

平成 30 年 6 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20220

研究課題名(和文)HPVインテグレーションと宿主細胞分泌エキソソームによる子宮頸癌発癌機構の解明

研究課題名(英文)An association between HPV integration and exosome

研究代表者

俞 史夏 (Yoo, Saha)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：80625674

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)：子宮頸部初期病変(CIN)から子宮頸癌でHPV型判定検査を施行した279例から初診時にCIN1あるいはCIN2と診断した症例のHPV型、経過を後方視的に解析した。その結果、観察期間中央値35.1か月での病変消失は68.8%、現状維持15%、CIN3への16.3%であった。進展例13例の内訳は16型3例、31型2例、33型1例、35型2例、52型6例、56型1例で、特に16、31、33、35、52型で比較的効率であった。また子宮頸癌細胞株から分泌されるエキソソームを超遠心法で回収する事に成功した。今後エキソソームとHPV型の関係について解析したい。

研究成果の概要(英文)：We followed Japanese patients with CIN1-2 for a mean follow up period of 35.1 months. We detected HPV DNA in cervical samples by PCR method. Over the follow up period, 13 (16.3%) lesions progressed to CIN3, while 55 lesions (68.8%) disappeared and 12 (15.0%) lesions persisted. The genotypes in which lesions progressed were type 16,31,33,35,52,56, respectively. And We extracted exosome from cervical cancer cell lines. We will analyze the association between HPV genotype and exosome.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 HPV エキソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の発生にはヒトパピローマウイルス (Human papilloma virus: HPV) 遺伝子 (特に E6, E7) の宿主遺伝子への組み込みという現象 (integration) が発癌に強く関わっているが、近年 HPV 遺伝子の働きのみならず宿主側の DNA methylation や miRNA 発現の変化といった epigenetic な変化が発癌に重要であることが明らかとなってきた。宿主細胞から分泌されるエクソソームの中にはその miRNA や微小蛋白質が含まれており、子宮頸癌発癌と深く関わっている可能性が高い。そこで我々は HPV ジェノタイプと宿主細胞での変化をエクソソームという観点から解析し、子宮頸癌発癌のメカニズムを解明する事を本研究の目的とした。子宮頸癌は全世界で毎年 50 万人が罹患し、女性の癌による死亡原因の第 2 位である。ほぼ全ての子宮頸癌の進行に HPV 感染が必須であることが広く認められている。HPV は約 8000 塩基対からなる環状二本鎖 DNA をゲノムとしてもつ小型 DNA ウィルスで、ウィルス蛋白がコードされた ORF (open reading frame) と遺伝子発現調整領域 (long control region: LCR) を持つ。ORF は初期遺伝子 (E1, E2, E4, E5, E6, E7) と後期遺伝子 (L1, L2) から成り、特に E6, E7 は発癌に強く関与する。CIN1 の基底細胞の核内では 50 ~ 100 コピーのウィルスゲノムがエクソソーム (細胞のゲノムに組み込まれていない DNA) として存在するが、CIN2-3 では HPV 遺伝子の宿主遺伝子への組み込み (integration) 例がみられるようになり、HPV16、18 型陽性子宮頸癌ではその多くが integration された状態となる。組み込まれた E7 は Rb ファミリー蛋白に結合しその機能を阻害する事が知られている。Rb の主な機能は細胞周期の調節である。主に G1 期から S 期への移行を制御する。Rb は転写因子 E2F と結合し E2F の機能を抑制しているが E7 が Rb と結合すると E2F が遊離し細胞周期が回転する。また RbE2F 結合体は cyclinD/CDK4 の働きにより E2F を遊離するが、E7 は CDK inhibitor である p21 や p27 とも直接結合する事により細胞周期を回転させている。E7 の生物学的活性の多くは概ね Rb 機能の不活化に依存しているといえる。また E6 に関しては、ユビキチンリガーゼ (E6AP) と結合し、p53 のユビキチン化を促す事により機能を喪失させる事が報告されている。その他 p53 の転写活性を直接抑制したりテロメラーゼ活性を亢進させる事によりアポトーシスを抑制している。このように E6, E7 の高発現は細胞周期回転やアポトーシス抑制といった癌化をきたすための重要なステップを引き起こすが、E6 あるいは E7 遺伝子をいずれか、あるいは両方を同時に正常細胞に遺伝子導入しても悪性転化は誘導されないこの事は HPV 遺伝子の integration だけでは子宮頸癌の発癌に不十分である事を示唆している。近年この発癌に至る過程の中で HPV 遺伝子の働きのみならず宿主側の DNA methylation や

microRNA 発現の変化といった epigenetic な変化が発癌過程に重要であることが明らかとなってきた。我々はその宿主側の因子の中で宿主細胞が分泌するエクソソームに着目している。エクソソームとは脂質二重膜で形成される細胞外顆粒であり、様々なシグナル伝達物質、mRNA や microRNA といった遺伝子発現調節因子が含まれており、細胞間のコミュニケーションツールとして以前より知られている。我々は宿主細胞から分泌されたエクソソームに含まれる microRNA を同定し、子宮頸癌の発癌過程における、HPV 遺伝子のジェノタイプとの関連性を明らかにし、子宮頸癌の発癌を制御する新たなバイオマーカーを探索できる可能性があると考え本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

子宮頸部初期病変 (CIN) の HPV 型と病変進展リスクについて解析する。また子宮頸癌細胞株からエクソソームを回収しその HPV 型との関連性を調べる事を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 子宮頸部初期病変 (CIN) から子宮頸癌患者 279 名から組織を採取し、PCR 法を用いて HPV 型判定を行い、それぞれの病変と HPV 型の解析を行った。

(2) 上記患者の内 CIN1-2 80 例について患者背景を解析した。

(3) 上記患者の内 CIN1-2 80 例について HPV 型判定を PCR 法を用いて解析した。

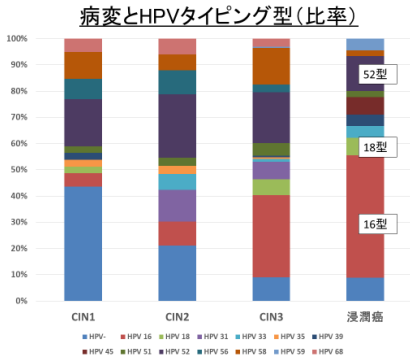
(4) 上記患者の内 CIN1-2 80 例について外来管理を行い病変の消失、進展を評価した。

(5) 上記患者の内進展した 13 例について、その HPV 型を解析した。

(6) 子宮頸癌細胞株 (SiHa, Caski) から宿主分泌エクソソームを超遠心法を用いて回収し、表面マーカー CD9, CD63 を Western Blott 法で、また nano サイトを用いてその粒子径の特定を行った。

## 4. 研究成果

(1) 日本人の子宮頸癌 (浸潤癌) 症例では HPV16 型が最も多く、次いで 52 型が多かった。CIN1 病変ではおよそ 3 割の症例で HPV が検出されなかった。CIN2, CIN3 と病変が進展するにつれて HPV16 型が増える傾向にあった。



(2) CIN1-2 の患者背景を示す。年齢中央値は 39.1 歳、BMI は 21.1、平均経妊回数は 1.58 回、平均経産回数は 0.97 回であった。また喫煙率は 21.2%であった。

CIN1-2 80例の臨床背景

臨床背景	80例の平均値
年齢	39.1歳
BMI	21.1
妊娠回数	1.58
経産回数	0.97
喫煙率	21.2%

平成28年度の女性の喫煙率:9.7%  
(JT全国喫煙者率調査のデータより抜粋)

(3) CIN1-2 で検出された HPV 型を示す。検出なしが 37.5%、52 型が 17.5%と最も多く、次いで 58 型 10.0%、16 型、31 型の 7.5%であった。

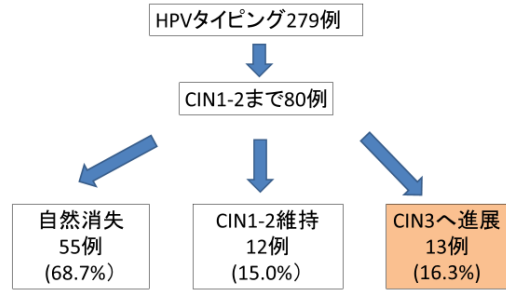
CIN1-2 80例のHPV型

HPV型	症例数
16	6 (7.5%)
18	1 (1.3%)
31	6 (7.5%)
33	2 (2.5%)
35	2 (2.5%)
39	2 (2.5%)
45	0 (0.0%)
51	4 (5.0%)
52	14 (17.5%)
56	7 (8.8%)
58	8 (10.0%)
59	0 (0.0%)
68	5 (6.3%)
検出なし	30 (37.5%)

重複例あり

(4) CIN1-2 の症例の経過を追っていくと、平均観察期間35.1カ月の時点で自然消失68.7%、現状維持15.0%、進展16.3%に認めた。

CIN1-2の臨床経過  
(観察期間中央値35.1カ月)



(5) 進展した 13 症例の内訳は HPV16 型が 3 例、31 型が 2 例、31 型が 1 例、35 型が 2 例、52 型が 6 例、56 型が 1 例であった。特に 52 型が最も高頻度であった。

CIN3へ進展した13症例のHPV型

HPV型	症例数
16	3
31	2
33	1
35	2
52	6
56	1

HPV52型が6例と最も多かった。  
HPV検出なしからのCIN3進展はみられなかった。  
13例中4例(30.7%)は喫煙者であった。

(6) 子宮頸癌細胞株 (Siha Caski) から宿主分岐エキソソームを超遠心法を用いて回収し、表面マーカーCD9,CD63をWestern Blott法で、またnano サイトを用いてその粒子径の特定を行った。

## 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5件)

Tanaka T, Terai Y, Kogata Y, Ashihara K, Maeda K, Fujiwara S, Yoo S, Tanaka Y, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome and invasive activity in uterine cervical cancer. Oncol Rep. 査読有 34、2015、2282-8

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

兪 史夏 (Yoo Saha)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80625674

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携検収者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし