

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16792

研究課題名(和文) 感染によるAPOBEC発現を介した遺伝子変異誘導とCIN進行機構の解明

研究課題名(英文) APOBEC-mediated gene mutagenesis and mechanism of CIN progression induced by infection

研究代表者

飯塚 崇 (IIZUKA, TAKASHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90748617

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)：先行研究で子宮頸部異形成とAPOBEC3の発現に相関があることが示唆されていた。本研究では、子宮頸部への感染や炎症とAPOBEC3の発現とを培養細胞を用いて検討した。自然免疫機構としてインターフェロンやトル様受容体9のリガンドを用いた検討でAPOBEC3Aの発現が上昇することが分かった。この発現はインターフェロンとトル様受容体9のリガンドで相乗作用を示すことが示唆された。またAPOBEC3の作用により細胞内のHPV-DNAの高頻度突然変異が生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸部上皮における感染・炎症においてAPOBEC3Aという抗ウイルス作用を示す自然免疫機構の酵素が関係していることが示唆された。APOBEC3Aは子宮頸部異形成細胞においてHPVウイルスゲノムの突然変異および宿主DNAへの組み込みに関与している可能性があり、この酵素の有無が子宮頸部異形成の進行にどのような影響を与えるのかを今後検討する必要がある。新たな治療法の開発やマーカーに発見に至る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have suggested association between cervical dysplasia and APOBEC3 expression. In the present study, cervical infection and APOBEC3 expression were examined using cultured cells. The expression of APOBEC3A was found to be up-regulated in studies using interferon and toll-like receptor 9 ligands as innate immune mechanisms. This expression was suggested to be synergistic with the ligands of interferon and toll-like receptor 9. In addition, the action of these molecules may result in hyper-mutations of HPV-DNA in cells.

研究分野：産科婦人科

キーワード：子宮頸部異形成 APOBEC ヒトパピローマウイルス 突然変異 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮頸癌は罹患率、死亡率共に特に若年層において増加しており、妊娠可能女性や子育て世代の女性に深刻な影響を及ぼす。子宮頸癌の発癌メカニズムが解明されていく中で、HPVの宿主細胞の Episomal から Integration への遺伝子組み換えのメカニズムは解明されておらず、これを明らかにすることが新たな子宮頸癌の治療法につながると考えられる。APOBECファミリーは塩基配列を構成するシチジンを脱アミノ化しウラシルに変換する酵素であり、抗体遺伝子のクラススイッチと体細胞超変異 (Somatic hypermutation) を引き起こすことが知られている。近年、APOBEC3(A3)と HPV との関連性が報告がされており、A3の抗ウイルス作用とともに、HPVの遺伝子組み換えや Integration に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、子宮頸癌の前がん病変である子宮頸部異形成(CIN)における APOBEC3の発現に注目し、APOBEC3の発現による CINの進行促進および APOBEC3発現と子宮頸部感染症との関連性を明らかにするとともに、その関連分子を同定して新たな CIN進行の予防法や診断法および治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

1. ヒトAPOBEC3の発現機序の解明と関連分子の同定

- 1) ケラチノサイトおよび HPV16陽性子宮頸部異形成由来の W12細胞を用いて TLR9リガンド (CpG-DNA) およびインターフェロンを添加した。これは子宮頸部のウイルス・細菌感染とそれに伴う炎症を *in vivo* の実験系で再現したものとした。この実験系により APOBEC3の mRNA レベルでの発現の変化を定量 PCR 法で確認した。また TLR9の siRNA および TLR9カスケードの下流である NF- κ Bの阻害剤による APOBEC3の発現変化を確認した。またマイクロアレイにより W12細胞への TLR9刺激に対する関連因子について網羅的に検索した。
- 2) UGI (ウラシル DNA グリコシダーゼインヒビター) -ERT2 (タモキシフェンと特異的に結合する変異エストロゲン受容体) 融合タンパクを発現する W12 cell を用いて、TLR9リガンド添加による W12の HPV-DNA の hypermutation を 3D-PCR 法で検討した。

2. 臨床検体での関連分子の発現確認

子宮頸部異形成の円錐切除検体を免疫組織学的に APOBEC3および関連分子の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) TLR9リガンド (CpG-DNA) により上皮細胞において APOBEC3Aの発現は上昇する

ヒトケラチノサイト由来細胞株 (HDK-K4DT) および HPV16陽性子宮頸部異形成由来細胞株 (W12) の培養実験において、TLR9リガンドの CpG-DNA (ODN2006) により APOBEC3Aの発現が上昇することが示された。また ODN2006の代わりに HPC16由来の CpG-DNA でも APOBEC3Aの発現上昇が確認された。TLR9カスケードである NF- κ B阻害薬の添加および TLR9の siRNA によるノックダウンにより ODN2006添加による APOBEC3Aの発現は抑制されたことから、TLR9の刺激に APOBEC3A発現が上昇することが示された。TLR9刺激による関連因子の網羅的検討もマイクロアレイ法で実施したが、有力な候補を同定するには至らなかった。

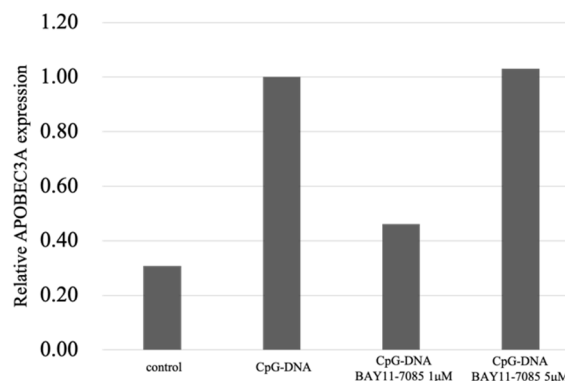


図 1. W12細胞における CpG-DNA および NF- κ B阻害薬による APOBEC3Aの発現変化

(2) CpG-DNA と IFN は APOBEC3A 発現に対して相乗的に作用する

IFNを投与後に CpG-DNA を投与するとそれぞれを単独で投与したときに比べて APOBEC3Aの発現が上昇し、発現量は相乗作用を示した。これは IFNによる TLR9カスケードの活性化 (MyD88発現上昇) が関与していることが示唆された。生体内において、局所の感染で生じた炎症刺激が近傍に波及し、その波及した部位では TLR9刺激に対する反応性が上昇し、感染に対して準備状態になることが示唆された。

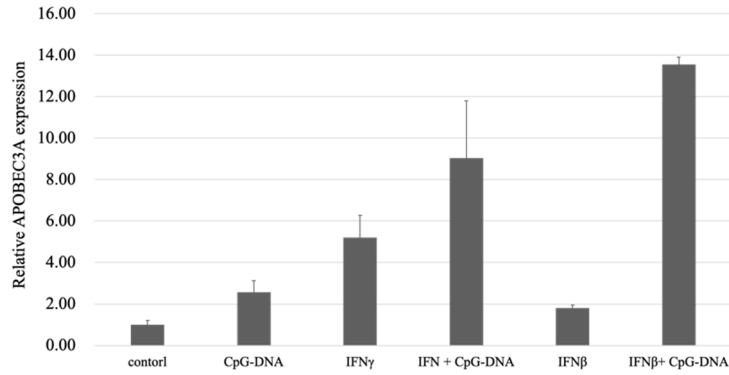


図 2. W12 細胞における CpG-DNA および IFN による APOBEC3A の発現変化

(3) TLR9 リガンド (CpG-DNA) により HPV-DNA の高頻度突然変異が生じる

UGI-ERT2 W12 細胞をタモキシフェン投与下 (UGI が核内に移行し、APOBEC により変換されたウラシルが除去できなくなる) で CpG-DNA (ODN2006) を添加したところ、HPV16 の E2 領域の DNA において APOBEC3 が関与したと考えられる C-to-T の突然変異が認められた。TLR9 刺激により発現上昇した APOBEC3A は HPV-DNA の hypermutation を引き起こすことが示唆された。

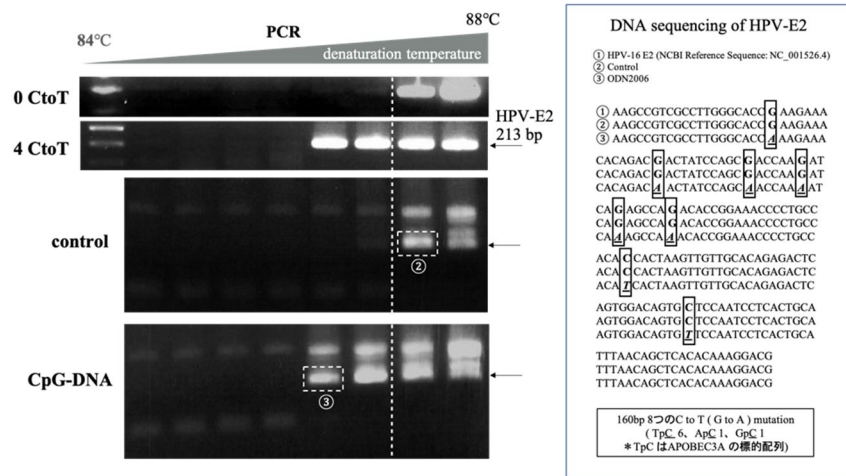


図 3. 3D-PCR による HPV-E2 の C-to-T mutation の解析

(4) 子宮頸部異形成と TLR9 発現との関連

子宮頸部異形成と TLR9 の発現との関連性を臨床検体で検討した。子宮頸部異形成の進行に伴い TLR9 の発現が免疫組織学的に上昇し、そのリガンドである CPG-DNA などのウイルス・細菌由来の DNA が子宮頸部異形成の進行と関連していることが示唆された。

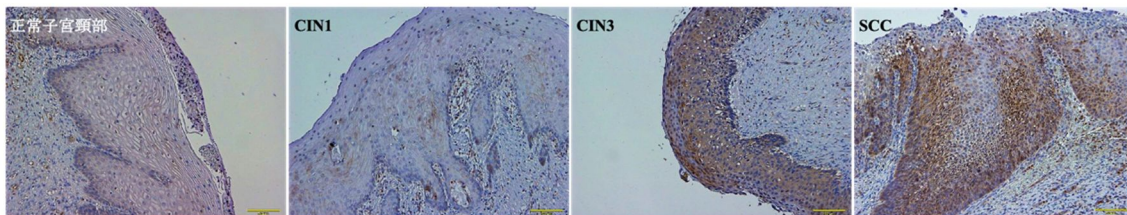


図 4. 子宮頸部上皮における TLR9 の発現

APOBEC3A の免疫染色による検討も実施したが、正常の子宮頸部上皮において APOBEC3A は核に高発現していたことから異形成や癌による差を免疫染色により評価することはできなかった。

子宮頸部上皮における感染・炎症において APOBEC3A という抗ウイルス作用を示す自然免疫機構の酵素が関係していることが示唆された。APOBEC3A は子宮頸部異形成細胞において HPV ウィルスゲノムの突然変異および宿主 DNA への組み込みに関与している可能性があり、この酵素の有無が子宮頸部異形成の進行にどのような影響を与えるのかを今後検討する必要がある。

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 Kousho Wakae, Tomoaki Nishiyama, Satoru Kondo, Takashi Izuka, Lusheng Que, Cong Chen, Kina Kase, Kouichi Kitamura, Md Mohiuddin, Zhe Wang, Md Monjurul Ahasan, Mitsuhiro Nakamura, Hiroshi Fujiwara, Tomokazu Yoshizaki, Kazuyoshi Hosomochi, Atsushi Tajima, Tomomi Nakahara, Tohru Kiyono & Masamichi Muramatsu	4. 巻 8
2. 論文標題 Keratinocyte Differentiation Induces APOBEC3A, 3B, and Mitochondrial DNA Hypermutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 9745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27930-z	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯塚崇、若江亨祥、中村充宏、小野政徳、村松正道、藤原浩
2. 発表標題 子宮頸部の炎症は APOBEC3の発現を誘導しCINの進行に影響しうる
3. 学会等名 日本性感染症学会 第31回学術大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----