

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790517

研究課題名（和文）新しいヒトパピローマウイルス産生系を用いたウイルス増殖サイクルの解析

研究課題名（英文）Developing a new cell culture system for efficient production of infectious HPV virions to study molecular mechanisms of HPV infection cycles.

研究代表者

中原 知美 (NAKAHARA TOMOMI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：60601177

研究成果の概要（和文）：子宮頸がんの原因ウイルスであるヒトパピローマウイルス(HPV)は、その増殖が宿主細胞の分化に依存するため、実験室下で感染性ウイルス粒子を得ることが困難である。本研究は、効率よく HPV 粒子を産生する方法を開発し、HPV 感染のメカニズムを解明することを目的とした。人為的な操作により、HPV ゲノムの大規模複製を誘導できる細胞の作製に成功した。また、細胞因子である ATM や NF- κ B の活性化は、HPV 複製を抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：The life cycle of human papillomavirus (HPV), an etiological agent of cervical cancer, relied upon host cell differentiation, hindering production of infectious HPV virions in a laboratory. The aims of this research are to develop a new cell culture system for efficient production of infectious HPV virions and to study molecular mechanisms of HPV replication cycles. We were able to manipulate cells to induce HPV genome amplification and found that activation of cellular DNA damage response including ATM and NF- κ B can suppress HPV genome replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：パピローマウイルス、複製、ATM、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

高リスク群ヒトパピローマウイルス(HPV)は子宮頸がんの原因ウイルスであり、陰茎がん等の他の生殖器がんや、頭頸部がんとの因果関係も疑われている。HPV は約 8,000 塩基対の環状二本鎖 DNA をゲノムとする小型のウイルスで、その生活環は表皮・粘膜の形成と密接に関わっている。小さな傷などを通して粘膜等の重層扁平上皮組織に侵入し、基底細胞に感染すると、HPV ゲノムは、感染直後の一過的な複製（初期複製）を経て、50-200 コピー程度の核内エピソームとなると考えられている。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、ゲノムの大幅な増幅（後期複製）、ウイルスキ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 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。

2. 研究の目的

(1) HPV 感染宿主である角化細胞を用いて、実験室下で効率よくかつ大量に感染性 HPV ウイルス粒子を産生できる培養系の作製および評価

(2) ウイルスゲノム複製に関わる宿主因子の同定と解析

3. 研究の方法

(1) 感染性 HPV 粒子の大量産生を目的とし、角化細胞の分化に依存せず、ウイルスゲノムの増幅を人為的に誘導できる角化細胞を樹立する。まず Cre-loxP 組み換え反応を利用して、HPV ゲノムを一定のコピー数で維持複製する角化細胞を樹立した (Fig.1)。その細胞に、ウイルスゲノム複製に必須のウイルスタンパク質である E1 および E2 をテトラサイクリン応答性プロモーター下より発現させ、ゲノム増幅について調べた。角化細胞は、トランスフェクション法による遺伝子導入の効率が低い細胞である。そこで、レトロウイルスを用いた遺伝子導入法を用いた。高発現を得るため、E1 はコドン最適化して用いた。ゲノムコピー数は、定量 PCR 法により測定した。

(2) E1・E2 依存的ゲノム複製に対して負に働く宿主因子の同定を行った。候補因子の shRNA を用いたノックダウンや、阻害薬処理により E1・E2 依存的ゲノム複製に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1)① HPV16 を維持複製する角化細胞の樹立。loxP 配列を両端に付加した全長 HPV16 ゲノムを、CMV プロモーターとピューロマイシン薬剤耐性遺伝子の間に挿入したプラスミドを作製し、Cre 酵素発現プラスミドと共に、不死化したヒト子宮頸部 (Human Cervical Keratinocytes:HCKs) および皮膚由来角化細胞 (Human Dermal Keratinocytes:HDKs) に導入した。角化細胞内において、Cre 組み換え酵素の発現により loxP 配列同士で組み換えが起こり、環状の全長 HPV16 ゲノムと、ピューロマイシン薬剤耐性遺伝子発現ベクターにわかれる (Fig.1)。薬剤選択によ

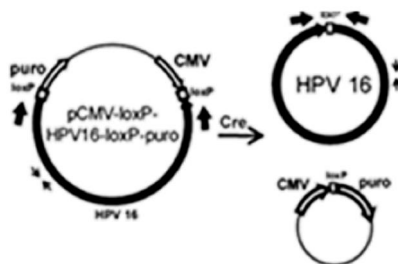


Figure. 1

り、ピューロマイシン耐性の角化細胞を培養し、total genomic DNA を回収して細胞内における HPV16 ゲノムについてサザンブロット法により調べた。これらの細胞 (HCK1T/HPV16) では、HPV16 ゲノムが数十コピーの核内エピソームとして安定に維持された。

②テトラサイクリン応答性プロモーターを用いた E1・E2 発現の誘導による人為的なゲノム複製の誘導

テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 rtTA の発現カセットを有するレンチウイルスベクターと、テトラサイクリン応答性プロモーターから E1 もしくは E2 を発現するレンチウイルスベクターを、HCK1T/HPV16 に同時に感染することにより、テトラサイクリンにより E1・E2 発現を誘導できる細胞集団を作製した。培養液にドキシサイクリン (DOX) を添加 24 時間後に細胞を回収し、ゲノム DNA を抽出して HPV16 ゲノムの状態やコピー数について調べた。結果、野生型 E1 および E2 を導入した細胞では、DOX 依存的にゲノムコピー数が 100 倍程度増加したが、ゲノムコピー数は 24 時間でプラトーに達し、それ以上増加しなかった (Fig.2)。

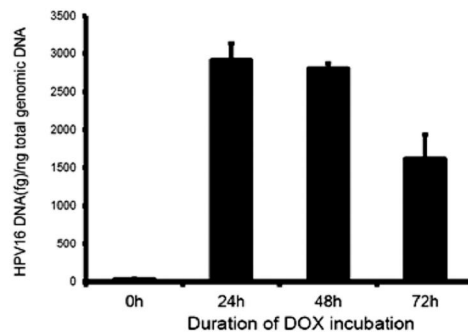


Figure. 2

③E1・E2 発現によるゲノム増幅を利用したウイルス粒子産生系の樹立

②で樹立した細胞集団から、限界希釈法によるクローニングにより、ゲノム増幅が大きい細胞を (1000 倍以上に増幅) 数クローン選択し、プロデューサー細胞とした (Fig.3)。レトロウイルスを用いた遺伝子導入により、外来性プロモーターからのキャプシドタンパク質 L1・L2 発現を試みたが、十分な発現量を得ることができなかった。そこで、高濃度のカルシウムを含む培養液中で細胞分化を促し、HPV 上にコードされているプロモーター由来の L1・L2 発現を誘導した。結果、細胞の分化依存的な L1・L2 発現を検出できた。密度勾配超遠心により、ウイルス粒子を回収できたが、感染性については確認できなかった。

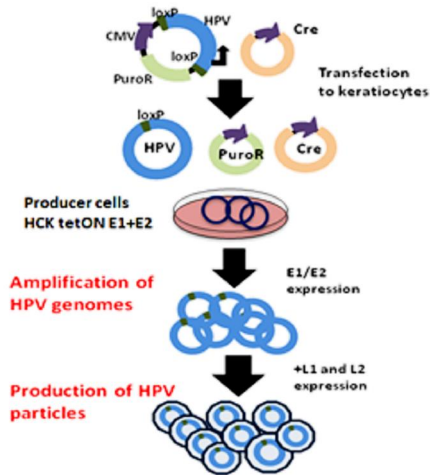


Figure.3

②の結果から、E1・E2 発現に対する何らかの細胞応答により、ウイルスゲノム複製が抑制される可能性を推測し、その機構について検討した。細胞因子によるウイルスゲノム複製の抑制機構を解明することにより、抑制を解除し、より大量のウイルス粒子産生が可能な培養系の樹立を目指す。

(2)① E1 および E2 発現細胞における DNA damage response の活性化

近年、様々なウイルスのゲノム複製時に、宿主細胞の DNA 損傷修復系が活性化されることが報告されている。そこで、E1・E2 発現によって誘導される HPV16 ゲノム複製に対する細胞応答について、細胞の DNA 損傷修復系に着目して解析した。野生型 E1 や、E1 のヘリカーゼ活性欠失変異体であり、ゲノム複製をサポートできない E1K483A を E2 と共に発現誘導し、DOX 添加 24 時間後に細胞を回収した。これらの細胞において、DNA 損傷認識に中心的な役割を果たす ATM やその下流因子である NBS のリン酸化、および ATR によってリン酸化される Chk1 について調べた。結果、E1 の発現を誘導した細胞では、ATM、NBS、Chk1 のリン酸化が増加してい

