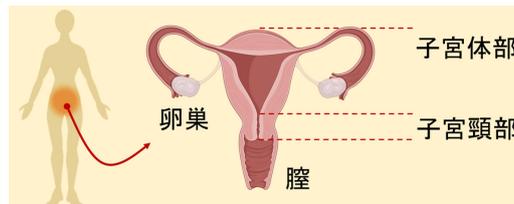


悪性度の高い子宮頸癌の原因となる HPV18 型の標的細胞とウイルス複製の特徴を解明

発表のポイント

- ◆悪性度の高い子宮頸癌の原因となる HPV18 型の初期プロモーター活性を発光強度で測定する新たなシステムを開発しました。
- ◆患者由来の正常な子宮頸部のオルガノイドに同システムを導入することに成功し、HPV18 型のウイルス複製に関わる因子としてヒストンシャペロン蛋白である NPM3 を同定しました。
- ◆本研究で開発したシステムは他の型の HPV 感染症の研究に応用できる可能性があるほか、NPM3 の解析が HPV18 型発癌の機序解明や予防法・治療法の開発につながっていくことが期待されます。



子宮下部から膣の間に位置する子宮頸部

概要

東京大学医学部附属病院女性診療科・産科の田口歩届出研究員、東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻の豊原佑典大学院生、曾根献文准教授、大須賀穰教授ならびに、早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の松永浩子次席研究員、早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻の竹山春子教授らの研究グループは、子宮頸癌（注 1）の原因となるヒトパピローマウイルス（HPV、注 2）の中でも悪性度の高い癌の原因とされる HPV18 型の標的細胞に注目し、HPV18 型の複製に関与する細胞内分子 NPM3（注 3）の同定に成功しました。

子宮頸癌は、HPV が子宮頸部の SCJ 部位（図 1）に感染すると細胞内で HPV 初期プロモーターという遺伝子領域が活性化します。本研究グループは、HPV18 型初期プロモーター下流に発光蛋白遺伝子を組み込んだベクターを作製し、患者由来の SCJ オルガノイド（注 4）に導入する世界初の実験を行いました。さらに、次世代シーケンサー（注 5）を用い、シングルセル解析（注 6）によって、初期プロモーターが活性化した個々の細胞の特徴を解析しました。これにより、SCJ の中でもより未分化な細胞内で HPV18 型初期プロモーターが活性化しやすいことや、ヒストンシャペロン蛋白（注 7）である NPM3 が HPV18 型ウイルスの複製に関わっていることを解明しました。

本研究成果は、日本癌学会誌「Cancer Science」の本掲載に先立ち、11 月 24 日にオンライン版で掲載されました。

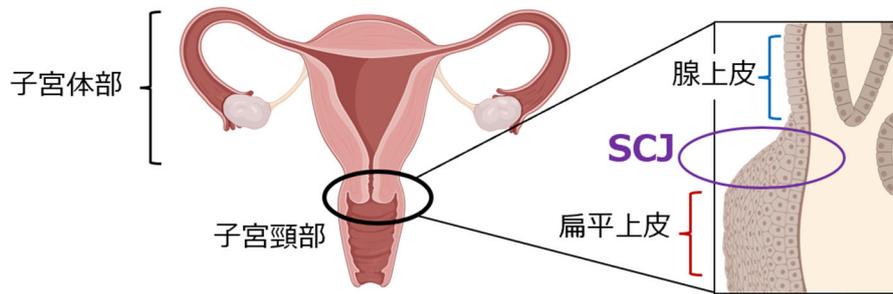


図 1：子宮頸部と SCJ

子宮は子宮体部と子宮頸部に大別され、出入り口にあたる子宮頸部は腔から連続する扁平上皮と子宮内膜から連続する腺上皮の移行部にあたり、SCJ（Squamocolumnar junction）と呼ばれます。

発表内容

(1) 研究の背景

日本では子宮頸癌ワクチンの普及の遅れから若い世代の罹患者数が増加しており、ワクチンによる一次予防とともに、HPV 感染後の子宮頸癌への進行予防法や治療法の開発が重要視されています。性交渉により HPV が SCJ に侵入し、細胞内で HPV の初期プロモーターが活性化することで感染が成立します。また、HPV には高リスク型と低リスク型があり、高リスク型の感染で子宮頸癌へ進展するリスクが高まります。高リスク型は約 13 種類知られており、特に HPV18 型は、前がん病変で見つかりにくく、悪性度の高い腺癌や小細胞癌で見つかる頻度が高い管理が難しい HPV です。本研究では、HPV18 型の感染標的細胞を同定し、感染成立や癌化の機構を解明するため、初期プロモーターの活性化に着目しました。患者さんから採取した検体の一部を特殊な環境下で三次元培養を行う手法で、人体臓器に模した小さな三次元培養（ヒト由来 SCJ オルガノイド）を作り出し、HPV プロモーターの活性を測定しました。

