

氏名	北川 恭子
生年月日	
本籍	千葉県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第165号
学位授与の日付	平成10年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	PCR法を用いた子宮頸部病変におけるヒトパピローマウイルス(HPV)の型判定法の確立とその応用
論文審査委員	(主査) 中西 義信 (副査) 二階堂 修, 大熊 勝治, 山下 克美, 大場 義樹

学位論文要旨

The number of the human papillomaviruse (HPV) type has reached over seventy and is still increasing. Since some types are associated with genital lesions, to develop a simple and sensitive method for the HPV identification is important. Using the polymerase chain reaction with consensus primers corresponding to the E6 and L1 regions of the HPV genome, a new typing method was established, which enables us to identify nine known HPV types with five-time higher sensitivity and in one-third of time comparing to previous methods.

This method proved a close association between HPV infection and cervical carcinomas. Moreover, a loss of the E1 or E2 gene from the HPV18 genome was frequently observed in cervical carcinoma, and this could be related to an aggressive property of this viral type. In addition to the known types, six different sequences that have not been classified into any HPV types were detected. As comparing the amplified sequences by L1-PCR, HPVs were classified into six groups, which are consistent with clinical pictures.

These results indicated that this newly-established method for the HPV typing is a great use in the research and diagnosis of HPV-related diseases.

パピローマウイルスはヒトを含めた多種の動物に感染し発癌能を持つことが動物レベルで確認されている。ヒトパピローマウイルス(HPV)は1998年までに70種以上の型が同定されており、そのなかの一部の型の感染が子宮頸癌の原因の一つとなっている可能性があると考えられ、その証明に向けて基礎的研究および疫学的研究が多くの研究機関で進められてきた。HPV感染が子宮頸癌の発症原因であることが証明されれば、積極的なHPV感染予防策の実施が可能となり、その成果として子宮頸癌発症は減少すると期待できる。基礎的研究ではウイルスが産生する蛋白の機能解析が、疫学的研究では臨床病変部におけるHPVの検出とその型種

の同定が中心である。疫学研究の分野では、癌病変部のみならず癌の前段階の所見としてとらえることのできる異形成の時点から特定の型のHPV感染が高頻度に検出されるならば、それらの感染が発癌のステップの中で初期の必須条件になっていると推測することができる。また子宮頸癌病変において100%の検出率でHPVが見つかるならば、このウイルスの発癌への関与は異形成発症の時点だけでなく、その後の癌病変への進展過程でも何らかの役割を担っていると考えられる。これらの点について、より多くの症例での検討結果を得ることはHPV感染についての普遍的事実を知るために重要である。しかしこれまでに各研究機関で報告されてきた検出率にはばらつきがあり、一定の見解を得るまでに至っていない。これには従来の検出方法が原因となっていると考えられた。また検出判定時にはラジオアイソトープの使用が必須であり、検討可能な施設が限定される原因の一つになっていた。そこで本研究では多くの医療機関および研究機関において検査が行えるように、ラジオアイソトープを使用しなくても高い検出感度で判定でき、迅速簡便に正確な検出判定が行える検出系を確立することを目標とした。

従来のHPV検出方法にはサザンブロット法が主に採用されていたが、検出感度が不十分、型判定までに時間がかかる、判定できる型種に限度があり又誤った型判定結果を導く危険性がある等、多くの問題点を持つ。本研究では、高い検出感度で一度に複数の型を判定できるように、コンセンサプライマーを用いたPCR法を確立した。PCRのターゲットはHPV DNA中のE6およびL1領域に設定し、2種類のPCR法、すなわちE6-PCR法およびL1-PCR法を確立した。E6は癌遺伝子で癌細胞中での蛋白産生が確認されており、L1はHPV DNA中で型間の相同性が最も保たれている領域である。これらの領域をターゲットとすることにより、E6では癌において感染が見られる複数の型の増幅、およびL1ではさらに広範囲の型の増幅が可能な検出系の構築を目指した。本法はPCR産物を複数の制限酵素で切断し、その切断パターンの違いによってHPV型を判別する方法である。各コンセンサプライマーは型間の相同性が高い領域に設定したが、同時にプライマー間の相同性は逆に低いところを選択したため、各型のPCR産物から得られる制限酵素切断パターンは型特異的なものとなり、型種の識別に利用できた。クローン化されたHPV各型を用いて増幅および型判定の検討を行った結果、E6-PCR法では子宮頸癌における感染が報告されている4種類の型が、L1-PCR法ではそれらを含む子宮頸部における感染が報告されている計9種類の既知のHPV型が検出同定できた。本法は従来の方法と比べて判定までに要する時間が1/3以下に短縮され、検出感度は5倍以上上昇した。この感度は従来法での検査工程ではその使用が必須であったラジオアイソトープの使用を必要とせず確認できた。さらに必要となるDNAサンプルも少量化され、子宮頸部から綿棒で採取した擦過細胞から抽出したDNAでも検出可能であった。このため生検を用いて検討できる患者のみならず、健常人を対象としたスクリーニング的なHPV感染の診断に本方法を使用することが可能となった。

子宮頸部病変部臨床検体を対象としてE6-PCR法およびL1-PCR法でHPVを検出した結果、初期病変の段階から浸潤癌に至るまで100%に近い確率でHPVが感染していることがわかった。この結果からHPV感染は子宮頸癌発症の初期段階から関与しており、病変部が進行してもウイルス感染は消失することなく持続し、癌化への進展過程にも関与していることが示唆された。またHPVの中でも発癌に対してハイリスクグループとして区分されているHPV16型とHPV18型の陽性率の和は、病変のステージが進むにつれて上昇した。これはこの2種の型が感

染後は、浸潤癌への移行性が他の型の感染の場合よりも高いことを示唆するものであった。

子宮頸癌発症に関与していると考えられるHPVの型種は複数報告されているが、年々新規の型が同定されている現状では、既知の型のみならず未知のHPV型も迅速、簡便に検出できる方法が要求される。今回確立したPCR法を用いて臨床検体からのHPV同定を行ったところ、既知の9種類のHPV型が検出できるのみならず塩基配列が未発表の型(HPV-X型)が6種類検出された。これらには既知の型であるが塩基配列が公表されていない型や新規の型が含まれていると考えられた。よってこの検出法は既知の型の同定だけでなく子宮頸部に感染するHPVを、未知の型も含めて幅広く検出可能な検出系であることが期待された。

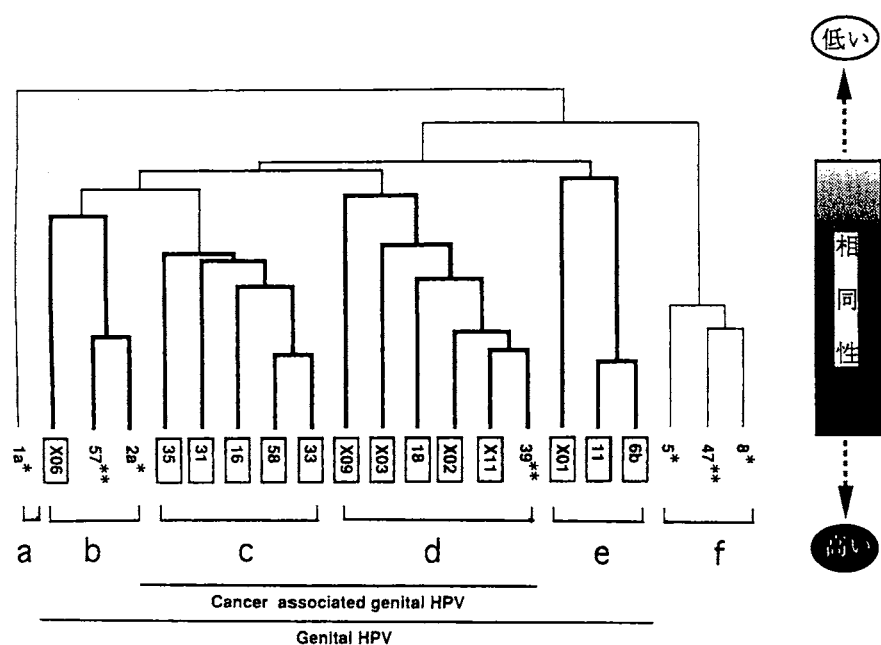
子宮頸癌発症のリスクファクターとなる複数のHPV型の中でもHPV18型が感染している浸潤癌では、癌細胞の特徴や患者の予後等の面から特に悪性度の高い症例が多いことが報告されている。子宮頸癌から樹立した細胞株の多くはHPV16型陽性由来とHPV18型陽性由来であるが、それら細胞の中でのHPV DNAの残存状態としてはE1/E2領域を欠失している例が多い。特にE2蛋白はE6など癌遺伝子の転写を負に制御に関与する機能があることから、遺伝子欠失のイベントは癌化に正の方向に働くと考えられてきた。しかしながら臨床検体におけるHPVウイルスDNAの残存状態の特徴はこれまで明らかにされていない。そこでHPV18型陽性の臨床例でのウイルスDNAの残存状態を、まずE1とE2領域に注目してHPV16型陽性の例と比較し、さらに癌検体を対象に全領域をターゲットにしてPCR法を用いて解析した。E1およびE2領域の欠失は異形成病変ではHPV16型、HPV18型いずれの陽性例でも検出されず、浸潤癌ではHPV18型陽性例でのみ認められた。また癌検体でのウイルスDNA全体中の残存状態はE1からL2の領域内の一部を欠失している例が見られた。これらの結果からHPV18型陽性の癌の悪性度が高いという特徴は、ウイルス遺伝子の部分欠失などの遺伝子変異が一因となっている可能性があると考えられた。しかしHPV DNAの欠失の有無と被検者の予後(生存率)の相関を調べたが、検討した9例では明らかな傾向は見い出せなかった。更に長期追跡調査および追加検討が必要と思われる。

子宮頸部に感染するHPVは多種あるが、発癌リスクの程度は様々である。各型で産生される蛋白の特徴に視点を向けると、発癌のリスクで分類した型間では蛋白の機能に差異がある。このことから感染が認められる疾患の性質によってHPVをグループ分類した場合、同一グループ内では蛋白をコードしている遺伝子配列は高い相同性を持つ可能性があると考えられた。そこでL1-PCR法で検出された6種類の、型が未知のHPV (HPV-X型)の塩基配列がどのHPV型とより高い相同性を持つのかを知ることを目的として、PCR増幅産物の塩基配列の解析から塩基配列が既知の15種のHPVとともにHPV型をグループ分類することを試みた。この結果、対象とした21種のHPVは6つのグループに分類された(図1)。各グループ内では感染部の疾患の特徴に共通性が見られることがわかり、L1-PCRでターゲットとなった型種は全て生殖器に感染を起こす4つのグループに属していた。これは臨床検体での陽性各例のサンプル採取場所に一致するものだった。このようなグループごとの感染場所および発癌性の有無といった特徴の共通性がある一方、子宮頸癌発症に対して共にハイリスクと一括されてきたHPV16型とHPV18型は別々のグループに分類された。先に述べたように、HPV18型陽性癌症例では臨床上の特徴が他の型の場合とは異なることには、ウイルス遺伝子の部分欠失が原因の一つであると考えられたが、L1-PCRによって増幅される領域の塩基配列による分類の結果は、感染したHPVの型種による癌の悪性度の程度を遺伝子レベルからも推測するのに有効

であることを示唆するものだった。このことから増幅されるHPV型が既知であるか未知のものかに関わらず、増幅された塩基配列を解読してグループ分類することによって感染病変の性質が推測可能になると期待された。

今回確立したL1-PCR法によるHPV検出は、健常者を含めた様々なステージの被検者に対して適応が可能で、検出されたHPVのPCR増幅内の塩基配列からグループ分類することによって感染病変の予後が推測できることから、子宮頸癌の早期発見および適切な診療方針を決定するために有効な情報を提供し得る、迅速簡便で高感度な検査方法であると考えられた。

図1 HPV各型のL1-PCRターゲット領域の塩基配列の相同性から作成した系統図



- a; 足底疣贅
- b; 尋常性疣贅
- c,d; 子宮頸癌
- e; 尖圭コンジローマ
- f; 疣贅状表皮発育異常症(EV)

- L1-PCRで増幅される
- * L1-PCRで増幅されない
- ** L1-PCR未検討

学位論文審査結果の要旨

北川恭子氏から提出された学位論文について、各審査委員による査読の後に平成10年7月1日に口頭発表会が公開で行われた。同日に上記5名の審査委員によって最終の審査委員会が開かれた結果、以下の理由により当該論文は博士(薬学)の学位を授与するに値すると判定された。

この論文は、PCR法を利用したヒトパピローマウイルス(HPV)の検出および型判定法の開発についての研究結果を記述したものである。HPVは発癌能を有するウイルスであり、特に子宮頸癌の原因ウイルスではないかと考えられている。しかし、生体におけるHPVの検出法はまだしっかり確立されていなかった。また、HPVには遺伝子構造の異なる70種以上の型の存在が知られており、それぞれのウイルス型で病変を誘発する程度が異なると予想されている。したがって、HPVの感染が認められたとしても、どの型が存在するかを特定することが、感染者における病変の進行を予測する上できわめて重要である。

北川氏は、PCR法を利用して高感度でかつ型判定可能なHPV遺伝子検出法の開発を行った。さまざまな遺伝子部位に対応するプライマーを作製し、PCR反応についても種々検討した結果、当初の目的を満たす方法の確立に成功した。この方法を用いて臨床検体が解析されたところ、子宮頸癌とHPV感染との関連性が裏付けられた。さらに、これまで報告されていない新しいHPV型の存在が明らかとなった。この研究は発癌性が疑われているウイルスを検出する新しい方法を開発したものであり、今後おおいに医療に応用されると期待される。