

Table 1. Plasma membrane proteins overexpressed in endometrial cancer cells

Accession number	Protein name	No. peptides used for identification	iTRAQ ratio							
			HEC-1	HEC-1A	HEC-6	HEC-108	HEC-116	HEC-251	SNG-II	
O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	5	1.670	1.271	2.032	3.175	2.824	3.958	1.364	
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	1	0.398	3.017	5.745	8.722	4.307	5.239	1.727	
P25942	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	2	2.518	5.353	7.796	6.438	8.526	2.747	n.d.	
P31431	Syndecan-4	5	n.d.	n.d.	0.949	11.644	2.905	4.396	8.121	
P32004	Neural cell adhesion molecule L1	26	1.211	0.905	2.171	9.025	2.603	13.756	4.283	
P50895	Basal cell adhesion molecule	15	0.692	0.876	5.378	2.493	2.363	3.936	2.864	
P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor	3	1.773	3.140	5.228	16.042	4.507	3.265	3.256	
Q10589	Bone marrow stromal antigen 2	2	n.d.	6.438	85.276	94.318	87.278	3.435	38.946	
Q14126	Desmoglein-2	9	2.360	3.199	1.912	2.827	5.286	2.542	4.637	
Q9H5V8	CUB domain-containing protein 1	2	0.907	2.234	11.680	3.508	11.603	8.623	17.020	
Q9Y624	Junctional adhesion molecule A	1	4.374	17.088	25.645	47.784	23.673	77.025	18.523	

The iTRAQ ratios were calculated comparing the endometrial cancer cells' iTRAQ signal divided by the normal endometrial cells' iTRAQ signal. Proteins overexpressed more than twofold in at least four cell lines are listed. Abbreviations: n.d. = Not detected.

HEC-88nu or SNG-II cells (BST2-expressing endometrial cancer cell lines) were assigned to one of three treatment groups ( $n = 6$  per group): (i) PBS; (ii) isotype control; (iii) anti-BST2 antibody, 5 mg/kg (SNG-II) or 10 mg/kg (HEC-88nu) twice weekly. Although the tumors of all mice were approximately equal in initial volumes, significant differences in tumor growth were observed during the study, as illustrated by the tumor growth curve in Figure 4a. All mice were sacrificed on days 61 (HEC-88nu) or 85 (SNG-II) post-tumor inoculation. The tumors of the anti-BST2 antibody treatment group were markedly smaller than that of the PBS and control IgG treatment groups (Fig. 4b). The tumor weights of the anti-BST2 antibody treatment group were significantly decreased compared with the PBS and control IgG treatment groups, whereas there was no statistical difference between the PBS and control IgG treatment groups at the termination of the experiment (Fig. 4c).

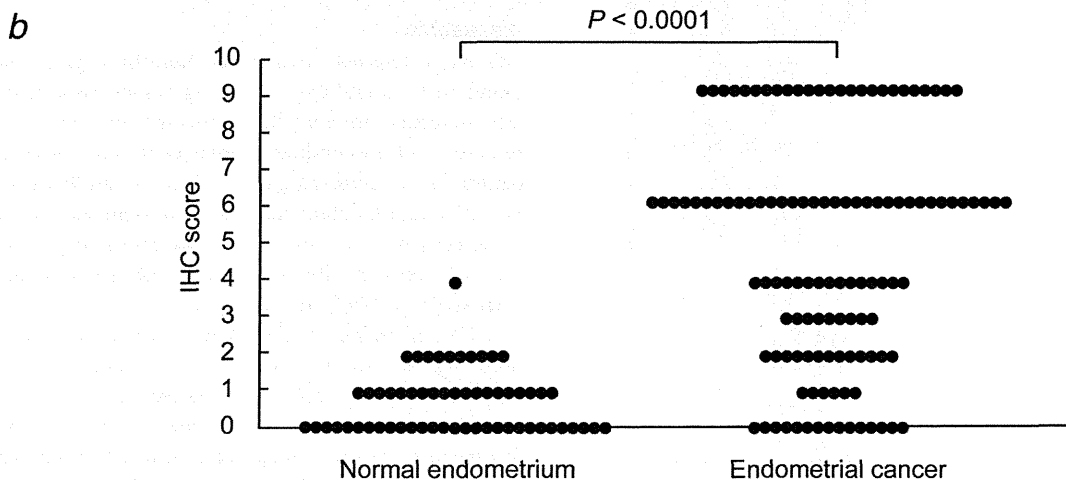
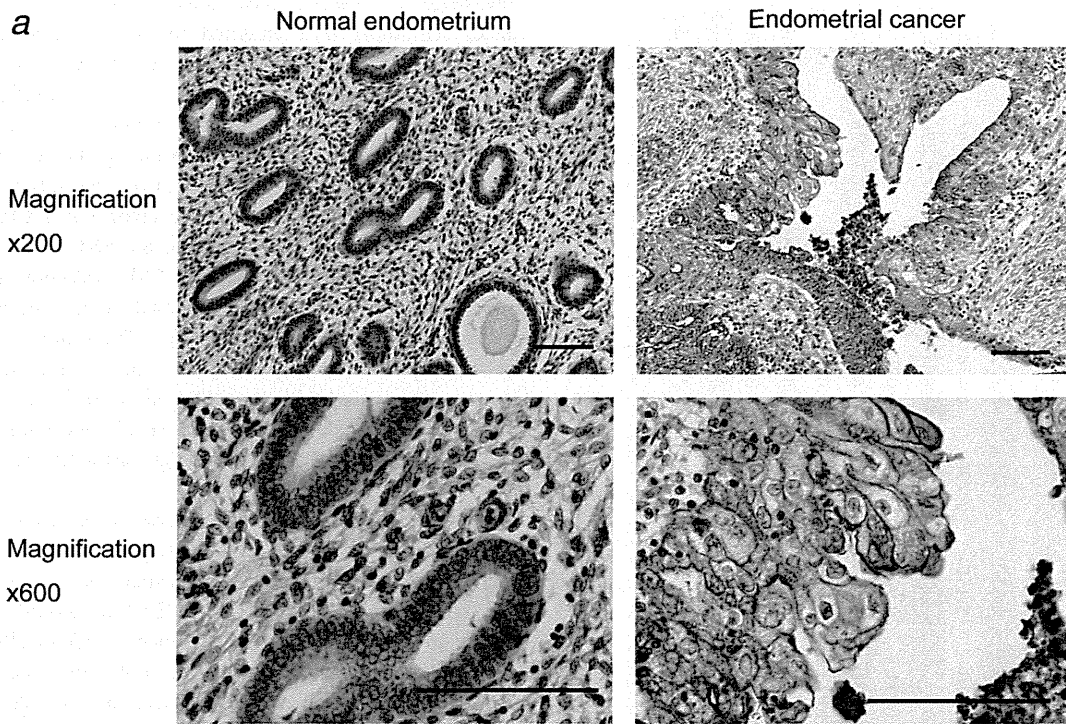
Once we had established a proof of principle that the anti-BST2 antibody can inhibit tumor growth, we then sought to identify mechanisms by which the anti-BST2 antibody acts on tumor cells. Anti-BST2 antibody treatment showed no significant therapeutic effect in identically treated NOD/SCID mice, with anti-BST2 antibody treated mice developing tumors at virtually the same rate as PBS and control IgG treated mice (Fig. 5).

## Discussion

Our study focused on a novel biotechnological method we found to be useful for identifying tumor-associated cell-surface antigens differentially expressed in cancer cells with respect to corresponding normal cells. The ideal expression pattern of a tumor-specific antigen for antibody therapy is that it should be abundant and homogeneous on the surface of cancer cells, and absent from normal tissue.<sup>19</sup> Such targets can be experimentally identified at different molecular levels, such as DNA, RNA, and protein.

DNA microarray technologies have led to the identification of genes that are dysregulated in cancer cells when compared with normal cells.<sup>20,21</sup> However, DNA arrays measure only the changes at the mRNA level, and this is not always translated to corresponding changes at the protein level, leading to many false positives and missed positives. The use of mRNA expression patterns by themselves is often insufficient for understanding the expression of protein products, as additional post-translational mechanisms, including protein translation, post-translational modification, and degradation, may influence the level of a protein and its antigenic epitopes.<sup>22,23</sup> In addition, effective induction of ADCC or CDC mediated by a therapeutic antibody requires abundant expression of cell-surface proteins specifically on the cancer cells,<sup>24,25</sup> providing a compelling rationale for a more direct analysis of gene expression at the protein level by proteomic methods.

