

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：32645  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24590453  
研究課題名(和文) 癌遺伝子hWAPLの発現解析と診断への応用

研究課題名(英文) Expression analysis of hWAPL oncogene

研究代表者

山田 正俊 (Yamada, Masatoshi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50449120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、hWAPLに特異的な一次抗体を使用し、子宮頸部病変において増殖上皮細胞にhWAPLタンパクが過剰発現することを免疫組織学的に証明した。hWAPLタンパクは子宮頸部病変が軽度異形成(CIN1)から高度異形成(CIN3)、さらに癌へと進展するごとにその発現量が増えることが明らかとなり、病変の形成において重要な役割を果たしているタンパクであることが示唆された。

また、子宮頸部病変の発生やhWAPLの発現に関与するヒトパピローマウイルス(HPV)の検出法に関する研究を行い、子宮頸部からのHPVの検出においては、従来のDNA検出法よりもmRNAで検出する手段がより特異的であることを示した。

研究成果の概要(英文)：By use of immunohistochemical method, we showed that the expression of hWAPL protein increases in the cervical lesion. The expression of hWAPL protein increased as the cervical lesion progresses from mild dysplasia (CIN1) to severe dysplasia (CIN3) and carcinoma. This indicates that hWAPL protein is important to form cervical lesions.

We also demonstrated that the detection of mRNA of human papilloma virus (HPV), which is associated with cervical lesions and the expression of hWAPL, is more specific than that of DNA.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：hWAPL 子宮頸部病変 HPV

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)感染が原因で引き起こされる。HPVが持続感染化するとその一部で子宮頸部の細胞に異常(異形成)を生じ、さらに平均で10年以上の歳月の後、ごく一部(感染者の1%以下)が異形成から子宮頸癌に進行する。この異形成から子宮頸癌にいたる分子機構の一つとしてHPVのE6/E7の関与が示されているが、そのメカニズムにおいて申請者らによって新たにhWAPLの関与が示された(図参照)。また、hWAPLの発現制御により子宮頸癌細胞の増殖抑制が確かめられたことから、子宮頸癌の分子標的治療にhWAPL siRNAが有効である可能性も申請者らの研究で示された。一方、hWAPLの正常な機能については、その詳細は不明であるが、申請者らは精子形成への関与が示唆されることを報告した。また、hWAPLがcohesinと結合してクロマチンの制御にかかわっていることも報告され、hWAPLの過剰発現により染色体不安定性がもたらされ、発癌に至る可能性も示唆された。

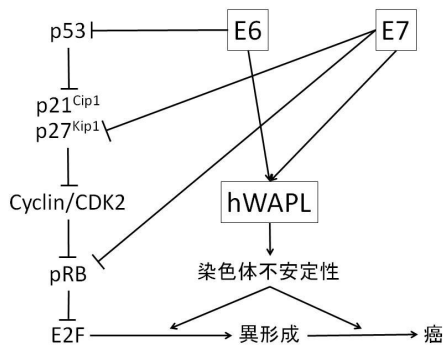


図 hWAPLを介する子宮頸癌発生の分子機構

一方、ノンコーディングRNAのひとつである、約20~25塩基から成るmicroRNAは、様々な遺伝子の発現を制御する機能を有すると考えられ、近年、癌をはじめ様々な疾患で注目を浴びている。現在では1000を超えるmicroRNAが

データベースに登録されている。hWAPLもmicroRNAによりその発現が制御される可能性があるが、hWAPLの標的と成るmicroRNAは未だ知られていない。hWAPLの詳細を臨床病理学的、分子生物学的に解明することは、子宮頸部異形成ならびに子宮頸癌の診断のみならず、治療への応用も期待される。

2. 研究の目的

本研究では癌遺伝子hWAPLに着目した。子宮頸部病変には、前癌状態とも言える異形成病変(軽度、中等度、高度)、上皮内癌、および扁平上皮癌があり、軽度異形成から各段階を経て浸潤癌である扁平上皮癌へと至る。子宮頸部病変の各臨床病理学的stageにおけるhWAPL蛋白の発現解析を行うことにより、これまでに存在しなかった子宮頸部病変の病期の分子診断法と病期進展の予後診断を確立する。

また、hWAPLのsiRNAにより子宮頸癌細胞株由来の腫瘍が退縮することは、これまでの研究で実証済みであり、従ってhWAPLの発現を制御するmicroRNAが同定されれば、そのトランスフェクションにより腫瘍縮小効果が十分期待される。本研究ではhWAPLの標的microRNAの同定を行い、hWAPLの抑制による子宮頸癌の治療法開発を目指す。

臨床的には、子宮頸癌の発生を抑制するためには早期に子宮頸部病変を検出することが求められる。現在本邦ではHPVの検出に関しては専らDNAによる検査がおこなわれているが、今回HPVのmRNAを検出する手段が、より優れたHPV検査になり得るか否かの検証もおこなった。

### 3. 研究の方法

hWAPL に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行い、子宮頸部病変における hWAPL タンパクの発現解析を行う。

プレートトランスフェクション法を用い、hWAPL の発現を制御する microRNA の同定を行う。

HPV mRNA 検出試薬 APTIMA<sup>®</sup>を用い、子宮頸部病変を有する患者より採取された検体において、既存の HPV DNA 検出試薬 HC2<sup>®</sup>と AMPLICOR<sup>®</sup>との比較対象下に HPV 検出の感度、特異度の検証をおこなった。

