

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 720 号	論文提出者 河合 遼子
論文題目 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移におけるヒトパ ピローマウイルス-16 型感染について	

I. 緒言

近年、喫煙や飲酒を主病因とする口腔扁平上皮癌 (OSCC) の発生率は減少傾向にあるが、若年者の OSCC や中咽頭扁平上皮癌(OPSCC)の発生率は増加傾向にある。これら腫瘍の発生率増加には上記の主病因以外の関与が考えられており、ヒトパピローマウイルス (HPV) も病因の一つとして知られている。

HPV は約 120 種類以上の遺伝子型が見つかっており、疫学的に癌と関連が示される高リスク型 (HR-HPV) と、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。特に HR-HPV-16 型は OSCC から多く検出される。

OSCC において、頸部リンパ節転移の有無は重要な予後推測因子であり、頸部リンパ節転移の病態を把握することは、適切な治療計画を選択するためには非常に重要である。しかしながら、現在までに HPV 感染と OSCC の頸部リンパ節転移に関連する報告はみられない。そこで、本研究では OSCC 原発巣と頸部リンパ節転移巣の HPV-16 型感染の検索を行った。さらに、OSCC における HPV-16 型感染と細胞増殖能の関連についても評価した。

II. 対象および方法

1. OSCC 原発巣および頸部リンパ節転移巣サンプル

愛知学院大学歯学部附属病院にて、病理診断により扁平上皮癌と診断された 130 症例を使用し、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC 100 症例、頸部リンパ節転移がみられた OSCC 30 症例の原発巣・頸部リンパ節転移巣を対象とした。また、使用した症例の組織分類は全て WHO 分類・grade 1 の高分化型扁平上皮癌であった。

2. DNA 抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋処理された組織の連続した 4 μ m 切片 5 枚から DNA を抽出した。

3. PCR 解析

コンセンサスプライマーを用いて HPV 感染スクリーニングを行い、HPV 陽性となった症例を用いて、HPV-16 型の型特異的 PCR を行った。

4. 病理組織学的検索および免疫組織化学的検索 (IHC)

PCR 検索において HPV-16 型陽性と判定された症例の組織上で HPV タンパクを確認するために、Monoclonal Mouse Anti-HPV を使用し IHC を行った。また、HPV のマーカーである p16 INK4A の抗体として CDKN2A / p16 INK4A Rabbit anti-Human Polyclonal (aa50-150) Antibody を使用した。

5. in situ ハイブリダイゼーション (ISH)

PCR 検索にて HPV-16 型陽性と判定された症例の組織上で HPV DNA を確認するために、GenPoint™ HPV in situ Hybridization System for Biotinylated Probe と HPV Types 16/18 Biotinylated DNA Probe を使用し ISH を行った。

6. HPV-16 型陽性および陰性 OSCC の細胞増殖能の IHC

細胞増殖活性の指標となる Ki-67 および Topoisomerase II α の IHC を行った。頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC HPV-16 型陽性群と陰性群、頸部リンパ節転移が認められた OSCC HPV-16 型陰性群の各 10 症例と頸部リンパ節転移が認められた OSCC HPV-16 型陽性群 8 症例を免疫染色し、1 症例につき任意の 5 ヶ所における 1,000 腫瘍細胞あたりの陽性細胞数

を検索した。

7. 統計学的解析

HPV-16 型陽性率の解析では、カイ 2 乗検定法を使用し、期待値が 5 以下の場合はフィッシャーの直接確率検定法を使用した。また、OSCC の細胞増殖能の IHC においては、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. OSCC 原発巣および頸部リンパ節転移巣の HPV 解析

OSCC 原発巣の HPV-16 型陽性率は、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC 原発巣では 43.0% (43/100 例)、頸部リンパ節転移がみられた症例の OSCC 原発巣では 26.7% (8/30 例) と少なかったが、有意な差はみられなかった。さらに、頸部リンパ節転移がみられた 30 症例のうち原発巣で HPV-16 型陽性であった 8 症例において、3 症例(10.0%)は、原発巣と頸部リンパ節転移巣の両部位で HPV-16 型陽性を示し、5 症例(16.7%)は、原発巣のみで HPV-16 型陽性であった。この結果より、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC 原発巣の HPV-16 型陽性率は、頸部リンパ節転移がみられた OSCC 原発巣のみの陽性率や、原発巣・頸部リンパ節転移巣の両部位陽性率よりも、有意に高かった ($p < 0.05$)。

IHC においては、腫瘍細胞の核に HPV 陽性像が認められ、また、細胞質に p16 INK4A 陽性像が観察された。p16 INK4A の陽性率は、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC 原発巣：90.7% (39/43 例)、頸部リンパ節転移がみられた OSCC 原発巣：87.5% (7/8 例)、頸部リンパ節転移巣：66.7% (2/3 例)であった。

ISH においては、多くの症例で腫瘍細胞の核内にびまん性の陽性像を示す宿主細胞のゲノムに組み込まれていない DNA エピゾームの状態が確認された。

2. HPV-16 型陽性および陰性 OSCC の細胞増殖能

1) Ki-67

頸部リンパ節転移の有無に関わらず HPV-16 型陽性群の方が陰性群に比べ Ki-67 陽性像が多く認められたが、有意な差はみられなかった。

2) Topoisomerase II α

頸部リンパ節転移の有無に関わらず HPV-16 型陽性症例の方が陰性症例に比べ Topoisomerase II α 陽性像が多く認められた。頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC の HPV-16 型陽性群と陰性群の間に有意な差がみられた ($p < 0.01$)。

IV. 考察

頸部リンパ節転移の発生率は、OSCC と OPSCC において、25～65%と報告されている。Joo らは、OPSCC の頸部リンパ節転移のある症例では、転移のない OPSCC 症例と比べ、HR-HPV の陽性率が有意に高かったが、OSCC 症例においては、差が認められなかったと報告している。本研究の HPV-16 型陽性率は、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC に高い傾向が認められた。また、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC 原発巣の HPV-16 型陽性率は、頸部リンパ節転移がみられた OSCC 原発巣のみの陽性率や、原発巣・頸部リンパ節転移巣の両部位陽性率よりも、有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの結果より、HPV-16 型陽性 OSCC は、陰性症例と比較し、頸部リンパ節転移を起こすリスクは低いことが判明した。これは、リンパ節転移を有する方が HPV 陽性率が高いという OPSCC の結果とは異なっていた。しかし、我々の ISH

の結果より、HPV-16 型陽性 OSCC のほとんどで HPV DNA がエピゾームの状態であることが確認され他の HPV 関連疾患と異なり、E 6 および E 7 遺伝子の発現は比較的高くないと考えられ、OSCC における頸部リンパ節転移のリスクが低い可能性が考えられた。

Weinberger らは、HPV 陽性で p16 INK4A を発現している頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) は再発率が低く、予後が良好であることを報告した。さらに、p16 INK4A の過剰発現は、放射線感受性との関連が認められ、p16 INK4A 陽性 HNSCC 症例の放射線治療において治療効果が高いことが報告されている。HPV の E 7 遺伝子による RB 遺伝子の不活化は p16 INK4A の蓄積を引き起こすため、p16 INK4A の高発現は E 7 遺伝子の高発現を反映していると報告されている。本研究で行った IHC では、HPV-16 型陽性症例の p16 INK4A 免疫染色で、陽性像が多く観察された。この結果より、OSCC における HPV-16 型陽性症例でも、HPV に関連した HNSCC と同様に良好な予後が予想される。

Ki-67 は、腫瘍の悪性度と正の相関が見られるため、腫瘍組織における増殖細胞を検出するマーカーとして利用されている。Linxweiler らは、HPV 陽性 HNSCC では、HPV 陰性 HNSCC より p16INK4a および Ki-67 の陽性率が高かったと報告している。本研究においても、頸部リンパ節転移の有無に関わらず、HPV-16 型陽性症例の方が陰性症例に比べて陽性細胞数が多かった。

Topoisomerase II α は、正常細胞および腫瘍細胞にみられる細胞増殖と DNA 修復に関連した細胞周期関連タンパクであり、腫瘍性病変よりウイルス感染関連病変で活性が高くなると報告されている。本研究においても、頸部リンパ節転移が認められなかった OSCC において、HPV-16 型陽性群に多く陰性群との間に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。一方、頸部リンパ節転移がみられた OSCC では、HPV-16 型陽性症例の方が陰性症例に比べて陽性細胞数が多かったが、有意な差はみられなかった。

これらの結果より、HPV-16 型感染により OSCC の細胞増殖活性は上昇するが、頸部リンパ節転移との関連は低いと考えられた。

V. まとめ

子宮頸癌の原因として広く知られる HPV は、近年、喫煙や飲酒などの習慣の減少に伴い、主病因に変わる OSCC の重要な病因と考えられ、HPV 感染に関連した口腔粘膜疾患の発生は増加傾向にある。特に、若年者の OSCC の発生率は増加傾向にある。OSCC において、頸部リンパ節転移の有無は重要な予後推測因子であり、頸部リンパ節転移の病態を把握することは、適切な治療計画を選択するために非常に重要である。しかし、HPV 感染と OSCC の頸部リンパ節転移について、現在までに報告は認められない。そこで、本研究では、OSCC 原発巣と頸部リンパ節転移巣の HPV-16 型感染について、PCR 解析に加えて、IHC および ISH により検索を行った。PCR 解析の結果、OSCC および頸部リンパ節転移巣における HPV-16 型陽性率は、頸部リンパ節転移がみられた症例の OSCC 原発巣および頸部リンパ節転移巣では少なかった。特に頸部リンパ節転移巣で HPV-16 型感染は最も低かった。さらに、ISH では HPV-16 型陽性 OSCC のほとんどで HPV DNA がエピゾームの状態であることが確認された。以上のことから、OSCC では HPV-16 型陽性症例は頸部リンパ節転移のリスクが低い可能性が示唆された。さらに、OSCC における HPV-16 型感染の検索は頸部リンパ節転移リスクの指標と成り得ることが考えられた。