

## 博士論文

ハイリスクヒトパピローマウイルス陽性子宮頸癌における  
細胞極性維持蛋白hScribならびに蛋白脱リン酸化酵素Protein  
phosphatase 1 $\gamma$  (PP1 $\gamma$ ) に与えるヒトパピローマウイルスE6  
蛋白の影響の解析

清木 孝之

## 略語一覧

HPV ----- ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus)

PBM ----- PDZ binding motif

JNK ----- c-jun N-terminal kinase

ERK ----- extracellular Signal-regulated Kinase

PP1  $\gamma$ ----- protein phosphatase 1 ガンマ

ATCC ----- American Type Culture Collection

DMEM ----- Dulbecco's Modified Eagle Medium

HRP ----- Horseradish peroxidase

DMSO ----- Dimethyl sulfoxide

siRNA ----- small interfering RNA

siLuc----- ルシフェラーゼ遺伝子(人間の細胞には存在しない)を標的として作成された siRNA

siE6----- E6 遺伝子を標的として作成された siRNA

EMT----- 上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition)

## 目次

要旨.....	5
背景.....	6
1. 子宮頸癌における HPV および、HPV E6 癌蛋白の役割について.....	6
2. ハイリスク HPVE6 癌遺伝子と PDZ ドメイン蛋白の関連について.....	12
3. hScrib の構造とその生理学的機能.....	15
4. hScrib、PP1 $\gamma$ 複合体について.....	17
目的.....	19
方法.....	20
1.細胞培養.....	20
2.ウエスタンブロッティング法.....	20
3.発現ベクターの作成、および精製.....	22
4.GST 融合タンパクを用いた <i>in vitro</i> 結合能アッセイ	
PP1-16E6 の結合試験.....	22
5. <i>In vitro</i> 転写アッセイ.....	22
6.MG132 負荷試験.....	23
7. small interference RNA (siRNA) 法.....	23
8. 蛍光免疫染色法.....	24

9. 子宮頸部病変の免疫組織化学染色法.....	24
結果.....	26
1. 16型HPV E6癌遺伝子によるhScrib-PP1 $\gamma$ 複合体への作用.....	26
2. 16型および18型HPV陽性子宮頸癌培養細胞株におけるhScrib、PP1 $\gamma$ の発 現量および細胞内局在の検討.....	30
3. 16型および18型子宮頸癌組織におけるhScribおよびPP1 $\gamma$ の発現パターン についての検討.....	36
考察.....	41
謝辞.....	45
参考文献.....	46

## 要旨

子宮頸癌の原因とされるハイリスク型ヒトパピローマウイルス (HPV)の持つ E6 癌蛋白は、p53 癌抑制蛋白や細胞極性決定因子 human Scribble (hScrib) などといった PDZ ドメイン蛋白と結合し、これらをユビキチンプロテアソーム依存的分解することで、癌化の一因を作ることが知られている。近年、hScrib は ERK を直接制御することが見いだされ、また細胞増殖の過程でセリン・スレオニン脱リン酸化蛋白の一つである protein phosphatase1  $\gamma$  (PP1 $\gamma$ ) と複合体を形成し、活性化された ERK を制御することがわかった。そのため、hScrib の持つ機能の一部に PP1 $\gamma$  が関与し、発癌過程で大きな役割を持っている可能性が高い。

私は子宮頸癌における hScrib、PP1 $\gamma$  の発現様式、およびハイリスク型 16、18 型 HPV との関連について、分子細胞生物学的検討、および臨床検体を用いた病理学的検討を行った。HPV 陽性子宮頸癌培養細胞株を用いた実験で、16 型 HPVE6 癌蛋白により、hScrib、PP1 $\gamma$  はプロテアソーム依存的な分解をされ、発現レベルが減少していること、さらに PP1 $\gamma$  は核より細胞質へと局在が変化していることを見出した。また病理学的検討においては 16 型 HPV 陽性子宮頸癌では PP1 $\gamma$  の発現低下、および局在の変化が起きていた。以上より、PP1 $\gamma$  が 16 型 HPVE6 癌蛋白の新規標的因子であり、hScrib とともに子宮頸癌の新規バイオマーカーになる可能性を持つ蛋白であると考えられる。

## 背景

### 1. 子宮頸癌におけるHPVおよび、HPV E6癌蛋白の役割について

子宮頸癌は、全世界で年間53万人が発症し約半数が死亡しており、女性の部位別癌死亡率の第3位を占めている (1)。アフリカ、アジアなど発展途上国で特に患者数が多く、予防ワクチンが開発された現在においても、特に妊孕性を有する若年女性の健康を脅かす存在となっている。

子宮頸癌はHPV (human papillomavirus) が引き起こすウイルス発癌であることが知られている。HPVは腫瘍原性ウイルスとされ、ヒトの皮膚あるいは粘膜より感染する。多くの場合、临床上の問題を引き起こすことはなく、宿主免疫応答の結果一過性の感染に終わることがほとんどであるが、感染が持続して何らかの原因でウイルスの生活環に異常を来たすと悪性形質を獲得し、発癌に至ることが知られている。

HPVには100以上のサブタイプの存在が知られている。子宮頸癌を含む悪性腫瘍から検出される群をハイリスクHPV (16型, 18型など) と呼び、尖圭コンジローマなど良性腫瘍から検出される群をローリスクHPV (6型, 11型など) と呼ぶ (2)。ハイリスクHPVが引き起こす疾患のうち最も解明が進んでいるのが子宮頸癌であり、子宮頸部異形成を前癌状態とする多段階発癌メカニズムが提唱されている。

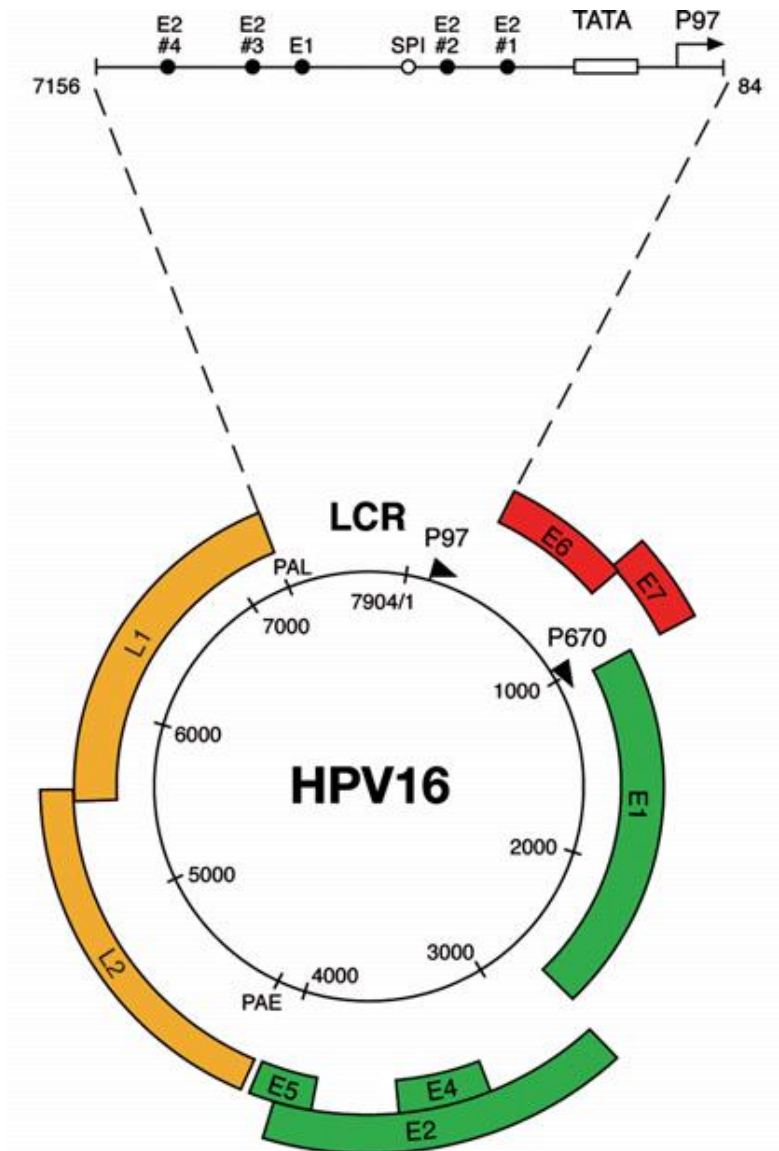
HPV は、約 8,000 塩基対からなる環状二本鎖 DNA ウイルスであり、HPV のゲノム構造は、初期遺伝子領域 (E1, E2, E4, E5, E6, E7) と後期遺伝子領域 (L1, L2)、そしてこの他に、制御領域である long control region (LCR) が存在する (3) (図 1)。子宮頸癌発癌メカニズムを図示する (図 2)。HPV の生活環は上皮内のみで完結することが知られている。宿主の皮膚や粘膜の微細な傷から侵入して重層扁平上皮の基底細胞にまず感染し、この核内にて 50-100 コピー程度の HPV ゲノムが複製され、episomal state と呼ばれるヒトとウイルスのゲノムが共存する状態となる。この基底細胞内ではウイルスはほとんど複製することなく、長期に渡って「潜伏感染可能な状態」となっている。この間、感染細胞が最終分化を開始し上層へと移行するに伴ってウイルス遺伝子発現が増加し、増殖感染 (proliferative infection) の状態になる。どのウイルス遺伝子が発現するかは扁平上皮の分化 (縦方向) に依存して変化し、例えば傍基底細胞では、E6, E7 が発現し細胞の増殖を促進させる。中間層では、E1, E2 がウイルスゲノムの複製を促す。表層近くなると、同時にウイルスキャプシドを形成する構造蛋白質 L1, L2 が発現し、L1/L2 キャプシドがウイルスゲノムを包埋して新しいウイルス粒子が完成し、重層扁平上皮の剥離とともにウイルスが腔内へと放出され、感染が広がっていく。このように、HPV は血管のない粘膜上皮内にて初めて形成されるため、粘膜下や血管に感染・侵入することはない。そのためウイルス血

症にはならず宿主による免疫排除も受けにくく、その生活環を長期間に渡って維持出来るシステムを有している。更に、この持続感染過程の中で、ウイルス DNA がヒトの染色体への組み込まれると (integration)、ウイルス粒子形成は起こらなくなり、E6, E7 遺伝子の恒常的な過剰発現が起こることが知られている。この E6, E7 遺伝子は癌遺伝子として知られており、これらがドライバーとなって、宿主の p53, RB といった癌抑制遺伝子や、テロメラーゼの活性化、細胞極性決定因子である hScrib, hDlg をはじめとする PDZ ドメイン蛋白を分解してその機能を喪失させることにより最終的に染色体不安定を引き起こす結果、悪性形質を獲得し、子宮頸癌発癌に至ることが明らかになっている (4)。

ハイリスクHPV E6癌遺伝子は、宿主の様々な蛋白を制御し、その多くをユビキチン-プロテアソームシステムを介した分解へ誘導する (4-6)。E6癌遺伝子の標的となる蛋白は、p53、またhScrib、hDlg、MAGIなどといったPDZドメイン蛋白、そして、hTERTの抑制因子として細胞寿命を調節するNFX1-91、アポトーシス誘導に関わるBakなどが、プロテアソーム依存的分解、もしくは不活化されることが証明されており、発癌過程における様々な段階での役割をそれぞれが担っているとされる (5) (7-12) (図3)。



