

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 高本 大路

横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 産婦人科学 主任教授 宮城 悦子

副査 横浜市立大学附属病院 病理診断科 准教授 山中 正二

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学准教授 佐野 大佑

博士の学位論文審査結果の要旨

The analysis of human papillomavirus DNA in penile cancer tissue by in situ hybridization

(陰茎癌組織における in situ hybridization 法を用いた
ヒトパピローマウイルス DNA の発現解析)

1.緒言

陰茎癌は男性の悪性腫瘍の中で0.5%未満と稀な疾患である。発生率は地域差があり、大部分の先進国ではまれな疾患であり、米国では人口10万人あたり0.3-1.8人である (Lu, B.et al, 2009) (da, Costa.et al, 2015)。南米やアフリカ、東南アジアなどの発展途上国での罹患率は高くブラジルでは人口10万人あたり3.7人、ウガンダでは人口10万人あたり4人と報告されている。一方、イスラエルでは人口10万人あたり0.04人と少ない。本邦では10万人あたり0.4人と他の先進国と同程度である (Iwasawa A.et al, 1993)。これまでの研究で human papillomavirus (HPV)は女性生殖器と同様に男性生殖器の扁平上皮に感染する可能性があるが、陰茎癌と HPV との関連は依然として解明されていない。陰茎癌における HPV 検出法は PCR 検査や in situ hybridization (ISH) 法があるが、PCR は高い感度を誇る一方で形態学的背景が失われやすい。ISH 法は形態損失も少なく直接検出することが可能である。本研究では、陰茎癌組織における HPV 遺伝子の発現を ISH 法を用いて調べた。

2.対象と方法

病理学的に陰茎癌と診断され、陰茎切除術を受けた41例と腫瘍切除術を受けた3例を本研究の対象とした。本研究にあたり横浜立大学の倫理委員会で承認を受けた。(人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会 承認番号：D1209028) 症例はすべて、1990年4月から2010年3月までに横浜市立大学附属市民総合医療センターとその関連病院で治療を受けたものである。切除されホルマリン固定されている癌組織を4 μ mに薄切、未染プレパラートを作成し、子宮頸癌の HPV 検出に用いられている市販のキット (VENTANA 社製 INFORM HPV III)を用いて ISH を行い HPV の有無を一人の経験ある病理医が確認した。透徹・封入方法は水洗したのちに80%エタノール1分を2回、90%エタノール1分を2回、100%エタノール1分を2回行いアセトンに10秒、キシレン1分を2回行い封入する。INFORM HPVIIIはDNPを標識したNPV ProbeにAnti-DNP, Mouse Anti-rabbit Amplifier, Biotin 標識, Gout Anti-Mouse 抗体の順で反応させ Stereptaavidin-AP に NBT/BCIP で青色の沈殿を形成させる。INFORM HPVIII High Risk Probe は

16,18,31,33,39,45,51,52,56,58,66 の HPV genotype を認識し, Low Risk Probe は 6,11 の HPV genotype を認識する. 腫瘍浸潤の深さ, 組織学的分化の悪性度, 浸潤の悪性度, Broder の悪性度, 山本-小浜 (Y-K) 悪性度, リンパ管塞栓と koilocytosis の有無について検討を行った. 最初の 2 年間は 3 ヶ月ごとに, 3 年目は 6 ヶ月ごとに, 4 年目からは 1 年ごとに追跡検査を行った. Mann-Whitney の U 検定とカイ二乗検定を行い, 患者背景と術前因子を解析した. 個々の因子の同定には多変量ロジスティック回帰分析を用いた. OS の推定には Kaplan-Meier 積限界推定法を用いた. 生存期間はログランク検定を用いて比較し, $P < 0.05$ は統計的に有意な差を示すとみなした.

