

論文の内容の要旨

論文題目：

ヒトパピローマウイルス陽性子宮頸癌に対する
ユビキチンプロテアソームシステムを標的とした
新規治療法の検討

指導教員：矢野 哲 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入（進）学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名：長阪 一憲

子宮頸癌の発癌過程には、ヒトパピローマウイルス (Human Papilloma Virus 以下 HPV と略) が関与することは疫学的に明らかになっている。すなわち、適切な組織採取を行えば、子宮頸癌の 95-100% に HPV の感染が確認される。HPV は約 6.8~8 Kbp のゲノムを持つ 2 本鎖 DNA を有する腫瘍ウイルスである。ヒトの皮膚や粘膜などの上皮に感染する。サブタイプは 100 を超え、子宮頸癌ではこの内、HPV16、18、52、58、59 が多く、特に HPV16 は約 50%、HPV18 は約 20%

以上に同定されることが報告されている。HPV はさらに、外陰部などに発生する良性の尖形コンジローマなどの発生に関与する 6、11 型などのローリスク HPV と、子宮頸癌やその前癌病変である異型上皮症の発生に関連するハイリスク HPV の 2 種類に分類される。HPV の DNA は環状であり、遺伝子構成は遺伝子発現の調節領域である URR (upstream regulatory region) 、ウイルスの複製に関与する early viral gene と呼ばれる E1、E2、E4、E5、E6、E7 の 6 遺伝子、そしてウイルスキャプシドをコードする late viral gene と呼ばれる L1、L2 に分かれている。この中で発癌過程に関与しうる機能を示すのは E6、E7 であるとされる。ハイリスク HPV に感染した子宮頸部の細胞は、E6、E7 癌蛋白が細胞内で過剰発現することによって、通常数年から数十年の期間を経て発癌すると考えられている。この過程で HPV のゲノムはヒトのゲノムと組み換えを起こし、E6、E7 癌遺伝子とそのプロモーターである URR を含んだ領域が組み込まれた細胞が高率に癌化能を得ることができる。ハイリスク HPV の持つ E6、E7 癌蛋白は、それぞれヒトの細胞周期やアポトーシスを制御する癌抑制蛋白である p53、pRB の不活性化に加え多様な生物活性を有しており、ヒト正常細胞を単に不死化するだけでなく、悪性形質の付与にも積極的に関与していることが明らかになってきている。

ユビキチンプロテアソームシステムによる蛋白分解は 80%以上の細胞内蛋白の分解に関与しており、細胞周期制御、アポトーシス制御、血管新生など癌の増殖や転移、あるいは免疫や炎症応答などに必要な様々な局面において重要な役割を担っている。近年、このユビキチンプロテアソームシステムをウイル

すが、感染と自己複製のために、このシステムを操作していることも明らかになってきている。プロテアソームはユビキチンが付加された蛋白を認識し、分解の標的とする。HPV は E6 と E7 が協調して永続的な感染と複製を促進するために、細胞周期制御、アポトーシス制御、増殖制御などを行う蛋白質である p53、RB、human Scribble (以下 hScrib)、hDlg などといった鍵となる癌抑制蛋白質を、ユビキチンプロテアソームシステムを利用し、標的として分解する。

E6 癌蛋白に標的とされ不活性化されるものとしては、p53 の他に、hScrib、hDlg、MAGI ファミリー、MUPP1 など PDZ domain 含有蛋白質が報告されているが、その中で hScrib と hDlg のショウジョウバエのホモログである、Scribble、Discs large は、neoplastic tumor suppressor proteins と呼ばれ細胞極性を決定する機能を有し、その遺伝子変異導入により個体は細胞極性の崩壊とともに増殖能を持つようになるため、癌抑制蛋白であることが証明されている。ショウジョウバエを用いた研究によると、neoplastic tumor suppressor proteins は、Scribble、Discs large、lgl などを含め、数種類が報告されているが、多くの癌抑制蛋白と異なり、細胞構築の乱れや異常増殖能の獲得といった癌細胞特有の悪性化に重要な癌抑制蛋白とされている。hDlg は N 末端に 3 つの PDZ domain を持ち、他に SH3、GuK という domain を持つ蛋白構造をしている。このような構造を持つ蛋白質は、細胞増殖などの細胞外シグナルを細胞膜や細胞骨格に伝えている MAGUK (membrane-associated guanylate kinase)蛋白と呼ばれている。hDlg は、細胞膜の adherens junction に発現し、神経芽細胞や上皮細胞においては紡錘体形成に関与し、また大腸癌で多くの変異が報告されている癌抑制蛋白である adenomatous

