

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861498

研究課題名(和文) HPV 持続感染に関する遺伝的要因の同定

研究課題名(英文) Genomic factor associated with HPV persistent infection

研究代表者

阿部 修平 (ABE, Syuhei)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：50549590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1)本邦における子宮頸癌予防と健診システムを考慮する際にはHPV16型/HPV52型の臨床的意義を解明することが重要であるという結果が得られた。2)ウイルス側要因として、頸管擦過細胞中のHPV16型/HPV52型DNA型判定やウイルス量の判定が子宮頸部細胞診の推移を推定する分子マーカーとして有用である件を示した。3)宿主側要因の新知見として、子宮頸癌とDEFB4コピー数多型との関連を見だし、いずれも子宮頸癌の発症の診断・予防に有用であると考えられた。本研究は今後、次世代シーケンシング法を用いたexome解析およびメチル化アレイ解析を行い、より詳細な宿主側要因の同定に連なることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We obtained three heads of results in this study. (1) When considering the cervical cancer prevention and health check system in Japan, to clarify the HPV genotyping of the HPV16 and HPV52 is important. (2) HPV16 and/or 52 genotyping and viral load of cervical scraping cells are useful as a molecular marker to estimate the changes in the cervical cytology. (3) Latest knowledge of an association between cervical cancer and DEFB4 copy-number variation, it was considered useful for the diagnosis and prevention of the onset of cervical cancer.

This study now performs exome analysis and methylation array analysis using the next-generation sequencing method is expected to be connected to the identification of more host side factors.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮頸癌 コピー数多型 DEFB4 HPV

### 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌発症の分子メカニズムを解明することは、子宮頸癌の予防法、健診システムの確立、さらには新規治療法の開発につながる。現在までに、ウイルス側要因として発癌性ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の持続感染の存在が関与していることが明らかになり、中和抗体価の上昇を誘導する子宮頸癌予防ワクチンの開発につながった。一方、human leukocyte antigen (HLA) class II 領域の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) が HPV に対する感染防御作用と関連していることが報告されるなど、子宮頸癌の発症には宿主側要因も関連していることが示唆されている。そこで、子宮頸癌発症の分子メカニズム解明には、HPV 感染の疫学調査に基づくウイルス側要因と宿主側要因の双方からの総合アプローチが必要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮頸癌発症の分子メカニズムの全容解明を目指して、まず長崎県における HPV 感染の疫学調査を行い、ついで、ウイルス側要因として発癌性 HPV ウイルスの DNA 型判定や定量化の臨床的意義、子宮頸癌と関連する宿主 (ヒト) 側要因の同定について最先端のゲノム解析技術を用いてアプローチした。主な検討項目は以下の3点である。

- 1) **HPV ワクチン導入前の女性を対象とした疫学調査により、ウイルス側要因解析のターゲットウイルス同定と宿主側要因の解析に用いる検体を集積する。**
  1. 子宮頸部細胞診異常例における HPV 感染の実態を調査する (Yamasaki K et al. JOGR 2011)
  2. 妊婦における HPV 感染の実態を調査する (Yamasaki K et al. J Hum Genetics 2011)
- 2) **ウイルス側要因からのアプローチ**
  1. 発癌性 HPV 持続感染例におけるウイルス量と細胞診所見の推移との関連を明らかにする (Hamaguchi D et al. Journal of Medical Virology 2013, 14)。
  2. NILM・ASC-US 例における発癌性 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明らかにする (in submission)。
- 3) **宿主側要因からのアプローチ**
  1. 候補遺伝子アプローチとして、ウイルス感染防御の作用を有する defensin 遺伝子コピー数多型と子宮頸癌との関連を明らかにする (Abe S et al. J Hum Genetics 2013, 8-13)。
  2. ゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study: GWAS) により、子宮頸癌と関連する遺伝子多型を網羅的に同定する (in submission)。

