

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07636

研究課題名(和文) コホート検体を用いたHPV E7遺伝子変異とCIN3進展における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of HPV E7 gene mutations and CIN3 progression using cohort samples

研究代表者

内野 繭代(森繭代) (Mori-Uchino, Mayuyo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30570452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「CINコホート検体を用いたHPV発現プロファイルの検討」では、HPV16、18、52、58型を対象にHPV由来のE6/E6*、E1 L1の発現を検討し、HPV18型陽性症例ではL1の発現の消失を認めること、逆にHPV52型陽性症例では、CIN3でもL1発現を認めることを見出した。「Markovモデルを用いたCIN予後予測」では、進展と退縮を繰り返すCINの自然史を反映できる統計モデルであるMarkovモデルを用いた解析により、HPV16型は段階的に急速に子宮頸部異形成の進展を認めること、HPV52型、58型は、持続感染が多く軽度から中等度異形成で維持される特徴を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸部異形成(CIN)の適切な管理のためには、CINの進展退縮を予測することが必要である。CINの予後は感染HPVタイプにより異なる。HPVタイプ毎の特徴を理解することがCINの進展や退縮を予測するには不可欠である。本研究の結果により、HPVタイプ毎の特徴を見出したことにより、HPVタイプ毎の治療方針に反映させることが可能となる。これにより子宮頸部円錐切除術といった侵襲的な治療を回避することや、待機することが可能となり、患者の負担軽減に繋がり、非常に社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the "Study of HPV expression profile using CIN cohort samples," we examined the expression of HPV-derived E6/E6*, E1 and L1 in HPV types 16, 18, 52, and 58 and found that HPV type 18 positive cases showed loss of L1 expression, while HPV type 52 positive cases showed L1 expression even in CIN3. In contrast, in HPV52-positive cases, L1 expression was observed even in CIN3. In "Prediction of CIN Prognosis Using the Markov Model," we analyzed the Markov model, a statistical model that can reflect the natural history of CIN with repeated progression and regression, and found that HPV type 16 shows rapid development of cervical dysplasia in a stepwise manner, while HPV types 52 and 58 are associated with persistent infection and mild to moderate dysplasia. HPV types 52 and 58 are characterized by persistent infection and mild to moderate dysplasia.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：HPVタイプ CIN 子宮頸がん

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の発生は、HR-HPV による発癌（進展）方向と宿主免疫排除による進展抑制方向の両方向の個人差によって規定される。CIN 進展・退縮のバイオマーカーとしては、HPV ジェノタイプが信頼性の高いバイオマーカーとなることは知られているが、最も進展率の高いと言われている HPV16 型でも CIN3 への進展率は 3 割程度であり、進展群と退縮群があることがわかっており、その進展退縮を正確に予測することは困難と考えられている。CIN 進展のバイオマーカーとして、国内外で、L1 や E4 などの HPV 由来遺伝子発現や、p16 免疫染色なども検討されているが、いずれも進展退縮マーカーとしては不十分である。一方で、CIN の管理は定期的な通院管理が何年にもわたり継続し、労働世代の女性にとって時間的負担となっており、CIN の予後を予測できるバイオマーカーの探索は喫緊の課題である。感染する HPV のタイプや HPV のバリエーションにより、浸潤癌への進行頻度がことなることがわかってきたが、各 CIN 患者における CIN 進展リスクを正確に層別化することはいまだ困難である。HPV タイプごとのウイルス由来遺伝子発現プロファイルの検討や、CIN の自然史を考慮した統計手法を適用することで HPV タイプごとに CIN 進展リスクを層別化できる可能性が高い。

2. 研究の目的

HPV タイプごとの CIN 進展における特徴を解明するとともに、CIN の自然史を考慮した CIN 進展リスクの層別化を行う。

3. 研究の方法

1. CIN コホート検体を用いた HPV 発現プロファイルの検討

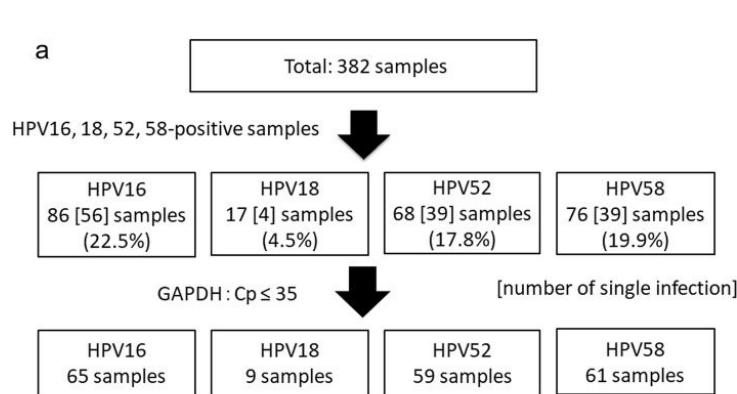
日本におけるコホート研究、ケースコントロール研究で採取した子宮頸部異形成検体 400 検体 (AMED 革新癌プロジェクト 2016/2 月 - 2018/3 月) と、その予後を含む臨床情報をもとに検討を行った。具体的には、まず子宮頸部異形成検体の HPV ジェノタイプ解析を行った。その中で HPV16 型、18 型、52 型、58 型陽性検体において、HPV 由来遺伝子の発現解析を行った。HPV 由来遺伝子として、がん遺伝子である E6、E6*、ウイルス複製やケラチン化に関わる E1/E4、ウイルスキャプシドの構成成分である L1 の発現を RT-qPCR で検討した。

2. Markov モデルを用いた CIN 予後予測

東京大学医学部附属病院で子宮頸部異形成の診断で 2008 年から 2015 年の間に外来フォローされていた症例を対象に、HPV タイプごとにその特徴を検討した。解析手法として、CIN が進展と退縮を繰り返すという特徴 (双方向性変遷) を考慮できる Markov モデルを適用した。

4. 研究成果

1. CIN コホート検体を用いた HPV 発現プロファイルの検討



b HPV types and cervical lesion

	CIN1	CIN2	CIN3	total
HPV 16	16 (24.6)	39 (60.0)	10 (15.4)	65
HPV 18	6 (66.7)	2 (22.2)	1 (11.1)	9
HPV 52	16 (27.1)	36 (61.0)	7 (11.9)	59
HPV 58	24 (39.3)	35 (57.4)	2 (3.3)	61
	62 (32.0)	112 (57.7)	20 (10.3)	194

図 1 HPV タイプと CIN グレードの内訳

は高か

382 検体中、HPV16, 18, 52, 58 型陽性検体はそれぞれ、86, 17, 68, 76 検体であった (混合感染)。CIN グレードの分布は、CIN1, CIN2, CIN3 でそれぞれ、62, 112, 20 検体であった (図 1)。High risk HPV 陽性症例はそれ以外の症例に比べて若年であった。それ以外の臨床的背景には有意差は認めなかった。E6* は CIN グレードの進行とともに検出率が高くなった。HPV16 や HPV18 型では、E6* の発現が高く、E6 の検出率は低かった。一方、HPV52 型では、E6* の発現は低かったが E6 の検出率

った。

E1/E4 の発現は、CIN グレードの進展とともに検出率が高くも検出率が高く、HPV18 型陽性症例では検出率が低かった。

最も特徴的であったのが、L1 の発現であった。L1 の発現は、ウイルスタイプにより異なり、HPV18 型陽性検体では検出されなかったが、HPV52 型陽性検体では CIN のグレードに関わらず高い発現を認めた (図 2)。L1 はウイルスキャプシド構成蛋白であり、ウイルス産生に伴い発現する。また HPV のヒトゲノムへの組み込み (インテグレーション) が起こった検体では L1 の発現の欠落がみられる。HPV18 型陽性症例では CIN1 の時点からウイルス産生を伴わない感染形式をとっているか、もしくは CIN1 の時点で既に HPV ゲノムのインテグレーションが起こっていることが示唆された (Baba S, *Virology*, 2020)。

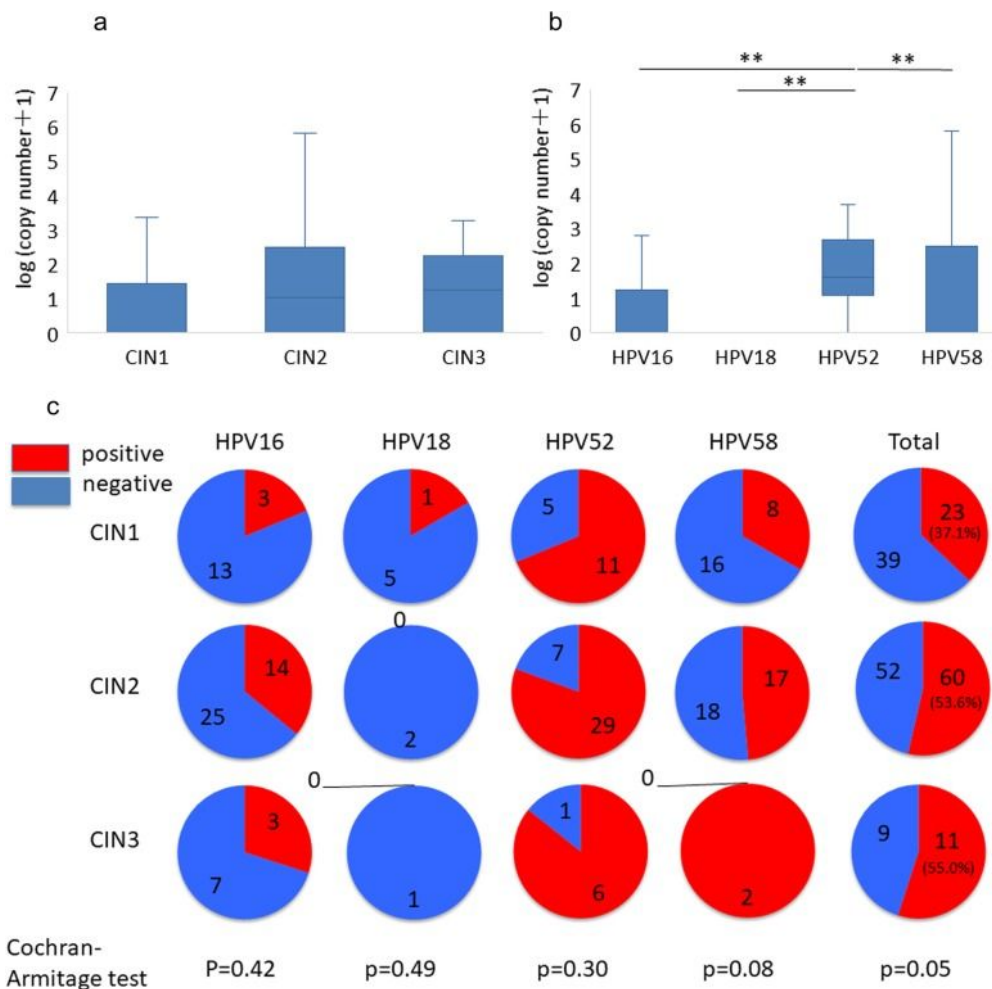


図 2 . HPV タイプ毎、CIN グレード毎の L1 発現

2 . Markov モデルを用いた CIN 予後予測

1417 人中、737 人が対象となった。Normal, CIN1, CIN2 患者はそれぞれ、195 人、259 人、283 人であった。HPV16, 52, 58 型陽性症例はもっとも頻度が高かった。

全体解析では、Normal 群では 50-90%が次の診察時も Normal であった。CIN1 患者では、29-55%が退縮し、34-44%が CIN1 にとどまり、残りが CIN2 以上に進展した。CIN2 患者では、50%以上の患者が CIN2 にとどまった。CIN3 への進展率は HPV タイプにより異なり、HPV16, 18, 52, 58 型陽性患者でそれぞれ、15.6%, 10.3%, 11.1%, 7.7%であった。HPV16 陽性患者ではより強い病変に進展しやすいことがわかった。

Markov モデルを用いて 2 年後予後を予測した結果、2 年後予後は HPV タイプ毎に異なることがわかった。特に、HPV16 型陽性患者では Normal, CIN1, CIN2 からそれぞれ 13%, 30%, 42%が CIN3

以上に進展することが分かった。一方、HPV52, 58 型陽性患者では、登録時病変の程度に関わらず 30-40%の患者で CIN1-CIN2 と診断されていることがわかった (表 1)。

Markov モデルを適用することで、HPV16 型は段階的に急速に子宮頸部異形成の進展を認めること、日本人に多い HPV タイプである HPV52 型、58 型は、持続感染が多く軽度から中等度異形成で維持される特徴を見出した (Taguchi A, *Cancers*, 2020)。

Current state	HPV category	State after 2 years			
		Normal	CIN1	CIN2	CIN3/Cancer
Normal	HPV 16	0.598 (0.506-0.684)	0.099 (0.074-0.128)	0.169 (0.127-0.215)	0.132 (0.090-0.183)
	HPV 18	0.610 (0.479-0.719)	0.156 (0.109-0.215)	0.156 (0.093-0.230)	0.076 (0.033-0.148)
	HPV 52	0.533 (0.474-0.593)	0.189 (0.162-0.219)	0.180 (0.146-0.216)	0.096 (0.070-0.130)
	HPV 58	0.559 (0.484-0.627)	0.171 (0.140-0.205)	0.206 (0.162-0.255)	0.062 (0.041-0.089)
	Other hrHPVs	0.723 (0.676-0.766)	0.155 (0.132-0.182)	0.085 (0.066-0.108)	0.034 (0.023-0.050)
	No hrHPVs	0.838 (0.814-0.861)	0.105 (0.090-0.121)	0.042 (0.032-0.054)	0.012 (0.007-0.020)
CIN1	HPV 16	0.434 (0.349-0.512)	0.089 (0.067-0.115)	0.175 (0.134-0.223)	0.300 (0.225-0.378)
	HPV 18	0.535 (0.396-0.652)	0.146 (0.100-0.207)	0.172 (0.102-0.257)	0.146 (0.069-0.267)
	HPV 52	0.473 (0.413-0.529)	0.178 (0.152-0.208)	0.183 (0.150-0.221)	0.164 (0.122-0.219)
	HPV 58	0.469 (0.399-0.535)	0.165 (0.135-0.197)	0.239 (0.192-0.291)	0.126 (0.084-0.181)
	Other hrHPVs	0.656 (0.606-0.702)	0.156 (0.133-0.181)	0.102 (0.079-0.128)	0.084 (0.058-0.119)
	No hrHPVs	0.808 (0.781-0.835)	0.107 (0.091-0.123)	0.049 (0.038-0.065)	0.034 (0.021-0.054)
CIN2	HPV 16	0.335 (0.266-0.404)	0.079 (0.059-0.101)	0.165 (0.121-0.218)	0.418 (0.330-0.512)
	HPV 18	0.373 (0.245-0.501)	0.119 (0.074-0.178)	0.186 (0.099-0.302)	0.320 (0.178-0.507)
	HPV 52	0.381 (0.324-0.434)	0.156 (0.129-0.184)	0.175 (0.138-0.216)	0.286 (0.220-0.367)
	HPV 58	0.356 (0.291-0.419)	0.150 (0.122-0.181)	0.260 (0.209-0.319)	0.232 (0.167-0.307)
	Other hrHPVs	0.518 (0.453-0.571)	0.146 (0.122-0.169)	0.117 (0.089-0.148)	0.218 (0.159-0.299)
	No hrHPVs	0.706 (0.643-0.749)	0.106 (0.090-0.123)	0.063 (0.045-0.089)	0.124 (0.079-0.191)

表 1. Markov モデルを用いて予測した HPV タイプ毎の 2 年後状態

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Kawata Akira, Taguchi Ayumi, Ishii Yoshiyuki, Baba Satoshi, Mori Mayuyo, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment and Molecular Phenotyping of Organoids from the Squamocolumnar Junction Region of the Uterine Cervix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 694 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12030694	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 Baba Satoshi, Taguchi Ayumi, Kawata Akira, Hara Konan, Eguchi Satoko, Mori Mayuyo, Adachi Katsuyuki, Mori Seiichiro, Iwata Takashi, Mitsuhashi Akira, Maeda Daichi, Komatsu Atsushi, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Kawana Kei	4. 巻 17
2. 論文標題 Differential expression of human papillomavirus 16-, 18-, 52-, and 58-derived transcripts in cervical intraepithelial neoplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-020-01306-0	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 Taguchi Ayumi, Hara Konan, Tomio Jun, Kawana Kei, Tanaka Tomoki, Baba Satoshi, Kawata Akira, Eguchi Satoko, Tsuruga Tetsushi, Mori Mayuyo, Adachi Katsuyuki, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Yasugi Toshiharu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Multistate Markov Model to Predict the Prognosis of High-Risk Human Papillomavirus-Related Cervical Lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 270 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020270	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	田口 歩 (Taguchi Ayumi) (60756782)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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
---------	---------