

論文の内容の要旨

論文題目 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 γ (PP1 γ) に与えるヒトパピローマウイルスE6蛋白の影響の解析

氏名 清木 孝之

(背景と目的)

子宮頸癌は女性の悪性腫瘍としては3番目に多く、毎年53万人の新規罹患者と27万人の死亡者をだしている。その成因としては頸管上皮細胞におけるハイリスクHPV感染があり、特に16型と18型HPVの感染は子宮頸癌全体の70%以上に認められている。

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。

この内、ハイリスクHPVにおけるE6癌蛋白はp53などの癌抑制蛋白を含む様々な蛋白と結合し、主にプロテアソーム依存的な分解を起こして癌化の一因を作ることが知られているが、特にそのC末端にあるClass1 S/TXVモチーフ(PDZ-Binding motif)を介してPDZドメイン蛋白と結合し影響を及ぼすとされている。

標的とされるPDZドメイン蛋白には、細胞極性決定因子とされるhScrib、hDlg、MAGI-1などが知られているが、近年、hScribが、そのC末端にあるRVxFモチーフを介して、脱リン酸化蛋白であるPP1 γ と結合することと、正常細胞ではhScribが、hScrib-PP1 γ 複合体を形成してERK系路の負の制御を行っていることが証明された。しかしながらHPV陽性癌細胞におけるhScrib-PP1 γ 複合体の発現動態、機能は未だ解明されていない。

今回私はERK系路を負に制御するhScribとPP1 γ のハイリスク型である16型および18型HPVにおける発癌過程の分子細胞生物学的な検討を行った。さらに16型および18型HPV陽性子宮頸癌組織に対して免疫組織染色を施行し、hScrib及びPP1 γ の異常発現と病理組織像との関連について調べた。

(方法)

16型HPVE6(16E6)のPP1 γ に対する直接作用を調べる為、GSTプルダウンアッセイによる結合試験と、*in vitro*転写アッセイを行った。また、hScrib、PP1 γ への細胞内での16E6の働きを調べるため、細胞内へのトランスフェクション法を用いてHPV非感染細胞株での16E6遺伝子の導入試験を行った。また、プロテアソーム阻害剤であるMG132を培地に添加し、hScrib、PP1 γ に対するE6の作用が、プロテアソーム依存的であるかを検討した。

次に16型HPV陽性子宮頸癌細胞株CaSki細胞と18型HPV陽性子宮頸癌細胞株HeLa細胞

胞において siRNA による E6 ノックダウンを行い hScrib、PP1 γ の蛋白発現および、局在をウェスタンブロット法および蛍光細胞免疫染色法で調べた。

また、16 型、18 型単独陽性の子宮頸癌病理検体をもちい、hScrib、PP1 γ の組織免疫染色を行い、発現パターンを観察した。

(結果と考察)

結合試験にて 16E6 と PP1 γ は直接結合することが示された。また細胞内では 16E6 の強制発現により、hScrib、PP1 γ はともに発現が低下することが示された。また、PP1 γ の発現低下はプロテアソーム阻害剤の存在下では抑制され、生体内では PP1 γ は 16E6 と直接結合し、ユビキチン-プロテアソーム系を介した蛋白分解作用を受けていることが考えられた。

一方で、CaSki 細胞では hScrib、PP1 γ は 16E6 存在下で発現が低下している傾向が見られたが、siRNA 法で、16E6 蛋白をノックダウンさせると、発現は増加した。加えて 16E6 の存在が hScrib、PP1 γ それぞれの細胞内局在の変化をきたし、さらに ERK の活性を引き起こしていることが示された。また、細胞分画法での検討では、CaSki 細胞では siRNA 法で E6 をノックダウンさせると、hScrib は細胞膜へ PP1 γ は核への発現移動、増加を認め、正常細胞と近い形態をきたすことが示された。これは HPV 非感染細胞である、HaCaT の発現パターンと類似しており、CaSki 細胞において 16E6 は hScrib、PP1 γ の細胞内局在の異常を引き起こしていることが考えられた。一方で、HeLa 細胞では siRNA 法で 18E6 をノックダウンさせても CaSki と同様の一定の傾向を示す結果は得られなかった。

一方、子宮頸癌組織を用いた免疫組織化学染色による検討では、HPV16 陽性子宮頸癌で、細胞株での検討結果と同様に、hScrib、PP1 γ の発現低下と、細胞質への局在変化がおきていることを見いだした。これに対して、HPV18 型陽性例では hScrib、PP1 γ とも発現低下は必ずしも起こらず、また局在変化の方向性も多様であった。

以上のことより、HPVE6 存在下では hScrib-PP1 γ が細胞質へと局在変化をきたすことは 16 型 HPV 陽性子宮頸癌において普遍的な事象と考えられた。また 16 型 HPV 陽性子宮頸癌では E6 が hScrib、PP1 γ を通して ERK 系路に影響を与えている可能性を示すことが出来た。さらに組織免疫染色の検討では、正常子宮頸部組織と 16 型 HPV 陽性子宮頸癌では、細胞内局在の変化にかなり明確なある一定の法則性がある傾向を示していることから、hScrib、特に新規に同定された PP1 γ が子宮頸癌における臨床的バイオマーカーとして活用できる可能性が考えられた。今後は更なる解析で、今回我々の同定したメカニズムを、臨床病態と結びつかせることで、臨床へと応用させていければと考えている。