



Title	ヒトパピローマウイルスの各種タイプ間における癌遺伝子機能の比較
Author(s)	高見, 恭成
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37173
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【26】

氏名・（本籍）	たか 高	み 見	やす 恭	なり 成
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 6 7 7	号	
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日			
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	ヒトパピローマウイルスの各種タイプ間における癌遺伝子機能 の比較			
論文審査委員	(主査) 教授 羽倉 明			
	(副査) 教授 豊島久真男	教授 上田 重晴		

論 文 内 容 の 要 旨

（目 的）

現在ヒトパピローマウイルス（HPV）は約66種類のタイプが同定され、これらのうち特定のタイプがある種の癌の発生に関与すると考えられている。HPVはその tropism から皮膚型、粘膜型に大別され、また腫瘍原性の違いから良性型と悪性型に分類可能である。現在最も多く研究がなされているのは、子宮頸癌との関与が疑われている16型及び18型である。両タイプ共にウイルス初期遺伝子の E 6 E 7 遺伝子（E 6 E 7）に培養細胞に対する transform 活性が認められ、またこれら産物が子宮頸癌組織中で発現していることから、E 6 E 7 は頸癌の発生や維持に重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、他のタイプについての研究はほとんどなされていない。本研究ではHPVタイプで認められる腫瘍原性の差異をウイルス遺伝子レベルで明らかにする目的で、E 6 E 7 の機能を中心に各タイプ間の transfoerm 活性を比較検討した。

（方 法）

本実験に用いたHPVは1, 5, 6, 16, 17及び52型の6種類である。1, 5, 17型は皮膚型で1型は足底疣贅など良性腫瘍を誘発するのに対し、5, 17型は疣贅状表皮発育異常症患者に生じた皮膚癌から分離されることから悪性化に関与するものと考えられる。6, 16, 52型は粘膜型であり、6型は尖圭コンジローマなどから分離されるので良性型、一方16, 52型は子宮頸癌から分離されるので悪性型と分類されている。これらのHPV E 6 E 7 領域を含むDNA断片を動物細胞発現ベクター pZipneo SV (x) 1 に挿入し、各 E 6 E 7 の発現を Mo-MuLV の LTR の支配下に置いた。これらプラスミドを pHyg (hygromycin 耐性遺伝子を含む) と10:1の比でリン酸カルシウム法で培養細胞に transfect後、

プラスミド保持細胞を hygromycin で選択し。その性状を調べた。用いた細胞は、株化した細胞として NIH 3 T 3, 3 Y 1, C127 を、初代培養細胞として Fisher rat から調製した primary rat embryo fibroblast (REF) を使用した。

(結 果)

1. NIH 3 T 3, 3 Y 1 に各 E 6 E 7 を導入した場合、飽和密度の上昇や顕著な形態変化が認められたのは 16, 52 型のみであった。一方、C127 に各タイプの E 6 E 7 を導入すると程度の差はあるが、すべてのタイプで変化が認められた。形態的变化の強さは $16, 52 > 5, 17 > 1 > 6$ の順であった。軟寒天培地中でのコロニー形成は 16, 52 型を導入したすべての細胞種で認められたが、他のタイプではコロニー形成能は確認できなかった。
2. 初代培養細胞、REF に各タイプ E 6 E 7 を transfect して生じた個々の hygromycin 耐性コロニーの不死化能を調べた。各 E 6 E 7 を transfect して生じたコロニー数はいずれの場合も pZipneo で生じたコロニー数よりも多かった。このことはすべてのタイプの E 6 E 7 に細胞増殖を促進する活性があることを示す。しかしながら、不死化能を獲得したコロニーは 1, 16, 52, 型を導入した細胞のみであった。各 E 6 E 7 と活性型 c-Ha-ras を REF に co-transfect して focus 形成の有無を調べたところ、1, 16, 52, 型でのみ focus の形成が認められた。
3. 粘膜型間での腫瘍原性の差異を明らかにする目的で、6 型と 16 型の E 7 について更に詳細に解析した。両型の E 7 を効率良く同程度発現させる目的で E 7 領域のみ pZipneo に挿入して上記 transform 能を検討したところ、6 型にはその活性が認められなかった。そこで 16 型および 6 型の E 7 間でのキメラを作成し、transform 能を支配している domain の同定を試みた。すなわち両型間の E 7 の、N 末端から約 $\frac{1}{3}$ の領域を互換した 2 種類のキメラ、6/16E 7 (N 末端が 6 型)、16/6E 7 (N 末端が 16 型) を作成し、これらの transform 能を調べた。その結果 6/16E 7 に軟寒天培地での増殖能、活性型 ras と共同して REF を transform する活性及び、不死化能が認められた。しかし不死化させる効率は 16E 7 に比べやや低下していた。一方、6/16E 7 にはこれらの活性は認められなかった。

(総 括)

1. HPV 各タイプ間によって E 6 E 7 遺伝子の培養細胞に対する各種 transform 活性に強弱があることを明らかにした。
2. 同じ悪性型に分類される HPV 間でも粘膜型である 16, 52 型と皮膚型である 5, 17 型の E 6 E 7 遺伝子とは異なる transform 活性を示すことを明らかにした。このことから、HPV による子宮頸癌と皮膚癌の発生には異なる機構で起こる可能性が示唆された。
3. 粘膜タイプ間で認められる腫瘍原性の差異の一因として、E 7 の N 末端から $\frac{1}{3}$ 領域の domain が重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒトパピローマウイルス（HPV）には多くのタイプが存在し、このうちの一部が皮膚癌や子宮頸癌の発生に密接に関与しているものと考えられている。本研究は粘膜および皮膚由来の悪性型と良性型HPVのトランスフォーム能を比較検討することにより、癌化に関与するウイルス遺伝子の同定とその機能を明らかにすることを目的として行われたものである。本研究によって、粘膜悪性型と皮膚悪性型HPVの癌遺伝子機能に差異があり、両者による癌化が一部異なった機構によって引き起こされる可能性が示された。また、粘膜悪性型と良性型E7ORF（open reading frame）間でのキメラE7ORFの解析から、両者間で認められるトランスフォーム活性の強弱が主としてE7蛋白のN末端から30アミノ酸残基によって規定されていること、また30アミノ酸以降のC末端側もトランスフォーム活性の一部を調節していることが明らかにされた。以上の研究はHPVによる癌化機構の解明に重要な知見を提供するものであり、学位に値するものと考えられる。