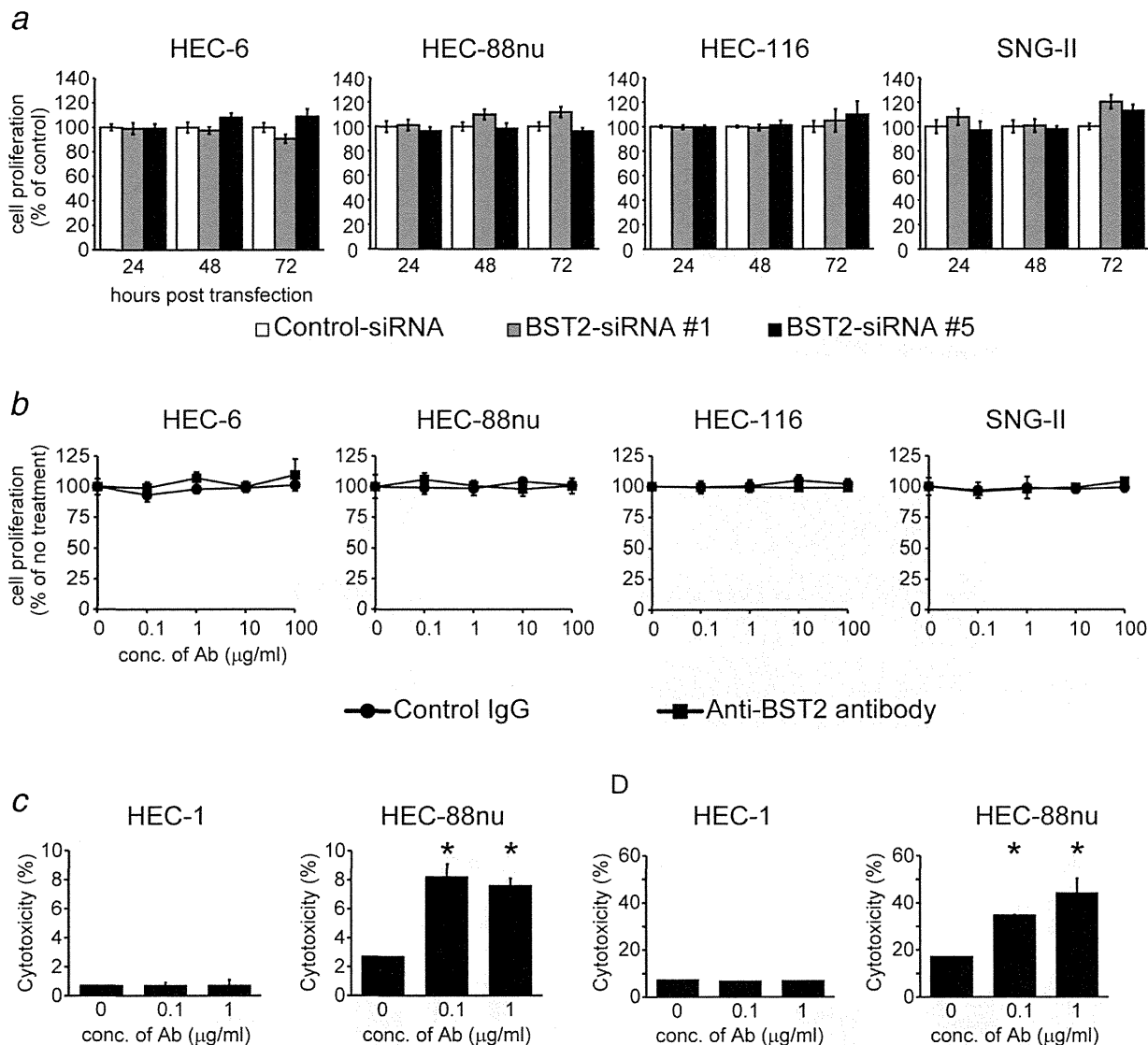
The intensity of individual proteins in the sample is crucial when performing proteomic analyses, as larger amounts



**Figure 2.** (a) Representative immunohistochemical staining for BST2 in normal endometrium and endometrial cancer specimens. Immunostained sections were counterstained with hematoxylin and photographed with an Olympus FSX100 (Olympus). The expression of BST2 was negative in normal endometrium, whereas endometrial cancer showed strong membranous reactivity for BST2. Scale bar, 100  $\mu$ m. (b) BST2 immunoreactivity in normal endometrial tissues and endometrial cancer tissues. The expression of BST2 was increased in endometrial cancer, with significant difference ( $p < 0.0001$ ). IHC score = intensity score (0, 1, 2, or 3)  $\times$  positivity score (0, 1, 2, or 3).

of some proteins may hinder the detection of less abundant proteins, such as cell-surface membrane proteins. As such, enrichment of plasma membrane proteins is an important initial step. Physical isolation of membrane proteins using centrifugation and/or chemical extraction are well-described methods.<sup>26,27</sup> However, these techniques fail to isolate only the cell-surface membrane proteins and usually provide

extracts that consist of all the membrane structures, including those inside the cell (e.g., endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and mitochondrial membranes). The proteins that are found inside the cell will most likely not be accessible to the systemically delivered antibodies and hence do not represent a group of interest for discovery of targetable molecules. Another way to enrich specifically the potentially accessible

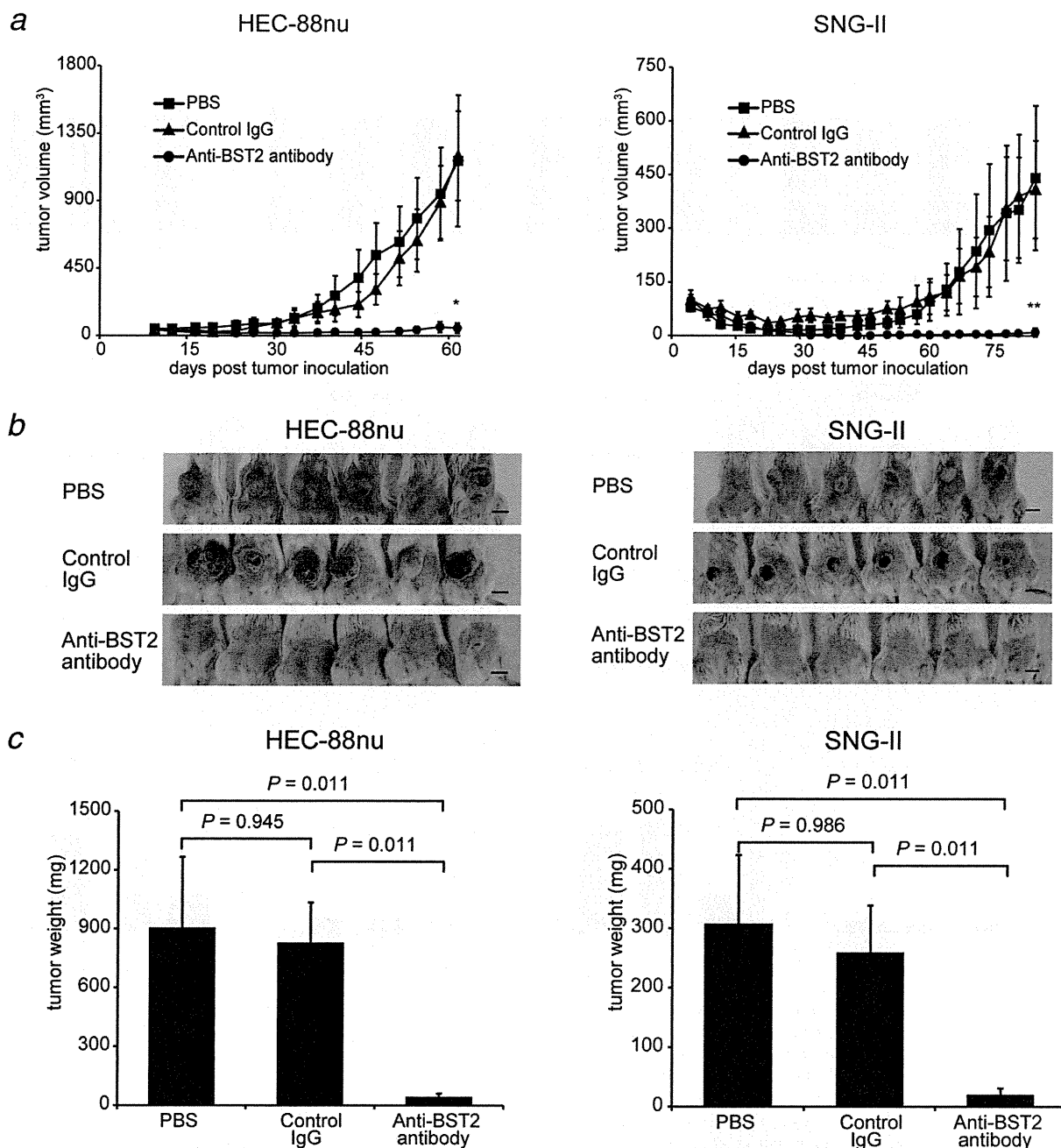


**Figure 3.** *In vitro* growth assay of endometrial cancer cells treated with BST2-siRNA (a) or anti-BST2 antibody (b). HEC-6, HEC-88nu, HEC-116, and SNG-II cells are BST2-positive endometrial cancer cell lines. (a) A total of 1,000 cells were plated in each well of 96-well plates and then siRNA was transfected. Cell proliferation was assessed at 24, 48, and 72 hr using a WST-8 assay. Values were normalized to control-siRNA treated cells. There were no significant differences in cell proliferation among BST2-siRNA and control-siRNA treated cells. (b) Anti-BST2 antibody or isotype-control IgG (final concentrations of 0.1, 1, 10, or 100 µg/ml) were added to 1,000 cells/well in 96-well plates. Cell proliferation was assessed at 72 hr using the WST-8 assay. Values were normalized to untreated cells. Anti-BST2 antibody had no direct cytotoxic effect on endometrial cancer cells *in vitro*. (c), ADCC activity of anti-BST2 antibody. Calcein-labeled HEC-1 (BST2-negative) and HEC-88nu (BST2-positive) cells were incubated with bone marrow-derived lymphokine-activated killer cells at an *E/T* ratio of 50 in the presence of 0, 0.1, or 1.0 µg/ml anti-BST2 antibody. (d) CDC activity of anti-BST2 antibody. <sup>51</sup>Cr-labeled HEC-1 (BST2-negative) and HEC-88nu (BST2-positive) cells were incubated with 12.5% baby rabbit complement in the presence of 0, 0.1, or 1.0 µg/ml anti-BST2 antibody. Anti-BST2 antibody had ADCC and CDC activity against HEC-88nu cells (BST2-expressing endometrial cancer cell line). \**p* = 0.045.

cell-surface proteins involves conjugating membrane proteins with the small molecule biotin and using the receptor streptavidin to extract the labeled proteins.<sup>28,29</sup>

In this study, we quantitatively analyzed the plasma membrane profiles comparing normal endometrium and endometrial cancer using a biotinylation-based approach for cell membrane enrichment combined with iTRAQ technology