polyposis coli (以下 APC) および、APC の結合蛋白で、細胞接着に関与している蛋白である β -catenin と協調して、細胞構築や細胞周期制御に関与していることが証明されている。一方、hScrib は LAP(leucine-rich and PDZ domain)ファミリーの蛋白とされ、16 の leucine-rich repeats (LRRs)と 4 つの PDZ domain を持っており、hDlg と同じく細胞膜の adherence junction に発現する。私は、hScrib を発現した細胞では、細胞周期の G0/G1 から S 期への進行が著明に低下し、増殖が制御されていることを報告した。この研究では、細胞周期調節能および細胞増殖抑制能に hScrib のどの部位が重要であるかを検討したところ、hScrib がその抗腫瘍効果を示すには少なくとも、16 の Leucine-rich repeats と 1 番の PDZ domain を必要であり、また hScrib がその抗腫瘍効果を示すのに必要な domain に含まれる領域と結合する蛋白を検索したところ、PDZ domain に癌抑制蛋白 APC が結合することが明らかになった。そのため、hScrib が癌抑制蛋白の働きを持つためには、細胞の増殖抑制に重要な機能をもつ APC と PDZ domain を介して結合することが不可欠であることより、hScrib は APC と協調して細胞の増殖制御に関与することがわかった。

一方、ハイリスク E6 癌蛋白質はその C 末端に hScrib や hDlg の持つ PDZ domain に結合する T/S-X-L/V 配列 (スレオニン/セリン-不特定のアミノ酸-ロイシン/バリン : 以後 T/S-X-L/V) を持っており、この配列はハイリスク HPV E6 癌蛋白で共通に保存されており、ローリスク HPV E6 癌蛋白には認められていない。ハイリスク E6 癌蛋白は、PDZ domain の T/S-X-L/V 配列を介して hScrib や hDlg と結合し、ユビキチン化を介して分解するが、p53 と同様に、細胞中のユビキチン

ロテインリガーゼである E6AP と E6 癌蛋白が、標的蛋白質と三量体を形成することにより起こり E6AP 依存的なユビキチンプロテアソームシステムで分解していることが明らかになっている。

そこで今回、私は、子宮頸癌の発癌過程において、HPV が細胞内で感染し、重要な癌抑制蛋白を分解し発癌に関与するというメカニズムに着目し、E6 癌蛋白の利用するユビキチンプロテアソームシステムをターゲットとした HPV 陽性子宮頸癌に対する抗腫瘍効果について、HPV 陽性子宮頸癌細胞株である CaSki 細胞、HeLa 細胞また HPV 陰性子宮頸癌細胞株である C33a 細胞を用いて、ユビキチンプロテアソームシステムの蛋白分解装置であるプロテアソームをプロテアソーム阻害剤である MG132 によって不活性化し、細胞内での p53、hDlg、hScrib の蛋白発現の安定化、アポトーシス誘導能、抗腫瘍効果について検討した。まず、MG132 の細胞増殖抑制効果、細胞毒性については MTT アッセイ法にて検討を行った。CaSki、HeLa 細胞では感受性が高く、(CaSki; IC_{50} $1.12 \pm 0.06 \mu M$, HeLa; IC_{50} $7.43 \pm 1.24 \mu M$)、一方で HPV 陰性子宮頸癌細胞株である C33a は感受性が低かった ($IC_{50} > 10 \mu M$)。子宮頸癌細胞内での p53、hDlg、hScrib の蛋白発現の安定化についてはウエスタンブロット法にて解析を行い、アポトーシス誘導能については AnnexinV 染色、TUNEL アッセイにて解析を行った。CaSki、HeLa 細胞では、hScrib、hDlg、p53 の蛋白発現の安定化が MG132 添加時間および濃度

依存的に観察され、CaSki 細胞では 98%、HeLa 細胞では 80%にアポトーシス誘導が観察されたが、C33a 細胞では、癌抑制蛋白の発現増加は見られず、10%にのみアポトーシス誘導が観察され、HPV 陽性細胞でのみ、MG132 の有意な抗腫瘍効果が高く認められることがわかった。また、このアポトーシス誘導能が、細胞周期の G1 期および G2 期における細胞周期停止により、引き起こされることがフローサイトメトリーを用いた解析により明らかになった。また、一般にプロテアソーム阻害剤は、NF- κ B の活性化を阻害することにより、抗腫瘍効果を持つとされる。また、子宮頸癌細胞においても NF- κ B の活性化が病変の進行とともに認められるとされているが、MG132 によるプロテアソームを阻害した解析では、HeLa 細胞では NF- κ B の活性化阻害能を認めたが、CaSki 細胞では有意な NF- κ B の活性化阻害を認めることはできなかった。一方、in vivo では、私は、まず HPV 陽性細胞、陰性細胞を SCID マウスに皮下移植して各子宮頸癌細胞の担癌ヌードマウスを作成し、それぞれのマウスに MG132 の腹腔内投与を行うことで、マウス皮下の腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討を行った。HPV 陽性担癌マウスでは MG132 の投与により腫瘍サイズの著しい縮小効果（縮小率 95%）が癌抑制蛋白の安定化とともに認められた。これらの結果から HPV 陽性子宮頸癌に対し、プロテアソーム阻害剤の子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は、HPV により標的とされていた癌抑制蛋白を賦活化することで引き起こされていると考え

られ、今後の子宮頸癌に対する臨床応用の可能性を示唆された。