

7 パピローマウイルス E2蛋白質のウイルス転写機能に関する解析

慶應大

藤井多久磨, 福地 剛, 久布由兼行, 塚崎克己, 石川光也, 舩本暢生, 吉村泰典, 野澤志朗

【目的】パピローマウイルスの E2蛋白質はウイルス遺伝子の転写を調節しており, ウイルスの生活史において重要な働きをしている. ヒトパピローマウイルス16型 (HPV16) の感染は子宮頸癌発生に深く関与するが, 種特異性が強く感染動物実験が困難である. 一方, ウサギパピローマウイルス (CRPV) はウサギに腫瘍を形成し, 腫瘍の癌化を研究するうえで良いパピローマの動物モデルとなりうる. そこで CRPV の E2蛋白質と HPV16 の E2蛋白質の転写活性について比較検討した. 【方法】1. E2発現ベクターをレポーター遺伝子とともに上皮由来培養細胞内にトランスフェクションし, 転写活性を測定した. 2. 遺伝子導入された E2の発現レベルを調べるためにゲルシフトアッセイ, RNA プロテクションアッセイを行った. 3. E2蛋白質の DNA 結合領域への結合安定性を解析するために大腸菌組換え E2蛋白質を作製しゲルシフトアッセイを行い, 種による違いを比較検討した. 【成績】1. CRPV の E2蛋白質は少量発現している場合には転写活性が認められるが発現量が増加するにたが, 転写活性が低下する傾向が認められた. 2. HPV16型の E2の場合には E2導入遺伝子の量依存性に転写活性が上昇する傾向が認められた. 3. HPV16型の E2は CRPV の E2に比べて DNA への結合性が安定していた. 【結論】CRPV と HPV16型の E2蛋白質はその転写調節機構に違いが認められるが, E2蛋白質が細胞内で少量発現している場合, 両者とも転写活性化を促す因子として機能することが判明した. したがって, E2蛋白質はパピローマウイルスに対する分子療法における標的分子として妥当であると考えられた.

14
日
演
月

8 HPV 陽性子宮頸癌における E6, E7遺伝子発現の普遍的存在

東京大

中川俊介, 吉川裕之, 八杉利治, 川名 敬, 松本光司, 山田 学, 恩田貴志, 武谷雄二

【目的】ほぼすべての子宮頸癌におけるヒトパピローマウイルス (HPV) DNA の存在はウイルス発がんの最大の根拠の一つである. HPV による発がん機序は E6/E7蛋白による癌抑制蛋白 p53及び pRb の不活化で主に説明される. しかし, HPV16/18陽性の子宮頸癌細胞株や少数の HPV16/18/33/51陽性の子宮頸癌検体以外では, E6/E7遺伝子の発現や転写機構は確認されていない. E6/E7遺伝子の発現が, HPV 陽性子宮頸癌やその前駆病変 (CIN) に普遍的に認められる所見であるかを検証した. 【方法】E6, E7領域にコンセンサスプライマーを用いた RT-PCR を設計し, HPV 陽性の子宮頸癌31例と CIN 23例の組織から抽出した RNA を用いて, E6, E7遺伝子の発現及び E7 transcript (E6 mRNA) の splice donor/acceptor sites を検討した. 【成績】1) E6発現は子宮頸癌及び CIN において, 各々97%, 100%とほぼ全例に確認された. 2) E7発現は子宮頸癌では100%であったが, CIN 全体での検出頻度は74%で, CIN I, II, III と病変が進展するに従って検出頻度が, 50.69, 86%と増加した. 3) HPV31, 35, 52, 56, 58, 59における E6 mRNA の splice donor/acceptor sites が初めて明らかとなった. 【結論】子宮頸癌において E6, E7発現は HPV 型に依らず普遍的に認められ, CIN においては E6発現は子宮頸癌と同様だが, E7発現は認められないことも多く, high-grade CIN で発現頻度が高い.

9 子宮頸癌における HPV のコピー数と存在様式の意義

岡山大

長尾昌二, 吉野内光夫, 倉本博行, 長谷川幸清, 橋本一郎, 本郷淳司, 水谷靖司, 児玉順一, 工藤尚文

【目的】ヒトパピローマウイルス (HPV) が子宮頸癌の発症に大きく関与していることについては広くコンセンサスが得られている. HPV E6, E7タンパクは P53および pRb と結合して細胞周期制御機構を攪乱することから両者の高発現が癌化に重要である. E6, E7の高発現に寄与する E2領域の破碎・欠失を伴うゲノムの宿主内取り込み, およびコピー数の多寡を同時に診断することを目的として研究を行った. 【方法】HPV16型陽性の22例の子宮頸癌組織, および28例の子宮頸癌関連病変の擦過細胞から同意を得て DNA を抽出し, 定量性に優れた real-time PCR 法を行って E2および E6領域の copy 数を測定した. 存在様式の判定は次のように行った. $E2 \neq E6$; episome 単独 (E), $E2 = 0$; integration 単独 (I), $E2 < E6$; concomitant (C) また, DNA 100 μ g あたりの E6コピー数を算出し, HPV のコピー数とした. 【成績】CIN では E:7例, I:2例, C:2例, microinvasive では E:4例, I:1例, C:6例, invasive では E:10例, I:11例, C:7例との結果が得られ, 病変の進行とともに integration が増加していた. また, 宿主内取り込みは CIN の段階ですでに起こり始めていることが明らかになった. 一方, episome 単独の存在様式の症例についてみると病変の進行とともに HPV のコピー数が増加する傾向を認めた. 【結論】本法はきわめて少量の DNA から HPV の存在様式を正確に診断することが可能であり, 同時に E6のコピー数の多寡を算出できるため, 病変の進行にともなう存在様式の変遷とコピー数の変化についても知見が得られた. 本法を応用することにより, 特に異型上皮での病変の進行を予想することが可能になることが期待される.