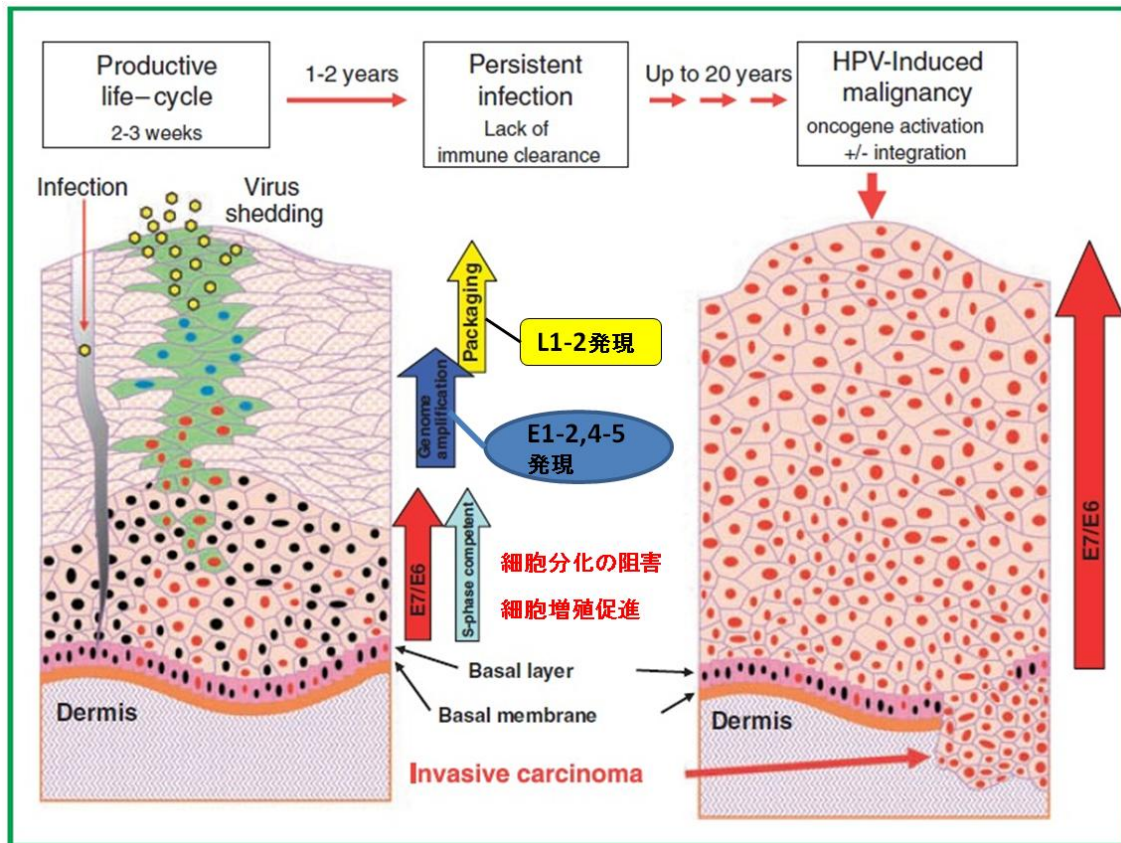
図1 16型HPVの構造図



(文献3より抜粋)

16型 HPV の環状エピゾームのモデルである。HPV は約 8kbp からなる小型の環状 2 本鎖ウイルスで、おもに分裂、増幅に携わる Early gene (E1-E7) と外殻を形成する Late Gene (L1,L2) をそれぞれコードしている。E6 と E1 の手前にそれぞれプロモーター(p97, p670)を有している。さらに p97 以前には Long Control Resion (LCR)が存在し、E1、E2 の結合ドメインを有しており、これらの部位が各遺伝子の発現調節を可能にしている。

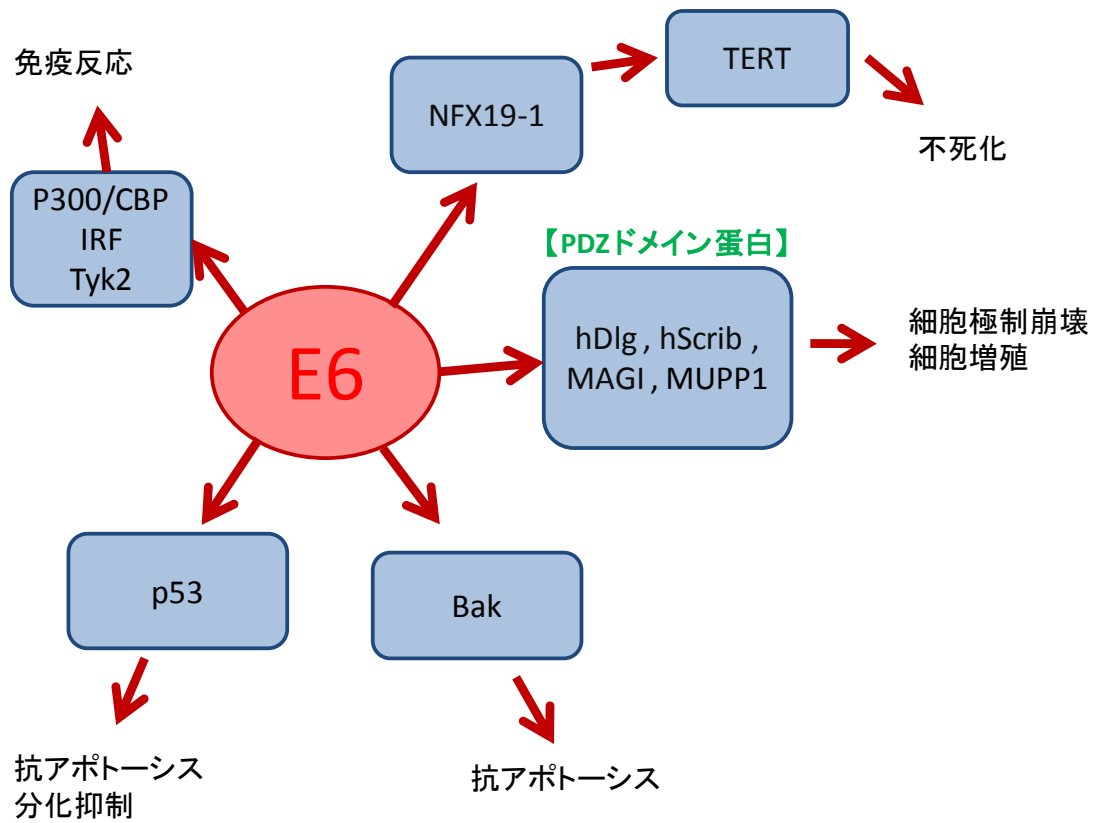
図 2 HPV 感染による子宮頸癌発癌メカニズム



(文献 13 より抜粋及び一部改編)

HPV は子宮頸部上皮の微細な傷から侵入し、基底膜へ感染する。そして、まず E6 および E7 遺伝子を発現させる。これにより合成された E6、E7 蛋白は細胞分化を阻害し、細胞増殖能を増加させる。かくして基底層より表層においても未分化で増殖能のある細胞が残存できる状態となり、この間にゲノム複製に関わる E1、E2 および E4、E5 蛋白が発現、つづいて外殻形成蛋白である L1、L2 が発現し、最終的に上皮表層で増殖した HPV が散布される。この過程が長期間持続することで頸管上皮細胞の形質が過剰に変化し、発癌をおこす。

図 3 標的蛋白を介した HPVE6 の細胞内における働き



E6 は様々な分子を標的とし、細胞内のシグナル伝達を制御する。ハイリスク HPV の持つ E6 蛋白は p53、PDZ ドメイン蛋白などと結合し、プロテアソーム依存的分解を起こすことで発癌過程における様々な役割を担っている。

## 2. ハイリスクHPV E6癌遺伝子とPDZドメイン蛋白の関連について

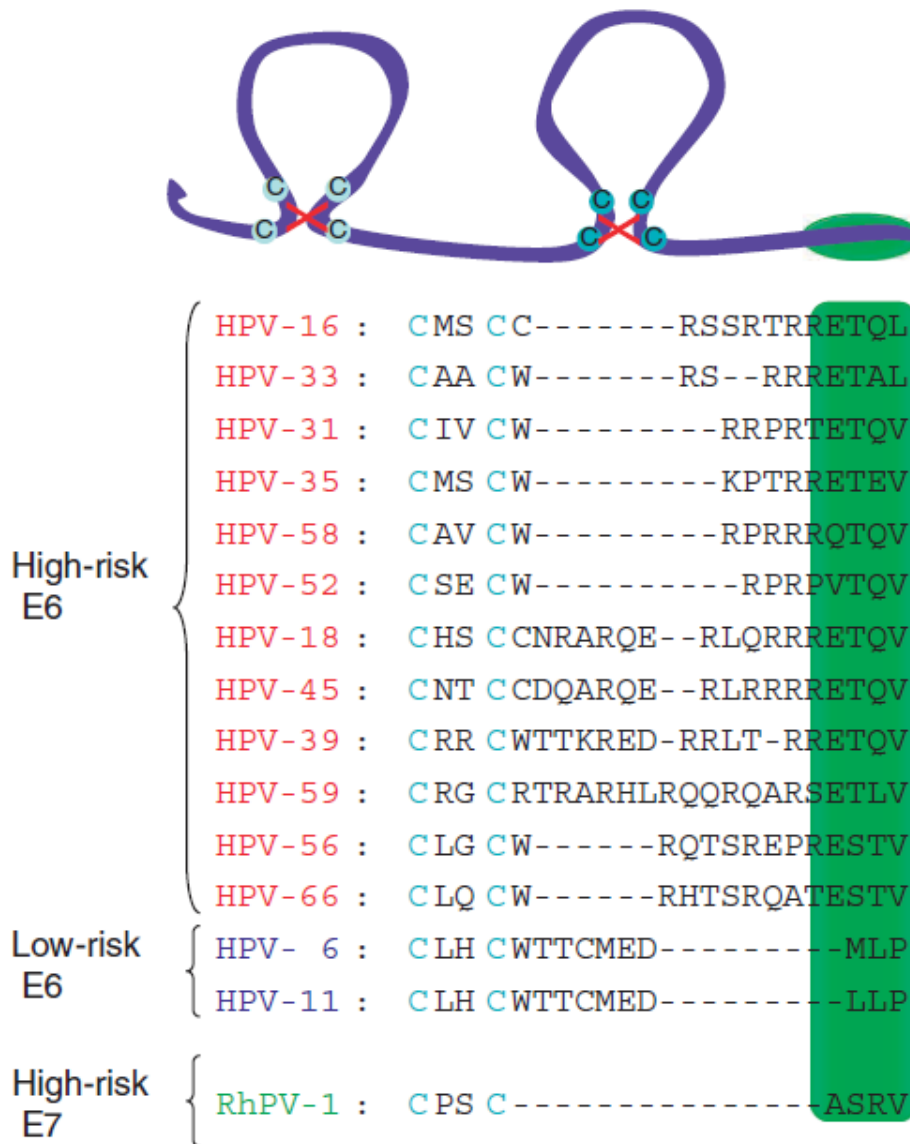
PDZドメイン蛋白の持つPDZドメインは約80~90アミノ酸配列から構成されており、ドメイン内に持つ結合ポケットを介して蛋白間連携の足場となって機能を発揮する蛋白である。細胞骨格のネットワーク形成、細胞表層からのシグナル伝達などを様々な機能を持っている。このドメインを有する、PSD-95、Dlg、ZO-1のそれぞれの頭文字をとってPDZドメイン蛋白と名づけられており、現在までに数千種類のPDZドメイン蛋白が同定されている (14) (15)。

子宮頸癌の発癌過程において、E6あるいはE7癌遺伝子が、p53や、pRBを標的とし制御をすることは重要であるが、子宮頸癌では、一般的な癌と異なり、p53遺伝子の変異は、0~6% と頻度が非常に低いことが知られている。E6癌遺伝子はE7癌遺伝子とともに、ヒトの初代角化細胞に導入すると、ヒトの角化細胞を不死化させる機能をもつ。E6癌蛋白の変異体を作製したところ、p53は分解するが、細胞の不死能を失った変異体があった。このことは子宮頸癌の発生において、p53以外に重要なターゲットをE6癌蛋白が持つ可能性を示唆している。

ハイリスクHPVの持つE6癌蛋白のアミノ酸配列のC末端には、class1 PDZドメイン結合配列 (PBM) と呼ばれる、x-T/S-x-L/V-COOH配列(スレオニン/セリン-不特定のアミノ酸-ロイシン/バリン)があり (図4)、興味深いことに、このclass1 PBMは、ハイリスクHPV E6遺伝子間で共通に保存されており、6型および11型と

いったローリスクHPVでは認められない。また、ハイリスクHPVE6癌遺伝子は、このPBMを介して、hScribや、hDlgなどのPDZドメイン蛋白を、プロテアソーム依存的分解の標的にすることがわかった (16) (17)。その他、E6の標的となるPDZドメイン蛋白は、現在知られている限りでも10種以上に及んでいる (16)。これらの多くは細胞極性や細胞接着の制御、細胞内シグナル伝達や細胞増殖などに関与していることが知られており、その意義についての研究が進んでいる (表1)。

