

論 文 要 旨

**Study on the presence of human papillomavirus
in squamous cell carcinomas of
the oral cavity, oropharynx and esophagus**

〔 口腔・咽頭および食道の扁平上皮がんにおける
ヒトパピローマウイルスの検出 〕

Andres Orlando Castillo Giraldo***Introduction and Objectives***

There is convincing evidence that infection with high-risk type of human papillomavirus (HPV) can lead to cervical cancer. Regarding HPV-16, evidence supports its causal role in cancers of the vulva, vagina, penis, and anus. The association of HPV with cancers of the upper aero-digestive tract is also suspected. The present thesis describes the study on the possible associations of HPV with squamous cell carcinomas (SCCs) of the oral cavity, oropharynx and esophagus.

Subject and Methods

In this study, 261 formalin fixed paraffin embedded SCC tissues of 71 oral cavity, 24 oropharynx, and 166 esophagus surgically resected and biopsies from Japanese, Pakistani and Colombian patients were examined. In addition, 26 additional tissues of esophagus, with or without cancer cells, from Japanese patients were analyzed. HPV DNA detection and genotype were analyzed by PCR using SPF10 HPV primers and INNO-LiPA HPV genotyping v2, respectively. The HPV-16 viral load and physical status was determined by quantitative real-time PCR analysis. The HPV-16 E6 gene was directly sequenced by fluorescent dye-labeled dideoxynucleotides and cycle sequencing methods. In addition, immunohistochemistry for p16INK4a and p53 were conducted.

Results

In cancer of the tonsil from Kagoshima, Japan, HPV was detected in 10/24 (42%) of the cases examined, and all of the HPV type detected was HPV-16. In all the HPV-16 positive cases, the viral

genome was integrated in the host genome. Their viral load average was 17.8 copies per cell, which was similar to what was observed in Japanese cervical carcinomas (geometric mean= 13.04; 95%CI= 0.4-406.3). No other HPV genotypes were detected in tonsillar carcinomas.

In the analysis of 37 SCCs of the tongue, the difference of HPV detection rates among three countries was not statistically significant ($P=0.646$). In 20 (54%) cases, HPV-16 was positive and 18 of them had integrated HPV-16 genome. In 34 SCCs of the oral cavity other than the tongue, HPV-16 was detected in 20 (56%) cases and HPV-6 in one case. All HPV-16 positive specimens had integrated viral genome. The geometric means of HPV-16 viral load in cancers of the tongue and the other oral cavity were 0.03 and 0.12 copies per cell, respectively.

Cancer of the esophagus examined in the present study numbered 75, 42 and 49 in Japan, Pakistan and Colombia, respectively. HPV was detected in 11 (15%), 11 (26%) and 9 (18%), respectively; the difference of detection rates among three countries was not statistically significant ($P=0.293$). The most frequently HPV type detected was HPV-16. Its infection, including multiple infections with other HPV genotypes, was detected in 9, 8 and 6 cases, respectively, in three countries. The single infections of HPV-6 (N=1), HPV-18 (N=4), and HPV-45 (N=1) were also detected. Multiple infections of different HPV types were found in 13 esophageal carcinomas although no multiple infections were observed in SCCs of the oral cavity and oropharynx. The difference of frequencies of multiple infections between cancers of the esophagus and the other cancer sites was statistically significant ($P=0.001$). All the HPV-16 detected in esophageal carcinomas from Japan and Pakistan was integrated in the host genome. On the other hand, in Colombian cases, 2 cases harbored only episomal HPV-16 DNA, 3 cases had integrated HPV-16 genome only, and the remaining one case had a mixed infection of episomal and integrated HPV-16. The geometric means of HPV-16 viral load in cancers of the esophagus was 0.12 copies per cell. In 11 HPV positive cases, adjacent normal epithelia were also examined for HPV detection. No normal epithelia harbored high-risk HPV.

Discussions and Conclusions

HPV DNA was detected in SCCs of the oral cavity, oropharynx and esophagus. The most frequently detected HPV type was HPV-16. Its genome was frequently integrated in the host genome, suggesting its etiological involvement. In addition, the viral load of HPV-16 in the SCC of the tonsil was similar to that in cervical cancer and was much higher than those in other cancer sites.

The results described in this thesis suggest an etiological role of HPV-16 in tonsillar cancer as was reported elsewhere. In cancers of the oral cavity and esophagus, its etiological involvement could not be ruled out although viral load was low.

論文審査の要旨

報告番号	総研第 26 号	学位申請者	Andres Orlando Castillo Giraldo
審査委員	主査	秋山 伸一	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	有馬 直道	副査 出雲 周二
	副査	竹内 亨	副査 梅北 善久

Study on the presence of human papillomavirus
in squamous cell carcinomas of
the oral cavity, oropharynx and esophagus

〔 口腔・咽頭および食道の扁平上皮がんにおける
ヒトパピローマウイルスの検出 〕

1983年に高リスク型のヒトパピローマウイルス (HPV) が子宮頸がん組織から検出されるとの報告以来、HPV が子宮頸がんの原因ウイルスとしての役割を果たしていることが明らかとなった。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。そこで学位申請者らは、上部消化管における HPV の病因学的役割を明らかにすることを目的として、口腔がん、咽頭 (扁桃) がんおよび食道がんの病理標本を用いて、HPV ゲノムの検出とそのサブタイプや variant の分布、ウイルス量と宿主ゲノムへの組み込みの有無を解析・検討した。

対象は、口腔がん 71 例、咽頭 (扁桃) がん 24 例、食道がん 166 例である。日本、パキスタンおよび南米コロンビアよりがん組織のパラフィン包埋病理標本を収集し、解析に用いた。日本の食道がん症例については、がん周囲の正常粘膜上皮の病理標本も解析に用いている。HPV ゲノムの検出は SPF1/2 プライマーを用いて行い、HPV 陽性例については、INNO-LiPA HPV genotyping キットにより HPV の型を判定した。HPV16 陽性例については、real-time PCR 法にてウイルスを定量し、HPV E2 と E6 のコピー数の比を求めることにより宿主ゲノムへの組み込みの有無を確認した。HPV-16 E6 領域は PCR 増幅後、塩基配列の解析を行った。さらに、免疫組織化学染色法にて p16 と p53 の蛋白発現頻度を調べた。

その結果、本研究で以下の知見が明らかとなった。

- 1) 口腔、扁桃および食道のいずれの扁平上皮癌においても HPV ゲノムが検出された。
- 2) 検出された HPV の型は HPV-16 が最も多く (口腔がん 97%、扁桃がん 100%、食道がん 77%)、2 例を除くすべての HPV 陽性例において、高リスク型の HPV ゲノムが検出された。一方、HPV 陽性例のがん周囲の正常粘膜上皮から検出された HPV はすべて低リスク型であった。
- 3) 扁桃がんでは HPV-16 のコピー数は多く、約半数は子宮頸がんと同程度のコピー数が検出されたが、その他のほとんどの口腔がんや食道がんでは細胞あたり 1 コピー未満と推定され、ウイルス量がかなり少ないことがわかった。
- 4) ほとんどの HPV-16 陽性例において 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) 上部消化管のいずれの部位においても、同じ箇所共通した多型のある European variant と Asian-American variant が多く確認された。
- 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。

上部消化管のがん組織から高リスク型の HPV ゲノムが検出され、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 が上部消化管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。特に扁桃がんにおいては、HPV のコピー数も子宮頸がんと同程度であったことは興味深く、本研究結果は 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 26 号	学位申請者	Andres Orlando Castillo Giraldo
審査委員	主査	秋山 伸一	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	有馬 直道	副査 出雲 周二
	副査	竹内 亨	副査 梅北 善久
<p>主査および副査の5名は、平成20年 1月22日、学位申請者 Andres Orlando Castillo Giraldo 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。</p> <p>質問1) 上部消化管がんが発生した後に HPV が感染したという可能性はないか？ (回答) その可能性は否定できない。しかし、検出されたほとんどの HPV ゲノムは宿主ゲノムへの組み込みが確認されている。HPV の感染初期には episomal の状態で検出されるので、本研究の結果から、がんが発生する前にすでに HPV が感染していた可能性が高いことと考える。</p> <p>質問2) がん組織で検出される HPV はモノクローナルであるのか？ (回答) CIN3 や子宮頸がんから検出される HPV はモノクローナルであるとの報告がある。上部消化管がんについてはそのような報告はない。</p> <p>質問3) 扁桃がんで検出された HPV のコピー数が高い理由は何か？ (回答) 先行研究では、扁桃はアデノウイルスや EBV などのヘルペスウイルスの感染および増殖が確認されている。本研究の結果より、HPV も同様に、扁桃は増殖するのに良い条件が整っている可能性を示していると考ええる。また、扁桃には tonsillar crypt を有しているために、そこにウイルスが感染している場合は機械的に排除される可能性が低いのかもしれない。</p> <p>質問4) HPV と他のウイルス感染症による相互作用などはあるのか？ (回答) HIV 陽性の女性が HPV に感染すると子宮頸がんなど生殖器がんのリスクが高くなるという報告がある。また鼻咽頭がんや咽頭がんで、HPV と EBV の重感染による相互作用の可能性も示唆されている。</p> <p>質問5) HPV 感染率の高い集団を追跡した研究はあるのか？ (回答) 血清中の HPV-16 L1 に対する抗体を調べた集団において、その後の咽頭がん、扁桃がんおよび舌癌の発生リスクを調べた研究があり、HPV16 陽性者ではこれのがんの発生リスクが高かった。また北欧の研究では、保存されていた血清中の HPV 抗体価とその後の食道がんリスクとの関連を調べており、有意な関連を報告している。しかしながら、中国で行われた大規模なコホート研究では HPV-16 および HPV-18 と食道がんリスクとの関連は認めていない。</p> <p>質問6) HPV の初期遺伝子の中に E3 が抜けている理由はなぜか？ (回答) HPV ゲノムは実際には、E1 から E8 といった8つの初期遺伝子の ORF の存在が知られているが、E3 と E8 についてはその機能が不明であるので、表記されないことが多い。</p> <p>質問7) 他の環境因子に関する情報は得られていないのか？ (回答) 今回はそのような情報は得ていない。最近の米国における研究によると、口腔の HPV 感染は特定の性行動と強く関連していることが明らかとなっている。また、喫煙や飲酒などは独立して、HPV 感染が口腔・咽頭がんのリスク因子となっていることも報告されている。</p> <p>質問8) bracken fern の発がん性物質は何か？ (回答) bracken fern にはptaquiloside (PTQ) と呼ばれる発がん性の物質が含まれており、DNA のアルキル化剤として知られている。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 9) HPV は細胞性免疫によって排除されるのか？

(回答) 子宮頸部では、上皮細胞の落屑によって HPV 粒子は細胞外へ放出されるので、細胞性免疫がウイルス排除の主たる役割を果たしているわけではないと考える。しかし、子宮頸部の持続感染やがんが観察された女性の中には、HPV 抗体産生能や細胞性免疫反応が低い者が存在することが知られており、宿主側の免疫反応に関わる要因も重要である。

質問 10) 高リスク型の HPV の中で、HPV-16 が多く検出される理由は何か？

(回答) 30 種類近くの高リスク型の HPV が存在すると考えられているが、子宮頸がんにおいてもその約半数において HPV-16 が検出されている。いくつかの報告で、他の高リスク型と比べて HPV-16 は持続感染しやすいことが確認されている。

質問 11) 一般集団における HPV 感染の分布はどうなっているのか？

(回答) Miller らのメタアナリシスによると、一般集団の約 10% に口腔内 HPV 感染が見られ、低リスク型よりも高リスク型の検出率が約 3 倍高い。

質問 12) HPV の感染部位と HPV の型には関連があるのか？

(回答) 子宮頸がんでは、HPV-16 は扁平上皮がんで、HPV-18 は腺癌に多いとの報告がある。

質問 13) HPV のコピー数と宿主ゲノムへの組み込みとの間に関連があるのか？

(回答) episomal の HPV は増幅可能であるので、一般的には episomal な HPV はコピー数が多い。

質問 14) HPV が宿主ゲノムへ組み込まれる際に、特異的な部位に組み込まれるのか？

(回答) ランダムに組み込まれると言われているが、多くは脆弱であると知られる部位である。

質問 15) 食道の正常粘膜上皮の組織はどのようにして選んだのか？扁桃がんにおいては、micro dissection などを用いて、リンパ球などは除いているのか？

(回答) 食道がんの切除標本の中から、がん組織を含まず正常組織のみが含まれているパラフィンブロックを選んで、解析に用いた。Micro dissection は用いていないので、リンパ球などが含まれた組織である。

質問 16) これまでの研究では、HPV 陽性がんでは p53 の変異との関連が認められず、むしろ HPV 陰性がんが多く観察されているが、今回の結果は先行研究と一致するのか？また、食道がんの p53 の発現頻度は、他の研究と比べて矛盾はしていないか？

(回答) 今回は p53 の変異は調べていない。免疫染色で確認される p53 蛋白は変異蛋白である可能性と異常集積を見ている可能性があるが、詳しくは検討していない。本研究の食道がんの p53 の発現頻度 (52%) については、他の研究報告 (45-75%) と大きな違いはない。

質問 17) HPV-16 が食道の正常粘膜上皮から検出されなかった理由はなぜか？

(回答) おそらく感染初期には正常粘膜上皮からも検出された可能性はあり、HPV-16 の高い発がん性を考慮すると、その状態は episomal であったと考える。しかしながら、今回の食道がん症例で検出されたほとんどの HPV-16 ゲノムは宿主ゲノムへの組み込みが確認されており、感染初期に見られる episomal の状態がほとんどなかったことより、がん部及び非がん部の episomal HPV-16 はすでに排除されたために、検出されなかったのかもしれない。子宮頸がんなどでは、病変進行とともに HPV-16 検出率が高くなり子宮頸がんの半数以上で検出される。形質転換や細胞の不死化能力が高い HPV-16 感染が認められるということは、すでに細胞への何らかの影響を与えている可能性があることから、正常組織から HPV-16 が検出される可能性は低いために今回は検出されなかったと考える。

質問 18) HPV の重感染が食道がんのみで観察された理由はなぜか？

(回答) ブラジルのコホート研究では、子宮で観察された重感染のウイルスの多くは排除され、持続感染となりやすい型のみが単独感染として残り、発がんに関連するとの報告がある。本研究の口腔・扁桃がん HPV-16 の単独感染が観察されたが、これは HPV-16 が口腔がんの発がん過程に深く関与している可能性を示唆するものかもしれない。しかし、重感染が発がんに重要であるか否かはまだ不明である。はっきりとした理由はわからないが、食道がん症例で重感染が持続しているということは、宿主の免疫反応が低下もしくは欠如していることを意味しているのかもしれない。今後の検討が必要と考える。

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。