論 説

良性および悪性喉頭腫瘍と HPV との関わり

— 癌化プロセスへの一考察 —

竹山 勇・堤 康一朗

Relationship between Laryngeal Tumor and Human Papilloma Virus

Isamu Takeyama and Kouichiro Tsutsumi

(St. Marianna University School of Medicine)

Human papilloma virus (HPV) genome, a circular double-stranded DNA molecules with approximately 8,000 base-pairs, is suspected to be one of the etiological factors in laryngeal benign and malignant tumors. In the present review article, a close relationship between HPV infection/expression and laryngeal tumors is addressed.

HPV-6/11 infection is well known to cause juvenile-onset laryngeal papilloma. We have detected HPV-11 DNA/mRNA signals and/or papilloma virus genus-specific common antigen in all samples of adult-onset multiple laryngeal papilloma (AMLPP), providing direct evidence of the association of HPV-11 infection and AMLPP. Recently, several molecular biological studies using polymerase chain reaction have detected HPV-16 DNA in laryngeal squamous cell carcinomas (20%~54%). We found one laryngeal carcinoma in which the HPV-16 transforming genes, E6 and E7, were expressed. The HPV-16 long control region was active in cultured laryngeal epithelial cells (HLEC cells) from vocal cords, indicating that HLEC cells are target cells for HPV-16 gene expression. Moreover, HLEC cells could become immortalized by transfection with HPV-16 DNA (HLEC-16 cells).

A modified in vivo implantation system showed that HLEC-16 cells form epithelium which resembles precancerous lesions, such as severe dysplasia. These results suggest that, although the exact mechanism remains to be elucidated, HPV-16 infection may play an important role in laryngeal multistep carcinogenesis.

Key words: human papilloma virus, laryngeal papilloma, laryngeal carcinoma

はじめに

子宮尖形コンジローマならびに子宮頸癌の発症に一群のヒトパピローマウイルス (human papilloma virus : HPV) の感染が深く関与する

ことが、DNA 組換え技術を中心とする分子生物学的研究によって確かとなってきた^{1)~6)}。喉頭の粘膜は大部分が多列線毛上皮に被われているが、喉頭癌の好発部位である声帯は組織学的

に子宮頸部と同様、重層扁平上皮を含んでおり、近年、喉頭領域においても、良性腫瘍である喉頭乳頭腫^{7)~20)}と喉頭癌の一部^{20)~28)}に HPV 遺伝子を検出できることが報告され、これらの腫瘍発生と HPV 感染の関連性が指摘されている。本論文では著者らの研究成果を中心に喉頭乳頭腫および喉頭癌と HPV との関わりについて述べ、併せて腫瘍発生機構に対する考察に言及したい。

I. ヒトパピローマウイルス (human papilloma virus : HPV) とは

ヒトパピローマウイルス (HPV) はヒトを自然宿主とし、パポウイルス科に属する小型の DNA ウィルスであり、現在までに70種類近くの亜型が分離され、良性腫瘍から検出されるこ

とが多い良性型(2, 6, 7, 11型など)と悪性腫瘍から検出されることが多い悪性型(5, 8, 16, 18型など)とに分類することができる¹⁾²⁾。HPV の遺伝子配列はウィルスの性質を発現するための蛋白をコードする初期遺伝子群 (E 領域, E1, 2, 4-7), ウィルスの殻を形成するための蛋白を発現する後期遺伝子群 (L 領域, L1, 2) およびこれら E/L 領域の転写を制御する long control region (LCR) からなっている (図1)。

HPV の感染および増殖が扁平上皮細胞特異性を示すことは良く知られており、ある特定臓器の扁平上皮細胞でのみ HPV 遺伝子の転写が活性化されることが推察されている²⁹⁾³⁰⁾。

II. 喉頭乳頭腫と HPV

喉頭に発生する良性腫瘍の中で、喉頭乳頭腫は比較的良好に経験する疾患の一つである。この喉頭乳頭腫は、発症年齢や臨床像の相違により 1) 若年性多発型, 2) 若年性単発型, 3) 成人多発型, 4) 成人単発型, の4群に大別することができる。

1) 若年性喉頭乳頭腫 (juvenile-onset laryngeal papilloma : JLP)