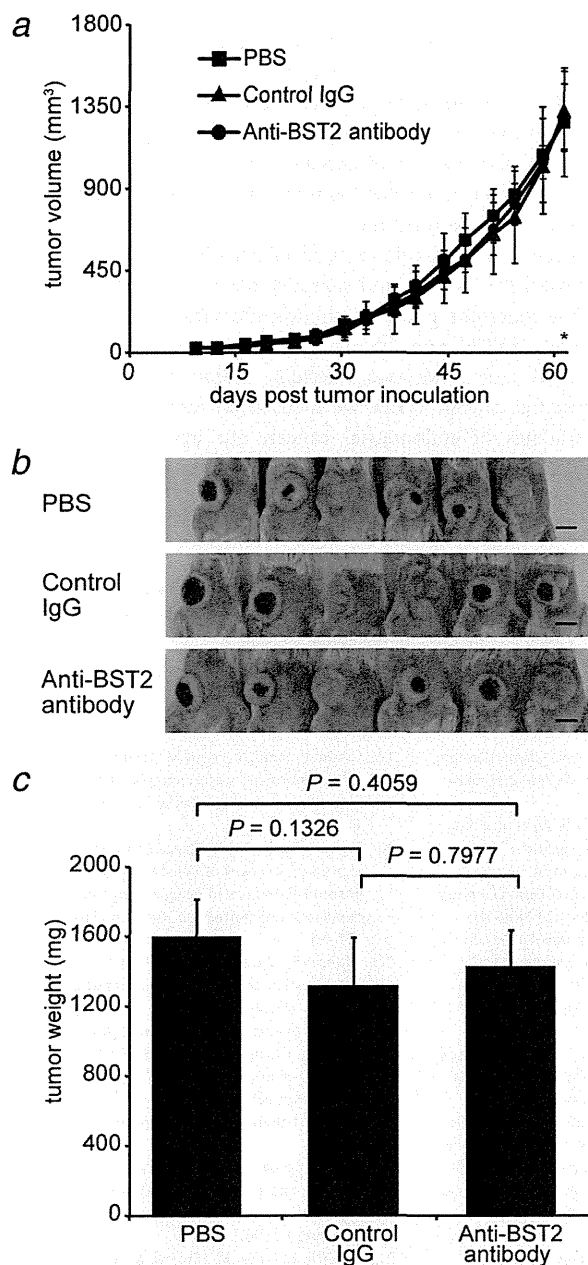
using nano LC-MS/MS analysis. While quantitative membrane proteomic approaches combining biotin labeling followed by enrichment of cell surface membrane proteins by avidin-beads and SILAC technology or spectral counting were already reported,<sup>28,30</sup> we demonstrated that iTRAQ approach is also an alternative method, suitable for the quantitative analysis of the cell surface membrane proteins.



**Figure 4.** *In vivo* therapeutic effect of anti-BST2 antibody on endometrial cancer growth. SCID mice inoculated with HEC-88nu or SNG-II cells (both are BST2-expressing endometrial cancer cell lines) received PBS, control IgG, or anti-BST2 antibody twice a week for 4 weeks from days 4 (SNG-II) or 9 (HEC-88nu) post-tumor inoculation. (a) Time-course of tumor volume change. Tumor volumes were measured twice a week and calculated as the product of length, width, and height. The mean volume  $\pm$  SD of six tumors in each group is shown. Anti-BST2 antibody treatment resulted in significantly decreased tumor growth compared with the other control groups (PBS and control IgG) at the termination of the experiment. \* $p = 0.0110$ , \*\* $p = 0.0108$ . (b) Mice at the end of the experiment. Scale bar, 1 cm. (c) Tumor weight at autopsy. After 4 (HEC-88nu) or 8 (SNG-II) weeks of observation following treatment, tumors were removed and weighted. Their weights were significantly different between the experimental (anti-BST2 antibody) group and the control (PBS and control IgG) groups ( $p = 0.011$ ).

In total, we identified 272 proteins, 139 of which (51%) were found to be cell-surface proteins. Given that global genomic analysis predicts that 20 to 30% of all open reading

frames encode integral membrane proteins,<sup>31</sup> our results indicate that the membrane proteins were moderately enriched by our sample preparation strategy.



**Figure 5.** Natural killer cells are required for antitumor activity of anti-BST2 antibody *in vivo*. NOD/SCID mice inoculated with HEC-88nu cells (BST2-expressing endometrial cancer cell line) received PBS, control IgG, or anti-BST2 antibody twice a week for 4 weeks from day 9 post-tumor inoculation. (a) Time-course of tumor volume change. Tumor volumes were measured twice a week and calculated as the product of length, width, and height. The mean volume  $\pm$  SD of six tumors in each group is shown. There were no significant differences in tumor volumes among PBS, control IgG, and anti-BST2 antibody groups at the termination of the experiment. \* $p = 0.9769$ . (b) Mice at the end of the experiment. Scale bar, 1 cm. (c) Tumor weight at autopsy. After 4 weeks of observation following treatment, tumors were removed and weighted. There were no significant differences in tumor weights among the three groups.

Eleven proteins were annotated as unique membrane proteins whose expression was specifically up-regulated in endometrial cancer (Table 1). These proteins included several reported markers for prediction of clinical outcome (neural cell adhesion molecule L1 and CUB domain-containing protein 1), suggesting a certain amount of robustness for our methodology of identifying tumor-associated antigens.<sup>32,33</sup> In the present study, BST2 was further validated as a potential therapeutic target for endometrial cancer, because BST2 showed one of the most significant differences between normal endometrium and endometrial cancer (a 10-fold up-regulation was shown in four of seven endometrial cancer cell lines compared with the normal endometrial cell line) and has been reported to be overexpressed in endometrial cancer using genome-wide gene expression profiling.<sup>21</sup> In future work, we would like to characterize other novel candidates for developing new therapeutic agents.

BST2 (also termed CD317, tetherin, or HM1.24) was originally identified as a Type II membrane glycoprotein with an unusual topology (one-pass transmembrane domain and C-terminal glycosylphosphatidylinositol anchor) that is preferentially overexpressed on multiple myeloma cells.<sup>34,35</sup> More recently, BST2 has also been proposed as a tumor-associated antigen expressed in some human cancer cell lines.<sup>36-38</sup> However, BST2 is an interferon-induced protein and inflammatory cytokines such as interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  might also induce its expression.<sup>35</sup> Furthermore, BST2 has been found to block the release of enveloped virus particles (e.g., HIV-1, Marburg virus, and Ebola virus) and may therefore be an important component of the antiviral innate immune defense.<sup>39,40</sup> Future research should further explore the role of BST2 in inflammatory diseases.

To our knowledge, protein expression of BST2 in endometrial cancer has not been described before. Our results are the first to show that BST2 is significantly overexpressed in endometrial cancer compared with normal endometrium. The degree of histological differentiation and surgical pathological staging showed no significant correlation with expression of BST2. Given the almost ubiquitous expression of BST2 in endometrial cancer, BST2 might have some value acting as a potential molecular therapeutic target.<sup>19</sup> In this study, we demonstrated that the administration of the anti-BST2 antibody reduced the growth of BST2-positive endometrial cancer cells in SCID mice. The suppressive effects on tumor growth were observed in two cell lines. In principle, the putative mechanisms of monoclonal antibody-based cancer therapy can be classified into two categories.<sup>41,42</sup> One mechanism is direct action to block the function of target signaling molecules or receptors, or stimulate apoptosis. It has been reported that BST2 gene is one of the important activators of the NF- $\kappa$ B pathway,<sup>43</sup> suggesting that the signaling from BST2 antigen affects the biological responses of BST2-expressing cells. However, silencing of BST2 expression by siRNA transfection did not alter its cell proliferation, and the anti-BST2 antibody had no direct cytotoxic effect on

BST2-positive endometrial cancer cells *in vitro*. The other mechanism of tumor growth suppression is *via* an indirect action mediated by immune systems such as the ADCC and CDC. We showed that the anti-BST2 antibody had ADCC and CDC activity against BST2-expressing endometrial cancer cells. Indeed, the same clone of this monoclonal antibody used in this study has previously been shown to be effective in promoting ADCC and CDC.<sup>37,38</sup> To examine the relative importance of ADCC, xenograft analysis was performed using NOD/SCID mice,<sup>44</sup> which have impaired natural killer cells, thereby compromising their ADCC activity. Anti-BST2 antibody treatment did not result in a significant decrease in tumor growth, suggesting that host effector mechanisms, and ADCC in particular, critically contribute to the antitumor activity of the anti-BST2 antibody *in vivo*.<sup>45</sup>

Beyond tumors, expression of BST2 on normal tissue is a key factor in assessing the suitability of an antigen for antibody targeting in oncology. Expression of BST2 in normal tissues is still less clear. An earlier report indicated that BST2 expression was barely detectable on normal B cells and was not detected on other normal tissues, including bone marrow, liver, heart, kidney, and spleen.<sup>34</sup> A recent article demon-

strated the expression of BST2 in various normal tissues by immunohistochemistry.<sup>46</sup> Although limited, a Phase I clinical study reported that a humanized anti-BST2 antibody did not cause any serious toxicity when administered to patients with relapsed or refractory multiple myeloma.<sup>47,48</sup> To consider the potential for toxicity of targeted anti-BST2 therapies, additional studies in relevant animals, including nonhuman primates, would be warranted.

In summary, we have used a high-throughput proteomic approach to identify and quantify membrane proteins which might represent potential therapeutic targets of endometrial cancer. BST2, one of the proteins identified using this method, may serve as a candidate therapeutic target for endometrial cancer. While we focused on identifying targetable candidates of endometrial cancer, our approach is broadly applicable to other malignancies for screening new therapeutic targets.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Chugai Pharmaceutical for the gift of antibodies against BST2; Ms. A. Katsuhara and Ms. M. Urase for experimental assistance; Ms. Y. Kanazawa for secretarial assistance.

### References

- Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005;105:1417-23.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
- Leth-Larsen R, Lund RR, Ditzel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1369-82.
- Shin BK, Wang H, Yim AM, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem* 2003;278:7607-16.
- Zhao Y, Zhang W, Kho Y. Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal Chem* 2004;76:1817-23.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:376-86.
- Alex P, Gucek M, Li X. Applications of proteomics in the study of inflammatory bowel diseases: current status and future directions with available technologies. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:616-29.
- Choe L, D'Ascenzo M, Relkin NR, et al. 8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease. *Proteomics* 2007;7:3651-60.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
- Obel JC, Friberg G, Fleming GF. Chemotherapy in endometrial cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006;4:459-68.
- Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, et al. Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2004;22:2159-66.
- Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, et al. Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration. *Ann Oncol* 2007;18:409-20.
- Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, et al. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am J Pathol* 2003;163:2259-69.
- Mizumoto Y, Kyo S, Ohno S, et al. Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene* 2006;25:5673-82.
- Scheurer SB, Rybak JN, Roesli C, et al. Identification and relative quantification of membrane proteins by surface biotinylation and two-dimensional peptide mapping. *Proteomics* 2005;5:2718-28.
- Roden MM, Lee KH, Panelli MC, et al. A novel cytotoxicity assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *J Immunol Methods* 1999;226:29-41.
- Neri S, Mariani E, Meneghetti A, et al. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1131-5.
- Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, et al. Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells. *Lung Cancer* 2009;63:23-31.
- Carter P, Smith L, Ryan M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:659-87.
- Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, et al. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol Oncol* 2001;83:177-85.
- Wong YF, Cheung TH, Lo KW, et al. Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. *Oncogene* 2007;26:1971-82.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:304-13.
- Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:960-9.
- Mimura K, Kono K, Hanawa M, et al. Trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:4898-904.
- van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2006;12:4027-35.
- Patwardhan AJ, Strittmatter EF, Camp DG II, et al. Comparison of normal and breast cancer cell lines using proteome, genome, and interactome data. *J Proteome Res* 2005;4:1952-60.
- Tan S, Tan HT, Chung MC. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 2008;8:3924-32.

28. Conn EM, Madsen MA, Cravatt BF, et al. Cell surface proteomics identifies molecules functionally linked to tumor cell intravasation. *J Biol Chem* 2008;283:26518–27.
29. Kischel P, Guillonau F, Dumont B, et al. Cell membrane proteomic analysis identifies proteins differentially expressed in osteotropic human breast cancer cells. *Neoplasia* 2008;10:1014–20.
30. Qiu H, Wang Y. Quantitative analysis of surface plasma membrane proteins of primary and metastatic melanoma cells. *J Proteome Res* 2008;7:1904–15.
31. Wallin E, von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 1998;7:1029–38.
32. Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, et al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 2003;362:869–75.
33. Mamat S, Ikeda J, Enomoto T, et al. Prognostic significance of CUB domain containing protein expression in endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2010;23:1221–7.
34. Goto T, Kennel SJ, Abe M, et al. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. *Blood* 1994;84:1922–30.
35. Ohtomo T, Sugamata Y, Ozaki Y, et al. Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:583–91.
36. Walter-Yohrling J, Cao X, Callahan M, et al. Identification of genes expressed in malignant cells that promote invasion. *Cancer Res* 2003;63:8939–47.
37. Kawai S, Azuma Y, Fujii E, et al. Interferon-alpha enhances CD317 expression and the antitumor activity of anti-CD317 monoclonal antibody in renal cell carcinoma xenograft models. *Cancer Sci* 2008;99:2461–6.
38. Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, et al. HM1.24 (CD317) is a novel target against lung cancer for immunotherapy using anti-HM1.24 antibody. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:967–76.
39. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008;451:425–30.
40. Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, et al. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol* 2009;83:1837–44.
41. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005;23:1147–57.
42. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:714–27.
43. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:3307–18.
44. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 1995;154:180–91.
45. Mulgrew K, Kinneer K, Yao XT, et al. Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3122–9.
46. Erikson E, Adam T, Schmidt S, et al. In vivo expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:13688–93.
47. Powles R, Sirohi B, Morgan G, et al. A phase I study of the safety, tolerance, pharmacokinetics, antigenicity and efficacy of a single intravenous dose of AHM followed by multiple doses of intravenous AHM in patients with multiple myeloma. *Blood* 2001;98:165A.
48. Tai Y-T, Anderson KC. Antibody-based therapies in multiple myeloma. *Bone Marrow Res* 2011; 2011:924058.

## HPVワクチンの長期的効果を検証

# 大阪府内科医会がOCEAN STUDYへの症例登録を呼びかけ

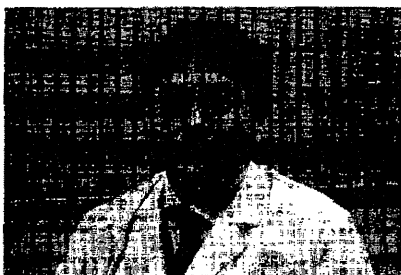
子宮頸がんの発症を抑制する HPV（ヒトパピローマウイルス）ワクチン。日本人での発症抑制効果を検証する初めての大規模臨床研究「OCEAN STUDY」が大阪で始まった。HPV ワクチンがわが国に導入されて2年余り。その接種場所が、産婦人科から内科にシフトしつつあることから、大阪府内科医会は同研究への協力を表明し、会員に症例登録を呼びかけている。同研究はワクチン接種時に子宮がん検診受診を強く呼びかける試験デザインとなっており、受診率向上にも大きく貢献すると期待される。

（編集部）

### 日本人のHPVタイプや ワクチンの長期持続効果を検証

「われわれが HPV ワクチン接種の普及に力を入れるのは、若年の子宮頸がん患者の急増を目の当たりにしているからだ」。

OCEAN STUDY 研究事務局を務める大阪大学産科学産婦人科学教室の上田豊氏はこう強調する。子宮頸がん（上皮内がんを含む）は 2000 年代に入ってから急増ぶりがすさまじく、20 歳代・30 歳代の女性人口 10 万人当たり発症率は 20 人前後（1990 年代）から 35 人（2004 年）にまで跳ね上がった。性生活の活発化が背景にあるといわれている。患者の年齢層は若年化。1985 年には 60～80 歳代が発症のピークであったが、2005 年には 30 歳代後半がピークとなり 20～30 歳代患者が増加。「妊娠出産前に子宮摘出せざるを得な



上田豊氏

いケースが増えている」（同氏）。

こうしたことから、2011 年 1 月から公費助成が開始され、大阪府下でも全自治体が中学校 1 年～高校 1 年までの女子を対象に HPV ワクチンの公費助成を行っている。

HPV ワクチンは HPV の感染を予防することによって子宮頸がんの発症を抑制する。現行の HPV ワクチンは HPV-16 型および 18 型の感染を予防するもので、他の発がん性の型には効果が期待できない。世界的には 16 型と 18 型で子宮頸がんから検出される HPV 全体の約 7 割を占めるとされている。

一方、日本の事情は海外とは異なり、HPV52 型や 58 型の占める割合が多く、16 型と 18 型は合わせて 58.8% と報告されている。ただし、最近、日本の小規模な研究では 20 歳代では 90% から HPV-16 型・18 型が検出されたとの報告もある。

つまり「海外より予防可能な子宮頸がんは少ないと考えられているが、本当のところははっきりしない。予想以上に効果が期待できる可能性もある」（同氏）という。

また、HPV ワクチンの中・長期的な効果持続期間も明らかではない。日本で発売されている「サーバリック

ス」、「ガーダシル」は、いずれも大規模臨床試験により、約 3 年のフォローアップ期間では極めて高い子宮頸がん発症予防効果が報告されているが、さらに長期のフォローアップ期間における調査では、統計学的に有意な結果は、まだ発表されていない。仮に効果持続期間に限界があることが証明されれば、再接種が検討されることにつながる。

### 子宮がん検診を利用した 試験デザインが特徴

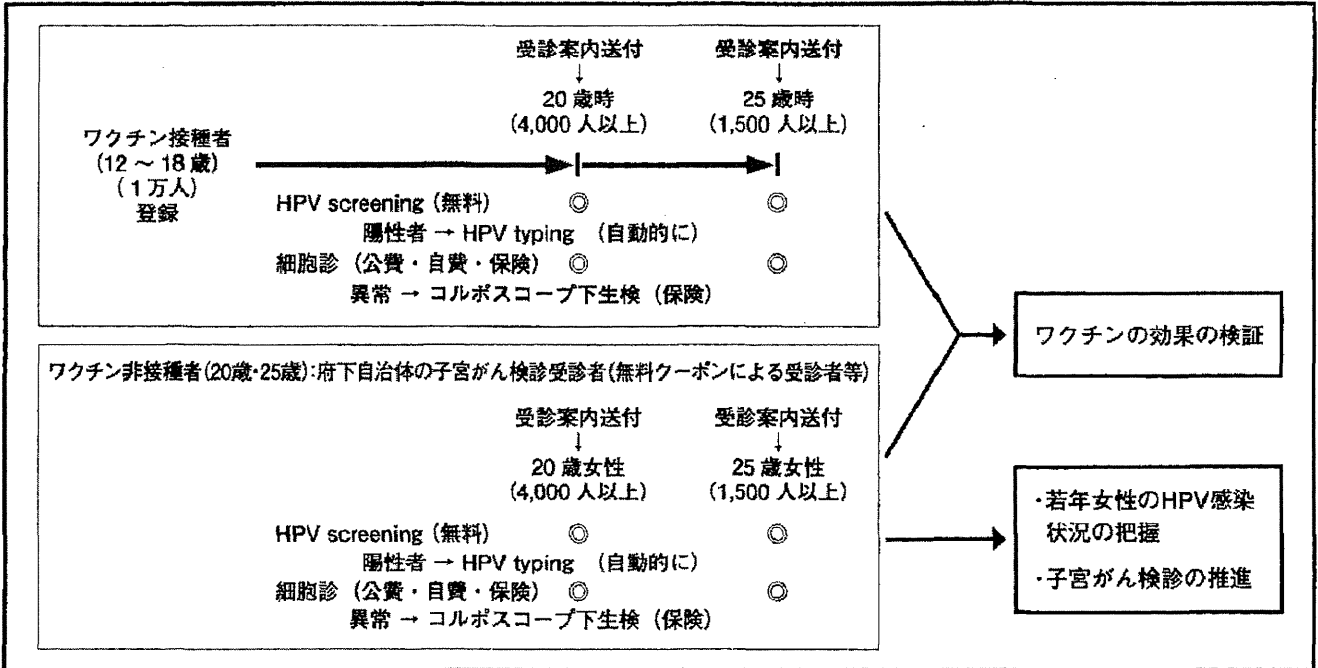
「OCEAN STUDY」の目的は、この 2 つの疑問、すなわち①日本の若年女性における現在の HPV 感染状況、②日本における HPV ワクチンの中・長期的効果——を検証するとともに、③子宮頸がん検診受診率の向上を図るというものだ。

