

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 の生活環と遺伝子機能の解明

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所がん遺伝子研究分野 准教授

#### 研究要旨

HPV感染は子宮頸癌発症の主要なリスクファクターである。本研究課題では、HPVの感染・複製機構を解明し、その情報に基づいて抗ウイルス剤、抗腫瘍剤の新規標的を同定することである。

今年度は18型HPVの複製モデルを利用して、各遺伝子の機能解析を行った。またE4遺伝子産物が、いくつかの宿主因子に加えて、E6やE7などのウイルス蛋白の不活化にかかわる可能性を示した。

またHPV複製モデルを利用して、新規化合物の抗ウイルス効果を評価した。

#### 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。形成された腫瘍は自然治癒することがほとんどであるが、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。そのためこれまで HPV の感染・複製機構は十分に解明されていない。

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。さらにウイルス遺伝子の働きや、異形性・発がん誘導の機構についても解析を行う。

#### B. 研究方法

【HPV 複製モデルの構築】

HPV18 の複製系として、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ウイルスゲノム型 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、HPV18 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 制御遺伝子変異体の作成】

HPV の各遺伝子に変異を導入するには、polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。ここでは一塩基置換により、ナンセンス変異を導入した。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】

ヒト繊維芽細胞 (human foreskin fibroblast; HFF, クラボウ) は 10% FBS/DMEM を用いて、5% CO<sub>2</sub>

37 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】

HFF, HFK に対してはそれぞれ専用の試薬を用いて transfection を行った (nucleofector kit, AMAXA)。

#### 【サザンブロット解析】

細胞からのゲノム DNA の精製には市販のゲノム DNA 精製キットを利用した。回収した DNA (2µg) 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)。

#### 【皮膚モデル培養系】

真皮モデルは HFF を type-I 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。このゲル上で HFK を培養し、さらにゲル表面を空気に晒すことによって HFK は分化・層状化し、約 10 日間で皮膚モデルが構築される。

#### 【ウイルスベクターの構築】

HFK に各種遺伝子を導入する際には、MuLV 系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。

#### 【メチルセルロース懸濁培養、および分化マーカーの確認】

1.8mM CaCl<sub>2</sub> 含有 1.5% メチルセルロース/EpiLife-KG2 に HFK を懸濁し、48~96 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, involucrin を Western 法によって検出することで行った。

(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. 研究成果

1. HPV18 の調節遺伝子機能の解析

#### HPV18 の全ゲノムを含むプラスミドをもとにして、E1、E2、E4、E5、E6、E7 の各

HPV18 の全ゲノムを含むプラスミドをもとにして、E1、E2、E4、E5、E6、E7 の各

ORF、5'寄りの部位にナンセンス変異を導入し、各遺伝子の変異体を作成した。E4ORF は E2ORF と読み枠違いでオーバーラップしているため、E4 に導入した点変異は E2 に対してはサイレント変異となるようにデザインした。

これらのプラスミドから HPV18 ゲノム領域を切り出し、リガーゼによってゲノム状に環状化したものをヒト角化細胞に導入し、その複製などを解析した。なお、HPV18 の複製起点(ori)を含むネオマイシン耐性遺伝子発現ベクターを同時に導入し、その後 G418 を含む培地で培養を続けることで、HPV ゲノム導入細胞の選別をおこなった。

得られた細胞内の HPV ゲノムコピー数をサザンプロットによって解析したところ、E6 変異体で顕著なゲノムコピー数の低下が確認された。その他の変異体はほぼ野生型と同程度のゲノムコピー数を維持していた(数百コピー/細胞)。

つぎに、カルシウム処理によって分化誘導をかけた場合のゲノムコピー数の変化を調べた。野生型では分化処理により 10 倍程度のコピー数増加が確認できた。それに対して E6 変異体では全く増加が認められなかった。また、E7 変異体ではコピー数の増加は野生型の 1/3 程度に下がっていた。E4 と E5 変異体に関しては、コピー数の増加は若干低下していたが、有意というには繰り返し実験が必要である。

さらに、高度に上皮細胞の分化の影響を調べるために、得られた細胞を用いて皮膚モデル培養系(raft culture)を構築した。野生型 HPV DNA を導入したもの

は、角質層の顕著な肥大が観察された。E4、E5 両変異体でも野生型と同程度の異形性が確認された。しかし E6 と E7 の変異体では、全く異形性は観察されなかった。ビリオン構成タンパクである L1 タンパクに対する組織免疫染色を行ったところ、野生型では角質層に L1 の発現が確認された。それに対し、E6、E7 の変異体では L1 の発現は検出できなかった。E4 と E5 変異体では野生型と同程度に、角質層での L1 発現が認められたが、その発現量は有意に低下していた。

## 2. HPV18 E4 遺伝子機能の解析

E4(遺伝子産物としては RNA スプライシングによって E1 の N 末 5 アミノ酸が E4 タンパクに融合した E1<sup>E4</sup> タンパクとして発現する)は感染組織の分化層で高発現しており、ウイルス複製の後期過程に関わる可能性が示されていた。我々は以前に、HPV18 型及び 16 型の E4 を HeLa や CV1 細胞で発現させると、G2/M 細胞周期停止を誘導すること、E4 は細胞質に凝集塊を形成することを報告している。ここではこの凝集塊形成の意義を解析した。

18E4 はすでに報告したように、細胞質に凝集塊を形成する。その凝集塊は(i)周りにピメンチンケージが形成されている、(ii)HDAC6、Hsp40、ユビキチン化タンパクが凝集塊に含まれる、(iii)凝集塊形成は微小管形成、HDAC6、およびダイニンに依存する、という点から、aggresome 様の構造体であることが分かった。

またこの aggresome には チューブリンがリクルートされ、細胞内の正常な中心

体形成が抑制されていた。さらに HPV18 の E6 と E7 も aggresome に捕獲されており、E4 発現細胞では E6、E7 による p53、RB 発現抑制が解除されていることが分かった。

### 3. HPV 複製モデルを利用した、新規化合物の抗ウイルス活性の評価

抗 HPV 活性を持つ化合物のスクリーニングには、HPV 複製系の確立が必要である。ここでは我々が構築した HPV 複製系を用いて、いくつかの新規化合物の抗ウイルス活性を評価した。

HPV18 を導入した角化細胞で、新規化合物の効果を調べたところ、5 $\mu$ M で細胞内のゲノムコピー数が約 1/2 にまで低下させるものが見つかった。同じような効果はカルシウム分化時にも観察された。

## D. 考察

### 1. HPV 調節遺伝子の機能について

今回は HPV18 の調節遺伝子の、ウイルス複製における機能を解析した。その結果 E6 はゲノムメンテナンスに必須ではないが重要な役割を持つことが示された。これにより E6 変異体では細胞内の HPV 遺伝子の発現量は非常に低く抑えられ、その結果、分化に応じたゲノムコピー数の増加や、皮膚モデル培養系での異形性誘導、L1 タンパク発現などが求められなくなったと考えられた。

E7 はメンテナンスには関与しないが、分化時のゲノム増加に関与していた。さらに皮膚モデル培養系では、E7 変異体は異形性や L1 の発現が認められなかった。この事は E7 が分化プログラム(異形性)の制御に重要であり、E7 による分化

改変がゲノムコピー数の増加や後期遺伝子の発現に関与している可能性を調べた。

E4 と E5 は分化に応じたゲノムコピー数の増加に、E7 ほどではないが関与している可能性が考えられた。皮膚モデルでも、ほぼ野生型と同様の異形性を誘導したが、L1 の発現量は有意に低下していた。これらの作用機序は現在のところ不明である。

以上の点から、E6 が有望な薬剤標的であると考えられた。ここでの E6 の作用機序を考えることが次の目標である。

### 2. HPV 複製における E4 の役割に関して

E4 による aggresome 形成が、チューブリンなど種々の細胞性因子の補足、及び不活化に関与する可能性が示された。特に チューブリンは M 期進行に重要な中心体の主要構成因子であり、E4 による G2/M 期細胞周期停止に寄与している可能性が示唆された。

また、E4 aggresome は HPV の E6、E7 という主要な oncoprotein も捕獲し、細胞質中のこれらの因子量を抑制することが分かった。E6、E7 は HPV 感染による腫瘍形成に関わることが知られており、E4 はこれらの因子の機能を抑制することで、HPV 複製において何らかの機能を有していることが推測された。特に E7 は角化細胞の分化を抑制することが知られており、一方で HPV のビリオン産生には細胞の最終分化が必要であることが報告されている。E4 は感染組織上層部で発現し E7 の機能を抑制することで、感染細胞をビリオン産生に必要な分化状態へ移行させるというモデルが考えられた。

### 3. 我々の HPV 複製モデルの有用性に関して

ここで利用されている HPV 複製系は、(i)構築が容易である、(ii)短期間に樹立できる、(iii)皮膚モデル培養系に適用できる、という利点がある。HPV 導入細胞は、長期間培養することで形質が変わり、がん化形質を持つようになる。またウイルスゲノムのインテグレーションも認められるようになる。そのような細胞では、正常なウイルス複製の観察は困難であるが、ここで用いた系ではそのような問題の発生は低く抑えられている。

いくつかの新規化合物の評価を行ったところ、有望と思われるものが見つかった。今後は皮膚モデル培養系にも適用して、その異形性誘導やビリオン産生の抑制効果を評価する予定である。

### E. 結論

ヒト角化細胞に HPV ゲノム型 DNA を導入する系によって、HPV 複製機構解析のための基盤が構築された。それを用いて、HPV 調節遺伝子の役割を解析し、抗ウイルス剤の標的因子の検索をすすめることが可能となった。

また、種々の化合物の抗ウイルス活性の評価を行うプラットフォームとしても利用できることが示された。今後は、スクリーニング系としてハイスループット化を目指す必要がある。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kajitani N., Satsuka A., Yoshida S. and Sakai H.: HPV18 E1<sup>E4</sup> is assembled

into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins. *Frontiers in Virology* 4: article 251, 2013.

article 251, 2013.

Yamamoto M., Onogi H., Kii I., Yoshida S., Iida K., Sakai H., Abe M., Tsubota T., Ito N., Hosoya T., and Hagiwara M.: Novel CDK9-selective inhibitor prevents replication of broad DNA viruses. *J. Clin. Invest.* (in press, 2014)

### 2. 学会発表

梶谷直子、酒井博幸: HPV E1<sup>E4</sup> はアグリソームを形成しウイルス因子のタンパク量制御に関与する. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3 日-5 日

梶谷直子、酒井博幸: Human papillomavirus (HPV) E1<sup>E4</sup> は aggresome を形成する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日

### H. 知的財産権の出願・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