若年性喉頭乳頭腫 (JLP) はそのほとんどが多発性で再発を繰り返す症例であり、治療に難渋することが多いが、思春期以降にはしばしば自然退縮もみられる。1980年代に入り、Costa ら⁷⁾、Braun ら⁸⁾が HPV 属に共通して存在する抗原 (papilloma virus genus-specific common antigen : pgs-antigen) に対する抗体を用いた免疫組織染色により、JLP と HPV 感染の関係を明らかなものとした。現在では分子生物学的手法の発展と共に、この JLP 発症には主として HPV-6, -11 型の感染が関与することが知られており^{12)~18)}、その感染経路としては子宮尖形コンジローマを持った母親からの出産時産道感染が想定されている^{9)~11)}。事実、帝王切開で出産した子供には JLP はほぼ発症しないといてよい。大山らは1987年以来、JLP を国際的、学際的に調査研究し、タイ国における本

図1 パピローマウイルス蛋白質の構造遺伝子地図

パピローマウイルス (HPV) の初期蛋白質 (E1~E8) および後期蛋白質 (L1, L2) の構造遺伝子である読取り枠 (open reading frame : ORF) はこのウィルスの環状2本鎖DNAの片方に局在し、その相対的な位置関係とともに HPV の型にかかわらずよく保存されている。図は HPV1a DNA の塩基配列の ORF の位置とその第1 ATG の位置(矢印)を示している。L 領域 (L1) と E 領域 (E8) の間には long control region と呼ばれるウィルス転写制御領域がある。

症の研究でも経腔分娩で出生した小児がすべてであったとしている¹⁰⁾。また、Shah らも JLP 109 例中 108 例 (99.1%) が自然分娩であり、その内 60 名 (55.0%) の母親が尖形コンジローマに罹患していたと報告し、尖形コンジローマの全妊婦における罹患率は 0.5~1.5% といわれていることからみると、この数値は極めて高く、尖形コンジローマで検出されている HPV-6, -11 型との関連性を強く支持する内容といえよう¹¹⁾。

2) 成人喉頭乳頭腫 (adult-onset laryngeal papilloma : ALP)

成人喉頭乳頭腫 (ALP) の場合は、JLP と異なり単発型の症例が多い。1982~1983 年の Mounts ら¹²⁾、Steinberg ら¹³⁾ のサザンブロット法を用いた報告以来、ALP 組織においても HPV-6, -11 型の感染が証明されてきており、その感染経路に関する調査研究は今後の課題とされている。本症は成人になってから感染したとする考えもあるが、仮に産道感染からとするならば、JLP として発症するはずであった症例がなんらかの、主として宿主側の要因によって発生が抑えられ、成人に至るまで、いわゆる “silent infection” の期間を経て ALP として発症した可能性も考えられる¹⁶⁾。

私共も ALP における HPV 感染の有無を、*in situ* hybridization 法 (ISH 法) と免疫組織学的手法 (pgs-antigen の検出) を用いて検索し

た¹⁴⁾(表 1)。その結果、腫瘍が片側声帯に留らず、両側声帯、仮声帯、喉頭蓋喉頭面などへの広がりを見せていた多発型の症例、あるいは腫瘍摘出後に同一部位や他の部位に腫瘍の再発を認めた再発性症例の全例に HPV-6 型あるいは 11 型 DNA と pgs-antigen のいずれかないしは両者を検出した。この HPV DNA (図 2 A, 2 B) と pgs-antigen のシグナル(図 2 C)は、腫瘍表層に向って強くなっている。このことはウイルス DNA が細胞染色体の外で増殖し、換言すれば細胞 DNA に組み込まれず、上皮細胞の分化に伴い複製していることを示している。また、これらの HPV 感染陽性の ALP 症例からは、組織を変性させない条件でアンチセンスの RNA プローブを用いる ISH 法により HPV-11 型初期遺伝子群 E 領域をコードする RNA シグナルも検出された(図 2 D)。この 11 型 E 領域 RNA シグナルの発現パターンは、(1)腫瘍細胞核を中心に放射状に拡がりを見せ、(2)その強度は症例によってまちまちであり、(3)同一症例でも個々の細胞によって不均一であった¹⁵⁾。これらの所見と対比させて Stoler らの尖形コンジローマ組織での結果から推察すると、検出された RNA の大部分は E1~E5 由来のシグナルであると思われた³¹⁾³²⁾。

一方、腫瘍が片側声帯に局限し、手術的摘出によって再発を認めなかった単発型症例では、

表 1 成人喉頭乳頭腫(20例)における免疫組織学的ならびに *in situ* hybridization 法による HPV の検索

症例 No.	性	発症時 年 齢	生検時 年 齢	発症型	pgs-antigen	HPV-11 DNA	HPV-11 RNA
1	男	29	36	多発型	+	++	+
2	男	31	40	多発型	+	+	+
3	男	55	59	多発型	+	+	+
4	男	55	62	多発型	+	+	—
5	男	39	44	多発型	+	—	—
6	男	31	43	多発型	+	—	—
7	男	58	66	多発型	—	+	+
8	男	40	47	多発型	—	+	—
9~20	男	44~70	45~75	単発型	—	—	—