「公費助成に対してエビデンスを示すためにも、費用対効果の検証が重要」と上田氏は指摘する。同研究は、大阪産婦人科医会が主体となって推進し、在阪 5 大学の産婦人科教室が学閥を越えて参加している。

試験デザインは図 1 の通り。12～18 歳の HPV ワクチン接種者を登録し、20 歳時、25 歳時に自治体を実施している子宮頸がん検診を受診してもら



■ 図1 研究概要



い、この際に HPV 検査も行って、子宮頸部細胞診異常の頻度と HPV 感染状況を調査する。HPV 陽性者にはウイルス型判定を行う。

研究協力者には、この HPV 検査を無料で行う。現在、自治体は細胞診の無料クーポンを配布しているが、「クーポン郵送の際に、府下自治体の6割がこの研究の案内を同封してくれるようになった」という。

HPV ワクチンの効果は明らかなので接種群非接種群をランダムに割り付けるデザインは倫理的に行えない。そのため、同研究では自治体の子宮がん検診受診者のなかから、同数のワクチン非接種者を選び出して比較対象群とする。ワクチン接種時に研究協力医師が行うことは、対象年齢のワクチン接種者と保護者から同意書を取り、登録票に記入するだけだ。

ワクチン接種群の登録目標は、2013 年度末までに 1 万例。しかし、現在のところ登録症例は 2 製剤合わせて 2,500 例弱にとどまっている。10 代の女性が産婦人科を受診する機会が少な

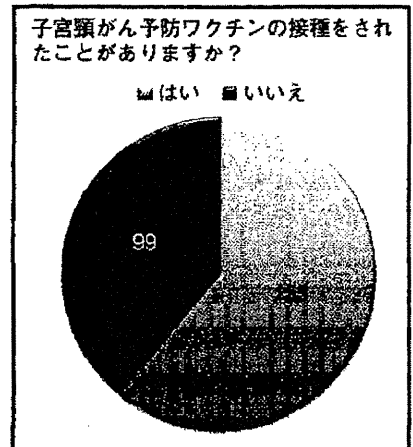
いからだ。

メーカーの出荷データから推測すると HPV ワクチンの接種場所は、産婦人科から内科にシフトしつつある。大阪府内科医会の調査では 2011 年当時、約 60% の会員が HPV ワクチンの接種経験を有していた (図 2) が、さらに高くなっている可能性もある。「産婦人科医だけではこれ以上の症例登録は困難。本研究の成功には内科の先生方の協力が欠かせない」と上田氏は内科医の参加に期待を寄せる。

現行の HPV ワクチンでは予防できない子宮頸がんが必ず存在する。HPV ワクチンを接種したことで将来子宮頸がんにはならないとの誤解から、子宮がん検診受診率が低下することが懸念されている。HPV ワクチン接種後も、必ず検診を受けるよう指導することが重要であり、その意味でも同研究は有意義なものといえよう。

こうしたことから、大阪府内科医会は同研究への協力を決定した。会長の福田正博氏は「公共性の高い臨床研究であり、当会会員も、ぜひ協力してほ

■ 図2 内科医のHPVワクチン接種経験(大阪府内科医会調査)



しい」と訴えている。なお、5月22日(水)の大阪府内科医会定例講演会にて大阪大学産科学婦人科学教室の木村正教授の講演とともに、当研究の説明会も実施する予定である。

■大阪府内科医会への入会のお問い合わせは同会事務局まで  
Eメール: opa-office@umin.ac.jp  
FAX: 06-6191-5337

## 子宮頸がん と HPV



新潟大学大学院医歯学総合研究科 産科学婦人科学  
榎本隆之

## 緒言

日本における子宮頸がんの発症率は10万あたり11.1人で、米国(7.8人)カナダ(8.25人)ドイツ(11.5人)フランス(10.1人)とほぼ同等である。子宮頸がんは子宮頸部の扁平上皮円柱上皮接合部(Squamo-Columnar-Junction SCJ)から発生することが知られている。多くは扁平上皮癌であるが、近年腺癌の占める割合の増加が著しく1975年では5%であったのが2006年には23%となっている。また20～30代の発症率の増加が著しく、1975年には10万人あたり10人であったのが2002年には36人となっている(図1)。

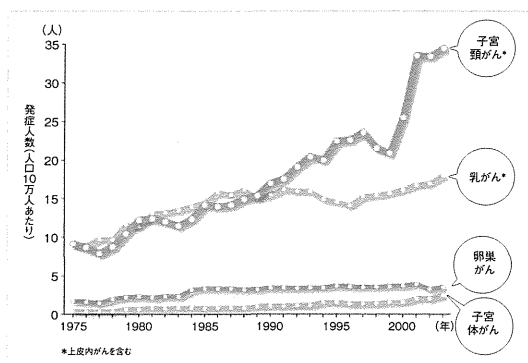
## HPV と子宮頸がん

子宮頸がんはヒトパピローマウイルス(human papilloma virus HPV)の感染によっておこることが知られている。HPVはパポバ属に属する約8,000塩基対ほどの環状二本鎖DNAウイルスで主要キャプシド(L1)DNA配列の近似性から100種類が同定されて、うち30種類が性的接触によって感染し、15種類(HPV16、18、31、33、35、

39、45、51、52、56、58、59、68、73、82)が発がんに関与しているといわれている。発がんに関与しているHPVを高リスク型HPV(あるいは悪性型HPV、発がん性HPV)と呼ぶ。高リスクHPVは子宮頸がん以外にも膣がん、外陰がん、肛門がん、中咽頭がんの発生にも関与していることが知られている。しかし、子宮頸がんではほぼ100%HPVが検出されるのに対し膣・外陰がんでは40%、中咽頭がんでは12%に過ぎない。高リスク型HPVには15種が含まれるが、16型および18型が特に重要で、多くの国では子宮頸がんの約70%から16型か18型が検出されるが、日本では60%である<sup>1)</sup>(図2)。HPVは15～24才の一般女性の30～40%に検出され、20才代の女性の20%から高リスク型HPVが検出されるという報告もある。一方一般男性の高リスク型HPV感染率は米国では年齢に関わらず10-20%である。

## HPVによる発がん機構

粘膜型HPVは性行為を介して生じる粘膜上皮の微小な傷から、生殖器粘膜の基底細胞に侵入し、



国立がんセンターがん対策情報センター、人口動態統計(厚生労働大臣官房統計情報部)

図1 20-39歳の女性10万人当たりの各種がんの発症率推移

その他の型 : 41%

16型 : 45%

18型 : 14%

その他の型 : 52, 58, 33, 31, 35 型 etc.

図2 日本人の子宮頸がんから検出されるHPVの種類

ゲノムが宿主 DNA に組み込まれず episome として存在する潜伏状態となる<sup>2)</sup>。感染細胞の分裂時にはウイルスゲノムも複製し、娘細胞に分配される。潜伏感染細胞の上皮への分化にともないウイルス増殖が起こる。子宮頸部の Squamo-Columnar Junction SCJ は細胞増殖が速く、HPV の潜伏・持続感染が SCJ で起こると、HPV 増殖時に coilocytosis と呼ばれる病変が生じる。6 型や 11 型などの低リスク型 HPV に感染しても決して宿主 DNA に組み込まれることはないが、高リスク型 HPV に感染すると宿主 DNA に組み込まれる (integration) ことがあり、これが発がんに関係していると考えられている。HPV には初期遺伝子と後期遺伝子という Open Reading Frame を持っていて、子宮頸がんでは高リスク型 HPV の初期遺伝子の E2 が開裂・欠失しており、これに伴い E6 および E7 が過剰発現している。E7 は Rb と結合して Rb を不活化し、Rb と E2F の複合体から E2F を放出させる。E2F は p14ARF を誘導し、その結果、p53 を蓄積することによってアポトーシスを誘導し、またこの p53 は p21waf1 を介して細胞周期を停止させようとする。しかし、悪性型 HPV の癌遺伝子の E6 はユビキチンリガーゼの 1 つである E6AP (E6-associated protein) と複合体をつくと p53 に対する結合能を獲得し E6AP の働きにより p53 をユビキチン化してプロテアゾームによる p53 の分解を促進する<sup>3, 4)</sup>。したがって、p53 は結果的にはアポトーシスの誘導も細胞周期の停止も起こせず、遺伝子異常を持った細胞の増殖が起こると考えられる。

また、子宮頸がんでは p16<sup>INK4a</sup> の点突然変異あ

るいは欠失、プロモータ領域のメチル化による発現の消失が約 25% に認められる<sup>5)</sup>。喫煙は子宮頸がんの発生においては HPV 感染と独立した危険因子であり、喫煙により CIN および SCC 発生の危険性は 2~3 倍になると報告されている<sup>6)</sup>。喫煙によって p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域のメチル化が起こり、エピジェネティックな発現抑制を惹起することにより、発癌に関与している可能性が指摘されている。p14<sup>ARF</sup> は p16<sup>INK4a</sup> と遺伝子座を共有し、p16<sup>INK4a</sup> の exon 1 と p15<sup>INK4b</sup> の exon 2 の間に存在する p16<sup>INK4a</sup> の exon 1β、及び p16<sup>INK4a</sup> の exon 2 と 3 からなる遺伝子である<sup>7)</sup>。p14<sup>ARF</sup> は HDM2 と直接結合し、p53 の分解を抑制する働きがある。また、p14<sup>ARF</sup> の転写が E2F によって亢進することも知られている。RB 経路に異常が起こると E2F の転写活性が亢進し、細胞周期を正常にコントロールできなくなるが、E2F は p14<sup>ARF</sup> の発現を誘導し p53 経路を活性化することにより癌化を防いでいると考えられる。HPV 陽性の子宮頸がんでは正常子宮頸部扁平上皮と比較して p16<sup>INK4a</sup> 及び p14<sup>ARF</sup> の発現量の亢進している症例が有意に多い<sup>8)</sup>。また、HPV 陰性の子宮頸がんでは p16<sup>INK4a</sup> の発現の著明な減少がみられる。HPV 陽性の子宮頸がんでは E7 により RB の不活化が起こるため E2F の転写活性が亢進し、その結果 p14<sup>ARF</sup> の発現が亢進していると考えられる (図 3-a)。HPV 陽性の子宮頸がんにおいて p16<sup>INK4a</sup> の発現の亢進している理由は、E7 によって RB 経路が不活化されていることに対するフィードバック機構が働いていると考えられている。これに対し HPV 陰性の子宮頸がんは INK4a 遺伝子座の欠

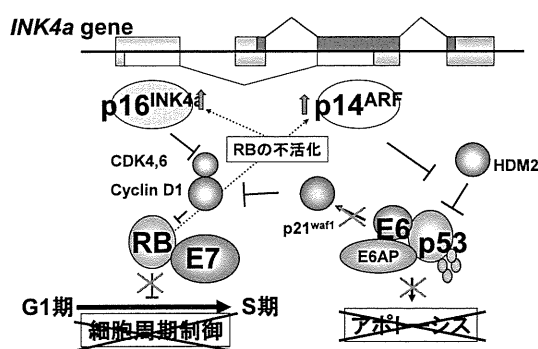


図 3-a HPV 陽性子宮頸がん

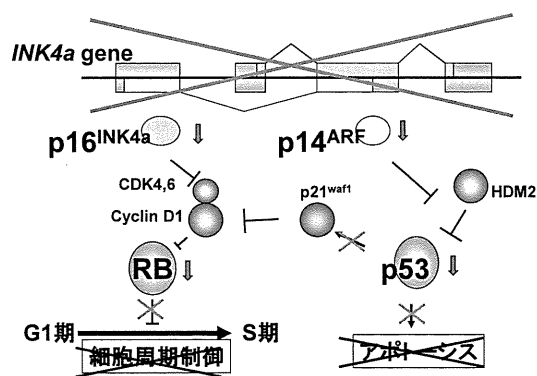


図 3-b HPV 陰性子宮頸がん

失あるいは点突然変異により p16<sup>INK4a</sup>-RB 経路及び p14<sup>ARF</sup>-p53 経路ともに不活化され癌化が起きると考えられる (図3-b)。

子宮頸がんは前がん病変を経て発生することが知られているが、前がん病変は子宮頸部上皮内腫瘍 (Cervical Intraepithelial Neoplasia CIN) あるいは子宮頸部異形成とよばれていて CIN 1 が軽度異形成、CIN2 が中等度異形成、CIN3 が高度異形成および上皮内がんに対応する。CIN1 の50% の症例は病変が消失していくこと、高リスク型 HPV が高頻度に検出される CIN3 でも進行癌となる症例は30-50% に過ぎないこと<sup>9)</sup> より、従来の形態学的な観察あるいは HPV のタイピングだけでは悪性化していく上皮内病変を同定できない。

ある病変が腫瘍性病変か非腫瘍性病変であるかを判定する方法として X 染色体を利用したクロナリティー解析法という解析手法がある。女性の体細胞には、父親由来および母親由来の2本の X 染色体があるが、X 染色体のいずれか一方は胎生期にランダムに不活化され、不活化された X 染色体上の遺伝子は発現されなくなる。不活化された側の X 染色体は細胞分裂を経ても不活化を保持している<sup>10)</sup> (図4-a)。正常組織では父親由来の X 染色体が不活化されている細胞と母親由来の X 染色体が不活化されている細胞が混在している。これに対して、癌が一つの体細胞由来、即ちモノクローナルな細胞の集団であれば、個体中の癌細胞はすべて父親由来または母親由来の同一の X 染色体が不活化されていることになる<sup>11)</sup>。不活化された染色体の DNA は高度にメチル化されていることが知られている。DNA のメチル化は複製後も維持できるので、不活化された側の X 染色体は細胞分裂を経てもメチル化による不活化を保持できる。この原理を用いて X 染色体上の遺伝子であるアンドロゲン受容体遺伝子 (AR) の exon 1 のメチル化のパターンを利用した癌のクロナリティー解析法が開発されている<sup>12)</sup> (図4-b,c)。CIN の診断のもと経過観察をおこなった症例についてクロナリティー解析および HPV の typing を行ったところ、CIN 1 の50%、CIN2 の70%、また全ての CIN3 がモノクローナルな病変で腫瘍としての性格をすでにもっていることがわかる。モノクローナルな CIN のほぼ全症例から

悪性型 HPV が検出されるが、ポリクローナルな CIN からは様々なタイプの HPV が検出される。高リスク型 HPV 感染を認める CIN 病変は認めない病変に比し有意に持続・進行し、モノクローナルな CIN 病変はポリクローナルな病変に比し有意に持続・進行することが分かった<sup>13)</sup> (図5-a, b, c)。CIN 病変の持続・進行という転帰の予測は、悪性型 HPV 感染の有無よりクロナリティー解析の結果のほうがより関連し、さらには悪性型 HPV 感染の有無とクロナリティー解析とを組み合わせることにより鋭敏である。また、モノクローナルな CIN 病変には悪性型 HPV の一部が宿主ゲノムに組み込まれていることが示されている。したがって、HPV 感染が起こった直後の CIN 病変では HPV DNA は episome に存在し、ポリクローナルな病変を形成するが (図6-a)、HPV が宿主ゲノムへ組み込まれることにより、HPV 感染細胞がモノクローナルに増殖した腫瘍性の上皮内病変が形成され、さらに遺伝子変化が加わって浸潤癌に発展すると考えられる (図6-b)。

また、CIN 3 の診断の下、子宮腔部円錐切除術を行った症例に対し12分割した標本より病変部のみを切り出しクロナリティー解析を行ってみると、子宮腔部に連続して瀰漫性に存在する病変では、すべての切片上の病変が同じ不活化のパターンを示し、単一細胞由来の CIN が広がって形成された病変であることがわかるが、子宮腔部に島状に不連続に存在する病変のなかには、それぞれの病変の X 染色体の不活化のパターンは互いに異なっているものがある (図7)<sup>14)</sup>。このことより CIN3 の多くは悪性型 HPV の感染により1つの細胞から発生し、コルポスコピーで認められるような広がりを持った病変に進展するが、なかには HPV 感染によって多中心性に発生する症例があることがわかる。

## HPV ワクチンとその効果

1990年代になってウイルス様粒子 (virus-like particle ; VLP) を昆虫細胞や酵母などの真核細胞で生成する技術が開発されるようになり HPV ワクチンが開発されるようになった。VLP とは、ウイルスと同じ外観や抗原性を有するが、ウイルス遺伝子を含まない空粒子である。子宮頸がん予

