

学 位 論 文 題 名

子宮頸癌細胞株 SiHa からクローン化したヒトパピローマ
ウイルス16型 E 6 / E 7 cDNA の生物学的活性

学位論文内容の要旨

I 緒 言

ヒトパピローマウイルス（HPV）16型などの高リスク HPV は、外陰・子宮頸部の悪性病変に高率に検出されるが、とくに E 6 / E 7 領域は、その HPV DNA の検出される子宮頸癌細胞株中に常に存在し、発現しており、ラットやマウスの細胞株をトランスフォームする活性やヒト角化上皮細胞を不死化させる活性がある。これに対し、良性病変から分離される HPV11型などの低リスク HPV の E 6 / E 7 領域のトランスフォーム活性は極めて低い。この違いは、主に E 6 / E 7 遺伝子産物の質的違いにより生ずると考えられているが、E 6 / E 7 領域からの転写産物の構造にも違いがある。すなわち、HPV16, 18型を含む子宮頸癌組織や、細胞株では、E 6 内でスプライスした E 6 / E 7 mRNA が検出されるが、HPV 6 b, 11型を含む良性病変からは、スプライス型の E 6 / E 7 mRNA は検出されない。

本研究では、HPV16型の E 6 / E 7 領域において、mRNA スプライスの有無が、その生物学的活性に影響を及ぼすかどうかを検討することを目的に、子宮頸癌細胞株 SiHa から HPV16 型 E 6 / E 7 cDNA を合成し、さらに、そのスプライス部位変異株を作成し、それらのトランスフォーム活性および細胞 DNA 合成誘導能を検討した。

II 実験材料および方法

1. プラスミド

HPV16型の E 6, E 7 および E 6 / E 7 断片を、ネオマイシン耐性遺伝子をもつ発現ベクター pcD2 - Y にクローン化して、pcD2 - E 6, pcD2 - E 7 および pcD2 - E 6 E 7 を作製した。また、E 6, E 7 断片を、ステロイドで発現を誘導できるベクター p5031* にクローン化し、p5031* E 6 および p5031* E 7 を作製した。

2. DNA トランスフェクションおよびトランスフォーム活性

各々の pcD 2 - E 6 / E 7 cDNA と活性型 *ras* をリン酸カルシウム共沈法により初代ラット線維芽細胞 (REF) にトランスフェクトし, G418で2週間選択した後, トランスフォームコロニーの出現率 (*ras* 協同トランスフォーメーション効率) を検討した。

3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

細胞株由来の全 RNA を DNase I 処理し, oligo dT をプライマーとして, 逆転写酵素により第 1 鎖 cDNA を合成し, PCR を行なった。

4. 点突然変異の導入および塩基配列解析

cDNA の塩基配列と一ヶ所のミスマッチをもつ 20mers のオリゴヌクレオチドを用いて, Kunkel 法により点突然変異を導入した。点突然変異およびその他の塩基配列の解析には, ジデオキシ法を用いた。

5. 細胞 DNA の合成誘導能

各々の p5031*E 6 / E 7 cDNA と pSV2hygro をラット 3 Y 1 細胞にトランスフェクトし, ハイグロマイシン B で選択した後, 12コロニーずつをクローン化し, 混合して, デキサメサゾンでその発現を誘導できる細胞株を樹立した。その細胞を無血清下で培養した後, デキサメサゾン添加時と非添加時の [³H] -チミジン取り込みの比 (細胞 DNA 合成誘導能) を比較した。

6. S 1 マッピング

DNA プローブと細胞 RNA をハイブリダイズさせ, nuclease S 1 を加えて消化した。S 1 抵抗性の断片をアルカリアガロースゲルで分離し, オートラジオグラフィーにより検出した。

Ⅲ 結 果

1. HPV16E 6 / E 7 cDNA のクローン化とスプライス部位変異株の作製

HPV16型 DNA を含む子宮頸癌細胞株 SiHa から細胞 RNA を抽出し, E 6 / E 7 領域をはさむプライマーを用いて RT-PCR を行なったところ, 3 種類の HPV16E 6 / E 7 mRNA (full-length E 6 / E 7 mRNA, E 6 * I / E 7 mRNA, E 6 * II / E 7 mRNA) に対する cDNA (cF (wt), c * I, c * II) が合成され, それぞれをクローン化した。

さらに, full-length E 6 / E 7 mRNA のみが転写されるような cDNA をつくる目的で, cF (wt) の E 6 内のスプライスドナー部位またはアクセプター部位に, それぞれ一ヶ所の点突然変異を導入し, 2 つの cDNA 変異株 (cF (Do), cF (Ac)) を得た。塩基配列解析により, それぞれ 227n. p. の G が A に, 407n. p. の A が C に変異したことが確認された。

これらの 5 つの cDNA を, それぞれ発現ベクター pcD 2 - Y および p5031* にクローン化し,

pcD2-cF (wt), pcD2-c*I, pcD2-c*II, pcD2-cF (Do), pcD2-cF (Ac), および p5031*cF (wt), p5031*c*I, p5031*c*II, p5031*cF (Do), p5031*cF (Ac) を作製した。

2. HPV16E6/E7 cDNA のトランスフォーム活性

pcD2-cF(wt)と pcD2-c*I のトランスフォーメーション効率は、それぞれ62.8%, 43.6%で、いずれもゲノム由来の DNA とほぼ同じレベルであったが、しかし、pcD2-c*II, pcD2-cF (Do), pcD2-cF (Ac) では16.1%, 19.1%, 21.2%と、pcD2-cF (wt) に比べ、それぞれ有意 ($p < 0.05$) に低下していた。

3. HPV16E6/E7 cDNA の細胞 DNA の合成誘導能

p5031*cF (wt) の細胞 DNA 合成誘導能は2.35倍、p5031*c*I は1.53倍であり、その cDNA の発現により細胞 DNA 合成が誘導されたが、しかし、p5031*c*II, p5031*cF (Do), p5031*cF (Ac) では、細胞 DNA 合成誘導能は検出されず、p5031*cF (wt) に比べ有意 ($p < 0.05$) に低下していた。

4. トランスフォーム細胞株における HPV16E6/E7 mRNA の解析

各々の E6/E7 cDNA と活性型 *ras* によりトランスフォームした REF 細胞株から細胞 RNA を調製し、RT-PCR 法により、転写される HPV16E6/E7 mRNA を解析した。その結果、pcD2-cF (wt) を含む細胞株では、CaSki や SiHa などの HPV16型を含む子宮頸癌細胞株と同様に、full-length E6/E7 mRNA と E6*I/E7 mRNA が転写されていたが、アクセプター部位の変異株 pcD2-cF (Ac) を含む細胞では、E6*I/E7 mRNA の転写が抑制され、主に full-length E6/E7 mRNA と E6*II/E7 mRNA が転写されていた。

一方、ドナー部位変異株 pcD2-cF (Do) を含む細胞からは、full-length E6/E7 mRNA のほかに、E6*I/E7 mRNA とほぼ同じサイズの mRNA が検出された。この PCR 産物の塩基配列解析により、本来のドナー部位より5塩基上流 (221n.p.) からのスプライスが確認された。pcD2-c*I, pcD2-c*II を含む細胞では、それぞれ、E6*I/E7 mRNA, E6*II/E7 mRNA に相当するバンドのみが検出された。

転写レベルを比較するために、同じ細胞 RNA と³²Pラベルした HPV16型 E6/E7 領域の DNA プローブを用いて S1 マッピングを行なった。その結果、pcD2-cF (wt) を含む細胞株では、full-length E6/E7 mRNA と E6*I/E7 mRNA が転写されていたが、cDNA 変異株を含む細胞株では、full-length E6/E7 mRNA に相当するバンドのみが検出された。

IV 考 察

HPV16型のE 6 / E 7 領域から転写される mRNA におけるスプライスの有無が、実際にE 6 / E 7 領域の生物学的活性に影響を及ぼすかどうかを検討するために、HPV16型の full-length E 6 / E 7 mRNA に対する cDNA に、そのスプライス部位が良性型と同配列になるように点突然変異を導入した。ドナー部位変異株のドナー部位は HPV 6 b 型と、アクセプター部位変異株のアクセプター部位は HPV11型とほぼ同じ配列となるため、この部位におけるスプライスが完全に抑制されるものと想定されたが、RT-PCR 法による解析により、アクセプター部位変異株を含むトランスフォーム細胞株中では、下流のアクセプター部位 (526n. p.) へのスプライスが生じ、ドナー部位変異株のトランスフォーム細胞株では、本来のドナー部位より5塩基上流(221n. p.)からのスプライスが生じることが判明した。しかし、定量性に優れたS 1マッピング法で検討したところ、変異株を含む細胞においては、スプライス型 mRNA の転写量は極めて少なく、主に full-length E 6 / E 7 mRNA が転写されていた。

