

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791711

研究課題名(和文) ディフェンシンのコピー数多型による子宮頸癌発症リスクの解明

研究課題名(英文) Copy number variations of DEFB gene and the risk of cervical carcinoma

研究代表者

山崎 健太郎 (YAMASAKI, KENTARO)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号：90380899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：1) DEFB4 コピー数について子宮頸癌群とコントロール群とで比較検討し、DEFB4 コピー数の減少は子宮頸癌の発症リスクの上昇に関連していることを報告した。2) 初診時のHPV-DNA型検査は、NILMもしくはASC-US症例における子宮頸部細胞学的所見のその後の進行を予測しうるマーカーである可能性がある。

研究成果の概要(英文)：1) DEFB4 CNV was observed in both cervical cancer and healthy control groups, and a lower DEFB4 copy number may be associated with susceptibility to cervical cancer, which is a population at high-risk of persistent oncogenic HPV infection. We found CNV of DEFB4 to be an additional host genetic susceptibility factor of cervical cancer. Further studies are required to determine the reproducibility of our findings in larger patient groups and different study populations.

2) we confirmed that common oncogenic HPV infection is associated with a higher risk of progression of cytological findings 2 years later in Japanese women with NILM or ASC-US; of these infections, HPV-16 was found to have a higher risk of progressive cytological findings than HPV-52. Therefore, the initial HPV-DNA genotype might be a potential predictive marker of later progression of cytological findings in the uterine cervix in Japanese women with NILM or ASC-US.

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：子宮頸癌 HPV DEFB cytology 多型

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の発症に HPV ハイリスク型の持続感染が関与していることは、すでに報告されている。長崎においても、子宮頸癌および子宮頸部異形成の患者における、感染している HPV-DNA 型の疫学的調査により、HPV16 型に次いで 52 型が多く検出されることを明らかにしてきた(Yamasaki et al., 2011)。□しかし、この HPV 感染の自然史は必ずしも明らかではなく、世界の各地域の子宮頸癌患者で見つかる HPV-DNA 型の分布に若干の違いがあることや宿主によって持続感染の成立頻度に違いがあったり、子宮頸癌発症のリスクに差があることについて、理由ははっきり分かっていない。持続感染が成立するかしないかを分ける要因としては、1) 接触したウイルス量の違い、2) HPV-DNA 型の違いによる感染力の差、3) 宿主側の HPV 排除に働く免疫応答の違い、などの宿主側(ヒト)とウイルス側両方の要因が関連しているものとする。ウイルス側の要因としては、HPV-DNA 型によって、感染力や子宮頸癌への進展リスクが異なる事が報告されているが、そのリスクがウイルス側からのみ判断できないことは、世界各地において見つかる HPV-DNA 型の頻度が異なる事からも推定される。宿主側の要因としては、ウイルス感染防御の免疫機構と関連する遺伝子多型の存在が考えられる。妊婦における HPV-DNA 型の分布に関する疫学的調査では、妊娠三半期に HPV 感染率が異なる事などから宿主側要因の関与が考えられる(Yamasaki et al., 2011)。

2. 研究の目的

(I) ディフェンシンのコピー数多型の違いが子宮頸癌群および子宮頸部異形成群と正常対照群で異なる事を検証する：
長崎大学産婦人科では子宮頸癌および子宮頸部異形成例の感染 HPV-DNA 型と症例の宿主側要因を探る目的で採取した、患者 DNA が約 1,300 例分が集積されている。これらを用いて、子宮頸癌および異形成の群 200 例と正常対象群 200 例についてディフェンシン遺伝子群のコピー数多型をそれぞれ計測した。このデータを 2 群間の比較にとどまらず、感染 HPV-DNA 型別にも行い、ディフェンシン遺伝子群のコピー数多型と HPV 感染および子宮頸癌発症と異形成発生の関連について検討した。

(II) 子宮頸部細胞診所見が NILM もしくは ASC-US における発癌性 HPV 感染とその後の子宮頸部細胞診所見の推移との関連を解析する：
発癌性 HPV には主要な 16 種類の型 (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) が存在し、HPV16 型は子宮頸癌の約 70% より検出されるため、子宮頸癌の発症リスクが他の型よりも高い可能性が示唆されている。子宮がん検診を受ける一般集団で最も多

