

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20791138
研究課題名（和文）
子宮頸部発癌過程での低酸素応答異常と HPV 癌遺伝子による HIF-1 活性化の分子機構
研究課題名（英文）
Activation of hypoxia-inducible factor 1 by Human Papillomavirus Oncoproteins
研究代表者
中村 充宏（NAKAMURA MITSUHIRO）
金沢大学・附属病院・医員
研究者番号：50377397

研究成果の概要（和文）：Human Papillomavirus (HPV) の癌遺伝子である E6、E7 は低酸素下にて Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) の発現を上昇させ、そのターゲット遺伝子である VEGF の発現上昇が認められた。E7 に注目し検討した結果 E7、p53 そして HIF-1 α の 3 因子が相互に関わっていることが明らかとなった。また E7 が p53 と MDM2 との関与を減弱させることにより HIF-1 α との結合を促進させていること、E7 と p53 との結合には E7 の Rb 結合部位が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Our studies indicate that cells containing complete HPV31 genomes showed enhanced levels of HIF-1 α upon treatment with the hypoxia mimic DFO, which resulted from protein stabilization and led to increased expression of VEGF. Both HPV E6 and E7 were able independently to enhance induction of HIF-1 α upon DFO treatment. Our studies further indicate that HPV31 E7 associates with both HIF-1 α and p53 in cells, and this association results in reduced interaction of the HIF-1 α /p53 complex with MDM2. These findings shed light on mechanisms by which HPV contributes to angiogenesis both in benign cervical lesions and in cervical cancers and describes a novel role of the E7 oncogene in the virus-host interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：婦人科腫瘍

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：HPV、低酸素、子宮頸癌、HIF-1

1. 研究開始当初の背景

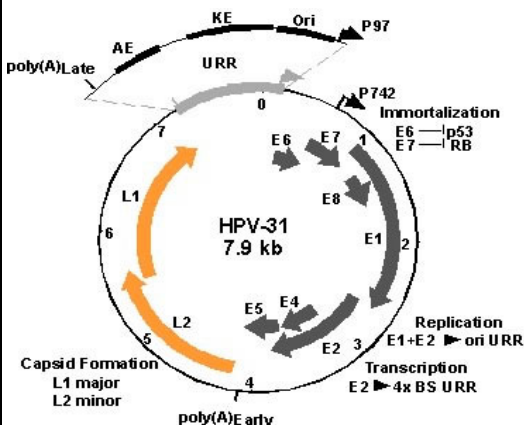
ヒトパピローマウイルス (Human Papillomavirus 以下 HPV) は子宮頸癌の原因ウイルスとして同定されこれまで数十種類のタイプが報告されている。HPV の感染により癌遺伝子である E6、E7 が癌抑制遺伝子である p53、Rb を抑制することにより細胞を不死化する。その後 RAS などの癌遺伝子が活性化することで癌化することが知られている。また癌組織は低酸素の状態にさらされており、このような環境下で重要な役割を果たしているのが Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) である。HIF-1 は HIF-1a と HIF-1b が Dimer を形成している。HIF-1 の活性化に寄与しているのが HIF-1a である。低酸素下で HIF-1a が安定化することで HIF-1 が恒常的に発現される。HIF-1 が血管新生や細胞増殖に関与する遺伝子の転写を活性化することで Tumorigenesis や Carcinogenesis に寄与している。HIF-1 が転写を活性化させる遺伝子としてこれまで VEGF や TGF- β など 70 種類以上もの遺伝子が報告されている。これまで HPV と低酸素、特に HIF-1 との関連についての報告はほとんどなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

これらの背景をから今回我々は HPV 感染による HIF-1 発現上昇のメカニズムとその分子生物学意義について検討することにした。と特に HPV ウイルスの重要な癌遺伝子である E6、E7 に注目しそれらと HIF-1 との相互作用を検討することによって子宮頸部発癌のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

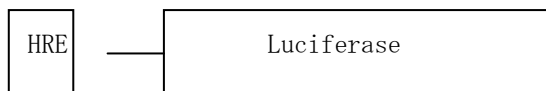
説明と同意の下に得られた正常ヒトケラチノサイト (Human foreskin keratinocyte、HFK) に高リスク型の HPV31 ゲノム (図 1) を Episomal に導入した細胞 (HPV31 cell)、及び Oncoprotein である E6 or E7 を Integration させた細胞 (HPV31E6cells、HPV31E7 cells) を樹立した。



(図 1)

まず初めにこれらの細胞を低酸素下に培養し、HIF-1a 発現の有無について検討した。Deferoxamine mesyrase (DFO) を用いることで低酸素と同様の環境を作った。

次に HPV 感染細胞における HIF-1 発現上昇による転写活性の検討を行った。プロモーター上に HRE (HIF-1 response elements: HIF-1 binding site) を有した Luciferase reporter plasmid (図 2) を作成しこれを HPV31 感染細胞及び Control 細胞に Transfection す。その後 Normoxia と Hypoxia の状態で培養した後 Luciferase assay を行い Hypoxia によって転写活性がどれだけ上がっているかを検討した。転写活性の上昇が認められれば血管新生や細胞増殖に関与する個々の遺伝子につき Real-time PCR などによって mRNA の発現について検討した

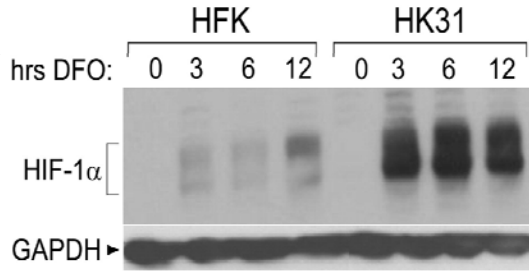


(図 2)

HPV 感染細胞における HIF-1a 発現上昇を確認した後、その発現上昇のメカニズムを検討すべく E6、E7 に注目し以下の検討を行った。先述した HPV31E6cells、HPV31E7cells を低酸素下に培養し HIF-1a の発現上昇を検討することでどの遺伝子が関与しているのかを検討した。これら遺伝子を HIF-1a との相互作用については免疫沈降法を用いて検討を行った。

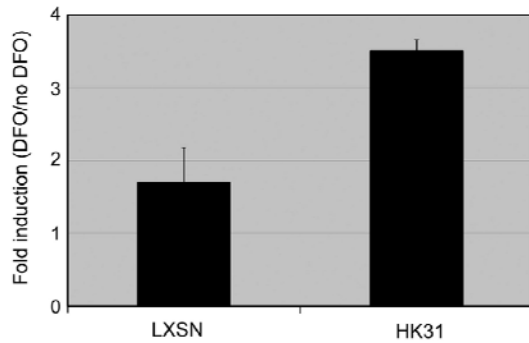
4. 研究成果

HPV31 cells (HK31)でのHIF-1の発現上昇はHFKに比べ著明に上昇していた(図3)。



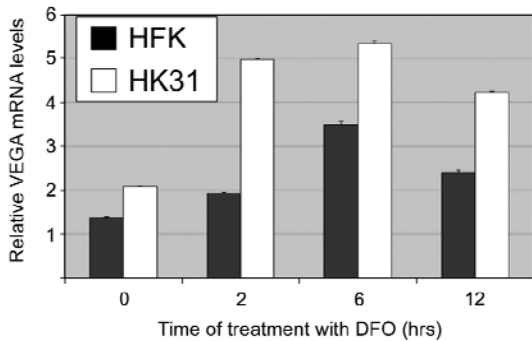
(図3)

HIF-1 応答プロモーターを用いた Luciferase assay では HPV31 cells は HFK (LXSN) に比べ有意に HIF-1 による転写活性が亢進していた(図4)。



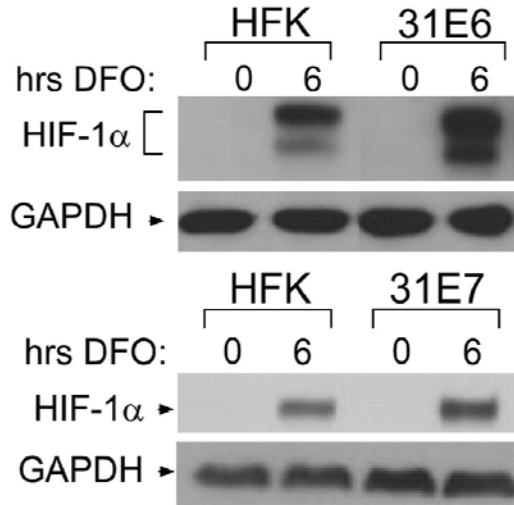
(図4)

