

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592432

研究課題名(和文)陰茎癌におけるヒトパピローマウイルス感染と生体内反応因子に関する研究

研究課題名(英文) Human papillomavirus (HPV) infection and expression of signal transduction in penile cancer.

研究代表者

千馬 正敬 (SENBA, Masachika)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60216562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は、多段階の過程を経て癌化と関連している。ヒトパピローマウイルス(HPV)の遺伝子は、シグナル伝達を調整する物質と相互作用にて、発癌の中心的な役割を担っている。

陰茎癌におけるHPVの感染は、70%であった。HPV陽性例で、NF- $\kappa$ Bの陽性率は、92.9%であった。他方、HPV陰性例で、NF- $\kappa$ Bの陽性率は、16.7%であった。p53は、70%陽性であり、p40は、100%陽性であった。p40が、p53と比較して陰茎癌に特異的であった。陰茎癌における転写因子NF- $\kappa$ Bの出現は、HPV感染陰性例よりもHPV感染陽性例において多く出現していた。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation has been linked to various steps involved in oncogenesis. Human papillomavirus (HPV) gene products play a central role in the induction of tumor transformation by interacting with several regulatory proteins. Mediators of inflammatory response can induce genetic changes including point mutations in both tumor suppressor genes and oncogenes, resulting in the formation, development and progression of cancer.

HPV found in 70% of the cases. In the HPV positive cases, NF- $\kappa$ B positivity was 92.9%. On the other hand, in the HPV negative cases, NF- $\kappa$ B positivity was 16.7%. The p53 family, p40 is the most recently discovered. In penile cancer, p40 gene expression was 100%, but p53 gene was 70%. It is suggested that p40 is markedly superior to the standard p53. In penile cancer, NF- $\kappa$ B is expressed more frequently in the presence of HPV infection than in its absence.

研究分野：医歯薬学 熱帯病理学 腫瘍ウイルス学

キーワード：ヒトパピローマウイルス 陰茎癌 ウイルス感染症 発癌 生体内反応 ケニア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 感染に起因している癌死の比率は、発展途上国では、20%から25%、先進国では、7%から10%であると推測されている (Pisani et al, 1997)。慢性炎症と癌化との関連性は、広く受け入れられている。特に、腫瘍ウイルスとヒト癌との関連性に強い相関性がある。例えば、B型肝炎ウイルス (HBV) およびC型肝炎ウイルス (HCV) 感染と肝細胞癌、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染とバーキット・リンパ腫およびホジキン・リンパ腫、ヒト T 細胞白血病ウイルスタイプ-1 (HTLV-1) 感染と成人 T 細胞白血病、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス感染とカポジ肉腫、ヒトパピローマウイルス感染と子宮頸癌、陰茎癌、肛門癌、口腔癌、皮膚癌などが報告されている (Hausen, 2002; Damania, 2007; Senba et al., 2009)。

(2) 熱帯地域の発展途上国においては先進諸国と異なり、発癌ウイルス感染が関与した、子宮頸癌、陰茎癌、悪性リンパ腫、肝細胞癌などの悪性腫瘍の頻度が高い。高温多湿な熱帯地域の自然環境、住民の栄養状態などは、ウイルスがヒトへ感染し、また、ウイルス由来の遺伝子によりヒトの癌抑制遺伝子の変異が発現しやすい条件を与えていると考えられる。HPVによる腫瘍は、社会および衛生状態の劣悪な熱帯地域の発展途上国では重要な疾患である。我々は、タイ国北部における陰茎癌中の HPV のジェノタイプの解析を行い報告した。研究では、南米などの他地域に多い HPV-16 と異なり、HPV-18 の感染が多く見られた。今後、更に亜熱帯・熱帯地域の国々におけるヒトパピローマウイルスのジェノタイプの解析を続けて行きたい。

## 2. 研究の目的

(1) HPV 関連腫瘍は、先進国である日本では比較的少ない腫瘍である。社会および衛生状態が劣悪な熱帯地域の開発途上国では重要な疾患であり、我々のタイ国北部における研究では、多くの陰茎癌に HPV-18 の感染が見られた。今後、更に亜熱帯・熱帯地域の国々における陰茎癌において HPV 感染と転写因子、サイトカインの活性との関連性を検索する。陰茎癌の多い地域および民族では、子宮頸癌の頻度も高く、両腫瘍に対して HPV の持続感染が関与していることが強く推測される。亜熱帯・熱帯地域における HPV 感染と陰茎癌発生のメカニズムの解明を検索する。