このような転写パターンを示す cDNA 変異株とスプライス型 mRNA のみを発現する cDNA の生物学的活性を比較したところ、E 6 * I / E 7 mRNA を発現する cDNA では、トランスフォーム部位および細胞 DNA 合成誘導能が cF (wt) とほぼ同等であったが、full-length E 6 / E 7 mRNA あるいは E 6 * II / E 7 mRNA のみを発現する cDNA ではトランスフォーム活性は低く、DNA 合成誘導能は検出されなかった。このことから、2つの生物学的活性には、E 6 * I / E 7 mRNA の転写が重要であることが明かになった。

これらの生物学的活性は、HPV16型のE 6 遺伝子には認められないが、E 7 遺伝子には単独で認められ、E 7 遺伝子の発現に依存することが判明している。従って、本研究により、HPV16型では、E 6 * I / E 7 mRNA の転写により、ウイルス癌遺伝子であるE 7 遺伝子が効率的に発現していることが示された。さらに、HPV16型のE 6 * II / E 7 のスプライスはE 6 * I と同じE 6 内スプライスであるが、E 7 遺伝子の発現にはかならずしも重要でないことをはじめて明かにしえた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 教 授

副 査 教 授 柿 沼 教 授

副 査 教 授 葛 巻 教 授

ヒトパローマウイルス (HPV) 16型などの高リスク HPV は、外陰・子宮頸部の悪性病変に高率に検出されるが、とくにその初期遺伝子 E 6 / E 7 領域は、ラットやマウスの細胞株をトランスフォームする活性を有することやヒト角化上皮細胞を不死化させることが確認されており、ウイルス癌遺伝子として注目されている。これに対し、良性病変から分離される HPV11型などの低リスク HPV の E 6 / E 7 領域のトランスフォーム活性は極めて低い。この違いは、主に E 6 および E 7 遺伝子産物の質的違いにより生ずると考えられているが、E 6 / E 7 領域からの転写産物の構造にも違いがある。すなわち、HPV16, 18型を含む子宮頸癌組織や細胞株では、E 6 内でスプライスした E 6 / E 7 mRNA が検出されるが、HPV 6 b, 11型を含む良性病変からは、スプライス型の E 6 / E 7 mRNA は検出されない。しかし、この領域におけるスプライスの意義については未だ説明されていない点が少なくない。

本研究では、HPV16型において、E 6 領域内での mRNA スプライスの有無が、E 6 / E 7 領域の生物学的活性に影響を及ぼすかどうかを検討することを目的に、子宮頸癌細胞株 SiHa から HPV16型 E 6 / E 7 cDNA を合成し、さらに、そのスプライス部位変異株を作成し、それらのトランスフォーム活性および細胞 DNA 合成誘導能を検討した。

HPV16型 DNA を含む子宮頸癌細胞株 SiHa から細胞 RNA を抽出し、E 6 / E 7 領域を挟むプライマーを用いて RT-PCR を行なったところ、3種類の HPV16 E 6 / E 7 mRNA (full-length E 6 / E 7 mRNA, E 6 * I / E 7 mRNA, E 6 * II / E 7 mRNA) に対する cDNA (cF (wt), c * I, c * II) が合成され、それぞれをクローン化した。さらに full-length E 6 / E 7 mRNA のみが転写されるような cDNA をつくる目的で、cF (wt) の E 6 内のスプライスドナー部位またはアクセプター部位に、それぞれ一ヶ所の点突然変異を導入し、2つの cDNA 変異株 (cF (Do), cF (Ac)) を得た。塩基配列解析により、それぞれ 227n. p. の G が A に、407n. p. の A が C に変異したことが確認された。これらの 5つの cDNA を、トランスフォーム活性をみるために発現ベクター pcD 2 - Y に、および細胞 DNA 合成誘導能をみるために発現ベクター p 5031* にクローン化し、pcD 2 - cF (wt), pcD 2 - c * I, pcD 2 - c *

II, pcD2-cF (Do), pcD2-cF (Ac), および p5031*cF (wt), p5031*c*I, p5031*c*II, p5031*cF (Do), p5031*cF (Ac) をそれぞれ作製した。pcD2-cF (wt) と E6*I に対する cDNA である pcD2-c*II pcD2-c*I のトランスフォーメーション効率は、それぞれ 62.8%, 43.6% で、いずれも E7 領域を含むゲノム由来の DNA とほぼ同じレベルであったが、しかし、E6*II に対する cDNA である pcD2-c*II, および変異株 pcD2-cF (Do), pcD2-cF (Ac) では 16.1%, 19.1%, 21.2% と、pcD2-cF (wt) に比べ、それぞれ有意 ($p < 0.05$) に低下していた。また、p5031*cF (wt) の細胞 DNA 合成誘導能は 2.35 倍、p5031*c*I は 1.53 倍であり、その cDNA の発現により細胞 DNA 合成が誘導されたが、しかし、p5031*c*II, p5031*cF (Do), p5031*cF (Ac) では、細胞 DNA 合成誘導能は検出されず、p5031*cF (wt) に比べ有意 ($p < 0.05$) に低下していた。

