

歯は歯周組織(歯肉・歯根膜・セメント質・歯槽骨)により顎骨に支持されている。そして歯周病は、デンタルプラーク中の細菌の影響により歯周組織が慢性炎症的に破壊されていく疾患である。歯周組織の一つである歯根膜(歯根表面のセメント質と歯槽骨の間に存在する靭帯組織)の中にはいわゆる「歯周組織幹細胞」としての未分化間葉系幹細胞が成人になっても存在しており、その生物学的機能を十分に引き出すことにより、歯周組織再生が達成可能となる。

図1 歯周組織と歯周病

周病の蔓延により脅かされている現状を考えると、予知性の高い新規歯周組織再生療法の開発は社会的急務であるといえる。

歯周組織の再生は可能か？

はたして、歯周組織の再生は医学的・生物学的に可能なのであろうか？我々の歯は、2種類の硬組織(セメント質、歯槽骨)と2種類の軟組織(歯肉、歯根膜)からなる歯周組織により、顎骨に強固に支持されている。具体的には、歯根膜線維芽細胞により産生されるコラーゲン線維束の端がセメント

質と歯槽骨に埋入されることにより、歯と歯槽骨は強固に連結されている。近年、歯根周囲の靭帯組織であるこの歯根膜組織の中に骨芽細胞やセメント芽細胞へ分化し得る間葉系幹細胞が成人になっても存在することが示され¹⁾、歯根膜に存在するこのような細胞の生物学的活性を十分に引き出すことにより、従来の原因除去治療のみでは不可能と考えられてきた歯周組織の再生を誘導することが歯科医学的に可能であると現在では考えられている(図1)。

理想的な歯周組織の再生誘導を考えた場合、①歯周組織欠損部に面する歯

根面に歯根膜由来細胞が選択的・優先的に誘導されること、②これら歯根膜由来細胞中に含まれる未分化間葉系幹細胞(歯周組織幹細胞)が分化能を保有したまま増殖した後、骨芽細胞やセメント芽細胞や歯根膜線維芽細胞として部位特異的な分化を遂げること、③歯根膜線維芽細胞によって産生されたコラーゲン線維束が骨芽細胞やセメント芽細胞により新生された骨組織、セメント質に埋入され歯と歯槽骨間に線維性の結合が再生されること、が必要となる。

歯周組織再生療法開発の現状

このような歯周組織再生誘導に際し必要とされる過程を少なくとも部分的に活性化することにより、歯周組織再生誘導を果たそうとする試みがすでに臨床応用されている。たとえば、組織誘導再生法(GTR法)は、歯肉上皮の下方増殖を抑制し、歯周組織欠損部へ歯根膜細胞の選択的・優先的な誘導を果たすことにより歯周組織再生を誘導するものである。また、セメント質新生を誘導すると考えられているエナメル基質蛋白を歯周組織欠損部に投与することにより歯周組織再生を促進しようとする治療法もすでに臨床応用されており、これらの治療法はともに一定の成果を挙げている。

近年、歯周組織欠損部への歯根膜細胞の遊走や同欠損部における細胞増殖および硬組織形成細胞への分化の過程をある種のサイトカインを局所投与す

1. PDGF + IGF-1
(platelet-derived growth factor) : (insulin like growth factor-1)
2. BMP-2
(bone morphogenetic protein-2)
3. TGF- β
(transforming growth factor- β)
4. OP-1 (BMP-7)
(osteogenic protein-1)
5. VEGF
(vascular endothelial growth factor)
6. BDNF
(brain-derived neurotrophic factor)
7. PDGF + β -TCP
(platelet-derived growth factor) (β -tricalcium phosphate)
8. EGF-2 (bFGF)
(basic fibroblast growth factor)

表 1 サイトカインによる歯周組織再生誘導

ビーグル犬	対照側 (n=6)	FGF-2側 (n=6)
新生骨形成率 (%)	35.4 ± 8.9	83.6 ± 14.3
新生骨梁形成率 (%)	16.6 ± 6.2	44.1 ± 9.5
新生セメント質形成率 (%)	37.2 ± 15.1	97.0 ± 7.5

FGF-2 投与時の欠損量を 100% とし、6 週後に新生が確認された骨、骨梁、セメント質量をそれぞれ百分率で表わしている。対照側には基剤（架橋ゼラチン）のみを投与した。*p < 0.01 (文献 2 より引用改変)

表 2 ビーグル犬に作製した実験的 2 級根分岐部病変に対する FGF-2 の歯周組織再生誘導効果

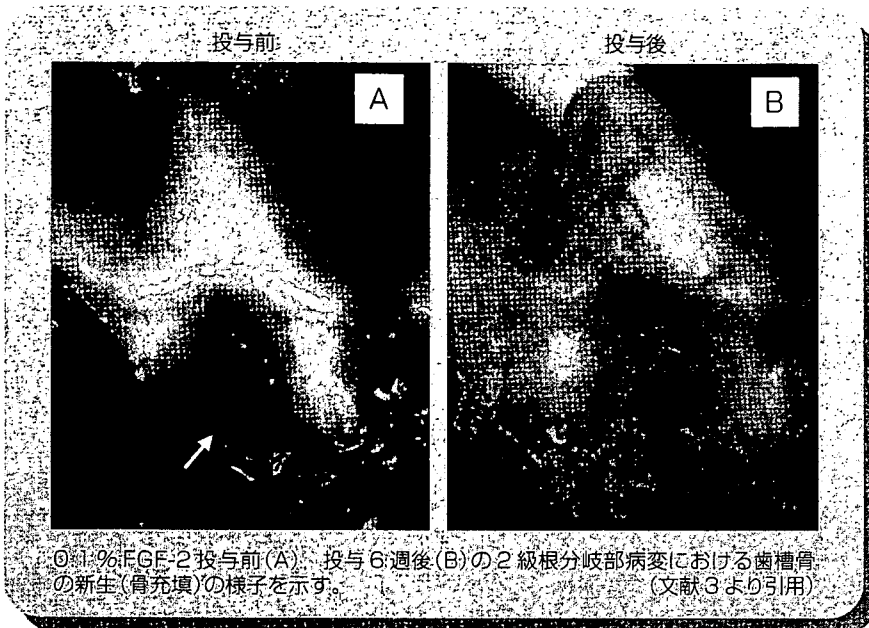
ることにより活性化し、歯周組織再生を促進しようとする新たな治療法の確立が試みられている。表 1 に示すすべてのサイトカインは、少なくとも動物実験において歯周組織再生誘導効果が確認されているものである。このうち、PDGF-BB と β -TCP の合剤²⁾は歯周組織再生誘導用 device として 2006 年米国にて FDA の承認がとられている。

一方、我々の研究室では、強力な血管新生作用と間葉系細胞の増殖誘導能を有する塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF ; FGF-2) に着目し、FGF-2 を歯周外科時に歯槽骨欠損部に局所投与することにより、歯周病により失われた歯周組織の再生を人為的に誘導・促進する、新しい歯周組織再生療法の開発

に取り組んでいる。

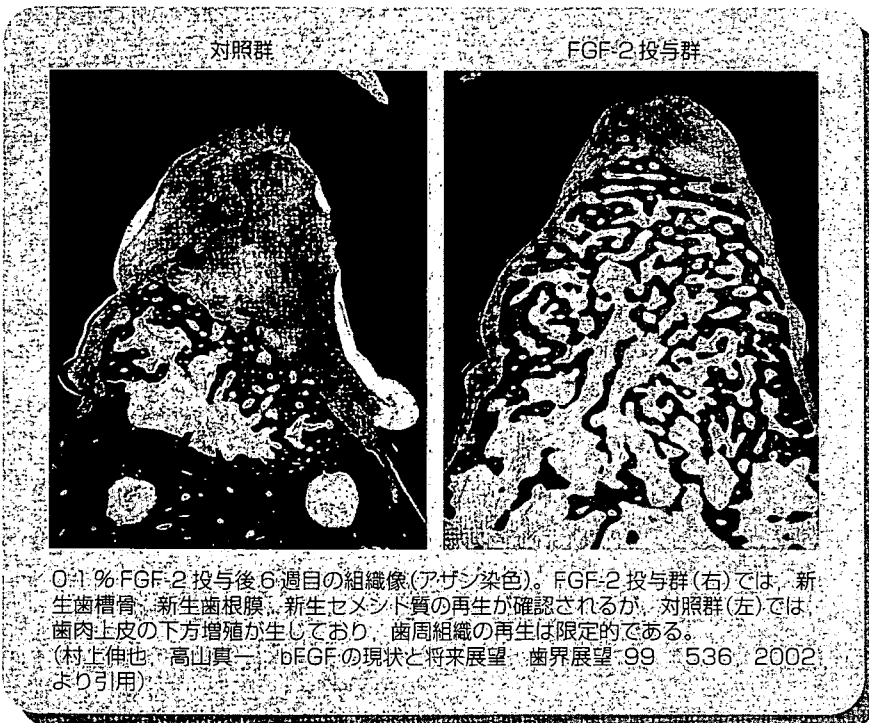
塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織再生誘導

我々は、FGF-2 の局所投与が歯周組織再生を促進するか否かをビーグル犬モデルを用いて検証した³⁾。まず、下顎臼歯部複根歯に歯槽骨欠損 (2 級根分岐部病変) を作製した。シリコン印象材を同欠損部に充填した状態で、一度肉弁を復位・縫合し、同上歯槽骨欠損部に炎症反応を惹起した。4 週後に再手術し、印象材を除去後、通常の歯周外科手術に準じて骨欠損部および露出歯根面の十分な搔爬を行い、歯槽骨欠損底部を印記しておく目的で歯科用ドリルを用いて根面にノッチを付与した。その後、架橋ゼラチンを基剤とした FGF-2 を実験側の歯周組織欠損部に填入し、対照側には、同基剤のみを填入した。そして、FGF-2 投与後 6 週経過した後に、FGF-2 投与部位に歯周組織の再生が誘導されているか否かを組織学的計測により検討した。その結果、FGF-2 投与側では、肉眼的にも明らかな骨の新生が認められた (図 2)。そして、組織学的にも新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質が観察され、統計学的にも有意な歯周組織再生が誘導、促進されているのが確認された (表 2、図 3)。これ以外のモデルとして、ビーグル犬の歯槽骨に作製した 2・3 壁性骨欠損や、カニクイザルにおける根分岐部病変に FGF-2 を局所投与した場合⁴⁾においても、歯肉上皮の下方増殖・骨性癒着・歯根吸収などの



