

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 10 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：23791303

研究課題名（和文） ヒト乳頭腫ウイルス型特異的細胞変性効果に関する分子病理学的研究

研究課題名（英文） A study for the molecular mechanisms of HPV-type specific cytopathogenic effect.

研究代表者

江川 長靖 (EGAWA NAGAYASU)

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：90533399

研究成果の概要（和文）：16 型ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）を用いて、E1 ウイルス蛋白質が初期複製・後期複製に必須であるが維持複製には必須でないことを示した。抗ウイルス薬として E1 阻害剤の開発が試みられているが、E1 阻害剤の効果は限定的である可能性がある。この過程で開発した実験系を用いて、HPV の任意の蛋白質の機能を生活環の中で検討することが可能となった。

組織学的に細胞内封入体をもつ、特異な「型特異的細胞変性効果」を示す扁平疣贅より新型 HPV126 を発見しゲノム全長をクローニングし報告した。

研究成果の概要（英文）：We have established an experimental system which can evaluate the requirement of any viral gene of interest in the viral life cycle by supplying and deleting exogenous expression of the gene and demonstrated that E1 is entirely dispensable for maintenance replication of the HPV16 genome in human keratinocytes. Thus, inhibition of E1 may not be able to eliminate the viral genome from the basal cell layer. The rationale for development of E1 inhibitors as anti-HPV drugs may be more restricted than formerly envisaged.

HPV 126, isolated and characterized in the present study, is a novel type of genus gamma papillomavirus and associated with flat wart- or EV-related tinea versicolor-like clinical features: histological ICBs as with other genus gamma papillomaviruses; and immunohistochemical expression of Ki-67 and p53 in characteristic manner not typical for benign cutaneous warts.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ヒト乳頭腫ウイルス・HPV・子宮頸がん・ウイルス生活環・ウイルス複製・型特異的細胞編成効果

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス（HPV）はヒトにおける乳頭腫の原因ウイルスであり、現在 100 型以上が報告されている。被感染細胞に対する発癌能をはじめとした増殖・分化面での影響は HPV 型特異的であり、各被感染病巣

の肉眼的、病理学的所見には「HPV 型特異的細胞変性効果」が観察される。その背景となる HPV と宿主細胞との相互作用の分子機構解明は HPV 感染症ならびにそこから発生する子宮頸がんなどの発症機構の理解を助ける重要な研究課題である。

HPV の生活環は、重層扁平上皮の分化に依存しており(図1)(J Clin Virol. 2005 Mar; 32: S7-15.)、単層培養系では生活環を再現できない。近年、ようやく3次元分化誘導培養法を用いて in vitro で生活環を再現することが可能となり、生活環を通した HPV 型特異的細胞変性効果の分子機構の研究が端緒についたところである。実際、感染からウイルス形成までの3つの異なる局面(感染成立、感染維持、子孫ウイルス産生)におけるウイルスゲノム複製機構(特にE1 ウイルスヘリケースの関与について)、高リスク粘膜型 E6 蛋白質のもつ PDZ ドメイン含有蛋白質分解能のウイルス生活環に与える影響や E1/E4 と感染性粒子形成との関連など解明すべき課題は多い。

これまで、子宮頸がんの原因ウイルス(高リスク粘膜型)に分類される一部の型(特に16、18、31型など)においては、E6 ウイルス蛋白質による p53 の分解、PDZ ドメイン含有蛋白質の分解、E7 ウイルス蛋白質による pRb の分解等、そのウイルス遺伝子の発がんに対する寄与に関して解明が進み一定の成果が上がっているが(Cancer Sci. 2007 Oct;98(10):1505-11.)、ウイルスの生活環における評価はほとんど行われていない。加えて、これまで研究が進行している一部の型を除いて、他の型、特に皮膚型において、分子生物学的研究は手をつけられていないのが現状である。

2. 研究の目的

・本研究では、in vitro においてヒトパピローマウイルス(HPV)の生活環-ウイルス感染から感染性ウイルス粒子形成までを再現し、「HPV 型特異的細胞変性効果」の分子機構を解明する糸口を提供することを目的とする。その結果を通して HPV 感染症(子宮頸部上皮内腫瘍(CIN 病変)や難治性疣贅等)の治療法の開発への研究基盤の確立を試みる。

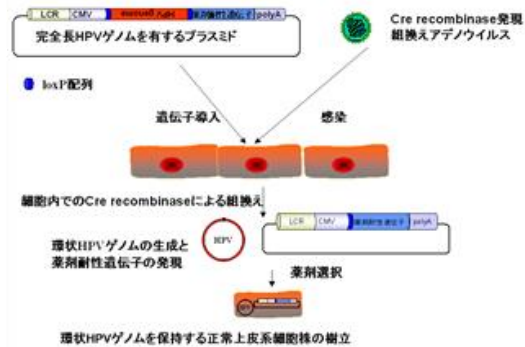
- (1) 正常上皮系細胞株を用いて野生型及び変異を持つ組換えヒトパピローマウイルス(HPV)ゲノムを保持する細胞の樹立。
- (2) 2次元培養、3次元分化誘導培養法を用いて in vitro で HPV 生活環の再現、及び変異 HPV ウイルスゲノムを用いての機能解析。特に E1 ウイルスヘリケース蛋白質に注目しての複製機構の解明を行う。

3. 研究の方法

- (1) 環状ヒトパピローマウイルスゲノムを保持する正常上皮系細胞株の樹立

①2つの loxP 配列に挟まれた野生型及び遺伝子に変異の入った全長 HPV ゲノムを持つプラスミドと Cre recombinase 発現プラスミド(Cre 発現アデノウイルスベクター)を用いて、子宮頸部や正常皮膚等由来

の不死化正常上皮系培養細胞に遺伝子導入する。細胞内で Cre-loxP 組換えが起こり、環状ヒ HPV ゲノムが切り出される。組換え依存的に発現する薬剤耐性遺伝子を用いて、環状 HPV ゲノムを保持する細胞を選択する。この方法は、主に現在用いられている環状 HPV ゲノムを細胞外で作製して遺伝子導入する方法より効率が良いと考えられる。



(2) E1 蛋白質の3つの異なる phase におけるウイルスゲノム複製機構の解明

①野生型および E1 欠損型 HPV ゲノムを保持する細胞株の樹立を試みる。予備実験によって E1 を欠損することによって細胞株の樹立が困難であることが示唆されており、初期複製に E1 遺伝子が必要である可能性を示唆している。そのため、あらかじめ FRT

(Flippase recognition target) 配列で挟んだ、E1 発現コンストラクトをレトロウイルスで導入した細胞を用いて樹立を行う。樹立後にアデノウイルスを用いて Flippase を発現させ、E1 遺伝子を除去、ウイルスゲノムの量的変化をサザンブロットングや定量的 real-time PCR 法を用いて行い、E1 遺伝子の維持複製時における機能を明らかにする。

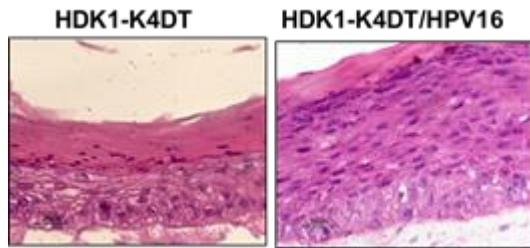
②カルシウム添加による2次元分化誘導、培養 3次元分化誘導培養法を用いて HPV 生活環の再現を試みる。野生型および E1 欠損型 HPV のウイルス生活環における機能評価(ウイルスゲノム増幅効率などを評価し、E1 遺伝子の後期複製時の機能を明らかにする)。

③ 加えて、HPV 初期遺伝子に対する siRNA を用いその影響を HPV ゲノム量の変化を追うことで、E1、E2 の抗 HPV 剤(複製阻害剤)の標的としての妥当性について評価する。

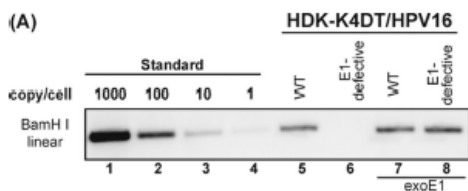
4. 研究成果

(1) ①正常皮膚不死化細胞株(HDK1K4DT)を用い野生型および変異型組換えヒトパピローマウイルス(HPV)ゲノムを保持する細胞の樹立に成功した。HDK1K4DT は、これまで用いてきた子宮頸部上皮不死化細胞株と比較して、分化誘導能をもち、3次元分化誘

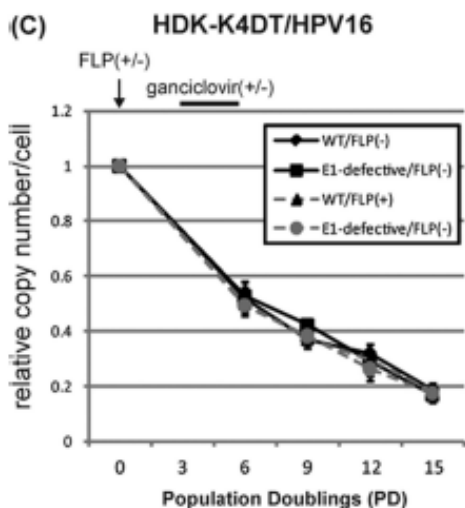
導培養で角層形成まで分化誘導が可能であった(写真左)。加えて、HPV16ゲノムを保持する HDK1K4DT 細胞では表皮肥厚や顆粒層の増化等の表現型が見られた(写真右)。



②E1 欠損型 HPV16 ゲノムでは、HPV 保持 HDK1K4DT 細胞の樹立はできず、外来性の E1 蛋白質発現下においてのみ樹立可能であった(サザンブロット:右より 1、3 レーン目比較)。初期複製(感染成立)時に E1 ウィルスヘリケース蛋白質が必須であることを示している。

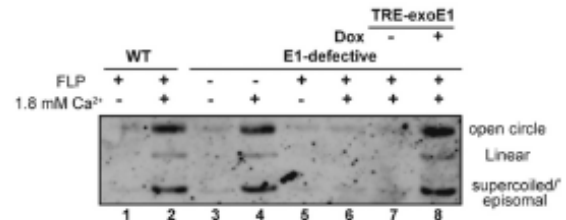


③野生型および E1 欠損型 HPV ゲノム保持細胞を E1 蛋白質存在下で樹立後、Flippase と薬剤選択を用いて外来性 E1 蛋白質の発現を停止させ、その後のそれぞれの HPV ゲノムの維持効率を比較したところ、野生型および E1 欠損型 HPV とともに同程度のゲノム維持効率であった(下グラフ)。このことは維持複製において E1 ウィルスヘリケースが必須でない可能性を示している。



④カルシウム添加による分化誘導培養を用いて、後期複製(子孫ウィルス産生)時の E1 蛋白質のウィルスゲノム複製に与える影響

を検討した。野生型の HPV ゲノムにおいては、分化誘導時ウィルスゲノムの増幅が観察された(サザンブロット:下左 2 レーン)。一方、E1 欠損型 HPV ゲノムにおいては、外来性の E1 蛋白質存在下においてのみ、分化誘導に伴うウィルスゲノムの増幅が見られた(同:下右 6 レーン)。このことは、後期複製時において E1 蛋白質が必須であることを示している。

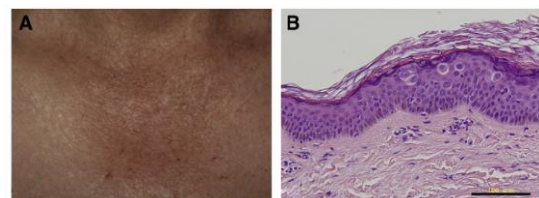


以上、E1 蛋白質の 3 つの異なる局面におけるウィルスゲノム複製機構の解明を行い、E1 蛋白質が初期複製・後期複製に必須であるが維持複製には必要ないことを示し発表した。ウィルス蛋白質を必要としない複製機構は宿主側の免疫機構刺激にくく、持続感染に有利に働いている可能性がある。また、E1 は抗ウィルス薬の標的として期待され E1 阻害剤の開発が試みられているが、E1 阻害剤は維持複製を阻害しない可能性が示され、E1 阻害剤の効果は限定的である可能性がある。

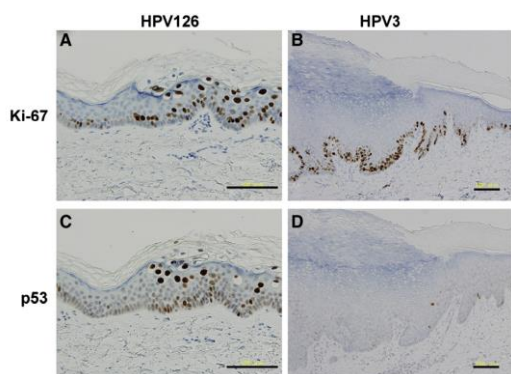
⑤この過程で開発した FLP-FRT 系を用いた外来遺伝子の発現制御系と変異型組換え HPV を用いることで、HPV の任意の蛋白質の機能を生活環の中で検討することが可能となった。

⑥L2 領域を薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子と置き換えたウィルスゲノムを作製し、ウィルス粒子の作製、感染実験・初期複製・維持複製のモニターや複製阻害剤のスクリーニングに応用を検討し予備実験を行った。

(2) 我々の発見した HPV126 型は扁平疣贅様臨床形態をもつが、病理組織学的には細胞内封入体をもち表皮肥厚は顕著ではない(下写真)。



一方で、Ki-67・P53 の免疫染色で角層直下まで陽性であるなど、特異な「HPV 型特異的細胞変性効果(CPE)」を示していた(下写真)。



この HPV126 ゲノム全長をクローニングし、HPV126 として、病理組織学的特徴と共に発表した。HPV126 は他の細胞内封入体を持つ疣贅と同様にガンマ属に属していた。近年新型 HPV の報告の多くは DNA 配列のみで、臨床像などの CPE の記載がなく、シーケンスから臨床像、組織学的特徴まで記載された HPV126 の報告は意義深いと考える。

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 7 件)

(1) Nagayasu Egawa, Tomomi Nakahara, Shin-ichi Ohno, Mako Narisawa-Saito, Takashi Yugawa, Masatoshi Fujita, Kenji Yamato, Yukikazu Natori, and Tohru Kiyono, The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome, Journal of Virology, 査読あり、86(6)、2012 年、3276-3283、DOI:10.1128/JVI.06450-11.

(2) Nagayasu Egawa, Kazuhiro Kawai, Kiyofumi Egawa, Yumi Honda, Takuro Kanekura, Tohru Kiyono, Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53, Virology, 査読あり、422、2012 年、99-104、DOI: 10.1016/j.virol.2011.10.011

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nagayasu Egawa、HPV16 E1 IS NOT REQUIRED FOR THE VIRAL GENOME MAINTENANCE、第 27 回国際パピローマウイルス会議、2011 年 9 月 19 日、ドイツ・ベルリン
- ② Nagayasu Egawa、HPV16 E1 IS NOT REQUIRED FOR THE VIRAL GENOME

MAINTENANCE、第 59 回日本ウイルス学会 (国際学会)、2011 年 9 月 15 日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江川 長靖 (EGAWA NAGAYASU)

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：90533399