

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592462

研究課題名(和文)子宮頸癌発生に関与する腔内変異原分子の探索と検知機器開発の基礎的検討

研究課題名(英文)Detection of mutagenic molecule for cervical cancer

研究代表者

藤井 多久磨(Fujii, Takuma)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：10218969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：腔内細菌叢は乳酸菌を主体とし、わずかの好・嫌気性菌から構成されているが、乳酸菌優位のバランスを保ちながら腔内清浄を保っている。このバランスが崩れ、細菌性陰症と呼ばれるような状態になっている患者ではヒトパピローマウイルス(HPV)の多重感染がみられることがわかった。子宮頸部にHPV感染がある状況ではヒトの免疫が増強しており、HPV感染に引き続き起こる癌化を阻止する機構が働いている。一方、HPV感染がヒトの免疫から逃れるような機構も存在することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The normal vaginal flora composed of both major lactobacillus and minor aerobic/anaerobic bacteria, keep the vaginal cleanliness. Overgrowth of the anaerobic bacteria or *G. Vaginalis* causes bacterial vaginosis. The multiple genotypes of HPV infection were observed under the overgrowth of anaerobic bacteria or *G. Vaginalis*, suggesting HPV infection and anaerobic bacteria or *G. Vaginalis* have network in premalignant status. HPV infection in the high grade of intraepithelial lesion results in the enhancement of immune response. This mechanism might have some negative effect on the progression. In contrast, HPV infections have an effect on the immune escape in the normal or low grade intraepithelial lesions. The balance of the viral infection and host immune response might be crucial for the multistep carcinogenesis in the cervix.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ヒトパピローマウイルス

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌はヒトパピローマウイルス (HPV) 感染を端緒とし、遺伝子変異や環境因子など複数の要因が多段階に關与して引き起こされる疾患である。本研究では子宮頸部発癌に至る共役因子を明らかにし、発癌機構のさらなる解明とともに、その結果を臨床応用に結びつけるものである。in vitro の実験では HPV の E7、E6 タンパク質の発現により、免疫応答の抑制、不死化、異常増殖、形質転換、アポトーシスの抑制、分化の抑制が起こるとされているが、個々の異常では発癌に至らない。これらの複合的な遺伝子異常の蓄積が発癌には必要と考えられている。HPV の一過性感染では発癌に至らず、持続感染が発癌には必要とされており、持続感染を引き起こすメカニズムの解明が望まれている。本研究では子宮頸癌の発生に関わる因子として腔内の環境に着目した。その発端は腔内細菌の異常繁殖が慢性頸管炎を引き起こし、この環境が HPV 持続感染から発癌に至る機構に重要な場を与えていると推察した論文にある (Cancer Epidemiol Biomarker Prev 10,1021,2001)。腔内細菌叢は乳酸菌を主体とし、わずかの好・嫌気性菌から構成されているが、乳酸菌優位のバランスを保ちながら腔内清浄を保っている。細菌性膣症・膣炎は何らかの内・外的因子による細菌生育環境の変化、宿主免疫反応の低下などによる感染防御の脆弱化を契機として引き起こされる病態である。微生物感染が引き起こす炎症が発癌機構において促進的に働くことは胃/腸など他臓器において明らかとなっている。そこで、本研究では子宮頸部癌化のメカニズムを解明するために、微生物感染が引き起こす変化や免疫応答の変化を中心に解析する。一方、嗅覚を指標にした診断法は電子鼻 (electric-nose) とし

て注目を集めており、(JAMA,301,585,2009; Ann Oto Rhino Laryngol,114,504,2005;Ann J Rhinol 20,170,2006)、嗅覚で肺癌が検出できると報告され注目されている (Thorax 62,565,2007)。そこで、子宮頸癌においても嗅覚検知器が臨床的に役立つ装置であるか否かを検討する。

2. 研究の目的

腔内細菌叢の変化が子宮頸部発癌に果たす役割について解析した。

前癌病変の患者において子宮頸部局所免疫応答の変化を解析し、子宮頸部発癌との関連を解析した。

腔内に発現している分子を嗅覚検知器で分析し、その臨床応用の可能性について検討した。

3. 研究の方法

本研究参加の同意の得られた患者から、試料として、子宮頸部細胞診、子宮頸部狙い組織診の情報を入手した。患者から腔内分泌物・頸管粘液および子宮頸部擦過細胞を採取し、下記の研究方法にて実験を遂行した。

