

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	佐塚 文乃
論文題目	HPVのライフサイクル解明に向けた新規レプリコンの構築とその検証		
(論文内容の要旨)			
Human Papillomavirus (HPV) は、このウイルスと子宮頸癌との関連を示したzur Hausen博士へのノーベル賞贈呈 (2008年) や、国内での予防ワクチン認可により、我が国でも高い関心を集めているウイルスのひとつである。HPVは子宮頸癌との関連から臨床的に重要なウイルスの一つであるが、上皮細胞の分化に伴って増殖、および遺伝子発現制御を行う特徴を有したウイルスであるため、生物学的、特に皮膚形成や癌発生メカニズムの観点からも非常に面白く、広く生命現象の理解に役立つ可能性を持つウイルスである。しかしながら細胞分化に強く支配された複製機構を有するために、HPVのライフサイクルを通常の組織培養条件では十分に再現することが困難であり、その解明は遅れていた。 本研究ではHPVの複製を解析できる実験系を構築し、構築した系でHPVのライフサイクルの解析を試みた。はじめに細胞培養にて高効率に維持・増殖するHPVプラスミド複製系を作成し、この複製系を用いて単層および3次元皮膚モデル培養系にてHPVの複製・維持を確かめた。その結果、今回構築した系は、HPVのライフサイクルを観察するに適したものであることが証明された。 次にこの系の抗薬剤スクリーニングの有効性を確かめるため、HPV陽性の癌細胞に対して増殖抑制効果が報告されているサイトカイン (IFNβ, TGFβ, TNFα) を使用し、HPVに対する抗ウイルス効果を評価することにした。その結果、本実験系においてIFNβがHPV複製及びHPVによる感染細胞の過形成誘導に対し抑制的な効果を有することが認められた。このことから、構築した本系の薬剤スクリーニングとしての有効性が確かめられた。また本系を用いて、HPVのゲノムメンテナンスに関与するウイルス性因子の特定を行い、複製機能に関与するとされるE1, E2がゲノムメンテナンスに必須であるという結果が得られた。さらに、本系で利用した3次元皮膚モデル培養系の有用性を示すため、上皮組織における【表皮・間質】の相互作用についての評価モデルを構築した。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、HPVの複製系を構築し、その抗ウイルス化合物スクリーニング系としての有用性を示したものである。

申請者の所属していた研究室では、ヒトの病原ウイルスであるHPVの生物学的解析を行ってきた。このウイルスの感染は子宮頸癌発症の危険因子であり、その感染機構を明らかにすることは、子宮頸癌の予防・治療法の開発を行う上で重要であると考えられる。しかしHPVは重層上皮の分化段階に強く依存した複製を行うことが知られており、一般的な細胞培養条件ではウイルスは複製を行うことが出来ず、これまでHPVの生物学的研究は立ち後れていた。本論文はHPVの生物学的研究の進展に寄与するべく、HPVの複製を組織培養条件下で解析できる実験系を構築し、その有用性を示したものである。ここでは皮膚モデル培養系 (raft culture) を用い、そこへ申請者の考案した新規のHPVレプリコンDNAを導入することで、再現性の高いHPV複製解析系を構築している。従来はHPVレプリコンとして全長のHPV DNAをリガーゼによって環状化したものを利用していましたが、その方法では導入した細胞でのHPV DNAの維持効率が不安定であり、HPVの複製系を構築するのに不十分であった。申請者の考案した新規レプリコンでは、HPV DNAを薬剤耐性遺伝子発現ベクターに挿入することで、HPV DNAを維持した細胞を選別できる工夫が施されており、従来のものに比べてその維持効率が10倍程度改善された。また皮膚モデル培養系で、HPV感染組織に認められる過形成誘導が観察され、ウイルスの産生的複製も効率よく再現されていることを確認した。この新規HPVレプリコンを用いてウイルス制御遺伝子の機能をreverse geneticsの手法を用いて解析しており、E1, E2以外の制御遺伝子の機能がウイルスDNAの複製や維持に必須ではないことを明らかにした。さらにここで構築された複製系を利用して、サイトカインなどの抗ウイルス活性の評価を行っており、I型インターフェロンに強い抗ウイルス活性があることを示している。

また、主論文との関連はないが、「表皮-間質」間の相互作用に関しても皮膚モデル培養系を利用した解析を行い、未完成の報告ではあったが今後の研究の進展が期待できるものであった。

本論文は、HPVの複製制御機構の解明には至らなかったものの、新規に考案した複製系の有用性を示したものであり、その学術的意義は十分にあり、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成22年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日