

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08260

研究課題名(和文)皮膚発癌におけるヒトパピローマウイルスE6/E7の役割とCD55陽性細胞との関連

研究課題名(英文) Role of human papilloma virus E6/E7 and CD55 positive cells in skin carcinogenesis

研究代表者

六戸 大樹 (Rokunohe, Daiki)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50436036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚有棘細胞癌、ボーエン病などの表皮腫瘍における、HPVの関与を検討するため遺伝子増幅(PCR法)を行ったところ、外陰部発生の有棘細胞癌、ボーエン病で高リスク群HPV-16が検出される頻度が明らかに高く、露光部に生じる皮膚有棘細胞癌とは発症機序が異なることが示唆された。E6過剰発現SCC由来細胞株(A431)への細胞増殖能、スクラッチ試験による遊走能を非導入細胞と比較したが、有意差はみられなかった。HPV感染とCD55陽性細胞の関連性を調べるため、HPV陽性が確認された腫瘍組織においてCD55免疫染色を行ったところ、単位面積当たり陽性数は、HPV陽性腫瘍において有意に多く検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚有棘細胞癌は皮膚癌の中で二番目に多い腫瘍である。本研究で、特に外陰部の有棘細胞癌においてはヒトパピローマウイルス(HPV)が発生に関与している可能性が示された。HPVの遺伝子を皮膚由来細胞に発現させただけでは腫瘍の性質は変化しなかったため、腫瘍形質獲得には別な機序が関与していることが示唆された。なお、HPVが関与する腫瘍ではCD55陽性細胞が多く検出されることがわかり、将来の研究の基盤となる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We performed PCR to detect HPV DNA in primary cutaneous SCCs/Bowen's diseases. We found that HPV-16 was more frequently detected in tumors developed in genital area than in those developed in other site, indicating that HPV is related to the mechanisms of developing genital tumors. Cell growth and migration tests did not show significant difference between E6 overexpressing SCC cultured cells and control cells. CD55 IHC revealed more positive cells in HPV+ SCC tissues than in control tumor samples.

研究分野：皮膚腫瘍

キーワード：皮膚有棘細胞癌 ウイルス発癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス (HPV) が発癌に深く関与していることは周知の事実であるが、皮膚有棘細胞癌(SCC)、Bowen 病をはじめとする表皮角化細胞由来の腫瘍においても HPV がその発生に関与している可能性が考えられている。HPV-16 や HPV-18 などの高リスク群 HPV の DNA は、宿主のゲノム DNA への組み込み (integration) が起こりやすく、HPV oncogene である E6、E7 の高発現を引き起こす。E6/E7 により、感染細胞はアポトーシス回避、血管新生促進、ゲノムの不安定化といった機序を介して、癌化へと至ると考えられている (図 1)。HPV 陰性子宮頸癌細胞に E6 を発現させると、腫瘍における CD55 陽性細胞の割合が増加し、これら細胞がより悪性度が高いことが報告され、CD55 が新規治療法のターゲットとなり得ることが示唆された (Leung TH et al. J Pathol, 2017)。しかし、粘膜上皮由来の HPV 発癌と比較し、表皮角化細胞における発癌機序についての研究はまだ発展途上であり未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本邦の表皮角化細胞由来腫瘍において発癌に深く関わる HPV の型を明らかにすること。表皮角化細胞における HPV 発癌機序を、培養細胞に HPV がん遺伝子を導入することによって解析し、さらには、近年報告された CD55 分子との関連に着目して解析すること。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍組織における HPV の検出と型判定

対象とする皮膚腫瘍は、弘前大学医学部附属病院で病理組織検査を実施された SCC、Bowen 病である。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) を用いて腫瘍組織から DNA を抽出し、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法により HPV-DNA を特異的に増幅した。なお、プライマーによっては検出不可能な型もあるため、複数のプライマーペア (GP5+/GP6+, L1C1/L1C2+C2M) を併用して検出感度を上げた。また、増幅された PCR 産物をサンガーシーケンス法で解析、BLAST search を用いて HPV 型判定を行った。