(2) 慢性炎症と腫瘍の間の原因的関連性は、広く認知されていて、転写因子 NF- $\kappa$ B が慢性炎症から腫瘍化を起こすことで重要な役割を担っていると確認されている。また、多数の癌細胞で、NF- $\kappa$ B の活性化は、発癌、進行、転移において重要な役割を果たしている。この転写制御因子は、さまざまな炎症細胞と関連して形質変換細胞を作り悪性進行のための分子に合図するネットワークのために不可欠である。多数のサイトカイン、ケモカイン、

成長因子と生存因子の発現と機能は、NF- $\kappa$ B に依存的である。NF- $\kappa$ B の活性化は、変換と腫瘍形成に関連した種々のプロセスに関係している。そして、形質変換、脈管形成とアポトーシスの予防を含んでいる。NF- $\kappa$ B の活性は、癌細胞の成長と侵襲性のための脈管形成方法の調節に関与している。故に、NF- $\kappa$ B、Toll-like receptor、サイトカイン、ケモカインなどの因子の発現を HPV 感染と陰茎癌発生との関連性を検索する。

## 3. 研究の方法

### 組織標本

アフリカ・ケニア国リフトバレー州立病院の陰茎癌の病理組織標本 20 例のパラフィン・ブロックを使用して、研究を遂行した。この研究に際してケニア国大統領府より許可書を頂いている (Research permit No. OP. 13/001/8C224/36)。この外科材料は、10%ホルマリンで固定された後に、パラフィンで埋包された標本が、組織化学、免疫組織化学、インサイツ・ハイブリダイゼーション (ISH) などに使用された。パラフィン・ブロックは、3.5 ミクロンに薄切され、コーティング・スライドグラスに貼り付けられて各種の研究に使用された。

### インサイツ・ハイブリダイゼーション

パラフィン・ブロックは、3.5 ミクロンに薄切した切片をシラン・コートのスライド・グラスに貼り付けてインサイツ・ハイブリダイゼーション (ISH) に用いた。HPV-DNA の検出のために ISH 法を用いた。ISH は、ダコー社の ISH 検出キットを用いた (Dako Co., Carpinteria, CA, USA)。また、ISH のためのプローブは、wide spectrum HPV-DNA probe (Dako Co., USA) を用いた。なお、コントロール標本は、ISH 陽性プローブ、ISH 陰性プローブ、および、HPV-DNA 陽性コントロール・スライドを使用いたしました (Kreatech Diagnostic, Amsterdam, Netherlands)。スライド標本は、脱パラフィンの後に、ペプシン溶液を入れたバットを 37°C の恒温槽に 30 分浸した。水洗の後に純粋で 4 回洗浄の後に HPV-DNA のプローブを掛け、カバーグラスを掛け、95°C のホットプレートに 5 分置いた。この後 37°C の恒温槽で 1 晩置いた。スライド・グラス標本からカバーグラスを外し、TBS バッファーで 4 回洗浄の後に、alkaline-conjugated anti-digoxigenin antibody を掛けて 37°C の恒温槽に 30 分置いた。純水で 4 回洗浄の後に、NBT/BCIP を掛け 37°C の恒温槽に 15 分置いた後に、脱水、透徹、封入の後に顕微鏡で観察した。

### 免疫染色

パラフィン・ブロックは、3.5 ミクロンに薄切した切片をシラン・コートのスライド・グラスに貼り付けて免疫染色に用いた。薄切標本のスライド・グラスを脱パラフィンの後

に、抗原賦活化液に漬け 10 分間電子レンジで処置、その後トリス緩衝液 pH7.4 (ヤトロン) で各 5 分 4 回洗浄した。5%過酸化水素液で 10 分間浸し内因性のペルオキシダーゼを除去した。その後トリス緩衝液 pH7.4 (ヤトロン) で各 5 分 4 回洗浄した。この後、各種の抗体を用いて免疫染色を行った。使用した抗体: NF- $\kappa$ B (Polyclonal antibody; NF- $\kappa$ B p65, Applied Biological Materials Inc.)、Toll-like receptor (TLR)-5 (Monoclonal antibody; Clone: 19D759.2; Enzo life Sciences Inc.)、TLR-9 (Monoclonal antibody; Clone: 26C593.2; Enzo life Sciences Inc.)、p53 (Monoclonal antibody; Dako Inc.)、p40 (Monoclonal antibody; Diagnostic BioSystems Inc., CA, USA)、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (Monoclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology Inc.)、interleukin (IL)-33 (Polyclonal antibody; Rockland Antibodies & Assays Inc.)、transforming growth factor (TGF)- $\beta$  (Polyclonal antibody; Proteintech Inc.)、LEFTY (Polyclonal antibody; Proteintech Inc.)、matrix metalloproteinase (MMP)-2 (Polyclonal antibody; Proteintech Inc.)、MMP-9 (Polyclonal antibody; Proteintech Inc.)、AKT (Polyclonal antibody; Rockland Inc.)、intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 (Polyclonal antibody; Proteintech Inc.)、vascular endothelial growth factor (VEGF) (Monoclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology Inc.)、and macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Polyclonal antibody; Proteintech Inc.)。薄切標本のスライド・ガラスに 100 倍に希釈した抗体を掛けて、湿箱に入れて、5°Cの薬品保冷庫で 1 晩置いた。その後トリス緩衝液 pH7.4 (ヤトロン、ニチレイバイオサイエンス社) で各 5 分 4 回洗浄した。二次抗体 (ヒストファイン・シンプルステイン MAX-P0 (M) を掛け、37°Cの恒温槽で 1 時間置いた。その後トリス緩衝液 pH7.4 (ヤトロン社) で各 5 分 4 回洗浄した。その後、DAB (同仁化学研究所) で 10 分間発色させた。その後、脱水、透徹、封入して顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

##### 組織型の分類

陰茎癌の症例の年齢は、35 から 82 歳であり、平均年齢は、59.4 歳であった。陰茎癌 20 症例の内、17 症例は、角化型扁平上皮癌であり、3 症例は、非角化型扁平上皮癌であった。

##### 陰茎癌の中の HPV-DNA

陰茎癌全体の中の HPV-DNA の陽性率は、20 症例中、14 症例が陽性であり、70%の陽性率であった。陰茎癌の角化扁平上皮癌 17 症例中 13 症例が陽性であり、陽性率は、76.5%であった。他方、非角化扁平上皮癌 3 症例中 1 症

例が陽性であり、陽性率は、33.3%であった (図 1. A & B)。

##### 免疫染色における各種の反応

HPV-DNA 陽性例で、NF- $\kappa$ B の陽性率は、92.9%であった。他方、HPV-DNA 陰性例で、NF- $\kappa$ B の陽性率は、16.7%であった (図 1. C)。LEFTY は、TGF- $\beta$  の類似遺伝子群の一つである。TGF- $\beta$  は、陰茎癌で 100%陽性であった。しかしながら、HPV-DNA 陽性例において LEFTY は、92.9%陽性であった。他方、HPV-DNA 陰性例において LEFTY は、50%陽性であった。癌抑制遺伝子 p40 は、最近発見された癌抑制遺伝子 p53 の一族である。陰茎癌において p40 遺伝子の変異は、100%陽性であった (図 D)。しかしながら、p53 遺伝子の変異は、70%陽性であった。このことは、陰茎癌において、p40 遺伝子の変異は、p53 の変異と比較して、陰茎癌の扁平上皮癌により特異的であると考えられた。TLR-5、TLR-9 (図 1. E)、p40、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (図 1. F)、interleukin (IL)-33、transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 、matrix metalloproteinase (MMP)-2、MMP-9、AKT、intracellular adhesion molecule (ICAM)-1、vascular endothelial growth factor (VEGF)、macrophage migration inhibitory factor (MIF) などの物質の陽性率は、HPV-DNA 陽性、および HPV-DNA 陰性で、差異は、認められなかった。これらの遺伝子は、転写因子 NF- $\kappa$ B によって主に調節されている。結論として、陰茎癌における NF- $\kappa$ B の出現は、HPV 感染陰性例よりも HPV 感染陽性例において多く出現していた。

##### 結果の総括

癌抑制遺伝子は、癌の発生を抑制する機能を持つ遺伝子である。そのため癌抑制遺伝子に変異が起ると癌が発生する。特に有名な癌抑制遺伝子が p53 遺伝子である。p40 は、p53 癌抑制遺伝子のファミリーの 1 つである。本研究において、p53 不活化は、20 例中 14 例 (70%) であったが、p40 不活化では、20 例中 20 例 (100%) であり、明らかに陰茎癌に対して特異性が高いと言う結果を示した。

転写因子 NF- $\kappa$ B は、急性および慢性炎症、細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの生理現象に関与している。NF- $\kappa$ B 活性化と、これに続くサイトカイン、ケモカイン、成長因子の産生とアポトーシスの抑制は、発癌、癌進行と癌転移において重要な役割を担っている。陰茎癌における転写因子 NF- $\kappa$ B の出現は、HPV 感染陰性例では、10%であり、HPV 感染陽性例では、100%であった。したがって、HPV 感染の陰茎癌において、NF- $\kappa$ B が、より活性化される。Toll-like 受容体 (TLRs) は、炎症によって誘発された発癌のために NF- $\kappa$ B 活性化のためのシグナル伝達開始の可能性がある。TLRs は、NF- $\kappa$ B の主要なアクチベーターの一つで、微生物感染に応答する受容体である。NF- $\kappa$ B は、HPV を伴った癌の進行の間、

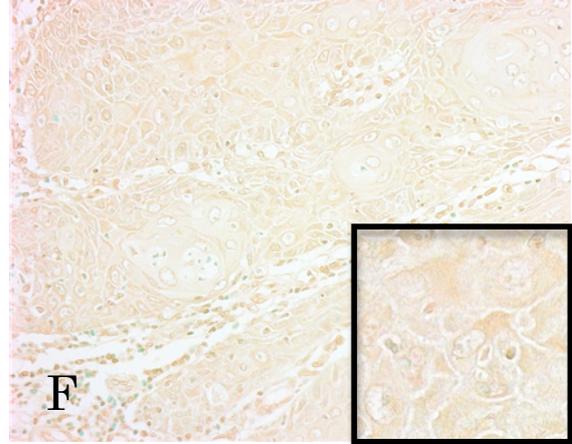
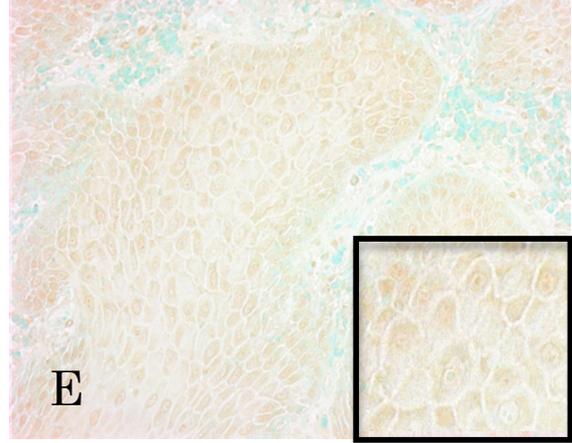
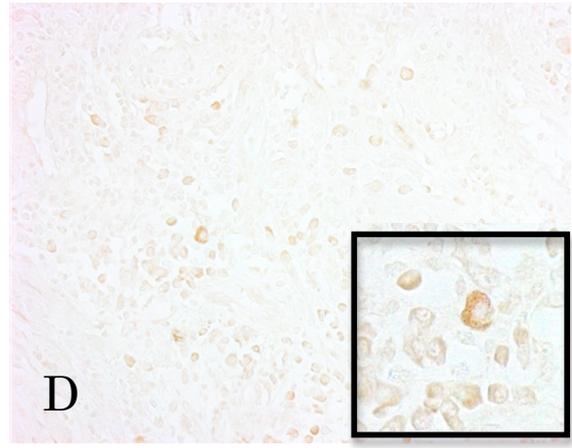
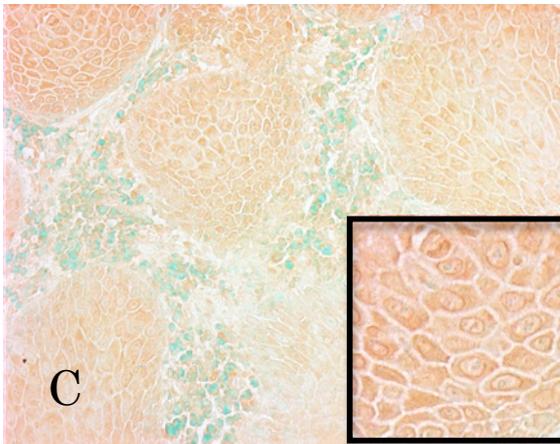
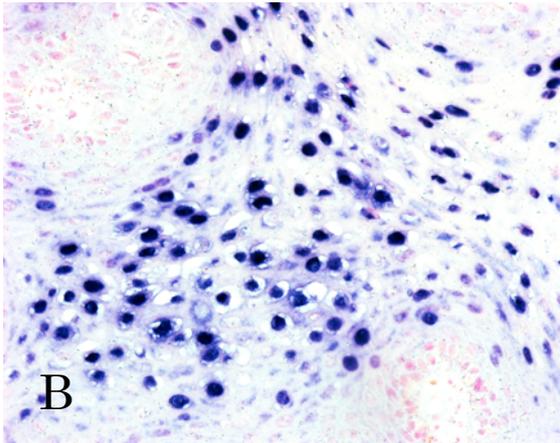
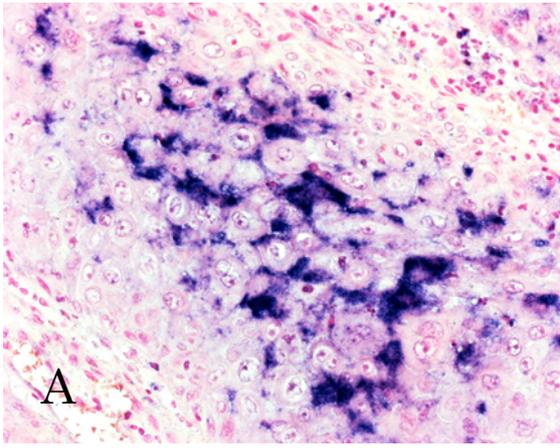