### 3. 研究の方法

本研究は、倫理委員会の承認と患者の同意を得て

施行された。

#### 1) HPV ワクチン導入前の女性を対象とした疫学調査により、ウイルス側要因解析のターゲットウイルス同定と宿主側要因の解析に用いる検体を集積する。

1. 子宮頸部細胞診異常例における HPV 感染の実態を明らかにする: 2007年8月から2009年11月の期間、子宮頸部細胞診異常を指摘された女性 625 例を対象として、Pap smear test、コルポスコピー下狙い組織診および HPV-DNA タイピング検査 (Linear Array HPV Genotyping kit) を実施した。
2. 妊婦における HPV 感染の実態を調査する: 2007年8月から2010年10月の期間、妊婦 151 例を対象として、Pap smear test および HPV-DNA タイピング検査 (Linear Array HPV Genotyping kit) を施行した。

#### 2) ウイルス側要因からのアプローチ

1. 発癌性 HPV 持続感染例におけるウイルス量とその後の細胞診所見の推移との関連解析: 発癌性 HPV 陽性の女性 305 例について、Pap smear test および HPV-DNA タイピング検査による 6 ヶ月間のフォローアップを行い、HPV16 型持続感染 24 例および HPV52 型持続感染 24 例を同定し対象とした。HPV16 型もしくは HPV52 型の DNA ウイルス量と細胞診所見の推移との関連を検討した。内部コントロールはアルブミン遺伝子を用いて、DNA 量はリアルタイム PCR で測定され、HPV ウイルス量は HPV-DNA 量/アルブミン DNA 量で補正して算出された。
2. NILM・ASC-US 例における発癌性 HPV 感染とその後の子宮頸部細胞診所見の推移との関連解析: 2007年から2011年の期間に、Pap smear test および HPV-DNA タイピング検査を行い 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) 宿主側要因からのアプローチ

1. 候補遺伝子アプローチとして、ウイルス感染防御の作用を有する defensin 遺伝子コピー数多型と子宮頸癌との関連解析: 子宮頸癌 204 例 (子宮頸癌群) と健常女性 200 例 (コントロール群) を対象とした。コピー数多型を有する defensin beta 4 遺伝子 (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 コピー数を測定した。統計学的解析には t 検定を用い、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。

- GWAS 解析による子宮頸癌と関連する遺伝子多型を網羅的解析：子宮頸癌と関連する SNPs を同定するため、子宮頸癌 226 例および子宮頸癌非罹患 186 例を対象として、Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affy6.0; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を使用して 500,000SNPs をタイピングして GWAS 解析を施行した。一回目の GWAS 解析の確認検査として、一般集団には Human genome database の SNP データを利用して、子宮頸癌群の SNP データとの GWAS 解析を実施した。

