

2009240/4A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 忠仁

平成22(2010)年5月

目次

I. 総括研究報告	
ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 1
神田 忠仁	
II. 分担研究報告	
1. ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析	----- 5
神田 忠仁	
2. ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 8
川名 敬	
3. HPVの生活環の解明と、それを利用した抗腫瘍剤の探索	----- 12
酒井 博幸	
4. C型肝炎ウイルス(HCV)NS5A と相互作用し HCV 産生を調節する宿主因子の探索とその機能解析	----- 18
鈴木 哲朗	
5. 樹状細胞からみた C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染機構の解析	----- 22
林 紀夫	
6. C型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞株の樹立	----- 25
松浦 善治	
7. HCV の持続感染維持機構の解析	----- 28
加藤 宣之	
8. 初回献血者におけるがんウイルスマーカー陽性率の調査と輸血によるがんウイルス感染予防に関する研究	----- 34
内田 茂治	
9. ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 39
近藤 一成	
10. ウイルスを標的にした発がん予防の研究	----- 41
松本 光司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 49

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

研究代表者：神田 忠仁

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）のE6/E7癌遺伝子の感染細胞染色体への組み込みが子宮頸がんの、C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染が肝がんの原因となる。これらのウイルスの持続感染を阻止する実用的な方法の開発をめざした。主要な成果は以下のとおりである。

- 1) 15種の高リスク型HPV共通中和エピトープを応用した第二世代HPVワクチンの事業化に必要な周辺技術の整備を進め、ワクチン被験者血清抗体を定量する検出系を作った。我が国のHPV感染状況を正確に把握するために、multiplex-PCRで増幅したL1遺伝子断片を型特異的なDNAプローブと結合させてHPVを検出し、型を判定する方法を導入し、新たにHPVサーベイランスを進めた。
- 2) HPV16型陽性のCIN3病変に高発現しているE7蛋白質特異的細胞傷害性T cell（E7-CTL）の測定法を開発した。HPV16型E7蛋白質を菌体表面に提示している乳酸菌を経口投与する治療ワクチンを使った前癌病変治療の第I/IIa相臨床試験を開始した。
- 3) IFN治療でHCVを排除できなかったHCV慢性感染者4名の血清中のHCVゲノムを次世代シーケンサーによって包括的に解析し、IFN抵抗性に関わるHCV準種の存在を検討した。
- 4) 培養細胞で増殖するHCVJFH-1株では、NS5A蛋白質が、C末端領域のセリンリン酸化を経てCore蛋白質と結合し、粒子形成に至る。このリン酸化を担う3種類のセリンスレオニンキナーゼを同定した。
- 5) 日赤血液センターをベースに輸血を介したHIV、HTLV-1、HBV、HCV感染の調査を継続した。

研究分担者

神田忠仁 国立感染症研究所・センター長
川名 敬 東京大学医学部・助手
酒井博幸 京都大学ウイルス研究所・准教授
松本光司 つくば大学産婦人科・准教授
近藤一也 NTT東病院産婦人科・医師
松浦善治 大阪大学微生物病研究所・教授
鈴木哲朗 国立感染症研究所・室長
加藤宣之 岡山大学医学部・教授
林 紀夫 大阪大学大学院・教授
内田茂治 日本赤十字社血液事業本部・課長

ある。従って、ワクチンによって高リスクHPVの感染を防ぐか、潜伏感染に介入してHPVを排除すれば、子宮頸がんを予防できる。第一世代HPV感染予防ワクチンは、16、18型にしか効果がないため、高リスクHPV群の感染を一括して予防するワクチン抗原の開発を目的とした。HPVによる子宮頸部上皮高度異形成（CIN3）で高発現するHPV E7蛋白質を標的とするCTLを子宮頸部粘膜に誘導する治療ワクチンの開発を目的とした。HPVの潜伏感染に介入して、ウイルスを排除する方法を開発するために、HPV潜伏感染の分子機構を解析し、また、臨床材料に存在するE6遺伝子のわずかな変異（variation）と前癌病変推移の関連を調べた。

A. 研究目的

15種の高リスクHPVが子宮頸がんの原因で

高感度の検出系を使って、我が国で流行している HPV 型のサーベイランスを行い、感染実態の正確な把握をめざした。(神田、川名、酒井、松本、近藤)

C型肝炎ウイルス (HCV) は我が国の肝炎および肝がん 80%と関連している。HCV は肝細胞での増殖・再感染を繰り返すので、阻害剤の標的探索を念頭に、ウイルスの肝細胞への吸着・侵入からゲノムの複製、ウイルス粒子の形成に至るすべての素過程を詳しく調べた。IFN とリビピリンの併用療法の有効性は HL28 の遺伝子型で推定できるが、予想に反して HCV を排除できない患者では、IFN の効果を阻害する HCV 準種が存在すると仮定し、患者血清中の全ての HCV のゲノムの包括的な解析を進めた。(松浦、鈴木、加藤、林、神田)

輸血により伝播する HBV、HCV、ヒトリンパ球向性ウイルス (HIV、HTLV-1) の感染は発がんとも密接な関係がある。新規感染者のウイルス遺伝子を解析して、感染者の背景を明らかにし、輸血によるウイルス感染の実状把握を目的とした。(内田)

B. 研究方法

- 1) 次世代 HPV ワクチンの臨床試験を念頭に、被験者血清中の中和抗体を検出する ELISA 系を作製した。被験者の HPV 感染状況を解析するために、L1 遺伝子を標的にした multiplex-PCR 産物を型特異的な DNA プロブと結合させて HPV 型を判定する新たな高感度検出系を使い、HPV サーベイランスを行った。(神田、近藤)
- 2) HPV16型陽性の前癌病変LSILを持つ患者43例についてHPV16 E6領域のDNA変異をダイレクト・シーケンス法で調べ、病変の自然消退・進展との関連をKaplan-Meier法で解析した。(松本)
- 3) 子宮頸がん前癌病変 (CIN3) では HPV の E7 蛋白質が高発現している。HPV16 型陽性の CIN3 病変に存在する E7 特異的細胞傷害性 T cell (E7-CTL) の測定法を開発し、患者頸部の E7-CTL を検出した。乳酸菌に HPV16 型 E7 蛋白質を提示した経口型 HPV 治療ワクチンによる前癌病変治療の第 I/IIa 相臨床試験を、東京大学医学部産婦人科で開始した。(川名)
- 4) ヒト初代角化細胞に HPV16、18 型ゲノム DNA と選択用のプラスミドを同時に導入して三次

元培養し、表皮様構造を構築する系を開発した。E4、E5、E6、E7 内部に終止コドンを導入した変異体を作成し、ゲノムの複製効率を調べた。(酒井)

5) IL28 の遺伝子型では IFN 治療の有効性が示されたにもかかわらず HCV を排除できなかった HCV 慢性感染者の血清 (治療直前と治療後 1 週間) を入手し、含まれる HCV ゲノムを包括的に調べた。(神田)

