

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791161

研究課題名(和文)

子宮頸管炎-頸癌関連の証明:HPV 遺伝子型、炎症因子とゲノム不安定性亢進の関与

研究課題名(英文)

Proof of relationship between cervical cervicitis and cervical cancer: participant of HPV genotype, inflammation factor and genomic instability

研究代表

葛岡(二井)美津穂(KUZUOKA(FUTAI) MIZUHO)

北里大学 医学部・助教

研究者番号：10365158

研究成果の概要(和文): HPV16、52、58、31型が日本女性で多く認められ、リスク不明のHPVのいくつかは高リスク群の可能性があると判明した。さらに、高危険群 HPV 単独感染と punctate 感染様式、炎症マーカーとして NF- κ B・iNOS、ゲノム不安定性である LOH、MSI が扁平上皮癌の癌化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文): HPV types 16, 52, 58 and 31 were frequently detected in Japanese women with cervical neoplasias and several unspecified-risk HPV might be high-risk types. A single infection of high risk type HPV ,punctate signal pattern ,inflammation markers(NF- κ and iNOS), genomic instability (LOH and MSI) seemed to be closely correlated with cervical carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：(1)子宮頸癌(2)子宮頸管炎(3) HPV 遺伝子型(4) 炎症関連因子(5)ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮頸癌患者数の増加

子宮頸癌検診の普及に伴い、子宮頸癌の死亡率は低下傾向が続いている。しかし、子宮頸癌発生数は未だ年5000人を超えている。しかも、早期治療される高度異形性、上皮内癌の数はむしろ増加している。さらに、初交年齢の低下により若年化も問題となっている。

(2) 子宮頸癌と Human papilloma virus (HPV) との関係

1983年、zur Hausenらにより子宮頸部組織に HPV16 型ゲノムが高率に存在すると報告されて以来、子宮頸癌と HPV についての研究が急速に展開された。その結果、子宮頸癌の90%以上で HPV 感染が確認され、16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 型などが高危険群とされた。さらに、癌化の機能として、HPV の産生する E7 が RB タンパクを不活化し、E6 が p53 の不活化とアポトーシスの抑制、テロメラーゼの活性化を惹起し癌化を誘導するというところまで明らかとなってきた。

(3) 子宮頸癌発生に関する因子

生涯を通して HPV に感染する女性の割合は、70%超とされている。しかし、実際に癌化に至るのは極僅かである。HPV 以外に癌化に関する因子は、現状では不明である。

子宮頸癌に関する遺伝子異常としては、癌抑制遺伝子の FHIT や TSLC1 の発現低下、癌遺伝子の c-myc, erbB2 の過剰発現、ras の変異などの単発的報告はあるが、遺伝子異常の詳細も分かっていない。

(4) 慢性炎症と発癌

最近、慢性炎症に惹起される NF-kB 活性化、COX-2 発現が発癌に関与すること、共同研究者らにより潰瘍性大腸炎の癌化にゲノム不安定性の亢進が関与することが明らかにされた。

子宮頸部病変の病態解析、診断をする上で HPV genotype 検索は不可欠である。本邦において大規模な母集団を用いて高危険群 HPV genotype を網羅的に解析し、経過を追跡している研究はほとんどない。そこで、子宮頸部病変を多数治療している当科で大規模解析をする必要性に迫られた。また、頸癌の背景には慢性炎症が多く見られることから、HPV 感染に加えて慢性炎症が発癌のプロモーターに相当する可能性があると考え、HPV 感染に加え慢性炎症とそれに続くと考えられるゲノム不安定性の亢進に焦点を当て、子宮頸部病変の発癌機構を解明するという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、多数の子宮頸部病変において、(1) HPV genotype と感染様式、(2) 慢性炎症に關与する慢性炎症細胞浸潤、炎症関連因子 (NF-kB, COX-2, IL-6, 8 など) および (3) MSI, LOH につて解析する。そして、(1) ~ (3) を統合することにより、HPV の持続感染、慢性炎症による遺伝子不安定性の亢進が、異形成・上皮内癌・進行癌という子宮頸部病変における発癌機構にどのように關与するかを証明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) HPV genotype と感染様式の解析：正常 53 例、軽度異形成 44 例、中等度異形成 62 例、高度異形成 47 例、上皮内癌例 57 例、上皮内腺癌 2 例、扁平上皮癌 70 例、腺癌 16 例、コンジローマ 2 例の HPV genotype の検出を行った。HPV16 型陽性例のうち 55 例の HPV 感染様式 (局在) を in situ hybridization にて検出した。

