

ヒトパピローマウイルス治療ワクチンの開発を目的とした 潜伏感染機構の解明

慶應義塾大学医学部 産婦人科学教室

助教 村上 功

(共同研究者)

University of Cambridge, Department of Pathology Director of Research John Doorbar

はじめに

子宮頸癌は女性の癌では乳癌に次いで多く、その原因はヒトパピローマウイルス (HPV) である。子宮頸癌制圧は産婦人科医にとって喫緊な重要課題であり、その方法としてHPVワクチンが期待されている。HPVワクチンは予防ワクチンと治療ワクチンに大別されるが、現在実用化されているHPVワクチンは予防ワクチンであり、治療ワクチンの実用化のめどは立っていない。予防ワクチンによりHPV感染が減少しても、現在すでにHPVに感染している者が多数いることを考えると、より早期に効果が表れる治療ワクチンの開発の意義は大きい。

現在の治療ワクチンは、癌細胞で常に発現しているHPVの癌タンパクE7をターゲットにしているものが多い。しかし、E7に対する細胞性免疫は弱く、HPV感染細胞、特に潜伏感染細胞の排除はできないと考えられる。現状での治療ワクチンの効果は極めて低い。治療ワクチンの実用化には新たなターゲットとなるタンパク質の同定が必須である。そのためにHPVの生活環の解明、特に潜伏状態のHPVの詳細な解明が必要である。

HPVは基底細胞に感染すると増殖せず、HPVゲノムが核内エピゾームとして維持される潜伏状態となる。潜伏感染細胞が分裂する際に、細胞DNAの複製と同時にHPVゲノムも複製して娘細胞に分配されるので、潜伏感染細胞は長期間にわたって子宮頸部に存在すると考えられている^{1,2} (図1)。潜伏状態のHPVは低ゲノムコピー数で維持されており³、臨床の現場では、病変を形成しない潜

伏感染細胞を検出することは極めて困難で、潜伏感染細胞の核内HPVゲノムを回収することは容易ではない。また、HPVが宿主細胞に感染した後、免疫回避が起こることが様々な実験結果より示唆されているが、詳細は解明されていない^{4,5}。

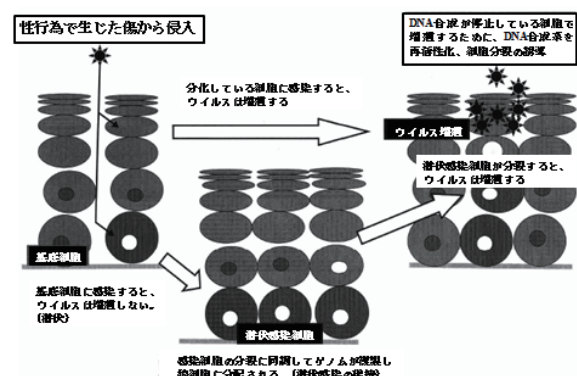


図1 HPVの生活環

本研究は、HPVの潜伏感染機構の解明、及びHPV感染時における免疫回避機構の解明を目的とした。まず初めに、HPVを保持した細胞の動態を検出可能なツールの作成を行った。本研究では、HPV11型・16型・18型にgreen fluorescent protein (GFP) を挿入しkeratinocyteへ遺伝子導入を行い、GFPを蛍光顕微鏡で検出することでHPVの感染や複製等の動態を観察できると考えた。

方 法

① 細胞培養

本研究では、human keratinocyte cell lineであるNormal Immortal KeratinocyteS (NIKS) を用いた。NIKS細胞はX線を4800rad照射したマウス胎児由来3T3細胞の存在下で培養した。NIKS細胞は5%ウシ胎児血清、ハイドロコルチゾン ($0.4 \mu\text{g/ml}$)、コレラ毒素 (8.4 ng/ml)、インシュリン ($5 \mu\text{g/ml}$)、アデニン ($24 \mu\text{g/ml}$)、上皮成長因子 (10 ng/ml)、ペニシリン ($50 \mu\text{g/ml}$)、カナマイシン (100 unit/ml) を添加したHam's F-12 medium/ Dulbecco's modified Eagle medium (3:1) で培養した。

② プラスミドの作成

pSELECT-zeo-GFPBsr (InvivoGen) から、GFPBsrをKOD -Plus- (TOYOBO) を用いPCR法にて増幅した。HPV11型・16型・18型はKOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用い、L1遺伝子とL2遺伝子の一部を欠失した変異型を作成した。変異型HPV11型・16型・18型にLigation high Ver. 2 (TOYOBO) を用いGFPBsrを挿入した (HPV11GFPBsd、HPV16GFPBsd、HPV18GFPBsd) (図2)。