6) HCV NS5A 蛋白質は C 末端領域のセリンがリン酸化されると Core 蛋白質と結合し、粒子形成の初期過程が進む。このリン酸化を担う細胞因子を探索した。410 種類のヒト蛋白質リン酸化酵素と NS5A の結合を試験管内で調べ (AlphaScreen 法)、強く結合した酵素による NS5A リン酸化を調べた。さらに遺伝子ノックダウンにより HCV 産生への影響を解析した。(鈴木)

7) 血清由来 HCV の細胞培養系の樹立を目指して、HCV の感染を高感度に検出可能な指示細胞株の樹立を試みた。ヒト免疫不全ウイルスと酵母由来の転写因子に HCV のプロテアーゼの切断配列を融合させたキメラ転写因子と、これら転写因子の認識配列の下流にレポーターの遺伝子を組み込んだインジケーター細胞を樹立した。(松浦)

8) HCV キャリア株である 1B-4 と 1B-5 株および急性肝炎症例由来の KAH5 株の HCV レプリコン複製細胞アッセイ系を使って、各種抗 HCV 剤 (IFN- α 、 γ 、 λ やスタチン剤、およびシクロスポリン) の活性を評価した。2年間培養した全長 HCV RNA 複製細胞 (O2) から IFN- α に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞 (O2r) を単離した。両細胞に含まれる HCV ゲノムと細胞の遺伝子発現を比較した。両細胞由来の Total RNA を O2 或は O2r 細胞由来の治療細胞に再度強制導入して得られた第 2 世代の全長 HCV RNA 複製細胞の IFN 感受性を調べた。(加藤)

9) HCV 感染による免疫機能低下の機序を明らかにするために、HCV replicon 複製細胞や JFH-1 を感染させた肝癌細胞株で、HCV の複製時にトレランスに関与するアミノ酸代謝酵素 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の変動を調べた。(林)

10) 東京都、茨城県、栃木県、神奈川県、福岡県の 5ヶ所の血液センターで、初回献血者を対

象に HBs 抗原、HBc 抗体、HCV 抗体、および HTLV-I 抗体の陽性率を調査した。(内田)

倫理面への配慮

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、「国立感染症研究所動物実験に関する基本方針」、「大学等における実験動物について」等を踏まえ、動物実験が適切に行われるよう配慮した。

患者試料を使う場合は、提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省より示された「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存した。

C. 研究結果

1) 抗 L2 抗体の中和活性は、L1/L2 キャプシドとの結合活性と平行した。臨床試験で得られる被験者血清中の中和抗体を、ELISA で短時間に簡便に測定できる。

子宮頸部擦過細胞 543 検体のうち 266 検体で HPV が検出された。検出頻度が高いのは、HPV52、16、58、56、51 であった。そのうち、30%で複数の HPV が検出された。(神田、近藤)

2) E6蛋白質のアミノ酸配列の変異のうち、25番目のアミノ酸が Asp である患者 (n=10) では Glu である患者 (n=33) よりも有意に病変が消失しにくかったが (12ヶ月後の病変消失率; 24% versus 72%, P=0.01)、病変の進展とは関連が見られなかった。(松本)

3) 粘膜型 E7-CTL が多いと病変が退縮する傾向があった。乳酸菌に HPV16 型 E7 蛋白質を提示した経口型 HPV 治療ワクチンによる前癌病変治療の第 I/IIa 相臨床試験は順調に進んでおり、一部の被験者に E7-CTL の誘導がみられた。これまで重篤な副作用は無い。ワクチンの至適量を決めるデータの取得をめざしている。(川名)

4) E4、E5、E6、E7 遺伝子は三次元培養された角化細胞での HPV ゲノム維持に関わらないことがわかった。また、間質細胞として用いた繊維芽細胞で Ras 経路下流の活性化が生じると、上皮組織の悪性形質が助長されることが分か

った。(酒井)

5) ロシユ社の次世代シーケンサー GS FLX を用いて、少量の血清中の HCV 塩基配列情報を包括的に取得するシステムをつくった。大量の配列情報から特定の領域の情報のみを抽出し、その領域の変異配列の種類と組成を明らかにする解析ツールを作った。シークエンシング解析で同定された準種の遺伝子断片をクローニングし、準種間の抗 IFN 活性を調べた。特定の NS5A 準種発現細胞で IFN の抗ウイルス作用の減弱が認められた。(神田)

6) 3 種類のセリンスレオニンキナーゼが NS5A をリン酸化し HCV 産生調節に関与することを見出した。このうち Casein kinase 2 はすでに NS5A リン酸化活性が報告されているが、他の 2 種類は HCV 生活環との関連が初めて示された。(鈴木)

7) HCV 感染インジケータ細胞株に JFH-1 株を感染させるところ、接種量依存的にレポーターの発現上昇が認められた。さらに、レポーターの発現は C 型肝炎患者血清や HCV のレセプター候補分子である CD81 に対する抗体により抑制された。C 型肝炎患者の血清中に存在する HCV の感染の検出を検討したが、現時点で有意なレポーターの発現は観察されていない。(松浦)

8) III 型 IFN λ による HCV レプリコンの複製抑制活性は HCV 株と細胞の違いによって異なることがわかった。(加藤)

9) HCV replicon 複製細胞等で HCV の複製に伴い IDO が発現した。HCV 感染者、非感染者の DC を炎症性サイトカインで刺激すると、トリプトファンをキヌレニンに分解する機能的な IDO が誘導された。HCV 感染者由来の IDO 発現 DC は、非感染者と比べて、より強く制御性 T 細胞を誘導し、これは IDO 阻害剤である 1-MT で回復した。(林)

10) 平成 11 年に導入したミニプール核酸増幅検査 (NAT) により、輸血による HBV、HCV、HIV 感染は大幅に減少した。平成 12、16 年のプールサイズの縮小と、平成 20 年の検査機器更新に伴う検体量の 200 μ l から 850 μ l への増加で検出感度が向上したが、平成 20 年には 4 例の輸血後 HBV 感染が確認された。(内田)

D. 考察

1) 第二世代 HPV ワクチン抗原の開発・事業化

は最終段階にあり、臨床試験が視野に入っている。L1/L2 キャプシド ELISA は、実用的な免疫応答の測定系となる。

我が国で流行している HPV 型の正確な把握はワクチン戦略の基盤情報となる。複数の HPV 型に感染している女性が少なくとも 30%以上存在することは、従来の常識と異なる。検出方法の改良によって感染実態に近づいたと思われる。

(神田)

2) HPV16陽性前癌病変の自然消退とE6領域の変異には有意な関連が認められた。変異体は宿主免疫から排除されにくい可能性がある。

3) 乳酸菌に HPV16 型 E7 蛋白質を提示した経口型 HPV 治療ワクチンは、低用量でも E7-CTL の誘導がみられたので、用量を上げれば効果が確認できる可能性がある。(川名)

4) 構築した表皮培養モデルは、宿主の分化に連動した HPV 増殖を阻害する抗ウイルス剤のスクリーニング、効果の評価及び作用機構の解明に役立つ。(酒井)

5) HCV 慢性肝炎患者体内の HCV 準種の網羅的な解析が可能になり、今後これまで解析されなかった低レベル準種の役割が明らかにされる。

(神田)

6) NS5A リン酸化を介した HCV 複製、粒子形成機構の詳細を明らかにすることにより新たな創薬標的が見出されるものと期待される。(鈴木)

7) HCV 感染インジケータ細胞株に C 型肝炎患者血清を接種し、継代を重ねることで血清由来 HCV を分離できる可能性がある。(松浦)

8) IFN 抵抗性は HCV ゲノムの特性と宿主因子の両者で規定されることが示唆された。(加藤)。

9) HCV 感染が直接的、間接的に IDO を誘導し、制御性 T 細胞の誘導を介して免疫病態に関与する可能性がある。

9) HBV、HCV、HIV ゲノムを検出する核酸増幅検査の高感度化は「すり抜け」防止に役立っているが、未だ完全ではない。(内田)

E. 結論

1) 次世代 HPV ワクチンは臨床試験に必要なデータと周辺技術が整いつつある。(神田、近藤)

2) HPV E7 蛋白質を表面に提示する乳酸菌死菌の経口投与による CIN3 治療の有効性は、高用量を用いた臨床試験で明らかになる。(川名)

3) HPV 増殖が起こる表皮モデル系は、HPV 潜伏感染の維持と感染細胞の分化に連動した HPV 増殖の分子機構を理解する優れた実験系であり、抗 HPV 剤のスクリーニングにも役立つ。(酒井)

4) IFN 治療に耐性の HCV 準種の存在が示唆された。今後、解析症例を増やして確認する必要がある。

(神田)

5) HCV 増殖素過程の詳細な解析によって、抗 HCV 薬の標的となりうる反応が明らかになりつつある。製薬会社への情報提供を進める。(松浦、鈴木)

6) 献血者のウイルスマーカー陽性率の動向を調査することは、輸血用血液の安全性や献血者スクリーニングの有効性をモニタリングする上で重要である。(内田)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

別紙に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中

識別番号 11000010 (神田)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析
研究分担者 神田忠仁 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）は生殖器粘膜の基底細胞に侵入し、ゲノムが核内エピゾームとして維持される潜伏感染を樹立する。HPV の E6、E7 蛋白質はそれぞれ p53、Rb の機能を阻害するので、感染細胞で HPV ゲノムの組み込みが起り、E6、E7 蛋白質が発現し続けると細胞が不死化し、前がん病変となる。従って、ワクチンによる HPV 感染予防ないし潜伏している HPV ゲノムの排除で、子宮頸がんを予防できる。欧米で市場導入された第一世代 HPV ワクチンは、高リスク型の 15 の遺伝子型のうち 16、18 型にしか効果がない。我々は、HPV16 型の副キャプシド蛋白質 L2 に存在する型共通中和エピトープ（L2-エピトープ）を利用する第二世代ワクチン抗原を開発したので、臨床試験に必要な周辺技術の整備を進めた。潜伏感染維持の分子機構を知るために、HPV ゲノムに結合する細胞蛋白質を探索し、ヌクレオリンの結合を確認した。In vitro での HPV ゲノム複製では、ローリング・サークル型複製が起ることを明らかにした。

C 型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染は我が国の肝がんの 80% と関連している。HCV を排除する IFN/リバビリン併用療法の有効性は HL28 の遺伝子型で推定できるが、予想に反して HCV を排除できない患者では、IFN の効果を阻害する HCV 準種が存在すると仮定し、患者血清中の全ての HCV のゲノムの包括的な解析を進めた。

A. 研究目的

子宮頸がんの原因となる 15 種の高リスク HPV の感染予防が期待できるワクチン抗原を開発したので、製薬会社と連携し事業化するために、臨床試験に必要な周辺技術の整備をめざした。

HPV の潜伏感染維持機構を解析するために、ウイルスゲノムに結合する細胞蛋白質の探索、in vitro 複製系の構築を行った。

B. 研究方法

- 1) 交差性エピトープに結合する抗 L2 ウサギ抗血清の HPV16、18、31、51、52、58 型偽ウイルスに対する中和力価を測定した。同時にこれらの型の L1/L2 キャプシドを抗原とする ELISA で、結合力価を測定した。293 細胞で発現させた L2 をナイロン膜に固定し、Western blotting で抗体との結合を調べた。
- 2) HPV16 のゲノム DNA 断片と HeLa 細胞核抽出液を混合し、DNA に結合した細胞蛋白質を回収した。得られた蛋白質を質量分析機で解析した。細胞内での結合は、クロマチン免疫沈降法で検討した。
- 3) HPV16 の複製開始点を持つプラスミドと E1 蛋白質、E2 蛋白質を使った無細胞系で HPV DNA 複製を調べた。HPV16 ゲノムをエピゾームとし

て安定に維持するヒト子宮頸部前癌病変由来 W12 細胞の抽出液の DNA 複製への作用を検討した。

4) 試料中の複数の HPV DNA を同時に高感度で検出できる新しい HPV タイピング方法として、HPV 型間で比較的保存されている L1 DNA を標的にした multiplex PCR を行い、型特異的な DNA プローブとのハイブリダイゼーションにより増幅 DNA の型を判定する方法を用いた。分担研究者である近藤博士が採取した子宮頸部擦過細胞に含まれる HPV DNA を検討した。

5) IL28 の遺伝子型では IFN 治療の有効性が示されたにもかかわらず HCV を排除できなかった HCV 慢性感染者の血清（治療直前と治療後 1 週間）を入手し、含まれる HCV ゲノムを包括的に調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行った。

C. 研究結果

1) 抗 L2 抗体の中和活性は、L1/L2 キャプシドとの結合活性と平行した。Western blotting での L2 との結合は、中和活性と必ずしも相関

しなかった。

2) HPV16 ゲノム DNA の E6 遺伝子の 3' 端と E7 遺伝子の 5' 端領域が細胞抽出液中の nucleolin と結合することがわかった。HeLa 細胞に強制発現した nucleolin 及び内在性 nucleolin は、いずれも細胞内で HPV16 DNA を含むプラスミドに結合した。また HPV16 ゲノム DNA を保持するヒト子宮頸癌由来 W12 細胞で、内在性 nucleolin と HPV16 ゲノムとの結合が確認された。

3) 無細胞 HPV 複製系に W12 細胞抽出液を加えると、アガロースゲル電気泳動での移動度がプラスミド型の複製産物とは異なる高分子量の複製 DNA が検出された。鋳型プラスミドを一カ所切断する制限酵素処理により、高分子量の複製 DNA は、一カ所切断した鋳型プラスミドと同じ長さの DNA に変換された。

4) 子宮頸部擦過細胞 543 検体のうち 266 検体で HPV が検出された。検出頻度が高いのは、HPV52、16、58、56、51 であった。そのうち、30%で複数の HPV が検出された。

5) ロシュ社の次世代シーケンサーGS FLX を用いて、1回のシーケンシングで、 $\sim 4 \times 10^8$ 塩基（平均 400 塩基長の配列を 10^6 種類）の HCV 塩基配列情報を取得するシステムをつくった。大量の配列情報から特定の領域の情報のみを抽出し、その領域の変異配列の種類と組成を明らかにする解析ツールを作った。

また、HCV 蛋白質の抗 IFN 活性を測定する培養細胞系を検討した。GFP、DsRed などの蛍光蛋白質と HCV NS5A の遺伝子導入・発現用レトロウイルスベクターを構築した。ヒト細胞に導入後蛍光蛋白質陽性細胞をセルソーターにより濃縮し、IFN に 24 時間暴露した後にセンダイウイルスまたは VSV を感染させ、感染効率を測定する系を作った。シーケンシング解析で同定された準種の遺伝子断片をクローニングし、準種間の抗 IFN 活性を調べた。特定の NS5A 準種発現細胞で IFN の抗ウイルス作用の減弱が認められた。

D. 考察

1) 抗 L2 中和抗体のレベルは、L1/L2 キャプシドを抗原とする ELISA で測定できる。臨床試験で得られる多量の血清試料中の中和抗体を測定するハイスループット系となる。

2) nucleolin は細胞分裂期の染色体に局在することから、その結合を介して nucleolin が HPV ゲノムの維持に関わる可能性が示唆された。

3) 分化した W12 細胞では、複製フォークが一

方向に進行するローリングサークル型の HPV DNA 複製が起こることが報告されており、無細胞系でこの現象が再現されたと考えられる。

4) 検出方法の改良により、従来の HPV サーベイランスの成績より高頻度で HPV 複数感染が検出され、検出頻度が高い型も従来の報告と異なる。感染実態に近い成績が得られたと思われる。

5) HCV 慢性肝炎患者体内の HCV 準種の網羅的な解析が可能になり、今後これまで解析されなかった低レベル準種の役割が明らかにされる。

E. 結論

1) 臨床試験被験者の血清に含まれる抗 L2 中和抗体のレベルは、L1/L2 キャプシドを抗原とする ELISA で測定できる。

2) 我が国の女性に感染している HPV 型と複数感染の実態が明らかになりつつある。

3) IFN 治療に耐性の HCV 準種の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kondo, K., Ishii, Y., Mori, S., Shimabukuro, S., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Nuclear location of minor capsid protein L2 is required for expression of a reporter plasmid packaged in HPV51 pseudovirions. *Virology*, 2009:394 (2), 259-65.

2) Sato, H., Matsuo, R.K., Ishii, Y., Mori, S., Nakahara, T., Ouchi, F.S., Kawana, K., Fujii, T., Taketani, Y., Kanda, T., and Kukimoto, I.: Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009:387 (3), 525-530

2. 学会発表

1) 森清一郎、石井克幸、近藤一成、神田忠仁：ヒトパピローマウイルス 51 型 (HPV51) キャプシドに組み込まれたレポーターの発現と副キャプシド蛋白質 (L2) の機能。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京

2) 佐藤英貴、松尾理加、石井克幸、中原知美、森清一郎、柗元巖、神田忠仁：ヒト核小体蛋白質 nucleolin は HPV16 ゲノム DNA に結合する。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10

月 27 日、東京

3) 石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、神田忠仁:高リスク型共通中和抗体によるヒトパピローマウイルス (HPV) 感染抑制機構。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京

4) Tadahito Kanda: Development of an HPV vaccine for a broad spectrum of high-risk types Development of a vaccine. 第 68 回日本癌学会総会、横浜、2009 年 10 月 3 日。

5) 松尾理加、終元 巖、神田忠仁:「無細胞系におけるヒトパピローマウイルス DNA のローリングサークル型複製」。第 32 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 10 日

H. 知的所有権の取得

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中
識別番号 110000109

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

分担研究者 川名 敬、東京大学医学部附属病院 産科婦人科学

研究要旨

子宮頸がん前癌病変（CIN2-3）からの退縮・増悪には、宿主側の子宮頸部局所の細胞性免疫が関与している。一方、CIN2-3は粘膜上皮に限局した粘膜病変であり、粘膜型リンパ球がその細胞傷害活性を担っている。本研究において、子宮頸部粘膜に存在する抗HPV-CTLを測定する系を樹立して、CIN2-3患者における抗HPV-CTLと病変の推移を検討したところ、抗HPV-CTLが強く誘導されている患者では、CIN2-3病変が退縮しやすいことが示された。これにより、CIN2-3の退縮に必要な抗HPV-CTLの有効域が設定された。

さらに、CIN2-3患者に抗HPV-CTLを誘導することを目的とした乳酸菌を利用したHPV治療ワクチンの第I/IIa相臨床試験が進行中である。3例が乳酸菌HPVワクチンの経口投与を受け、有害事象はなく、全例において、子宮頸部における抗HPV-CTLが誘導されていた。CIN2-3病変に抗HPV-CTLが浸潤している組織像を確認しているが、現時点では明らかな治療効果は得ていない。投与量を増量中であり、それにより抗HPV-CTLが有効域まで達すれば臨床的有効性を期待できる。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（以下、HPV）は、性行為感染によって子宮頸部粘膜に感染し、ウイルス増殖を伴う感染が長期間持続すると、その一部が不死化、癌化に向かい子宮頸癌を発症する。その過程で、HPVの癌遺伝子であるE6、E7の永続的な発現が不可欠である。子宮頸癌の前癌病変である子宮頸部上皮高度異形成（以下、CIN2-3）では、70-90%においてE7癌蛋白質の発現が確認されている。これまで多種のE7を標的にしたHPV治療的ワクチンが開発され、

CINを対象とした臨床試験が行われてきたが明らかな臨床的有効性は未だ示されていない。その最大の問題点は、CIN2-3が粘膜病変であるにもかかわらず、粘膜免疫誘導を評価せず、かつワクチン接種法も粘膜免疫誘導に適していなかった点であると考えられる。

本研究の目的は、E7に対するCTL（E7-CTL）を子宮頸部粘膜に誘導するHPV治療ワクチンを開発することである。安全性が高く、Th1系の免疫誘導に優れ、腸管粘膜への親和性の高い乳酸菌を利用し、ヒ

トでの安全性と子宮頸部への E7-CTL 誘導能を検討することを目的とした。また CIN2-3 の退縮に必要な E7-CTL の有効域を設定することを目的とした。

B. 研究方法

子宮頸部リンパ球の検討では、文書で同意を得た HPV16 型陽性の CIN2-3 患者から、子宮頸部擦過細胞を採取した。その細胞から Percoll 不連続密度勾配遠心法で単核球画分を回収した。単核球の一部を固相化して HPV16 型 E7 蛋白質の全長を網羅した、4-8 アミノ酸からなる合成ペプチドを別々に提示させ、そこに各症例から得られた子宮頸部リンパ球(10^4 cell)に添加した。CD4+ Th1 細胞を表す IFN γ 産生細胞数を ELISPOT 法により測定した。CIN2-3 症例 19 例を根治治療を要した 10 例、治療を要せずに経過している 9 例に分け、各群の IFN γ 産生細胞数を比較した。

ヒトでの食経験のある乳酸菌株 *Lactobacillus casei* 株をワクチンキャリアーとして用いた。共同研究者であるジェノラック BL(株)が保有する手法で、子宮頸癌で最も多く検出される HPV16 型の癌蛋白質 E7 を乳酸菌の細胞表面に提示した乳酸菌 E7 (LacE7) を作製し、加熱処理によって死菌化してワクチン抗原とした。この際 E7 の Rb binding site のアミノ酸を改変して悪性形質転換能を消失させた改変型 E7 を用いた。この乳酸菌 E7 ワクチンを GMP 製造によって製剤化した。

HPV16 単独陽性の CIN3 症例を対象とし、LacE7 (250mg=1 cap) は、1cap/day を 1 例、2cap/day を 2 例に投与された。投与は 1 日 1 回朝食前内服で、5 日間/週として、1, 2, 4, 8

週の 4 クールとした。9 週で最終効果判定を行い、必要があれば CIN3 に対する根治治療を行った。

(倫理面への配慮)

子宮頸部擦過細胞の採取については、施設研究倫理委員会の承認を得て、文書で同意を得た患者から採取された。乳酸菌 E7 ワクチンの第 I/IIa 相探索的臨床試験を企画し、施設研究倫理委員会にて承認を得た。適格基準を満たし、文書で同意を得た CIN3 を登録した。

C. 研究結果

CIN 患者の子宮頸部から $3 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cell (median: 3×10^6 cell)の子宮頸部リンパ球が得られた。腸管粘膜の粘膜リンパ球に特異的に存在する表面抗原マーカーのインテグリン $\alpha 4\beta 7$ 陽性リンパ球が、子宮頸部リンパ球の 50-70%に存在することがわかり、腸管由来の粘膜リンパ球が子宮頸部粘膜局所にホーミングしていることを初めて見出した。

HPV16 陽性の CIN2-3 の 19 例から採取した子宮頸部リンパ球の検討では、IFN γ 産生細胞数は 0-126 cells/ 10^4 cells と個体差があった。根治治療を要した群では、平均 38 cells(0-72)/ 10^4 cells に対して、治療不要群では、平均 98 cells(63-126)/ 10^4 cells となり、有意に治療不要群で E7-CTL が子宮頸部に誘導されていることがわかった($p < 0.005$)。この結果から、CIN2-3 の退縮が期待できる E7-CTL の有効域を 100 cells/ 10^4 cells 以上と考えた。

乳酸菌 HPV ワクチン LacE7 は、現時点で 3 例がプロトコール終了し、4 例が投与中

である。全例において、LacE7 と因果関係のある有害事象は認めていない。投与終了の3例では、全例が子宮頸部リンパ球、末梢血リンパ球のいずれにおいても E7-CTL が誘導された。誘導能は経時的に上昇した。しかし、最終効果判定の時点で有効域と考えられる子宮頸部リンパ球の E7-CTL > 100 cells/10⁴ cells に達する症例はなかった。臨床的效果判定では、1例に PR を見た。2例は SD であった。PR の1例では、CIN3 病変に E7-CTL が浸潤している像をテトラマー免疫組織染色で確認し、E7 陽性細胞が消失している像も観察された。

D. 考察

前年度までにマウスを用いて、乳酸菌 HPV ワクチンの経口投与によって、腸管由来のインテグリン $\alpha 4\beta 7$ 陽性粘膜リンパ球に E7-CTL が誘導されることを示してきた。そして、このインテグリン $\alpha 4\beta 7$ 陽性リンパ球が子宮頸部にホーミングすることが CIN 患者で確認された。このことから、乳酸菌 E7 ワクチンの経口接種による腸管粘膜を介した E7-CTL 誘導の戦略が子宮頸部の E7 陽性病変にキラー活性を示す可能性が十分に期待された。そこで第 I/IIa 相探索的臨床試験の形式で、HPV16 単独陽性の CIN3 症例を対象とした臨床試験を開始している。

我々が樹立した子宮頸部リンパ球を用いた子宮頸部局所の E7-CTL 測定により、自然経過における CIN2-3 の退縮例と増悪例の宿主側の免疫応答の違いを見出すことに成功し、そこから、乳酸菌 HPV ワクチンの有効域が設定できた。

今後は、乳酸菌 HPV ワクチンの投与量を増量することにより、有効域まで誘導能を

高めれば臨床的有効性を獲得できるのではないかと期待される。

E. 結論

子宮頸癌の前癌病変は粘膜病変であって、粘膜病変を消失させる治療的ワクチンには粘膜リンパ球を誘導しなければならない。本研究では、乳酸菌を利用した新規の粘膜免疫誘導型ワクチンの開発を進行させている。

また、自然経過における HPV 感染の転帰を予知できるバイオマーカーとして、宿主側の免疫応答を子宮頸部局所で知ることができるようになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawana K, Yasugi T, Taketani Y: Human papillomavirus vaccines: current issues and future: Review. *Indian J Med Res*, 130: 341-347, 2009
- 2) Sato H, Kusumoto-Matsuo R, Ishii Y, Mori S, Nakahara T, Shinkai-Ouchi F, Kawana K, Fujii T, Taketani Y, Kanda T, Kukimoto I: Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 387: 525-530, 2009
- 3) Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y: Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *Am J Reprod Immunol*, 62: 90-95,

2009

4) Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike-Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T, Taketani Y. The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *Br J Cancer*, 101: 145-148, 2009.

5) Huang Z, Hyodo H, Fujii T, Nagamatsu T, Matsumoto J, Kawana K, Yamashita T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Effect of progesterone on HLA-E gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cell line. *Am J Reprod Immunol*, 61:221-226, 2009

2. 学会発表

1) Kei Kawana, Katsuyuki Adachi, Terufumi Yokoyama, Ayako Tomio, Shiho Miura, Kensuke Tomio, Satoko Kojima, Yuki Iwasawa, Tomomitsu Sewaki, Tomoyuki Fujii, Yuji Taketani, Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 elicits mucosal cytotoxic cellular immune response to HPV16 E7. International congress of mucosal immunology, Boston, 2009, July3-9

2) 川名 敬、子宮頸癌の発生制御をめざした予防的・治療的ヒトパピローマウイルス (HPV)ワクチン開発に関する研究。日本産科婦人科学会、学術奨励賞記念講演、京都、2009、4月

3) 川名 敬、新規 HPV ワクチンによる子宮頸がんの治療。日本医学会シンポジウム、東京、2009、12月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他

I. 参考文献
特になし。

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

ウイルスを標的とする発がん予防の研究
(HPVの生活環の解明と、それを利用した抗腫瘍剤の探索)

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所・准教授

研究要旨

HPV 感染は子宮頸がん発症の主要なリスクファクターであると考えられている。HPV 感染による悪性腫瘍形成を抑えるためには、このウイルスの複製機構を解明することが重要である。本研究課題では HPV の生活環を解明し、その情報に基づいて抗ウイルス剤、抗腫瘍剤の新規の標的を同定することを目指している。

【新規複製系を利用した HPV 遺伝子機能の解析】

これまでに報告した新規レプリコンを用いた HPV 複製系を改変し、HPV ライフサイクル全体を評価する系を構築した。その系を利用して HPV 制御遺伝子の機能の検討を行い、E6, E7 はゲノム維持に必須ではないことを示した。

【E7 による過形成誘導機構の解析】

E7 による過形成誘導に、p63 アイソフォームの発現変化が関与している可能性を示した。また E7 とインテグリンの相互作用に関しても、同様に過形成誘導に関わる可能性が考えられた。

【E4/E5 と相互作用する新規宿主因子の検索】

E4, E5 と相互作用する宿主因子の検索を行い、HoxC9 や DnaJ, Fat などの候補因子を同定した。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) は標的組織である重層上皮に感染し、疣贅やコンジローマなどの良性腫瘍を誘発する病原ウイルスである。形成された腫瘍は多くの場合自然治癒するが、一部は長期にわたり持続感染し、まれに悪性腫瘍へと進展することが知られている。特に子宮頸がんでは、ほぼ全ての症例で HPV の感染が確認されており、HPV の感染が子宮頸がん発症の主要なリスクファクターであると考えられている。また、子宮頸がん以外でも肛門がんや頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) への関与も示されており、このウイルスの感染を予防・治療する戦略を考案することが重

要となっている。

本研究課題では HPV の生活環を分子レベルで解明し、その知見に基づいて HPV 感染に対する抗ウイルス剤や抗腫瘍剤の分子標的を提案することを目的としている。HPV の遺伝子発現や複製は、感染標的である上皮細胞の分化状態に強く依存しているために、通常の組織培養法ではその生活環を支持することが出来ない。この研究では HPV の複製をサポートできる皮膚モデル培養系やセミソリッド培地培養法などを利用して HPV の生活環を再現し、その感染・複製機構を解明することにした。また、細胞に導入する HPV DNA の改良や、遺伝子導入法の最適化についても検討を加えた。

B. 研究方法

【HPV 複製系の構築】

HPV-FL (FL for full-length) 型の構築は、HPV16, 11, 18 型のゲノム DNA を制限酵素処理やライゲーション反応によってつなぎ換え、両端に LCR 配列を持つようなウイルスゲノムを構築した。これを pEGFP1 (クロンテック) を改変した G418 耐性プラスミド内に挿入したものを HPV-FL とした。HPV-S (S for self-ligation) 型の複製系では、HPV16, 11, 18 型の全ゲノムを含むプラスミドからウイルス DNA 領域のみを切り出し、それらを T4 DNA ligase によって環状化したものをゲノム型 DNA として利用した。HPV DNA を維持する細胞を選別する目的で、各 HPV 由来の複製起点 (ori 配列) または LCR を含むネオマイシン耐性プラスミド (HPV-ori plasmid または LCR plasmid) を構築した。

HPV の各遺伝子に変異を導入する際には、polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。変異の導入は PCR 操作を行った部分の全配列を検証することで確認した。

【細胞培養】

HeLa, CV1, 293T, ヒト繊維芽細胞 (human foreskin fibroblast; HFF, クラボウ) は 10% FBS/DMEM を用いて、5% CO₂ 37°C 条件において培養した。ヒト角化細胞 (human foreskin keratinocyte; HFK, クラボウ) は専用の培地 (EpiLife-KG2, クラボウ) を用いて、同条件で培養した。

【遺伝子導入】

HeLa, CV1, 293T に対しては通常の DNA-リン酸カルシウム共沈法を用いて transfection を行った。HFF, HFK はそれぞれ専用の試薬を用いて transfection を行った (nucleofector kit, AMAXA)。

【サザンプロット解析】

細胞からのウイルス DNA の抽出には SDS-proteinase K を用いた total DNA 回収法を利用した。一部エピゾーム状の DNA のみを回収する目的で Hirt の方法を適用した。回収した DNA は制限酵素処理

によって線状化し、それをアガロースゲルで泳動したものをナイロンメンブレンに転写した。検出/可視化には DIG-標識・検出試薬を利用した (ロシユ)。通常のサザン法と DIG 検出法の組合せで十分な感度が得られない場合には、HPV の L1 領域を標的とした PCR と DIG 検出法を組み合わせで用いた。

【皮膚モデル培養系】

真皮モデルは HFF をコラーゲンゲルに埋め込み、数日の間収縮させることで構築した。このゲルの表面に HFK を重層させ、さらに HFK 表面を空気に晒すことによって HFK は層状化および分化し、皮膚モデルが構築される。

【ウイルスベクターの構築】

ras や HPV 遺伝子を HFK に遺伝子導入する際には、MuLV ベースのレトロウイルスベクターを用いた。導入する遺伝子に応じて、LXSN, LPCX (Clontech) を使い分け、それぞれの plasmid に目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は、各 plasmid を pCL10A1 パッケージングベクター (Retrogen) とともに 293T 細胞に transfection し、培養上清中に放出されたウイルスベクターを回収し利用した。

【yeast two-hybrid assay (YTH)】

E4, E5, E7 と相互作用する因子の同定には YTH アッセイを利用した。実験系には市販のキットを利用し、cDNA ライブラリーも同様に、HeLa 細胞由来の cDNA を挿入した市販品を用いた (インビトロジェン)。

【GST-pull down 法】

GST 融合蛋白は、pGEX ベクターを用いて大腸菌 HB101 株の中で発現させたものを、グルタチオンビーズで精製して利用した。結合を確認する宿主因子は reticulocyte lysate を用いた in vitro 翻訳系を利用して合成した。宿主因子は合成時に 35S 標識を行っている。結合は一般的なプロトコルに従って行い、GST 融合蛋白に結合した蛋白をイメーリアナライザー (BAS5000, 富士フイルム) によって検出した。

【メチルセルロース懸濁培養、および分化マーカーの確認】

1.5%メチルセルロース/EpiLife-KG2 に HFK を懸濁し、10~48 時間培養することで分化誘導を行った。分化マーカーの発現誘導は transglutaminase, filaggrin を Western 法によって検出することで行った。

【FACSによる細胞周期解析】

細胞は必要に応じてメタノール固定、あるいはフォルマリン固定し、PI 染色によって染色体をマークし、EPICS XL-MCL (Beckman Coulter)を用いて FACS 解析を行った。

(倫理面への配慮)

この研究の遂行において用いた実験材料や方法は個人情報、および倫理面での問題を生じない。

C. 研究結果

【新規複製系を利用した HPV 遺伝子機能の解析】

HPV-FL 型のレプリコンを利用した HPV 複製系に関してはすでに報告済みである (Cancer Sci., in press, 2010)。従来の方法に比べ FL 型を利用すると、効率よく安定に HPV DNA を維持した細胞を得ることが出来る。しかし DNA サイズがかなり大きくなり、ウイルスゲノムとしてパッケージされない点や、構造が本来のゲノム DNA とはかなり異なり、HPV ゲノムの機能を完全に再現しているとはいえない点が問題となる。そこで従来法に用いられていた HPV-S 型 DNA を利用して、HPV DNA を維持した細胞を効率よく得る方法を考案した。従来法で S 型 DNA を用いる場合、transfection された細胞の選別に pSV2neo など、薬剤耐性遺伝子を発現するプラスミドを同時に細胞に導入し、1 週間程度薬剤による選択を行っていた。この選別法では transfection 時に HPV-S 型 DNA と pSV2neo が co-transfection されたものを回収することが可能であるが、HPV DNA に関しては何ら選択圧がかかっていない。そのために薬剤で選別した細胞を経代しているうちに HPV DNA が欠落

