

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトパピローマウイルス 16 型 (HPV16) 後期プロモーター制御因子の解析

指導教員 矢野 哲 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

佐藤 香央里

子宮頸癌は年間約 15000 人が発症し、約 2500 人が死亡している。子宮頸癌の最大リスク因子は高リスク型といわれる HPV の感染で、なかでも 16 型は子宮頸癌の半数以上に検出される。HPV は 8000 塩基対の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとする小型のウイルスで、エンヴェロープは持たない。性行為等で生じた表皮の微少な傷から侵入し、表皮の幹細胞である基底細胞に感染する。そこで一過性のゲノムの複製が起こり、50-200 コピー程度のゲノムが核内エピゾームとなる。ウイルス増殖は無く、潜伏持続感染が樹立される。感染細胞が分裂する際は、染色体の複製に同調して HPV ゲノムも複製し、娘細胞に分配される。感染細胞が表皮形成の分化過程に入ると、HPV 非構造遺伝子の発現と大規模なゲノムの複製、キャプシド遺伝子の発現が順次起こり、顆粒層でウイルス粒子が形成される。ウイルスの増殖量は少ないが、ウイルス粒子は物理化学的に安定で長く生殖器粘膜上に留まり、表皮に傷があれば侵入して新たな持続感染細胞を作ったり、別の個体に感染する。このような HPV 生活環は、ウイルス蛋白質のなかで最も多量で免疫系に認識されやすいキャプシド蛋白質を表皮分化の最終過程でのみ発現させることになり、免疫系から逃れるには都合がよい。

HPV は分化の最終過程にある細胞で増殖するため、停止している細胞の DNA 合成系を再活性化する機能を持っている。HPV の E7 蛋白質は pRb に結合して E2F を遊離させ、DNA 合成に必要な遺伝子群の発現を誘導する。E6 蛋白質は p53 を分解して異常な DNA 合成に反応してアポトーシスが生じるのを防ぎ、ウイルス増殖に必要な時間を稼ぐ。HPV 感染細胞で、稀に E6、E7 遺伝子が染色体に組み込まれ、継続発現するようになると pRb と p53 の機能を失った不死化状態となり、さらに変異が蓄積して、十数年後に発癌する。

HPV には 2 つのプロモーター (P97 及び P670) があり、E6、E7 遺伝子は P97 から、キャプシド遺伝子 (L1、L2 遺伝子) は P670 から転写される。P670 の転写活性は厳格に制御されており、通常の培養細胞のような未分化な細胞では活性が強く抑制されている。表皮の分化を誘導する促進性の転写因子である hSkn-1a と C/EBP- β が P670 の上流に直接結合し、転写活性を昂進することが報告されている。しかし hSkn-1a と C/EBP- β を高発現させた培養細胞での P670 の転写活性は、ウイルスキャプシドの合成を支え

るには充分でなく、未知の機構が想定されている。本研究では、P670 の周辺に塩基置換変異を導入し、未分化細胞ないし分化がある程度進んで分化マーカーが発現している細胞（軽度に分化した細胞）での転写活性を調べた。結果から、P670 の転写活性に重要な配列を特定し、データベースに基づく結合因子の予測とゲルシフトアッセイによる確認を行い、P670 の発現制御に関わるシス因子の解析を行った。

P670 からの転写活性をモニターするため、P670 レポータープラスミド (p670/ Δ p97-luc) を作製した。このプラスミドは、LCR 内の P97 からの転写の影響を除くため、nt103 から上流の領域を除き、nt104 から nt865 までの領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつなぎ、作製した。また、このプラスミドを基礎に 106 塩基から 865 塩基まで、20 塩基ずつ配列を置換した 38 個の変異体 (p670/ Δ p97-luc 変異型) を作製し、変異による P670 からの転写活性の変化を解析した。導入する置換変異配列には、MATCHTM public version 1.0 (BIOBASE GmbH, Wolfenbuettel, Germany) を用いて既知の転写因子の結合配列を含まないことを確認した。これらプラスミドを細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定して、P670 の転写活性をモニターした。トランスフェクションした細胞は HeLa/Tet-on/hSkn-1a 及び HaCaT の 2 種を用いた。HeLa/Tet-on/hSkn-1a は、ドキシサイクリンが転写を誘導するプロモーターの下流に hSkn-1a 遺伝子をつないだ発現カセットを組み込んだ HeLa であり、ドキシサイクリン添加により hSkn-1a の発現が誘導される。そして、hSkn-1a の発現誘導によりケラチン 10 やインボルクリン等の分化マーカーが発現する。HaCaT は自然に不死化したヒト角化細胞由来の細胞株であり、低カルシウム存在下で培養してコンフルエントになった後、高カルシウム存在下で維持すると hSkn-1a が発現し、ケラチン 10 やインボルクリンが誘導される軽度分化状態となる。トランスフェクション後ドキシサイクリン無添加で培養し、hSkn-1a の誘導していない未分化な HeLa/Tet-on/hSkn-1a と、ドキシサイクリン添加により hSkn-1a の発現を誘導し、軽度に分化した HeLa/Tet-on/hSkn-1a を用いた。また、HaCaT はトランスフェクション後低カルシウム存在下で培養した未分化な HaCaT と、トランスフェクション後コンフルエント及び高カルシウム刺激により軽度に分化した HaCaT を用いた。