図 4 HPVE6 癌遺伝子の C 末端配列について



(参考文献 13 より抜粋。)

ハイリスク HPVE6 遺伝子配列の C 末端には PDZ ドメイン 結合配列 (PBM) が存在する。配列はハイリスク HPV の中でも、それぞれに結合性の高い分子が存在する。これまでの研究により hScrib は、18 型 HPVE6 遺伝子配列の C 末端 (ETQV) より 16 型の C 末端配列にある ETQL により強い結合を示すことが生化学的検討により証明されている。

表 1 ハイリスク HPVE6 癌遺伝子の標的となる PDZ ドメイン蛋白について

PDZ-containing Targets of Papillomavirus Oncoproteins			
PROTEIN	FUNCTION	EFFECT ON TARGET PROTEIN	REFERENCE
Dlg	Cell polarity/tumour suppressor	ubiquitination and proteasomal degradation	Gardiol <i>et al.</i> (1999)
Scribble	Cell polarity/tumour suppressor	ubiquitination and proteasomal degradation	Nakagawa and Huijbregtse (2000)
MAGI-1 MAGI-2 MAGI-3	Cell polarity/tumour suppressor PTEN localisation to membrane	ubiquitination and proteasomal degradation	Glaunsinger <i>et al.</i> (2000) Thomas <i>et al.</i> (2002)
MUPP1	Signalling complex scaffold	ubiquitination and proteasomal degradation	Lee <i>et al.</i> (2000)
PATJ	TJ formation and integrity	ubiquitination and proteasomal degradation plus E6 <sup>+</sup> -directed degradation	Latorre <i>et al.</i> (2005) Storrs and Silverstein (2007)
PSD95	Signalling complex scaffold	ubiquitination and proteasomal degradation	Handa <i>et al.</i> (2007)
PTPH1/ PTPN3	Protein tyrosine phosphatase	ubiquitination and proteasomal degradation	Jing <i>et al.</i> (2007) Töpfer <i>et al.</i> (2007)
PTPN13	Non-receptor phosphatase	?	Spanos <i>et al.</i> (2008b)
TIP-1	Down regulator of PDZ interactions	?	Hampson <i>et al.</i> (2004)
TIP-2/GIPC	TGFβ signalling	ubiquitination and proteasomal degradation	Favre-Borvin <i>et al.</i> (2005)
CAL	Intracellular trafficking	ubiquitination and proteasomal degradation	Jeong <i>et al.</i> (2007)
PAR3	Cell polarity/tumour suppressor	ubiquitination and proteasomal degradation plus relocalisation	Tomaić <i>et al.</i> (2008)

(参考文献 13 より抜粋)

ハイリスク HPVE6 癌遺伝子の標的となる PDZ ドメイン蛋白は、hDlg1、hScrib、MAGI-1 などが知られている。これらの多くは、細胞極性、細胞接着、細胞増殖などのシグナル伝達を制御する遺伝子であることが報告されている。

### 3. hScrib の構造とその生理学的機能

hScrib はショウジョウバエにおける癌抑制遺伝子として知られる scribble の相同遺伝子産物であり、分子量 175kDa の蛋白である。hDlg1、Hug1/2 と共に Scribble 複合体を作り、極性維持、細胞接着の制御を行い、細胞外からのシグナル伝達に寄与しているとされる (13)。

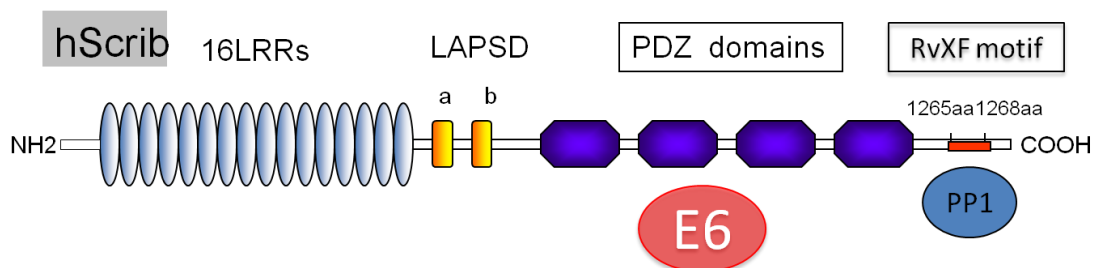
hScrib の蛋白構造を図示する (図 5)。hScrib は LAP (LRRs and PDZ) 蛋白質の

中の一つであり、その遺伝子配列の N 末端側に 16 個の Leucine-rich repeat (LRR) および LAP-specific domain (LAPSD) を含み、主に細胞膜に局在する事が知られている (18)。また、hScrib の遺伝子配列の C 末側には、ERK と直接結合する、KIM(kinase interaction motif) (19) 、および Protein phosphatase 1 (PP1) と結合し得る RVxF 配列などが確認され、報告されている (20)。

hScrib の持つ機能はこれまでに、細胞極性因子として Par 複合体、Crumb 複合体と協調し、細胞極性を保つほかに、E-cadherin などの細胞膜に発現する蛋白とともに、細胞接着を制御するがわかってきた (21-23)。

また、hScrib は JNK、ERK 経路をともに制御しており、ジョウジョウバエを用いた実験では、Scribble を細胞内でノックダウンすることで ERK、JNK 系路が活性化するほか、特に Ras の変異下では、Scribble がノックダウンされると細胞増殖、浸潤能、遊走能を獲得することが明らかになっている (24-28)。

図 5 hScrib のドメイン構造図



配列の N 末端側に 16 個の LRR および、LAPSD を含み、4 つの PDZ ドメインを持つ。ハイリスク型 HPV E6 遺伝子は PDZ ドメインを介して結合し、また、PP1 $\gamma$  は、配列の C 末端にある、RVxF 配列を介して結合する。

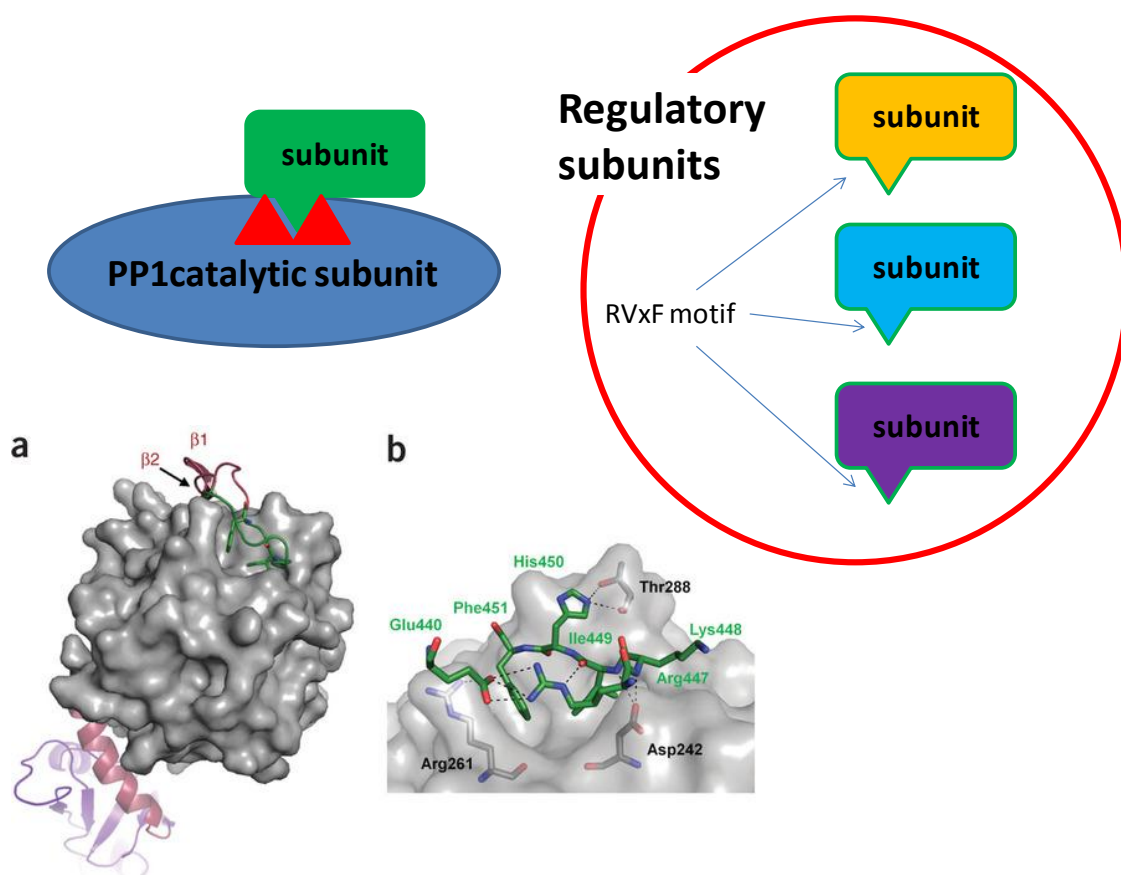


#### 4. hScrib - PP1 $\gamma$ 複合体について

近年、hScrib が ERK と KIM 配列を介して直接結合し、その活性を負に制御すること(脱リン酸化)がわかったが、どのようにして活性化された ERK を失活化させるのかは hScrib 自体に脱リン酸化をさせる機能は持ち得ていないため、未だ解明されていなかった (19)。

長阪らは、仮説として、hScrib が他因子を介して ERK の脱リン酸化を行っていると考え、hScrib に結合し得る因子を網羅的質量分析の手法を用いて、解析を行った。その結果、hScrib と結合し得る蛋白として、protein phosphatase1 $\gamma$  (PP1 $\gamma$ ) を同定した (20)。PP1 は 3 種のアイソフォーム (PP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) があり、おののお各 regulatory subunit を形成することで、それぞれの細胞内局在や、活性能を制御する。そして、主に核内にて細胞周期を制御する蛋白などに対する、脱リン酸化蛋白としての役割を果たし、regulatory subunit に存在する RVxF 配列を介して特異的に相互作用をされている (図 6)。RVxF 配列は、{K or R or H or N}. {S or V or I or L}. X. {F or W or Y} である (29)。hScrib は、RVxF 配列を介して、PP1  $\gamma$  と結合し、複合体を形成することで、ERK 経路を負に制御し、細胞増殖抑制をおこすことが見い出されている (20)。

図 6 PP1 の作用機構について



(上段) PP1 は RVxF 配列を介して、subunit を制御し、細胞内局在や、活性能を調節している。(下段 a, b) PP1 の RVxF 配列についての立体模式図である (文献 30 より抜粋)。灰色の構造は PP1 であり、その中の RVxF 配列はポケット構造となって subunit である蛋白 (緑色) と結合することで機能を発揮する。

## 目的

ハイリスク型 HPVE6 癌遺伝子の hScrib、PP1 $\gamma$  を制御するメカニズムを検討する

ハイリスク型 HPVE6 癌遺伝子は、様々な蛋白を標的とし、制御することが証明されている。その中で、PDZ ドメイン蛋白である、hScrib および、hScrib と複合体になり得る PP1 $\gamma$  の発癌過程における機能を解析することは、子宮頸癌発癌メカニズムを理解する上で重要である。

そこで私は、ハイリスク型である 16 型および 18 型 HPVE6 癌遺伝子による hScrib および、PP1 $\gamma$  の作用機序を解明するべく、以下の 3 つ検討を行った、

- 1.in vitro 下での各蛋白間の相互作用について
- 2.子宮頸部由来培養細胞を用いた細胞内発現および局在について
- 3.臨床検体を用いたそれぞれの遺伝子の病理学的検討について

## 方法

### 1. 細胞培養

HPV 陽性子宮頸部由来細胞株 (CaSki 細胞, HeLa 細胞)、HEK293 細胞 (胎児腎由来細胞株)、HaCaT 細胞 (ヒト上皮ケラチノサイト由来細胞株) を、それぞれ ATCC (American Type Culture Collection) から購入、細胞は全て、10% Fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液で、5%CO<sub>2</sub> 下 37°C のインキュベーター内で培養した。細胞は、トリプシン処理後に回収、あるいは PBS 溶液で洗浄後、ディッシュスクレイパーを用いて細胞を回収し、その上で、細胞は 1200rpm、4 分間の遠心分離処置を行い、細胞ペレットとして回収し実験に使用した。

### 2. ウェスタンブロッティング法

回収された細胞からの蛋白抽出には、TNE buffer (0.1% Tris-HCL, 10% NP-40, 150mM NaCl, 1mM EDTA) に proteinase inhibitor cocktail (Roche) を添加して行った。その後、短時間、細胞を超音波破碎、さらに 5000rpm、20 分の遠心処理を行い、その上清を抽出して実験に用いた。各蛋白濃度は Brad ford assay (Bio-Rad) によって定量化した。

また、細胞分画には、Calbiochem 社の ProteoExtract Fractionation Kit (Calbiochem)

を用い、標準化されたプロトコールに従って、細胞分画ごとの蛋白を抽出した。

ウエスタンブロッティング法は、蛋白抽出液に SDS サンプルバッファー添加し、95°Cで5分間加熱後、同量の各蛋白抽出液を SDS-PAGE にて分画し、Hybond ECL PVDF 膜 (Amersham Bioscience) に転写を行った。ブロッキング及び、1、2次抗体の溶媒には 2% ECL prime blocking reagent (GE healthcare Life Sciences) (0.5% Tween 20 に溶解) を用いた。転写後、各抗体をプローブし、その後 0.5% Tween 20 にて転写された膜を十分に洗浄後、各蛋白発現は、ECL 検出試薬 (GE healthcare Life Sciences) と ImageQuantLAS4000 検出システムを用いて検出をした。

使用した1次抗体は、抗 hScrib 抗体 (C-20、Santacruz 社 200倍希釈)、抗 PP1 $\gamma$  抗体 (Santacruz 社 200倍希釈)、抗 p53 抗体 (DO-1、Santacruz 社 500倍希釈)、抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signalling 社 3000倍希釈)、活性化型抗 ERK 抗体 (Cell Signalling 社 3000倍希釈)、また実験のローディングコントロールとして抗 alpha-tubulin 抗体 (abcam 社 1000倍希釈)、抗 E-cadherin 抗体 (Cell Signalling 社 500倍希釈)、抗 p84 抗体 (abcam 社 1000倍希釈)、抗 vimentin 抗体 (abcam 社 1000倍希釈) を使用した。また、2次抗体には HRP 標識抗マウス、HRP 標識抗ウサギモノクローナル抗体 (GE healthcare Life Sciences 社それぞれ 25000倍希釈)、HRP 抗ヒツジポリクローナル抗体 (Zymed 社 25000倍希釈) を使用した。

### 3. 発現ベクターの作成、および精製

HPV16 型 E6 癌遺伝子および、ミュータジェネシスの手法で配列の C 末端にある PDZ ドメイン結合配列 (TQL) を欠失させた 16 型 E6 遺伝子  $\Delta$ PDZ (HPV16E6 $\Delta$ PDZ) を作成し、pcDNA (invitrogen)、pGEX6P-1 (Amersham) それぞれにこの領域の cDNA をサブクローニングし、pcDNA16E6、pcDNA16E6 $\Delta$ PDZ、pGEX (GST) 16E6 ベクターを作成した。作成したベクターはそれぞれ、Qiagen plasmid midi kit (Qiagen) を用いて精製をし、pH7.5 Tris-HCl 溶液または超純水に溶解して、保存した。

### 4. GST 融合蛋白を用いた *in vitro* 結合能アッセイ

GST および、GST-16E6 融合蛋白は、それぞれのベクターを含む大腸菌溶解液から抽出、さらに抽出液からグルタチオンセファロース 4B ビーズ (GE healthcare Life Sciences) にて蛋白を回収し、精製をした。次に、PBS に溶解した PP1 $\gamma$  精製蛋白 (Santacruz 社 sc-4291) および、GST、GST-16E6 融合蛋白を混合し、4°C 下で 2 時間震盪させ、沈殿物を PBS にて 4 回洗浄した。回収された蛋白は、ウェスタンブロット法にて解析をした。

### 5. *In vitro* 転写アッセイ

Promega TNT kit Rabbit-Retuculocyte lysate system (Promega社) を用いて、プロト

コールに従い、 $[^{35}\text{S}]$ -Methionine (Amersham社) でラベリングしたp53 (ポジティブコントロールとして使用)、さらに16E6蛋白、PP1 $\gamma$ 蛋白を作成し、それぞれの蛋白精製を行った。p53およびPP1 $\gamma$ を16E6と30°C下で反応させた後に、回収されたサンプルを精製した後、SDS-PAGEで解析をした。

## 6. MG132 負荷試験

プロテアソーム阻害剤である MG132 (N-CBZ-Leu-Leu-Leu-al, Sigma-Aldrich 社) を DMSO に溶解し、培養液中に濃度 10 $\mu\text{M}$  となるようにして細胞培養液に添加、その 6 時間後に細胞を回収した。

## 7. small interference RNA (siRNA) 法

16 型 E6 に対する siRNA (UUAAAUGACAGCUCAGAGG)、18 型 E6 に対する siRNA (CAUUUACCAGCCCGACGAG) は外注で合成を依頼した (ファスマックジャパン社)。これらの配列は既報の文献より引用をした (31)。また、これらのコントロールには Luciferase に対する siRNA (siLuc) を使用した。

HPV 陽性子宮頸癌培養細胞株は 6cm ディッシュにて培養をし、50-60% confluent の状態で、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションにて上記の siRNA を導入し、トランスフェクション後 48 時間に、各サンプルの蛋白全量、および細胞分画された後に、蛋白回収した。

回収した蛋白はウェスタンブロット法にて解析した。各実験は3回以上施行し、各蛋白の発現レベルを Adobe Photoshop ソフトを用い、定量化し、その平均を以てヒストグラムを作成した。なお、今回は定量化データに対し統計学的検討は行っていない。

## 8. 蛍光免疫染色法

カバースリップ上で培養し、上記のとおり siRNA 導入を行い作成した 16E6 ノックダウン CaSki 細胞を PBS にて3回洗浄し、3.7%ホルマリン溶液で室温下30分浸し、固定した。さらに PBS で再洗浄後、PBS/0.1% Triton に5分浸し、透過処理を行い、1次抗体を1時間処理し、洗浄後に2次抗体で処理を行い、さらに洗浄後、マウントガラスによる封入処理を行った。完成したサンプルは、コンフォーカル顕微鏡 (Zeiss Axiovert 100M microscope attached to LSM 510 confocal unit) にて観察し、細胞内局在の検討を行った。

## 9. 子宮頸部病変の免疫組織化学染色法

正常子宮頸部組織および子宮頸部病変は、文書によるインフォームドコンセントの後、倫理委員会のガイドラインの元で東京大学医学部附属病院にて子宮頸部病変をもつ患者より採取を行った。今回検討した症例は、HPV-DNA 検査にて



16型、および18型単独陽性と判定された子宮頸癌検体24例（FIGO stage 1b）と、正常子宮頸部検体8例に対して、免疫組織化学染色を行った。

ホルマリン固定パラフィン封入された組織を0.5 $\mu$ m単位で薄切処理をし、自動免疫組織染色システム（BenchMark XT; Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA）を用いて自動免疫染色を行った。1次抗体には抗hScrib抗体（C-20、Santacruz社100倍希釈）、抗PP1 $\gamma$ /PPP1CC抗体（Lifespan bioscience社200倍希釈）、2次抗体にはHRP標識抗体（Zymed社）を使用した。なお、ネガティブコントロールの評価を行った後に、病理医のもとで、発現パターンの観察を行った。

## 結果

### 1. 16 型 HPV E6 癌遺伝子による hScrib-PP1 $\gamma$ 複合体への作用

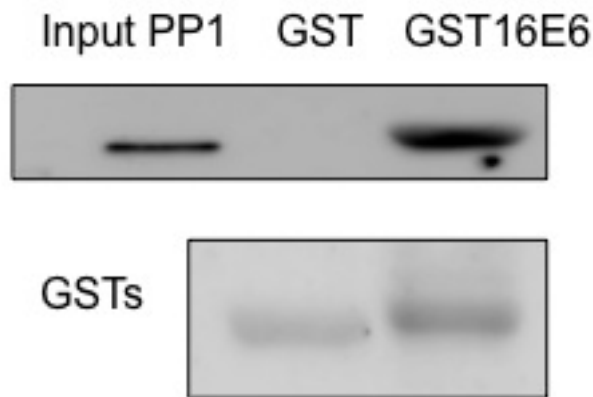
HPV16E6 癌蛋白と PP1 $\gamma$  について直接作用を検証すべく、GST プルダウンアッセイを行い、蛋白結合能の検討を行った。その結果、*in vitro* 下では、16E6 と PP1 $\gamma$  が直接結合することを確認した (図 7)。次に E6 が、PP1 $\gamma$  に与える作用を観察するため、*In vitro* 下転写アッセイにて作成され、それぞれラベル化された蛋白を混合したところ、16E6 と p53 を混合したサンプルでは時間依存的に p53 の分解が認められたが、16E6 と PP1 $\gamma$  と混合したサンプルでは PP1 $\gamma$  はポジティブコントロールである p53 のように時間依存的に分解されなかった (図 8)。すなわち、16E6 と PP1 $\gamma$  は直接結合をし得ると考えられるが、E6 による PP1 $\gamma$  に対する分解能は *in vitro* 下ではあまり強くなく、これらの蛋白はお互い直接結合するが、既存の考察とは異なったメカニズムが存在する可能性があると考えた。

次に、細胞内における 16 型 E6 遺伝子による hScrib-PP1 $\gamma$  複合体への作用を検討した。まず、HEK293 細胞に 16E6 をトランスフェクション法で導入し、それぞれの蛋白の発現レベルの検討を行った (図 9)。その結果、wild type の 16 型 E6 癌蛋白では導入遺伝子量依存的に hScrib の発現量が減少し、それとともに hScrib が直接作用する活性型 ERK の発現量が増加した。このことは、hScrib と ERK は直接リンクをしている可能性を示している。一方で、16 型 E6 癌蛋白の持つ PBM

を失活させた 16E6 $\Delta$ PDZ 蛋白を細胞内に導入すると、結合し作用することのできない hScrib の蛋白発現量は変化しないが、活性型 ERK の発現量は増加することがわかった。このことは、PBM 非依存的に E6 と作用する因子が ERK 制御に関わっていることを示唆している。一方で、PP1 $\gamma$  の発現量は PBM 非依存的に減少していた。即ち、この結果は 16 型 E6 癌蛋白は hScrib と PBM を介して作用するが、同時に PP1 $\gamma$  と直接結合し、お互いがそれぞれ独立して作用し、ERK 系路を制御していることを示唆している。これらの検討により、16 型 E6 癌蛋白は hScrib だけでなく、その結合蛋白である PP1 $\gamma$  と直接結合し、標的とし、作用することがわかった。

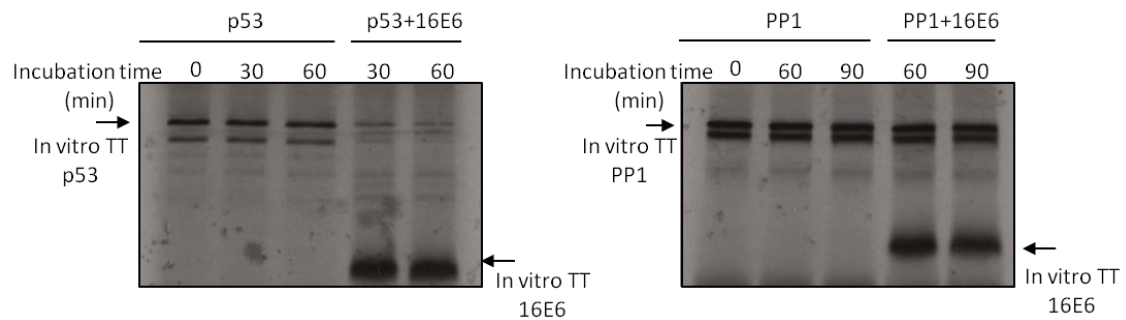
次に HEK293 に pcDNAHPV16E6 ベクターを導入し、培養後、プロテアソーム阻害剤 MG132 を添加し、細胞内の蛋白発現を確認した (図 10)。16E6 強制発現時には上記実験と同じく hScrib と PP1 の減衰が認められたが、MG132 添加によって、双方の再発現が見られた。このことから、16E6 による PP1 $\gamma$  減弱は PBM を介さないが、プロテアソーム依存的分解に起因する事がわかった。

図7 HPV16E6 と PP1 $\gamma$  は結合する (GST16E6 によるプルダウンアッセイ)



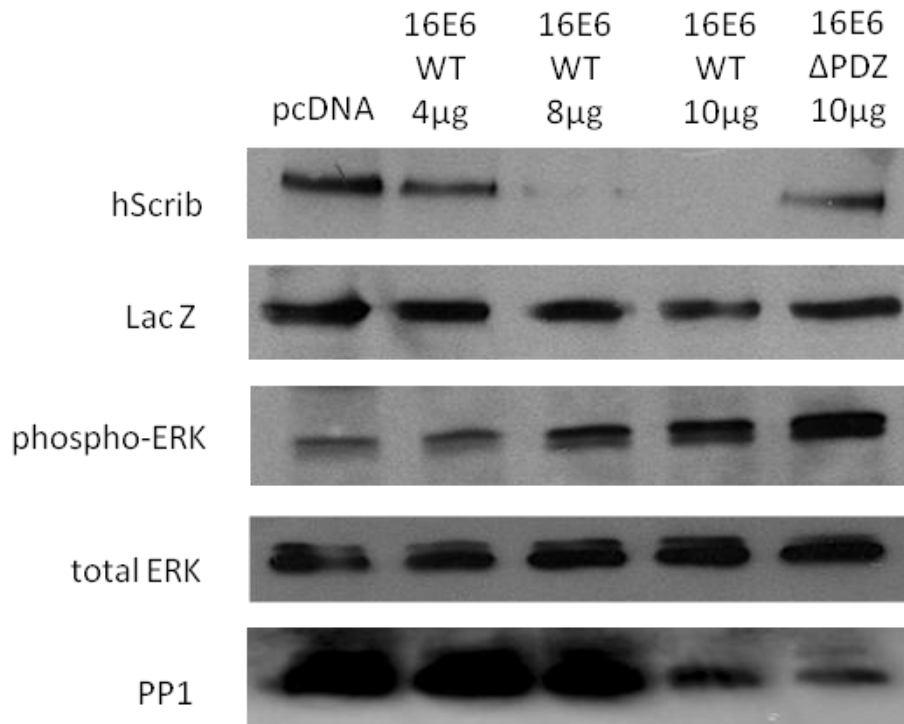
GST-16E6 融合蛋白を精製し、GST プルダウンアッセイを行った。左レーンは input としての PP1 $\gamma$  を示している、中レーンは GST のみを用いてインキュベートしたもの (Negative control) 、右レーンが GST-16E6 で PP1 $\gamma$  をインキュベートしたものである。GST16E6 と PP1 $\gamma$  が直接結合し得ることがわかった。

図8 co-incubation による PP1 $\gamma$  と 16E6 の分解反応試験



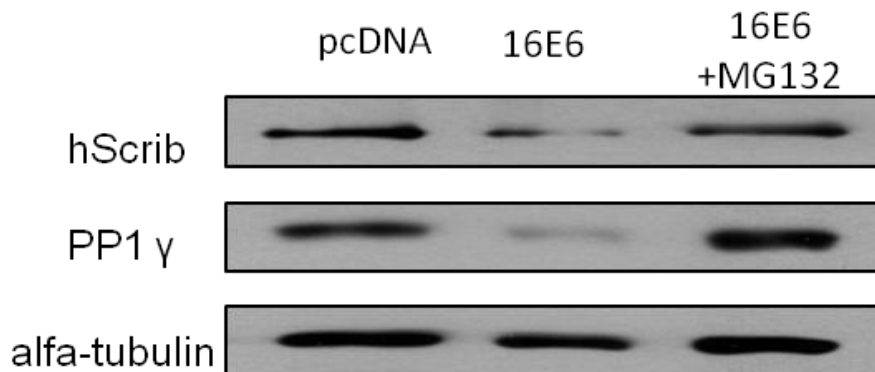
左は p53 と 16E6 を混合したもの (positive control) で、右は PP1 $\gamma$  と 16E6 を混合し、作用を検討したものである。In vitro 下では、16E6 の PP1 $\gamma$  に対する分解能は弱いことがわかった。

図9 16型E6癌蛋白はhScribおよびPP1 $\gamma$ にそれぞれ作用し、PBM非依存的にERKを活性化する



HEK293細胞に16E6をトランスフェクション法で導入し、それぞれの蛋白の発現レベルの検討を行った。左からpcDNA(Negative control)、wild type16E6(4 $\mu$ g/dish)、(8 $\mu$ g/dish)、(10 $\mu$ g/dish)、右端はPBMをmutationさせた16E6 $\Delta$ PDZ(10 $\mu$ g/dish)である。16型E6癌蛋白はPBM依存的にhScribを制御、PBM非依存的にPP1 $\gamma$ を制御し、またERKを活性化している。

図 10 MG132 負荷試験



pcDNAHPV16E6 遺伝子を HEK293 細胞にトランスフェクション法で導入をし、培養後、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加した。左は pcDNA (Negative control)、中軸は Wild type の 16E6 遺伝子を導入した細胞、右軸は 16E6 遺伝子を導入後、細胞に MG132 を添加したものである。16E6 を遺伝子導入することで、hScrib と PP1 の発現量の減少が認められたが、MG132 添加によって、プロテアソーム依存的分解作用が阻害され、それぞれ発現は回復した。

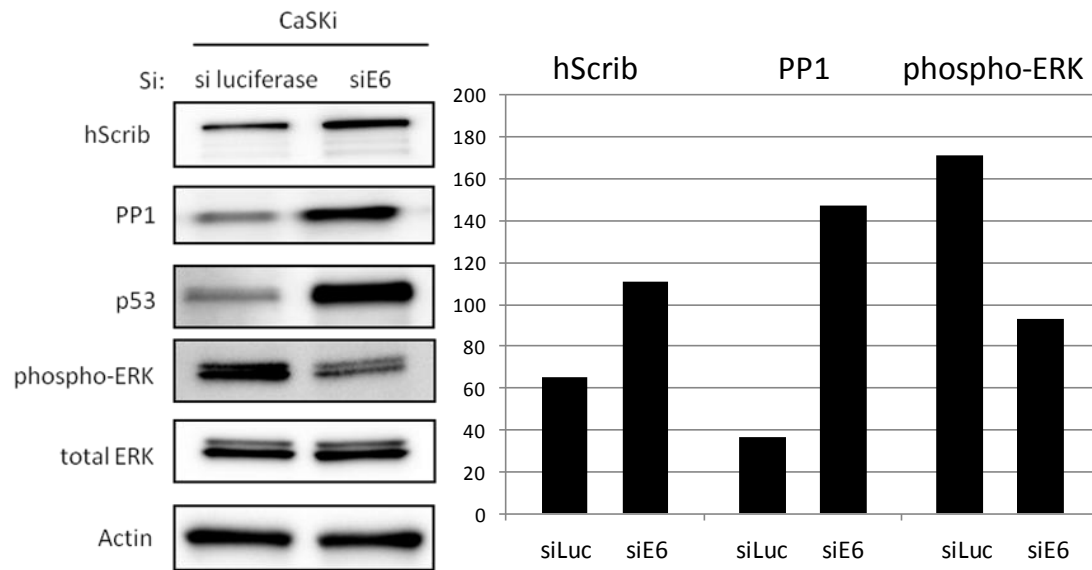
## 2. 16 型および 18 型 HPV 陽性子宮頸癌培養細胞株における hScrib、PP1 $\gamma$ の発現量および細胞内局在の検討

HPV 陽性子宮頸癌培養細胞株における hScrib、PP1 $\gamma$  発現量およびの細胞内局在について検討を行った。16 型 HPV 陽性子宮頸癌培養株の CaSki 細胞に対して siRNA 法で E6 蛋白をノックダウンさせると、hScrib および PP1 $\gamma$  の発現量が増加することがわかった (図 11)。また、これらの細胞を蛍光免疫染色法を用いて、確認した所、E6 ノックダウン下で核内 PP1 $\gamma$  の増加が認められた (図 12)。

次に、細胞内局在の変化を検討するべく、siRNA 法でコントロールとして siLuc

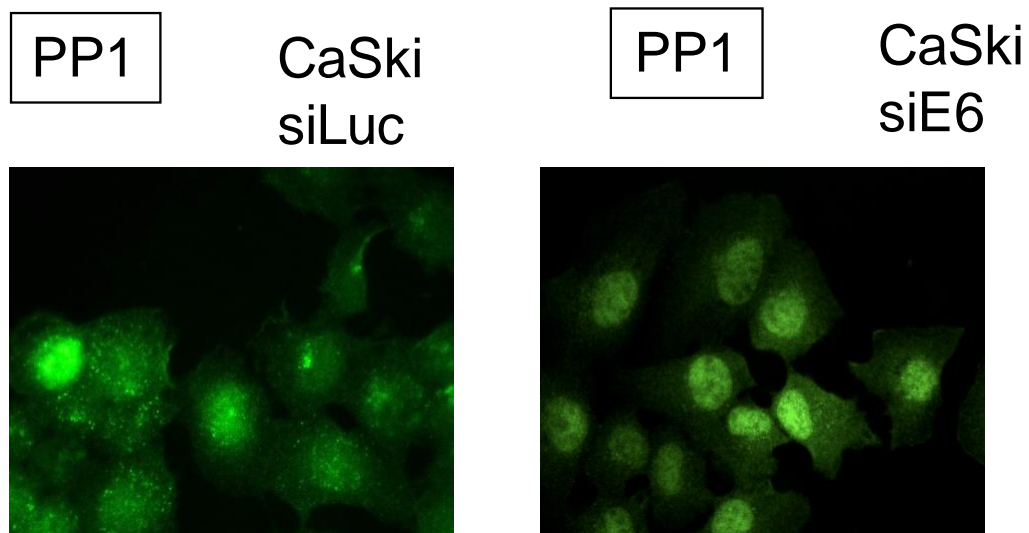
を導入した CaSki 細胞、および E6 癌蛋白をノックダウンされた CaSki 細胞をそれぞれ、細胞分画法にての各分画の蛋白抽出を行い、ウエスタンブロッティング法で検討を行った(図 13)。細胞分画は、プロトコールに従い 4 つの分画に分けられ、F1 が細胞質、F2 が細胞膜、F3 が核、F4 が細胞骨格となる様それぞれ分けて蛋白抽出をした。非 HPV 感染細胞である HaCaT における hScrib、PP1 $\gamma$  の細胞内発現量を局在別にウエスタンブロッティング法で検討、また蛍光免疫染色法でも検討をした図を示す (図 14)。上皮細胞では hScrib は細胞膜、PP1 $\gamma$  は主に核に発現するとされるが、HPV 陽性培養細胞株である CaSki 細胞においては、それぞれの発現パターンは大きく変化しているのがわかる。しかしながら、siRNA 法にて 16 型 E6 癌蛋白をノックダウンさせると、hScrib、PP1 $\gamma$  は共に HaCaT 細胞と同様な細胞内局在を示していることがわかった。一方で、18 型 HPV 陽性子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞においては、16 型 HPV 陽性 CaSki 細胞の発現パターンは異なり、siRNA 法を用いて 18E6 癌蛋白をノックダウンさせても、それぞれの蛋白が適切な局在を示すことはなく、HaCaT 細胞に類似した発現パターンを認めなかった (図 15)。このことは、まだ不明瞭な段階ではあるが、16 型と 18 型 HPV で、hScrib および PP1 $\gamma$  への作用が異なる可能性を示唆している。

図 11 CaSki 細胞における HPV16E6 癌蛋白の作用について



16 型 HPV 陽性子宮頸癌培養株の CaSki 細胞に対して siRNA 法で E6 蛋白をノックダウンさせると、hScrib および PP1 $\gamma$  の発現量が増加することがわかった