図 1. A: 陰茎癌（悪性腫瘍）組織中のヒトパピローマウイルス（紫黒色）（インサイツ・ハイブリダイゼーション（ISH）法）。B: コンジローマ（良性腫瘍）組織中のヒトパピローマウイルス（紫黒色）（インサイツ・ハイブリダイゼーション（ISH）法）。C: 陰茎癌組織中における  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の発現（免疫組織化学法）。

図 1. D: 陰茎癌組織中における p40 の発現（免疫組織化学法）。E: 陰茎癌組織中の TLR-9 の発現（免疫組織化学法）。F: 陰茎癌組織中における  $\text{TNF}\alpha$  の発現（免疫組織化学法）。挿入写真は、各写真の拡大である。

継続的に活性化される。NF- $\kappa$ Bは、陰茎癌の組織中に77%認められ、他方TLR-9は、86%に認められた。TLR-9は、NF- $\kappa$ Bと比較して若干発現が高い結果が得られた。

腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF) は、サイトカインの一種である。このTNF- $\alpha$ のシグナルが、発癌を促すことで知られているNF- $\kappa$ Bを活性化して癌化が進展する。陰茎癌の組織中にTNF- $\alpha$ は、86%陽性であり、発癌への関与が考えられた。

#### <引用文献>

1. Pisani P, Parkin DM, Munoz N, Ferlay J.: Cancer and infection: Estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6: 387-400, 1997.
2. Hausen H. Papillomavirus and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2: 342-350, 2002.
3. Damania B. DNA tumor viruses and human cancer. *Trends Microbiol*, 15: 38-44, 2007.
4. Senba M, Mori N, Wada A: Oncogenesis of human papillomavirus (HPV). In: Tao HE, editor. *DNA Tumor Viruses*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 75-102, 2009.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Ishikawa C, Senba M, Barnes BJ, Mori N. Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T cells. *Int J Oncol*, 2015, in press, IF: 2.773 査読有
2. Mori N, Ishikawa C, Senba M. Activation of PKC- $\delta$  in HTLV-1-infected T cells. *Int J Oncol*, 2015 Apr;46(4):1609-18. doi: Apr; 46(4):1609-18. Doi: 10.3892/ijo.2015.2848. Epub 2015 Ja 26. IF: 2.773 査読有
3. Tun MM, Aoki K, Senba M, Buerano CC, Shirai K, Suzuki R, Morita K, Hayasaka D. Protective role of TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci Rep*, 2014 Jun 18;4:5344. doi: 10.1038/srep05344. IF: 5.078 査読有
- 4 Adachi K, Nakamura R, Osada Y, Senba M, Tamada K, Hamano S. Involvement of IL-18 in the Expansion of Unique Hepatic T Cells with Unconventional Cytokine Profiles during *Schistosoma mansoni* Infection. *PLoS One*, 2014 May 13;9 (5): e96042. doi: 10.1371/journal.pone.0096042. eCollection 2014. IF: 3.730 査読有
5. Kimura R, Rokkaku T, Takeda S, Senba M, Mori N. Cytotoxic effects of fucoidan nanoparticles against osteosarcoma. *Mar Drugs*, 2013, 11 (11): 4267-4278. IF: 3.978 査読有
6. Ishikawa C, Tanaka J, Katano H, Senba M,

Mori N. Hippuristanol reduces the viability of primary effusion lymphoma cells both in vitro and in vivo. *Mar Drugs*, 2013, 11 (9): 3410-3423. IF: 3.978 査読有

7. Kimura R, Senba M, Cutler SJ, Ralph SJ, Xiao G, Mori N. Human T-cell leukemia virus type I Tax-induced I $\kappa$ B- $\zeta$  modulates Tax-dependent and -independent gene expression in T cells. *Neoplasia*, 2013, 15(9): 1110-1124. IF: 5.470 査読有
8. Rokkaku T, Kimura R, Ishikawa C, Yasumoto T, Senba M, Kanaya F, Mori N. Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. *Int J Oncol*, 2013; 43: 1176-1186. IF: 2.657 査読有
9. Bao LQ, Huy NT, Kikuchi M, Yanagi T, Senba M, Shuaibu MN, Honma K, Yui K, Hirayama K. CD19(+) B cells confer protection against experimental cerebral malaria in semi-immune rodent model. *PLoS One*, 2013 May 28;8(5):e64836. IF: 3.730 査読有
10. Wada A, Wong PF, Hojo H, Hasegawa M, Ichinose A, Llanes R, Kubo Y, Senba M, Ichinose Y. Alarin but not its alternative-splicing form, GALP (Galanin-like peptide) has antimicrobial activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013; 434(2): 223-227. IF: 2.460 査読有
11. Ishikawa C, Kawakami H, Uchihara JN, Senba M, Mori N. CD69 overexpression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivation. *Biochem Biophys Acta - Molecular Cell Research (BBA-Mol Cell Res)*, 2013; 1833(6): 1542-1552. IF: 5.538 査読有
12. Senba M, Mori N. Mechanisms of viral immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev*, 2012; 6: 135-144, Review 査読有
13. Senba M, Kawai K, Mori N. Pathogenesis of metastatic calcification and acute pancreatitis in adult T-cell leukemia under hypercalcemic state. *Lukemia Res Treatment*, 2012, 2012; e128617, 9 pages, Review, Special issue on "HTLV-1 infection and its associated diseases". 査読有
14. Shimokawa C, Kabir M, Taniguchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali IK, Sobuz SU, Senba M, Hout E, Haque R, Petri WA Jr, Hamano S. *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *J Infect Dis*, 2012; 206: 744-751, IF: 6.288

査読有

〔学会発表〕(計 5件)

1. 千馬正敬：陰茎癌におけるヒトパピローマウイルス感染と生体内反応. 熱帯医学同門会、長崎市、京華園、2015. 2. 14.
2. Bao LQ, Huy NT, 菊池美穂子、柳哲雄、千馬正敬、Nasir SM, 本間季里、由井克之、平山謙二：マラリア感染と治療を繰り返すことにより制御性のCD19陽性B細胞が生じ実験的脳マラリアの発症が抑制される. 第54回日本熱帯医学会、長崎市、ブリックホール、2013. 10. 3~10. 5.
3. Tun MM, Hayasaka D, Aoki K, Senba M, Shirai K, Suzuki R, Morita K: TNF- $\alpha$  and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection. 第61回日本ウイルス学会、神戸市、神戸ポートピアホテル、2013. 11. 10~11. 12.
4. Hamano S, Shimokawa C, Kabir M, Tanuuchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali IKM, Sobuz SU, Senba M, Haupt E, Haque R, Petri WA Jr.: Entamoeba moshkovskii is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitiss in mice. Third International Conferances on Neglected Tropical Doseases. Dhaka, Bangladrsh, 2012. 9. 1.
5. Bao LQ, Huy NT, Kikuchi M, Yangai T, Senba M, Shuaibu MN, Honma K, Hirayama K: CD19(+) B cell confer protection against experimental cerebral malaria in semi-immune rodent model. The 6th Nagasaki Symppsium on Tropical Emerging Infectious Diseases. Nagasaki, Nagasaki University, 2012. 12. 10. ~12. 125

〔図書〕(計 2件)

1. Senba M, Mori N. Pathogenesis of Kaposi sarcoma associated with human herpesvirus-8 infection. In: Viktorsson K, editor. Advancements in cancer research. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012; 105-132, eBook. ISBN: 978-1-61470-260-3
2. Senba M, Mori N. Pathogenesis of Kaposi sarcoma associated with human herpesvirus-8 infection. In: Viktorsson K, editor. Advancements in cancer research. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012; 105-132, Hardcover Book. ISBN: 978-1-61470-252-8

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千馬 正敬 (SENBA, Masachika)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号： 60216562