

200907006A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：吉浦孝一郎  
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成22年（2010年）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・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 -----13

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 -----23

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・教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）

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（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----30

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----34

# 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成21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

研究代表者：吉浦孝一郎（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・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（HPV）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、ヒト子宮頸癌および子宮頸部異形成の例で認められる HPV の型を明らかにし、それらをフォローアップすることによって、日本人における高リスク HPV の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（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・薬物治療学・准教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・人類遺伝学・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・講師）

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ヒトの single nucleotide polymorphism (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の受診率が低く、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し、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と考えられているが、90%以上（あるいは、ほとんどすべて）が自然治癒すると考えられているのである。すなわち、子宮頸癌は HPV 感染を自然治癒できない集団からの発症するのであり、なぜ HPV 感染が持続感染する集団と HPV 感染が自然治癒する集団とに分かれるのかは明らかではない。このような事実の上で、HPV 感染が持続感染す

る集団をあらかじめ予測できる手段を明らかにできれば、子宮頸癌発症が予測可能となる。

今回の研究の最大目標は、HPV 感染が持続感染する集団と HPV 感染が自然治癒する集団を区別できる SNP を検索することである。しかも、HPV 感染と子宮頸癌発症の関連研究によるオッズ比は 100 を超えるものであり、目標とする“予測 SNP”は予測精度（感受性）が高く、予測特異度が高いものである可能性がある。いわゆる common disease（ありふれた病気）の関連研究からえられる関連 SNP とは異

なり、ほとんど HPV 持続感染を決定する単一遺伝子変化に近いものであると予想される。

ヒトの SNP の検索のためには、きちんと情報がリンク管理された試料の収集が絶対条件であり、研究初年度から 2 年目である本年度にかけて、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 型判定を行いつつ試料収集を行い、長崎県における HPV 感染の疫学的な調査もかねて研究を進めた。

## 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

長崎大学医学部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。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試料収集・管理システムを構築し、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と HPV のタイピング情報も加味したベセスダシステムと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 型判定は、アンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイピングキット（Roche ダイアグノスティック社）を採用し、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. GeneChip システムによるジェノタイピング

全ゲノム SNP ジェノタイピングは、Affymetrix 社製 GeneChip システムを用いて行った。Affymetrix 社により提示された手順に従い、48 試料を扱うプロトコールで行った。システムのスキャナーによりシグナル取得後に BirdSead によって、タイピングを行った。

収集した試料から組織診断によって最終的に子宮頸癌と診断された 209 例のジェノタイピングを行い、一般集団対照集団として東京大学人類遺伝学教室の徳永勝士教授から 184 例の Genome-Wide Human SNP 6.0 Array 解析例を対照群として用いた。

ジェノタイピング結果は plink により関連解析を行い、plink による解析結果は haploview により図式化した。plink 解析の対象 SNP 選択の設定は、対照集団にお

いてマイナーアレル頻度 (MAF: minor allele frequency > 0.05 , Hardy-Weinberg 平衡検定 p-値 (HWE) > 0.005, SNP call rate > 0.97 に設定した。

## 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

長崎大学医学部産科婦人科教室関連病院の協力で, 子宮頸部擦過細胞, 頸管粘液および血液試料の収集・管理システムを整えた。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, 長崎済生会病院, 田川市立病院の 6 箇所です料収集を行った。収集対象者は, 主として子宮がん検診で子宮頸部細胞診異常 (日母分類クラス IIIa 以上, ベセスダシステム LSIL 以上) を指摘されて研究開始時点でフォローアップされていた症例群と妊婦 (産後 1 か月まで) を対象とした。それらに精密検査としてコルポスコピー検査を施行し, 子宮頸部異形成を指摘された群, 妊婦群, そして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 群に分類した。子宮頸部異形成と診断された群は, フォローアップすることによって HPV 感染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

試料収集は, 長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て開始し, インフォームド・コンセントを書面で取得して研究を行った。

能であるので, 子宮頸部異形成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。平成平成 22 年 1 月 23 日までに延べ 1,315 例を収集し, 一ヶ月平均 50 例弱から試料収集を行っている。臨床病名による内訳は, 妊婦 (産後 1 か月まで) が 19%, 異形成が 59%, 上皮内癌 (治療後も含む) が 9%, 子宮頸癌 (扁平上皮癌, 治療後も含む) が 8%, その他の癌 (腺癌や子宮体癌を含む) が 3%, 病名不明が 3%であった (図 1)。

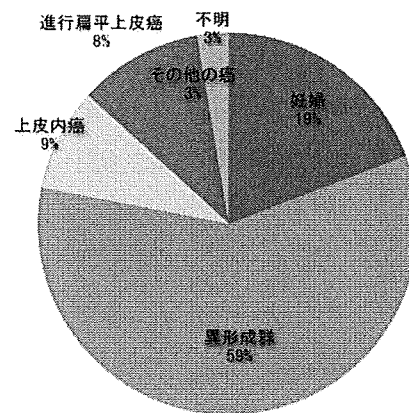


図1 臨床病名による内訳

## 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

延べ 1,315 例のうち、子宮頸部細胞診および HPV 型検査をうけた例が 813 例(重複は 1 とする)あり、そのうち妊婦が 144 人であった。妊婦 144 人中 HPV 感染を認めたものは 52 人 (36%) であり、その平均年齢は 29 歳であった。HPV 型の分布を図 2 に示す。妊婦においては HPV16 型 (10%) と 52 型 (10%) が同数で、最も多く検出された型であり、3 番目に HPV31 型 (6%)、以下 18 型、58 型と続く。妊婦が長崎の一般女性集団の HPV 型頻度を算定するのに適している理由としては、生殖年齢層のなかで、一定の sexual activity を見込む事ができる点である。本来の一般集団女性 HPV 感染の型別頻度 (陰性も含めて) の算出には、一般検診で受診する集団を対象とすべきであるが、本研究はそれをめざした研究計画ではないので、今回は妊婦集団で代用した。

一方、研究参加の最初の時点での子宮頸部細胞診で LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion) と判定された 130 人の HPV 型分布を図 3a に、HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion) と判定された 136 人の分布を図 3b に、SCC (Squamous cell carcinoma) と判定された 71 人の分布を図 3c に示す。LSIL 群の

HPV 感染陽性率は 95% (130 人中 123 人) で平均年齢は 37 歳、HSIL 群の HPV 感染陽性率は 99% (136 人中 135 人) で平均年齢は 41 歳、SCC 群では陽性率が 94% (77 人中 73 人) で平均年齢が 57 歳であった。胞診異常の 3 群における HPV の型分布は、LSIL 群においては妊婦群と似た傾向があり、HPV52 型が最も多く (11%)、次に 16 型 (10%)、56 型 (9%) と続く。しかし、HSIL 群と SCC 群では、型分布に違いが現れる。両群では上位 2 位の型は、HPV16 型、52 型と LSIL 群と変わりはないが、頻度は HSIL 群で 16 型が 29%、SCC 群では 39% と上昇し、52 型の頻度は HSIL 群で 15%、SCC 群で 11% と 16 型の頻度の 2 分の 1 以下となる。HSIL、SCC 群では 58 型も 52 型と同程度の頻度が見られ、病変進行に関わる重要な型であることが分かる。また、LSIL 群において 3 番目に多い型である HPV56 型の感染は HSIL 群と SCC 群ではほとんどみられなくなっている。最後に組織診で CIN3 以上 (高度異形成および上皮内癌、浸潤癌) と診断された症例の年齢を HPV16 型と 52 型別に図 4 に示す。HPV16 型では 20 代の症例もあり 30 代が発症の最頻ピークであるのに対して、HPV52 型では 40 代がピークで、70 代以上では HPV16 型より多く認められる。

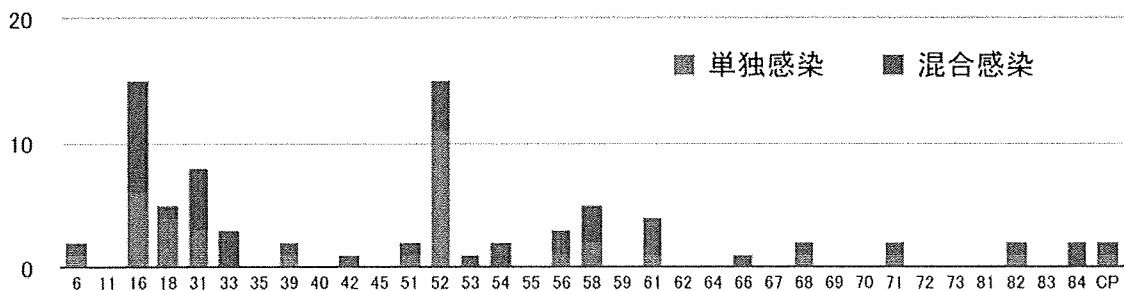


図2 妊婦初回検査時のHPV-DNA型分布

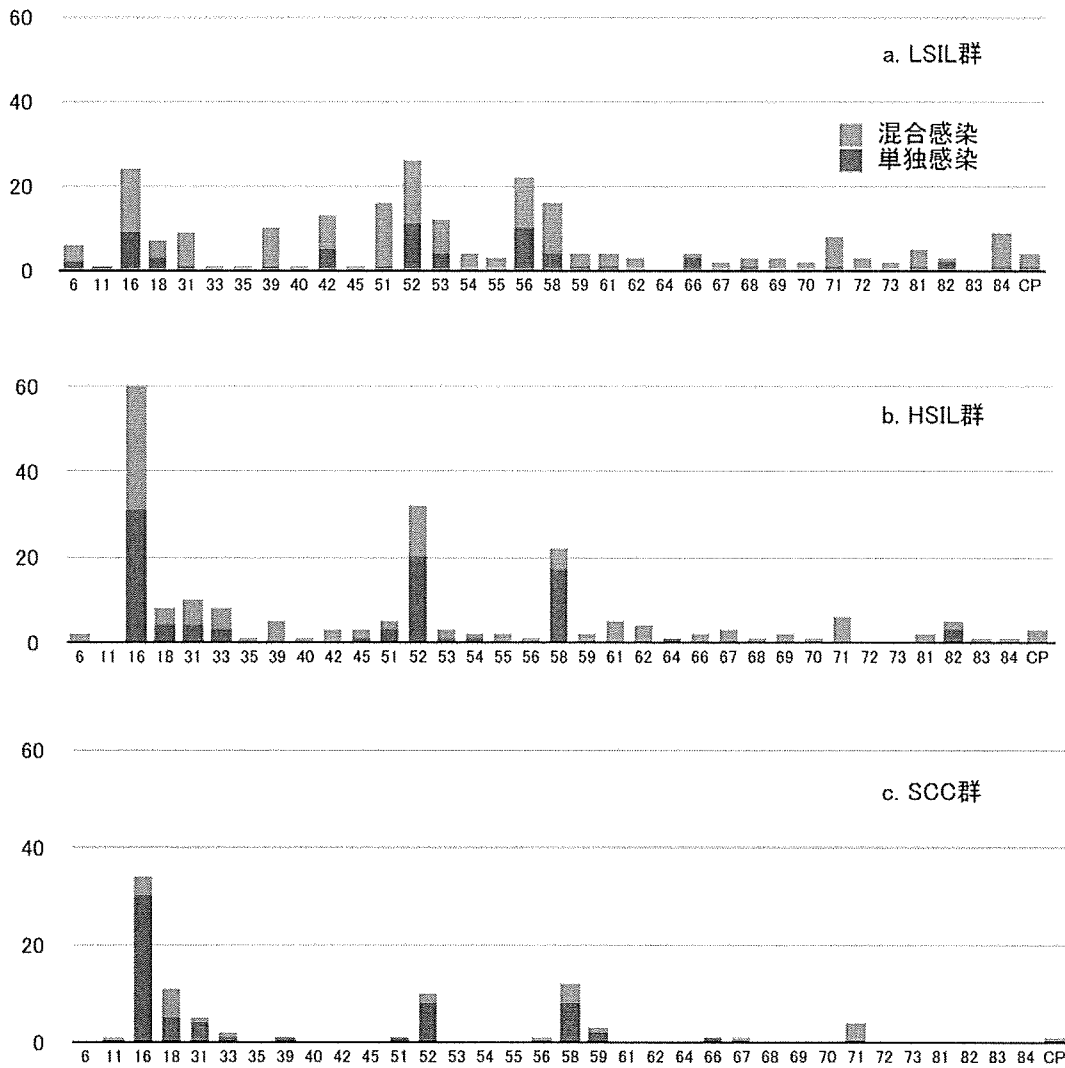


図3 a.LSIL群のHPV-DNA型分布、b.HSIL群の群のHPV-DNA型分布、c.SCC群のHPV-DNA型分布

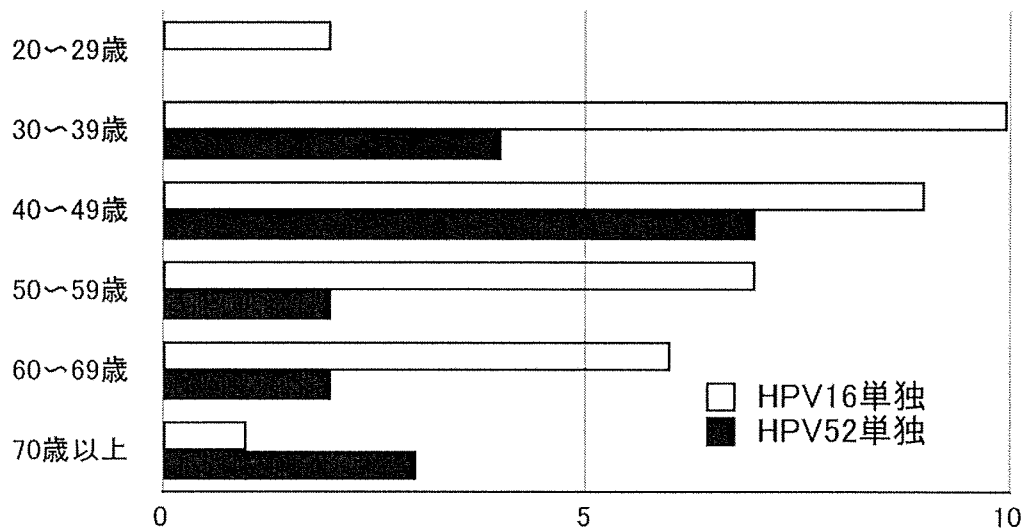


図4 CIN3以上におけるHPV16型感染例とHPV52型感染例の年齢分布



### 3. 長期フォローアップによる HPV 排除

細胞異形性を指摘されて受診し初回に HPV 感染陽性で、1年以上フォローアップした患者が62例ある。これらの患者の HPV 感染状況は、一年後に陽性であった例が51例(82%)、陰性となった例が11例(18%)であった。すなわち、HPVが消失した例は、一年後で18%である。一般に、HPV感染から一年後に HPV は、80%が消失するといわれているが、我々のデータは異なっている。

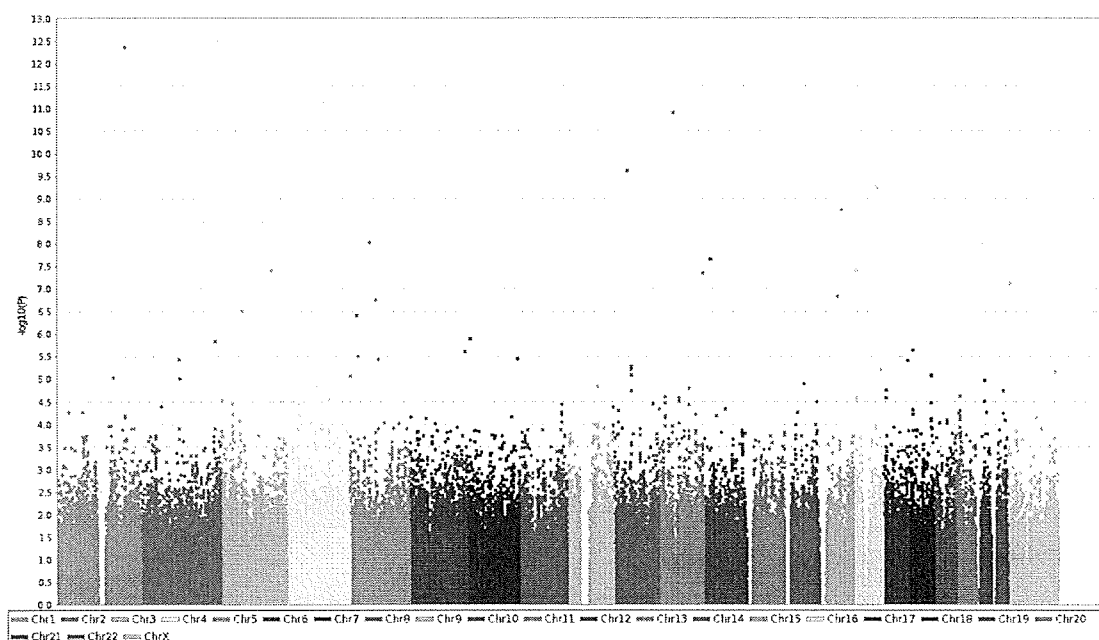
### 4. 関連解析

Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP 6.0 Array を使った全ゲノム SNP タイピングを行い、plink によって子宮頸癌209例と一般集団対照集団184例の比較関連解析を行い、結果は haploview により図式化した。

### 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」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。本年度までに頸癌確定症例(手術治療後も含め)を209例収集した。

2009年12月より日本でも発売された子宮頸癌予防ワクチンは、HPV16型と18型、2つの型を対象とした免疫抗体を獲得させるように設計されたものである。今回、長崎における HPV 型分布をみると、確かに HPV16型は子宮頸部細胞診判定で高度扁平上皮内病変を推定する HSIL 群や子宮頸癌を推定する SCC 群で最も多く認められる型(29~39%)であるが、18型(4~13%)の寄与は、HPV52型(11~15%)や58型(11%)と比べて小さい。HSIL 群と SCC 群をあわせると、HPV52型と58型に感染している割合は26%にのぼり、本邦で使用されている子宮頸癌予防ワク



チンでは、抗原に対する交差反応を考慮しても 3 割程度の子宮頸癌は予防できない。そのため、ワクチン発売後も子宮頸部細胞診の子宮頸癌予防意義は極めて重要である。また、今後の日本における子宮頸癌ワクチンの効果についても、16 型・18 型のみならず、52 型・58 型にも注意をはらった前向きのコホート研究が必要である。

HSIL および SCC において、HPV の単独感染が多くなり clonal な感染に至っている。このことは、おそらく体内から HPV の排除が出来ずに、最終的に HPV が残存し続けた結果であろうと思われる。つまり、子宮頸癌へいたる段階では、high risk group HPV の感染と HPV 体内排除機構のいずれもが関与していると考えられる。

HPV 型別の子宮頸部上皮のガンへの進行度は、異なることが図 4 から推察される。HPV16 型は、短い期間に進行し若くして頸癌まで進行する可能性があるのに対し、HPV52 型による病変の進行は、緩やかに進行するのであるであろう。

一年以上のフォローアップデータによると、HPV の消失は、18%にしか認められない。おそらく、我々のフォローした患者は、最初に細胞異形性を指摘された患者群であり、HPV 排除機構が弱い群である可能性が高い。一般集団でのフォローアップデータは、なかなか入手することは困難だが、少なくとも検診によって細胞異形性を指摘された患者は、自然治癒には時間がかかる可能性があることを念頭に置いて経過観察する必要がある。

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すものである。

大目標であった子宮頸癌になりやすい傾向があるかないかを決定する SNP の探索は、まだ、途中の段階である。最終年度である本年度までに、子宮頸癌発症患者 209 名を収集し、遺伝子型を決定して対照 184 名と比較した。まだ、1st screening が終了した段階であり、極端に低い P-値を示す SNP があるが、これらを確認しながら本当に関連した SNP の特定を進める。

## E. 結論

本邦における子宮がん検診において、今後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。

本邦で使用されている子宮頸癌予防ワクチンによって、HPV52 型の感染防御が可能か否かについては、今後大いに議論されまた、前向きコホート研究が必要である。

高リスク型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、目標に向けて試料収集が順調に進んだ。まだ、解析途中であるが、研究を完成させるべく進めていき

たい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takahata T, Yamada K, Yamada Y, Ono S, Kinoshita A, Matsuzaka T, Yoshiura KI, Kitaoka T. Novel mutations in the SIL1 gene in a Japanese pedigree with the Marinesco-Sjögren syndrome. *J Hum Genet.* 55(3): 142-146. 2010.
2. Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T, Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12. *J Hum Genet.* 55(2): 124-126. 2010.
3. Kimani JW, Yoshiura K, Shi M, Jugessur A, Moretti-Ferreira D, Christensen K, Murray JC. Search for Genomic Alterations in Monozygotic Twins Discordant for Cleft Lip and/or Palate. *Twin Res Hum Genet.* 12(5): 462-468. 2009.
4. The Super Science High School Consortium. Japanese map of the earwax gene frequency: a nationwide collaborative study by Super Science High School Consortium. *J Hum Genet.* 54(9): 499-503. 2009.
5. Machida J, Félix TM, Murray JC, Yoshiura K, Tanemura M, Kamamoto M, Shimoizato K, Sonta S, Ono T. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate Craniofac J.* 46(5): 532-540. 2009.
6. Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa N. A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. *BMC Genet.* 10: 42. 2009.
7. Toyoda Y, Sakurai A, Mitani Y, Nakashima M, Yoshiura KI, Nakagawa H, Sakai Y, Ota I, Lezhava A, Hayashizaki Y, Niikawa N, Ishikawa T. Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type? *FASEB J.* 23(6): 2001-2013. 2009.
8. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet.* 54(5): 304-309. 2009.
9. Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Hirahara F, Matsumoto N. A locus for ophthalmo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. *Am J Med Genet A.* 149A(3): 336-342. 2009.

10. Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura KI, Niikawa N, Kishino T. Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene. *Gene* 432(1-2): 97-101. 2009.
11. Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Niikawa N. Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. *Am J Med Genet A*. 149A(4): 785-787. 2009.
12. Wu L, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J. A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A*. 149A(4): 816-818. 2009.
13. Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, Masuzaki H. Human Papillomavirus DNA in Plasma of Patients with HPV16 DNA-positive Uterine Cervical Cancer. *Jpn J Clin Oncol* (in press).
14. Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of FGFR1. *Human Reproduction* 25: 1076-1080, 2010.
15. 三浦清徳、増崎英明 Nuchal translucency: NT 長崎市医師会報 43巻 (11号), 32-34, 2009
16. 三浦清徳 Severe preterm IUGR における confined placental mosaicism の関与 -特に周産期から出生後 12 ヶ月について -第 27 回周産期シンポジウム記録集 29-29 2009.
17. 三浦清徳、山崎健太郎、三浦生子、中山大介、増崎英明 TTTS のリスクを推定する分子診断法の確立を目指して-母体血漿中胎盤由来 mRNA を用いた検討- 日本産婦人科・新生児血液学会誌 vol18, 107-113, 2009
18. 谷川輝美、三浦清徳、吉田敦、中山大介、増崎英明 胎児死亡例からみた常位胎盤早期剥離の検討 日本産婦人科・新生児血液学会誌 vol18, 13-17, 2009
19. 中山大介、三浦清徳、増崎英明 (地域における母体救急搬送体制と問題点 5) 長崎県 臨床婦人科産科 医学書院 第 64 巻 第 1 号 82-87, 2010
2. 学会発表  
 <国際学会>  
 <国際学会>  
**The American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, October 20-27, 2009.**  
 916/W The presence of cell-free male DNA in the plasma from non-pregnant women with scleroderma. Higashijima A, Yamasaki K, Miura K, Nakayama D, Yoshiura K, Masuzaki H  
 1106/W: The difference of HPV (human papillomavirus) DNA genotypes may

- influence the speed of carcinogenesis in cervical squamous intraepithelial lesions among Japanese patients. Yakamaski K, Miura K, Miura S, Shimada T, Fujishita A, Samashima T, Murakami M, Yoshiura K, Masuzaki H.
- 1292/W: Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe N, Yoshiura K, Niikawa N,
- 1377/W: DNA array-based copy number analysis in chorionic villus samples (CVS) of spontaneous abortions with normal karyotypes. Yamada T, Ohra T, Hosoki K, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Yoshiura K, Minakami H, Niikawa N
- 1613/T/Poster Board 162 Disocordant increased nuchal translucency thickness in monochorionic twin is a possible predictor of severe TTTS. S. Abe, K. Miura, K. Yamasaki, Y. Ikeda, H. Masuzaki.
- 1619/T: Microarray-based analysis using cell-free mRNA in pregnant women has a potential to estimate a placental status. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Higashijima A, Abe S, Yoshiura K, Niikawa N, Masuzaki H.
- 1985/T: Brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 and 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on SNP array. Kuniba H, Oikawa M, Kondoh T, Kinoshita A, Moriuchi H, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K.
- 2892/F: Resequencing of the whole candidate region for 16q22-linked spinocerebellar ataxia in Japanese individuals using next-generation sequencing. Kaname T, Tsukahara M, Yanagi K, Fujimori K, Kikuzato I, Teruya M, Imada Y, Nezu M, Yabo S, Sato Y, Miwa Y, Hirano T, Hirano R, Takashima H, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K.
- <国内学会>
- 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会（京都） 2009 年 4 月 3 日-5 日
- 母体血に流入する胎盤特異的 miRNA の網羅的スクリーニング. 三浦清徳, 三浦生子, 山崎健太郎, 吉田敦, 嶋田貴子, 中山大介, 増崎英明
- TTTS 発症の推定に母体血漿中の胎盤由来 mRNA 定量化は有用か? 三浦生子, 三浦清徳, 山崎健太郎, 池田裕一郎, 三浦生子, 吉田敦, 中山大介, 増崎英明
- 自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムの関与. 東島愛, 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 谷川輝美, 中山大介, 小川文秀, 佐藤伸一, 増崎英明
- 妊娠中の子宮頸部細胞診と HPV 感染の推移に関する検討. 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 三浦清徳, 池本理恵, 三浦生子, 濱口大輔, 小寺宏平, 藤下晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 中山大介, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 嚢胞化絨毛における分子遺伝学的解析の有用性に関する検討. 松本由有子, 三

浦清徳、山崎健太郎、中山大介、吉浦孝一郎、中山雅弘、増崎英明

第 19 回日本産婦人科・新生児血液学会（北海道）2009 年 6 月 12-13 日

母体血中胎盤特異的 miRNA 流入量の分娩に伴う変化に関する検討. 三浦清徳、三浦生子、東島 愛、阿部修平、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

第 45 回日本周産期・新生児学会（名古屋）2009 年 7 月 12-14 日

母体血に流入する胎盤特異的 miRNA とその流入量に関する検討. 三浦清徳、三浦生子、東島 愛、阿部修平、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

前置胎盤・低置胎盤の術中超音波検査

吉田敦、山崎健太郎、三浦清徳、中山大介、増崎英明

第 16 回日本遺伝子診療学会 2009 年 7 月 30 日（水）～8 月 1 日（土）、ホテル札幌ガーデンパレス、札幌

W-14: 日本における HPV 感染の特徴と HPV 持続感染に関わる SNP 検索. 吉浦孝一郎、三浦清徳、中山大介、増崎英明

0-03: ヒト疾患モデルとしての interferon regulatory factor 6 遺伝子改変マウスの表現型解析

0-006: アレイ染色体検査のための健常人 CNV データベース構築の試み. 松井健、霜川 修、吉浦孝一郎、新川詔夫、松本直通、原田直樹

0-008: Brain AVM maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA using high-density SNP array. 及川将弘、国場英雄、近藤達郎、永安 武、新川詔夫、吉浦孝一郎

0-011: PCR-高解像度融解曲線分析法による遺伝子スキャンニングシステムの構築. 要 匡、柳 久美子、福嶋義光、吉浦孝一郎、新川詔夫、成富研二

0-012: 次世代型シーケンサを用いた原因候補全領域リシーケンス解析へのアプローチ: 日本人ゲノム 16q122 領域の構造解析. 要 匡、塚原正俊、柳 久美子、藤森一浩、喜久里育也、照屋盛実、今田有美、鼠尾まい子、矢野修一、佐藤友紀、三輪有希乃、平野 隆、平野隆城、高嶋 博、吉浦孝一郎、新川詔夫、成富研二

0-023: 母体血中への胎盤特異的 miRNA の流入量に関する検討. 三浦清徳、三浦生子、東嶋 愛、阿部修平、山崎健太郎、嶋田貴子、吉浦孝一郎、増崎英明

0-025: 自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムノ関与に関する検討. 東嶋愛、三浦清徳、山崎健太郎、小川文秀、川上 純、吉浦孝一郎、増崎英明

0-024: デュシェンヌ型筋ジストロフィー保因者の妊婦における出生前診断への cell-free fetal DNA の応用. 城 大空、三浦清徳、三春範夫、三浦生子、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

0-026: 長崎県における HPV-DNA 型の分布と DNA 型による癌化への影響に関する検討. 阿部修平、山崎健太郎、三浦清

徳, 中山大介, 嶋田貴子, 三浦生子,  
藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 吉浦  
孝一郎, 増崎英明

O-033: 軟口蓋裂および粘膜下口蓋裂の  
ゲノムワイド連鎖解析. 津田雅由, 中  
島光子, 平野明喜, 三古谷 忠, 山田  
崇弘, 吉浦孝一郎

第 54 回日本人類遺伝学会 2009 年 9 月  
23 日 (水) ~26 日 (土), グラン  
ドプリンスホテル高輪, 東京

OA 016: 6 番染色体部分片親性ダイソミー  
を認めた 3M 症候群の 1 例. 佐々木健  
作, 岡本伸彦, 小崎健次郎, 川良洋城,  
吉浦孝一郎, 松本直通, 原田直樹

OA 019: アレイ染色体検査のための健常  
人 CNV データベース構築の試み. 松井  
健, 霜川修, 齋藤和正, 吉浦孝一郎,  
新川詔夫, 松本直通, 原田直樹

OA 056: 発作性運動誘発性舞踏アテトー  
ゼ (PKC) の変異解析. 小野慎治, 菊  
池妙子, 木下晃, 小澤寛樹, 新川詔夫,  
吉浦孝一郎

PA 031: 網羅的解析による母胎血中胎盤  
特異的 microRNA の同定とその局在に  
関する検討. 三浦清徳, 三浦生子, 東  
島愛, 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴  
子, 吉田敦, 中山大介, 吉浦孝一郎,  
増崎英明

PB 100: 羊水検査で検出した 2 番染色体  
長腕逆位重複の 1 例. 松井健, 堀越嗣  
博, 川目裕, 霜川修, 佐々木由喜, 松

本直通, 吉浦孝一郎, 原田直樹

PB 133: 日本人口唇裂患者における 8q24  
の検証. 津田雅由, 引田正宣, 秋田定  
伯, 平野明喜, 内山健, 吉浦孝一郎

PB 147: 次世代シーケンサによる日本人  
ゲノム 16q-ADCA 原因候補領域の構造  
解析. 要匡, 塚原正俊, 柳久美子, 藤  
森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田  
有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友  
紀, 三輪友希乃, 平野隆, 平野隆城,  
高嶋博, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富  
研二

PB 148: 嚢胞内乳ガンは嚢胞内乳頭腫に  
比べ顕著なゲノム変化を有する: 高密  
度 SNP マイクロアレイによるゲノム  
ワイド copy number/LOH 解析. 及川将  
弘, 永安武, 矢野洋, 安倍邦子, 林徳  
真吉, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

PB 150: 長崎県における HPV-DNA 型の分  
布と子宮頸癌との関連に関する検討.  
阿部修平, 山崎健太郎, 三浦清徳, 三  
浦生子, 嶋田貴子, 中山大介, 吉浦孝  
一郎, 増崎英明

PB 151: 長崎における HPV-DNA 型の頻度  
と持続感染に関する研究. 山崎健太郎,  
三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 藤下  
晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 吉浦孝一郎,  
増崎英明

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成20年は, なし

# 分 担 研 究 報 告 書



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成21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

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（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・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。本研究グループは、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。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。

ヒトの SNP の検索のためには、きちんと情報がリンク管理された試料の収集が絶対条件であり、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 型判定を行いつつ試料収集を行い、長崎県における HPV 感染の疫学的な調査もかねて研究を進めた。

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

長崎大学医学部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。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試料収集・管理システムを構築し、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とHPVのタイピング情報も加味したベセスダシステムと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 型判定は、アンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイピングキット (Roche ダイアグノスティック社) を採用し、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。

(倫理面への配慮)

試料収集は、長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て開始し、インフォームド・コンセントを書面で取得して研究を行った。

## 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

長崎大学医学部産科婦人科教室関連病院の協力で、子宮頸部擦過細胞、頸管粘液および血液試料の収集・管理システムを整えた。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、長崎済生会病院、田川市立病

院の6箇所ですり試料収集を行った。収集対象者は、主として子宮がん検診で子宮頸部細胞診異常 (日母分類クラス IIIa 以上, ベセスダシステム LSIL 以上) を指摘されて研究開始時点でフォローアップされていた症例群と妊婦 (産後1か月まで) を対象とした。それらに精密検査としてコルポスコピー検査を施行し、子宮頸部異形成を指摘された群、妊婦群、そして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群に分類した。子宮頸部異形成と診断された群は、フォローアップすることによって HPV 感染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、子宮頸部異形成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。平成平成22年1月23日までに延べ1,315例を収集し、一ヶ月平均50例弱から試料収集を行っている。臨床病名による内訳は、妊婦 (産後1か月まで) が19%、異形成が59%、上皮内癌 (治療後も含む) が9%、子宮頸癌 (扁平上皮癌、治療後も含む) が8%、その他の癌 (腺癌や子宮体癌を含む) が3%、病名不明が3%であった (図1)。

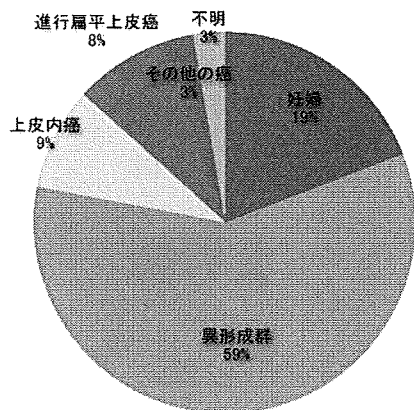


図1 臨床病名による内訳

## 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

延べ1,315例のうち、子宮頸部細胞診およびHPV型検査を受けた例が813例(重複は1とする)あり、そのうち妊婦が144人であった。妊婦144人中HPV感染を認めたものは52人(36%)

一方、研究参加の最初の時点での子宮頸部細胞診でLSIL(low grade squamous intraepithelial lesion)と判定された130人のHPV型分布を図

であり、その平均年齢は29歳であった。HPV型の分布を図2に示す。妊婦においてはHPV16型(10%)と52型(10%)が同数で、最も多く検出された型であり、3番目にHPV31型(6%)、以下18型、58型と続く。妊婦が長崎の一般女性集団のHPV型頻度を算定するのに適している理由としては、生殖年齢層のなかで、一定のsexual activityを見込む事ができる点である。本来の一般集団女性HPV感染の型別頻度(陰性も含めて)の算出には、一般検診で受診する集団を対象とすべきであるが、本研究はそれをめざした研究計画ではないので、今回は妊婦集団で代用した。

人中123人で平均年齢は37歳、HSIL群のHPV感染陽性率は99%(136人中135人)で平均年齢は41歳、SCC群では陽性率が94%(77人中73人)で平均年齢が57歳であった。

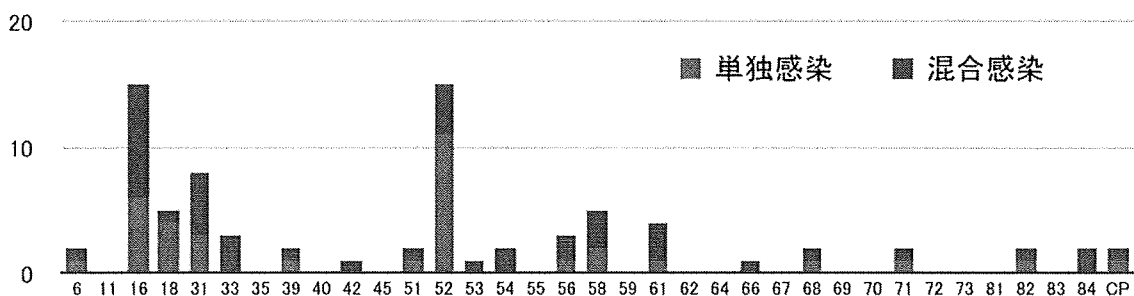


図2 妊婦初回検査時のHPV-DNA型分布

3aに、HSIL(high grade squamous intraepithelial lesion)と判定された136人の分布を図3bに、SCC(Squamous cell carcinoma)と判定された71人の分布を図3cに示す。LSIL群のHPV感染陽性率は95%(130

細胞診異常の3群におけるHPVの型分布は、LSIL群においては妊婦群と似た傾向があり、HPV52型が最も多く(11%)、次に16型(10%)、56型(9%)と続く。しかし、HSIL群とSCC

群では、型分布に違いが現れる。両群では上位2位の型は、HPV16型、52型

52型と同程度の頻度が見られ、病変進行に関わる重要な型であることが分

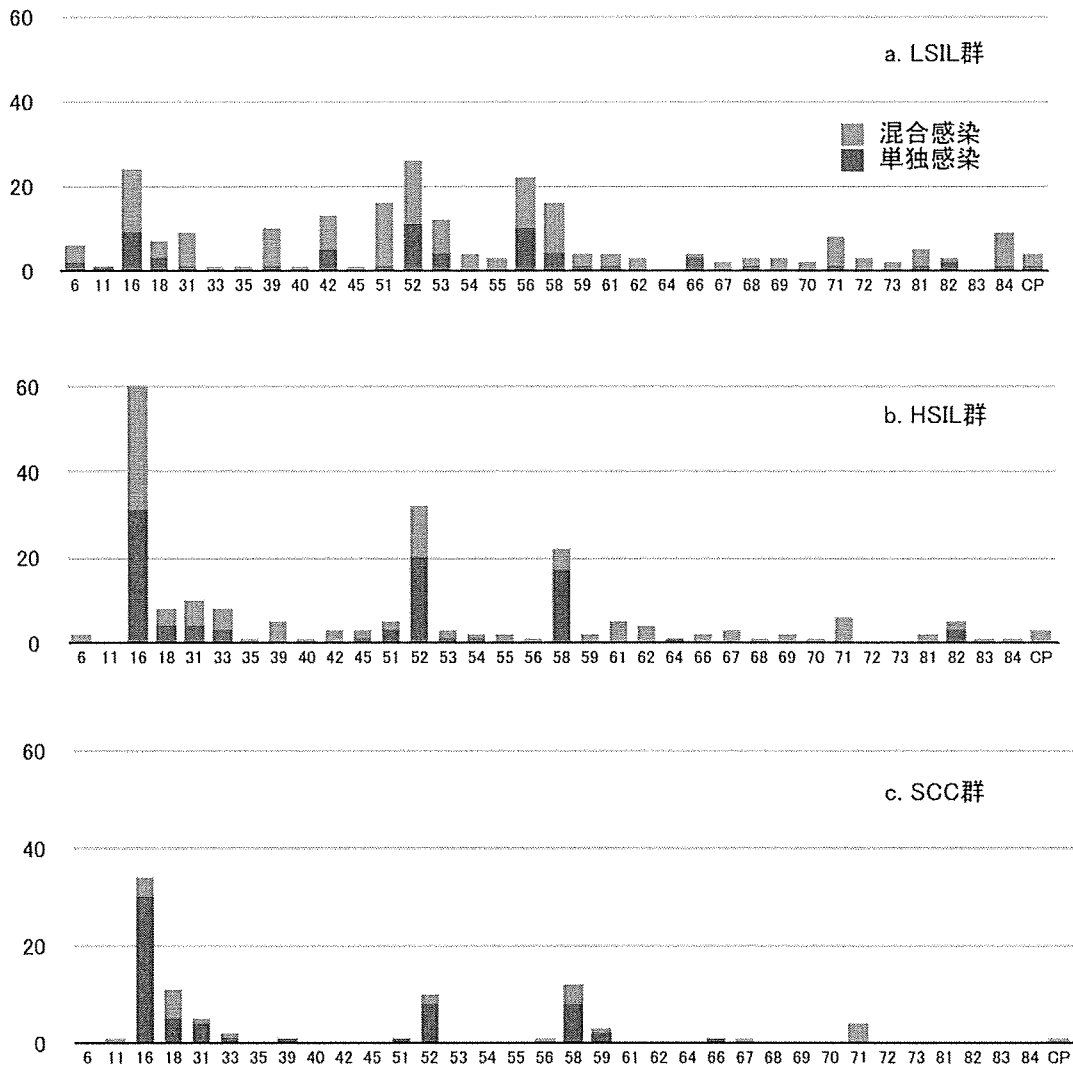


図3 a.LSIL群のHPV-DNA型分布、b.HSIL群の群のHPV-DNA型分布、c.SCC群のHPV-DNA型分布

と LSIL 群と変わりはないが、頻度は HSIL 群で 16 型が 29%、SCC 群では 39% と上昇し、52 型の頻度は HSIL 群で 15%、SCC 群で 11% と 16 型の頻度の 2 分の 1 以下となる。HSIL、SCC 群では 58 型も

かる。また、LSIL 群において 3 番目に多い型である HPV56 型の感染は HSIL 群と SCC 群ではほとんどみられなくなっている。

HPV の型別系統樹からみると、今回の解析対象者において HSIL 群と SCC 群で感染している HPV 型はそのほとん

どが A9 ファミリーに属していることが分かった。

さらに、複数の HPV 型が一人の人から検出される混合感染と単独の HPV 型が感染する単独感染の割合について、