

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460411

研究課題名(和文) 子宮頸部腺癌におけるHPV感染と遺伝子異常の検討 - 胃型形質との関係を含めて -

研究課題名(英文) Study of HPV status and genetic abnormality in cervical adenocarcinoma including the association with gastric phenotype of mucin

研究代表者

佐野 孝昭 (Sano, Takaaki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90292581

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)：子宮頸部腺癌89例でのHPV検索の結果、HPV感染は47例(53%)で、うちHPV16型が27例(30%)、HPV 18型が20例(22%)であった。16,18型以外のHPV型は検出されなかった。HPV陰性例は42例(47%)であり、うち11例は胃型腺癌であった。免疫組織学的な胃型形質は、非胃型腺癌でもしばしば陽性であり、HPV感染の有無に関係なく頸部腺癌に広く認められた。HPV陰性腺癌は、消化器の発癌と共通する種々の遺伝子異常(TP53、RAS、GNAS、STK11など)が関連する、ヘテロな集団と考えられ、特定の遺伝子異常を有していないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the result of HPV detection for 89 cervical adenocarcinoma, positive HPV infection was found in 47 cases (53%), of which HPV type 16 and type 18 were 27 (30%) and 20 (22%) cases, respectively. HPV types other than type 16 and 18 were not detected. HPV-negative cases were 42 (47%), 11 of which were gastric type adenocarcinoma. Immunohistochemical gastric feature were often shown in non-gastric type adenocarcinomas, and widely seen in the cervical adenocarcinoma regardless of HPV status. In this study, HPV-negative cervical adenocarcinoma was found to have various genetic abnormalities in common with gastrointestinal carcinogenesis (TP53, RAS, GNAS, STK11 etc.), and was considered to be heterogeneous population and not to have a specific genetic abnormalities.

研究分野：病理学

キーワード：子宮頸部 HPV陰性 腺癌 胃型 遺伝子異常 SMILE GNAS STK11

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は Human papillomavirus (HPV) 感染によって引き起こされる癌で、HPV の感染が発癌には最も重要な因子であり、通常ほとんど (90%以上) の扁平上皮癌は HPV 感染を基に発生する。腺扁平上皮癌に関しては、我々の検討や多くの文献的考察からも、大部分は HPV 関連と考えられ、その発癌機構や生物学的態度は扁平上皮癌とほぼ同様と考えられている。一方で多くの子宮頸部腺癌も HPV 関連と考えられているが、一部の腺癌は HPV とは無関係に発生すると考えられている。我々は扁平上皮癌や腺扁平上皮癌の発がんのメカニズム、病理・細胞学的なマーカーの検索を行ってきたが、これまでの研究の過程で、HPV 陰性の腺癌が存在することは確実であり、この HPV 陰性の子宮頸部腺癌に関しての発がんのメカニズムや原因はこれまでほとんど検討されてきていない。また、近年、子宮頸部腺癌の一部に、胃の幽門腺に類似した胃型粘液を産生する“胃型腺癌”が存在することが明らかとなってきた。この胃型腺癌は子宮頸部の Lobular endocervical glandular hyperplasia を背景に発生するとも言われており、予後不良であるとの報告もある。さらに、この胃型腺癌と HPV 陰性腺癌はほぼ overlap (胃型腺癌 HPV 陰性腺癌) するのではないかと考えられており、いわゆる悪性腺腫もこの HPV 陰性群の一部にはいるものと推測されているが、これらに関する報告は少なく、さらなる検討が必要である。

2. 研究の目的

よって、今回の研究の目的は、これまで蓄積された子宮頸部腺癌の病理組織標本を基に、(1) 子宮頸部腺癌の正確な HPV 感染率の検索と亜型分類、陽性例に関しては HPV 組み込みの有無を検索する。

