

国際交流助成（海外渡航）

研究テーマ；HPV 関連中咽頭癌におけるウイルス持続感染機構の解明

氏名；甲能武幸

所属；Northwestern University Feinberg School of Medicine, Department of Microbiology Immunology （米国シカゴ）

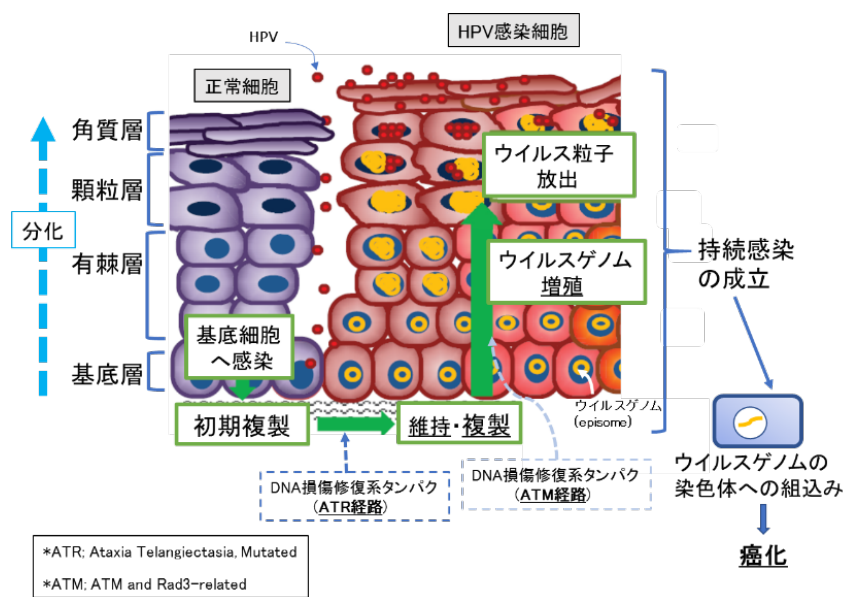
研究報告

【研究背景】近年、頭頸部領域では一部の中咽頭癌や乳頭腫などのヒトパピローマウイルス (HPV) に起因する腫瘍が急増している。特に、米国では 2020 年までに HPV 関連中咽頭癌の罹患率は子宮頸癌を上回るとされており、本疾患の制圧は喫緊の課題となっている。

これまで、HPV の既感染病巣に対する治療として、HPV の癌タンパクである E6 や E7 を標的とした創薬などが検討されてきたが、癌タンパクに対する細胞性免疫は弱く HPV 潜伏感染細胞は排除できないことや、HPV の DNA 型が多岐に渡ることから効果は極めて低かった。そこで、治療薬の実用化に向けて、新たな標的タンパクの同定のために HPV の生活環の解明、特に持続感染機構の解明が重要となってきた

今回の助成を受けて、私は Northwestern 大学の Microbiology Immunology 部門の Chair である Laimins 教授の研究室に留学している。Laimins Lab では、これまで HPV18 型や 31 型陽性の子宮頸癌細胞株を用いた研究で、HPV のウイルスタンパクが宿主の DNA 損傷修復経路やヒストン脱アセチル化酵素などのエピジェネティック因子を活性化させ、これらの事象が上皮細胞におけるウイルスゲノムの維持・複製・増殖に関わって持続感染が成立することを報告してきた（図 1）。一方、HPV 関連の頭頸部癌は、好発部位である口蓋扁桃陰窩の粘膜上皮構造が子宮頸部と異なる点や、90%近くが HPV16 型に起因するという点から、子宮頸部とは違う独自の感染様式を有する可能性が示唆されている。しかし頭頸部における HPV の持続感染や腫瘍化に至る分子生物学的機序に関する基礎研究の報告は乏しく、十分解明されていない。

図1 上皮細胞における HPV の生活環



(HPVは基底細胞に感染すると増殖せず、HPVゲノムが核内エピゾームとして維持される潜伏状態となる。潜伏感染細胞が分裂する際に、細胞DNAの複製と同時にHPVゲノムも複製して娘細胞に分配される。上皮細胞の分化に伴いウイルスゲノムは爆発的に増殖し、粒子として表層より放出される。ゲノムが宿主の染色体に組み込まれると癌化に至る。)

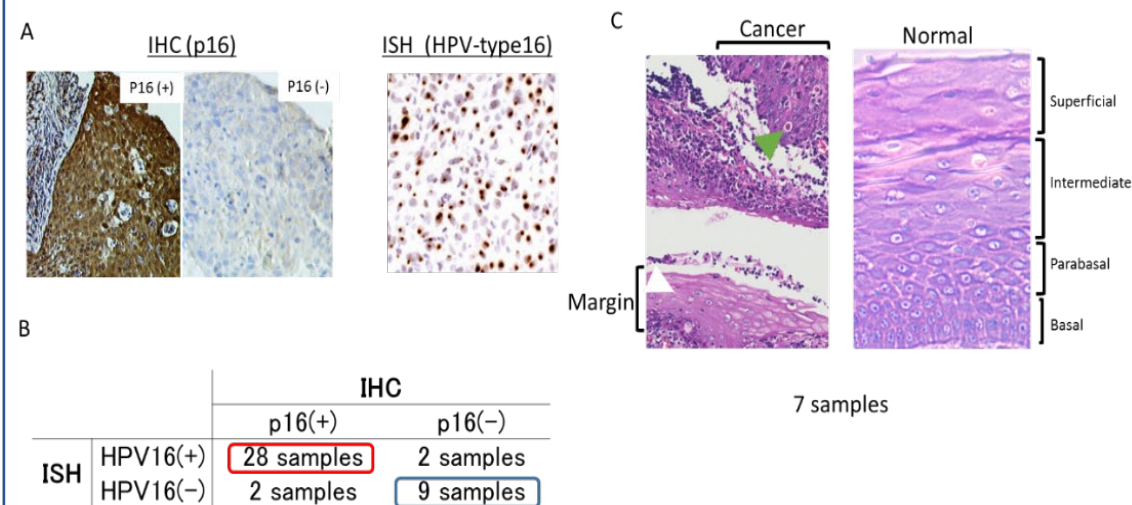
本研究は、HPV 関連中咽頭癌において、子宮頸癌と同様に DNA 損傷修復経路が活性化し、HPV の生活環に寄与するか検証していくことを目的としている。

また、近年の網羅的なゲノムシーケンス解析により、抗ウイルス因子でありシチジン脱アミノ化酵素群の APOBEC3 が、頭頸部癌や肺癌を含む様々な癌において特徴的な変異を誘導していることが報告されているので、HPV 関連頭頸部癌における発現についても検討した。

【研究方法・結果】 本研究に際し、まずNorthwestern University Hospital のHead and Neck Surgery部門およびHematology Oncology部門と連携し、口蓋扁桃および舌扁桃を原発とする中咽頭癌の手術検体を収集した。

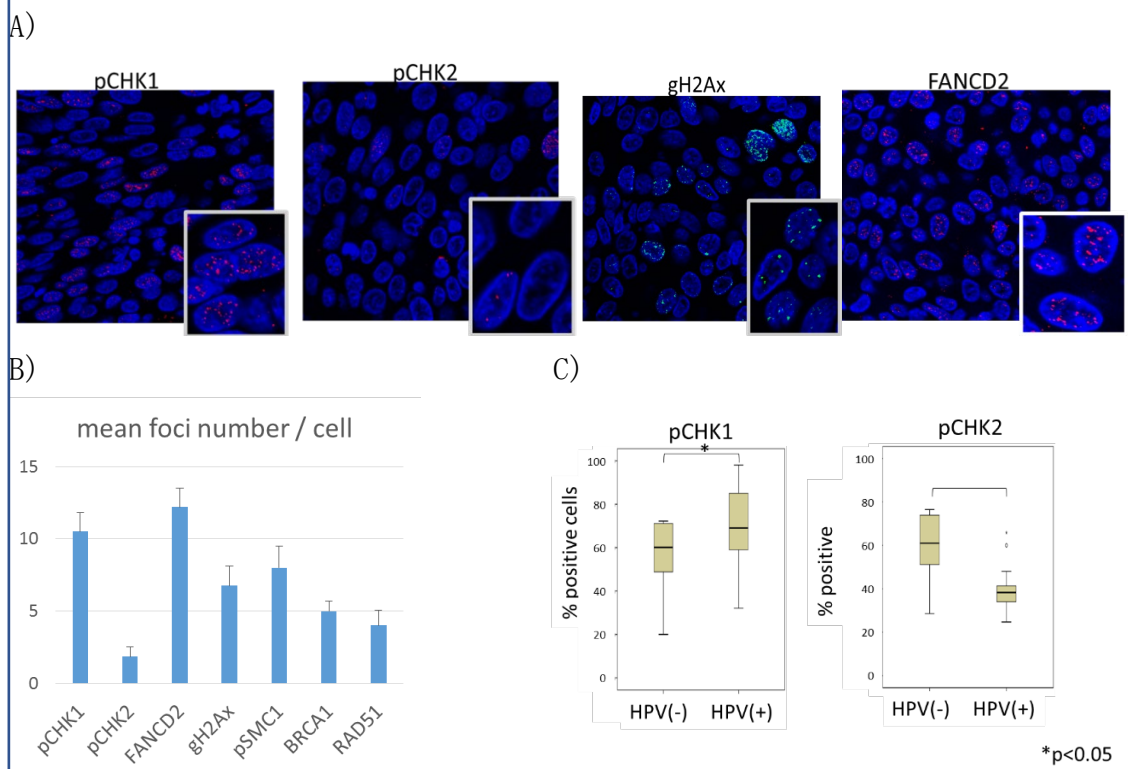
組織からパラフィン包埋切片を作成し、p16-INKAの免疫組織染色およびIn-situ hybridization法によるHPV16型の感染の有無を評価した。その結果、HPV陽性が28検体、HPV陰性が9検体、正常組織を含む断端部は7検体で取得できた(図2)。

図2 中咽頭癌組織におけるHPV16型有無の評価

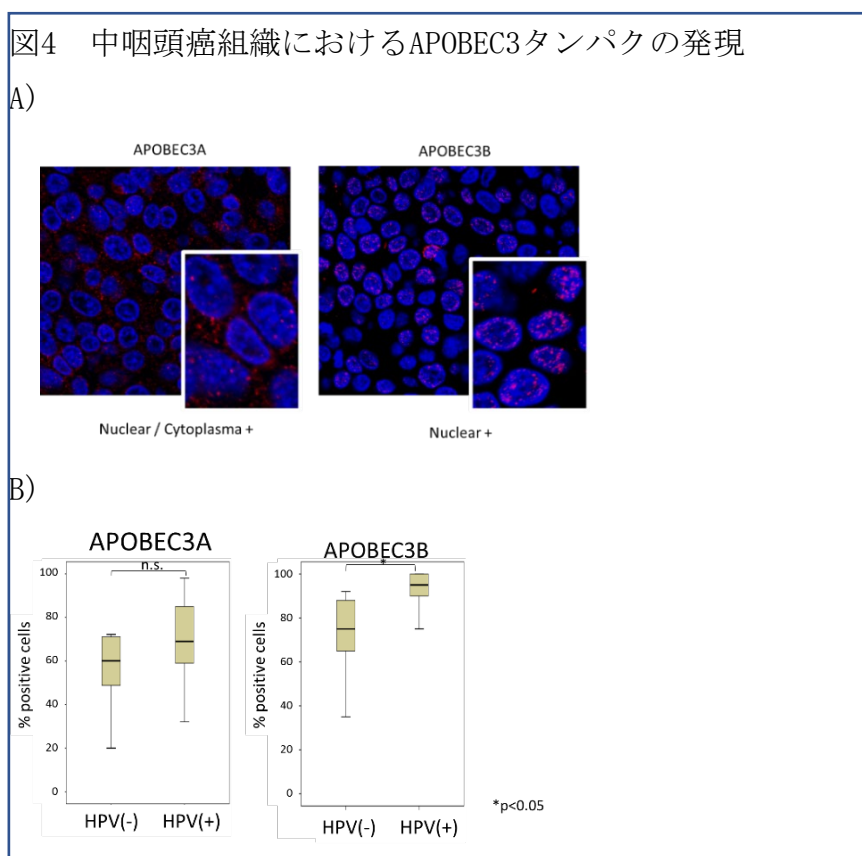


次に当研究室の先行研究の知見に基づき、宿主のDNA損傷修復経路のうち2本鎖DNAの損傷時に中心的な役割を果たすATM経路と1本鎖DNA損傷時に活性化するATR経路のタンパク（phosphorylated CHK1, phosphorylated CHK2, FANCD2, phosphorylated H2Ax, BRCA1, RAD51など）の発現や局在などを免疫蛍光染色にて観察した。

図3 中咽頭癌組織におけるDNA損傷修復系タンパクの発現



HPV陽性中咽頭癌の腫瘍組織では、核内において各種DNA損傷修復系タンパクの点状集積 (nuclear foci) を認め (図3A) 、その量は断端部や正常組織よりも腫瘍部の方が多かった。特に、ATM経路のタンパク (phosphorylated CHK2) よりもATR経路のタンパク (phosphorylated CHK1) がより多く発現していた (図3B)。また、HPV陽性と陰性の腫瘍を比較すると、陽性の方が有意に発現していた細胞の割合が高かった (図3C)。



一方、APOBECに関してはAPOBEC3Aが細胞質と核内の両方に、APOBEC3Bが核内のみで発現を認め (図4)、DNA損傷修復系のタンパクと同様に、HPV陽性腫瘍で有意に多く発現していた。

次に、これら組織での知見を確認し、その動態を検証するために細胞レベルでの評価を行った。まず、前癌状態として、ウイルスゲノムが宿主の遺伝子に組み込まれておらず環状DNA (エピソーム) の状態で細胞内に存在するHPV16型感染上皮細胞モデルを作成した。方法としては、胎児ヒト包皮組織より正常上皮細胞であるHuman Foreskin Keratinocyte (HFK) 細胞を分離させ、マウス胎

児由来3T3細胞の存在下で培養した後に、HPV16型ゲノムをトランスフェクションさせた（HFK16細胞）。本細胞はHPVの癌タンパクであるE6・E7の発現を認め、サザンブロット法にてHPVゲノムをエピソームとして保有することを確認した（HFK16細胞）。また、shRNA発現レンチウイルスベクターを用いて、HFK16細胞からE6・E7の発現を抑制した細胞も作成した。

これらの細胞を用いたウエスタンブロット法による検討では、HFKよりもHFK16の方が各種DNA損傷修復系タンパクおよびAPOBEC3をより多く発現しており、E6/E7の抑制により発現レベルが低下していた。このことから、HPVが感染上皮細胞におけるDNA損傷修復系およびAPOBEC3の活性化に寄与していることが示唆された。

さらに、ウイルスゲノムが宿主遺伝子に組み込まれた癌細胞として、既存のHPV陽性頭頸部癌細胞株であるUPCI:SCC090細胞、UPCI:SCC154細胞と、コントロールとしてHPV陰性頭頸部癌細胞株であるSCC9細胞、SCC25細胞、SCC68細胞を用い、同様にウエスタンブロット法による検討を行った。

HPV陽性の細胞株において、有意にDNA損傷修復系タンパクの発現が亢進していた。今後は、APOBEC3とDNA損傷修復経路との関連性について検証していく予定である。

留学期間中のため、本研究は現在も進行している。従って記載内容はこれまでの研究の進捗状況にとどまる。また、論文発表前につき、主要な図表は一部省略したり、公表を控えさせていただいた。残された留学期間を有効に活用し、研究成果をより充実したものにできるべく務めていきたいと考えている。

謝辞：

留学にあたり、助成いただきました公益財団法人中山人間科学振興財団の皆様には厚く御礼申し上げます。また、留学期間中にご指導を賜りましたNorthwestern 大学 Feinberg 医学校 Laimonis A Laimins 教授、留学前よりご指導を賜りました慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 小川郁教授をはじめ医局の先生の皆様にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。