

## ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

分担研究者 柊元 巖 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター第一室室長  
研究協力者 石井 克幸 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究官

### 研究要旨：

臨床検体を用いてヒトパピローマウイルス（HPV）のゲノム内の変異の有無を検討し、子宮頸部発癌におけるその生理的意義を明らかにすることを目的とした。これまでに、一部の子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）の擦過細胞検体において、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に C to T の置換変異が蓄積している現象（hypermutation）を見出した。また HPV16 ゲノムを維持する CIN 由来のヒト培養細胞において APOBEC タンパク質を強制的に発現させると、同様の hypermutation が HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に導入された。APOBEC タンパク質が HPV ゲノムに hypermutation を導入し、HPV ゲノムの細胞 DNA への組込みを容易にすることで、子宮頸部発癌に関わる可能性が示唆された。

### A．研究目的

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染は子宮頸癌発症の原因であり、子宮頸部基底細胞での HPV 癌タンパク質 E6 および E7 の持続的な発現が、異常増殖細胞を生み出すことが示されている。一方で、E6/E7 の恒常的な発現のみでは、悪性形質を獲得した癌細胞の発生には至らず、通常 10 年以上に及ぶ持続感染の間に、宿主細胞ゲノムに変異や染色体異常が蓄積することで、浸潤癌の発生につながると考えられている。

近年、様々な臓器の癌ゲノムが解読されることで、発癌過程における宿主ゲノム変異の包括的な解析が進展した結果、子宮頸癌の発症にホストの抗ウイルス因子である APOBEC3B タンパク質の関与が想定されている。APOBEC3 タンパク質群による変異導入は、細胞ゲノムのみならず HPV ゲノムにも検出されることが報告されているが、その子宮頸癌発症との関連は明らかに

されていない。

本研究は、子宮頸部臨床検体を用いて HPV ゲノム内の変異の有無を検討し、子宮頸部発癌におけるその生理的意義を明らかにすることを目的とする。

### B．研究方法

HPV16 陽性の子宮頸部上皮内腫瘍（cervical intraepithelial neoplasia: CIN）の擦過細胞から DNA を抽出して、Differential DNA Denaturation PCR(3D-PCR)法により、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内の A/T-rich hypermutation について検討した。臨床検体は、NTT 東日本関東病院・産婦人科の近藤一成先生より供与を受けた。3D-PCR 増幅産物をプラスミドにクローニングして、その配列を解読した。また、CIN 由来の W12 細胞を用いて、APOBEC3 タンパク質による HPV16 ゲノムへの変異導入の可能性についても、3D-PCR 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト臨床検体の利用にあたっては、関連機関の倫理審査委員会の承認を得て、提供者本人から書面での同意書を得た上で行った。

### C . 研究結果

軽度病変(CIN1)11例および高度病変(CIN3)27例を解析した結果、E2領域の hypermutation が CIN1 で 4 例 (36%) CIN3 で 6 例 (22%) 検出された(図1)。3D-PCR 増幅産物の配列を解析したところ、E2 のコーディング鎖に C to T の置換変異が集積していることが分かった(図2)。また、CIN1 と比較して CIN3 で有意に高い変異塩基数を示した。一方で、hypermutation の有無で年齢差は認められなかった。さらに C to T 置換変異の標的配列を調べたところ、TpC および CpC に偏って変異が導入されていた。

W12細胞をインターフェロン で処理すると、幾つかの APOBEC3 タンパク質 (APOBEC3A, 3F, 3G) の mRNA 発現が誘導され、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内に C to T hypermutation が検出された。この現象は、APOBEC3G に対する siRNA の導入によりブロックされた。また W12 細胞に APOBEC3A, 3G を強制発現すると、同様の hypermutation が検出された。

### D . 考察

臨床検体で検出された C to T hypermutation の標的配列から、APOBEC3 タンパク質の関与が強く示唆された。特に近年、子宮頸癌でのゲノム変異蓄積における APOBEC3B の役割が提唱されており、APOBEC3B が HPV ゲノムにも作用して hypermutation を導入する可能性が考えられた。

臨床検体での HPV ゲノムの hypermutation は、著しく低い割合 (HPV ゲノム全体の 0.5%以下) でしか検出されなかったことから、ウイルス増殖や維持に及ぼす影響は小さいことが予想された。

一方で、hypermutation が検出された E2 遺伝子は、子宮頸癌において細胞ゲノムへの組み込みにより、しばしば欠失していることが知られて

いる。APOBEC3 タンパク質による C to T 置換変異は、細胞の DNA 修復系により切断処理されることが示されており、E2 遺伝子内での DNA 二本鎖切断が細胞ゲノムへの組み込みを容易にして、子宮頸癌の発生に関わる可能性が考えられた。

### E . 結論

子宮頸部の HPV 感染病変において、APOBEC3 タンパク質が HPV ゲノムに変異を導入することで、子宮頸部発癌に関与する可能性が示唆された。

### F . 研究発表

#### 論文発表

1. Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** in press.
2. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. **J. Virol.** 89: 2448-2452 (2015)
3. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. **Jpn. J. Clin. Oncol.** 44: 910-917 (2014)

4. Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation. *J. Virol.* 88: 1308-1317 (2014)

#### 学会発表

1. 森 清一郎、柊元 巖  
ヒトパピローマウイルス16型のがん蛋白質 E6/E7によるAPOBEC3Bプロモーターの活性化  
第73回日本癌学会学会学術総会  
2014年9月、横浜
2. 柊元 巖、近藤 一成、岩田 卓、川名 敬  
日本人女性のCIN2/3および子宮頸部浸潤癌でのHPV遺伝子型分布  
第73回日本癌学会学会学術総会  
2014年9月、横浜
3. 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柊元 巖  
ヒトパピローマウイルス16型E6/E7による APOBEC3Bプロモーターの活性化機構  
第62回日本ウイルス学会学術集会  
2014年11月、横浜
4. 若江 亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柊元 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回日本ウイルス学会学術集会  
2014年11月、横浜
5. 増田 雄司、柊元 巖、益谷 央豪

Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase, E6AP-E6 complex

第37回日本分子生物学会年会  
2014年11月、横浜

6. Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I.  
Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16  
29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
7. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Kamoto H, Bonetti A, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T.  
Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 and host interactions using CAGE technology.  
29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル

#### G . 知的所有権の出願・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。

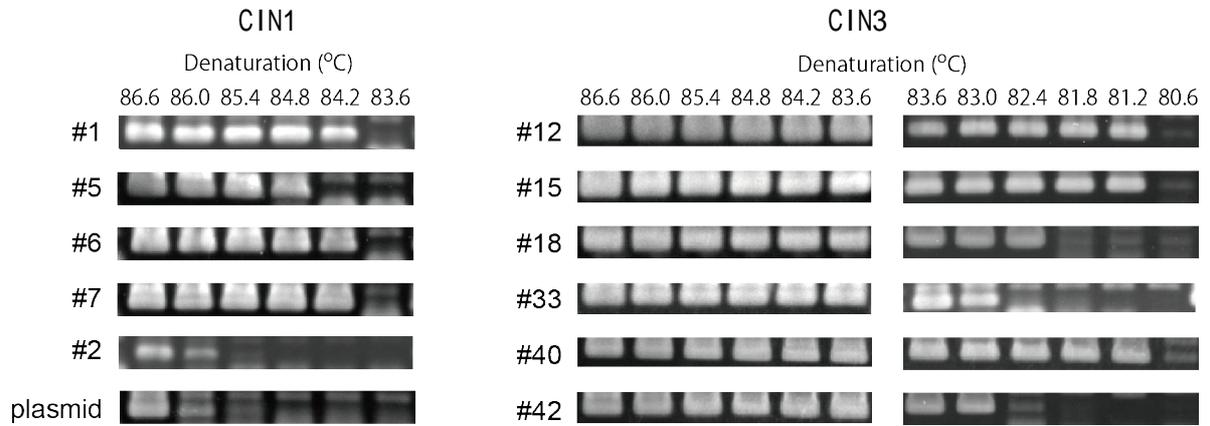


図1 3D-PCRによるE2 DNAの増幅

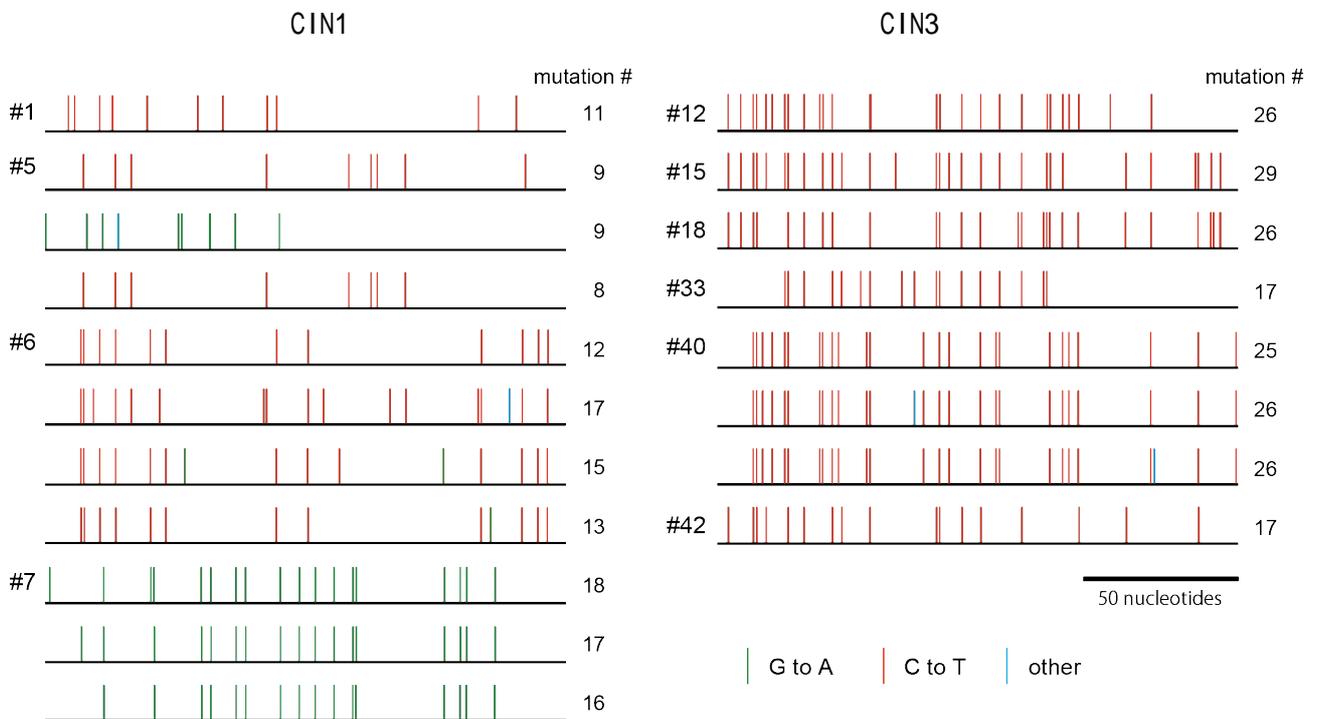


図2 E2 遺伝子への変異導入