0.1% FGF-2 投与前(A)、投与6週後(B)の2級根分岐部病変における歯槽骨の新生(骨充填)の様子を示す。(文献3より引用)

図2 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯槽骨再生(→巻頭Color Gravure参照)



0.1% FGF-2 投与後6週目の組織像(アザン染色)。FGF-2投与群(右)では、新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質の再生が確認されるが、対照群(左)では、歯肉上皮の下方増殖が生じており、歯周組織の再生は限定的である。(村上伸也、高山真一、bFGFの現状と将来展望、歯界展望、99、536、2002より引用)

図3 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯周組織再生(→巻頭Color Gravure参照)

異常な治癒形態を生じない、統計学的に有意な歯周組織再生が誘導されてくることを確認している。また、2001年より FGF-2 の歯周組織再生誘導効果ならびに安全性の検討を目的として、多施設参加の第Ⅱ相臨床治験(プラセボを含む用量反応同時対照による二重盲検試験)が行われた。その結果、ヒトの2壁性および3壁性歯槽骨欠損に対し、0.3% FGF-2含有ハイドロキプロピルセルロース(HPC)製剤の局所投与がレントゲン写真上で統計学的に有意な歯槽骨新生を誘導し得ることが確認されている。また、同治験期間中には安全性上大きな問題になるような事例は認められなかったと報告されている。

FGF-2による歯周組織再生誘導のメカニズム

FGF-2による歯周組織再生誘導の機序を知る一助として、培養ヒト歯根膜由来細胞(HPDL)に対する FGF-2 の作用を、我々は詳細に検討している。その結果、FGF-2はHPDLの増殖を濃度依存的に促進し、さらに血清中の何らかの因子と協調することによりHPDLの増殖を相乗的に促進することを確認した⁵⁾。また、未成熟なHPDLのほうが FGF-2 に対するレセプターを数多く発現し、FGF-2 に対して高い反応性を示すことも明らかにしている⁶⁾。

次に、ヒト歯根膜細胞からの細胞外基質産生に及ぼす FGF-2 の作用について検討を加えた。その結果、FGF-2は他のサイトカイン刺激に比し、特徴的

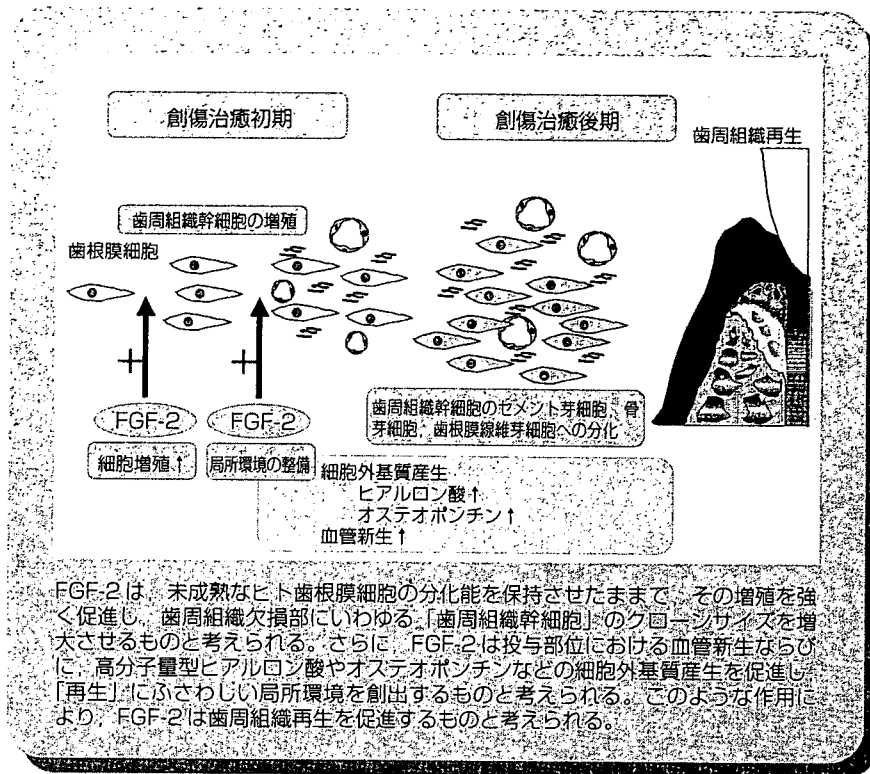


図4 歯周組織再生を誘導する FGF-2 の作用機序 (仮説)

DDS 技術に期待するもの

組織・臓器の再生誘導を効率的に行うには、組織工学 (tissue engineering) というシグナル分子 (signaling molecule) の作用を至適条件で作用させることが必須であり、そのために Drug Delivery System (DDS) のコンセプトを導入することの意義が指摘されている。実際、今回紹介した動物実験においても、FGF-2の徐放が期待される架橋ゼラチンを用いている。しかしながら、どの濃度で、どの程度の期間 FGF-2を作用させることが、歯周組織再生誘導に関して最大の効果を生むのかに関しては、いまだ十分な検討はなされておらず、今後の検討課題の一つとして残されている。一方、FGF-2存在下においては歯根膜細胞の骨芽細胞・セメント芽細胞への分化が可逆的に抑制されることが知られている⁵⁾。したがって、しかるべき時期に FGF-2の活性が投与部位から消失することもまた、効果的な歯周組織再生誘導を考える上で重要な点となるであろう。一方、著明な骨誘導能を有する bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) の局所投与により歯周組織再生が促進されるが、その際、歯根と歯槽骨が部分的に骨性癒着 (ankylosis) する可能性があることが指摘されている。これを回避するためには、創傷治癒の早期に BMP-2が放出されないようにする、もしくは、FGF-2のような増殖因子が早期に作用した後、BMP-2のような

に高分子量型ヒアルロン酸の合成を促進することが明らかとなった⁷⁾。高分子量型ヒアルロン酸は、創傷治癒初期過程に重要な役割を演じている細胞外基質の一つと考えられている。また最近、FGF-2は細胞遊走活性を有するオステオポンチンの産生も HPDLより誘導することが確認されている (投稿準備中)。さらに FGF-2は投与部位において血管新生促進作用を発揮することもよく知られており、これらの作用を通じて、歯周組織再生にふさわしい環境が FGF-2の投与部位に創出されるものと考えられる (図4)。

すなわち、創傷治癒の初期段階にお

いて FGF-2は、①歯根膜細胞を未分化な状態に保ちつつ増殖を促進することにより治癒の場での歯根膜細胞の細胞密度を増加させる、そして、②血管新生促進・細胞外基質産生の制御を通じて歯周組織再生にふさわしい局所環境を整備する、ものと考えられる。そしてその結果として、歯槽骨、セメント質の新生を含む歯周組織再生が、FGF-2投与部位において量的、時間的に促進されることになるのであろう⁸⁾ (図4)。

分化因子が作用するよう工夫された DDS が有効かもしれない。このような DDS 機能を有したサイトカイン基剤が開発されれば、個々のサイトカインの作用がさらに高められ、単に歯周組織再生療法としてのサイトカインの適応が拡大されるのみならず、その適応は広く顎顔面領域の再建手術にも応用し得るようになるものと期待される。

●文 献

- 1) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364** : 149-155, 2004
- 2) Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, et al : Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain : results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol* **76** : 2205-2215, 2005
- 3) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al : Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res* **38** : 97-103, 2003
- 4) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, et al : Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* **80** : 2075-2079, 2001
- 5) Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al : Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* **32** : 667-675, 1997
- 6) Takayama S, Murakami S, Nozaki T, et al : Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* **33** : 315-322, 1998
- 7) Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, et al : Fibroblast growth factor-2 regulates the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* **203** : 557-563, 2005
- 8) 村上伸也 : 塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織再生の試み. *大阪大学歯学雑誌* **47** : 75-84, 2003

解明が進むヒトパピローマウイルス による子宮頸癌の発症機構

E6, E7 癌タンパク質の新規機能

温川恭至, 清野 透

子宮頸癌発生の原因ウイルスとして、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus : HPV) が同定されて20年以上が経過した。90%以上の子宮頸癌では16型など一群のHPVがコードするE6, E7が癌細胞で発現しており、それぞれp53, RB癌抑制遺伝子産物を不活化していることが明らかになっている。E6にはテロメラーゼを活性化する機能も備わっており、E6とE7は共同してヒト初代上皮細胞を高率に不死化することができる。E6とE7の発現のみでは細胞は癌化しないが、E6, E7は細胞の不死化から癌化に至る多くの過程に関与していると考えられている。本稿では、最近明らかになったE6, E7の機能を紹介するとともに、HPV被感染細胞が子宮頸癌へと進行する機構について考察したい。

キーワード● HPV, E6, E7, 子宮頸癌, 標的分子

はじめに

子宮頸癌の少なくとも90%以上は、16型をはじめとする特定の高リスク型HPVの感染が主因であると考えられている。現在、全世界で毎年約50万人が子宮頸癌を罹患し、そのうち約1/3の方が死亡しており、女性の癌による死亡原因の第2位に位置している。先進国における子宮頸癌の発生率は主に検診の効果により年々減少傾向にあるが、日本では初交年齢の低下に伴い20歳代の若い年齢層での急激な増加傾向が社会問題となっている。

HPVゲノムは染色体外においてプラスミド状態で複製されるが、子宮頸癌細胞からは染色体に組み込まれたHPVゲノムDNAが検出される。染色体への組み込み時期は高度異形成への進展時とほぼ一致している。癌細胞中ではE6とE7遺伝子が必ず発現しており、発癌および癌形質の維持に重要な役割を果たしている¹⁾。

E6とE7は、それぞれp53, RBの不活化に加え多様な生物活性を有しており、ヒト正常細胞を単に不死化するだけでなく、悪性形質の付与にも積極的に関与していることが次第に明らかになってきた。

1 E6の新たな機能

① テロメラーゼの活性化

テロメラーゼを構成する逆転写酵素サブユニット (telomerase reverse transcriptase : TERT) は、幹細胞などごく一部の細胞でしか発現しておらず、多くの体細胞ではテロメア末端の一定以上の短縮に伴い細胞老化がおとずれ増殖停止する。また、ヒト癌において、テロメラーゼの活性化は、p53経路またはRB経路の異常と並んで最も共通にみられる変化であることが示されている。通常の培養条件においてヒト正常子宮頸部角化細胞の不死化には、少なくともRB経路の

Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses : Novel functions of E6 and E7 oncoproteins

Takashi Yugawa/Tohru Kiyono : Virology Division, National Cancer Center Research Institute (国立がんセンター研究所ウイルス部)

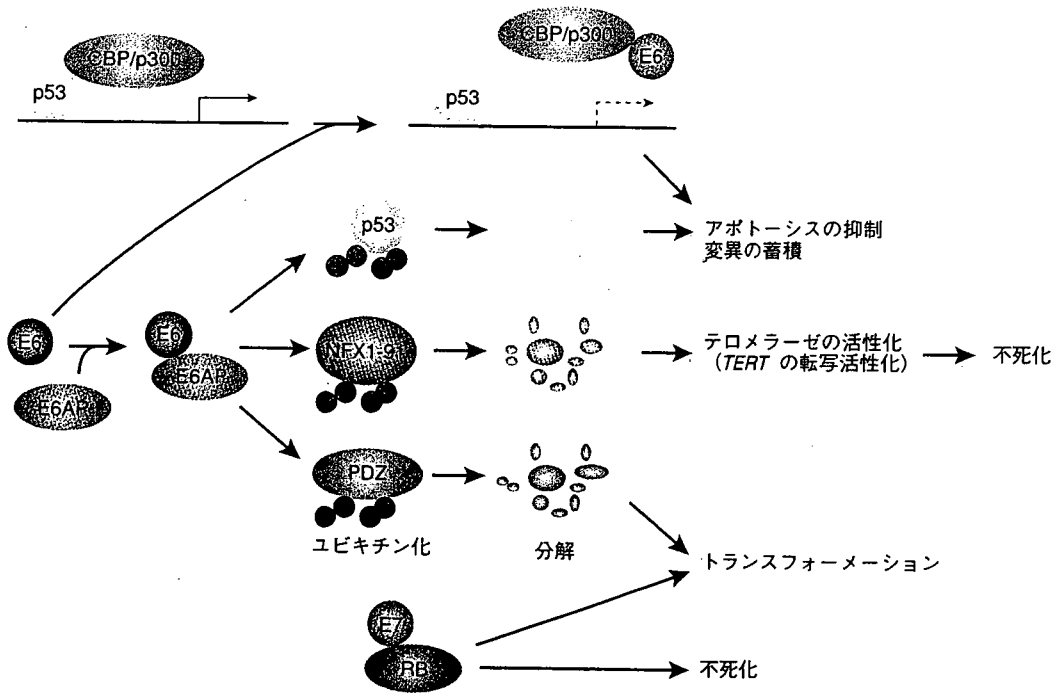


図1 E6とE7の主要な標的分子

E6は細胞のHECT型ユビキチンリガーゼ(E3)の1つであるE6APと結合し、標的タンパク質の分解を促進する。E6あるいはE6APそれぞれ単独ではp53にほとんど結合しないが、両者の複合体はp53と結合し、E6APのユビキチンリガーゼ活性により本来の基質ではないp53をユビキチン化する。ユビキチン化されたp53はプロテアソームに認識され分解を受ける。また、E6はp53の転写共役因子であるCBP/p300やADA3とも結合し、その機能を抑制することでp53経路をより完全に遮断している。E7はN末端のLXCXEモチーフを介してRBと結合し、RBとE2Fの結合を阻害することでRBを不活化する。また、E7はRBの分解も促進することが知られている。E7によりRB経路が不活化されるとp14^{ARF}を介してp53経路が活性化し細胞周期の停止かアポトーシスが誘導されるが、E6によりp53が不活化されていると細胞は増殖を継続することが可能となる。また、E6はTERTプロモーターに対する抑制因子NFX1-91の分解を介して、TERT遺伝子の発現を誘導する。体細胞においてテロメラーゼ活性はTERTの発現に依存しているため、E6はこれによってテロメラーゼを活性化し、E7と共同して正常細胞の不老化を誘導する。E6は他にも複数のPDZドメイン含有タンパク質を標的化し、細胞のトランスフォーメーションを促進する可能性がある。

不活化とテロメラーゼの活性化が必要である。HPVによる不老化では、RB経路の不活化はE7が担っておりテロメラーゼの活性化はE6によってなされるが、後者の分子機構に関しては長年不明であった。最近、E6によってTERTプロモーターに対する転写抑制因子NFX1-91がE6AP依存的に分解促進されることが示された(図1)²⁾。この結果、転写抑制が解除されMycのE-boxへの結合が促進されるが、その過程にはさらにE6とc-mycの複合体形成や³⁾、E6によるc-myc誘導⁴⁾などが提唱されている。

② p53の不活化とNotch1の下方制御

E6は単独で上皮角化細胞の分化を抑制する活性を有しているが、その分子基盤は未解明である。近年、皮膚などの重層扁平上皮組織においては、Notch1が角化細胞の分化誘導因子であり、癌抑制遺伝子として機能することがわかってきた⁵⁾。これまでNotch1は癌遺伝子として分離され、実際、乳癌などでの高発現が報告されていたためこの報告は驚きであった。正常子宮頸部では比較的高レベルに検出されるNotch1の発現は低分化型や悪性度の高い子宮頸癌では低下して

おり、活性型の Notch1 を子宮頸癌由来の細胞株に導入すると E6E7 遺伝子の転写抑制を介して細胞増殖を抑制することが示された⁶⁾。

しかしながら、Notch1 の発現低下をもたらす分子機構は不明であった。これに関し、われわれは E6 が p53 の不活化を介して Notch1 の発現を抑制していることを発見し、p53 の新規標的遺伝子として Notch1 遺伝子を同定した (投稿準備中)。さらに、この p53-Notch1 経路は、角化細胞においてゲノム傷害誘導時に活性化し、分化を促進することがわかった。すなわち、p53 は Notch1 遺伝子の発現誘導を介した角化細胞の最終分化誘導によって、ゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系列から排除していると考えられる。これは重層扁平上皮組織における p53 の新たなゲノム監視機構を示唆している (図 2)。HPV による子宮頸癌発症においては、E6 によって p53 の分解が促進されると同時に Notch1 癌抑制遺伝子の発現が抑制されており、E6 による Notch1 下方制御を介した分化抑制が発癌に関与していると推測される。

一方で、子宮頸部における扁平上皮化生^{*1}や異形成、高分化型の癌では、Notch1 の高発現が観察されており、また Notch1 の活性化は (機序は明らかでないが) PI3K-Akt 経路の活性化を導くことで、子宮頸癌の発生に貢献しているという報告もあり⁷⁾、二面性を呈している Notch1 の生物活性に関しては今後詳細な検討が必要である。同時に、子宮頸癌以外の上皮癌においても p53 の変異が Notch1 癌抑制遺伝子の不活化を介して発癌を促進する可能性もあり、さらなる解析を行う必要がある。

③ 複数の PDZ ドメイン含有タンパク質の標的化

E6 と E7 は、それぞれ齧歯類株化細胞をトランスフォームし造腫瘍性を与えることが知られている。子宮頸癌から分離される高リスク型 HPV の E6 タンパク

※1 扁平上皮化生

子宮頸部においては扁平、円柱上皮接合部 (squamo-columnar junction) が女性ホルモンの影響により年齢とともに移動するが、単層円柱上皮が予備細胞の増殖により扁平上皮化することを扁平上皮化生とよぶ。HPV は子宮頸部の扁平上皮にも感染するが癌化の頻度は低い。この解剖学的に特異な領域の基底細胞に HPV が感染することが子宮頸部上皮内腫瘍性病変 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) の形成、子宮頸癌の発生につながると思われる。

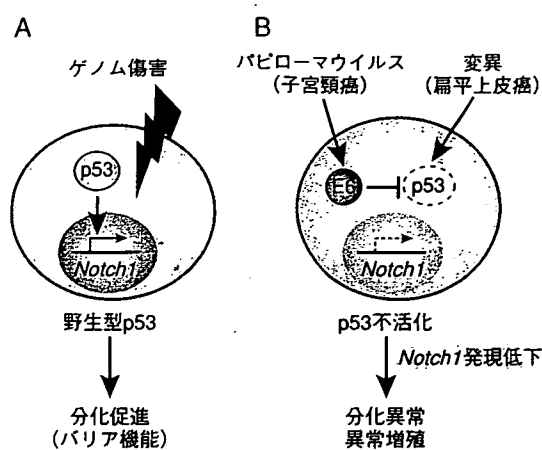


図 2 p53 依存性の Notch1 発現誘導と子宮頸癌における Notch1 下方制御のもつ生物学的意義

A) 正常上皮角化細胞にゲノム傷害がもたらされると、p53 は Notch1 遺伝子発現を活性化し分化を誘導する。これは生体がつまみバリア機能である可能性がある。すなわち、p53 は分化促進によってゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系列から排除しつつ、一過的に表皮層を厚くすることで UV などのさらなるストレスから防御をはかっている可能性がある。この p53 の応答は重層扁平上皮組織における新たなゲノム監視機構として機能しているのかもしれない。B) HPV による子宮頸癌発症においては、高発現する E6 によって p53 の不活化と同時に Notch1 癌抑制遺伝子の発現が抑制されており、細胞は分化に対する抵抗性と異常増殖能を獲得する可能性がある。また、子宮頸癌以外の上皮癌においても p53 の変異が Notch1 癌抑制遺伝子の不活化を介して発癌を促進している可能性がある。

