

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590306

研究課題名（和文）HPV亜型別の感染細胞内組み込み様式に基づく、病理学的な予後推測マーカーの検討

研究課題名（英文）Study on histopathological biomarker in cervical lesions based on HPV subtypes and integration status of HPV within host genome

研究代表者

佐野 孝昭（SANO TAKAAKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90292581

研究成果の概要（和文）：

HPV 感染マーカーの p16 蛋白と、HPV 組み込み様式によって発現量が増加する L1 蛋白を指標とし、子宮頸部病変への予後推測に応用できるかどうかを検討した。細胞診自己採取検体では、HPV 検査を併用することで、病変の検出感度及び特異度を上げることが可能となった。p16 染色に加え、増殖マーカーである ki-67 染色を細胞診検体に同時に行い、2重染色法とすることで、より特異的に腫瘍細胞の同定ができるようになった。

研究成果の概要（英文）：

Human papillomavirus (HPV) L1 capsid protein (L1) is associated with the productive phase of HPV infection. We examined the relationship between L1 and p16 expression in cervical intraepithelial neoplasia. A study compared the usefulness of self-collected (SC) materials for cervical cytology and HPV genotyping. These results suggest that a combination of Pap and HPV tests on SC material may provide a diagnostic strategy with high sensitivity and specificity. A study evaluated the usefulness of p16/Ki-67 as a new biomarker in the diagnosis of cervical lesions. The p16/Ki-67 double immunostaining in cytology sample is useful as a surrogate marker of high-grade lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：HPV、p16 蛋白、L1 蛋白、免疫染色、子宮頸癌、異形成、腺癌

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は HPV 感染によって引き起こされる癌であり、HPV の感染の有無や型を同定することは重要である。しかしながら、HPV は性行為感染症の 1 つであり、日本における 20 代の健常人女性のおよそ 10-20% が感染しているといわれ、HPV 感染者がすべて医療の対象になるわけでもない。また、HPV テストの結果はあくまで HPV の存在診断であり、一過性の感染、持続感染、腫瘍化が生じている病変、腫瘍化し病変がより進行している病変など、を区別することはできない。それ故に HPV テスト単独では意味をなさず、低異型度の上皮内病変（軽度～中等度異形成）の時点で、予後を予測できる検査やマーカーの利用が期待されている。

2. 研究の目的

HPV 感染マーカーのひとつである p16 と、HPV 感染細胞内でのウイルス粒子の産生パターンとウイルス組み込み様式によってその発現量が変化する L1 蛋白を指標とし、子宮頸部病変の予後推測に応用できるかどうかを、病理・細胞検体を用いて検討する。また、HPV ワクチンが本邦でも実用化されるに伴い、ワクチンの対象からはずれる HPV16, 18 型以外の亜型（52, 58, 33, 31 型など）の感染様式や発癌のメカニズムを同時に解明したい。

一方、頸部腺癌は HPV 関連である通常型腺癌が主体であるが、一部に胃の幽門腺に類似した胃型粘液を産生する胃型の腺癌が存在することが明らかとなった。この胃型腺癌は HPV との関連が乏しく、HPV 非関連の子宮頸部腺癌と推測され、予後不良であることが言われている。頸部腺癌についても HPV 亜型や、組み込み形式による予後因子の検討を行いたい。

3. 研究の方法

HPV 感染に伴い、感染初期に一過性に発現する蛋白（L1 蛋白）と、病変の形成期から進行期にかけて定常的に発現している蛋白

（p16 蛋白）を、子宮頸部病変からの病理組織検体と液状化細胞診検体を用いて、発現パターン、発現量の推移を様々な方法で検証し、HPV 亜型、HPV の宿主細胞内での組み込みパターンやコピー数との比較を行う。①病理組織標本にて、p16・L1 蛋白の発現を免疫組織学的に検討する。②HPV subtype の判定と、real-time PCR 法によってウイルスの組み込みの有無とコピー数を測定する。③頸部腺癌についても HPV 亜型や、組み込み形式による予後因子の検討を行う。

4. 研究成果

1. HPV 感染マーカーのひとつである p16 と、

HPV 感染細胞内でのウイルス粒子の産生パターンとウイルス組み込み様式によってその発現量が変化する L1 蛋白を指標とし、子宮頸部病変の予後推測に応用できるかどうかを、病理組織検体を用いて検討した。子宮頸部の low grade の異形成（CIN1～2）で、経過観察ののち予後の判明している標本を一部に含む症例群に対し、免疫組織学的に p16 と L1 蛋白の発現を検討した。

症例には 48 例の病変退縮群と、40 例の病変進行群を含む。p16 陽性率は病変進行群で有意に高く、一方で p16-/L1- 例は病変退縮群と有意に相関していた。p16 と L1 の発現は子宮頸部病変の進行に伴って、L1-/p16-、L1+/p16-、L1+/p16+、L1-/p16+ の順に変化していくことが推測された。以上より、病理組織検体においても L1/p16 蛋白発現の状態によって、病変の予後を推測できることが明らかとなり、実際の日常診断の現場においても有用であると考えられた。

2. 液状細胞診検体の可能性を広げるものとして、自己採取検体での利用がある。細胞診自己採取検体は診断に十分な細胞量の確保や、適正な部位からの細胞採取などが実用にあたっての問題点とされている。

