

研究題目 HPV 陽性扁平上皮癌の増殖に必要な脱ユビキチン化酵素の同定

とその機能解析

研究組織

研究代表者：常松 貴明（徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：石丸 直澄（徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野）

工藤 保誠（徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔生命科学分野）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ヒトパピローマウイルス(HPV)陽性扁平上皮癌は子宮頸癌と頭頸部癌のみにみられる特徴的な癌である。一般に癌は遺伝子異常の蓄積より発生するが、本腫瘍はハイリスク HPV の感染に伴ってウイルス由来のタンパクが宿主タンパクの新たな機能の獲得や阻害を誘導し、発癌に至ると考えられている。これまでの報告から HPV は宿主側のユビキチンシグナル経路をより好んで標的としているように思われるが、ウイルスタンパク自体を標的とする治療法やウイルスタンパクによって影響を受ける宿主側のタンパクを標的とした分子標的治療は確立されていない。そこで本研究では酵素であるため阻害薬開発に直結する脱ユビキチン化酵素に着目して、その阻害によって HPV 陽性扁平上皮癌特異的に細胞死を誘導できる分子を同定し、その分子基盤を確立することを目的とする。

[1-2] 研究の方法・経過

これまでに研究グループでは、ヒトでは存在するすべての脱ユビキチン化酵素に対する siRNA ライブラリを用いて、HPV 陽性扁平上皮癌細胞株および HPV 陰性扁平上皮癌細胞株に遺伝子導入し、MTT assay によって HPV 陽性扁平上皮癌特異的に細胞傷害性を示す siRNA のスクリーニングを実施した（図 1）。スクリーニングの結果、いくつかの候補分子を得たため、候補分子の siRNA を用いて、複数の細胞株に対

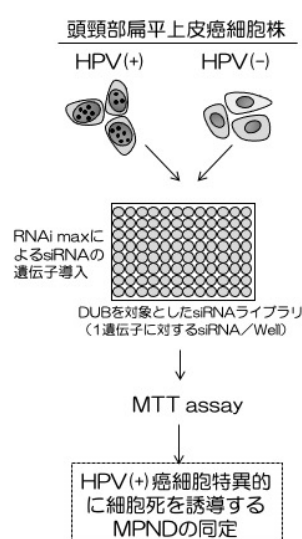


図1

し、遺伝子導入することで検証実験を行なった。その結果、MPN domain containing (MPND) と呼ばれる報告のほとんどない分子に絞られた。

生化学的な解析を行なったところ、MPNDはHPV由来癌タンパク質として知られるE6やE7と*in vivo*および*in vitro*で

複合体を形成することが明らかとなった。しかしながら、MPNDのHPV陽性扁平上皮癌における役割は不明なままである。そこで、本共同利用では先端酵素学研究所の小迫英尊教授と共同でHPV感染によってMPNDと結合する分子をプロテオーム解析によって同定し、その機能解析を含めた役割を解明するという本研究計画の着想に至った。

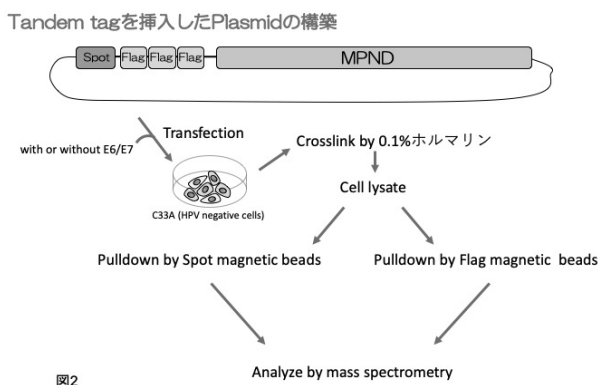
具体的な研究方法としては、MPND遺伝子にタンデムにSpot-tagおよび3xFlag-tagを付与し、HPV陽性および陰性癌細胞株に遺伝子導入した細胞株を作成する。作成後、Spot-Trap Magnetic agaroseおよびFlag M2 Magnetic beadsを用いてそれぞれMPND複合体を精製、マスマスペクトロメトリーにてプロテオーム解析を行う。得られた結果より、Spot-tagおよびFlag-tag

で同定されたペプチドを比較・検討し、いずれの tag、いずれの細胞株でも同定された分子を MPND の相互作用分子候補、さらに HPV 陽性癌細胞特異的に検出された分子を HPV の感染によって MPND が新たに獲得した相互作用分子候補とする。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

2020 年度の本共同利用では、上述の研究計画に基づいて、図に示す Plasmid を構築し、プロテオーム解析を実施した（図 2）



プロテオーム解析の結果、HPV 由来癌タンパク E6 が結合し、ユビキチンリガーゼとして働くことが知られる E6-AP などの HPV 感染関連タンパク質が複合体に含まれていた。加えて、興味深いことに、最近、頭頸部癌や子宮頸癌の発癌過程において中心的な役割を担うことが報告されつつある Yes1 Associated Transcriptional Regulator (YAP1) も含まれていた。現在、主に生化学的手法を用いて MPND、HPV 由来癌タンパク質 E6 および E7、YAP1 の関係性と意義を解析中である。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同利用によって、HPV 陽性扁平上皮癌における MPND の新たな役割が明らかとなりつつある。将来的には MPND を標的とした *in vitro* の阻害剤スクリーニングを実施し、HPV 陽性扁平上皮癌の新たな分子標的療法の確立につなげていきたい。

本着想は脱ユビキチン化酵素の *in vitro* の阻害剤スクリーニングを実施している米国バージ

ニア大学 Anindya Dutta 教授との 2020 年度国際共同研究加速基金 国際共同研究強化 (A) の採択につながったため、本共同利用および国際共同研究を通じて大きく発展していくことが見込まれる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし

[3-2] 学会発表
なし

[3-3] 成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

研究者らの生化学的解析から、MPND が E6 や E7 と結合する複合体を精製する際に、ソニケーションを加えると、その効率が著明に上昇することを見出している。2020 年度の共同利用で実施したプロテオーム解析では低濃度のホルマリンによるクロスリンク後に DNase によって、DNA 断片化したが、不十分であった可能性が高い。そこで、次年度以降にソニケーションを行なったサンプルを用いて同様のプロテオーム解析を実施することで、今年度の研究結果の検証ならびにより多くの情報を得ることができると考えている。