

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16879

研究課題名(和文) HPV LCRを用いた新規選択的治療法の開発

研究課題名(英文) selective gene expression system by HPV LCR reporter

研究代表者

田中 克征(Tanaka, Katsuyuki)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・特任助手

研究者番号：80647412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がんの90%以上でヒトパピローマウイルス(HPV)のDNAが確認できることから、HPVの感染こそが子宮頸がん発症の最大のリスクと言える。

HPV DNAにはLCR(Long Control Region)と呼ばれる遺伝子発現の制御領域が存在している。そこで我々は、LCR領域を利用した新たな治療方法の開発しようと試みた。

まずLCR領域依存的に目的遺伝子を発現するプラスミドの作成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において、子宮頸がん発症の予防に繋がるHPVワクチンの接種は現在中止されている。本研究は子宮頸がん発症の予防のみならず、ワクチンでは対処できない子宮頸がんの治療の一助になることを主眼に置いている。本研究は、正常な細胞に影響を与えずにHPVに感染した細胞を選択的に除去することで子宮頸がん発症を抑制すること、HPV由来の子宮頸がん細胞を除去することを目的としている。

研究成果の概要(英文)：Since the DNA of human papillomavirus (HPV) can be confirmed in more than 90% of cervical cancers, it can be said that HPV infection is the greatest risk of developing cervical cancer.

HPV DNA has a gene expression control region called LCR (Long Control Region). Therefore, we tried to develop a new treatment method using the LCR region.

First, a plasmid expressing the target gene in an LCR region-dependent manner was prepared.

研究分野：分子生物学

キーワード：婦人科腫瘍学 腫瘍学 ウイルス学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

子宮頸がんの90%以上でヒトパピローマウイルス(HPV)が検出され、その多くが HPV16, 18 である。このことから子宮頸がん発症の最大のリスクは HPV に感染することだと考えられる。そのため、HPV の感染を抑制するために HPV ワクチンが開発され、世界中で使用され、新規の子宮頸がん発症を抑制することができた。

しかしながら、我が国では HPV ワクチン接種者に(因果関係は不明であるものの)重篤な健康被害が発生したことから、現在では接種中止となっている。また、このワクチンは主に HPV16,18 に対するワクチンであり、100種以上存在するすべての HPV に対応してはいなかった。さらにワクチンでは、新たな HPV の感染は防いでも、すでに感染している場合では効果がなく、子宮頸部前がん病変や子宮頸がんを治療できるわけではない。

そこで我々は HPV に感染していれば効果のある治療法を開発することにした。そこで目を付けたのが HPV 遺伝子の発現を制御している LCR(Long control region)である。子宮頸がんで見つかる HPV DNA はこの LCR 領域や E2 遺伝子が欠損しており、本来抑制されているはずの E6/E7 が過剰発現していることが特徴である。このことから LCR 領域依存的に遺伝子を発現させ、その発現制御を HPV E2/E6/E7 の機能に依存させることで、HPV 陽性細胞でのみ効果を発揮させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

Papillomavirus: PV は、重層扁平上皮を構成する角化細胞で特異的に増殖する。PV ゲノム複製は、基底細胞における感染直後の一過的な初期、潜伏に関わる維持、分化に応じた後期複製の3段階に切り替わる。また、潜伏感染状態の基底細胞で HPV(human PV)の E6, E7 遺伝子が異常発現すると細胞は不死化し、やがてがん化する。子宮頸がんのほぼ100%が HPV 陽性であり、その過半数を HPV16, 18 が占める。

本研究では、子宮頸がんの予防・治療のため、

- 1) HPV 陽性子宮頸がん細胞の選択的排除
- 2) 前がん病変を形成する HPV 感染細胞の選択的排除

を可能とする新規方法論の確立を目的とする。

子宮頸部腺がん等については罹患数が増加していること、早期発見が困難であること、治療に抵抗性があることなどから、前がん病変をも対象とした治療法を打ち立てる上で本研究は極めて重要な課題である。

3. 研究の方法

(1) HPV LCR を用いた E2 依存的なレポータープラスミドの開発

HPV18 LCR を用いたレポータープラスミドは HPV 陰性子宮頸がん細胞でも活性を示したことから、HPV の存在に関わらず角化細胞に対して活性を有する可能性がある。原因として LCR 領域に宿主細胞側の転写因子が結合する部位が存在していることが考えられる。まず HPV16 LCR 領域を用いたレポータープラスミドを作製、また転写因子結合部位に単独変異や2箇所以上の変異を持つレポータープラスミドを作製する。これらのプラスミドを各種子宮頸がん細胞や正常子宮頸部角化細胞に導入し、E2 依存的に活性が上昇するものを選択する。

(2) E6/E7 発現依存的な E2 遺伝子発現プラスミドの開発

多くの子宮頸がんでは HPV DNA が染色体へ組み込まれる際に E2 遺伝子の欠損などにより、LCR 領域による E6/E7 発現抑制が認められないことから、E2 依存的なレポータープラスミドでは効果が得られない可能性がある。そこで、E6/E7 の不活化標的である p53 と pRB によって制御される Survivin 遺伝子(BIRC5)プロモーターをベースに、さらに E6/E7 依存性に厳密に制御される人工プロモーターを開発する。また、E6 による PDZ ドメイン蛋白質分解を介して Hippo 経路が不活化されると活性化される TEAD の結合配列を用いた補助プラスミドの作製も行う。これらは高リスク型 HPV の E6/E7 に特異的かつ共通の機能に依存しているため、特定の型のみでなく幅広い高リスク型 HPV 病変に対応可能である。