ISH 法と免疫組織学的方法によって HPV 感染を証明できず、また、HPV-16 型の感染は全ての ALP 症例に見出せなかった(表 1)。一般的に多発型症例の肉眼所見は尖形コンジローマ類似の像を呈し(図 3 A)、組織学的に細胞異型や分裂像をほとんど呈さないものが多い(図 3 B)。一方、成人例で経験することの多い単発型症例は肉眼的にも hyperkeratotic で白く硬い印象を与え(図 3 C)、組織学的に強い細胞異形の認められる症例が多い。Mounts らは ALP 組織中にサザンブロット法により HPV-6 型のサブタイプを検出し、HPV-6c を検出した症例の乳頭腫は喉頭を越えて進展し、多発し、再発を繰返すことを示した¹⁷⁾。また、Nakajima らは成人型喉頭乳頭腫 12 例中 3 例に pgs-antigen を検出し、その 3 例の乳頭腫は多発性であったこと

を報告している¹⁸⁾。すなわち、ALP 組織中の HPV の存在と型は、喉頭乳頭腫の臨床像とよく相関しているといえることができる。さらに、Steinberg らは再発性の喉頭乳頭腫が緩解期にあるときでも、周辺組織や正常喉頭上皮内に HPV-6 型の存在が見出されることを示している¹³⁾。

3) 喉頭乳頭腫の悪性化

喉頭乳頭腫の癌化については多くの報告もみられ、本腫瘍を前癌病変として注意深く取扱うべきであるとする考え方も強い。Howley らのグループの肺扁平上皮癌を伴った喉頭乳頭腫症例において、喉頭乳頭腫、肺癌および転移巣から HPV-11 型 DNA が検出された報告は注目されている¹⁹⁾。この細胞遺伝子に組み込まれない良性型 HPV 感染細胞の癌化のメカニズムの解

図 2

- A および B. *in situ* hybridization 法による成人喉頭乳頭腫からの HPV 11 型 DNA シグナルの検出(矢印)。乳頭腫の細胞核に局限して銀粒子が認められる。
 C. 免疫組織化学的方法による成人喉頭乳頭腫からの pgs-antigen の検出。乳頭腫組織表層の細胞核に局限して染色される(矢印)。
 D. *in situ* hybridization 法による成人喉頭乳頭腫からの HPV 11 型 RNA (E 領域) の検出。核を中心に放射状に銀粒子が認められる。

図 3

- A. 成人多発型喉頭乳頭腫症例の肉眼所見。腫瘍は尖形コンジローマ類似の像を呈し、声帯のみではなく喉頭蓋喉頭面(矢印)にも多発している。
- B. 成人多発型喉頭乳頭腫症例の組織学的所見。空胞細胞症(koilocytosis)がみられ、細胞異型や分裂像はほとんど呈さない。
- C. 成人単発型喉頭乳頭腫症例の肉眼所見。周辺正常組織と比較し白く硬い印象を与える。

明は、後述の喉頭癌発癌のプロセスにおける HPV の役割の解明と共に今後の大きな課題といえよう。放射線治療は喉頭乳頭腫の癌化を惹起するという諸家の報告がみられ、このことは良性型 HPV 感染細胞の悪性化に果す放射線の役割を示唆しており興味深い。

Ⅲ. 喉頭癌と HPV

昨今の細胞生物学や分子生物学を基盤とする腫瘍学の進歩から、発癌へのプロセスがイニシエーション、プロモーション、プログレッションという明確に区分された段階的な過程を含むものであり、それぞれの段階において遺伝子レベルでの変化がおこなっていることが明らかとなってきた(多段階発癌説)。

1) 喉頭癌組織からの HPV 遺伝子検出

喉頭癌組織からの HPV 遺伝子検出に関しては、遺伝子を増幅して検出する polymerase chain reaction 法 (PCR 法) が普及してきた現在、その検出報告が増えてくるものと思われる。

喉頭癌と HPV との関連が報告されたのは、Brandsma らのグループが極めて高度に分化した扁平上皮癌である疣贅癌(verucous carcinomas) 6 例全例に、サザンブロット法によって HPV-16 型 DNA を証明したのが最初である²¹⁾。その後、Syrjanen らのグループによって ISH 法を用いて HPV DNA を証明する研究がなされ、116 例の喉頭扁平上皮癌を検討した報告では 12.9% の喉頭癌に、少なくとも 1 種類の HPV DNA の存在することが示された²²⁾。最近の PCR 法による HPV DNA の検索結果によれば^{23)~28)}(表 2)、HPV DNA の陽性率は Prez-Ayara ら²⁵⁾ による 54% から私共のグループの得た 21% まで様々であるが、そのサブタイプは子宮頸癌と同様、HPV-16 型の頻度が最も高く、現状での結論は、16 型を中心とする HPV が関与する喉頭癌症例のサブグループが存在することはほぼ確からしい事実と考えてよい。

2) 喉頭癌組織における HPV-16 型 E6/E7 領域の発現

現在、HPV 陽性の子宮頸癌細胞で発現して

いる HPV 遺伝子の分析, また, HPV 遺伝子断片を細胞に導入する実験から, HPV の細胞トランスフォーム活性は E6 および E7 遺伝子が担っていると考えられている¹⁾²⁾. 私共が PCR 法により HPV-16 型 E6 領域遺伝子を検出し得た 7 例の声門型喉頭癌症例の新鮮凍結癌組織から DNA および RNA を抽出し解析したところ, 1 例からサザンプロット法による解析の結果, HPV-16 型遺伝子は ALP 症例における HPV-11 型遺伝子の場合と異なり, 細胞遺伝子に組み込まれた形で存在していることが実証された(図 4 A-a). また, ノザンプロット法により, このトランスフォーミング遺伝子 E6/E7 領域の発現が確認された¹⁵⁾(図 4 A-b). この所見は, 喉頭癌細胞の中で HPV-16 型遺伝子が安定して存在するためには細胞遺伝子に組み込まれることが重要であることを示唆している.

この症例は 60 歳の男性 (T3N0M0) で, 呼吸困難を主訴に来院し, 喉頭全摘出術が行なわれ, 腫瘍は組織学的に高分化型と低分化型の扁平上皮癌が混在する像を呈し(図 4 B), 肉眼的には右声帯部を中心として腫瘍は内腔を充満するように声門上下へ大きく拡がっていた(図 4 C).

3) 正常声帯上皮細胞における HPV-11 型および 16 型遺伝子制御領域の転写活性

前述したように HPV の感染・増殖は上皮細胞/臓器特異性を示し, ある特定臓器の扁平上

皮細胞でのみ HPV 遺伝子の転写が活性化されることが推察される²⁹⁾³⁰⁾.

私共は, ヒト喉頭上皮細胞 (human laryngeal epithelial cells : HLEC 細胞) が HPV 遺伝子の発現にとってのターゲットであることを確認するために, 正常ヒト声帯から初代無血清培養した HLEC 細胞に HPV-11 型および 16 型のエンハンサー領域を導入し, クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) アッセイを試みた¹⁵⁾. リポフェクション法によって培養 HLEC 細胞に導入された 11 型および 16 型のエンハンサー領域は遺伝子導入 48 時間後において強い転写活性 (CAT 活性) を示した(図 5 A). また, HPV-16 型の全遺伝子を導入した場合には E6/E7 領域遺伝子の RNA 転写を ISH 法で検出証明することに成功した. (図 5 B, 5 C). これらの成績から喉頭上皮細胞が 11 型および 16 型遺伝子の発現にとっての受容細胞であることが明確となったとはいえ, このことが HPV の喉頭特異性を規定している唯一の要因であるとは即断できない. ウイルスの生活環を考慮すると, ウイルスのレセプターが存在がある種の上皮細胞に局限されていると仮定すれば, in vivo における喉頭上皮細胞にウイルスレセプターが存在するという直接の証拠はいまだみられていない. この点をさらに検討するためにも, 今後は培養した HLEC 細胞で HPV

表 2 PCR 法を用いた喉頭癌組織からの HPV DNA 検出の報告

報 告 者	HPV DNA 陽性率	HPV の型	陽性症例数/ 検討症例数
Kiyabu, et al ²³⁾ (1989)	40.0%	16型	4/10
Hoshikawa, et al ²⁴⁾ (1990)	20.5%	16型	6/34
Perez-Ayara, et al ²⁵⁾ (1990)	54.0%	16型	16/48
Ogura, et al ²⁶⁾ (1991)		18型	1/1
Anwar, et al ²⁷⁾ (1993)	37.0%	18型	12/43
		16型	2/43
		18型と 33型	1/43
		16型と 18型	1/43
Shidara, et al ²⁸⁾ (1993)	28.8%	16型	11/45
		18型	2/45