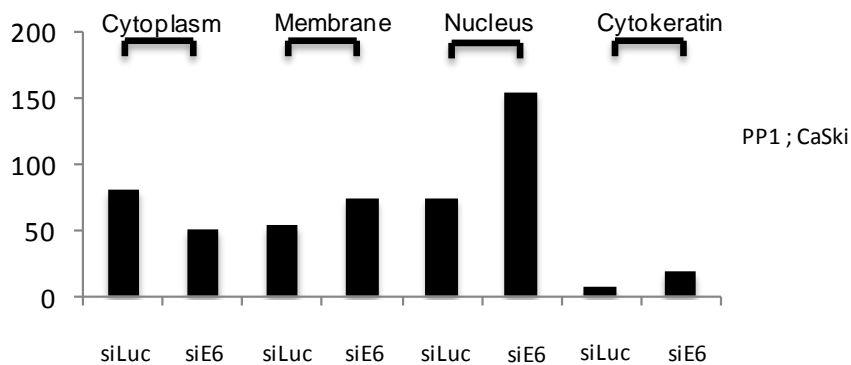
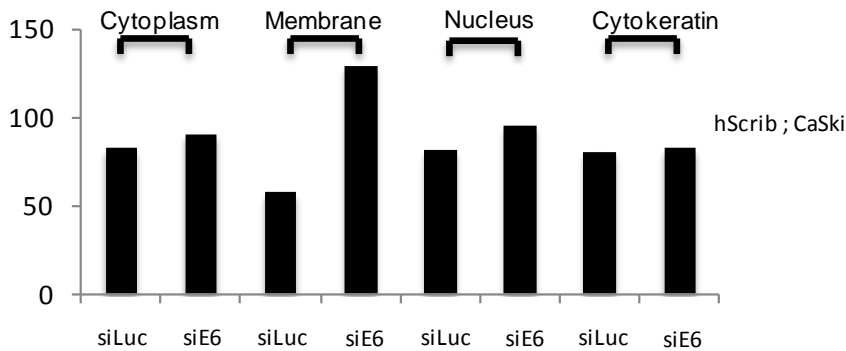
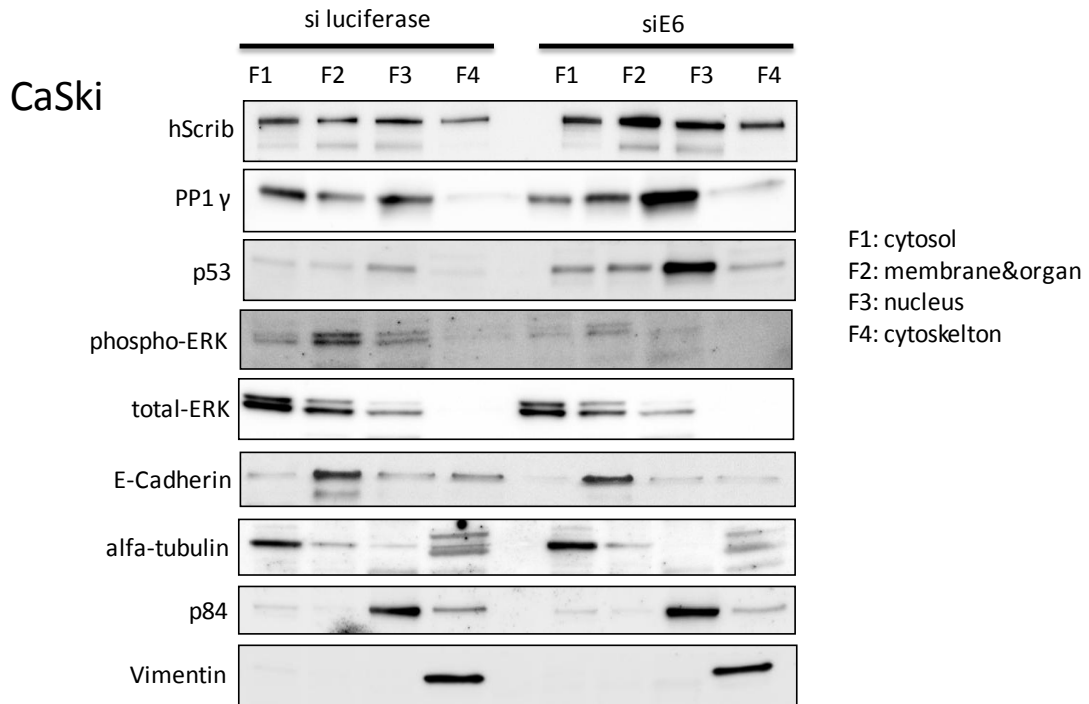
図 12 CaSki 細胞における PP1 $\gamma$  の発現パターン



上皮細胞では hScrib は細胞膜、PP1 $\gamma$  は主に核に発現するとされるが、HPV 陽性培養細胞株である CaSki 細胞においては、それぞれの発現パターンは大きく変化し、瀰漫性に発現しているが、siRNA 法で E6 をノックダウンされた CaSki 細胞では正常に近い発現パターンである。

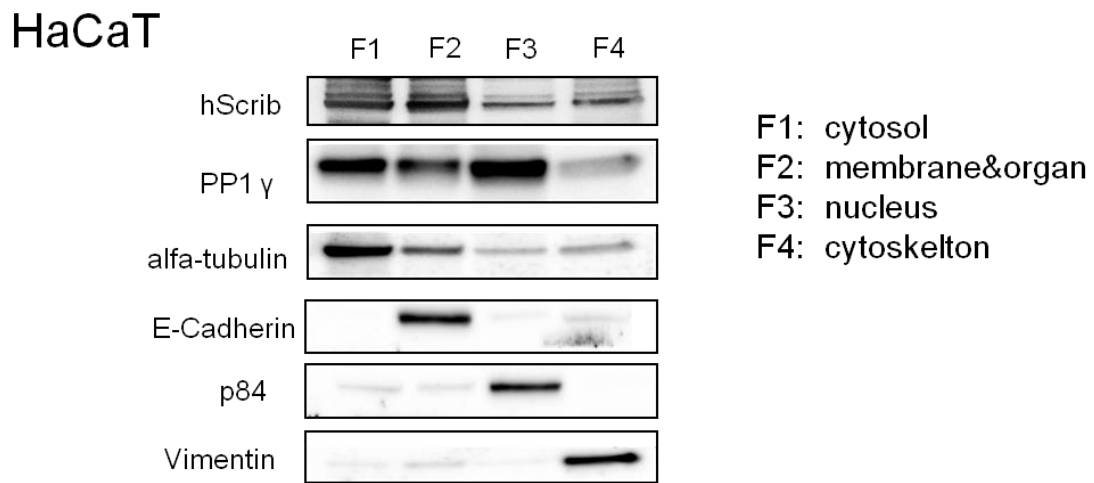


図 13 CaSki 細胞における HPV16E6 癌蛋白の作用 (細胞分画法による検討)



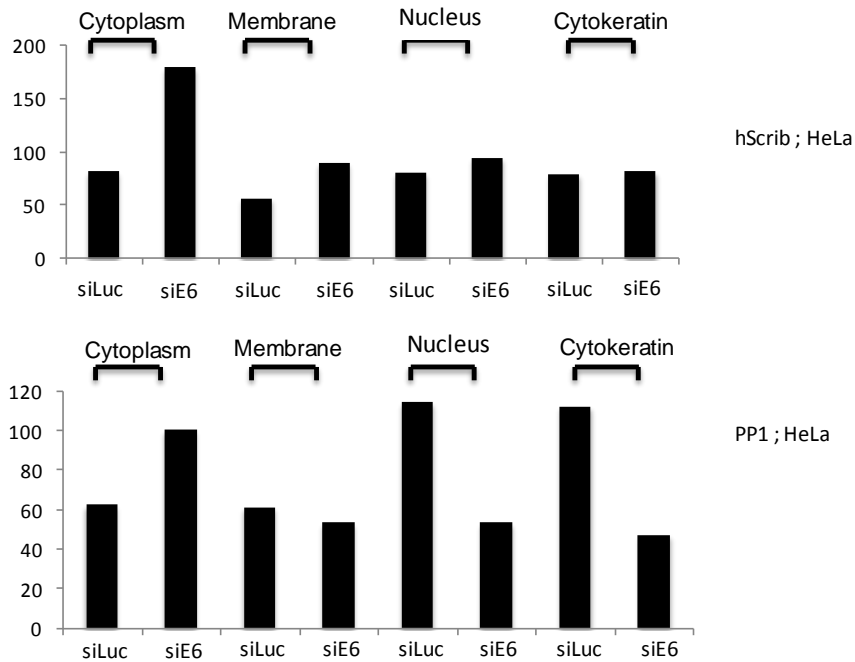
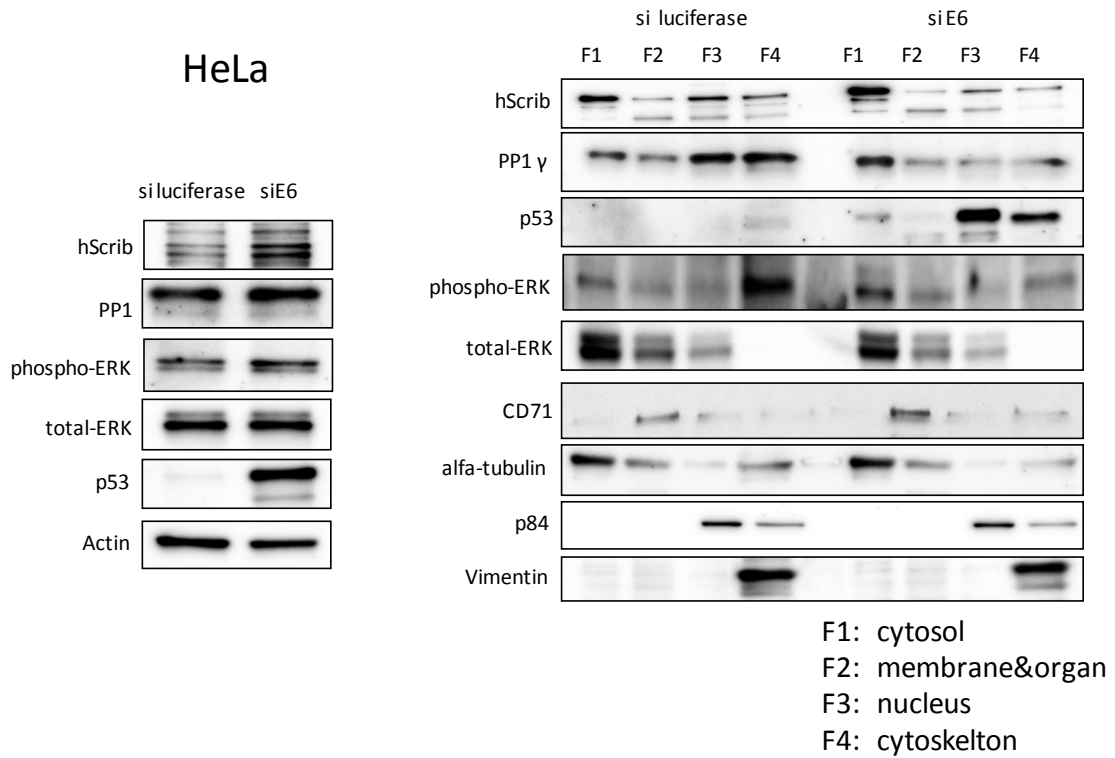
siRNA 法により CaSki 細胞内の 16E6 をノックダウンした結果、hScrib は主に細胞膜に、PP1γ は核に発現が増加することがわかった。下段のヒストグラムは、それぞれの発現量を定量化したものである。alfa-tubulin は細胞質、E-Cadherin は細胞膜、p84 は核、Vimentin は細胞骨格のマーカーである。

図 14 HaCaT 細胞における、hScrib、PP1 $\gamma$  それぞれの細胞内局在について



非 HPV 感染ヒトケラチノサイトである HaCaT 細胞では、hScrib は主に細胞膜に PP1 $\gamma$  は主に核に発現が多いことがわかる。それぞれの細胞内局在を細胞分画法後にウエスタンブロッティング法にて検討をした。alfa-tubulin は細胞質、E-Cadherin は細胞膜、p84 は核、Vimentin は細胞骨格のマーカである。

図 15 HeLa 細胞における HPV18E6 癌蛋白の作用 (細胞分画法による検討)



