

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590540

研究課題名(和文)新規抗ウイルス剤開発を目指したHPV過形成誘導機構の解明

研究課題名(英文) Understandings of the HPV-induced tumorigenesis for developing anti-virus reagents.

研究代表者

酒井 博幸 (Sakai, Hiroyuki)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：80281731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：HPV感染は、子宮頸癌や頭頸部癌の重要危険因子である。これらの癌の予防・治療にはHPVに対する抗ウイルス剤の開発が期待されている。そこでHPVの複製機構、および腫瘍形成機構を解明することで、有望な抗ウイルス剤の標的分子を同定することを目的とした。

その結果ウイルスのE6遺伝子産物がウイルス複製効率に重要であることが分かった。またE7遺伝子産物は腫瘍誘導に関与するのみ出なく、子孫ウイルス粒子の産生にも寄与していることが示された。これら、E6やE7の作用機序を更に解明することで、有望な抗ウイルス剤の分子標的が同定可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The infection of HPV is a major risk factor for cervical cancers and some of head and neck squamous cell carcinomas. For prevention of these cancers, it is critical to develop effective anti-virus reagents. In this project, I examined the mechanisms of virus replication and virus-induced tumorigenesis for identification of the candidate targets for anti-virus reagents.

It was revealed that E6 was important for the genome maintenance of HPV and that E7 was critical both for the virus-induced tumorigenesis and vegetative virus replication.

These results indicates that both E6 and E7 are good candidates for the developing anti-virus reagents. For the identification of the reagents, it is essential to clarify the action mechanisms of these oncoproteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HPV 腫瘍形成 抗ウイルス剤 子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus、以下 HPV と略す) は、ヒトの皮膚や粘膜などの重層上皮組織に感染する病原ウイルスです。このウイルスの感染によって、通常はイボやコンジローマなどの良性腫瘍が誘発されますが、まれに悪性腫瘍へ進展することがあり、特に子宮頸がんの発症においては、そのほとんどが HPV 感染に起因するものであることがわかっています。

近年、HPV 感染に対する予防ワクチンが我が国でも承認され、このワクチン接種が普及することで、子宮頸がんの発症は大きく低減すると期待されます。しかしワクチン接種に対する公的補助などは不確定であり、たとえ普及したとしても HPV 感染の約 30% は防ぐことができないと考えられています。また、このワクチンに関しては感染者への治療効果は確認されていません。そのため抗 HPV 剤の開発が重要となりますが、このウイルスの複製機構はよくわかっていないため、抗 HPV 剤の分子標的も同定されていません。

HPV の複製は通常の細胞培養条件ではサポートされないため、その複製機構を解析することが困難でした。申請者は HPV の複製を再現する新規の複製モデル、『三次元皮膚モデル培養系』の構築に成功しており、その系において HPV 感染による過形成誘導を確認しています。

また過形成誘導の責任因子の一つとして、HPV がコードする E7 を同定しています。ウイルス感染による過形成の誘導は、感染細胞数を増やし子孫ウイルスのコピー数を増大させるという点でウイルス複製に重要であるばかりでなく、過形成誘導は悪性腫瘍への転換の重要なステップとなっています。

当申請課題では HPV 感染による過形成誘導機構の詳細を明らかにし、その結果に基づいて、過形成誘導を阻害するための分子標的を同定します。HPV 感染による過形成誘導を抑制することが可能となれば、有望な抗ウイルス剤、さらに抗腫瘍剤の開発に結びつくことが期待されます。また重層上皮での過形成誘導機構の解明は、正常上皮の形成機構の解明にも貢献しうるものと考えられます。

2. 研究の目的

申請者はヒトパピローマウイルス (HPV) の複製と、その感染時に誘導される過形成を再現した『三次元皮膚モデル培養系』を独自に開発し、学術誌にその成果を発表している。この解析系を利用して HPV による過形成誘導機構を解析し、その成果に基づき抗ウイルス剤および抗腫瘍剤の分子標的を同定する。

3. 研究の方法

【HPV 複製系の構築】

HPV-FL (FL for full-length) 型の構築は、HPV16, 18 型のゲノム DNA を制限酵素処理やライゲーション反応によってつなぎ換え、両

端に LCR 配列を持つようなウイルスゲノムを構築した。これを pEGFP1 (クロンテック) を改変した G418 耐性プラスミド内に挿入したものを HPV-FL とした。

HPV-S (S for self-ligation) 型の複製系では、HPV16, 18 型の全ゲノムを含むプラスミドからウイルス DNA 領域のみを切り出し、それらを T4 DNA ligase によって環状化したものをゲノム型 DNA として利用した。HPV DNA を維持する細胞を選別する目的で、各 HPV 由来の複製起点 (ori 配列または LCR) を含むネオマイシン耐性プラスミド (HPV-ori plasmid または LCR plasmid) を構築した。

HPV の各遺伝子に変異を導入する際には、polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。変異の導入は PCR 操作を行った部分の全配列を検証することで確認した。

【細胞培養】

ヒト繊維芽細胞 (human foreskin fibroblast; HFF, クラボウ) は 10% FBS/DMEM を用いて、5% CO₂ 37 条件において培養した。ヒト角化細胞 (human foreskin keratinocyte; HFK, クラボウ) は専用の培地 (EpiLife-KG2, クラボウ) を用いて、同条件で培養した。

【遺伝子導入】

HFF, HFK に対してはそれぞれ専用の試薬を用いて transfection を行った (nucleofector kit, AMAXA)。

【サザンブロット解析】

細胞からのウイルス DNA の抽出には SDS-proteinase K を用いた total DNA 回収法を利用した。一部エピゾーム状の DNA のみを回収する目的で Hirt の方法を適用した。回収した DNA は制限酵素処理によって線状化し、それをアガロースゲルで泳動したものをナイロンメンブレンに転写した。検出/可視化には DIG-標識・検出試薬を利用した (ロシユ)。

【皮膚モデル培養系】

真皮モデルは HFF を type-I コラーゲンゲルに埋め込み、数日の間収縮させることで構築した。このゲルの表面に HFK を重層させ、さらに HFK 表面を空気に晒すことによって HFK は層状化および分化し、約 10 日間で皮膚モデルが構築される。

【ウイルスベクターの構築】

ras や HPV 遺伝子を HFK に遺伝子導入する際には、MuLV 系のレトロウイルスベクターを用いた。導入する遺伝子に応じて、LXSN, LPCX (Clontech) を使い分け、それぞれの plasmid に目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は、各 plasmid を pCL10A1 パッケージングベクター (Retrogen) とともに 293T 細胞に transfection し、培養上清中に放出されたウイルスベクターを回収し利用した。

【メチルセルロース懸濁培養、および分化マーカーの確認】

1.5 % メチルセルロース

/EpiLife-KG2+DMEM (1:1)に HFK を懸濁し、10~48 時間培養することで分化誘導を行った。分化マーカーの発現誘導は transglutaminase, filaggrin, involucrin を Western 法によって検出することで行った。

【FACS による細胞周期解析】

細胞は必要に応じてメタノール固定、あるいはホルマリン固定し、PI 染色によって染色体をマークし、EPICS XL-MCL (Beckman Coulter) を用いて FACS 解析を行った。

4. 研究成果

【HPV18 の調節遺伝子機能の解析】

HPV18 の全ゲノムを含むプラスミドをもとにして、E1, E2, E4, E5, E6, E7 の各 ORF, 5' 寄りの部位にナンセンス変異を導入し、各遺伝子の変異体を作成した。E4ORF は E2ORF と読み枠違いでオーバーラップしているため、E4 に導入した点変異は E2 に対してはサイレント変異となるようにデザインした。

これらのプラスミドから HPV18 ゲノム領域を切り出し、リガーゼによってゲノム状に環状化したものをヒト角化細胞に導入し、その複製などを解析した。なお、HPV18 の複製起点 (ori) を含むネオマイシン耐性遺伝子発現ベクターを同時に導入し、その後 G418 を含む培地で培養を続けることで、HPV ゲノム導入細胞の選別をおこなった。

得られた細胞内の HPV ゲノムコピー数をサザンブロットによって解析したところ、E6 変異体で顕著なゲノムコピー数の低下が確認された。その他の変異体はほぼ野生型と同程度のゲノムコピー数を維持していた (数百コピー/細胞)。

つぎに、カルシウム処理によって分化誘導をかけた場合のゲノムコピー数の変化を調べた。野生型では分化処理により 10 倍程度のコピー数増加が確認できた。それに対して E6 変異体では全く増加が認められなかった。また、E7 変異体ではコピー数の増加は野生型の 1/3 程度に下がっていた。この点は HPV16 型との顕著な違いである。E4 と E5 変異体に関しては、コピー数の増加は若干低下していたが、有意というためには繰り返し実験が必要である。

さらに、高度に上皮細胞の分化の影響を調べるために、得られた細胞を用いて皮膚モデル培養系 (raft culture) を構築した。野生型 HPV DNA を導入したものは、角質層の顕著な肥大が観察された。E4, E5 両変異体でも野生型と同程度の異形性が確認された。しかし E6 と E7 の変異体では、全く異形性は観察されなかった。ビリオン構成タンパクである L1 タンパクに対する組織免疫染色を行ったところ、野生型では角質層に L1 の発現が確認された。それに対し、E6, E7 の変異体では L1 の発現は検出できなかった。E4 と E5 変異体では野生型と同程度に、角質層での L1 発現が認められたが、その発現量は有意に低下していた。

【E4 による aggresome 形成の意義に関して】

E4 に関してはすでに細胞周期の進行を抑制することを報告しているが、その分子機構として、M 期進行にかかわる細胞骨格成分に作用することで、G2/M 期で細胞周期停止を誘導する可能性を示した。

E7 は上皮細胞の分化を抑制することで過形成を誘導するが、メチルセルロース懸濁培養法を用いた実験系で、E4 は E7 の作用に拮抗して細胞分化を促進することが示された。

18E4 はすでに報告したように、細胞質に凝集塊を形成する。その凝集塊は (i) 周りにビメンチンケージが形成されている、(ii) HDAC6, Hsp40, ユビキチン化タンパクが凝集塊に含まれる、(iii) 凝集塊形成は微小管形成、HDAC6, およびダイニンに依存的である、という点から、aggresome 様の構造体であることが分かった。

またこの aggresome には チューブリンがリクルートされ、細胞内の正常な中心体形成が抑制されていた。さらに HPV18 の E6 と E7 も aggresome に捕獲されており、E4 発現細胞では E6, E7 による p53, RB 発現抑制が解除されていることが分かった。この現象が、先に述べた E4 と E7 の拮抗作用に関連している可能性が示唆された。

【E7 による過形成誘導機構】

我々はすでに皮膚モデルを利用して、E7 による過形成誘導活性を報告している。そこでは、この過形成誘導には E7 による pRb と p130 というポケット蛋白の分解 (不活化) が重要であることを示した。

しかし、E7 には他にも多くの機能が知られており、また低リスク型の E7 にも過形成誘導機構があることから、ポケット蛋白の分解の他の機能も関与している可能性が考えられる。JNK は通常の皮膚モデルでは基底細胞でのみ活性化 (リン酸化) が認められるが、E7 発現皮膚モデルでは、上層部でも活性化していることが認められた。カルシウムによる分化誘導実験では、JNK のリン酸化が分化に伴って失われることが分かった。E7 発現細胞は、分化誘導後も JNK のリン酸化状態が保たれていた。さらに、正常な HFK を JNK 阻害剤で処理すると、細胞分化が進行することが確かめられた。

これらのことから、E7 は分化刺激後も JNK を活性化状態に保つことで、細胞の増殖性を亢進すると同時に分化を抑制し、上皮の過形成を誘導する可能性が考えられた。

【HPV18 複製モデルを利用した、新規化合物の抗ウイルス活性の評価】

抗 HPV 活性を持つ化合物のスクリーニングには、HPV 複製系の確立が必要である。ここでは我々が構築した HPV 複製系を用いて、いくつかの新規化合物の抗ウイルス活性を評価した。

HPV18 を導入した角化細胞で、新規化合物の効果を調べたところ、5 μ M で細胞内のゲノムコピー数が約 1/2 にまで低下させるものが見つかった。同じような効果はカルシウム分化時にも観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Kajitani N., Satsuka A., Yoshida S. and Sakai H.: HPV18 E1^{E4} is assembled into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins. *Frontiers in Virology* 4: article 251, 2013.

Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., and Sakai, H.: Productive lifecycle of human papillomavirus that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol.* 3: 152, 2012.

[学会発表](計 8件)

佐塚文乃, 梶谷直子, 川手章史, 酒井博幸: Analysis of HPV genome replication. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep11-16

梶谷直子, 佐塚文乃, 川手章史, 酒井博幸: HPV 18 E1^{E4}, a viral gene product encoded by the early gene region of HPV genome, interacts with vimentin intermediate filaments in vitro and in vivo. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep11-16

佐塚文乃, 梶谷直子, 川手章史, 酒井博幸: HPV ゲノムの複製メカニズムの解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子, 佐塚文乃, 川手章史, 酒井博幸: Identification of a function of Human papillomavirus 18 E1^{E4}. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子, 川手章史, 酒井博幸: HPV 18E1^{E4} の新規機能の探索: ピメンチンとの相互作用. 第 71 回 日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日-21 日

梶谷直子, 川手章史, 酒井博幸: HPV 18E1^{E4} の新規機能の探索. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13 日-15 日

梶谷直子, 酒井博幸: HPV E1^{E4} はアグリソームを形成しウイルス因子のタンパク量制御に参与する. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子, 酒井博幸: Human papillomavirus (HPV) E1^{E4} は aggresome を形成する. 第 61

回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10 日-12 日

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
酒井 博幸 (SAKAI, Hiroyuki)

研究者番号: 80281731

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: