

学位論文内容の要約

愛知学院大学

乙 第 号	論文提出者 Anuudari Erkhembaatar
論文題目 義歯性エプーリス過形成上皮におけるヒトパピロー マウイルスの感染について	

I. 緒言

ヒトパピローマウイルス (HPV) の感染は子宮頸癌およびその前癌病変の最大のリスクファクターである。また、HPV は皮膚または粘膜の上皮に良性腫瘍性病変である乳頭腫あるいは異形成を誘発する。HPV は鎖長約 8,000bp の環状二本鎖 DNA をゲノムとして持ち、正二十面体のキャプシド構造を外殻とする直径約 55nm の小型の DNA ウイルスである。HPV のゲノムの構造はウイルス DNA の複製などに関与する初期遺伝子群 (E 領域) とウイルス外套蛋白をつくる後期遺伝子群 (L 領域) とに大別される。HPV の遺伝子は 8 つの遺伝子から構成されており、E6 と E7 遺伝子が病変の悪性化に関与しているといわれている。これまでゲノム配列の相同性に基づき約 120 種類以上の遺伝子型 (genotype) が見つかり、疫学的にがんとの関連が示される高リスク型 (HR-HPV) と、尖形コンジローマ等の良性病変形成にとどまる低リスク型 (LR-HPV) とに大別されている。また、HPV は皮膚型と粘膜型の分類もあり、それぞれ様々な疾患との関連が示唆されている。

口腔領域においては、扁平上皮癌や上皮内癌などの悪性病変および白板症、口腔乳頭腫、尋常性疣贅、扁平苔癬、巣状上皮性過形成などの良性病変に、HPV が関与していることが報告されている。口腔領域の悪性病変に関しては、HPV-2、3、6、11、13、16、18、31、33、35、52、57 などが、また、良性病変に関しては、HPV-1、2、3、4、6、7、10、11、13、16、18、30、31、32、33、35、45、52、55、57、59、69、72、73 などのタイプが報告さ

れている。特に HR-HPV-16、18、33 は口腔粘膜の悪性病変である扁平上皮癌から多く検出され、LR-HPV-6 と 11 は良性病変の白板症や口腔乳頭腫から多く検出されている。また、近年、中咽頭の HPV 関連疾患、特に扁平上皮癌の発生が増加している。

最近になり、HPV 感染の口腔領域のリザーバーとして歯肉接合上皮が注目されている。また、中高年者の口腔粘膜では義歯の装着が、義歯性エプーリス、義歯性口内炎、フラビーガム、乳頭状過形成などの口腔粘膜疾患の発生に関連しているとの報告がある。これは、義歯装着に伴う口腔内の清掃状態の悪化、義歯による機械的・化学的刺激、義歯床を介したカンジダ感染の他、HPV 感染も要因の一つとして考えられている。そこで、義歯装着の有無が HPV の口腔領域の感染にどのように関与しているのかを検索した結果、義歯装着者の方が未装着者よりも HPV 感染率が高いことが確認された。

義歯性エプーリスには、別名として、義歯線維腫、線維性エプーリス、義歯刺激性過形成等の名称もある。臨床的にも組織学的にも、義歯性エプーリスは、義歯床縁の持続的な刺激と炎症に起因すると考えられている。絶えず義歯より慢性刺激を受けている義歯性エプーリスの過形成上皮では、上皮に創傷が生じやすく HPV 感染の機会が増すことが容易に考えられる。

そこで、本実験では、義歯性エプーリスの過形成上皮における HPV 感染の検索を行い、口腔粘膜における HPV のリザーバーとなっている可能性に

について考えた。また、その過形成上皮の細胞増殖能についても検索を行った。

II. 対象および方法

1. サンプル

実験には、愛知学院大学歯学部附属病院でエプーリスと診断された 118 症例の生検および手術摘出による歯肉粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを使用した。男性 49 症例、女性 69 症例の 118 症例を用いた。対象者の年齢は、20 歳から 91 歳までであり、平均年齢は 64.4 歳であった。また、66% (78/118) が義歯性エプーリスで、34.0% (40/118) は義歯を装着していない患者のエプーリスであった。

また、生検および手術摘出サンプルの中で、正常な歯肉粘膜 12 症例のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを対照として用いた。年齢は、21 歳から 87 歳までであり、平均年齢は 55.0 歳であった。1 症例が、義歯を装着している患者の歯肉で、残りの 11 症例が義歯を装着していない患者の歯肉であった。

2. DNA 抽出

エプーリスと正常歯肉の連続した 6 μ m 切片を 6 枚作製し、最初の 1 枚に HE 染色を施してエプーリスの過形成上皮および正常歯肉上皮を確認した。その後、残りの 5 枚の切片を DNA 抽出に使用した。DNA 抽出は、QIAamp DNA

FFPE Tissue Kit (QIAGEN、東京、日本)を用いて製品のプロトコールに従い行った。

なお、コントロールには、CaSki 細胞を HPV-16、HeLa 細胞を HPV-18 の陽性コントロールとして用いた。また、HPV-6、11 陽性の白板症および HPV-33 陽性の子宮頸癌 (扁平上皮癌) サンプルをそれらのコントロールとした。

3. PCR 解析

HPV 感染の分析は、好感度の HPV DNA の L1 領域を増幅する PCR 法を用いて行った。偽陰性を避けるために、抽出した DNA の量と質の確認を Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA)を用いて行った。さらに、すべてのサンプルについて抽出した DNA の確認のため、 β -globin gene を PCR 法にて増幅して確認した。

第一段階として、コンセンサスプライマーを用いて HPV 感染のスクリーニングを行った。コンセンサス PCR に用いるプライマーとしては、HPV DNA の L1 領域を増幅する GP5/6 と GP5+/6+ を用いた。GP5/6 は、LR-HPV-1、6、8、11、13、30、32 と、HR-HPV-16、18、31、33 を検出する。また、GP5+/6+ は、LR-HPV-6、11、34、40、42、43、44 と、HR-HPV-16、18、31、33、35、39、45、51、52、54、56、58 を検出する。コンセンサスプライマーで陽性となったサンプルには、HPV 型特異的 PCR 法を用いて、口腔粘膜疾患において多く検出されている LR-HPV-6、11 および HR-HPV-16、18、33 を検索した。

4. 病理組織学的・免疫組織化学的検索

PCR 検索で陽性となったサンプルの組織上での HPV タンパクを確認するために、マウスモノクローナル anti-HPV antigen (Clone K1H8, M3528, DAKO, Carpinteria, USA) と EnVision™/HRP method (K1392, DAKO, Carpinteria, USA) を用いて製品のプロトコールに従い、免疫組織化学的に検索を行った。また、すべての対照の正常歯肉も同様に検索した。

5. *in situ* ハイブリダイゼーション

PCR 検索で陽性となったサンプルの組織上で HPV DNA を確認するために、HPV-6、11、16、18、30、31、33、35、45、51、52 を検出する HPV Types Wide Spectrum Biotinylated DNA Probe (Y1404, Dako North America, USA) と Dako *In-situ* Hybridization System for Biotinylated Probes (BCIP/NBT) (K0601, Dako, North America, USA) を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを製品のプロトコールに従い行った。また、すべての対照の正常歯肉も同様に検索した。

6. HPV-16 陽性義歯性エプーリスの細胞増殖能の免疫組織化学的検索

PCR による検索で HPV-16 陽性となった義歯性エプーリス (陽性群) と、陰性であった義歯性エプーリス (陰性群)、および義歯を装着していない患者からの HPV 陰性エプーリス (対照群) の過形成上皮の細胞増殖能を免疫組織化学的に検索した。抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (PC10) (DAKO, Glostrup, Denmark) と EnVision™/HRP method (K1392, DAKO, Carpinteria, USA) を使用して、陽性群と陰性群および対照群の各

10 症例を製品のプロトコールに従い染色した。また、1 症例において任意の 5 ヶ所における上皮細胞 1,000 細胞あたりの陽性細胞数を確認した。

7. 統計学的解析

統計学的解析には、フィッシャーの直接確率検定法ならびに、一元配置分散分析とそれに続く多重比較を用いた。危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. エプーリス過形成上皮の HPV 解析

本研究の結果、コンセンサス PCR における HPV 陽性率は、全サンプルの 16.9%(20/118)であった。性別で見た HPV 陽性率は、男性 14.3%(7/49)、女性 18.8%(13/69)であり、有意差は認められなかった。義歯性エプーリスの HPV 陽性率は 23.1%(18/78)で、義歯を装着していない患者のエプーリスでは 5.0%(2/40)であり、フィッシャーの直接確率検定を行ったところ両者の間には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。対照群の正常歯肉では、すべての症例で HPV 感染はみられなかった。

HPV のタイプ別でみると、義歯性エプーリスでは HPV-11 が 38.9% (7/18)、HPV-16 が 66.7% (12/18)、HPV-18 が 5.6% (1/18)であった。また、2つの症例では HPV-11 と HPV-16、および HPV-16 と HPV-18 がそれぞれ重複感染していた。義歯を装着していない患者のエプーリスでは HPV-16 と HPV-18

が各々 1 症例ずつ認められた。陽性率の最も高かったタイプは HPV-16 であった。

病理組織学的には、義歯性エプーリスおよび義歯を装着していない患者からのエプーリス共に、上皮に過剰角化、棘細胞増殖、上皮突起の延長が認められた。免疫組織化学的検索では、HPV 陽性の義歯性エプーリスおよび義歯を装着していない患者からのエプーリス共に、上皮の細胞核に anti-HPV antigen 陽性像が認められた。また、*in situ* ハイブリダイゼーションでは、HPV 陽性の義歯性エプーリスおよび義歯を装着していない患者のエプーリス共に、上皮全層にわたり上皮の細胞核に HPV Types Wide Spectrum Biotinylated DNA Probe による陽性像がみられた。

2. HPV-16 陽性義歯性エプーリスの細胞増殖能

HPV-16 陽性義歯性エプーリス（陽性群）の上皮では、基底細胞層から上部の棘細胞層まで、多くの細胞核に PCNA 陽性像が認められた。HPV 陰性であった義歯性エプーリス（陰性群）では、陽性群と比較して PCNA 陽性像は少なく基底細胞層付近にみられた。また、対照群では、陰性群と同様な所見を示し、その数は少なかった。1,000 細胞あたりの PCNA 陽性細胞数は、陽性群では 113.3 ± 4.4 、陰性群では 57.3 ± 2.2 、対照群では 46.9 ± 4.7 となり、一元配置分散分析とそれに続く多重比較を行ったところ、各群の間で有意な差が認められ ($p < 0.01$)、陽性群では陰性群や対照群に比べ、陽性細胞数は多かった。

IV. 考察

本実験の結果は、義歯装着者の方が HPV 感染率が高いとの結果であり、口腔内清掃の不良や義歯による慢性的な口腔粘膜への機械的刺激・化学的刺激などが HPV 感染率上昇の要因として考えられた。

また、これまでの報告では、義歯装着者では、悪性型である HPV-16 がより多く検出され、義歯の装着が口腔粘膜疾患、特に悪性病変に関与していることが推測されると述べている。本実験の結果も、義歯性エプーリスにおいて HR-HPV である HPV-16 が最も感染率が高く、これらの結果を裏付けるものであった。

HPV は上皮の増殖が可能な基底細胞に感染すると考えられている。このためには、皮膚や粘膜に外傷などが生じて角化層が破れ、そこからウイルス粒子が侵入し基底細胞層に至る必要がある。また HPV は、基底細胞への感染が成立した後、感染細胞が基底細胞層を離れ有棘細胞層の中ほどまで分化・増殖する間は、ウイルスのコピー数が約 20~50 に維持される特異なライフスタイルを持っている。この持続感染の形成には、ゲノムの増幅と感染細胞への適度な増殖刺激が必要である。感染細胞が顆粒層に達して終末分化に近づくと、HPV は細胞あたり数百から数千コピーまで急激に増幅し、細胞が破壊されることなく成熟したウイルス粒子は角化層に遊離されることが考えられている。義歯装着と HPV 感染の関連において、これらの HPV 感染

の特異性を考えると、義歯と口腔粘膜との摩擦や不適合義歯の辺縁の刺激によって口腔粘膜上皮が損傷されやすいために、義歯装着者では未装着者に比べて口腔粘膜に HPV が侵入・感染する機会が多くなることが推測される。さらに、義歯性エプーリスにおいては、通常の口腔粘膜より外方性に増殖したエプーリスを覆う過形成上皮が、多くの慢性の刺激と炎症を被るため、角化層の破壊に伴う HPV の侵入が起き易くなり、基底細胞に感染する機会が増すことが容易に予想される。また、上記のように持続感染の為には、ゲノムの増幅と感染細胞への適度な増殖刺激が必要であるが、義歯性エプーリスの過形成上皮において慢性の刺激と炎症がその役割も果たしていると思われる。

PCNA は DNA 複製に関与し、盛んに増殖している細胞の核に多く発現することが知られており、口蓋の炎症性の乳頭状過形成でも PCNA の発現が有意に高かったと報告されている。近年、子宮頸部および咽頭の扁平上皮癌において、HPV が PCNA の発現を直接的に高めることが報告されている。本研究においても、HPV-16 陽性群では、陰性群や対照群に比べ有意に PCNA 陽性率が高い結果となった。これは、義歯性エプーリスの過形成上皮は正常上皮よりも増殖能が高く、中でも HPV-16 感染を起こしている過形成上皮が最も増殖能が高いことを意味し、HPV-16 の持続感染を起こすための適度な増殖刺激が感染細胞に加わっていることを示唆している。

本実験から、絶えず義歯より慢性刺激を受けている義歯性エプーリスの

過形成上皮は、HPV-16 等の高リスク型 HPV 感染が起きやすく、義歯性エプーリスの過形成上皮が HPV 感染のリザーバーとして、口腔領域および中咽頭の HPV 関連疾患、特に扁平上皮癌等の発生に関与している可能性が考えられた。今後は、義歯に関連する粘膜疾患、特に義歯装着に関連する扁平上皮癌等の悪性疾患に HPV 感染がどのように関与しているかについて、より多くの症例数を用い、義歯性エプーリスに感染している HPV の型と、同一口腔・咽頭領域に発生した扁平上皮癌から検出された HPV の型が一致するかどうかを調べる等の疫学的調査を行い、義歯装着等を含めた口腔内環境と HPV 感染の関係を明らかにし、HPV 関連口腔疾患の予防・治療に貢献できる歯科医療を行う必要があると考えられた。

V. 結論

本研究では義歯性エプーリス過形成上皮の HPV 感染について、PCR 法、病理組織学的・免疫組織化学的方法、*in situ*ハイブリダイゼーション法により検索を行った。また、その過形成上皮の細胞増殖能についても検索を行った。

その結果、絶えず義歯より慢性刺激を受けている義歯性エプーリスの過形成上皮には、HPV 感染が起きやすく、義歯性エプーリスの過形成上皮が HPV 感染のリザーバーとなり、口腔領域および中咽頭の HPV 関連疾患、特に扁平上皮癌等の発生に関与している可能性が考えられた。今後、義歯性エ

(内 容 の 要 約)

No. 11

愛知学院大学

プーリスと、同一口腔・咽頭領域に発生した扁平上皮癌からそれぞれ検出された HPV の型が一致するかどうかの検索等による、詳細な検討が必要である。