(2) 腫瘍組織における HPV 感染パターンの確認

子宮頸癌では高リスク型 HPV-DNA が宿主のゲノム DNA に組み込まれ、癌化に寄与することが明らかとなっている。PCR で HPV 陽性を示した皮膚腫瘍については、感染パターン (episomal pattern あるいは integrated pattern) を in situ hybridization (ISH) 法で確認した。

(3) 培養表皮角化細胞由来株への HPV-E6 遺伝子導入と CD55 との関連性検討

培養表皮角化細胞由来株 (HaCaT, A431, SCC-13) に、E6 を遺伝子導入した。これら細胞を用いて、E6 発現が腫瘍形質獲得 (細胞増殖能、遊走能、浸潤能) に寄与するか検討。E6 を発現させた表皮角化細胞由来株における CD55 陽性細胞について解析。また、HPV 陽性腫瘍における CD55 陽性細胞を免疫組織化学染色で検討。

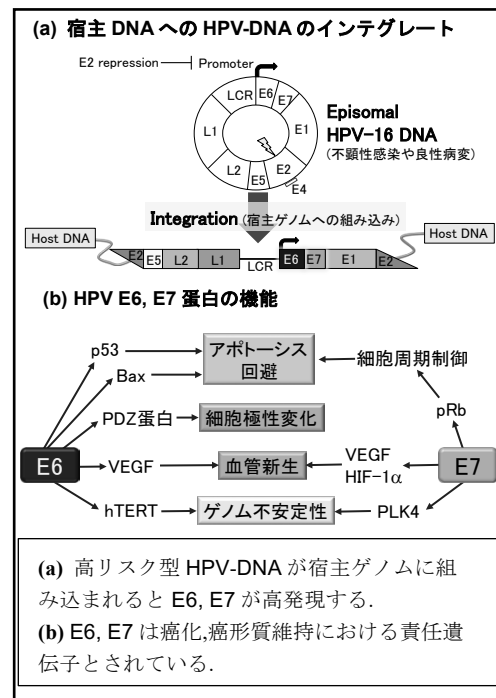


図 1. HPV による癌化機序

4. 研究成果

(1) 腫瘍組織における HPV の検出と型判定

皮膚 SCC および Bowen 病の腫瘍検体から抽出した DNA を鋳型に HPV-DNA を PCR で増幅した (図 2)。増幅バンドから DNA 断片を抽出し、Sanger-sequencing で配列を確認し、HPV 型を判定した。

表 1. 陰部原発 SCC, Bowen 病

No.	年齢	性	診断*	部位	HPV型
1	89	男	BD	陰茎	-
2	70	男	BD	陰茎	16
3	83	女	BD	小陰唇	16
4	43	女	BD	大陰唇	-
5	73	男	BD	陰茎	53
6	75	男	SCC	陰囊	16
7	71	男	SCC	陰茎	-
8	54	女	SCC	大陰唇	16
9	89	男	SCC	亀頭	-
10 (自験例)	83	女	SCC (BC)	大陰唇	16
11	20	女	BP	小陰唇	16
12	33	女	BP	大陰唇	-
13	54	男	BP	陰囊, 肛門	16

* BD, Bowen's disease; SCC, Squamous cell carcinoma; BC, Bowen's carcinoma; BP, Bowenoid papulosis

