様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791748
研究課題名（和文）：尿路性器腫瘍に対するヒトパピローマウイルス感染の関連性についての検討
研究課題名（英文） Etiological role of human papillomavirus infection in the development of urogenital tumor
研究代表者： 重原 一慶（SHIGEHARA KAZUYOSHI）
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：20595459

研究成果の概要（和文）：
尿路HPV感染を調査する上で最も簡便かつ非浸襲的な方法は、尿検体を使用することと考え、子宮頸癌検診で汎用されている液状細胞診を応用することにより、HPV-PCR検査と細胞診が同時に可能であることを報告した。また、女性膀胱腫瘍84例を対象とした検討では、HPV検出率は6.0%（5例）であった。その5例について、分子細胞学的手法を用いて、感染したHPVが腫瘍の発生に関与していることを示唆し得るデータを得た。同様に日本人陰茎癌の47%がHPV感染に関連したものであったことを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Firstly, as urine samples are suitable for large-scale studies of not only HPV but also other microorganisms that cause urethritis because of the ease and noninvasive nature of sampling, we have attempted to improve the analysis methods using urinary samples. We found that this method is applicable for detection of HPV in urine. In addition, eighty-four female patients with primary bladder tumor were studied. HPV-DNA was detected in 5 (6.0%) of 84 eligible patients, and we demonstrated that HPV infection is likely to play an important role in the development of female bladder tumor based on various histopathological and molecular methods. Furthermore, we found that 47% of penile cancer was likely to be associated with penile HPV infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：感染症
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学
キーワード：ヒトパピローマウイルス、性感染症、陰茎癌、膀胱癌

１．研究開始当初の背景

子宮頸癌の原因である HPV 感染症は、女性の場合、性交開始後の数年以内に約 50%に認め、生涯における感染率は 80%以上とされており、最も多い性感染症(STIs)の 1 つであると考えられている。一方、近年の疫学研究によって男性も女性と同等に HPV 感染が生じていることが分かり、海外の大規模コホート研究によると、毎年約 40%の男性において HPV 感染症が生じていると推測されている。従来から、男性における HPV 感染は無症候性であり、男性は HPV 感 の

リザーバーに過ぎないと考えられてきたが、近年、子宮頚癌以外の腫瘍の発生と HPV 感染との関連性についても示唆され始め、陰茎癌の 50%、咽頭癌の約 60%、肛門癌の約 90%から HPV が検出されたと報告されている。さらに、これらの HPV 感染が関連した悪性腫瘍の罹患率は、近年増加傾向を示していることから、男性に対する HPV 感染予防ワクチンの接種についても検討され、現在世界 70 カ国以上で男性にも適応されるようになった。

２．研究の目的

本邦においても女性に対する HPV 感染予防ワクチン接種が実用化されているが、その接種率はようやく 50%以上に達したに過ぎない。本邦において男性にも男性に対するワクチンの適応が認められれば集団接種効果によりさらなる子宮頚癌罹患率の低下が期待され、男性においても HPV 感染関連疾患の発症予防が期待される。

そこで、本邦においても男性に対するワクチン接種を推奨するためのエビデンスの確立が必要と考え、本研究を立案した。

３．研究の方法

（１）尿検体におけるＨＰＶ感染の検査法の開発

尿路HPV感染を調査する上で最も簡便かつ非浸襲的な方法は、尿検体を使用することである。しかし、従来から尿検体からのHPV-DNAの検出は困難であり、その検出率は低いといわれてきた。まず、尿検体を用いたHPV検出法の確立を試みた。

子宮頚癌検診で汎用されている液状細胞診の手法を用いて、健常者および尿道炎患者の尿におけるＨＰＶ検出率を、PCR法を用いて検討した。また、その病原性の可能性を推定するために、HPV陽性検体において、パパニコロウ染色を用いたHPV感染関連細胞異常の有無と、in situ hybridization法でHPV-DNAの細胞内分布について検討を行った。

（２）膀胱腫瘍とＨＰＶ感染との関連性についての検討

女性は尿道が短いため、男性に比べ膀胱内HPV感染が生じやすいのではないかと考え、まず女性膀胱腫瘍に対象を限定して調査を行った。

① パラフィン包埋腫瘍切片を用いて、それら腫瘍切片からDNAを採取し、各検体において、Modified GP5+/GP6+ PCR法にてHPV-DNAの有無について検討した。HPV陽性検体については、HPV GenoArray Kitを用いてHPVの型判定を行った。

