



Title	ヒトパピローマウィルスの検出とその発現制御に関する研究
Author(s)	真木, 英雄
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40407
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	眞木英雄
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第12817号
学位授与年月日	平成9年2月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	ヒトパピローマウイルスの検出とその発現制御に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 西原力 (副査) 教授 那須正夫 教授 溝口正 教授 本田武司

論文内容の要旨

ヒトパピローマウイルス(HPV)はパポバウイルス科に属する小型DNAウイルス(ゲノムは約8Kb)であり、皮膚や粘膜上皮にイボ様の増殖性病変を引き起こす病原体として知られている。HPVは70種を越える型が見つかっており、特に悪性型(16, 18, 33型)は子宮頸癌、前立腺癌、舌癌等特定の癌組織で検出されこれらの癌発生とHPV感染との関係が注目されている。

まず、悪性型HPVを型特異的かつ高感度に検出するPCR法と多くの型(6b, 11, 16, 18, 33, 52b, 58型)を検出できるユニバーサルPCR法を開発した。本法を用いて前癌病変、子宮頸癌組織を調べた結果、各々61%, 83%の割合でHPVが検出された。正常組織では、HPVは検出されなかった。また、9例にユニバーサルPCRでのみHPVが検出されたが、塩基配列の解析により確認したところ既知のHPV5例が同定された。残り4例については未知のHPVである可能性がある。さらに、前癌病変では子宮頸癌と比べると検出頻度は低いが、悪性度の高いほうにHPVの検出頻度が高くなっていた。このように子宮頸癌にHPVが高頻度に検出されることは、単にHPVが癌に感染しやすいということではなく、HPVにまず感染しこれが持続感染状態になり子宮頸部の細胞に癌抑制遺伝子の不活性化等の影響を与え、さらにもういくつかの条件が加わって癌化に至るという可能性が考えられ、本法などを活用した今後のデータの蓄積が望まれる。

HPV遺伝子はE1-E7の初期遺伝子とL1, L2の後期遺伝子から構成されている。HPVの感染機構が不明であるのは構造蛋白質をコードしている後期遺伝子(L2)の発現制御が不明であるためである。そこで、16, 18, 33型に共通してE5-L2間に短い非翻訳領域(SNR)が存在することに注目し、この部分にプロモーターが存在するとの仮説をたてこれを検証した。CAT遺伝子の上流に16, 18, 33型のSNRをそれぞれ導入し、種々の子宮頸癌培養細胞株に導入後、CAT遺伝子の発現を調べたところすべて発現が見られた。また、HPV16-SNRを逆配列で導入した場合CAT遺伝子の発現は認められなかったことも、HPV16-SNRにプロモーターが存在することを支持するものである。

次にプロモーターを制御する調節因子について検討した。16, 18, 33型のSNRの塩基配列には、poly(A)シグナルとNF-IL6/LAP結合部位が共通して存在していた。poly(A)シグナルは上流からの転写を終結し、LAP(liver-activating

protein)は様々な遺伝子の発現誘導に重要な役割を果たしていることが知られている。HPV-SNRのプロモーター様活性に対するLAPやpoly(A)シグナルの影響を調べたところ、LAPの同時導入により16, 18, 33型とも上昇し、poly(A)シグナルの欠失によっても16, 18型では増強された。33型では約2分の1に低下したが、これは同時に転写活性に必要なTATA boxやLAP結合部位が欠失されたためと推察され、さらに、HPV-16 SNRによって転写されたCAT遺伝子産物の転写開始点を調べたところ、転写開始部位はL2領域の上流約40 bpであり、TATA boxはこの上流約20 bpであることが明らかとなった。HPVは上皮系細胞にのみ感染し分化した細胞でのみ増殖するという特徴があるため、通常L2プロモーターは抑制状態にあることが考えられる。実際、HPVが取り込まれた子宮頸癌細胞株でも後期遺伝子の発現は認められていない。このプロモーターは分化と共に増加するLAPによって活性化され、またHIV等のウイルスで発現制御に関わっているpoly(A)シグナルの欠失によっても同様に活性化された。HPVの16, 18, 33型のすべてにおいてLAP結合部位とpoly(A)シグナルが近接していることから、これらによる複雑な制御が存在するものと考えられる。

E7蛋白質は他の腫瘍ウイルスの癌関連蛋白質(SV40 large T, adenovirus E1A)とホモロジーを有し、これらと同様に形質転換能もある。E7抗体を用いてE7の細胞内局在を検討したところ、既知のように核内に存在するE7はエピトープがマスクされているため染色されず細胞質のみが染色された。そこで、E7と β -ガラクトシダーゼ(β gal)の各領域を含む融合蛋白質(E7- β gal)を作製し、 β gal活性を指標にして核移行を検討した結果、E7- β galは核内へ移行し、E7本来の形質転換能を保持していることも確認された。またE7の核移行に必要なペプチド領域(16-41番目のアミノ酸)を明らかにした。この領域には塩基性アミノ酸からなる核移行シグナルは存在しないが、他のHPV間でも保存されていた。従って、E7には新しい核移行シグナルが存在するか、あるいは他の蛋白質と結合して核へ移行している可能性が考えられる。後者の場合、癌抑制遺伝子のRb遺伝子産物がE7と結合することが知られており、さらに16-41番目のアミノ酸はRb結合部位とも重複している。しかしE7の16-41番目のアミノ酸に点変異を導入しRbと結合できない構造を調製しても、培養細胞へ導入後その蛋白質は核内へ移行した。これらのことからE7はそれ自身で核内へ移行している可能性が示唆された。これらの知見はHPVと癌化との関係を知る手がかりとなり、さらにSNRにプロモーター様活性が見い出されたことはそのメカニズム解明への第一歩であるといえる。

論文審査の結果の要旨

真木君は、癌化との関連においてヒトパピローマウイルス(HPV)の検出とその発現制御に関して検討し、以下の知見を得た。すなわち、HPVの16型、18型、33型をそれぞれ特異的に検出する型特異的PCR法と様々な型のHPVを検出するユニバーサルPCR法を開発し、これらを用いて子宮頸癌や前癌病変組織等の臨床サンプルについて解析し、HPVと癌化の関連性を確認するとともに、本法の有効性を検証した。また、HPVの非翻訳領域にプロモーター様活性をみいだし、LAPやpoly(A)シグナルなどにより後期遺伝子(L2)の発現が調節されている可能性を示した。さらにE7タンパク質の核移行に必要なペプチド配列を明らかにし、Retinoblastomaタンパク質の結合はHPVの形質転換機能には必要であるが、核移行には無関係であることを示した。

以上の研究は、癌化とHPVの関連について重要な知見を示したものであり、学術的に高く評価でき、博士(薬学)学位論文として充分価値あるものと認められる。