

審査の結果の要旨

氏名 三浦 紫保

本研究は、微生物に対する自然免疫のセンチネル分子で獲得免疫誘導の増強・促進的な役割を担う CD1d のヒトパピローマウイルス (HPV) による抑制機序を調べるため、HPV 関連病変の CD1d の発現について調べ、次いで HPV E5 蛋白質に着目し、HPV6 型 E5 または HPV16 型 E5 を導入した CD1d 発現細胞を作成し分子生物学的検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. HPV 関連病変における CD1d の発現の変化をみるため、研究倫理委員会で承認され(承認番号 1390-1)、文書で同意を得た HPV 関連疾患患者からの病理組織 (ホルマリン切片) 45 例を用いて、CD1d の免疫染色を行った。CD1d の発現は、ほとんどが HPV 陰性の正常または炎症性の子宮頸部上皮の症例に限られていて、すべての CIN1-2、子宮頸癌、コンジローマの領域で抑制されていた。HPV 関連病変ではほとんどの症例で CD1d の発現が抑制されていることが示された。
2. 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(C33A, HeLa, CaSki)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。C33A 細胞は HPV 陰性、HeLa 細胞は HPV18 型陽性、CaSki 細胞は HPV16 型陽性の細胞株であり、全ての細胞でフローサイトメトリーにおいて細胞表面に CD1d の発現はみられず、各細胞株の total RNA から逆転写 PCR を行った結果、全ての細胞では mRNA レベルで CD1d の発現が抑制されていることが示された。つまり子宮頸癌細胞株では、CD1d の発現は転写前に消失していることが示された。
3. C33A 細胞に CD1d を導入した C33A/CD1d 細胞株とヒト膺上皮細胞株で内因性に CD1d を発現している VK/E6E7 細胞を用いて、それぞれの細胞に HPV6 型と 16 型 E5 を恒常的に発現した細胞株を作成した。E5 蛋白質は FLAG で標識し、抗 FLAG 抗体を使って各実験を行った。HPV E5 を導入した C33A/CD1d 細胞と VK/E6E7 細胞において 6E5、16E5 を導入した細胞、コントロールの空ベクターを挿入した細胞それぞれにおいて転写レベルでは同等に発現していることが示された。蛋白質レベルでは、6E5、16E5 を導入した細胞ではコントロールの細胞と比較して CD1d の発現は抑制されていることが示された。また、フローサイトメトリーの結果では 6E5、16E5 を導入した細胞において細胞表面の CD1d の発現が抑制されていることが示された。
4. CD1d の細胞内局在をみるために、共焦点顕微鏡による観察を行ったところ、C33A/CD1d 細胞において、コントロールの空ベクターを導入した細胞では CD1d は細胞

全体に広がっていて細胞表面により強い反応がみられたのに対し、E5 導入細胞では 6 型、16 型ともに CD1d は小胞体周囲に限局し、小胞体で E5 と CD1d が共存しているのが示された。

5. E5 が小胞体内で calnexin と結合し、calnexin の関わる CD1d 形成を阻害するのではないかと考え、E5 と calnexin の結合の有無をみるため C33A/CD1d 細胞に E5 を導入した細胞で免疫沈降ブロッティングを行ったところ、E5 蛋白質と calnexin が結合していることが示された。同細胞で CD1d と calnexin の共存を視覚的に見るために共焦点顕微鏡による観察を行ったところ、6E5、16E5 導入細胞において calnexin は小胞体の位置に一致して CD1d と完全に merge しているのが示された。つまり E5、calnexin、CD1d の結合が示された。
6. E5 が関与する CD1d の抑制における細胞質内のプロテアソームの役割を述べるため、C33A/CD1d に空ベクターを導入した細胞、-6E5、-16E5 を導入した細胞それぞれにプロテアソーム阻害薬である MG132 を添加してウェスタンブロッティングと蛍光免疫染色を行ったところ、E5 を導入した細胞では抑制されていた CD1d の発現が回復しているのが示された。CD1d は、HPV E5 蛋白質が小胞体内で分子シャペロンと結合することにより、プロテアソーム蛋白質分解系で分解されることが示された。
7. E5 発現細胞では CD1d の関与する IL12 の産生も抑制するのかどうかを調べるため、C33A/CD1d に空ベクターを導入した細胞、-6E5、-16E5 を導入した細胞それぞれにおいて抗 CD1d51.1 モノクローナル抗体でプライミングした後に 2 次抗体で架橋反応を起こさせ、IL-12 が産生されるかを定量 PCR で検出した。空ベクターを導入したコントロール細胞では 24 時間後に IL12 の産生がみられたが、6E5、16E5 を導入した細胞では IL-12 の産生はほとんど見られなかった。HPV E5 蛋白質による CD1d 分解の結果、CD1d 依存性のサイトカイン IL-12 の産生が阻害されることが示された。

以上、本論文では HPVE5 蛋白質が calnexin に結合することで CD1d を蛋白質分解系に誘導しその発現を抑制していることが示され、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。HPVE5 蛋白質が担っている機能として、HPV の新たな免疫エスケープ機構を見出したと考えられ、学位授与に値するものと考えられる。