

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461674

研究課題名(和文) 新しい手法を用いたヒト乳頭腫ウイルスによる皮膚病変の発症機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of pathogenic mechanism of human papilloma virus; related skin neoplasm by using new strategies.

研究代表者

金子 高英 (KANEKO, TAKAHIDE)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20333718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HPV関連皮膚腫瘍のサンプルの蓄積・保存を施行し、サンプルのDNAを採取、smartAmpによるHPVウイルスの感染の有無を検討、シーケンスによるHPVの型判定・タイピングを施行。APOT assayによるHPVの染色体への挿入の判定を随時遂行した。病変の癌関連遺伝子の網羅的検索は次世代シーケンサーを用い、TruSeq Amplicon Cancer Panelで癌関連遺伝子を増幅・変異を検索、臨床組織学的特徴や予後との比較検討をした。DNAバイスルファイト処理化にてHPVメチル化の測定、難治性良性病変へのHPV染色体挿入の確認をAPOT assayで追加解析した。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this research are to analyze the mechanisms of carcinogenesis related to human papilloma virus infection. In HPV-related skin neoplasms, we elucidated the typing of high-risk HPV, the insertion of HPV to chromosome, the relationship between pathophysiology and mutation of cancer-associated gene by using new strategies including smartAmp, APOT assay and TruSeq Amplicon Cancer Panel. Also, we analyzed that how the metylation of HPV influence pathophysiology of HPV-related skin neoplasms.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乳頭腫ウイルス 悪性腫瘍 DNA

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の関連する悪性や良性の皮膚病変は多いが、HPV の感染から発症に至る機序に関しては不明な点も多い。

2. 研究の目的

1) HPV 関連皮膚悪性腫瘍病変で、高リスク HPV の型、染色体へ HPV の挿入、癌関連遺伝子の変異の病変形成への関与、2) 難治性良性病変での低リスク HPV の染色体への挿入や癌関連遺伝子の変異、3) HPV のメチル化の病態への影響、の3点を新しい手法を用いて解明し、HPV 感染による皮膚腫瘍発生のメカニズムの解明に迫ることである。

3. 研究の方法

立案した実験は以下の通りである。

(1) 症例の蓄積とサンプルの追加保存

HPV が関連すると考えられるボーエン病、ボーエン様丘疹症、疣状癌、難治性の疣贅、その他有棘細胞癌などから生検を行い、DNA 採取、RNA 採取、凍結サンプルを追加し症例数を増やす。

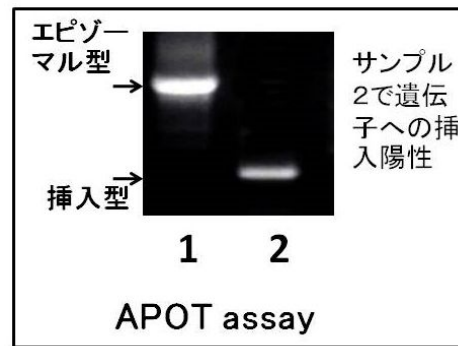
(2) HPV ウイルス型の迅速診断

PCR を用いて HPV の L1 領域を PCR で増幅して、その部のシーケンスをおこなうことにより HPV の型を決できるが、非常に多く (100 以上) の型が報告され、型間で相違点の少ないケースも多く、さらに PCR による増幅エラーも問題である。そこで、最新の PCR 法である smartAmp 法を採用した。本法は、プライマーを 5 本使用し DNA への特異性を高めるのが特徴。さらに新規 Aac DNA polymerase は、一定温度で二本鎖 DNA を解離しつつ、新しい DNA 鎖を合成することが可能な酵素であり、反応時間も 30 分と短く、ミスマッチ増幅エラーは抑制される。DNA を採取し、本 smartAmp 法にて HPV ウイルスの有無を確認し、さらにシーケンスを行い、HPV のタイプを決定を行うこととした。

