

Title	子宮頸部腫瘍におけるp16INK4a 蛋白質過剰発現の解析
Sub Title	
Author	石川, 光也(Ishikawa, Mitsuya)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.T67- T80
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050601-0067

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

子宮頸部腫瘍における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の解析

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

いし かわ みつ び
石 川 光 也

(平成 16 年 7 月 26 日受付)

Key Words : p16^{INK4a}, uterine cervical carcinoma, human papillomavirus

ヒトパピローマウイルス (以下 HPV と略す) は皮膚や粘膜に感染して乳頭腫を形成するウイルスであることが知られており, 女性生殖器領域においては良性疾患である尖圭コンジローマから HPV6 型, 11 型が分離されている¹⁾. その後子宮頸癌組織から HPV16 型が分離されたことにより²⁾, HPV はヒトがんウイルスとして注目されるようになった. さらに HPV16 型のウイルス遺伝子産物である E6, E7 蛋白質が, 宿主細胞の癌抑制遺伝子産物である p53 蛋白質, Rb 蛋白質と結合してその機能を抑制することがわかり³⁻⁵⁾, HPV 感染と発癌のメカニズムを結びつけることができるようになった. 以上の経緯から, 今日では HPV 感染は子宮頸部扁平上皮癌の発癌因子として認識されている.

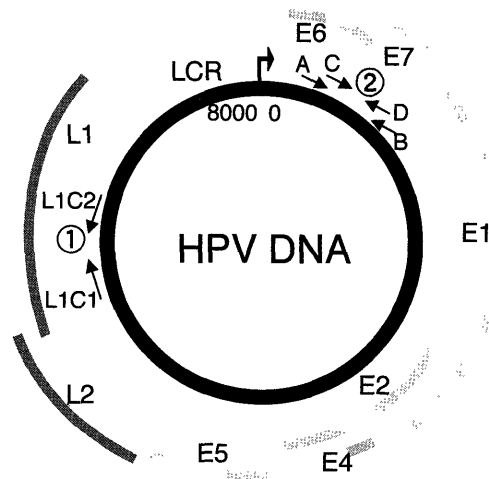
HPV は約 8000 塩基対からなる環状二本鎖 DNA ウイルスで, ウイルス遺伝子の転写や複製に関与している初期遺伝子 E1, E2, E4, E5, E6, E7 と, カプシドとよばれる殻をコードしている後期遺伝子 L1, L2, および遺伝子発現調節領域である Long Control Region (LCR) から構成されている (第 1 図). HPV は L1 領域の塩基配列の相同性からサブタイプが分類され, 現在では約 90 種類以上のサブタイプが存在している. それらは発癌に対する危険度の点でローリスク型 HPV とハイリスク型 HPV に分類され, ローリスク型 HPV の代表例は尖圭コンジローマで検出されている HPV6 型, 11 型である. 一方子宮頸癌組織から検出されたサブタイプはハイリスク型 HPV と定義され^{6), 7)}, その代表例は HPV16 型, 18 型である.

子宮頸部への HPV 感染は性感染症の一つであり, 多くの感染者が存在していることが推測されるが, 現実には感染者のすべてが発癌に至るわけではなく, ごく一部

の感染者がウイルスを排除できないまま持続感染となり発癌に至ると考えられている. HPV 感染者が発癌に至るか否かは, 起因する HPV のサブタイプにより決まるのか, 未だ解明されていない宿主側の因子により決まるのかは不明であるが, 正常の子宮頸部上皮から前癌病変である軽度異形成, 中等度異形成, 高度異形成, そして上皮内癌へと進行し, さらに扁平上皮癌へと至る発癌過程において, HPV 感染に対する宿主細胞の反応を捉えることができれば, その反応を指標として HPV 感染が引き起こす発癌の過程を解明することが可能となる. 本研究では HPV 感染に対する宿主細胞の反応の一つとして, サイクリン依存性キナーゼのインヒビターである p16^{INK4a} 蛋白質に着目した.

p16^{INK4a} 蛋白質は癌抑制遺伝子産物である Rb 蛋白質がリン酸化を受けて不活化される反応を阻害する活性を有し, 細胞周期を調節している蛋白質である. p16^{INK4a} 蛋白質は重要な癌抑制遺伝子産物の一つとして報告され⁸⁾, 肺癌や白血病など多種の悪性腫瘍において p16^{INK4a} 遺伝子の異常やプロモーターのメチル化などによる p16^{INK4a} 蛋白質の不活化が認められている⁹⁻¹¹⁾.

一方で, Parry らの培養細胞を使った報告によると, Rb 蛋白質が不活化している腫瘍細胞では Rb 蛋白質が正常に機能している細胞に比べ p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現していることが判明し, p16^{INK4a} 蛋白質の発現は Rb 蛋白質の機能と逆の相関を示していることがわかった^{12), 13)}. このため, ハイリスク型 HPV E7 蛋白質による Rb 蛋白質の不活化は p16^{INK4a} 蛋白質の過剰な発現を導くことが推測される¹⁴⁻¹⁷⁾. すなわち, 過剰に発現した p16^{INK4a} 蛋白質は HPV E7 蛋白質による Rb 蛋白質不活化の指標として解析することが可能である.



扁平上皮系病変におけるHPV検出に使用したプライマー L1領域：①
 L1C1 5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTT-3' (nt. 5611-5634) L1C2 5'-TACCCTAAATACTCTGTATTG-3' (nt. 5843-5863)

頸部腺癌におけるHPV検出に使用したプライマー E6.E7領域：②
 HPV16型 A: 5'-TGTCAAAAGCCACTGTGTCC-3' (nt. 419-438) B: 5'-GAGCTGTCATTTAATTGCTC-3' (nt. 637-656)
 C: 5'-TCGGTGGACCGTTCGATGTA-3' (nt. 493-512) D: 5'-GATCAGTTGTCTCTGGTTGC-3' (nt. 606-625)
 HPV18型 A: 5'-TGCCAGAAACCGTTGAATCC-3' (nt. 426-445) B: 5'-TCTGAGTCGCTTAATTGCTC-3' (nt. 674-693)
 C: 5'-ATAGCTGGGCACTATAGAGG-3' (nt. 492-511) D: 5'-TGCAATGTTGCCTTAGGTCC-3' (nt. 596-615)
 nt: nucleotide

第1図 HPVのゲノム構造とPCRプライマーの位置

HPVは約8000塩基対からなる環状2本鎖DNAウイルスであり、初期遺伝子E1, E2, E4, E5, E6, E7と、後期遺伝子L1, L2、および遺伝子発現調節領域Long Control Region (LCR)から構成されている。各遺伝子領域および複製開始点(矢印)を示す。本研究におけるHPV感染の検出に際しては、扁平上皮系病変では①に示したL1領域のPCRを行い、頸部腺癌では②に示したE6E7領域のnested-PCRを行った。

