

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する

ゲノム医学からのアプローチ

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：吉浦孝一郎
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授

平成20年（2008）4月

目 次

I. 総括研究報告書

- ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する
ゲノム医学からのアプローチ
吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）……………1

II. 分担研究報告書

1. 患者試料収集態勢の整備、情報の整理統括 ……………12
研究分担者
増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）
中山大介（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）
三浦清徳（長崎大学医学部・歯学部附属病院・講師）
研究協力者
山崎健太郎（長崎大学医学部・歯学部附属病院・助教）
2. 患者試料の遺伝子型タイピング ……………20
研究分担者
吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）
木住野達也（長崎大学先端生命科学研究支援センター・
遺伝子実験施設・准教授）
近藤 新二（長崎大学先端生命科学研究支援センター・
遺伝子実験施設・助教）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………27

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……………31

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成19年度総括研究報告書

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関するゲノム医学からのアプローチ

主任研究者：吉浦孝一郎（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授）

研究要旨

本研究は、ヒト子宮頸癌の原因であるヒトパピローマウイルスの持続感染に関わる、宿主（ヒト）側の遺伝的要因を明らかにすることを第一の目的としている。また、目的達成のための試料収集時には、ヒト子宮頸癌患者および子宮頸癌検診での異型性状態で認められるヒトパピローマウイルス（HPV）の型を明らかにし、フォローアップすることによって、高リスク HPV の日本人における頻度を明らかにすることを第二の目的としている。

分担研究者

木住野 達也（長崎大学先導生命科学研究支援センター・遺伝子実験施設・准教授）
近藤 新二（長崎大学先導生命科学研究支援センター・遺伝子実験施設・助教）
増崎 英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科学・教授）
中山 大介（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科学・准教授）
三浦 清徳（長崎大学医学部・歯学部附属病院産科婦人科学・助教）

A. 研究目的

本研究の目標は、子宮頸癌の発症リスクを高めている宿主であるヒトの SNP の検索を行い、SNP タイピングによって子宮頸癌検診の効率を高めること、またワクチン投与に関し科学的な基盤情報を得ることを目的とする。これは先進国のなかで子宮がん検診率が低く、若年者の進行した子宮頸癌が増加している日本国の厚生医療に有益な情報をもたらす、本国の少子化対策の一環と位置づけられる。

子宮頸癌の発症は、ほとんど（> 95%）がヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染（HPV を体内から排除できない）によると考えられている。HPV 感染は、ほとんど全ての女性が経験するが、90%以上が自然治癒すると考えられているのである。ヒトの SNP の検索のためには、きちんと管理され情報がリンクされた試料の収集が絶対条件であり、研究初年度に当たる本年度は、産婦人科学教室との連携による試料収集システムの構築、

HPV 感染患者試料収集、HPV 型判定、とその傾向の解析を中心課題とした。

1. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) の頻度算出

子宮頸癌検診によって要精密検査とされた患者群からのスメアを採取し、細胞診と HPV 型判定を同時に行い、細胞診の結果と HPV 型を対比させ、異型度の進んだ患者群に認められる HPV 型頻度を算出し、「異型度が進んだ組織にみとめられる」という意味での高リスク HPV の頻度を算出する。本スクリーニングによる一般的 HPV の頻度を算出は、これまでに報告された「子宮頸癌に多くみられる」という意味での高リスク HPV が日本人においてどれくらい認められるかを確定させることができる。一般の日本人に認められる HPV 型頻度は、ワクチン作製の基礎データとなりうる。つまり、ワクチンの中身として HPV の型として何を使用すべきかの科学的根拠を与える。

HPV の型判定は、現在の日本の子宮頸癌検診システムの検討を考慮する必要があるため、塗抹法およびシンレイヤー法による細胞診を日母分類およびベセスダシステムを用いて判定し、HPV 型判定はアンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイプングキット (Roche ダイアグノスティック社) による HPV タイピングを採用することとした。細胞診でクラス IIIa 以上と判定された症例にはコルポスコピー検査を行い組織診が行われた。

2. 子宮頸癌の発症リスクを高めている宿主であるヒトの SNP の検索

HPV の分類は子宮頸癌試料から分離される頻度が高いか低いかによって、高リスク群と低リスク群に分類されるが、実際の子宮頸癌試料からは高リスク群も低リスク群も分類される。病因である HPV 側だけから子宮頸癌発症を考察することは、宿主と病因を考慮すべき場合に、病因のみの側面しか解明できない。持続感染 (HPV を体内から排除できない) 者には、持続感染に至る宿主側の因子が存在するのではないかと考え、患者対照試験により一塩基置換多型 (SNP) を用いた全ゲノムスキャン (GWAS) によってその規定因子を探索する。

収集された持続感染群 (患者) と HPV 排除群 (対照) の DNA を用いて、全ゲノム SNP タイピングを完成させ、患者対照試験を行う。1) 本サンプリング法は、エクストリームサンプリング法であること 2) 遺伝的背景が均一な集団が収集できることにより、全ゲノムスキャン (GWAS) SNP-関連解析法としては比較的少数 (100 患者 vs 100 対照) による試験で到達できると期待される。しかも、子宮頸癌に HPV の持続感染が関与していることは、ほぼ 100% であるから、宿主要因が存在すれば、確実に明らかにすることが出来る。

本研究は、以上のような目的を達成させることにより、実際に HPV 感染の治癒過程と HPV の型との関連、日本人における高リスク HPV 型の一般感染頻度が得られワクチンとしてターゲットにする HPV 型の情報、持続感染群を規定する SNP の同定によりワクチン投与対照群を明らかにできるなど今後の厚生行政に生かす貴重なデータを提供できる。

B. 研究方法

1. 試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集

最終目標達成に向けて、最も力を注ぐべき点であり、産婦人科学教室および関連病院の協力無くしては、本研究は成り立たないので試料収集システムの構築を目指した。細胞診、組織診の病理診断と関連づけながら収集するシステムティックな収集態勢の構築をめざし、血液試料の収集のみならず、現在の子宮頸癌検診システムの検討も兼ねるように考慮することとした。

なお、本研究の試料収集は、長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、およびそれぞれの病院の倫理委員会の承認を得て開始されており、全ての試料について書面にてインフォームドコンセントをえている。遺伝子解析の倫理上の問題は、生じないように手続きを行い研究を開始した。

2. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) の頻度算出

HPV の型判定は、アンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイプングキット (Roche ダイアグノスティック社) を採用することとし、細胞診による異型度と HPV の型頻度との対応、あるいは組織診と HPV の型頻度との対応を行った。

3. Affymetrix 社製 GeneChip システムによるジェノタイプング

文部科学省 21 世紀 COE プログラムによって購入された Affymetrix 社の GeneChip システムを使用して全ゲノム

SNP タイピングを行う。Human Mapping 500k (250K + 250K) セットもしくはさらに高密度の Genome-Wide Human SNP 5.0 Array または 6.0 アレイを購入してタイピングする。

C. 研究結果

1. 試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集

1) 試料収集システムの構築

長崎大学産科婦人科教室関連病院の協力を仰いで、子宮頸部スメアの収集態勢を整えた。長崎大学医学部・歯学部附属病院、長崎市民病院、日本赤十字社長崎原爆病院、佐世保市立総合病院の 4 箇所試料収集を行うこととした。収集対象者は、主に検診に於いて子宮頸部異型性を指摘された群、妊婦、また持続感染者と見なせる子宮頸癌発症者 (手術後の患者も含む) の 3 群である。子宮頸部異型性を指摘された群は、フォローアップすることによって HPV の消失を確認できる群である。妊婦は、いわゆる長崎の一般女性集団における HPV の頻度算定が可能であるので、子宮頸部異型性を指摘された群に認められる HPV の型と比較するための基本データとして非常に重要である。実際の HPV 型判定は、シンレイヤ法による細胞診も含めてエスアールエル (SRL) と共同して行っている。

2) HPV 感染患者試料収集

システム構築に数ヶ月を要し、平成 19 年 9 月から実際の収集作業が始まった。平成 19 年 12 月 20 日までに延べ 211 例の症例を収集しており、一ヶ月平均 50

例の症例収集を行っている。臨床病名による内訳は、軽度異型性 30%、中等度異型性 9%、高度異型性 18%、上皮内癌 8%、子宮頸癌 9%、その他 14%、スクリーニング 1%であった。細胞診結果による内訳は、クラス I:3%、クラス II:37%、クラス III:6%、クラス IIIa:30%、クラス IIIb:13%、クラス IV:4%、クラス V:6%であった。

2. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) の頻度算出

扁平上皮癌 15 例における HPV 型は、16 型:2 例、18 型:3 例、45 型:1 例、52 型:5 例、58 型:2 例、59 型:2 例、感染なし:1 例であった(延べ数が 16 例となっているのは、58 型と 59 型の混合感染が 1 名いるため)。腺癌 2 例は、1 例が上皮内の腺由来で HPV:18 型、1 例が子宮内膜由来で HPV:陰性であった。

妊婦 22 例における HPV 感染頻度は、非感染者が 14 例で感染者が 8 例であった。6 型:1 名、18 型:2 名、52 型:3 名、他に 1 名:16+33 混合感染、1 名:33+56+CP6108 混合感染であった。

3 ヶ月後に再検査できた 17 例について、感染 HPV 型が変化したかどうかを検討してみると 4 例において HPV 感染の完全消失や複数感染中で一部の型の消失が認められた。

平成 19 年 12 月 20 日までに収集できた全症例において HPV 感染の型を数えると、最も多いのが 16 型、次に 52 型、次に 18 型と 58 型が同数となっている。

3. 子宮がん検診におけるベセスダシステムの有用性-日母分類との比較から-

今年度の研究結果から、HPV タイピングとベセスダシステムを用いた細胞診で軽度から中等度異形成の症例を全例検出することが可能であった。

3. Affymetrix 社製 GeneChip システムによるジェノタイピング

Human Mapping 500k (250K + 250K) セットの中の NspI 250K アレイとさらに高密度の Genome-Wide Human SNP 5.0 Array の比較検討を行った。技術的な操作は、ほとんど全く同じであり、やはり高密度の SNP 5.0 Array が優れている。現状では、購入コストも SNP 5.0 Array に分がある。

HPV の感染に関する全ゲノム SNP タイピングは、SNP 5.0 Array の使用法が 48 試料一度に処理するプロトコルを採用しており、実試料の収集実績から来年度の課題としている。

D. 考察

本研究課題の目標である「ヒトパピローマウイルス持続感染制御にかかわる SNP もしくは CNV 探索」においては、試料収集が律速段階であり、最も重要視される点である。本年度は、試料収集システム (HPV タイピングシステム、細胞診システムを含めた) の構築と収集開始に重きをおいた。九月から順調に試料収集が行われており、目標達成のために確実に進行している。

子宮頸癌患者と一般女性の比較であれ

ば、試料収集に時間を費やし HPV の型判定も必要ないと考えられるが、HPV の型判定・細胞診との関連・組織診との関連・高度異型性と HPV 型との日本での関連など、日本で収集すべき HPV 関連研究データを全て解析可能な研究デザインとして進行させている。

HPV 感染消失群は一般女性がほとんどこの部類に入ると思われるので、収集に関しては異型性フォローアップ者の中での消失群を捉えるのではなくとも、一般女性で代用できると考えられこちらの群の収集は順調である。しかし、持続感染群として収集する子宮頸癌（術後も含めて）患者が収集例の 9%であることを考えると、月平均 5 名を収集していることになる。子宮頸癌 100 人収集のためには、20 ヶ月が必要である。平成 20 年 8 月までには、50 例は収集可能で、最終年度である平成 21 年 8 月までには目標の 100 例の収集が達成可能である。特に子宮頸癌発症者に関しては、長崎周辺の多くの病院の協力を仰いで、収集を急がなければならないし、またその予定である。

日本人の HPV 感染における HPV 型分類において、本年度の研究のみからでも興味ある結果を示している。まず、検出された全 HPV 型頻度において 52 型と 58 型（いずれも頸癌発症の高リスク群と考えられている）の割合が高く、16 型・18 型の割合が約 45%、52 型・58 型が約 35%程度である。扁平上皮癌に限ってみれば 16 型・18 型の割合が約 45%、52 型・58 型が約 50%と、むしろ 52 型・58 型の方が多い。これは、いわゆる欧米で高リスク感染頻度では 80%とも考えられる 16 型・18 型の

割合に比べて、かなり日本人特異的であることが分かる。

今後、本邦における子宮がん検診でもベセスダシステムの導入が普及していくと予想されるが、本研究を継続することでその安全性と有益性が確認されるものと考えられる。さらに本研究は、日本版の HPV タイピングを併用した子宮がん検診システムの構築、子宮がん予防対策としてのワクチン開発および接種システムの構築につながり、日本国における少子化対策および国民の健康福祉に有用な情報がもたらされる。

論文発表・学会発表では、関連解析シミュレーションにおいて NspI 250K アレイでは SNP の数が充分でなく、SNP 5.0 Array を使用することで SNP による関連解析は充分であろうと考えられ、SNP 6.0 は SNP に関する限りは SNP 5.0 と比較して劇的な改善は望めないと考えられている。SNP 6.0 の有利な点は、copy number variation (CNV, コピー数多型) 部位の検出において優れていると思われるが、患者・コントロールの比較といった試料数を多くジェノタイピングすること、試料収集時のコストなどを勘案すると SNP 5.0 を使用したジェノタイピングを行う。

E. 結論

ヒトパピローマウイルス持続感染制御にかかわる SNP もしくは CNV 探索に向けて研究が立ち上がり、目標に向けて試料収集が順調に進んでいる。SNP アレイの活用についても、技術的な側面、コスト面からも使用するアレイが絞り込まれ、次年度でのタイピングに向けて順調に進

んでいる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, Soejima H, Ohta T, Masuzaki H, Kinoshita A, Urano T, Yoshiura K, Matsumoto N, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Role of DNA methylation and histone H3 lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse Grb10. *Mol Cell Biol.* 27(2): 732-742, 2007.
2. Sato D, Shimokawa O, Harada N, Olsen OE, Hou JW, Muhlbauer W, Blinkenberg E, Okamoto N, Kinoshita A, Matsumoto N, Kondo S, Kishino T, Miwa N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. Congenital arhinia: Molecular-genetic analysis of five patients. *Am J Med Genet A.* 143(6): 546-552, 2007.
3. Miura K, Yoshiura K, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H. A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. *Hum Genet.* 121 (5): 631-633, 2007.
4. Kikuchi T, Nomura M, Tomita H, Harada N, Kanai K, Konishi T, Yasuda A, Matsuura M, Kato N, Yoshiura K, Niikawa N. Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC): confirmation of linkage to 16p11-q21, but unsuccessful detection of mutations among 157 genes at the PKC-critical region in seven PKC families. *J Hum Genet.* 52(4): 334-341, 2007.
5. Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura K, Shimada T, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H. Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. *Clin Chem.* 53(6): 1167-1168, 2007.
6. Sato D, Liang D, Wu L, Pan Q, Xia K, Dai H, Wang H, Nishimura G, Yoshiura K, Xia J, Niikawa N. A syndactyly type IV locus maps to 7q36. *J Hum Genet.* 52(6): 561-564, 2007.
7. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M, Ishikawa T. Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry.* 46(26): 7678-7693, 2007.
8. Dateki S, Kondoh T, Nishimura G, Motomura K, Yoshiura K, Kinoshita A, Kuniba H, Koga Y, Moriuchi H. A Japanese patient with a mild Lenz-Majewski syndrome. *J Hum Genet.* 52(8): 686-689, 2007.

9. Shiels A, Bennett TM, Knopf HL, Yamada K, Yoshiura K, Niikawa N, Shim S, Hanson PI. CHMP4B, a novel gene for autosomal dominant cataracts linked to chromosome 20q. *Am J Hum Genet.* 81(3): 596-606, 2007.
10. Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Owan I, Kanaya F, Kubota Y, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Bohring A, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K. Mutations in CD96, a member of the immunoglobulin superfamily, cause a form of the C (Opitz trigonocephaly) syndrome. *Am J Hum Genet.* 81(4): 835-841, 2007
11. Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K. Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. *J Periodontal Res.* 42(6): 541-545, 2007.
12. Nakayama D, Masuzaki H, Miura K, Hiraki K, Yoshimura S, Ishimaru T. Effect of placenta previa on blood loss in second-trimester abortion by labor induction using gemeprost. *Contraception.* 75: 238-240. 2007.
13. Shimada T, Miyashita M, Miura S, Nakayama D, Miura K, Fukuda M, Masuzaki H. Genital human papilloma virus infection in mentally-institutionalized virgins. *Gynecologic Oncology* 106: 488-489. 2007.
14. Tanigawa T, Nakayama D, Miura K, Miura S, Shimada T, Masuzaki H. Prenatal ultrasonographic findings may be useful in predicting the prognosis of trisomy 18. *Prenat Diagn.* 27: 1039-1044. 2007.
15. 吉田至剛、三浦清徳、中山大介、増崎英明：特集 第 58 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会/Nuchal translucency の臨床的意義および問題点とその対応 産婦人科の実際 56 巻 第 5 号 781-785, 2007
16. 三浦清徳、増崎英明：画像で見る産科学/多胎妊娠における膜性診断の役割 ペリネイタルケア 26 巻 9 号 862-865, 2007
17. 三浦清徳：(5) 双胎形成のメカニズムとその異常に関する分子遺伝学的検討 日本産科婦人科学会雑誌 第 59 巻 第 10 号 1814-1825, 2007
18. 三浦清徳、増崎英明、石丸忠之：母体血中に流入する胎盤由来 cell-free DNA/mRNA の臨床応用 臨床検査 51 巻 13 号 1691-1697, 2007

2. 学会発表

The international symposium in the 7th Annual Meeting of the East Asian union of Human Genetic Society, Dec 7-8, Changsha, China, 2007

Identification of the earwax gene, *ABCC11*, and its function. Yoshiura K.

The American Society of Human Genetics, 57th Annual Meeting

San Diego, California, October 23-27, 2007

536/T: Origin and mechanisms of formation of Fwtus-infetu: Two cases with genotype and methylation analysis. Miura S, Miura K, Yoshiura K, Hirahara F, Yamanaka M, Niikawa N, Masuzaki H.

540/T: Deficiency of a member of the immunoglobulin superfamily causes a form of C (Opitz trigonocephaly) syndrome. Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Owan I, Kanaya F, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K.

1272/F: Novel CHMP4B mutations underlie autosomal dominant cataracts linked to chromosome 20q. Shiels A, Bennett TM, Knopf HLS, Yamada K, Yoshiura K, Niikawa N, Shim S, Hanson PI.

2419/T: Circulation cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. Miura K, Yoshiura K, Miura S, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H.

2524/W: Search for genomic alterations in monozygotic twins discordant for cleft lip and palate. Kimani JW, Yoshiura K, Murray JC.

The 14th World Congress on Gestational Trophoblastic Diseases, 2007/11/11-14

FUKUOKA, JAPAN

Clinical applications of hCG-mRNA quantification in choriocarcinoma. Yamasaki K, Miura K, Miura S, Moriyama S, Gunjigake H, Masuzaki H.

第 59 回日本産科婦人科学会総会、2007/4/14-17、京都

シンポジウム 2 : 多胎妊娠の予防と管理
双胎形成のメカニズムとその異常に関する分子遺伝学的検討. 三浦清徳

胎児内胎児の発生メカニズムに関する検討. 三浦生子、三浦清徳、山中美智子、平原史樹、新川詔夫、増崎英明

耳垢タイプは母乳分泌量に相関するの
か? 嶋田貴子、三浦清徳、三浦生子、
吉田敦、谷川輝美、北島百合子、中山
大介、増崎英明

妊娠高血圧症候群の重症化を予測する因子に関する検討. 吉田敦、北島百合子、谷川輝美、三浦清徳、中山大介、増崎英明

第 80 回日本超音波医学会 学術集会、2007/5/18-20、鹿児島

前置胎盤における超音波検査と母体血漿中 mRNA 定量化の有用性. 三浦清徳、三浦生子、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、宮本正史、吉村秀一郎、増崎雅子、増崎英明

表現型の異なる双胎例の超音波所見とその発生機序に関する考察. 山崎健太郎、

三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、吉田敦、宮本正史、増崎雅子、吉村秀一郎、中山大介、増崎英明

出生前に認められた胎児卵巣嚢胞の転帰に関する検討。嶋田貴子、三浦清徳、後藤英夫、大畠雅之、中山大介、増崎英明

子宮筋腫合併妊娠の超音波所見と臨床所見との関連について。北島百合子、三浦清徳、吉田敦、三浦生子、宮本正史、増崎雅子、吉村秀一郎、中山大介、増崎英明

癒着胎盤における子宮温存手術。中山大介、三浦清徳、藤本洋子、嶋田貴子、梅崎靖、増崎英明

プロテインS欠乏症が疑われた妊娠中の深部静脈血栓症の2症例。谷川輝美、中山大介、三浦清徳、吉田敦、増崎雅子、宮本正史、北島道夫、嶋田貴子、増崎英明

無心体双胎の出生前超音波所見について。松本加奈子、吉田敦、三浦清徳、中山大介、増崎英明

パネルディスカッション：癒着胎盤の術前診断は可能か？吉田敦、谷川輝美、三浦生子、宮本正史、増崎雅子、福田久信、吉村秀一郎、三浦清徳、中山大介、増崎英明

第 43 回日本周産期・新生児医学会、平成 19 年 7 月 8 日(日)～10 日(火)、東京

Duchenne 型筋ジストロフィーの出生前診断における当科のストラテジー。三浦清徳、三浦生子、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

母体血漿中に流入する胎盤由来 mRNA の同定とその臨床的意義。三浦生子、三浦清徳、山崎健太郎、嶋田貴子、平木宏一、中山大介、増崎英明

症例報告：前置胎盤および癒着胎盤合併の妊娠中期中絶。中山大介、吉村秀一郎、三浦清徳、吉田敦、増崎英明

癒着胎盤の術前診断に関する検討。吉田敦、三浦生子、三浦清徳、平木宏一、中山大介、増崎英明

当院における常位胎盤早期剥離についての検討。谷川輝美、中山大介、吉田敦、三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、増崎英明

TTTS を発症しなかった discordant twins の検討。山崎健太郎、三浦清徳、吉田敦、平木宏一、中山大介、増崎英明

第 52 回日本人類遺伝学会 2007 年 9 月 12 日(水)～15 日(土)、東京。

教育講演：耳垢遺伝子を通して考える人類遺伝学研究。吉浦孝一郎

シンポジウム：周産期遺伝学の現状と展望 周産期医療における胎児・胎盤由来

cell-free DNA/mRNA の臨床的意義とその応用. 三浦清徳

山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、吉浦孝一郎、嶋田貴子、中山大介、増崎雅子、新川詔夫、増崎英明. 双胎間輸血症候群の発症予知に関する検討—cell-free placental mRNA の分子マーカーとしての可能性.

三浦清徳、吉浦孝一郎、山崎健太郎、嶋田貴子、平木宏一、吉田敦、谷川輝美、北島百合子、増崎雅子、中山大介、新川詔夫、増崎英明. 母胎血漿中で定量可能な胎盤由来 cell-free mRNA の同定に関する検討.

中島光子、新川詔夫、吉浦孝一郎. 爪から抽出した genomic DNA を用いた多型解析: 血液サンプルとの比較.

国場英雄、霜川修、Liag Desheng、Xia Jiahui、木下晃、吉浦孝一郎、原田直樹、近藤達郎、大橋博文、黒澤健司、福島義光、成富研二、新川詔夫. 歌舞伎メーカーシップ症候群の染色体転座・微細欠失内の候補遺伝子解析.

佐々木健作、霜川修、川良洋城、国場英雄、近藤達郎、夫律子、本多啓輔、松本直通、吉浦孝一郎、新川詔夫、原田直樹. 未培養羊水の全ゲノム増幅による出生前診断の試み.

霜川修、夫律子、副島英伸、佐々木健作、近藤達郎、松本直通、吉浦孝一郎、新川詔夫、原田直樹. 母由来重複に起因する 11p15 部分トリソミーの 1 例.

柳久美子、要匡、知念安紹、蒔田芳男、岡本伸彦、前原博樹、久保田義顕、尾池雄一、山本俊至、黒澤健司、福島義

光、Axel Bohring、John Opitz M、吉浦孝一郎、新川詔夫、成富研二. C 症候群の原因遺伝子.

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月11日(火)～15日(土)、パシフィコ横浜、ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル

染色体転座切断点解析による Opitz 三角頭蓋症候群の原因同定と病態解析. 要匡、柳久美子、知念安紹、蒔田芳男、前原博樹、岡本伸彦、山本俊至、黒澤健司、福島義光、J.M. Opitz、吉浦孝一郎、新川詔夫、成富研二

第14回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会、2007/10/21、久留米・久留米大学 筑水会館

出生前に胎児洞性徐脈と診断された一例. 黒田葵、三浦清徳、山崎健太郎、藤本洋子、中山大介、増崎英明

Nuchal translucency の臨床的意義 —当科における検討から—. 吉田至剛、三浦清徳、山崎健太郎、三浦生子、嶋田貴子、中山大介、増崎英明

Duchenne 型筋ジストロフィー保因者の出生前診断における工夫. 山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、藤本洋子、池田光、中山大介、増崎英明

第52回日本生殖医学会総会、2007/10/25-26、秋田

Kallmann syndrome と Fibroblast Growth
Factor Receptor 1 (FGFR-1) の遺伝子構
造に関する検討. 三浦清徳、三浦生子、
山崎健太郎、増崎英明

**第 228 回日本産科婦人科学会長崎地方
会・日本産婦人科医会長崎県支部会、
2007/12/9**

母体血漿中へ流入する胎盤特異的 mRNA
の同定とその臨床的意義. 三浦清徳、
山崎健太郎、三浦生子、増崎英明

H. 指摘財産権の出願・登録状況

整理番号：P07-0229

提出日：平成19年12月14日

国際出願番号：PCT/JP2006/312673

**名称：耳垢型又は腋下臭症の評価方法
発明者**

**住所：長崎県長崎市文教町1番14号
国立大学法人長崎大学内**

氏名：新川詔夫

氏名：吉浦孝一郎

出願番号：特願2007-106595

出願日：平成19年4月13日

**名称：胎盤機能の網羅的かつ非侵襲的評
価方法および検査用試薬**

発明者

**住所：長崎県長崎市文教町1番14号
国立大学法人長崎大学内**

氏名：三浦清徳

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
平成19年度分担研究報告書

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する
ゲノム医学からのアプローチ

研究項目：患者試料収集態勢の整備、情報の整理統括

分担研究者：増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）
中山大介（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）
三浦清徳（長崎大学医学部・歯学部附属病院・講師）
研究協力者：山崎健太郎（長崎大学医学部・歯学部附属病院・助教）

研究要旨

本研究は、ヒト子宮頸癌の原因であるヒトパピローマウイルスの持続感染に関わる、宿主（ヒト）側の遺伝的要因を明らかにすることを第一の目的としている。目的達成のための試料収集態勢を構築し、ヒトパピローマウイルス（HPV）の型を明らかにして情報管理態勢の整備を目指す。

A. 研究目的

研究の目標は、子宮頸癌の発症リスクを高めている宿主であるヒトの SNP の検索を行い、SNP タイピングによって子宮頸癌検診の効率を高めること、またワクチン投与に関し科学的な基盤情報を得ることである。これは先進国のなかで子宮がん検診率が低く、若年者の進行した子宮頸癌が増加している日本国の厚生医療に有益な情報をもたらす、本国の少子化対策の一環と位置づけられる。研究グループは、1) 我々産婦人科学教室からなる臨床グループ：患者試料収集・HPV 型頻度疫学調査 2) 基礎系研究者からなるヒトの SNP 検索グループからなってい

る。研究初年度に当たる本年度は、我々臨床グループが試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集を行った。

B. 研究方法

1. 試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集

産婦人科学教室および関連病院の協力無くしては、本研究は成り立たないので予算執行時の平成19年6月から、試料収集システムの構築を目指した。新しく研究をスタートするにあたり、日本の子宮頸癌・HPV 研究に必要な種々の情報が得られるように、これまでの収集法とは異なった全く新

しい試料収集システムの構築を目指した。細胞診、組織診の病理診断と関連づけながら収集するシステムティックな収集態勢の構築をめざし、血液試料の収集のみならず、現在の子宮頸癌検診システムの検討も兼ねるように考慮した。

2. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) の頻度算出

HPV の型判定は、現在の日本の子宮頸癌検診システムの検討を考慮する必要があるため、塗抹法およびシフレイヤー法による細胞診を日母分類およびベセスダシステムを用いて判定し、HPV 型判定はアンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイプングキット (Roche ダイアグノスティック社) による HPV タイピングを採用することとした。細胞診でクラス IIIa 以上と判定された症例にはコルポスコピー検査を行い組織診が行われた。

C. 研究結果

1. 試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集

1) 試料収集システムの構築

長崎県における子宮がん検診および治療の大部分を網羅しうるように長崎大学病院群の産婦人科と連携し、子宮頸部スメアの収集態勢を整えた。長崎県は住民の出入りが都市部と比較して少ないという地域性から、この体制によってヒトパピローマウイルスの感染の有無を長期にわたり追跡可能である。長崎大学医学部・歯学部

附属病院、長崎市民病院、日本赤十字社長崎原爆病院、佐世保市立総合病院の4箇所ですり試料収集を行うこととした。収集対象者は、主に検診に於いて子宮頸部異型性を指摘された群、妊婦、また持続感染者と見なせる子宮頸癌発症者 (手術後の患者も含む) の3群である妊婦は、いわゆる長崎の一般女性集団における HPV の頻度算定が可能であるので、子宮頸部異型性を指摘された群に認められる HPV の型と比較するための基本データとして非常に重要である。実際の HPV 型判定は、シフレイヤー法による細胞診も含めてエスアールエル (SRL) と共同して行っている。

なお、本研究の試料収集は、長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、およびそれぞれの病院の倫理委員会の承認を得て開始されており、全ての試料について書面にてインフォームドコンセントを得ている。遺伝子解析の倫理上の問題は、生じないように手続きを行い研究を開始した。

2) HPV 感染患者試料収集

システム構築に3ヶ月を要し、平成19年9月から実際の収集作業が始まった。平成19年12月20日までに延べ211例の症例を収集しており、一ヶ月平均50例の症例収集を行っている。臨床病名による内訳は、軽度異型性30%、中等度異型性9%、高度異型性18%、上皮内癌8%、子宮頸癌9%、その他14%、スクリーニング1%であった。

細胞診結果による内訳は、クラス I : 3%、クラス II : 37%、クラス III : 6%、クラス IIIa : 30%、クラス IIIb : 13%、クラス IV : 4%、クラス V : 6%であった。

2. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) の頻度算出

扁平上皮癌 15 例における HPV 型は、16 型 : 2 例、18 型 : 3 例、45 型 : 1 例、52 型 : 5 例、58 型 : 2 例、59 型 : 2 例、感染なし : 1 例であった (延べ数が 16 例となっているのは、58 型と 59 型の混合感染が 1 名いるため)。腺癌 2 例は、1 例が上皮内の腺由来で HPV : 18 型、1 例が子宮内膜由来で HPV : 陰性であった。

妊婦 22 例における HPV 感染頻度は、非感染者が 14 例で感染者が 8 例であった。6 型 : 1 名、18 型 : 2 名、52 型 : 3 名、で他に 1 名 : 16+33 混合感染、1 名 : 33+56+CP6108 混合感染であった。

3 ヶ月後に再検査できた 17 例について、感染 HPV 型が変化したかどうかを検討してみると 4 例において HPV 感染の完全消失や一部の HPV 感染の消失が認められた。

平成 19 年 12 月 20 日までに収集できた全症例において HPV 感染の型を数えると、最も多いのが 16 型、次に 52 型、次に 18 型と 58 型が同数となっている。

3. 子宮がん検診におけるベセスダシステムの有用性-日母分類との比較から-

今年度の研究結果からは、HPV タイピングとベセスダシステムを用いた細胞診によって軽度から中等度異形成の症例を全例検出することが可能であった。

D. 考察

本研究課題の目標である「ヒトパピローマウイルス持続感染制御にかかわる SNP もしくは CNV 探索」においては、試料収集が律速段階であり、最も重要視される点である。本年度は、試料収集システム (HPV タイピングシステム、細胞診システムを含めた) の構築と収集開始に重きをおいた。九月から順調に試料収集が行われており、目標達成のために確実に進行している。

子宮頸癌患者と一般女性の比較であれば、試料収集に時間を費やし HPV の型判定も必要ないと考えられるが、HPV の型判定・細胞診との関連・組織診との関連・高度異型性と HPV 型との日本での関連など、日本で収集すべき HPV 関連研究データを全て解析可能な研究デザインとして進行させている。

日本人の HPV 感染における HPV 型分類において、本年度の研究のみからでも興味ある結果を示している。まず、検出された全 HPV 型頻度において 52 型と 58 型 (いずれも頸癌発症の高リスク群と考えられている) の割合が高く、16 型・18 型の割合が約 45%、52 型・58 型が約 35%程度である。扁平上皮癌に限ってみれば 16 型・18 型の割

合が約 45%、52 型・58 型が約 50%と、むしろ 52 型・58 型の方が多。これは、いわゆる欧米で高リスク感染頻度では 80%とも考えられる 16 型・18 型の割合に比べて、日本人においては日本人特有の型別頻度を呈していることが分かる。

今後、本邦における子宮がん検診でもベセスダシステムの導入が普及していくと予想されるが、本研究を継続することでその安全性と有益性が確認されるものと考えられる。さらに本研究は、日本版の HPV タイピングを併用した子宮がん検診システムの構築、子宮がん予防対策としてのワクチン開発および接種システムの構築につながり、日本国における少子化対策および国民の健康福祉に有用な情報をもたらされる。

E. 結論

ヒトパピローマウイルス持続感染

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama D, Masuzaki H, Miura K, Hiraki K, Yoshimura S, Ishimaru T. Effect of placenta previa on blood loss in second-trimester abortion by labor induction using gemeprost. *Contraception*. 75: 238-240. 2007.

2. Miura K, Yoshiura KI, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H. A strong association

制御にかかわる SNP もしくは CNV 探索に向けて研究が立ち上がり、目標に向けて試料収集が順調に進んでいる。収集は、軌道に乗っているため、一般女性における頻度算出などが行えるように収集対象を広げていく。また、子宮頸癌患者試料は、毎月約 5 例の収集スピードなので、長崎県内の関連施設のより一層の協力を仰いで、毎月 10 例の収集を目指して 100 例の子宮頸癌患者試料の収集を目標としていきたい。次年度には、基礎系グループの全ゲノムスキャンが完成できることを目標とする。

F. 健康危険情報

なし

between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. *Hum Genet*. 121: 631-633. 2007.

3. Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura KI, Shimada T, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H. Circulating Cell-Free Placental mRNA in the Maternal Plasma as a Predictive Marker for Twin-Twin Transfusion Syndrome. *Clin Chem* 53: 1167-1168. 2007.

4. Shimada T, Miyashita M, Miura S, Nakayama D, Miura K, Fukuda M,

Masuzaki H. Genital human papilloma virus infection in mentally-institutionalized virgins. *Gynecologic Oncology* 106: 488-489. 2007.

5. Tanigawa T, Nakayama D, Miura K, Miura S, Shimada T, Masuzaki H. Prenatal ultrasonographic findings may be useful in predicting the prognosis of trisomy 18. *Prenat Diagn.* 27: 1039-1044. 2007.

6. 吉田至剛、三浦清徳、中山大介、増崎英明：特集 第 58 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会/Nuchal translucency の臨床的意義および問題点とその対応 産婦人科の実際 56 巻 第 5 号 781-785, 2007

7. 三浦清徳、増崎英明：画像で見る産科学/多胎妊娠における膜性診断の役割 ペリネイタルケア 26 巻 9 号 862-865, 2007

8. 三浦清徳：(5) 双胎形成のメカニズムとその異常に関する分子遺伝学的検討 日本産科婦人科学会雑誌 第 59 巻 第 10 号 1814-1825、2007

9. 三浦清徳、増崎英明、石丸忠之：母体血中に流入する胎盤由来 cell-free DNA/mRNA の臨床応用 臨床検査 51 巻 13 号 1691-1697, 2007

2. 学会発表 国際学会

57th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 2007/10/23-27 San Diego, CA, USA

Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. Kiyonori Miura, Kentaro Yamasaki, Shoko Miura, Koh-ichiro Yoshiura, Takako Shimada, Daisuke Nakayama, Norio Niikawa, Hideaki Masuzaki

Origin and Mechanisms of Formation of Fetus-in-fetu: Two Cases with Genotype and Methylation Analyses. Shoko Miura, Kiyonori Miura, Koh-ichiro Yoshiura, Daisuke Nakayama, Michiko Yamanaka, Naomichi Matsumoto, Fumiki Hirahara, Norio Niikawa, Hideaki Masuzaki

The 14th World Congress on Gestational Trophoblastic Diseases, 2007/11/11-14 FUKUOKA, JAPAN

Clinical applications of hCG-mRNA quantification in choriocarcinoma Yamasaki K, Miura K, Miura S, Moriyama S, Gunjigake H, Masuzaki H

国内学会

第 59 回日本産科婦人科学会総会、2007/4/14-17、京都

シンポジウム 2：多胎妊娠の予防と管理

双胎形成のメカニズムとその異常に