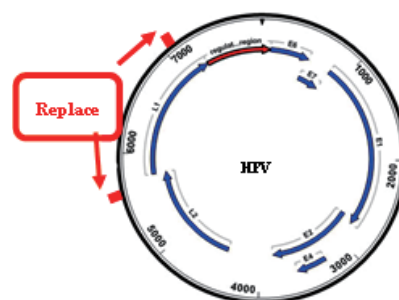


図2 GFP 搭載 HPV の作成

③ HPV感染NIKS細胞の作製

NIKS細胞 (2×10^5) を3T3細胞存在下の6-wellプレートに撒き、24時間培養した。続いてトランスフェクション用に準備したHPV DNA ($2 \mu\text{g}$) を $6 \mu\text{l}$ のFuGENE HD (Promega) を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌日に75cm²ディッシュに継代した。継代翌日からブラストサイジンによるセレクションを開始した。2日毎にメディウムは交換し、4日間セレクションを施行した。その後増殖した細胞を実験に使用した。

④ HPVゲノムコピー数の測定

HPV16型ゲノムコピー数は、HPV16 E4遺伝子配列内に設定した5'-GACTATCCAGCGACC AAGATCAG-3'と5'-CTGAGTCTCTGTGCAACAACCTTAGTG-3'のプライマーを用いreal-time PCR法で測定した。また、HPV18型ゲノムコピー数は、HPV18 E4遺伝子配列内に設定した

5'-CCAGACGTCGGCTGCTACA-3' と 5-GACAGGTCCACAATGCTGCTT-3' のプライマーを用い real-time PCR法で測定した。

結 果

① 293T細胞へのトランスフェクション

作成した HPV11GFPBsd、HPV16GFPBsd、HPV18GFPBsd を 293T細胞にトランスフェクションを行い、GFPの発現効率と発現強度を確認した(図3)。トランスフェクション効率は90%であり、HPVにGFPBsdを挿入することによるトランスフェクション効率の低下は認められなかった。

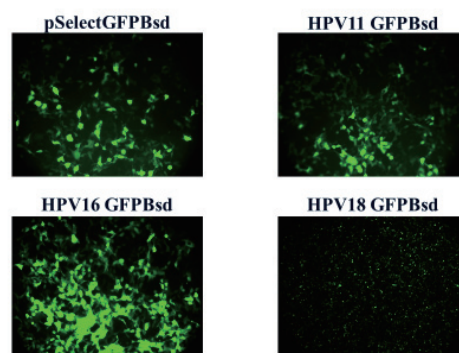


図3 293T細胞へのトランスフェクション

② NIKS細胞へのトランスフェクション

HPV16GFPBsdをNIKS細胞にトランスフェクションを行った。トランスフェクション効率は20%であった。GFPを有した細胞の割合の増加を認め、HPVによる複製が示唆された(図4)。

しかし、GFPシグナルはパッセージ毎に低下し、2パッセージ後からはGFPシグナルは確認できなかった。

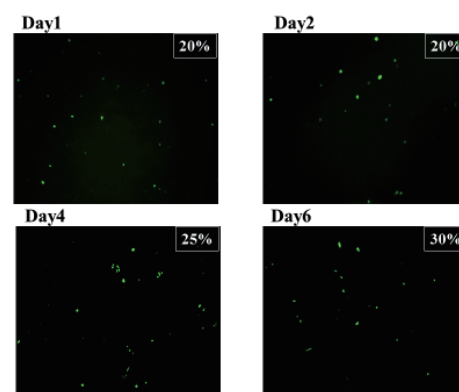


図4 NIKS細胞へのトランスフェクション

③ パッセージ毎のHPVゲノムコピー数の変化

HPV16野生型(WT)、HPV16GFPBsd(GFP)共にパッセージ毎にHPVゲノムコピー数は減少していった(図5)。ゲノムコピー数の減少は、結果②のGFPシグナルの低下を支持する結果となった。HPV16型と異なり、HPV18型はパッセージ毎でHPVゲノムコピー数は維持されていた(図6)。これらの結果より、HPV16型よりHPV18型の方がNIKS細胞内でHPVゲノムが維持・複製されることが示された。

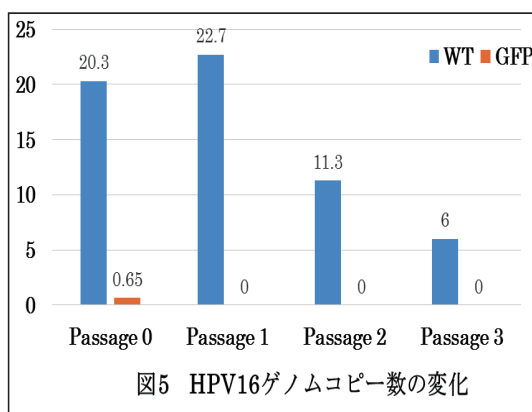


図5 HPV16ゲノムコピー数の変化

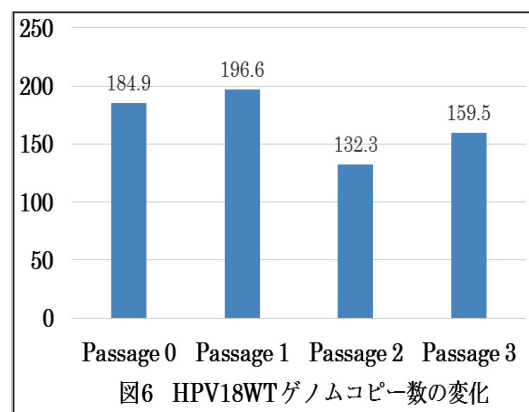


図6 HPV18WTゲノムコピー数の変化

考 察

現在までにNIKS細胞へHPVゲノムをトランスフェクションする方法を確立した。HPV16GFPBsdを有したNIKS細胞の複製を確認することができたが（図4）、パッセージと共にHPV16ゲノムの減少が認められた（図5）。しかし、HPV18野生型においてパッセージ毎でHPV18ゲノムは維持されていた（図6）。Vecchioらは、in vitroにおいてHPV18ゲノムの複製は認めるが、HPV16ゲノムの複製は認めなかったと報告している⁶。この原因として、E1・E2の発現が十分ではないためと結論付けている。

今後の研究計画として、HPV16型に関してはTet-on systemの導入やHPV16全長にGFPを挿入したプラスミドを用いた実験を計画している。これらのプラスミドを用いれば、NIKS細胞内でHPV16GFPが維持・複製されるのではないかと考えている。また、野生型の結果よりHPV18型を用いた実験系の確立は可能であると考えられる。現在までにHPV18GFPBsdをNIKS細胞へトランスフェクションし、パッセージ後のGFPシグナルを確認した。これらGFPを有したHPVを用いin vitroでのDNA damage responseの解析、ウイルス粒子を作成しex vivoでの初期感染細胞の同定と解析を長期研究計画としている。

要 約

本研究は、HPVの潜伏感染機構の解明、及びHPV感染時における免疫回避機構の解明を目的としている。最終的には潜伏感染状態のHPVにも対応可能なHPV治療ワクチンの開発を目的として、研究を遂行している。

昨年よりUniversity of Cambridge, Department of Pathology, Dr Doorbarの研究室にて本研究を実施している。現在までに実験に必要な実験手法の確立やツールの作成を行った。今後は、HPVの潜伏感染機構の解明、及びHPV感染時における免疫回避機構の解明のため、in vitro・ex vivo実験を中心とした研究を行う。

謝 辞

本研究の実施に当たり、第40回調査研究助成を頂きました公益財団法人 大和証券ヘルス財団に深謝申し上げます。

文 献

1. Broker TR, Jin G, Croom-Rivers A, Bragg SM, Richardson M, Chow LT, Vermund SH, Alvarez RD, Pappas PG, Squires KE, Hoesley CJ. Viral latency-the papillomavirus model. Dev Biol (Basel) 106:443-51, 2001.
2. Nicholls PK, Doorbar J, Moore RA, Peh W, Anderson DM, Stanley MA. Detection of viral DNA and

- E4 protein in basal keratinocytes of experimental canine oral papillomavirus lesions. *Virology* 25;284(1):82-98, 2001.
3. Stanley MA. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 52 (1-2):45-59, 2001.
 4. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 75(9):4283-96, 2001.
 5. Bachmann A, Hanke B, Zawatzky R, Soto U, van Riggelen J, zur Hausen H, Rosl F. Disturbance of tumor necrosis factor alpha-mediated beta interferon signaling in cervical carcinoma cells. *J Virol* 76(1):280-91, 2002.
 6. Vecchio A, Romanczuk H, Howley P, Baker C. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* 66 (10):5949-58, 1992.