

氏 名（本籍） ^{たか}高 ^の野 ^{ただ}忠 ^お夫

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 3 1 3 8 号

学位授与年月日 平 成 10 年 9 月 9 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 平 成 2 年 3 月 28 日
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 子宮頸癌発生・進展過程における Human papilloma
virus (HPV) 感染とアポトーシスおよび増殖能
の topographic analysis

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 矢 嶋 聰 教授 名 倉 宏

教授 堀 井 明

論文内容要旨

【目 的】

子宮頸癌発生の自然史は、扁平上皮内病変 (squamous intraepithelial lesion ; SIL) から上皮内癌を経て浸潤癌へ至る経路が推定されている。近年このような子宮頸部の carcinogenesis に関しては、human papilloma virus (HPV) 感染とその他の複数の発癌因子が複合的に関与していると考えられている。アポトーシスは自発的、能動的な細胞死であり、細胞増殖と生体の恒常性維持に密接に関連することから、近年 carcinogenesis においてもその意義が注目されている。

そこで、今回子宮頸癌発生・進展過程におけるアポトーシスの役割を明らかにするために、アポトーシスとその関連遺伝子蛋白および細胞増殖能の発現を検討し、あわせて HPV 感染との関連性も検討した。

【対 象】

子宮頸部微小浸潤癌 (microinvasive squamous cell carcinoma ; MIC) 症例で正常子宮頸部扁平上皮 (normal squamous epithelium ; NE), 軽度扁平上皮内病変 (low grade squamous intraepithelial lesion ; LSIL), 高度扁平上皮内病変 (high grade squamous intraepithelial lesion ; HSIL) のすべての病変を同時に併せ持つ手術時摘出標本 25 例を対象とした。10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 3 μ m 連続薄切切片を作製した。

【方 法】

1. アポトーシス細胞の検出は組織上の DNA fragmentation の認識する TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を用いた。2. 増殖相細胞の検出には抗 Ki-67 を、またアポトーシス関連因子として抗 bcl-2 および抗 p53 抗体を用い、streptavidin-biotin-peroxidase 法にて免疫組織化学染色を行った。いずれも抗体は 50 倍希釈とし、オートクレーブによる抗原賦活化を行った。3. アポトーシスの評価は、断片化 DNA (アポトーシス) を認める細胞比率 (apoptotic index) を、免疫組織化学染色の評価は増殖細胞比率 (Ki-67 index), bcl-2 index および p53 index を算出して行った。各 index の算出は正常扁平上皮または病変部において各 3 カ所以上を検鏡し、500 個以上の細胞中に占める陽性細胞数の平均値の百分率とした。4. HPV DNA 検出には、HSIL および MIC 病変から microdissection 法により得られた組織より DNA を抽出し、L1 領域のコンセンサスプライマーを用いて PCR 法を施行した。さらに DNA 検出例では、restriction fragment length polymorphism 法により型判定を行った。

【結 果】

1. HPV DNA は、19 例 (19/25 ; 76%) に認め 16 型が 9 例 (9/19, 47.4%) であった。
2. 全体では、apoptotic index は病変の進行に伴い減少し ($p < 0.0003$), 一方 Ki-67 index は増加した ($p < 0.0001$)。bcl-2 index は病変の進行に伴い増加した ($p < 0.0002$)。しかし、p53 index は病変の進行との相関は認めなかった。なお、HSIL・MIC 間には apoptotic index, Ki-67 index, bcl-2 index, そして p53 index いずれにおいても各 index に差を認めなかった。
3. HPV 陽性群 (19 例) と HPV 陰性群 (6 例) に分けて各 index を比較すると、両群とも apoptotic index, Ki-67 index, そして bcl-2 index は病変の進行に伴い変化し、全体と同様の結果であった。4. ただし、p53 index のみは HPV 陽性群では病変の進行と無関係であったのに比し、HPV 陰性群では病変の進行に伴い増加し、HPV の有無による違いがみられた。

【結 論】

1. 子宮頸部病変の進行に伴い、アポトーシスは減少し、増殖能および bcl-2 発現は増加した。
2. p53 発現は、HPV 陽性群では病変の進行との関係はなく、HPV 陰性群でのみ病変の進行に伴って発現が増加した。3. 子宮頸部病変の発癌過程では以下のようなメカニズムが推測された。
1) HPV DNA 陽性の場合、DNA 傷害を受けた細胞は、p53 と HPV E6 関連蛋白が結合することにより分解され G₁ arrest が起こらず修復不十分のまま DNA が分裂を繰り返す。また bcl-2 過剰発現がアポトーシスを抑制しさらに細胞増殖を促すことにより異型細胞、癌細胞出現につながる。2) HPV DNA 陰性の場合、HPV 陽性群と比較して p53 が過剰発現する。この p53 は主に変異型であると考えられるが、仮に野生型であるとしても bcl-2 過剰発現によりその機能が失われ、アポトーシス抑制による細胞増殖、そして他の因子との複合的作用も相まって異型細胞、癌細胞出現につながるのではないか。

審査結果の要旨

子宮頸癌発生の自然史は、扁平上皮内病変 (squamous intraepithelial lesion ; SIL) から上皮内癌を経て浸潤癌へ至る経路が推定されている。現在このような子宮頸部の carcinogenesis に関しては、human papilloma virus (HPV) 感染とその他の複数の発癌因子が複合的に関与していると考えられている。一方、アポトーシスは、自発的・能動的な細胞死であり、細胞増殖と生体の恒常性維持に密接に関連することから、近年 carcinogenesis においてもその意義が注目されている。

本研究では、子宮頸癌発生とその進展過程を解明することを目的として、正常子宮頸部扁平上皮 (normal squamous epithelium ; NE)、軽度扁平上皮内病変 (low grade SIL ; LSIL)、高度扁平上皮内病変 (high grade SIL ; HSIL)、子宮頸部微小浸潤癌 (microinvasive squamous cell carcinoma ; MIC) のすべての病変を同時に併せ持つ症例を対象に、増殖能、アポトーシスおよびその関連因子 (bcl-2, p53) などの免疫組織学的な検索を行い、あわせて HPV 感染との関連性も検討した。

本研究により、子宮頸部病変の進行に伴い、HPV 陽性群・陰性群共にアポトーシスは減少し、増殖能および bcl-2 発現は増加すること、また p53 発現は、HPV 陽性群では病変の進行に無関係であるのに対し、HPV 陰性群では病変の進行に伴って増加することが明らかになった。

この結果から、HPV 感染子宮頸部病変では、DNA 障害により増加する p53 は、HPV E6 により分解される。その結果、G1 停止が起これば修復不十分のまま障害を受けた細胞が増殖を続ける。また bcl-2 過剰発現がアポトーシスを抑制しさらに細胞増殖が促され、前癌病変あるいは浸潤癌への形質転換が起こりやすい環境となっていることが考えられる。また、HPV 非感染上皮で前癌病変あるいは浸潤癌へと進展する例では、DNA 損傷を受けると p53 が増加する。大部分は変異型と考えられるが、たとえ野生型であっても bcl-2 過剰発現により正常の p53 機能が抑制され、他の因子との複合的作用も相まって前癌病変あるいは浸潤癌への形質転換が起こることが考えられた。

以上本研究は、同一検体内に NE, LSIL, HSIL, MIC のすべての病変を同時に併せ持つ症例を対象にした初めての系統的な比較検討であり、HPV DNA の有無により子宮頸癌発生・進展過程に違いがある可能性を示唆している。今後、さらなる検討を加えることにより、子宮頸部細胞診、子宮頸部病変の管理法、また子宮頸癌の予後推定などへの応用が期待され、学位に十分値するものと判断される。