

平成23年5月20日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591948

研究課題名(和文)

子宮頸部細胞診検体からのHPV組み込み型子宮頸癌ハイリスク者診断法の開発

研究課題名(英文) Detection of HPV infection status from liquid based cytology specimens

研究代表者

本郷 淳司 (HONGO ATSUSHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：10301293

研究成果の概要(和文)：我々は子宮頸癌培養細胞を用い、その原因ウイルスである HPV の感染により IGF-I 受容体(IGF-IR)の過剰発現を生じている事を発見した。この事象を応用し、ヒト子宮頸癌および前癌組織を免疫組織染色にて検討したところ、IGF-IR 発現や局在が HPV の感染やその存在様式を示唆し、前癌病変から癌にいたる課程で変化することを示した。この病理切片での局在を、より低侵襲な細胞診検体に応用しようと検討したが、残念ながら細胞診検体を用いた検討は困難であった。しかし異型上皮組織内の IGF-IR 等の発現局在は HPV の存在様式を反映しており、簡便な鑑別診断として有効であった。

研究成果の概要(英文)：We found that infected HPV caused up-regulation of the insulin-like growth factor receptor in cervical cancer cell lines. By using this phenomenon, we evaluated expression levels and its localization of IGF-IR in human cervical cancer and its precursor lesions by immunohistochemistry. We could distinguish status of HPV infection by the localization of IGF-IR overexpression. Then we tried to utilize this technique in liquid based cytology specimens. However, we could not distinguish HPV infection status from cytology specimens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：HPV、IGF-I 受容体、p53

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は子宮頸癌の最大病因であるが、その 80%は宿主免疫により自然治癒する。臨床では、一般に高度異型上皮以上の病変に対し、子宮頸部円錐切除術が行われるが、その適応決定には苦慮することも多い。初期異型上皮の HPV はエピソームに存在するため自然治癒するが、HPV が子宮頸部基底細胞の宿主染色体に組み込まれると自然治癒は起こりえず、発癌リスクが著しく高くなる。しかし、従来の病理診断は形態学に基づいており、必ずしも HPV の存在様式を正確に反映していない場合もある。その分子診断には FISH 法や RNA-in situ hybridization 法など、高価で手間の掛かる手法を要するのが難点であり、簡便な診断法の確立が望まれている。

### 2. 研究の目的

我々は細胞膜に存在する受容体型チロシンキナーゼである I 型インスリン様増殖因子受容体 (IGF-IR) の子宮頸部異型上皮内における過剰発現の局在が、HPV 組み込みの有無により劇的に変化する事を発見した。今回、これを分子マーカーとした HPV 存在様式の簡便な分子組織診断・細胞診診断法を新規に確立し、子宮頸部初期病変の円錐切除適応決定に関する臨床応用を図ることを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

我々は以前 IGF-IR に対するアンチセンス法を用いて子宮頸癌培養細胞の増殖抑制実験を行って報告した際に、多くの子宮頸癌由来細胞では、他の臓器由来癌細胞と比較して著しく IGF-IR が過剰発現していることに気づいた (Nakamura, Hongo, et al. Cancer Res, 1999)。我々は以前、マウス造血細胞由来の 32D 細胞を用いて、IGF-IR の発現が、癌抑制遺伝子産物である p53 によって強力に転写抑制されていることを報告している事より (Prisco, Hongo, et al. Mol Cell Biol, 1997)、HPV 陽性の子宮頸癌細胞では、HPV E6 によるユビキチン化分解のため p53 蛋白が分解失活しており、その為に p53 による転写抑制から回復した IGF-IR が過剰発現を呈するのではと推測した。一方、HPV E6 の発現はウイルス遺伝子がほとんど episome に存在する CIN I, II では上皮の中層から表層にあり、ウイルス遺伝子が宿主細胞の染色体に組み込まれることが多い CIN III ではその発現は

E2 蛋白などの抑制を受けることなく上皮の全層に見られるとされている。IGF-IR の発現が E6 蛋白発現のサロゲートマーカーになるとすると、その発現局在は E6 と同様となり、その局在から HPV ウイルスの存在様式が示唆されないかと考えた。これらを実証するため、(1)まず IGF-IR の発現が実際に HPV 感染によって影響を受ける機序を、子宮頸癌培養細胞に、HPV E6 遺伝子、また E6, E7 の発現抑制作用を有する E2 遺伝子をそれぞれ遺伝子導入して検討した。

(2)次に円錐切除や子宮全摘によって得た子宮頸部病変をインフォームド・コンセントの下に免疫組織染色で検討し、それぞれの上皮内における IGF-IR ならびに、同様に HPV E7 のサロゲートマーカーとされる p16 蛋白の発現強度、ならびにその局在を検討した。

(3)同様の検討が細胞診で可能かどうか確かめるため、インフォームド・コンセントを得た子宮頸部擦過液状細胞診検体のうち、診断のために用いた残りの一部を用い、組織と同じように、免疫染色を行い、検討した。

