

## 論文の内容の要旨

論文題目 子宮頸がん多段階発がん機構の解析

指導教員 中釜 斉 連携教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 吉松 有紀

子宮頸がんは、高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染後、病理学的には子宮頸部上皮内腫瘍性病変 CIN1(mild dysplasia)、CIN2 ( moderate dysplasia )、CIN3 ( severe dysplasia、carcinoma in situ )を経て浸潤がんへ進行する。子宮頸がん細胞中では HPV 遺伝子の E6 と E7 が保持されかつ発現していることから、この2つの遺伝子が発がん及びがん形質の維持に重要であると考えられている。CIN 病変の進展の原因として、E6 及び E7 蛋白質の発現増加が示唆されており、これには、ウイルスゲノムの部分欠失や染色体への組込み等が関わると思われている。E6 と E7 はそれぞれ、がん抑制遺伝子産物の p53、 pRb を不活化している。

子宮頸がん発症機序を理解するうえで、関与が示唆される因子について、その因果関係を実験的に検証することが重要であると考えられる。発がん経路には臓器特異性もあるため、各臓器に対応する多段階発がんモデルが提唱されている。子宮頸がんの発生、進展モデルは主に表皮由来の細胞が用いられ、実際のがん発生母地であるヒト正常子宮頸部上皮細胞 (human cervical keratinocyte: HCK) を用いた解析は、ほとんどなされていない。そこで、我々は子宮頸がんの発症、進展を *in vitro* で再現するため、子宮頸がんの *in vitro* 多段階発癌モデルを確立することを目的とした。まず、HCK を human telomerase reverse transcriptases (hTERT) の導入によって不死化した細胞株 (HCKT) を樹立した。

次に、子宮頸がんの発症の起点になると考えられている HPV E6 及び E7 遺伝子を HCKT 細胞に導入した(HCKT-E6E7 以下 HCKT-E と略す)。E6E7 のみではがん化に不十分であることが実験的に示唆されていることから、子宮頸がんにおいて異常が報告されているがん遺伝子 (Akt、ErbB2、Hras(活性型変異体 Hras<sup>V12</sup>)、Myc (c-myc)、 Hras 及び Myc) を HCKT-E 細胞に導入した。ヌードマウス皮下移植における造腫瘍能検討の結果、E6、E7 に加え、Hras の遺伝子導入により、腫瘍原性が付与されることが判明した。さらに c-myc を導入することで、高頻度に tumor-initiating cells (がん源細胞) が含まれた高い造腫瘍能を示す細胞株を得ることに成功した。独立に単離した正常子宮頸部上皮細胞 ( HCK4, HCK7, HCK8, HCK9 ) へ、同定した 4 つの遺伝子 ( E6、 E7、 Hras、 c-myc ) を導入することで再現性良くヒト子宮頸がん源細胞株を樹立できた。Hras の変異が検出された CIN2 及び CIN3 病変は 2 年以内に悪性化することが報告されており、子宮頸部上皮細胞のがん化において ras の活性化が重要であることが示唆されている。また、子宮頸がんにおいて Hras と Myc の過剰発現が同時に認められるとの報告もあることから、本研究により確立された子宮頸がんの in vitro 多段階発癌モデルは、実際の子宮頸がんの病態を反映していると考えられる。これらの成果は、子宮頸がんの悪性化機構の理解に貢献すると期待される。

Weinberg RA らが、ヒト乳腺上皮細胞、ヒト線維芽細胞等に hTERT、Hras 及び SV 40 大型腫瘍抗原(SV 40 large T: LT)、又は、LT の代わりに E6 と E7 を導入してもヌードマウス皮下移植における造腫瘍能獲得には不十分であるが、さらに SV 40 小型腫瘍抗原(SV 40 small T: ST)の導入により Akt 経路を活性化することで造腫瘍能を獲得すると報告している。

一方、子宮頸がんは、他臓器のがんと比較して発症年齢が低いこと、及び、我々のモデルでは E6 と E7 に加え、1 つのがん遺伝子の導入により造腫瘍性を獲得することから実際のがん化の過程で E6、E7 を高発現するようになった細胞が、がん細胞になるまでの過程は短いと推測される。E6、E7 は複数の細胞性因子を標的とすることで、多段階発がんにおける多くのステップを担っている。従って、E6、E7 の標的分子の子宮頸がん発生における生物学的意義を理解することは、がんの治療を目指す上で非常に重要である。

HPV は現在約 120 種類が報告されており、型により種々の E6、E7 が存在する。一般に、E7 には pRb 結合モチーフが保存されており、被感染細胞の増殖に寄与していると考えられている。E6 は動物種・型によって種々の活性が報告されているが、細胞死を抑えることが共通した機能と考えられている。さらに、子宮頸がんから分離される高リスク型 E6 蛋白質の C 末には全て PDZ ドメイン結合モチーフが保存されていることが知られている。しかしながら、そのがん化における意義は明らかにされていない。そこで、本研究では、E6 の C 末の機能を詳細に解析することを目的とした。

上述の研究により確立した発がんモデルを基に、HCKT-E7-Hras 細胞に野生型 E6 または E6 の機能の一部を欠損した各種変異体を導入した。ヌードマウス皮下移植において造腫瘍能を検討した結果、p53 分解能を欠く変異体 (E6SAT) 発現細胞は、野生型 E6 発現細胞に匹敵する腫瘍原性を示した。一方、E6 の C 末 1 アミノ酸を欠いた変異体 (E6 $\Delta$ 151 : E6 の C 末を介した PDZ ドメイン含有蛋白質の標的化能を欠く) 発現細胞では、野生型 E6 発現細胞と比較し、著しい造腫瘍能の低下が認められた。これより、E6 による C 末を介した PDZ ドメイン含有蛋白質の標的化が、p53 の分解よりも腫瘍原性において重要であることが示唆された。

次いで、野生型 E6 発現細胞と、E6 $\Delta$ 151 発現細胞間の造腫瘍能の差は、PDZ ドメイン含有蛋白質の機能制御・分解亢進の有無にある可能性が考えられたため、E6 $\Delta$ 151 発現細胞における E6 の標的候補の PDZ ドメイン含有蛋白質の発現を RNA 干渉法により抑制した。解析の結果、PAR3、SCRIB、MAGI が腫瘍原性に大きく寄与しており、がん抑制遺伝子として機能している可能性が示唆された。PDZ ドメイン含有蛋白質の異常は、ウイルス感染を誘因としないがんとの関連も示唆されており、その解析は、ヒトのがんの発生成立機構の解明に新たな視点を加える可能性がある。

本研究で確立したモデルは、ヒトでの多段階発がんを再構成させた *in vitro* モデルであり、発がん分子機構解析から治療法の開発まで広い分野での応用が期待される。また、がん源細胞の成立・維持機構を解明することは、がん源細胞を対象としたより良い分子標的治療を開発するためにも有用であり、本研究により得られた知見並びにモデルは、子宮頸がんに限らず、広く発がん機構の解明につながるものである。