子宮頸癌検診における細胞診自己採取検体の利用と、HPV 検査との併用の意義について検討を行ったところ、自己採取検体では通常の医師採取検体に比べ、Pap スメアーでの判定に偽陰性が出やすい傾向があるが、HPV 検査を併用することで、病変の検出感度を上げることができるという結果が得られた。以上から、細胞診自己採取検体の検診への利用は、同時に HPV 検査を併用することで、検出感度が低い弱点をカバーできる可能性が示唆された。

3. HPV の感染は子宮頸癌や頸部異形成病変の発症に必須の要因である。臨床では病理・細胞診検体において、その形態像とともに個々の腫瘍細胞に HPV 感染の有無を直接確認するには in situ hybridization 法などの手法があるが、手技が複雑であり、感度の問題もあり日常的には行われていない。そこで、HPV 感染とその宿主 DNA への組み込みの指標として p16 発現が代理マーカーとしてよく利用されている。病理組織学的には子宮頸癌や頸部異形成病変に極めて特異的に p16 の高発現が認められ、診断に有用となっている。一方細胞診領域においても p16 染色は有用であり、形態診断の補助的な役割を担っている。しかしながら、細胞診上では、p16 の免疫染色は頸管腺や内膜腺などの非特異的な染色像が混在するため、腫瘍細胞の正確な同定にはしばしば困難なことがある。

近年、p16 染色に加え、増殖マーカーである ki-67 染色を同時に行い、2 重染色法とすることで、より特異的に腫瘍細胞の同定ができるようになった。この p16/ki-67 の 2 重染色法をすでに HPV 型の判明している検体で評価したところ、明瞭に腫瘍細胞を同定できることが判明した。また、液状細胞診標本で施行することで、1 枚のガラス検体あたりの正確な腫瘍細胞の個数（腫瘍細胞の量）を計測することができた。これにより、標本上の腫瘍細胞の個数が、HPV 型と有意に相関していることが判明し、高悪性度 HPV 型や、特に HPV16 型においては有意に出現する腫瘍細胞量が多いことが明らかとなった。また、同様の検討を自己採取検体でも比較したところ、自己採取検体では明らかに出現する細胞量が少ないことがわかった。これは自己採取検体での判定に偽陰性が出やすい理由と合致するものであった。

4. 近年、子宮頸部腺癌の一部に特徴的な形態像と胃型の粘液形質を有する胃型腺癌の概念が提唱されている。胃型腺癌は HPV 陰性例が多く予後不良と報告されているが、その詳細について結論は出ていない。

今回、子宮頸部腺癌での胃型形質の発現率、胃型形質と HPV の関連性について検討した。子宮頸部腺癌 72 例から胃型腺癌の組織学的診断基準（豊富で淡明な細胞質と明瞭な細胞境界）を満たし、かつ HIK1083 陽性を条件として胃型腺癌を抽出した。さらに HPV 感染状態、消化管への分化傾向および悪性度を調べるため HPV 型判定検査および p16、MUC6、TFF1、CDX2、PDX1、p53、HER2、ki-67 の免疫組織化学的検討を行った。

胃型腺癌は 10/72 例(14%)で、非胃型腺癌と比べ有意に進行例が多かった。HPV 陽性率は非胃型腺癌 63%に対し胃型腺癌 0%であった。胃型、非胃型間で MUC6、TFF1、CDX2 の陽性率に有意差はなく、HPV 陽性、陰性間で MUC6、TFF1、CDX2、PDX1 の陽性率に有意差は認められなかった。胃型腺癌はすべて HPV 陰性であったが、胃型形質自体は胃型腺癌に特異的ではなく、HPV 感染の有無に関わらず子宮頸部腺癌にしばしば認められることが明らかとなった。

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 5 件）

1. Yoshida T, Sano T, Takada N, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, Obara M, Fukuda T.
Cervical Cytology and Human Papilloma

Virus Genotyping with Self-Collected and Clinician-Collected Materials: Analysis with Linear Array Assay 査読有
Acta cytol 55:106-112, 2011

2. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, Obara M, Fukuda T
Usefulness of CINtec PLUS p16INK4a/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical Cancer 査読有
Acta cytol 55: 413-420, 2011

3. 佐野孝昭、吉田朋美、福田利夫
病理診断に役立つ分子生物学：Human papillomavirus：解説編”
病理と臨床 29（臨時増刊号）289-292, 2011
査読無

4. 佐野孝昭、吉田朋美、福田利夫
”病理診断に役立つ分子生物学：Human papillomavirus：診断編”
病理と臨床 29（臨時増刊号）293-297, 2011
査読無

5. Hoshikawa S, Sano T, Yoshida T, Ito H, Fukuda T, Oyama T.
Immunohistological analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in low-grade dysplastic lesions of the uterine cervix
Pathol Res Pract 206: 816-820, 2010 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 星川里美、佐野孝昭、吉田朋美、伊藤秀明、小山徹也、福田利夫
子宮頸部の Low grade dysplasia における L1 capsid 蛋白および p16 蛋白の免疫組織学的検討
第 100 回日本病理学会総会（横浜）2011/4/29

2. 吉田朋美、佐野孝昭、高田奈美、鹿沼達哉、小原満雄、伊藤晃子、矢崎千秋、井上浩、福田利夫
若年者における子宮頸癌細胞診の普及への試み
第 52 回日本臨床細胞学会総会 2011/5/21

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 孝昭 (SANO TAKAAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90292581

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

吉田朋美 (YOSHIDA TOMOMI)
群馬大学 医学部保健学科・助教
研究者番号：00312893