



Title	口腔前癌病変と扁平上皮癌におけるHPVの関与について
Author(s)	石橋, 美樹
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59293
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【44】

氏 名	石 橋 美 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯学)
学 位 記 番 号	第 2 4 9 0 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 9 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	口腔前癌病変と扁平上皮癌における HPV の関与について
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 古郷 幹彦 (副査) 教 授 豊澤 悟 准教授 松本 憲 講 師 福田 康夫

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

口腔癌の発生には、喫煙と飲酒が主なリスクファクターであることが知られているが、近年、ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus : HPV) の関与が注目されている。HPV には 100 種類以上の型があり、このうち、16 型や 18 型などの高リスク型 HPV は子宮頸癌の原因ウイルスとして知られている。HPV が持続感染すると、高リスク型 HPV の非構造蛋白質である E6 蛋白質が癌抑制遺伝子産物である p53 の分解を促進し、E7 蛋白質は癌抑制遺伝子産物である pRb を不活化することにより、癌化へと導いていくと考えられている。

口腔癌における HPV の検出率は報告論文によりばらつきがみられ、また、子宮頸部の上皮異形成において HPV 感染を示す細胞形態であるコイロサイトーシスは、口腔病変では認められないことから、口腔癌発生における HPV 感染の関わりについては明確でないところが多い。

本研究では、子宮頸部の前癌病変および扁平上皮癌を HPV 感染の陽性指標として、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法と Genotyping 法により HPV 検出の妥当性を確認し、口腔の前癌病変および扁平上皮癌における HPV 検出を試みた。そして、子宮頸部の HPV 感染による癌化過程において、過剰発現する p16^{INK4a} について免疫染色を行い、HPV 感染との関与について検討した。p53 は多くの癌では遺伝子変異により異常蓄積するが、子宮頸癌では E6 蛋白質により分解が促進される。そこで、免疫組織化学的に p53 異常蓄積を検討し、子宮頸部と口腔の発癌における p53 の異常蓄積の割合を検討した。また、子宮頸癌は HPV の持続感染により発症することから、子宮頸部と口腔における免疫応答の違いが想定される。そこで、子宮頸部病変と口腔病変における免疫担当細胞数を指標として、両者の免疫応答の違いを検討した。

【材料と方法】

1. 検体材料

大阪大学歯学部附属病院口腔外科 1 (制御系) において切除した前癌病変 57 例と扁平上皮癌 50 例について、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて検討を行った。HPV 感染の陽性指標として大阪大学医学部附属病院において生検ないし手術を行った子宮頸部前癌病変 19 例と扁平上皮癌 10 例を用いた。

2. HPV 感染率に関する検討

① コンセンサスプライマーを用いた PCR による検討

パラフィンブロックから DNA を抽出し、PCR を行った。プライマーには L1 領域のコンセンサスプライマーである My09/My11 と Gp5+/Gp6+を用いた。

② HPV typing 法による検討

23 種類の HPV 型に対する Multiplex primer で PCR を行った後、蛍光標識し、各 HPV に対するプローブの付いたマイクロアレイにアプライしてハイブリダイゼーションを行い、蛍光強度を測定した。

③ p16^{INK4a} 免疫染色による検討

子宮頸部病変では HPV 感染の指標とされている p16^{INK4a} 発現を、CINtec® Histology Kit を用いて染色し、Kong らの判定基準 (Am J Surg Pathol, 31:33-43, 2007) により陽性判定を行った。

3. 免疫染色による p53 遺伝子変異の検討

p53 に対するモノクローナル抗体を用い、免疫染色を行った。判定は、病変部細胞の陽性率と染色強度からスコア化することにより行った (Cancer Res, 55:237-241, 1995)。

4. 子宮頸部粘膜と口腔粘膜における免疫応答に関する検討

ヘルパー T 細胞のマーカーである抗 CD4 抗体、キラー T 細胞のマーカーである抗 CD8 抗体、マクロフ

ァージのマーカ―である抗 CD68 抗体、ランゲルハンス細胞のマーカ―である抗 CD1a 抗体を用いて染色し、子宮頸部病変と口腔病変における免疫担当細胞の分布について検討した。

【結果と考察】

1. HPV 感染率に関する検討

- ① コンセンサスプライマーを用いた PCR 法：子宮頸部病変では 96.6% (28/29 例) に HPV-DNA が検出され、この HPV 検出法の妥当性が確認できた。一方、口腔病変全体における平均 HPV 陽性率は 14% (15/107 例) であった。
- ② HPV typing 法：子宮頸部病変では 82.8% (24/29 例) に HPV-DNA が検出された。一方、口腔病変全体では、8.4% (9/107 例) に HPV が検出された。これらの陽性例はすべて、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法では HPV-DNA は検出されなかった。これは GeneSQUARE 法の各プライマーの設計が、コンセンサスプライマーである My09/My11 と Gp5+/Gp6+の組み合わせでは増幅されない領域が含まれていることが原因と考えられた。

上記①②の結果から、口腔病変全体における HPV 陽性率の平均は 22.4% (24/107 例) と子宮頸部病変に比較して低く、口腔癌発生の主なリスクファクターは喫煙と飲酒であり、HPV の関与の可能性は低い事が示唆された。

- ③ p16^{INK4a} の発現と HPV 感染率： p16^{INK4a} 発現は、HPV 感染陽性の指標として用いた子宮頸部病変では 29 症例中 27 例 (93%) に陽性反応を示し、口腔病変全体では 107 症例中 23 例 (21.5%) に陽性反応を示した。HPV 陽性率との関連については、p16^{INK4a} と HPV がいずれも陽性を示したものは、子宮頸部病変では 29 例中 26 例で (一致率：89.7%)、口腔病変では 107 例中 6 例 (一致率：5.6%) であった。これらの結果から、口腔病変における p16^{INK4a} の発現は HPV 感染と関連しないことが示されたが、HPV 陽性かつ p16^{INK4a} 陽性を示した症例では、その発症に HPV が関与した可能性が考えられた。

2. 癌抑制遺伝子 p53 の異常蓄積について

p53 免疫染色では、子宮頸部病変の平均陽性スコアが 0.2 であるのに対して、口腔病変では 3.2 と有意に高い値を示した。このことから、口腔前癌病変と扁平上皮癌においては、過去の報告にも記載されているように、p53 遺伝子変異がみられるものが多いことが示唆された。

3. 子宮頸部粘膜と口腔粘膜における免疫応答

子宮頸部病変と口腔病変において、CD4、CD8、CD68、CD1a 陽性細胞数に有意な差は認められず、両組織において免疫応答に差がない可能性が考えられた。

【結論】

口腔の前癌病変および扁平上皮癌における HPV 検出率は 22.4%であり、子宮頸部病変と比較して有意に低いことが示されたが、一部の口腔病変の中には、HPV 感染が口腔扁平上皮の癌化に関与する可能性もあることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、口腔扁平上皮癌の発生におけるヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の関与について検討したものである。本研究では、HPV 感染による発癌機序が知られている子宮頸部病変を HPV 検出の陽性指標として、その検出方法が適切であることを確認し、口腔の前癌病変(57 例)と扁平上皮癌(50 例)における HPV 検出を行った。コンセンサスプライマーを用いた PCR 法、HPV typing 法および p16^{INK4a} に対する免疫染色法にて検討した結果、HPV は、口腔前癌病変では約 26%の症例に、口腔扁平上皮癌では約 17%の症例に検出され、子宮頸部病変における HPV 検出率に対してか

なり低いことが示された。

本研究の結果は、口腔の前癌病変や扁平上皮癌における様々な HPV 検出率が報告されている中で、信頼度の高い HPV 検出率を示した点で、口腔扁平上皮癌発生における今後の臨床疫学研究の一助となり、博士 (歯学) の学位に値するものと認める。