



Title	Correlation between tumorigenicity and expression levels or splicing patterns of transcripts of the human papillomavirus type 16 E6 gene.
Author(s)	井上, 忠夫
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38946">https://hdl.handle.net/11094/38946</a>
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</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	井上 忠 夫
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 11274 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	<b>Correlation between tumorigenicity and expression levels or splicing patterns of transcripts of the human papillomavirus type 16 E6 gene.</b> (ヒトパピローマウイルス16型 E6遺伝子の転写発現レベルおよびスプライシングパターンと造腫瘍性との関係)
論文審査委員	(主査) 教授 羽倉 明  (副査) 教授 山西 弘一 教授 栗村 敬

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus; HPV) 16型, 18型は子宮頸癌の発症に深く関与していることが明らかになってきた。その癌遺伝子である E6, E7は, 初代培養細胞の不死化や, 株化細胞のトランスフォーメーションと関係していることが知られている。E7蛋白の機能とトランスフォーメーションとの関係についての報告は多いが, E6蛋白の機能とトランスフォーメーションとの関係は十分に解析されていない。我々は, 以前, 株化細胞の E6遺伝子による造腫瘍性獲得の可能性を指摘したが, 今回は (1) E6遺伝子と造腫瘍性, トランスフォーム能との関係を明確にするため, さまざまな E6発現ベクターを作り, それらの導入細胞のトランスフォーメーションと E6mRNA の発現レベル, スプライシングパターンを比較検討した。さらに, (2) E6蛋白の機能として, 癌抑制遺伝子産物である p53との結合能, 分解能, 及び異なるプロモーターの転写活性化能が知られているが, それらの機能と細胞のトランスフォーメーションとの関係を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

(1) プラスミドとして pZipneoSV(x)1 ベクターを用い, 3種類の E6発現ベクター, (i)野性型の E6 ORF (open reading frame) を含むもの, (ii) splice donor site に変異を入れ, unspliced E6mRNA のみを発現するもの, (iii) splice donor site と acceptor site の間に TTL (translational termination linker) を入れ, truncated E6\*蛋白のみが発現するもの, を作った。これらの E6発現ベクターを導入したマウス株化細胞における E6mRNA の発現レベルを分析するためにノーザンブロッティングと RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) を行なった。

(2) E6領域内の<sup>(a)</sup>p53結合領域, <sup>(b)</sup>p53分解領域, <sup>(c)</sup>転写活性化能の支配領域に変異を導入し, その機能を欠如した E6変異型発現ベクターを構築した。これらの E6発現ベクターをマウス株化細胞にトランスフェクトし, それらの導入細胞の造腫瘍性, 足場非依存性, 低血清培地での増殖能を比較した。造腫瘍性は  $2 \times 10^5$  細胞をヌードマウス皮下に注射し, 調べた。足場非依存性は 0.33% 軟寒天培地でのコロニー形成能を調べた。低血清培地での増殖能は 6 cm シャーレに  $2 \times 10^4$  細胞づつまき低血清培地 (0.2%) で 24 時間毎の細胞数の変化をみた。

#### 【結果】

(1) E6 unspliced mRNA のみを発現するベクター導入細胞が最も強い造腫瘍性, 足場非依存性, 低血清培地での増殖能を示した。E6 unspliced と spliced mRNA の両方を発現する野性型ベクター導入細胞は弱い造腫瘍性, 足場非依

存性、低血清培地での増殖能を示した。truncated E6\*蛋白だけを発現するベクター導入細胞はトランスフォーム形質を示さなかった。

3種類のE6発現ベクター導入細胞のE6 mRNAを分析すると、E6 unspliced mRNAのみを発現するベクター導入細胞は野性型と比べ、unspliced mRNAのレベルが10倍以上高かった。さらに野性型E6ベクター導入細胞の皮下注射により低率に生じた腫瘍はその腫瘍由来細胞をもう一度ヌードマウス皮下に注射すると、より強い造腫瘍性を示した。この腫瘍由来細胞のE6 mRNAを調べるとunspliced mRNAのレベルが最初の野性型E6ベクター導入細胞の数倍に上昇していた。

(2)p53との結合能を欠失したE6発現ベクターと転写活性化能を欠失したE6変異型ベクター導入細胞は造腫瘍性を完全に失った。また全てのE6変異型ベクター導入細胞は足場非依存性を著しく減少していた。また転写活性化能を欠失したE6変異型ベクター導入細胞は低血清培地で増殖できなかった。

#### 【総括】

(1) full length E6蛋白が株化細胞の造腫瘍性のみならず、足場非依存性、低血清培地での増殖能といったトランスフォーメーション形質と関連していることが分かった。

(2) E6遺伝子による株化細胞の造腫瘍性にはE6蛋白とp53との結合能、E6蛋白の転写活性化能が重要であり、足場非依存性にはいずれの機能も重要である。また低血清培地での増殖能にはE6蛋白の転写活性化能が最も重要であることが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

ヒトパピローマウイルス(HPV)の16型、18型は、子宮頸癌発症の原因ウイルスでありその初期遺伝子であるE6、E7は株化細胞の癌化を引き起こすことが知られている。E7遺伝子に関してはよく解析が進んでいるが、E6遺伝子に関する解析は十分でない。本研究はE6遺伝子にどのようなトランスフォーム活性があるかを調べ、それらのトランスフォーム活性とE6転写産物との関係を明確にする事を目的とした。またunspliced mRNA由来のfull length E6蛋白は癌抑制遺伝子産物であるp53と結合し、分解すること、また異種プロモーターの転写活性化能をもつこと、が知られているが、それらの機能とトランスフォーム能との関係を解析した。その結果、E6遺伝子は造腫瘍性及び血清要求性の減少と密接に関連しており、full length E6蛋白がそのトランスフォーム活性に重要であることを見出した。またトランスフォーム活性にはp53との結合能、転写活性化能が重要でありp53の分解能は必要でないことを明らかにした。以上の研究はHPVによる子宮頸癌発症機構の解明に重要な知見を提供するものであり、学位を授与する価値があると認められる。