

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461683

研究課題名(和文)皮膚腫瘍におけるヒトパピロームウイルス感染の検討と病変形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Detection of human papillomaviruses in skin tumors and investigation of the pathogenesis

研究代表者

清水 晶 (Shimizu, Akira)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70396638

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)：今回の研究により、爪部色素線条型ボーエン病で新たに悪性型のHPV67型が検出されることを示した。また、有棘細胞癌30例におけるHPV感染を検討し、外陰部有棘細胞癌2例のみで悪性型のHPV16型が検出された。HPV陽性外陰部有棘細胞癌は、ボーエン様丘疹症由来であった。さらに特殊なタイプの角化型コンジローマと色素性コンジローマを新規に報告した。最終年には転写因子GATA2変異例による多発性疣贅を経験した。手指を中心に多数の疣贅が見られ、その性状は尋常性疣贅に近く、HPV型も 型、EV型のマイナーなタイプが多数検出された。HPV易感染性について現在検討中である。

研究成果の概要(英文)：We reported HPV-associated Bowen's disease and clarified some characteristics. 1. It could be detected in young patient. 2. Nail and anogenital region were mainly affected. 3. Some cases showed longitudinal melanonychia. We have reported a case of HPV type 67 associated Bowen's disease presenting with longitudinal melanonychia. We further investigated 30 cases of squamous cell carcinoma and detected 2 HPV type 16 associated SCC. They were anogenital SCC and had been developed from bowenoid papulosis. Furthermore, we newly reported a case of keratotic condyloma acuminatum and a pigmented condyloma acuminatum. In the last year, we examined a patient with generalized verrucosis due to GATA2 deficiency. Numerous warts were scattered in the hand and foot. Several HPV types were detected. The mechanism of the susceptibility to HPV is under investigation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 ヒト乳頭腫ウイルス 遺伝性疾患

1. 研究開始当初の背景

HPV は子宮頸癌の原因ウイルスであり、また皮膚科領域では主に尖圭コンジローマ、尋常性疣贅を生じる。皮膚腫瘍でも多施設で HPV の検出が試みられているが、その検出は散発的であり、HPV 検出率も方法により、また施設により違いが見られる。これまで皮膚科領域では HPV のサブタイプによる特異的細胞変性効果が報告され、またサブタイプにより尋常性疣贅の臨床像(色素性疣贅など)も異なる。皮膚の悪性腫瘍では、手指、外陰部の Bowen 病において悪性型の HPV が検出されることが報告されてきた(1, 2)。我々は最近 HPV56 が陽性の爪甲色素線条を呈する Bowen 病を報告した(3, 4)。これらの結果は、Bowen 病においても良性腫瘍で見られるような HPV 型特異的細胞変性効果が存在することを示唆している。さらにこのほかにも HPV の関連する皮膚腫瘍が存在すると思われる。

近年、子宮頸癌に対して2種類の HPV ワクチンが使用されるようになった。現在のワクチンは子宮頸癌予防のために作製されており、対象となる HPV 型も子宮頸部癌の主な原因となる HPV 16 と 18 (HPV 6 と 11) に限られている。HPV ワクチンは HPV の被殻蛋白である L1 に対して作られているが、その抗原性は HPV 16 および 18 と極めて近縁の型に限られている。将来的に HPV 関連皮膚腫瘍も含めた HPV ワクチン開発のために、皮膚腫瘍における HPV サブタイプを把握することは不可欠である。

2. 研究の目的

悪性および良性の皮膚腫瘍における悪性型及び良性型 HPV の網羅的な検出を行う。

3. 研究の方法

(1). 各種の皮膚腫瘍における HPV 感染率の検討と新規 HPV 関連腫瘍の探索を行う。各種の皮膚腫瘍における HPV 感染を網羅的に検出する。HPV が感染している新規の皮膚腫瘍を見出し、HPV 陽性腫瘍の病理学的および臨床的な特徴を明らかにする。

皮膚腫瘍における HPV の網羅的な検出

皮膚腫瘍パラフィンブロックより Dexpat (TAKARA)を用いて DNA 抽出を行う。始めに、悪性型の HPV をよく検出する L1C1/L1C2 プライマー(5)を用いて PCR で検討し、検出された DNA 断片のシーケンシングにより、HPV のサブタイプを同定する。また、良性悪性を問わず幅広く HPV を検出できる GP5+/6+プライマー(6)などのコンセンサスプライマーでも比較検討する。HPV 陽性例では ISH(DAKO 社 Genpoint system)を行い、ウイルスの局在を確認する。このシステムで用いられているプローブは悪性型 HPV のカクテルであるが、予備的な検討では、検出率が高くウイルス DNA の局在を見るのは最適であ

った。これらの解析により、HPV のサブタイプと組織内のウイルスの局在が明らかになる。陽性コントロールを用いた予備実験も含め、計画通りに進まない場合は、(1) DNA の抽出方法および試料(全てではないが生標本がある)の変更、および(2) プライマーの検討(プライマーの標的領域や配列を検討)を行う。

ウイルスの塩基配列についての詳細な検討

HPV の塩基配列を決定し、その特徴を詳細に検討する。重要な HPV に関しては、できるだけ long PCR を用い全長のシーケンシングを行う。ホルマリンによる変異の恐れがあり、なるべく生標本を用いる。皮膚腫瘍から検出される HPV は、同じサブタイプでも皮膚病変に特徴的な変異を持つバリエーションである可能性がある。我々の今までの検討では、爪甲色素線条を伴う Bowen 病では、HPV 56 の reference sequence と共通な塩基配列および QV26762 バリエーションの塩基配列の2つが検出されている(4)。将来発現実験に用いる鋳型 DNA は、その後の解析を円滑に進めるため、生標本で検出された臨床材料由来 DNA か、由来の明らかな標準的な HPV プラスミドとする。

新規 HPV 関連皮膚腫瘍の探索

爪甲色素線条を伴う Bowen 病の多くで HPV 56 が検出されることを既に我々が発表したが、このように HPV 陽性の皮膚病変では、特徴的な臨床像を呈する可能性がある。手指、外陰部といった部位的な特性や角化・色素産生などの臨床的な特性に注目する。HPV 感染が臨床的な特徴を誘導するメカニズムを解明する。

4. 研究成果

爪甲色素線条型 Bowen 病と HPV について。

当科ではこれまで、HPV 感染による爪甲色素線条型 Bowen 病を5例経験している。稀な症例ではあるが、全国的には相当数の症例が同様に診断されている可能性がある。HPV と Bowen 病に関する報告は以前より散見され、特に手指、外陰部の Bowen 病において HPV16 型などの悪性型 HPV が検出されることが知られている(2)。興味深いことに当科で経験した爪甲色素線条型 Bowen 病では5例中4例で HPV56 型が検出された。HPV56 型は HPV 16 型と同じハイリスクグループに属する。子宮頸癌で検出され、正常子宮頸部組織やコンジローマからの検出率は低いとされている。HPV 陽性 Bowen 病の特徴としては、1. Bowen 病の発症年齢としては低い 20 - 30 歳代の若年者にも見られる、2. 爪、外陰部などに多い、3. 爪甲色素線条のような特徴的な臨床像を呈するものが多い、などが挙げられた。他施設では爪甲色素線条型 Bowen 病では HPV56 型のみならず、HPV16 型を始めとして数種の HPV

が検出されている。したがって、爪甲色素線条型 Bowen 病に対して HPV56 型が中心的に関与しているかどうかを確認するために症例の蓄積が必要であった。

今回の研究により、爪部色素線条型ボーエン病で新たに悪性型の HPV67 型が検出されることを示した (7)。Bowen 病で色素沈着をきたす機序はメラノファージなどの存在による。しかし、爪甲色素線条型 Bowen 病の一番の特徴は、過角化による爪甲の変形・肥厚である。また、爪甲下の角質増殖も見られることを報告した (7)。これらの結果から、爪甲色素線条型 Bowen 病では HPV56 型を始め、種々の悪性型 HPV により発症することが明らかになった。

有棘細胞癌と HPV について

有棘細胞がん HPV 感染については多くの報告がある。当科で経験した有棘細胞癌 30 例における HPV 感染を検討した。これまでの報告と異なり、外陰部有棘細胞癌 2 例のみで悪性型の HPV16 型が検出された。HPV 陽性外陰部有棘細胞癌では周囲に黒色結節を伴っており、bowenoid papulosis 由来であった (8)。興味深いことに同様の報告は欧米を除くアジアからしかなく、人種差などが原因であることも考えられる。耳鼻咽喉科領域では中咽頭癌が HPV 関連であることが知られているが、中咽頭癌では HPV 陽性例のほうが予後良好であるとされている (9)。自験例では 2 例の HPV 陽性例のうち、1 例にはリンパ節転移が見られた。HPV 関連有棘細胞癌の予後については今後慎重に検討していく必要がある。

特徴的な臨床像を呈するコンジローマについて。

角化型のコンジローマ (10) と色素性コンジローマ (11) を発表した。外陰部の皮膚腫瘍からは高率に HPV が検出され、コンジローマのバリエーションを把握することは疾患鑑別の際に有用である。併せて、外陰部上皮性腫瘍における HPV 感染について当科と関連病院において調査し、効率に HPV 感染が検出されることを示した (12)。

GATA2 変異による多発性疣贅について。

期間中に GATA2 変異例を経験した。多発性疣贅がみられ、免疫グロブリン正常、単球減少から診断した。手指を中心に多数の疣贅が見られ、その性状は尋常性疣贅に近く、HPV 型も型、EV 型のマイナーなタイプが多数検出された。この症例では、肛門癌、骨髄異形成症候群、リンパ浮腫が見られている。単球に加え、血中の樹状細胞はほぼ消失していた。現在 HPV 易感染性の機序について解析を進めている。GATA2 欠損症は血液内科領域では国内の報告も見られるため、他の遺伝性疾患に比べて遭遇する可能性の高い疾患と思われる。

Ikenberg H, Gissmann L, Gross G, Grussendorf-Conen EI, zur Hausen H. Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int J Cancer* 32 : 563-5.1983

Mitsuishi T, Sata T, Matsukura T, Iwasaki T, Kawashima M. The presence of mucosal human papillomavirus in Bowen's disease of the hands. *Cancer* 79:1911-7.1997

Shimizu A, Tamura A, Abe M, Motegi S, Nagai Y, Ishikawa O, Nakatani Y, Yamamoto Y, Uezato H, Hoshino H. Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix. *Br J Dermatol* 158:1273-9.2008

Shimizu A, Tamura A, Abe M, Amano H, Motegi S, Nakatani Y, Hoshino H, Ishikawa O. Human papillomavirus type 56-associated Bowen disease. *Br J Dermatol* 167:1161-4.2012

Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 82:524-31.1991

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. *J Gen Virol* 76 :1057-62. 1995

Shimizu A, Yasuda M, Hoshijima K, Kato M, Takahashi A, Tamura A, Ishikawa O. Detection of Human Papillomavirus Type 67 in Subungual Bowen's Disease Presenting as Longitudinal Melanonychia. *Acta Derm Venereol* 95:745-6. 2015

Shimizu A, Kato M, Takeuchi Y, Sano T, Kaira K, Uezato H, Ishikawa O. Detection of human papillomavirus (HPV) in patients with squamous cell carcinoma and the clinical characteristics of HPV-positive cases. *Br J Dermatol* 171:779-85.2014

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 92:709-20. 2000

Shimizu A, Hattori M, Kaira K, Ishikawa O. Keratotic condyloma acuminatum. *J Dermatol.* 43:716-7. 2016

Shimizu A, Kato M, Ishikawa O.

Pigmented condyloma acuminatum. J Dermatol. 41:337-9. 2014

Kato M, Shimizu A, Takeuchi Y, Hattori T, Abe M, Amano H, Motegi S, Tamura A, Ishikawa O. Human papillomaviruses in anogenital epithelial lesions. Acta Derm Venereol. 94:597-9. 2014

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13件)

Ogata D, Shimizu A, Hokama Y, Tsuchida T. A case of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma with bone invasion and verruca vulgaris of the fingernails. Eur J Dermatol. 査読有 In press

Shimizu A, Hattori M, Kaira K, Ishikawa O. Keratotic condyloma acuminatum. J Dermatol. 査読有 3:716-7. 2016

