

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462540

研究課題名(和文)子宮頸部発癌の分子機構解明とその結果の臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of cervical cancer and its clinical application

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハイリスク型ヒトパピローマウイルス(HPV)の同定およびモニタリングは、世界におけるHPV型の分布を知ること、感染予防ワクチンの予防効果のモニタリング、今後ワクチンが普及するにつれ、検出されるHPV型の分布に変化がみられるか否かなどの点で重要である。従来から行われている頸部擦過細胞検体から得られたHPVの型判定法は多重感染も高頻度に検出される方法であり、ワクチン効果のモニタリングが難しい。しかしながら、統計処理により集団におけるHPV感染型を統計学的に補正処理することでHPV感染予防ワクチンの効果を推定することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Monitoring the attribution of human papillomavirus (HPV) genotypes to cervical precancerous lesions is essential for evaluating the potential efficacy of HPV vaccines. Three procedures, Clinichip HPV test (Chip) and modified GP5+/6+ PCR coupled to fluorescent bead sorter detection (MGP) in exfoliated cervical cells (C-Chip and C-MGP, respectively) or formalin-fixed paraffin-embedded tissues (F-MGP), were compared to determine the appropriate genotyping procedures. In CIN 2/3 specimens, HPV16/18/31/33/45/52/58 hierarchical attribution was 88.4% (76/86) with C-Chip, 86.0% (74/86) with C-MGP, and 83.7% (72/86) with F-MGP ( $p = 0.49$ ). Although F-MGP is theoretically a reliable method for determining HPV genotype attribution, it is acceptable to use C-Chip or C-MGP, coupled to the hierarchical attribution formula to correct the bias of multiple infections. These approaches using exfoliated cervical cells are practical for monitoring the efficacy of HPV vaccines.

研究分野：gynecology

キーワード：human papillomavirus vaccine cervical cancer

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、子宮頸癌は毎年約1万人が罹患し3,500名が死亡するという頻度の比較的多い癌である。最近では癌発生の若年化が認められ、妊孕能温存の見地からも注目を集めている。子宮頸癌は予防可能な癌とされるが、癌検診受診率は欧米と比較して高くなく、ヒトパピローマウイルス(HPV)感染予防ワクチンは定期接種化されたものの、副反応の報告が相次ぎ、その普及はあまり期待されない状況にある。女性の生涯では50-80%はHPVに感染するといわれ、現在のところHPV感染は避けられない。子宮頸部発癌機構において、HPV感染が重要な働きを示していることは過去20年の研究成果より明らかとなりつつある。疫学的には、子宮頸癌組織には99.7%のハイリスクHPVが検出できると報告されている。HPVは200種類の型が同定されているが、子宮頸部発癌に関与するハイリスク型HPVは現在14種類ほどが同定されている。HPV型の検出においては、世界においても地域差があることが知られ、欧米では比較的稀なHPV52,58型が日本を含む東アジアに多いことも報告されている。このハイリスク型HPVの同定およびモニタリングは、世界におけるHPV型の分布を知ること、感染予防ワクチンの予防効果のモニタリング、今後ワクチンが普及するにつれ、検出されるHPV型の分布に変化がみられるか否かなどの点で重要である。

## 2. 研究の目的

従来、前癌病変および癌組織に感染しているHPV型判定を行う場合、子宮頸部擦過細胞を検体として利用することが実地臨床の現場では行われている。しかしながら、患者の子宮頸部擦過細胞検体から採取されたDNAには、病変を形成していない一過性のHPV感染も検出されてしまうため、結果として複数のハイリスクHPV型のDNAが検出されることも

多く、病変形成に関わった真のHPV型の同定が困難である。そこで、既に診断の得られている子宮頸部腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体(FFPE)から、DNAを抽出してウイルスDNAの塩基配列を決定することで、病変と関連のあるハイリスクHPV型を同定することにした。この結果を従来から行われている頸部擦過細胞検体から得られたHPVの型判定と比較することで、既存の方法による型判定との違いを検証する。病変部位から検出されたHPVの型が真の病変形成に関わった型であり、それ以外の型が擦過細胞から検出されている場合には、病変形成に関与しなかった型と言えそうであるが、その一方で、FFPEサンプルではDNAの変性や断裂もあり、検出感度が低下するという欠点も存在する。したがって、本研究課題では、本邦において、双方の利点、欠点を補うような方法を提案できるか否かを検討することにした。

## 3. 研究の方法

患者検体の中で擦過細胞およびFFPEが保存されている検体を選別し、HPV型判定を行う。型判定法についてはクリニチップ法(C-chip)とPCR-MGP法を採用する。クリニチップ法は擦過細胞を用いて解析が可能であり、臨床的に広く使われている方法である。我が国においては保険収載の検査薬品として評価されている方法である。PCR-MGP法は世界保健機構の研究グループが開発した方法であり、世界的に広く使われている方法の一つである。PCR-MGP法では擦過細胞検体(C-MGP)とFFPE検体(F-MGP)におけるHPV型判定の解析を行えることから、合計3つの解析結果を照合し、方法の違いによるHPV型判定の違いを比較した。HPVの型が複数検出される場合には既報の方法によるhierarchical attribution法およびproportional attribution法にて解析した<sup>1,2</sup>。なお、本研究は施設内倫理委員会の承認を得

て行った。

#### 4. 研究成果

(1)3つの方法の型別一致率は83.9%-100%であった。

(2)CIN2/3の病変において、HPV16/18型の寄与する割合はC-chip法で52.3%(45/86)、C-MGP法で54.7%(47/86)、F-MGP法で52.3%(45/86)であった。

(3)CIN2/3の病変において、HPV16/18/31/33/45/52/58型の寄与する割合はC-chip法で88.4%(76/86)、C-MGP法で86.0%(74/86)、F-MGP法で83.7%(72/86)であった。

(4)CIN3の病変において、HPV16/18/31/33/45/52/58型の寄与する割合はC-chip法で96.4%(53/55)、C-MGP法で89.1%(49/55)、F-MGP法で94.5%(52/55)であった。F-MGP法C-chip法、C-MGP法で分析し、hierarchical attribution法を用いて統計解析することで、C-chip、C-MGP、H-MGPといった3つの手法間に統計学的な有意差がないことが分かった。

##### (考察)

HPVワクチンの効果を調べるためには、適切なHPV型判定の方法が求められる。PCR法は感度が良いため、真の病変形成に関わらないHPV感染も検出する可能性がある。特に子宮頸部擦過細胞を用いた解析では、病変以外の部位からの細胞も採取されるために、その可能性は高い。一方で、FFPEを用いた解析では、顕微鏡で病変と確認された部位からDNAを抽出するため、その可能性は低くなるがDNAの質が低下するために本来病変形成にかかわったHPV型を見落とす可能性がある。さらに、FFPEからの検体でHPVの重感染が見られた場合、どのように判定するのかが問題となる。既報によれば<sup>1,2</sup>、母集団においてHPVの感染頻度に重み付けをし、病変を形成したHPV型を推定するという方法がとられている(proportional attribution法)。さらに、

母集団においてHPVの感染頻度から、一番頻度の高いものを病変形成にかかわったHPV型と決めてしまうという方法が採用されている(hierarchical attribution法)。どちらも、推定により病変形成にかかわったHPV型を決めていく方法であり、絶対の真理ではないが、他に病変形成にかかわったHPV型を決定する方法がないために代用されているのが実情である。HPV感染予防ワクチンの効果を推定するには何らかの方法でHPV型感染の分布を確定する必要があり、今後もこのような方法が採用されていくと推察された。本邦では、この推定方法によりワクチン効果を調べた報告がないこと、解析に用いる検体の違いや解析手法の違いによる結果の違いについて分析した報告がないことから、本研究課題で分析を行った。

現在、米国ではHPV感染予防のワクチンとして9価ワクチンが承認され、実施されつつある。9価ワクチンには発癌にかかわる7種のHPV型と良性の腫瘍(いぼ)の発生にかかわる2種の型の予防が可能である。発癌にかかわる7種のHPVはHPV16/18/31/33/45/52/58型であり、本ワクチンではCIN2/3の83-87%が予防可能である。病変をCIN3に限定すると、89-96%の予防が可能であった。いずれの方法においても検体や解析手法の違いには統計学的な有意差はなかった。言い換えれば、FFPEを用いた解析手法は煩雑なため、擦過細胞を用いたC-chipやC-MGP法が簡便で便利である。今後はこれらの方法でHPVワクチンの効果をモニタリングするのが良いと推察された。

##### 参考文献

<sup>1</sup> *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17: 1611-22.

<sup>2</sup> *Int J Cancer.* 2009; 125: 2151-8

##### 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 39 件)

1. Fujii T, Torii Y, Iwata T, (et al,10, contribution to equal,1<sup>st</sup>,5<sup>th</sup>): Comparison of methods using paraffin embedded tissues and exfoliated cervical cells to evaluate human papillomavirus genotype attribution, Cancer Sci, 査読有 107(10): 1520-1526,2016
2. Fujii T (1,1<sup>st</sup>): Changing state of gynecologic oncologist specialty in Japan. J Obstet Gynaecol Res, 査読有 42 (5):481-488, 2016
3. Miyazaki J,Nishizawa H, Fujii T (et al,12,12<sup>th</sup>): Increased levels of soluble corin in pre-eclampsia and fetal growth restriction.Placenta, 査読有 48:20-25,2016
4. Kawai S, Ichikawa R, Fujii T (et al,6,6<sup>th</sup>): Ovarian clear cell adenocarcinoma revealed in a young patient during hormone therapy: a case report, Fujita Med J, 査読有 2(4):77-79, 2016
5. Ueda T,Murayama K, Fujii T, (et al,5,4<sup>th</sup>): Preoperative magnetic resonance imaging findings of myoma as risk factors for bleeding during laparoscopic myomectomy, Fujita Med J, 査読有 2(3):59-61,2016
6. Kurahashi H, Kato T, Fujii T, (et al,12,12<sup>th</sup>): Preimplantation genetic diagnosis/screening by comprehensive molecular testing. Reprod Med Biol, 査読有 15(1):13-19, 2016
7. Kasuga Y, Iwata T, Fujii T, (et al,17,11<sup>th</sup>,14<sup>th</sup>): Pregnancy Outcomes After Abdominal Radical Trachelectomy for Early-Stage Cervical Cancer: A 13-Year Experience in a Single Tertiary-Care Center. Int J Gynecol Cancer, 査読有 26(1): 163-8, 2016
8. Fujii T, Saito M, Iwata T, (et al,12,1<sup>st</sup>,4<sup>th</sup>): Performance of p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. Int J Clin Oncol, 査読有 20(1):134-142, 2015
9. Miyazaki J, Ito M, Fujii T (et al,14,14<sup>th</sup>): Intragenic duplication in the PKHD1 gene in autosomal recessive polycystic kidney disease: BMC Med Genet, 査読有 16:98, 2015
10. Matsumoto K, Fujii T, Iwata T, (et al,17,10<sup>th</sup>,11<sup>th</sup>): Human leukocyte antigen class II DRB1\*1302 allele protects against cervical cancer: At which step of multistage carcinogenesis? Cancer Sci, 査読有 106(10):1448-54, 2015
11. Iwata T, Fujii T, (et al,11,1<sup>st</sup>,2<sup>nd</sup>): Cytokine Profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. Int J Clin Oncol, 査読有 20(1):126-33 2015
12. Minami Y, Sekiya T, Fujii T (et al,10,10<sup>th</sup>): Relationship between detection of the cervical gland area during the late third trimester and necessity for induction of labor to prevent post-term delivery. J Med Ultrasonics, 査読有 41(4): 463-471, 2014
13. Tsutsumi M, Fujiwara R, Fujii T, (et al,10,9<sup>th</sup>): Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. PLoS One,査読有 9(5): e96710, 2014
14. Nishio H, Yaguchi T, Fujii T, (et al,13,8<sup>th</sup>): Immunosuppression through constitutively

activated NF- B signalling in human ovarian cancer and its reversal by an NF- B inhibitor. Br J Cancer, 査読有 110(12):2965-74, 2014

15. Nakamura M, Fujii T, (et al,7,2<sup>nd</sup>): Surgical anatomy imaging associated with cervical cancer treatment: A cadaveric study. Clin Anat, 査読有 27(3): 503-510, 2014

16. Komatsu H, Yagasaki K, Fujii T (et al,7,7<sup>th</sup>): 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, 2014

17. Torii Y, Kato R, Fujii T, (et al,6,5<sup>th</sup>): ERCC1 expression and chemosensitivity in uterine cervical adenocarcinoma cells. Anticancer Res, 査読有 34(1): 107-115, 2014

〔学会発表〕(計 109 件)

1. Fujii T, Nishio H, Sugiyama J, Iwata T, Tanaka K, Susumu N, Tsuda H, Minegishi K, Hamatani T, Yoshimura Y, Aoki D: Symposium47 Recent advances in gynecologic cancer surgery: Sparing Fertility / Retrospective analysis of fertility-sparing surgery for cervical cancer;40<sup>th</sup> World Congress of the International College of Surgeons, Kyoto International Conference Center, Kyoto, October 23-26,2016

2. Fujii T, Ohwaki A, Saito M, Iwata T, Kukimoto I, Sato H, Okumoto T, Torii Y: How do we treat and care the patient with multiple primaries followed with a recurrent anogenital cancer?; A case report. 30th International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop (HPV 2015). Lisbon, Portugal, September 17-21, 2015

3. Ichikawa R, Kawaii S, Torii Y, Kuroda M, Fujii T: Abnormal cervical cytology of Japanese young women, The 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology, Pacifico Yokohama, Yokohama, May 28-June 1,2016

4. Noda Y, Nishizawa H, Kato T, Kambayashi A, Ouchi Y, Terasawa S, Miyazaki J, Ito M, Kurahashi H, Fujii T: Sex determination of fetus by noninvasive prenatal testing(NIPT)with maternal blood. The13th International Congress of Human Genetics, Kyoto International Conference Center, Kyoto, April3-7.2016

5. Miyazaki J, Nishizawa H, Kambayashi A, Ito M, Noda Y, Terasawa S, Kato T, Miyamura H, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T: Increased levels of soluble corin in patients with pre-eclampsia and fetal growth restriction. The13th International Congress of Human Genetics, Kyoto International Conference Center, Kyoto, April3-7.2016

6. Miyazaki J, Kato T, Kani C, Hayashi S, Ishii R, Miyamura H, Nishio E, Nishizawa H, Kuwahata A, Ochi M, Inazawa J, Kurahashi H, Fujii T: Preliminary study for comprehensive preimplantation genetic diagnosis. IFFS/JSRM International Meeting 2015, PacificoYokohama, Yokohama, April 26-29, 2015

7. Ito M, Hirota Y, Nishizawa H, Nishio E, Tsukada K, Fujii T: Study on the efficacy of adhesion preventive materials in experimental models of laparoscopic surgical adhesion. 14th World Congress of Endoscopic Surgery. Paris, France, June 25-28, 2014

8. 藤井多久磨、今西宣晶、相磯貞和:内視鏡下子宮頸癌根治術に必要な基靱帯・尿管後層の解剖の知識. 第39回日本産婦人科手術学会,

仙台国際センター・宮城県仙台市, 2016 年 11 月 12 日-13 日(11 月 13 日)

〔図書〕(計 9 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 2017-2018 (監修:高久文磨, 編集:黒川 清, 春日雅人, 北村 聖), pp.658-659, 医学書院, 2017

2. 藤井多久磨: Chapter2 女性のライフサイクル別 Women's Health を阻害する疾患 性成熟期前半 3.子宮頸がん・子宮頸部異形成, 女性医療のすべて (編集:大田博明), pp.56-57, メディカルレビュー社, 2016

3. 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 2015-2016 (監修:高久文磨, 編集:黒川 清, 春日雅人, 北村 聖): pp.663-664, 医学書院, 2015

4. 藤井多久磨: 第 章 治療と今後の展望  
2. 最新の子宮頸癌治療 1 妊孕性温存療法はどこまで可能か レーザー蒸散術. 子宮頸癌トータルマネジメント 啓発から予防・管理・治療まで (監修:小西郁生, 編集:嘉村敏治, 鈴木光明): pp.59-61, メディカルビュー社, 2014

5. 藤井多久磨, 仲村 勝: Narrow Band Imaging は診断に有用ですか?, 婦人科癌診療 Q & A - 一つ上を行く診療の実践 - (鈴木 直, 岡本愛光, 井籠一彦 編): pp.46-48, 中外医学社, 2014

6. 藤井多久磨: CIN/子宮頸がん・広汎性子宮頸部摘出術の適応と実際. 婦人科診療ハンドブック (杉山 徹, 大須賀穰, 宮城悦子

編): pp.273-275, 中央医学社, 2014

7. 鳥居 裕, 藤井多久磨: XV-2 子宮頸癌. 診療ガイドライン UP-TO-DATE 2014-2015. (門脇孝, 小室一成, 宮地良樹監修): pp.821-23, メディカルレビュー社, 2014

8. 鳥居 裕, 藤井多久磨: 第 章-11-6 子宮(子宮頸癌). 女性医学ガイドブック更年期医療編 2014 年度版.(日本女性医学学会 編): pp.167-72, 金原出版, 2014

9. 鳥居 裕, 藤井多久磨: 第 章-11-7 子宮(子宮体癌). 女性医学ガイドブック更年期医療編 2014 年度版.(日本女性医学学会 編): pp.172-176, 金原出版, 2014

〔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

岩田 卓 (IWATA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 30296652

(3)連携研究者

高柳淳 (Takayanagi Atsushi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 80245464