

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791167

研究課題名（和文）子宮頸部腺癌に対する抗腫瘍ペプチドの開発

研究課題名（英文）Generating Synthetic Anti-HPV18 E7 Peptide

研究代表者

大野 暁子 (ONO AKIKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：70383883

研究成果の概要（和文）：E7 の部分ペプチドの各種発現ベクターを作成し HPV-E7 と pRb のタンパク・タンパク間の相互作用を定量的に測定できる mammalian two hybrid アッセイ系を用いて、結合阻害活性を指標としてペプチドの性能を評価した。より強い結合力が期待できる自己五量体化ペプチドにおいて、阻害活性の向上が認められた。HeLa 細胞に上記候補ペプチド発現ベクターを遺伝子導入したが、細胞増殖能の有意な低下は認められず、導入効率を改善するため、ペプチドを発現する組換えアデノウイルスベクターを作製した。

研究成果の概要（英文）：Quantitative binding assay system to investigate the interaction between HPV18 E7 and RB was constructed as expression plasmids. Peptide construct including LxCxE motif showed a certain but labile amount of inhibitory effect. Adjustment of the peptide by adding a pentamerization domain showed stronger inhibitory effect. Cell viability assay did not show significant difference due to poor plasmid transfection efficiency. Adenovirus vectors expressing the pentamerized peptides were constructed for improvement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：癌、ウイルス、タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

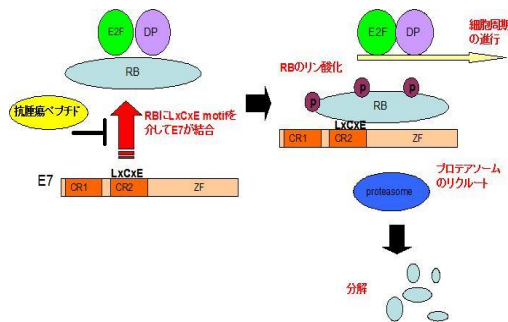
子宮頸癌は細胞診による検査法の普及により先進国ではその発生頻度は減少傾向にあるといわれているものの、世界全体として

みると女性が罹患する癌の中では2番目に多いといわれている。従来に比べて早期発見される症例が増加したことで治癒が可能な症例も同時に増加したものの、依然死亡に至る

症例も多い。また既存の治療法では骨盤リンパ節郭清を含めた根治術、および放射線療法・化学療法追加により下肢の重症リンパ浮腫や瘻孔形成など患者のQOLを著しく低下させる後遺症が高頻度で発生する。既存の治療法では進行癌での妊孕性温存も極めて困難であり、近年患者の晩婚化・若年化に伴い、新しい治療の選択肢の開発が期待されている。

子宮頸癌の発症のほとんどにヒトパピローマウイルス (HPV) の関与が認められており、その90%以上からはハイリスク型 HPV (16,18,31,33,45,51,52,58 等) の DNA が検出されている。なかでも HPV 18 型は腺癌との関連が強いといわれているが、その予後は扁平上皮癌に比べ悪い。細胞診が必ずしも有効でないことやコルポスコピー検査においても特徴的な異常を示さないことも多く、扁平上皮癌のように早期病変の検出ができないことが理由にあげられている。扁平上皮癌と比べ放射線や抗癌剤への感受性が低いことなどから腺癌に対する別の機序による治療法が望まれている。

癌細胞中ではウイルス由来の E6 タンパクと E7 タンパクが発現しており、これらが癌化および癌形質の維持に寄与している。具体的には、細胞周期の調節やアポトーシスに干渉して形質転換を起こしている。E7 タンパクは、癌抑制遺伝子産物の Rb タンパクを始め、プロテアソームや各種転写因子などに結合することで癌細胞の代謝に関与している (図 1)。



【図 1】

HPV18 の E7 タンパクは CR2 ドメインの LxCxE motif を介して癌抑制遺伝子タンパクの pRb と結合し、転写因子の E2F が活性化し、G1 期から S 期へのエンタリーを誘導するといわれている。また C 末領域も pRb と弱く結合し (Patrick DR et al. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem* 269, 1994)、CR1 ドメインは pRb と結合しないものの、E2F との結合部位へのアクセスを妨げるのではないかとされている (Helt AM et al. Destabilization of the

retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol* 75, 2001)。更には細胞内に E7 タンパクが存在するだけで、pRb 量が低下するとも言われており、このタンパクの不安定化にも CR1 domain が関与しているという (Berezutskaya E et al. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 8, 1997)。

このように絞り込まれている E7 タンパクと標的タンパクの相互作用に必要な領域を利用し、相互作用を阻害する E7 タンパク由来の改変ペプチドの開発を試みた。

## 2. 研究の目的

癌細胞中ではウイルス由来の E6 タンパクと E7 タンパクが発現しており、これらが癌化および癌形質の維持に寄与している。E7 タンパクは、癌抑制遺伝子産物の Rb タンパクを始め、プロテアソームや各種転写因子などに結合することで癌細胞の代謝に関与している。E7 タンパクと標的タンパクの相互作用に必要な領域は絞り込まれており、本研究は、子宮頸癌原因ウイルスの機能を阻害するペプチドを開発し、癌細胞の代謝への影響を詳細に検討することでより効果の高い治療用ペプチドを利用した治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

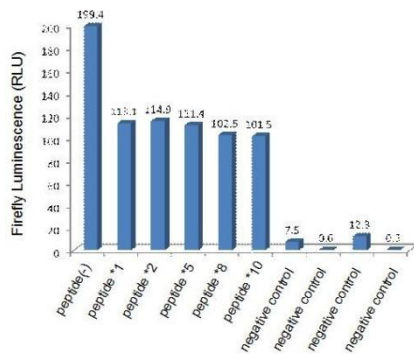
pHPV-18 E7 および pRb cDNA を組み込んだ mammalian two hybrid アッセイ系を作製し HPV-E7 と pRb のタンパク・タンパク間の相互作用を定量的に測定した。E7 部分ペプチド発現ベクター、次いで合成ペプチドを用いて、結合阻害活性を指標により小分子量で細胞膜透過性ペプチドを融合した抗腫瘍ペプチドを開発することを目指した。

このため、各種ペプチド発現ベクターを作製し、two hybrid アッセイベクターと細胞に一過性に共導入し、HPV-E7・pRb のタンパク・タンパク間の相互作用阻害活性を評価した。良い成績が得られたペプチド発現ベクターを癌細胞に導入し、表現系を解析した。具体的には、HPV18 陽性細胞株である HeLa 細胞、C4-I 細胞、また申請者が所属する研究室で樹立されたオリジナルの SKG-I 細胞や SKG-II 細胞などを用いてペプチド導入時の細胞増殖抑制効果を解析した。さらに遺伝子導入効率の向上を目指し、組換えアデノウイルスベクターを作製した。現在その評価中である。また、他の標的分子を探すため、microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) 法を用いて子宮頸癌検

体の遺伝子変化の解析を行った。

#### 4. 研究成果

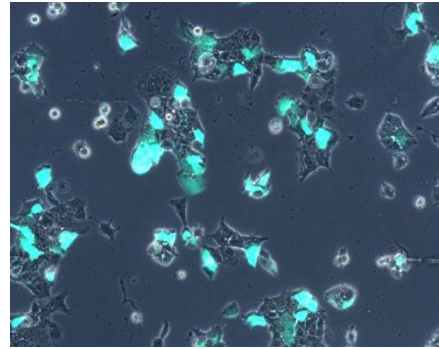
(1) HPV-E7 と pRb のタンパク・タンパク間の相互作用を定量的に測定できる pHPV18-E7 および pRb cDNA を組み込んだ mammalian two hybrid アッセイ系を作製した。結合阻害活性を指標とし、E7 の一部を含めた各種阻害ペプチド発現ベクターを作成し、その評価を行った。ベクターにはホタルルシフェラーゼ遺伝子 minimal TATA box 上流に GAL4 結合サイトの 5 回繰り返し配列が配置されており、RB および各種 partial E7 の遺伝子をクローニングしたコンストラクトから発現した融合タンパク質が相互作用すると、ネガティブコントロールに比べてルシフェラーゼの活性が飛躍的に増加する。まずは阻害ペプチドを含めずに予備試験を行い、作成したベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションすることでルシフェラーゼ活性に差を認めることを確認した。阻害ペプチドに関しては、ペプチドは小分子であるため、能動輸送でも細胞内に容易に取り込まれると考えられるが、細胞内への導入を高めるために、ポリリジンやポリアルギニンを配列に付加した。E7 は RB 以外にも、c-myc にも作用するとの報告があったため、ペプチドに多価性を持たせるために E7 の部分配列にリンカーを挟み、c-myc の部分配列も挿入した。このペプチド発現ベクターも含めて assay を繰り返したところ、ある一定のペプチド導入による dose dependent inhibition が認められた。しかし、ペプチドを導入することで逆に luciferase 活性が増加する場合もあり、不安定な結果で改良が必要であった。



(2) transfection に用いるベクターの骨格部分には pTriEx を用いていたが、CMV エンハンサー領域が系に影響を及ぼしている可能性があったため、ベクターの骨格部分を pORF に交換し、同様に assay を行った。

ついで阻害ペプチドの細胞内分布を検討するために、GFP タンパクを組み込み、蛍光顕微鏡下で局在を検討した。E7 タンパクは最も核内で作用を及ぼしていると考えられるため、核移行シグナルを含むオリジン配列やオリゴアルギニンを配列に付加する工夫

を加えたものは核内への局在は良好であった。



(3) 抗体としての力価を高めるのを目的としてペプチドの配列に工夫を加えることにした。より強い結合力が期待できる cartilage oligomeric matrix protein (COMP) assembly domain を融合させた自己五量体化ペプチドにおいて、阻害活性の向上が認められた。しかし HPV-E7 を発現する HeLa 細胞に上記候補ペプチド発現ベクターを遺伝子導入したが、細胞増殖能の有意な低下は認められなかった。そこで GFP タンパクとの融合遺伝子を作製し遺伝子導入したが全細胞で蛍光は観察されなかった。このことからペプチド非導入細胞が多いため、細胞障害性が観察されないと推測された。遺伝子導入効率を向上させる目的で非増殖性アデノウイルスを併用したが、十分な導入効率は得られなかった。これを克服するためペプチドを発現する組換えアデノウイルスベクターを作製し、現在評価中である。

(4) c-myc に対する阻害効果は系の構築および評価が困難であったため、他の標的分子を探すため、microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) 法を用いて子宮頸癌検体の遺伝子変化の解析を始めた。当分子生物学教室が作成した BAC microarray (GSPArray7700™) を用いて 30 検体の子宮頸癌サンプルを解析した。各患者の癌組織 (test) および末梢血白血球 (reference) からそれぞれ DNA を抽出し、蛍光標識後に 7718 個の BAC clone から成る microarray に hybridize させ、48 時間から 72 時間後に洗浄し、蛍光強度を測定した。測定したデータより Cy3/Cy5 の蛍光強度比を算出した。3 回ずつ検出されている平均値を用い、その値が 1.25 以上の場合を増幅あり、また 0.75 以下の場合を loss と定義し、解析を進めた。

具体的な変化としては、1q、3q、5p および 20p の増幅、そして 11q および 6p の欠失が認められた。6p には新規候補領域の関与が示唆された。変動を認めた BAC clone 領域に存在する遺伝子で、癌の発生・進展に関連が深いと考えられる分子を in silico で検索し、

標的分子を絞っている。さらにその分子について発現を mRNA レベルで検討するために realtime RT-PCR の準備を進めている。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 大野 暁子. Detections of Genomic Alterations in Uterine Cervical Cancer Using BAC Microarray. 第 67 回日本癌学会学術総会(2008/10/28) 名古屋国際会議場

② 大野暁子. BAC Microarray-CGH 法を用いた子宮頸癌のゲノム変化解析. 第 31 回日本分子生物学会年会(2008/12/11) 神戸ポートアイランド

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大野 暁子 (ONO AKIKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：70383883

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし