

博士論文

Human Papillomavirus (HPV) 16, 18, 52, 58 型における
子宮頸癌発癌形式の検討

馬場 聡

1 目次

目次	2
要旨	4
序文	5
子宮頸癌の疫学・予防	5
HPV	7
HPV のトランスクリプトームと CIN 進展の分子機構	8
CIN 進展における HPV 感染の分子機構と HPV ジェノタイプ	10
HPV18 とは	11
HPV ジェノタイプとトランスクリプトーム	13
子宮頸癌の 3 次元細胞培養モデル・背景	14
CAGE	15
研究目的	16

実験方法	17
結果	30
考察	50
結論	54
謝辞	55
参考文献	56

要旨

子宮頸癌発生段階における Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) の状態での Human Papillomavirus (HPV) 16, 18, 52, 58 のトランスクリプトームの違いを検討する目的で、子宮頸部異形成の検体から、癌遺伝子である *E6*・*E6**、ケラチン化に関わる *E1*⁴、カプシド形成に関わる *L1* を標的として発現の比較検討を行った。*E6*・*E6** の発現は異形成の進展により増加し、CIN の進展度に依存することが確認された。一方で *E1*⁴ の発現は HPV16 で多く、HPV18 で少なかった。また *L1* の発現は HPV52 に多く HPV18 は皆無であった。*E1*⁴ と *L1* の発現は HPV ジェノタイプ依存性であることが判明した。子宮頸癌の進展形式はジェノタイプ毎に異なる可能性が示された。更に癌化リスクのより高い HPV18 に注目し、3次元細胞培養モデルを確立した。3次元細胞培養により HPV18 の遺伝子が活性することを確認した。

序文

<子宮頸癌の疫学・予防>

子宮頸癌の 2018 年の新規患者発生数は全世界において 569,847 人、死亡者数は 311,365 人と推測され、女性の癌関連死の第 4 位となっている¹。子宮頸癌は、子宮頸部異形成（Cervical Intraepithelial Neoplasia: CIN）を経て浸潤癌へ進展することが知られており、CIN は進展の grade によって軽度異形成（CIN1）、中等度異形成（CIN2）、高度異形成・上皮内癌（CIN3）に分類される。子宮頸癌の発生頻度は 20, 30 代を中心とし、比較的若年で診断される傾向がある²。

子宮頸癌の主な発生原因は Human Papillomavirus（HPV）感染であることがわかっており、通常は 5-10 年以上かけて子宮頸部初期病変を経由して、比較的緩徐な癌化に関わることが多いことが知られている^{3,4}。近年 HPV ワクチンの使用により、ワクチンが普及している国ではワクチン接種開始より 7 年間の経過で HPV 関連癌が減少したといった報告がある⁵。その一方で、本邦では HPV ワクチンの投与は十分に普及しておらず、未だに子宮頸部上皮内癌を中心に子宮頸癌となる患者が増加している²。また HPV ワクチン普及したとしても子宮頸癌発生数が減少に転じるまで時間を要することが予想される為、子宮頸癌の早期発見の為に HPV による発癌機序を解明し、その特性に応じた管理方法の追求は喫緊の課題である。

子宮頸癌の主な症状は不正性器出血や接触出血であるが、CIN 初期の患者は無症状であり、子宮頸癌検診で発覚することが多い。本邦における予防検診では子宮頸部細胞診を中心に普及しているが、HPV 検診の有用性についても様々な報告がされている。HPV 単独の検診を行う国も増えてきている^{6,7}。特に CIN2 以上の病変に関しては、HPV 検査単独の方が、細胞診よりも検出感度が高いとされている⁸。また子宮頸部細胞診とともに HPV 検査の併用が有効であるとした報告もある⁹。

<HPV>

HPV は約 8000 塩基の環状二本鎖 DNA ウイルスであり、子宮頸部・陰茎・膣・外因・咽頭・肛門に存在する。主に性交渉により感染し、性交開始より 2-3 年以内に 50-80%の患者が感染すると言われている¹⁰。子宮頸癌における HPV の寄与率は 96%と言われているが、膣癌（64%）、外陰癌（51%）、咽頭癌（63%）、陰茎癌（36%）、肛門癌（93%）の原因にもなり、特に HPV16 および HPV18 が関与した報告が多い^{11,12}。国際がん研究機関（IARC）では、人に対する発がん性がある Group 1（HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59）、人に対する発がん性がおそらくある Group 2A（HPV68）、人に対する発がん性が疑われる Group 2B（HPV26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97）に分類される¹³。また、地域によって HPV のジェノタイプの分布に差があり、東アジアでは HPV16, 18 だけでなく、HPV52, 58 の検出頻度が高いことが知られている¹⁴。

<HPV のトランスクリプトームと CIN の進展の分子機構>

HPV にコードされる遺伝子群は初期遺伝子領域（p97 プロモーター（early promotor）に支配される）と後期遺伝子領域（p670 プロモーター（late promotor）に支配される）に分かれ、それぞれ *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7* と *L1*, *L2* の 8 つの遺伝子領域を持ち、様々なスプライシングサイトを持つことで多様な遺伝子産物を産生する。HPV16 感染の human keratinocyte(W12E)では最低でも 13 個の遺伝子産物があるとした報告がある¹⁵。

各遺伝子の発現は上皮の分化と CIN の進展により変化していく。性交渉を契機に子宮頸部扁平・円柱上皮境界部（SCJ）の基底層に侵入した HPV は、*E6* や *E7* 遺伝子を発現する。*E6* ならびに *E7* は、それぞれ p53 の発現抑制や pRb の発現抑制により癌化を促す¹⁶。また *E6** は *E6* のスプライシング産物であるが、*E7* の発現を促すことで癌化を促進するとされる¹⁷。持続感染により *E4* を産生するようになり、*E4* はケラチン化に関わる可能性が示唆されている¹⁸。また *E1* の働きについては正確には解明されていないが、ケラチン化だけでなくウイルスの複製にも関わりとされている¹⁹。*L1* ならびに *L2* は表層上皮で産生され、ウイルスのキャプシド形成に関与する²⁰。ウイルス由来のトランスクリプトームと CIN の進展との関連については *E6*, *E7* の発現は進展に伴い増加していくといった報告や、*L1* は逆に減少するといった報告がある^{21,22,23}。(図 1)

(図 1) HPV 感染と発現遺伝子産物の模式図

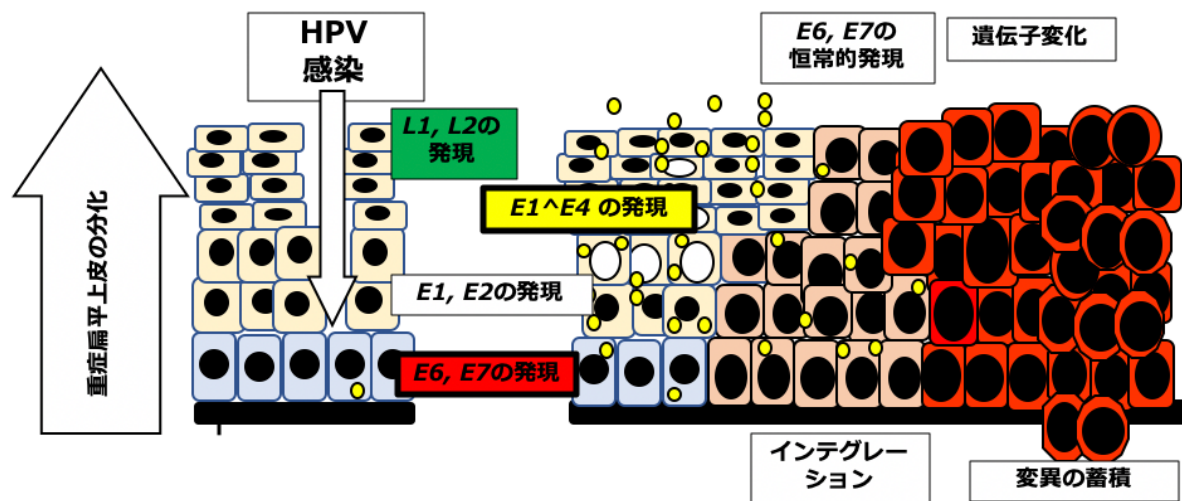


図 1 のように HPV は子宮頸部の基底層に感染し、まず *E6*, *E7* を発現しする。重層扁平上皮細胞の分化に伴い *E1*, *E2*, *E1*⁴ を発現し、表層では *L1*, *L2* を発現する。

田口歩 HPV のウイルス学と発癌 臨床婦人科産科 医学書院 2018 より改変。

<CIN の進展における分子機構と HPV ジェノタイプ>

HPV は子宮頸部に感染後、約 10%の患者で潜伏性に持続感染し増殖し、子宮頸癌に進展していく²⁴。日本人の前向きコホート研究において、7 種類の HR-HPV (high risk-HPV : HPV16, 18, 31, 33, 35, 52, 58) では CIN3 への進展率が高いことが示されている²⁵。更に、我々のグループでは CIN の進展と退縮を繰り返すという特徴を反映した統計モデルである Markov モデルを適用し、HR-HPV の自然史を検討した。その結果 2 年以内の進展・退縮において、HPV16 は CIN2 から CIN3 以上への進展が 42%と高値でかつ段階的に進展しやすく、HPV18 は CIN2 から CIN3 以上への進展が 32%であるが CIN の段階では発見されにくく、HPV52/58 では CIN2 から CIN3 以上への進展が 25%程度であり CIN の持続感染が多いとした進展率の特徴も明らかにした²⁶。このように HR-HPV の中でもジェノタイプ毎に癌化のリスクは細分化されることが想定される。

<HPV18 とは>

HPV18 は HPV16 と同様に HR-HPV の中で最も癌化しやすいジェノタイプの一つであり、IARC の Group 1 の中でも HPV18 では発癌作用が強いと報告されている²⁷。HPV16, HPV18 では感染後に 15%前後の患者で CIN3 ないしそれ以上の病変へ、10 年以内に進展すると報告されており、他のジェノタイプより癌化のリスクが高いことが分かっている²⁸。しかし HPV16 と HPV18 は共に高リスクであるが、様々な面で相違を認める。特に HPV18 は前癌病変での検出が困難であることが知られている。検出率に関して、HPV16 ないし HPV18 の子宮頸癌における頻度は 50%と 15%と共に高値であるが、子宮頸部高度異形成では 40%と 3-7%であり、HPV18 は前癌病変と子宮頸癌での検出率が他のジェノタイプと異なることが報告されている^{16,29}。つまり HPV16 は子宮頸部異形成ならびに子宮頸癌共に同頻度で高かったが、HPV18 は子宮頸癌では頻度が高いものの、前癌病変では検出頻度が低い事が分かる^{16,29}。またインテグレーションの起こりやすさに注目した癌進展に関する研究では、HPV18 では HPV16 に比して HPV ゲノムのヒトゲノムへの組み込み（インテグレーション）が起こりやすいとした報告もある³⁰。このことより HPV18 は HPV16 に比して子宮頸部異形成の期間が短い可能性が示唆されている。また発生する組織型にも違いがあることが知られており、子宮頸部腺癌の 40%が HPV18 によって惹起されることが分かっている¹⁶。HPV16 感染の子宮頸癌はほとんどが扁平上

皮癌であるが、HPV18 感染の子宮頸癌では 50%程度で腺癌が生じることが分かっている³¹。子宮頸癌において、腺癌は扁平上皮癌に比して予後が不良とされている³²。更に若年女性の子宮頸部の感染率が多いことも分かっている^{10,33}。このように HPV18 感染による子宮頸癌は若年発症が多く、さらに予後不良の腺癌発生の頻度が高いため、臨床的に非常に問題となるケースが多い。HPV18 は前述の通りワクチン接種により大幅に感染リスクを軽減できる。しかしワクチンが普及していない本邦では癌予防のためにその他の方法が必要である。HPV18 における進展度のマーカーを遺伝子産物に注目して探索すれば、早期発見につながる可能性があると考えられる。

<HPV ジェノタイプとトランスクリプトーム>

HPV 由来のトランスクリプトームの発現は、HPV ジェノタイプに依存するといった報告がある^{34,35}。子宮頸癌発症には HPV の持続感染の成立、HPV ゲノムのヒトゲノムへのインテグレーション、癌遺伝子変異の蓄積が必要であるが、特に HPV ゲノムのインテグレーションにより癌遺伝子である *E6* および *E7* が持続的な発現することは細胞の不死化に重要である¹⁶。また HPV18 では HPV16 と比べると、*E6** の発現が *E6* に比して高かったといった報告や、HPV18 では *E4* の発現が皆無であったとした報告がある^{34,35}。