Ashida A, Shimizu A, Okuyama R. Acquired epidermodysplasia verruciformis associated with HPV type 47 in an HIV-infected patient J Dermatol. 査読有 43:717-8. 2016

Shimizu A, Yasuda M, Hoshijima K, Kato M, Takahashi A, Tamura A, Ishikawa O. Detection of human papillomavirus type 67 in subungual Bowen's disease presenting as longitudinal melanonychia. Acta Derm Venereol. 査読有 95:745-746. 2015

Kato M, Shimizu A, Yokoyama Y, Kaira K, Shimomura Y, Ishida-Yamamoto A, Kamei K, Tokunaga F, Ishikawa O. An Autosomal Recessive Mutation of DSG4 Causes Monilethrix through the ER Stress Response. J Invest Dermatol. 査読有 135:1253-60. 2015

Kishi K, Shimizu A, Kato M, Amano H, Ishikawa O. Successful treatment of genital Bowen's disease with imiquimod 5% cream. Int J STD AIDS. 査読有 26:752-4. 2014

Shimizu A, Kato M, Takeuchi Y, Sano T, K K, Uezato H, Ishikawa O. Detection of human papillomavirus (HPV) in patients with squamous cell carcinoma and the clinical characteristics of HPV-positive cases. Br J Dermatol. 査

読有 171:779-85. 2014

Kuraishi N, Shimizu A, Kato M, Takeuchi Y, Tamura A. Giant Condyloma Acuminatum in the Axilla. Acta Derm Venereol. 査読有 95:355-6. 2014

Shimizu A, Kato M, Ishikawa O. Bowenoid papulosis successfully treated with imiquimod 5% cream. J Dermatol. 査読有 41:545-6. 2014

Shimizu A, Nakatani Y, Nakamura T, Jinno-Oue A, Ishikawa O, Boeke JD, Takeuchi Y, Hoshino H. Characterisation of cytoplasmic DNA complementary to non-retroviral RNA viruses in human cells. Sci Rep. 査読有 30;4:5074. 2014

Shimizu A, Kato M, Ishikawa O. Pigmented condyloma acuminatum. J Dermatol. 査読有 41:337-9. 2014

Kato M, Shimizu A, Takeuchi Y, Hattori T, Abe M, Amano H, Motegi SI, Tamura A, Ishikawa O. Human Papillomaviruses in Anogenital Epithelial Lesions. Acta Derm Venereol. 査読有 94(5):597-9. 2014

Ishibuchi H, Shimizu A, Negishi I, Ishikawa O. A Perianal Erythematous Plaque: A Quiz. Acta Derm Venereol. 査読有 94:492-3. 2013

[学会発表](計4件)

服部麻衣、清水 晶、塚越博之、猿木信裕、石川 治 コクサッキーウイルスA6型が検出された非定型的な手足口病の2例 第89回日本皮膚科学会群馬県地方会 2015.12.17 前橋市

Mai Hattori, Akira Shimizu, Hiroo Amano, Osamu Ishikawa, Takeki Mitsui, Kyoichi Kaira, Daisuke Oikawa, Fuminori Tokunaga, Hajime Nakano and Daisuke Sawamura Generalized verrucosis caused by a GATA2 deficiency. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 11-13, 2015 Okayama

清水 晶 教育講演 31「ウイルス性疣贅 update」遺伝子異常を伴う多発性疣贅の診断と治療 第114回日本皮膚科学会総会 2015.5.30 横浜

栗山裕子、清水晶、加藤円香、天野博雄、石川治(群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学)、中野創、澤村大輔(弘前大学

大学院医学系研究科皮膚科学) GATA2
遺伝子変異を認めた generalized
verruccosis 第78回日本皮膚科学会東部
支部学術大会 2014. 10. 4.青森 Best
Scientific Poster Award 受賞

〔図書〕(計3件)

清水 晶 ウイルス性疣贅(いぼ) 伝染
性軟属腫 今日の治療指針 私はこう治
療している: p1260, 2016

清水 晶 特集:皮膚科で診る STI - HSV,
HPV, HIV 感染症編 Bowenoid papulosis
Visual Dermatology Vol16 No08:
2016

清水 晶
Lewandowsky の皮疹
臨床皮膚科 69: 16, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 晶 (SHIMIZU Akira)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70396638