

シンポジウム1 子宮頸癌の発生と進展—その制御を目指して—

E2 蛋白質をターゲットとした HPV 感染症に対する
抗ウイルス薬剤開発への基礎的検討

慶應義塾大学助手 藤井 多久磨

目 的

ヒトパピローマウイルス (HPV) の感染予防対策としてウイルス粒子表面蛋白質を用いた予防ワクチンの開発が試みられているが、この方法では約 80 種類とも報告されているさまざまな HPV の型に対応することが困難であると指摘されている。したがって、感染したウイルスを不活化できるような薬剤が開発されることが望ましい。現在、HPV 16 型を中心としたハイリスク型に属するグループは子宮頸癌組織に高率に検出されており、その持続感染が発癌に深く関与していることが報告されている。その機序としてはウイルス初期蛋白質のなかで E6・E7 蛋白質が宿主細胞の細胞周期を強制的に回転させることにより宿主細胞の増殖を促し、細胞の癌化に関与していると考えられている。近年、E6・E7 遺伝子の転写機構の解析は、パピローマウイルス遺伝子を強制的に導入するトランスフェクション法によりおこなわれ、初期遺伝子の一つである E2 蛋白質が宿主由来の転写因子と複合体を形成することにより調節されることが明らかになったが、その詳細はいまだ解明されていない。一方、兎のパピローマウイルスである cottontail papillomavirus (CRPV) を用いた感染実験は遺伝子導入状態がより生理的な条件であるので、遺伝子の発現調節機構を自然界に近い状態で観察できる利点がある。しかも、HPV は種による特異性が強く感染実験は困難であることから、ウイルス感染後の遺伝子調節機構を CRPV を用いて解析することは意義がある。今回、我々は E2 蛋白質のウイルス遺伝子の転写に及ぼす働きをトランスフェクション実験および感染実験にて解析するとともに、E2 蛋白質を中心とする転写因子複合体形成を阻害しうるペプチドを同定し、将来の抗ウイルス薬剤の候補となりうる根拠を示す。したがって、本研究では次の 4 点の達成を目指す。

I. 子宮頸部腫瘍における HPV16 型遺伝子ならびに E2 遺伝子の存在を明らかにすると共に、E2 蛋白質が分子標的治療にふさわしい分子であるか否かを検討する。

II. トランスフェクション実験により、HPV16 型と CRPV の E2 蛋白質がウイルス遺伝子の発現調節に果たす役割について比較検討を行い、転写因子としての E2 蛋白質が示す特性について明らかにする。

III. 感染実験により CRPV の E2 蛋白質が E6・E7 遺伝子のプロモータ転写活性を誘導するか否かを検討する。これにより、E2 蛋白質がヒトに対する分子標的治療を目指すうえで、抗ウイルス剤開発の標的蛋白質としてふさわしいか否かを明らかにする。

IV. HPV16 型 E2 蛋白質に結合するペプチドを同定し、そのペプチドが E2 蛋白質のプロモータ転写活性を阻害することにより、将来の抗ウイルス薬剤候補になりうる理論的根拠を示す。

方 法

I. 子宮頸部腫瘍における HPV16 型ならびに E2 遺伝子の存在：HPV16 型の DNA をプローブとした *in situ hybridization*, E2 遺伝子を標的とした *in situ PCR* を行い、それらの組織内局在を検討する。

II. E2 蛋白質がウイルス遺伝子の発現調節に果たす役割 (トランスフェクション実験)：HPV16 型もしくは CRPV の E2 蛋白質発現ベクターおよびエンハンサーに E2 蛋白質結合部位が組み込まれている E2 応答レポーター・ベクターをヒト子宮頸癌由来培養細胞 C33a またはウサギ上皮由来不死化培養細胞 Sf1Ep にトランスフェクションし、E2 蛋白質のプロモータ転写活性をルシフェラーゼ・アッセイにて測定・比較する。

III. E2 蛋白質がウイルス遺伝子の発現調節に

果たす役割(CRPV感染実験): Sf1Ep細胞にCRPVを感染させた後, E2応答レポーター・ベクターをトランスフェクションし, ルシフェラーゼ・アッセイにてE2蛋白質のプロモータ転写活性を測定する. E6・E7遺伝子の発現の有無はreverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法により検討する.

IV. 抗ウイルス薬剤候補としてのペプチドの単離とその解析: 大腸菌組み換えにより得たHPV16型E2蛋白質を標的としてプレートに固相化し, 任意の12個のアミノ酸をファージのファイバー蛋白質に組み込んだライブラリーを用いパニング法にてスクリーニングし, E2蛋白質と結合するファージを単離する. 単離されたファージの提示するペプチド配列がE2蛋白質のプロモータ転写活性に及ぼす効果をルシフェラーゼ・アッセイにて測定する.

成 績

I. 子宮頸部腫瘍におけるHPV16型ならびにE2遺伝子の存在: in situ hybridization法により異形成ではウイルスDNAは傍基底層に少数コピー存在し, 中層から表層にかけてウイルスコピー数が増加する傾向が認められた. in situ PCRにてE2遺伝子の組織内局在が確かめられた.

II. E2蛋白質がウイルス遺伝子の発現調節に果たす役割(トランスフェクション実験): HPV16型とCRPVのE2蛋白質は類似のプロモータ転写活性を有することが明らかとなり, トランスフェクションしたE2発現ベクターのDNAが少量の場合には濃度依存的に転写活性が上昇した. すなわち, E2蛋白質は細胞内の濃度がある程度に達するまでは, E6・E7遺伝子などの初期遺伝子に対しては潜在的に転写促進作用のあることが示された.

III. E2蛋白質がE6・E7遺伝子の発現調節に果たす役割(CRPV感染実験): CRPV感染細胞では感染粒子が増加するに伴い, プロモータ転写活性の上昇が認められ, 感染細胞におけるE2蛋白質の増加が示唆された. 同時にE6・E7遺伝子が発現してくることをRT-PCR法により確認した. これらの事から, II. の結果とも合わせ, HPV16

型感染実験が困難である現時点において, CRPVの感染実験はHPV16型感染の擬似モデルとして有用であることが示された. 同時に, E2蛋白質が転写活性を有することが明らかとなったので, E2蛋白質の機能を阻害することにより, ウイルス初期遺伝子の発現を抑制し, ひいては感染細胞におけるウイルスの活動を停止させ得ることを明らかにした.

IV. 抗ウイルス薬剤候補としてペプチドの単離とその解析結果: 10^{11} クローンのファージ・ライブラリーから57クローンのファージをパニング法により選別し, ファージクローンのファイバー蛋白質のペプチドを同定したところ, 4種類のペプチドでトリプトファンを含む配列が見出され, このうち2種のペプチドはE2蛋白質のプロモータ転写活性を阻害することが観察されたことから, 今回同定したトリプトファンを含むペプチドがE2蛋白質との結合に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった.

結 論

I. E2遺伝子はほとんどの異形成組織において保持されており, E2蛋白質はウイルスのライフサイクルにおいて重要なウイルス蛋白質の一つであることを明らかにした.

II. E2蛋白質はウイルス初期遺伝子の転写調節に関与する重要な蛋白質であり, E2蛋白質が抗ウイルス薬剤開発における標的蛋白質としてふさわしいことをはじめて明らかにした.

III. HPV16型E2蛋白質の転写促進活性を阻害するためには, トリプトファンを含むペプチド配列が重要であることを明らかにし, 将来の新しい抗ウイルス薬剤開発への理論的根拠を示した. すなわち, E2蛋白質の機能をペプチドにより阻害することによりウイルスの転写を抑制し, その結果として感染細胞の増殖を抑制しうることを明らかにした. E2蛋白質をターゲットとした分子標的療法はE2蛋白質の機能部位がHPV型間で保存されている点を考慮に入れると, ワクチン療法と異なり多数のHPVの型に対応が可能であるという点で意義がある.