HeLa 細胞においては、siRNA 法で 18 型 E6 細胞をノックダウンしても、hScrib、PP1 $\gamma$  とともに、16E6 をノックダウンさせた CaSki 細胞や、HaCaT 細胞のような細胞内発現パターンをとらなかつた。下段のヒストグラムは、それぞれの発現量を定量化したものである。alpha-tubulin は細胞質、CD71 は細胞膜、p84 は核、Vimentin は細胞骨格のマーカーである。

### 3. 16型および18型子宮頸癌組織におけるhScribおよびPP1 $\gamma$ の発現パターンについての検討

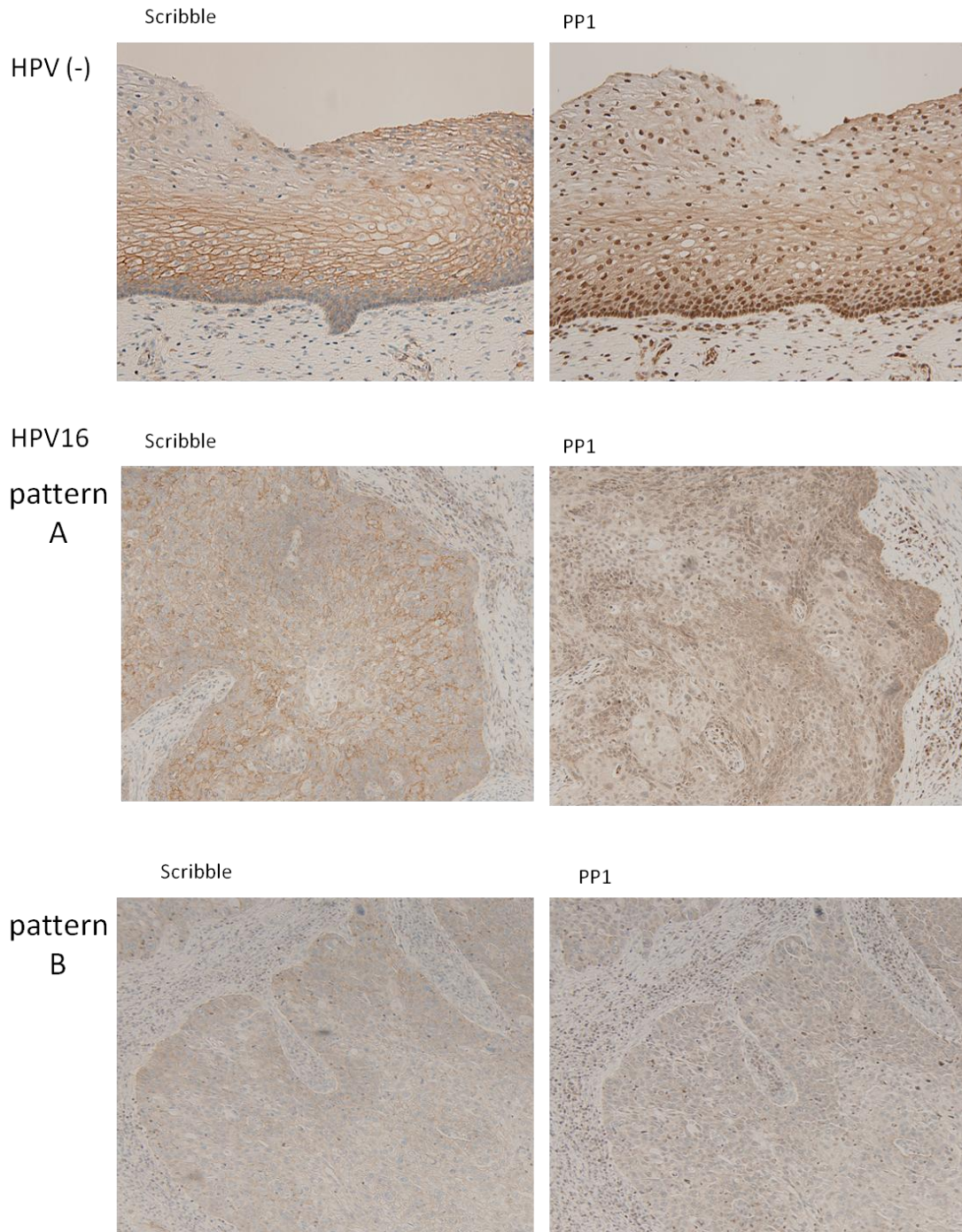
HPV陽性培養細胞株を用いた分子細胞学的検討にて、hScribおよびPP1 $\gamma$ のそれぞれの細胞内局在が、特に16型HPV陽性CaSki細胞では、一定の発現パターンを示し、16E6癌蛋白に依存した細胞内局在変化が起きていることがわかった。さらなる検討を行うべく、私は子宮頸癌組織の組織免疫化学染色法での、hScrib、PP1 $\gamma$ の発現パターンを観察した。症例は総数32例である。その内訳は、正常子宮頸部組織8例と、HPV16単独陽性子宮頸癌11例、HPV18単独陽性子宮頸癌13例である。頸癌検体は全て文書によるインフォームドコンセントの後、東京大学医学部附属病院にてHPVDNA検査を施行された検体を抽出した。また、HPV複合タイプ感染例は今回の検討対象から外している。子宮頸部組織におけるhScribおよびPP1 $\gamma$ の発現パターンを図に示す(図16、17)。正常子宮頸部組織と、子宮頸癌組織では、それぞれhScrib、PP1 $\gamma$ の発現パターンの違いを認めた。既報の通りにhScribは正常組織では主に細胞膜に発現をするが、子宮頸癌組織では明らかに細胞内局在の異常を認め、またPP1 $\gamma$ においても、正常子宮頸部組織では核に発現しているが、子宮頸癌組織では多くは細胞質に瀰漫性に発現、あるいはほとんど発現をしていないことを発見した。

続いて、各子宮頸部組織例のhScrib、PP1 $\gamma$ それぞれの発現パターンについて

表に示す (表 2)。正常上皮において hScrib は全例細胞膜に分布していた。これに対し、HPV16 陽性子宮頸癌組織では全体的に低発現、また瀰漫性に細胞質に拡散し、また細胞膜での発現は認めなかった。11 例中 5 例が細胞質、残り 6 例は発現を認めなかった。一方で、HPV18 陽性子宮頸癌では 13 例中 9 例が細胞膜に発現し、残る 2 例が細胞質、2 例は発現を認めなかった。また、PP1 $\gamma$  は、正常子宮頸部組織は全例で核に強く発現を認めたが、HPV16 陽性子宮頸癌では全体的に低発現であり、瀰漫性に発現している傾向を認めた。11 例中 9 例が主に細胞質に低発現し、2 例が発現無しであった。HPV18 陽性子宮頸癌では 13 例中 1 例が細胞膜、5 例が細胞質、3 例が核、4 例で発現を認めなかった。

今回の検討ではまだ症例数が少なく、有意差はなかったが、一定の傾向として、HPV16 陽性例に関しては、hScrib、PP1 $\gamma$  は共に細胞質へ局在変化をし、特に PP1 $\gamma$  は hScrib と比べて発現が低下している症例を多く認めた。一方で、HPV18 陽性例では HPV16 のような一定の傾向はなく、多様な分布を認め、培養細胞での検討と同様の傾向を示していた。そのため、今回の検討により、特に 16 型陽性子宮頸癌では hScrib、PP1 $\gamma$  の発現異常をきたしていることがわかった。

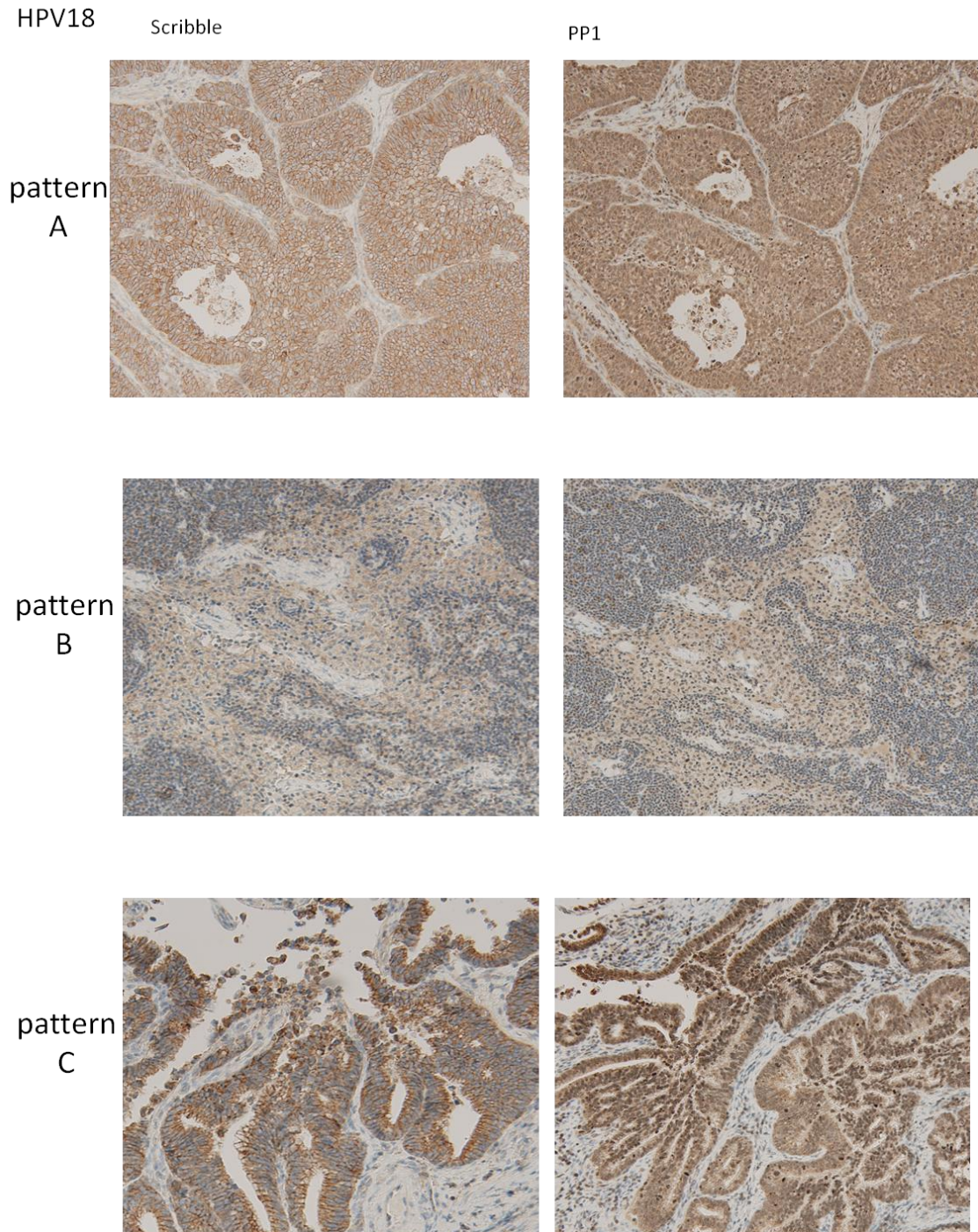
図 16 正常子宮頸部組織および 16 型 HPV 陽性子宮頸癌の組織免疫化学的検討



(20×10 倍にて撮影)

最上段は正常子宮頸部上皮。中段(pattern A)は 16 型 HPV 陽性子宮頸癌(hScrib 強染例)、下段(pattern B)は 16 型 HPV 陽性子宮頸癌(hScrib、PP1 $\gamma$  ともに弱染例)である。いずれも、hScrib、PP1 $\gamma$  は子宮頸癌では細胞内局在が細胞質方向へ拡散している

図 17 18 型 HPV 陽性子宮頸癌の組織免疫科学的検討



(10×10 倍にて撮影)

最上段(pattern A) : hScrib は細胞膜に局在。PP1 $\gamma$  は細胞質へ局在

中段(pattern B) : 弱染例。hScrib、PP1 $\gamma$  とも低発現

下段(pattern C) : hScrib は細胞膜および細胞質へ局在、PP1 $\gamma$  は核および細胞質に局在。16 型と比して、多様なパターンを呈し、法則性がない。

表 2 子宮頸部組織における hScrib および PP1 $\gamma$  局在部位について

hScrib

	normal		cervical cancer	
	HPV negative	16-positive	18-positive	
membrane	8	0	9	
cytoplasm	0	5	2	
nuclear	0	0	0	
no expression	0	6	2	
Total	8	11	13	

PP1

	normal		cervical cancer	
	HPV negative	16-positive	18-positive	
membrane	0	0	1	
cytoplasm	0	9	5	
nuclear	8	0	3	
no expression	0	2	4	
Total	8	11	13	

正常上皮組織および、HPV16 型陽性、HPV18 型陽性子宮頸癌組織における主要染色部位ごとに症例数をプロットした。図 16、17 の pattern B に認める、明らかな弱染例は、no expression にカテゴライズした。



## 考察

in vitro 発現系の実験では、HPV16E6 癌蛋白が PP1 $\gamma$  に直接結合し、また HEK293 細胞でこれらの遺伝子を強制発現させた実験系では、16E6 癌蛋白が hScrib、PP1 $\gamma$  を標的とし、減少させる働きがあることが解った。hScrib が 16E6 によりプロテアソーム依存的分解を受けることは既知であるが (6)、MG132 負荷試験の結果より、16E6 存在下で認められる PP1 $\gamma$  の発現低下はプロテアソーム依存的分解が原因であることが示された。

同様に CaSki 細胞を用いた実験でも 16E6 存在下では hScrib と PP1 $\gamma$  の発現が減少する傾向が見られた。さらに 16E6 の存在が hScrib、PP1 $\gamma$  双方の局在変化を起こさせ、さらに活性型 ERK の発現が増加していることがわかった。また、細胞分画法による検討では、siRNA 法で CaSki 細胞の 16E6 癌蛋白をノックダウンさせると、hScrib は細胞膜へ、PP1 $\gamma$  は核への発現上昇を認めた。これは HPV 非感染細胞である HaCaT 細胞の発現パターンと類似しており、CaSki 細胞での検討から、16E6 癌蛋白は hScrib、PP1 $\gamma$  の細胞内局在異常を起こし、それぞれを細胞質で瀰漫性に発現をさせている可能性が示唆された。

ERK の活性化に関しては、近年の研究で、hScrib-PP1 複合体などの hScrib が作用する脱リン酸化蛋白によって ERK を負に制御することがわかっている (20)。そのため、hScrib、PP1 $\gamma$  それぞれの発現低下により、ERK 活性が上がることは

単純に説明できるが、hScrib と PP1 $\gamma$  それぞれが細胞質へと局在変化をすることは、2つの蛋白が複合体を作ることによって ERK 活性化を抑制する既知のデータと矛盾する印象を受ける。しかし、CaSki 細胞質内で、hScrib と PP1 $\gamma$  が真に複合体を形成しているかはこの実験では明らかではなく、子宮頸部発癌過程における、hScrib、PP1 $\gamma$  の発現パターンの変化、およびそれに伴う ERK との結合能など、これから検討すべき課題は多い。

実際の子宮頸癌検体においては、HPV16 陽性子宮頸部進行癌では hScrib、PP1 $\gamma$  がともに細胞質への局在変化する傾向をほとんどの症例で観察することが出来たのに対し、HPV18 型陽性例ではこれらの蛋白の発現低下、細胞内局在の低下は必ずしも起こらず、また局在変化の方向性も多様な傾向があった。今回は、検討症例数が少なく統計学的検定による有意差を示せなかった。しかし、少なくとも HPV16 陽性子宮頸癌に関しては特に PP1 $\gamma$  の発現低下 (蛋白の減少) と、hScrib と PP1 $\gamma$  の細胞内局在変化を認め、培養細胞株の実験と同様な結果が認められた。

以上の事より、HPV E6 存在下で hScrib と PP1 $\gamma$  が細胞質へと局在変化をすることが 16 型 HPV 感染型の子宮頸癌細胞においては普遍的な事象と思われる。今回のデータは、HPV16E6 が hScrib、PP1 $\gamma$  の局在変化を誘導し、同時に活性化型 ERK を増加させる事を示せた。hScrib は、JNK、および ERK 系路を通じて細胞

増殖を調節する働きを持つ。さらに、E7 と Ras 刺激による細胞増殖が Ras 蛋白下流のシグナルである ERK 系路を制御する hScrib-PP1 $\gamma$  複合体により抑制的に働く事は既に確認されている (20)。そのため、子宮頸癌において、HPV16E6 が hScrib-PP1 $\gamma$  複合体そのものを負に制御することで、細胞内で E6 と E7 が協調的に働き、ERK 系路を効率的に活性化させていることが推測される。

近年、治療ワクチンを主体とした、HPVE6 および E7 に対する Trial は既に行われており、また一定の成果も見られている (32)。そのため、さらに HPVE6、E7 双方の機能をさらに解明することで、よりよい標的を選択し、また治療効果を判定する上でも有用であると考ええる。

一方、臨床学的な側面において、注目すべきは hScrib と PP1 $\gamma$  の局在変化の発見である。2000 年の Nakagawa らの発表以来、E6 と hScrib との関連が報告されているが、そのバイオマーカーとしての臨床応用に関しては未だ具体案を呈しきれていない (32)(33)。それは、本実験結果を見ても分かる通り、進行癌においての hScrib の分解が on/off で分けられるようなクリアカットな性質をもつ事象ではないからである。一方で、今回の研究では hScrib の減弱だけでなく PP1 $\gamma$  の細胞内局在変化という条件を加えることで、正常組織とのより明確な差を見出すことが出来た。同条件において症例数を増やし、子宮頸部異形成との関連、またそれぞれの臨床データとの更なるリンクを行うことによって、16 型 HPV 陽

性子宮頸癌において、hScrib あるいは PP1 $\gamma$  が、早期子宮頸癌における有用なバイオマーカーとなる可能性があり、とくに進行癌における EMT の部分に着目すれば、転移を予測するバイオマーカーとして活用できる可能性が考えられる。

また、18 型 HPV 陽性頸癌に関しては、E6 と hScrib-PP1 $\gamma$  複合体の明確な関与を示すことは出来なかったが、さらなる検討が必要である。序文で述べたとおり、HPV E6 の働きは 16 型と 18 型では PDZ モチーフの選択性など、全く異なった傾向があり、18 型 HPV 感染子宮頸癌における細胞増殖能などへの影響に関しては 16 型とは異なる機序がおこっていると推測する。

HPV16 型と 18 型では組織型の異なる癌ができる傾向にあり、また 18 型陽性腺癌が早期からリンパ転移する傾向にあることも知られている。細胞極性に関わる PDZ 蛋白である hScrib および、今回我々が新規に 16 型 E6 癌蛋白の標的とされると同定した細胞分裂に関与する PP1 $\gamma$  と、それぞれの子宮頸癌の進展度との関連をさらに解明することができれば、hScrib と PP1 $\gamma$  はそれぞれ子宮頸部病変の早期発見、あるいは、治療効果予測に対するバイオマーカーになりうる可能性があると考えられる。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御高閲いただいた、東京大学医学部産婦人科教室の藤井知行主任教授、川名敬准教授、上妻志郎前教授、帝京大学産婦人科教室の中川俊介講師に深く感謝いたします。また、実験計画や実験手法について御指導、ご協力いただいた、東京大学医学部産婦人科教室の織田克利先生、平池修先生、長阪一憲先生、谷川道洋先生、池田悠至先生、樫山智子先生、白根晃先生、国立がんセンターの清野透先生、温川恭至先生に心よりお礼申し上げます。

## 参考文献

1. Arbyn M, Castellsagué X, Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J.  
“Worldwide burden of cervical cancer in 2008.” *Annals of Oncology*. 22. 2675–2686.  
2011.
2. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM.  
“Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade  
cervical lesions: a meta-analysis update.” *International Journal of Cancer*. 121.  
621–632. 2007.
3. Doorbar J. “Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical  
cancer” *Clinical Science*. 110. 525–541. 2006.
4. Munger K. “The role of human papillomaviruses in human cancers.” *Frontiers in  
Bioscience*. 7. d641–d649. 2002.
5. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, and Howley PM. “The HPV-16 E6 and  
E6-AP complex functions as a ubiquitinprotein ligase in the ubiquitination of p53.”  
*Cell*. 75. 495–505. 1993.
6. Nakagawa S, Huibregtse JM. “Human scribble (Vartul) is targeted for  
ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the  
E6AP ubiquitin-protein ligase.” *Molecular & Cellular Biology*. 20. 8244–8253.

2000.

7. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. "Papillomavirus E6 proteins"

Virology. 20;384. 324–334. 2009.

8. Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ. "The E6 protein of human

papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300." EMBO

Journal. 18. 5061–5072. 1999.

9. Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. "p300/CBP and cancer." Oncogene. 23. 4225–4231.

2004.

10. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. "Identification of a novel telomerase

repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex."

Genes & Development. 18. 2269–2282. 2004.

11. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA. "Resistance to

apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak

and increased Bcl-2 expression" Cancer Letters. 205. 81–88. 2004.

12. Thomas M, Banks L. "Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6."

Oncogene. 17. 2943–54. 1998.

13. Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaić V, Massimi P, Nagasaka K, Kranjec C,

Gommah N, Banks L. "Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity."

Oncogene. 27. 7018–7030. 2008.

14. Kennedy MB. “Origin of PDZ(DHR, GLGF) domains.” Trends in Biochemical Science. 20. 350. 1995.

15. Ranganathan R, Ross E. “PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes.” Current Biology. 7. R770–R773. 1997.

16. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. “Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94. 11612–11616. 1997.

17. Nakagawa S, Huibregtse JM. “Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase.” Molecular and Cellular Biology. 20. 8244–8253. 2000.

18. Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni MJ, Arsanto JP, Ginestier C, Marchetto S, Jacquemier J, Isnardon D, Le Bivic A, Birnbaum D, Borg JP. “Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement.” Oncogene. 24. 4330–4339. 2005.

19. Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomaić V, Subbaiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Myers M, Banks L. “The cell polarity regulator



- hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction.” *Oncogene*. 29. 5311-5321. 2010.
20. Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L. “A Novel Interaction between hScrib and PP1 $\gamma$  Downregulates ERK Signaling and Suppresses Oncogene-Induced Cell Transformation.” *PLoS One*. 8. e53752. 2013.
21. Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Esum I, Richardson HE. “Control of tumorigenesis by the Scribble Dlg Lgl polarity module.” *Oncogene*. 27. 6888-6907. 2008.
22. Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. “The mammalian SCRIB polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin.” *Journal of Cell Biology*. 171. 1061–1071. 2005.
23. Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni MJ, Arsanto JP, Ginestier C, Marchetto S, Jacquemier J, Isnardon D, Le Bivic A, Birnbaum D, Borg JP. “Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement.” *Oncogene*. 24. 4330–4339. 2005.
24. Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, Allred C, Muthuswamy SK. “Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and

reveals a role for cell polarity in carcinoma.” *Cell*. 135. 865–878. 2008.

25. Dow LE, Elsum IA, King CL, Kinross KM, Richardson HE, Humbert PO. “Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling.” *Oncogene*. 27. 5988–6001. 2008.

26. Wu M, Pastor-Pareja JC, Xu T. “Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion.” *Nature*. 463. 545–548. 2010.

27. Brumby AM, Richardson HE. “Scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*.” *EMBO Journal*. 22. 5769–5779. 2003.

28. Pagliarini RA, Xu T. “A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior.” *Science*. 302. 1227–1231. 2003.

29. Cohen PT. “Protein phosphatase 1 – targeted in many directions” *Journal of Cell Science*. 115. 241-256. 2002.

30. Ragusa MJ, Dancheck B, Critton DA, Nairn AC, Page R, Peti W. “Spinophilin directs protein phosphatase 1 specificity by blocking substrate binding sites.” *Nature Structural & Molecular Biology*. 17. 459-464. 2010.

31. Accardi R, Rubino R, Scalise M, Gheit T, Shahzad N, Thomas M, Banks L, Indiveri C, Sylla BS, Cardone RA, Reshkin SJ, Tommasino M. “E6 and E7 from human

papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1.” *Journal of Virology*. 85. 8208-8216. 2011.

32. Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T. “Therapeutic Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: A Novel Approach” *The Open Virology Journal*. 6. 264-269. 2012.

33. Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Takizawa S, Suzuki Y, Yasugi T, Huibregtse JM, Taketani Y. “Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix” *British Journal of Cancer*. 90. 194-199. 2004.