

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861318

研究課題名(和文) 遺伝子改変酵素群APOBECはHPV感染における発癌因子か？

研究課題名(英文) Are APOBEC deaminases oncogenic in HPV infection?

研究代表者

若江 亨祥 (Wakae, Koucho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70638303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は遺伝子改変酵素群APOBECのヒトパピローマウイルス(HPV)感染病態における病的役割を明らかにする事を目的とした。その結果、APOBECはHPVやインターフェロンにより発現が誘導される事、APOBECはHPVゲノムや宿主ゲノムに変異を導入し、またHPVゲノムの宿主へのインテグレーションと相関する事、その一方でHPVビリオン産生細胞で発現すると、感染性を低下させる事を発見した。以上の知見は抗ウイルス因子と発癌因子という、HPV感染病態におけるAPOBECの二面的役割を反映していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the pathophysiological role of APOBEC deaminases in HPV infection. We obtained the following conclusion. 1. APOBECs are induced by interferons and HPV 2. APOBECs hypermutate HPV or host genomes, and their expression correlates with integration of HPV genome into the host 3. On the contrary, APOBECs decrease infectivity of HPV virion when expressed in virion-producing cells. These findings revealed the bilateral role of APOBECs as antiviral and oncogenic molecules, in HPV infection.

研究分野：virology

キーワード：APOBEC 子宮頸癌 hypermutation HPV

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(Human Papillomavirus, HPV) 感染は子宮頸癌や中咽頭癌の原因である。HPV ワクチン接種は副作用の懸念から事実上中断しており、また、既感染者からのウイルス排除は実現していない。持続感染病態のより深い理解に基づいた、前癌段階での治療戦略が求められている。

申請者は、遺伝子改変酵素群 AID/APOBEC ファミリー (Activation-Induced cytidine Deaminase / Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like)に着目し、これまで研究を行ってきた。AID/APOBEC はヒト免疫不全ウイルスなどレトロウイルスに対して変異導入活性を發揮し、抗ウイルス活性を發揮する事が 2000 年代に示された。その一方で乳癌をはじめ様々な癌ゲノムから hypermutation (連続する C-to-U 変異、AID/APOBEC が導入する特徴的な変異) が検出され、発癌因子の可能性も提唱されていた。

2. 研究の目的

我々はこれらの知見を、発癌ウイルスである HPV にも拡張し、感染における病的役割を明らかにする事を目的とした。In vitro で APOBEC3 が HPV ゲノムに変異を導入する事を当時見出していたため、APOBEC3 が抗ウイルス因子である可能性、及び発癌因子である可能性を想定した。

3. 研究の方法

<in vivo における APOBEC の発現及び HPV との相関>
子宮頸部異形成検体及び中咽頭癌を用いて。での APOBEC の発現を RT-PCR 法及び免疫染色法にて評価した。また HPV16 ゲノムの hypermutation を、臨床検体より抽出した DNA 検体を用いて、3D-PCR 法(低い変性温度で AT-rich な DNA を高感度で増幅する)及び次世代シーケンスを用いて検討した。また DNA-qPCR を用いて中咽頭癌検体の HPV16 E2/E6 比を算出し、HPV ゲノムのインテグレーションを評価し (インテグレーションにより E2 が断裂するため、比は低下する)、APOBEC との相関を検討した。

<APOBEC と HPV ビリオン感染性への影響>
T 抗原を高発現する 293 細胞に HPV 構造遺伝子 L1, L2 及びレポーター遺伝子発現ベクターを cotransfection し、高塩濃度下で精製する事で、感染性をレポーター活性で評価できる pseudovirion (PsV) が得られる。この実験系で APOBEC3 を共発現し、得られた PsV の感染性を評価した。

4. 研究成果

<HPV16 感染と APOBEC3 発現の相関>
子宮頸部異形成および中咽頭癌検体で APOBEC3 の発現が確認された。HPV16 陽性および陰性例の比較から、APOBEC3A の発現は HPV16 と相関する事が示された (図 1)。また子宮頸部異形成の病期と APOBEC3G の発現が相関する事を見出した。

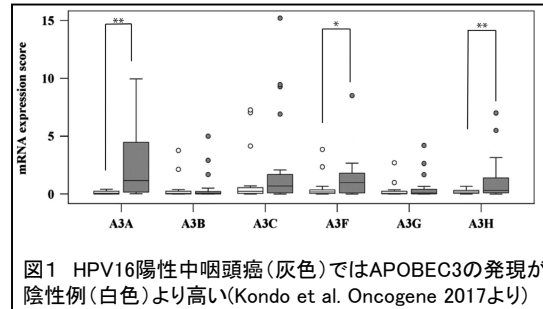


図1 HPV16陽性中咽頭癌(灰色)ではAPOBEC3の発現が陰性例(白色)より高い(Kondo et al. Oncogene 2017より)

<APOBEC による HPV ゲノム変異導入活性>
3D-PCR 法及び次世代シーケンスにて、HPV16 ゲノムの hypermutation が、子宮頸部異形成及び中咽頭癌から検出された。次世代シーケンスによる解析から、hypermutation の頻度は 0.02%と見積もられた。(図 2)

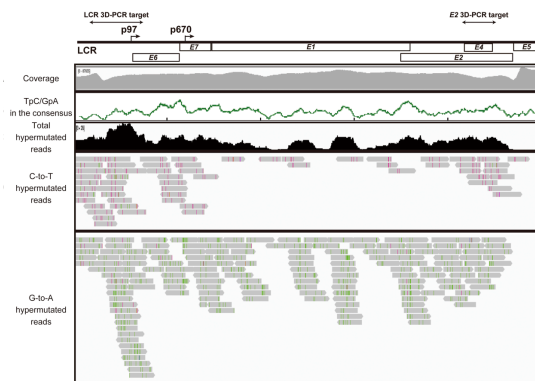


図2 子宮頸部異形成検体での HPV16 hypermutation。連続する C-to-T/G-to-A 変異 (ピンク及び緑) を含むリードが検出される (Wakae et al. Virology 2015より)

<APOBEC3A の発現と HPV16 ゲノムインテグレーションの相関>
HPV16 陽性中咽頭癌検体において、APOBEC3A の発現と HPV ゲノムへの宿主ゲノムへのインテグレーションが相関する事を見出した (図 3)。

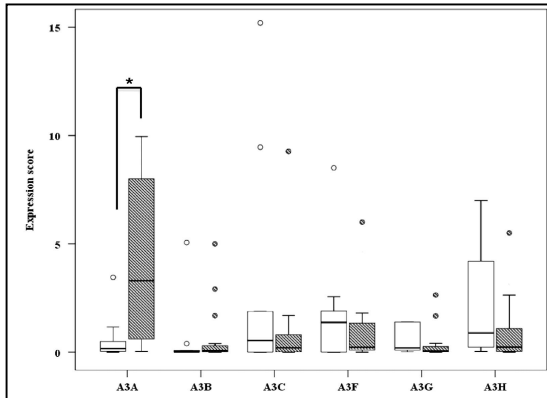


図3 HPV16インテグレーションが起こった中咽頭癌(灰色)ではAPOBEC3Aの発現がエピソード型HPVゲノム群(白色)(Kondo et al. Oncogene 2017より)

<APOBECによるHPVビリオンの感染性抑制>
APOBEC3をPsV産生細胞で強制発現させる事で、PsVの感染性が低下する事を発見した(図4)。APOBEC3はHPVの構造遺伝子L1と結合する事が免疫沈降法にて示され、APOBEC3とL1の結合がキャプシドの凝集を抑制している可能性が示唆された。

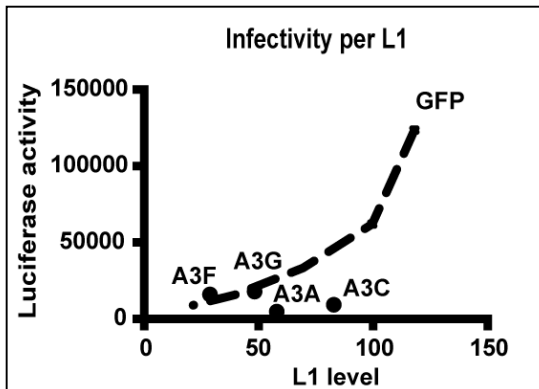


図4 APOBEC3のpseudovirion産生細胞での強制発現により感染性が低下する(Ahasan et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015より)

以上の知見から、HPV感染はAPOBEC3の発現を誘導し、抗ウイルス因子として働く一方で、ウイルスゲノム変異による多様性の創出、さらにはインテグレーションを惹起することによる発癌にも寄与している事が示唆された。(図5)

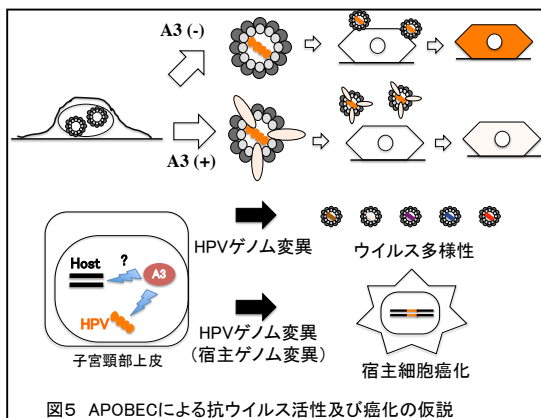


図5 APOBECによる抗ウイルス活性及び癌化の仮説

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 8件)

1. T Iizuka, K Wakae, M Nakamura, K Kitamura, M Ono, H Fujiwara, M Muramatsu, APOBEC3G is increasingly expressed on the human uterine cervical intraepithelial neoplasia along with disease progression, Am J Reprod Immunol, 査読有、in press, 2017

2. 村松正道、喜多村晃一、若江享祥

『B型肝炎ウイルスとAPOBECファミリー』生化学、総説、第88巻第5号(2016)、査読無

3. Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Nakanishi Y, Ishikawa K, Komori T, Moriyama-Kita M, Endo K, Muroso S, Wang Z, Kitamura K, Nishiyama T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Muramatsu M, Yoshizaki T. APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers, 査読有 Oncogene. 2017;36:1687-1697; doi:10.1038/onc.2016.335

4. Ahasan MM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Mori S, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2015;13:457(3):295-9.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.103>

5. G Liang, G Liu, K Kitamura, Z Wang, S Chowdhury, Ahasan MM, K Wakae, M Koura, M Shimadu, K Kinoshita, and M Muramatsu TGF- β Suppression of HBV RNA through AID-dependent Recruitment of an RNA Exosome Complex PLoS Pathog. 査読有 2015 Apr 2;11(4):e1004780

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004780>

6. Kukimoto I, Mori S, Aoyama S, Wakae K, Muramatsu M, Kondo K Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia J Med Virol. 査読有 2015; 87; 10; 1754-1760 DOI: 10.1002/jmv.24215

7. Wakae K, Aoyama S, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Monjurul AM, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I,

Yamaguchi K, Shigenobu S, Nishiyama T, Muramatsu M. Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing. *Virology*. 査読有 2015;485:460-466. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.017>

8. Z Wang, **K Wakae**, K Kitamura, S Aoyama, G Liu, M Koura, Ahasan MM, I Kukimoto, M Muramatsu APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus type 16 DNA upon Interferon- β stimulation *J Virol*. 査読有 2014;88(2):1308-17 doi: 10.1128/JVI.03091-13

〔学会発表〕(計 7件)

1. **Kousho Wakae**, Que Lusheng, Md Mohiuddin, Kouichi Kitamura, Wang Zhe, Takashi Izuka, Mitsuhiro Nakamura, Hiroshi Fujiwara, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki, Tomoaki Nishiyama, and Masamichi Muramatsu, Role of APOBEC3 in HPV-related carcinogenesis, International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017, 2017年1月27日、神戸ポートピアホテル

2. **若江 亨祥**, Que Lusheng, 喜多村 晃一、飯塚 崇、中村 充弘、藤原 浩、近藤 悟、吉崎 智一、柗元 巖、西山 智明、村松 正道、APOBEC3はHPV16感染細胞のミトコンドリアDNAにhypermutationを導入する、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜

3. **Kousho Wakae**, Que Lusheng, Kouichi Kitamura, Takashi Izuka, Mitsuhiro Nakamura, Hiroshi Fujiwara, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki, Tomoaki Nishiyama, and Masamichi Muramatsu, APOBEC3 hypermutates mitochondrial DNA in differentiating dysplastic keratinocytes, The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine/The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 2016年10月30日、TKP ガーデンシティ品川

4. **若江 亨祥**, 青山 慧、王 哲、喜多村 晃一、劉 光炎、アハサン・ムハンマド・モンジュルル、小浦 美樹、今康 美依子、坂本 直也、中村 充弘、京 哲、近藤 悟、藤原 浩、吉崎 智一、柗元 巖、山口 勝司、重信 秀治、西山 智明、村松 正道 ヒトパピローマウイルス発癌病態における遺伝子改編酵素群 APOBEC の役割、2015年12月8日、金沢大学付属病院

5. **若江 亨祥**, 青山 慧, 王 哲, 喜多村

晃一, 劉 光炎, アハサン=ムハンマド=モンジュルル, 中村 充宏, 藤原 浩, 柗元 巖, 山口 勝司, 重信 秀治, 西山 智明, 村松 正道 子宮頸部異形成における HPV16 ゲノム hypermutation の検出 第4回次世代シーケンス現場の会、2015年7月1日、つくば国際会議場

6. **若江 亨祥**, アハサン・ムハンマド・モンジュルル、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柗元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道、APOBEC3はHPV16 Pseudovirion の感染性を低下させる、第33回日本生化学会北陸支部会、2015年5月23日、富山大学杉谷キャンパス

7. **若江 亨祥**, アハサン・ムハンマド・モンジュルル、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柗元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道、APOBEC3はHPV16 Pseudovirion の感染性を低下させる、第62回ウイルス学会、2014年11月14日、パシフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/worpress/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若江 亨祥 (WAKAE, Kousho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70638303