

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791719

研究課題名(和文)ハイリスクHPV型のタンパクを標的とした新たな分子標的治療に関する基礎的検討

研究課題名(英文)Study of a new therapy targeting proteins of high-risk HPV

研究代表者

大野 暁子(OHNO, AKIKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70383883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：IgGシグナルペプチド(ss)-細胞膜移行シグナル(Atp)-E7由来Rb結合ペプチド(RbB)-E7由来myc結合ペプチド(MycB)-5量体化COMPドメインペプチド(COMP)-6xHisタグおよび各種欠失体を発現する組換えアデノウイルスベクターの作製に至った。また、HPV E6タンパク質を5つの領域に分断し、ss-Atp-RbB-MycB-COMPに組み込んだ遺伝子を作製し、アデノウイルスへの組み込みを行い、これらのウイルスをHeLa細胞、CaSki細胞、C33a細胞、A431細胞に感染させ、細胞障害性を検討した結果、HeLa細胞では全てのウイルスで傷害性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Adenovirus vector expressing IgG signal peptide(ss)-cell penetrating peptide(Atp)-E7 pRb-binding peptide(RbB)-E7 c-myc-binding peptide(MycB)-pentameric COMP domain peptide(COMP)-6xHis was constructed. Several deletion variants as well as vector containing partial HPV E6 peptide were also generated. Cell lines such as HeLa, CaSki, C33a, and A431 were infected with these adenoviruses to examine the cytotoxicity. Growth inhibition was observed only in HPV18 positive HeLa.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：HPV

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は年間約1万人が罹患し、3500人が死亡している。早期に発見されれば治癒可能な癌であるが、進行癌と診断された場合には治癒困難な疾患である。子宮頸癌の原因としてヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が重要な役割を担っており、なかでもウイルスタンパクである E6, E7 タンパクは P53, Rb 癌抑制遺伝子産物の分解や失活に深く関与し、最終的に細胞周期を攪乱し癌化に寄与すると言われている。したがって、これらのウイルスタンパクの機能阻害を分子標的治療のターゲットとすることは理解されやすい。HPV 感染による子宮頸部発癌メカニズムの解明はすすんでおり、E6, E7 タンパクは共同で細胞の不死化、アポトーシスの抑制、細胞の異常増殖、細胞分化の抑制、免疫応答の抑制に働いていることが判明している。

E6, E7 遺伝子はウイルスゲノム上隣接した領域にあり、mRNA では同一転写産物から翻訳されてタンパクが産生されている。このことを利用して siRNA によるウイルス遺伝子発現抑制を企図した分子標的治療の開発が模索されてきた。研究者が所属している研究室からも HPV18 型の E6, E7 遺伝子発現抑制による分子標的治療の基礎的研究が報告されている (Fujii T, Int J Oncol, 2006)。しかしながら、siRNA は細胞内への遺伝子導入効率とその発現作用時間に限界があり、治療の実用化には至っていない。

現在、タンパク分子間の相互作用を遮断する安定した小分子の開発が将来の治療薬候補として期待されている。実際にタンパク構造骨格を基盤として combinatorial chemistry の手法を用いた小分子のスクリーニング解析が行われているが、その後の機能解析に時間のかかる難点がある。

研究者は以前より、Rb タンパクと E7 タンパクとの結合部位の中で E7 の C 末端領域に着目し、その結合を阻害する小分子開発の基礎的な実験を行ってきたが、良好な成績が得られなかった。そこで 5 量体を形成する cartilage oligomeric matrix protein (COMP) assembly domain (Proc Natl Acad Sci USA, 1997) の利用を試みた。この融合タンパクは、単量体では結合性の低いペプチドも標的タンパクにより強固に結合できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では子宮頸部の癌化に関わるタンパクの中から HPV の E6, E7 タンパクとの結合部位が判明しているタンパクを候補として、ウイルス由来タンパクと宿主タンパクとの結合を物理的に阻害するペプチドの同定を試みた。

すなわちターゲットとなる結合部位のペ

プチドを COMP 融合タンパクとして発現させて、まずは増殖阻害効果を判定した。今後は競合阻害によりタンパク結合およびその機能を抑制できるか否かを検討したい。

そのためウイルスもしくは宿主由来のタンパクのどちらかの結合部位のアミノ酸配列と COMP との融合タンパクを発現するプラスミドベクターおよび組換えアデノウイルスベクターを構築した。

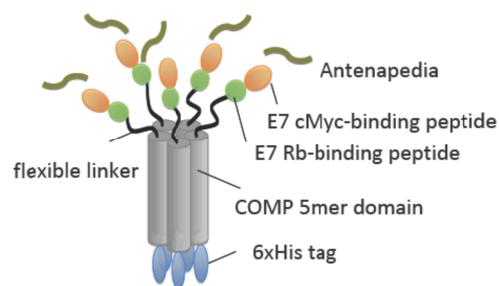
HPV16 もしくは HPV18 型の E6, E7 タンパクが発現している子宮頸癌由来培養細胞株 (HeLa, SiHa, SKG I, SKG II, SKG IIIa) にプラスミドまたは組換えアデノウイルスを導入し、細胞の増殖抑制効果やアポトーシス出現の有無を解析した。

今後は子宮頸癌細胞に特異的に増殖抑制効果を示す COMP ペプチド配列を決定し、その配列を基に合成ペプチドを作製する。同様に子宮頸癌由来培養細胞株を用い、その合成ペプチドの生物学的作用を検討する。

3. 研究の方法

E6, E7 タンパクの機能阻害をもたらすペプチドを発現するプラスミドの作製:

ターゲットとなるペプチド配列を 5 量体として発現できる COMP-assembly domain (COMP-AD) のプラスミドを構築する。COMP-AD にはターゲットとなる複数のペプチドを搭載できるメリットがある。予備的な実験として図 1 のように、E7 の c-Myc 結合部位とともに Rb タンパク結合部位のペプチドを発現するプラスミドベクターを構築した。



[図 1]

この実験においてはリポフェクション法による遺伝子導入を行うことから、その導入効率が問題となる。一般に、全ての細胞には遺伝子導入されることはなく、遺伝子導入されなかった細胞にはこのペプチドの効果も期待できない。そこで、タンパク発現ユニットにイムノグロブリン由来の分泌タンパクシグナル配列(ss)、さらに、この COMP-AD には発現したペプチドが効率よく細胞外から細胞内に移行するように antenapedia(atp)由来の細胞内移行シグナルを付加している。これにより遺伝子導入され

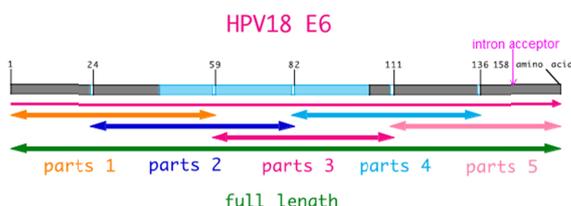
ていない隣接した細胞にもペプチドが取り込まれることを期待した。遺伝子導入効率はC末の His tag に対する抗体でモニターが可能である。

E7 タンパクにおいてはCR2領域にLxCxEのRbタンパク結合モチーフが存在しており、ハイリスク型HPVに共通なことから、ターゲット領域と考えられるが、その他にもRbタンパクとの結合を示す領域がE7タンパクC末端領域に存在しているので、その部分をCOMPに搭載して解析を行う。E6タンパクではDLG, hSrib, MAG1, MUPP1などのPDZドメインを有するタンパクとE6タンパクとの結合部位がHPVハイリスク型共通のターゲットとなるので、その部分をCOMPに搭載し解析を行った。

4. 研究成果

作成したペプチドを当初はリポフェクション法により各種子宮頸癌細胞株に導入して細胞の増殖能の変化を観察する予定であったが、予備的な実験において導入効率が著しく悪い状態を示唆する結果が得られた。このため、効果が弱くペプチドの優劣判定が難しいと判断し、遺伝子導入効率の優れた組換えアデノウィルスベクターを用いることにした。

発現ペプチドの構成は前項(方法)と同様、分泌タンパク(ss) + Antenapedia 膜貫通タンパク+Rb結合タンパク + c-Myc結合タンパク +COMP+His tag である。これを Gateway LR 組換え法を用いてアデノウィルスベクタープラスミドに組み込んだ後、HEK293細胞に導入し、組換えアデノウィルスに変換した。また、コンストラクトのうちどの部分が増殖阻害効果に寄与しているのかを判定するために、分泌タンパク・Rb結合タンパク・COMPのそれぞれの欠失コンストラクトも作成した。また、ペプチドが大きくなってしまふ欠点はあるものの、E6タンパクとの結合部位はHPVハイリスク型共通のターゲットとなるので、基盤となるコンストラクトにfull E6、partial E6(5種類)を加えたものも作成した。Partial E6は各自48-58アミノ酸からなるように分割した。このE6由来の部分はAntenapediaとRb結合タンパクの配列の間に立体障害を避けるために前後にスペーサーを付加してコンストラクトを作成し、アデノウィルスベクターに組み込んだ。(図2)



[図2]

作成した計10種類のペプチド発現アデノウィルスは、HeLa、CaSki、C33a細胞にそれぞれ感染させ、細胞の増殖阻害効果の有無を確認した。MOIにばらつきがあり予備的な実験ではあるものの、HPV18型を発現しているHeLaにおいて細胞の増殖阻害傾向(細胞の形態異常を含む)を観察することができた。(図3・表1)この増殖阻害傾向はHPV18を含まないCaSki細胞やC33a細胞では観察されなかった。ただ、HeLa細胞はアデノウィルスが感染しやすい特徴を持っているため、今後MOIをそろえた上で細胞増殖阻害効果の判定が必要であること、またgal染色などを用いて他の細胞と比べて細胞のアデノウィルス感染率を検討する必要がある。



[図3]HeLa細胞

peptide	titer (pfu/ml)	appr.MOI	HeLa (HPV18)	CaSki (HPV16)	C33a (HPV-)
(no infection)	-		100	100	150
#4(ful)	7.5E+07	1~5	90*	100	120
#5(del-ss)	1.6E+08	2~10	nd	nd	nd
#6(del-RbB)	4.5E+08	6~30	20*	60	60
#7(del-COMP)	5.8E+07	1~4	90*	100	120
E6 full (#4+)	4.3E+08	6~30	70*	100	80
E6parts 1	1.9E+08	2~10	80*	100	120
E6parts 2	3.9E+08	5~25	70*	100	90
E6parts 3	1.1E+08	1~5	80*	100	120
E6parts 4	1.1E+08	1~5	60*	100	120
E6parts 5	2.8E+08	3~15	50*	70	70

[表1]

数値は感染なしの細胞数を100とした場合の相対細胞数を示す。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 暁子 (OHNO AKIKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70383883