#### 4. 研究成果

- 子宮頸癌ワクチンを接種していない女性を対象とした疫学調査**：性交渉を介した HPV 感染経路の存在と本邦では HPV16 型・52 型の臨床的意義の解明が重要と確認された。
  - 細胞診異常例における HPV 感染の実態調査：長崎県では HPV16 型 (44.3%)、HPV52 型 (20.6%) および HPV58 型 (16.0%) が占める割合が高く、HPV16 型および 18 型が多い欧米の報告と異なっていた (Yamasaki K et al. JOGR2011)。一方、CIN3/SCC 例では HPV16 型あるいは 18 型の単独感染例の割合 (約 70%) が高く、HPV16 型/18 型の子宮頸癌予防ワクチンの有効性も確認された。
  - 妊婦における HPV 感染の実態調査：妊婦では HPV16 型 (29.6%)、HPV52 型 (31.5%) および HPV31 型 (13.0%) が占める割合が高く、妊娠初期には複数感染の占める割合は約 60% であった (Yamasaki K et al. J Hum Genetics 2011)。
- ウイルス側要因からのアプローチ**
  - 発癌性 HPV 持続感染例におけるウイルス量と細胞診所見の推移との関連解析：HPV52 型持続感染群では、細胞診進行群における HPV ウイルス量の中央値は 2.211、細胞診非進行群におけるそれは 0.022 であった ( $p=0.003$ , Mann-Whitney U-tst)。一方、HPV16 型持続感染群では、細胞診進行群における HPV ウイルス量の中央値は 4.206、細胞診非進行群におけるそれは 0.103 であった ( $p=0.001$ )。HPV16 型および HPV52 型のウイルス DNA 定量化は、短期間の細胞診所見の推移を予測する指標になりうると考えられた (Hamaguchi D et al. J Med Virology 2013, 14)。
  - NILM・ASC-US  
NILM および ASC-US 例のうち、初回検診時に発癌性 HPV 陽性群の 2 年後の細胞診所見が進行するリスクは、非発癌性 HPV 陽性群 (relative risk 3.827; 95% CI: 1.282-11.422) あるいは HPV 比感染群 (relative risk 2.124; 95% CI: 1.451-3.110) と比較して有意に高かった。初診時に発癌性 HPV16 型感染群の 2 年後の細胞診所見が進行するリスクは、発癌性 HPV52 型感染群と比較して有意に高かった (relative risk 2.094; 95% CI: 1.005-3.935)。

NILM および ASC-US 例における初回の検診時の HPV-DNA 型は、その後の細胞診所見の推移を予測する指標となりうることを示唆された (in submission)。

#### 3) 宿主側要因からのアプローチ

- DEFB4 コピー数多型と子宮頸癌との関連解析：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 (標準偏差値) 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である 0.49 (0.33-0.74) より相対的に高かった。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いだした。すなわち、DEFB4 コピー数の減少は、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考えられた (Abe S et al. J Hum Genet 2013, 8-13)。
- GWAS 解析による子宮頸癌と関連する遺伝子多型の網羅的解析：初回の GWAS 解析により、子宮頸癌群と非罹患群とを比較して 89 個の SNPs について子宮頸癌との関連が示唆された ( $p$  値  $<10^{-4}$ )。ついで、確認検査に用いる異なる一般集団として Human Genome Variation Database で得られる SNP データと比較した 2 回目の GWAS 解析を行い、2 個の SNP (rs621310 および rs11653282; 初回の GWAS 解析における  $p$  値はそれぞれ  $6.24 \times 10^{-5}$  および  $6.69 \times 10^{-5}$ ) と子宮頸癌との関連が確認された (それぞれ  $p$  値  $3.90 \times 10^{-4}$  および  $7.57 \times 10^{-5}$ )。今回同定された 2 個の SNPs (rs621310 および rs11653282) は、子宮頸癌発症へ関与している遺伝子と示唆された (in submission)。

#### 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 3 件)

- Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura K, Masuzaki H. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. J Hum Genet. 2014 May;59(5):251-5. Epub 2014 Feb 13. 査読有。
- Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki

K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. J Hum Genet. 58(5): 250-3. 2013.査読有

3. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. J Med Virol. 85(12): 2093-100. 2013.査読有

〔学会発表〕(計 2件)

1. 阿部 修平、三浦 清徳、金内 優典、増崎 英明  
発癌性ヒトパピローマウイルス感染と細胞診所見  
(NILM あるいは ASC-US) の推移との関連、日本婦人科腫瘍学会、栃木県総合文化センター(栃木県)、2014年7月17日~19日
2. 阿部 修平、三浦 清徳、東島 愛、河野 通晴、山崎 健太郎、三浦 生子、小寺 宏平、藤下 晃、鮫島 哲郎、布施 正樹、村上 誠、池本 理恵、増崎 英明  
ヒトパピローマウイルス 16 型および 52 型感染細胞の 2 年後の所見、第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区) 2013 年 7 月 19~21 日

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 修平 ( ABE, Syuhei )

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
助教

研究者番号：50549590