(3) HPV の染色体への挿入の判定

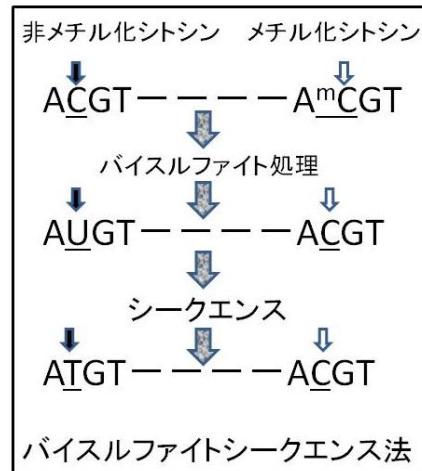
HPV は通常エピソードな状態で核に存在するが、癌化などの時は染色体に挿入がおこる。それを検出するための手段が、amplification of papillomavirus oncogenic transcript (APOT) assay である。染色体への挿入がおこると HPV 遺伝子決失がおき、またヒトの染色体の配列も mRNA の中に組み込まれる。その結果、HPV の mRNA を cDNA に逆転写し PCR で増幅すると、エピソードのタイプに比較すると短く、シーケンスを行うとヒトの配列とともに HPV の染色体挿入部がわかる。凍結サンプルから mRNA を採取、oligo-dT プライマーで cDNA を合成し、HPV 特異的プライマーにて増幅しサイズを確認、その後シーケンスにて挿入部位を確認することとした。特にボーエン病、ボーエン様丘疹症なので、それらの変異と、臨床、組織、

経過とに相関性があるか調査することとした。



(4) 病変の癌関連遺伝子の網羅的検索

病変の癌関連遺伝子の変異を検索する場合、正常の組織に由来する配列もあるため、同じ領域をかなりの深さでシーケンスすることが必要となる。近年、パーソナル型の次世代シーケンサーが臨床の領域でも使用が可能になり、当大学の中央研究室にも導入されている。



今回、そのパーソナル型の次世代シーケンサーイルミナ miSeq を用いて、TruSeq Amplicon Cancer Panel にて癌関連遺伝子を増幅し変異を検索することにした。この方法により癌関連遺伝子 48 について検索が可能となる。対象疾患別の変異と、臨床、組織、経過を比較することとした。

(5) HPV のメチル化の測定

HPV の L1 遺伝子と the long control region 領域についてバイスルファイトシーケンスを行う。DNA をバイスルファイト処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変化するがメチル化シトシンは変換されない。その違いをメチル化部位と有無が分かる。

サンプルから DNA を採取、重亜硫酸ナトリウム処理にて一晚処理。通常の PCR を行い、その後シーケンスを行う。バイスルファイト処理をしたもの、しないものの塩基配列を比較して、メチル化の部位を同定。メチル化の有無が、臨床症状、組織、経過などの違いに相関性があるか解析する。

(6) 難治性良性病変での HPV の染色体への

挿入を確認

HPV の染色体癌化には、高リスク型の E6 と E7 が関与し、高リスク型の E6 は p53 蛋白に、E7 蛋白は RB 蛋白に強力に結合して、それらの蛋白を分解してしまう。しかし、低リスク型の E6 や E7 はその活性は弱い。今回、難治性の良性の疣贅などで、低リスク型の HPV が染色体に挿入され、病変が持続されるのではないかと考えた。良性の疣贅などについても、DNA や凍結サンプルを保存し、特に難治性のものについて染色体への挿入について APOT 法を行う。

4 . 研究成果

本研究で予定し実施した計画とその結果内容に関して以下にまとめ記載する。本研究開始当初から施行してきた以下の 3 つの実験は継続的に複数年も実験を遂行してきた。すなわち、1) HPV 関連皮膚腫瘍 (ポーン病、ポーン様丘疹症、疣状癌、難治性疣贅、有棘細胞癌とその亜型) の蓄積およびサンプルの追加保存を前年から引き続き施行した。2) HPV ウイルス型の迅速診断を施行した。すなわち各症例の DNA を採取し、smartAmp による HPV ウイルスの感染の有無の検討したのちに、シークエンスによる HPV の型判定、HPV タイピングも引き続き行った。3) amplification of papillomavirus oncogenic transcript (APOT) assay を用いた HPV の染色体への挿入の判定も継続的に実行してきた。上記の実験に加えて、平成 27 年度から取り組んできた以下の 6 つの実験に関しても追加実験を重ねてきた。すなわち、1) 病変の癌関連遺伝子の網羅的検索、2) HPV のメチル化の測定、3) 難治性良性病変での HPV の染色体への挿入を確認、4) 病変の癌関連遺伝子の網羅的検索をパーソナル型の次世代シーケンサーイルミナミSEQ を用いて、TruSeq Amplicon Cancer Panel にて癌関連遺伝子を増幅し変異を検索、さらに臨床組織学的特徴や臨床的予後経過との比較検討、5) DNA バイスルファイト処理化による HPV のメチル化の測定、6) 難治性良性病変での HPV の染色体への挿入の確認に関して症例数の上乘せ分も amplification of papillomavirus oncogenic transcript assay により追加解析をし、総合的に解析検討した。以上の様に、計画立案した内容に関しては、大きな軌道修正もなくおおむね順調に施行できたものと自己評価している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Matsuzaki Y, Kaneko T, et al. (2 番目 /7 人) Postoperative maxillary cyst presenting as a skin tumour on the cheek. *Eur J Dermatol*, 査読有, 2017; 27(4): 433-434. DOI: 10.1684/ejd.2017.3046
2. Nakajima K, Jin K, Kaneko T, et al. (3/7) Cholesterotic fibrous histiocytoma with no associated dyslipidemia. *Int J Dermatol*, 査読有, 2017; 56: e124-e126. DOI: 10.1111/ijd.12380.
3. 黒川景子, 金子高英: 弘前大学皮膚科における 10 年間の基底細胞癌の統計的検討. *皮膚病診療*, 2017; 39(9):994-1000.
4. Matsui A, Kaneko T, Takiyoshi N, Rokunohe D, Nakano H, Sawamura D: Juvenile temporal arteritis with eosinophilia associated with systemic sclerosis. *Dermatol*. 査読有, 2017; 44(3):e50-e51. DOI: 10.1111/1346-8138.13508.
5. Kaneko T, Rokunohe D, Takiyoshi N, Minakawa S, Nakano H, Sawamura D. Usefulness of ultrasonography in the diagnosis of ischaemic fasciitis. *Clin Exp Dermatol*, 査読有, 2016; 41:502-505. DOI: 10.1111/ced.12834.
6. Minakawa S, Tanaka H, Kaneko T, Matsuzaki Y, Kono M, Akiyama M, Minegishi Y, Sawamura D: Hyper-IgE syndrome with a novel mutation of the STAT3 gene. *Clin Exp Dermatol*. 査読有, 2016; 41(6):687-689. DOI: 10.1111/ced.12865
7. Makita E, Akasaka E, Sakuraba Y, Korekawa A, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D. Squamous cell carcinoma on the lip arising from discoid lupus erythematosus: a case report and review of Japanese patients. *Eur J Dermatol*, 査読有, 2016; 26: 395-396. DOI: 10.1111/ijd.12380.
8. Kaneko T, Korekawa A, Akasaka E, Nakano H, Sawamura D: Amelanotic acral lentiginous melanoma mimicking diabetic ulcer: a challenge to diagnose and treat. *Eur J Dermatol*, 査読有, 2016; 26:107-108. DOI : 10.1684/ejd.2015.2695
9. Kaneko T, et al. (1/6) Primary amelanotic rhabdoid melanoma: a case report with review of the literature. *CaseRep Dermatol*, 査読有, 2015; 10: 292-297. DOI: 10.1159/000441347.
10. Aizu T, Matsui A, Takiyoshi N, Akasaka E, Kaneko T, Nakano H, Sugiura K, Akiyama M, Sawamura D: Elderly-onset generalized pustular psoriasis without a previous history of psoriasis vulgaris. *Case Rep Dermatol*. 査読有, 2015; 7:187-193. DOI: 10.1159/000438505
11. Korekawa A, Kaneko T, et al. (2/11)

- Mycosis fungoides bullosa associated with bullous pemphigoid. *Int J Dermatol*, 査読有, 2015 ; 54: e366-e368.
DOI: 10.1111/ijd.12821.
12. Minakawa S, Kaneko T, Niizeki H, Mizukami H, Saito Y, Nigawara T, Kurose R, Nakabayashi K, Kabashima K, Sawamura D: Case of pachydermoperiostosis with solute carrier organic anion transporter family, member 2A1 (SLC02A1) mutations. *J Dermatol*, 査読有, 2015 ; 42(9): 908-910.
DOI: 10.1111/1346-8138.12974.
 13. Akasaka E, Hakano H, Korekawa A, Fukui T, Nishikawa Y, Kaneko T, Koga H, Hashimoto T, Sawamura D: Anti-laminin gamma1 pemphigoid associated to ulcerative colitis and psoriasis vulgaris, co-existing with distinct autoantibodies to laminin gamma1, type XVII collagen, and laminin 332. *Eur J Dermatol*. 査読有, 2015; 25(2):198-199 .
DOI:10.1684/ejd.2014.2499
 14. 三浦弘行、小野修一、清野浩子、対馬史泰、野田 浩、掛端伸也、藤田大真、藤田 環、高井良尋、金子高英、澤村大輔：上肢皮膚悪性に対するセンチネルリンパ節シンチグラフィ動態像の時間放射能曲線に関する検討。臨床放射線、2015 ; 60 : 1735-1744.
 15. Miura H, Ono S, Shibusani K, Seino H, Tsushima F, Kakehata S, Hirose K, Fujita H, Kakuta A, Aoki M, Hatayma Y, Kawaguchi H, Sato M, Takai Y, Kaneko T, Sawamura D: Contribution of dynamic sentinel lymphoscintigraphy images to the diagnosis of patients with malignant skin neoplasms in the upper and lower extremities. Springerplus, 査読有, 2014; 3: 625.
DOI: 10.1186/2193-1801-3-625.
 16. Minakawa S, Kaneko T, Matsuzaki Y, Akasaka E, Mizukami H, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Mitsuhashi Y, Sawamura D: Case of oculocutaneous albinism complicated with squamous cell carcinoma, Bowen's disease and actinic keratosis. *J Dermatol*. 査読有, 2014;41(9):863-864.
DOI: 10.1111/1346-8138.12597.
 17. Minakawa S, Kaneko T, Rokunohe D, Nakajima K, Matsuzaki Y, Nakano H, Hashimoto T, Sawamura D: Pemphigoid gestationis with prepartum flare. *J Dermatol*. 査読有, 2014;41(9):850-851.
DOI: 10.1111/1346-8138.12576.
 18. Minakawa S, Kaneko T, Fukui T, Sakuraba Y, Aizu T, Korekawa A, Takiyoshi N, Rokunohe A, Moriyama T, Sawamura D: Assessment of a Case of Type Allergy against Human Insulin in a Type 2 Diabetic Patient and Allergic Reactions to Human Insulin in Japan. *Case Rep Clin Med*, 査読有, 2014;3:496-499.
DOI: 10.4236/crcm.2014.38108.
 19. Kaneko T, Takeuchi S, Nakano H, Sawamura D: Intralymphatic histiocytosis with rheumatoid arthritis: Possible association with the joint involvement. *Case Rep Clin Med*, 査読有, 2014;3: 149-152.
DOI:10.4236/ercm.2014.33036.
- [学会発表](計25件)
1. 金子 高英, 牧田 瑛子, 福井 智久, 六戸 大樹, 中野 創, 澤村 大輔: Carcinosarcoma 癌として手術する?肉腫として手術する? Basal cell carcinosarcoma の1治療例と文献的考察. 第32回日本皮膚外科学会総会・学術大会, 2017年
 2. 滝吉 典子, 金子 高英, 萩原 千尋, 中野 創, 澤村 大輔, 矢口 直:基底細胞母斑症候群の1例. 日本皮膚科学会青森地方会第379回例会, 2017年
 3. 原 憲司, 金子 高英, 福井 智久, 滝吉 典子, 中野 創, 澤村 大輔, 野村 和夫: LIPH ダーモスコピーで経時的変化を観察できた hemosiderotic fibrous histiocytoma. 第116回日本皮膚科学会総会, 2017年
 4. 高橋 実か, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: 著明な嚢腫構造を示した poroid hidradenoma -当教室で経験した poroma の統計も含めて-. 第116回日本皮膚科学会総会, 2017年
 5. 金子 高英, 原 憲司, 滝吉 典子, 神可代, 皆川 智子, 中野 創, 澤村 大輔: ダーモスコピーで脳回転様外観を呈した基底細胞癌-基底細胞癌 276例のダーモスコピー所見の検討と共に-. 第33回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2017年
 6. 会津 隆幸, 滝吉 典子, 六戸 亜希子, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: 経過中に多形皮膚萎縮が拡大した菌状息肉症. 第33回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2017年
 7. 福井 智久, 金子 高英, 高橋 実か, 原 憲司, 是川 あゆ美, 滝吉 典子, 赤坂 英二郎, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔, 矢口 直: 巨大びまん性神経線維腫の1例. 日本皮膚科学会青森地方会第376回例会, 2016年
 8. 萩原 千尋, 金子 高英, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔, 野村 和夫: Giant bilateral Becker's nevus の1例. 日