② HPVが腫瘍組織内に確実に感染していることを立証するために、in situ hybridization法を用いて、腫瘍組織内のHPV-DNAの分布について観察を行った。

③ 感染したHPVが腫瘍発生に関与しているか否かについて、HPVの発癌蛋白の１つであるHPV-E7のバイオマーカーであるp16-INK4aおよびmcm-7の発現について免疫組織化学を用いて検討を追加した

（３）陰茎癌におけるＨＰＶ感染との関連性についての検討

膀胱腫瘍におけるＨＰＶ感染の関与についての調査と同様の手法を用いて調査を実施した。

４．研究成果

(1) 子宮頚癌検診で汎用されている液状細胞診を、尿検体に応用することにより、HPV-PCRと同時に尿細胞診が可能であり、HPV陽性検体において、HPV感染関連細胞異常が認められる検体が存在することがわかった。さらに一部の症例ではin situ hybridization法で尿路上皮細胞にHPV感染が生じていることを突き止めた。

(2)女性膀胱腫瘍84例中5例（6.0%）からHPV

が検出された。その5例について、in situ hybridization法を用いて、腫瘍組織内のHPV-DNAの分布を観察したところ、確実に組織内にHPV感染が生じていることがわかった。また、感染したHPVが腫瘍発生に関与しているか否かについて、HPVの発癌蛋白の１つであるHPV-E7のバイオマーカーであるp16-INK4aおよびmcm-7の発現について免疫組織化学を用いて検討を追加した。HPV陽性例では、これらのマーカーの発現を強く認め、HPV陰性検体ではこれらのマーカーはほとんど発現していなかった。これらの結果は、感染したHPVが腫瘍の発生に関与していることを示唆し得るものと考えられた。さらに、HPV陽性5症例のうち、2例（40%）で子宮頸癌の既往があり、子宮頸癌組織と膀胱癌組織から検出されたHPV型が一致（ともにHPV16）していることがわかった。

(3) 陰茎癌17例を対象に、パラフィン包埋切片よりDNAを採取しPCR法にてHPV-DNAの検出を行い、HPV陽性症例についてはHPV型判定を行ったところ、17例中8例（47%）でHPV-DNAが検出され、すべて高リスク型HPV感染であった。HE染色の標本を詳細に検討すると正常亀頭粘膜、PIN(Penile Intraneoplasia)、癌が混在している症例は3例存在した。ISHでは、HPV陽性例において癌組織内に高リスク型HPV-DNAの存在を確認した。IHCではHPV陽性検体の6/8例（75%）でp16-INK4およびmcm-7の発現を認め、PINでは基底層中心に、癌ではび漫性に発現していた。PINと陰茎癌のIHCの染色パターンは女性の子宮頚部異型性（CIN）と子宮頚癌と類似しており、HPV陽性の陰茎癌は、PINを経て癌化するのではないかと考えられた。また、これらの蛋白はHPV陰性例では発現は弱く、IHCスコアはHPV陽性癌検体の方が有意に高く、陰茎癌の約半数はＨＰＶ感染が関連していることを分子細胞学的に証明した。

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７件）

1. Shigehara K, Kawaguchi S, Sasagawa T, 他 4 名. Etiological Correlation of Human Papillomavirus Infection in the development of Female Bladder Tumor. APMIS, 2013 (in press). (DOI; 10.1111/apm.12070)
2. 重原一慶, 並木幹夫. 陰茎癌の疫学と病因. 泌尿外科 2013(in press).
3. Kawaguchi S, Shigehara K, Sasagawa T, et 他 6 名. Liquid-based urine cytology as a tool for detection of human papillomavirus, Mycoplasma, and Ureaplasma in men. J Clin Microbiol 2012; **50**:401-6. (DOI; 10.1128/JCM.05219-11)
4. Kawaguchi S, Shigehara K, Sasagawa T, 他 8 名. A case study of human papillomavirus-associated bladder carcinoma developing after urethral condyloma acuminatum. Jap J Clin Oncol 2012; **42**: 455-8. (DOI; 10.1093/jjco/hys024)
5. 中嶋 一史, 重原 一慶, 川口 昌平, 他 7 名. 液状細胞診を用いた男性咽頭及び尿路のHPV感染率についての検討. 日本性感染症学会誌 2012; **23**: 101-107.
6. Shigehara K, Sasagawa T, Kawaguchi S, 他 7 名. Etiological role of human papillomavirus infection in bladder carcinoma. Cancer 2011; **117**: 2067-76. (DOI; 10.1002/cncr.25777)
7. 川口昌平, 重原一慶, 笹川寿之, 他 7 名. 前立腺癌と HPV 感染との関連性についての検討. 日性感染症学会誌 2011; **22**: 124-30.

〔学会発表〕（計 17 件）

1. 重原一慶. 陰茎癌における HPV 感染の関連性についての分子細胞学的・病理学的検討.

第24回日本性感染症学会、2012年12月8日、長良川国際会議場（岐阜市）
2. 中嶋一史、液状細胞診を用いた男性咽頭及び尿路のHPV感染率についての検討. 第24回日本性感染症学会、2012年12月8日、長良川国際会議場（岐阜市）
3. 中嶋一史. 日本人男性における尿路性器HPV感染率についての中間結果. 第24回日本性感染症学会、2012年12月8日、長良川国際会議場（岐阜市）
4. 川口昌平. 尿道尖圭コンジローマ治療後に発症したHPV感染の関与が疑われた膀胱癌の1例. 第24回日本性感染症学会、2012年12月8日、長良川国際会議場（岐阜市）
5. 重原一慶. 男性におけるHPV感染症. 第26回日本エイズ学会総会・日本性感染症学会合同シンポ、2012年11月25日、慶応大学日吉キャンパス、（東京都）
6. 中嶋一史. 男性咽頭及び尿路のHPV感染率についての検討. 第3回日本性感染症学会北陸支部学術集会、2012年10月27日、金沢市文化ホール、（金沢市）
7. 中嶋一史. 液状細胞診を用いた男性咽頭及び尿路のHPV感染率についての検討. 第20回北陸ウイルス研究会、2012年9月15日、金沢都ホテル、（金沢市）
8. 重原一慶. 男性におけるHPV感染症. 石川県泌尿器科医会、2012年7月26日、金沢都ホテル（金沢市）
9. 重原一慶. 男性におけるHPV感染症. 第35回大阪STI研究会、2012年6月30日、ホテル日航大阪（大阪市）
10. 中嶋一史. 液状細胞診を用いた男性咽頭及び尿路のHPV感染率についての検討. 第26回北陸泌尿BRM、2012年2月18日、ホテル金沢（金沢市）
11. 重原一慶. 陰茎癌におけるHPV感染の役割と発癌のメカニズムについての検討. 第21回日本泌尿器科分子細胞研究会、2012年2月10日、北海道大学医学部学友会館フラテ（札幌市）
12. 重原一慶：女性の膀胱腫瘍と子宮頚部病変の合併例におけるＨＰＶ感染症との関連性についての検討. 第23回日本性感染症学会、2011年12月3日、都市センターホテル、（東京都）
13. 川口昌平. Buschke-Lowenstein腫瘍の1例. 第24回日本性感染症学会、2011年12月3日、都市センターホテル、（東京都）
14. 中嶋一史. ＳＴＤ外来を受診した男性における咽頭及び尿路のHPV感染状況についての検討. 第24回日本性感染症学会、2011年12月3日、都市センターホテル、（東京都）
15. 重原一慶：Condylomatous Carcinomaの1例～HPV6発癌の分子細胞学的検討. 第19回北陸ウイルス研究会、2011年9月28日、金沢都ホテル（金沢市）
16. Shigehara K, : The Etiological Role of Human Papillomavirus in Bladder Carcinoma and Papilloma. 27th International HPV conference (Berlin) 17-22, September, 2011.
17. 重原一慶：ヒトピローマウイルス感染と泌尿器科疾患. 第99回日本泌尿器科学会総会. 未来講演６、2011年4月22日、名古屋国際会議場（名古屋市）

６．研究組織
(1)研究代表者
重原　一慶（SHIGEHARA KAZUYOSHI）
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：20595459