定量的 reverse transcriptase PCR 法により、A.vaginae と G.Vaginalis 感染の有無を調べた。HPV 感染の有無についてはクリニチップ法にて HPV 型を同定した。

腔内に分泌されているサイトカイン、ケモカインを網羅的に Multiplex Immunoassay 法にて IL-1β,-2,-4,-5,-6,-7,-8,-10,-12,-13,-17,

G-CSF,GM-CSF,INF- γ ,MCP-1,MIP-1, TNF- α を解析し、疾患と関連が見込まれた IL-1b と IL-8,MIP-1b について ELISA 法にて疾患との関連を解析した。臭覚検知器として大熊等が独自に開発した「ニオイセンサ」および島津製作所製「におい識別装置 FF-2A」を用い腔内に分泌される分子の解析を行った。

4. 研究成果

A.Vaginae と G.Vaginalis の感染は HPV の多重感染に伴い優位に増加する傾向を示し、CIN と細菌性膣症の関連が示唆された。HPV 多重感染は活動的な性行動の結果なのか、それとも免疫などのほかの要因によりひきおこされているのかについては今後の検討課題である。

頸管粘液に含まれるサイトカインの中で IL-1b と IL-8 は高悪性度扁平上皮内病変の患者で強く発現していることがわかった。MIP-1b は細胞診で正常・低悪性度扁平上皮内病変の患者の中で HPV16,18,31,33,35,45,52,58 型(ハイリスク型) 感染陽性例において発現が低下していることが明らかとなった。IL-1b, IL-8 は宿主免疫を増強するサイトカインであり、これらの発現が高いということは前がん病変の排除に働いていると考えられる。一方、MIP-1b がハイリスク型 HPV 感染が検出される正常・低悪性度扁平上皮内病変で発現レベルが低いということは HPV 感染が免疫逃避を行っている可能性が示唆された。

大熊が作製した 5 種のプローブを用いたニオイセンサを用い、患者検体を測定したが、臨床情報との明らかな相関関係は得られなかった。そこで、にお

い識別装置 FF-2A を用いて検体を測定し、「におい」のパターンを多変量解析にて 10 グループに分類することができた。この中では多変量解析で名付けられた PC1 の値が上昇するほど、G.Vaginalis の検出頻度が高いことが明らかとなった。G.vaginalis 感染は嫌気性菌繁殖の危険因子とされていることから、嫌気性菌感染に伴う「におい」が装置で感知されていると考えられた。

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 17 件)

1.Satoh T, Fujii T,(et al,10,3rd): Rapid genotyping of carcinogenic human papillomavirus by loop-mediated isothermal amplification using a new automated DNA test (Clinichip HPV™). J Virol Methods, 査読有 188(1-2) : 83-93, 2013

2.Nishio H, Fujii T, Iwata T,(et al,15,2nd,10th): Reproductive and obstetric outcomes after radical abdominal trachelectomy for early-stage cervical cancer in a series of 31 pregnancies. Hum Reprod, 査読有 28(7):1793-8,2013

3.Komatsu H, Iwata T, Fujii T (et al,7, 5th 7th):Repair of the threatened feminine identity: experience of women with cervical cancer undergoing fertility preservation surgery, Cancer Nursing, 査読有 37(1) : 75-82, 2013

4.Nishio S, Fujii T, Iwata T,(et al,8 2nd, 6th): P16ink4a immunohistochemistry is a promising biomarker to predict the outcome of low grade cervical intraepithelial neoplasia: comparison study with HPV genotyping, J Gynecol Oncol, 査読有 24(3):215-21, 2013

5.Murakami I, Fujii T, Iwata T,(et al, 7,2nd ,6th): Methylation of human papillomavirus-52 and -58 is a candidate biomarker in cervical neoplasia, J Clin Virol, 査読有 58(1):149-54, 2013

6.Kataoka F, Fujii T(et al,8, 7th): Evaluation of clinical usefulness of a medical monitor equipped with an organic electroluminescence panel in comparison with liquid crystal display monitors. J Minim Invasive Gynecol, 査読有 20(4): 522-528, 2013

