

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791682

研究課題名(和文)血清疫学的手法によるヒトパピローマウイルス感染の診断と子宮頸部前癌病変の管理

研究課題名(英文)Neutralizing antibodies against HPV and prognosis of CIN

研究代表者

越智 寛幸(Ochi, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90574145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はヒトパピローマウイルス(HPV)感染の実態を血清疫学的方法によって明らかにし、HPV感染予防ワクチンによる子宮頸癌発症予防をより効果的なものとするための基礎データを蓄積すること。また、子宮頸癌前癌病変患者の血清中和抗体の有無を調べることで、子宮頸癌発症の高リスク群を抽出し、効率的な管理方法を検討することである。「CINの自然史に関する多施設共同コホート研究」のデータ解析から、子宮頸部前がん病変患者におけるHPV中和抗体の測定が、その後の臨床経過を予知するための指標として有用であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to analyze the association of neutralizing antibody generated by human papillomavirus (HPV) infections with the progression and persistence of low-grade cervical abnormalities. We analyzed follow-up date of patients enrolled in a prospective non-intervention cohort study. Our findings suggested that neutralizing antibody assays for women with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) may be useful for predictor of disease persistence and progression.

研究分野：産婦人科学

キーワード：ヒトパローマウイルス 血清疫学 子宮頸癌 子宮頸部前癌病変

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、世界で毎年約 50 万人新たに発症し、27 万人がこの癌で死亡している。女性の癌では乳癌に次いで世界で 2 番目、特に発展途上国で多く認められる。本邦では年間約 15,000 人に発症し、約 5,000 人がこの癌で死亡している。HPV 感染が子宮頸癌発症の最大のリスクファクターであることは疑いようがないが、ほとんどは一過性で排除され、HPV ゲノムは検出されなくなることから、HPV DNA 検査のみでは真の感染実態を把握することはできない。非常に限られたヒトに HPV の持続感染が維持される一方で、どれくらいの頻度で、複数ある高リスク HPV に感染し、それが排除されているのか。あるいは一度排除された HPV が感染を繰り返すことがあるのかなど、いまだ不明な点が多く、血清疫学的手法による感染実態の把握が必要であるが、わが国における血清疫学的調査は極めて少ない。

HPV 血清疫学の困難性 -中和抗体測定系を用いる理由-

HPV の血清疫学がこれまであまり行われてこなかった理由は、HPV は増殖できる細胞培養系がなく抗原蛋白の入手が困難であったことや、免疫系に曝されにくいといったことがあげられる。現在ではバキュロウイルスノ昆虫細胞系を用いて作製した HPV キャプシドを抗原として ELISA 法をもちいて検出される抗 L1 キャプシド抗体が、HPV 感染を知るためのよい指標となることが分かっている。抗 L1 抗体は HPV 粒子の立体構造を認識し、複数ある遺伝子型の型間で、交差性があまりみられないことから、各型の感染を経時的に把握することも可能である。HPV 感染の検出法としては感度ではゲノム DNA の検出に劣るが、HPV 感染の大部分を占める過去の感染を知るには血清抗体の検出が有用である。また近年 HPV の中和活性測定系の開発が進み、人工的な感染モニター系を用いて、自然感染したヒト血清中の中和抗体を高感度に検出することが可能となってきた。この方法は ELISA を用いた方法に比べて、非常に高感度に型特異的な抗体を検出することができることから、感染予防ワクチンの評価に用いられてきた (Kondo K, Ochi H et al, *Virology*, 2007) (Kondo K, Ochi H et al, *Journal of Medical Virology*, 2008)。本研究ではこの中和抗体測定系を用いることで、より高い精度で血清疫学的解析が可能と考えられた。

HPV 感染の地域性 -本邦独自の血清疫学的解析の必要性-

HPV ゲノム DNA 型の頻度は地域によって差があり、海外では 16 型、18 型の頻度が高いことが知られているが、日本を含めた東アジアでは、欧米に比べて 52 型と 58 型の頻度が高いことが分かっている。しかし、欧米ではこれらの型の頻度は少なく、あまり検討がされ

ていない。我々が HPV DNA 検査を行った 228 2 例 (細胞診正常 1517 例、CIN1 318 例、CIN2-3 307 例、浸潤癌 140 例) のデータによると、細胞診正常者と CIN2-3/浸潤癌患者における HPV 型分布を比較することによって算出される相対危険度は、16/18/31/33/35/52/58 型の 7 タイプが他のハイリスクタイプやローリスクタイプに比べて格段に高く、HPV 型の同定がハイリスク群の抽出に有効と考えられた。しかし、現行のワクチンが感染を予防できる 16/18 型の陽性率は浸潤癌全体では 67% であり、より効果的な HPV 感染予防ワクチンの開発が期待されている。HPV 感染予防ワクチンによる子宮頸癌の発症予防をより効果的なものとするには、本邦独自に血清疫学的調査を行い地域性のある HPV 感染の実態を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染の実態を血清疫学的方法によって明らかにし、HPV 感染予防ワクチンによる子宮頸癌発症予防をより効果的なものとするための基礎データを蓄積すること。また、子宮頸癌前癌病変患者の血清中和抗体の有無を調べることで、子宮頸癌発症の高リスク群を抽出し、効果的な管理方法を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