### 4. 研究成果

(1)HPV を 1-2 コピー有する SiHa 細胞に HPV16 E6 遺伝子を導入したところ、p53 蛋白発現量は著明に減少し、IGF-IR 発現量は著明に増加した。反対に HPV を約 50 コピー有する HeLa 細胞に HPV E6/E7 の転写を抑制する働きをもつ HPV18 E2 遺伝子を導入したところ、p53 蛋白発現量は回復し、IGF-IR 発現量の減弱を認めた。それぞれの遺伝子導入を行い、恒久的発現クローンを樹立して検討を進めた。SiHa 細胞は足場非依存状態ではほとんどコロニーを形成せず、ヌードマウス皮下に接種してもほとんど腫瘍を形成しないが、E6 遺伝子を導入したクローンでは足場非依存性増殖能と腫瘍形成能の著しい亢進を認めた。野生型の E6 の代わりに変異を導入した E6 の導入ではこのような変化は見られず、また E6 遺伝子導入クローンに IGF-IR の siRNA を用いて IGF-IR 発現を抑制すると、前述の足場非依存性増殖能は再度減弱した。また E2 遺伝子を導入した HeLa クローンでは野生型の HeLa 細胞の有する強い足場非依存性増殖能と腫瘍形成能の減弱を認めた。以上のことより HPV の感染はその E6 蛋白が p53 を分解促進することにより、普段は p53 によりその転写活性が抑制されている IGF-IR の過剰発現を呈していること、またこの IGF-IR の過剰発現が足場非依存性増殖能と腫瘍形成能の増強に働いていることが明らかにな

った。

(2) 次に子宮頸部異型上皮と子宮頸癌の円錐切除による摘出組織を抗 IGF-IR 抗体および、抗チロシンリン酸化 IGF-IR 抗体を用いて免疫組織染色することにより検討した。異型上皮から子宮頸癌へ進展するにつれて、IGF-IR 発現量は有意に増加した。各々 30 例と少ない症例数ではあるが、CIN III 以上で有意に IGF-IR が高発現しており、また HPV が染色体に組み込まれず細胞質に存在すると考えられる CIN I-II の 86.7% (52/60) において、IGF-IR の過剰発現は中層細胞から表層細胞に局限し、一方 HPV が宿主の染色体に組み込まれていると考えられる CIN III の 86.7% (26/30) において、IGF-IR の過剰発現は上皮内全層に均一に認められた。子宮頸部基底細胞のエピソームに HPV が存在する CIN I-II では宿主細胞の分化と共にウイルスの初期蛋白の転写翻訳が行われており、E6, E7 蛋白の発現は中層細胞以降で開始する。一方、HPV が宿主に組み込まれた際に E1, E2 領域が寸断されている CIN III では E6, E7 の発現は無秩序に基底細胞から開始する。HPV 組み込みの有無の違いによる、上皮内の IGF-IR 発現局在の違いは、各々の上皮各層内の E6, E7 発現局在とまさしく一致していると考えられた。また異型上皮においては IGF-IR の過剰発現の局在は HPV E6 蛋白の発現局在と一致しており、この事象を利用して HPV の宿主への遺伝子組み込みの有無を判定できる可能性が示唆された。

(3) 病理組織の検体と同様の検討を、細胞診でも出来ないか検討するため、さらに病理組織を用いて HPV E7 のサロゲートマーカーである p16 蛋白の発現局在でも検討した。p16 の発現局在は IGF-IR とほぼ同様であり、この 2 者は同様に HPV E6/E7 の発現局在をしめすマーカーとして利用できると考えられた。細胞診検体で組織内での発現局在を類推するために、上皮内で特に基底細胞層に局在して発現する p63 蛋白との共在が、HPV E6/E7 遺伝子産物の基底細胞層からの発現と相関すると考え、組織および液状細胞診検体にて検討を加えた。当初、正常基底細胞層に発現する p63 を指標に、p63 蛋白陽性かつ IGF-I 受容体もしくは p16 蛋白の発現細胞の有無にて、HPV の遺伝子組み込みの有無は判定できないかと想定した。しかしながら①正常組織を用いて行った検討では、表面からの擦過細胞診では p63 陽性である基底細胞や傍基底細胞の採取量は微少であること、②組織内での検討では同一症例でも HPV の組

み込みが想定される部位と想定されない部位が多く混在していること、③ HPV が感染した異型上皮では、p63 蛋白の発現は基底細胞や傍基底細胞に局限しておらず、中層から表層細胞にいたるまで、幅広く発現していることが判明した。以上のことから、残念ながら細胞診検体を用いた同様の検討は困難であると結論づけた。しかしながら、異型上皮組織内の IGF-IR, p16 の発現局在は HPV の存在様式を反映しており、鑑別診断に有効であり、RNA in situ hybridization よりはるかに簡便な方法であった。

#### 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)

- ① Hiroyuki Kuramoto, Atsushi Hongo, et al. Immunohistochemical Evaluation of Insulin-like Growth Factor I Receptor Status in Cervical Cancer Specimens, Acta Medica Okayama, 査読有, Vol.62(4), 2008, p p.251-259.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 本郷淳司、新規 truncated IGF-IR を用いた婦人科癌治療の試みとその作用機序の解明、第 9 回 日本婦人科がん分子標的研究会、平成 22 年 9 月 10 日、天津プリンスホテル
- ② 本郷淳司、HPV E6 蛋白による IGF-I 受容体発現亢進の分子機序とその意義、第 44 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 / 第 7 回日本婦人科がん分子標的研究会、平成 20 年 7 月 18 日、名古屋国際会議場
- ③ 本郷淳司、子宮頸癌における IGF-I 受容体レセプター過剰発現の分子機序解明とその発現パターンによる HP

V感染様式診断への臨床応用、第60  
回日本産科婦人科学会学術集会、平  
成20年4月15日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本郷 淳司 (HONGO ATSUSHI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：10301293