伝子が検出された。一方

で、12例の症例で E1-E2 領域の部分欠失あるいは全欠失を認めた。この欠失はインテグレートの際に生じたと考察したが、エピソーマル DNA と比べてインテグレート HPV は DNA コピー数が少ないため、検出感度の差で結果の乖離が生まれた可能性が示唆された。高率にインテグレートする HPV16 はウイルスコピー数が少ないため、一部の子宮頸がん組織で検出されない可能性があるため、HPV 検査の際には、少ない DNA コピー数の癌も検出できるような高感度アッセイの開発が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakamoto Jinichi, Saito Mayumi, Zhang Shitai, Takakura Masahiro, Takagi Hiroaki, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Determination of human papillomavirus type in archival tissue specimens of invasive cervical cancer using molecular mapping and E6/E7-based polymerase chain reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 265996 ~ 265996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jinichi Sakamoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Determination of human papillomavirus type in archival tissue specimens of invasive cervical cancer using molecular mapping and E6/E7-based polymerase chain reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂本人一
2. 発表標題 多重型HPV感染癌とHPV陰性癌の組織検体におけるMolecular mappingとE6/E7ベースのポリメラーゼ連鎖反応を用いた発癌ヒトパピロウイルス(HPV)型の決定
3. 学会等名 第75回日本産婦人科学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本 人一
2. 発表標題 レーザーマイクロダイゼクションと新規領域のPCRを用いた多重型HPV感染子・HPV未検出子宮頸癌の解析
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本 人一
2. 発表標題 レーザーマイクロダイゼクションと新規領域のPCRを用いた多重型HPV感染子・HPV未検出子宮頸癌の解析
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 JINICHI SAKAMOTO
2. 発表標題 Detection of a single HPV type in invasive cervical cancer (IVCC) using the laser captured microdissection and the uniplex E6/E7 PCR method
3. 学会等名 International papillomavirus congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本 人一
2. 発表標題 子宮頸がん検診・治療のアルゴリズム構築のための網羅的HPV解析
3. 学会等名 第67回北日本産婦人科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------