- 本皮膚科学会青森地方会第 376 回例会, 2016 年
9. 金子 高英, 高橋 実か, 原 憲司, 福井 智久, 赤坂 英二郎, 滝吉 典子, 中島 康爾, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔: 腋窩廓清における至適摘出リンパ節個数について. 第 31 回日本皮膚外科学会総会・学術集会, 2016 年
 10. 高橋 実か, 金子 高英, 原 憲司, 福井 智久, 萩原 千尋, 滝吉 典子, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔: 乳癌に対する放射線療法後に発症した血管肉腫. 日本皮膚科学会青森地方会第 375 回例会, 2016 年
 11. 原 憲司, 萩原 千尋, 神 可代, 是川 あゆ美, 赤坂 英二郎, 中島 康爾, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: 臀部に生じた basosquamous cell carcinoma. 日本皮膚科学会青森地方会第 375 回例会, 2016 年
 12. 金子 高英, 黒川 景子, 中野 創, 澤村 大輔: 手掌の Giant cell tumor of soft tissue ~ 既報告例の統計的考察に合わせ ~. 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2016 年
 13. 会津 隆幸, 金子 高英, 滝吉 典子, 松井 彰伸, 中野 創, 澤村 大輔: 再発を繰り返す甲状腺濾胞癌の治療経過中に発症した同時性三重多発悪性黒色腫の 1 例. 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2016 年
 14. 中島 康爾, 是川 あゆ美, 六戸 亜希子, 六戸 大樹, 会津 隆幸, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: 神経周囲浸潤を伴ったケラトアカントーマ. 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2016 年
 15. 滝吉 典子, 金子 高英, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔: 紅皮症化した毛孔性紅色秕糠疹. 日本皮膚科学会青森地方会第 371 回例会, 2015 年
 16. 是川あゆ美, 中島 康爾, 牧田 瑛子, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔, 熊野 高行, 佐藤 正憲: 下眼瞼に結節を形成した霰粒腫. 日本皮膚科学会青森地方会第 371 回例, 2015 年
 17. 会津 隆幸, 金子 高英, 滝吉 典子, 松井 彰伸, 中野 創, 澤村 大輔: 表皮嚢腫より発生した基底細胞癌の 1 例. 第 31 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2015 年
 18. 金子 高英, 六戸 大樹, 牧田 瑛子, 松井 彰伸, 金城 千尋, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔, 鈴木 幸彦, 中澤 満: 眼瞼結膜から発生した扁平上皮癌の 1 例. 第 31 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2015 年
 19. 六戸 大樹, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: Localized involutinal lipatrophy の 2 例. 第 114 回日本皮膚科学会総会, 2015 年
 20. 金子 高英, 赤坂 英二郎, 六戸 亜希子, 六戸 大樹, 皆川 智子, 中島 康爾, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔: 眼窩下神経に神経浸潤した頬部有棘細胞癌の 1 例. 第 30 回日本皮膚外科学会総会・学術大会, 2015 年
 21. 滝吉 典子, 会津 隆幸, 黒川 景子, 六戸 大樹, 赤坂 英二郎, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: Human papillomavirus が検出された陰茎部 Bowen 病の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 368 回例会, 2014 年
 22. 坂本 瑛子, 会津 隆幸, 櫻庭 裕佑, 是川 あゆ美, 赤坂 英二郎, 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔: 有棘細胞癌を合併した円板状エリテマトーデス. 日本皮膚科学会青森地方会第 366 回例会, 2014 年
 23. 金子 高英, 会津 隆幸, 松井 彰伸, 滝吉 典子, 六戸 大樹, 松崎 康司, 中野 創, 澤村 大輔, 北山 眞任, 橋本 浩, 廣田 和美: 複数の神経ブロックを併用して腋窩郭清を施行した重症型表皮水疱症の 1 例. 第 29 回日本皮膚外科学会総会・学術集会, 2014 年
 24. 金子 高英, 中野 創, 澤村 大輔, 原田 研: Ischemic fasciitis の 1 例. 第 65 回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 2014 年
 25. 金城 千尋, 金子 高英, 坂本 瑛子, 櫻庭 裕佑, 六戸 大樹, 中島 康爾, 会津 隆幸, 中野 創, 澤村 大輔, 柳沢 道朗: 右肩甲骨腫瘍で発見された原発不明悪性黒色腫の 1 例. 第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 2014 年
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
金子 高英 (KANEKO, Takahide)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 2 0 3 3 3 7 1 8
- (2) 研究分担者
澤村 大輔 (SAWAMURA, Daisuke)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 6 0 1 9 6 3 3 4