

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791855

研究課題名(和文) エピジェネティクスな調節に基づく子宮頸部腫瘍の病態解明アプローチ

研究課題名(英文) The pathologic clarification of cervical cancer based on epigenetic regulation

研究代表者

村上 功 (MURAKAMI, ISAO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70445237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ハイリスクHPVのメチル化の頻度やパターンをHPV全長に関して網羅的な検索を行い、子宮頸部上皮内病変・予後との関連性の検討を行った。HPV52型・58型 L1遺伝子のメチル化はCINが高位病変になるほど高くなる傾向が認められた。更にHPV52型 L1遺伝子のメチル化は病変の予後と相関があり、CINに対する新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

次に腔内に分泌されているサイトカインを網羅的に解析した。解析結果よりCINのハイリスクHPV感染例では病変進行とともにMCP-1は発現低下し免疫逃避が、GM-CSFは発現上昇し宿主の抗腫瘍免疫応答が誘起されていることを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the correlation between methylation status in the L1 gene and the long control region (LCR) of HPV52/58 and CIN. The increased methylation at the CpG sites in the HPV52/58 L1 gene was correlated with the severity of cervical neoplasia. These data suggest that HPV methylation status of the L1 gene is a candidate biomarker of CIN for detecting CIN2 and CIN3.

The elucidation of antitumor immunity in CIN lesion is important for the elucidation of carcinogenic mechanism in cervical cancer. We investigated associations with the results of cytodiagnosis and HPV infection. It appeared that GM-CSF expression increased with lesion progression in the CIN cases, and the results suggested that host antitumor immune response was induced. On the other hand, MCP-1 expression decreased with lesion progression in the CIN cases, and the results suggested that immune escape developed, and that may be correlation with the progression in the CIN.

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 メチル化 エピジェネティクス バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

女性の癌発生における微生物感染関与の割合は20~25%といわれ、その半数はヒトパピローマウイルス (HPV) 感染に起因し、その他にはヘリコバクタピロリ、肝炎ウイルス、Epstein-Barr Virus (EBV) が関与している (Infections causing human cancer, zur Hausen H)。細菌やウイルスによる感染は宿主細胞のメチル化を引き起こすと報告され、注目されている。とくに炎症はエピジェネティック異常の誘発要因であり発癌との関連が報告されている。(Clin Cancer Res 12,989,206; Cancer Res 70,1530,2010)。最近ではDNAのメチル化異常の組織への蓄積は発癌リスク上昇に関連していると考えられ、「エピジェネティックな発癌の素地」が出来上がっていると表現される。

子宮頸癌の発癌リスクとしてHPV感染が挙げられる。HPV感染そのものは炎症を引き起こさないが、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可能性がある (Cancer Epidemiol Biomarker Prev 10,1021,2001)。そこで本研究では子宮頸部発癌機構におけるメチル化の関与と腔内細菌が引き起こす炎症が発癌に及ぼす影響について解析することにした。炎症が発癌に関連するとなれば、癌発生予防の手段も講じることができるため、臨床的に大変有意義である。

一方、ウイルスゲノムそのもののエピジェネティックな変化についても重要な論文が発表された。Fernandez等は発癌に関連する2本鎖DNAウイルス(HPV, HBV, EBV)のゲノム網羅的な解析を行ったところ、病変の進行に伴い、ウイルスゲノムの転写因子結合部位にメチル化が誘導され、転写制御因子が結合できなくなるために発癌を促進するウイルスタンパク質の発現が上昇していることを見出した。一方、Doerfler等はウイルスゲノムのメチル化は、宿主免疫監視機構から逃れようとしている変化ではないかと推察している (Epigenetics 3,125,2008)。いずれにせよ、ウイルスゲノムのメチル化は発癌メカニズムにおいて重要な鍵をにぎっていると考えられる。