を増殖させてウイルス粒子を得るにいたる系の確立，すなわち，HPV の複製を許容する系の確立が不可欠であり，急務な課題である。

4) HPV-16 型遺伝子を導入した喉頭上皮細胞の性質と癌化プロモーション

ヒト上皮細胞の培養技術と遺伝子導入法の進歩に伴い，1980年代後半よりヒト各種上皮細胞に対する HPV-16 型遺伝子の導入が細胞癌化の必須条件の一つである無制限増殖能を引き出すことが報告されてきており^{1)~3)33)} その活性は HPV 遺伝子の E6 および E7 領域が担うことが明らかとなってきた¹⁾²⁾。私共のこれまでの研

究では，培養した HLEC 細胞に HPV-11 型および16型遺伝子を導入して発現させ，その細胞の表現型を検討すると，HPV-11 型遺伝子を導入した細胞は HPV 遺伝子を導入していない，コントロールとして用いた正常細胞とほぼ同一時期に分化し，その後の増殖を継続させることができなかったが，HPV-16 型遺伝子を導入した細胞群の内，2つの細胞群が11型遺伝子導入細胞の増殖停止後も限りなく増殖を続けている (HLEC-16 細胞)。このことは HPV-16 型遺伝子は培養環境下において HLEC 細胞の寿命を延長する能力をもち，HPV-11 型遺伝子はその

図 4

- A-a. サザンブロット解析による喉頭癌組織からの HPV 16型 DNA の検出。HPV-16型遺伝子は細胞遺伝子に組込まれた形で存在していることがわかった。レーン1=HPV-16型のフルゲノムを制限酵素 Bam HI で消化したもの。レーン2=HPV-16型のフルゲノムを Bam HI+Pst I で消化したもの。レーン3=症例より抽出したDNAを Bam HI で消化したもの。レーン4=症例より抽出したDNAを Bam HI+Pst I で消化したもの。
- A-b. ノザンブロット解析による HPV-16型 E6/E7 領域転写産物 (RNA) の検出。約 1.8 kb 付近にバンドが確認された (矢印)。
- B. HPV-16型 E6/E7 領域の転写 (図 2 A-b) が確認された症例の組織所見。
- C. HPV-16型 E6/E7 領域の転写 (図 2 A-b) が確認された症例の肉眼所見。

図 5

- A. ヒト培養声帯上皮細胞での HPV-11 型, 16 型エンハンサー領域の転写活性(リボフェクション法による遺伝子導入後 48 時間目における CAT アッセイ). レーン 1 = 16 型エンハンサー. レーン 2 = 11 型エンハンサー. レーン 3 = 18 型エンハンサー (16 型, 11 型エンハンサーよりも転写活性は弱かった). レーン 4 = 陰性コントロール (pA10-CAT プラスミド). レーン 5 = 陽性コントロール (pSV2-CAT プラスミド: 細胞種特異性のない SV 40 ウイルスエンハンサー/プロモーターを有す).
- B. *in situ* hybridization 法による HPV-16 型 E6/E7 RNA 陽性の培養細胞コロニー (リボフェクション後 48 時間).
- C. *in situ* hybridization 法による HPV-16 型 E6/E7 RNA 陰性コロニー (図 5 B で示されたようなシグナルは HPV 遺伝子を導入しなかった培養細胞では検出されなかった).

能力はもたないことを示しているものと思われる. そこで, HLEC-16 細胞から DNA を抽出し解析したところ, 喉頭癌症例と同様, 導入した HPV-16 型遺伝子は細胞遺伝子に組み込まれた形で存在しており, 活発に E6/E7 領域を転写していることが実証された. しかし, HLEC-16 細胞にその他の癌細胞として重要な性質は欠如していた. すなわち, (1) HLEC-16 細胞の形態に正常 HLEC との顕著な差は認めず (図 6 A, 6 B), (2) HLEC-16 細胞は軟寒天培地上では増殖できず (足場依存性増殖), (3) ノードマウスの皮下に注入しても腫瘍は形成せず, (4) 正常 HLEC 細胞とその増殖率はほぼ同一であった. これらの成績から HLEC 細胞は導入された HPV-16 型遺伝子によって直ちに細胞の癌化までは誘導されないものの, HLEC-16 細胞は発癌途上段階に形質転換した細胞と考えることができ, 喉頭上皮細胞の発癌プロセス解析に対する一つの実験モデルとして有用であると思われる. 事実, 正常ヒト扁平上皮細胞をシリコンシートに培養し, ノードマウス内で三次元構築させると正常の分化増殖が観察され, 生体の扁平上皮の形態を再構築することが可能であるが⁴⁰⁾ (図 6 C), HLEC-16 細胞では正常の分化像を示さず異形成類似の前癌状態を形成し (図 6 D), 形態学的に前癌構築の再現を実証した. また, HLEC-16 細胞は活性化 ras 遺伝子を導入することによって足場非依存性の増殖能を獲得でき, 発癌プロモーターの一つであるオカダ酸によって顕著な形態変化を示した.

