

論文の内容の要旨

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

氏名 馬場聡

序文

子宮頸癌の主な原因は HPV 感染であることがわかっており、子宮頸部異形成 (Cervical Intraepithelial Neoplasia: CIN) を経由して癌化していく。

HPV は約 8000 塩基の環状二本鎖 DNA ウイルスであり、国際がん研究機関 (IARC) の分類では、人に対する発がん性がある Group1 (HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59) が判明している。

HPV16, HPV18 は最も悪性度が高いとされ広く分布しているが、東アジアである本邦では HPV52,58 の頻度が高いことが知られている

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である Markov モデルを適用し、HPV16, HPV18, HPV52/58 において HPV16 は段階的に進展し、HP18 は CIN の段階では発見されにくく、HPV52/58 では CIN の持続感染が多いとした進展の特徴を明らかにしている。HPV18 は HPV16 に比して子宮頸部異形成の期間が短い可能性があり、また 50%程度で腺癌が生じ、予後が悪いことが問題となっている。

HPV のトランスクリプトームと CIN 進展の分子機構であるが、コードされる遺伝子群は初期遺伝子領域 (early promotor に支配される) と後期遺伝子領域 (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。E6 ならびにそのスプライシングにより産生される E6*は癌化に、E1 ならびに E4 から産生される E1^4 はケラチン化に、L1 はカプシド形成に関わるとされる。

また、昨今様々な細胞に対して生体に近い実験系として、スフェロイド培養やマトリゲルを用いた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。また HPV 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。HPV18 の癌化に関しては HPV16 に比して in vivo でも in vitro でも研究が進んでおらず、HPV18 感染前癌細胞の 3 次元細胞培養モデルの確立が求められる。

(本研究の目的)

1、HPV ジェノタイプ毎の管理方法の追求

HPV16, HPV18, HPV52, HPV58 の CIN の進展度毎に、臨床検体を用いて E6/E6*, E1^4, L1 の発現量・陽性率を比較検討しジェノタイプ毎の特徴について追求を行なった。

2、予後不良とされる HPV18 感染細胞の 3 次元細胞培養モデルの確立・特異的な癌進展形式の評価

NIKS 細胞(Immature keratinocytes)に HPV18 ゲノムをトランスフェクションした細胞 (NIKS-HPV18) を用いて、マトリゲル内での 3D 細胞培養モデルを確立し、細胞活性や形態変化の観察、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行なった。

(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。子宮頸癌細胞診異常を認めた 382 人の患者を対象とした。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 HPV16,18,52-58,その他のハイリスク (31,33,35,39,45,51,56,59) ,negative の 6 群に分けて比較検討した。
2. プライマー作成とスタンダードプラスミド作成：E6.E6*, E1^4, L1 のプライマーを作成し、スタンダードにプラスミドを用いてスタンダードカーブを作成した。
3. RNA 抽出と PCR: 全ての RNA は生検検体から抽出され、cDNA に逆転写した。PCR は GAPDH により補正後にコピー数の絶対評価を行なった。(以下の式を用いた : $\text{normalized copy number} = \text{copy number} / 2^{[30 - \text{GAPDH Cp value}]}$)
4. NIKS-HPV18 の 2 次元細胞培養・3 次元細胞培養
pSP73HPV18 を制限酵素処理、切断した HPV18 の DNA を再環状化した。NIKS 細胞に HPV18DNA をトランスフェクションした(NIKS-HPV18)。2 次元細胞培養 (on feeder 培養) では NIKS-HPV18 を不活化した 3T3 細胞上で培養した。3 次元細胞培養ではマトリゲル・コラーゲン IV・VitroGel を用いて培養を行なった。またスフェロイド培養でも細胞形態を観察した。
6. 免疫染色による発現遺伝子の評価：対象とした遺伝子は Ki67、p16 と HPV-E4 とした。
7. CAGE 法、Pathway 解析による発現遺伝子の評価：RNA は RIN (>7.0)、A260/A230 (>1.8) 、A260/A280 (>1.8)を測定し条件を揃えた。Maser analysis tool を用いて、RECLU ver3.4 (RIKEN CLST)にて KEGG pathway 解析 (NIKS、NIKS-HPV18 各々の feeder 2D と Matrigel 3D に対して遺伝子発現量を比較)、更に網羅的遺伝子解析を行った。p < 0.05 かつ 2 倍以上の log fold 変化を edgeR package によって抽出した。
8. HPV18 遺伝子の発現量：PCR を用いて HPV18 の発現量を測定した。
9. 統計学的解析：JMP Pro(13.0.0)を用いた。HPV 毎ないし CIN 進展度を分類し、患者背景には分散分析ないし Steel-Dwass 検定を用い、発現量に関しては Steel-Dwass 検定、陽性率に関しては Cochran-Armitage 検定を用いた。コピー数に関しては 10 コピー/L 以下の検体は陰性とした。P<0.05 を有意差ありとした。

[結果]

1. CIN 患者における HPV のジェノタイプ：382 名の患者のうち、GAPDH の Cp 値が 35 以下の検体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。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)。

2. *E6/E6**の陽性率・発現量：CINの進展毎の検討では、進展に合わせて発現率が有意に増加した ($p<0.01$)。HPV ジェノタイプ毎の発現量の検討では、HPV16 感染において *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 感染についても *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。対象的に HPV52 感染は *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。
3. *E1^4*の陽性率・発現量：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。
4. *L1*の陽性率・発現量：*L1*の発現量は HPV52 感染で有意に多かった ($p<0.05$)。また HPV18 感染では発現が皆無であった。陽性率では HPV52 では 78%、HPV58 では 44%、HPV16 では 31%で陽性であったが、HPV18 では 11%であった。
5. NIKS-HPV18の各培養条件による形態学的変化：スフェロイド培養、Vitrogel 培養、コラーゲンIV培養では細胞集塊の増大はなかったが、マトリゲル培養では増大を認めた。
6. NIKS-HPV18 と NIKS 細胞の比較：On feeder 培養では MTT アッセイを用いて比較検討したところ、細胞活性に差を認めなかった。マトリゲル培養では NIKS-HPV18 が NIKS に比して有意に大きく成長していた ($p<0.05$)。
7. Ki67、p16、E4の免疫染色：NIKS-HPV18にて HPV 由来の E4 が陽性であり、p16 の発現を確認し、NIKS 内での HPV18 の感染を確認した。
8. 遺伝子解析 (KEGGpathway、CAGE)、NIKS-HPV18の遺伝子発現量：前述した条件通りに発現変動遺伝子を抽出し得た。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。遺伝子の発現に関してプロモーターに着目したところ、マトリゲル培養では early promotor がより発現されている傾向が示された。

(考察)

*E6/E6**の陽性率については CINの進展度に合わせて上昇するが、*E1^4* と *L1* の発現率については CINの進展度との相関を認めなかった。このことは 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、*E1^4* や *L1* については進行期に依存せずに HPV ジェノタイプ毎に発現パターンがあることが示唆された。*L1* の発現量について HPV18 でほぼ皆無であった。HPV18 の癌化ではウイルスの複製・増殖が不可欠ではない可能性が示唆された。インテグレーションされた場合に *L1* の発現が失われていくことを踏まえると、HPV18 は CINの早期の段階でインテグレーションが起これ、そのことが早い癌化速度に関与していると考えられる。また *E1^4* の発現低値が腺癌発生の高頻度と関与すると考えられた。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。この事は HPV52 感染の病変では細胞分化を伴う HPV の感染生活史が進展しても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が示唆される。本研究から HPV52 感染患者が CIN の期間が長い事は、高い LI の発現率と関係している可能性があると考えられた。

次に HPV18 感染 NIKS 細胞の 3 次元細胞培養モデルの確立をした。マトリゲル培養では細胞集塊の増大を認めたが、スフェロイド培養・コラーゲンIV培養・VitroGel 培養では増大しなかった。また NIKS-HPV18 では NIKS に比して 2 次元細胞培養では細胞活性は変化しないが、マトリゲル培養では細胞集塊が有意に増大した。更に遺伝子解析により、NIKS-HPV18 のマトリゲル培養では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分かり、網羅的遺伝子解析により HPV における early promotor の発現活性が late promotor に比して相対的に高くなることが確認された。これ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。つまり足場としてラミニンによる細胞外マトリックスを加えることで NIKS 細胞に感染した HPV18 はより生体に近い形で遺伝子を活性化することが示唆された。マトリゲルを用いた 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。今後、特異的な癌進展形式の評価の追求に使用できると考える。