博 士（医 学） 吉 田 武 史

学 位 論 文 題 名

食道癌における human papillomavirus 感染の解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

食道扁平上皮癌における最大の危険因子は、飲酒および喫煙であるが、非飲酒・非喫煙の食道癌症例もしばしば経験し、我が国においては、alcohol 代謝遺伝子である ALDH2・ADH1B の遺伝子多型を含めた飲酒・喫煙以外の因子による発癌の可能性も考えられる。子宮頸癌発癌に関わっているとされる human papillomavirus（HPV）も、食道癌の危険因子と考えられているが、既報の食道癌患者の HPV 感染頻度は、本邦の PCR による報告だけを見ても 0～42%と様々で一定の見解が得られていない。今回、食道扁平上皮癌、特に上皮内癌症例における HPV 感染の有無を明らかにし、さらに alcohol 代謝遺伝子との関連も含めて臨床病理学的に検討を行う事を目的とした。

【対象と方法】

2002 年 1 月から 2007 年 1 月までの期間に、北海道大学病院光学医療診療部にて内視鏡的粘膜切除術を施行された食道扁平上皮癌症例のうち、上皮内癌 50 例(以下 m1 群)、および当院外科にて外科手術により切除された食道扁平上皮癌症例のうち、深達度粘膜下層以深の浸潤癌 40 例(以下≧sm 群)について検討した。臨床検体から塩析法を用いて DNA を抽出し、HPV ゲノム間で homology の高い L1 領域、及び癌遺伝子を含んでいると考えられている E6/E7 領域、それぞれに対する相同性の高い primer を用いる consensus PCR にて HPV を検出した。ALDH2・ADH1B 遺伝子多型については、target 遺伝子の一部を PCR にて増幅した PCR 産物を、制限酵素切断によるバンドの違いで多型を診断する PCR-RFLP 法により判定を行った。

【結果】

HPV 陽性群と陰性群で臨床病理学的検討を行ったが、年齢・性別・喫煙・腫瘍部位において統計学的な差を認めなかった。また深達度でも、m1 群 20.0%に対し、≧sm 群 27.5%と、深達度の深い群で陽性率がより高いものの、統計学的には両群間に有意差を認めなかった。一方、飲酒量との関係では、飲酒量の多い症例で HPV 陽性例が多い結果となった。飲酒量に関しては、alcohol の 1 日摂取量（g/day）が 66 未満の群と 66 以上の群で有意差を認めた。また生涯飲酒量を定量化した指標である Modified Drinking Index を用いた検討では、MDI＜735 の群で HPV 陽性が 50 例中 5 例（10.0%）であったのに対して、DI≧735 の群で HPV 陽性が 40 例中 16 例（40.0%）と有意に高かった。多飲酒者に多くみられる平均赤血球容積の増大と HPV 感染については有意な差は認めなかった。
また遺伝子多型については、acetaldehyde 代謝活性の弱い ALDH2 欠損者の群と ALDH2*1/*1 型群での HPV の感染率に差を認めず、さらに alcohol 代謝速度が遅いとされる ADH1B*1/*1 と、alcohol 代謝の速い変異型の ADH1B*2 保有者との間でも HPV の感染率に差を認めなかった。

【考察】

HPV 感染が成立すると、ウイルス DNA は episome の形で宿主細胞に存在するが、子宮

頸癌では異形成が高度になるとウイルスDNAは宿主細胞にintegrateされ、E6/E7蛋白を発現してp53とRbに作用し癌化の一端を担うと考えられている。過去の中国を中心とした既報をみると、飲酒・喫煙以外での食道癌癌化の原因として、HPVがその一因である可能性が考えられるため、特に非飲酒非喫煙症例や女性あるいは若年発症の食道扁平上皮癌症例にHPV感染が多いのではないか、と推測し今回の検討に至ったが、HPV陽性者が占める割合はむしろ多量飲酒者で多く、予想と反対の結果であった。

国際がん研究機関（IARC）は2007年、alcoholと飲酒習慣自体に十分な食道扁平上皮癌に対する発癌性がある（Group 1）と認定し、ALDH2のhetero欠損が食道扁平上皮癌発癌に寄与する十分なevidenceがあると結論づけた。今回の食道癌患者における検討では、多量飲酒者で有意にHPV感染率が高かったが、食道癌の危険因子である遺伝子多型とHPV感染率に関連は認められなかった。頭頸部癌においては、癌患者のおよそ20%にHPV感染を認め、alcoholとHPV感染がそれぞれ独立した危険因子であり、また多量飲酒者にHPV感染が多く、多量飲酒およびHPV感染の相乗効果が頭頸部癌のriskを高めるという報告がある。多量飲酒によって脆弱な、あるいは小さな傷ができた食道粘膜へのHPV感染は、多量飲酒と相乗的に、食道癌riskを高める可能性があり、多量飲酒とHPV感染の相乗効果が、遺伝子多型とは別の、食道癌における危険因子である可能性が示唆された。また、頭頸部癌におけるHPV感染率が高く、また生涯に経験した(oral or/and vaginal) sex partnerの人数が多い人ほど頭頸部癌riskが高まるとして、HPV感染と頭頸部癌発癌に関連があるとする報告がある。今回の検討では性行動との関連について今回interviewを行っておらず詳細は不明であるが、検討した食道癌患者でHPV陽性であった症例には高齢の症例も含まれており、高齢になってから性行動によりHPVが感染したとは考えにくい部分もある。したがって食道においては、比較的若く性生活のある時期にHPVが感染し、その後持続感染している可能性が高いと思われる。

【結語】

食道扁平上皮癌、特に上皮内癌症例における感染率と、HPV陽性例における臨床病理学的検討を行った。上皮内癌症例とsm以深浸潤癌症例とではHPVの感染率に大きな差を認めなかったが、多量飲酒者で有意にHPV感染が高かった。また食道癌の危険因子であるALDH2・ADH1Bの遺伝子多型とHPV感染率に関連は認められず、多量飲酒とHPV感染の相乗効果が、遺伝子多型とは別の、食道癌における危険因子である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査　教 授　浅 香 正 博
副 査　教 授　田 中 伸 哉
副 査　教 授　松 野 吉 宏

学 位 論 文 題 名

食道癌における human papillomavirus 感染の解析

Human papillomavirus（HPV）は、食道癌の危険因子と考えられているものの、既報の食道癌患者の HPV 感染頻度は様々で一定の見解が得られていない。申請者は、食道扁平上皮癌、特に上皮内癌症例における HPV 感染の有無を明らかにし、さらにアルコール代謝遺伝子との関連も含めて臨床病理学的に解析を行った。内視鏡的粘膜切除術を施行された上皮内癌 50 例(以下 m1 群)、および外科手術により切除された深達度粘膜下層以深の浸潤癌 40 例(以下≧sm 群)について、それぞれ臨床検体から DNA を抽出し、L1 領域、E6/E7 領域、それぞれに対する consensus PCR にて HPV を検出した。ALDH2、ADH1B 遺伝子多型については、PCR-RFLP 法により判定を行った。

HPV の陽性率は、m1 群 20.0%に対し、≧sm 群 27.5%と、深達度の深い群で陽性率がより高いものの、統計学的には両群間に有意差を認めなかった。HPV 陽性群と陰性群で臨床病理学的検討を行ったが、年齢・性別・喫煙・腫瘍部位において統計学的な差を認めなかった。多飲酒者に多くみられる平均赤血球容積の増大と HPV 感染については有意な差は認めなかった。また遺伝子多型については、ALDH2 、ADH1B において HPV の感染率に差を認めなかった。一方、飲酒量との関係では、飲酒量の多い症例で HPV 陽性例が多く認められ、統計学的に有意差を認めた。食道癌において多量飲酒が HPV 感染の一因を担っている可能性が示唆された。

公開発表では、学位論文内容発表の後、副査田中伸哉教授より、今回食道癌において L1 領域よりも E6/E7 領域の consensus PCR の結果が低かった事の意義と E6/E7 の発現や変異型 p53 の発現との関連について、今回多量飲酒者に HPV 感染が多かった事について免疫学的な関与の可能性があるか、今回の解析したアルコール代謝遺伝子と飲酒量との関係についての質問があった。申請者はそれに対し、食道癌における HPV の持続感染形態については不明な点が多いが、HPV が integration される過程において E6/E7 は欠失していたりあるいは今回 target とした E6/E7 に変異が生じている可能性があり L1 領域の陽性率に差が生じた可能性があると述べ、また今回直接 E6/E7 や p53 の発現については調べる事が出来なかったが、E6/E7 が子宮癌でみられるように integration していなければ発現していない可能性があると述べた。また免疫学的な関与に関しては、HPV のクリアランスに直接関与しているという明確な報告はなく、アルコール代謝遺伝子と飲酒量については、少量飲酒者

において代謝の遅いアルコール遺伝子保有者の割合が多かったと述べた。

次いで副査松野吉宏教授より、microdissection を行う事によって HPV の陽性率がさらに高まるのか、多量飲酒者に関して HPV 癌化の一翼を担っているのかどうかについての質問があった。申請者はそれに対し、今回解析した HPV 検出系では 50ng のおよそ一万分の一までの検出が可能であり、microdissection により大きな陽性率の変化は生じない可能性が高く、HPV 検出については抽出された DNA 純度と type-specific な target primer を用いる事でより検出率が高まる可能性があると述べ、また多量飲酒者における HPV 癌化の関連性については、多量飲酒者における HPV の感染形態は明らかではなく、今後コントロール群における HPV 陽性率と合わせた比較検討が必要と述べた。

最後に主査浅香正博先生より、今後この研究をどのように発展させていく予定があるのかについての質問があった。申請者はそれに対し、食道癌においては上皮内癌と進行癌において陽性率に大きな差は認めず、少なくとの cancer progression には関与しないと思われるが、コントロール群と比較して HPV が単独の食道癌リスクファクターとなり得るのかどうか、また食道癌における HPV 持続感染の形態を、in situ hybridization や E6/E7 発現、シークエンス解析と合わせて、今後検討を行いたいと述べた。

本研究は、食道癌における HPV 感染について詳細な背景因子との検討を行い、多量飲酒者においてその陽性率が高い事を初めて示したもので、今後感染が確認された HPV が癌化に関与しているのかを解析していく上で意義のある知見が示され、HPV と食道癌双方の関係解明について、今後の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども合わせ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。