

学位論文の要旨

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)

June 2024
(2024年6月)

Daiji Takamoto
高本 大路

Department of Urology
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学

(Research Supervisor: Takashi Kawahara, Senior Lecturer)
横浜市立大学附属市民総合医療センター 泌尿器・腎移植科
(研究指導教員: 河原 崇司 講師)

(Doctoral Supervisor: Kazuhide Makiyama, Professor)
(指導教員: 槇山 和秀 主任教授)

学位論文の要旨

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)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5920620/pdf/ol-15-05-8102.pdf>

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 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 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 in situ hybridization (ISH) 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[®] HPV III 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 Streptavidin-AP に

NBT/BCIP で青色の沈殿を形成させる。INFORM HPV III 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.

引用文献

Anne, P. Lont., Kroon, B.K., Horenblas, S., Gallee, M.P., Berkhof, J., Meijer, C.J., Snijders, P.J.(2006), Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*. 119, 1078–1081.

Bezerra, A.L., Lopes, A., Santiago, G.H., Ribeiro, K.C., Latorre, M.R., Villa, L.L.(2001), Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: Analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*. 91, 2315–2321.

Bosch, F.X., Muñoz, N., de Sanjosé, S.(1997), Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomed Pharmacother*. 51, 268–275.

da Costa W.H., de Oliveira Rosa R.A., Santana, T.B., Benigno, B.S., da Cunha, I.W., de Cássio Zequi, S., Guimaraes, G.C., Lopes, A.(2015), Prognostic factors in patients with penile carcinoma and inguinal lymph node metastasis. *Int J Urol*. 22, 669–673.

Iwasawa, A., Kumamoto, Y., Fujinaga K. (1993), Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Urol*. 149, 59–63.

Klussmann, J.P., Weissenborn, S.J., Wieland, U., Dries, V., Eckel, H.E., Pfister, H.J., Fuchs, P.G.(2003), Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: A different tumor entity? *Med Microbiol Immunol*. 192:129–132.

Lu B., Wu Y., Nielson, C.M., Flores, R., Abrahamsen, M., Papenfuss, M., Harris, R.B., Giuliano, A.R. (2009), Factors associated with acquisition and clearance of human papillomavirus infection in a cohort of US men: A prospective study. *J Infect Dis*. 199, 362–371

Senba, M., Kumatori, A., Fujita, S., Jutavijittum, P., Yousukh, A., Moriuchi, T., Nakamura, T., Toriyama, K.(2006), The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand. *J Med Virol*. 78, 1341–1346.

ter Harmsel, B., Smedts, F., Kuijpers, J., van Muyden, R., Oosterhuis, W., Quint, W.(1999), Relationship between human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 93, 46–50.

Weaver, M.G., Abdul-Karim, F.W., Dale, G., Sorensen, K., Huang, Y.T.(1989), Detection and localization of human papillomavirus in penile condylomas and squamous cell carcinomas using in situ hybridization with biotinylated DNA viral probes. *Mod Pathol.* 94–100.

Wiener, J.S., Effert, P.J., Humphrey, P.A., Yu, L., Liu, E.T., Walther, P.J.(1992), Prevalence of human papillomavirus types 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.

論文目録

I 主論文

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

Takamoto, D., Kawahara, T., Kasuga, J., Sasaki, T., Yao, M., Yumura, Y., Uemura, H.

雑誌名：Oncology Letters Vol.15, No.5, Page 8102-8106, 発行年 2018 年

II 副論文

1. A low psoas muscle volume is associated with a poor prognosis in penile cancer.

Takamoto, D., Kawahara, T., Tokita, T., Kasuga, J., Yumura, Y., Uemura, H.

雑誌名：Oncotarget Vol.11, No.38, Page 3526-3530, 発行年 2020 年

III 参考論文

1. 陰茎癌病理組織における HPV(human papillomavirus)感染関連細胞の臨床的検討

高本 大路, 春日 純, 河原 崇司, 佐々木 毅, 湯村 寧, 上村 博司.

雑誌名：日本性感染症学会誌 第 28 巻, 1 号, 67-72 頁, 発行年 2017 年

2. A Longer History of Hemodialysis Can Lead to Sarcopenia in Renal Transplantation Patients.

Takamoto, D., Kawahara, T., Mochizuki, T., Makiyama, K., Teranishi, J., Uemura, H.

雑誌名：Transplantation Proceedings Vol.50, No.8, Page 2447-2450,
発行年 2018 年

3. Fluorescent Light-Guided Cystoscopy with 5-ALA Aids in Accurate Surgical Margin Detection for TURBO: A Case Report.

Takamoto, D., Kawahara, T., Ohtake, S., Mochizuki, T., Kuroda, S., Nakaigawa, N., Izumi, K., Miyoshi, Y., Makiyama, K., Yao, M., Sawazumi, T., Inayama, Y., Ohta, J., Uemura, H.

雑誌名 : Case Report in Oncology Vol.11, No.1, Page 164-167,
発行年 2018 年

4. Successful immunomodulation in kidney transplant recipients with cytokine release syndrome after coronavirus disease.

Takamoto, D., Sasaki, H., Kataoka, H., Kodama, F., Higuchi, H., Hirano, T., Takada, Y., Harada, S., Harada, H., Tanaka, H.

雑誌名 : IJU Case Report Vol.24, No.5, Page 373-377, 発行年 2022 年