<子宮頸癌の3次元細胞培養モデル>

HPV の生活史の研究では、3次元細胞培養として Raft 培養が用いられている³⁶。

Raft 培養は扁平上皮への分化を促進することで HPV の生活史の解明などに用いられている。また他にも生体に近い実験系として、スフェロイド培養やオルガノイド培養などの3次元細胞培養が用いられている。スフェロイド培養では幅広い細胞でより生体に近い環境で細胞培養ができるが、オルガノイド培養はマトリゲル

(Matrigel) に含まれる細胞外マトリックスの基底膜を構成するラミニンを用いることで、培養細胞との相互作用を介して臓器特異的な3次元細胞培養が可能である。

オルガノイド培養は患者由来組織を用いた3D培養として様々な癌種の研究で用いられている^{37,38,39,40,41,42}。我々の研究グループはすでに子宮頸部扁平・円柱上皮境界部 (SCJ) 由来のオルガノイド培養を確立し、子宮頸癌の研究に応用を試みている

⁴³。

<CAGE >

HPV 由来トランスクリプトームの発現は early promotor と late promotor により調整されている⁴⁴。RNA sequence の一種である Cap Analysis Gene Expression

(CAGE) は転写開始点の活性を一塩基レベルで網羅的に定量化できる^{45,46}。CAGE 法を用いることで、ヒト遺伝子発現の評価のみならず、HPV 由来トランスクリプトームの発現評価が可能となる。HPV 由来転写開始点を評価した先行研究により、CIN の進展と共に HPV 由来の転写開始点のパターンが変化することが明らかになっている。CAGE を用いることで HPV のプロモーター活性が early promotor 優位であるか、あるいは late promotor 優位であるかの判断が可能となる。転写開始点パターンは、CIN1, 2 では late promotor 優位の症例が多く、CIN3 ないし子宮頸癌では early promotor 優位の症例が多いことが報告されており、CAGE が発癌段階の推定に一役を担うと考えられる⁴⁴。

研究目的

1：HPV 由来トランスクリプトームの発現パターンを解析することで、HPV ジェノタイプ毎の特徴を解明するため、

1-1. CIN 進展に伴い、本邦で頻度の高い HPV16, 18, 52, 58 由来トランスクリプトームの発現パターンの変化を発現量・陽性率に着目し解明する。

1-2. 感染 HPV ジェノタイプ毎に、HPV 16, 18, 52, 58 由来トランスクリプトームの発現パターンの特徴を発現量・陽性率に着目し解明する。

2：予後不良とされる HPV18 感染における基底層での分子機構を解明することを目的として、

2-1. HPV18 感染評価に適した各種 3 次元培養モデルを検討する

2-2. 各種培養方法における HPV18 感染細胞のウイルス宿主相互作用を解明する。

実験方法

1. 対象と検体採取

本研究は全て施設内審査委員会の承諾のもとで行われた。（以下承認番号、東京大学：G10082、慶應大学：G2015-388、千葉大学：560、秋田大学：2174、国立感染症研究所：659、日本大学：234-0）。全ての患者に同意書を配布し、インフォームド・コンセントを取得し、検体使用の許可を受けた。高齢になってからの HPV 感染は発癌までに時間を要することを考慮して、60 歳以下を対象とし、2016 年 2 月より 2017 年 12 月までに東京大学、慶應大学、千葉大学を受診し、子宮頸癌細胞診異常を認め、コルポスコピー検査を施行し組織生検がされた 382 人の患者がエントリーされた。検体は東京大学産婦人科学教室内の実験室内で常時施錠され、-80°C で保存された。症例は匿名化され院内データ管理ファイルで保管された。

患者背景では年齢、経産、喫煙歴、ステロイドあるいは免疫抑制剤使用の有無、診断からの経過時間について調べられ、CIN1, 2, 3 の 3 群と HPV16, HPV18, HPV52, HPV58, その他のハイリスク（HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV56, HPV59）, negative の 6 群に分けて比較検討した。CIN の病期診断は秋田大学で同一の病理医によりなされた。

2. HPV ジェノタイピング

全ての検体は東京大学に集積され、Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit

(Favorgen Biotech Corp. Ping-Tung, Taiwan) を用いて DNA を抽出した。国立感染症研究所にて PGMY-CHUV 法を用いてジェノタイピングした⁴⁷。Primer は PGMY09/11 *L1* と human leukocyte antigen-DQ (HLADQ) を用いて、続いてリバーブロットハイブリダイゼーションを用いた⁴⁴。

以下全て東京大学にて施行された。

3. プライマー作成とスタンダードプラスミド作成

プライマーは PaVE (The papilloma visur genome database) に記載の塩基配列を参照し、Primer-Blast (NCBI) を用いて作成された。(表 1)

全ての Primer は①19-23 bp の長さ②転写産物は 70-260 bp の長さで作成された。

スタンダードに用いたプラスミドは Eurofin Scientific 社 (Luxembourg City, Luxembourg) に人工産物として外注し、スタンダードカーブを作成した。

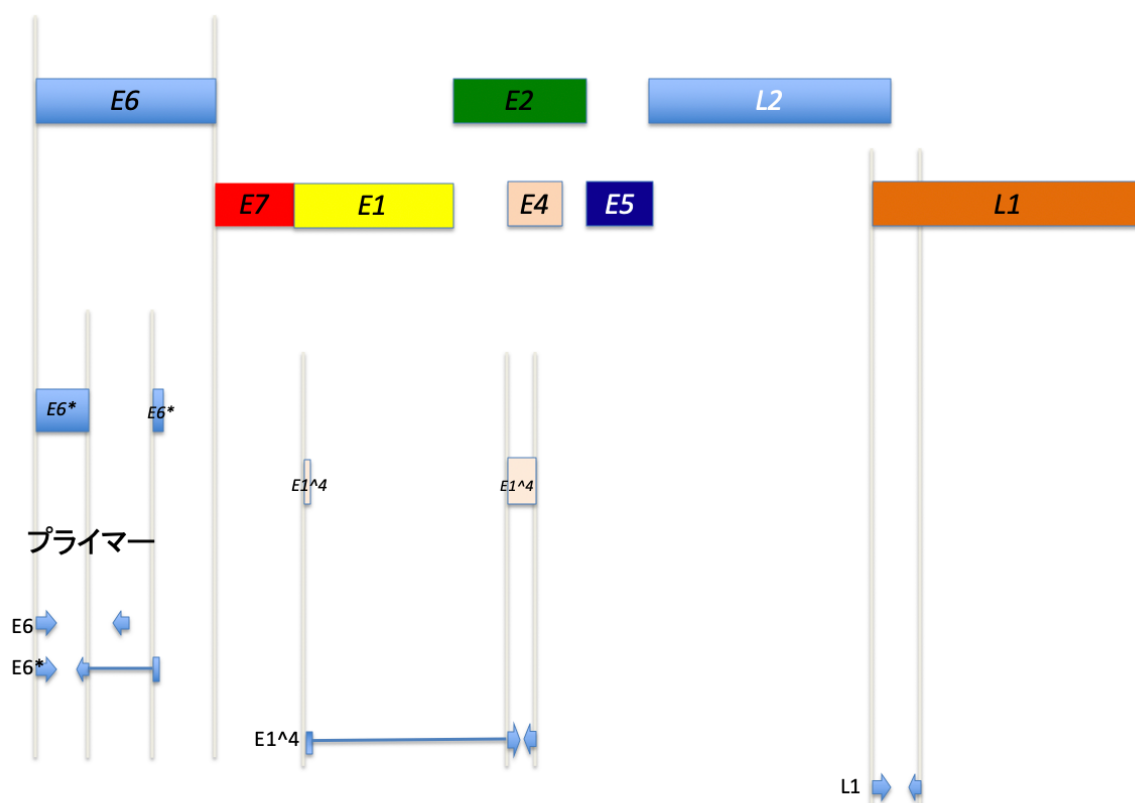
(表1) GAPDH と各 HPV ジェノタイプにおける遺伝子産物のプライマー設定

Target	Direction	Sequence	Product size	Genome position
GAPDH	Forward	GAAAGGTGAAGGTCGGAGTC	227	
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTC		
HPV16 <i>E6</i>	Forward	AGCGACCCAGAAAGTTACCAC	260	123-143
	Reverse	GTTGTATTGCTGTTCTAATGTTG		382-362
HPV16 <i>E6*</i>	Forward	AGCGACCCAGAAAGTTACCAC	114	123-143
	Reverse	TTAATACACCTCACGTCGC		418-409+226-217
HPV16 <i>E1⁴</i>	Forward	CCTGCAGCAGCAACGAAGTATC	218	874-880+3358-3372
	Reverse	TTGGTCGCTGGATAGTCGTC		3479-3460
HPV16 <i>L1</i>	Forward	GTCTCTTTGGCTGCCTAGTG	89	5641-5660
	Reverse	TGCGTGCAACATATTCATCCG		5729-5709
HPV18 <i>E6</i>	Forward	AACACGGCGACCCTACAAG	248	125-143
	Reverse	ATGTGTCTCCATACACAGAGTC		372-351
HPV18 <i>E6*</i>	Forward	AACACGGCGACCCTACAAG	120	123-143
	Reverse	ACCGCAGGCACCTCTGTAAG		426-416+233-225
HPV18 <i>E1⁴</i>	Forward	GATCCAGAAGTACCAGTGAC	194	920-929+3434-3443
	Reverse	GAGAAGTGGGTTGACAGGTC		3617-3598
HPV18 <i>L1</i>	Forward	TCCTTCTGTGGCAAGAGTTGT	123	5657-5677
	Reverse	CCACCTGCAGGAACCCTAAAA		5779-5759
HPV52 <i>E6</i>	Forward	TTTGAGCATCCAGCAACAC	197	105-123
	Reverse	TAGGCACATAATACACACGCC		302-282
HPV52 <i>E6*</i>	Forward	TTTGAGCATCCAGCAACAC	128	105-123
	Reverse	GACAAATTATACATCTCTCTTCG		510-502+224-216
HPV52 <i>E1⁴</i>	Forward	AGGACCCTGAAGTAACGAAG	150	868-879+3345-3352
	Reverse	CTGGAGTCTGTGACGCGTCTGG		3482-3463
HPV52 <i>L1</i>	Forward	ACTGTGTACCTGCCTCCTGTA	72	5670-5690
	Reverse	GATGCTTGTGCGAGACACAT		5741-5722
HPV58 <i>E6</i>	Forward	GAAACCACGGACATTGCATG	254	130-149
	Reverse	GTGTTTGTCTAATGTGTCTCC		383-362
HPV58 <i>E6*</i>	Forward	GAAACCACGGACATTGCATG	109	130-149
	Reverse	CAAATAATACATCTCAGATCGC		515-510+232-223
HPV58 <i>E1⁴</i>	Forward	GACCCTGAAGTGATCAAATATC	127	889-898+3358-3372

	Reverse	GTGTTGTCTCTGGAGTCTGG		3741-3452
HPV58 L1	Forward	CCTCCTGTGCCTGTGTCTAA	104	5682-5700
	Reverse	GGATTGCCAACAGCCAAAAGT		5785-5765

各々の PCR のターゲット遺伝子に対する、遺伝子産物の大きさ・プライマー配列・プライマーの場所について記載した。

(プライマー作成位置の参照)



上記のようにプライマーを設計した。スプライシングサイトを挟むことで余剰な遺伝子の検出を避けた。

4. RNA 抽出と real-time PCR (quantitative RT-PCR)

全ての RNA は生検検体より、RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNase にて処理にされた後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出された。抽出された RNA は SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT- PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA に逆転写した。

PCR は cDNA を 1 μ l 使用し、Light Cycler 480 system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いた。GAPDH により補正後にコピー数の絶対評価を行った。(以下の式を用いた : $\text{normalized copy number} = \text{copy number} / 2^{[30 - \text{GAPDH Cp value}]}$)

PCR の増幅条件は 95 °C で 10 秒、62 °C で 10 秒、72 °C で 18 秒を 45 サイクル行った。全ての PCR 反応にメルティングカーブ解析を施行した。

