

る癌の約90%は扁平上皮癌で、好発年齢は40~50歳といわれている。HPVの癌化のメカニズムについては、HPVのE6, E7蛋白が癌蛋白質の性質を備え、細胞の不死化に関与していることが報告されている。現在HPVはlow-risk型とhigh-risk型に分類されている。low-risk型のHPVは、尖圭コンジローマや乳頭腫との関連が認められている。一方、high-risk型のHPVは尖圭コンジローマからほとんど検出されないが、子宮頸部の高度前癌病変や子宮頸癌組織内から検出されている。特に近年は若年者のHPV感染が問題となり、近い将来、若年者の子宮頸癌の増加が危惧されている。HPVと子宮頸癌との関連性が徐々に明らかにされつつあるが、HPV感染から発癌に至るまでのメカニズムのうち、未だ明らかにされていない部分も多い。我々はhigh-risk型HPV18 E7蛋白質と動原体の構成要素であるCENP-Cが結合する事を見いだしたが、本研究ではその結合が動原体機能にどのように影響するかを検討した。

[研究方法]

1. Expression vectorの作製

(1) pCMV-HA-CENP-Cの作製

CENP-C cDNAの(a.a.483-943)領域をPCRにて増幅後、pCMV-/myc/nuc vector (Invitrogen)へサブクローニングし、さらにそれを鋳型に3つのNLS領域を含むようにCENP-C cDNAをPCRにて増幅後pCMV-HA vector (BD Science)へサブクローニングした。

(2) pFLAG-CMV2-HPV18 E7, pFLAG-CMV2-HPV11 E7 vectorの作製

鋳型DNAはヒューマンサイエンス研究資源バンクよりpHPV11, pHPV18を入手し、各々のE7領域にHindIII, BamHISiteを付加した特異的なプライマーを用いて、PCRで増幅後pFLAG-CMV2 vector (Sigma)へサブクローニングした。

2. Transfection

293T細胞を10cm dishに培養し、上述のvectorをLipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)を用いて、transfectionし24時間後に蛋白質を抽出した。

3. Western blotting

10-15% polyacrylamide gelで電気泳動後ニトロセルロース膜に転写後、各々の抗体に室温で1時間反応させ、検出にはECL plus (GE Healthcare)を用いた。抗

4) ヒトパピローマウイルス18型 E7蛋白質の動原体機能に与える影響

研究代表者 柳沼 裕二

[研究目的]

HPVのうち約半数(HPV 1,5,8,14,20,21,25,47型等)は皮膚型と呼ばれ、手や足などの皮膚に感染し乳頭腫を形成する。その他の型(HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41-45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70型)は性器・粘膜型と呼ばれ、生殖器に感染し、尖圭コンジローマの原因となる場合もあり、また、子宮頸癌との関連も注目されている。子宮頸部から発生す

体には抗 FLAG M2 (Sigma)、抗 HA (Roche) 抗体を用い、抗 CENP-C 抗体は名古屋大学の依田欣哉先生より供与していただいた。コントロールには actin を用いた。

4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法

ChIP 法は ChIP assay kit (Upstate) を用いて行った。概要は以下のとおりである。

- (1) 293T 細胞を 1%ホルムアルデヒド、37℃、10分間培養し、蛋白質と DNA をクロスリンク。
- (2) DNA が400-800bp 程度に切断されるように sonication を行う。
- (3) 293T 細胞では抗 HA antibody, HeLaS-3 細胞では抗 CENP-C 抗体を用いて immunoprecipitation を行う。
- (4) 沈降した DNA を PUC19 にサブクローニングし塩基配列を決定したり、沈降した DNA を鋳型に semi-quantitative PCR を行う。Figure1A, 2A の lane1 は 17cycle で、次の lane では 3cycle ずつ追加していった。Input DNA のコントロールには β -actin DNA に対する特異的プライマーを用いた。

5. SiRNA 法

SiRNA220 (5'-UGGAGUAAUCAUCAACAUDTdT-3') は HPV18 E7 を knock down することが知られており、HeLaS-3 細胞株へトランスフェクトした。ネガティブコントロールには nonspecific SiRNA (catalogue No. D-001206-13-05, Thermo Fischer Scientific, Inc.) を用いた。

[成績]

1. ChIP 法により CENP-C は α -satellite DNA type I (Human alphoid repetitive DNA, chromosome 6, 11 and X)、human α -satellite from the centromeric region DNA with 16 monomer tandem repeats などの α -satellite DNA と結合することを明らかにした。
2. 293T 細胞に pCMV-HA-CENP-C と pFLAG-CMV2-HPV18 E7, pFLAG-CMV2-HPV11 E7 を強制発現させた系では high-risk 型 HPV18 E7 は染色体17および X の α -satellite DNA との結合を阻害したが low-risk 型 HPV11 E7 はその結合を阻害しなかった (Figure1)。
3. HeLaS-3 細胞株は HPV18 DNA が genome に integrate されており、恒常的に HPV18 E7 蛋白質を発現している細胞株である。SiRNA 法により HPV18 E7 発現を抑制し (Figure2)、その条件下で CENP-C に対する抗体で ChIP を行った結果、Figure に示すとおり、HPV18 E7 蛋白質の発現を抑制すると染色体17、X と α -satellite DNA との結合の抑制が解除された。

Figure 1

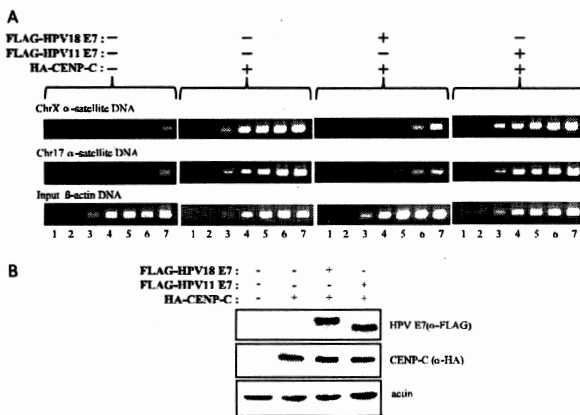
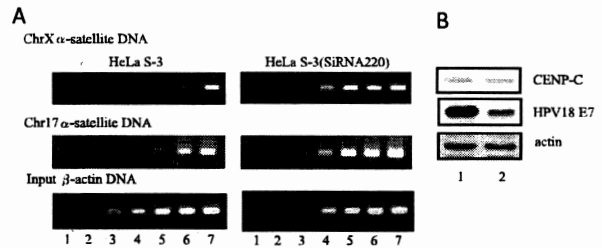


Figure 2



[結論・考察]

CENP-C は直接あるいは間接的に α -satellite DNA に結合している事が明らかとなり、これが動原体の機能にとって重要である事が予想される。本研究で我々は high-risk 型 HPV18 E7 蛋白質は CENP-C と α -satellite DNA の結合を阻害する事を明らかにした。これは high-risk 型 HPV18 E7 蛋白質と CENP-C との結合が直接的に CENP-C と α -satellite DNA の結合を阻害する機序ともう一つは CENP-C は CENP-B と結合することが知られており、CENP-B は CENP-B box を介して α -satellite DNA と結合する。また我々が明らかにした high-risk 型 HPV18 E7 蛋白質と CENP-C との結合には CENP-C の C 末側が重要であるが、その領域は

まさに CENP-B が α -satellite DNA との結合に重要な領域とオーバーラップしていることより、high-risk 型 HPV18 E7 蛋白質と CENP-C との結合が CENP-C と CENP-B との結合を阻害する事により間接的に α -satellite DNA との結合を阻害する機序も考えられる。直接的、間接的にしろ、high-risk 型 HPV18 E7 蛋白質が CENP-C と α -satellite DNA の結合を阻害することにより正常な動原体の機能を障害する事が考えられた。従来より HPV18 型 E7 蛋白質を発現させると aneuploidy を誘発することが知られており、本研究から HPV18 型 E7 蛋白質と CENP-C の結合により、動原体の機能が障害され aneuploidy が生じると考えられる。