今日では、子宮頸癌組織からハイリスク型HPVが検出されることからハイリスク型HPV感染は子宮頸癌の発癌因子とされてきたが、本研究では子宮頸部扁平上皮癌および前癌病変におけるハイリスク型HPV感染とp16^{INK4a}蛋白質過剰発現の関連を検討することにより、子宮頸部発癌機構におけるハイリスク型HPVの関与を分子生物学的に裏付けることを試みた。

一方、子宮頸癌の一組織型である子宮頸部腺癌は、子宮頸癌の約10%を占めていたに過ぎなかったが近年増加傾向にあり^{18), 19)}、また扁平上皮癌に比べて予後不良とされていることから、臨床重要な疾患となってきている²⁰⁻²²⁾。ところで、頸部腺癌におけるHPV感染の報告はなされているものの、その検出率は報告により大きな違いが見られ、はたして頸部腺癌の発癌機構にHPV感染が関与しているのか否かは不明のままである²³⁻²⁸⁾。そこで本研究では、ハイリスク型HPV感染とp16^{INK4a}蛋白質過剰発現との関連を解析することで、頸部腺癌発癌機構におけるハイリスク型HPV感染の関与につき検

討した。さらに腺系病変における病理組織学的な分類や予後因子とp16^{INK4a}蛋白質過剰発現頻度との相関の有無も検討した。

今回の研究では、p16^{INK4a}蛋白質過剰発現の解析は組織検体を用いて行い、子宮頸部腫瘍において病変に特異的なp16^{INK4a}蛋白質の過剰発現を検出することができた。しかし子宮頸癌のスクリーニングとして現在普及している細胞診では、比較的容易にかつ患者への苦痛を伴わずに検体を採取することが可能であることから、細胞診検体を用いてp16^{INK4a}蛋白質の過剰発現を検出することができれば、組織検体の採取を行わなくてもp16^{INK4a}蛋白質の過剰発現を解析することが可能になると考えられる。そこで本研究では、細胞診検体を用いた免疫細胞化学染色を行い、p16^{INK4a}蛋白質の過剰発現が検出可能か否かを検討した。

対 象

検体の採取にあたっては研究内容および安全性について十分な説明を行い、患者から同意を得たうえで行った。

1. 子宮頸部扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の関連

慶應義塾大学病院を受診した軽度異形成患者 75 症例、中等度異形成患者 49 症例、高度異形成患者 34 症例、上皮内癌患者 21 症例、および扁平上皮癌患者 18 症例を対象としてハイリスク型 HPV 感染の検出を行った。さらにハイリスク型 HPV 感染が検出された症例を対象として p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の検出を免疫組織化学染色を用いて行った。また扁平上皮化生や炎症性異型と診断された良性異型患者 7 症例を p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の対照群とした。

2. 子宮頸部腺系病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の関連

慶應義塾大学病院にて手術を行った上皮内腺癌 10 症例、頸部腺癌 62 症例、腺扁平上皮癌 9 症例を対象として p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の検出を免疫組織化学染色にて行った。また正常子宮頸管腺上皮 7 症例を p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の対照群とした。さらに頸部腺癌症例のうち 49 症例を対象として HPV16 型および 18 型の感染の有無を検討した。

3. 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

慶應義塾大学病院を受診した軽度異形成患者 12 症例、中等度異形成患者 15 症例、高度異形成患者 12 症例、上皮内癌患者 13 症例、および頸部腺癌患者 14 症例を対象とした。

方 法

1. 子宮頸部扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出

前述の対象症例において、ThinPrep 法 (Cytocorp, アメリカ) にて回収した子宮頸部擦過細胞浮遊液を用いてハイリスク型 HPV DNA の検出を行った²⁹⁾。なお、本研究では多くの報告でハイリスク型として認識されている HPV16 型, 18 型, 31 型, 33 型, 35 型, 45 型, 51 型, 52 型, 56 型, 58 型をハイリスク型 HPV と定義した^{6), 7)}。

子宮頸部擦過浮遊液 10 ml を 3000 rpm で 30 分間遠沈し、沈渣をリン酸緩衝食塩水 (以下 PBS と略す) にて洗浄後、0.2M 塩化ナトリウム 250 μl, pH8.0 の 0.1M EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 250 μl, 20 mg/ml proteinase K 2.5 μl, 10%ドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と略す) 25 μl を加え 37°C にて一晩反応させた。煮沸処理にて DNase 活性を失活させた 10 mg/ml RNase を 5 μl 加え、37°C にて 4 時間反応させ、TE (10mM Tris-HCl+1mM EDTA pH8.0) 飽和フェノール 500 μl と混和させ 12000 rpm にて 5 分間遠沈し、上清にイソアミルアルコール含有クロロホルム 500 μl を混和し、12000 rpm にて 5 分間遠沈した。上清に 5 mg/ml glycogen 1 μl, 3M の酢酸ナトリウム 50 μl, イソプロピルアルコール 500 μl を混和して 12000 rpm にて 5 分間遠沈した。沈殿したゲノム DNA を 70% エタノールにて洗浄後 50 μl の TE (pH8.0) に溶解した。

抽出したゲノム DNA から、Yoshikawa らが作成したコンセンサスプライマー L1C1・L1C2 (第 1 図) を使用して HPV L1 領域の約 250 塩基対を標的とした PCR 法を行った³⁰⁾。プロトコールは 95°C で 10 分の後に 95°C で 1 分 30 秒, 48°C で 1 分 30 秒, 70°C で 2 分間を 43 サイクル、その後 70°C 10 分と設定した。

PCR 産物の一部分を L1C1 プライマーを用いて再増幅して約 200 塩基対の DNA 断片を得た後に、自動 DNA シークエンサー (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems, アメリカ) を用いてその塩基配列を決定した。得られた HPV L1 領域の塩基配列から NCBI データベース (GeneBank sequences <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) および Sequencing Analysis 3.3 software (Perkin-Elmer Corp, アメリカ) を用いて HPV の型判定を行った。

2. 子宮頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の検出

前述の対象症例の手術検体パラフィン包埋切片から病変部分のみを切り出し、HPV16 型と 18 型感染の有無について解析を行った。

手術検体を 15 μm に薄切し、パラフィン除去としてキシレン 500 μl を加えて 3000 rpm で 5 分間の遠沈を行い上清を捨てる行程を 3 回繰り返した。沈渣を 100% エタノールにて洗浄後、0.2M 塩化ナトリウム 200 μl, pH8.0 0.1M EDTA 200 μl, 20 mg/ml proteinase K 4 μl, 10%SDS 20 μl を加え 37°C にて一晩反応させた。フェノール、クロロホルム処理を行った後に、エタノール沈殿し 50 μl の TE (pH8.0) に溶解した。

抽出したゲノム DNA から HPV16 型および 18 型の E6E7 領域を標的とした nested PCR 法を行った。PCR 法のプライマーは HPV16 型および 18 型の E6E7 領域の塩基配列から第 1 図の通りに設定した^{6), 31)}。PCR 法の陽性コントロールとして、HPV16 型の垂型がサブクローニングされたプラスミド PK114/K (Mattis Durst 博士より供与) および Japanese Collection of Research Bioresources より入手した HPV18 型がサブクローニングされているプラスミドを使用し、至適プロトコールを決定した。PCR 法のプロトコールは、95°C で 10 分の後に 94°C で 1 分 30 秒、55°C で 2 分、72°C で 2 分間を 30 サイクル、その後 70°C 10 分と設定した。

さらに、高感度 in situ hybridization (以下 ISH と略す) 検出システム GenPoint キット (DAKO Cytomation, 日本) を用いて頸部腺癌における HPV16 型、18 型 DNA の局在を調べた。前述の頸部腺癌症例のうち 43 症例の手術検体からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、キシレンによる脱パラフィン化、99% および 95% エタノールによる親水化を行った。ターゲット遺伝子の賦活化のために Target Retrieval Solution (DAKO Cytomation, 日本) に 95°C、40 分間浸した。6000~10,000 倍に希釈した proteinase K (DAKO Cytomation, 日本) に室温で 10 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため 0.3% 過酸化水素とメタノールに 20 分間反応させ、95% および 100% エタノールにて脱水し風乾した。HPV-wide spectrum, HPV16 型、HPV18 型のビオチン標識プローブ (DAKO Cytomation, 日本) を用いて 37°C で一晩反応させた。HPV-wide spectrum は HPV6 型、11 型、16 型、18 型、30 型、31 型、33 型、35 型、45 型、51 型 および 52 型を検出可能なプローブである。さらに 50

倍希釈 Stringent Wash Solution (DAKO Cytomation, 日本) にて、45°C から 55°C で 20 分間洗浄し、50mM Tris-HCl, 300 mM 塩化ナトリウム、非イオン性界面活性剤 Tween 20 から成る TBST 溶液 (DAKO Cytomation, 日本) で洗浄した。100 倍希釈した二次酵素試薬 (DAKO Cytomation, 日本) を滴下し、horse raddish peroxidase 標識ストレプトアビジンと反応させた。TBST にて洗浄後、ジアミノベンチジンによる発色とヘマトキシリンによる後染色を行った。

3. 子宮頸部腫瘍における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色

扁平上皮系病変においては子宮頸部生検検体を用い、頸部腺系病変においては手術検体を用いて p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を免疫組織化学染色にて検出した。

前述の検体からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成した。キシレンと 100% エタノールに反応させた後 PBS にて洗浄し、1% 過酸化水素に 5 分間浸透させて内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。PBS にて洗浄後クエン酸 (pH 6.0, 95°C, 20 分間) による抗原賦活化を行った。正常ヤギ血清を 15 分間作用させ非特異的反応を抑制し、抗 p16^{INK4a} 蛋白質モノクローナル抗体 clone E6H4 (MTM Laboratories AG, ドイツ) を 200 倍希釈したものを 1 次抗体として 3 時間作用させた^{17), 32-34)}。2 次抗体として HISTOFINE Simple Stain MAX PO (M) (Nichirei, 日本) を 30 分間加え、発色はジアミノベンチジンを用い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の評価法を第 1 表に示した。染色強度を陰性 (-) と 3 段階の陽性 (+, ++, +++) に分類し、病変に占める染色陽性細胞の割

第 1 表 p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色評価法

		染色頻度(%)				p16 ^{INK4a} 蛋白質 過剰発現の評価
		0%	~5%	~50%	50%~	
染色強度	-					陰性
	+					弱陽性
	++					中陽性
	+++					強陽性

p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を、染色強度と染色頻度の組合せから陰性、弱陽性、中陽性、強陽性に分類し、中陽性と強陽性を過剰発現と定義した。

(Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 1 表を許可を得て転載)

合から染色頻度を3段階に分類した。染色強度と染色頻度の組合せから p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を陰性、弱陽性、中陽性、強陽性に分類した。このうち中陽性と強陽性を p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現と定義した。

4. 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

前述の症例の子宮頸部擦過細胞を ThinPrep 法にて回収し、その浮遊液から擦過細胞をスライドガラスに噴霧してモノレイヤー標本を作製した。標本は 100%エタノールにて固定し、1%過酸化水素に5分間浸透させて内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。以後の行程は免疫組織化学染色と同じ手順で行った³²⁻³⁴⁾。

p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色における判定は、細胞質と核に p16^{INK4a} 蛋白質染色が観察された場合に陽性とした。

5. 統計

扁平上皮系病変の進行と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関については Spearman 順位相関係数検定を用いて解析した。頸部腺癌における各臨床因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関については Kruskal-Wallis 検定または Mann-Whitney 検定にて解析した。いずれも危険率 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意差ありと判定した。

結 果

1. 子宮頸部扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染率と p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度の関連

扁平上皮系病変において PCR 法で検出されたハイリスク型 HPV サブタイプは 16 型, 18 型, 31 型, 33 型, 35 型, 51 型, 52 型, 56 型, および 58 型であった。各病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出率を第 2 表に示した。軽度異形成症例では 75 例中 37 例 (49.3%)、中等度異形成症例では 49 例中 39 例 (79.6%)、高度異形成症例では 34 例中 26 例 (76.5%)、上皮内癌症例では 21 例中 18 例 (85.7%)、扁平上皮癌症例では 18 例中 16 例 (88.9%) でハイリスク型 HPV が検出された。

扁平上皮系病変における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を第 2 図に示した。軽度異形成症例 (第 2 図 A. B) では上皮全層を占める異型細胞において細胞核および細胞質に p16^{INK4a} 蛋白質への染色を認めた。特に上皮のうち下層 3 分の 1 に p16^{INK4a} 蛋白質の強い染色を認め、p16^{INK4a} 蛋白質の強染色は異常増殖を示す領域に

第 2 表 扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染頻度

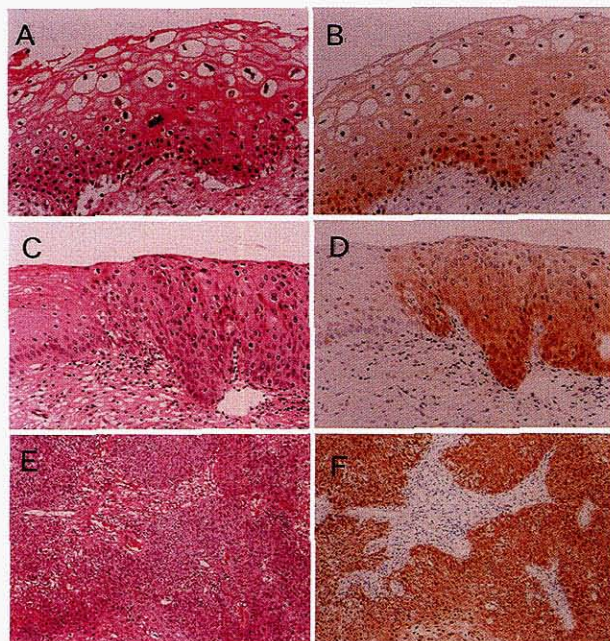
	ハイリスク型 HPV 感染検出率	
	症例数	陽性 (%)
軽度異形成	75	37 (49.3)
中等度異形成	49	39 (79.6)
高度異形成	34	26 (76.5)
上皮内癌	21	18 (85.7)
扁平上皮癌	18	16 (88.9)

