

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16869

研究課題名(和文) HPV維持複製における初期遺伝子群の発現解析：新規抗ウイルス薬への応用

研究課題名(英文) Analysis of Early Genes in HPV maintenance replication: The Application to new anti-HPV drugs

研究代表者

村上 功 (MURAKAMI, Isao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70445237

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)：episomal HPVが恒常的に発現しているNIKS細胞の作成に世界で初めて成功した。これらNIKSを用い、HPV初期遺伝子と複製の関連を検討するため7days assayを行った。HPV11とHPV16共にNIKSがconfluenceに達するまでゲノムコピー数は維持された。confluence後ではHPV16のゲノムコピー数は上昇したのに対し、HPV11は低下した。またE1を欠損させたHPV11とHPV16をNIKSに遺伝子導入し、7-days assayを行ったところHPV11、HPV16ともに宿主細胞の密度依存性にE1依存性の複製からE1非依存性の複製へ移行していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果よりHPVは、宿主細胞の分化に伴いE1非依存性の複製からE1依存性の複製に移行していると考えられた。今までの研究によりHPVはE1依存性に維持複製されていると考えられていたが、今回の結果より基底細胞内での維持にはE1が不要であることが示唆された。

これらの結果はHPVにおける今までの概念を覆す結果と言える。今回確立した細胞株と実験手法を用いた初期遺伝子群の発現解析は、HPVのlife cycleの包括的な理解、さらにはHPV感染とそれに続いて起こるウイルス遺伝子発現の制御につながるものが期待される。この実験系を用いてさらなる研究が可能であり、新たな知見が発見されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Wild-type and mutated HPV11/16 genomes were maintained in NIKS using a modified growth protocol that allows genome maintenance and first commitment to differentiation to be studied.

Both wild-type HPV11/16 genomes were maintained during cell division, despite different growth rates and patterns of transcription. However, HPV16 genome levels rose post-confluence, while HPV11 genome copy number declined. Both HPV11/16 E1-deficient genomes were maintained pre-confluence, reinforcing the emerging view that maintenance-replication is E1-independent. Loss of functional E1 prevented HPV16 confluence-dependent genome amplification, indicative of a confluence-mediated switch in replication mode.

研究分野：ヒトパピローマウイルス(HPV)の生活環と発癌

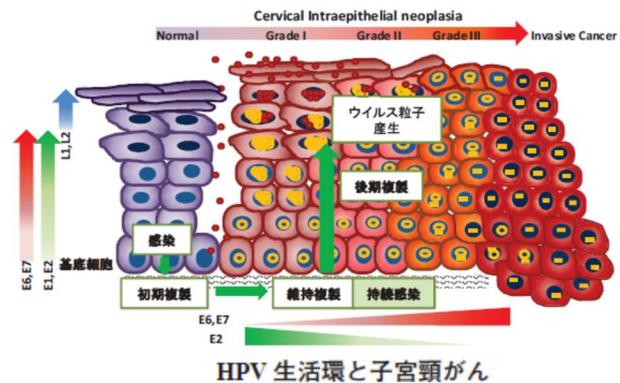
キーワード：低リスク型ヒトパピローマウイルス 高リスク型ヒトパピローマウイルス E1遺伝子 生活環

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、進行がん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 HPV (ヒトパピローマウイルス) 感染が重要な役割を担っている。

HPV が感染する基底細胞では、ウイルスゲノムは細胞の分裂時に倍加して娘細胞に分配されることにより、一定のコピー数に維持され (維持複製)、ウイルス増殖を伴わない潜伏持続感染状態となる。感染細胞が分化を始めると、ウイルスタンパク質の発現上昇、ゲノムの大幅な増殖 (後期複製)、ウイルスクャプシドの発現が順次おこり、最終分化した角化細胞においてウイルス粒子が産生される。

HPV の非構造タンパク質をコードする初期遺伝子群 (E1, E2, E4, E5, E6, E7) の内、E1 と E2 は HPV ゲノム複製に必須である。また、高リスク型 HPV (HPV16、HPV18) の E6 と E7 は p53、Rb 癌抑制遺伝子産物の分解を促進し、ウイルスゲノムの増殖に適した細胞環境をもたらすと考えられている。しかしながら、基底細胞への感染から初



期複製、維持複製におけるこれら遺伝子発現パターンはいまだ不明である。また、低リスク型 HPV (HPV11) の E6、E7 は p53、Rb 癌抑制遺伝子産物の分解を促進しないとされているが、いまだ証明されていない。また、最近 ATM や ATR を中心とする DNA 損傷修復系の活性が HPV ゲノム複製の制御に密接に関わる事が分かってきた。しかし、DNA 損傷修復系の角化細胞に対する作用機序や、HPV 生活環のどの段階に関与しているかは不明である。いずれにせよ、HPV の生活環は未解明な部分が多いが、初期遺伝子群の発現パターンと宿主細胞の DNA 損傷修復が、HPV の基底細胞での持続感染とその後の発癌メカニズムにおいて重要な鍵をにぎっていると考えられる。

HPV 持続感染の分子機構を明らかにすることは、HPV 持続感染へ介入し、感染組織からのウイルス排除を可能にする抗ウイルス薬開発の基盤を得る上で重要である。しかし、HPV は角化細胞の分化に依存して増殖することから、培養細胞から感染性ウイルス粒子を得ることが困難であり、実験室下でウイルス増殖サイクルを再現できない。また、感染性ウイルス粒子を容易に得られないことから、HPV 感染直後の初期課程についてはほとんど明らかになっていない。そのため、episomal で安定的に HPV が維持された角化細胞の樹立とそれらを用いた実験系の確立が必須となる。

今回検討する培養細胞、臨床検体における HPV 遺伝子発現と細胞環境に関し、低リスク型 HPV と高リスク型 HPV で差異が見出されれば、将来「高リスク型 HPV による癌化の抑制を可能にする抗ウイルス薬開発」への応用が期待される。

2. 研究の目的

HPV を導入した角化細胞および HPV の感染した臨床検体を用いて HPV の遺伝子発現・タンパク質発現パターンを中心に解析し、子宮頸部発癌機構の解明を目的とした。具体的な実験方法は、低リスク型 HPV と高リスク型 HPV を導入した角化細胞および臨床検体における HPV ゲノム量の変化、HPV 初期遺伝子の発現パターンと分化、p53 発現や DNA 損傷修復系などの

宿主細胞環境の関連を解析する。

3. 研究の方法

本研究では、角化細胞の中で最も生体内での生活環を模倣している normal immortal keratinocytes (NIKS)に野生型、もしくは変異型 HPV11（低リスク型 HPV）と HPV16（高リスク型 HPV）を遺伝子導入し実験に用いた。NIKS は細胞密度が高くなるに伴い分化が誘導されることが知られている。そのため HPV を導入した NIKS を day1 から day7（confluence）まで培養し細胞を回収、AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit(Qiagen)を用いて DNA、RNA、タンパク質を抽出した。抽出した DNA、RNA を用いて genome 数、各初期遺伝子の mRNA の変化を定量 PCR にて測定を行った。また細胞密度により、宿主細胞環境（早期分化マーカーである K10、G1 期と S 期で陽性となる細胞増殖マーカーである MCM の発現）に変化が生じるか検討を行った。

4. 研究成果

NIKS に HPV11 と HPV16 を遺伝子導入し、growth assay を行った(図 1)。HPV11 は HPV が導入されていない NIKS と同様な細胞増殖を示したのに対し、HPV16 では 5 日目以降 (confluence) の細胞分裂が活性化された。次に細胞分化マーカーである K10 と、細胞増殖マーカーである MCM7 を用いて免疫染色を行い、宿主細胞環境の検討を行った(図 2)。3 日目では全ての細胞株で K10 は陰性、MCM7 は陽性であった。7 日目では NIKS・HPV11 を導入した NIKS では K10 陽性・MCM7 陰性であったのに対し、HPV16 を導入した NIKS では K10 陰性・MCM7 陽性であった。これらの結果より HPV11 とは異なり、HPV16 では正常な contact inhibition を阻害し細胞分裂をさらに活性化、それに伴い HPV16 の genome 数を上昇させることができることが示唆された。次に HPV11 と HPV16 の genome 数の変化を 7-days assay を用いて検討した(図 3)。HPV11 と HPV16 共に NIKS が confluence に達するまでゲノムコピー数は維持された。しかし confluence 後では HPV16 のゲノムコピー数は上昇したのに対し、HPV11 は低下した。これらの結果から、HPV11 は宿主細胞が分化するまで HPV16 と同様な維持複製が行われているのに対し、宿主細胞が分化すると複製が抑制されていることが明らかになった。HPV18 においても HPV16 と同様な結果となった。

次に初期遺伝子と HPV の維持複製の検討を行った。E1/E2/E6/E7 を欠損させた HPV11 と HPV16 を NIKS に遺伝子導入し、7-days assay を用いて検討した。これら初期遺伝子の中で野生型と相違を認めた遺伝子は E1 であった(図 4)。E1 遺伝子欠損 HPV11 と HPV16 は 4 日

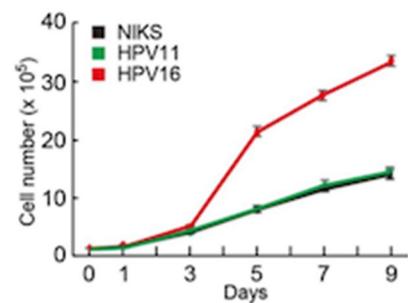


図 1

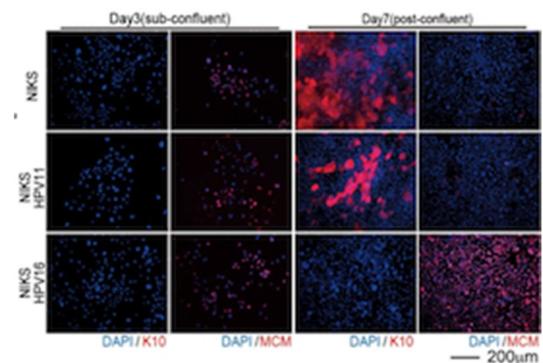


図 2

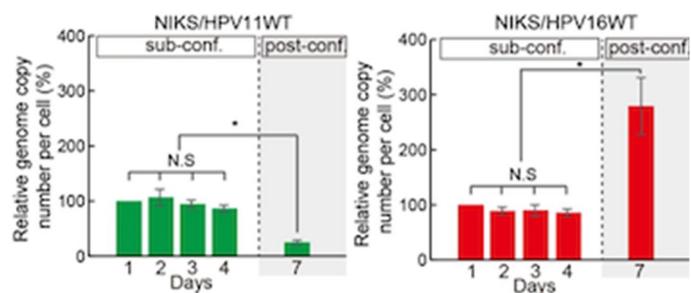


図 3

目 (sub-confluence) まで genome 数は維持されたのに対して、7日目 (post-confluence) では低下した。これらの結果より HPV は E1 非依存性の複製が行われていることが示唆された。宿主細胞の分化に伴い E1 非依存性の複製から E1 依存性の複製に移行していると考えられる。今までの HPV 研究により HPV は E1 依存性に維持複製されていると考えられていたが、今回の結果より基底細胞内での維持には E1 が不要であることが示唆された。

これらの結果は HPV における今までの概念を覆す結果と言える。今回確立した細胞株と実験手法を用いた初期遺伝子群の発現解析は、HPV の life cycle の包括的な理解、さらには HPV 感染とそれに続いて起こるウイルス遺伝子発現の制御につながることを期待される。この実験系を用いてさらなる研究が可能であり、新たな知見が発見されることが期待される。

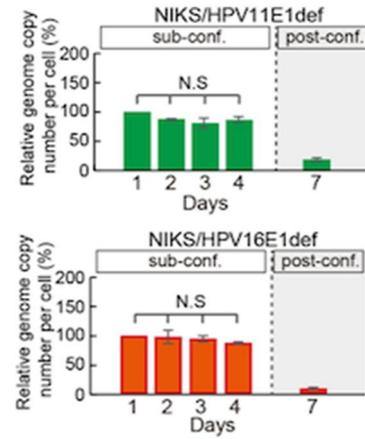


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 村上功、岩田卓、森定徹、青木大輔	4. 巻 72
2. 論文標題 HPV検査の活用法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 150-157
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 無
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 -

1. 著者名 Isao Murakami, Nagayasu Egawa, Heather Griffin, Wen Yin, Christian Kranjec, Tomomi Nakahara, Tohru Kiyono, John Doorbar	4. 巻 May 13;15(5)
2. 論文標題 Roles for E1-independent replication and E6-mediated p53 degradation during low-risk and high-risk human papillomavirus genome maintenance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	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） 10.1371/journal.ppat.1007755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Murakami I, Iwata T, Nakamura M, Morisada T, Tanaka K, Tanaka M, Aoki D
2. 発表標題 HPV E1 is dispensable for low and high-risk HPV maintenance and latent replication in keratinocytes but is necessary for genome amplification.
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakami I, Iwata T, Egawa N, Nakamura M, Morisada T, Tanaka K, Doorbar J, Aoki D
2. 発表標題 Nucleosome positioning on episomal human papillomavirus DNA in cultured cells.
3. 学会等名 The 32nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Egawa N, Murakami I, Griffin H, Doorbar J
2. 発表標題 E1 is dispensable for maintenance replication in keratinocytes, but necessary for sustenance of viral genome in confluent keratinocytes mediated by p53 degradation by E6.
3. 学会等名 the 32nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakami I, Nakamura M, Morisada T, Iwata T, Tanaka K, Tanaka M, Aoki D
2. 発表標題 HPV11 (low-risk) E6 directs p53 degradation in confluent keratinocytes and acts to sustain episomal copy number
3. 学会等名 The 69th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murakami I, Egawa N, Griffin H, Doorbar J
2. 発表標題 HPV11 (Low-risk) E6 directs p53 degradation in confluent keratinocytes, and like HPV16 (high-risk) E6, acts to sustain episomal copy number
3. 学会等名 2017 DNA Tumor Virus Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murakami I, Egawa N, Griffin H, Doorbar J
2. 発表標題 E1 is dispensable for low-risk and high-risk maintenance and latent replication in keratinocytes but is necessary for viral genome amplification
3. 学会等名 2017 DNA Tumor Virus Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka K, Murakami I, Iwata T, Aoki D, Iwamori M
2. 発表標題 Expression of difucosylated H-antigen in human uterine cervical carcinoma tissues detected by monoclonal antibody HMMC-1
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----