

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09603

研究課題名(和文) ゲノム編集法を用いたヒトパピローマウイルスの細胞感染機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cell infection mechanism of human papilloma virus using genome editing technique

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：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、BP-1がHPV受容体候補であると同定した。1) 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。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。2) BP-1は細胞の表面に発現し、HPVと結合及び共局している。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)これらの知見は、HPV BP-1がHPV受容体候補でありAIFが子宮頸がん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

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発することが知られている。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発することを発見した。この発見は、AIFが子宮頸がん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)：We found that HPV E6 induces cancer through apoptosis-inducing factor (AIF)-dependent, caspase-independent pathway, and defined an HPV receptor candidate, BP-1. 1) high risk HPV16 E6 binds to AIF and degrades AIF, and inhibits AIF-induced chromatin degradation. HPV 16 E6 binds to FAD domain of AIF and co-localized with AIF in cytoplasm. AIF knockdown reduced STS-induced apoptosis in E6-expressing cells. Low risk HPV6 E6 also binds to AIF, however, the capacity of degradation of AIF and inhibition of AIF-induced chromatin degradation was not observed. 2) HPV binds to and co-localization with BP-1 protein on the cellular surface, and HPV can not infect BP-1 deficient cells. These findings demonstrate AIF may be a novel therapeutic target for HPV-induced cervical cancer and HPV BP-1 is an HPV receptor candidate.

研究分野：ウイルス学 分子生物学

キーワード：HPV

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

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、外生殖器がん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、外生殖器がんある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、

- (1) 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
- (2) 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. 研究の方法

(1) HPV感染における細胞受容体候補の同定・機能解析

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、Opti-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。

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。

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。

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が細胞表面に発現していることの確認。

BP-1siRNA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。

(2) 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

HPV遺伝子との細胞結合蛋白の同定：タグ付きのHPVがん遺伝子であるE6とE7を発現するプラスミドを作製し、更に対称群として低リスク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。

AIF 及び変異体を発現するプラスミドの作製。

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 は 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。

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。

M132 などの試薬で E6、E7 の AIF による作用機構を解明する。

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。

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

(1) HPV BP-1 は HPV の細胞受容体である。

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が提示された。

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した。

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。

HPV BP-1 siRNA トラ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。

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。

(2) 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

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。

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。

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。

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。

高リスク E6 は(低リスク E6 ではなく)AIF を分解できたが、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。

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。

低リスク E6 安定発現細胞と比べ、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 は HPV 感染の細胞受容体候補であること、また E6 が AIF を分解することにより caspase 非依存性の経路を用いて発がんすることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shimada Masaru, Wang Haibin, Ichino Motohide, Ura Takehiro, Mizuki Nobuhisa, Okuda Kenji	4. 巻 1
2. 論文標題 Biodistribution and immunity of adenovirus 5/35 and modified vaccinia Ankara vector vaccines against human immunodeficiency virus 1 clade C	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41434-021-00308-z	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 Shimada M, Mizuki N, Okuda K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Therapeutic antibody for epidemic keratoconjunctivitis in a rabbit model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SL Vaccines And Vaccination J,	6. 最初と最後の頁 122-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Fukuda M, Nakamura J, Ito S, Kawazoe K, Miyanaga Y, Teshigawara T, Okuda K, Mizuki N, Shimada M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Vaccination inhibits the human adenoviral transduction in a mouse keratoconjunctivitis model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3498-3508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2021.05.010	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 -
1. 著者名 Ito S, Nakamura J, Fukuda M, Ura T, Teshigawara T, Fukushima J, Mizuki N, Okuda K, Shimada M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Prophylactic and therapeutic vaccine against Pseudomonas aeruginosa keratitis using bacterial membrane vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3152-3160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2021.04.035	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 -

1. 著者名 Shimada Masaru, Yamashita Akio, Saito Manami, Ichino Motohide, Kinjo Takao, Mizuki Nobuhisa, Klinman Dennis M., Okuda Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14195-14208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71134-3	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 -

1. 著者名 福田理子, 島田勝, 伊藤沙織, 宮永嘉隆, 川添賢志, 河越龍方, 奥田研爾, 水木信久	4. 巻 38
2. 論文標題 アデノウイルスベクターを用いた角結膜感染モデルマウス作製の試み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 337-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Ura Takehiro, Yamashita Akio, Mizuki Nobuhisa, Okuda Kenji, Shimada Masaru	4. 巻 39
2. 論文標題 New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 197-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2020.11.054	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 -

1. 著者名 Mannen Taro, Goto Masato, Yoshizawa Takuya, Yamashita Akio, Hirose Tetsuro, Hayano Toshiya	4. 巻 32
2. 論文標題 Distinct RNA polymerase transcripts direct the assembly of phase-separated DBC1 nuclear bodies in different cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E21-02-0081	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 -

1. 著者名 Taguchi Shinya, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Urate Shingo, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Tsukamoto Shunichiro, Kamimura Daisuke, Kinguchi Sho, Yamashita Akio, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of tumor necrosis factor- inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02864-1	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 -

1. 著者名 Abe Eriko, Yamashita Akio, Hirota Keigo, Yamaji Takahiro, Azushima Kengo, Urate Shingo, Suzuki Toru, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Tsukamoto Shunichiro, Uehara Tatsuki, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi, Takahashi Hidehisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22343-5	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 -

1. 著者名 Ura Takehiro, Takeuchi Masaki, Kawagoe Tatsukata, Mizuki Nobuhisa, Okuda Kenji, Shimada Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Current Vaccine Platforms in Enhancing T-Cell Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1367-1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines10081367	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 島田勝
2. 発表標題 アデノウイルス角結膜炎に対するワクチンおよび治療抗体に関する研究.
3. 学会等名 第57回日本眼感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田勝
2. 発表標題 The role of apoptosis-inducing factor (AIF) in caspase-independent pathway.
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022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)	

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
---------	---------