HIF-1 のターゲット遺伝子を検索した結果、VEGF の mRNA レベルでの発現上昇が認められた(図5)。



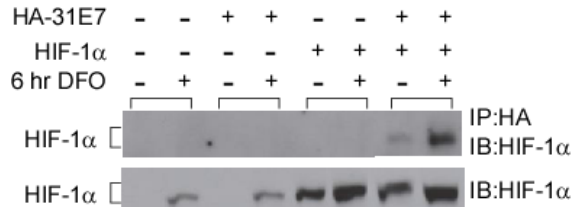
(図5)

HPV31E6cells、HPV31E7cellsの低酸素培養では、両方の細胞においてHIF-1の発現上昇が認められた(図6)。



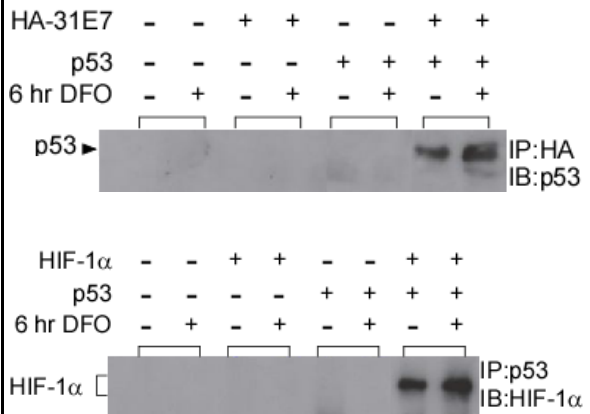
(図6)

そこで、我々はE7に注目しE7とHIF-1とのInteractionについて検討した。E7発現プラスミドを作製し免疫沈降法を行ったところE7とHIF-1αがInteractionしていることが確認された(図7)。



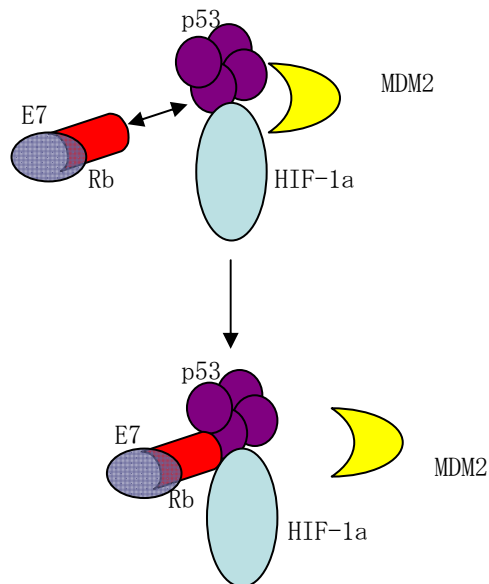
(図7)

詳細なメカニズムを解明するためにp53に注目した。E7がp53の発現を上昇させることが知られていることよりp53発現プラスミドを作製し免疫沈降法を行ったところE7はp53とも、またp53はHIF-1αともInteractionしていることが認められた(図8)。



(図8)

このように E7、p53 そして HIF-1α の 3 因子が相互に関わっていることが明らかとなった。さらなる詳細な検討の結果、E7 が p53 と MDM2 との関与を減弱させることにより HIF-1α との結合を促進させていること、E7 と p53 との結合には E7 の Rb 結合部位が必要であることが明らかとなった。



HPV 感染細胞における HPV の HIF-1 活性化への関与を初めて報告した。本研究は低酸素下での子宮頸癌進展における分子機構の解明や分子標的治療薬の開発に寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Mitsuhiro Nakamura, Jason M. Bodily, Melanie Beglin, Satoru Kyo, Masaki Inoue, and Laimonis A. Laimins. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology*. 2009 May 10; 387(2): 442-448. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 中村 充宏, Hypoxia-inducible factor, HIF-1α, is Induced by Human Papillomavirus Oncoproteins, 25th International Papillomavirus conference, 2009 年 5 月 12 日, Malmo Exhibition & Convention center, マルメ, (スウェーデン)

2. 中村 充宏, 子宮頸癌における HPV 癌遺伝子による HIF-1 活性化の分子機構, 第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 2009 年 4 月 5 日, 国立京都国際会館 (京都府)

3. 中村 充宏, HPV がん遺伝子 E6、E7 による HIF-1α 発現上昇とその意義, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 29 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 充宏 (NAKAMURA MITSUHIRO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号: 50377397