研究代表者は国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 神田忠仁センター長のもとHPVのウイルスゲノムのクロマチン構造に関する研究を行い、HPV16型とHPV31型においては細胞の分化に伴いウイルスゲノムメチル化に関与するヌクレオソーム結合部位が変化することを見出し、これを報告した (Int J Papillomavirus

conference, Montreal, 2010)。癌化機構におけるエピジェネティックな変化はウイルスゲノム、宿主ゲノムにとっても重要な変化であり、ウイルス発癌メカニズム解明には重要な分野となってきた。

今回検討する宿主およびウイルスゲノムの遺伝子情報の中でメチル化している頻度が高く、なおかつ病変の進行度特異性に優れているものが見出されれば、将来「診断ツール」への応用が期待される。

研究代表者が所属する研究室では10年以上にわたり、HPVに関する分子生物学的研究を行っている(下記文献)。最近では子宮頸管炎とHPV感染および発癌機構についての研究を開始しており、HPVに関連する研究に適した環境にある。

JJCR, 86, 28, 1995;
Gynecol Oncol 58, 210, 1995;
J Biol Chem 276 867, 2001;
Anti Cancer Res, 22, 1655, 2002;
Clin Cancer Res 9, 5423, 2003;
British J Cancer 88, 1883, 2003;
Gynecol Oncol, 94, 509, 2004;
Int J Gynecol Pathol, 22, 378, 2003;
Hum Pathol 34, 778, 2003;
Diagn Mol Pathol, 14, 103, 2005;
Int J Oncol 29, 541, 2006;
Int J Gynecol Cancer 163, 347, 2006;
Virchows Arch 453, 545, 2008

2. 研究の目的

【研究の全体構想】

子宮頸部発癌機構の解明をエピジェネティックな制御機構を中心として解析し、その結果をバイオマーカーとして有用か否かを検討する。

【本研究の具体的な目的】

ウイルスゲノムのメチル化およびクロマチン構造の変化を解析するとともに宿主側のメチル化と免疫応答の変化を解析する。

3. 研究の方法

ハイリスクHPVのメチル化の頻度やパターンをHPV全長に関して網羅的な検索を行い、子宮頸部上皮内病変・予後との関連性の検討を行った。

ハイリスクHPV型の中で日本人に多いとされるHPV型(16型、18型、52型、58型)に注目し、ウイルスゲノムのメチル化が炎症、および前癌病変の進行と浸潤癌とどのような関連があるのかについて解析を行った。具体的には bisulfite modification 後 HPV DNA を MethPrimer Design program を用いて全長を網羅するプライマーを設計した。各 HPV DNA のフルゲノムを DNA Methylation-Gold Kit

を用いて bisulfite modification を行った。bisulfite modification 後の HPV DNA を設計したプライマーを用いて PCR 増幅を行い、最終的に塩基配列を決定した。この結果を臨床情報と照合し、バイオマーカーとしての有用性について検討を行った。

次に腔内に分泌されているサイトカイン、ケモカイン (IL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-10、-12、-13、-17、G-CSF、GM-CSF、INF-、MCP-1、MIP-1、TNF-) を網羅的に Multiplex Immunoassay 法を用いて解析した。

これらの結果を照らし合わせ、免疫応答とメチル化に関連があるか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) HPV 52 型・58 型メチル化頻度の解析

HPV52 型 L1 遺伝子内の 21CpG、LCR 内の 13CpG、HPV58 型 L1 遺伝子内の 22CpG、LCR 内の 5CpG のメチル化の検討を行った。図 1 に L1 遺伝子内の各々の CpG における平均メチル化頻度を cervicitis/CIN1、CIN2、CIN3 に分けて示した。また、L1 遺伝子・LCR 内の全ての CpG における平均メチル化頻度を表 1 に示した。