野生型 P670 からの転写は、HeLa 及び HaCaT 共に、未分化細胞に比べ軽度に分化した細胞で 2 倍程度高く、hSkn-1a による転写の昂進作用が確認できた。塩基 546-565 及び 666-685 の置換体からの転写は、未分化細胞で大きく昂進し、軽度分化した状態で更に昂進した。これは、塩基 546-565 及び 666-685 の領域が P670 の活性を強く抑制する機能を担っており、この抑制が変異によって解除されたことを示している。そして、軽度分化した状態で更に昂進することは、hSkn-1a の発現による転写活性の昂進作用は保たれていることが予測された。hSkn-1a の結合配列は、塩基 546-565 の内部に含まれていたため、大腸菌で発現させた GST 融合 hSkn-1a とこれらの領域の結合をゲルシフトアッセイで調べた。プローブは、結合モチーフを中心にすえるため、塩基 551-580 及び塩基 661-690 の配列を用いた。hSkn-1a は、塩基 551-580 の配列に結合したが、塩基 551-580

の変異によって、この結合は減弱しなかった。よって、hSkn-1a の発現による転写活性の昂進作用は保たれ、この二つの領域において置換変異による影響を受けていないことが確認された。

塩基 546-565 及び 666-685 の領域に抑制的な細胞因子が結合すると考え、結合蛋白質の候補を探した。上記領域に結合する抑制性の転写因子として、塩基 546-565 内部に YY1 の結合配列が含まれることが既に報告されていた。しかし、大腸菌で発現させた GST 融合 YY1 とこれらの領域の結合をゲルシフトアッセイで調べると、YY1 は塩基 551-580 の配列に結合したが、塩基 551-580 の変異によって、この結合は減弱しなかった。そこで、MATCHTM public version1.0 を用いて新たな候補を検索したところ、この二つの領域は CCAAT displacement protein(CDP)の結合配列を含んでいた。

CDP は 1505 アミノ酸からなる 180kDa の蛋白質で、そのホモログを含め、未分化な多種の細胞に発現している。抑制性転写因子として、分化で発現が変化する遺伝子群の発現調節に関わることが報告されている。分化した細胞での発現量の減少、あるいは DNA への結合能が低下して発現抑制が解除される機構が示されている。大腸菌で発現させた GST 融合 CDP とこれらの領域の結合をゲルシフトアッセイで調べると、CDP は塩基 551-580 及び 661-690 の配列に結合した。そして、塩基 551-580 の変異によって、この結合は大きく低下し、塩基 661-690 の変異では結合能が失われた。このことより、塩基 546-565、666-685 の置換変異による転写活性の昂進は CDP の抑制解除に起因することが強く示唆された。実験に用いた細胞から抽出物を調整しウエスタンブロットで CDP の発現及び分化マーカーの発現を調べると、軽度分化誘導によりケラチン 10 などの分化マーカーが誘導されるが、未分化な状態でも、軽度に分化した状態でも、CDP の存在が確認され、発現量に変化はなかった。感染細胞の分化の進行によって、CDP による転写抑制が解除されると想定されるが、本研究で用いた HaCaT 及び HeLa では分化によって CDP を介した転写抑制の解除は観察できなかった。実際に抑制が解除される細胞は、さらに分化が進んだ細胞だと思われる。

本研究より、感染細胞が未分化な状態では塩基 546-565 及び 666-685 の領域に CDP が結合し P670 からの転写は抑制されていることが示された。