

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07047

研究課題名(和文) ヒトパピローマウイルス潜伏持続感染に関する転写因子の探索

研究課題名(英文) Search for transcription factors involved in latent and persistent human papillomavirus infection.

研究代表者

石井 克幸 (Ishii, Yoshiyuki)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号：90342899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルスは持続感染を確立する染色体外エピソームとして安定的に維持される。本研究では、CRISPR-Cas9技術を用いてホメオボックス転写因子HOXC13ノックアウト(KO)NIKS細胞を作製し、HOXC13が高リスクHPVゲノムの長期維持に必要なかどうかを検討した。HOXC13 KO細胞においてHPV16、HPV52、およびHPV58ゲノムのコピー数は、継代に伴い減少したが、HPV18ゲノムは継代を重ねても安定して存在した。HOXC13はHPV16、HPV52、およびHPV58のウイルスゲノムの安定的な維持に重要であるが、HPV18はそうではないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果である長期培養におけるHPV16、HPV52、HPV58のウイルスゲノムの維持にHOXC13が寄与する事実は、我々が以前提唱したHPVはHOXC13を発現する上皮幹細胞を標的とし、HOXC13依存的な初期プロモーターの活性化とウイルスゲノムの維持により持続感染を確立するとした仮説を支持している。HPV18は、HPV16、HPV52、HPV58と異なり、腺細胞指向性のようなユニークな特徴を持っている。今回のHOXC13に依存しないHPV18ゲノムの維持は、細胞指向性などHPV18の独自性を理解する上で重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The viral genome of the high-risk human papillomavirus (HPV), the causative agent of cervical cancer, is stably maintained as extrachromosomal episomes that establish persistent infection. We previously identified transcription factor HOXC13 as an important host protein mediating the short-term retention of the HPV16 and HPV18 genomes in normal human immortalized keratinocytes (NIKS). Here, we used CRISPR-Cas9 technology to construct HOXC13 knockout (KO) NIKS cells to determine whether HOXC13 is required for the long-term maintenance of high-risk HPV genomes. HPV16, HPV18, HPV52, and HPV58 whole genomes were transfected into HOXC13 KO cells, and the copy number of viral genomes per cell was monitored over cell passages. Copy numbers of HPV16, HPV52, and HPV58 genomes decreased continuously in HOXC13 KO cells, whereas HPV18 genomes remained stable throughout passages. Thus, HOXC13 is critical for the stable maintenance of the viral genomes of HPV16, HPV52, and HPV58, but not HPV18.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HPV 持続感染 HOXC13

1 研究の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、7000~8000bpの環状二本鎖DNAゲノムを持つ小型DNAウイルスである。現在までに400以上の遺伝子型が同定され、このうち、HPV16、HPV18、HPV52、HPV58を含む少なくとも13の遺伝子型が子宮頸がんの発症に関与しており、高リスク型HPVと呼ばれている。高リスク型HPVは子宮頸部上皮の基底細胞に感染し、感染した細胞が上皮に向かって分化すると、ウイルスゲノムはキャプシドタンパク質を産生しながら大量複製を行い、低悪性度の子宮頸部上皮内新形成(CIN)を引き起こす(ウイルス生産期)。高リスクHPVはまた、基底細胞において長期持続感染を確立し、ウイルスゲノムは、ウイルスタンパク質の発現能力が制限された染色体外エピソームとして安定に維持される(HPV感染の維持期)。持続感染中、ウイルスゲノムは時折宿主細胞ゲノムに組み込まれることがあり、これは浸潤性子宮頸癌の発生と強く関連している。

HPVゲノムには、ウイルスゲノムの複製に必須な2つの初期タンパク質、E1とE2がコードされている。E1はDNAヘリカーゼであり、ウイルスゲノムの複製起点でDNA二重らせんをほぐしてDNA複製を開始する。一方、E2は補助因子であり、複製起点近傍の特異的認識配列に結合してE1を複製起点に呼び寄せる。E1/E2どちらのタンパク質も、プロモーターの上流にある長鎖制御領域(LCR)の制御下でウイルス初期プロモーターから発現し、ウイルス生産期のゲノム複製に必要である。E2はまた、ウイルスゲノムを宿主クロマチンにつなぎとめ、細胞分裂によってウイルスゲノムを娘細胞に正確に分離する役割を担っており、HPVのライフサイクルの維持期にも重要である。E1はウイルスゲノムの複製開始には必須であるが、HPV16ゲノムのE1非依存的な維持が報告されている。このため、ウイルスエピソームの維持複製に対するE1の必要性については結論が出ていない。

ウイルスタンパク質に加えて、HPVは宿主細胞のタンパク質を利用して、そのライフサイクルの間、ウイルスゲノムの安定維持を可能にしている。プロモドメイン含有4(Brd4)、DEAD/H-Boxヘリカーゼ11(DDX11、ChIR1とも命名)、DNAトポイソメラーゼII結合タンパク質1(TopBP1)などの細胞因子は、E2と有糸分裂期のクロマチンとの会合に関与し、ウイルスゲノムの分離を促進している。さらに、最近我々は正常ヒト不死化ケラチノサイト(NIKS)には、HPV16およびHPV18ゲノムが安定に維持されるという特徴があり、ホメオボックス(HOX)転写因子HOXC13が、NIKSにおけるこれらのHPVゲノムの維持に重要な役割を果たすことを報告した(Ishii et al, 2020)。

HOXファミリーには、HOXA、HOXB、HOXC、HOXD遺伝子クラスターがあり、そこから39のパラログタンパク質が発現する。これらは胚発生の初期に機能して細胞や組織の同一性を確立し、細胞の増殖、分化、生存を制御する。マウスHOXC13は、口輪筋、舌糸状乳頭、毛包で高発現しており、これらの器官の成長と発達に機能している。同様に、ヒトHOXC13は、爪のマトリックスおよび毛包で高発現し、ケラチン遺伝子の発現制御に関与している。ヒトHOXC13の変異は、毛髪と爪の重度の欠損である外胚葉異形成9を引き起こす。

2 研究の目的

高リスクHPVゲノムの安定維持にHOXC13が必要であることをさらに確認するため、本研究では、CRISPR-Cas9技術により、HOXC13遺伝子をノックアウト(KO)したNIKSクローンを新たに構築した。このKO細胞を用いて、HOXC13がHPV16、HPV18、HPV52、HPV58ゲノムの長期維持に関与しているかどうかを検討した。

3 研究の方法

3-1 細胞培養

正常不死ヒトケラチノサイト(NIKS, ATCC® CRL-12191™)は、マイトマイシンC処理した3T3マウス線維芽細胞をフィーダーに、F培地で培養された(Ishii et al, 2020)。

3-2 HOXC13 KO NIKS細胞の作製

組換えレンチウイルスを使いHOXC13sgRNAをNIKS細胞へ導入した。

3-3 HPV全ゲノムのトランスフェクション

HPV16、HPV18、HPV52、HPV58全ゲノムをX-tremeGENE™ HP DNAトランスフェクション試薬(Sigma-Aldrich)を用いてNIKS細胞およびHOXC13-KO NIKS細胞へ導入した。

3-4 HPVゲノムの定量

QIAamp DNA mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて、HPVゲノムを導入したNIKS細胞から全

細胞 DNA を抽出した。HPV ゲノムの量は、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、StepOne™ Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) により測定された。

3-5 HPV mRNA レベルの定量

RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて細胞から全 RNA を単離し、10 ng の RNA を ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix/gDNA remover を用いて逆転写した。HPV mRNA から逆転写された DNA 量は、THUNDERBIRD® SYBER qPCR mix を用い、全 HPV ゲノム DNA を標準として StepOne™ Real-Time PCR システムで測定された。

3-6 クロマチン免疫沈降アッセイ

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイは、SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IP kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて、以前に記載されたように行った (Ishii et al., 2020)。

4 研究結果

4-1 HOXC13 KO 細胞は HPV16 ゲノムを維持する能力を失う

我々は以前、HOXC13 の siRNA を導入した NIKS 細胞は HPV16 および HPV18 ゲノムの保持能を低下させることを示した。しかし、これらの実験は、HOXC13 レベルが部分的に低下した状態で、短い培養期間 (4 日間) で行われたものであった。HOXC13 が HPV ゲノムの長期維持に必要であるかどうかを調べるため、HOXC13 遺伝子を標的とする組換え CRISPR-Cas9 レンチウイルスを導入して HOXC13 KO NIKS を作製した。2 つの HOXC13 KO クローン (2A および 10B) から得られたゲノム DNA の塩基配列解析から、HOXC13 のエクソン 1 のコード配列が、両アレルにおいて挿入またはフレームシフトによって破壊されていることが示された。ウェスタンブロット解析により、これらの KO クローンでは HOXC13 の発現が完全に失われていることが確認された。野生型 NIKS と比較して、HOXC13 KO クローンでは細胞増殖に対する阻害効果は観察されなかった。さらに、細胞の分化や上皮間葉転換を示す形態学的変化は、HOXC13 KO クローンでは観察されなかった。

HPV ゲノムの長期維持における HOXC13 の関与を調べるため、HOXC13 KO 細胞 (クローン 2A および 10B) に HPV16 ゲノムをトランスフェクトし、4 継代 (19 日目) まで培養し、各時点における細胞あたりの HPV16 ゲノムのコピー数を qPCR で測定した。親株のウイルスゲノムコピー数は細胞継代を通して細胞当たり約 200 コピーで一定であったが、HOXC13 KO クローンではウイルスゲノムの継続的な減少が認められた。サザンブロット分析により、NIKs では 4 継代 (19 日目) に環状 HPV16 ゲノムの存在が確認されたが、HOXC13 KO 細胞 (クローン 2A) では HPV16 ゲノムは検出されなかった。HPV16 ゲノムを保有する HOXC13 KO クローンでは細胞増殖に影響がなかったことから、HOXC13 KO 細胞におけるウイルスゲノムのコピーの減少は、細胞増殖の阻害によるものではないことがわかった。HOXC13 siRNA でトランスフェクトした NIKs では HPV16 初期遺伝子の発現が低下し、ウイルスゲノムの減少につながったという以前の研究と一致して、ルシフェラーゼレポーターアッセイで測定した HPV16 初期プロモーター活性は、HOXC13 KO 細胞では野生型細胞と比較して有意に低下していた。しかし、トランスフェクション効率 KO 細胞と野生型細胞で同等であった。さらに、HOXC13 の強制発現は、NIKs における HPV16 初期プロモーター活性を有意に増加させた。これらの結果は、HOXC13 が、ウイルス初期プロモーターを正に調節することによって、NIKs において HPV16 ゲノムを安定に維持するために必須であることを示している。

4-2 HOXC13 は HPV16、HPV52、HPV58 のゲノム維持に寄与するが、HPV18 には寄与しない

次に、HOXC13 KO 細胞を用いたウイルスゲノム維持の解析を、HPV18、HPV52、HPV58 を含む他の高リスク型にも拡大した。HOXC13 KO 細胞と野生型細胞に HPV16、HPV18、HPV52、または HPV58 の全ゲノムをトランスフェクトし、3 継代 (14 日目) まで培養し、細胞あたりのウイルスゲノムのコピー数を qPCR でモニターした。野生型細胞では、HPV16 と同様に、HPV18、HPV52、HPV58 ゲノムのコピー数は継代を通してほぼ一定で、それぞれ細胞当たり約 800、200、30 コピーであった (図 1A)。しかし、HOXC13 KO 細胞では、HPV16 と同様に HPV52 および HPV58 ゲノムのコピー数が継代 3 回目で 1/1000 に減少したのに対し、HPV18 ゲノムのコピー数は継代を通して野生型細胞のそれと比較して 1/5 から 1/10 のレベルで一定であった。HPV16 と同様に、HOXC13 KO は HPV18、HPV52、HPV58 ゲノムを保有する NIKs の細胞増殖に影響を与えなかった (図 1B)。

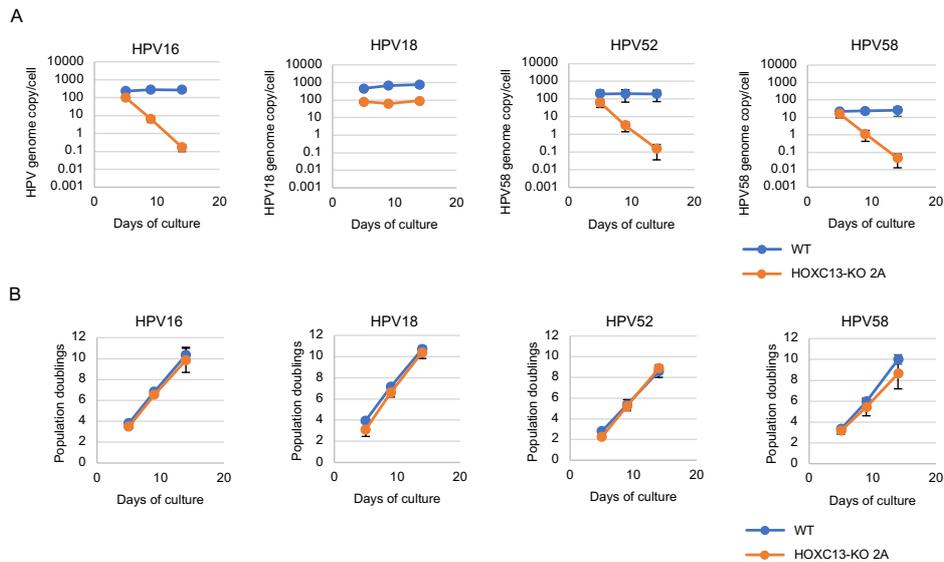


図1 HOXC13ノックアウト(KO) NIKS細胞におけるHPV16, HPV18, HPV52, HPV58型ゲノム維持

HPV18 ゲノムの安定した維持を確認するため、HPV18 ゲノムを導入した HOXC13 KO クローン(2A)の細胞培養をさらに6継代(27日目)まで延長した。HOXC13 KO 細胞では HPV18 ゲノムのコピー数が継代を通してほぼ安定していることが観察された。一方、細胞増殖は HOXC13 KO によって影響を受けなかった。ウェスタンブロット解析により、培養終了時に HOXC13 が HOXC13 KO クローンで発現していないことが確認され、長期培養で残存する野生型細胞が KO 細胞を上回った可能性は否定された。さらに、サザンブロット解析により、HOXC13 KO 細胞でも野生型細胞と同様に HPV18 ゲノムがエピソードとして維持されていることが示された。これらの結果から、HOXC13 は HPV16、HPV52、HPV58 ゲノムの安定維持には必要であるが、HPV18 ゲノムの安定維持には必要でないことが示された。

4-3 HOXC13 は HPV16、HPV52、HPV58 の初期遺伝子発現を制御するが、HPV18 は制御しない

HPV 初期プロモーターは、ウイルスゲノムの複製と維持に必須な E1/E2 遺伝子の発現を駆動するため、初期プロモーターに対する HOXC13 KO の影響を、レポーターアッセイによって4つの型間で比較した。HPV16、HPV18、HPV52、または HPV58 の LCR 制御によるルシフェラーゼ活性は、HOXC13-KO 細胞では野生型細胞と比較して低下しており、調べたすべての HPV 型の初期プロモーター活性のアップレギュレーションに HOXC13 が必要であることを示した。特に、HPV18 初期プロモーターは、HOXC13 KO 細胞では4つの型の中で最も高い活性を示し、野生型細胞で観察された HPV16 プロモーター活性の80%近くに相当した。

HPV 遺伝子制御における HOXC13 の役割をさらに解明するために、ウイルス初期遺伝子(E6、E7、E1、E2)の転写レベルに対する HOXC13 KO の影響を RT-qPCR で調べた。HOXC13 KO 細胞では、HPV16、HPV52、および HPV58 mRNA のレベルが、試験したすべての初期遺伝子について、野生型細胞と比較して有意に減少した。一方、HPV18 mRNA のレベルも同様の減少傾向を示したが、野生型細胞と HOXC13 KO 細胞の間で統計的有意差には達しなかった。これらの結果は、HPV18 遺伝子の制御における HOXC13 の役割は比較的わずかであることを示唆している。

最後に、HPV16、HPV18、HPV52、HPV58ゲノムを保有する NIKS において、HOXC13 と LCR との物理的な関連を ChIP アッセイで調べた。anti-HOXC13 IgG またはコントロール IgG と共沈した LCR および L2 DNA の量を qPCR で測定し、2つの領域間で比較した。抗 HOXC13 IgG を添加した沈殿物には、コントロール IgG を添加した沈殿物と比較して、4つの HPV 型すべてにおいて LCR および L2 DNA が濃縮されていた。さらに、4つの型すべてにおいて、LCR DNA のレベルは L2 DNA のレベルよりも有意に高かったことから、HOXC13 が LCR に優先的に結合していることが示された。注目すべきことに、HOXC13 と HPV18 LCR の結合レベルは、試験した4つの型の中で最も低かった。これは、HPV18 初期遺伝子発現に対する HOXC13 KO の影響が軽微であることと一致している。

5 考察

本研究では、CRISPR-Cas9 技術を用いて HOXC13 KO NIKS を構築し、この KO 細胞を用いて、HOXC13 が HPV16、HPV52、HPV58 ゲノムの安定維持に重要であることを実証した。ヒト HOXC13 は毛包で強く発現し、ケラチン遺伝子の発現制御に関与している。毛包は多能性幹細胞が豊富な領域であり、毛包幹細胞はウサギパピローマウイルスの標的細胞であると推定されている。最近、眉毛の毛包標本からも様々な HPV 遺伝子型が検出された。私たちは以前、HPV は HOXC13 を発現する上皮幹細胞を標的とし、HOXC13 依存的な初期プロモーターの活性化とその後のウイルスゲノムの維持を通じて持続感染を確立すると推測した (Ishii et al. 2020)。長期培養における HPV16、HPV52、HPV58 のウイルスゲノムの維持に HOXC13 が寄与していることを示す今回の結果は、この推測を支持するものである。

我々の以前の研究では、HOXC13 の siRNA ノックダウンにより、NIKS における HPV18 ゲノムの短期保持が抑制されることが示された (Ishii et al. 2020)。一方、今回の研究では、HOXC13 の KO は HPV18 の安定なゲノム維持に影響を及ぼさなかった。この結果は、HOXC13 KO が調べたすべての HPV 型のウイルス初期プロモーター活性をダウンレギュレートしたことと矛盾していた。このことは、HPV16、HPV52、HPV58 と同様に、HPV18 の初期プロモーターからの E1 または E2 のダウンレギュレーションにつながり、ゲノム維持複製を阻害するはずである。この矛盾については、HOXC13 KO 細胞における HPV18 初期プロモーターは、野生型 NIKS における HPV16 初期プロモーター活性の 80% のレベルに維持されていたことに注目すべきである。したがって、HOXC13 KO 細胞における HPV18 の初期プロモーター活性と、このプロモーターによって駆動される E1/E2 発現のレベルは、HPV18 ゲノムの維持複製を支持するのに十分高い可能性がある。重要なことは、レポーターアッセイの結果とは対照的に、HOXC13 KO は HPV18 初期遺伝子の発現にわずかな影響しか及ぼさなかったことである。このことは、HPV18 の初期遺伝子発現制御における HOXC13 の役割は少ないことを示唆している。さらに、以前の研究で、HaCaT 細胞で外因的に発現させた HPV18 E1 は、HPV16 および HPV11 E1 と比較して、E1 の mRNA レベルはこれらの型間で同等であったにもかかわらず、高レベルで存在することが明らかになった。HPV18 E1 の細胞内での高い安定性が、HOXC13 KO 細胞における HPV18 ゲノムの安定保持に寄与しているのかもしれない。

JASPAR データベース検索により、LCR における推定 HOXC13 結合配列が以下のように同定された: HPV16 の 3 つの部位、CTTGTAAAAT (7220-7228、プラス鎖)、CTTGTAAAAT (7883-7875、マイナス鎖)、TTTGTAAAA (7829-7837、プラス鎖); HPV18 の 2 つの部位、CTTGTACAA (7735-7743、プラス鎖)、GTTATAAAA (7396-7404、プラス鎖); HPV52 の 3 部位、CTTGTAAAA (7849-7857、プラス鎖)、CTAGTAAAA (18-26、プラス鎖)、ATTATAAAA (7940-7932、マイナス鎖); HPV58 の 3 つの部位、CTTGTAAAA (20-28、プラス鎖)、CTTGTAAAA (7736-7744、プラス鎖)、ATTGTAAAAC (7313-7321、プラス鎖) (下線は、典型的な HOXC13 結合モチーフに一致するヌクレオチド)。これらの結果は、HOXC13 が HPV16、HPV18、HPV52、HPV58 のすべての LCR に結合するという我々の知見を強く支持するものである。また、HPV18 では、推定される HOXC13 結合部位の数が 4 つの型の中で最も少なく、このことは HPV18 では、HPV16、HPV52、HPV58 に比べ、LCR への HOXC13 の結合が弱いことが示唆された。実際、ChIP アッセイでは、抗 HOXC13 抗体で沈殿した LCR DNA のレベルは、HPV18 の方が他の 3 型よりも低く、これは HOXC13 の潜在的結合部位の数と一致している。

HPV18 は、浸潤性子宮頸癌において世界で 2 番目に多い高リスク HPV であり、その癌は、HPV16、HPV52、HPV58 と比較してユニークな特徴を持つ。特に、HPV18 は扁平上皮癌よりも腺癌でより頻繁に検出され、感染と持続性に腺指向性を示すと考えられている。したがって、HOXC13 非依存的な HPV18 ゲノムの維持は、腺細胞または組織に豊富に存在する他の転写因子が、HPV18 初期プロモーターのアップレギュレーションとウイルスゲノムの安定した維持に寄与していることを示唆している。子宮頸部腺癌発生に対する HPV18 感染の特異的トロピズムを理解するためには、このような HPV18 特異的細胞因子/メカニズムを同定するためのさらなる研究が必要である。

6 参考文献

Ishii, Y., Taguchi, A., Kukimoto, I., 2020. The homeobox transcription factor HOXC13 upregulates human papillomavirus E1 gene expression and contributes to viral genome maintenance. FEBS Lett 594, 751-762.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiyuki Ishii; Seiichiro Mori; Takamasa Takeuchi; Iwao Kukimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Differential requirement of the transcription factor HOXC13 for the stable maintenance of human papillomavirus genome among high-risk genotypes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Virology	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） 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 -

〔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
---------	---------