(3) HSV TK 遺伝子、活性化型 Caspase-3 遺伝子の新規レポータープラスミドへの搭載

及び HPV 陽性細胞に対する in vitro 及び in vivo における選択的殺細胞性評価

LCR レポータープラスミドに治療用の遺伝子を搭載する。治療用の遺伝子の候補としては薬剤感受性を高める HSV TK 遺伝子や、細胞死を誘導する活性化型 Caspase-3 遺伝子を想定している。作製した治療プラスミド、補助プラスミドを複数の子宮頸がん細胞株を含む HPV 陽性細胞、HPV 陰性細胞に導入し、in vitro における選択的殺細胞性を評価する。また、前がん病変に対する効果の検討に関して、同研究室で樹立した HPV 感染状態模倣細胞を用いて選択的殺細胞性を評価する。さらに細胞への導入効率を高めるため、治療プラスミド及び補助プラスミドはレトロウイルスベクター化することも視野に入れている。また、同研究室で試行中の制限増殖型

AdV を用いることも考えている。制限増殖型 AdV は E1B 欠損型 ONYX-015 (dl1520) AdV を基礎とし、E1 領域、E3 領域を改変することでより特異性と安全性の向上させた AdV である。治療プラスミド及び補助プラスミドを制限増殖型 AdV 化し、in vitro においては HPV 陽性細胞及び正常細胞を含む HPV 陰性細胞に感染させ、選択的殺細胞性を評価する。また、in vivo においては HPV 陽性細胞を移植し腫瘍を形成させたマウスに対して、作製した制限増殖型 AdV を腫瘍内、腹腔内、静脈内など生体内投与する。標的細胞に効率よく感染・増殖するか、及び腫瘍増殖への影響を確認する。

4. 研究成果

(1) HPV LCR を用いた E2 依存的なレポータープラスミドの開発

先ず、基礎となる HPV16 LCR レポータープラスミドの作製を行った。図 1 で示した LCR 領域と HPV E6/E7 のプロモーターを PCR で増幅し必要なフラグメントのみを精製した。このフラグメントとプロモーター領域を欠損させた遺伝子発現用のプラスミドを連結し、目的である LCR レポータープラスミドの作製に成功した。

次に、このプラスミドを用いて蛍光タンパク質 EGFP の発現実験を行った。LCR レポータープラスミドは Invitrogen 社の組み換え反応系を利用することで様々な遺伝子発現を可能とするように設計してある。EGFP 発現レポーターを作製後、293T 細胞に導入したが HPV16 E2 の有無に関わらず EGFP の発現を確認することはできなかった。設計の不備や変異による機能異常などを考え調査を行った。また、LCR 領域に変異を導入することで発現量を増加させようと試みたが、決定的な解決はできなかった。

(2) E6/E7 発現依存的な E2 遺伝子発現プラスミドの開発

先ず、HPV E6/E7 依存的に目的遺伝子を発現するプラスミドは当時所属していた研究室で作製し、機能も確認済みである。(他研究室との共同研究であるためデータ不掲載)
また、恒常的に E2 を発現するプラスミドを用いて E2 が発現していること、DNA への集積が認められることも確認している。(当時所属していた研究室の研究員の方の研究のためデータ不掲載)

(3) HSV TK 遺伝子、活性化型 Caspase-3 遺伝子の新規レポータープラスミドへの搭載
及び HPV 陽性細胞に対する in vitro 及び in vivo における選択的殺細胞性評価

HSV TK 遺伝子、活性化型 Caspase-3 遺伝子の搭載はレポータープラスミドの問題が解決できず、実行できなかった。

また制限増殖型 AdV は正常細胞では増殖しないことは確認できている。(他研究室との共同研究のためデータ不掲載)

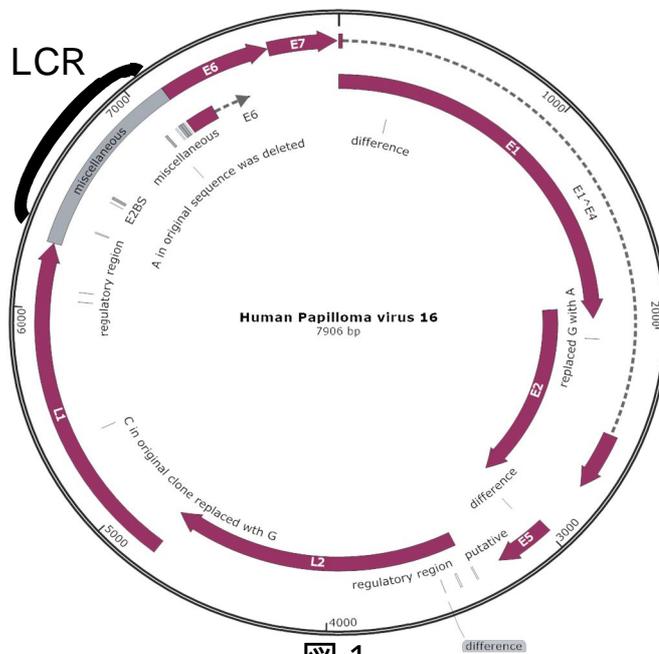


図 1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------