い細胞診所見は NILM/ASC-US であるが、感染している HPV 型による子宮頸癌発癌リスクの相違はあまり知られていない。2007 年から 2011 年の期間に、子宮頸部細胞診および HPV 型検査を行い NILM あるいは ASC-US と診断され、かつ発癌性 HPV 陽性の 319 例を対象とし、2 年後の細胞診所見の推移について検討した。

3. 研究の方法

(I) ディフェンシンのコピー数多型の違いが子宮頸癌群および子宮頸部異形成群と正常対照群で異なる事を検証する：

本研究は、長崎大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会の承認と患者の同意を得て行われた。2006 年 8 月から 2009 年 12 月までの期間に、長崎大学病院とその協力施設を受診した子宮頸癌 204 例(子宮頸癌群)と健康女性 200 例(コントロール群)を対象とした。両群の患者背景として、年齢、Body Mass Index (BMI)、分娩歴、喫煙歴や低用量ピル長期内服歴について、SPSS バージョン 19 を用いて t 検定あるいは² 検定による統計学的解析を行った。p 値が 0.05 未満の場合に両群間に有意差ありと判定した。コピー数多型を有する *DEFB4* を標的遺伝子とし、ヒトゲノム中に必ず 2 コピー存在するアルブミン遺伝子 (*ALB*) を基準の遺伝子として選択した。*ALB* および *DEFB4* それぞれの primer と Taqman probe を設計した。*ALB* が 2 コピーかつ *DEFB4* が 3 コピーのゲノム DNA をもとに、*DEFB4* がそれぞれ 2、3、4、5、6、7 および 8 コピーのものをそれぞれ同定して検量線を作成した。Comparative cycle threshold (CT) 法による相対定量を行い、各検体の *DEFB4* コピー数を測定し統計学的解析を行った。SPSS バージョン 19 を用いて t 検定を行い、p 値が 0.05 未満の場合に両群間に有意差ありと判定した。

(II) 子宮頸部細胞診所見が NILM もしくは ASC-US における発癌性 HPV 感染とその後の子宮頸部細胞診所見の推移との関連を解析する：

子宮頸部細胞診所見が NILM もしくは ASC-US である女性において、発癌性 HPV 感染とその後の細胞診所見の関連については未だ不明である。本研究では、日本人における発癌性 HPV 型検査の臨床的有用性を調査した。初回に HPV-DNA 型検査および子宮頸癌検診を実施し、NILM あるいは ASC-US と診断された 319 例を対象とし、その 2 年後の子宮頸部細胞診の結果を調査した。細胞診所見が進行したものを“進行群”、軽快もしくは変化しなかった群を“非進行群”とした。また、初回の HPV-DNA 型により、発癌性 HPV に感染していたものを発癌性 HPV、非発癌性 HPV に感染していたもの非発癌性 HPV 群および HPV 感染を認めなかったものを HPV 非感染群と

分類した。SPSS software version 19 を用いて統計解析し、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(I) ディフェンシンのコピー数多型の違いが子宮頸癌群および子宮頸部異形成群と正常対照群で異なる事を検証する：

年齢、BMI、分娩歴、喫煙歴および低用量ピル内服歴について、子宮頸癌群とコントロール群とでは有意差は認められなかった。子宮頸癌群における *DEFB4* コピー数の平均値（標準偏差）は 4.25 (1.25) コピーであった。一方、コントロール群におけるそれは 4.69 (1.45) コピーであり、両群間に有意差を認めた ($p=2.77e-4$, t-test)。 *DEFB4* 遺伝子が 4 コピー以下の集団のオッズ比 (95%信頼区間) は 2.02 (1.36-3.02) であり、5 コピー以上の集団のオッズ比は 0.49 (0.33-0.74) より相対的に高い値を示した。有意水準 5% で両群間に有意差を認めた。これまで宿主側要因として、HLA class II 領域などの SNPs と子宮頸癌との関連が報告されている。本研究では、新たに *DEFB4* コピー数の減少と子宮頸癌の発症リスクとの関連を見出し、*DEFB4* のコピー数多型が子宮頸癌の発症リスクと関連する宿主遺伝的要因であることを報告した。すなわち、*DEFB4* コピー数の減少は、その発現量の低下につながり、HPV 感染に対する防御作用が低下することに起因していると推察される。*DEFB4* の作用機序は未だ解明されていないが、*DEFB4* コピー数は 8p23.1 領域にクラスターを形成する他の *-defensin* 遺伝子群のコピー数とも関連しており、*DEFB4* 以外の *DEFB103*、*DEFB104*、*DEFB105*、*DEFB106* および *DEFB107* の遺伝子発現量も子宮頸癌の発症リスクに関与している可能性がある。また、コピー数多型には人種差や地域差が存在する事も報告されており、地域や人種差を考慮した大規模研究を行うことも必要である。また、ゲノムワイド関連解析や exome 配列解析による情報を加えることで、ウイルス側要因と宿主側要因の相互作用が明らかになる可能性がある。以上、私どもは *DEFB4* コピー数について子宮頸癌群とコントロール群とで比較検討し、*DEFB4* コピー数の減少は子宮頸癌の発症リスクの上昇に関連していることを報告した。