5. NIKS-HPV18 の 2 次元細胞・培養 3 次元細胞培養

5-1 HPV18 ゲノム感染 NIKS 細胞 (NIKS-HPV18) の作成

5-1-1 HPV18 ゲノムの準備

pSP73HPV18 (Promega, WI, USA) を、EcoRI (TAKARA, Shiga, Japan) を用いて 37 °C で制限酵素処理を行った。その後電気泳動にて全ゲノムを検出できたことを確認した。

5-1-2 ライゲーション

切断した HPV18 の DNA を 50 μ g、T4 DNA ligase (NEB, Ipswich, USA) を 400 単位、10 \times k buffer (TAKARA, Shiga, Japan) を 90 μ l 使用し、滅菌水で 900 μ l に満たし 65 °C で 20 分加熱し、16 °C で一晩インキュベートした。再環状化した DNA を電気泳動にて確認した。

5-1-3 トランスフェクション

(培養液)

(2) DMEM (Wako, Osaka, Japan)

(2) F-incomplete medium : F12 media (Wako, Osaka, Japan) 375 ml、DMEM with high glucose (Wako, Osaka, Japan) 125 ml、Fetal Bovine Serum (GE Healthcare, Boston, USA) 25 ml、100×Hydrocortisone (Merck Millipore, Massachusetts, USA) 5 ml、100×Insulin (Merck Millipore, Massachusetts, USA) 5 ml、100×Cholera Toxin (SIGMA, Tokyo, Japan) 5 ml、100×Adenin (SIGMA, Tokyo, Japan) 5 ml、Penicillin-Streptomycin (Wako, Osaka, Japan) 5 ml を混注したものの。

(3) F-complete medium : F-incomplete medium 500 ml に 100×Epidermal Growth Factor (R &D システムズ, Tokyo, Japan) 5 ml を混注したものの。

(方法)

3T3 細胞 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1658, Manassas, USA) を、DMEM を用いて 10 cm の細胞ディッシュで培養した。コンフルエントとなったところで 50×Mitomycin (SIGMA, Tokyo, Japan) を 1 滴滴下し不活化させ、2 時間後に 3T3 細胞を 6 cm の細胞ディッシュに継代した。翌日に 2×10^5 個の NIKS 細胞 (Immature keratinocytes) (ATCC CRL-12191, Manassas, USA) を撒き、F-media incomplete を用いて培養した。再環状化した HPV18 の DNA を $1.0 \mu\text{g}$ 、X-termGene HD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) $0.5 \mu\text{l}$ を混注

し、15 分室温に、その後 37 °Cで一晩留置し NIKS 細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションした。

5-2 2次元細胞培養 (on feeder 培養)

NIKS ないし NIKS-HPV18 を前述の通り不活化した 3T3 細胞上で 10 cm の細胞デイスシュ (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いて培養した。培地は F-complete medium を使用し、2 日毎に培地交換を行った。

5-3 3次元細胞培養

5-3-1 マトリゲル (Matrigel) を用いた 3次元細胞培養

細胞を撒く前に Matrigel (CORNING, NewYork, USA) 10 μ l を、24 well の細胞デイスシュの底面に敷いた。2 時間 37 °Cでインキュベートした後に、 5×10^4 個の NIKS あるいは NIKS-HPV18 と F Media-incomplete 500 μ l、Matrigel 250 μ l を混在させ撒いた。F Media-complete 100 ul を 2 日毎に追加した。

5-3-2 CollagenIV, Vitrogel を用いた 3次元細胞培養

Matrigel に代わり CollagenIV (Nippi, Tokyo, Japan) あるいは VitroGel (The well BOOSCIENCE, NJ, Japan) を用いて、5-3-1 と同様に細胞培養を行なった。

5-3-3 スフェロイド培養

5×10^4 個の NIKS、NIKS-HPV18、HeLa 細胞(ATCC CCL-2, Manassas, USA)を ultra low attachment dish (CORNING, NewYork, USA) 上で DMEM (Wako, Osaka, Japan) を用いて培養し、4 日後に細胞形態・集塊を観察した。

6. 細胞活性、細胞集塊の評価

6-1 2次元細胞培養の細胞活性の評価

96 well の細胞ディッシュに前述のように不活化した 3T3 細胞を撒き 37 °Cで一晩インキュベートした。その後 5×10^3 個の NIKS、NIKS-HPV18 細胞を撒き、F media-complete を用いて培養し、培養 1, 2, 3 日目に cell counting Kit-8 (DOJINDO, Kumamoto, Japan) を用いて 2次元細胞培養 (on feeder 培養) の MTT アッセイを施行した。CCK-8 溶液を各ウェルに 10 μ l ずつ添加し、37°Cで 2 時間インキュベートし、 μ プレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定した。

6-2 3次元細胞培養の細胞集塊の評価

Matrigel 2 μ l を、96 well の細胞ディッシュに底面に敷いた。2 時間 37 °C でインキュベートした後に、 5×10^3 個の NIKS あるいは NIKS-HPV18 と F Media-incomplete 100 μ l、Matrigel 50 μ l を混在させ培養し、培養 1, 3, 8 日目の細胞集塊を観察した。評価は Image J software (version 1.52) を用いた。画像は白黒かつ 8 ビットに変換し、細胞の大きさは培養 3 日目では 12000 から 18000 の範囲の pixel 値の二乗総和、培養 8 日目では 30000 から 37000 の範囲の pixel 値の二乗総和のものを対象とした。画像は 6 well ずつ用意され平均化されたものを評価した。

7. 免疫染色による発現遺伝子の評価

NIKS、NIKS-HPV18 を 8 日目までマトリゲル培養し、スクレーパーで剥がして iPCell (GenoStaff, Tokyo, Japan) を用いて固定し、0.2 μ m に薄切した。対象とした遺伝子は Ki67 (Cell signaling technology, MA, USA)、p16 (SantaCruz Biotechnology, California, USA) と HPV の E4 (Labo Bio-medical Products, Rijswijk, The Netherland) とした。脱パラフィン後に、pH 9.0 の 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液を用いて賦活化した。REAL Peroxidase Blocking Solution (Agilent, Tokyo, Japan) にて 10 分間、DAKO Protein Block (Agilent, CA, USA) にて 30 分間留置後に、1/100 に薄めた Ki67、p16、E4 各々の抗体を 4 °C で一晩インキュベートした。二次抗体は HISTFINE MAX-

PO (MULTI) (NICHIREI, Tokyo, Japan) を用いて 60 分静置した。

8. 3次元細胞培養における発現遺伝子の評価

8-1 RNA の抽出

NIKS、NIKS-HPV18 に対して、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて on feeder 培養とマトリゲル培養それぞれに対して RNA を抽出した。Agilent RNA 6000 Nano assay にて RIN (>7.0)、A260/A230 (>1.8)、A260/A280 (>1.8) の抽出 RNA を CAGE 解析に用いた。

8-2 CAGE 解析

5'末端に Cap 構造が付与された RNA を対象に、1st strand cDNA に転写をし、CAGE バーコードを付与し、転写開始点を網羅的にシーケンスした。

ヒト遺伝子発現解析は Maser analysis tool (Management and Analysis System for Enormous Reads) を用いて、RECLU ver 3.4 (RIKEN CLST)にて行った⁴⁸。HPV18 遺伝子へのマッピングは ssCAGE を用いて行い、IGV (Integrative Genomic Viewer) を用いて可視化した^{49,50}。

8-3 Pathway 解析

CAGE データをもとに Metascape

(<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) を用いて発現変動遺伝子を調べた⁵²。その後 KEGG pathway を用いて NIKS、NIKS-HPV18 各々の feeder 2D と Matrigel 3D に対して、発現量を比較した。

9. HPV18 遺伝子の発現量

リアルタイム PCR を用いて HPV18 の発現量を測定した。プライマーと Taq Probe の塩基配列は以下に示したものが使用された。(表 2)

細胞培養から抽出した DNA 0.02 ug、Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) 10 μ l、プライマー (10 μ M) 3 μ l と Taq Probe (4 pmol/ul) 1 μ l と混注し PCR を施行した。PCR の条件は 95 °C で 60 秒、その後 95 °C で 15 秒、55°C で 15 秒、64°C で 45 秒を 45 サイクル施行した。全ての PCR 反応でメルティングカーブ分析を施行した。

(表 2)

Target	Direction	Sequence
HPV18	Forward	TCCTTCTGTGGCAAGAGTTGT

	Reverse	CCACCTGCAGGAACCCTAAAA
--	---------	-----------------------

Target	Sequence
Taq Probe HPV18	(FAM) TCGCAAGCCCACCATAGGCC (BHQ1)

発現量を測定するために以上の Primer とプローベを用いた。

10 統計学的解析

統計学的解析には JMP Pro (13.0.0) を用いた。HPV ジェノタイプないし CIN の grade に基づき分類し、その後に経産、喫煙歴、ステロイドあるいは免疫抑制剤使用の有無については分散分析を用い、年齢と診断後からの経過時間、HPV 発現量に関しては Steel-Dwass 検定を用い、陽性率に関しては Cochran-Armitage 検定を用いた。コピー数に関して 10 コピー/L 以下の検体は陰性とした。2次元細胞培養における MTT アッセイと 3次元培養における ImageJ による細胞集塊の大きさの対比、また HPV18 の 2次元細胞培養と 3次元細胞培養のコピー発現数の違いは、各々6 well ずつ測定し Wilcoxon 検定を用いた。これらは全て $p < 0.05$ を有意差ありとした。遺伝子解析は $p < 0.05$ かつ 2 倍以上の log fold 変化を edgeR package によって抽出し有意差ありとした。

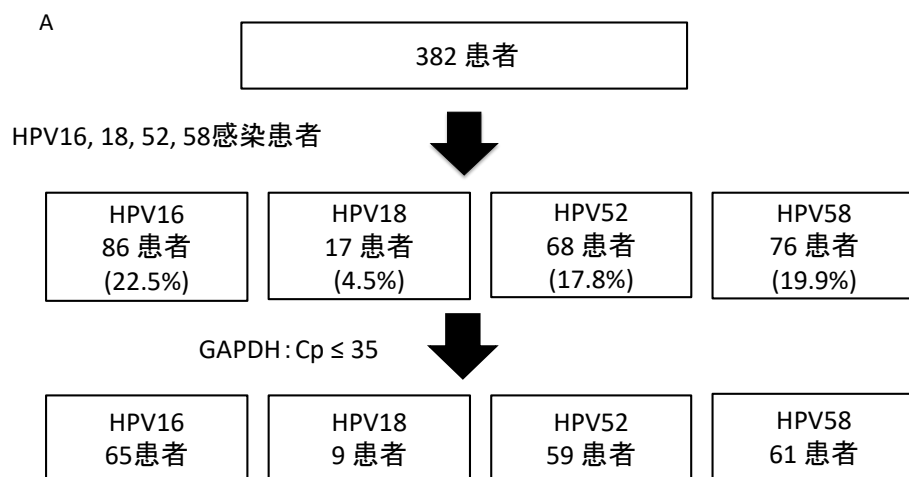
結果

1 CIN患者における HPV のジェノタイプ

1-1 HPV16, 18, 52, 58 感染患者

子宮頸部細胞診で異常を認め、組織診と HPV ジェノタイプを検索された 382 名の患者を対象とした。各型の数は HPV16 感染が 86 名 (22.5 %)、HPV18 感染が 17 名 (4.5 %)、HPV52 が 68 名 (17.8 %)、HPV58 感染が 76 名 (19.9 %)、その他のハイリスク HPV 感染は 83 名 (21.7 %) であった。そのうち単一の感染は HPV16 で 56 名 (65.1 %)、HPV18 感染が 4 名 (23.5 %)、HPV52 が 39 名 (57.3 %)、HPV58 感染が 39 名 (51.3 %) であった。生検検体は微小のため、mRNA の解析が十分な検体として GAPDH の Cp 値が 35 以下を対象としたところ、HPV16 感染が 65 名、HPV18 感染が 9 名、HPV52 が 59 名、HPV58 感染が 61 名となった。また HPV ジェノタイプ毎の CIN1, 2, 3 の数は HPV16 感染で CIN1 が 16 名 (24.6 %)、CIN2 が 39 名 (60.0 %)、CIN3 が 10 名 (15.4 %)、HPV18 感染で CIN1 が 6 名 (66.7 %)、CIN2 が 2 名 (22.2 %)、CIN3 が 1 名 (11.1 %)、HPV52 感染で CIN1 が 16 名 (27.1 %)、CIN2 が 36 名 (61.0 %)、CIN3 が 7 名 (11.9 %)、HPV58 感染で CIN1 が 24 名 (39.3 %)、CIN2 が 35 名 (57.4 %)、CIN3 が 2 名 (3.3 %) であった。(図 2)

(図 2) 対象となった患者の内訳



B

	CIN1	CIN2	CIN3	
HPV16	16 (24.6)	39 (60.0)	10 (15.4)	65
HPV18	6 (66.7)	2 (22.2)	1 (11.1)	9
HPV52	16 (27.1)	36 (61.0)	7 (11.9)	59
HPV58	24 (39.3)	35 (57.4)	2 (3.3)	61
	62 (32.0)	112 (57.7)	20 (10.3)	194

A : 382 名の HPV ジェノタイプの内訳

HPV16, 18, 52, 58 感染患者の数と単一感染の割合を示した。そのうち GAPDH の Cp 値が 35 以下の検体を用いた。最終的には HPV16 感染が 65 名、HPV18 感染が 9 名、HPV52 が 59 名、HPV58 感染が 61 名となり、HPV18 が少数であった。

B : HPV のジェノタイプと CIN の進展度

本研究で対象となった HPV16, 18, 52, 58 感染患者における CIN1, 2, 3 の内訳。HPV18 は CIN1 が中心、HPV16, 52, 58 は CIN2 が中心となった。

1-2 患者背景

1-2-1 HPV16, 18, 52, 58, その他のハイリスク感染患者と HPV 非感染患者の背景

その他の HPV 感染患者の年齢は 44.0 ± 1.2 歳であり、全ての群に比して有意に高齢であった ($p = 0.001$)。喫煙歴、経産歴、ステロイドないし免疫抑制剤の使用歴では各群間で有意差を認めなかった。(表 3)

(表 3) HPV ジェノタイプごとの患者背景

	HPV16	HPV18	HPV52	HPV58	Other HR-HPV	Negative	p値
年齢	37 ± 0.9 (n=86)	39 ± 3.6 (n=17)	38 ± 0.8 (n=68)	39 ± 1.0 (n=76)	44 ± 1.2 (n=78)	40 ± 1.7 (n=45)	0.001
喫煙	15/55 (27.3)	3/10 (30.0)	14/56 (25.0)	19/56 (28.4)	16/72 (22.2)	7/39 (18.0)	0.57
経産	23/57 (40.3)	3/10 (30.0)	23/56 (41.1)	22/57 (38.6)	26/74 (35.1)	15/40 (37.5)	0.97
免疫抑制剤の使用	0/59 (0.0)	0/10 (0.0)	2/57 (3.5)	2/58 (3.5)	2/74 (2.7)	1/36 (2.8)	0.56

HPV16, HPV18, HPV52, HPV58, その他のハイリスク HPV 感染患者と HPV 非感染患者について、年齢、喫煙、経産、免疫抑制剤の使用に関する内訳。その他の HPV 感染患者でそれ以外に群に比して年齢が高かったが ($p < 0.01$)、それ以外では患者背景に差はなかった。

1-2-2 CIN 進展度毎の患者背景

CIN の進展度毎における、患者の年齢、喫煙歴、経産歴、ステロイドないし免疫抑制剤の使用歴を検討したが有意差を認めなかった。(表 4)

(表 4) CIN 進展度毎の患者背景

	CIN1	CIN2	CIN3	p値
年齢	36±1.1 (n=62)	38±0.6 (n=112)	32.5±2.0 (n=20)	0.28
喫煙	10/55 (18)	31/93 (33)	6/19 (32)	0.12
経産	21/56 (38)	36/96 (38)	10/19 (53)	0.36
免疫抑制剤の使用	2/57 (3.5)	2/98 (0.0)	0/19 (0.0)	0.67

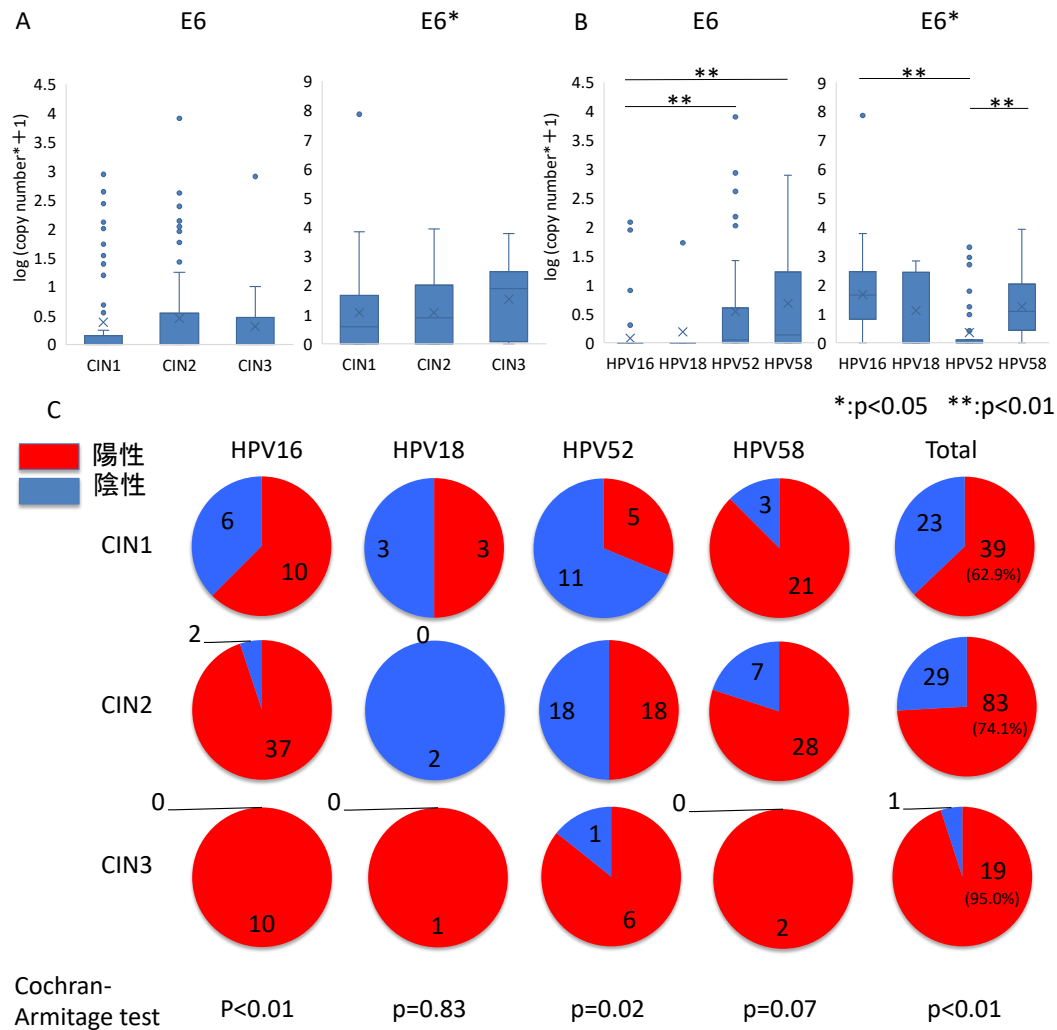
CIN の grade に対する年齢、診断からの期間 (ヶ月)、喫煙、経産、免疫抑制剤の使用に関する内訳。CIN の進展度では患者背景に有意差は認めなかった。

2 E6/E6*の発現量と陽性率

E6とE6*の発現量と陽性率を検討した。CINの進展度の検討では、発現量はCINの進展度で有意差を認めなかったが、陽性率ではCINの進展度に合わせて有意に増加した ($p < 0.01$)。

HPVジェノタイプ毎の発現量の検討では、HPV18, 52, 58に比してHPV16感染患者において特徴が見られ、E6の発現量が最も低かったが、E6*の発現量が最も多かった。HPV18感染患者については他のジェノタイプに比して発現量に有意差を認めなかったが、E6の発現量が少ないがE6*の発現量が多いのはHPV16と同様の傾向であった。対照的にHPV52感染患者はE6の発現量はE6*に比して高値であり、HPV58感染についてはE6とE6*の発現量はほぼ同等であった。(図3)

(図3) *E6/E6**の発現量と陽性率



A : CIN 進展度と *E6/E6**発現量の相関。CIN の進展度では有意差を認めなかった。

B : HPV ジェノタイプと *E6/E6**発現量の相関。*E6*は HPV16 で有意に低く、*E6**では HPV52 で有意に低かった。*E6* 発現量は HPV16<HPV52, 58 (p<0/05)。*E6**発現は HPV52<HPV16, 58 (p<0.05) であった。

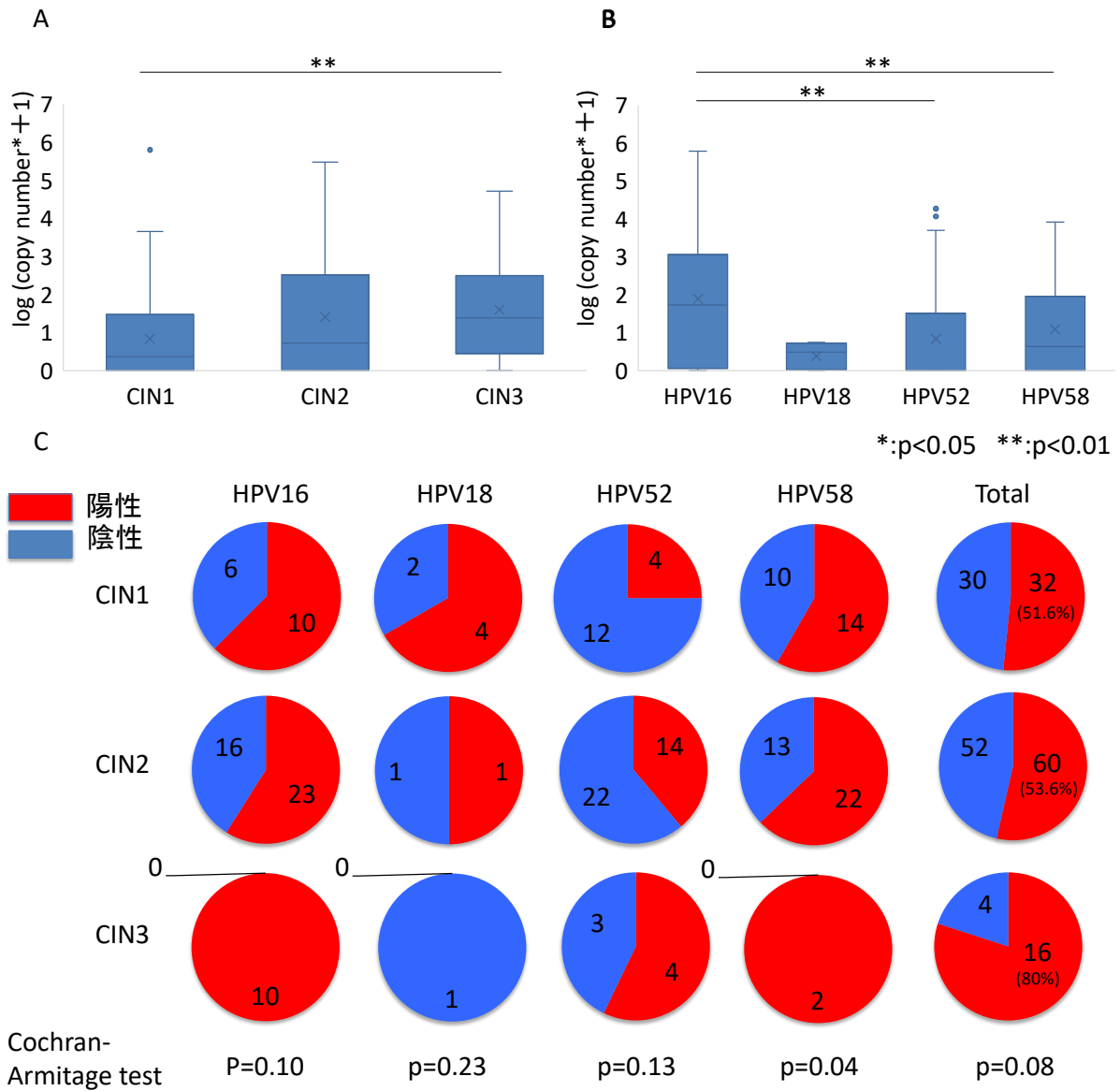
C : HPV ジェノタイプと CIN の grade に対する *E6/E6**の陽性率。全体の傾向として陽性率は CIN の進展に伴い高くなった (p<0.01) 。

3 E1^4の発現量と陽性率

E1^4の発現量と陽性率を検討した。CINの進展毎の検討では、発現量はCIN1に比してCIN3で発現量が多かった ($p < 0.05$)。発現量に関してはHPV16感染で高値、HPV18感染で低値であった。

陽性率の検討では、HPV58感染においてgradeにより陽性率が上昇していくことを確認した ($p = 0.04$)。(図4)

(図 4) *E1^4* の発現量と陽性率



A : CIN 進展度と *E1^4* 発現量の相関。CIN3 では CIN1 に比して有意に発現量が多かった ($p<0.01$)。

B : HPV ジェノタイプと *E1^4* 発現量の相関。HPV16 では HPV52, 58 に比して有意に発現量が多かった ($p<0.01$)。

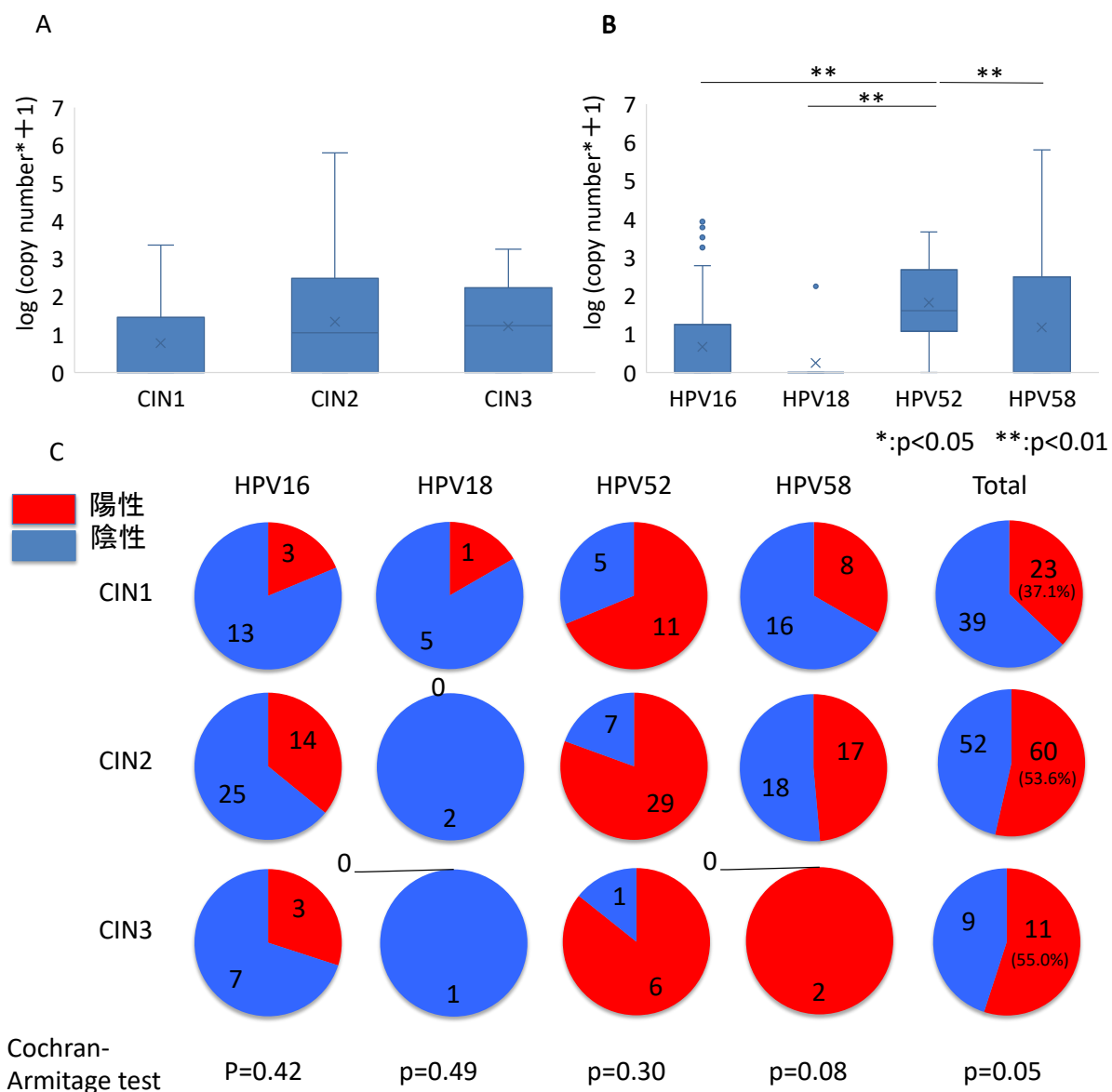
C : HPV ジェノタイプと CIN の grade に対する *E1^4* の陽性率。HPV58 では CIN の進展に伴い *E1^4* の陽性率が増加した ($p<0.05$)。

4 L1の発現量・陽性率

L1の発現量は HPV52 感染患者が HPV16, 18, 58 感染患者に比して有意に多かった ($p < 0.05$)。また HPV18 感染患者では発現をほとんど認めなかった。

また陽性率に関しては、HPV52 では 78 %、HPV58 では 44 %、HPV16 では 31 % で陽性であったが、HPV18 では 11 % (1 例のみ) であった。(図 5)

(図5) *L1*の発現量・陽性率



A : CIN 進展度と *L1* 発現量の相関。CIN の進展度では有意差を認めなかった。

B : HPV ジェノタイプと *L1* 発現量の相関。HPV52 が HPV16, 18, 58 にして有意に発現が多かった ($p < 0.01$)。

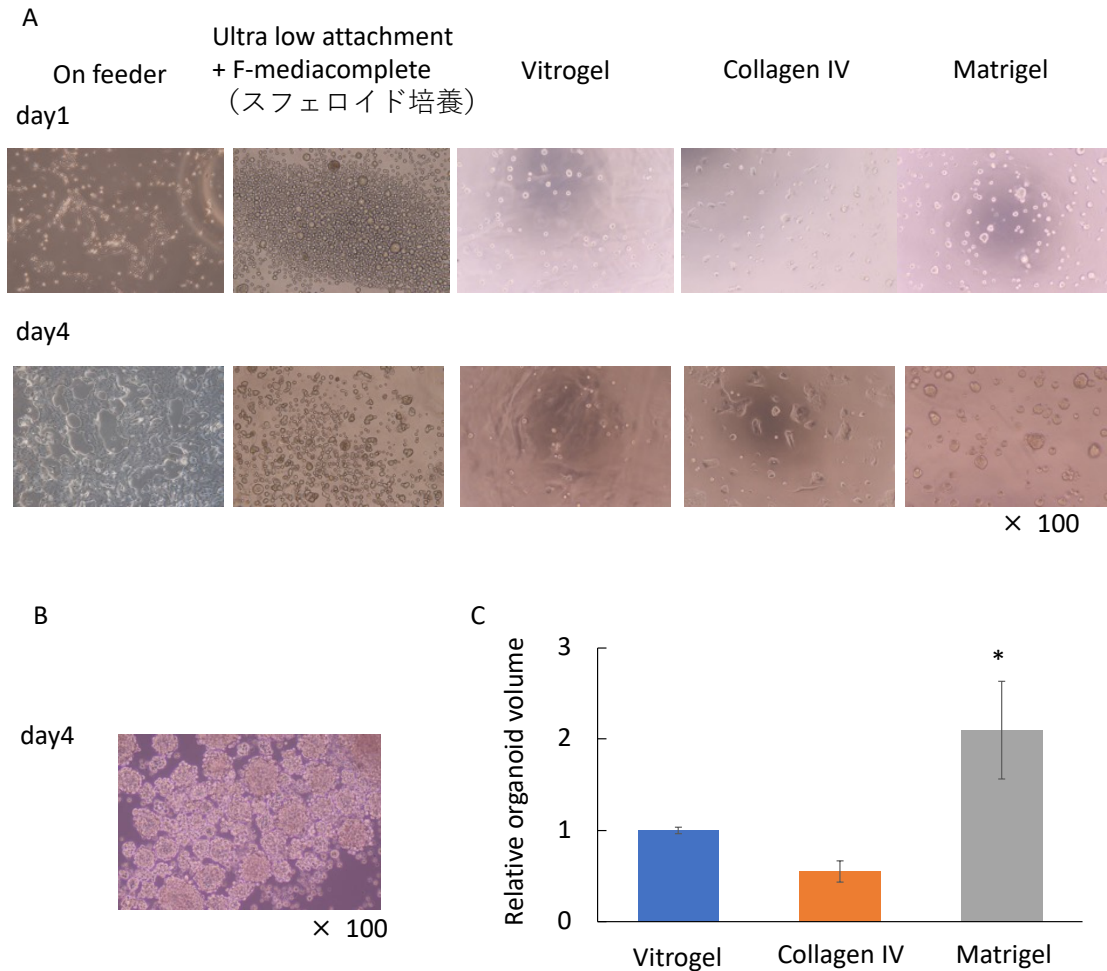
C : HPV ジェノタイプと CIN の grade に対する *L1* の陽性率。HPV18 では 11% (1 例のみ) しか陽性でなかった。

5 NIKS-HPV18 の各培養条件による細胞増殖と形態学的変化

ヒトの未分化ケラチノサイトである NIKS 細胞は、子宮頸部の HPV 感染細胞に類似する実験系として頻回に使用されているため、本研究でも NIKS 細胞を使用した。

NIKS、NIKS-HPV18 を on feeder 培養、スフェロイド培養、Vitrogel 培養、コラーゲンIV培養、マトリゲル培養し、1日目ないし4日目の細胞増殖と形態学的変化を観察したところ、NIKS、NIKS-HPV18 ともにマトリゲル培養では細胞集塊を形成し増大することがわかった。一方でスフェロイド培養では細胞集塊を認めず、Vitrogel 培養、コラーゲンIV培養では小さな細胞集塊を作ったが経時的に増大しなかった。ImageJ を用いて Vitrogel 培養、コラーゲンIV培養、Matrigel 培養の形態の大きさについて Wilcoxon 検定を使用し相対的に評価したが、Matrigel 培養で有意に集塊が大きかった。 ($p < 0.05$)。癌細胞では足場非依存性増殖が可能であることが知られている。しかし NIKS-HPV18 では浮遊状態でスフェロイドを形成しなかった。このため陽性コントロールとしてまた HPV18 陽性の子宮頸癌の細胞株である HeLa 細胞をスフェロイド培養したところ細胞の成長を認めた。以上から NIKS 細胞に HPV18 を導入してもスフェロイド形成能力がないことが判明した。(図6)

(図 6) NIKS-HPV18 の各培養条件による細胞増殖と形態学的変化



A、NIKS-HPV18 を on feeder 培養、スフェロイド培養、Vitrogel 培養、コラーゲンIV培養、Matrigel 培養し、1 日目ないし 4 日目の形態学的変化を観察した。NIKS-HPV18 が on feeder 培養で増殖すること、Matrigel 培養で細胞集塊を形成することを確認した。

B、HeLa 細胞をスフェロイド培養し、スフェロイド形成を確認した。

C、Image J を用いて Vitrogel 培養、コラーゲンIV培養、Matrigel 培養の形態の大きさを比較した。Matrigel 培養で有意に Vitrogel 培養とコラーゲンIV培養に比して細胞集塊が大きくなることを確認した($p < 0.05$)。

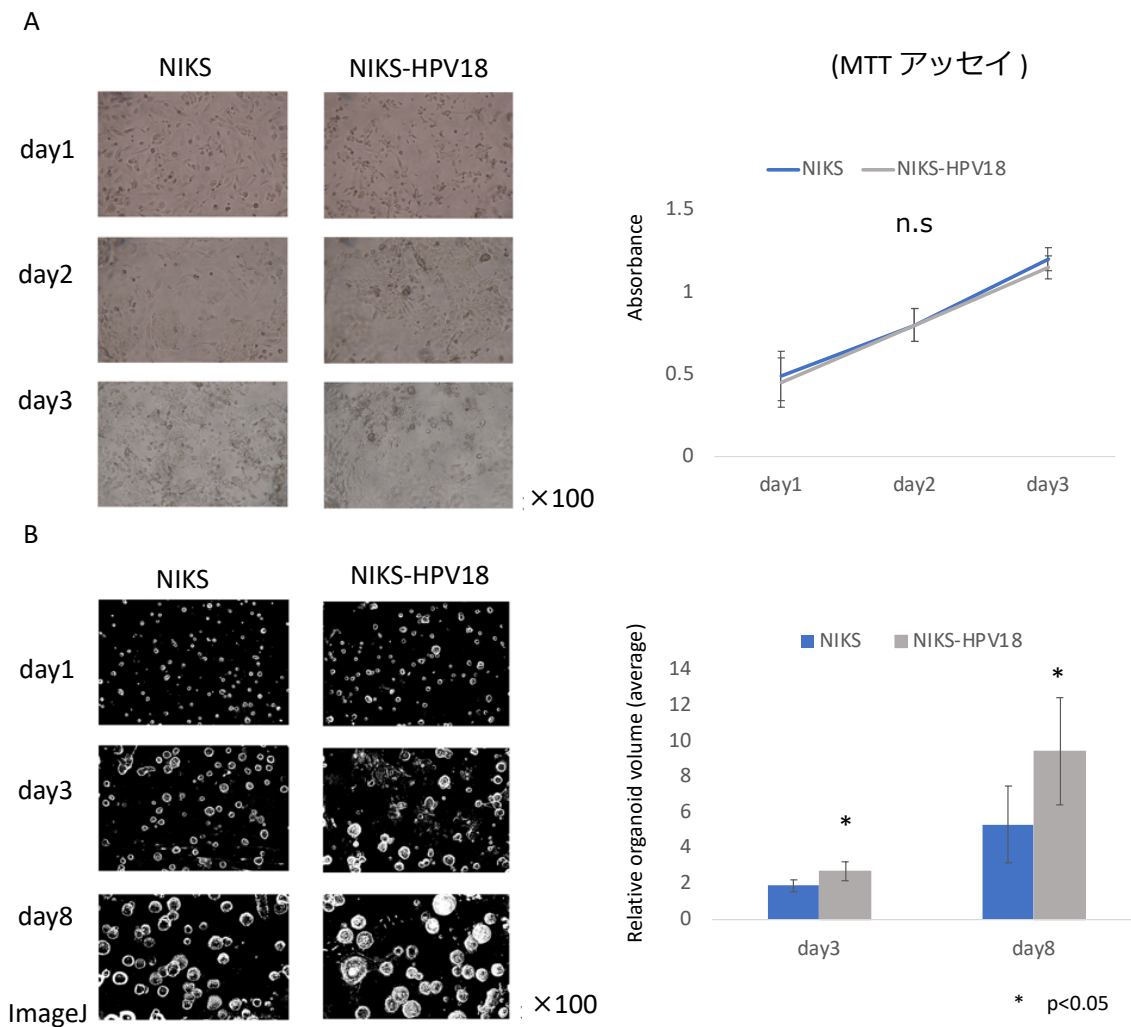
6 NIKS-HPV18 と NIKS 細胞の比較

NIKS-HPV18 と NIKS の on feeder 培養とマトリゲル培養における細胞の成長を比較検討した。On feeder 培養では MTT アッセイを用いて継時的に比較検討したところ、NIKS-HPV18 と NIKS には細胞増殖能に差を認めなかった。

マトリゲル培養では ImageJ を用いて細胞の大きさを比較検討した。マトリゲル培養では NIKS-HPV18 が NIKS に比して有意に大きな細胞集塊を認めた ($p < 0.05$)。

(図 7)

(図 7) NIKS-HPV18 と NIKS 細胞の比較の培養条件による違い



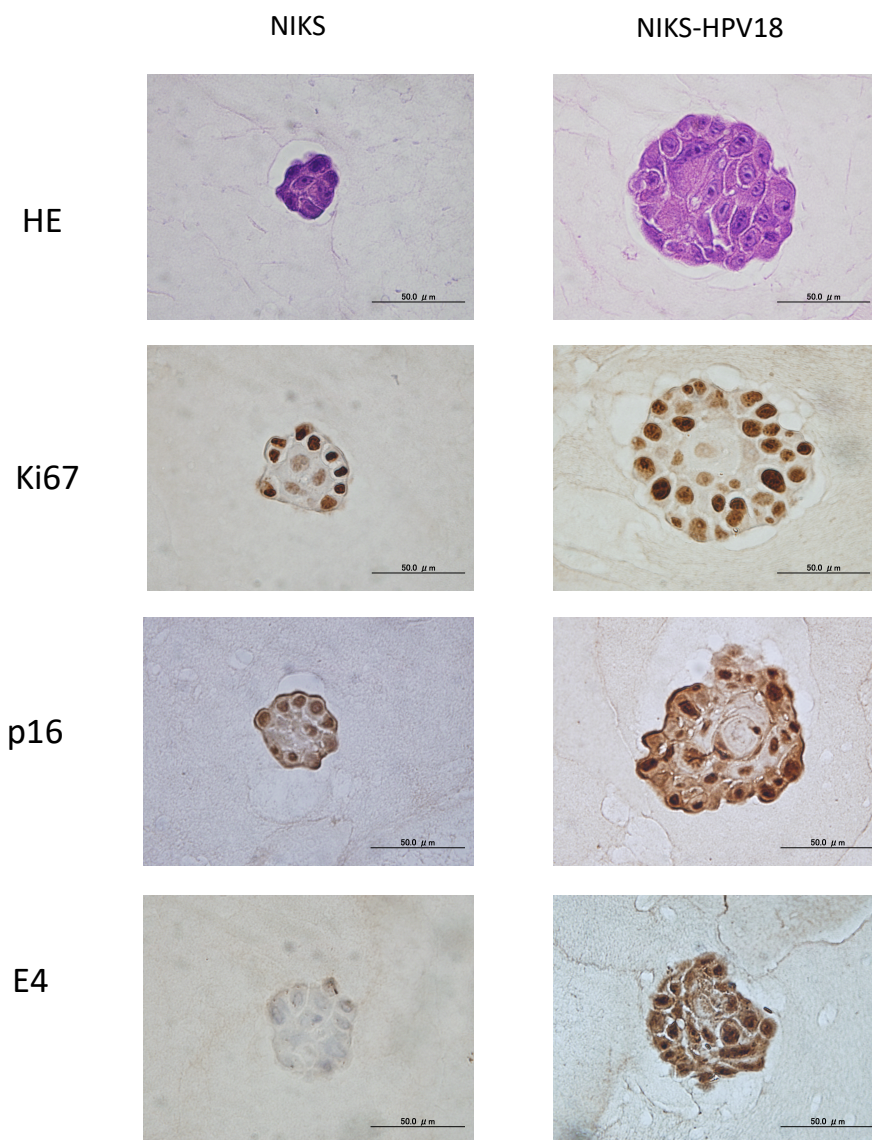
A、on feeder 培養における NIKS-HPV18 と NIKS の MTT アッセイ。on feeder 培養では NIKS-HPV18 と NIKS で細胞活性の差を認めなかった。

B、Matrigel 培養における NIKS-HPV18 と NIKS の細胞集塊の変化。Matrigel 培養では NIKS-HPV18 は NIKS に比して day3 でも day8 でも大きな細胞集塊を認めた ($p<0.05$)。

7 Ki67、p16、E4 の免疫染色

NIKS-HPV18 と NIKS に対してマトリゲル培養を行い、細胞増殖マーカーである Ki67、癌抑制遺伝子である p16、ケラチン化マーカーである HPV の E4 蛋白に対して免疫染色を行なった。NIKS-HPV18 と NIKS 共に Ki-67 は細胞集塊のより外側で陽性となる傾向を示した。NIKS-HPV18 と NIKS にて p16 が共に陽性であり、NIKS-HPV18 では E4 が陽性であり、免疫染色でも NIKS-HPV18 で HPV-18 の感染を確認した。(図 8)

(図 8) Ki67、p16、E4 の免疫染色



NIKS-HPV18 と NIKS の HE 染色, Ki67, p16, HPV 由来 E4 蛋白に対する免疫染色。NIKS-HPV18 と NIKS 共に Ki67 が陽性であった。p16 も共に陽性であり、p16 の特異性の低さによるものが原因が考えられた。HPV 由来 E4 蛋白に関しては NIKS-HPV18 でのみ陽性であった。

8 NIKS-HPV18 のプロファイルの特徴と培養条件による変化

8-1 発現変動遺伝子の抽出、KEGG Pathway 解析

まずは HPV18 ウイルス導入によるヒト遺伝子発現の差を確認するために、NIKS-HPV18 と NIKS に対して on feeder 培養（以下 2D）とマトリゲル培養（以下 3D）を行った。NIKS-HPV18-2D と NIKS-2D、NIKS-HPV18-3D と NIKS-3D に対して発現変動遺伝子を抽出したところ、2次元ないし3次元細胞培養どちらでも NIKS に比して NIKS-HPV18 の方が遺伝子変化を多く認めた。

更に、3次元培養を行うことでより生体に近い癌化の実験系となることを確認するために、培養条件による遺伝子発現の差を確認した。NIKS-HPV18-2D と NIKS-HPV18-3D、NIKS-2D と NIKS-3D に対して発現変動遺伝子を抽出したところ、NIKS-HPV18 の方が3次元細胞培養の際により多くの遺伝子変化を起こすことがわかった。（図 9-A）

NIKS-HPV18 ではウイルス関連変化が多いことが示された。更に NIKS-HPV18 では 2D 培養に比して、3D 培養の方がウイルス性の癌化、ウイルスの感染、細胞分裂速度が有意に上昇することが分かった。それに比して細胞結合は有意に低下することも示された。（図 9-B）

(図 9) NIKS-HPV18 のプロファイルの特徴と培養条件による遺伝子変化

A NIKS-HPV18とNIKSの対比

3次元細胞培養におけるNIKS-HPV18の発現亢進パスウェイ

NIKS-HPV18とNIKSの対比		パスウェイ	パスウェイ名	Log P	遺伝子
	2次元細胞培養	hsa00600	Sphingolipid metabolism	-3.51	UGCG,DEGS2,SGPP2
発現亢進転写開始点	52	hsa05166	HTLV-I infection	-3.13	SLC25A5,ATF4,CDK2,N2A,EGR1,FOS
発現抑制転写開始点	27				

B 2次元細胞培養と3次元細胞培養の対比

3次元細胞培養におけるNIKS-HPV18の発現亢進パスウェイ

3次元細胞培養におけるNIKS-HPV18の発現抑制パスウェイ

2次元細胞培養と3次元細胞培養の対比		パスウェイ	パスウェイ名	LogP	パスウェイ	パスウェイ名	LogP
	NIKS	hsa03010	Ribosome	-32.6	hsa04530	Tight junction	-6.31
発現亢進転写開始点	21		Viral carcinogenesis	-12.4	hsa05160	Hepatitis C	-3.59
発現抑制転写開始点	1210	hsa04510	Focal adhesion	-10.6	hsa04210	Apoptosis	-2.88
	NIKS-HPV18		Pathways in cancer	-8.90		Histidine metabolism	-2.83
		hsa04110	Cell cycle	-6.34	hsa00340	Regulation of lipolysis in adipocytes	-2.63
		hsa05166	HTLV-I infection	-6.11	hsa04923	Fatty acid biosynthesis	-2.38
			Pathogenic Escherichia coli infection	-5.82	hsa00061	beta-Oxidation, acyl-CoA synthesis	-2.32
			Fluid shear stress and atherosclerosis	-4.81	M00086	Chronic myeloid leukemia	-2.32
			Adherens junction	-4.46	hsa05220	Insulin resistance	-2.28
			Parkinson's disease	-4.29	hsa04931	Axon guidance	-2.16
					hsa04360	Thiamine metabolism	-2.03

A HPV18 ウイルス導入による遺伝子発現の差を確認するために、NIKS-HPV18-2D と NIKS-2D、NIKS-HPV18-3D と NIKS-3D に対して発現変動遺伝子を抽出した。左は発現遺伝子変化数、右は Pathway 解析による具体的な発現変動遺伝子。2D ないし 3D どちらでも NIKS に比して NIKS-HPV18 の方が多くの遺伝子変化を認めた。ウイルス関連遺伝子としては HTLV-1 関連が更新していた ($p < 0.01$)。

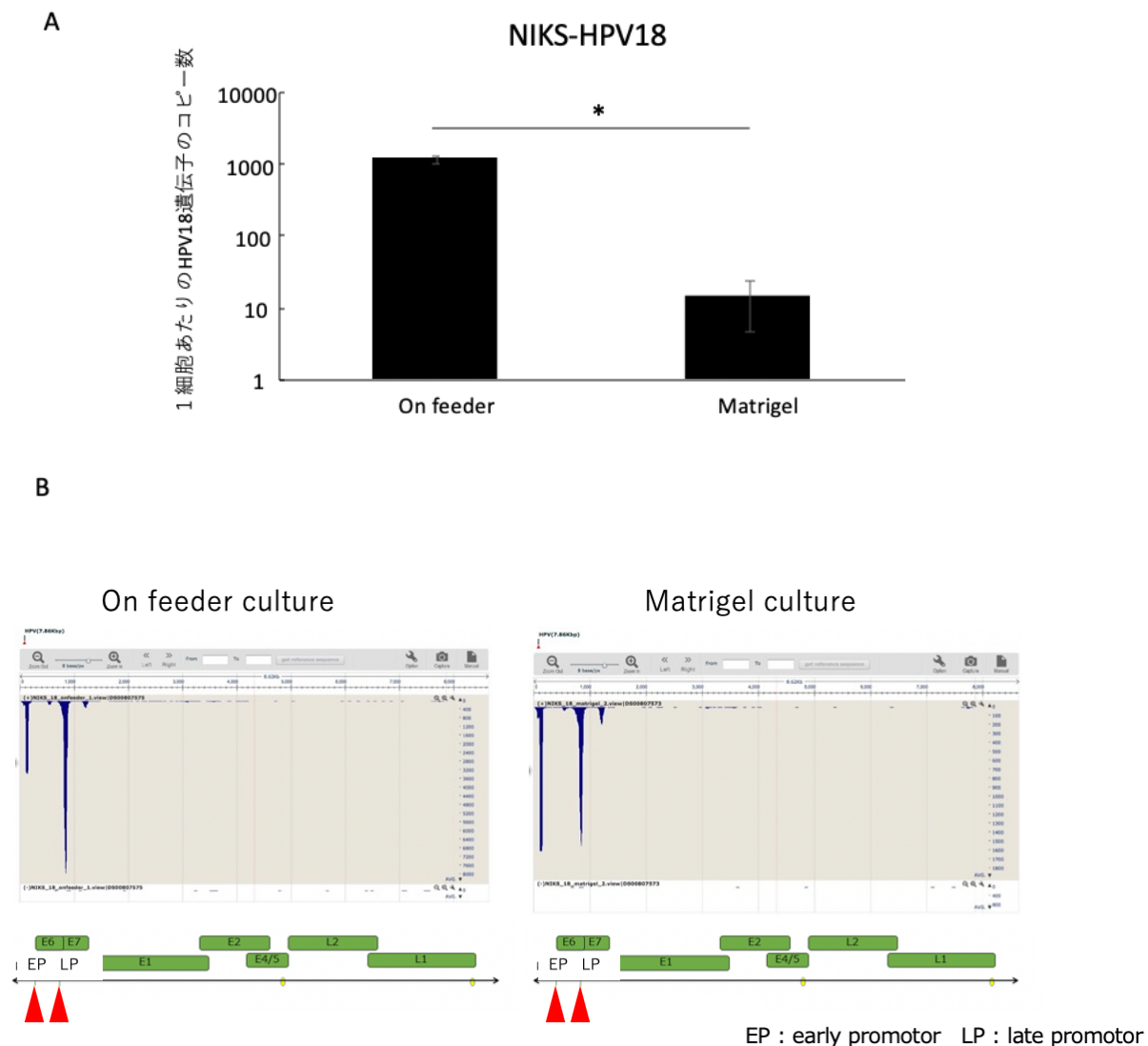
B 培養条件による遺伝子発現の差を確認するために、NIKS-HPV18-2D と NIKS-HPV18-3D、NIKS-2D と NIKS-3D に対して発現変動遺伝子を抽出した。左は発現遺伝子変化数、右は Pathway 解析による具体的な発現変動遺伝子。NIKS-HPV18 の方が 3D にてよりウイルス性の癌化、ウイルスの感染、細胞分裂速度はどの遺伝子変化が有意に亢進していた ($p < 0.01$)。

9 CAGE 法による培養条件による HPV-18 発現の評価

次に HPV18 遺伝子発現量の維持について on feeder 培養とマトリゲル培養で比較した。マトリゲル培養では HPV18 の遺伝子発現が継代にて on feeder 培養に比してコピー数の減少を認めたが、継代により HPV18 遺伝子が消失しないことを確認した。(図 10-A)

CAGE 法により HPV18 の転写開始点パターンに着目したところ、マトリゲル培養では on feeder 培養に比べ、early promotor がより活性化している傾向がみられた。(図 10-B)

(図 10) 継代によるコピー数の変化と CAGE 解析による promotor 活性の変化



A、on feeder 培養と Matrigel 培養のコピー数の違いの検討。on feeder 培養の方が、コピー数が維持されていたが ($p < 0.05$)、Matrigel 培養でもコピー数の維持を確認した。

B、CAGE を用いた promotor に着目した遺伝子発現量の解析。Matrigel 培養では on feeder 培養に比べて early promotor が活性化している傾向を認めた。

考察

本研究ではまず HPV ジェノタイプ毎と CIN の grade 毎のトランスクリプトーム解析を評価し、*E6/E6**、*E1⁴*、*L1* の発現量と発現率を調べることで HPV ジェノタイプ毎の CIN の進展形式の違いを検討した。

図 3 より *E6/E6** の発現率が CIN の grade に合わせて上昇していくのは、本検討と既報で結果が一致していた²¹。図 4、図 5 より *E1⁴* と *L1* の発現率については CIN の grade との相関を認めなかった。そのことは、HPV のジェノタイプが異なっても癌遺伝子である *E6/E6** が子宮頸癌の進行とともに増加することは必要不可欠であるが、*E1⁴* や *L1* については grade に依存せず、HPV ジェノタイプ毎に個別の発現パターンがあることが示唆された。

次に HPV ジェノタイプ毎の発現解析において、まずは図 3 より *E6/E6** の発現パターンがジェノタイプ毎に異なっていた。より癌化のリスクが高いことがわかっている HPV16 と HPV18 において、*E6** が *E6* に比して有意に多く発現していた。*E6** は *E6* と同様に発癌に関わる役割を持つとされているが意義不明なところが多く、さらなるデータの蓄積が必要である。

更に図 5 より *L1* の発現量については、HPV18 で発現を認めなかった。*L1* の主な役割はカプシド形成であり、そのことは細胞分化を伴うウイルス産性能・持続感染に

関与していると考えられる。それゆえ、HPV18 感染細胞にて *L1* の発現を認めなかったことは、HPV18 の感染維持には capsid 産生を介した HPV18 の複製が不可欠ではないことを示唆すると考えられる。

本研究の結果は、HPV18 由来の癌化の過程において新しい知見を加えたと考えている。図 5 より HPV18 感染患者で *L1* の発現を認めないことは、CIN の早期の段階で細胞分化の障害と、早期のインテグレーションが起こることを示唆し、そのことが HPV18 感染での癌化速度の速さに関与していると示唆された。

それに比して、HPV52 は CIN2, 3 のように進展している場合でも *L1* の発現が非常に高いことが分かった。通常は細胞分化の障害による CIN の進展に伴い、*L1* の発現は少なくなっていくと考えられている^{22,23}。HPV18 に比して HPV52 においては *L1* の発現が、CIN が進展しても高値であることは、HPV52 感染の病変では細胞分化を伴う HPV の感染生活史が維持されていることが示唆される。また CIN3 においても HPV52 感染患者では *L1* が高発現であることは、インテグレーションがより遅い段階で起きている可能性を示唆した。HPV52 感染は癌患者での検出率は低いながら CIN 患者では高頻度に検出される¹⁶。また Markov モデルの解析でも、HPV52 感染症例では CIN1, 2 の期間が持続しやすいこともわかっている。HPV52 感染患者が CIN の期間が長い事は、高い *L1* の発現率と関係している可能性があると考えられる。

本研究ではいくつかの制限がある。1、E1⁴に関してはスプライシングサイトのみを評価しているため、癌化について十分に検討することが困難であった。2、HPV18 の患者数が少なくより多くの患者数で検討できなかった。3、横断的研究であるため、CIN の進展・退縮への関与を検討するにはコホート研究が必要と考えられた。

また本研究では NIKS-HPV18 の 3次元細胞培養モデルの確立をした。癌細胞では足場非依存性増殖が可能であることが知られている。しかし図6より NIKS ならびに NIKS-HPV18 ではマトリゲル培養のみで細胞集塊の増大を認め、浮遊状態でスフェロイドを形成しなかった。陽性コントロールとして使用した HeLa 細胞では足場非依存的にスフェロイド形成を確認した。また図7より NIKS-HPV18 細胞と NIKS 細胞の対比において、2次元細胞培養では MTT 活性に有意差はないが、3次元細胞培養では有意に細胞集塊を形成することが確認された。

以上から NIKS 細胞に HPV18 を導入するだけではスフェロイド能力がなく、また足場としてはコラーゲンIVだけでは不十分であり、マトリゲルのラミニンによる細胞外マトリックスが NIKS ならびに NIKS-HPV18 の 3次元細胞培養には必要であることが示唆された。更に図9より HPV18 の遺伝子は3次元細胞培養でより発現が活性し、細胞増殖を促進・癌化させることが示唆された。これは3次元細胞培養では癌遺伝子がより活性化するといった既報と合致する^{51,52,53}。

更に遺伝子解析により 3次元細胞培養では 2次元細胞培養に比してウイルス感染パスウェイや癌化のパスウェイが活性化することが示された。更に図 10 より early promotor の発現活性が late promotor に比して相対的に高くなることも確認された。このことは生体における基底層での癌化進展時に観察されることと一致する^{45,54}。またこの結果は CIN の検討で HPV18 感染細胞にて *L1* の発現を認めなかったことと一致する。

以上のことより、マトリゲルを用いた NIKS-HPV18 を用いた 3次元細胞培養は、より生体内に近い環境での HPV18 による細胞癌化モデルとして使用できる可能性があると考えている。

本実験系ではいくつかの制限がある。1、今回ヒト未成熟ケラチノサイトとして NIKS 細胞を使用した。子宮頸部の細胞ではない。2、複数回の継代による遺伝子発現維持を確認していない。

このような制限があるが、マトリゲルによる 3次元細胞培養は HPV18 関連の癌化解析モデルとして十分実験系として使用できると考える。

結論

本研究では、まず HPV のジェノタイプ毎のトランスクリプトーム解析を行った。

HPV 由来トランスクリプトームの発現パターンは感染 HPV ジェノタイプ毎に特徴があることがわかった。特に、ウイルスキャプシドに関わる *L1* については、

HPV18 感染患者で発現を認めず、HPV52 感染患者では CIN が進展した患者でも高発現であることがわかった。本検討は横断的研究であるため追跡調査が必要であるが、そのことは HPV18 の短い CIN の期間と HPV52 の長い CIN の期間と関連している可能性が考えられた。HPV のジェノタイプ毎に癌化の過程が異なる可能性が示唆され、今後 HPV ジェノタイプ毎の CIN 管理方法を検討するうえで基盤となる可能性がある。

また臨床的に特に問題となりやすい HPV18 に注目し、NIKS-HPV18 の 3 次元細胞培養モデルを確立した。マトリゲルを用いて 3 次元細胞培養を用いることで、より生体環境に類似した HPV18 遺伝子の活性化を確認できた。本研究のマトリゲルを用いた NIKS-HPV18 の 3 次元細胞培養モデルは、今後の HPV18 の持続感染や HPV18 による癌化を検討するモデルとして活用できる可能性がある。

謝辞

川名 敬先生、田口 歩先生には実験手技、研究方法、研究内容、論文執筆に関して教育をしていただきました。藤井 知行先生、大須賀 穰先生には産婦人科教室の研究会でご指導をいただきました。織田 克利先生、永松 健先生、小松 篤史先生、足立 克之先生、森 繭代先生、江口 聡子先生、河田 啓先生には研究カンファランスにてご指導をいただきました。柗本 巖先生、森 清一郎先生には研究内容、裏付けで大変お世話になりました。前田 大地先生には病理診断のご支援をいただきました。三橋 暁先生、岩田 卓先生には患者サンプルの集積で大変お世話になりました。原 湖楠先生には統計処理を中心にご指導をいただきました。

全てに先生方に深く感謝いたします。

参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 394-424.
2. 榎本隆之. 日本産婦人科学会腫瘍委員会報告. 2019 年度患者年報. 日産婦誌 72 巻 6号 676-683
3. 温川恭至. ヒトパピローマウイルスによる分子機構. ウイルス. 日本ウイルス学会 2008; 58: 141-154
4. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370: 890-907.
5. Luostarinen T, Apter D, Dillner J, Eriksson T, Harjula K, Natunen K, Paavonen J, Pukkala E, Lehtinen M. Vaccination protects against invasive HPV - associated cancers. *Int J Cancer.* 2018 ;142(10):2186-2187.
6. US Preventive Services Task Force, Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, Davidson KW, Doubeni CA, Epling JW Jr, Kemper AR, Kubik M, Landefeld CS, Mangione CM, Phipps MG, Silverstein M, Simon MA, Tseng CW,

Wong JB. Screening for Cervical Cancer: US Preventive Services Task Force

Recommendation Statement. *JAMA*. 2018; 320(7): 674-686.

7. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie G, Mirabello L, Carozzi F, Cubie H, Wentzensen N, Snijders P, Arbyn M, Monsonego J, Franceschi S.

Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs *Int J Cancer*. 2018; 143(4): 735-745.

8. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C, Saslow D. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*. 2004; 103: 304-309.

9. Bosch FX, Robles C, Diaz M, Baussano I, Clavel C, Ronco G, Dillner J, Lehtinen M, Petry KU, Poljak M, Kjaer SK, Meijer CJ, Garland SM, Salmeron J, Castellsague X, Bruni L, de Sanjose S, Cuzick J. HPV-FASTER : broadening the scope for prevention of HPV-related cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13: 119-132.

10. Moscicki AB. HPV infections in adolescents. *Dis Markers*. 2007; 23: 229–34.

11. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018; 47: 14-26.
12. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer.* 2017; 141(4): 664-670.
13. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology.* 2013; 445: 224–31.
14. Sasagawa T, Maehama T, Ideta K, Irie T, Fujiko I. Population-based study for human papillomavirus (HPV) infection in young women in Japan: a multicenter study by the Japanese human papillomavirus disease education research survey group (J-HERS). *J Med Virol.* 2016; 88: 324–35.
15. Milligan SG, Veerapraditsin T, Ahamet B, Mole S, Graham SV. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology.* 2007; 360: 172–81.

16. Yukari Azuma, Rika Kusumoto-Matsuo, Fumihiko Takeuchi, Asami Uenoyama, Kazunari Kondo, Hajime Tsunoda, Kazunori Nagasaka, Kei Kawana, Tohru Morisada, Takashi Iwata, Daisuke Aoki, Iwao Kukimoto. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. *Jpn J Clin Oncol*. 2014; 44: 910–7.
17. Tang S, Tao M, McCoy JP, Zheng ZM. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papilloma virus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol*. 2006; 80: 4249–63.
18. Graham SV. Keratinocyte differentiation-dependent human papillomavirus gene regulation. *Viruses*. 2017; 9: 245.
19. Jennifer Biryukov, Jocelyn C Myers, Margaret E McLaughlin-Drubin, Heather M Griffin, Janice Milici, John Doorbar, Craig Meyer. Mutations in HPV18 E1^{E4} impact virus capsid assembly, infectivity competence, and maturation. *Viruses*. 2017; 9: 385.
20. Young Sam Choi, Woo Dae Kang, Seok Mo Kim, Yoo Duk Choi, Jong Hee Nam, Chang Soo Park, Ho Sun Choi. Human papillomavirus L1 capsid protein and human papillomavirus type 16 as prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia 1. *Int J Gynecol Cancer*. 2010; 20: 288–93.

21. Chih-Ming Ho, Bor-Heng Lee, Shwu-Fen Chang, Tsai-Yen Chien, Shih-Hung Huang, Chiu-Cho Yan, Wen-Fang Cheng. Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 2010; 127: 622–32.
22. Xiao W, Bian M, Ma L, Liu J, Chen Y, Yang B, Wu Q. Immunochemical analysis of human papillomavirus L1 capsid protein in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Acta Cytol*. 2010; 54: 661–7.
23. Stemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetic D, Ostojić DV, Rubesa-Mihaljević R, Manestar M. Evaluation of the HPV L1 capsid protein in prognosis of mild and moderate dysplasia of the cervix uteri. *Coll Antropol*. 2010; 34: 419–23.
24. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370: 890–907.
25. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, Mitsuhashi A, Fujii T, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Japan HPV And Cervical Cancer Study Group. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study *Int J Cancer* 2011; 128(12): 2898-910.

26. Taguchi A, Hara K, Tomio J, Kawana K, Tanaka T, Baba S, Kawata A, Eguchi S, Tsuruga T, Mori M, Adachi K, Nagamatsu T, Oda K, Yasugi T, Osuga Y, Fujii T.

Multistate Markov Model to Predict the Prognosis of High-Risk Human

Papillomavirus-Related Cervical Lesions. *Cancers (Basel)* 2020; 12(2): 270.

27. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017; 772: 23-35.

28. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1072–9.

29. S Bulk, J Berkhof, L Rozendaal, N C Fransen Daalmeijer, M Gök, F A de Schipper, F J van Kemenade, P J F Snijders, C J L M Meijer. The contribution of HPV18 to cervical cancer is underestimated using high- grade CIN as a measure of screening efficiency. *Br J Cancer.* 2007; 96: 1234–6.

30. Stuart I Collins, Christothea Constandinou-Williams, Kaisheng Wen, Lawrence S Young, Sally Roberts, Paul G Murray, Ciaran B J Woodman. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus

infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res.* 2009; 69: 3828–32.

31. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006; 11: 2286–302.

32. FIGO(International Federation of Gynecology and Obstetrics)26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 95: S1-257.

33. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 518–27.

33. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature.* 2017; 543: 378–84.

35. Heather Griffin, Zhonglin Wu, Rebecca Marnane, Vincent Dewar, Anco Molijn, Wim Quint, Christine Van Hoof, Frank Struyf, Brigitte Colau, David Jenkins, John Doorbar. E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PLoS One.* 2012; 7: e49974.

36. Paul F. Lambert. Using an immortalized cell line to study the HPV life Cycle in Organotypic “Raft” Culture. *Methods Mol Med.* 2005; 119: 141-55

37. S C Dollard, J L Wilson, L M Demeter, W Bonnez, R C Reichman, T R Broker, L T Chow. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft culture. *Genes Dev* 1992; 6: 1131–1142.
38. Tiziana Scanu, Robbert M Spaapen, Jeroen M Bakker, Chandra Bhan Pratap, Lin-en Wu, Ingrid Hofland, Annegien Broeks, Vijay Kumar Shukla, Mohan Kumar, Hans Janssen, Ji-Ying Song, E Andra Neefjes-Borst, Hein te Riele, David W Holden , Gopal Nath, Jacques Neefjes. Salmonella manipulation of host signaling pathways provokes cellular transformation associated with gallbladder carcinoma. *Cell Host Microbe*. 2015; 17: 763–774.
39. Yin Y, Bijvelds M, Dang W, Xu L, van der Eijk AA, Knipping K, Tuysuz N, Dekkers JF, Wang Y, de Jonge J, Sprengers D, van der Laan LJ, Beekman JM, Ten Berge D, Metselaar HJ, de Jonge H, Koopmans MP, Peppelenbosch MP, Pan Q. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids. *Antivir Res*. 2015; 123: 120–131.
40. Chen YW, Huang SX, de Carvalho ALRT, Ho SH, Islam MN, Volpi S, Notarangelo LD, Ciancanelli M, Casanova JL, Bhattacharya J, Liang AF, Palermo LM, Porotto M, Moscona A, Snoeck HW. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol*. 2017; 19: 542–549.

41. Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013; 110: 11127–11132.
42. Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe J, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y, Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncol. Lett.* 2017; 14: 6863–6868.
43. Yoshiaki Maru, Akira Kawata, Ayumi Taguchi, Yoshiyuki Ishii, Satoshi Baba, Mayuyo Mori, Takeshi Nagamatsu, Katsutoshi Oda, Iwao Kukimoto, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii, Yoshitaka Hippo. Establishment and Molecular Phenotyping of Organoids from the Squamocolumnar Junction Region of the Uterine Cervix. *Cancers* 2020; 12: 694.
44. Ayumi Taguchi, Kazunori Nagasaka, Charles Plessy, Hiroe Nakamura, Yoshiko Kawata, Sachi Kato, Kosuke Hashimoto, Takeshi Nagamatsu, Katsutoshi Oda, Iwao Kukimoto, Kei Kawana, Piero Carninci, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii. Use of Cap Analysis Gene Expression to detect human papillomavirus promoter activity patterns at different disease stages. *Sci Rep* 2020; 10(1) : 17991
45. Toshiyuki Shiraki, Shinji Kondo, Shintaro Katayama, Kazunori Waki, Takeya

Kasukawa, Hideya Kawaji, Rimantas Kodzius, Akira Watahiki, Mari Nakamura, Takahiro Arakawa, Shiro Fukuda, Daisuke Sasaki, Anna Podhajska, Matthias Harbers, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(26): 15776–15781.

46. Murata M, Nishiyori-Sueki H, Kojima-Ishiyama M, Carninci P, Hayashizaki Y, Itoh M. Detecting expressed genes using CAGE. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1164: 67–85.

47. Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGMV PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 3474–81.

48. Ohmiya H, Vitezic M, Frith MC, Itoh M, Carninci P, Forrest ARR, Hayashizaki Y, Lassmann T, The FANTOM Consortium (2014) RECLU: a pipeline to discover reproducible transcriptional start sites and their alternative regulation using capped analysis of gene expression (CAGE). *BMC Genomics.* 2014; 15: 269.

49. Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, Moulton HM, DeJesus P, Che J, Mulder LC, Yanguéz E, Andenmatten D, Pache L, Manicassamy B, Albrecht RA, Gonzalez MG, Nguyen Q, Brass A, Elledge S, White M, Shapira S, Hacohen N, Karlas A, Meyer TF, Shales M, Gatorano A, Johnson JR, Jang G, Johnson

T, Verschueren E, Sanders D, Krogan N, Shaw M, Konig R, Stertz S, Garcia-Sastre A, Chanda SK. Meta- and orthogonal integration of influenza “omics” data defines a role for ubr4 in virus budding. *Cell Host Microbe*. 2015; 18: 723–35.

50. Masaki Suimye Morioka, Hideya Kawaji, Hiromi Nishiyori-Sueki, Mitsuyoshi Murata, Miki Kojima-Ishiyama, Piero Carninci, Masayoshi Itoh. Cap Analysis of Gene Expression (CAGE): A Quantitative and Genome-Wide Assay of Transcription Start Sites. *Methods Mol Biol*. 2020; 2120: 277-301..

51. Nuria Eritija. Novel Three-Dimensional Culture System of Polarized Epithelial Cells to Study Endometrial Carcinogenesis. *Am J Patho*. 2010; 176(6): 2722–2731.

52. Kelly A Whelan, Amanda B Muir, Hiroshi Nakagawa. Esophageal 3D Culture Systems as Modeling Tools in Esophageal Epithelial Pathobiology and Personalized Medicine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018; 5(4): 461-478.

53. Kenna R Mills Shaw, Carolyn N Wrobel, Joan S Brugge. Use of Three-Dimensional Basement Membrane Cultures to Model Oncogene-Induced Changes in Mammary Epithelial Morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004; 9(4): 297-310.

54. Bienkowska-Haba M, Luszczek W, Myers JE, Keiffer TR, DiGiuseppe S, Polk P, Bodily JM, Scott RS, Sapp M. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. *PLoS Pathog.* 2018;14(3): e1006846.