京都大学	博士（医科学）	氏　名	吉田　智志
論文題目	Ras Modifies Proliferation and Invasiveness of Cells Expressing Human Papillomavirus Oncoproteins (Ras タンパク質によるヒトパピローマウイルスがん遺伝子発現細胞の増殖能と浸潤能の亢進)		

（論文内容の要旨）

婦人科がんのひとつである子宮頸がんでは、その 90%以上にヒトパピローマウイルス（HPV）の感染が確認されており、その発がんには HPV の感染が重要であると考えられている。HPV は良性腫瘍を形成するローリスク型と悪性腫瘍を形成するハイリスク型に分類され、発がんにはハイリスク型 HPV のコードするがん遺伝子である E6、E7 が重要な役割を果たしている。E6、E7 タンパクはそれぞれがん抑制タンパク質である p53、pRb と結合し不活化することで、チェックポイント監視機構及びアポトーシスから回避することで発がんに寄与している。しかし HPV に感染しても発がんしない人が多くいることや発がんに至るまで長い年月を要することから、子宮頸がんの発症にはウイルス感染だけでは不十分であり、他のがんと同様宿主側の遺伝的変異の蓄積を伴う多段階発がんによるものと考えられる。がん細胞では宿主側の変異として ras の変異が多く見られており、子宮頸がんにおいても Ha-ras(Hras)の変異ががんの進行とともに増加することが報告されている。

そこで HPV 感染細胞において ras の活性化が及ぼす影響を解析するため、ヒトケラチノサイトを用いて活性型 Hras（HrasV12）と HPV がん遺伝子を共発現させ、細胞増殖能と細胞老化を評価した。ヒトケラチノサイトに HrasV12 を単独発現させると細胞死の一種であるセネッセンスが誘導されるが、それは E7 を共発現させることで回避できることがわかった。その回避には E7 による pRb の分解が重要であることが示唆された。HPV 感染細胞では E7 の発現により Ras の活性化による増殖停止が回避され、その結果 Hras のがん遺伝子としての活性化が顕在化するのではないかと推察された。

HPV の増殖は上皮系細胞に限定されており、またライフサイクルが上皮の分化プログラムと密接に結びついているため、単層培養系では HPV のがん化メカニズムを詳細に解析できない。そこで上皮形態を再現できる皮膚モデル培養系を用いて解析を行った。この培養系は上皮がんの悪性形質の解析にも有用である。その結果、E7 と HrasV12 を共発現させた上皮組織では細胞の浸潤が観察された。そこでがんの浸潤に関わるタンパク質として MMP の発現を調べたところ、MT1-MMP と MMP9 の発現がそれぞれ Ras、E7 によって誘導されていた。MMP の阻害剤によって浸潤が抑制されたことから、この浸潤性は主に MMP の発現誘導で起きていると推察された。MAPK の阻害剤を用いた実験から、MT1-MMP と MMP9 は主に MEK-ERK 経路を介して発現誘導されていることがわかった。E7 と MEK1 の活性化変異体を共発現させた上皮組織では、部分的に浸潤が観察されたことから、Ras の活性化による MEK1 の持続的活性化が浸潤能獲得に重要であることが推察された。E7 による MMP9 の発現は pRb の分解に非依存的に誘導されており、MMP9 の発現誘導はハイリスク型及びローリスク型共通の E7 の機能であると考えられた。

以上より、HPV 陽性子宮頸がんでは Ras の変異や増幅などによる Ras シグナル経路の活性化が初期浸潤に重要な役割を果たしている可能性が示された。

（論文審査の結果の要旨）

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸がんの 90%以上で感染が確認され、子宮頸がん発症の主な危険因子であることが知られている。しかし、HPV 感染だけでは発がんには至らず、子宮頸がんは HPV 感染に加えて宿主因子の遺伝的変異を伴う多段階発がんによって引き起こされると考えられている。Ras はヒトのがんのおよそ 20%で活性化が起きており、がん細胞の悪性形質転換に関与している。子宮頸がんではがんの進行とともに H-ras の活性化が増加することが報告されている。

本論文では HPV 感染細胞の悪性形質獲得における Ras の関与について解析が行われた。活性化 H-ras を HPV がん遺伝子とともに初代培養ヒト角化細胞に導入すると、H-ras による senescence 細胞死が E7 による pRb の分解によって回避されることが示された。また H-ras と E7 を共発現させた細胞を用いて３次元皮膚モデル培養系を構築すると、組織浸潤することが示された。この浸潤は E7 による MMP9 の発現誘導、及び H-ras による MT1-MMP の発現誘導に起因していた。さらに MMP9 及び MT1-MMP の発現誘導機構を検討し、ERK 経路が関与している事が示された。また E7 による MMP9 の発現誘導は pRb の分解に非依存的であることが確認された。以上の結果に基づき、HPV 感染細胞では Ras 経路関連遺伝子の活性化によって悪性転換する可能性が示された。

以上の研究は、HPV による多段階発がんのメカニズムの解明に貢献し、当実験系は HPV 感染治療薬のスクリーニング系の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文としての価値があるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成２１年２月１９日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降