(II) 子宮頸部細胞診所見が NILM もしくは ASC-US における発癌性 HPV 感染とその後の子宮頸部細胞診所見の推移との関連を解析する：

発癌性 HPV 感染群では、非発癌性 HPV 感染群 (relative risk 3.827; 95% CI: 1.282–11.422) や HPV 陰性群 (relative risk 2.124; 95% CI: 1.451–3.110) と比較して、2 年後の細胞学的所見が進行する相対リスクは有意に高かった。HPV-16 感染群では、

HPV-52 感染群 (relative risk 2.094; 95% CI: 1.005–3.935) と比較して、2 年後の細胞学的所見が進行する相対リスクは有意に高かった。更に、2 年後の HPV-16 感染例における細胞学的所見の進行の相対リスクは、HPV-52 感染例に比べて高かった (相対リスク 2.094、95% CI: 1.005 から 3.935)。そのため、初診時の HPV-DNA 型検査は、NILM もしくは ASC-US 症例における子宮頸部細胞学的所見のその後の進行を予測しうるマーカーである可能性がある。

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 8 件)

1. Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, and Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *Journal of Human Genetics*. 2011;56:296-299.
2. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, and Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *Journal of Human Genetics*. 2011;56:313-315.
3. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2011;37:1666-1670.
4. Yamasaki K, Miura K, Abe K, Masuzaki H. Aggressive ovarian plasmacytoma resistant to radiation and chemotherapy. *ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA* 2013; 58:9-12.
5. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura KI, and Masuzaki H. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenatal Diagnosis* 2013; 33:214-222.
6. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura KI, and Masuzaki H. Copy

number variation of the antimicrobial-gene, *defensin beta 4*, is associated with susceptibility to cervical cancer. J Hum Genet. 2013; 58:250-253.

7. Miura K, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Yamasaki K, Abe S, Hasegawa Y, Kaneuchi M, Yoshida A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. Prenat Diagn. 2014;34:345-349.
8. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI and Masuzaki H. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. Journal of Human Genetics (in press).

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 三浦清徳、山崎健太郎、平木宏一、増崎英明:全胎状奇胎特異的 microRNA の同定とその臨床応用に関する検討
第 50 回日本婦人科腫瘍学会(2011.7.22-24、札幌コンベンションセンター、札幌)
2. 三浦清徳、長谷川ゆり、東島 愛、城 大空、阿部修平、三浦生子、山崎健太郎、吉田敦、吉村秀一郎、吉浦孝一郎、増崎英明:全胎状奇胎特異的 microRNA の網羅的解析 第 63 回日本産科婦人科学会(2011.8.29-3、大阪国際会議場、大阪)
3. 三浦清徳、東島愛、長谷川ゆり、阿部修平、築山尚史、三浦生子、山崎健太郎、吉田敦、増崎英明:胎盤特異的 mRNA に関連すると推定される microRNA の網羅的解析
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会(2013.5.10-12、ロイトン札幌、札幌)
クあいち,名古屋)

〔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 1 件)

名称：胎盤機能の網羅的かつ非侵襲的評価方法および検査用試薬

発明者：三浦清徳、増崎英明、新川詔夫、吉浦孝一郎、山崎健太郎、三浦生子
権利者：国立大学法人 長崎大学
種類：特許取得
番号：特許第 5487555 号
取得年月日：2014 年 3 月 7 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gyneclogy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎健太郎 (YAMASAKI KENTARO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員
研究者番号：90380899

(2)研究分担者

なし()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし()

研究者番号：