

審査の結果の要旨

氏名 馬場 聡

本研究は子宮頸癌発生段階における 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。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目指したものである。下記の結果を得ている。

1.

*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。*E1^4* 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、*E1^4* 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。

2.

*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 %であった。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。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。

3.

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 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 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う既報と合致する。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。また **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。

本論文の特記すべき点として、*L1* の発現量については HPV18 で発現を認めなかった点が挙げられる。*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 の感染維持にはキャプシド産生を介した 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。これは本研究の結果は、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。

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、遺伝子解析により HPV18 感染細胞の癌化の過程を反映していることを確認している。

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、今後の研究で使用できる可能性があると考えている。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。