7.Fujii T, (et al, 17,1st): Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia : a prospective cohort study. Int J Clin Oncol, 査読有 18:1091-1101,2013

8.Matsumoto K, A, Fujii T(et al,16,9th), for Japan HPV and Cervical Cancer(JHACC) Study Group : Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy : results from a multicenter, prospective, cohort study. Int J Clin Oncol, 査読有 17(3):233-9,2012

9.Matsumoto K, Fujii T(et al, 16,9th) for Japan HPV and Cervical Cancer(JHACC) Study Group : HLA Class II DRB1*1302 allele protects against progression to cervical intraepithelial neoplasia grade 3. Int J Gynecol Cancer, 査読有 22(3) : 471-478, 2012

10.Sakamoto K, Fujii T(et al,9 2nd): Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasia. Lab Invest, 査読有 92 : 688-702, 2012

11.Murakami I, Fujii T, Iwata T, (et al 7, 2nd, 4th): Tumor volume and lymphovascular space invasion as a prognostic factor in early invasive adenocarcinoma of the cervix. J Gynecol Oncol, 査読有 23 (3):153-158,2012

12.Hirasawa A, Fujii T(et al 11,6th): Lobular endocervical glandular hyperplasia and peritoneal pigmentation associated with Peutz-Jeghers syndrome due to a germline mutation of STK11. Ann Oncol, 査読有 23 (11):2990-2,2012

13.Ochi H, Fujii T, (et al 19,11th): Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions?, J Med Virol, 査読有 84(7):1128-34, 2012

14.Matsumoto K, Fujii T(et al,15,8th); for Japan HPV and cervical cancer (JHACC) study group. : Predicting the progression of cervical precursor lesions

by human papillomavirus genotyping : A prospective cohort study. Int J Cancer, 査読有 128, 2898-2910, 2011

15.Murakami I, Fujii T(et al,8, 5th): An adeno-associated virus vector efficiently and specifically transduces mouse skeletal muscle. Mol Miotechnol, 査読有 49: 1-10, 2011

16.Akita A, Fujii T, (et al,8,5th):Comparison of T2-weighted and contrast-enhanced T1-weighted MR imaging at 1.5 T for assessing the local extent of cervical carcinoma. Eur Radiol, 査読有 21(9):1850-1857, 2011

17.大熊慶一:非平衡蒸気検出型ニオイセンサシステムの開発、ケミカルエンジニアリング査読無 57(1)55,58,2012

{学会発表}(計 18 件)

1.Fujii T: 招待講演 Retrospective analysis of abdominal radical trachelectomy in 170 cases from one institution. International Symposium on radical hysterectomy, Seoul,Korea, August 2-4, 2013

2.Fujii T : - Brief Communication -Retrospective analysis of abdominal radical trachelectomy in our 140 cases. 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society. Vancouver, Canada, October 13-16, 2012

3.Fujii T 招待講演 : Concurrent Symposium / Abdominal radical trachelectomy in our experience of 126 cases. 16th World Congress on In Vitro Fertilization. / 6th World Congress on In Vitro Maturation. September 10-13, 2011, Tokyo, Japan

4.Fujii T, (et al 10,1st) Takatsuka N, Matsumoto K, Maeda H, Yasugi T, Mitsuhashi A, Aoki Y, Oki A, Watanabe Y, Yoshikawa H : Cartenoids,smoking and alcohol drinking affects outcome of low-grade CIN. 27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 17-22, 2011, Berlin, Germany

5. Fujii T 招待講演: Abdominal radical trachelectomy from our experience in the past ten years. 2nd Biennial Meeting of Asian society of Gynecologic Oncology. November 3-5, 2011, Seoul, Korea

国内学会発表

6. 藤井多久磨: 生涯研修プログラム 婦人科悪性腫瘍に対する拡大手術 / 骨盤内の解剖 手術層の見極めのために . 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌プリンスホテル、札幌市教育文化会館・札幌, 2013 年 5 月 10 日 5 月 12 日

7. 藤井多久磨: 教育・要望講演 HPV と子宮頸部の発癌 基礎から臨床へ 第 54 回日本臨床細胞学会総会(春期大会), グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール・東京, 2013 年 5 月 31 日 6 月 2 日

8. 藤井多久磨: コルポスコピーセミナー「コルポスコピー実例 Q&A」. 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, 2013 年 7 月 19 日 7 月 21 日

9. 藤井多久磨: 生涯研究プログラム 子宮頸部上皮内病変のマネージメント - HPV 時代のアップデート - / HPV ジェノタイピングの適応とその意義. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会, 神戸ポートピアホテル / 神戸国際展示場・兵庫, 2012 年 4 月 13 日 - 15 日

10. 藤井多久磨: 子宮頸部上皮内病変のマネージメント HPV 時代のアップデート HPV ジェノタイピングの適応とその意義. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会, 神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場,

2012 年 4 月 13 日 - 4 月 15 日

11. 藤井多久磨: コルポスコピーの有効的な利用法を考える - 最近のトレンド - . 第 52 回特定非営利活動法人日本婦人科腫瘍学会学術講演会, グランドプリンス新高輪・東京, 2012 年 7 月 19 日 - 7 月 21 日

12. 藤井多久磨、田中京子、岩田卓、杉山重里、青木大輔: 婦人科がん手術の基本手技を学ぶ / 広汎性子宮頸部摘出手術における妊孕性向上への工夫. 第 35 回日本産婦人科手術学会, 京都東急ホテル・京都, 2012 年 9 月 29 日 - 9 月 30 日

13. 藤井多久磨、齋藤深雪、岩田卓、田中京子、杉山重里、塚崎克己、青木大輔: ワークショップ 子宮頸がん行政検診における液状検体細胞診の導入 細胞診の従来法と液状検体法. 第 21 回日本婦人科がん検診学会総会・学術集会, イイノホール&カンファレンスセンター・東京, 2012 年 10 月 20 日

14. 藤井多久磨、青木大輔: シンポジウム 気管食道科領域の HPV 関連疾患の up-to-date / HPV 検査と HPV 感染予防ワクチンの現状と展望. 第 64 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会, ホテル日航東京・東京, 2012 年 11 月 8 日 - 11 月 9 日

15. 藤井多久磨、齋藤深雪、岩田卓、田中京子、杉山重里、塚崎克己、青木大輔: シンポジウム 子宮頸部腫瘍性病変に対するバイオマーカーの展開: LBC を用いた最適なマネージメントを目指して / 子宮頸がん検診における患者管理指針の確立をめざして - CINtec PLUS kit の有用性 - . 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター・新潟, 2012 年 11 月 9 日 - 11 月 10 日

16. 藤井多久磨、平松祐司、塩田充、増山寿、正岡直樹、寺尾泰久、三橋直樹：悪性腫瘍手術後のリンパ嚢腫発生の工夫と管理．第33回日本産婦人科手術学会、岡山コンベンションセンター、岡山、2011年2月12,13日

17. 藤井多久磨、平松祐司、塩田充、増山寿、正岡直樹、寺尾泰久、三橋直樹：悪性腫瘍手術後のリンパ嚢腫発生の工夫と管理．第33回日本産婦人科手術学会、岡山コンベンションセンター、岡山、2011年2月12,13日

18. 種田けい、大熊廣一：非平衡蒸気検出型二オイセンサの開発 子宮頸癌への応用．食品分析研究会、東洋大学白山校舎、東京、2011年9月14日

〔図書〕(計 4 件)

1. 藤井多久磨：ヒトパピローマウイルス(HPV)ジェノタイプ判定、臨床検査データブック LAB DATA 2013-2014, 659-660, (総ページ数 1042)医学書院、2013年

2. 進信幸、片岡史夫、西尾浩、山上亘、野村弘行、藤井多久磨：広汎性子宮頸部摘出術、「婦人科がん 低侵襲手術」, 14 - 17, (総ページ数 65)メジカルビュー社 2012年

3. 藤井多久磨、青木大輔：広汎性子宮頸部摘出術、「子宮頸癌・外陰癌の手術 理論と実際」 86-93, (総ページ数 157)、メジカルビュー社 2011年

4. 藤井多久磨、青木大輔：子宮頸部円錐切除術、産婦人科ポケット手術マニュアル(産婦人科の実際 第60巻別冊), 151 - 155 総ページ数 224) 金原出版、2011年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 多久磨 (FUJII TAKUMA)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：10218969

(2)研究分担者

大熊 廣一 (OKUMA HIROKAZU)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30297733

(3)連携研究者

岩田 卓 (IWATA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30296652