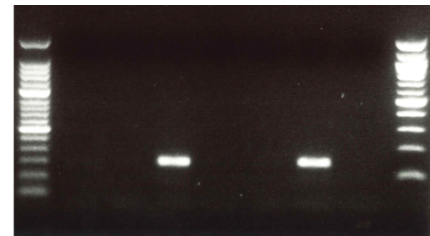
陰部以外の Bowen 病においては 11% に HPV を検出した。検出された HPV 型は HPV-57, HPV-56 であった (図 3A)。陰部以外に生じた SCC 病変では、17% に HPV が検出され、検出された型は HPV-16, HPV-18, HPV-58 であった (図 3B)。一方、外陰部発生の SCC あるいは Bowen では、62% の検体で HPV が検出され (表 1)、中でも HPV-16 が 87.5% (7/8) を占めており、皮膚 SCC においても子宮頸癌と同様に外陰部原発の症例では粘膜高リスク型の HPV が発癌に関与していることが示され、SCC や Bowen といっても発生部位によって発癌の機序が異なることが示唆された。

(2) 腫瘍組織における HPV 感染パターンの確認

PCR で HPV 陽性を示した皮膚腫瘍については、感染パターン (episomal pattern あるいは integrated pattern) を in situ hybridization で確認した。

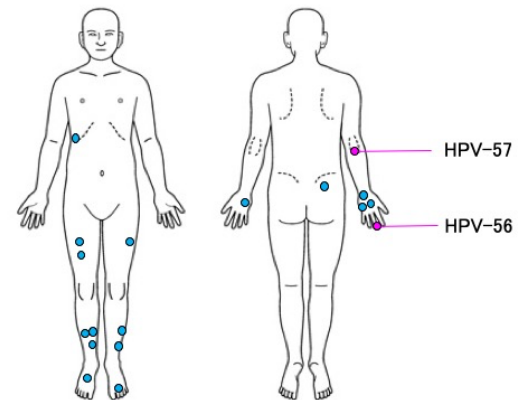
HPV を検出した全ての腫瘍において、核にドット状の陽性所見があり、腫瘍細胞のゲノムにインテグレートされていることを確認した (図 4)。コンジローマなど良性腫瘍で見られる HPV 感染は episomal pattern であり、核が全体に染まって見える。子宮頸癌では HPV-DNA が腫瘍細胞のゲノム DNA に組み込まれるため、ドット状パターンとなることが知られている。

これらの結果から、HPV 陽性の皮膚 SCC においても、子宮頸癌同様に高リスク型 HPV-DNA が腫瘍 DNA に組み込まれていることを確認でき、発癌に関与していることが示唆された。



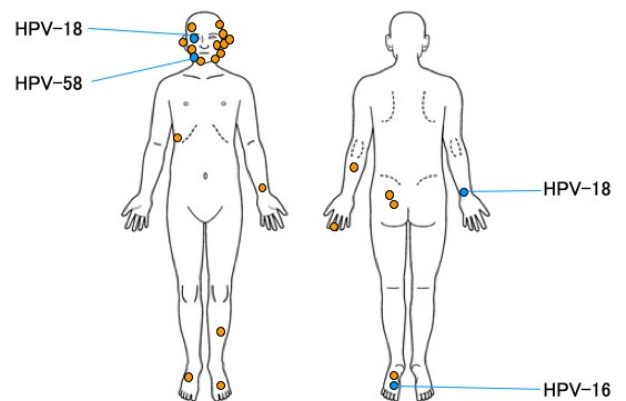
Sample #

図 2. HPV-DNA の検出 (PCR)



2例(11%)でHPVを検出

図 3A. 陰部以外の Bowen 病



4例(17%)でHPVを検出

図 3B. 陰部以外の SCC

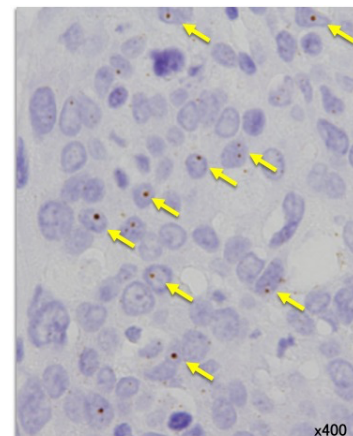


図 4. HPV 感染パターンの確認

(3) 培養表皮角化細胞由来株への HPV-E6 遺伝子導入と CD55 陽性細胞との関連性

培養細胞株 (A431) へ、HPV-E6 発現プラスミドを導入した。E6 発現ベクターを導入した A 431 細胞の細胞増殖能、スクラッチ試験による遊走能をコントロールと比較したが、有意な差はみられなかった。