Pseudovirion を用いた感染代用系の確立

中和抗体の測定には HPV キャプシドに分秘型アルカリフォスファターゼ (SEAP) の発現プラスミドをパッケージさせた Pseudovirion (偽ウイルス) を用いた。子宮頸癌に関わる HPV のなかでも本邦で高頻度に検出される HPV16/18/31/33/35/45/52/58 について (子宮頸癌の 95%以上) 以下の方法で、pseudovirion を用いた中和抗体測定法を確立した。

a. HPV L1、L2 キャプシド蛋白の発現;

Pseudovirus の作成にはまずヒト培養細胞で、L1 及び L2 キャプシド蛋白質を発現させる必要がある。16 型の HPV では L1、L2 遺伝子のアミノ酸配列を変えないように、塩基配列をヒトでよく用いられているコドンに変換すると、L1、L2 蛋白質の発現がみられる。他の HPV 型でも同様に、L1 及び L2 のコドン変異体を作製してヒト培養細胞での発現を確認する。コドン変異体は、80~100 塩基の合成 oligonucleotide を 20 塩基づつオーバーラップするように作製し、PCR でつないだ後クローニングし、シークエンスを行って塩基配列の確認する。Western blot で目的の HPV 型の L1 および L2 蛋白が発現していることを確認した。

b. HPV pseudovirion の作成;

SV40 の large T 抗原を高発現している 293FT 細胞に、SV40 の origin を持つ SEAP 発現プラスミドを導入すると、SEAP 発現プラスミドは T 抗原依存的に核内で大量に複製される。

この仕組みを利用して、L1およびL2のコドン変異体発現プラスミドを同時に transfection すると、発現した L1, L2 キャプシドが核内で自律集合して L1/L2 キャプシドを形成する。この際核内で大量に複製された SEAP 発現プラスミドがキャプシド内に取り込まれる。二日後に細胞を回収し、37 °C、overnight で maturation させて感染実験に用い

c. 中和抗体の測定;
 あらかじめ希釈した血清と pseudovirus を反応させた後に細胞に感染させたときの SEAP 活性と、血清を加えなかったときの SEAP 活性とを比較して判断する。pseudovirus の感染価を半減させる最大血清希釈倍数を中和抗体価とし、抗体価 40 倍以上を陽性と判定した。

コホートサンプルによる中和抗体の解析

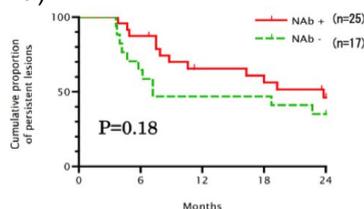
文部科学省特定領域「HPV と発がんに関するコホート研究」研究班より血清サンプルの提供をうけて研究を開始した。HPV 血清中和抗体の有無が、病変の存続・進展の予後を予知するマーカーとして使用可能か、コホート研究で長期間にわたって蓄積されたフォローアップを用いて検討した。

4. 研究成果

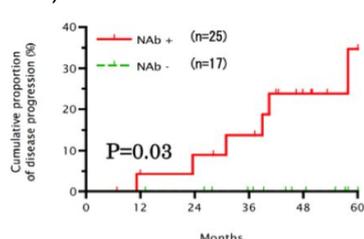
子宮頸部前癌病変症例のフォローアップにおける HP 中和抗体検査の有用性

HPV16 DNA 陽性の前癌病変患者において、HPV16 に対する血清中和抗体の有無が病変の消失や進展に関連するかを検討した結果、CIN1/2 患者で2年以内に病変が自然消失する割合は中和抗体陽性者で低く、中和抗体陽性者で病変が存続しやすい傾向がみられた(図 1-a)。また CIN3 へ進展した6名はすべて中和抗体陽性であり、進展リスクに有意差を認めた(図 1-b)ことから、子宮頸部前癌病変患者では HPV DNA の型判定に加えて、HPV 血清中和抗体の有無を測定することで、CIN3 への進展リスクの評価に役立つ可能性があることを明らかとなった(Ochi H, et al. *Journal of Medical Virology*, 2012)。

(図 1-a)

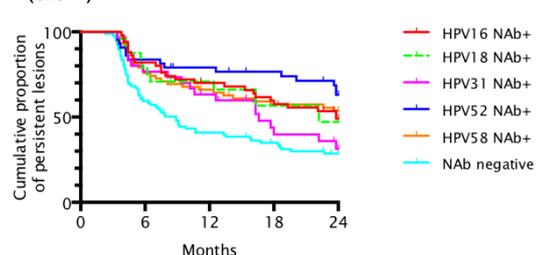


(図 1-b)

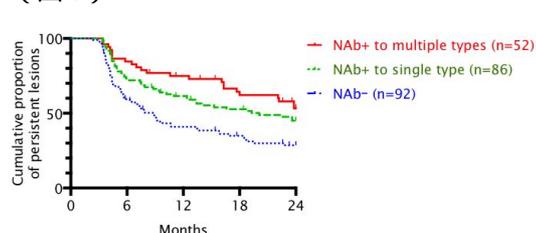


また、16 型以外の HPV 型についても検討する目的で、「HPV と発がんに関するコホート研究」の登録時に血清中の HPV16/18/31/52/58 型中和抗体(Nab)検査が可能であった 230 例について解析を行ったところ、LSIL 患者において HPV16/18/52/58 型の各々に対する中和抗体陽性は病変持続との関連が見られた。HPV31 では中和抗体陽性者で病変の自然消失までの時間が長い傾向が見られたが、有意差はなかった(図 2)。また、中和抗体陽性になる型が多いほど、有意に病変は持続しやすかった(図 3)。複数の型に対して中和抗体陽性の患者では sexual activity が高く、生涯性交パートナー数やクラミジア抗体価が有意に高かった。また、複数の型に対して中和抗体陽性の患者では、フォロー開始から 24 ヶ月後の HPV 検査で登録時とは異なる新しい HPV タイプが検出される割合が高い傾向にあった。一部の患者では HPV 感染を繰り返すことによって細胞診異常が持続している可能性があると考えられた。以上の結果は、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会にて報告した。これらのデータは英文論文として発表の予定で、現在準備中である。

(図 2)



(図 3)



子宮頸部細胞診異常症例のトリアージとしての HPV タイピング検査の有用性

本邦において、高リスク HPV のなかでも HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 の 8 タイプでは子宮頸部発がんリスクが特に高いと報告されている。がん検診にて子宮頸部細胞診異常を指摘された女性の中でコルポスコピー下生検(以下、コルポ診)を省略できる(直ちに治療が必要な CIN3 以上の病変を持たない)女性を見分けるためのトリアージとして HPV タイピング検査が有用か検討した。方法は、子宮頸部細胞診異常を指摘されてコルポ診のために 2 次検診病院を受診した患者 427 名 (LSIL 214 名、HSIL184 名、ASC-H 29

名)を対象に、少なくとも3カ所以上からの十分な数の生検を行うとともに13種のHPVタイプ検査が可能な検査(クリニックHPV)を行い、その臨床データを解析した。本研究は4施設の共同研究として各参加施設の倫理委員会の承認のもとに患者の同意を得て行われた。結果、LSIL患者の、高リスクHPV陽性率は2タイプ(HPV16/18)では29.4%、8タイプ(HPV16/18/31/33/35/45/52/58)、13タイプ(HPV16/18/31/33/35/45/51/52/56/58/59/68)を含めると、各々58.9%、74.8%であった。2タイプ(HPV16/18)が陰性であった患者中、7.9%にCIN3以上の病変が認められたが、8タイプ陰性者のなかにCIN3以上の病変を有する患者はおらず、約40%の患者でコルポスコピー検査を省略できた可能性があった。HPVタイプ検査はLSIL/ASC-US患者のなかでコルポ診を省略して細胞診による経過観察としてもよい低リスクの症例を区別するためのトリアージとして将来利用できる可能性がある。一方、HSIL/ASC-H患者では、8タイプ以上のHPVが陰性であっても、CIN3以上の病変が高率(>35%)にみとめられることから、HPVタイプ検査でコルポスコピー検査省略のトリアージはできない(Nakamura Y, Ochi H et al, *Int J Clin Oncol.*, 2015)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsunashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H for Japan HPV And Cervical Cancer (JHACC) Study Group, Do neutralizing antibody responses generated by human papilloma virus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol* 2012; 84: 1128-34. doi: 10.1002/jmv.23258. 査読あり
Nakamura Y, Matsumoto K, Satoh T, Nishide K, Nozue A, Shimabukuro K, Endo S, Nagai K, Oki A, Ochi H, Morishita Y, Noguchi M, Yoshikawa H., HPV genotyping for triage of women with abnormal cervical cancer screening results: a multicenter prospective study. *Int J Clin Oncol.* 2015 Feb 5. [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s10147-015-0789-4 査読あり

[学会発表](計1件)

越智寛幸, 沖明典, 八杉利治, 平井康夫, 八重樫伸生, 三橋暁, 藤井多久磨,

川名敬, 渡部洋, 横山正俊, 青木陽一, 古田玲子, 吉川裕之, HPV16/18/31/52/58型血清中和抗体と子宮頸部前がん病変の消失との関連
第67回日本産科婦人科学会学術講演会、
2015年4月10日 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

越智 寛幸 (HIROYUKI OCHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 90574145