

氏名	にしむらあきこ 西村 聡 子
学位(専攻分野)	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2231 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	ヒトパピローマウイルス E2 蛋白による子宮頸癌由来細胞の増殖抑制機構の解析

論文調査委員 (主 査)
教授 井口 八郎 教授 米原 伸 教授 永田和宏

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, 以下 HPV と略す) ゲノムを含む子宮頸癌由来細胞株である HeLa 細胞を用いて、HPV の E2 タンパク質による細胞増殖阻害機構の分子生物学的解析を行い、また癌細胞における増殖維持機構について考察した結果をまとめたものである。

HPV は、パポバウイルス科に属する小型の DNA ウイルスであり、ウイルス粒子の直径はおよそ 52-55 nm で正二十面体構造をしており、エンベロープをもたない。ウイルスゲノムは環状 2 本鎖 DNA で、分子量約 5.0×10^6 Da, 約 8000 塩基対 (bp) から成り立っている。このパポバウイルス科に属するウイルスとして、ポリオーマウイルス、SV 40 などの DNA 腫瘍ウイルスが知られている。HPV は皮膚や粘膜といった上皮系の細胞に感染し、局在型の過形成を引き起こす病原ウイルスである。HPV の引き起こす疾患の代表的なものにばやコンジローマがあり、これらの症状の多くは良性のものであるが、まれに悪性化して癌を形成することが知られている。特に子宮頸癌においては、HPV の感染が主なリスクファクターであると考えられている。

HPV の遺伝子産物の一つである E2 タンパク質は、DNA へ結合性の転写因子である。E2 は、ウイルスの転写制御のみならず DNA へ複製にも関わっており、ウイルスのライフサイクルにおいて中心的な役割を担っている。以前から、E2 タンパク質が子宮頸癌由来細胞株の増殖を抑制する活性をもつこと、またこの増殖阻害は HeLa や Caski といった HPV 陽性癌細胞に特異的であることが報告されている。

本論文は第一部と第二部の二つに分かれるが、まず第一部ではこの細胞増殖阻害機構に E2 のどのような活性が関わっているのかを明らかにする目的で、一連の E2 変異体を用いた解析を行った。その結果、HeLa 細胞の増殖阻害には E2 の転写活性化能が必要であることを見いだした。E2 は、プロモーターのコンテキストにより転写の活性化と抑制の両方に機能することが知られており、E2 により抑制を受けるプロモーターとして HPV 16 及び 18 の E6/E7 遺伝子のプロモーターが知られている。E6 及び E7 は HPV の主な癌遺伝子であると考えられており、それぞれ細胞の重要ながん抑制遺伝子産物である p53 及び pRB を不活化する事が知られている。このことから、HeLa 細胞の増殖阻害は、E2 により E6/E7 の転写が抑制される結果、E6/E7 によって不活化されていた p53 及び pRB が再活性化することによって起きることが考えられる。申請者は、E2 の転写活性化能はウイルスの E6/E7 プロモーターからの転写抑制にも必要であることを見出した。この転写抑制の機構としては、E6/E7 プロモーターの近傍に E2 結合部位が存在するため、E2 がその結合部位に結合する際に他の細胞性の転写因子と競合し置き換わる結果、転写が抑制されると考えた。申請者は in vivo フットプリンティングや他の機能的アッセイにより、転写的に活性の低い DNA テンプレートへの結合の際には、E2 の転写活性化能は DNA への結合性に影響しないが、転写に関してアクティブなテンプレートへの結合には E2 の転写活性化能が必要であることを見出した。

第二部では、HeLa 細胞増殖阻害とテロメラーゼ活性について解析した。これまでに、転写因子の転写活性化能はクロマチ

ン構造をとっている DNA への結合性に関わっていることが報告されていた。また、第一部の結果より、HeLa 細胞の増殖阻害機構として、E2 発現による E6/E7 の転写抑制、p53 及び pRB の再活性化及びそれに伴う下流の反応を経て細胞増殖停止に至るといった経路が考えられた。申請者はこの p53 及び pRB 経路を実際に示すと共に、それら以外の経路も HeLa 細胞増殖阻害に関わっていることを示唆し、その候補としてテロメラーゼ活性に関する経路を取り上げて解析を行った。その結果、HeLa 細胞では恒常的に高いテロメラーゼ活性が発現しているが、E2 の導入によりテロメラーゼ活性が抑制されること、また、この抑制は E6/E7 の発現、特に E7 の発現を補うことによって回復することを見出した。こうした結果を総合して、E2 発現による HeLa 細胞の増殖阻害機構に関して一つのユニークなモデルを提出した。

