

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16849

研究課題名（和文）頭頸部領域のヒト乳頭腫ウイルス受容体の解析

研究課題名（英文）Analysis of human papillomavirus receptors in the head and neck region

研究代表者

金城 秀俊（Kinjo, Hidetoshi）

琉球大学・病院・助教

研究者番号：00636417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はヒト乳頭腫ウイルス（HPV）の受容体を同定することにより、HPVの組織特異的な感染メカニズムを解明することであった。頭頸部領域で感染の多いハイリスク型HPV（HPV16型）とローリスク型HPV（HPV6型、HPV11型）のウイルス様粒子（VLP）を作製することはできた。同VLPを用いてvirus over-ray protein binding assay（VOPBA）や免疫沈降法を用いて受容体の同定を試みたが、残念ながら同定することはできず、今後の課題を残した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではHPVのVLP（ハイリスク型：HPV16型、ローリスク型：HPV6型、HPV11型）を作製することができた。しかし、残念ながらHPV（16型、6型、11型）の受容体を同定し、組織特異的な感染メカニズムを解明することはできなかった。HPVの組織特異的な感染メカニズムは免疫学的な監視からの逃避機構に関与している可能性もあると思われたため、今後の実験の課題をみつけることができた。

研究成果の概要（英文）：This study was to elucidate the tissue-specific mechanism of human papillomavirus (HPV) by identifying the receptors. It was possible to produce high-risk HPV (HPV16 type) and low-risk HPV (HPV6 type, HPV11 type) virus like particle (VLP), which are frequently infected in the head and neck region. We tried to identify the receptor using virus over-ray protein binding assay (VOPBA) and immunoprecipitation method using the same VLP, but unfortunately we could not identify it, leaving a future task.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ヒト乳頭腫ウイルス 組織特異的な感染メカニズム 中咽頭癌 喉頭乳頭腫

## 1. 研究開始当初の背景

中咽頭癌では約 50%でヒト乳頭腫ウイルス (以下: HPV)が検出され、HPV 感染が発癌に関わっていることが明らかになってきた。当科では 2007 年から現在まで頭頸部腫瘍における組織部位別の HPV 感染率について PCR 法および in situ hybridization 法により調べてきた (Deng et al., Head & Neck, 2013; 渡嘉敷ら, 喉頭, 2012; 喜友名ら, 喉頭, 2016)。その過程で中咽頭癌に感染している HPV 型は約 9 割が HPV16 型であった (HPV6/11 型は中咽頭組織では検出されなかった)。一方、喉頭では喉頭乳頭腫に感染している HPV 型は 6 型と 11 型のみであった。HPV は現在 200 種類以上が同定されているが、上記の様に型ごとに感染しやすい組織が異なり、このウイルスによる組織特異的感染メカニズムはよくわかっていない。

細胞株を用いた先行研究では HPV 受容体として膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンや 6 インテグリンが報告されている。しかし、膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンや 6 インテグリンは扁平上皮細胞に普遍的に発現しているタンパクであるため、HPV の組織特異的な感染には寄与していない (Raff et al., Journal of Virology, 2013; Sgaramella et al., British Journal of Cancer, 2015)。先行研究では扁平上皮癌細胞株や表皮角化細胞株を用いて HPV 受容体探索が行われてきた。細胞株は再現実験がやりやすいという利点があるが、実際の中咽頭や喉頭組織の環境を再現していないという問題点があり、組織特異的感染の鍵となる HPV 受容体が同定できなかった可能性がある。

そこで、本研究では実際の中咽頭や喉頭組織を用いて HPV16 型および HPV6/HPV11 型の感染の鍵となっている HPV 受容体を同定し、HPV の組織特異的な感染メカニズムの解明をめざした。

## 2. 研究の目的

本研究で組織特異的メカニズムに関わる HPV 受容体を見つけることにより、頭頸部領域の HPV 感染防御、喉頭乳頭腫切除後の再発防止に関する戦略を立てることを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の目的のために、3 つの研究を計画した。

### 研究 1: ハイリスク型 HPV (HPV16 型)、ローリスク型 HPV (HPV6/11 型) のウイルス様粒子 (Virus like Particle、以下 VLP) の作製

頭頸部領域ではハイリスク型 HPV では HPV16 型が、ローリスク型 HPV では HPV6 型、HPV11 型の感染が見られる。そのため、研究 1 では HPV16 型、HPV6 型、HPV11 型の VLP を作製した。

### 研究 2: 手術で採取した中咽頭組織と喉頭組織から膜タンパク質を抽出し、VLP を用いて Virus over-ray protein binding assay (VOPBA) を行う。VLP が結合するタンパク質を切り出し、LC-MS/MS 解析を実施し、HPV 受容体候補タンパクの同定を行う。

臨床観察から中咽頭は HPV16 型に、喉頭は HPV6 型および 11 型に特異的に結合する受容体が発現していると予想された。そのため手術で抽出した正常な中咽頭組織 (扁桃組織) と喉頭組織の検体の一部を使い、研究 1 で作製した VLP を用い VOPBA を行い、HPV 受容体の同定を試みた。

### 研究 3: ヒト培養細胞 (HEK293T 細胞) に HPV 受容体候補タンパク質を強制発現させ、VLP との結合能を明らかにし、HPV 受容体を同定する。

研究 2 により得られた HPV 受容体候補タンパクが感染に重要な働きをしているのかどうか細胞実験で確認する予定とした。手法は HPV 受容体候補タンパクのプラスミドを作製し、HEK293T 細胞にトランスフェクションする。次に VLP に GFP 発現プラスミド (GFP: 緑色蛍光タンパク質) を結合させ、HPV 受容体候補タンパクが発現する HEK293T 細胞に添加する。緑色に光る細胞数を数えることで、HPV 受容体候補タンパクの感染能力を数値化する。

## 4. 研究成果

ハイリスク型 HPV (HPV16 型)、ローリスク型 HPV (HPV6/11 型) の VLP は作製できた。作製した VLP と手術検体 (扁桃組織) から抽出したタンパクを用いて VOPBA を施行した。しかし SDS-PAGE のゲル上のバンド数が多く、切り出して質量分析に出すことは困難であった。それを解決するために免疫沈降法を用いることとした。細胞実験で免疫沈降後に SDS-PAGE 電気泳動を行い、ゲル上のバンドの切りだしができることを確認し、実際の扁桃組織を用いた。扁桃組織を用いて確認できたバンドを切り出し LC-MS/MS 解析をしたところ、結果は アクチンであった。本実験の目的は HPV の受容体を同定し、組織特異性のメカニズムを解明することが目的であったため今回の結果はそれにそぐわないと思われた。実験 2 の結果で HPV 受容体候補タンパクの同定ができなかったために、実験 3 を行うことはできなかった。

以上をまとめると今回の実験では HPV の VLP を作製することはできたが、VOPBA や免疫沈降法では HPV の受容体候補タンパクを見つけることはできなかった。その理由として HPV が細胞内に侵入するメカニズムについては諸説あるが、HPV と受容体は1対1の関係ではなく、複雑な反応を起こしている可能性がある。また、SDS-PAGE の際にタンパクの立体構造が壊れることによる影響や組織から膜タンパクを回収する方法についても検討が必要かもしれない。

そのため、視点を変えて HPV の組織特異性のメカニズムは HPV の免疫学的監視からの逃避機構が重要ではないかと考え、toll like receptor (以下 TLR) の発現を喉頭乳頭腫で検索してみた。結果、TLR の発現と HPV ウイルス遺伝子の発現に有意な負の相関をみつけた。今後は HPV と TLR の関わりについて精査を進めていき、HPV の組織特異的なメカニズムを検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------