全ての CpG における平均メチル化頻度は、HPV52 型 L1 遺伝子では cervicitis/CIN1 15% (0%~43%)、CIN2 34% (0%~83%)、CIN3 52% (8%~85%) であった。また HPV58 型 L1 遺伝子では cervicitis/CIN1 12% (0%~61%)、CIN2 38% (0%~100%)、CIN3 61% (11%~100%) であった。HPV52 型・HPV58 型 L1 遺伝子における全ての CpG における平均メチル化頻度は、病変間で有意差を認められた ($P < 0.05$)。しかし HPV52 型・HPV58 型共に LCR における全ての CpG における平均メチル化頻度は、病変間で有意差を認めなかった (表 1)。

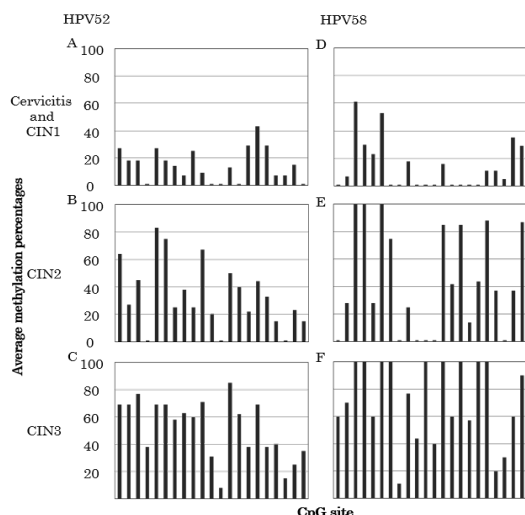


図 1 HPV52 型・58 型 L1 遺伝子のメチル化頻度と病変のグレード

表 1 HPV52 型・58 型のメチル化頻度と病変のグレード

A		
	L1 gene (%)	LCR (%)
Cervicitis & CIN1 (n=17)	15*	2.5
CIN2 (n=15)	34*	1.3
CIN3 (n=22)	52*	3.2
B		
	L1 gene (%)	LCR (%)
Cervicitis & CIN1 (n=20)	12†	0
CIN2 (n=9)	38†	0
CIN3 (n=12)	61†	0

Methylation status of HPV52 and HPV58 are defined as the average methylation percentages at all measured CpG sites.

* $P < 0.05$ (Student's *t* test).

† $P < 0.05$ (Student's *t* test).

次に子宮頸部上皮内病変の予後と HPV52 型 L1 遺伝子のメチル化頻度の関連を検討した。全 55 症例の内、治療を行っていない CIN1 6 症例と CIN2 9 症例の解析を行った。15 症例の臨床経過を図 2 A に示した。

フォローアップ期間の中央値は 12.6 ヶ月 (4~30 ヶ月) であった。全ての CpG におけるメチル化頻度の中央値は退縮症例では 15% (0%~28%)、持続・進展症例では 35% (5%~50%) であった。退縮症例と持続・進展症例でメチル化頻度に有意差を認めた。