(2) 免疫染色を基に、子宮頸部腺癌における胃型粘液形質の発現を検索し、“胃型腺癌”の発生率と HPV 感染との関係を明らかにする。

(3) HPV 陰性腺癌の発癌の原因を検索する。HPV 陰性の頸部腺癌は必ずしも単一の遺伝子の異常によって発生するものではないかもしれないが、現在までに他臓器で検索され、治療に応用されている遺伝子異常 (HER2、EGFR、ALK、RAS、p53、BRAF、LKB1、MET など) を中心に検索し、HPV 陰性の頸部腺癌の発癌の重要因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 子宮頸部腺癌検体からの HPV 検索
過去 10 年の間に蓄積された子宮頸部腺癌の病理組織標本を検索し、主として手術によって摘出された検体で、計 89 症例を対象とする。病理組織標本としては過去 20 年近く前の標本も検索可能であるが、10 年以上経過した病

理標本では DNA の変性が進み、DNA 抽出や PCR 反応が不良となる例も多くなることから、10 年以内の症例を中心とする。HPV 検索はパラフィンブロックの薄切標本から DNA を抽出し、多数の HPV 型 (6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 型の 16 亜型) に対応するプライマーを混合した Multiplex PCR 法にて HPV の有無、型判定を行う

(2) 子宮頸部腺癌における胃型粘液と胃型形質の発現検討

胃型腺癌の定義 (Kojima, Mikami et al. Am J Surg Pathol, 2007) に倣い、上記で HPV の有無と型判定の判明した同じ検体を用いて、胃型粘液 (MUC6, MUC5AC, HIK1083 (幽門腺粘液に対する抗体)) に対する抗体を用いて免疫染色を行い。特徴的な病理形態像と合わせて、胃型腺癌を抽出する。また関連する以下の抗体も同時に染色する。

胃十二指腸形質を homeobox 遺伝子産物: PDX1、HNF4A (hepatocyte nuclear factor 4A)

胃型粘液に関連した trefoil peptide: TFF1、TFF2、TFF3

腸型粘液と腸型形質を示す homeobox 遺伝子産物等: MUC2、CD10、CDX2

その他: PAS 染色、Alcian-Blue 染色など。

これらの検討から、胃型腺癌の詳細を明らかにし、特に胃型腺癌は HPV 陰性例に特異的なものであるのか、また HPV 陽性腺癌には胃型粘液や胃型形質は発現しないかどうかを明らかにしたい。また、臨床病理学的データと合わせ、胃型腺癌は予後不良であるとの報告 (Kusanagi et al. Am J Pathol, 2010) も再検証する。

(3) HPV 陰性腺癌の遺伝子異常を検索する

仮に HPV 陰性腺癌の多くが胃型形質を示す胃型腺癌であったならば、HPV 陰性腺癌には胃をはじめとする消化器発癌と類似の遺伝子異常が関与している可能性がある。そこで、消化器癌に代表的な遺伝子異常の検索と、近年の分子標的治療薬と直結する遺伝子異常を中心に検索した。HPV 陰性症例を中心に以下の遺伝子異常の有無を検索し、これらに排他的な関係があるかどうかを明らかにする。

K-RAS、TP53

EGFR: 肺癌においては遺伝子異常が知られ、また大腸癌においては高発現が特徴であり、分子標的治療薬の対象となる。

STK11: STK11 は Peutz-Jeghers 症候群の責任遺伝子で、遺伝子異常を伴う。以前から Peutz-Jeghers 症候群では子宮頸部の悪性腺腫または高分化腺癌が発生しやすいことが知られており、通常の頸部腺癌においても同じ遺伝子異常が起こっている可能性が

ある。

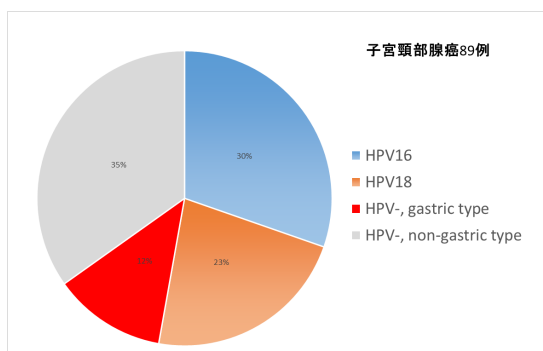
GNAS：近年、膵癌等での遺伝子異常が報告されてきており、子宮頸部においては Lobular endocervical glandular hyperplasia の一部に GNAS の遺伝子異常が報告されていることから、頸部腺癌においても、同様の遺伝子異常が生じている可能性がある。

