

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462531

研究課題名(和文)ヒトパピローマウイルス(HPV)の細胞感染機構の網羅的な解析

研究課題名(英文)A global study for HPV-cell infection mechanism

研究代表者

島田 勝 (SHIMADA, Masaru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40301452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間中、(1)我々は高力価のHPV偽粒子作成に成功した。そのHPVの偽粒子を使用し、HPVが細胞感染に関わる細胞膜分子であるBP-1を同定した。(2)新規細胞分子であるp55がE6とE7の両方に結合することが確認された。E6とp55が細胞内で共局在していることも確認された。E6はp55をユビキチン化によって分解し、また、細胞がアポトーシスに対する感受性はp55の発現量に影響された。P55はHPV感染による子宮頸がんの新たな治療ターゲットになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, (1) we successfully obtained high titer of HPV virus-like particles using combination of optimal code usage and high expression cells. Using this HPV virus-like particles, we found that BP-1 may be a receptor of HPV, because the infection of HPV to cells was 35% decreased when the BP-1 was down-regulated. (2) E6 and E7 are major oncogenes of HPV. We newly identified an apoptosis relative protein named p55 bound to both E6 and E7 and their co-localization was confirmed. Overexpression of p55 increased sensitivity of cellular apoptosis, while suppression of p55 decreased the apoptosis. E6 degraded P55 by ubiquitination pathway. Therefore p55 plays an important role in E6-related cervical cancer and p55 is a potent target for prophylaxis and therapy of cervical cancer.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HPV

1. 研究開始当初の背景

これまでに、100以上のHPV血清型が同定されている。このうち、約40血清型は生殖器に感染するHPVである。HPV16、HPV18などの血清型の感染は、外生殖器癌や子宮頸癌の原因になる。現在、日本で承認された子宮頸癌ワクチンはHPV16とHPV18に対するものである。そのワクチンの有効性は示されつつあるが、HPV血清型間の交差性が低く、約50%の子宮頸癌しか予防できない。更に、子宮頸がんに対する有効な治療薬はまだ開発されていない。そのため、次世代のHPVに対する治療・予防法が求められている。HPVは種特異性が高く、HPVを生産する培養細胞が確立されていない。そのため、HPVの細胞受容体、感染機序などの研究に関してほとんど明らかにされておらず、その解明はHPV感染の予防・治療に極めて重要である

2. 研究の目的

(1) 本研究では、独自に樹立した精製タグ付きHPV組換えウイルスを使用し、HPVの細胞侵入に関わる細胞因子を網羅的に同定することを目的とする。HPVの持続感染培養細胞が存在しないため、HPVは人工的に作成する必要がある。これまでの解析で、我々はHPV16とHPV18の粒子構成因子(L1, L2)を高発現するため、そのタンパク質コード領域をヒトコドンに最適化し合成した。このヒト化HPVの粒子構成因子と293TT細胞(ヒト腎臓上皮細胞由来のHEK293細胞にSV40 T抗原を導入することにより、SV40 originを有するプラスミドが細胞内で高増幅できる)を使用し、高力価のHPV疑似ウイルス(HPV VLP)の作製に成功した。さらに、高力価のFlagタグ付きのHPV-VLPの作製にも成功した。これを用い

てHPV16 VLP(L1-Flag)と親HPV16 VLPを感受性細胞に感染させ、Flag付きHPV16 VLPに結合する細胞膜分子を免疫沈降法で検索した。質量分析法で68.97%ペプチドのカバー率で細胞膜分子(HPV-BP1)を同定した。今後、HPV-BP1のHPV感染における役割を詳細に検証することで、HPV感染に対する新規な予防法の開発につながることを期待される。

(2) 精製タグ付きHPV遺伝子を使用し、HPV感染過程に関わる細胞因子を網羅的に同定することにより、発がんの分子メカニズムの解明を目的とする。

我々はタグ付きHPV遺伝子を発現するプラスミドを作製し、細胞に導入することで、タグ付きHPV遺伝子産物を細胞に高発現させることに成功した。このタグ付きHPV遺伝子産物を免疫沈降法で精製し、結合蛋白を質量分析法により同定することで、HPV感染過程および発がんに関わる細胞因子の同定と機能解析を行うことで、HPVの治療法の開発が期待できる。

3. 研究の方法

【HPV感染における細胞受容体の同定・解析---タグ付きHPV VLPでの生化学免疫沈降法】

HPV感染細胞から免疫沈降法でHPVとの結合細胞因子を同定する。

免疫沈降・プロテオーム解析での細胞結合蛋白の同定

HPV VLPの細胞感染条件や実験のスケールなどを更に検討し、質量分析法でHPV VLPの細胞結合蛋白の同定を行う。

HPV受容体候補であるHPV-BP1のHPV感染過程における機能解析 HPV-BP1の変異体、欠損細胞などを用いてHPVとの結合、感染などにおける機能を検討する。さらに、この分子に対する中和抗体の作成を行い、HPV感染の予防法の開発を試みる。

【HPV の感染過程の解明---ハプロ - ド細胞のジントラップ法】

ハプロ - ド細胞である HAP1 を用いてジントラップ法で HPV の細胞侵入に関わる細胞因子を同定する。現在、レポーター遺伝子を発現するシュ - トタイプレンチウイルスを作製し、そのウイルスを用いて、ジントラップ HAP1 細胞ライブラリ - の作製を進めている。次に、そのライブラリ - 細胞をチミジンキナ - ゼ遺伝子 (TK) を発現する組換え HPV に感染させ、ガンシクロビルで HPV の感染に対する耐性細胞を選択する。これにより、横浜市立大学先端医科学研究センタ - ・ゲノム解析室の協力の下、遺伝子解析による HPV 細胞感染に必須な遺伝子を同定する。(ガンシクロビルはヘルペスウイルスチミジンキナ - ゼによってリン酸化されることで活性型になり DNA 合成阻害効果を示すことでチミジンキナーゼを発現する細胞増殖を阻害する薬剤である)

【生化学免疫沈降法で同定した HPV 感染における細胞受容体候補の機能解析】

細胞受容体候補のノックダウンによる細胞の HPV 感染における変化の検討
ウイルスは複数の細胞因子および複数の経路を使って感染が成立する。市販の設計済み siRNA ライブラリ - を使用し、前年度に同定した細胞因子のノックダウンを行い、HPV 感染プロセスにおける分子機能を解析する。また、同定した分子に阻害剤、増強剤が存在する場合は、それらを用いた解析も行う。

【HPV 感染過程および発がんに関わる細胞

因子の網羅的解析】

HPV 遺伝子との結合蛋白の同定

タグ付きの HPV 遺伝子を含む発現プラスミドをヒト腎臓上皮細胞由来細胞である 293 細胞に導入し、タグに対する抗体を用いて免疫沈降法で HPV との結合蛋白を精製する。その結合蛋白を横浜市立大学・先端医科学研究センタ - ・プロテオ - ム解析室の協力の下、質量分析法により同定する。

同定された細胞因子の機能解析

新規に同定された細胞因子が HPV の感染過程および発がんに関わる可能性を siRNA ライブラリ - や遺伝子発現ベクタ - を用いて解析する。

4 . 研究成果

(1) HPV の培養がまだできないため、HPV 遺伝子のヒトコドンに最適化と高発現細胞との組み合わせによって、高力価の HPV 偽粒子作成に成功した。その HPV の偽粒子を使用し、HPV が細胞感染に関わる細胞膜分子である BP-1 を同定した。その BP-1 発現が抑制されると、HPV の細胞感染は 35%まで低下した。BP-1 が HPV の細胞感染と関わることを明らかにした。

(2) HPV の主な発がん遺伝子は E6 及び E7 である。E6 及び E7 遺伝子産物と結合する新規細胞分子がそれぞれ 16 個と 65 個同定された。その中の p55 という細胞分子が E6 と E7 の両方に結合することが確認された。E6 と p55 が細胞内で共局在していることも確認された。その p55 が高発現すると、細胞はアポトーシスを起こしやすく、抑制すると、細胞はアポトーシスを起こしにくくなった。E6 は p55 をユビキチン化によって分解することが明らかになった。E6 は p55 によるアポトーシスを抑制しました。よっ

て p55 は E6 の細胞癌化に重要な役割を担っていることが明らかになった。P55 は HPV 感染による子宮頸がんの新たな治療ターゲットになると考えられる。

5 . 主な発表論文 (計 5 件)

Shimada M., Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, Mizukami H, Klinman DM, Ozawa K, Okuda K. “ Prophylaxis and treatment of Alzheimer ’ s disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid beta protein ” . PLOS ONE, e57606, 2013. (査読あり)

Okuda K, Wada Y, Shimada M. “ Recent developments in preclinical DNA vaccination ” . *Vaccines*.2(1), 89-106, 2014. (査読あり)

Shimada M., Yoshizaki S, Ichino M, Klinman DM, Okuda K. Apoptosis of antigen-specific CTLs contributes to low immune response in gut-associated lymphoid tissue post vaccination. *Vaccine*, 32:5198-5205, 2014. (査読あり)

Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in viral vector-based vaccines. *Vaccines*, 2:624-641, 2014. (査読あり)

Okuda, K., Wada, Y., Shimada, M. Recent developments in DNA vaccination. *Vaccines*, 2(1), 89-106, 2014. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

島田 勝 . “ Therapeutic Vaccine in SIVmac239-infected Rhesus Macaque ” . 第一回アジア小児感染症学会、2013 年 8 月 30 日、東京大学医学部ホール (東京)

島田勝、水上浩明、小澤敬也、奥田研爾。抗 b アミロイド抗体を発現するアデノ随伴ウイルスを用いたアルツハイマー病の予防及び治療。第 97 回日本細菌学会関東支部総会、2014 年 10 月 30-31 日、東京ド - ムホテル (東京)

島田勝、山下暁朗、斎藤真奈美、岡山明子、平野久。ヒトパピローマウイルスにおける発がん機構の解明。第 73 回日本癌学会、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

島田勝、山下暁朗、斎藤真奈美、岡山明子、平野久。ヒトパピローマウイルスの感染による発がん機構の解明。第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月 10-12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

Masaru Shimada, Akio Yamashita, Manami Saito, Akiko Okayama, Hisashi Hirano. The role of apoptosis inducing factor 1 (AIFM1) in HPV-inducing cancer Keystone Symposia, Viruses and Human Cancer, Montana, USA, March 29-April 2, 2015.

Masaru Shimada, Akio Yamashita, Akiko Okayama, Takao Kinjo, Motohide Ichino, Hisashi Hirano, Kenji Okuda. The importance of apoptosis-inducing factor (AIF) in HPV E6-mediated apoptosis. 第 75 回日本癌学会、2016 年 10 月 6-8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

島田 勝 (SHIMADA, Masaru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号 : 40301452

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山下 暁朗 (YAMASHITA, Akio)