論文審査の結果の要旨

本申請論文は、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus; HPV) を用いて転写因子による癌細胞増殖阻害機構を解析し、癌細胞の増殖維持機構に関して考察を加えたものである。HPV はヒトの上皮基底細胞に感染し、いぼやコンジローマなどの腫瘍を誘発する病原ウイルスとして知られている。通常は良性の腫瘍である病変が悪性化することも知られており、特に子宮頸癌ではほとんどの場合 HPV の感染が認められ、代表的なヒトがんウイルスの一つである。

HPV 陽性の癌細胞では、ほとんどの場合ウイルスの持つがん遺伝子である E6 と E7 の発現が認められる。E6 は p53 蛋白質、E7 は pRB 蛋白質と結合してその機能を不活性化することが知られていたが、p53 蛋白質や pRB 蛋白質などが関与する細胞周期の監視機構の破綻が癌化過程、及び癌化細胞の増殖維持に重要であることを示唆した。一方、ウイルスのコードする転写調節因子である E2 は、癌化した細胞内でその機能的な発現が失われていること、HeLa などの HPV 陽性癌細胞株に発現ベクターを用いて E2 の発現を補ったところ、細胞の増殖性が失われることを見出した。このことは、E2 遺伝子の欠失が子宮頸癌の悪性化への推移の上で重要な役割を有していたことを示すものである。

申請者は転写因子である E2 蛋白がどのように細胞増殖制御に関わっていたかを明らかにするため、E2 の変異体を用いて解析を行い、E2 の転写活性化機能並びに E2 による E6/E7 の転写抑制が細胞の増殖阻害に重要であることを示した。更に申請者は E2 による E6/E7 のプロモーター活性の制御機構について検討を行った。DNA 結合型の転写活性化因子として知られる E2 蛋白質が E6/E7 のプロモーター活性を抑制するモデルとして、TBP や Sp1 などの細胞性の転写因子と DNA 上の結合部位を競合する可能性が示唆されていたが、本論文では E2 の転写活性化能が DNA 結合に対し正の働きを有していることを *in vivo* フットプリント法や E2 の生物活性を評価する方法で実証した。転写活性化能が DNA 結合に重要となるのは、DNA 基質が活発に転写を行っており各種転写因子などが結合した複雑なクロマチン構造が影響している可能性があり、*in vivo* における転写因子の DNA への結合性を考察する上で重要な知見である。

E2 による子宮頸癌由来細胞の増殖停止に関しては、E6/E7 の発現抑制による p53 や pRB の再賦活化が考えられたが、本論文では E6/E7 を介したテロメラーゼ活性の調節に関して検討を加えた。すなわち、E7 の機能により癌細胞内でのテロメラーゼが活性化しており、E7 の発現抑制に伴いテロメラーゼ活性が低下することを見出した。この現象はテロメア長の短縮につながり細胞増殖が停止したのか、あるいは pRB や p53 の活性化によってテロメア長監視機構が機能したために細胞が senescence を迎えたのかは検討されていないが、癌化細胞の増殖維持機構を考察する上で重要な発見である。

本論文はウイルス学や細胞生物学の広い研究領域に寄与する新知見を含んでいる。転写因子の DNA 結合性に関して、*in vivo* と *in vitro* の実験に認められる相違を検討し、転写活性化能や DNA の状態の効果を示したことは今後の展開に結びつくものである。また癌細胞の増殖性に関する本研究は、ウイルスのがん遺伝子によるテロメラーゼ活性調節機構やテロメア構造の意義に関して、新たな研究の道を開いたものと言える。

よって本論文は理学博士の学位論文に値するものと認める。なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について口頭試問した結果、合格と認めた。