

論文の内容の要旨

論文題目

CD1dを介した免疫応答に対するヒトパピローマウイルスによる免疫回避メカニズムに関する研究

指導教員 武谷雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

三浦紫保

ヒトパピローマウイルス（以下 HPV）は、子宮頸癌や尖圭コンジローマの発生に深く関与するウイルスとして知られている。100 種類以上ある HPV のうち粘膜型 HPV は約 40 種で、性行為感染により子宮頸部をはじめとする生殖器粘膜上皮に感染し潜伏している。子宮頸部上皮においてウイルス増殖の持続状態が続くと、感染上皮細胞は盛んに増殖し、感染細胞が偶発的に不死化（前癌状態）し、不死化細胞に遺伝子異常が蓄積することにより癌化（子宮頸癌）に至る。すなわち、子宮頸癌の最大リスク因子は HPV の持続感染である。粘膜型 HPV は 8 つのウイルス蛋白質を持つ。そのうち、E5 は小さな疎水性の蛋白質で細胞のゴルジ体や小胞体に存在する。E5 は、その局在が MHC 分子と同じであることから、これまでに MHC との関連性が報告されている。E5 は感染の初期段階で発現するが、感染細胞の悪性化していくに従いしばしば消失する。E5 は直接的な癌化作用はないが、HPV の持続感染を成立させるという点で子宮頸癌の発生に関与していると考えられている。

CD1d は、MHC class I 様の糖蛋白質で CD1d 拘束性 NKT との相互作用により、獲得免疫誘導の増強・促進的な役割を担う分子であると考えられている。CD1d は、invariant V α V β 鎖という特有のレセプターと結合し、これを持つ invariant NKT 細胞を活性化型に変化させる。CD1d と CD1d 拘束性 NKT が相互作用することで、双方の細胞からサイトカインが放出され、免疫担当細胞を局所に導入し、獲得免疫が急速かつ確実に起こる。単純ヘルペスウイルス、HIV、クラミジアト

ラコマティスなどを含むいくつかの病原体では、免疫回避の方略として CD1d の細胞表面の発現を抑制するメカニズムが知られている。

病原体に対する初期免疫応答における CD1d の重要性を考え、HPV が CD1d に関連した免疫経路を変えて宿主の初期免疫応答における感染細胞の排除を回避しているのではないかと考えた。MHC との関連性が指摘されている E5 に着目し、本研究では HPV による CD1d の抑制機序を調べることを目的とした。

まず、HPV 関連病変における CD1d の発現抑制を免疫組織化学的に証明した。正常と HPV 関連病変の 45 症例において抗 CD1d 抗体で免疫染色を行った。CD1d の発現は HPV 陰性の正常子宮頸部上皮では強くみられたが、HPV16 型陽性の CIN1-2 (子宮頸部上皮内腫瘍) や子宮頸癌、HPV6 型陽性のコンジローマの領域ではみられなかった。

子宮頸癌における基本的な CD1d 抑制のメカニズムを言及するために、いくつかの子宮頸癌細胞株における CD1d の転写レベルと細胞表面の CD1d 発現について調べた。HPV 陰性の子宮頸癌細胞株 C33A に CD1d を恒常的に導入した C33A/CD1d 細胞株を作成した。フローサイトメトリーでは C33A /CD1d 細胞株の細胞表面に CD1d の発現が強くみられたが、C33A 細胞株やほかの頸癌細胞株 (HeLa,CaSki) の細胞表面には CD1d 発現はみられなかった。RT-PCT の解析から、子宮頸癌細胞株では、mRNA レベルで CD1d の発現は抑制されていることがわかった。

E5 と CD1d の関連性を調べるために、C33A/CD1d 細胞株と CD1d が内在するヒト臍上皮細胞株 (VK/E6E7) を用いた。また、HPV として、ハイリスク型 HPV である HPV16 型とローリスク型 HPV である HPV6 型の蛋白質を用いた。それぞれの細胞に FLAG で標識した HPV16 と HPV6 の E5 を、レトロウイルスベクターを用いて導入した。各細胞で半定量 RT-PCR を行ったところ、HPV16E5 と HPV6E5 を導入しても CD1d の mRNA レベルで差はみられなかった。CD1d の蛋白質レベルでの比較をウェスタンブロッティングで行った。E5(-)の C33A/CD1d 細胞や VK/E6E7 細胞、また空ベクターを導入した細胞では CD1d を示すバンドがみられたが、E5 導入細胞ではほとんど同定できなかった。細胞表面の CD1d の発現をみるためにフローサイトメトリーを行ったところ、C33A/CD1d 細胞と VK/E6E7 細胞において、空のベクターを導入した細胞では CD1d は強く発現していたが、HPV6E5 と HPV16E5 導入 C33A/CD1d 細胞と VK/E6E7 細胞それぞれにおいて、細胞表出 CD1d は減少していた。

E5 導入 C33A/CD1d 細胞において、抗 CD1d 抗体と抗 FLAG 抗体、ER 特異的マーカー (ERtracker) または DAPI を使って免疫蛍光共焦点顕微鏡による観察を行った。空ベクターを導入した C33A/CD1d-LPCX 細胞において、CD1d は細胞全体にびまん性に広がっていて、細胞表面では強く、核の周囲では弱く発現していた。一方、E5 導入 C33A/CD1d 細胞では CD1d の発現は減少していて核周囲

の小胞体付近に局在していた。CD1d と小胞体のシグナルは核周囲の部分で重なり合い、大部分の CD1d は小胞体内に存在していることが示唆された。CD1d と FLAG- E5 の二重染色では CD1d と E5 が重なり合うことより、両者は小胞体内で共存していることが示唆された。

HPV16E5 は小胞体シャペロン calnexin と結合し、主に小胞体内でおこる HLA class1 重鎖の修飾を阻害するということが報告されている。Calnexin の関わる CD1d の修飾においても阻害するのではないかと考え、FLAG-E5 に結合した蛋白質を免疫沈降し抗 calnexin 抗体を使用して免疫ブロット解析した。E5 導入 C33A/CD1d 細胞では Calnexin に一致するおよそ 90kDa に位置するバンドが同定され、E5 と calnexin が結合していることが示された。CD1d と calnexin の共存を視覚的に証明するため C33A/CD1d-LPCX, -6E5, -16E5 細胞において抗 CD1d 抗体と抗 calnexin 抗体を用いて二重染色し、免疫蛍光共焦点顕微鏡を用いて観察した。C33A/CD1d-LPCX 細胞では CD1d はびまん性に細胞全体に広がって発現していて、calnexin と CD1d のシグナルの大部分は別であった。一方、calnexin の大部分は E5 導入 C33A/CD1d 細胞では小胞体の位置に一致した核周囲の部分に限局していて、CD1d は完全に calnexin と共存していた。

CD1d は翻訳後に感染細胞で蛋白分解を受けている可能性があり、細胞質内のプロテアソームの関与を調べるために、E5 導入 C33A/CD1d 細胞と C33A/CD1d-LPCX 細胞の培養液中にプロテアソーム阻害薬である MG132 を添加し、CD1d の蛋白質レベルをウエスタンブロットを用いて、MG132 未添加の細胞と比較した。抗 CD1d 抗体を使用し免疫ブロット解析を行ったところ、E5 導入 C33A/CD1d 細胞において、抑制されていた CD1d は MG132 存在下では回復した。この作用を視覚的に確認するため、E5 導入 C33A/CD1d 細胞と C33A/CD1d-LPCX 細胞において、MG132 で処理したものと処理していない細胞を抗 CD1d 抗体と DAPI に対する反応を免疫蛍光顕微鏡で観察した。MG132 添加により E5 導入 C33A/CD1d 細胞での CD1d シグナルが細胞全体にみられ、CD1d 分子が回復することがわかった。HPV の関わる CD1d の抑制にはプロテアソームが働いていることが示唆された。以上の結果より、HPVE5 は calnexin に関連した CD1d の小胞体内での合成を阻害することによって CD1d の細胞表面への細胞内輸送を阻害し、その結果として ER に停滞した CD1d が細胞質の蛋白分解経路に引き出されて分解されていると考えられる。

細胞表面の CD1d はインバリアント NKT と特異的に結合し、NKT 細胞を活性化するだけでなく、CD1d をもつ細胞からサイトカインの放出を促す。HPVE5 蛋白質が CD1d の作用にも影響を与えるかどうかを調べるため、架橋反応を起こさせ CD1d の関与する IL-12 の産生について検討した。そこで、E5 導入 C33A/CD1d 細胞と C33A/CD1d-LPCX 細胞を最初に抗 51.1mAb にさらし、次いで 2 次抗体である抗マウス IgG の架橋剤にさらした後、IL12 の産生を調べた。

架橋反応後0から24時間培養し、IL-12 p40と β -actinの定量的RT-PCRを行った。C33A/CD1d-LPCX細胞ではIL-12 p40転写産物は架橋反応後24時間で増加したが、E5導入C33A/CD1d細胞では、IL-12の増加はみられなかった。HPVE5によるCD1d抑制は、感染細胞からの炎症性サイトカインの分泌を抑制することにつながり、HPV感染細胞が免疫監視機構から逃れることに関与すると考えられた。

ハイリスク型とローリスク型によらず、HPVE5存在下でCD1d発現が抑制されることは、感染ウイルスが最初の感染部位である子宮頸部上皮において宿主の免疫監視を逃れ、感染状態に有利な環境をつくるためのウイルス側の工夫であると考えられる。

本研究では、HPV感染細胞においてCD1d発現が抑制され、その機能をHPVE5が担っていることを証明した。CD1dを介した免疫応答の抑制が、HPV感染細胞が免疫監視から逃れ、持続感染が成立するための一因となっている可能性が示された。将来的には、CD1dの発現が低下した症例に、CD1dを介さずにiNKT細胞を刺激することができる α GalCerがCINに対する治療薬になることも期待される。