HPV 感染と CD55 陽性細胞の関連性を調べるため、HPV 感染が確認された腫瘍組織において、CD55 免疫染色を行なった。単位面積当たりの CD55 陽性細胞数は、HPV 陽性腫瘍において良性皮膚腫瘍(脂漏性角化症)と比較して有意に多く検出された。CD55 陽性細胞が HPV 陽性腫瘍で増加する傾向は確認されたが、腫瘍悪性度への影響に関しては、今後のさらなる検討が必要と考えた。また、E6-A431 細胞では、original A431 と比較しても CD55 陽性細胞数は大きな差は検出されず、HPV 陽性腫瘍における CD55 陽性細胞の増加には、E6 タンパクとは独立した機序が関与していることが示唆され、今後の研究課題と考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukui Tomohisa, Akasaka Eijiro, Rokunohe Daiki, Matsuzaki Yasushi, Sawamura Daisuke, Kabashima Kenji, Nakano Hajime	4. 巻 100
2. 論文標題 Analysis of the mechanism underlying a mild phenotype of hereditary coproporphyrinemia due to a homozygous missense mutation in the transcription initiation codon of the coproporphyrinogen III oxidase gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 156 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jderm.2020.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asari Toru, Rokunohe Daiki, Sasaki Eiji, Kaneko Takahide, Kumagai Gentaro, Wada Kanichiro, Tanaka Sunao, Sawamura Daisuke, Ishibashi Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Occupational ionizing radiation-induced skin injury among orthopedic surgeons: A clinical survey	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Miyuki, Rokunohe Daiki, Kimura Atsuko, Takahashi Mika, Korekawa Ayumi, Nakajima Koji, Nakano Hajime, Yokoyama Minako, Tanaka Kanji, Yokoyama Yoshihito, Sawamura Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Significance of IL36RN mutation analyses in the management of impetigo herpetiformis: A case report and review of published cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui A, Akasaka E, Rokunohe D, Matsuzaki Y, Sawamura D, Nakano H.	4. 巻 93
2. 論文標題 The first Japanese case of familial porphyria cutanea tarda diagnosed by a UROD mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 65 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jderm.2018.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Korekawa A, Akasaka E, Rokunohe D, Fukui T, Kaneko T, Sawamura D, Ishikawa M, Yamamoto T, Nakano H.	4. 巻 180
2. 論文標題 Nagashima type palmoplantar keratoderma and malignant melanoma in Japanese patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.17251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 六戸大樹, 相樂千尋, 中野 創, 澤村大輔, 金子高英
2. 発表標題 BRAF・MEK阻害薬のリチャレンジが奏功した進行期悪性黒色腫
3. 学会等名 第36回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 未雪, 六戸 大樹, 高橋 実か, 是川 あゆ美, 中島 康爾, 中野 創, 澤村 大輔
2. 発表標題 灰黒色調を呈した下眼瞼表皮嚢腫
3. 学会等名 日本皮膚科学会東部支部学術大会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 六戸大樹, 金子高英, 古川和仁, 相樂千尋, 中野 創, 澤村大輔
2. 発表標題 ニボルマブ/イピリムマブ併用療法後に重症筋無力症を生じた悪性黒色腫 当科での併用療法のまとめとともに
3. 学会等名 第35回日本皮膚悪性腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子高英、福井智久、相樂千尋、滝吉典子、六戸大樹、会津隆幸、澤村大輔、須賀 康
2. 発表標題 Dabrafenib+Trametinib併用療法によって生じた発熱性好中球減少症
3. 学会等名 第35回日本皮膚悪性腫瘍学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中野 創 (NAKANO HAJIME) (90281922)	弘前大学・医学研究科・准教授 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------