一致していた。一方で基底膜下の間質は正常細胞で占められ、この部位には p16^{INK4a} 蛋白質への反応は認められなかった。また中等度異形成症例 (第 2 図 C. D) では上皮のうち下層 3 分の 2 に異常増殖を示す異型細胞を認め、同部位に p16^{INK4a} 蛋白質への強染色が認められた。本症例では病変に連続して正常上皮領域を認めたが、間質と共に p16^{INK4a} 蛋白質の染色は認められなかった。扁平上皮癌症例 (第 2 図 E. F) では病巣に局限して p16^{INK4a} 蛋白質の強陽性を認めたが、間質部分では p16^{INK4a} 蛋白質への反応は認めなかった。対照群である良性異型症例では 7 例中 1 例で弱陽性を示したのみであった。

ハイリスク型 HPV 感染陽性症例での p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は、軽度異形成では 37 例中 12 例 (32.4%)、中等度異形成では 39 例中 32 例 (82.1%)、高度異形成では 26 例中 23 例 (88.5%) であった。上皮内癌症例 18 例および扁平上皮癌症例 16 例は全例が p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現を示した (第 3 図)。p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は病変の進行と共に増加する傾向を示し、特に中等度異形成からは有意に増加していた ($p < 0.05$)。

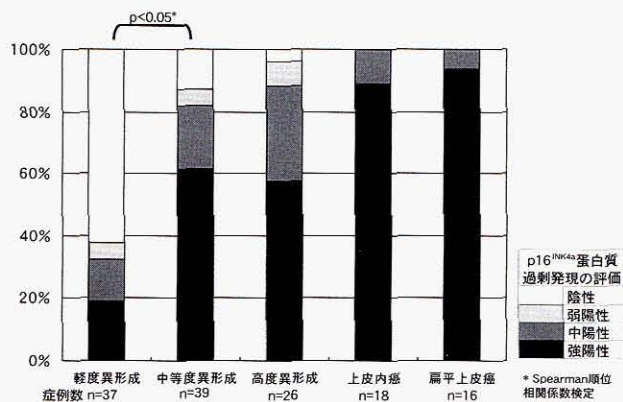
2. 子宮頸部腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度

上皮内腺癌および頸部腺癌症例における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を第 4 図に示した。第 4 図 A. B に示した上皮内腺癌症例においては、同一腺管内に正常腺上皮と腫瘍細胞が隣接している。腫瘍細胞では細胞質と核に p16^{INK4a} 蛋白質の強反応が認められたのに対し、正常腺上皮細胞では p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は認められなかった。また周囲の間質にも反応が認められず、p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は病変に局限して観察された。第 4 図 C. D に示した頸部腺癌症例においても、腫瘍細胞では細胞質と核に p16^{INK4a} 蛋白質の強反応が認



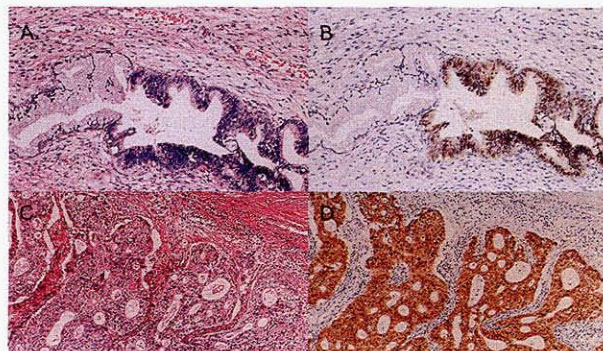
第2図 扁平上皮系病変における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色

A, B: 軽度異形成症例, C, D: 中等度異形成症例, E, F: 扁平上皮癌症例, A, C, E: ヘマトキシリン-エオジン染色, B, D, F: p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色 (すべて対物 20 倍)
A-B, C-D, E-F ではそれぞれ連続切片を用いて各染色法を行い, 同一視野を対比した。



第3図 ハイリスク型 HPV 感染陽性症例における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度

ハイリスク型 HPV 感染が検出された扁平上皮系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度を示した。病変が進行するに伴い p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度が増加する傾向が示され, 特に軽度異形成から中等度異形成に進行する際に有意に増加していた。



第4図 腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色

A, B: 上皮内腺癌症例, C, D: 頸部腺癌症例, A, C: ヘマトキシリン-エオジン染色, B, D: p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色 (すべて対物 20 倍)
A-B, C-D ではそれぞれ連続切片を用いて各染色法を行い, 同一視野を対比した。(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第1図を許可を得て転載)

第3表 腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度

症例数	p16 ^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色				
	陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)	
正常子宮頸管腺	7	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	0 (0)
上皮内腺癌	10	1 (10.0)	0 (0)	4 (40.0)	5 (50.0)
頸部腺癌	62	8 (12.9)	8 (12.9)	13 (21.0)	33 (53.2)
腺扁平上皮癌	9	1 (11.1)	0 (0)	1 (11.1)	7 (77.8)

染色態度は第1表による。

(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第2表を許可を得て転載)

第 4 表 頸部腺癌における病理組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関

	症例数	p16 ^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色				
		陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)	
組織型						
粘液性腺癌	38	6 (15.8)	4 (10.5)	7 (18.4)	21 (55.3)	} n.s.*
類内膜腺癌	16	1 (6.3)	3 (18.8)	3 (18.8)	9 (56.3)	
混合型	5	1 (20.0)	0 (0)	2 (40.0)	2 (40.0)	
分類不能	3	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	
分化度						
G1	17	3 (17.6)	1 (5.9)	4 (23.5)	9 (52.9)	} n.s.*
G2	10	2 (20.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	5 (50.0)	
G3	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
扁平上皮系病変合併						
あり	11	1 (9.1)	1 (9.1)	4 (36.4)	5 (45.5)	} n.s.**
なし	51	7 (13.7)	7 (13.7)	9 (17.6)	28 (54.9)	

検定は、*Kruskal-Wallis 検定および**Mann-Whitney 検定による

染色態度は第 1 表による

(Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 2 表, 第 3 表を許可を得て転載)

第 5 表 頸部腺癌における予後因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関

	症例数	p16 ^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色				
		陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)	
術後進行期分類						
pT1N0M0	46	6 (13.0)	5 (10.9)	9 (19.6)	26 (56.5)	} n.s.*
pT1N1M0, 1	6	0 (0)	1 (16.7)	4 (66.7)	1 (16.7)	
pT2N0M0	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
pT2N1M0, 1	5	2 (40.0)	0 (0)	0 (0)	3 (60.0)	
pT3, 4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
再発						
あり	11	3 (27.3)	1 (9.1)	3 (27.3)	4 (36.4)	} n.s.**
なし	47	4 (8.5)	6 (12.8)	9 (19.1)	28 (59.6)	

検定は、*Kruskal-Wallis 検定および**Mann-Whitney 検定による

染色態度は第 1 表による

(Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 3 表を許可を得て転載)

第6表 頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関

ハイリスク型 HPV	症例数	p16 ^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色			
		陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)
HPV16	16	0 (0)	1 (6.3)	1 (6.3)	14 (87.5)
HPV18	13	0 (0)	0 (0)	5 (38.5)	8 (61.5)
HPV16 & 18 重複感染	3	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
陰性	17	6 (35.3)	2 (11.8)	5 (29.4)	4 (23.5)

p < 0.01*

*検定は、Mann-Whitney 検定による
 頸部腺癌 49 症例のうち HPV16 型が 16 例、18 型が 13 例、混合感染が 3 例で検出された。染色態度は第 1 表による。
 (Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 4 表を許可を得て転載)

第7表 頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の検出-PCR 法と ISH 法の比較-

単位：症例数

PCR 法	ISH 法			
	陰性	HPV16 型	HPV18 型	wide spectrum*
陰性	13	0	1	1
HPV16 型	9	6	0	0
HPV16 型, 18 型重複	1	1	0	1
HPV18 型	6	0	3	1

は、PCR 法と ISH 法で結果が一致した群
 HPV wide spectrum* : HPV6 型, 11 型, 16 型, 18 型, 30 型, 31 型, 33 型, 35 型, 45 型, 51 型および 52 型を認識可能なプローブ

められたのに対し、周囲の間質には反応が認められず、p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は病変に局限していた。腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度を第 3 表に示した。対照群 7 症例において、p16^{INK4a} 蛋白質の弱陽性を 3 例に認めたが過剰発現を示した症例はなかった。p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は、上皮内腺癌 90.0%、頸部腺癌 74.2%、腺扁平上皮癌 88.9%であり、腺系病変においても p16^{INK4a} 蛋白質は高率に過剰発現していることが判明した。

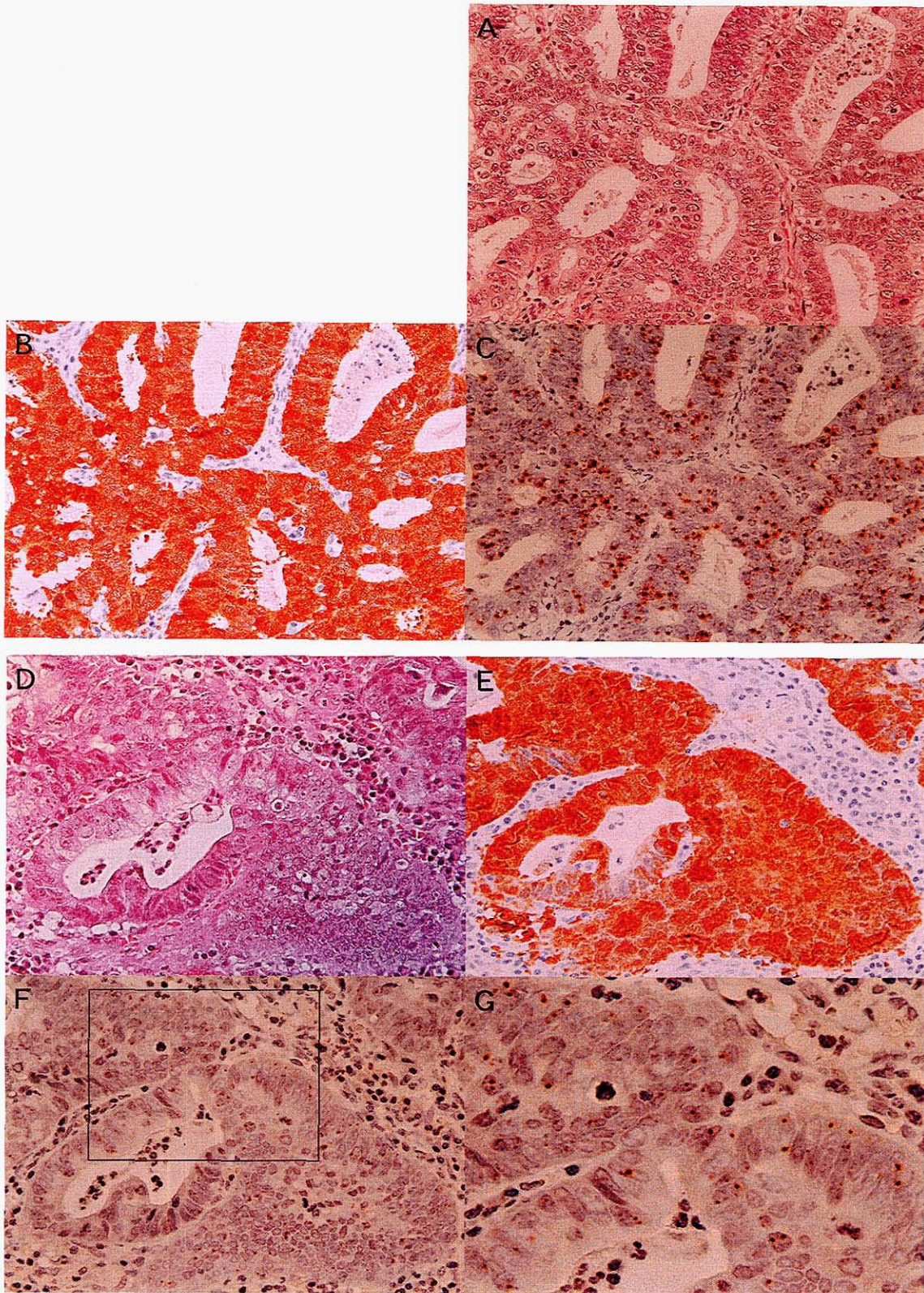
今回検討した頸部腺癌 62 例は病理組織学的に粘液性腺癌 38 症例 (内頸部型 37 症例および腸型 1 症例)、類内膜腺癌 16 症例および混合型 5 症例と、組織型分類が不能であった 3 症例に分類した。これらの組織型分類や分化度、扁平上皮系病変共存の有無といった病理組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関が認められるかを検討したが、各分類と p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度に有意な相関は認められなかった (第 4 表)。また

術後進行期分類や再発の有無といった各予後因子においても p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度との相関は認められなかった (第 5 表)。

