

博士(歯学) 濱平 須美子

学位論文題名

Comprehensive Detection of Human Papillomavirus in Buccal Cancer Collected in Bangladesh

(バングラデシュにおいて採取した頬粘膜がんに対する
ヒトパピローマウイルスの網羅的検出)

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、約8000塩基対からなる環状DNAウイルスで、現在まで100種類以上の型が報告されている。HPVは種々の上皮性病変の原因ウイルスとされているが、なかでも90%以上の子宮頸がんにおいてHPVが検出されている。

HPVは、初期遺伝子であり非構造ウイルス遺伝子のE1、E2、E4、E5、E6、E7と後期遺伝子であり構造遺伝子のL1、L2を持つ。E6、E7は、主要ながん遺伝子であり形質転換能を有する。E6タンパクと細胞内タンパクのE6APが結合した複合体はユビキチンライゲースとして働き、がん抑制遺伝子であるp53をユビキチン化し分解する。またE7タンパクはRbファミリータンパクと結合し転写因子E2Fを放出することにより、細胞遺伝子の転写を活性化させ、DNA合成の誘導や細胞周期を正に制御する。

疫学的、分子生物学的研究から、HPV感染と口腔のがん化の関連性が示されているが、それぞれの報告によりHPV感染率は0%から100%までの幅がある。報告された検出結果のうち、高増幅回数のPCRを行ったものにおけるHPV検出率が高くなる傾向が認められる。また現段階では、上皮細胞のがん化にどれだけの数のHPVウイルス粒子が必要かは明らかになってはいない。

【材料と方法】

試料として使用したDNA:

正常な頬粘膜組織 (日本人: 28例、バングラデシュ人: 55例)、頬粘膜がん組織 (バングラデシュ人: 21例) は、バングラデシュのBIRDEM病院及び、北海道大学病院で患者のインフォームドコンセントの下で生検または擦過により採取した。組織試料をプロテアーゼK (20 µg/ml) で処理後、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿によりゲノムDNAを精製し、出発材料とした。

PCR法:

26種類のHPV全長プラスミド、2種のHPVプラスミドを混合した試料、または、正常頬粘膜試料から抽出したDNAを鋳型として、コンセンサスプライマーである pU-1M (5'-TGTC AAAAACCGTTGTGTCC-3')、pU-31B (5'-TGCTAATTCGGTGCTACCTG-3')、pU-2R (5'-GAGCTGTCGCTTAA TTGCTC-3') を使用したPCRを行った。各PCRはDynaZyme (FINNZYME S社、フィンランド) を用いて、94°C 30秒、52°C 30秒、72°C 30秒での増幅を30サイクル行なった。これらPCR産物を精製した後、Ava II、Acc I を用い16時間の制限酵素処理を行いアガロース電気泳動にてHPV型を検討した。

DNAアレイ法:

25種類 (HPV-6、11、16、17、18、20、21、31、33、34、35、39、40、42、45、47、51、52、53、54、56、58、59、61型) のHPV型をクロスハイブリダイゼーションなしに検出することが可能な新規のDNAアレイ法 (ジェネティックラボ、日本) を用い、プロトコールに従って頬粘膜がん試料より抽出したDNAの解析を行なった。

【結果】

コンセンサスプライマーの特異性と感度:

コンセンサスプライマーを用い、26種の全長HPVプラスミドを鋳型としたPCRを行った結果、26種のHPVのうちHPV-16、18、31、33、35、39、40、45、52、56、58型が検出可能であった。その後、

同様のPCRを2種類のプラスミドを混合した試料を鋳型として行なったが、アガロースゲル電気泳動上では2つのバンドを区別することは困難であった。しかし、Ava II、Acc Iを用いた制限酵素処理を行うとPCR産物のHPVの型判別が可能であった。またこのPCR法により、1細胞中1コピーのHPVゲノムを検出可能であり、このコンセンサスプライマーセットを用いてHPV感染をスクリーニングできると考えられた。

正常口腔粘膜と悪性部位でのHPV検出：

試料はすべてGAPDHに対するPCRによって実験材料として適切であることを確認した上で、pU-1M/pU-2Rプライマーを用いたPCRにより解析した。PCRの結果、日本人正常粘膜28例中2例で、HPV-11、16型がそれぞれ確認された。しかし、バングラデシュ人の正常粘膜55例からは、HPV DNAは検出されなかった。バングラデシュ人の頬粘膜がん症例21例についてPCRを行なったがHPV DNAは検出されず、DNAアレイ法を用いた解析によっても、HPVは検出されなかった。

【考察】

喫煙、アルコール摂取と同様、近年HPVもまた口腔がんの主要なリスクファクターであるという報告がなされている。しかし、口腔領域でのHPV陽性率の報告にはかなりの幅がある。我々の以前の研究では、口腔扁平上皮がん症例の25%から30%においてHPV感染が認められた。43%の口腔がん症例において、p53の点突然変異がみられたが、HPV感染とp53点突然変異が同時に存在するものは稀であった。このことは、HPV感染が口腔がんの独立したリスクファクターであることを示唆している。

バングラデシュでは、頬粘膜部扁平上皮がんは、最も頻繁に生じる悪性新生物であるが、betel-quad が誘発因子の一つではないかと考えられる。betel-quad はがん抑制遺伝子を変異させることの可能な化学的遺伝毒性物質を含んでおり、Chiba らは、betel-quad の摂取がp53のエクソン5に特異的な変異をもたらすと報告している。このような遺伝子の変異がバングラデシュでの頬粘膜部悪性腫瘍にも生じている可能性は高い。

100種類以上のHPV型があることを考えると、今回検討した症例におけるHPV感染の可能性を除外することは出来ない。しかしながら、我々の用いたコンセンサスプライマーセットを使用したPCRでは頻繁に感染が確認されるHPV型を高感度で検出でき、またDNAアレイ法では、25種類の異なる型のHPVを同時に検出することが可能であることを考慮すると、バングラデシュにおいてはHPV感染が頬粘膜がんのリスクファクターとなる可能性は低いのではないかと考えられる。

Antonssonらは、バングラデシュにおいて採取した頰部の試料に対し45サイクルのPCRを行うことにより、全試料中の68%から皮膚型のHPVを検出したと報告をしている。しかし我々は35サイクル以上で高いバックグラウンドを検出した。また、高感度な方法によってのみ検出可能となるような低コピー数のHPVが、ヒト上皮細胞をがん化することが可能とは考えにくい。

我々はまた、バングラデシュと日本の正常口腔粘膜におけるHPV DNA検出をPCR法で行なった。その結果、日本人28例中2例のみが、HPV陽性であり、バングラデシュ人55例からはHPV DNAが検出されなかった。この結果はHPV感染率には、地理的な差異があることを示唆している可能性がある。頬粘膜におけるHPV感染には、文化や生活習慣の違いが影響を及ぼしている可能性も考えられるが、口腔領域へのHPV感染経路は未だ明らかではなく、今回認められた2国間におけるHPV感染率の差異が生じる原因の解明には個人的な問診を含めた詳細な解析が必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 太 保
副 査 教 授 柴 田 健 一 郎
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 助 教 授 安 田 元 昭

学 位 論 文 題 名

Comprehensive Detection of Human Papillomavirus in Buccal Cancer Collected in Bangladesh

(バングラデシュにおいて採取した頬粘膜がんに対する
ヒトパピローマウイルスの網羅的検出)

審査は柴田、向後、安田および中村審査委員全員が出席のもとに、まずは論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、提出論文の内容に関する審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

1. 提出論文の要旨

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、現在まで 100 種類以上の型が報告されており、種々の上皮性病変の原因ウイルスとされている。

疫学的、分子生物学的研究から、HPV 感染と口腔のがん化の関連が示されているが、各々の報告により HPV 感染率は 0% から 100% と幅があり、特に、高増幅回数の PCR を行った場合 HPV 検出率が高くなる傾向が認められる。

試料は、正常な頬粘膜組織 (日本人: 28 例、バングラデシュ人: 55 例)、頬粘膜がん組織 (バングラデシュ人: 21 例) をバングラデシュの BIRDEM 病院及び、北海道大学病院で患者のインフォームドコンセントの下で生検または擦過により採取した。組織試料

をプロテアーゼK (20 μ g/ml) で処理後、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿によりゲノム DNA を精製し出発材料とした。

26 種類の HPV 全長プラスミド、2 種の HPV 全長プラスミドを混合した試料、または、頬粘膜試料から抽出した DNA を鋳型として、コンセンサスプライマーである pU-1M (5'-TGTC AAAAACCGTTGTGTCC-3'), pU-31B (5'-TGCTAATTCGGTGCTACCTG-3'), pU-2R (5'-GAGCTGTCGCTTAATTGCTC-3') を使用した PCR を行った。各 PCR は Dynazyme (FINNZYMES 社、フィンランド) を用い、94°C30 秒、52°C30 秒、72°C30 秒での増幅を 30 サイクル行なった。これら PCR 産物を精製した後、Ava II、Acc I を用い 16 時間の制限酵素処理後アガロース電気泳動にて HPV 型を検討した。

また、25 種類 (HPV-6, 11, 16, 17, 18, 20, 21, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 47, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61 型) の HPV 型を交叉反応なしに検出することが可能な新規の DNA アレイ法 (ジェネティックラボ、日本) を用い、頬粘膜がん試料より抽出した DNA の解析を行なった。

コンセンサスプライマーを用いた PCR の結果、26 種の HPV のうち HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 45, 52, 56, 58 型が検出可能であった。その後、同様の PCR を 2 種のプラスミドを混合した試料を鋳型として行なったが、Ava II、Acc I を用いた制限酵素処理により PCR 産物の HPV の型判別が可能であった。これより、このコンセンサスプライマーを用いて HPV 感染をスクリーニングできると考えられた。

試料はすべて GAPDH に対する PCR によって実験材料として適切であることを確認し、コンセンサスプライマーを用いた PCR により解析した。その結果、日本人正常粘膜 28 例中 2 例で、HPV-6, 11 型がそれぞれ確認された。しかし、バングラデシュ人の正常粘膜 55 例は全て HPV 陰性であった。バングラデシュ人の頬粘膜がん症例 21 例についても PCR を行なったが HPV DNA は検出されず、DNA アレイ法を用いた解析によっても、HPV は検出されなかった。

喫煙、アルコール摂取と同様、近年 HPV もまた口腔がんの主要なリスクファクターであると報告されている。バングラデシュでは、頬粘膜がんは頻繁に生じる悪性腫瘍であるが、betel-quid が誘発因子の一つではないかと考えられる。betel-quid はがん抑制遺伝子の変異が可能な化学的毒性物質を含んでおり、遺伝子の変異がバングラデシュでの頬粘膜悪性腫瘍にも生じている可能性は高い。

100 種類以上の HPV 型があることを考えると、今回検討した症例における HPV 感染の可能性の除外は出来ないが、コンセンサスプライマーを使用した PCR 法では頻繁に感染が確認される HPV 型を高感度で検出でき、DNA アレイ法では 25 種類の HPV 型の同時検出が可能であることを考慮すると、バングラデシュにおいては HPV 感染が頬粘膜がんのリスクファクターとなる可能性は低いのではないかと考えられる。

また、バングラデシュと日本の正常口腔粘膜における HPV DNA 検出を PCR 法で行なったが、日本人 28 例中 2 例のみが、HPV 陽性であり、バングラデシュ人 55 例からは HPV DNA が検出されなかった。この結果は HPV 感染の地理的な差異を示唆している可能性がある。頬粘膜における HPV 感染には、文化や生活習慣の違いによる影響も考えられるが、口腔領域への HPV 感染経路は未だ明らかではなく、今回認められた 2 国間における HPV 感染率の差異が生じる原因の解明には個人的な問診を含めた詳細な解析が必要と考えられる。

2. 審査委員からの質問

- (1) HPV 感染による、細胞のがん化について。
- (2) Betel-quid について。
- (3) HPV の E6 タンパク質と p53 の関連性について。
- (4) HPV の皮膚に対する感染と、粘膜に対する感染の機序について。
- (5) DNA アレイを用いた HPV DNA 検出における具体的かつ詳細な内容について。

(6)論文中におけるバングラデシュと日本の正常頬粘膜についての検討について。

これらの質問に対して、論文提出者は適切な回答を行うとともに、本論文の学術的位置づけを的確に把握していると思われた。また、HPV に関する知識および分子生物学的分野に関して広範な知識を有することが認められると同時に、本研究を臨床分野へ応用する展望、将来性の点においても評価できる。以上のことから、学位申請者は博士(歯学)に値するものと判断し、主査ならびに副査は学位授与にふさわしいと判定した。