

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15379

研究課題名(和文)子宮頸がんハイリスク群に対する分子標的予防法の開発

研究課題名(英文)Molecular-targeting prevention against human papilloma virus-positive cervical cancer

研究代表者

酒井 敏行 (Sakai, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20186993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がん発症の分子機構は、human papilloma virus (HPV)の感染により、HPV由来のE7が、がん抑制分子RBを不活性化させることで、細胞を癌化させる。そこで、E7発現を抑制することでRBを再活性化することが出来れば、HPV陽性でも子宮頸がんの発症が抑制されることが考えられる。HPV陽性子宮頸がん細胞にsiRNA法でE7発現を抑制したところ、RBの脱リン酸化による再活性化が認められた。しかしながら、E6抑制だけでは、RB再活性化は生じるものの、細胞増殖には影響しなかった。細胞増殖にはE7以外の分子の寄与が考えられ、その分子も標的とした分子標的予防法が必要であろう。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of the onset of cervical cancer is that E7 molecule derived from human papilloma virus (HPV) inactivates tumor-suppressor molecule RB. Therefore, if RB can be reactivated by the suppression of the expression of E7, cervical cancer may be prevented even with HPV-positive.

In HPV-positive cervical cancer cells, the suppression of E7 expression by siRNA showed the reactivation of RB by dephosphorylation. However, by E7 suppression alone, RB reactivation occurred but cell proliferation was not inhibited. Contribution of molecules other than E7 is considered for cell proliferation in HPV-positive cervical cancer cells, and it may be necessary to target multiple-molecules to prevent HPV-positive cervical cancer.

研究分野：分子標的癌予防医学

キーワード：HPV RB E7

1. 研究開始当初の背景

世界規模で調査された臨床疫学データにおいて、子宮頸がん患者の93%のがん組織から human papilloma virus (HPV) が検出されていることから、子宮頸がんの発症は HPV の感染が原因であるとされている (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses, Vol. 64, International Agency for Research on Cancer, 1995)。

そこで、近年、HPV に対するワクチンが開発され、2014年に世界各国で認可された。しかしながら、ワクチン接種による副作用の問題もあり、日本では普及していないのが現状である。また、ワクチン接種はあくまで HPV 感染に対する予防法であり、HPV に感染している子宮頸がんハイリスク群に対する適切な予防法は存在しない。

興味深いことに、子宮頸がんを発症していない健康人でも HPV 感染は認められることが、疫学的に報告されている (J Pathol. 1999 189:12-9)。HPV による発がん機構は、HPV がコードする E7 タンパク質が、代表的ながん抑制遺伝子である RB タンパク質の働きを阻害することであり、発がんに至るには、十分量の E7 タンパク質が必要であることが知られている。すなわち、HPV 感染による子宮頸がんの発症には、HPV 感染に加えて、感染後に E7 発現が RB タンパク質を不活性化かさせることが重要であると考えられている。

2. 研究の目的

従来、申請者らは標的分子の発現制御を戦略とした新規がん予防法として「分子標的予防法」を提唱し、食品成分や医薬品によるがん抑制遺伝子の発現誘導による成果を数多く報告してきた。本研究課題では、それらの成果やノウハウを活かして、発がんウイルス HPV の E7 発現を抑制する食品成分や既存の医薬品を見出し、子宮頸がんハイリスク群である HPV 感染者に対する適切な予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

HPV の E7 タンパク質は、RB タンパク質に結合し、その不活性化を起こすことで細胞のがん化を引き起こす。RB タンパク質の働きは細胞増殖の抑制であり、その働きが阻害されると、細胞の無秩序な増殖が生じる。そこで、本研究計画では、HPV 陽性ヒト子宮頸がん細胞において、食品成分や医薬品を含むライブラリーから、E7 の発現を抑制する化合物を cell-based スクリーニングにより探索し、得られたヒット化合物に対しては、E7 タンパク質の発現抑制を確認し、さらに RB タンパク質の再活性化を確認する。発がん性を有する HPV

としては HPV16 が代表的であり、HPV16 陽性の子宮頸がん細胞で、化合物の作用を評価する。

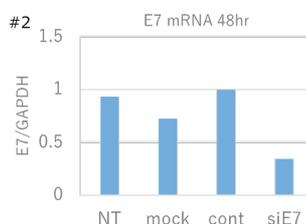
4. 研究成果

HPV 由来の E7 発現を抑制することで、RB が再活性化し、HPV 陽性の子宮頸がん細胞の増殖が抑制されるとの研究仮説を検証するために、まず、HPV16 陽性の子宮頸がん細胞 SiHa 細胞および CaSki 細胞において、siRNA 法で E7 発現抑制を試みた。

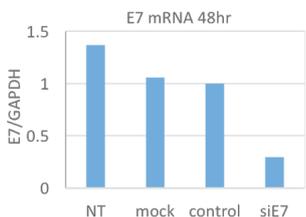
その結果、SiHa 細胞および CaSki 細胞とも、E7 mRNA の発現抑制が real time RT-PCR 法により確認された (図 1)。

図 1 : HPV16 陽性の子宮頸がん細胞 SiHa 細胞および CaSki 細胞における siRNA 法による E7 発現抑制

【SiHa 細胞】



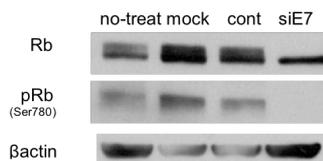
【CaSki 細胞】



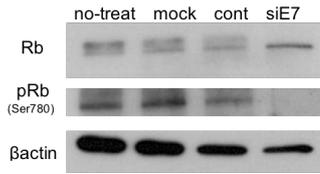
次に、siRNA による E7 発現抑制による RB への影響をウェスタンブロット法にて確認したところ、不活性化型であるリン酸化型 RB タンパク質が著しく減少し、RB の脱リン酸化による再活性化が認められた (図 2)。

図 2 : HPV16 陽性の子宮頸がん細胞 SiHa 細胞および CaSki 細胞において E7 発現抑制による RB タンパク質への影響

【SiHa 細胞】



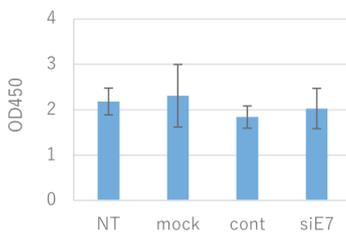
【CaSki 細胞】



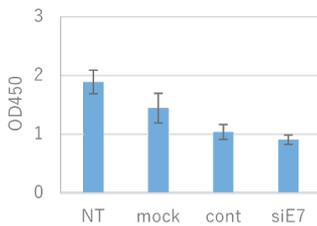
そこで、次に、siRNAによるE7発現抑制によるRB再活性化時における、細胞増殖への影響をWST-8法にて確認したところ、予想外に細胞増殖は抑制されなかった(図3)。

図3: HPV16陽性の子宮頸がん細胞SiHa細胞およびCaSki細胞においてE7発現抑制による細胞増殖への影響

【SiHa 細胞】



【CaSki 細胞】



これらの結果から、HPV16陽性子宮頸がん細胞SiHa細胞およびCaSki細胞において、siRNA法によりE7 mRNAの発現抑制が可能であることが明らかとなり、実際、E7を発現抑制したところ、不活性化型であるリン酸化RBが著しく減弱し、活性化型である脱リン酸化RBのみになることが分かった。このことは、E7発現抑制によりRBの脱リン酸化による再活性化が認められたと解釈された。

活性化型である脱リン酸化RBは、細胞周期のG1/S期進行に寄与する遺伝子群(例: thymidylate synthase、dihydrofolate reductase、cyclin E等)の発現を正に制御する転写因子E2Fを補足することで、それらの遺伝子発現を阻害し、その結果、細胞周期をG1期で停止させ、細胞増殖を阻害することが知られている。

そこで、E7の発現抑制によりRBの再活性化が生じたことから、その結果、細胞増殖を阻害と細胞周期をG1期で停止が生じると予

測していた。

しかしながら、E7発現抑制によりRB再活性化は生じるものの、用いた子宮頸がん細胞の細胞増殖は抑制されないという事実は、HPV由来の子宮頸がん細胞の増殖には、HPV由来のE7によるRB不活性化以外にも更なる分子機構が寄与していることを示している。すなわち、HPV陽性の子宮頸がんの分子標的予防法の開発には、E7によるRB不活性化による発がんに至る細胞増殖だけでなく、E7以外のHPV由来分子とそれによる細胞増殖の分子機構を明らかにする必要がある。そして、そのさらなる分子機構を踏まえた上で、E7だけでなく、それら複数の分子を標的分子として考慮した戦略が、HPV陽性の子宮頸がんの分子標的予防法の開発には必要であろうことを示唆している。

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)

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 敏行 (SAKAI TOSHIYUKI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：20186993

(2)研究分担者

曾和 義広 (SOWA YOSHIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70315935