3. 子宮頸部腺癌における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度と HPV 感染率の相関

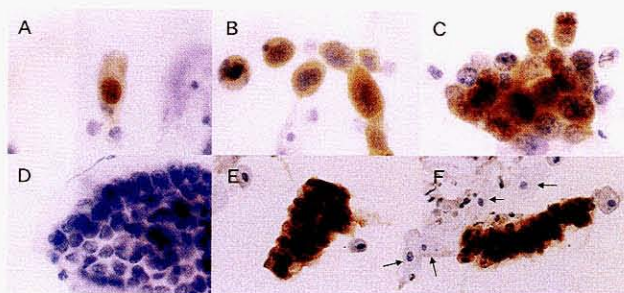
HPV 感染の検出を行った頸部腺癌 49 症例のうち HPV16 型もしくは 18 型が検出されたのは 32 症例 (65.3%) であった。頸部腺癌における HPV 感染の有無と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の相関を第 6 表にまとめた。HPV16 型または 18 型が陽性であった 32 症例のうち 30 症例 (93.8%) で p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が認められたのに対し、HPV16 型、18 型が陰性であった 17 症例では 9 症例 (52.9%) で p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が認められ、HPV 感染の有無により p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度に有意な差が認められた (p < 0.01)。

第 5 図に HPV16 型、18 型が陽性であった症例のへ



第5図 頸部腺癌における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色と HPV16 型, 18 型 In situ Hybridization
A-C: HPV16 型陽性症例, D-G: HPV18 型陽性症例, A, D: ヘマトキシリン-エオジン染色, B, E: p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色, C: HPV16 型特異的 in situ Hybridization, F: HPV18 型特異的 in situ Hybridization, G: F の黒枠内を拡大した。(A-F 対物 40 倍)
A-C, D-F ではそれぞれ連続切片を用いて各染色法を行い, 同一視野を対比した。

考 察



第6図 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

A：中等度異形成症例，B：高度異形成症例，C：上皮内癌症例，D：正常子宮頸管腺，E，F：頸部腺癌症例（すべて対物100倍）

E，F内の矢印は正常扁平上皮細胞を示す。（Ishikawa M et al：International Journal of Gynecological Pathology 22：378-385，2003の第2図を許可を得て転載）

マトキシリン-エオジン染色と p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色および HPV16 型，18 型特異的プローブを用いた ISH 法の切片を比較した。病変部分に限局して p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が認められ，さらに腺癌細胞の核内に HPV16 型，18 型 DNA の点状のシグナルが認められた。ISH 法の結果を第7表に示した。PCR 法にて HPV16 型もしくは 18 型が検出された 28 症例のうち 12 症例（42.9%）で HPV DNA が点状のシグナルとして検出され，PCR 法と ISH 法の検出結果は 43 例中 25 例（58.1%）で一致していた。

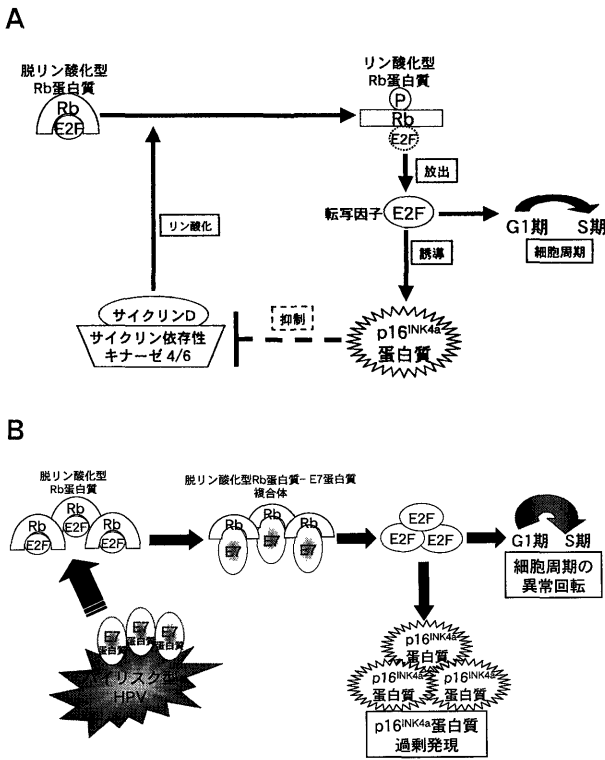
4. 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色の結果を第6図に示す。第6図 A, B, C, E, F の腫瘍細胞では p16^{INK4a} 蛋白質への染色を認めたのに対し，正常の子宮頸管腺（第6図 D）や第6図 E, F 視野内の矢印に認められる正常扁平上皮細胞では p16^{INK4a} 蛋白質への染色は認められなかった。軽度異形成 12 症例中 3 症例（25.0%），中等度異形成 15 症例中 8 症例（53.3%），高度異形成 12 症例中 9 症例（75.0%）および上皮内癌 13 症例全例において腫瘍細胞に p16^{INK4a} 蛋白質への染色を認めた。また腺癌においては 14 症例中 12 症例（85.7%）で染色陽性であった。

サイクリン依存性キナーゼインヒビターである p16^{INK4a} 蛋白質は Rb 蛋白質による細胞周期調節機構を制御する蛋白質である。Rb 蛋白質は脱リン酸化の状態では細胞周期転写因子である E2F を捕捉し細胞周期の回転を抑えている。しかし，Rb 蛋白質がサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ複合体によるリン酸化を受けると，リン酸化型 Rb 蛋白質は E2F と結合する活性を失い，E2F は細胞周期を G1 期から S 期に進めて細胞の増殖が始まる。また E2F はこの際に p16^{INK4a} 蛋白質の発現を誘導すると考えられている³⁵⁾。誘導された p16^{INK4a} 蛋白質はサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ複合体を阻害するため，間接的に Rb 蛋白質のリン酸化を抑制している。このように p16^{INK4a} 蛋白質は Rb 蛋白質による細胞周期調節機構を制御する役割を有している^{12), 13)}（第7図 A）。p16^{INK4a} 蛋白質は Serrano らにより 1993 年に報告された蛋白質であるが⁸⁾，肺癌や白血病をはじめとする多種の悪性腫瘍において p16^{INK4a} 遺伝子の欠失や変異またはプロモーターのメチル化などの遺伝子異常が見い出され，以来 p16^{INK4a} 蛋白質の不活化は発癌因子として注目されてきた^{9, 11)}。

一方で，ヒト乳腺上皮細胞にハイリスク型 HPV として最も代表的な HPV16 型の E7 蛋白質を導入すると p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現されることが報告された³⁵⁾。E7 蛋白質は脱リン酸化型 Rb 蛋白質と結合してその機能を抑制する活性を有し，この活性により脱リン酸化型 Rb 蛋白質に結合できない E2F が増加する。その結果細胞は異常増殖を起し，同時に p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現してくると考えられる（第7図 B）。以上の論理から扁平上皮癌の発癌過程でハイリスク型 HPV が Rb 蛋白質および細胞周期に及ぼす影響を p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現として捉えることができる^{14-16), 32)}。そこで本研究では，ハイリスク型 HPV が関与していると考えられている扁平上皮系病変において，HPV 感染と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の関連を検討した。

扁平上皮系病変での p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果，p16^{INK4a} 蛋白質は正常細胞や良性異型細胞では過剰発現を示さなかったが，扁平上皮系病変の癌細胞や異形成細胞では高率に過剰発現を示していたことが判明し，免疫組織化学染色を用いることにより正常細胞と腫瘍細胞を容易に鑑別することが可能であった。さらに p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度は病変の進行と共に増加していく傾向があり，特に軽度異形成から中等度異形成に進行する際に有意に上昇していることが判明した。



第7図 p16^{INK4a} 蛋白質の生理活性と過剰発現のメカニズム

(A) p16^{INK4a} 蛋白質の生理活性と発現のしくみ

脱リン酸化型 Rb 蛋白質は転写因子 E2F と結合することで細胞周期の調節を行っている。サイクリン D-サイクリン依存性キナーゼ 4/6 の複合体が Rb 蛋白質をリン酸化すると、リン酸化型 Rb 蛋白質は活性を失い E2F を放出する。フリーになった E2F は細胞周期を G1 期から S 期に進め、細胞の増殖が始まる。この際 E2F は p16^{INK4a} 蛋白質の発現を誘導する。p16^{INK4a} 蛋白質はサイクリン依存性キナーゼ 4/6 を抑制する活性を有しており、Rb 蛋白質のリン酸化に歯止めを掛けている。

(B) HPV E7 蛋白質による p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現のメカニズム

ハイリスク型 HPV の E7 蛋白質は宿主細胞の脱リン酸化型 Rb 蛋白質と結合してその機能を抑制する。E7 蛋白質の存在下では脱リン酸化型 Rb 蛋白質は E2F と結合できないため、フリーとなった E2F が増加する。このため細胞周期の異常回転が生じ、同時に p16^{INK4a} 蛋白質は過剰に発現する。Rb 蛋白質失活の結果として過剰に発現された p16^{INK4a} 蛋白質の生理的な役割は明らかにされていないが、p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現されても、ターゲットである脱リン酸化型 Rb 蛋白質はすでに E7 蛋白質による不活化を受けているため、もはや Rb 蛋白質による細胞周期調節機構は機能しなくなっている。(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第3図を許可を得て転載)

p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は Rb 蛋白質の機能的失活を示していることから、HPV 感染による発癌機構において Rb 蛋白質の不活化は軽度異形成から中等度異形成に進行する際に高率に生じていることが判明した。この結果から、細胞周期調節機構の破綻という観点において軽度異形成と中等度異形成は異なる病態であることが示唆された。また軽度異形成症例のうち p16^{INK4a} 蛋白質が過剰発現を示す群は上位病変へ進行する危険が高い群であると推測されるが、我々の検討ではこの推測を裏付ける明確な結論は未だ得られていない。今後、p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現というパラメーターを応用することで、軽度異形成患者群のうち上位病変へ進行する危険性が高い症例群を抽出する方法が導き出されれば臨床にきわめて有用なツールになると思われる。

一方、頸部腺系病変においても p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は病変に局限して高頻度に認められた。Riethdorf や Milde-Langosch らも頸部腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を報告している^{36), 37)}。本研究においても彼等が使用した抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったが、正常頸管腺上皮への非特異的の反応を認めたため、至適条件を見い出せなかった。

頸部腺癌は発癌因子や組織型別の分子生物学的差異などにおいて明かにされていない点が多い。そのため頸部腺癌における組織型、分化度、扁平上皮系病変の混在の有無といった病理組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関があるかを検討した。その目的は組織型の違いが HPV 感染の有無と関連しているか否かを検討することであったが、各組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関は認められず、組織型の違いと HPV 感染の有無を結び付けることは出来なかった。

また本研究では術後進行期分類や再発の有無といった予後因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関があるかを検討した。Lee らは p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が前立腺癌における再発予知のマーカーになりうることを報告しているが³⁸⁾、子宮頸部腺癌においては各予後因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関は認められなかった。

頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の関与について今日までいくつかの報告がされてきた²³⁻²⁸⁾。いずれも PCR 法や ISH 法を用いた HPV 感染の検出に関する報告であるが、ハイリスク型 HPV 感染の検出率はその解析方法の違いも反映して 32% から 91% と報告により大きな差が見られた。またハイリスク型 HPV 感染が検出されても頸部腺癌の発癌と結びつける根拠がなく、頸部腺癌の発癌過程に HPV 感染が関与しているか否かは不明であった。そこで本研究では、扁平上皮系病変にお

いて行った解析と同様に頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の有無と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の相関を検討し、頸部腺癌の発癌過程におけるハイリスク型 HPV の関与を明らかにしようと試みた。頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の検出に際しては、コンタミネーションなどの偽陽性を防ぐために、検体は頸部腺癌の病巣のみから抽出して隣接する扁平上皮細胞の混入を防いだ。さらに ISH 法も行い HPV DNA の局在を明らかにした。またパラフィン包埋切片を検体として用いることから生じる PCR 法の検出感度の低下を防ぐために、代表的なハイリスク型である HPV16 型と 18 型に標的を絞り²³⁻²⁸⁾、HPV16 型、18 型 DNA の E6E7 領域の塩基配列からそれぞれ特異的な nested-PCR 法を独自に開発して検出感度を高めた^{6), 31)}。その結果、頸部腺癌の 65.3%で HPV16 型もしくは 18 型が検出された。ISH 法においても HPV16 型、18 型の DNA が腫瘍細胞の核内に点状のシグナル (ドットパターン) として検出された。Cooper らによると ISH におけるドットパターンは HPV DNA が宿主細胞核にインテグレーションしていることを示している³⁹⁾。このことから頸部腺癌細胞に HPV16 型もしくは 18 型の DNA がインテグレーションしていることがわかった。

HPV 感染の有無と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度との相関を検討したところ、ハイリスク型 HPV 感染陽性症例における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は 93.8%を占め、ハイリスク型 HPV 感染陰性症例に比べて有意に高かった。頸部腺癌の 61.2%の症例でハイリスク型 HPV 感染とともに p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が検出された。これらの症例ではハイリスク型 HPV の DNA が検出されただけでなく宿主細胞の反応である p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現が認められたことから、頸部腺癌の発癌にハイリスク型 HPV 感染が関与している可能性が強く示唆された。

一方で、ハイリスク型 HPV が検出されなかった頸部腺癌においても p16^{INK4a} 蛋白質が過剰発現を示した群が 49 例中 9 例 (18.4%) 存在していたが、これらの症例では Rb 遺伝子の異常などの発癌機構が生じていると考えられた。しかし PCR 法による HPV 検出感度の限界も考慮に入れざるを得ない。また頸部腺癌のうち HPV 感染と p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が共に検出されなかった群は 49 例中 8 例 (16.3%) 存在していた。これらの症例は、HPV 感染が関与しないメカニズムにより発癌に至ったと考えられた。

現在子宮頸癌のスクリーニングの方法として細胞診が用いられていることから、本研究で行ってきた組織検体

を用いた p16^{INK4a} 蛋白質の免疫化学染色を細胞診検体に応用することが可能か否かを検討する目的で p16^{INK4a} 蛋白質の免疫細胞化学染色を試みた³²⁻³⁴⁾。その結果、組織検体と同様に細胞診検体で p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を検出することが可能であることが判明した。加えて頸部腺癌ではその解剖学的位置により、生検や腔拡大鏡診にて病巣を捉えにくいことがあり細胞診の診断精度が強く求められることがある。今回行った免疫細胞化学染色の試みから、臨床的に有用な補助診断法への発展が期待された。

総 括

本研究では、p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現とハイリスク型 HPV 感染を指標として子宮頸癌の分子生物学的解析を試みた。その結果、ハイリスク型 HPV による Rb 蛋白質の不活化は軽度異形成から中等度異形成に進行する際に高率に生じていることが判明した。さらに、頸部腺癌においてハイリスク型 HPV 感染の有無により p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に有意差が認められ、頸部腺癌の 61.2%の症例は発癌にハイリスク型 HPV 感染が関与している可能性が強く示唆された。

このように p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現を検討することで、扁平上皮系病変においてはハイリスク型 HPV 感染により引き起こされる宿主の変化と病変の進行との関連を解析することができ、さらに腺系病変においてもハイリスク型 HPV 感染と発癌を結びつけることができた。また細胞診検体を用いた臨床応用の可能性も示唆された。以上から、p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を解析することは、子宮頸癌における発癌機構の解明や診断ツールに利用可能であることが明らかとなった。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し直接御指導、御助言をいただきました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室塚崎克己助教授、久布白兼行講師、藤井多久磨博士に厚く感謝いたします。

本研究の一部は第 14 回国際細胞診学会 (アムステルダム, 2001), 第 42 回日本臨床細胞学会 (宇都宮, 2001), 第 30 回日本婦人科腫瘍学会 (横浜, 2001), 第 60 回日本癌学会 (横浜, 2001), 第 40 回日本臨床細胞学会秋期大会 (米子, 2001), 第 54 回日本産科婦人科学会学術集会 (東京, 2002), 第 43 回日本臨床細胞学会 (大阪, 2002), 第 61 回日本癌学会 (東京,

2002), 第20回国際パピローマ学会(パリ, 2002), 第9回国際婦人科癌学会(ソウル, 2002), 第55回日本産科婦人科学会学術集会(福岡, 2003), 第21回国際パピローマ学会(メキシコシティ, 2004), および第56回日本産科婦人科学会学術集会(東京, 2004)において発表した。

文 献

- 1) Gissmann L, zur Hausen H : Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*) : *Int J Cancer* 25 : 605-609, 1980
- 2) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H : A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3812-3815, 1983
- 3) Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E : The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 : 934-937, 1989
- 4) Werness BA, Levine AJ, Howley PM : Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248 : 76-79, 1990
- 5) Fujii T, Tsukazaki K, Kiguchi K, Kubushiro K, Yajima M, Nozawa S : The major E6/E7 transcript of HPV-16 in exfoliated cells from cervical neoplasia patients. *Gynecol Oncol* 58 : 210-215, 1995
- 6) Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, Yoshimoto H, et al : A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res* 67 : 127-139, 2000
- 7) zur Hausen H : Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application : *Nat Rev Cancer* 2 : 342-350, 2002
- 8) Serrano M, Hannon GJ, Beach D : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366 : 704-707, 1993
- 9) Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al : Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genetics* 8 : 27-32, 1994
- 10) Kamb A : Cell-cycle regulators and cancer. *Trends in Genetics* 11 : 136-140, 1995
- 11) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al : 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1 : 686-692, 1995
- 12) Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G : Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO Journal* 14 : 503-511, 1995
- 13) Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T, et al : Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers : an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 65 : 442-445, 1996
- 14) Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, et al : Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer* 75 : 1410-1416, 1997
- 15) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T : Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 48 : 580-585, 1998
- 16) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T : Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 153 : 1741-1748, 1998
- 17) Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, et al : P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 34 : 778-783, 2003
- 18) Sasieni P, Adams J : Changing rates of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix in England. *Lancet* 357 : 1490-1493, 2001
- 19) Liu S, Semenciw R, Mao Y : Cervical cancer : the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. *CMAJ* 164 : 1151-1152, 2001
- 20) Chen RJ, Lin YH, Chen CA, Huang SC, Chow SN, Hsieh CY : Influence of histologic type and age on survival rates for invasive cervical carcinoma in Taiwan. *Gynecol Oncol* 73 : 184-190, 1999
- 21) Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, Itamochi H, Sato S, Akeshima R, et al : Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who have had radical hysterectomy. *Eur J Surg Oncol* 26 : 464-467, 2000
- 22) Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, et al : Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81 : 1144-1151, 2002
- 23) Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J : Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 77 : 2275-2279, 1996
- 24) Lee MF, Chang MC, Wu CH : Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Int J Gynaecol Obstet*

- 63 : 265-270, 1998
- 25) Tase T, Okagaki T, Clark BA, Manias DA, Ostrow RS, Twiggs LB, et al : Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix : a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 48 : 993-998, 1988
- 26) Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM : International trends in the incidence of cervical cancer : I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 75 : 536-545, 1998
- 27) Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, et al : Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol* 157 : 1055-1062, 2000
- 28) Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E : The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer* 37 : 246-250, 2001
- 29) Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Mukai M, Saito M, Iwata T, et al : Papanicolaou tests and molecular analyses using new fluid-based specimen collection technology in 3000 Japanese women. *Br J Cancer* 88 : 1883-1888, 2003
- 30) Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A : Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 82 : 524-531, 1991
- 31) Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K : Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J General Virol* 72 : 1039-1044, 1991
- 32) Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al : Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92 : 276-284, 2001
- 33) Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ : Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 46 : 25-29, 2002
- 34) Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al : p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis : CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 56 : 56-63, 2003
- 35) Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al : Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 4350-4354, 1996
- 36) Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, Cviko A, Loning T, Crum CP : Human papillomaviruses, expression of p16, and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol* 33 : 899-904, 2002
- 37) Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Poppinghaus A, Riethdorf L, Loning T : Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virch Arch* 439 : 55-61, 2001
- 38) Lee CT, Capodiceci P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, et al : Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5 : 977-983, 1999
- 39) Cooper K, Herrington CS, Graham AK, Evans MF, McGee JO : In situ evidence for HPV 16, 18, 33 integration in cervical squamous cell cancer in Britain and South Africa. *J Clin Pathol* 44 : 406-409, 1991