3.結果

44 例中 5 例 (11.4%) に高リスク HPV の発現が認められた. 低リスク型 HPV の発現を認めた患者はいなかった. 次に, 高リスク HPV の発現と, 年齢, 腫瘍部位, 腫瘍径, T 期, 病理学的分化度, 核異型度, Broder 分類, 浸潤パターン, Y-K グレード, 脈管浸潤, リンパ管浸潤, koilocytosis, リンパ節転移との関連を検討した. 高分化型 ($P=0.044$), Broder's Grade 1 ($P=0.019$) の患者は, HPV 陽性率が有意に低かった. HPV の発現は, 癌特異的生存期間と有意な関連はなかった ($P=0.932$).

4.考察

HPV は子宮頸癌症例の 30~80%で ISH によって検出可能であるとされている. 陰茎癌において, 本研究における HPV 陽性率(11.4%)は, 以前の報告と比較して低かった (Weaver MR. et al, 1989). この理由として考えられるものは: i) 日本の陰茎癌患者はそもそも HPV 陽性率が低い, ii) このキットでは検出できない HPV 遺伝子型が陰茎癌の発癌遺伝子である, iii) HPV 遺伝子の容量は子宮頸癌と比較して低い可能性があげられる. 組織学的には, HPV の発現は分化度および角化度に相関していると考えられている. 一方で HPV 発現と分化度との間に負の相関を報告している文献もある (Klussmann JP, et al. 2003). 本研究は, 低分化の癌で HPV 陽性率が高いことを明らかにした. 固形癌患者を対象とした以前の研究でも分化度が低い悪性腫瘍の方が HPV 陽性率が高かったことを報告している. 子宮頸癌では 93-100%で HPV が陽性となった報告されている (Bosch FX, et al. 1997) (ter Harmsel B, et al. 1999). 一方で陰茎癌での HPV 検出率は 30%前後であったと報告されている (Wiener et al, 1992) (Bezerra et al, 2001) (Anne, P. Lont. et al, 2006). これらはすべて PCR 法にて検出されたものである. ISH 法で陰茎癌の HPV 検出したものは 65 例を対象とし 53.8%であったとする報告がある (Senba et al, 2006). このように陰茎癌は子宮頸癌と比較して多くの報告では HPV 検出率は低い. 結論として, 陰茎癌 44 例中 5 例 (11.4%) で HR HPV が検出された. LR HPV はいずれの症例にも検出されなかった. HR HPV の発現と腫瘍の分化および角化 (Borders 分類) との間には, ある程度の相関があった. HPV 陽性患者の OS は, HPV 陰性患者の OS と差がなかった.

INFORM HPV VIII を用いた ISH では HPV 遺伝子型は検出されないが、この方法は簡便であり、子宮頸癌組織と同様に陰茎癌組織の検査にも有用であろう。

論文審査結果の要旨

審査にあたり上記論文要旨の説明が行われた後、以下の質疑応答が行われた。

1. 山中副査より：1) 異形成との記載があるが、*dysplasia* なのか *atypia* なのか？、2) 核異形度と記載があるが、G1-3 に分類しており核異型度ではないか？、3) Koilocytosis の陽性例は p16 や ISH では全例で陽性になるのか？、4) Koilocytosis の判定は koilocytosis だけで判定しているのか？それともほかの病理所見も加味しているのか？、5) 子宮頸癌と同じようなメカニズムで HPV の関連性があるのか？との質問がなされた。1) については central review をしていただいた病理の先生より *dysplasia* ではなく、*atypia* について評価をされており、2) に関しても核異型度という記載が正しい内容であることを確認した。それに合わせて本文中および図表の核異形度の記載を核異型度の記載に変更した。3) については当院での検討においても koilocytosis 陽性例での ISH 法での HR HPV 陽性例は半数程度であり、報告でも幅はあるものの 3-7 割程度と一致していない。はっきりとしたメカニズムは不明だが、HPV 感染をきたし koilocytosis が形成されたのちに、陰茎癌となり腫瘍細胞の増殖にともない組織破壊が進み、HPV 感染部位が残存していない可能性などが考えられる。4) については泥状のクロマチンを呈する核所見（スマッジ核）や核異形などの HPV 感染細胞も加味しながら総合的に判定いただき、HPV 感染を示唆する場合は koilocytosis 陽性と報告いただいている。5) に関してはいまだにはっきりとした報告はないが、子宮頸癌と同様なメカニズムであるとする報告が多いことを説明した。

2. 佐野副査より：1) koilocytosis status と HPV ISH status の結果の乖離をどのように考察しているのか？(koilocytosis 診断の感度、HPV ISH の感度による影響など)、2) HPV 関連陰茎癌では子宮頸癌のように CIN の経過を経て発癌にいたるのか？、3) HPV 関連中咽頭癌では口蓋扁桃の陰窩のような解剖学的に HPV の持続感染が成立しやすい部位が存在するが、HPV 関連陰茎癌ではそのような解剖学的な特徴を有するか？との質問がなされた。1) については山中副査の質問時に返答した際に述べたような考察がなされていることを説明した。2) については、陰茎癌では子宮頸癌のような十分なスクリーニング検査が実施されておらず、発癌しある程度腫瘍が育った段階で診断されることが多く評価が難しい、と返答した。3) については陰茎癌の約半数が亀頭での発癌が報告されており、陰茎において皮膚の薄い亀頭部が発癌しやすい可能性について言及した。

3. 宮城主査より：1) 子宮頸癌のように陰茎癌でも HPV の持続感染をきたすのか？、

2) 病理組織で疣贅癌や疣状癌といったものは判別できるのか？、3) 陰茎癌では koilocytosis が陽性部位と、より悪性度の高い部位が共存するような所見が混在するのか？、4) 陰茎癌における ISH と PCR の感度の差はどの程度あるのか？との質問がなされた。1) については HPV 関連陰茎癌では同様のメカニズムをきたすようだが、大半を占める通常型の SCC においては koilocytosis 陰性で ISH や PCR 陽性の陰茎癌も存在しており、持続感染を証明できないものも多数存在していることを説明した。2) については疣贅癌と疣状癌では浸潤様式の違いがあり、浸潤形態などを総合的に判断することが多いことを山中副査よりアドバイスいただいた。3) については陰茎癌における HPV 感染と発癌のメカニズムが他の癌腫と違う可能性が考えられる。大半を占める通常型の SCC のように HPV との関連性をはっきりしていない腫瘍では HPV 感染が残存している部位と、腫瘍が進展している部位が混在しており、HPV 感染以外のメカニズムで癌化した部位と HPV 感染をした部位が混在している可能性は十分に考えられることを説明した。4) については ISH で検討されたパラフィン切片の経年変化の可能性も考えられる。希少癌であり、なかなか症例が集まらず 10 年以上古い検体も使用されている。現在はパラフィン切片から ISH 以外にも検査ができるようになっており、今後の症例検討で利用してみることも可能であることもアドバイスいただいた。

審査結果

申請者が行った研究は、本邦におけり希少癌である陰茎癌において病理組織における koilocytosis の評価と in situ hybridization 法にて HPV 感染の検討を行った初の研究報告であり、横浜市立大学医学博士号（乙号）の学位を授与するに値する業績であると、審査委員全員一致にて判断された。

令和 6 年 5 月 20 日

【講評】

希少癌である陰茎癌について、HPV の関与の頻度を明らかにするために、ISH 法により陰茎癌組織における HPV 遺伝子の発現を調べ、形態や予後因子や予後との関連を調べた研究である。結果として 44 例中 5 例（11.4%）のみが HPV 陽性という結果であったが、低リスク型 HPV の発現を認めた患者はなく、高分化型（ $P=0.044$ ）、Broder's Grade 1（ $P=0.019$ ）の患者で HPV 陽性率が有意に低いなどの知見が得られた。質疑応答では、多少の知識不足や書類の誤字脱字などの指摘があったが、質問に対して概ね適切な回答が得られた。44 例の検討で PCR 法は行われていなかったが、希少癌でのまとまった症例数の検討において、日本では初となる新たな知見が得られたことで論文採択となり、乙号学位相当の研究と判断した。

（主査 宮城悦子）