次に、各々の E6/E7 cDNA と活性型 *ras* によりトランスフォームした初代培養ラット線維芽細胞株から細胞 RNA を調製し、RT-PCR 法により、転写される HPV16 E6/E7 mRNA を解析した。その結果、pcD2-cF (wt) を含む細胞株では、CaSki や SiHa などの HPV16 型を含む子宮頸癌細胞株と同様に、full-length E6/E7 mRNA と E6*I/E7 mRNA が転写されていたが、アクセプター部位の変異株 pcD2-cF (Ac) を含む細胞では、E6*I/E7 mRNA の転写が抑制され、主に full-length E6/E7 mRNA と E6*II/E7 mRNA が転写されていた。一方、ドナー部位変異株 pcD2-cF (Do) を含む細胞からは、full-length E6/E7 mRNA のほかに、E6*I/E7 mRNA とほぼ同じサイズの mRNA が検出された。この PCR 産物の塩基配列解析により、本来のドナー部位より 5 塩基上流 (221 n. p.) からのスプライスが確認された。pcD2-c*I, pcD2-c*II を含む細胞では、それぞれ、E6*I/E7 mRNA, E6*II/E7 mRNA に相当するバンドのみが検出された。転写レベルを比較するために、同じ細胞 RNA と 32 P ラベルした HPV16 型 E6/E7 領域の DNA プロブを用いて S1 マッピングを行なった。その結果、pcD2-cF (wt) を含む細胞株では、full-length E6/E7 mRNA と E6*I/E7 mRNA が転写されていたが、cDNA 変異株を含む細胞株では、full-length E6/E7 mRNA に相当するバンドのみが検出された。

以上の結果をまとめると、変異株を導入した細胞内では、E6 領域でのスプライスは抑制され、主に full-length の E6/E7 mRNA が転写されていた。このような full-length の mRNA のみを主に発現する cDNA 変異株と、スプライス型の E6/E7 mRNA のみを発現する cDNA の生物学的活性を検討した結果、E6*I/E7 mRNA を発現する cDNA のトランスフォーム活性、細胞 DNA 合成誘導能は、cF (wt) とほぼ同等であったが、full-length のみ、

またはE 6 * IIのみを発現する cDNA では、トランスフォーム活性は低く、DNA 合成誘導能は検出されなかった。このことから、2つの生物学的活性には、E 6 * I / E 7 mRNA の転写が重要であることが明かになった。従って、本研究により、HPV16型では、E 6 * I / E 7 mRNA の転写により、ウイルス癌遺伝子である E 7 遺伝子が効率的に発現していることが示された。さらに、HPV16型の E 6 * II のスプライスは、E 6 * I と同じ E 6 内のスプライスであるが、E 7 遺伝子の発現には必ずしも重要でないことがはじめて示された。

口頭発表に際し、長嶋教授から full-length の E 6 / E 7 mRNA だけが発現されるような cDNA を作ることができたかどうか、HPV の良性、悪性などの性質と関連が有るのはスプライスの有無だけかどうか、についての質問と、E 6 * I mRNA が細胞の悪性化に重要であることの確認があった。葛巻教授からは、良性型 HPV の full-length の DNA と今回実験に使用した悪性型の full-length mRNA のみが転写される cDNA との間で、生物活性を比較したかどうか、悪性型 HPV の E 6、E 7 遺伝子の産物と p53や Rb などの癌抑制遺伝子産物が結合するが、E 6 * I などのスプライスした mRNA から翻訳される蛋白の結合能をしらべたかどうか、などの質問があった。また、柿沼教授からは、スプライスのないものは良性型と考えて良いのかどうかについて、full-length の E 6 / E 7 mRNA から翻訳される E 7 蛋白量の検討の結果について、E 6 蛋白の発現量について、さらに1つの E 6 / E 7 mRNA から E 6 蛋白と E 7 蛋白の両方が翻訳されるか否かについての質問があった。申請者はこれらの質問に対して概ね適切に解答しえたと判断された。またその後、副査の柿沼教授、葛巻教授から個別に審査をうけ合格の判定を下された。

以上、本研究は HPV16型の E 6 領域内のスプライスがウイルス癌遺伝子である E 7 遺伝子の発現に関与することをはじめて明確にしえた研究であり、博士（医学）の授与に値するものと判断された。