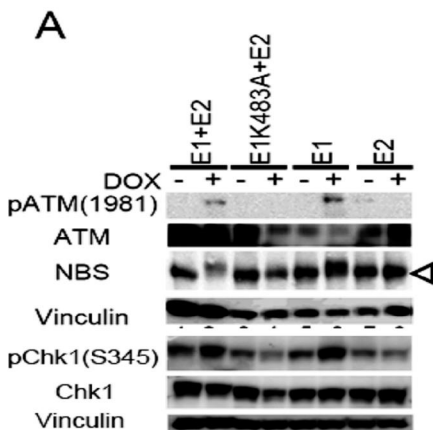


Figure.4

た。E1 発現細胞では、DNA 損傷修復系である ATM および ATR が活性化すること、これらの活性化には E1 のヘリカーゼ活性が関わることが示唆された(Fig.4)。

② ATM ノックダウンのゲノム複製に対する影響

DNA 損傷修復系 ATM の活性化が、E1・E2 依存的なゲノム複製に与える影響を調べた。ATMshRNA を導入し、E1・E2 依存的なゲノム複製について、ルシフェラーゼ shRNA を導入したコントロール細胞と比較したところ、ATM ノックダウン細胞では、E1・E2 依存的なゲノム複製がより増強した(Fig.5)。

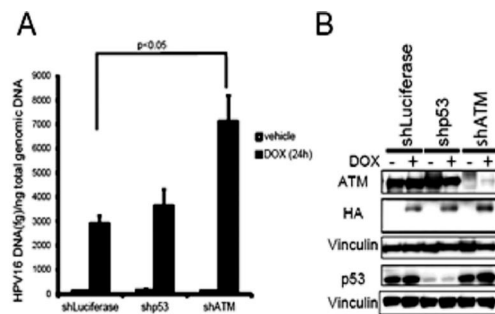


Figure.5

③E1 発現による NF- B の活性化

ATM シグナルの下流で、ウイルスゲノム複製を抑制する因子について検討した。DNA 損傷時の ATM 活性化は、時に、I B の分解を介した canonical pathway により、NF- B 活性化を引き起こすことが知られている。そこで E1 発現細胞において NF- B の活性化について検討した。結果、E1 の発現を誘導した細胞では、NF- B を負に制御する I B レベルの低下が観察され、I B レベルの低下は、E2 や E1K483A の発現を誘導しても観察されなかった。また、E1・E2 を発現誘導すると、NF- B の応答因子である TNF、IL-6 や IL-8 の転写活性化が観察された(Fig.6)。

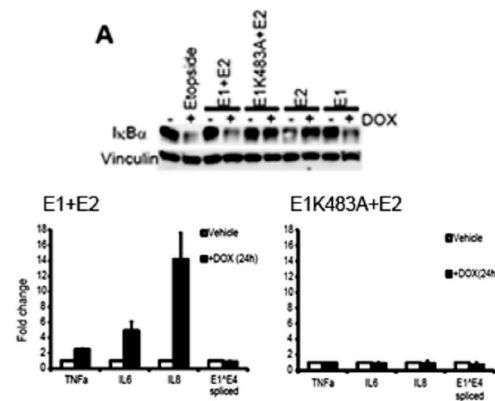


Figure.6

④ NF- B 抑制のゲノム複製に対する効果

NF- B の活性化を抑制すると、E1・E2 依存的ゲノム複製にどのように影響するか検討した。I B の野生型(IkBaWT)およびプロテオソーム分解抵抗性変異体(IkBaMT)を、レトロウイルスを用いて遺伝子導入し、恒常的に高発現させた。これらの細胞と、コントロールとして空ベクター(MCS)を導入した細胞において、E1・E2 発現時のゲノム複製について検討したところ、I B を発現する細胞では、E1・E2 依存的なゲノム複製が増強した(Fig.7)。すなわち、NF- B 活性化は、ゲノム複製を抑制することが示唆された。

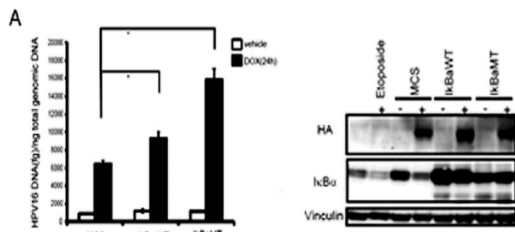


Figure.7

⑤ ATM 阻害薬 KU55933 の NFkB 活性化に対する影響

I B の分解が、実際に ATM 活性化に依存的であるかどうかについて検討した。ATM のキナーゼ活性を阻害する KU55933 存在下で、E1 および E2 発現誘導後の I B レベルの経時的な変化を調べた。結果、KU55933 存在下では、I B 分解が遅れることがわかった。つまり、I B は ATM シグナル活性化の結果分解されることが示唆された(Fig.8)。

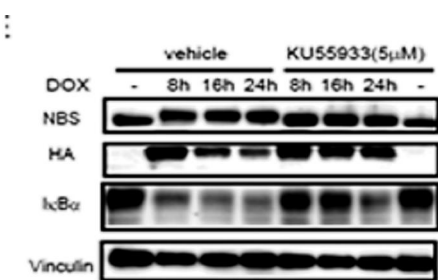


Figure.8

(3) 考察

(1) 角化細胞を用いた E1・E2 発現による人為的な HPV ゲノムの大規模複製の誘導と、ウイルス粒子産生系への応用について

・Cre-loxP 組み換え反応を利用して、環状 HPV ゲノムをエピソームとして維持する角化細胞を効率よく樹立できた。

・テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、培養角化細胞において人為的に HPV ゲノムの増幅ができた。

・外来性プロモーターから、L1 および L2 の発現量が十分に得られなかった。L1・L2 の mRNA は、未分化な角化細胞では不安定化されることが報告されている。本研究では、発現量を高くするため、コドン最適化した L1・L2 を用いており、そのような DNA 配列は失っているはずである。未だ同定されていない mRNA 不安定化に関わる DNA 配列が保存されている可能性が考えられた。

・三次元培養法などの煩雑な操作を行わずに、効率よく角化細胞を分化させることができ、内在性プロモーター由来の分化依存的な L1・L2 の発現を誘導できた。

今後は L1・L2 発現に関わる DNA 配列の探索および同定を行い、単層培養における分化誘導法を組み合わせることで、大量ウイルス粒子産生系の樹立を目指したい。

(2) E1・E2 依存的なウイルスゲノム複製に関わる宿主因子の探索について

・E1 による DNA 損傷修復系および NF- B の活性化を見出した。この活性化は E1 のヘリカーゼ活性に依存していた。

・ATM の shRNA によるノックダウンおよび分解抵抗性 I B 変異体の発現は、E1・E2 依存的なゲノム複製を増強したことから、ATM および NF- B は E1・E2 ゲノム複製を抑制する可能性が示唆された。

・E1 を発現しない HPV16 変異体ゲノムの解析から、HPV は初期複製および後期複製を E1 に依存する一方で、維持複製は E1 に依存しないことが分かった。

NF- B による HPV ゲノム複製の抑制は未だ報告のない新規の発見である。HPV16 の初期プロモーターへの結合を介して、NF- B が転写を抑制することが報告されている。本研究から、E1 発現による ATM/ NF- B 活性化は、ゲノム複製を抑制することが示唆された。NF- B の活性化は、複製抑制や転写制御を介して、感染直後の E1 依存的な初期複製が非依存的な維持複製に切り替わる機構に関わっているかもしれない。

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 1 件)

① Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Saito-Narisawa M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T.

The E1 protein of human papillomavirus type 16

is dispensable for maintenance replication of the viral genome.

J.Virology 2012 vol.86(6):p3276-83, 査読有,
DOI:10.1128/JVI.06450-11

〔学会発表〕(計 5 件)

① Nakahara T, Tanaka K, Ohno S, Egawa N,
Yugawa T, Kiyono T

A cellular factor involved in suppression of E1-dependent replication of Human papillomavirus type 16 (HPV16) in proliferating keratinocytes. 28th International papillomavirus conference. Nov. 30-Dec. 6, 2012, San Juan, Puerto Rico.

② 中原 知美、田中 克幸、大野 真一、
江川 長靖、温川 恭至、清野 透
ヒトパピローマウイルス 16 型(HPV16)の E1
ヘリカーゼ依存的ゲノム複製に対する細胞
応答。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。
2012 年 11 月 13-15 日。グランキューブ大阪。
大阪市。

③ Nakahara, T

The E1 protein of Human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. 遺伝病制御研究所研究集会(招待) 2012 年 6 月 18-19 日。北海道大学医学部 フラテ会館。札幌市。

④ N Egawa, T Nakahara, S Ohno, T Yugawa,
M Saito-Narisawa, T Kiyono.

HPV16 E1 is not required for the viral genome maintenance. 27th International Papillomavirus Conference Sep.17-22, 2011, Berlin, Germany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 知美 (NAKAHARA TOMOMI)
独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・研究員
研究者番号 : 60601177

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :