

## 論 文 要 旨

**RELATIONSHIP BETWEEN HUMAN  
PAPILLOMAVIRUS (HPV) AND LUNG CANCER**

ヒトパピローマウイルス感染と肺癌との関連性

Francisco Renan Aguayo Gonzalez

## 【序論および目的】

Lung cancer (LC) is the most common cause of cancer-related mortality in men and women in the world. The LC is usually classified into 2 major types: small-cell lung carcinomas (SCLCs) and non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). The later are subdivided in adenocarcinomas (ACs), squamous cell carcinomas (SCCs) and large cell carcinomas (LCC). Even though more than 80% of the patients with LC are smokers, only 1-15% of chronic smokers develop LC suggesting that other factors, genetic and/or environmental ones, may be required to develop LC. Recently, etiological involvements of some viral infections in the developments of malignant diseases have been remarkable and controversial. Human papillomavirus (HPV) is an epitheliotropic double-stranded DNA virus that belongs to the *papillomaviridae* family. An association between HPV infection and LC has been reported from all over the world but the frequency of LC with HPV is different from country to country. Relatively high frequencies were reported in Asian countries and low frequencies in European countries. A histology-specific involvement of HPV in LC development has been suspected but the results are not conclusive. The HPV integration into the host cell genome is known to be one of the major genetic changes facilitating transformation and the transition into a malignant state. This event causes a frequent HPV E2 gene disruption, leading to abnormal E6 and E7 oncoproteins expression. The p53 protein downregulation and p16 upregulation are associated with the oncogenic properties of HPV. In addition, tumour suppressor genes (TSGs) downregulation by promoter hypermethylation is a frequent event in lung cancer. The aims of this thesis were to analyze the presence, viral load, and physical status of high-risk types of HPV in LC from various countries, to examine associations between HPV presence and expressions of p16 and p53 and to analyze the p16 methylation status in LC specimens and its association with the presence and physical status of HPV.

## 【材料および方法】

The presence of HPV genome was analyzed among 165 paraffin-embedded tissues of bronchoscopic biopsy or resected LCs obtained from Asia, Oceania, and Latin America regions. The numbers of study subjects in each country were as follows: 31 from China, 21 from Pakistan, 8 from Papua New Guinea, 69 from Chile, 11 from Colombia, 10 from Perú, and 15 from Mexico. Sections (10 µm) of each formalin-fixed paraffin-embedded sample were prepared. The DNA was purified using conventional and reported methods. β-globin and generic HPV amplifications using PCO3/PCO4 and GP5/6+ primers, respectively, were conducted. To confirm the products of GP5/6+ fragments, Southern blot-ECL hybridization was conducted. The genotyping was determined by direct sequencing of amplified fragments using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems). The

expression of p53, p16 and E6 proteins was examined by immunohistochemistry. HPV-16 integration status was analyzed using both TAQMAN and SYBR green Real-time PCR methods (Applied Biosystems) amplifying E2 and E6 specific fragments of HPV-16. For specificity and validity tests, DNAs from SiHa cell line, which is known to contain 1-2 copies of HPV-16 per cell, were used. To determine the physical status of HPV-16, the ratio of E2 to E6 copy numbers was calculated. Since E2 is disrupted when HPV is integrated into cellular genome, E2/E6 ratio nearly equal to 1 indicates the presence of the episomal form only. Values less than 1 indicate the presence of both integrated and episomal forms, while a ratio of 0 indicates that the E2 fragment was not detected and that HPV exists in the integrated form only. The methylation status of p16 promoter region was analyzed using methylation-specific PCR.

#### 【結果】

HPV genome was detected in 38/165 (23%) of LCs. There was a significant difference in HPV frequency among LC histological types; 29/69 (42%) in SCCs, 6/83 (7%) in ACs, and 3/13 (23%) in SCLCs ( $P < 0.001$ ). The most frequent HPV genotype was HPV-16 (26/165, 16%) but this was not true in lung ACs. Other detected HPV genotypes were HPV-18 (5/165, 3%), HPV-31 (1/165, 0.6%), HPV-33 (1/165, 0.6%), HPV-45 (2/165, 1.2%), and HPV-6 (3/165, 1.8%). No association between HPV presence and age, sex, or smoking habit was found. P16, p53 and E6 expression was not associated with HPV presence. HPV-16 was frequently integrated in SCCs although the viral load was very low, ranging between  $4 \times 10^{-3}$  to 1000 copies/ng DNA. A frequent p16 methylation in NSCLCs from Chile was observed (79.7%). In addition, when we stratified by histological type, we observed that p16 promoter methylation was higher in SCCs (90.9%) compared with ACs (70%), and this difference was statistically significant ( $P = 0.029$ ). The p16 promoter methylation was associated with neither HPV presence, integration status nor smoking habit.

#### 【結論及び考察】

In this thesis, HPV was detected in 38/165 (23%) LCs from different countries. The frequency was similar to those reported in previous studies. Our results suggest that HPV is associated to a subgroup of SCCs but not with ACs. The most prevalent genotype was HPV-16, which is the most frequent genotype in cervical cancer. Real-time PCR analysis revealed that HPV-16 was frequently integrated in SCCs, suggesting a possible etiological involvement of HPV-16 in the lung SCC development. We found a very frequent p16 promoter methylation but it was related to neither HPV presence nor smoking, suggesting other factors' involvement in aberrant methylation of this TSG. In this study we were not able to find statistical association between molecular alterations associated with HPV cervical carcinogenesis such as p16 upregulation, p53 downregulation and HPV presence, suggesting that the function of HPV in lung carcinogenesis is different when compared with cervical cancer. Our findings suggest a possible selection of only high-risk HPV genotypes in bronchial epithelia. If clonal expansion occurs after HPV infection in lung epithelial cells, HPV is expected to be found in all the carcinoma cells. However, in the present study, apparently, a very small proportion of the malignant cells have HPV genomes integrated into the host genome. In conclusion, the frequent high-risk HPV presence in SCCs and the frequent HPV-16 integration into the host genome, suggest the possibility that HPV be involved in lung carcinogenesis. More studies are warranted.

## 論文審査の要旨

報告番号	総論第 1 号	学位申請者	Francisco Renan Aguayo Gonzalez
審査委員	主査	秋山 伸一	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	馬場 昌範	副査 米澤 傑
	副査	竹内 亨	副査 夏越 祥次

### Relationship between Human Papillomavirus (HPV) Infection and Lung Cancer

#### (ヒトパピローマウイルス感染と肺癌との関連性)

肺癌は、世界中で癌による死亡原因の大きな部分を占めている。肺癌患者の80%以上は喫煙者であるが、喫煙者の1-15%が肺癌に罹患するにすぎない。肺癌になるには、更に遺伝学的あるいは環境因子など、他の因子の関与が疑われている。近年、様々な癌の原因としてウイルス感染が挙げられている。肺癌でもヒトパピローマウイルス (HPV) の関与が報告されているが、HPV の検出率は報告によって大きな差があり、未だ最終的な結論は得られていない。そこで申請者は、ラテンアメリカおよびアジアの国々から肺癌を収集し、HPV 感染と肺癌の関連性について検討した。

各国から収集した squamous cell carcinomas (SCCs) 69 検体、adenocarcinomas (ACs) 83 検体、および、small cell lung carcinomas (SCLCs) 13 検体のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを検体として用いた。HPV の検出は PCR-Southern blot hybridization で行い、ウイルスゲノムコピー数の定量は Real-time PCR で行った。HPV の型別は、L1 領域のシーケンスで決定した。また、HPV の宿主染色体への組み込みは、E2 と E6 領域にプライマーを設定し、それぞれ増幅されたコピー数の E2/E6 比を算出して判定した。E6、p53、p16<sup>INK4a</sup> タンパクの発現は、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色で判定した。更に p16<sup>INK4a</sup> の promoter 領域のメチル化は、methylation-specific PCR で判定した。

以下の結果を得た。

- ① HPV は、SCCs の 29 例 (42%)、ACs の 6 例 (7%)、SCLCs の 3 例 (23%) に検出され、型別では HPV-16 が最も多く、HPV 陽性 38 例中 26 例が HPV-16 であり、以下 HPV-18 が 3 例、HPV-6 が 3 例、HPV-45 が 2 例、HPV-31 と HPV-35 がそれぞれ 1 例であった。
- ② HPV-16 ゲノム存在様式を調べた結果、チリの SCCs 検体 9 例中 8 例で宿主染色体に組み込まれており、全く組み込みがなく HPV-16 ゲノムがエピソード状のみで存在したのは 1 例のみであった。
- ③ Real-Time PCR で HPV-16 のゲノムコピー数を検討したが、HPV-16 陽性子宮頸がん に比べ肺癌ではゲノムコピー数が非常に少なかった。
- ④ HPV-16 ゲノムの存在様式と E6、p53、p16<sup>INK4a</sup> のタンパク発現とは関連がないことが判明した。
- ⑤ p16<sup>INK4a</sup> の promoter 領域のメチル化と HPV-16 の存在、および、p16<sup>INK4a</sup> のタンパク発現を比較したが、関連性がないことが分かった。

この研究では、肺癌の一部、特に SCCs の組織像を示す肺癌の約 40% に HPV が存在し、しかも、多くの症例で宿主染色体に組み込まれていることを明らかにしている。また、HPV 感染子宮頸癌では発現に関連性の認められる分子マーカー (E6、p53、p16<sup>INK4a</sup>) が、肺癌では HPV の存在とは関連性がないことを示し、肺癌における HPV の癌化への役割は、子宮頸癌における役割とは異なる事を示唆した興味深い論文である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

# 最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第 1 号	学位申請者	Francisco Renan Aguayo Gonzalez
審査委員	主査	秋山 伸一	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	馬場 昌範	副査 米澤 傑
	副査	竹内 亨	副査 夏越 祥次

主査および副査の5名は、平成19年11月21日、学位申請者 Francisco Renan Aguayo Gonzalez 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 腺がんと扁平上皮がんの占める割合が国で大きく異なる理由は？喫煙率が異なるためか？

(回答) チリでは、両者が同じ数になるように集めた。したがって国別の比較は意味がない。

質問2) HPV の DNA が見つかりながら、HPV の E6 の発現がない症例が多いのはなぜか？両者はなぜ乖離するのか？

(回答) 2例のみで、HPV の oncoprotein の一つである E6 タンパクが発現していた。もともと、HPV の viral load は低いので E6 が発現していても量が少ないことが考えられ、免疫染色では感度が低くて検出できないのかもしれない。

また、methylation で E6 の発現が抑えられている可能性もある。なお、episomal form で潜伏感染している場合も E6 が発現しているとの報告もあり、実際、この研究でも E6 の発現が見られた一例は、episomal form での潜伏感染であった。

質問3) 肺がんの viral load は子宮頸がんより低い、肺がんに見つかる HPV は発癌と関連しているのか？

(回答) viral load が高いほど発がん性が強いとは限らないのかもしれない。細胞あたりのコピー数が1を超える症例が半分程度あるが、SiHa 細胞も細胞あたりのコピー数は1-2個である。また、hit and run 仮説によれば、HPV は発現の初期過程に働き、その後は細胞から消失する。この仮説が正しいのかもしれない。

質問4) 感染ルートをどのように考えるか？肺がんとうつ頸がんの重複がんは多いか？また、テークスでは上部気道・消化管からの感染を有力な感染ルートと考えているようだが、そのような部位のがんと肺がんとの重複はあったか？

(回答) そのような症例は入手できなかった。HPV はリンパ球などでは増えず、intraepithelial にのみ増殖するので、血行を介した感染は考えにくい。

質問5) 感染の頻度と口腔や咽頭の HPV 関連がんで指摘されている oral-genital contact や oral-anal contact のような性行為との関連はどうか？

(回答) データを得ていないので分からない。

質問6) HPV 関連肺がんの罹患率が国ごとに異なる理由についてどのように考えるか？

(回答) フランスの Bouchet たちの報告では、HPV 陽性の肺がんは見つからなかった。人種的な差、HLA などの遺伝的な背景が関連しているのかもしれない。

質問7) p16 のプロモーター領域のメチル化は、喫煙、HPV などとは関連していないが、どのような因子と関連すると考えるか？

(回答) 環境要因などが重要と考えるが、よく分っていない。

質問8) Episomal form はどのように細胞に存在するのか。それは安定であるか(細胞増殖によって失われないのか)？

(回答) Episomal form で細胞に潜伏感染している HPV は Extrachromosomal に存在しており、安定である。

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) 中国で腺がんしか得られなかった理由は？

(回答) よく分らない。腺がんの方が手術しやすいので切除標本を入手しやすかったのかもしれない。

質問 10) HPV-16 の DNA sequence は地域で同じか？

(回答) 異なりうる。変異株が幾つか知られている。

質問 11) Real-time PCR で、TaqMan 法の方が SYBR Green 法より viral load が一桁高いのはなぜか？

(回答) 理由はよく分らない。SiHa 細胞では、両者に差がない。

質問 12) 抽出した DNA は正常組織とがん組織の混合組織から抽出したものか？

今回提示したデータはがん組織を代表すると考えて良いか？正常組織では p16 promoter の methylation はどの程度か？

(回答) 抽出した DNA は正常並びにがん組織混在部からのものであり、今後 microdissection により各組織を別々に検討する必要がある。正常肺組織の p16 promoter の methylation は検討していないが、リンパ球では methylation を認めない。

質問 13) HPV による hit and run により細胞にどのような変化が発生するか？

(回答) Chromosomal instability が発生する可能性がある。

質問 14) HPV-16 が肺の扁平上皮がんの発がんに重要であるという結果であった。HPV は腫瘍の進展や転移にも関係するのか？

(回答) 今回の研究では腫瘍の切除標本・生検のみで HPV の存在を評価しており、詳細な臨床病理学的因子は解析されていない。今後の検討課題である。

質問 15) 腺がんでも数例に HPV 陽性例がある。特に HPV-16 陽性腺がんの発癌機序については？

(回答) 腺扁平上皮がんのような症例だと思われる。腺がんから扁平上皮がんへ metaplasia の関与が報告されている。

質問 16) 最近、子宮頸がんの早期発見に E6, E7 を用いる場合があるようであるが、肺がんでも使えるか？

(回答) 子宮頸がんでは早期発見に有用とされる報告がある。肺がんでも E6,E7 蛋白の発現も重要と考えられる。また HPV の RT-PCR による解析も早期がんの発見に有用となりうるかもしれない。

質問 17) E7 の発現は見たか？

(回答) 見ていない。

質問 18) HPV-16 load は何で決まるか？

(回答) 分からない。

質問 19) 細胞に HPV 受容体はあるか？

(回答) 二つの可能性が報告されている。一つは proteoglycan であるという報告で、他の一つは、 $\alpha 6 \beta 4$  integrin であるという最近の報告である。

質問 20) HPV はなぜ、扁平上皮がんに見つかりやすいのか (感染しやすいのか) ?

(回答) alveolar cell は末梢にあるので、気道から遠く感染しにくい。したがって、腺がんには感染が少ないのではないかと考えている。扁平上皮がんは、気道に近い部位に起こるので、HPV 感染を受けたものが多いのではないかと考えている。腺がんには HPV 受容体と疑われている integrin の発現がないとの報告もある。

質問 21) HPV は肺がんの原因か？

(回答) 現時点では結論をだせないが、可能性は否定できないと考える。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。