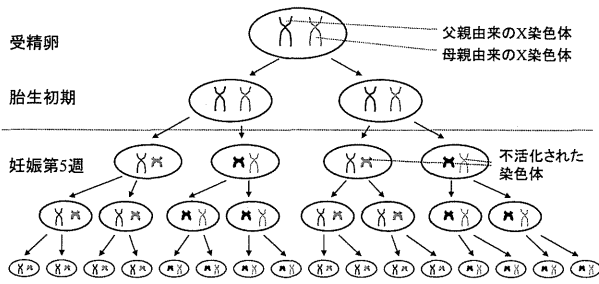


図4-a X染色体の不活化

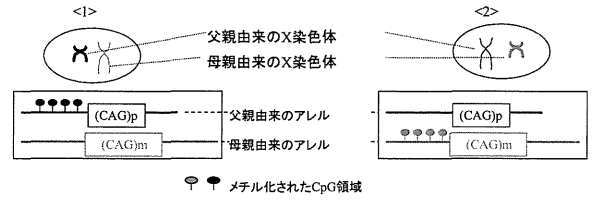


図4-b X染色体の不活化とメチル化

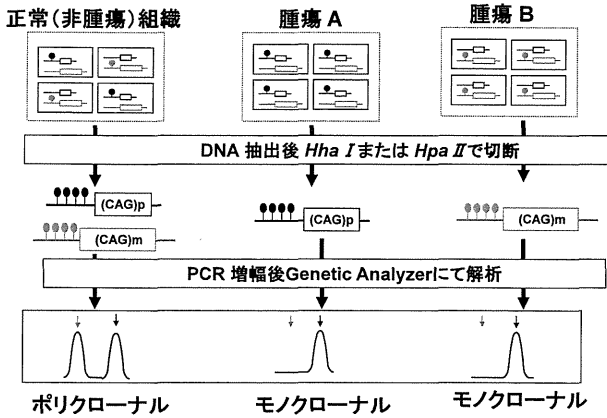


図4-c アンドロゲン受容体遺伝子を利用したクロナリティー解析

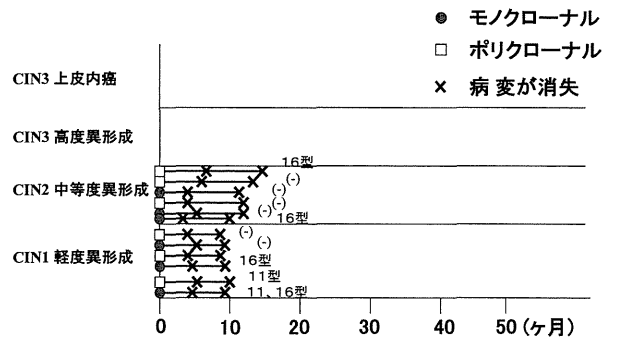


図5-a CIN1/2の経時的推移とクロナリティー、HPVの関連〈消失症例〉

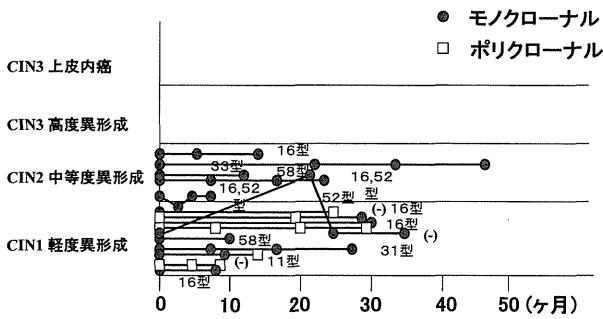


図5-b CIN1/2の経時的推移とクロナリティー、HPVの関連〈持続症例〉

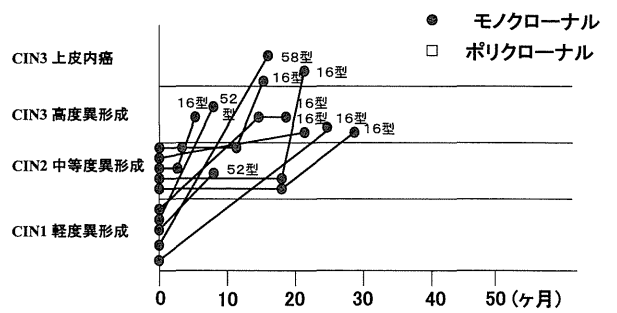


図5-c CIN1/2の経時的推移とクロナリティー、HPVの関連〈進行症例〉

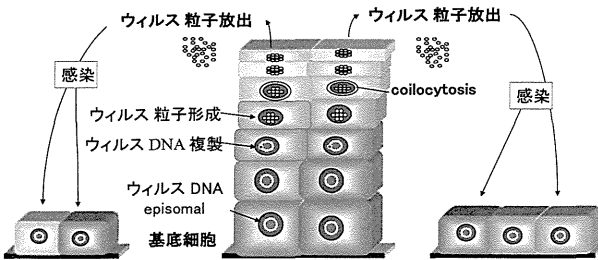


図6-a HPVの感染とポリクローナルな病変

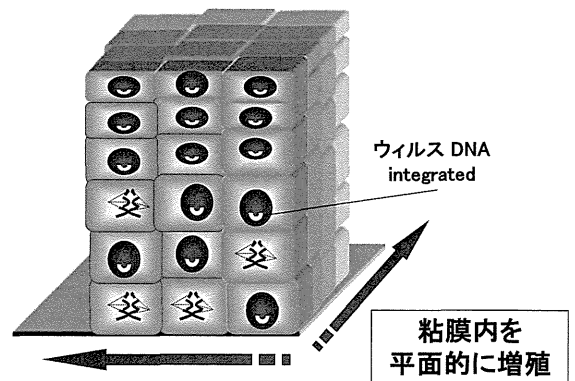


図6-b 高リスク HPVの感染とモノクローナルな病変

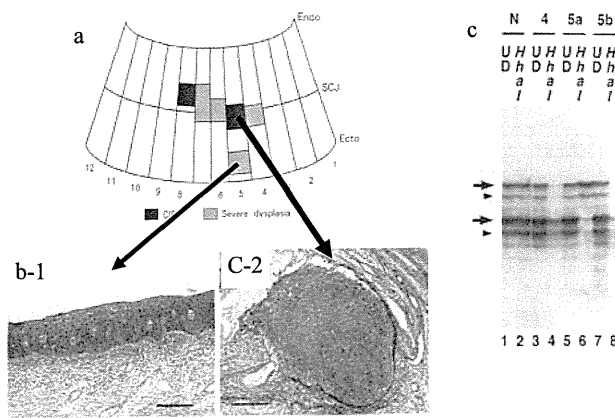


図7 円錐切除標本のクロナリティー解析

防ワクチンには2価ワクチン（グラクソ・スミスクライン社）と4価ワクチン（メルク万有社）がありいずれも16型及び18型の感染を防御することで、16型18型によるCIN2、CIN3、子宮頸がんの発生を予防する。4価ワクチンは16型18型以外に尖圭コンジローマの原因となる6型11型の感染を予防できる。いずれのワクチンも初回接種後3回（2価ワクチンは1、6か月後、4価ワクチンは2、6か月後）投与する。

HPV感染から子宮頸がんの発生まで10年以上かかることと、発がんをエンドポイントとするのは倫理上の問題があるため、ワクチンの有効性を検討する臨床試験は前がん病変（CIN2、CIN3）の発生をエンドポイントとして4価ワクチン（ガーダシル）は15-26歳の12,167人を対象に、2価ワクチン（サーバリックス）は15-25歳の18,644人を対象に大規模な第三相無作為化二重盲検試験が行われている。4価ワクチンはHPV16/18の未感染女性に対して1回目の接種から36か月（平均値）の時点で、ワクチン投与群とプラセボ投与群とを比較して、HPV16/18によるCIN2/3及び上皮内腺がん（AIS）に対して97%の予防効果が認められた<sup>15)</sup>。また、2価ワクチンは1回目の接種から34.9か月（中央値）の時点で、HPV16/18によるCIN2以上の病変に対して93%の予防効果が認められた<sup>16)</sup>。

### HPV ワクチンの問題点

HPVは感染すると一時増殖を経ずに潜伏・持続感染の状態となるので、ワクチンで誘導された抗体は常に生殖器粘膜に存在して、感染を防がな

ければならない。従って、ワクチンによって誘導された抗HPV抗体のレベルが長期間維持されることが重要である。血清中の抗HPV抗体が生殖器粘膜に滲出することでHPV感染を阻害すると考えられているが、接種から20-30年後の40-50歳代の女性での抗HPV抗体の滲出状態も含めて、感染防御に必要な抗体のレベルは現時点では不明である。しかし、2価ワクチンでは接種後6年の時点での血中HPV抗体価は抗HPV16抗体も抗HPV18抗体も自然感染で得られる抗体価の11倍を示したが<sup>17)</sup>、4価ワクチンでは接種後5年で血中抗HPV16抗体は自然感染の数倍程度、抗HPV18抗体は自然感染で得られる抗体価とほぼ同等のレベルまで下がると報告されている<sup>18)</sup>。

ワクチン接種の長期に渡る効果をフォローアップした報告では、2価ワクチンでは15～25才の436人に対しワクチン接種から平均6.4年の時点でHPV16/18陽性のCIN2以上の病変の予防効果は100%、4価ワクチンは16～23才の552人でHPV16/18陽性のCINの予防効果は100%であったが観察症例が少ないために有意とは言えなかった<sup>19, 20)</sup>。これらの成績から、接種から少なくとも5-6.4年後までは、ワクチン型HPVによる子宮頸部前がん病変の発生を予防する効果が持続すると考えられるが、4価のワクチンは接種後5年で血中抗HPV18抗体価が自然感染で得られる抗体価まで下がることから、接種後5年後たってもHPV18の感染が予防できるかについては、今後重要な問題になっていくと考えられる。仮に15才の女兒が4価ワクチンを投与されて20才の時点で抗HPV18抗体価が自然感染で得られる抗体価に下がりその後にHPV18に感染しても、頸がんが発生するのはさらに10年近くかかるわけだから実際にHPVワクチン導入が全人口レベルでの子宮頸がん患者・死亡者の減少につながるかは、今後の長期に渡る調査・検証が必要である。

### HPV ワクチンの中・長期予防効果の検証

上記のようにHPVワクチンの長期的予防効果については世界的にも検証されておらず、まして国内では中期的予防効果についても検証されていない。また、日本の若年女性におけるHPV感染状況についても大規模な調査はされていない。そ

ここで、①本邦における HPV ワクチンの中・長期的予防効果を検証すること、及び②日本の若年女性における現在の HPV 感染状況の把握を目的に、私が大阪大学に在任時に大阪産婦人科医会に所属する大規模疫学研究を立ち上げた。研究名は OCEAN STUDY (Osaka Clinical resEArch of HPV vacciNe) で研究概要を簡単に述べると HPV ワクチン接種者を摂取時に登録し、接種者が20才と25才になった際の子宮がん検診実施時に HPV 検査を行い、その結果を非接種群と比較することにより HPV ワクチンの効果を検証する(図8)。なおこの研究に対しては平成23年度より厚生労働科学研究のがん臨床研究費(日本における子宮頸がん予防 HPV ワクチンの医療経済的評価のための大規模臨床研究 H23-がん臨床-一般-019 研究代表者:榎本隆之)を獲得している<sup>21)</sup>。

## 結び

HPV ワクチンの公費助成が始まり、今後定期接種になる可能性もある。現在新潟県では被接種者の50%が内科で接種されている。接種時に、こ

のワクチンは HPV16型と18型に対するワクチンであるので100%子宮頸がんを防ぐわけではないこと、長期的なワクチンの効果については十分検証されたわけではないので今後も子宮がん検診を受ける必要があることを啓蒙することが必要である。現在9価ワクチンが開発中であり高リスク型 HPV すべてに効果があるワクチンが開発されれば子宮頸がんが撲滅される日がくるのも夢ではないと考える。

## 文献

- 1) Miura S, Matsumoto K, Oki A, et al: Do we need a different strategy for HPV screening and vaccination in East Asia? Int J Cancer 2006; 119: 2713-2715.
- 2) zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002; 2: 342-350.
- 3) Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, et al: Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the

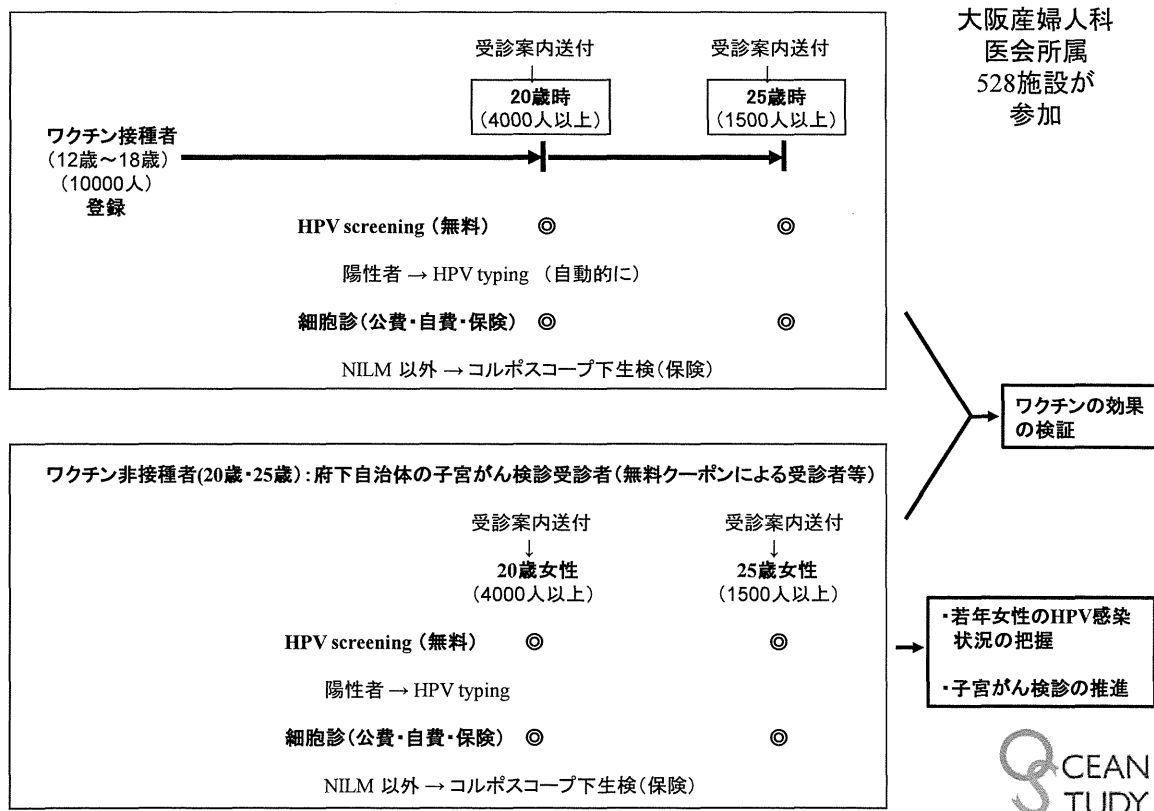


図8 研究概要

- interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 775-784.
- 4) Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al: The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: Natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61: 306-311.
  - 5) Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, et al: Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Brit J Cancer* 1999; 80: 458-467.
  - 6) Munoz N, et al: The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. Lyon IARC (WHO) scientific publications 1992; 119: 1-284.
  - 7) Sharpless NE, Depinho RA: The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 22-30.
  - 8) Kanao H, Enomoto T, Ueda, Y, et al.: Correlation between p14ARF/p16INK4A expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 2004; 213: 31-37.
  - 9) Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al: The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: Natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61: 306-311.
  - 10) Lyon MF: Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 1962; 14: 135-148.
  - 11) Fialkow PJ: Clonal origin of human tumors. *Biochem Biophys Acta* 1976; 485: 283-321.
  - 12) Enomoto T, Fujita M, Inoue M, et al: Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats: carcinomas of the female reproductive tract. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 292-297.
  - 13) Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, et al: Monoclonal expansion with integration of high-risk type human papillomaviruses is an initial step for cervical carcinogenesis: association of clonal status and human papillomaviruses infection with clinical outcome in cervical intraepithelial neoplasia. *Lab Invest* 2003; 83: 1517-1527.
  - 14) Enomoto T, Haba T, Fujita M, et al: Clonal analysis of high-grade squamous Intra-epithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Cancer* 1997; 73: 339-344.
  - 15) FUTURE II Group: Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007; 356: 1915-1927.
  - 16) Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al: Efficacy of human papillomavirus (HPV) -16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA) : final analysis of a 6 double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374: 301-314.
  - 17) Roteli-Martins CM, Naud P, Borba PD: Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 8.4 years of follow-up. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2012; 8: 1-8.
  - 18) Sven-Eric Olsson, Luisa L. Villa, Ronaldo L.R. Costa, et al: Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 4931-4939.
  - 19) Roteli-Martins CM, Naud P, Borba PD,: Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 8.4 years of follow-up. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2012; 8: 1-8.
  - 20) Villa LL, Costa R L R, Petta C°, et al: High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer*



2006; 95: 1459-1466.

- 21) 榎本隆之:『日本における子宮頸癌予防 HPV ワクチンの医療経済的評価のための大規模臨床研究』平成24年度厚生労働科学研究 がん臨床研究成果発表会抄録集, 日本対がん協会 がん臨床研究推進室, 東京, 2012; 247-250.

## 脚注

### 図4 - (a)

女性の細胞には母親由来(赤)と父親由来(黒)のX染色体がある。受精卵および胎生初期には両方のX染色体は活性化しているが、妊娠第5週(胎生16日頃)にはいずれか一方のX染色体はランダムに不活化される。一旦不活化されると、細胞分裂を経ても、不活化される側のX染色体は保持される。

### 図4 - (b)

X染色体の不活化は、X染色体上の遺伝子がメチル化されることによって起こる。X染色体に存在するアンドロゲン受容体(AR)遺伝子のexon 1には90%のヘテロ接合性を示すCAGの繰返し配列(マイクロサテライト領域)、およびその上流にメチル化を受けやすいCpG領域があり、この領域には制限酵素Hha I, Hpa II認識部位が存在している。〈1〉の細胞では父親由来のX染色体が、〈2〉の細胞では母親由来のX染色体が不活化されているが、〈1〉の細胞では父親由来のAR遺伝子のアレルのCpG領域が、〈2〉の細胞では母親由来のAR遺伝子のアレルのCpG領域がメチル化されていることを示している。父親由来と母親由来のアレルはCAGの繰返し配列の長さが異なっている。図では母親由来のアレルの繰返し配列がm個で父親由来のアレルの繰返し配列p個より多いためアレルの長さが母親由来の方が長いことを示している。

### 図4 - (c)

正常組織あるいは非腫瘍組織は母親由来のアレルがメチル化されている細胞と父親由来のアレルがメチル化されている細胞が混在している(ポリクローナル)。しかし、腫瘍はもともと1個の細胞に由来している(モノクローナル)ので、組織中

のすべての細胞では同側のアレルがメチル化によって不活化されている。腫瘍Aでは父親由来のアレルが、腫瘍Bでは母親由来のアレルがすべての細胞においてメチル化によって不活化されていることを示す。組織よりDNAを抽出後、制限酵素Hha IまたはHpa IIで処理すると、不活化(メチル化)されていないアレルは制限酵素で切断されるが、不活化(メチル化)されている側のアレルは制限酵素では切断を受けない。したがって、制限酵素で処理した鋳型DNAをPCR増幅すると、不活化されている側のアレル由来のPCR産物のみができる。PCR産物を電気泳動すると、正常組織あるいは非腫瘍組織では、母親由来のアレルがメチル化されている細胞と父親由来のアレルがメチル化されている細胞が混在しているために、両親由来の2本のバンドが検出される。しかし癌のようなモノクローナルな細胞集合では父親由来あるいは母親由来のアレルのみが増幅され1本のバンドが検出される。腫瘍Aでは父親由来の分子量の小さいアレルのみが、腫瘍Bでは母親由来の分子量の大きいアレルのみが増幅されていることをしめしている。ある個体中の2つの腫瘍が同じ起源かどうかについてクロナリティー解析を行う際、2つの腫瘍が腫瘍Aと腫瘍Bのように異なった不活化のパターンを示した場合は、両方の腫瘍が単一細胞由来ということはありません。したがって両病変は互いに全く関係のない独立した病変と診断できる。逆に2つの腫瘍が単一細胞由来であれば必ず同じ不活化のパターンを示すが、全く関係の無い独立した病変であっても50%の確率で両病変が同じ不活化のパターンを示す。したがって両病変が本当に単一細胞由来かどうかについて断定するには他の遺伝子の検索も必要となる。

### 図5

大阪大学医学部附属病院に子宮頸部細胞診異常で受診した患者に対し、初診時にコルポスコピー下生検を行いCIN 1/2と診断された患者のパラフィンの包埋病理切片から患者の同意の下マイクロディセクション法にて病変を回収し、DNAを抽出、HPVタイピングとクロナリティー解析を行った。患者は3~6か月毎に経過観察し、コルポス

コピーで子宮頸部を観察し、病変があれば再び生検を行った。経過観察中に病変が消失した12例中4例に高リスク HPV が検出された。また12例中6例はモノクローナルな病変、6例はポリクローナルな病変であった(図5-a)。病変が6か月以上、最長で48か月持続した症例15例中11例がモノクローナルな病変、1例は経過観察中にモノクローナルな病変となった。また15例中12例から高リスク HPV が検出された(図5-b)。経過観察中に病変が進行した10症例はすべてモノクローナルな病変を最初から形成しており、すべてから高リスク HPV が検出された(図5-c)

#### 図8

大阪産婦人科医会に所属する病院・医院の計528施設が参加し研究事務局を大阪大学医学部産婦人

科に置き、参加施設で12～18才のワクチン接種者10,000人を摂取時に登録する。登録者は20才と25才時の自治体の子宮がん検診の無料クーポン配布時に HPV スクリーニング検査を無料で施行する。細胞診の結果要精検者にはコルポスコプ下生検を行い HPV スクリーニング検査で陽性者にはタイピング検査を行う。対照群としてはワクチン非接種者が20才と25才時の自治体の子宮がん検診時に HPV スクリーニング検査を無料で実施、HPV 要請者にはタイピング検査を行う。対照群より若年女性の HPV 感染状況が把握でき、またワクチン接種群と対照群を比較することにより、ワクチンを公費助成の下接種した者については接種後4～9年後のワクチンの効果の検証が可能となる。

### 平成24年度がん登録届出状況

1月末現在

区分	4～12月	1月	計	(平成23年度計)
届出件数	15,418	1,337	16,755	22,000
医療機関数	119	40	実医療機関数 120	実医療機関数 116

新潟県・新潟県医師会・新潟県健康づくり財団

