

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

加藤 世太

論文題目

口腔扁平苔癬におけるヒトパピローマウイルス感染
について

I. 緒言

扁平苔癬は皮膚や粘膜に生じる原因不明の慢性炎症性角化症の一つで、口腔粘膜に発現するものを口腔扁平苔癬 (OLP) と呼ぶ。OLP は口腔扁平上皮癌 (OSCC) に悪性化することが知られているが、OLP の悪性化には喫煙や飲酒は関係していないことが多く、悪性化の原因については未だ明らかになっていない。

ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸癌の最大のリスクファクターである。120 種以上の遺伝子型が見つかっており、がんとの関連が示される高リスク型 (HR-HPV) と良性病変にとどまる低リスク型 (LR-HPV) とに大別されている。口腔において、特に HPV-6、11 は良性病変の白板症や口腔乳頭腫から、HPV-16、18、33 は悪性病変である扁平上皮癌 (SCC) などから多く検出されている。

OLP における HPV 感染率は正常粘膜よりも高いと報告されているが、OLP の悪性化における HPV の潜在的な役割は未だ解明されていない。そこで、本研究では、HPV 感染が OLP の悪性化におけるリスクファクターの一つとなっている可能性を考え、同疾患および悪性化した OLP における HPV 感染率と感染 HPV の型について検索した。また、HPV 感染 OLP の上皮の細胞増殖能についても評価した。

II. 対象および方法

1. サンプル

愛知学院大学歯学部附属病院および関連施設にて、生検による病理診断において OLP と診断された 200 例と、その中で、後に SCC となった 8 例を使用した。

2. DNA 抽出

パラフィン包埋処理された組織より連続した 4 μ m 切片 5 枚から DNA を抽出した。

3. PCR 解析

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。第二段階として、コンセンサスプライマーでの陽性症例について、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 に関する HPV 型特異的 PCR を実施した。また、悪性化した OLP の型特異的 PCR は、HPV-16 についてのみ行った。なお、HPV の遺伝子型を決定するために、ダイレクトシーケンスを行った。

4. *in situ* ハイブリダイゼーション

PCR での HPV 陽性 OLP の組織上で HPV DNA を確認するために、Dako *In situ* Hybridization System for Biotinylated Probes と HPV Types 16/18 Biotinylated DNA Probe を使用して行った。

5. 病理組織学的・免疫組織化学的検索

PCR での HPV 陽性 OLP の組織上で HPV タンパクを確認するために、Monoclonal Mouse Anti-HPV 抗体を使用して行った。

6. HPV-16 陽性 OLP の細胞増殖能の免疫組織化学的検索

PCR での HPV-16 陽性 OLP (陽性群) と陰性 OLP (陰性群) の上皮の細胞増殖能を検討するために、細胞増殖活性の指標となる Ki67 および Topoisomerase II α の検索を行った。陽性群と陰性群の各 10 例を免疫染色し、1 例につき任意の 5 ヶ所における上皮 1,000 細胞あたりの陽性細胞数を計測した。

7. 統計学的解析

HPV 陽性率の検討はカイ 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用いた。また、HPV-16 陽性 OLP の細胞増殖能の免疫組織化学的検索には一元配置分散分析を行った。危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. OLP の HPV 解析

コンセンサスプライマーを用いた PCR では、HPV 陽性率は 41.5% (83/200) であった。男女別の陽性率は、男性 39.0% (30/77)、女性 43.1% (53/123) であり、有意差は認められなかった。

HPV 型特異的 PCR での陽性率は、HPV-6 が 5.5% (11/200)、HPV-11 が 6.5% (13/200)、HPV-16 が 25.5% (51/200)、HPV-18 が 23.5% (47/200)、HPV-33 が 3.5% (7/200) であり、HPV-16 の陽性率が最も高く、HPV-6 と 16、6 と 18、11 と 16、11 と 18、16 と 33、18 と 33 の間に有意差が認められた (p

<0.01)。

今回最も陽性率の高かった HPV-16 は、HR-HPV であり、口腔の SCC においても高率に検出されていることから、HPV-16 についてさらなる検討を行った。HPV-16 の男女別の陽性率は、男性 26.0% (20/77)、女性 25.2% (31/123) であり、有意差は認められなかった。OLP 臨床型別の陽性率は、びらん型 28.3% (13/46)、網状型 18.6% (8/43)、斑状型 25.9% (7/27)、萎縮型 0.0% (0/6) であり、有意差は認められなかったが、びらん型が最も高かった。

PCR での陽性症例における HPV DNA の *in situ* ハイブリダイゼーションでは、上皮全層の細胞核に陽性像が確認され、HPV 免疫染色では、上皮上層の細胞核に陽性像が確認された。

2. HPV-16 陽性 OLP の細胞増殖能

1) Ki67

陽性群および陰性群の上皮ともに、基底細胞層付近の細胞核に Ki67 陽性像が確認された。陽性群と陰性群における陽性細胞数について、有意差は認められなかった。

2) Topoisomerase II α

陽性群の上皮では、上皮全層にわたり多くの細胞核に Topoisomerase II α 陽性像が確認された。陰性群の上皮では、陽性群と比較して陽性像は少なく、基底細胞層付近に確認された。陽性群と陰性群における陽性細胞数について、有意差が認められ ($p < 0.01$)、陽性群の方が陽性細胞数が多かつ

た。

3. 悪性化した OLP の HPV 解析

悪性化した OLP 8 例のうち 5 例 (62.5%) において HPV-16 が陽性と判定され、その臨床型は全てびらん型であった。

IV. 考察

OLP における感染 HPV の型は HPV-16 が最も多いとの報告が多く、本研究においても HPV-16 の陽性率が最も高かった。HPV-16 は HR-HPV で、口腔の SCC において多く検出されていることから、HPV-16 感染が OLP の悪性化に関与していることが示唆された。

HPV は上皮の増殖が可能な基底細胞に感染すると報告されている。基底細胞に HPV が感染するためには、外傷などで角化層が破れ、ウイルス粒子が基底層に至る必要がある。OLP ではびらんや潰瘍を伴うことが多く、HPV が侵入する機会が多くなることが推測される。本研究において、びらん型に最も多くの HPV 感染がみられた。他の OLP の研究においても同様の報告がなされている。また、HPV の持続感染の為にはゲノムの増幅と感染細胞への増殖刺激が必要であるが、OLP においては炎症がその役割を果たしていると思われる。

さらに、OLP の治療にはステロイドの塗布が一般的であるが、ステロイドにより免疫力が低下し潜在的な HPV 感染が再活性化され、その感染が増加するとの報告がある。これらのことより、OLP ではびらんや潰瘍が多く起こ

ると共に、治療にステロイドが使用されることが、HPV 感染を容易にしている可能性が考えられる。

本研究で、悪性化した OLP 8 例のうち 5 例 (62.5%) において、HPV-16 が認められ、それらは全てびらん型であった。Mattila らは、萎縮型の OLP に HPV 感染が多く認められ、悪性化した OLP 5 例中 2 例に HPV 感染が認められたと報告している。この報告と本研究の結果より、OLP の悪性化において HPV 感染が一つのリスクファクターであり、特にびらん型や萎縮型に HPV 関連の悪性化が起きやすいことが示唆された。

Montebugnoli らは、OLP と正常粘膜において、増殖細胞のマーカーである Ki67 陽性率を比較した結果、OLP での陽性率が高かったと述べているが、Mattila らは、HPV 陽性 OLP 群と陰性 OLP 群の Ki67 陽性率を比較した結果、有意差は認められなかったと報告している。本研究においても、陽性群と陰性群の間で Ki67 陽性率に有意差は認められなかった。

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る。また、子宮頸部粘膜の HPV 関連病変である子宮頸部上皮内腫瘍で Topoisomerase II α の発現が上昇していることが判明している。本研究においても、陽性群と陰性群における Topoisomerase II α 発現に有意差が認められ ($p < 0.01$)、陽性群の方が陽性細胞数が多かった。Topoisomerase II α の異常発現はアポトーシスの誘導と細胞活性に関与しており、HPV 感染した OLP では、その細胞増殖が亢進し

ていると考えられた。また、Topoisomerase II α は、腫瘍性病変よりもウイルス感染関連病変の方が活性が高いことが知られている。これらのことより、Topoisomerase II α が HPV 感染に関連した OLP 悪性化のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

V. まとめ

OLP および悪性化した OLP における HPV 感染について検索したところ、HPV 感染が OLP 悪性化のリスクファクターの一つであることが示唆された。また、OLP がびらん型を示した場合、HPV 感染と OLP の悪性化を考慮し、生検などの検査をする必要性が示唆された。さらに、Topoisomerase II α が HPV に関連した OLP 悪性化のマーカーとなり得る可能性が考えられた。