(2) 慢性炎症関連因子の解析：HPV 検体採取と同時期に採取した組織検体 (病変なし: 10 例、CIN1: 5 例、CIN2: 16 例、CIN3: 39 例、扁平上皮癌 (SCC): 25 例、腺癌 (AC): 8 例) に対し、NF-kB、iNOS、COX-2、IL-6、IL-8 の免疫染色を行った。発現の局在、発現量をスコア化し Mann-Whitney 検定で解析した。

(3) ゲノム不安定性 MSI・LOH の解析：HPV 検体採取と同時期に採取した組織検体 (病変なし: 1 例、CIN1: 5 例、CIN2: 15 例、CIN3: 22 例、SCC: 28 例、AC: 9 例) から、laser captured microdissection (LCM) で採取した各病変部の上皮から抽出した DNA を使用し Microsatellite marker : 17 番染色体マーカー: D17S795, TP53, D17S786, D17S579 : NCI 推奨マーカー: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 : Tumor suppressor gene マーカー: D31S1300 (FHIT), D7S486 (ST-T), D9S161 (p16INK4A), D11S904 (H-Ras), D13S268 (Rb) を使用し検出、解析した。

4. 研究成果

(1) HPV genotype と感染様式の解析：

HPV genotype

全体の HPV 感染率は 78.6% (282/359) であった。HPV16、52、58、31 型の順で検出率が高かった (図 1)。正常の 34.0% (18/53) から HPV が検出された。CIN1、CIN2、CIN3、SCC、腺癌の症例の HPV 感染率はそれぞれ 86.4% (38/44)、83.9% (52/62)、88.0% (93/106)、94.2% (66/70)、63.0% (10/16) で (図 2) 頸部病変がない症例よりも高く検出された。単独感染の率は CIN1 が 59.1% (26/44)、CIN2 が 43.5% (27/62)、に対し SCC が 76.0% (53/70)

で、扁平上皮癌の方が子宮頸部異形成より高く認められた。リスク不明とされる 66、70 型が扁平上皮癌より、62、71、82 型が CIN3 より検出された。

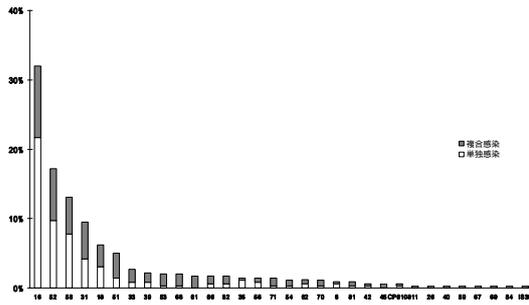


図 1

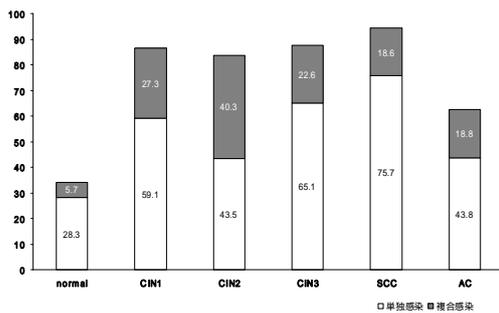


図 2

感染様式の解析：

ISH の検討では、Diffuse パターンのみは扁平上皮癌では 21 症例中 1 例に対し子宮頸部異形成では 32 例中 13 例、punctate パターンのみは扁平上皮癌では 21 例中 13 例、子宮頸部異形成では 21 例中 7 例であり、Diffuse パターンは子宮頸部異形成で、punctate パターンは扁平上皮癌で有意に高頻度に認められた。(表 1)

感染様式	D	D+P	P	Negative	合計
CIN1	1	-	-	1	2
(%)	(50)	-	-	(50)	(100)
CIN2	3	-	1	4	8
(%)	(37.5)	-	(12.5)	(50)	(100)
CIN3	9	2	6	5	22
(%)	(40.9)	(9.1)	(27.3)	(22.7)	(100)
SCC	1	5	13	2	21
(%)	(4.8)	(23.8)	(61.9)	(9.5)	(100)
AC	-	-	1	1	2
(%)	-	-	(50)	(50)	(100)

表 1

(2) 慢性炎症関連因子の解析：

NF-kB、iNOS において子宮頸部病変を有するものは有意に発現が高かった。また、COX2 において子宮頸部病変を有さないものと CIN1+2、CIN1+2 と CIN3、CIN1+2 と SCC、iNOS において CIN1+2 と SCC、SCC と AC の間にそれぞれ有意差を認め、後者で発現が高かった (図 3 ~ 5)。

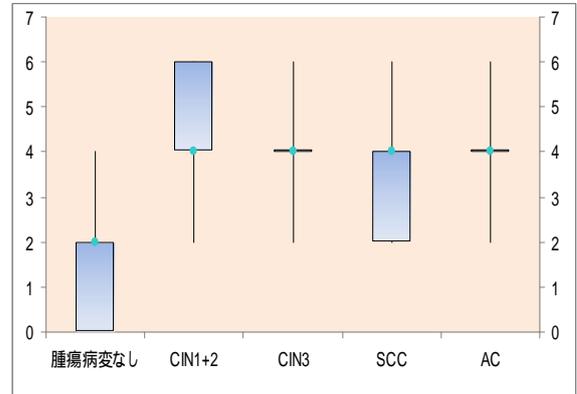


図 3 NFk

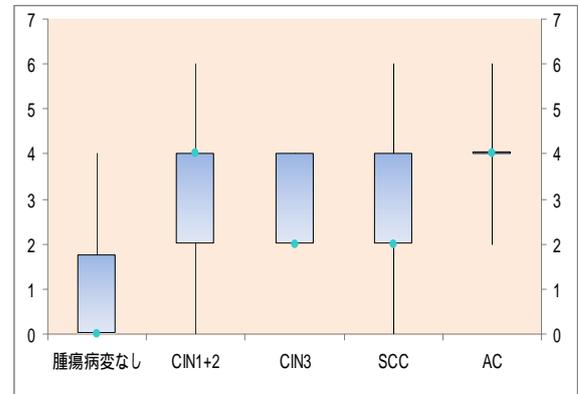


図 4 iNOS

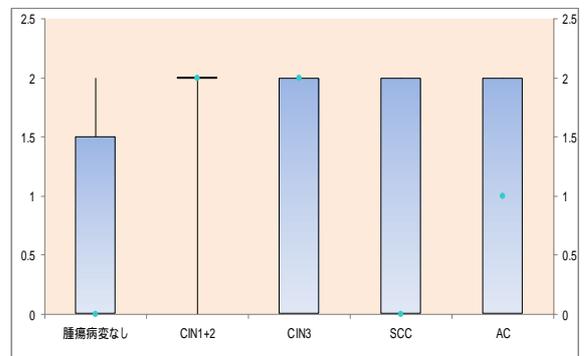


図 5 COX2

(3) ゲノム不安定性 MSI・LOHの解析：
LOHはCIN2:2例(13%)、CIN3:9例(41%)、SCC:8
例(29%)で検出された。MSIはCIN2:1例(7%)、
CIN3:6例(27%)、SCC:1例(4%)、腺癌:1例
(11%)で検出された。尚、CIN1からはLOH、
MSIのいずれも検出されなかった。

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)

Mizuho Futai, Jun Watanabe, Toshiko
Jobo, Shinpei Tsunoda, Yukari
Nishimura, Kayoko Watanabe, Isao
Okayasu, Nobuya Unno : Clinical
significance of human papillomavirus
(HPV) genotype by linear array assay
in Japanese women with uterine
cervical lesions and type 16 physical
status by in situ hybridization. ,
International Journal of Gynecological
Cancer, 査読有, 19: 1396-1401, 2009

[学会発表](計1件)

葛岡(二井)美津穂、他

LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test を用い
た HPV genotyping と子宮頸部病変との関連
の検討

北里腫瘍フォーラム、2009年1月30日、北
里大学医学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛岡(二井)美津穂(KUZUOKA(FUTAI) MIZUHO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：10365158