腫瘍の病理組織ブロックから DNA を抽出し、上記遺伝子を中心とした、次世代シーケンサーによる遺伝子異常の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 子宮頸部腺癌での HPV 検索結果

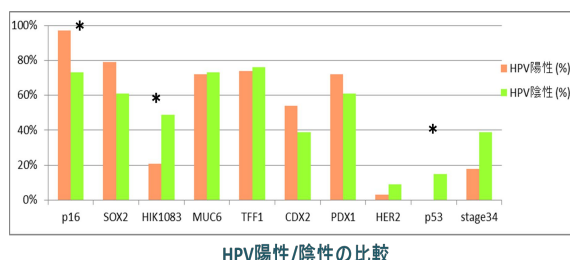
ヒト子宮頸部腺癌 89 例中、HPV 感染は 47 例 (53%) であり、うち HPV16 型が 27 例 (30%)、HPV 18 型が 20 例 (22%) であった。16, 18 型以外の HPV 型は検出されなかった。HPV 陰性例は 42 例 (47%) であり、うち 11 例は胃型腺癌であった (図)。HPV18 陽性群は、HPV16 陽性群や非感染群と比べ、有意に平均年齢が低く、細胞増殖能が高かった。HPV DNA の組み込みに関しては、検討まで至らなかった。



(2) 胃型・非胃型腺癌における免疫染色結果と臨床病理学的因子との関係

胃型腺癌は 12% (11/89)、非胃型腺癌は 88% (78/89) と分類された。平均年齢は、胃型腺癌 47.6 歳、非胃型腺癌 45.9 歳であり、有意差は認められなかった。胃型腺癌はいずれの型の HPV も検出されなかった。

リンパ節転移もしくは遠隔転移を示す Stage ~ の進行癌は、胃型腺癌の 64% (7/11) を占めたが、非胃型腺癌では 17% (13/78) にとどまり、有意差が認められた。予後に関する検討は今後の課題である。



胃粘液に対する抗体、胃・腸管の発生に関与する homeobox 遺伝子に対する抗体は、非胃型腺癌でもしばしば陽性となった。HPV 感染と胃型形質に関して、非胃型腺癌 (通常

型) の中でも、胃・腸管への分化傾向を示す腺癌がしばしば存在していた (図)。HIK1083 を除くそれ以外の胃型マーカーの発現は、HPV 感染の有無に関係なくしばしば認められた。よって、胃型形質は、いわゆる形態学的な胃型腺癌にのみ認められる特徴ではなく、HPV の感染によらず、子宮頸部腺癌においてしばしば認められる特徴であることが分かった。

(3) SMILE 病変の検討

子宮頸部腺癌の中から胃型腺癌を抽出する過程で、一部の腺癌や腺扁平上皮癌の上皮内病変中に粘液杯細胞の混在する、分化傾向の不明な病変が存在する症例を経験した。これらは子宮頸部移行帯に発生する Stratified mucin-producing intraepithelial lesions (SMILE) と言われ、異型を伴う重層扁平上皮内に粘液杯細胞が混在するまれな上皮内病変であり、腺系と扁平上皮系の両方向への分化を示すことを特徴とする。SMILE と HPV との関連について詳細はこれまで明らかではなかった。そこで、In situ hybridization (ISH) 法にて HPV の存在の有無と局在を検討し、SMILE 病変中の粘液の性質、分化傾向等を解析した。

症例は 2 例で、いずれも 30 歳代で、円錐切除検体で SMILE を伴う微小浸潤癌と、SMILE を伴う CIN3 と診断された。それぞれ HPV16 型と HPV18 型が陽性であった。組織学的にはいずれも CIN3 病変の上皮内及び腺侵襲部分の一部で、細胞質内粘液を有し印環細胞様の形態をとる異型細胞が上皮の全層にわたり増殖していた。異型粘液杯細胞を含め病変全体に p16 強陽性であった。p40 と Alcian blue の重染色では、異型粘液杯細胞は p40 陰性であるが、粘液細胞以外にも p40 陰性の細胞が多数認められた。よって、SMILE 病変内には、明らかに粘液を産生する腺系細胞、扁平上皮系細胞のほかに、腺系への分化を示す腫瘍細胞もしくはいずれにも分化していない未分化な腫瘍細胞が混在している可能性が示唆された。粘液杯細胞は胃型形質を示さなかった。HPV16/18 型に対する ISH 法を行ったところ、異型扁平上皮細胞核と、粘液杯細胞の核に陽性シグナルが確認された。今回の ISH 法の結果より、SMILE 病変内の粘液杯細胞は HPV 感染を示す腫瘍細胞であることが明らかとなった。ISH 法にて SMILE の粘液杯細胞核に HPV signal を証明できたのは今回の 2 例が初めてと思われる。

(4) HPV 陰性腺癌の遺伝子異常

HPV 陰性例中の 20 例で、次世代シーケンサーを用いての遺伝子解析を行った。これまで、子宮頸部腺癌で報告されている癌遺伝子 (KRAS、GNAS、EGFR、STK11、TP53) を QIAGEN 社の CancerPanel GeneRead システムを用いて解析した。この 20 例には 7 例の胃型腺癌が含まれている。結果 20 例中 4 例は DNA の

劣化が強く、解析が困難であった。16例中いずれの遺伝子異常も認めなかった症例が6例であった。結果、5例がTP53の変異、STK11の変異とGNAS変異がそれぞれ2例ずつ、KRAS変異を1例認めた。胃型腺癌7例に限ると、TP53, STK11, GNASの変異がそれぞれ1例ずつ認められ、4例はすべて陰性であった。一部症例での解析であるが、HPV陰性腺癌は遺伝子異常の観点からみると、種々の遺伝子異常によっておこる、ヘテロな集団と考えられ、特定の遺伝子異常を有していないものと考えられる。また、胃型腺癌という組織型に限局しても、この傾向は同じであった。HPV陰性の子宮頸部腺癌は、消化器の発癌と共通する種々の遺伝子異常によって起こることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shimizu A, Kato M, Takeuchi Y, Sano T, Kaira K, Uezato H, Ishikawa O. Detection of human papillomavirus (HPV) in patients with squamous cell carcinoma and the clinical characteristics of HPV-positive cases. Br J Dermatol, 査読有、171:779-785, 2014
10.1111/bjd.13234

Sano T, Nakamura C, Yoshida T, Oyama T. Stratified mucin-producing intraepithelial lesions (SMILEs) of the uterine cervix are associated with HPV integration. Pathol Int, 査読有、64, 628-630, 2014
10.1111/pin.12217

佐野 孝昭, Human papillomavirus (HPV) 感染と免疫染色. 北関東医学, 査読無、64, 347-348, 2014
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kmj/64/4/_contents/-char/ja/

〔学会発表〕(計 3 件)

中村 千春、本田 周子、矢嶋 尚生、佐野 孝昭、井出 宗則、瀬川 篤記、小山 徹也。Stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE)を伴った子宮頸部病変の2症例。第103回日本病理学会総会(広島国際会議場、広島市) 2014/4/26

高月 寛、田村 晴美、外山 秀人、渡辺 敦子、栗原 康哲、千明 政彦、高野 豊、佐野 孝昭、杉原 志朗。子宮がん検診で経験した stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE)を伴ったCIN3の2症例。第52回日本臨床細胞学会秋期大会(大阪国際会議場、大阪市)2013/11/2

中村 千春、佐野 孝昭、井出 宗則、瀬川

篤記、小山 徹也。子宮頸部腺癌の免疫組織化学的検討-胃型形質の発現について-。第102回日本病理学会総会(ロイトン札幌、札幌市) 2013/6/8

〔図書〕(0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特になし

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