

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・分担）研究報告書

HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究
分担研究者 温川恭至 国立がん研究センター研究所

ウイルス発がん研究分野 主任研究員

研究要旨 正常ヒト子宮頸部角化細胞において環状HPV16ゲノムを細胞当たり約50コピーで安定に複製維持する細胞に、外来性E1とE2の発現を薬剤により誘導できる細胞集団を作製し、クローニングにより複数の細胞株を得て解析を進めた。ドキシサイクリンの添加によりHPV16ゲノムのコピー数が細胞当たり約1万コピーに増幅した。さらにCa添加による分化誘導によりL1とL2の発現が確認された。ゲノム増幅と分化誘導の組み合わせにより平皿培養細胞からの成熟HPVゲノムを精製できたが、それらの感染性を確認するには至らなかった。一方で、ゲノム増幅の際、NFκBの活性化が認められ、ゲノム増幅を抑制していることを見出した。NFκBは、E1のタンパク分解を促進することによりHPVゲノム複製を調節する可能性が示唆された。NFκBによるゲノム複製調節機構を破綻させることにより、(1)さらに効率良くコピー数を増加しウイルス産生系へ応用できるだけでなく、(2)持続感染細胞におけるHPVゲノム維持機構に介入し得る可能性を得た。

A. 研究目的

これまで、HPV感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることが複数のグループより報告されており、中和活性を正しく評価するためには本物のHPV粒子を用いる必要がある。しかし、HPVは角化細胞の分化に伴いゲノムを増幅したのち分化に伴う後期遺伝子の発現誘導によりパッケージングされることから、in vitroにおける再現は困難である。従来の方法では、安定供給の難しい初代ヒト角化細胞にHPVゲノムを導入した後、3次元培養により角化細胞の分化を誘導することにより少量

のウイルス粒子を回収できることが報告されているにすぎない。本研究においては不死化したヒト正常角化細胞で環状HPVゲノムを安定して維持する細胞株の樹立とともに、平皿培養においてHPVゲノムを増幅、パッケージングさせる技術を開発する。それにより、中和活性評価や感染機構の解析に必須の本物のHPV粒子を安定供給する。また、HPVゲノムの複製機構を明らかにし、複製阻害により被感染細胞を排除する有効な新しい戦略を打ち立てる研究基盤を確立する。

B. 研究方法

昨年度までに、環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮

頸部角化細胞株において、外来性にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導できる細胞集団の作製に成功している。E1単独、E2単独、E1+E2の発現誘導により環状HPVゲノムの増幅が見られるかを検討した。さらに平皿培養細胞より成熟ウイルス粒子の産生を試みた。

また、昨年度までに野生型ならびにE1発現欠損HPV16ゲノムを不死化皮膚角化細胞内で複製する細胞株を樹立している。これら2つの細胞株におけるHPVゲノムの維持複製ならびに分化誘導時における後期複製を比較した。

一方、E1とE2の発現誘導に加えCa添加により角化細胞の分化を誘導すると、ゲノムコピー数の増加と共に、複製ゲノムからのL1とL2の発現が確認された。密度勾配遠心法により成熟ウイルス粒子と思われる分画を精製し、ウイルスDNAの検出により回収ウイルス粒子量を推定した。

さらに、HPV複製阻害剤のスクリーニングを簡易に行うために、レポーター遺伝子を搭載したHPVゲノムを種々作製し、それらの有用性について検討した。HPVゲノム後期遺伝子コード領域内の様々な部分を分泌型ルシフェラーゼ発現カセットと置換したHPVゲノムを作製し、皮膚及び子宮頸部由来の角化細胞に導入後、ゲノム複製効率とレポーター遺伝子の発現量について検討した。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあ

っては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

C. 研究結果

環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞株にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導すると、ゲノムは24時間以内に細胞あたり約50コピーから1万コピー以上に増幅した。しかし、E1とE2の発現誘導後にはATMおよびATRの活性化やNFκBの活性化と共に細胞増殖抑制が誘導された。ATMおよびATRを含むPI3Ksを抑制する阻害薬ウォルトマニン添加や、NFκB活性化を抑える分解抵抗性のIκBの高発現によりゲノムコピー数は更に約2倍以上増加することが示された。さらに、NFκB活性化を抑制すると、E1のタンパク分解が抑制されることを見出した。NFκBは、E1の安定性を調節することにより、HPVゲノム複製を制御する可能性が高い。

E1とE2の発現誘導とCa添加によって分化誘導した角化細胞からウイルス粒子分画を回収し、HeLa細胞へ感染したが、感染成立に伴うE1⁺E4 mRNAの発現は確認できなかった。

一方、HPV複製阻害剤のスクリーニングに有用なレポーター遺伝子搭載HPVゲノムを作製した。このレポーターHPVは、角化細胞内で野生型と同様の効率で維持複製し、培養上清のルシ

フェラーゼ活性測定により、ゲノムコピー数の変化を容易にモニターすることができた。

D. 考察

不死化角化細胞の平皿培養系において、E1,E2の発現誘導によりHPVゲノムが数千倍に増幅可能な細胞集団を樹立し、その中から増幅効率の高いクローナルな細胞株を複数樹立した。これらの細胞株に、Ca添加による角化細胞の分化誘導を行うと、複製された内在性ゲノムからL1とL2の発現を誘導できることが分かった。これまでL1とL2の発現に至る高度な分化誘導には、3次元培養が必須であると考えられていた。本研究では、Ca添加による角化細胞のスフェロイド形成および、スフェロイド形成時にL1とL2の発現が良く見られる傾向が観察された。さらに、密度勾配遠心法により、スフェロイド化した細胞からHPVゲノムDNAを含む成熟ウイルス粒子分画を精製できた。すなわち、効率よくスフェロイド形成を誘導することにより、3次元培養のような煩雑な手順を経ずとも、平皿培養系から細胞分化に依存して産生される真の成熟HPV16ウイルス粒子を、比較的容易に産生できる可能性が示唆された。今後、L1とL2をより高発現する分化誘導条件の最適化などを行い、感染性を有した成熟ウイルス粒子の精製法を確立し、平皿培養からの大量安定産生技術を確立したい。

一方HPVの複製阻害剤はCINの治療

薬あるいは子宮頸がんの予防薬として期待できる。昨年度の研究結果より、E1阻害剤を用いたとしても、ウイルス感染時の初期複製と粒子形成に至るウイルス増殖期の複製を阻害できるものの、持続感染病変の基底細胞における複製を抑制し被感染細胞を排除することは理論的に困難であることが示された。従って、E1阻害剤に拘らず、広くHPV複製を阻害する薬剤のスクリーニングが必要である。今年度は、HPV複製阻害剤のハイスループットスクリーニングが可能な細胞株の作製に成功した。また、NFκBがE1のタンパク分解を促進することを見出し、持続感染細胞においてE1依存的な複製が抑制される要因であると推察された。NFκBによるHPVゲノム複製の調節機構に介入することにより、(1)E1,E2によりゲノム複製を増強することから、より効率よいウイルス産生系法の確立への応用や、(2)E1タンパク分解を抑制することにより、持続感染細胞に溶解感染等を惹起し、感染細胞の排除を狙うという新たな抗ウイルス薬デザイン戦略が考えられる。

今後は、これらの知見に基づいた抗ウイルス薬スクリーニングを行いたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 33:4434-47, 2013.

Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y,
Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N,
Fujita M. ATM regulates Cdt1 stability during
the unperturbed S phase to prevent
re-replication. Cell Cycle 13: 471-481, 2014.

2. 学会発表

中原 知美、田中 克征、大野 真一、
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 /Cellular factors involved in
suppression of human papillomavirus type 16
(HPV16) genome replication in keratinocytes.
第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横
浜、2013 年 10 月

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、神戸国際会議場、
2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし