

## 論 文 要 旨

### Human papillomavirus in high and low risk areas of esophageal squamous cell carcinoma in China

中国の食道がん高リスクおよび低リスク地域に  
おけるヒトパピローマウイルスの検出

Karem Yoshie Shuyama Delgado

**Introduction:** Human papillomavirus (HPV) is a non-enveloped, double-stranded DNA virus with more than 90 genotypes. To date, molecular and epidemiological studies have convincingly demonstrated that HPV infection with certain genotypes, i.e., high-risk HPV, plays an essential role in the development of uterine cervical cancer. A number of studies reported HPV DNA detection in extragenital cancers as well, although the etiological involvement of HPV in those malignancies is still controversial. HPV DNA detection rates in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) samples appear to be different from area to area, where the contribution of oncogenic HPVs to ESCC risk is higher in the areas with high ESCC risks.

**Objective:** To examine the potential roles of human papillomavirus (HPV) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) development.

**Subjects and Methods:** We examined the presence of HPV DNA in paraffin-embedded ESCC tissues collected from two areas with different ESCC incidence rates in China, i.e., Gansu (n=26) and Shandong (n=33) using PCR with SPF10 primers, or PCR with GP5+/GP6+ primers combined with Southern blot hybridization. HPV genotype was

determined by the INNO-LiPA HPV genotyping kit, which allows simultaneously genotype among 25 different HPV types. Real time PCR was conducted to analyze viral load and physical status using HPV-16 E6 and E2 primers. Expression of p16<sup>INK4a</sup>, p53, and HPV-16/18 E6 protein was also examined by immunohistochemical staining (IHC).

**Results:** HPV DNA was detected in five cases using GP5+/GP6+ primers PCR, in addition 11 cases when using Southern blot hybridization (in total 16 cases) and in three additional cases by using SPF10 primers PCR (in total 19 cases): 17 cases (65%) in Gansu, where ESCC incidence is much higher than in Shandong, where HPV was positive in 2 samples (6%). HPV genotypes 16 and 18 were detected in 79% and 16% of HPV-positive samples, respectively. Double infection was detected in 16% of the genotypes samples including HPV-16 and -6, HPV-16 and -18, and HPV-16 and -51. The quantity of HPV-16 E6 DNA ranged from 0.001 to 283.29 copies ng<sup>-1</sup> of genomic DNA, which corresponds to <1-2 copies cell<sup>-1</sup>. E2/E6 ratio was determined by real-time PCR. In nine (60%) cases, E2 DNA was not detected. In the rest of the cases, E2 DNA was detected, but the E2/E6 ratio was less than the unity. We could not detect HPV-16/18 E6 protein expression by immunostaining in any of the HPV-16 positive samples. Neither p16<sup>INK4a</sup> nor p53 expression was related to HPV presence in ESCCs.

**Conclusions:** A large proportion of ESCC specimens harbor HPV-16 genome in the integrated form in a certain area with a high ESCC incidence. Detection rate varied upon the method used, with a higher sensitivity when using Southern blot hybridization or SPF10 primers PCR. Real-time PCR analysis suggested the presence of only a small number of HPV-16 copies in carcinoma cells. There was no HPV-16/18 E6 protein expression, and on top of that, HPV-16 presence was not related to the expression of p16<sup>INK4a</sup> or p53 protein. Further studies seem warranted to examine the possible etiological roles of HPV in ESCC.

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 30 号	学位申請者	Karem Yoshie Shuyama Delgado
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋山 伸一	副査 竹内 亨
	副査	米澤 傑	副査 夏越 祥次

Human papillomavirus in high and low risk areas of  
esophageal squamous cell carcinoma in China

〔 中国の食道がん高リスクおよび低リスク地域における  
ヒトパピローマウイルスの検出 〕

ヒトパピローマウイルス (HPV) には 100 近くの型が報告されており、粘膜上皮に感染する HPV はヒトへの発がん性によって、低リスク型と高リスク型に分類される。先行研究により、HPV-16 など高リスク型の HPV は、子宮頸がんの原因ウイルスとしての役割が明らかとなっている。一方、上部消化管や呼吸器系のがん組織においても HPV ゲノムが検出されるという報告は多いが、これらの部位における HPV の病因学的役割については不明である。2001 年までに報告された結果をまとめた Syrjänen の総説によると、食道がん 2,020 例の HPV 陽性率は PCR 法で約 15% であるが、地域間のばらつきが大きい。また Syrjänen は、食道がんリスクが高い地域において HPV 陽性率が高い傾向にあることを指摘している。そこで学位申請者は、HPV の食道がん発生における役割を明らかにすることを目的として、中国国内において食道がんの高リスク地域である甘粛省と低リスク地域の山東省の食道がん患者のがん組織を用いて HPV 検出頻度や型の分布およびコピー数などを比較検討した。

