

令和元年6月12日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16839

研究課題名(和文) APOBECを介したHPV発癌機序の解明と発癌予測因子としての応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of APOBEC-mediated HPV carcinogenesis and its application as prognosis factor

研究代表者

若江 亨祥 (Wakae, Kousho)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：70638303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルス(HPV)感染病態における、発癌因子APOBECの発現誘導機構を解明した。HPV16(+)子宮頸部異形成由来細胞の分化により、APOBEC3A及びAPOBEC3Bの発現が誘導され、宿主ゲノムに変異が導入される事が示唆された(Wakae, Sci. Rep. 2018)。またHPV関連癌である子宮頸癌や中咽頭癌検体でも宿主ゲノム変異が導入され、APOBEC3Bの発現と相関した。HPV感染病態において、宿主細胞の分化がAPOBEC発現、及び宿主ゲノム変異を誘導する事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸がんや中咽頭癌の原因ウイルスであるヒトパピローマウイルス(HPV)が、どのような状況で発癌因子APOBECを発現し、遺伝情報を改変するのか、機序の一端を解明した。ウイルス学的・分子生物学的に重要な発見であると共に、HPV-APOBECによる発現機構を解明する事で、HPV関連癌の新しい予防・治療戦略の創出に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We clarified the mechanism how oncogenic host factors, APOBECs, are induced in HPV infected cells. We demonstrated that, differentiation of an HPV16(+) cervical keratinocyte induces APOBEC3A and 3B, as well as mutates host genome (Wakae, Sci. Rep. 2018). In addition, host gene mutations were detected from HPV-associated cancers, including cervical and oropharyngeal cancers, and were correlated with APOBEC3B expression. These results suggested that differentiation of HPV-infected host cells induces APOBECs and mutates their own genome.

研究分野：分子生物学

キーワード：APOBEC HPV 子宮頸癌 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(Human Papillomavirus, HPV) 感染は子宮頸癌や中咽頭癌の原因である。HPV ワクチン接種は海外では著しい成果を挙げているものの、副作用の懸念から本邦では事実上中断している。また既感染者からのウイルス排除は実現していない。持続感染病態、及び発癌病態の詳細な理解が、新規治療戦略を考える上で重要である。

我々は遺伝子改変酵素群 APOBEC ファミリー(Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like)に着目し、HPV 感染及び発癌病態について研究をすすめてきた。APOBEC はレトロウイルスに変異導入活性を有する抗ウイルス分子である一方、宿主ゲノムにも変異を導入する事で発癌因子としても働く。連続的に C-to-U 変異を導入する特徴を持つ(hypermutation)。これまでに以下の知見を得た。

- In vitro で APOBEC は宿主ゲノム及び HPV ゲノムに hypermutation を導入する。また子宮頸部異形成や中咽頭癌といった HPV16 陽性癌検体からも hypermutation は検出される (Wang, J. Virol. 2014, Wakae, Virology 2015)
- HPV16 陽性中咽頭癌にて、APOBEC3A の発現とウイルスゲノム挿入は相関する (Kondo, Oncogene, 2017)
- APOBEC は変異導入活性非依存的に HPV 偽ビリオンの感染を抑制する (Ahasan, Biochem Biophys Res Commun, 2015)

2. 研究の目的

これまでの研究で、APOBEC は HPV 感染の下流で働く発癌因子、及び HPV の増殖を抑える免疫分子としての二面性がある事が判明した。本研究はこれをさらに発展させ、APOBEC の発現誘導機構について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

HPV16(+)子宮頸癌組織、中咽頭癌組織、及び扁桃良性疾患組織を用いて、APOBEC の発現を免疫染色法と RT-PCR 法で評価した。また宿主ゲノム変異について、Differential DNA denaturation PCR(3D-PCR)及び次世代シーケンスにて評価した。

また in vitro での検討として、HPV16(+)子宮頸部異形成細胞株 W12 を in vitro で分化させ、APOBEC の発現を RT-PCR 及びウェスタンブロット 法で、宿主ゲノム変異を 3D-PCR 及び次世代シーケンスにて評価した。

4. 研究成果

(HPV16 陽性細胞の分化により誘導される、APOBEC 発現と宿主ゲノム変異)
HPV16(+)子宮頸癌組織、及び中咽頭癌組織において、ミトコンドリアゲノム変異が 3D-PCR 及び次世代シーケンスにて検出され、A3B の発現と相関を示した(Wakae, Sci. Rep., 2018)。
HPV16(+)子宮頸部異形成由来細胞である W12 の in vitro での分化により、A3A 及び A3B の発現が誘導された。また分化及び A3A, A3B の強制発現により、ミトコンドリア遺伝子 COI に変異が導入される事が示唆された。HPV16 感染細胞では、宿主細胞の分化に同期して APOBEC の発現、宿主ゲノム変異が誘導される事が示唆された。

(加齢による扁桃上皮での発現誘導)

良性疾患(扁桃炎、扁桃周囲膿瘍)での、咽頭扁桃及び口蓋扁桃における APOBEC の発現を評価したところ、A3F, A3G の発現量が年齢と相関する事を発見した(Seishima, Sci. Rep., 2018)。APOBEC の発現量の増加が、加齢による発癌リスクの一因となっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1: Que L, Liu G, Kitamura K, **Wakae K**, Li Y, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Muramatsu M. Molecular characterization of AID-mediated reduction of hepatitis B virus transcripts. Virology. 2017 Oct;510:281-288.
doi: 10.1016/j.virol.2017.07.035.

2: Iizuka T, **Wakae K**, Nakamura M, Kitamura K, Ono M, Fujiwara H, Muramatsu M. APOBEC3G is increasingly expressed on the human uterine cervical intraepithelial neoplasia along with disease progression. Am J Reprod Immunol. 2017 Oct;78(4).
doi: 10.1111/aji.12703.

3: Seishima N, Kondo S, **Wakae K**, Wakisaka N, Kobayashi E, Kano M, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Imoto T, Ishikawa K, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Koura M, Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. Expression and subcellular localisation of AID and APOBEC3

in adenoid and palatine tonsils. Sci Rep. 2018 Jan 17;8(1):918.
doi: 10.1038/s41598-017-18732-w.

4: **Wakae K**, Nishiyama T, Kondo S, Izuka T, Que L, Chen C, Kase K, Kitamura K, Mohiuddin M, Wang Z, Ahasan MM, Nakamura M, Fujiwara H, Yoshizaki T, Hosomochi K, Tajima A, Nakahara T, Kiyono T, Muramatsu M. "Keratinocyte differentiation induces APOBEC3A, 3B, and mitochondrial DNA hypermutation." Sci Rep. 2018 Jun 27;8(1):9745.
DOI: 10.1038/s41598-018-27930-z.

5: Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, **Wakae K**, Nakamura T, Watashi K, Wakita T, Muramatsu M. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. PLoS Pathog. 2018 Jun 21;14(6):e1007124.
doi: 10.1371/journal.ppat.1007124.

6: **若江亨祥**、村松正道、喜多村晃一、「HPV 感染・発癌病態における遺伝子改変酵素群 APOBEC の役割」別冊 Bio Clinica, 4 巻、2017,115-119

7: **若江亨祥**、村松正道、「DNA 脱アミノ化」生体の科学、4 巻、2018,2-3

〔学会発表〕(計 5 件)

1. **Kousho Wakae**, Tomoaki Nishiyama, Satoru Kondo, Takashi Izuka, Mitsuhiro Nakamura, Hiroshi Fujiwara, Tomokazu Yoshizaki, Masamichi Muramatsu, "APOBEC3 hypermutates mitochondrial DNA in HPV16-positive keratinocytes" 第 65 回日本ウイルス学会学術集会

2. **若江亨祥**、西山智明、近藤悟、飯塚崇、中村充弘、藤原浩、吉崎智一、村松正道「APOBEC3 は子宮頸部異形成細胞のミトコンドリア DNA に hypermutation を導入する」NGS 現場の会第五回研究会、2017

3. **Kousho Wakae**, "Role of cytidine deaminase, APOBEC3s, in the pathology of HPV tumorigenesis", Joint Seminar in Zhongshan affiliated hospital of Dalian university, 2018

4. **Kousho Wakae**, Satoru Kondo, Hai Pham, Masamichi Muramatsu, and Tomokazu Yoshizaki "EBV LMP1 alters APOBEC3 expression profile, and hypermutates mitochondrial DNA", 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018

5. **Kousho Wakae**, Satoru Kondo, Takashi Izuka, Mitsuhiro Nakamura, Zhe Wang, Tomoaki Nishiyama, Tomokazu Yoshizaki, Hiroshi Fujiwara, and Masamichi Muramatsu, "ROLE OF APOBEC3 ENZYMES IN THE PATHOLOGY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS", 30th International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir2.html>

アウトリーチ活動
国立感染症研究所一般公開
(2018年9月29日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
研究分担者氏名：若江 亨祥
ローマ字氏名：Wakae Kousho
所属研究機関名：国立感染症研究所
部局名：ウイルス第二部
職名：主任研究官
研究者番号(8桁)：70638303

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。