シンポジウム

子宮頸癌ウイルス発癌の可能性に関する研究

佐賀医科大学講師 岩 坂 剛

研究目的

子宮頸癌発症に關与するウイルスとして1970年代初め、まず単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)が、そして1970年代後半になると、ヒトパピローマウイルス(HPV)が注目されるようになった。これまでの研究で、HSV-2の発癌能力については単独による完全な造腫瘍能が証明されている。一方、HPVについては細胞をtransformする能力は証明されているが、いまだ単独による完全な癌化能力は証明されていない。われわれの研究はこうした事実を踏まえ、(1) HSV-2 DNAによる発癌機構の解明、(2) HPV 16型および HPV 18型 DNAの *in vitro*における発癌能力の検討、(3) HSV-2と HPVの協同作用による発癌能力の検討、(4) これらのウイルスによる発癌過程におけるウイルス DNAの存在状態、さらには内因性癌遺伝子の増幅および発現との関係を検討することを目的とした。

研究方法

I. ウイルス DNAの導入および発癌能力の検討

(i) ハムスター胎児(SHE)初代培養細胞に HSV-2 DNAの断片、あるいは HPV 6, 11, 16, 18型 DNAをリン酸カルシウム沈澱法によつて導入し、細胞の immortalization あるいは造腫瘍能の獲得の有無を検討した。

(ii) HSV-2 DNA断片の導入によつてすでに immortalization を獲得したハムスター胎児細胞(AE)にさらに HPV 16型および HPV 18型 DNAを導入することによつて造腫瘍能の獲得の有無を検討した。これら造腫瘍能の検討は 1×10^7 個の細胞をヌードマウス皮下に接種し、少なくとも3カ月間観察した。

II. 癌化細胞におけるウイルス DNAの検出および内因性癌遺伝子の増幅および発現の検討

(i) HSV-2 DNAあるいは HPV DNAの導入によつて得られた異なつた癌化過程にある細胞からそれぞれDNAを抽出し、制限酵素で切断した後、Southern blot hybridization法を用いてウイルス DNAの検出を試み、同時に癌遺伝子(c-myc および Ha-ras)の増幅の有無を検討した。

(ii) HSV-2による癌化細胞については c-myc 癌遺伝子の発現を蛍光抗体法で検討した。

成 績

I. HSV-2 DNAの発癌能力

(i) HSV-2による発癌が少なくとも2段階で起こることが証明された。すなわち HSV-2 DNA 地図上、0.42~0.58の位置にある DNA断片で完全な発癌が可能であるが、この断片の左側2/3によつて immortalization が獲得され、さらに右側1/3が加わることによつて造腫瘍能が付加されることがわかつた。

(ii) 前述の造腫瘍能を付加する能力を持つ DNA断片上に、子宮頸癌関連抗原 AG-4と同一の抗原性を持つ分子量144,000の蛋白がコードされていることが証明された。

(iii) 子宮頸癌患者血清中の抗 AG-4抗体の検索を行つたところ、その陽性率は46%であり、対照群における陽性率15%に対して有意な高率を示した。

(iv) HSV-2 DNA断片の導入により癌化した細胞の中にウイルス DNA断片および AG-4抗原が証明されたが、一度腫瘍を造らせたのち、再度 *in vitro*に移した細胞の中には、ウイルス DNA および AG-4抗原が共に証明できなくなつた。ところが後者では腫瘍形成前には検出できなかつた内因性癌遺伝子 c-myc の発現が認められるようになった。

II. HPV DNAの発癌能力

(i) HSV-2 DNAの特定の断片の導入により

すでに immortalize した細胞 (AE) にさらに HPV 16型あるいは18型 DNA を導入すると、いずれにも focus 形成がみられ、transform した細胞は高い saturation density を示すと共に高率にヌードマウスにおける造腫瘍能を示した (HSV-2 による initiation, HPV による promotion という zur Hausen が提唱した発癌仮説の可能性が実験的に証明された)。

(ii) HPV 16型 DNA による癌化細胞では全例において1コピー以上のウイルス DNA が証明されたが、HPV 18型 DNA による癌化細胞では証明されるウイルス DNA がすべて1コピー以下であり、中にはウイルス DNA を証明できないものもあつた (“hit and run”発癌機構を示唆している)。またこれらのウイルス DNA は腫瘍形成を経ることによつて、制限酵素による切断パターンが変化するものがみられた。

(iii) 初代培養 SHE 細胞に HPV 6, 11, 16および18型 DNA を導入した場合、すべての培養プレートに focus 形成が認められた。各々の focus から細胞をクローニングした後、継代数5代目でヌードマウスに接種したところ、いずれの細胞にも造腫瘍能は認められなかつた。ところが、これらの細胞は継代を繰り返すことによつて、すべて immortalization を獲得した。さらに継代を続けると、HPV 16型 DNA で transform された細胞は継代25代目にヌードマウスにおける造腫瘍能を獲得した。また、HPV 18型 DNA で transform された細胞は継代48代目においてヌードマウスに腫瘍をつくるようになった。一方、SHE 細胞、AE 細胞、および HPV 6型、11型 DNA 導入によつて immortalization を獲得した細胞では継代数50代を超えても造腫瘍能が認められなかつた。

III. HPV DNA で誘発された癌化細胞における内因性癌遺伝子の増幅

(i) HPV 16型 DNA あるいは HPV 18型 DNA の導入によつて癌化した細胞のいずれにも c-myc 遺伝子および Ha-ras 遺伝子の増幅は認められなかつた。

結 論

I. HSV-2による発癌が多段階で起こることが証明され、さらに子宮頸癌関連抗原 AG-4が HSV-2 DNA の腫瘍原性を有する断片上にコードされていることが証明された。

II. HSV-2による in vitro 発癌では癌化が完了した時点で内因性癌遺伝子の発現が起こりうること、また、この発癌過程が“hit and run”機構に基づくことが示唆された。

III. HPV 16型および18型 DNA は他の cofactor の協力のもとに、例えば HSV-2との協同作用によつて完全発癌が可能であることが証明された。

IV. HPV 18型 DNA による発癌が“hit and run”機構に基づく可能性が示唆された。

V. HPV 16型および HPV 18型には初代培養細胞を immortalize する能力があること、さらに、継代操作を加えることによつて完全発癌まで持つてゆけることが示された。

VI. HPV 6/11型および HPV 16/18型の2群間において、その潜在的発癌能力に差があることが実験的に証明された。

VII. HPV 16型あるいは HPV 18型による癌化細胞において内因性癌遺伝子 c-myc および Ha-ras の増幅は認められず、発現レベルにおける検索の必要性が示唆された。