する可能性があり、また、HPV DNA を維持できない細胞が回収した細胞プールに含まれていると考えられる。この問題を避ける目的で、薬剤選択用のプラスミドに HPV の複製起点を含む DNA を組み込んだ。このプラスミドは HPV DNA の複製に応じて、細胞内で複製することが可能であり、細胞を長期にわたって薬剤選択することが出来る。この時回収された細胞は全て、HPV の複製を支持していることも保証される。

この新しい複製系を用いた場合、薬剤選択後に残る細胞数は FL 型に比べ少なくなるが、細胞内の平均コピー数は FL 型と同程度、従来法に比べると数倍~10 倍程度多いことが分かり、本来の HPV ゲノム DNA と同型のもので効率の良い複製系が確立できたことが分かった。さらにこの系を利用して、HPV16, HPV18 で E1, E2, E4, E5, E6, E7 にナンセンス型点変異を導入した変異体を作成した。これらを導入した HFK 用いて raft culture を構築し、HPV ライフサイクルにおける各遺伝子の意義の解析を開始しているが、現在までに E1, E2 を除く各遺伝子は、HPV のゲノムメンテナンスに必須ではないことが分かった。ただし、多くの経代を経た HFK では E7 が細胞増殖性維持に必須であり、E7 を欠失した変異体では見かけ上メンテナンスされないという結果が得られた。また E6 の変異体に関しても、E7 ほどではないが、やはり細胞増殖性の維持に関与しているという知見を得る。

【E7による過形成誘導機構の解析】

高リスク型 HPV の E7 を HFK に発現させ、それを用いて raft culture を構築すると表皮層に強い過形成が誘導される。この過形成誘導機構として我々は E7 によるポケット蛋白 (pRb と p130) の不活化が関与していることを見だし、すでに報告している (Oncogene 25: 4155-4164, 2006)。しかし低リスク型 HPV E7 でも有意の過形成が誘導されること、また pRb や p130 の発現抑制では E7 ほど強い過形成が誘導されないことから、その他の因子の関与

が考えられた。

そこで重層上皮形成に関与するキーフクターである p63 に注目した。p63 には大きく分けて 2 つのアイソフォームが存在する。転写活性化 (TA) ドメインを持つ p63TA は発生期で重層上皮の形成に関与しており、形成された上皮では基底細胞の増殖性維持に関わっている。TA ドメインを欠いた Δ Np63 は分化層で発現し、p63TA の機能を打ち消すことで細胞の分化を誘導するというモデルが存在する。

正常 HFK を用いて raft culture を構築し p63 の発現プロファイルを解析すると、基底層細胞で TA 型が、分化層で Δ N 型の発現が確認された。それに対して E7 発現 HFK を用いた場合は、分化層で TA 型の発現が認められ、 Δ N 型の発現誘導が阻害されていることが観察された。このことはハイリスク型の E7 に固有の現象であり、pRb 経路の下流に p63 の発現調節が存在する可能性を示唆している。

また、高リスク型、低リスク型、いずれの E7 もインテグリン β 4 と相互作用することが分かった。インテグリン β 4 は α 6 などとヘテロダイマーを形成し、上皮細胞の基底膜への接着、基底細胞の形質維持に関与していると考えられている。E7 の発現によって基底細胞のインテグリン β 4 の発現量は変化しないが、その発現が分化層細胞でも確認された。また、インテグリン経路の下流因子として FAK, Ras 経路 (ERK, JNK) の活性化が確認された。その機構は不明であるが、E7 によってインテグリン経路が恒常的に活性化し、分化層細胞での細胞増殖性維持に関与していた可能性が示唆された。

【E4/E5 と相互作用する新規宿主因子の検索】

E4 は HPV 感染組織では主に分化層で高発現していることが報告されている。また機能としては中間径フィラメントであるサイトケラチンのネットワークを崩壊させることが知られている。しかしその生物学的な意義はよく分かっていない。一方でサイトケラチンネットワークの崩壊とは独

立に、E4 の発現によって細胞増殖が G2/M 期で停止することを中原らが報告している (J. Virol. 76: 10914-10920, 2002)。また、E4 は E7 によって誘導された細胞増殖促進シグナルを打ち消し、細胞分化を可能とするという知見を我々は得ている。

ここでは E4 の機能に関する情報を集める目的で、E4 と相互作用する因子の同定を行った。同定には酵母を用いた Two-hybrid 法を利用し、その相互作用は GST-pull down や細胞内共局在を検証することで確かめた。相互作用する因子はいくつか同定され、その中にはスプライス関連因子としても知られる PRP8 や、発生期に関与し、癌との関連や皮膚での発現が示されている HoxC9, 中間径フィラメント蛋白の vimentin, co-chaperon の機能を持つ DnaJ が含まれた。

また機能のよく分かっていない HPV の E5 についても同様の検索を行った。ここでは DNA 損傷修復に関わる Ku70, ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 Fat の orthologue などを同定した。

現在これら宿主因子と E4/E5 との相互作用の生物学的意義を検証中であり、その作用が明らかになると、新規の抗ウイルス剤の標的として利用できると思われる。

D. 考察

【新規複製系を利用した HPV 遺伝子機能の解析】

HPV-FL 型は遺伝子導入や、その後の細胞内維持の効率が高く、細胞内での HPV ゲノムの複製や遺伝子発現、細胞への影響を調べる上では優れたレプリコンであると考えられた。しかし、感染性ウイルスを産生できない点や、未知の人為的要素を含んでいる可能性が否定できず、HPV の生活環の解明という点では問題があると指摘されてきた。そこで従来法同様に、HPV ゲノム DNA の構造を保持し、かつ導入細胞の選別・維持の効率が高いと思われる新規の複製系を構築した。予想された通り、transfection 時の遺伝子導入効率

では FL 型に及ばなかったが、HPV DNA の維持効率では FL 型と同程度、従来法より有意に良いという結果が得られた。この系は HPV ライフサイクルの解析を行う上で優れたプラットフォームとなることが期待される。

HPV の制御遺伝子である E1, E2, E4, E5, E6, E7 に関して、それぞれいくつかの生物機能が報告されているが、ウイルスの生活環における役割はあまり知られていない。そこで今回得られた複製系を利用し、これを raft culture に応用することで、各遺伝子の役割に関する知見が得られると考えている。この点は今後の重要な課題である。

これまでに E6 や E7 が HPV ゲノムのメンテナンス(長期維持)に必要であるという報告がいくつか出されていた。しかし今回の解析から、これらの遺伝子はゲノムメンテナンスに必須ではなく、実験条件下での細胞増殖性の維持に必要であったことが分かった。しかしこの結果は単層培養条件下のものであり、raft culture などの分化誘導系における検証が必要であると考えている。

【E7 による過形成誘導機構の解析】

HPV 感染組織ではコンジローマなどの良性腫瘍が形成される。これは高リスク型、低リスク型共通の特質である。HPV 感染による過形成誘導機構としては、E7 によるポケット蛋白の不活化の他に、E6 による PDZ 蛋白の分解や E5 の関与が示されている。我々は以前 E7 による過形成誘導を raft culture で再現し、その分子機構として pRb と p130 の分解誘導を示した。しかし、E7 による過形成誘導機構の説明としては十分ではなく、その後の解析を継続していた。そこで p63 発現パターンの変更も過形成誘導に関与している可能性が示唆された。重層上皮組織での、細胞分化に応じた p63 発現プロファイル変化の分子メカニズムは明らかではなく、E7 による発現調節機構の解明を通して、その詳細が解明されるのではないかと考えている。p63 の発現パターンは低リスク型 E7 で

は修飾されず、p63 発現調節の上流に pRb-E2F が存在する可能性が示唆された。pRb も p130 同様に、細胞分化に関与するという報告も多いことから、pRb-p63 経路の存在の可能性も十分にあると考えられる。

また E7 とインテグリン $\beta 4$ の相互作用に関しても新しい知見を得た。インテグリン $\beta 4$ は基底細胞の維持に重要であると考えられ、E7 がその相互作用を介してインテグリン経路を活性化することで、基底膜を離脱した細胞でも増殖能・未分化性を維持できるというモデルが考えられた。実際に HFK に E7 を発現させると、コントロールに比べ、インテグリン経路の下流因子、FAK, ERK, JNK の活性化が確認できた。今後は E7 とインテグリン $\beta 4$ の相互作用の生化学的解析と、その意義について検証していきたい。

【E4/E5 と相互作用する新規宿主因子の検索】

E4, E5 と相互作用する宿主因子の同定をすすめ、いくつかの候補因子を見いだした。未だ、その生理的意義は分からないが、いくつかは HPV の複製や細胞分化調節、腫瘍形成に関与する可能性を持っていると考えられた。E4 や E5 は、これまでに行われている HPV ゲノム DNA での変異解析や、その raft culture への応用でも、明確な役割は分かっていない。今回得られた候補因子の発現や機能変化を通して、E4, E5 の新規生物機能が明らかになることを期待しており、現在解析をすすめている。

E. 結論

今回は新規 HPV 複製系の改良と、それを用いた reverse genetics による、遺伝子機能解析を行った。未だ途中段階であるが、HPV 複製制御機構を理解する上で重要なアッセイ基盤になると考えられ、今後の抗ウイルス剤開発や、そのスクリーニングに貢献するものと期待される。

また E7 による過形成誘導機構に関しても、新たな分子機構の解明をすすめており、感染初期の腫瘍形成を抑制する上での

重要な分子標的となる可能性がある。初期の腫瘍形成は悪性腫瘍への転換の重要なステップと考えられ、このステップを阻害できれば悪性腫瘍への進展を阻止、あるいは遅延できる可能性が考えられる。

HPV 制御遺伝子の中で、その役割がよく分かっていない E4 と E5 に関しても、その機能が明らかになれば、その知見に基づいて抗ウイルス剤の分子標的の同定をすすめることが可能となる。今回得られた候補因子の HPV 複製における役割を明らかにし、抗ウイルス剤開発に貢献したいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Satsuka, A., Yoshida, S., Kajitani, N., Nakamura, H., and Sakai, H.: A novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. *Cancer Sci.* (in press, 2010)

2. 学会発表

佐塚文乃, 梶谷直子, 中村博保, 酒井博幸. Mechanisms of the HPV-induced transformation. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.

佐塚文乃, 梶谷直子, 中村博保, 吉田智志, 酒井博幸. HPV16 における各種調節遺伝子のウイルスゲノムメンテナンスへの影響. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

佐塚文乃, 梶谷直子, 中村博保, 酒井博幸. A novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 兵庫, 2009.

3. 総説

佐塚文乃, 酒井博幸. HPV のライフサイクル. *Visual Dermatology*, 3 月号, 2010.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

- なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

C型肝炎ウイルス(HCV)NS5Aと相互作用しHCV産生を調節する宿主因子の探索とその機能解析

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部長

研究要旨 昨年度までに、HCV NS5A 蛋白は Core 蛋白との相互作用を介して粒子形成の初期過程に関与すること、NS5A-Core 相互作用には NS5A の C 末端領域のセリンリン酸化が重要であることを明らかにした。本年度は、NS5A をリン酸化し HCV 産生を調節する宿主因子の同定を行った。410 種類のヒト蛋白リン酸化酵素と NS5A の結合を試験管内で探索し、有意な結合を示したものについて NS5A リン酸化能を調べ、さらに遺伝子ノックダウンにより HCV 産生への影響を解析した。その結果、これまでに 2 種類のカゼインキナーゼアイソフォームが NS5A をリン酸化し HCV 産生調節に関与することを見出した。NS5A リン酸化を介した HCV 複製、粒子形成機構の詳細を明らかにすることにより新たな創薬標的が見出されるものと期待される。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の非構造蛋白NS5Aは、ウイルスRNAの複製やインターフェロン感受性、HCVの病原性発現などに関与する多機能蛋白である。最近、NS5A蛋白は複製複合体の構成因子であるだけでなく、感染性粒子の形成に関与する可能性が示された。我々はこれまでに、HCV NS5A蛋白はCore蛋白との相互作用を介して粒子形成の初期過程に関与すること、NS5A-Core相互作用にはNS5AのC末端領域のセリンリン酸化が重要であることを報告した(Masaki T. et al., J Virol (2008))。NS5A蛋白のリン酸化制御がHCV粒子形成過程において重要な役割を担うことが考えられる。HCV粒子形成分子機構の解明につなげるべく、NS5A蛋白キナーゼの網羅的な探索を行った。

B. 研究方法

HCV NS5A-蛋白キナーゼ(PK)結合解析にはAlpha(Amplified Luminescence Proximity

Homogeneous Assay)テクノロジー(Perkin Elmer)を利用した。小麦胚芽無細胞蛋白質合成系によってビオチン化PK及びFLAGタグ付加HCV NS5Aを調製した。これらにストレプトアビジン化ドナービーズ及び抗FLAG抗体結合アクセプタービーズを混合し発光シグナルを検出した。

NS5A蛋白のリン酸化アッセイは、同様に調製されたPK及びNS5Aに³²P-gammaATPを加え反応後、リン酸化NS5AをSDS-PAGE、オートラジオグラフィで検出した。

HCV遺伝子型2a JFH-1株のゲノムcDNAプラスミド(pJFH1)をXbaI切断により直鎖化し精製後、これらを鋳型として試験管内にてRNA合成を行った。得られたRNAをエレクトロポレーション法によりHuh7細胞へ導入しHCV粒子(HCVcc)を産生させた。Huh7.5.1細胞に各siRNAを導入し、24時間後にHCVccをMOI=1で感染させ48時間後に細胞内外のHCV Core蛋白質をELISA法で定量した。さらに、培養上清を