対象は、甘粛省の食道がん患者 26 名と山東省の食道がん患者 33 名である。食道がん組織のパラフィン包埋病理標本から DNA を抽出し、GP5+/GP6+プライマーを用いた PCR の後にサザンブロッティングによる検出を行った。さらに SPF10 プライマーを用いた PCR 法による HPV ゲノムの検出を行い、HPV 陽性例については INNO-LiPA HPV genotyping キットを用いて HPV の型を判定した。HPV16 陽性例については、real-time PCR 法にてウイルスの定量と宿主ゲノムへの組み込みの有無を確認した。また、免疫組織化学染色法にて p16、p53 や HPV-16/18 の E6 蛋白などの発現頻度を解析している。

その結果、本研究で以下の知見が明らかとなった。

- 1) 食道がんリスクの高い甘粛省では HPV ゲノムの検出頻度が 65% と高く、リスクの低い山東省では 6% と低かった。その差は統計学的に有意であった。
- 2) HPV 陽性例中、HPV-16 が 79%、HPV-18 が 16% であり、ほとんどが高リスク型であった。
- 3) HPV-16 のコピー数は細胞あたり 1-2 コピー未満と推定され、食道がんではウイルス量がかなり少ないことがわかった。
- 4) すべての HPV-16 陽性例で HPV が宿主ゲノムに組み込まれていることが確認された。
- 5) HPV-16/18 陽性例においても E6 蛋白の発現を確認することはできなかった。
- 6) HPV ゲノム検出の有無と p16 や p53 の蛋白発現との間に有意な関連は認めなかった。

Syrjänen が指摘したように食道がんリスクの高い甘粛省では高リスク型の HPV ゲノムの検出頻度が高く、そのほとんどの例において宿主ゲノムへの組み込みが確認されたことは、高リスク型の HPV が食道がんの発生に何らかの役割を果たしている可能性を示唆するものである。しかし一方で、子宮頸がんとは異なり、ウイルス量が少なく、HPV の発がんメカニズムに深く関わる E6 の発現や p16 および p53 の発現との関連が確認できなかった。これは、発がん過程における HPV の役割が、子宮頸がんとは異なり、食道がんでは異なる可能性も示唆しており、本研究の結果は、HPV による発がん機序の解明に資するものと考えられる。

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	総研第 30 号	学位申請者	Karem Yoshie Shuyama Delgado
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋山 伸一	副査 竹内 亨
	副査	米澤 傑	副査 夏越 祥次

主査および副査の5名は、平成20年 1月18日、学位申請者 Karem Yoshie Shuyama Delgado 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) 今回の2つの対象地域から得られた食道がんの分化度の分布に有意差がみられるが、2つの地域のHPV検出率の違いは、がんの分化度が異なるからではないか？

(回答) 多変量解析を用いてがんの分化度の分布の違いを考慮しても、地域差は有意であり、地域差を考慮するとがんの分化度は有意ではなくなる。しかしながら、他の食道がんの研究で分化度とHPV検出率との関連を検討しているものがないので、比較検証ができない。

質問2) 異なる地域から検体を得ているが、分化度の診断は各々の地域の病理学者が行ったのか？

(回答) 分化度の診断は日本で行い、一人の病理学者が行った。

質問3) 2つの対象地域の住民集団で、遺伝的背景は同じであるのか？

(回答) この2つの集団の遺伝的背景を直接比較している論文はないが、1998年にChuらが中国の北部と南部の集団間で遺伝的背景が異なることを報告している。

質問4) 2つの対象地域の住民集団で、飲酒や喫煙については調べていないのか？また、その他の生活習慣などは同じであるのか？

(回答) 一般的に、飲酒と喫煙は食道がんのリスク要因であるが、今回の対象者からはそのような情報を得ていないので検討していない。山東省と比べて、一般的に甘粛省の社会経済状態は低いと思われ、食事の内容はかなり異なっているようである。甘粛省は貯蔵食を摂取することが多いため、真菌類などに汚染された食事が食道上皮の炎症と関連しているとの報告もある。食道がんにおけるHPVの検出頻度の地域差について、宿主の遺伝的背景や他の要因分布の違いを考慮した研究報告はない。

質問5) “hit and run” 仮説について説明して下さい。また、その仮説によると早期がんと進行がんではHPVの検出頻度はどのようなことが期待されるか？

(回答) この仮説はスコットランドのウシで、パピローマトーシスに罹患後、bracken fernを食べたウシに発生するがんとの関連を示した動物モデルから提唱された。ウシパピローマウイルスの4型(BPV-4)がパピローマトーシスの原因で、パピローマトーシスで検出されるBPV-4のウイルス量は高いが、その後に発生するがん組織においてウイルスはほとんど検出されない。従ってこの仮説によると、HPVはがんが発生する前あるいはかなり早い段階でのみ役割を果たし、その後は姿を消すことになるので、進行がんよりも早期がん検出される確率が高いと考える。

質問6) 臨床病期が異なるがんでHPVの検出頻度を比較してはいないのか？

(回答) 今回はそのような検討は行っていないが、食道の正常上皮とdysplasiaで調べた研究はある。しかし、その報告ではHPVの検出頻度には違いは見られていないが、ウイルス量は不明である。

## 最終試験の結果の要旨

質問 7) 今回の対象地域で、正常集団における HPV の感染率はどうなっているのか?

(回答) 今回の対象地域については、そのような情報は得られていない。しかしながら、中国の他の食道がん高リスク地域において血清疫学調査の報告があるが、食道がん症例とコントロール群との間に有意差はなかった。

質問 8) INNO-LiPA キットで用いた PCR プライマーにイノシンが含まれている理由は何か?

(回答) イノシンはチミン、アデニンおよびシトシンを区別することなく PCR 反応が可能となるため、プライマー領域に一塩基の多型があっても増幅が可能である。従って、このプライマーによって複数の HPV の型を同時に検出することが可能となる。

質問 9) SPF10 プライマーが GP5+/GP6+プライマーと比べて感度が高い理由は何か。GP5+/GP6+プライマーで PCR のサイクル数を増やすことによって感度をあげることはできないか?

(回答) SPF10 は HPV の型によって特に感度が良いことがあり、Kleter らの報告によると、ウイルス量が少ない場合、SPF10 プライマーは特に感度が良い。もう 1 つの理由として、増幅領域の長さがある。SPF10 は 65bp と短い領域を標的としているので、特にパラフィン包埋標本では有効である。GP5+/GP6+プライマーを使った PCR のサイクル数は最大にして行った。

質問 10) p16 の蛋白発現レベルでは差がなかったが、mRNA レベルで調べられるのではないか? パラフィン包埋標本で mRNA を測定することはできないか? また、p16 のメチル化は調べたか?

(回答) パラフィン包埋標本を使って mRNA を検出することは可能であり、市販のキットもあるが、我々の教室で他の者が mRNA の解析を試みたが、成功していない。標本の状態によるのかもしれない。p16 のメチル化については、今回は調べていない。他の研究によると、p16 のメチル化は食道がんで高頻度に観察されるようであるが、HPV との関連をみたものではない。

質問 11) 甘粛省では子宮頸がんの罹患率も高いのか?

(回答) 罹患率に関するデータはないが、子宮頸がんによる死亡率は 10 万人年あたり甘粛省で 28 人、山東省で 20 人であるので大きな差はない。

質問 12) HPV ゲノムのコピー数が多い症例があるが、何か臨床病理学的特徴はあるか?

(回答) 特徴的な病理学的所見は認められない。性、年齢などの得られた情報との関連もなかった。

質問 13) HPV-51 が検出された症例が 1 例あるが、何か臨床的特徴があるか?

(回答) この症例は低分化がんであったが、それはこの症例に特異的な所見ではなかった。

質問 14) 今後、今回のデータをどのように臨床へ応用することが可能であるか?

(回答) 食道がんの高リスク地域において、balloon cytology によって HPV のスクリーニングを行い、陽性者については高リスク集団としてフォローすることに応用できる。

質問 15) Linxian では、どのような栄養学的因子が食道がんに関連しているのか?

(回答) 主にビタミン A、C、E やセレンなどの欠乏がリスク要因となっているとの報告がある。

質問 16) GP5+/GP6+プライマーが標的とする領域はそれほど大きくないが、PCR 反応の伸長ステップを長くした理由はなぜか?

(回答) PCR のサイクル数やそれぞれのステップの時間については、サイクル数や反応時間を変えたいくつかの条件で試みたが、最終的には Roda らの方法を参考にした。

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しての学力・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。