

博士（医学）西川武志

学位論文題名

ヒトパピローマウイルス8型E7遺伝子による
発癌機構の実験的研究

学位論文内容の要旨

ヒトパピローマウイルスhuman papillomavirus (HPV) は、皮膚や粘膜に乳頭腫を形成し、ことに皮膚粘膜の悪性腫瘍にかかるウイルスとして重要である。現在までに60以上のゲノム型が分離され、ゲノム型によって感染部位ならびに関係する病変が異なることが知られている。その中に疣状表皮発育異常症（EV症）や免疫不全状態の患者に発生する皮膚悪性腫瘍から主に分離されるHPV5型、8型、47型などの皮膚高リスク型、子宮頸部異形性ならびに子宮頸癌組織の約80%から分離されるHPV16型、18型などの粘膜高リスク型が含まれている。粘膜高リスクHPV型による発癌機構の研究においてそのE7遺伝子は、ラットやマウスの細胞株をトランスフォームし、活性型ras遺伝子と共同で初代ラット培養細胞をトランスフォームする活性があること、またE7遺伝子単独でヒト角化上皮細胞を不死化し、E6遺伝子はこの活性を促進することが報告されており、E7遺伝子が発癌の主役を担っていると考えられている。

一方、皮膚高リスク型HPVによる発癌機構の研究においては、HPV8型とHPV47型のE6遺伝子が、マウスやラットの細胞株を形態学的にトランスフォームし、トランスフォーム細胞株中にE6遺伝子の発現が見られることなどが報告されている。しかしながら、E7領域も含め他の領域の細胞不死化活性やトランスフォーム活性の研究は現在までになされていない。

本研究では、皮膚高リスク型E7遺伝子のトランスフォーム活性を検討するため、HPV8型E7遺伝子およびE6/E7遺伝子を

含む断片を発現ベクターである pcD2-Y の SV40 エンハンサー／プロモーターの下流にそれぞれ組み込み、pcD2-8E7、pcD2-8E6/E7 を作製したうえで以下の実験を行った。陽性コントロールとして、HPV16型E7 遺伝子およびE6／E7 遺伝子を含む断片を組み込んだpcD2-16E7、pcD2-16E6/E7を作製した。

トランスフォーメーション効率：これらのプラスミドを活性型H-ras 遺伝子と共に、初代ラット線維芽細胞 rat embryo fibroblast(REF) にトランسفエクトし、トランスフォーム活性の有無を培養 2 週後におけるREFのトランスフォームコロニー形成数を測定することによって検討した。結果は、pcD2-8E7：12%、pcD2-16E7：43%、pcD2-16E6/E7：53%のトランスフォーム効率を示した。それぞれのトランフォームコロニーからトランスフォーム細胞株を樹立し、pcD2-8E7プラスミドでトランスフォームした細胞株を 8 RE 細胞株、pcD2-16E7プラスミドでトランスフォームした細胞株を 16 RE 細胞株と名づけ以下の実験を行った。

サザンプロットハイブリダイゼーション：8 RE 細胞株のDNA中に、HPV8型E7 領域が組み込まれていることを確認するため、pcD2-8E7プラスミド中のHPV8型E7 DNAの両側に切断部位をもつ酵素 *Bam*H1、HPV8型E7 領域の中に切断点をもつ酵素 *Pst*I と *Sau*3AI、またはpcD2-8E7プラスミドを 1ヶ所のみで切断する酵素 *Hind*III で、8 RE 細胞DNAを消化し、サザンプロットハイブリダイゼーションを行なった。その結果、得られたトランスフォーム細胞株には、導入したHPV8型E7 領域が複数コピー存続し、少なくともその一部は完全な形で組み込まれていることが示された。

トランスフォーム細胞の増殖能：8 RE 細胞株および 16 RE 細胞株の *in vitro* 培養における増殖能を検討するため、倍加時間、飽和密度、プレート効率および 0.3% 軟寒天培地中増殖能を検討した。倍加時間は、8 RE 細胞株で、平均 20.3 時間、16 RE 細胞株は、平均 9.7 時間の倍加時間を示し、8 RE 細胞株の増殖速度は、16 RE 細胞株の約 1/2 であった。飽和密度は 8 RE 細胞株の場合、平均 $65.2 \times 10^5 / 6\text{cm dish}$ で、16 RE 細胞株では、平均 $255.8 \times 10^5 / 6\text{cm dish}$ であり、8 RE 細胞株は、非トランスフォーム細胞 (REF) の 4 倍以上、16 RE 細胞株の約 1/4 の飽和密度を示し

た。8 RE、16 RE両細胞株は、ともに0.3%軟寒天培地中でコロニーを形成したが、コロニー形成率も、8 RE細胞株で平均4.6%、16 RE細胞株で平均13.2%であった。以上の結果から8 RE細胞株はトランスフォーム細胞としての性質を示したが、16 RE細胞株より細胞増殖能が低いことが確認された。

トランスフォーム細胞の造腫瘍性：トランスフォーム細胞(2×10^5)をPBSに懸濁して、生後1～2日目の同系ラット(Fisher F344)の皮下に接種し、腫瘍形成の有無および担癌ラットの生存を1ヶ月間観察した。接種後5日目には、8 RE細胞株や16 RE細胞株を接種したすべてのラットで腫瘍形成がみられ、また担癌ラットの平均生存期間は、8 RE細胞株を移植したラットの方が16 RE細胞株を移植したラットより短い値を示した。腫瘍の増生も8 RE細胞株による腫瘍の方が速く、大きな腫瘍を形成した。

誘発された腫瘍の組織学的所見：8 RE細胞株により誘発された腫瘍は、異型性が強く濃染性の核を持つ細胞からなり、周囲には小円形細胞の浸潤が多く見られる低分化型の肉腫像を示し、16 RE細胞株で誘発された腫瘍にくらべ悪性度の高い組織像を示した。

結語

本研究において、皮膚高リスク型であるHPV 8型E 7遺伝子が活性型H-ras遺伝子と共同で初代ラット線維芽細胞(REF)をトランスフォームすることを初めて見いだした。樹立したトランスフォーム細胞株は高い増殖能を示し、造腫瘍能を認めた。またその腫瘍は、組織学的に低分化型の肉腫像を示した。以上の結果からHPV 8型E 7遺伝子は、HPV関連の皮膚の癌化を考える上で、非常に重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査教授 大河原 章
副査教授 柿沼 光明
副査教授 葛巻 還

学位論文題名

ヒトパピローマウイルス8型E7遺伝子による 発癌機構の実験的研究

ヒトパピローマウイルスhuman papillomavirus (HPV) は、皮膚粘膜の悪性腫瘍にかかるウイルスとして重要である。現在までに60以上のゲノム型が分離され、その中に疣状表皮発育異常症や免疫不全状態の患者に発生する皮膚悪性腫瘍から主に分離されるHPV5型、8型、47型などの皮膚高リスク型、子宮頸癌組織の約80%から分離されるHPV16型、18型などの粘膜高リスク型が含まれている。HPV16型では、E7遺伝子に、ラットやマウスの細胞株をトランスフォームし、活性型ras遺伝子と共に初代ラット培養細胞をトランスフォームする活性があることなどが報告されており、E7遺伝子が発癌の主役を担っていると考えられている。一方、皮膚高リスク型HPVでは、HPV8型と47型のE6遺伝子が、マウスやラットの細胞株を形態学的にトランスフォームすることが報告されているが、E7領域も含め他の領域の細胞不死化活性やトランスフォーム活性の研究は今までになされていない。本研究では、皮膚高リスク型E7遺伝子のトランスフォーム活性を検討するため、HPV8型E7遺伝子およびHPV16型E7遺伝子（陽性コントロール）を含む断片を発現ベクターであるpcD2-YのSV40エンハンサー／プロモーターの下流にそれぞれ組み込み、pcD2-8E7、pcD2-16E7を作製したうえで以下の実験を行った。

トランスフォーム効率：これらのプラスミドを活性型H-ras遺伝子と共に、初代ラット線維芽細胞(REF)にトランスフェクトし、培養2週後におけるREFのトランスフォームコロニー形成数を測定することによってトランスフォーム活性の有無を検討した。結果は、pcD2-8E7：12%、pcD2-16E7：43%のトランスフォーム効率を示した。それぞれのトランスフォームコロニーから細胞株を樹立し、pcD2-8E7およびpcD2-16E7でトランスフォームした細胞株をそれぞれ8RE細胞株、16RE細胞株と名づけた。

サザンプロットハイブリダイゼーション：pcD2-8E7プラスミド中のHPV8型E7DNAの両側に切断部位をもつ酵素BamH1、E7領域内に切断点をもつ酵素PstIとSau3AI、またはpcD2-8E7を1ヶ所のみで切断する酵素HindIIIで、8RE細胞DNAを消化し、サザンプロットハイブリダイゼーションを行なった。その結果、8RE細胞株には、導入したHPV8型E7領域が複数コピー存続し、少なくともその一部は完全な形で組み込まれていることが示された。

トランスフォーム細胞の増殖能：トランスフォーム細胞株のin vitro培養における倍加時間、飽和密度、0.3%軟寒天培地中増殖能を検討した。倍加時間は、8RE細胞株で平均20.3時間、16RE細胞株で平均9.7時間であった。飽和密度は8RE細胞株で、平均 $6.52 \times 10^5/6\text{cm dish}$ 、16RE細胞株では、平均 $2.55.8 \times 10^5/6\text{cm dish}$ であり、8RE細胞株は、非トランスフォーム細胞(REF)の4倍以上、16RE細胞株の約1/4の値を示した。また0.3%軟寒天培地中でのコロニー形成率は、8RE細胞株で平均4.6%、16RE細胞株で平均13.2%であった。以上の結果から8RE細胞株はトランスフォーム細胞としての

性質を示すが、16RE細胞株より *in vitro* における細胞増殖能が低いことが確認された。

トランスフォーム細胞の造腫瘍能：トランスフォーム細胞 (2×10^5) を生後1～2日目の同系ラット(Fisher F344)の皮下に接種し、腫瘍形成の有無および担癌ラットの生存を1ヶ月間観察した。接種後5日目には、8RE細胞株、16RE細胞株を接種したすべてのラットで腫瘍形成がみられ、また担癌ラットの平均生存期間は、8RE細胞株を移植したラットの方が16RE細胞株を移植したラットより短い値を示した。腫瘍の増生も8RE細胞株による腫瘍の方が速く、大きな腫瘍を形成した。

誘発された腫瘍の組織学的所見：8RE細胞株により誘発された腫瘍は、16RE細胞株で誘発された腫瘍にくらべ、異型性が強く濃染性の核を持つ細胞からなる低分化型の肉腫像を示した。

以上本研究において、皮膚高リスク型であるHPV8型E7遺伝子が、活性型H-ras遺伝子と共に初代ラット線維芽細胞をトランスフォームすることを初めて見いだした。樹立したトランスフォーム細胞株は高い増殖能を示し、造腫瘍能が認められた。またその腫瘍は、組織学的に低分化型の肉腫像を示した。以上の結果からHPV8型E7遺伝子は、HPV関連の皮膚の癌化において、非常に重要であると考えられる。