

頭頸部扁平上皮癌におけるヒトパピローマウイルスと染色体欠失に関する検討

林 研 一

Detection of Human Papillomavirus (HPV), and Chromosomal Deletion in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck

Ken-ichi Hayashi

(平成6年1月27日受付)

緒 言

近年、ヒト子宮頸癌¹⁻³⁾や陰茎癌⁴⁾などの発生因子としてヒトパピローマウイルス(以下、HPVと略す)の関与が注目されている。HPVは、その塩基配列の相同性により分類され、これまでに60以上の型のHPVが分離されているが、子宮頸癌においては、その80%以上の症例にHPV DNAが認められ⁵⁾、また、HPV 16型、HPV 18型の初期遺伝子領域 E6 および E7 の導入により、マウスやラット株細胞は完全にトランスフォームし⁶⁻⁸⁾、ヒト線維芽細胞や角化細胞は不死化する⁹⁾ことが証明されている。

ところで、ヒト頭頸部扁平上皮癌と HPV 感染との関連性についても、主に免疫染色法^{10,11)}や *in situ* ハイブリダイゼーション法¹²⁻¹⁶⁾による結果が報告されているが、その詳細な検討を行うためには、その他の分子生物学的手法を用いた解析が必要である。これまでも、サザンハイブリダイゼーション法^{17,18)}や polymerase chain reaction (以下、PCR と略す)法¹⁹⁻²¹⁾を用いた報告も見られるが、これらの報告では検討例数が少なく、頭頸部扁平上皮癌における HPV の関与を明らかにしたとは言い難い。そこで本研究では、主にホルマリン固定・パラフィン包埋された頭頸部(喉頭、舌、歯肉、頬、上顎洞、口底、口唇)扁平上皮癌組織から DNA を抽出し、組織中の HPV DNA の存在を検出するのに極めて高感度な PCR 法を用いて検

し、ヒト頭頸部扁平上皮癌の発生に HPV が関与する可能性を検討することにした。

また、HPV が高率に検出される子宮頸癌では、3 番染色体短腕の欠失が100%の症例に認められ²²⁾、また、大腸癌²³⁻²⁵⁾、胃癌²⁶⁾、肺小細胞癌²⁷⁾などでも、特定の染色体の欠失が高頻度に認められており、これら染色体の欠失は癌化に密接に関わる変化であると考えられている。しかし、これまで口腔癌における染色体の欠失に関する報告はないため、本研究では、子宮頸癌の100%の例で欠失が報告されている3番染色体短腕²²⁾と、各種の腫瘍において最も共通して欠失の認められている17番染色体短腕²⁴⁻²⁷⁾について、口腔癌における染色体欠失の有無を検討した。

材料ならびに方法

頭頸部扁平上皮癌における HPV DNA の検索と口腔扁平上皮癌における染色体欠失についての検討の2つに大別し記載する。

I. 頭頸部扁平上皮癌におけるヒトパピローマウイルス DNA の検索

頭頸部扁平上皮癌組織より DNA を抽出し、PCR 法²⁸⁾を用いて、組織中の HPV DNA の存在を検索し、頭頸部扁平上皮癌の発生における HPV の関与について検討した。本研究で検索した HPV の型は、乳頭腫や尖圭コンジローマなどの良性病変に認められる HPV 6 型と11型、また、子宮癌や陰茎癌等の悪性病変に高頻度に検出される HPV 16型と18型であり、それぞれの型の HPV に特異的なプライマーを用いて検索した。

広島大学歯学部口腔外科学第二講座(主任:石川武憲教授)本論文の要旨は平成4年4月の第46回日本口腔科学会総会、および平成4年11月の第37回日本口腔外科学会総会において発表した。

1. 研究材料

ヒト頭頸部扁平上皮癌77例の癌組織を研究対象とし、HPV DNA の検索を行った。その内訳は、喉頭癌9例、舌癌25例、歯肉癌22例、頬粘膜癌7例、上顎洞癌7例、口底癌6例、口唇癌1例である。また、舌癌の2例、歯肉癌の4例、口底癌の2例では、リンパ節転移巣について検討した。さらに、対照として正常歯肉組織10例について同様の手法により検索を行った(表1)。

表1 DNA 抽出を行った症例の部位別分類内訳

	No. of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues	No. of fresh tissues	Total
Carcinomas			
Larynx	9	0	9
Tongue	19	6	25
Gingiva	18	4	22
Cheek	7	0	7
Maxillary sinus	7	0	7
Oral floor	6	0	6
Lip	0	1	1
Total	66	11	77
Normal			
Gingival tissue	0	10	10

材料には、手術時に採取しホルマリン固定・パラフィン包埋した組織を主に用いたが、一部の例については、手術時あるいは剖検時に採取し、直ちに液体窒素で凍結し、 -80°C で保存していた新鮮凍結材料を用いた。

2. 実験方法

(1) DNA の抽出法

ホルマリン固定・パラフィン包埋組織からの DNA の抽出は、Goelz ら²⁹⁾ の方法に改良を加えた方法で行った(表2)。一部の症例では新鮮凍結材料から DNA の抽出を行ったが、その抽出法は、組織の細切後、表2に示す抽出法の3. 以後に記載した方法に従った。

(2) PCR 法

前述の方法で抽出した DNA は、まず、internal control として cellular gene である β -globin 遺伝子が、PCR 法により増幅されることを確認した。PCR の条件を表3に示した。 β -globin 遺伝子が増幅されなかった例は、検索対照より除外し、増幅された例についてのみ HPV DNA の検索を行った。

検索した HPV の型は、HPV 6型、11型、16型、お

表2 ホルマリン固定・パラフィン包埋切片からの DNA 抽出法

1. Cut embedded tissue with microtome
2. Dewax with xylene and trim the sections
3. Dissolute in SDS-Proteinase K solution (SDS-Proteinase K solution: $1 \times \text{SSC}$, 1% SDS, 0.1 mg/ml Proteinase K)
4. Incubate for 24~48 h at 48°C
5. Extract DNA with phenol-chloroform method
6. Precipitate with ethanol
7. Redissolute the pellet in $10 \mu\text{g/ml}$ RNase solution
8. Incubate for 1 h at 37°C
9. Repeat 5.-6.
10. Redissolute the pellet with Tris-HCl (pH 7.5)

表3 PCR 法の条件

PCR 反応液	
Template DNA	0.1 μg
Primer (sense, anti-sense)	each 100 pmol
dNTP	each 200 μmol
Reaction buffer	
<i>Taq</i> polymerase	2.5 U
PCR cycle (40 cycles)	
Denaturation	at 92°C for 1 min
Annealing	at 55°C for 2 min
Extention	at 72°C for 2 min

び18型である。抽出した DNA 0.1 μg を鋳型とし、それぞれの型の HPV の塩基配列³⁰⁻³³⁾ に特異的なプライマー(表4)を用い、各型ごとに PCR 法(表3)を行なった。なお、HPV 6型、11型については、Genemed Biotechnologies 社製、HPV 16型、18型については、湧永製薬社製のプライマーを用いた。組織中の HPV DNA の有無は、反応液の1/10量を3%アガロースゲル(NuSieve 3:1 agarose; Pharmacia 社製)で電気泳動後、エチジウムブロマイドにより染色を行い、使用したプライマーから予想されるサイズの増幅産物の有無により判断した。

(3) サザンハイブリダイゼーション法

HPV DNA を検索した症例の一部では、その増幅産物が目的とした HPV DNA の増幅産物であることを確認するために、サザンハイブリダイゼーション法を用いてさらに検討した。サザンハイブリダイゼーション法には、Japan Cancer Research Resources Bank (以下、JCRB と略す)を通じ供与されたそれぞれの型の HPV DNA をプローブとして用いた。

表4 HPV 遺伝子の増幅に用いたプライマー

	Sequences (5'-3')	Base position
HPV 6 E6		
sense primer	AGACCAGTTGTGCAAGACGTTTAA	140-163
anti-sense primer	GCACGTCTAAGATGTCTTGTTTAG	379-402
HPV 11 E6		
sense primer	AGACCAGTTGTGCAAGACGTTTAA	140-163
anti-sense primer	AAGGGAAAGTTGTCTCGCCACACA	260-283
HPV 16 E7		
sense primer	GCAACCAGAGACAACACTGATC	606-625
anti-sense primer	ATTGTAATGGGCTCTGTCCG	701-720
HPV 18 E7		
sense primer	TCACGAGCAATTAAGCGACT	670-689
anti-sense primer	CTGAGCTTTCTACTACTAGC	808-827

Base positions are those from the original reports³⁰⁻³³.

増幅産物を電気泳動後、ナイロン膜 (Hibond N; Amersham 社製) にサザンブロットし、プローブを DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim 社製) を用いてジゴキシゲニンで標識し、ハイブリダイゼーションを行い、DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acid (Boehringer Mannheim 社製) を用いて化学発光させ、X線フィルム (XAR-5; Kodak 社製) を感光させることにより検出した。

II. 口腔扁平上皮癌における染色体欠失についての検討

口腔扁平上皮癌組織と正常組織あるいは末梢血液から DNA を抽出し、restriction fragment length polymorphism marker (以下、RFLP マーカーと略す) を用いたサザンブロット法により、ヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; 以下、LOH と略す) の有無を検索することにより、染色体の欠失を検討した。

1. 実験材料

手術時や剖検時に採取し、 -80°C で凍結保存していた11例の口腔扁平上皮癌組織 (1例の紡錘細胞癌を含む) と正常組織 (脾臓、肝臓あるいは筋肉) を実験材料として用いた (表5)。また、一部の症例では、正常組織に代えて正常末梢血液を使用した。すでに原発巣の摘除されていた2例では、転移巣と正常組織を被験対象とした。

2. 実験方法

(1) Genomic DNA の抽出法

手術時や剖検時に採取し、 -80°C で凍結保存していた組織約 1g を、液体窒素中で粉碎し、粉末化した後、DNA 抽出用緩衝液 (50 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1% SDS) に溶解した。次いでプロテアーゼ処理後、

表5 実験材料と症例別の PCR 法による HPV の検出結果

Case	Age	Sex	Location	Type of HPV			
				6	11	16	18
A	78	f	Maxillary sinus	-	-	+	-
B	91	m	Tongue	-	-	-	-
C	66	m	Meta. T (Gingiva)	-	-	-	-
D*	43	f	Tongue	-	-	-	-
E	46	f	Tongue	-	-	-	-
F	71	f	Gingiva	-	-	-	-
G	53	m	Gingiva	-	-	-	-
H	60	f	Tongue	-	-	-	-
I	73	m	Lip	-	-	-	-
J	74	f	Tongue	-	-	-	-
K	63	m	L.N. (Tongue)	-	-	-	-

Meta. T.: metastatic tumor

L.N.: metastasis to lymph node (primary site)

* spindle cell carcinoma

フェノール・クロロホルム法で高分子 DNA を抽出した。正常末梢血液からの DNA の抽出は、Mono-poly resolving medium (Flow Laboratories 社製) を用いて、末梢血液中の有核細胞を分離した後、DNA を抽出した。

(2) 実験に使用した DNA プローブ

実験に用いたプローブとその染色体上の位置および用いた制限酵素の組合せを表6に示した。なお、これらのプローブは、JCRB を通じて供与されたものである。

(3) サザンハイブリダイゼーション法

実験(1)で抽出した DNA を制限酵素 *Msp*I あるいは

表6 使用プローブの染色体上の位置と制限酵素の組合せ

Chromosome location	Locus	Probe	Enzyme
3p 14-p 21	D3S2	HF12-32	MspI
17p 13.3	D17S5	YNZ22	PstI, MspI

PstI で完全消化した後、10 µg の DNA を0.8%アガロースゲルで電気泳動、サザンブロット法により、ナイロン膜 (Hybond N; Amersham 社製) にトランスファーし、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション法は、I の2. 実験方法(3)に示す方法で行った。

結 果

I. 頭頸部扁平上皮癌におけるヒトパピローマウイルス DNA の検索結果

頭頸部扁平上皮癌56例について、PCR 法で HPV 6 型および11型 DNA の存在を検索した結果、HPV 6 型はいずれの症例においても検出されなかったが、HPV 11型が舌癌の1例に検出された。対照として検索した正常歯肉10例では、HPV 6 型と11型のいずれ

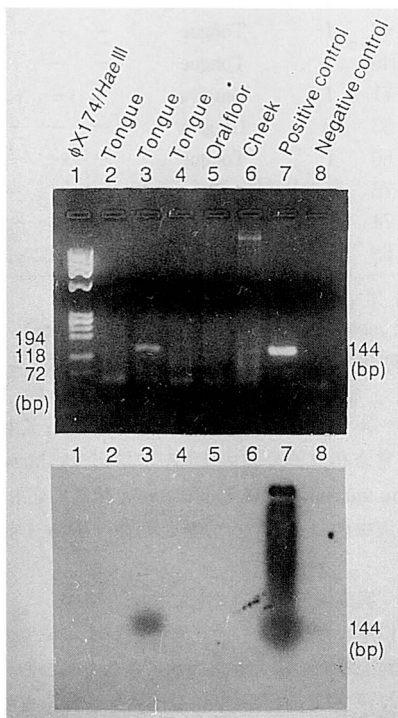


図1 HPV 11型の代表的検出例。(電気泳動とサザンハイブリダイゼーションによる)

表7 PCR 法による HPV 6 型と HPV 11 型の検出結果

	Total	PCR positive (%) for	
		6	11
Squamous cell carcinoma			
Larynx	9	0(0.0)	0(0.0)
Tongue	17	0(0.0)	1(5.9)
Gingiva	14	0(0.0)	0(0.0)
Cheek	6	0(0.0)	0(0.0)
Maxillary sinus	4	0(0.0)	0(0.0)
Oral floor	5	0(0.0)	0(0.0)
Lip	1	0(0.0)	0(0.0)
Total	56	0(0.0)	1(1.8)
Normal gingival tissue	10	0(0.0)	0(0.0)

も検出されなかった (図1, 表7)。

HPV 16型 DNA は、頭頸部扁平上皮癌の77例中26例 (33.8%) に検出され、特に、喉頭癌では77.8%と高い検出率を示し、口腔癌では頬粘膜癌で57.1%と検出頻度が高かった。また、HPV 18型は、頭頸部扁平上皮癌の77例中3例 (3.9%) に検出されたが、その3例はすべて頬粘膜癌であり、頬粘膜癌に限定して考えると、42.9%と高率に検出されたことになる。また、対照として検索した正常歯肉10例では、HPV 16型と18型のいずれも検出されなかった (図2, 図3, 表8)。

増幅産物が目的とした HPV DNA によるものであることを確認するために、一部の症例についてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、電気泳動時に、そのサイズより目的の増幅産物であると考えられたバンドは、プローブとハイブリダイズし、目的とした増幅産物であることが確認された (図1, 図2, 図3)。また、HPV 16型の検索時に、電気泳動により、プライマーから予想される目的とした増幅産物のサイズ (115 bp) とは異なるサイズ (約 170 bp) のバンドがしばしば認められたが、このバンドは、プローブとハイブリダイズせず、目的とした HPV DNA とは無関係の増幅産物であることが判明した (図2)。

いずれかの型の HPV が検出された27例を表9に示した。この27例中23例では、HPV 16型が単独に検出され、また、頬粘膜癌の2例では、HPV 16型と18型の両者が検出されたが、HPV 18型が単独で検出された頬粘膜癌も1例存在した。HPV 11型の検出された唯一の例では、HPV 16型も検出された。

以上の結果から、頭頸部に発生する扁平上皮癌症例

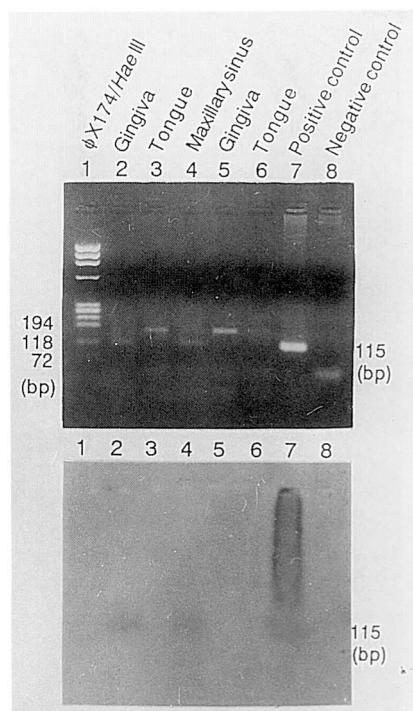


図2 HPV 16型の代表的検出例。
(電気泳動とサザンハイブリダイゼーションによる)

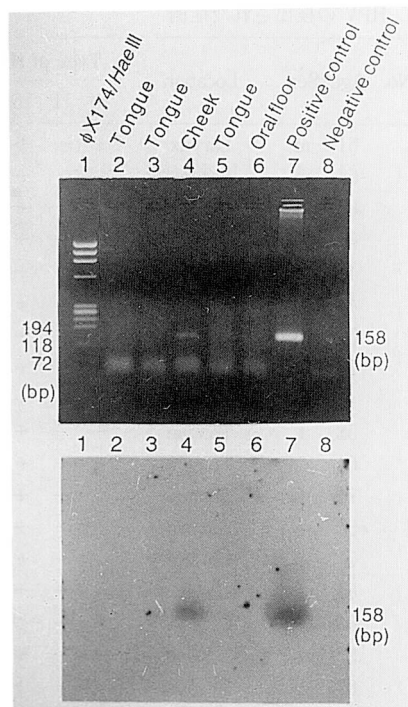


図3 HPV 18型の代表的検出例。
(電気泳動とサザンハイブリダイゼーションによる)

にも、HPV DNA の認められる例があり、特に HPV 16型の検出率の高いことが明らかとなった。

II. 口腔扁平上皮癌における染色体欠失についての検索結果

HF12-32 をプローブとして、口腔扁平上皮癌における3番染色体短腕の欠失を検索した結果の代表例を図4に、また、YNZ22 をプローブとして、口腔扁平上皮癌における17番染色体短腕の欠失を検索した結果の代表例を図5に示した。

図4の4例中、症例BとCの2例では、正常組織で2.9 kbp と 1.3 kbp の2本のバンドが認められ、ヘテロ接合性の消失の有無が観察可能な informative case であった。一方、症例Aでは、正常組織で1.3 kbp のバンドのみ、症例Eでは、2.9 kbp のバンドのみが認められ、いずれも uninformative case であった。informative case の2例について、腫瘍組織での変化を観察すると、ともに正常組織と同様の2本のバンドが認められ、3番染色体短腕の欠失は認められなかった。

11例の口腔扁平上皮癌症例で、3番染色体短腕の欠失を検討した結果、6例が informative case であったが、いずれの腫瘍組織にも、ヘテロ接合性の消失は認

表8 PCR 法による HPV 16型と HPV 18型の検出結果

	Total	PCR positive (%) for	
		16	18
Squamous cell carcinoma			
Larynx	9	7(77.8)	0(0.0)
Tongue	25	5(20.0)	0(0.0)
Gingiva	22	7(31.8)	0(0.0)
Cheek	7	4(57.1)	3(42.9)
Maxillary sinus	7	2(28.6)	0(0.0)
Oral floor	6	1(16.7)	0(0.0)
Lip	1	0(0.0)	0(0.0)
Total	77	26(33.8)	3(3.9)
Normal gingival tissue	10	0(0.0)	0(0.0)

められなかった(表10)。

図5の4例は、いずれも正常組織で3.8 kbp と 3.4 kbp の2本のバンドの認められる informative case であった。症例Bでは原発巣(T)およびいずれの転移巣(M1, M2)でもこれら2本のバンドが認められたのに対し、症例AのT, M1, M2では、3.8 kbp のバ

表9 HPVの検出された症例

Case No.	Age	Sex	Location	Type of HPV			
				6	11	16	18
1	61	m	Larynx	-	-	+	-
2	68	m	Larynx	-	-	+	-
3	68	m	Larynx	-	-	+	-
4	65	m	Larynx	-	-	+	-
5	42	m	Larynx	-	-	+	-
6	44	m	Larynx	-	-	+	-
7	57	m	Larynx	-	-	+	-
8	73	m	Tongue	-	-	+	-
9	40	m	Tongue	-	-	+	-
10	58	f	Tongue	-	-	+	-
11	64	m	Tongue	-	+	+	-
12	71	f	Tongue	-	-	+	-
13	58	f	Gingiva	-	-	+	-
14	70	m	Gingiva	-	-	+	-
15	84	f	Gingiva	-	-	+	-
16	68	f	Gingiva	-	-	+	-
17	57	f	L.N. (Gingiva)	-	-	+	-
18	67	f	Gingiva	-	-	+	-
19	65	f	Gingiva	-	-	+	-
20	77	m	Cheek	-	-	+	-
21	52	m	Cheek	-	-	+	+
22	61	m	Cheek	-	-	+	+
23	74	m	Cheek	-	-	-	+
24	80	f	Cheek	-	-	+	-
25	58	m	Maxillary sinus	-	-	+	-
26	76	f	Maxillary sinus	-	-	+	-
27	59	m	L.N. (Oral floor)	-	-	+	-

L.N.: metastasis to lymph node (primary site)

ンドが、また、症例CのM1, M2, M3 および症例DのT, M1 では、3.4 kbp のバンドが各例の正常組織(N)でのバンドに対比して弱くなっており、17番染色体短腕の欠失していることが示された。なお、この染色体欠失を制限酵素 *MspI* を用いて再検したところ、同様の結果を得た。

11例の口腔扁平上皮癌症例について、YNZ22 をプローブとして17番染色体短腕の欠失を検討した結果、8例が informative case であり、このうち6例(75.0%)に染色体欠失が認められた(表10)。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌における染色体欠失は、子宮頸癌とは異なり、3番染色体短腕の欠失頻度は低く、17番染色体短腕の欠失頻度の高いことが判明した。

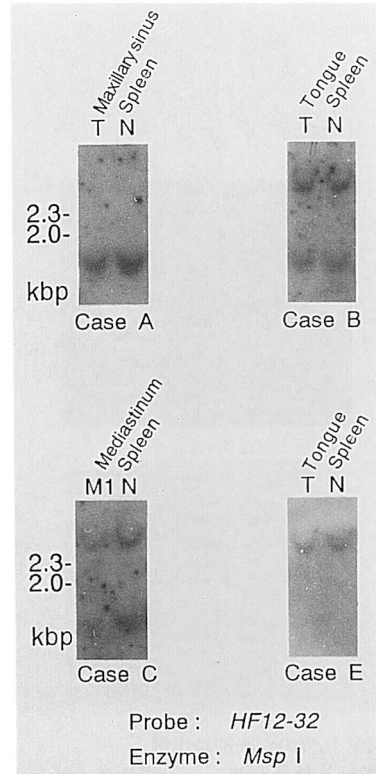
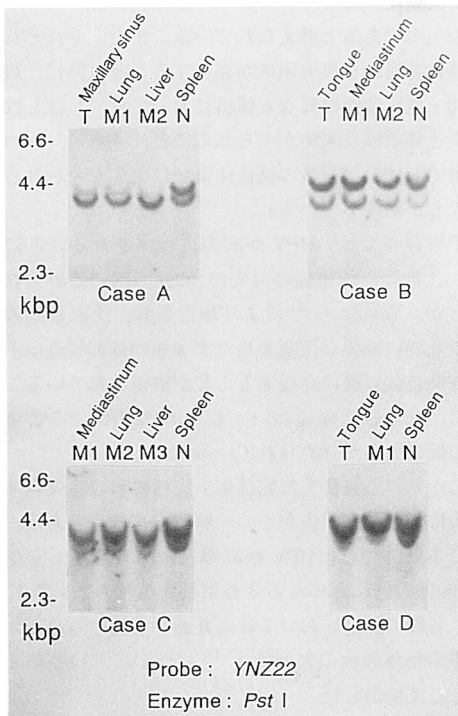


図4 3番染色体短腕の代表的検索例。

考 察

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、ヒトの皮膚や粘膜に様々な種類の疣状腫瘍を形成するウイルスであり、これまでに60種類以上の型のHPVが分離されている。近年、HPVが、ヒトの子宮頸癌⁵⁾、陰茎癌⁴⁾、疣贅状表皮発育異常症患者に頻発する皮膚癌^{34,35)}などの発生病因因子として重要な役割を果たしていることが明らかになり、特に子宮頸癌においては、HPVが主な病因であることはほぼ間違いないと考えられている。

ところで、頭頸部扁平上皮癌、あるいは口腔粘膜疾患へのHPVの関与にも興味もたれ、これまでこれらの検討にLöningら¹⁰⁾およびWelchら¹¹⁾は免疫染色法を用い、また、MildeおよびLöning¹²⁾、EversoleおよびLaipis¹³⁾、Syrjänenら¹⁴⁾、Zeussら¹⁵⁾、YoungおよびMin¹⁶⁾は *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた。さらに de Villiersら¹⁷⁾およびTsuchiyaら¹⁸⁾はサザンハイブリダイゼーション法を用いて、頭頸部扁



T : primary tumor
 M1~3: metastatic tumor
 N : normal tissue

図5 17番染色体短腕の代表的検索例.

表10 染色体欠失の検索結果

Case	HF12-32 3p14-21 MspI	YNZ22 17p13.3 PstI
A	—	2
B	1, 2	1, 2
C	1, 2	1
D	—	1
E	—	—
F	—	1, 2
G	—	2
H	1, 2	2
I	1, 2	—
J	1, 2	—
K	1, 2	1

1: loss of the smaller sized constitutional allele
 2: loss of the larger sized constitutional allele
 1, 2: heterozygosity remained in the tumor
 —: constitutional homozygosity

平上皮癌における HPV の関与について報告している。しかしながら、免疫染色法や *in situ* ハイブリダイゼーション法は、検出感度が低く、また、60種類以上にもほる HPV の型を同定することも困難であり、また、サザンハイブリダイゼーション法を用いたこれまでの報告では、検討した例数が少なかった。その後、分子生物学的手法の進歩に伴い、Goelz ら²⁹⁾ はホルマリン固定・パラフィン包埋された組織からも DNA の抽出が可能であることを報告し、Saiki ら²⁸⁾ が PCR 法を報告した後、Shibata ら^{36,37)} は、ホルマリン固定・パラフィン包埋された組織から抽出した DNA を鋳型として PCR 法を応用することも可能であることを示した。頭頸部扁平上皮癌における HPV の関与について、Chang ら¹⁹⁾、Shroyer および Greer²⁰⁾、Shindoh ら²¹⁾ も、PCR 法を用いて報告しているが、検討例数が少なく、頭頸部扁平上皮癌における HPV の関与を明らかにしたとは言い難い。そこで本研究では、より多くの症例について検討を行うために、主にホルマリン固定・パラフィン包埋され保存されていた病理標本より DNA を抽出し、検出感度の極めて高い PCR 法により、頭頸部扁平上皮癌組織中の HPV DNA の検索を行った。PCR 法を用いた HPV DNA の検出方法として、Maki ら³⁸⁾ および Yoshikawa ら³⁹⁾ は、プライマーを複数の型の HPV DNA の相同性の高い部分に設定し、一組のプライマーで複数の型の HPV DNA を増幅可能にする方法を開発している。しかし、パラフィン包埋組織には、PCR 法に用いる *Taq* ポリメラーゼに対する阻害物質が含まれる可能性が示され⁴⁰⁾、この阻害物質は、サンプルの洗浄や希釈、熱処理やプロテアーゼ処理によっても除去できないと報告されている⁴¹⁾ ことから、本研究では、PCR 法をより確実に行うために、検出目的の HPV の型に特異的なプライマーを用い実験を行った。これまで頭頸部扁平上皮癌で検出されている HPV 6, 11, 16 および18型を検索対象とし、プライマーは、HPV 6 と11型では、他の型の HPV と相同性の低い初期遺伝子領域 E6 に、一方、HPV 16, 18型では、導入によりマウスやラット株細胞をトランスフォームすることが証明され⁶⁻⁸⁾、さらに、ヒト線維芽細胞や角化細胞を不死化する能力を持つと報告⁹⁾ されている E7 に設定したものをを用いた。

以上のことを背景におき、頭頸部扁平上皮癌組織と正常歯肉組織における HPV DNA の存在を検索した結果、頭頸部扁平上皮癌の被験組織56例中には HPV 6型は検出されず、HPV 11型は1例 (1.8%) のみに検出された。77例の頭頸部扁平上皮癌中、HPV 16型は26例 (33.8%) に、また、HPV 18型は3例 (3.9%)

に検出された。発生部位別でみると、HPV 16型は喉頭癌で77.8%、頬粘膜癌では57.1%と高率に検出され、HPV 18型は頬粘膜癌で42.9%と高率に検出された。一方、検索した10例の正常歯肉組織では、いずれの型のHPVも検出されなかった。Shindohら²¹⁾は、舌扁平上皮癌24例について、PCR法によりHPV 16、18および33型のDNAを検索した結果、1例でHPV 16型と18型を、また、7例でHPV 16型を検出したと報告している。本研究では、舌癌25例中、5例(20.0%)にHPV 16型が検出され、Shindohらの報告²¹⁾と比べ、HPV DNAの検出率は若干低かった。また、Changら¹⁹⁾は口腔扁平上皮癌40例について、PCR法によりHPV 6、11、16および18型の有無を検索し、HPV 6型を1例(2.5%)に、HPV 16型を9例(22.5%)に、HPV 18型を1例(2.5%)に検出したと報告しているが、本研究では、口腔(舌、歯肉、頬粘膜、口底)癌60例中、HPV 16型が17例(28.3%)に、HPV 18型が3例(5.0%)に検出され、Changらの報告¹⁹⁾と比較してその検出率は高かった。しかしながら、本研究の実験結果から、口腔扁平上皮癌の発生部位により、HPV DNAの検出率の異なることが考えられ、検索例の発生部位の内訳が異なることにより、結果に差が生じた可能性が推定された。

本研究により、頭頸部扁平上皮癌におけるHPV DNAの検出率は、発生部位により異なることが示唆された。発生部位によってHPV DNAの検出率に差の生じる原因としては、部位によってHPVに接触する可能性が異なることや、HPVは上皮基底層のみに感染するとされており、感染の成立には上皮基底層に達する損傷が存在することが必要条件となるため、受傷リスクが部位により異なることが考えられる。また、上顎洞では、慢性炎症による上皮の損傷もHPV感染のリスクをもたらす可能性が考えられる。

本研究では、HPV DNAの検出結果を、一部の症例についてサザンハイブリダイゼーション法で確認した。目的のHPVの全長をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法を行うことにより、電気泳動でのHPVの検出結果を確認することに加え、電気泳動時にしばしば認められたプライマーから予想される鎖長のバンド以外のバンドは、目的としたHPVとは無関係のバンドであることも判明した。

近年、各種癌組織における染色体欠失が明らかにされ、癌の発生・進展に伴う変化として注目されている。これは、分子生物学的手法の進歩により、RFLPマーカーを用いて、染色体の欠失をヘテロ接合性の消失(LOH)として観察できるようになったためである。文献的に、大腸癌²³⁻²⁵⁾、胃癌²⁶⁾、肺小細胞癌²⁷⁾、

乳癌⁴²⁾、肝癌⁴³⁾などでは、各々に特定の染色体の欠失が高頻度に認められており、癌化に密接に関わる変化の一つであると考えられている。また、それぞれの腫瘍に特異的な欠失領域が存在すること以外に、組織学的・発生学的に異なる腫瘍においても、しばしば同じ染色体領域に欠失がみられること、さらに、一つの腫瘍でしばしば複数の染色体領域に欠失がみられることなどが判明している。

子宮頸癌では、HPVが高率に検出されることに加え、3番染色体短腕の欠失が100%の例に認められることが、Yokotaら²²⁾により報告され、子宮頸癌の発生や進展に重要な役割を果たす未知の癌抑制遺伝子が3番染色体短腕に存在することが推定されている。さらに、肺小細胞癌においても、100%の例で3番染色体短腕の欠失が認められている²⁷⁾。

しかし、これまで口腔扁平上皮癌における染色体の欠失については報告がなく、解明すべき点である。そこで本研究では、HPVが高率に認められる子宮頸癌の100%の例に認めらる3番染色体短腕の欠失²²⁾に加え、各種の腫瘍において最も共通して認められている17番染色体短腕の欠失^{23-27,42)}について、口腔癌を対象として検討した。

その結果、口腔癌では3番染色体短腕の欠失は認められなかったが、17番染色体短腕の欠失が高頻度に認められた。この結果は、3番染色体短腕の欠失を100%の例に認め、17番染色体短腕の欠失は低頻度である子宮頸癌の様相²²⁾とは大きく異なっていた。口腔に近接する消化管の腫瘍であり、組織型の共通する食道癌では、PCR法により検索した43例中3例(7.0%)にHPV DNA(HPV 16型1例、HPV 18型2例)が認められたと藤ら⁴⁴⁾は報告しており、また、Meltzerら⁴⁵⁾およびWagataら⁴⁶⁾は、食道癌では3番染色体短腕の欠失は低頻度で、17番染色体短腕の欠失は高頻度であったと報告している。以上より、口腔癌の一部の症例では、HPV DNAが検出されるものの、その染色体欠失の様相は、子宮頸癌よりもむしろ食道癌に近いことが推測された。口腔癌においては、17番染色体短腕の欠失頻度が高いことが本研究で判明し、その発生や進展に重要な役割を持つ癌抑制遺伝子が17番染色体短腕上に存在することが考えられた。17番染色体短腕上に存在する癌抑制遺伝子としては、p53が知られており、Sakaiら⁴⁷⁾は、口腔扁平上皮癌27例中17例(63%)にp53の変異が認められたと報告している。しかし、乳癌⁴²⁾、肝癌⁴⁸⁾などの研究では、17番染色体短腕には、p53以外の未知の癌抑制遺伝子が存在する可能性も示唆されていることから、本研究で認められた17番染色体短腕の欠失が、p53の変

異によるものであるとは即断できない。この点を解明するために、今後、17番染色体短腕の欠失と p53 の変異を同一の症例で検討する必要がある。

これまで、HPV 16型や18型については、その初期遺伝子領域 E6 および E7 蛋白が、それぞれ癌抑制遺伝子蛋白の p53 と RB に結合する⁴⁹⁻⁵⁰⁾ ことが知られており、また、細胞を G1/G0 期に停止させ、細胞の増殖を負に調節する P53 と RB の機能は、E6, E7 蛋白との結合により阻害されることが判明している。このため、多くの種類の癌細胞に見られる p53 や RB 遺伝子の欠失や変異は、子宮頸癌細胞ではほとんどみられないが、HPV の感染していない子宮頸癌細胞株では、p53 や RB の変異が高率に認められることを Scheffner ら⁵¹⁾ は示している。しかし、本研究で染色体欠失を検討した症例 A は、HPV 16型が検出された症例であるが、17番染色体短腕の欠失も認められた。この所見については、17番染色体短腕の欠失が p53 遺伝子の変異によるものではなかった可能性、あるいは、HPV 感染と p53 の変異の両方が観察されるより悪性度の高い症例であった可能性などが考えられた。また、この症例ではサザンハイブリダイゼーション法で HPV 16型が検出されなかったことから、細胞中の HPV DNA のコピー数が少なかったと考えられ、癌化に p53 の変異を要した可能性も考えられた。

結 論

頭頸部扁平上皮癌における HPV の関与と染色体欠失に関して検討し、次の結論が得られた。

(1) HPV 16型は、頭頸部癌例の33.8%に検出されたが、発生部位別では、喉頭癌で77.8%、頬粘膜癌で57.1%と、その検出率が高かった。

(2) HPV 18型は、頭頸部癌例の3.9%に検出され、特に頬粘膜癌での検出率は、42.9%と高かった。

(3) HPV 11型は舌癌の1例で検出されたが、頭頸部癌における HPV 6型および11型の検出率は低いと考えられた。

(4) 正常歯肉組織の10例では、HPV 6, 11, 16, 18型のいずれも検出されなかった。

(5) HF12-32 をプローブとして用い検討した結果、口腔扁平上皮癌における3番染色体短腕の欠失頻度の低いことが判明した。

(2) YNZ22 をプローブとして用い検討した結果、口腔扁平上皮癌では、17番染色体短腕の欠失頻度の高いことが示された。

以上を総括すると、頭頸部扁平上皮癌例の一部には HPV DNA が認められ、その発生に HPV、特に HPV 16型の関与する可能性が推測され、また、口腔扁平上

皮癌における染色体欠失は、子宮頸癌で報告されている染色体欠失の様相とは異なり、むしろ食道癌に類似したパターンを示す傾向が明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った、広島大学下里常弘名誉教授ならびに広島大学歯学部口腔外科学第二講座石川武憲教授に深甚なる謝意を表するとともに、貴重なる御助言、御校閲を賜った本学口腔病理学講座二階宏昌教授ならびに本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に深謝致します。同時に、本研究を進めるに際し、終始御指導、御教示を頂いた本学医学部病理学第一講座田原榮一教授に深謝致します。

また、御助言頂いた本学口腔病理学講座高田 隆助教授、口腔外科学第二講座辻野哲弘博士に感謝の意を表します。最後に本研究を遂行するにあたり多大な御協力を頂いた口腔外科学第二講座の医局員各位に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Dürst, M., Gissman, L., Ikenberg, H. and zur Hausen, H.: A papilloma-virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from a different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 3812-3815, 1983.
- 2) Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S. and Orth, G.: A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature.* 321, 246-249, 1986.
- 3) Takami, Y., Kondoh, G., Saito, J., Noda, K., Sudiro, T.M., Sjahrurachman, A., Warsa, U.C., Yutsudo, M. and Hakura, A.: Cloning and characterization of human papillomavirus type 52 from cervical carcinoma in Indonesia. *Int. J. Cancer.* 48, 516-522, 1991.
- 4) Wiener, J.S., Effert, P.J., Humphrey, P.A., Yu, L., Liu, E.T. and Walther, P.J.: Prevalence of human papillomavirus type 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer.* 50, 694-701, 1992.
- 5) Shimada, M., Fukushima, M., Mukai, H., Kato, I., Nishikawa, A. and Fujinaga, K.: Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18, and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1-5, 1990.
- 6) Yutsudo, M., Okamoto, Y. and Hakura, A.:

- Functional dissociation of transforming genes of human papillomavirus type 16. *Virology*. **166**, 594-597, 1988.
- 7) Kanda, T., Furuno, A. and Yoshiike, K.: Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virol.* **62**, 610-613, 1988.
 - 8) Phelps, W.C., Yee, C.L., Müger, K. and Howly, P.M.: The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation similar to those of adenovirus E1a. *Cell*. **53**, 539-547, 1988.
 - 9) Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J. and Dipaolo, J.A.: Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* **61**, 1061-1066, 1987.
 - 10) Löning, T., Reichart, P., Staquet, M.J., Becker, J. and Thivolet, J.: Occurrence of papillomavirus structural antigens in oral papillomas and leukoplakias. *J. Oral Pathol.* **13**, 155-165, 1984.
 - 11) Welch, T.B., Barker, B.F. and Williams, C.W.: Peroxidase-anti-peroxidase evaluation of human oral squamous cell papillomas. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **61**, 603-606, 1986.
 - 12) Milde, K. and Löning, T.: Detectin of papillomavirus DNA in oral papillomas and carcinomas: application of *in situ* hybridization with biotinylated HPV 16 probes. *J. Oral Pathol.* **15**, 292-296, 1986.
 - 13) Eversole, L.R. and Laipis P.J.: Oral squamous papillomas: Detection of HPV DNA by *in situ* hybridization. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **65**, 545-550, 1988.
 - 14) Syrjänen, S.M., Syrjänen, K.J. and Happonen, R-P.: Human papillomavirus in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by *in situ* hybridization. *J. Oral Pathol.* **17**, 273-278, 1988.
 - 15) Zeuss, M.S., Miller, C.S. and White, D.K.: *In situ* hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **71**, 714-720, 1991.
 - 16) Young, S.K., and Min, K.W.: *In situ* DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **71**, 726-729, 1991.
 - 17) de Villiers, E.-M., Weidauer, H., Otto, H. and zur Hausen, H.: Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int. J. Cancer.* **36**, 575-578, 1985.
 - 18) Tsuchiya, H., Tomita, Y., Shirasawa, H., Tanzawa, H., Sato, K. and Shimizu, B.: Detection of papillomavirus in head and neck tumors with DNA hybridization and immunohistochemical analysis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **71**, 721-725, 1991.
 - 19) Chang, F., Syrjänen, S., Nuutinen, J., Kärjä, J. and Syrjänen, K.: Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *Arch. Dermatol. Res.* **282**, 493-497, 1990.
 - 20) Shroyer, K.R. and Greer, R.O.Jr.: Detection of human papillomavirus DNA by *in situ* DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **71**, 708-713, 1991.
 - 21) Shindoh, M., Sawada, Y., Kohgo, T., Amemiya, A. and Fujinaga, K.: Detection of human papillomavirus DNA sequences in tongue squamous-cell carcinoma utilizing the polymerase chain reaction method. *Int. J. Cancer.* **50**, 167-171, 1992.
 - 22) Yokota, J., Tsukada, Y., Nakajima, T., Gotoh, M., Shimosato, Y., Mori, N., Tsunokawa, Y., Sugimura, T. and Terada, M.: Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* **49**, 3598-3601, 1989.
 - 23) Salomon, E., Voss, R., Hall, V., Bodmer, W.F., Jass, J.R., Jeffreys, A.J., Lucibello, F.C., Patel, I. and Rider, S.H.: Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* **328**, 616-619, 1987.
 - 24) Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M.M. and Bos, J.L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Eng. J. Med.* **319**, 525-532, 1988.
 - 25) Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y. and White, R.: Allerotype of colorectal carcinomas. *Science* **244**, 207-211, 1989.
 - 26) Sano, T., Tsujino, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Haruma, K., Ito, H., Nakamura, Y., Kajiyama, G. and Tahara, E.: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res.* **51**, 2926-2931, 1991.
 - 27) Yokota, J., Wada, M., Shimosato, Y., Terada, M. and Sugimura, T.: Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 9252-9256, 1987.
 - 28) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA

- polymerase. *Science*. 239, 487-491, 1988.
- 29) Goelz, S.E., Hamilton, S.R. and Vogelstein, B.: Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 118-126, 1985.
 - 30) Schwarz, E., Dürst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., Zech, R., Wolfesperger, E., Suhai, S. and zur Hausen, H.: DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J.* 2, 2341-2348, 1983.
 - 31) Dartmann, K., Schwart, E., Gissmann, L. and zur Hausen, H.: The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology*. 151, 124-130, 1986.
 - 32) Seedorf, K., Krämmer, G., Dürst, M., Suhai, S. and Röwekamp, W.G.: Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 145, 181-185, 1985.
 - 33) Cole, S.T. and Danos, O.: Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* 193, 599-608, 1987.
 - 34) Orth, G., Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Jablonska, S., Obalek, S., Jarzabek-Chorzelska, M. and Rzeska, G.: Epidermodysplasia verruciformis: a model for the role of papillomavirus in human cancer. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.* 7, 259-282, 1980.
 - 35) Yutsudo, M. and Hakura, A.: Human papillomavirus type 17 transcripts expressed in skin carcinoma tissue of a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Int. J. Cancer*. 39, 586-589, 1987.
 - 36) Shibata, D., Fu, Y.S., Gupta, J.W., Shah, K.V., Arnheim, N. and Martin, W.J.: Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* 59, 555-559, 1988.
 - 37) Shibata, D.K., Arnheim, N. and Martin, W.J.: Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 167, 225-230, 1988.
 - 38) Maki, H., Saito, S., Ibaraki, T., Ichijo, M. and Yoshie, O.: Use of universal and type-specific primers in the polymerase chain reaction for the detection and typing of genital human papillomaviruses. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 411-419, 1991.
 - 39) Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H. and Iwamoto, A.: Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 524-531, 1991.
 - 40) De Franchis, R., Cross, N.C., Foulkes, N.S. and Cox, T.M.: A potent inhibitor of *Taq* polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 16, 10355, 1988.
 - 41) Lo, Y. M., Mehal, W.Z. and Fleming, K.A.: *In vitro* amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumor DNA and from paraffin wax embedded tissues using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 42, 840-846, 1989.
 - 42) Sato, T., Tanigami, A., Yamakawa, K., Akiyama, F., Kazumi, F., Sakamoto, G. and Nakamura, Y.: Allelotype of breast cancer: Cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res.* 50, 7184-7189, 1991.
 - 43) Zhang, W., Hirohashi, S., Tsuda, H., Shimosato, Y., Yokota, J., Terada, M. and Sugimura, T.: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 16 and 4 in human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 108-111, 1990.
 - 44) 藤也寸志, 田中真二, 森良一, 池部正彦, 北村 薫, 馬場欽也, 松田裕之, 桑野博行, 杉町圭蔵: Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いた, 食道癌における Human Papillomavirus (HPV) DNA の検出. 消化器癌の発生と進展 3, 307-310, 1991.
 - 45) Meltzer, S.J., Yin, J., Huang, Y., McDaniel, T.K., Newkirk, C., Iseri, O., Vogelstein, B. and Resau, J.H.: Reduction to homozygosity involving p53 in esophageal cancers demonstrated by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4976-49, 1991.
 - 46) Wagata, T., Ishikawa, K., Imamura, M., Shimada, Y., Ikenaga, M. and Tobe, T.: Deletion of 17p and amplification of the *int-2* gene in esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 51, 2113-2117, 1991.
 - 47) Sakai, E., Rikimaru, K., Ueda, M., Matsumoto, Y., Ishii, N., Enomoto, S., Yamamoto, H. and Tsuchida, N.: The p53 tumor-suppressor gene and *ras* oncogene mutations in oral squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 52, 867-872, 1992.
 - 48) Fujimori, M., Tokino, T., Hino, O., Kitagawa, T., Imamura, M., Ishikawa, T., Nakagana, H., Harada, H., Yagura, M., Matsubara, K. and Nakamura, Y.: Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 51, 89-93, 1991.
 - 49) Werness, B.A., Levine, A.J. and Howley, P.M.: Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248, 76-79, 1990.
 - 50) Dyson, N, Howley, P.M., Münger, K. and Harlow, E.: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science.* 243, 934-937, 1989.
 - 51) Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J.C. and Howley, P.M.: The state of the p53 gene and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 5523-5527, 1991.