### 4. 研究成果

本研究において、hWAPL に特異的な一次抗体を使用し、子宮頸部病変において増殖上皮細胞に hWAPL タンパクが過剰発現することを免疫組織学的に証明した(図 1)。

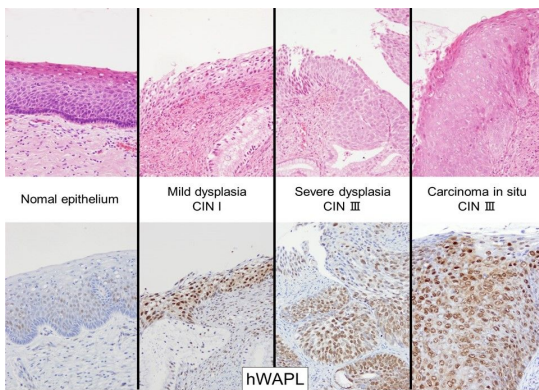


図1 hWAPL抗体を用いた子宮頸部病変に対する免疫組織染色

hWAPL タンパクは子宮頸部病変が軽度異形成(CIN1)から高度異形成(CIN3)、さらに癌へと進展するごとにその発現量が増えることが明らかとなり、病変の形成において重要な役割を果たしているタンパクであることが示唆された(図 2)。子宮頸部病変の検出に際して、既知のマーカールとして p16 や Ki-67 が知られているが、

hWAPL の染色性はこれらのタンパクと同等の染色態度を示し、子宮頸部病変の診断に際しても有用なマーカーとなりうることが示された。

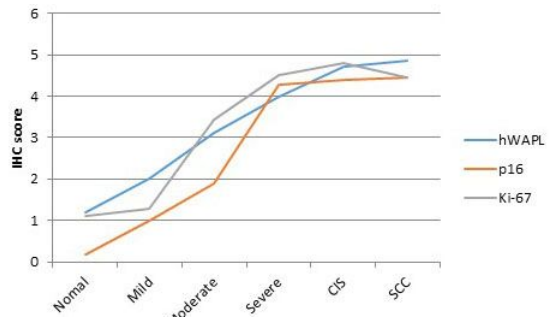


図2 子宮頸部病変における関連タンパクの発現強度

また、子宮頸部病変の発生や hWAPL の発現に關与するヒトパピローマウイルス(HPV)の検出法に關する研究では、子宮頸部からの HPV の検出においては、APITMA を用いた HPV mRNA の検出が、従来の DNA 検出法と同等の優良な結果を示すことが示された(図 3)。さらに、異形成病変(SIL)を有する患者群では、DNA 検出法よりも優れた特異度を示した(表 1,2)。

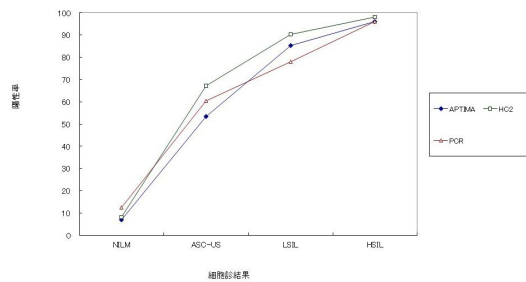


図3 各細胞診判定における高リスクHPVに対するAPTIMA、HC2、AMPLICORの陽性率

	APTIMA	HC2
感度(95% CI)	91.2(83.4 - 96.1)	94.5(87.6 - 98.2)
p-value		0.25
特異度(95% CI)	84.2(79.7 - 88.1)	80.4(75.6 - 84.7)
p-value		<0.01
陽性適中率	62.4	94.5
陰性適中率	97.1	80.4

表1 SIL症例を対象とした高リスクHPVに対する APTIMAとHC2の感度と特異度

	APTIMA	AMPLICOR
感度 (95% CI)	91.2 (83.4 – 96.1)	87.9 (79.4 – 93.8)
p-value		0.37
特異度 (95% CI)	84.2 (79.7 – 88.1)	78.2 (73.3 – 82.7)
p-value		<0.05
陽性適中率	62.4	53.7
陰性適中率	97.1	95.8

表2 SIL症例を対象とした高リスクHPVに対する APTIMAとAMPLICORの感度と特異度

一方、hWAPL の制御に關与する microRNA の同定する実験を試みたが、現在のところ効率的に発現を制御する microRNA の同定には至っておらず、引き続き研究を継続する。

## 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 1 件)

1. Y. Nakayama, M. Yamada, A. Kurata, H. Kiseki, K. Isaka, M. Kuroda. Evaluation of the Human Papillomavirus mRNA Test for the detection of cervical lesions in Japan. European Journal of Gynaecological Oncology 2015; 36: 192-196 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. 山田正俊、子宮頸部扁平上皮病変における hWAPL の発現検討 (第 101 回日本病理学会 総会 平成 24 年 4 月 東京)

[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

山田 正俊 (MASATOSHI YAMADA)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50449120

### (2) 研究分担者

黒田 雅彦 (MASAHIKO KURODA)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80251304

倉田 厚 (ATSUSHI KURATA)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10302689