

氏 名	なか はら とも み 中 原 知 美
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2605 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Modulation of the Cell Division Cycle by Human Papillomavirus Type 18 E4. (ヒトパピローマウイルス18型 E4 タンパク質による細胞周期制御機構に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 岡 雅 雄 教 授 速 水 正 憲 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

子宮頸癌においては95%以上の病変組織からヒトパピローマウイルス (HPV) の DNA が検出され、HPV 感染が子宮頸癌発症の主な原因であると考えられる。HPV の複製は感染標的である上皮系細胞の分化状態と密接に関わっている。感染組織の基底細胞において HPV は潜伏状態を維持するが、感染細胞の分化にともなってゲノムの大量複製およびウイルス後期遺伝子発現が行われ、子孫ウイルス粒子が産生される。このような細胞分化に応じたウイルス複製がどのような分子機構に基づくかは解明されていない。

HPV 遺伝子産物の一つである E1/E4 タンパク質 (E4) は、感染組織の分化層で高発現が観察される。その生物活性としては、E4 発現により上皮系細胞でサイトケラチンネットワークの崩壊が誘導されることが報告されており、E4 は上皮組織の分化層において細胞機能を調節することで、ウイルス複製に寄与している可能性が考えられる。

この研究では細胞の増殖性に対する E4 発現の影響を検討した。その結果、子宮頸癌との関連の高い16型および18型の HPV 由来の E4 に細胞増殖を制御する機能を見出した。この結果は HPV の生活環における E4 の役割を解明する上で重要な知見を与えるものである。

HPV16 および18由来の E4 を組込んだ発現ベクターをヒト HPV 陽性子宮頸癌由来の HeLa 細胞に導入し、E4 が細胞増殖に与える影響を調べたところ、E4 発現によって細胞増殖が抑制されることが分かった。細胞周期を調べたところ E4 発現細胞では G2/M 期の集団の増加が観察された。このことから、E4 は細胞増殖を G2/M 期で停止させる働きを持つことが示された。

HeLa 細胞には HPV18 のゲノムが組込まれており、ウイルス癌遺伝子産物である E6 および E7 タンパク質が恒常的に発現している。E6 および E7 はそれぞれ、癌抑制遺伝子産物である p53、および pRb の機能を不活性化することで、細胞周期調節不全を引き起こす。E4 による細胞増殖停止が、E6 および E7 の機能に依存するかどうか検討する目的で、HPV 陰性の C33A 細胞と CV1 細胞を用いて同様の検討を行った。その結果、どちらの細胞においても G2/M 細胞周期停止が観察され、E4 による G2/M 細胞周期停止には E6 および E7 の機能は関与しないことが示された。

G2/M 細胞周期停止は、ストレスや DNA 損傷といった刺激によって誘導され、その間に DNA 損傷の修復、あるいはアポトーシスの誘導によって異常細胞を排除し、正常な組織機能の維持をはかる。しかしながら E4 を発現し G2/M 期で増殖停止している細胞では DNA 合成が引き続いて行われている可能性が示唆された。フローサイトメトリー解析では、G2/M 期で停止して十数時間後から 4N 以上の DNA を含む細胞集団の増加が認められた。また顕微鏡観察下で巨核や多核を持つ細胞の出現が観察された。

次に、E4 による G2/M 細胞周期停止が、E4 に関する既知の生物活性に関連するかを検討した。これまでに、E4 はその N 末端でサイトケラチンと共局在し、C 末端によってサイトケラチンネットワークを崩壊することが知られていた。そこで HPV18 の E4 をもとに N 末端および C 末端領域の欠損変異体を作製し、それらが細胞増殖に及ぼす影響を解析した。

その結果、E4の細胞増殖停止機能には、N末端C末端いずれも必須ではなく、サイトケラチンとの相互作用とは独立のものであることが示唆された。

HPVは増殖を停止した分化細胞においてウイルスゲノムの大量複製を行う。このためHPV感染組織では分化細胞層におけるDNA合成の維持が必要となる。近年、分化層におけるDNA合成の再活性化に、E7が中心的な役割を果たすことを示唆する結果が報告された。本研究において、E4発現細胞はG2/M細胞周期停止しているにも関わらず、DNA合成を行っていることが示された。HPVの生活環においては、細胞の分化（分裂停止）とDNA複製機構の維持という、相反する事象の成立が必要であり、今回の結果は、E4の機能がこのようなHPV特有の生活環に重要な役割を果たす可能性を示唆するものである。今後は更にこの研究を進展させ、HPVの生活環におけるE4の機能を解明したいと考えている。

論文審査の結果の要旨

ヒトパピローマウイルス（HPV）は、様々な器官の上皮系組織に感染し、感染部位に過形成を引き起こす病原ウイルスである。感染組織の一部はまれに悪性化する。なかでも子宮頸癌では、病変組織の95%以上からHPVのDNAが検出されるため、HPV感染が子宮頸癌発症の主な原因であると考えられている。ウイルス各遺伝子の生物活性を解明し、それらの宿主細胞へ及ぼす影響を理解することは、HPV感染によって引き起こされる疾病の機構を解明することへつながり、新しい治療法の確立に貢献するものである。

申請者は、子宮頸癌と関連性の高いHPVであるHPV18の、ウイルス遺伝子産物の一つであるE4タンパク質が、感染標的である上皮系細胞の細胞増殖に与える影響を検討した。その結果、E4タンパク質発現が細胞増殖を抑制することを見だし、フローサイトメトリーを用いた検討により、E4タンパク質が、細胞周期のG2/M期において細胞増殖を停止させることを解明した。興味深いことに、E4発現によるG2/M期細胞増殖停止は、DNA合成の停止やアポトーシスの誘導を伴わないものであることが示された。

E4タンパク質は上皮組織の分化した層において高発現する。申請者は、E4タンパク質が分化した細胞において細胞周期を調節することにより、ウイルスゲノム複製を亢進している可能性を明かにした。

以上の研究は、ヒトパピローマウイルスの複製機構の解明に貢献し、ウイルス感染症の分子機構の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年2月6日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。