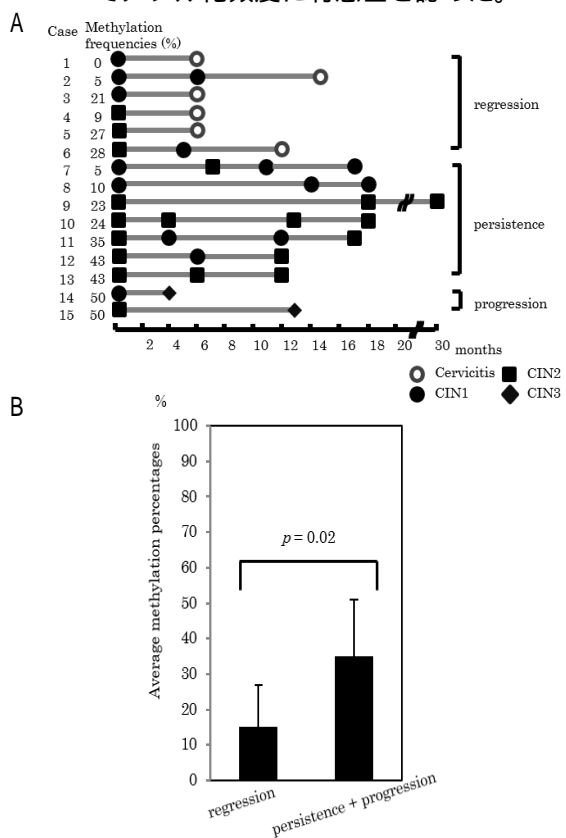


図 2 HPV52 型 L1 遺伝子のメチル化頻度と病変の推移

HPV52 型・58 型メチル化頻度の検討の報告は我々が世界で初めてである。HPV52 型・58 型 L1 遺伝子のメチル化は CIN が高位病変になるほど高くなる傾向が認められた。更に HPV52 型 L1 遺伝子のメチル化

は病変の予後と相関があり、CIN に対する新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

(2) 子宮頸部上皮内病変における局所免疫応答の解析

次に腔内に分泌されている IL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-10、-12、-13、-17、G-CSF、GM-CSF、INF-、MCP-1、MIP-1、TNF- を網羅的に Multiplex Immunoassay 法を用いて解析した。

IL-1、IL-8、G-CSF、MIP-1 は多症例で測定範囲を超える高濃度であったため測定できず検討除外した。その他の 13 種で細胞診結果と相関したのは GM-CSF (p=0.015) と MCP-1 (p=0.004) であった。GM-CSF は HPV 感染と関係なく HSIL で NILM と LSIL に比べ高値を示した (p=0.009)。MCP-1 は high risk HPV 感染群において HSIL で NILM と LSIL に比し低値を示した (p=0.008) が、low risk HPV 感染群と HPV 非感染群では病変間の有意差はなかった。

GM-CSF と MCP-1 はともに抗腫瘍免疫応答を誘起するサイトカインであり、CIN の high risk HPV 感染例では病変進行とともに MCP-1 は発現低下し免疫逃避が生じると考えられた。一方で、GM-CSF の発現上昇は宿主の抗腫瘍免疫応答が誘起されていることを示唆している。

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 2 件)

Murakami I, Fujii T, Dan K, Saito M, Ohno A, Iwata T, Aoki D. Methylation of human papillomavirus-52 and -58 is a candidate biomarker in cervical neoplasia. *Journal of Clinical Virology* 2013 Sep;58(1):149-54 DOI:10.1016/j.jcv.2013.06.026.

査読:有

Murakami I, Fujii T, Kameyama K, Iwata T, Saito M, Kubushiro K, Aoki D. Tumor volume and lymphovascular space invasion as a prognostic factor in early invasive adenocarcinoma of the cervix. *Journal of Gynecologic Oncology* 2012 Jul;23(3):153-8 DOI:10.3802/jgo.2012.23.3.153.

査読:有

[学会発表](計 4 件)

村上功, 藤井多久磨, 齋藤深雪, 杉山重里, 西尾浩, 大野暁子, 森定徹, 岩田卓, 田中京子, 青木大輔

子宮頸部上皮内病変に対する新規バイオマーカーの開発 ~ ヒトパピローマウイルス 52 型・58 型メチル化頻度の解析 ~
第 12 回日本婦人科がん分子標的研究会
2013 年 7 月 16 日

奈良

Murakami I, Fujii T, Dan K, Ohno A, Saito M, Iwata T, Aoki D
Methylation frequencies of human papillomavirus-58 in cervical neoplasia

28th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop
2012 年 12 月 3 日 ~ 5 日
San Juan, Puerto Rico

Murakami I, Fujii T, Ohno A, Saito M, Iwata T, Aoki D
HPV52 genome methylation in asymptomatic infection and cervical neoplasia

27th International papillomavirus conference and clinical workshop
2011 年 9 月 20 日
Berlin

村上功, 岩田卓, 藤井多久磨, 杉山重里, 西尾咲子, 西尾浩, 大野暁子, 平尾薫丸, 青木大輔, 吉村泰典
子宮頸部上皮内病変における局所免疫応答の解析

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会
2011 年 8 月 29 日 ~ 31 日

大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 功 (MURAKAMI, Isao)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 70445237