

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11288

研究課題名(和文)ヒトパピローマウイルス(HPV)の感染機構に関する研究

研究課題名(英文)A study for human papillomavirus (HPV) infection mechanism

研究代表者

島田 勝 (Shimada, Masaru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40301452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1) BP-1は細胞の表面に発現し、HPVと結合及び共局在している。BP-1が欠損されると細胞へのHPV感染が有意に低下した。2)高リスクHPV E6がAIFに結合し、AIFの分解によってAIFが誘発したクロマチン分解を阻害する。E6はAIFのFADドメインに結合し、AIFと共局在する。AIF欠損では、16E6発現細胞がSTS誘発アポトーシスを減少させた。これらの知見は、HPV BP-1がHPV受容体候補であり、高リスクE6はAIFを介してアポトーシスを抑制し、AIFが子宮頸癌の新しい治療標的を表す可能性があることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) HPV BP-1受容体候補を見つけたことで、今後はBP-1遺伝子を標的としたワクチンや抗体などの開発によって、新しいアプローチでHPVの感染予防および治療法を開発できる。2)高リスクHPV E6遺伝子はアポトーシス遺伝子であるp53を分解し、カスパーゼ依存性経路によって癌を誘導することがよく知られている。本研究では初めてHPV E6がカスパーゼ非依存であるアポトーシス誘導因子(AIF)の分解によって癌を誘導することを発見した。この発見は、AIFが子宮頸癌の新しい治療標的を表す可能性があることを示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found 1) HPV BP-1 is expressing on the surface of cells, binding and co-localized with HPV. The efficacy of HPV infection to cells were reduced when BP-1 is inhibited. 2) high risk HPV E6 binds to AIF, and can degrade AIF and inhibits AIF-induced chromatin degradation. E6 binds to FAD domain of AIF and co-localized with AIF. AIF knockdown reduced STS-induced apoptosis E6-expressing cells. These findings indicate that HPV BP-1 is a HPV receptor candidate and 16E6, but not 6E6, blocks AIF-mediated apoptosis, and that AIF may represent a novel therapeutic target for HPV-induced cervical cancer.

研究分野：ウイルス学 分子生物学

キーワード：HPV

1. 研究開始当初の背景

これまでに、100以上のHPV血清型が同定されている。このうち、約40血清型は生殖器に感染するHPVである。HPV16、HPV18などの血清型の感染は、外生殖器癌や子宮頸がんの原因になる。現在、日本で承認された子宮頸がんワクチンは3つあり、二価ワクチン(HPV16, 18)、四価ワクチン(HPV6, 11, 16及び18)と九価ワクチン(6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52及び58)である。それらのワクチンは子宮頸がん、外生殖器癌或いは疣に有効性が示されつつあるが、HPV血清型間の交差性が低く、約70%の子宮頸がんしか予防できない。更に、ウイルス感染後の子宮頸がんに対する有効な治療薬はまだ開発されていない。そのため、次世代のHPVに対する治療・予防法が求められている。HPVは種・細胞特異性が高く、HPVを生産する培養細胞は確立されていない。そのため、HPVの細胞受容体、感染機序などの研究に関してほとんど明らかにされておらず、その解明はHPV感染の予防・治療にとって極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトパピロ・マウイルス(HPV)の細胞受容体の同定およびウイルス感染・発がんに関わる細胞因子を網羅的に解析し、次世代のHPV感染に対する治療・予防法の確立を目的とする。具体的には、

HPV感染時に受容体として機能する分子の同定およびウイルス感染予防法の開発。
タグ付きHPV遺伝子産物に結合する細胞因子を網羅的に同定し、解析することによるHPVの発がん分子メカニズムの解明。

3. 研究方法

HPV感染における細胞受容体候補の同定・機能解析

- a. タグ付きHPV疑似粒子の作製。タグFlagをHPV L2に付け、L1と一緒に293TT細胞に導入し、OptiPrep density gradient mediumで精製することにより、高力価のタグ付きHPV疑似ウイルスを作製する。
- b. タグ付きHPV疑似粒子でHeLa細胞を吸着、洗浄、固定し、Flagタグを用いた免疫沈澱アッセイを行う。
- c. 質量分析法で、HPV BP-1はHPV感染における細胞受容体候補であることを同定する。
- d. 抗BP-1抗体を用いて細胞を免疫染色し、蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーでBP-1は細胞表面に発現していることを確認する。
- e. BP-1 siRNAの細胞導入によるBP-1発現の抑制あるいは抗BP-1抗体、BP-1蛋白でBP-1受容体の機能を低下させ、LuciferaseあるいはGFP発現するHPV疑似ウイルスを細胞感染させ、BP-1はHPVの受容体であることを確認する。

HPV感染過程および発がんに関わる細胞因子の網羅的解析

- a. HPV遺伝子との細胞結合蛋白の同定

タグ付きのHPV癌遺伝子であるE6とE7を発現するプラスミドを作製し、更に対照群として低発がん性HPV由来のE6、E7を発現するプラスミドも作製する。それらをヒト腎臓上皮細胞由来細胞である293TT細胞に導入する。タグに対する抗体を用いて免疫沈降法でHPVE6あるいはE7との結合蛋白を精製する。その結合蛋白を質量分析法により同定する。

- b. AIF 及び変異体を発現するプラスミドの作製
- c. タグ付きの E6 及び E7 を発現するプラスミドと AIF プラスミドを細胞に co-transfection し、免疫沈降で E6 と E7 が AIF と結合することの確認。また、E6 と E7 の有無で AIF の発現を定量する。
- d. E6 と E7 の AIF 変異体との免疫沈降で、AIF との結合ドメンの確認。
- e. M132 などの試薬で E6、E7 の AIF による作用機構を解明する。
- f. クロマチンアッセイで、E6、E7 の AIF によるクロマチン分解への影響の検討
- g. アポトーシスアッセイで、E6、E7 の AIF を介するアポトーシスへの影響の検討

4. 研究成果

HPV BP-1 は HPV の細胞受容体である

- a. タグ Flag 付き HPV 疑似ウイルスとの細胞付着、固定、免疫沈降、質量分析により、HPV BP-1 は HPV の細胞受容体であることを提示された。
- f. 細胞を免疫染色し、蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーにより BP-1 は細胞表面に発現していることを確認した。
- b. 免疫染色で、HPV 粒子と HPV BP-1 は細胞表面で共局在していることを確認した。
- c. HPV BP-1 siRNA トランスフェクションした細胞への HPV の感染率が低下している。
- d. BP-1 蛋白あるいは BP-1 抗体を処理した細胞への HPV の感染率が低下している。

HPV 感染過程および発がんに関わる細胞因子の網羅的解析

- a. 免疫沈降・質量分析で新たに 16 個の E6 結合細胞因子と 65 個の E7 結合細胞因子を同定した。
- b. その中で AIF(アポトーシス誘導因子)は E6 と E7 の両方に結合している。
- c. E6 と十数種類の AIF 変異体を免疫沈降した結果、高リスクと低リスク HPV E6 は両方とも AIF FAD ドメンと結合している。
- d. 免疫染色で E6 はアポトーシス フォームの AIF と細胞質内に共局在していることを共焦点顕微鏡で確認できた。
- e. 高リスク E6 は(低リスク E6 ではなく)AIF を分解できた。しかし、その分解はプロテアソーム抑制剤である M132 で解錠できた。
- f. AIF 蛋白は HeLa 細胞核内のクロマチンを分解できたが、その分解も高リスク E6 によって(低リスク E6 ではなく)抑制された。
- g. 低リスク E6 安定発現細胞とくらべ、AIF 欠損高リスク E6 安定発現細胞はアポトーシスが誘導されにくい。

以上の結果より、我々は HPV BP-1 が HPV 感染の細胞受容体候補であること、また E6 が AIF の分解を介し、ガスパーズ非依存性のアポトーシスを抑制することを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamashita Akio, Takeuchi Osamu	4. 巻 50
2. 論文標題 Translational control of mRNAs by 3'-Untranslated region binding proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMB Reports	6. 最初と最後の頁 194 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5483/bmbrep.2017.50.4.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Usuki Fusako, Yamashita Akio, Fujimura Masatake et al	4. 巻 9
2. 論文標題 Environmental stresses suppress nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and affect cells by stabilizing NMD-targeted gene expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38015-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamaji Takahiro, Yamashita Akio, Wakui Hiromichi, et al	4. 巻 9
2. 論文標題 Angiotensin II type 1 receptor-associated protein deficiency attenuates sirtuin1 expression in an immortalised human renal proximal tubule cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52566-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Azushima Kengo, Uneda Kazushi, Wakui Hiromichi, et al	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of rikkunshito on renal fibrosis and inflammation in angiotensin II-infused mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42657-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinguchi Sho, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of ATRAP in Renal Proximal Tubules on Angiotensin Dependent Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e012395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.119.012395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masaru Shimada, Akio Yamashita, Motohide Ichino, Takao Kinjo, Kenji Okuda.
2. 発表標題 The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation
3. 学会等名 2nd International Conference on Oncology and Radiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru Shimada, Michiko Mori, Saori Ito, Kenji Kawazoe, Yoshitaka Miyanaaga, Kenji Okuda, Nobuhisa Mizuki.
2. 発表標題 Development of a vaccine against adenovirus-conjunctivitis in a mouse model
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru Shimada, Michiko Mori, Saori Ito, Kenji Kawazoe, Yoshitaka Miyanaaga, Kenji Okuda, Nobuhisa Mizuki.
2. 発表標題 Development of a vaccine against adenovirus-conjunctivitis in a mouse model
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田 勝、伊藤 沙織、盛 理子、竹内 正樹、福島 淳、水木 信久、奥田 研爾
2. 発表標題 緑膿菌角膜炎に対する新規膜小胞ワクチンの開発
3. 学会等名 第53回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石戸 みづほ、盛 理子、島田 勝、福島 淳、水木 信久
2. 発表標題 緑膿菌角膜炎に対する新規膜小胞ワクチンの開発
3. 学会等名 第55回日本眼感染症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 盛 理子、島田 勝、宮永 嘉隆、川添 賢志、水木 信久
2. 発表標題 アデノウイルス角結膜炎モデルマウスを用いたワクチン開発
3. 学会等名 第55回日本眼感染症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 盛 理子、島田勝、宮永嘉隆、川添賢志、河越龍方、水木信久
2. 発表標題 アデノウイルス結膜炎マウスモデルの樹立およびワクチンの開発
3. 学会等名 第54回日本眼感染症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田勝、盛理子、川添賢志、宮永嘉孝、水木信久
2. 発表標題 アデノウイルス結膜炎マウスモデルの樹立およびワクチンの開発
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田勝、盛理子、川添賢志、宮永嘉孝、奥田研爾、水木信久
2. 発表標題 アデノウイルス結膜炎における感染マウスモデルの樹立
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaru Shimada, Saori Ito, Michiko Mori, Jun Fukushima, Kenji Okuda, Nobuhisa Mizuki.
2. 発表標題 Vaccine development against Pseudomonas aeruginosa keratitis using membrane vesicles.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Shimada, Akio Yamashita, Akiko Okayama, Hisashi Hirano, Nobuhisa Mizuki, Kenji Okuda.
2. 発表標題 Scyl2 inhibits Adenovirus release from host cells.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山下 暁朗 (YAMASHITA Akio) (20405020)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	