Ⅳ. 喉頭腫瘍発生における HPV の役割

これまでに蓄積してきた分子生物学的研究成果は, 良性腫瘍である喉頭乳頭腫とある種の喉頭癌の発生に HPV 感染が大きな要因となる可能性を支持してきているが, 特に喉頭癌 (悪性腫瘍化) プロセスにおいて 16 型を中心とする HPV の役割には多くの未解決な問題もまた残されている. HPV-16 型遺伝子の細胞遺伝子への組み込みと発現したウイルス蛋白が喉頭のも

段階発癌プロセスに関わるメカニズムを想定しつつ、現在考える HPV と喉頭癌発生に関する仮説を図 7 に示した。

以前から喉頭癌発生には喫煙という疫学的要

因が指摘されているが、環境因子としてタバコに含まれる化学物質が、各発癌プロセスにおいて ras などの癌遺伝子ならびに p 53 などの癌抑制遺伝子の変化を引き起こしているものと考え

図 6

- A. 正常喉頭上皮細胞の無血清培養時の形態。
- B. HPV-16型遺伝子を導入した喉頭上皮細胞の無血清培養時の形態 (HLEC-16細胞)。
- C. 培養された正常ヒトケラチノサイトのヌードマウス内での三次元再構築像。正常の分化が観察される。
- D. HLEC-16細胞のヌードマウス内での三次元再構築像。異形成類似の前癌状態を形成する。

図 7 HPV-16型感染の発癌過程での想定される関わりをの模式図

えられる。また、ある種の喉頭癌症例の発癌プロセスにおいては、HPV 遺伝子の細胞遺伝子への組み込みおよび発現が、喫煙による化学発癌と同様の遺伝子変化を引き起こすか、あるいは代価している可能性が高い(図7)。近年、HPV-16 型の E6 及び E7 蛋白が、癌抑制遺伝子として同定されてきた p 53 遺伝子³⁴⁾ および Retinoblastoma (Rb) 遺伝子³⁵⁾ がコードする蛋白と各々結合することが明らかとなり、E6 及び E7 蛋白がこれらの癌抑制遺伝子産物に結合し、その機能を阻害することが HPV の発癌への関与と考えることができる。特に E6 蛋白には試験管内で p 53 蛋白と結合し速やかに分解する活性があり³⁶⁾、細胞内で p 53 蛋白の持つ転写調節能を抑制する³⁷⁾ ことが確かめられており、p 53 蛋白の機能は細胞染色体の安定性を保つことにあることが最近の研究で明らかとなってきた³⁸⁾。すなわち、これらの知見を基にすれば、(1)声带上皮細胞に感染し発現を開始した HPV-16 型 E6, E7 領域は、(2)LCR 内に存在するステロイドホルモン反応性配列などの働きにより活性化が進み³⁾、転写活性がある一定の域値以上となった場合、すなわち、感染からの長い潜伏期を要し、(3)A. E7 の Rb 蛋白結合/不活化、B. E6 の p 53 蛋白結合/分解が加速し、(4)結果として細胞増殖の暴走と遺伝子の不安定性が上昇し、(5)HPV 遺伝子が細胞遺伝子に組み込まれる確立が高まり、(6)組み込まれた HPV-16 型遺伝子は安定した形でさらに E6/E7 を発現し続け、(7)細胞は不死化し、(8)不死化細胞中の遺伝子不安定性は新たな染色体異常を惹起し、(9)細胞は不可逆的な悪性化をたどる、という考え方が成り立つであろう。Hashida らは HPV-16 型 E7 の発現がヒト上皮細胞遺伝子の遺伝子不安定性を上昇させることを実験的に証明している³⁹⁾。

極めて最近の報告として HPV 陰性の培養細胞が、HPV-16 型 E6, E7 領域を導入することにより高率にヌードマウスでの肺転移能が上昇したという実験結果がみられるが⁴⁰⁾、私共も

HPV-16 型陽性の喉頭癌症例では、癌細胞において基底膜構成成分であるⅣ型コラーゲンやラミニンの発現が不良であることを見出し、転移抑制を緩慢化している所見をみている⁴¹⁾。これらの成績は HPV の喉頭多段階発癌プロセスへの関わりが、既に癌となった細胞の悪性度をさらに促進させる可能性も示唆しているといえる。

おわりに

本論説では良性腫瘍である喉頭乳頭腫の発症に HPV-6, -11 型感染が密接に関与することと、喉頭多段階発癌プロセスにおける HPV-16 型感染の役割に関する考察を、現在までに得られてきた知見と著者らの研究結果を総合して論述してきた。ワクチンの開発をも含めた難治性喉頭乳頭腫に対する、より良い治療法の確立、また、喉頭癌症例の Rb, p 53 遺伝子を中心とした様々な細胞性遺伝子の変化と HPV 感染がどのように関連しているのか、などをさらに検討していくことが今後の重要な課題であろう。

稿を終えるにあたり、ドイツ癌センター Dr. H. zur Hausen, Dr. L. Gismann (クローン化された HPV 遺伝子の授与)、カナダメモリアル大学 Dr. A. Pater (使用したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼプラスミドの授与)に深く感謝する。また、ISH 法、PCR 法について御教示いただいた群馬大学第2病理学教室中島 孝教授に深謝する。

文 献

- 1) zur Hausen H: Human papilloma viruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**: 9~13, 1991.
- 2) Howley PM, Schlegel R, Maryland B, et al: The human papilloma viruses. *Am J Med.* **85**: 155~158, 1988.
- 3) Tsutsumi K, Narasimhaswamy B, Sun Q, et al: Human papilloma virus 16 DNA immortalizes two types of normal human epithelial cells of the uterine cervix. *Am J Pathol.* **140**: 255~261, 1992.
- 4) Sun Q, Tsutsumi K, Kelleher MB, et al: Squamous metaplasia of normal and carcinoma *in situ* of HPV 16-immortalized human endocer-

- vical cells. *Cancer Res* **52** : 4254~4260, 1992.
- 5) Rakesh M, Tsutsumi K, Pater A, et al : Human papilloma virus type 16 expression in cervical keratinocytes, role of progesteron and glucocorticoid hormones. *Obstet Gynecol* **81** : 5~12, 1993.
- 6) Sun Q, Tsutsumi K, Yokoyama M, et al : In vivo cytokeratin-expression pattern of stratified squamous epithlium from human papilloma virus-type-16 immortalized ectocervical and foreskin keratinocytes. *Int J Cancer* **54** : 656~662, 1993.
- 7) Costa J, Howley PM, Bowling MC, et al : Presence of human papilloma viral antigens in juvenile multiple laryngeal papilloma. *Am J Clin Pathol* **75** : 194~197, 1981.
- 8) Braun L, Kashima H, Eggleston L, et al : Demonstration of papilloma virus antigen in paraffin sections of laryngeal papillomas. *Laryngoscope* **92** : 640~643, 1982.
- 9) Quick CA, Watts SL, Krzyzek RA, et al : Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **89** : 467~471, 1980.
- 10) 大山 勝, 吉田浩己, 小田 紘, 他 : タイ国における若年性喉頭乳頭腫の臨床疫学的ならびにウイルス学的研究. *喉頭* **1** : 46~51, 1989.
- 11) Shah K, Kashima H, Polk BF, et al : Rarity of cesarean delivery in case of juvenile-onset respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* **68** : 795~799, 1986.
- 12) Mounts P, Shah KV and Kashima H : Viral etiology of juvenile-and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 5425~5429, 1982.
- 13) Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, et al : Laryngeal papilloma virus infection during clinical remission. *N Engl J Med* **308** : 1261~1264, 1983.
- 14) Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M, et al : *In situ* hybridization and immunohistochemical study of human papilloma virus infection in adult laryngeal papillomas. *Laryngoscope* **99** : 80~85, 1989.
- 15) 堤康一郎, 星川智英, 鈴木 毅, 他 : ヒトパピローマウイルス遺伝子の喉頭腫瘍組織での発現と正常声帯上皮細胞における転写活性. *日耳鼻* **96** : 767~773, 1993.
- 16) 竹山 勇, 堤康一郎 : 喉頭乳頭腫とヒト papillomavirus. *JOHNS* **5** : 67~72, 1989.
- 17) Mounts P and Kaskins H : Association of human papilloma virus subtype and clinical course in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* **94** : 28~33, 1984.
- 18) Nakajima T, Tsumuraya M, Morinaga S, et al : Papilloma virus infection among Japanese ; an immunohistochemical study for papilloma virus genus-specific antigen in human surface epithelial lesions. *Jpn J Cancer Res* **76** : 508~516, 1985.
- 19) Byrne JC, Tsao MS, Fraser RS, et al : Human papilloma virus-11 DNA in a patient with chronic laryngo-tracheobronchial papillomatosis and metastatic squamous cell carcinoma of the lung. *N Eng J Med* **317** : 873~878, 1987.
- 20) 竹山 勇 : 発癌へのホルモンとウイルスの関与. *日耳鼻* **93** : 1745, 1990.
- 21) Brandsma JL, Steinberg BM, Abramson AL, et al : Presence of human papilloma virus type 16 related sequence in verrucous carcinoma of the larynx. *Cancer Res* **46** : 2185~2188, 1988.
- 22) Syrjanen S, Syrjanen K, Mantyjarvi R, et al : Human papilloma virus DNA in squamous cell carcinomas of the larynx demonstrated by *in situ* hybridization. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **49** : 175~186, 1987.
- 23) Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, et al : Detection of human papilloma virus in formalin fixed ; invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* **13** : 221~224, 1989.
- 24) Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, et al : Detection of human papilloma virus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. *Laryngoscope* **100** : 647~650, 1990.
- 25) Peretz-Ayara M, Ruiz-Cabello F, Esteban F, et al : Presence of HPV 16 sequence in laryngeal

- carcinomas. *Int J Cancer* **46** : 8~11, 1990.
- 26) Ogura H, Watanabe S, Fukushima K, et al : Presence of human papilloma virus type 18 DNA in a pharyngeal and a laryngeal carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **82** : 184~186, 1991.
- 27) Anwar K, Nakakuki K, Naiki H, et al : Ras gene mutation and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* **53** : 22~28, 1993.
- 28) Shidara K, Suzuki T, Hara F, et al : Lack of synergistic association between human papilloma virus and ras gene point mutation in laryngeal carcinomas. *Laryngoscope* in press.
- 29) Yasumoto S, Taniguchi A, Sohma K, et al : Epidermal growth factor (EGF) elicits down-regulation of human papilloma virus type 16 (HPV-16) E6/E7 mRNA at the transcriptional level in an EGF-stimulated human keratinocyte cell line ; functional role of EGF-responsive silencer in the HPV 16 long control region. *J Virol* **65** : 2000~2009, 1991.
- 30) Nakshatri H, Pater MM and Pater A : Ubiquitous and cell-type-specific protein interactions with human papilloma virus type 16 and 18 enhancers. *Virology* **178** : 92~103, 1990.
- 31) Stoler MH, Wolinsky S, Whitbeck A, et al : Differentiation-linked human papilloma virus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by *in situ* hybridization with messagespecific RNA probes. *Virology* **172** : 331~340, 1989.
- 32) Iftiner T, Oft M, Bohm S, et al : Transcription of the E6 and E7 genes of human papilloma virus type 6 in anogenital condyloma is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J Virol* **66** : 4639~4646, 1992.
- 33) Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, et al : Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papilloma virus type 16 DNA. *J Virol* **61** : 1061~1066, 1987.
- 34) Werness BA, Levine AJ, Howley PM, et al : Association of human papilloma virus types 16 and 18 E6 proteins with p 53. *Science* **248** : 76~79, 1990.
- 35) Dyson N, Howley PM, Munger K, et al : The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243** : 934~937, 1989.
- 36) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al : The E6 oncoprotein encoded by human papilloma virus type 16 and 18 promotes the degradation of p 53. *Cell* **63** : 1129~1136, 1990.
- 37) Mietz JA, Unger G, Huibregtse JM, et al : The transcriptional transactivation function of wild-type p 53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO* **11** : 5013~5020, 1992.
- 38) Lane DP : p 53, guardian of the genome. *Nature* **358** : 15~16, 1992.
- 39) Hashida T and Yasumoto S : Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papilloma virus type 16 E7 oncogene. *J Gen Virol* **72** : 1569~1577, 1991.
- 40) Chen L, Ashe S, Singhial MC, et al : Metastatic conversion of cells by expression of human papilloma virus type 16 E6 and E7 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** : 6523~6527, 1993.
- 41) 堤康一郎, 鈴木 毅, 岩武博也, 他 : 声門上癌間質における基底膜構成成分の発現 —p 53 蛋白腫瘍細胞核内蓄積及びヒトパピローマウイルス16型感染との関係—. *喉頭* **5** : 97~101, 1993.

(別刷請求先: 竹山 勇
〒216 川崎市宮前区菅生2-16-1
聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科学教室)