

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860349

研究課題名(和文)パピローマウイルスの維持複製を抑制する宿主因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of the host factors involved in the genome replication of Human papillomaviruses associated with the viral persistence

研究代表者

中原 知美 (Nakahara, Tomomi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：60601177

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)：子宮頸がんの原因であるヒトパピローマウイルス(HPV)は、宿主である重層扁平上皮の細胞分化と連動して、ウイルスゲノム複製の様式を3段階に切り替える。本研究は、HPVゲノム複製に関する宿主因子を同定し、ゲノム複製の切り替えメカニズムを解明することを目的とした。ウイルスDNAヘリカーゼであるE1と、宿主の主要な転写因子であるNF- κ Bが負のフィードバックループを形成しており、このフィードバック機構は、HPVゲノム複製の切り替えに関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：High-risk Human papillomaviruses (HR-HPVs), an etiological agent of cervical cancer, undergo three phases of the viral genome replication in the viral life cycle which is tightly linked to the differentiation status of stratified squamous epithelium. The aim of this study was to elucidate molecular mechanisms for switching the viral replication in keratinocytes, host for persistent infection of HPVs. We found that E1, a viral DNA helicase, activates NF- κ B through ATR pathway and this activation of NF- κ B limits E1 dependent-viral replication. Thus, E1 and NF- κ B form a negative feedback loop which may function as a molecular switch for the viral genome replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パピローマウイルス 持続感染 ゲノム複製 DNA損傷修復系 NF κ B プロテオソーム

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(high risk human papillomavirus: HR-HPV)感染は、時に数十年持続することが知られており、この持続感染が子宮頸がん発症の背景となっている。HPV は約 8000 塩基対の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとするウイルスであり、その生活環は皮膚・粘膜における角化細胞の分化と密接に連動する。HPV ゲノムは、皮膚または粘膜の重層扁平上皮の基底細胞に侵入後、一過的な複製(初期複製)により 50-200 コピー程度の核内エピゾームとなる。基底細胞では細胞分裂時に HPV ゲノムも倍加して(維持複製)娘細胞に分配されることにより、一定コピー数を維持し、ウイルス増殖を伴わない潜伏感染状態となる。感染細胞の分化に伴って HPV 遺伝子発現様式が変化し、ゲノムの大量複製(後期複製)が起こり、ウイルス粒子が形成される。

HPV ゲノムの複製はウイルスがコードする DNA ヘリカーゼである E1 と E2 タンパク質に依存する。しかし、HPV ゲノム複製が初期、維持、後期複製の 3 段階に切り替わる分子機構の詳細は明らかになっていない。申請者の以前の研究から、E1 は、初期及び後期複製には必須であるが、維持複製には必要ないことが明らかになった。つまり HPV 持続感染線の要となる維持複製は、主に宿主因子により制御されている可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) HPV ゲノムの 3 段階複製に関する宿主因子の同定とその役割を明らかにする。主に維持複製に関わる因子の同定に焦点を当て、潜伏持続感染状態におけるウイルスゲノム複製を制御するウイルス-宿主間の相互作用の本態と分子機構を解明する。

(2) 抗 HPV 薬開発のプラットフォームとなるレポーター-HPV の作製と評価を行う。従来 HPV ゲノム維持複製の評価には、手間のかかる DNA 抽出と、定量 PCR 法やサザンブロット法が必要であった。本研究では、レポーター遺伝子の発現カセットを挿入した HPV ゲノムを作製し、レポーター遺伝子の発現により HPV ゲノム複製を評価できる”レポーター HPV ゲノム“を開発する。レポーター-HPV ゲノムを基盤としたスクリーニングにより、維持複製に影響する宿主因子や生理活性物質の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 申請者は以前に、HPV16 ゲノムを長期的に維持できる子宮頸部角化細胞を作製し、HPV 持続感染培養モデルの樹立に成功した。この細胞にテトラサイクリン発現誘導系を用いて E1 及び E2 発現を人為的に導入すると、活発な HPV ゲノム複製を誘導できた。E1 発現誘導時には、宿主の DNA 損傷修復系が活性化し、この活性化は E1 依存的複製を

抑制することが示唆された。本研究では、DNA 損傷修復系により活性化することが知られる因子の RNAi 干渉によるノックダウンや、特異的阻害剤などがゲノム複製に与える影響を検討した。その結果から、それぞれの宿主因子の HPV ゲノム複製における役割を調べた。

(2) HPV ゲノムの後期遺伝子コード領域の様々な部分を、分泌型ルシフェラーゼの発現カセットと交換した種々のレポーター HPV16 ゲノムを作製した。これらを培養角化細胞に導入し、培養上清中のルシフェラーゼの測定と、細胞から抽出したゲノム DNA における HPV ゲノムコピー数の qPCR 法による定量結果を比較することにより、コピー数とルシフェラーゼ値の相関性や、レポーターゲノムの維持効率について評価した。

4. 研究成果

(1) E1 発現による NF-κB の活性化

DNA 損傷修復系の活性化は、時に NFκB の活性化を誘導することが報告されている。NFκB は、自然免疫反応を司る主要な転写因子であることから、様々なウイルスタンパクが NFκB 活性化経路と相互作用することが報告されている。そこで、DNA 損傷修復系により活性化する因子の候補として、NFκB 経路の活性化について検討した(図 1)。

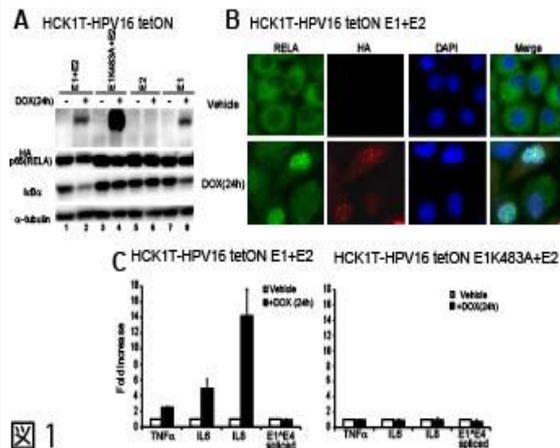


図 1

結果、E1 の発現を誘導した細胞では、NF-κB を負に制御する IκBα レベルの低下が観察された(図 1A)。さらに、E1・E2 を発現誘導すると、NF-κB の核移行が促進され(図 1B)。その転写標的因子である TNFα、IL-6 や IL-8 の転写活性化が観察された(図 1C)。このような IκBα レベルの低下や NF-κB 標的因子の転写活性化は、E2 や DNA 損傷修復系の活性化誘導しない E1 の変異体である E1K483A の発現を誘導しても観察されなかった。また、DNA 損傷修復系の主要なキナーゼである ATR の阻害薬 VE-822 存在下では、E1 による NF-κB の活性化が回避された(図 3A)。すなわち、E1 は DNA 損傷修復系の ATR 経路の活性化を介して NF-κB 経路を活性化することが明らかになった。

NF- κ B 活性化抑制の HPV ゲノム複製に対する効果

NF- κ B 活性化が、E1・E2 依存的ゲノム複製に与える影響を検討した。I κ B α の野生型 (I κ B α WT) およびプロテオソーム分解抵抗性変異体 (I κ B α MT) の高発現を導入し (図 2A)、これらの発現により NF- κ B の活性化を回避した場合とそうでない場合の、HPV ゲノム複製を比較した。結果、I κ B α 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 (図 2B)。すなわち、NF- κ B 活性化は、ゲノム複製を抑制することが示された。

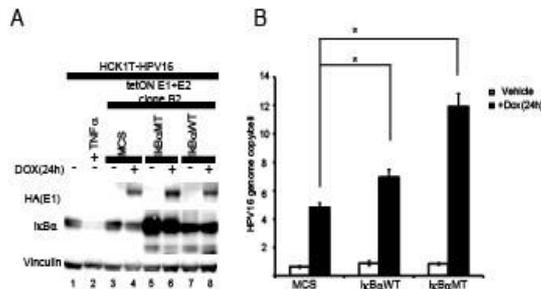


図 2

NF- κ B 活性化による E1 依存的ゲノム複製抑制の分子機構

I κ B α の分解抵抗性変異体発現や ATR の阻害薬 VE-822 添加により、E1 発現による NF- κ B 活性化が回避された条件下において、E1 発現量の経時的変化を検討した。結果、NF- κ B 活性化を回避していない条件下と比べ、E1 のタンパク質安定性が増加した (図 3A)。さらに、293T 細胞に E1 を一過的に発現させ、TNF α 処理により NF- κ B 活性化を増強すると、E1 のコピキチン化が増加した (図 3B)。これらの結果から、NF- κ B 活性化は E1 のプロテオソーム分解を促進することにより、E1 依存的ゲノム複製を抑制することが示された。つまり、E1 による NF- κ B 活性化は負のフィードバックとして機能し、HPV ゲノム複製の制御に関与することが示唆された。

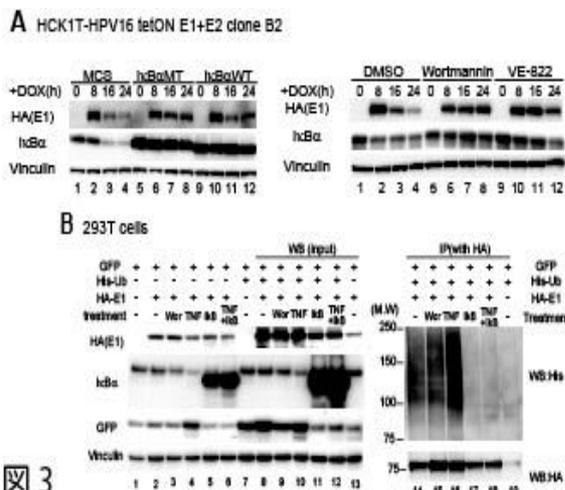


図 3

NF- κ B を介したフィードバック機構と HPV ゲノムの維持複製

患者由来の細胞株で HPV31 ゲノムをエピゾームとして維持する CIN612 細胞や、HPV16 ゲノムを維持する子宮頸部角化細胞では、親細胞に比べ、NF- κ B 活性の恒常的な増加が観察された (図 4A)。I κ B α の分解抵抗性変異体発現の導入や、TNF α 処理による NF- κ B 活性の抑制や亢進は、これらの細胞におけるゲノムコピー数を増加もしくは減少させた (図 4B)。このことから、E1-NF- κ B フィードバックは、HPV ゲノムの維持複製にも関与することが示唆された。

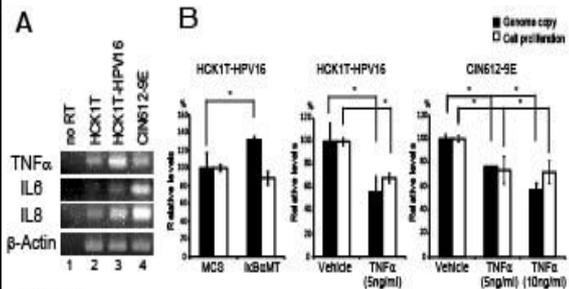


図 4

(2) レポーター-HPV16 ゲノム作製と評価

HPV 後期遺伝子コード領域の一部を分型ルシフェラーゼの発現カセットと交換した HPV ゲノムを 9 種類作製した (図 5)。これらを角化細胞に導入し、導入直後、2 週間後、1 ヶ月後に培養上清中のルシフェラーゼ活性および細胞内レポーターゲノムコピー数を評価した。

結果、9 種類全てが野生型と同程度の効率でゲノムコピー数を維持した。培養上清中のルシフェラーゼ活性には、レポーター間で差があったが、最も感度の高いレポーターで、細胞あたり 1 コピーのゲノムが 1000 細胞程度から検出可能であり、qPCR 法による DNA コピー数の定量と同程度の感度であった。

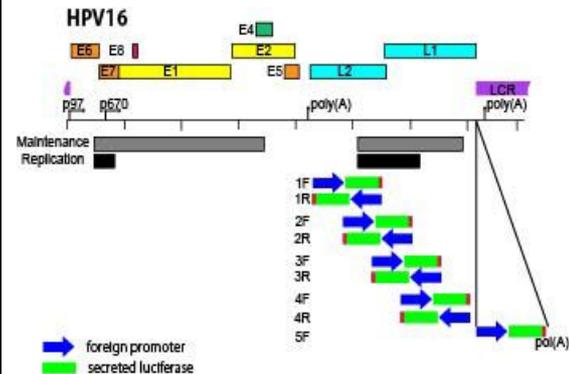


図 5

で感度が高かったレポーター-HPV16 ゲノムを子宮頸部角化細胞に導入して、長期的にレポーターゲノムを維持できる細胞株の樹立を試みた。結果、3 か月以上の長期にわたり、レポーターゲノムコピー数を維持する細胞株の樹立に成功した。しかし、培養が長

期になると、ゲノムコピー数は一定に維持されているにもかかわらず、徐々に培養上清中のレポーターの値が低下した。長期の培養中にレポーターの発現プロモーターがメチル化などによるサイレンシングを受けた結果であると考えられ、今後改善が必要であることが判った。

(3) 考察と本研究のインパクト

未分化な角化細胞にE1発現を導入すると、NF-κBの活性化が誘導され、この活性化はE1のタンパク分解を促進することによりE1依存性ゲノム複製を抑制することを、世界に先駆けて明らかにした。HPVゲノム複製は、未分化な角化細胞において、初期から維持複製へと切り替わる。以前の研究から、維持複製は必ずしもE1に依存しないことが明らかになったことから、本研究で見出したE1-NF-κB負のフィードバック機構(図6)は、初期から維持複製への切り替えに関与すると考察する。

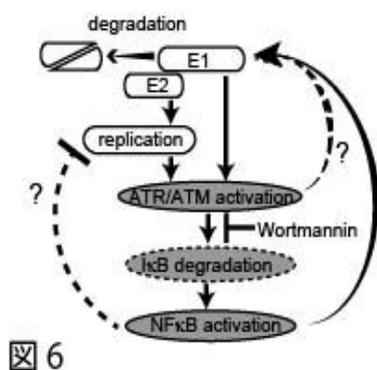


図6

さらに、HPVゲノムを維持複製している細胞におけるNF-κB活性の変化が、HPVゲノムコピー数に影響したことから、HPV維持複製は、E1-NF-κBフィードバック機構を介して、E1依存性および非依存性複製を流動的に切り替え可能であることが示唆された。他の研究室より以前に、HPVの維持複製には二つの複製モードがありうることが報告されており、本研究結果と一致している。NF-κBは、炎症や免疫反応によって活性化することから、HPVはそのような感染組織の環境変化に対応し、E1依存性、非依存性複製をすばやく切り替えることにより、長期的な持続感染を可能にしているのであろう。このような切り替えメカニズムに介入し、HPVゲノム複製をどちらかの複製モードに固定することができれば、ゲノム複製の特異的阻害薬の効果を最大化し、ウイルスゲノム排除を誘導できる可能性がある。

HPVゲノムのL1コード領域をレポーター遺伝子発現カセットに置き換えても、維持複製に影響しないことが明らかになった。レポーター-HPVゲノムは、薬剤やsiRNA等がウイルス複製に与える影響を比較的容易に評価することができることから、抗ウイルス薬開発に向けた大規模スクリーニング系開発

への足がかりをつかんだ。

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4件)

1. Tomomi Nakahara and Tohru Kiyono
Interplay between NF-κB/interferon signaling and the genome replication of HPV. *Future Virology* 2016 vol.11, No.2, p141-155 doi:10.2217/fvl.16.2 (査読あり)

2. Nakahara T., Tanaka K, Ohno S, Egawa N, Yugawa T, Kiyono T.
Activation of NF-κB by human papillomavirus 16 E1 limits E1-dependent viral replication through degradation of E1. *J Virol.* 2015 May;89(9):5040-59. doi: 10.1128/JVI.00389-15. (査読あり)

3. 中原知美、清野透

HPVゲノム複製の制御機構と発がんウイルス 第64巻第1号, pp.57-66, 2014, doi: 10.2222/jsv.64.57. (日本語総説・査読無し)

4. Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T., Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T.
Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Mol.Cell.Biol.* 2013 Nov;33(22):4434-47. doi: 10.1128/MCB.00577-13(査読あり).

[学会発表](計9件)

1. 中原知美、田中克征、温川恭至、清野透
HPV16の初期複製、維持複製、後期複製の切り替え機構。平成27年度北海道大学遺伝子病制御研究所共同研究集会。2015年12月18日、北海道大学、札幌市

2. 中原知美、温川恭至、清野透
ヒトパピローマウイルスE1タンパク質の安定性を制御する機構。第63回日本ウイルス学会学術集会。2015年11月22-24日、福岡国際会議場、福岡市

3. 中原知美、田中克征、温川恭至、清野透
ヒトパピローマウイルス16型ゲノム複製を制御するE1-NF-κB負のフィードバック機構に対するE6およびE7の効果。第74回日本癌学会学術集会。2015年10月8-10日、名古屋国際会議場、名古屋市。

4. 中原知美、田中克征、温川恭至、清野透
ヒトパピローマウイルス16型のE1ヘリカーゼによるNFκB活性化は、E1の分解促進を介してE1依存性ウイルスゲノム複製を制限する。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10-12日、パシフィコ横浜、横浜市。

5. 中原知美、田中克征、大野真一、温川恭至、清野透。NFκB 活性化はヒトパピローマウイルス 16 型のゲノム複製を抑制する。第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25 - 27 日、パシフィコ横浜、横浜市。

6. Tomomi Nakahara, Nayagasu Egawa, Takashi Yugawa, Tohru Kiyono. Development of a novel HPV16 replicon that enables highly sensitive monitoring of the maintenance replication. 29th International Papillomavirus Conference and Clinical & Public Health Workshops. 2014 年 8 月 20 - 25 日, Seattle, USA.

7. Tomomi Nakahara, Katsuyuki Tanaka, Takashi Yugawa, Tohru Kiyono. Activation of NFκB induced by Human papillomavirus 16 E1 through DNA damage response limits the E1-dependent viral replication. Molecular Biology of DNA tumor viruses conference. 2014 年 7 月 21 - 26 日, Madison, USA.

8. 中原知美、江川長靖、大野真一、温川恭至、清野透。レポーター遺伝子を搭載したヒトパピローマウイルス 16 型(HPV16)ゲノムの作製と評価。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 10 - 12 日、神戸国際会議場、神戸市。

9. 中原知美、田中克征、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 型のゲノム複製に関する宿主因子の解析。2013 年 10 月 3 - 5 日、パシフィコ横浜、横浜市。

〔その他〕

ホームページ等

国立がん研究センター研究所ホームページ
ヒトパピローマウイルスの生活環に基づく
子宮頸がん発症機構の解析

<http://www.nccri.ncc.go.jp/s003/010/010/20151220124026.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中原 知美 (NAKAHARA TOMOMI)

国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：60601177