質の C 末端にはすべて PDZ ドメイン結合モチーフが保存されており、トランスフォーミング活性およびヌードマウスでの腫瘍原性に必須である。また、E6 トランスジェニックマウスにおける皮膚の過形成誘導は、PDZ ドメイン結合モチーフに依存している。これまでに、DLG, Scrib, MAGI-1, -2, -3, MUPP1 などの PDZ ドメイン含有タンパク質が、E6 と結合し分解促進される標的タンパク質候補として報告されている。これらのタンパク質群は細胞極性の維持や細胞間接着装置の形成などにかかわっていると考えられており、E6 による分解促進は上皮-間葉転換を誘導し、トランスフォーメーションを引き起こす可能性がある。しかしながら、いずれの標的分子についても、その子

宮頸癌発生における生物学的意義は未解明である。

2 E7の新たな機能

① p600との相互作用

E7のN末端側にはSV40の大型T抗原やアデノウイルスのE1Aにも保存された領域CR1とCR2がある。CR2にはLXCXEモチーフがあり、これを介してRBファミリータンパク質に結合し不活化している。最近、E7はCR1を介してp600と相互作用することが示された⁸⁾。RBファミリータンパク質と結合できるがp600と結合できないE7変異体ではトランスフォーミング活性が失われていること、また子宮頸癌細胞株においてp600をRNAiによってノックダウンすると足場非依存性の増殖が阻害されることから、p600との相互作用はE7のトランスフォーメーション能にとって必須な役割をもつことが示唆される。しかし、E7がp600の機能をいかに修飾しているのかについては今後の課題である。

② 新規標的因子群

E7の主要な標的であるRBは、P/CAFアセチル・トランスフェラーゼによってアセチル化を受け、細胞周期からの離脱と細胞分化に機能することが示されている⁹⁾。E7は、このP/CAFと相互作用し活性を阻害することが報告されており¹⁰⁾、RBの不活化と合わせて、角化細胞の分化抑制につながる可能性がある。また、P/CAFはp53の転写共役因子としても機能することから、P/CAFの不活化は間接的に前述のp53による分化誘導経路を阻害する可能性もある。

E7は他にもRBファミリータンパク質の不活化やPP2Aとの結合・機能抑制を介してAktの活性化を誘導する¹¹⁾¹²⁾。また、アポトーシスや細胞老化の阻害に働くDEK遺伝子の発現を亢進したり¹³⁾、PMLと相互作用してPMLによる細胞老化を回避する機能¹⁴⁾も有しており、これらの活性はE7によるトランスフォーメーションに関与している可能性がある。

3 E6, E7による染色体不安定性の誘導

染色体不安定性に由来する細胞性遺伝子異常の蓄積

は多くの癌において重要な機構である。E6, E7は、それぞれ独立した機構で短期間に染色体不安定性を誘導することが知られている¹⁵⁾。

詳細な機構は不明だが、E7によるサイクリンA、E/CDK2の制御を介して、中心体のover-duplication(過剰複製)が生じる¹⁶⁾¹⁷⁾。これにより、有糸分裂時に複数の紡錘体極が形成される。また、E6によってG2/Mチェックポイントが無効化されるため、複数の紡錘体極形成による染色体の分配異常を伴ったまま細胞質分裂が進行し、異数体が出現する。また、これも詳細な機構は不明だが、E6, E7発現細胞においてDNA損傷が蓄積した状態で細胞周期が進行すると、分裂後期に染色体(おそらく染色体末端部)間で橋状構造(anaphase bridge)が形成され、bridge-breakage(架橋-DNA切断)サイクルが反復されることによって染色体の構造異常が引き起こされる¹⁸⁾。これらの機序を介して、E6, E7による染色体不安定性が誘導され、染色体異常がもたらされる。他にも、E6, E7によって、Aurora A, Plk1, SurvivinといったG2/M期タンパク質群の高発現が観察されており¹⁹⁾、染色体の不安定化に関与している可能性がある。

4 E6, E7の高発現に至る機構

—ウイルスゲノムの組込みとE2からの開放

HPVは重層扁平上皮組織の基底細胞に潜伏感染し、細胞の分化とともに溶解感染状態に入り、ウイルスゲノム複製とキャプシド構造タンパク質の発現によりウイルス粒子を産生し、上層の最終分化細胞と共に脱落するという生活環をとっている。したがって、ウイルス血症を起こさないため免疫監視機構が働きにくく、感染が持続しやすい。それでも、あらたなHPV感染の多くは1年以内に排除され自然治癒する。しかし、一部の症例では、何らかの理由により持続感染状態が続く(図3)。E6, E7はIRF(interferon regulatory factor)の機能抑制など免疫監視機構から積極的に逃れる機能を有しているため、E6, E7を安定発現する段階に入った前癌細胞はより存続し続けることになる。すなわち、異形成が宿主の免疫機構によって排除されるより早く、HPVゲノムDNAの染色体への組込

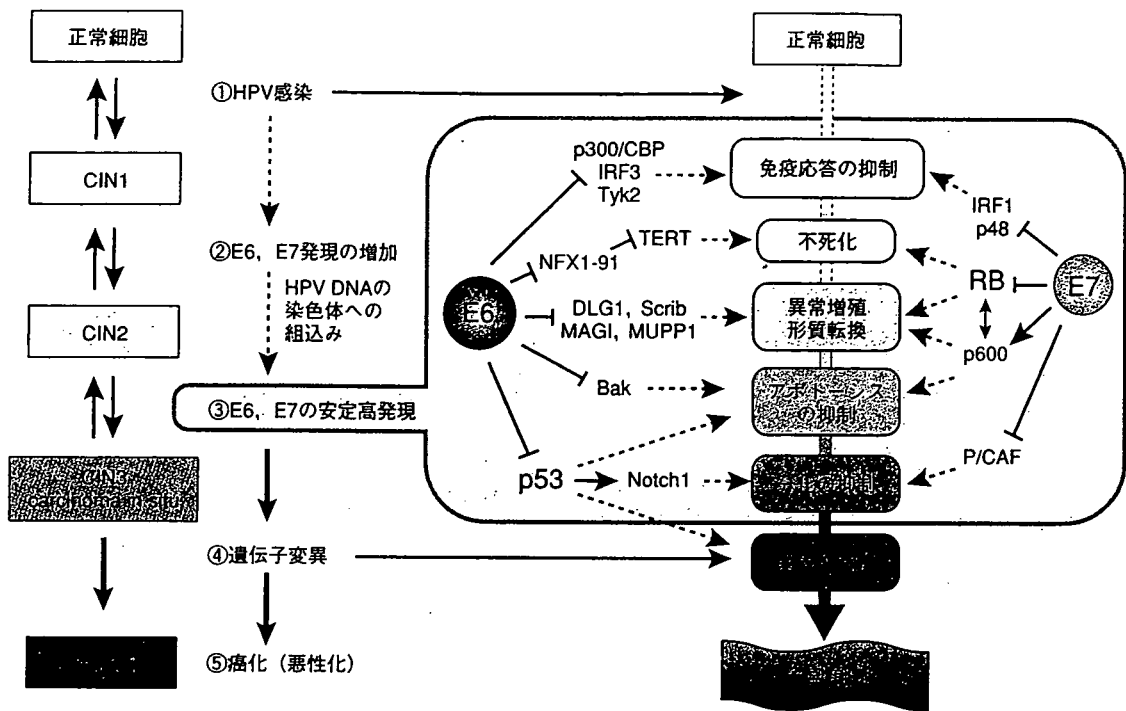


図3 HPVによる子宮頸癌の発生機構

大部分のHPV感染は自然治癒するが、宿主免疫監視機構を逃れHPV感染が持続するとCIN1(微細な異形成)病変が形成される。持続感染の後、HPVゲノムDNAの染色体への組込みとE2の欠失変異により基底細胞におけるE6とE7の発現が増加すると、その細胞は不死化・形質転換・アポトーシスの抑制・分化の抑制・遺伝子変異の蓄積といった癌化に必要な多くのステップを一度に踏破しCIN2(中等度異形成)からCIN3(高度異形成)へと進行する。RBとp53が不活化してテロメラーゼ活性をもつことで細胞が不死化し異常増殖を行う間に、染色体不安定性による遺伝子変異の蓄積が起き、増殖優位性を獲得したクローナルな癌細胞集団が出現すると考えられる

みなどによりE6とE7を高発現する細胞が出現することが、癌化にとって必須でありかつ律速段階となっていると考えられる。

この染色体上の組込み位置に関して、後述するようにc-myc近傍に組込まれ遺伝子増幅したと思われる例が報告されている²⁰⁾。しかしながら、多くの組込みはゲノム全域で起きており、挿入変異の証拠も見つかっていない。

癌細胞から見つかるHPVゲノムの組込みパターンには共通の特徴がある。E6, E7遺伝子とそのプロモーターは必ず存在し、同じプロモーターから転写されるE2遺伝子には必ず欠失変異が見つかる。したがって、組込み後の主要ウイルス転写産物はE6とE7をコードし、3'-非翻訳領域は細胞側遺伝子由来となり、多

くの場合mRNAの安定性が増すことが知られている。E2は、ウイルス遺伝子の発現を制御する転写因子であり、少なくとも染色体に組込まれたE6E7プロモーターに対しては抑制的に働くことがすでに知られており、Brd4がこの転写抑制における共役因子として機能することが最近明らかになった²¹⁾。さらに、E2はE6²²⁾、E7²³⁾との直接結合を介してこれらの機能を阻害することも報告された。E2遺伝子を子宮頸癌細胞株に再発現させると増殖阻害が誘導されることから、E2の発現消失とE6, E7の安定発現は癌化への進行のみならず癌形質の維持に必要であることが示される。また、HPVゲノムの組込み初期にはエピソードHPV DNAも共存すると考えられる。E1とともにE2はE6E7プロモーター領域にある複製起点に働き

onion skin 型の複製^{*2}をもたらす可能性がある。このような細胞では、E6E7領域の増幅や転座などのゲノム異常が起きる一方、その程度に応じてアポトーシスが誘導されると考えられる。実際にHeLa細胞の染色体を詳細に解析すると*c-myc*近傍に組み込まれた8q24領域のHPV18ゲノムが*c-myc*とともに増幅し、増幅領域の転座が複数回にわたって起きていることが推定される²⁴⁾。一方でSiHa細胞^{*3}のようにHPV16 DNAが1コピーのみ組み込まれている癌細胞もある。組みみに依存したゲノム異常の他にいったんE6とE7が高発現すると、染色体不安定性が短期間に誘導され細胞性遺伝子の変異が蓄積し、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化などにより増殖優位性を獲得したクローナルな細胞集団が出現し、癌化へと進行すると推測される(図3)。実際にヒト正常角化細胞に子宮頸癌で発現している程度のE6とE7を発現させ、三次元培養すると高度異形成に準ずる組織像が得られる。

HPVトランスジェニックマウスを用いた子宮頸癌モデルの解析から、重層扁平上皮組織の基底細胞におけるE6、E7の発現に加えエストロゲンが子宮頸癌の発生と悪性化に寄与していることが示された²⁵⁾。また、臨床サンプルの疫学的解析から正常組織や前癌病変ではみられなかったアロマターゼ(アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素)の発現が約35%の子宮頸癌においてみられており、このアロマターゼの発現誘導はエストロゲン受容体の発現亢進と相関することがわかった²⁶⁾。さらに、HPV陽性子宮頸癌由来細胞に対して特異的に、外来導入したアロマターゼがエストロゲン受容体の発現とE6、E7の高発現の誘導ならびに足場非依存的な細胞増殖能の亢進を引き起こすことが示された。一方、BRCA1はエストロゲン受容体遺伝子発現に抑制的に働くことが知られているが、E6とE7はBRCA1と直接結合しこの転写抑制を解除することができる²⁷⁾。これらのことから、アロマターゼ

の発現誘導とエストロゲン刺激がE6、E7の発現と協調して子宮頸癌への進行におけるリスク因子となっていることが示唆される。

おわりに

E6、E7の発現だけでは、ヒト正常上皮細胞を癌化するには不十分であることはすでに述べたとおりである。これまでに、子宮頸癌細胞において*H-ras*の変異、*PIK3CA*、*c-myc*、*ErbB2*、*cIAP1*の増幅、*PTEN*、*TSLC1*の発現低下といったいくつかの遺伝子変化が見出されており、癌化における関与が示唆されているが詳細は不明である。子宮頸癌の発生に関与する遺伝子変化を同定するため、子宮頸部由来の正常細胞をもとに、E6、E7をはじめ癌化との関連が指摘されている種々の遺伝子を導入し腫瘍原性を評価する必要がある。この*in vitro*で子宮頸癌を再構成する系は、実際の個体内における変異蓄積過程を短期間に模倣する系ともいえる。これらの細胞性遺伝子の変化も、実はE6とE7による染色体不安定性の結果促進され*in vivo*で選択されたものと考えられることから、E6、E7は子宮頸癌発生において事実上唯一の原因と捉えることができる。この点において、E6、E7の安定高発現をもたらすHPVゲノムDNAの染色体への組み込みは、HPV感染後、発癌における最大のリスク因子であると考えられ、今後詳細な機構解析が必要である。

子宮頸癌の予防に関して、特定の高リスク型HPVに対するワクチン(Merck社の対HPV-6、-11、-16、-18ワクチンGARDASIL、GlaxoSmithKline社の対HPV-16、-18ワクチンCervarix)が開発されている。これらのワクチンは海外の臨床試験では期待通りの効果をあげており、GARDASILは2006年6月にFDAに承認され、日本でも臨床試験が開始されている。こ

※2 onion-skin 型の複製

1つの複製起点から複数のDNAループが形成される複製様式。SV40 DNAなどが宿主染色体に組み込まれ、ウイルスゲノムの複製起点より複製が開始される場合にみられる。ウイルスゲノム複製の反復に伴って隣接する染色体上のDNA配列も過剰に複製されることによるため、遺伝子増幅をもたらす原因になる可能性がある。

※3 SiHa細胞

子宮頸癌由来の細胞株。高リスク型のHPV16陽性で、1細胞当たりHPV16 DNAを1コピー有する。他に、子宮頸癌に由来する細胞株の例としてCaSki細胞、HeLa細胞があるが、これらはそれぞれHPV16 DNAを約200~400コピー、HPV18 DNAを約50コピー有している。いずれも、E2の発現導入やE6E7転写産物に対するRNA干渉などによってE6E7の発現を抑制すると、少なくともp53、RB経路が再活性化し、増殖停止が誘導される。

これらのワクチンは型特異性が高く HPV-16, -18 の感染による子宮頸癌 (約 70%) には効果が期待できるがその他の型の HPV 感染には効果が弱いか全くない。ワクチンは 3 回の接種が必要で、4 年を超える感染予防効果はまだ確認されていない。ワクチンの接種率が 100% であっても検診やあらたな治療・予防法の開発が必要であることはいうまでもない。

今回紹介した HPV 研究の例からも明らかのように、ウイルスによる発癌機構の研究はウイルス発癌に限局されず広く発癌機構の解明につながるもので、正常細胞のもつ増殖・分化・老化・細胞死といった基本的生命機能の根底理解に通じる架け橋ともいえよう。

文献

- 1) zur Hausen, H. : Nature Rev. Cancer, 2 : 342-350, 2002
- 2) Gewin, L. et al. : Genes Dev., 18 : 2269-2282, 2004
- 3) Veldman, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 8211-8216, 2003
- 4) McMurray, H. R. & McCance, D. J. : J. Virol., 77 : 9852-9861, 2003
- 5) Nicolas, M. et al. : Nature Genet., 33 : 416-421, 2003
- 6) Talora, C. et al. : Genes Dev., 16 : 2252-2263, 2002
- 7) Veeraraghavalu, K. et al. : J. Virol., 79 : 7889-7898, 2005
- 8) Huh, K. W. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 11492-11497, 2005
- 9) Nguyen, D. X. et al. : EMBO J., 23 : 1609-1618, 2004
- 10) Avvakumov, N. et al. : Oncogene, 22 : 3833-3841, 2003
- 11) Menges, C. W. et al. : Cancer Res., 66 : 5555-5559, 2006
- 12) Pim, D. et al. : Oncogene, 24 : 7830-7838, 2005
- 13) Wise-Draper, T. M. et al. : J. Virol., 79 : 14309-14317, 2005

- 14) Bischof, O. et al. : Mol. Cell. Biol., 25 : 1013-1024, 2005
- 15) Duensing, S. & Munger, K. : Int. J. Cancer, 109 : 157-162, 2004
- 16) Duensing, S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 10002-10007, 2000
- 17) Duensing, A. et al. : Oncogene, 25 : 2943-2949, 2006
- 18) Duensing, S. & Munger, K. : Cancer Res., 62 : 7075-7082, 2002
- 19) Patel, D. et al. : Cancer Res., 64 : 1299-1306, 2004
- 20) Ferber, M. J. et al. : Cancer Genet. Cytogenet., 154 : 1-9, 2004
- 21) Wu, S. Y. et al. : Genes Dev., 20 : 2383-2396, 2006
- 22) Grm, H. S. et al. : Oncogene, 24 : 5149-5164, 2005
- 23) Gammoh, N. et al. : J. Virol., 80 : 1787-1797, 2006
- 24) Macville, M. et al. : Cancer Res., 59 : 141-150, 1999
- 25) Brake, T. & Lambert, P. F. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 2490-2495, 2005
- 26) Nair, H. B. et al. : Cancer Res., 65 : 11164-11173, 2005
- 27) Zhang, Y. et al. : J. Biol. Chem., 280 : 33165-33177, 2005

参考文献

「わかる細胞周期と癌」(田矢洋一/編), 2章3) p93-101. イラスト医学&サイエンスシリーズ, 羊土社, 2000

Profile

筆頭著者プロフィール

温川 恭至 : 1998 年筑波大学大学院生物科学研究科にて学位を取得後、理化学研究所奨励研究員を経て、'99 年から約 4 年間米 NIH, NCI-Frederick にて外来研究員。この間一貫して、マウスレトロウイルスによる白血病誘導の分子機構に関する研究を続けた。2003 年から国立がんセンター研究所ウイルス部研究員。HPV E6 タンパク質の機能解析をもとに、上皮角化細胞の増殖・分化機構に関する研究に臨んでいる。

辞書としても、教科書としても使える便利なガイドブック! 発行 羊土社

阻害剤 活用ハンドブック

好評発売中

作用機序・生理機能などの重要データがわかる

編/秋山 徹 (東京大学分子細胞生物学研究所)
河府和義 (東北大学加齢医学研究所)

■ 定価 (本体 4,600円+税) ■ B6判 ■ 469頁 ■ ISBN4-7581-0806-4



特集

子宮頸癌発生の予防に向けての戦略

3. 子宮頸癌の発癌分子機構に関する overview

清野 透

国立がんセンター研究所ウイルス部

Key Words/p53, Rb, テロメラーゼ

要旨

一般に癌細胞では、p53 経路の異常、Rb 経路の異常、テロメラーゼの活性化が高頻度に認められる。HPV 陽性の子宮頸癌では E6 と E7 遺伝子の発現に依存してこれら 3 つの異常が獲得されている。そのため、E6 と E7 の発現は癌化のみならず癌形質の維持にも必要であり、HPV 陽性の子宮頸癌細胞から E6 と E7 の発現や機能を抑えることができれば、癌細胞の増殖を止めることができる。

はじめに

子宮頸癌発生の予防に向けての戦略を練るには、子宮頸癌発生の分子機構を理解することが必要である。本稿では、子宮頸癌の 90%以上を占めるヒトパピローマウイルス (HPV) 陽性子宮頸癌を対象に、HPV の特徴と子宮頸癌発生の分子機構を概説し、どのような予防法が有効かを考えるうえでの基盤を提供したい。

HPV 感染と子宮頸癌の因果関係

子宮頸癌の 90%以上からは特定の型 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 型など) の内、いずれかの HPV DNA が検出され、そのうち、約半数は 16 型である。癌細胞中ではウイルス遺伝子のうち、E6 と E7 が必ず発現しており、この 2 つが癌化および癌形質の維持における責任遺伝子であることは疑いない。E6 と E7 は癌細胞内で p53 と RB を不活化しているが、HeLa などの子宮頸癌由来の培養細胞株で、これらの発現を阻害すると、細胞の増殖はほぼ完全に停止する。ほかの癌では高頻度に見られる p53 の

変異や p16^{INK4a} の発現低下が子宮頸癌ではほとんど見られない。また、通常の癌に比べ、好発年齢が若い。これらはすべて HPV 感染と E6, E7 の発現が子宮頸癌発症の主要な原因であることを示している。HPV 感染を伴わずに発生する子宮頸癌は多く見積もっても 10%以下である。将来、仮にワクチンなどで HPV が撲滅されれば子宮頸癌の罹患数は現在の 10%以下となる。

ウイルスの構造と生活環

HPV は約 8,000 塩基対からなる小型の 2 本鎖 DNA ウイルスである (図 1)。HPV は傷などを介し、扁平重層上皮の基底細胞の $\alpha 6$ インテグリンに接着し、感染する²⁾。感染した基底細胞の核内では 50 ~ 100 コピーのウイルスゲノムが複製維持される。ウイルスゲノムの複製や分配には E1 と E2 が重要な働きをしている。E2 は転写因子として複製起点近傍にあるウイルスプロモーターに結合するとともにヘリケースである E1 を複製起点にリクルートする。E2 は E6 にも結合し、相互に発現・機能を修飾しあっているようである³⁾。さらに、Brd4 との結合を介して細胞分裂時にウイルスゲノムを宿主染色体につなぎ止める働きをもつ³⁾。細胞の分化に伴い、潜伏感染状態にあったウイルスは溶解感染状態に入り、ウイルスゲノムは数百倍から数千倍に複製増幅される。また、キャプシド蛋白質 L1, L2 の発現が誘導され、ウイルスゲノムは正 20 面体からなるキャプシド蛋白質に包まれ、ウイルス粒子が形成される。すなわち、HPV は同一病変部位において宿主組織幹細胞で潜伏感染しながら分化細胞では溶解感染を起こし、ウイルス粒子を放出することができる。また、抗原性の高いウイルス粒子は、免疫防御機構の働きにくい粘膜表層あるいは皮膚角化層で初めて形成されるため、免疫学的にも排除されにくい。

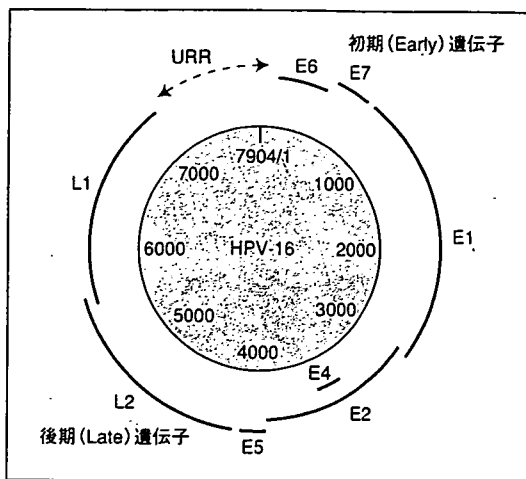


図 1 HPV-16 のゲノム構造

パピローマウイルスは環状 2 本鎖 DNA をゲノムに持つ。URR (upstream regulatory region あるいは LCR (long control region) と呼ばれる領域には複製起点やプロモーターが存在する。便宜上、決められた第 1 番目の塩基は多くのパピローマウイルスで Hpa I 認識配列に相当し、ヘリケースである E1 の結合配列 (複製起点) であった。E1 は E2 の助けを借りて環状の 6 量体 2 つを形成し、2 本鎖 DNA を解すとともに複製に必要な DNA ポリメラーゼ、プライメラーゼ、RPA などをリクルートする。E7 はそれらの細胞因子の転写を活性化する (本文参照)。L1, L2 はキャプシド蛋白質をコードする。その転写と mRNA の安定化には細胞の分化特異因子が必要である。

このような特異な生活環により、HPV は同一感染巣から長期間ウイルス粒子を産生し続けることができる。

HPV 感染から子宮頸癌発生まで

HPV 感染から子宮頸部扁平上皮癌の発生過程を概観してみよう。HPV が病変を形成するには上皮幹細胞に感染する必要がある。扁平重層上皮から単層円柱上皮へ移行する子宮頸部の SCJ (squamocolumnar junction) は解剖学的にも HPV 感染の標的として申し分ない。基底細胞に HPV が感染してから数週間程度で HPV が産生

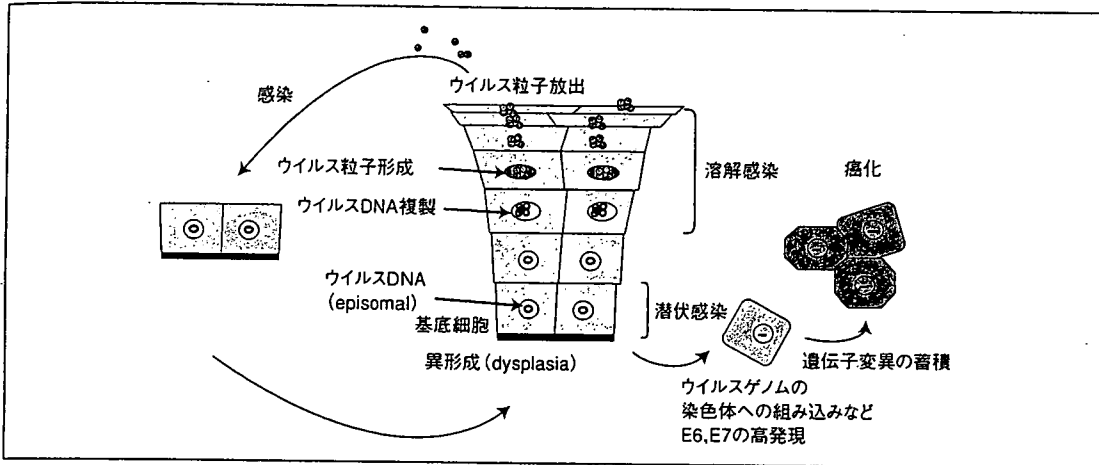


図2 パピローマウイルスの生活環と癌化

基底細胞が分裂すると1つは基底細胞層に留まり、もう一方は第2層へと押し出されていく。基底細胞が分裂するたびに上方へと押し出される細胞は最終分化へと向かい、やがて表皮あるいは粘膜の表面から剥がれ落ちていく。したがって、パピローマウイルスが病変を維持するためには基底細胞に感染する必要がある。パピローマウイルスは宿主細胞の分化と共に爆発的なウイルスゲノム複製と capsid 蛋白発現によりウイルス粒子を産生し、分化した粘膜あるいは表皮細胞と共に剥がれ落ちる。ウイルスが潜伏感染状態にある基底細胞においてはE6とE7の発現は低い、細胞DNAへの組み込みなどによりこれが高くなることが癌化への岐路になると考えられる。

(文献(14)より改変)

され、微細な CIN1 (mild dysplasia) 病変を形成しているはずであるが、肉眼病変として検出されるには被感染細胞が基底(細胞)層で一定以上の面積を占める必要がある。あらたな HPV 感染の多くは1年以内に自然治癒すると考えられているが、CIN1の一部は持続感染し、CIN2 (moderate dysplasia) ~ CIN3 (severe dysplasia, carcinoma in situ) へと進行する。CIN1では基底細胞におけるE6とE7を含めたウイルス遺伝子発現は低く、分裂により基底層を離れた細胞の分化に伴いウイルス遺伝子発現が増加する。細胞分裂像はほぼ基底細胞層に限られる。これに対し、CIN2 ~ CIN3への進展に伴い、基底細胞でのE6とE7の発現は次第に増加し、これに由来する細胞は傍基底細胞層や有棘細胞層でも分裂像を示すようになり、病変全体がよりクローナルな細胞集団へと置き換わってゆく(図2)。この病変の進行に伴う変化としては、宿主染色体へのHPV DNAの組み込みが知られており、多くのCIN3やほとんどの子宮頸癌

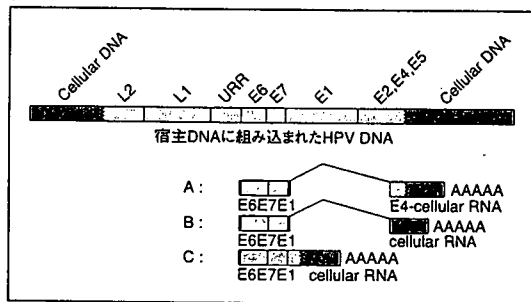


図3 細胞DNAに組み込まれたHPV DNAからの転写

宿主DNAに組み込まれたHPV DNA由来のmRNAは、A、B、Cいずれかのパターンに分けられるが、いずれもE6とE7のみが発現される。このような組み込まれ方をした細胞のみがクローナルに増殖してくると考えられる。このようなmRNAはAPOT (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts) 法により比較的簡単に検出できる¹⁹⁾。

症例から染色体へ組み込まれたHPV DNAが検出される。組み込まれた領域から転写されるmRNAは3つのパターンに分けられるが、いずれもE6とE7のみが発現される(図3)。実際、E6とE7を高発現させたケラチノサイトを3次

元培養すると CIN3 に匹敵する組織像を示す。E6 と E7 の高発現は短期間に染色体不安定性誘導による染色体異常をもたらす。これらの細胞の中から癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化などにより、さらに増殖優位性を獲得した細胞集団が出現する。こうした繰り返しを経て癌細胞が出現すると考えられる。この中で、最も確率的に起きにくいステップは染色体への組み込みなどによる E6 と E7 の高発現細胞の出現で、その後のステップはかなりの確率で進行していくのではないかと筆者らは推測している。HPV の“リスク”を規定しているのは、後述する E6, E7 の生物活性の強弱や免疫逃避機構のほか、染色体への組み込み頻度も関係しているかも知れない。エストロゲンは子宮頸癌のリスク因子の1つであるが、E7 あるいは E6E7 トランスジェニックマウスモデルでは子宮頸癌の発生と進展に寄与していることが示されている⁹⁾。子宮頸部腺癌からは HPV16 のほか、HPV18 DNA が相対的に高頻度に見つかるが、この場合も幹細胞における HPV DNA の組み込みと E6, E7 の高発現が重要であると考えられる。E6 と E7 の高発現に加え、子宮頸癌では、PIK3CA, myc, ErbB2, cIAP1 の増幅、ras の変異、PTEN, TSLC1 の発現低下などが報告されている。

HPV 感染と癌化における E6 と E7 の働き

では、E6 と E7 の既知の機能を概説し、癌化と癌形質の維持に関わる機能をウイルスの生活環における意義と対応させながら推測してみよう。

1. E7 による RB ファミリー蛋白質の不活化

E7 蛋白質は RB ファミリー蛋白質と直接結合し、その機能を阻害することが知られている

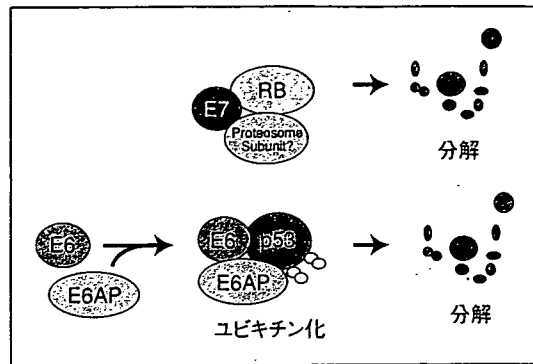


図4 E6 と E7 による p53 と RB の不活化機構

E6 は細胞のユビキチンリガーゼ (E3) の一つである E6AP と結合する。E6 あるいは E6AP それぞれ単独では p53 にはほとんど結合しないが、両者の複合体は p53 と結合し、E6AP のユビキチンリガーゼ活性により p53 をユビキチン化する。ユビキチン化された p53 はプロテオソームに認識され分解を受ける。E6-E6AP 複合体による p53 のユビキチン化は HDM2 と異なり、p53 のリン酸化や p14^{ARF} により阻害されないため、p14^{ARF} が誘導されたり DNA 損傷により p53 のリン酸化が起きても E6 発現細胞では p53 のレベルは低く保たれる。E7 は N 末の LXCXE モチーフを介して RB と結合し、また、分解も促進することが知られている。しかし、E6AP に相当するユビキチンリガーゼは同定されていない。E7 は 26S プロテオソームの S4 サブユニットと結合により RB をプロテオソームによる分解に導いている可能性も示唆されている。

(図4)⁹⁾。E7 蛋白質は約 100 アミノ酸から成り、1つの Zn フィンガードメインをもつ。一部の例外を除いてパピローマウイルスの E7 の N 末側には SV40 などのポリオーマウイルスの大型 T 抗原やアデノウイルスの E1A にも保存された領域 CR1 (conserved region 1) と CR2 (conserved region 2) とがある⁹⁾。これらのウイルス蛋白質は CR2 に保存された LXCXE モチーフ (L:ロイシン, X:任意のアミノ酸, C:システイン, E:グルタミン酸) を介して RB ファミリー蛋白質に結合する。HPV16 など高リスク型 HPV の E7 は RB の分解をも促進する。細胞には HDAC1, 2, Brg1 といったヒストン修飾やクロマチンリモデリングにかかわる蛋白質が、LXCXE または類似モチーフを持っており、RB

の B ポケットと呼ばれるドメインを介して結合することが知られている。転写因子 E2F は, A, B ポケットの両方を介して RB と結合する。E7 は CR1 にも RB との弱い結合活性があり RB と E2F の結合阻害にはこの領域が必要だとされている。正常細胞が G1 期から S 期に進入する際には, RB はリン酸化され不活化される。RB を最初にリン酸化するのはサイクリン D と CDK4 (または 6) の複合体であるが, サイクリン D 自身も LXCXE 類似モチーフを介して RB と結合する。CDK4 (または 6) インヒビターの 1 つである p16^{INK4a} はこのサイクリン D/CDK4 複合体と結合し, RB のリン酸化 (不活化) を抑

える。E7 などによる RB の不活化は p16^{INK4a} の高発現を誘導するが, RB 自身が E7 により不活化されているため, 細胞は p16^{INK4a} を高発現したまま増殖する。したがって, p16^{INK4a} の高発現は E7 の高発現を反映しており, CIN3 や浸潤癌のよいマーカーとなることが示されている。

HPV の生活環を考えた場合, ウイルスゲノムの複製は本来細胞周期を抜け分化に向かう細胞で起きるため, そのままでは複製因子群の供給は期待できない。そこで, ウイルスは E7 により RB を不活化することで, ウイルスゲノムの複製に必要な DNA 複製関連遺伝子群の発現を誘導する戦略をとったと考えられる。このよう

表 1 E6, E7 の標的蛋白と機能との関連

推測 (観察) される生物学的機能		
E6	E6AP/p53	p53 の分解促進
	DLG	細胞間接着による細胞増殖抑制の解除?
	Scrib	細胞間接着による細胞増殖抑制の解除?
	MUPP1	細胞間接着による細胞増殖抑制の解除?
	MAGI-1, 2, 3	PTEN の機能制御?
	NFX1	テロメラーゼの活性化, 不死化
	paxillin	細胞骨格の破壊?
	ERC55 (E6BP)	細胞最終分化の抑制?
	IRF3	インターフェロンの誘導抑制
	Bak	アポトーシスの抑制
	Tyk2	インターフェロンによる応答抑制
	CBP/p300	細胞の分化抑制?
	MCM7	細胞 DNA 複製の制御?
E7	Rb, p107, p130	E2F 放出による G1/S 移行の促進
	Mi2	(ヒストン脱アセチル化酵素複合体)
	cyclin A	細胞周期の調節 (Rb を介した結合?)
	cyclin E	細胞周期の調節 (p107 を介した結合?)
	p27	cdk 活性阻害の解除
	p21	cdk 活性阻害の解除
	AP1 (c-jun, c-fos 等)	特定遺伝子の転写活性化
	TBP	特定遺伝子の転写活性化?
	TAF110	特定遺伝子の転写活性化?
	26S proteasome S4 subunit	Rb の分解促進?
	MPP2	特定遺伝子の転写活性化?
	hTid1	ゲノムの複製?
	p48	インターフェロンによる応答抑制
	M2 pyruvate kinase	解糖系酵素の活性調節
	p600	インテグリンを介した生存信号に関連?

にRBの不活化はウイルス増殖にとって不可欠な活性である。

E7にはRBファミリー蛋白質以外にも多くの標的蛋白質が同定されている(表1)。しかし、E7の生物学的活性の多くは、おおむねRB機能の不活化に依存していると考えられる。実際、E7と結合できない変異を加えた“正常”Rbのノックインマウスと、E7トランスジェニックマウスを掛け合わせると、E7により引き起こされていた異常がほとんど見られなくなる⁷⁾。

2. E6によるp53の不活化とアポトーシスの抑制

高リスク型HPVのE6はユビキチンリガーゼ(E6AP)と結合し、E6APの基質特異性を変えるアダプターとして機能し、p53などのユビキチン化と分解を促進する(図4)。E6の基本的な役割の1つは宿主細胞をアポトーシスから守ることであると考えられる。E7などによる異常なRBの不活化はアポトーシスを誘導する。E6はRBの不活化によるアポトーシス誘導を抑えることでウイルスの増殖を可能にしていると考えられる。また、高リスク型と低リスク型HPVのE6は共通して、アポトーシス誘導因子Bakや⁸⁾、ヒストンアセチラーゼであるCBP/p300とも結合する⁹⁾¹⁰⁾。CBP/p300は、p53やAP1、NF κ Bをはじめ、種々の転写因子と結合し、転写補助因子として働くが¹¹⁾、E6はp300によるp53のアセチル化の抑制を介して転写活性化能を抑制していることが報告された。したがって、高リスク型HPVのE6はp53の転写促進活性の抑制に加え、p53の分解を促進することで2重にp53を不活化する。

3. E6によるテロメラーゼの活性化

テロメラーゼの活性化は、ヒト癌で最も共通(約85%)に見られる変化である。E6や癌遺伝子c-mycはTERTの転写を活性化することでテロメラーゼ活性を誘導することができる。TERTのプロモーターやイントロンにはMyc結

合配列が多数存在する。Myc/Max複合体はこの配列に結合して直接TERTの転写を活性化するが、E6によるTERTの転写活性化機構は転写抑制の解除だと考えられている。一つの機構として、TERTプロモーターに結合し、転写抑制因子として働くNFX-1の91kDaアイソフォームがE6/E6APにより特異的に分解促進されることが報告されている。ウイルス学的に考察すると、1つの被感染細胞から肉眼的病変を作り長期間病変を維持するためにはテロメア長の短小化を抑えることが有利に働く可能性と、テロメラーゼの活性化がテロメア長非依存的に細胞増殖を活性化する可能性などが考えられる。

4. E6によるトランスフォーメーション

p53の不活化やテロメラーゼの活性化と独立して、E6には細胞をトランスフォームする活性がある。3Y1細胞の接触阻止能を抑え、NIH3T3細胞などにヌードマウスでの腫瘍原性を与えるほか、皮膚で特異的に発現するE6トランスジェニックマウスは皮膚の過形成や時に皮膚癌を引き起こす。これらの活性はE6のC末端にあるクラスIのPDZドメイン結合モチーフ

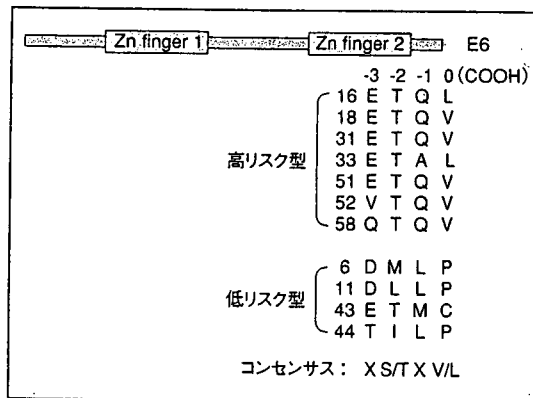


図5 高リスク型HPVのE6のC末に保存されたPDZドメイン結合モチーフ

子宮頸癌から分離される高リスク型HPVのE6蛋白質のC末にはすべてPDZドメイン結合モチーフが保存されている。これまでに、DLG, Scrib, MUGI-1, -2, -3, MUPP1などがこのドメインに結合し、分解促進されることが示されている。

フ (XS/TXV/L/I, X: 任意のアミノ酸, S/T: セリンまたはスレオニン, V/L/I: バリン, ロイシン, またはイソロイシン) に依存しており, このモチーフは低リスク型 HPV の E6 などにはいっさい保存されていない (図 5). このモチーフを介した標的蛋白質として DLG1, Scrib, MAGI-1, -2, -3, MUPP1 といった PDZ ドメインをもつ蛋白質群が同定されている. これらの PDZ ドメインを持つ蛋白質群は細胞極性の維持, 細胞分化を保証する不等分裂, 細胞間接着装置の形成, そこからの増殖抑制シグナルの伝達に関わっていると推測されており, E6 はこれらの蛋白質群の分解を促進することで, トランスフォーメーションや過形成を引き起こすと考えられる.

5. E6 による角化細胞の分化抑制

E6 は角化細胞の分化を抑制することが知られ

ている. この活性は E7 による RB 経路の不活化と協調して細胞周期を S 期へ向かわせるのに役立つと考えられる. その分子機構は不明だが, 複数の機構が関与していると考えられる. AP1 ファミリーなどの転写因子と E6 は共に CBP/p300 の CH3 ドメインを介して結合する. AP1 ファミリーは角化細胞の分化に重要だと考えられており, E6 はこれらの転写因子の活性を抑えることで分化を抑制している可能性が考えられる⁹⁾. 最近, 皮膚角化細胞において Notch1 が癌抑制遺伝子として機能していることが皮膚特異的遺伝子欠損マウスの解析により示された¹⁰⁾. すなわち, Notch1 を欠損させると皮膚の正常な分化が抑制され過形成が誘導される. Notch1 はこれまで癌遺伝子としての側面がよく知られていた. 子宮頸癌においては Notch1 が癌遺伝子として機能するという報告と癌抑制遺

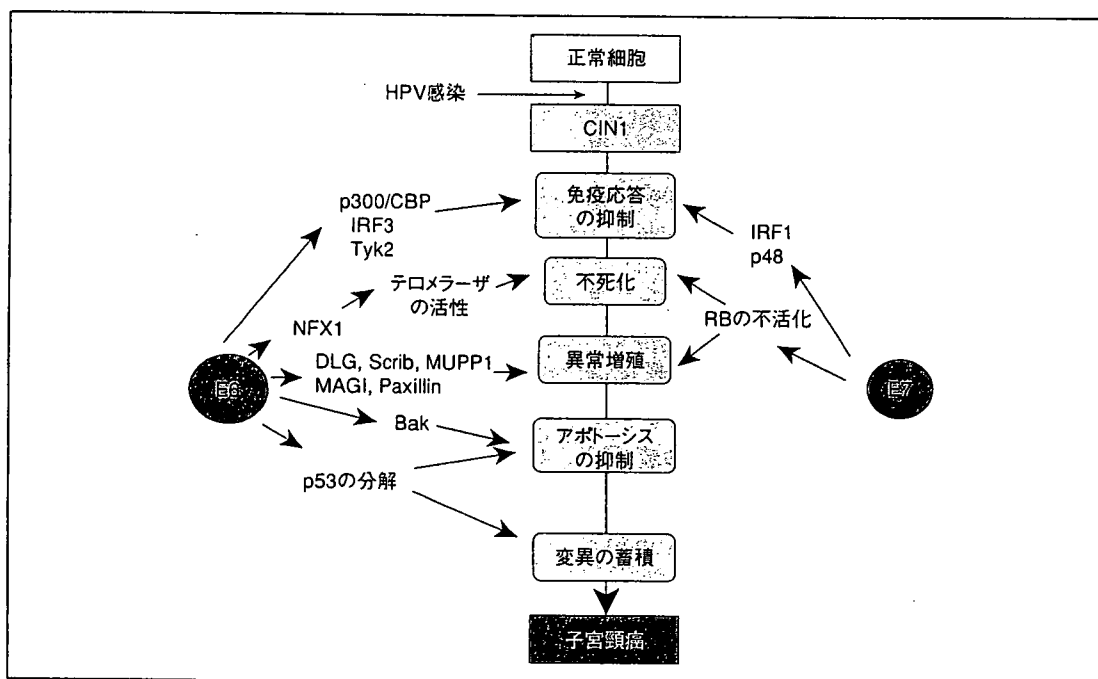


図 6 HPV による子宮頸癌の発生機構

HPV 感染が排除されないと CIN1 (mild dysplasia) 病変が形成される. 基底細胞における E6 と E7 の発現がいったん増加するとその細胞は癌化に必要なかなりのステップを一度に獲得することになる. RB と p53 が不活化しテロメラーゼ活性をもつ細胞がクローナルに異常増殖する間にさらなる変異の蓄積が起きると考えられる.

(詳細は本文参照)

伝子として機能するという一見相反する報告があり、Notch1の2面性を示しているのかもしれない。筆者らは子宮頸部角化細胞に活性型Notch1を発現させると細胞は増殖停止すること、E6を導入するとNotch1の発現が低下することなどを見つけており、E6によるNotch1シグナルの抑制も分化抑制機構の一つだと考えている。

6. E6とE7による免疫監視機構からの逃避
ウイルス蛋白質は外来性抗原であり、免疫監視機構の標的である。実際、HPV感染症は子宮頸部異形成を含め多くが自然治癒するが、AIDSや腎移植後の免疫抑制状態ではHPVの持続感染が問題となる。また、尖圭コンジローマの原因であるHPV6、11の母子感染により発症するRRP (recurrent respiratory papillomatosis) は、免疫寛容により自然治癒が期待できないために難治性となる。HPVが他のウイルスに比べ免疫学的に排除されにくい生活環を持っていることはすでに述べたが、E6とE7自身は免疫監視機構から積極的に逃れる働きも担っているようである(図6)。E6はIRF3 (Interferon regulatory factor 3) と結合し、インターフェロンの発現誘導を阻害する¹⁹⁾。また、E6とE7はTyk2, p48とそれぞれ結合してインターフェロンにより誘導される遺伝子群の発現を抑えることが報告されている。実際に、HPV感染病変ではMHC (主要組織適合性遺伝子複合体) クラスIの発現やランゲルハンス細胞やT細胞の数が減少しているという報告もある。コンジローマの治療に使われるイミキモドはTLR (Toll-like receptor) の活性化などを介してサイトカインの産生を促し、免疫監視機構を活性化させ、HPV感染巣の排除に寄与していると考えられている。

子宮頸癌予防と治療の将来

子宮頸癌の予防を発癌機構に基づいて考えると、1) 感染防御、2) 感染排除、3) 前癌細胞、癌細胞の排除、などが考えられる。これらのうち、現在最も進んでいるのは、1) の感染防御ワクチンであるが、これについては他稿に詳しいので、本稿では2)、3) の現状と将来の可能性についても考えてみよう(図7)。

HPV感染あるいはCIN1の大部分が自然治癒することを考えると、CIN1～2の持続感染者に対する免疫系の賦活化治療が期待できる。インターフェロンなどに加えイミキモドのような免疫系賦活修飾薬でさらに効果の高い薬剤が開発されれば、フォローアップのコストや患者の精神的負担の軽減が期待できる。CIN1に対してはE1, E2阻害薬など、ウイルスゲノムの複製を特異的に阻害するような薬剤も有効であろう。E2を標的とした治療ワクチンがCRPV (Cottontail rabbit papillomavirus) のモデルでは成功しており、既存のパピローマの消退や新たなパピローマ形成を抑制できることが示されている。それでも、子宮頸癌になる人は残る。子宮頸癌の治療は切除が基本であるが、進行癌では放射線療法、化学療法が主流となる。癌細胞としての形質維持をE6とE7が担っていることから、E6とE7は絶好の標的である。E6とE7を標的とした治療ワクチンはCRPVのモデルでは成功しており、すでに臨床試験も始まっている。E6とE7は外来抗原であり、癌特異抗原であるため特異性も高く期待も大きい。しかし、前述したように、E6とE7には自身の抗原提示やそれに引き続く免疫反応を抑制する機能が備わっており、種々の工夫が必要であろう。先に述べた免疫系賦活修飾薬との併用などが有効かも知れない。また、癌細胞におけるE6とE7の発現を止める治療も考案されている。RNA干渉