(2) 研究の内容

婦人科癌手術を受けた患者さんから、正常と考えられる子宮頸部の SCJ の一部を採取し、オルガノイド培養を行い（SCJ オルガノイド）しました。まず、オルガノイドと正常子宮頸部 SCJ を対象に空間的位置情報を確認した上で、微小領域の遺伝子発現プロファイルを評価し、培養した SCJ オルガノイドが子宮頸部 SCJ の性質を有することを確認しました。次に、HPV18 型の初期プロモーターに注目し、初期プロモーターの活性を担う領域（LCR：Long control region）に発光蛋白遺伝子を繋いだベクターを作製しました。初期プロモーターが活性化すると発光するので、プロモーターの活性化を発光強度で測定できるシステムです（図 2）。このベクターを SCJ オルガノイドに導入しました。

導入後、細胞を 1 細胞ごとに分け、シングルセルソーティングで細胞の発光強度を測定し、発光細胞と非発光細胞を分取しました。ひとつひとつの細胞を個別に解析し、発光細胞と非発光細胞を比較することで、HPV18 型初期プロモーターが活性化した細胞の特徴が示されました（図 3）。その結果、169 個の遺伝子において HPV18 型初期プロモーターが活性化した細胞で有意に発現上昇していることがわかりました（図 4）。

この 169 個の遺伝子のうち、特に重要な遺伝子を探すため、HPV18 型が複製するヒト上皮由来の細胞（NIKS 細胞）で候補遺伝子の発現を低下させる実験を行ったところ、ヒストンシャペロン蛋白である NPM3 という遺伝子が HPV18 型の複製に重要であることが示唆されました。

NPM3 は未分化幹細胞で多く発現することが報告されていますが、本研究でも、NPM3 の遺伝子発現を低下させると細胞の分化能に関する遺伝子の発現が低下する傾向にありました。

以上のことから、HPV18 型初期プロモーターが活性化しやすい細胞が SCJ の未分化な細胞であること、そして NPM3 が未分化性の維持と HPV18 型の複製に関与していることが示唆されました。従来、HPV が SCJ の細胞の中でも特に未分化細胞に感染することで、癌化すると考えられてきましたが、本研究によって、ヒトの生体に近いオルガノイドでそれが裏付けられました。

(3) 今後の展望

本研究では子宮頸部 SCJ オルガノイドで HPV18 型初期プロモーター活性を測定する世界初の実験を行い、HPV 感染細胞を同定しました。このシステムは今後、HPV 感染症研究への幅広い応用が期待できます。また、NPM3 が HPV18 型の初期複製にどのように関わるかを明らかにすることで、HPV18 型による発癌の機序解明、予防法・治療法の開発に繋がる知見が得られる可能性があります。

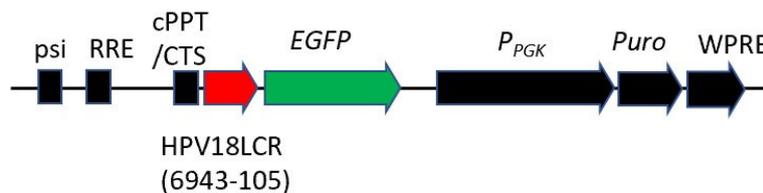


図 2 : HPV18 型 LCR レンチウイルスベクター

HPV18 型の LCR が活性化すると、その下流の EGFP（蛍光）が発現し、発光するシステムを構築しました。

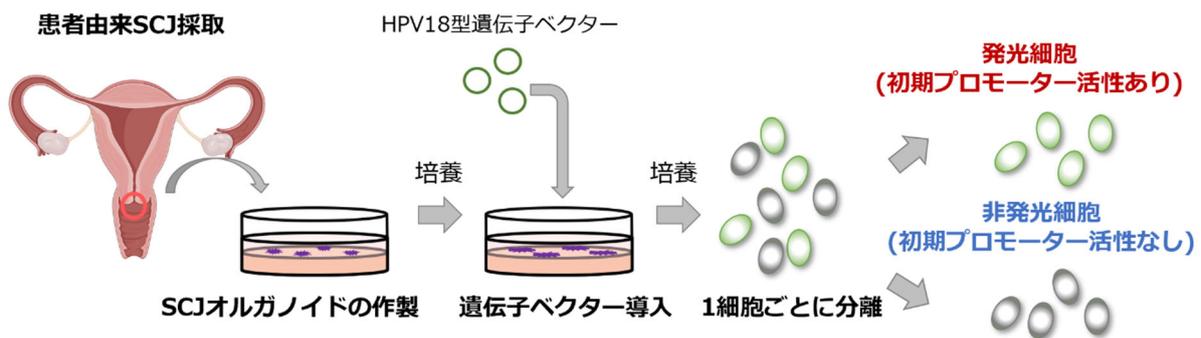


図 3 : 本研究の流れ

患者由来の SCJ オルガノイドを作製し、HPV18 型の初期プロモーターの遺伝子導入を行った後、1 細胞ごとに分離し、発光細胞と非発光細胞へ振り分け、それぞれの細胞のシングルセル解析を行いました。

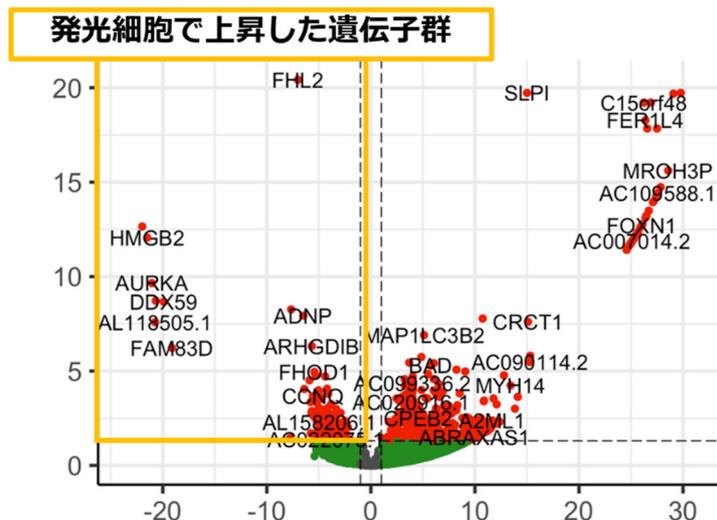


図 4 : シングルセル解析による初期プロモーター活性細胞の特徴

発光細胞と非発光細胞のシングルセル解析結果を比較すると、初期プロモーター活性のある発光細胞で 169 遺伝子の発現が有意に上昇していることがわかりました（図の遺伝子名は 169 遺伝子の一部、これらの中に NPM3 も含む）。

発表者・研究者等情報

東京大学

医学部附属病院 女性診療科・産科

田口 歩 届出研究員（医師）

兼：大阪大学免疫学フロンティア研究センター 特任研究員

研究当時：東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科 助教

大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

豊原 佑典 大学院生（医学博士課程）

曾根 献文 准教授

兼：医学部附属病院 女性外科

大須賀 穰 教授

兼：医学部附属病院 女性外科

早稲田大学

ナノ・ライフ創新研究機構

松永 浩子 次席研究員

大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

竹山 春子 教授

論文情報

雑誌名：Cancer Science

題名：Identification of target cells of human papillomavirus 18 using squamocolumnar junction organoids

著者名 : Yusuke Toyohara, Ayumi Taguchi*, Yoshiyuki Ishii, Daisuke Yoshimoto, Miki Yamazaki, Hiroko Matsunaga, Kazuma Nakatani, Daisuke Hoshi, Saki Tsuchimochi, Misako Kusakabe, Satoshi Baba, Akira Kawata, Masako Ikemura, Michihiro Tanikawa, Kenbun Sone, Mayuyo Uchino-Mori, Tetsuo Ushiku, Haruko Takeyama, Katsutoshi Oda, Kei Kawana, Yoshitaka Hippo, Yutaka Osuga (*責任著者)

DOI : 10.1111/cas.15988

研究助成

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 新興・再興感染症研究基盤創生事業 (多分野融合研究領域) 「単一細胞解析技術の統合による HPV18 型幹細胞発癌機構の解明 (課題番号: 23wm0325057h0001)」 (研究代表者 田口歩)、新興・再興感染症研究基盤創生事業 (多分野融合研究領域) 「新規培養技術を用いた、扁平腺接合部細胞における高悪性度 HPV18 型の潜伏持続感染および発癌機構の解明 (課題番号: 20wm0325014h0001)」 (研究代表者 田口歩)、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) 「1 細胞/微小組織マルチオミックスのオールインワン解析による生命科学研究の支援 (課題番号: JP22ama121055)」、創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (BINDS) 「創薬等支援のための 1 細胞・微小生体組織のトランスクリプトーム解析 (課題番号: JP21am0101104)」、科研費「子宮頸癌の起源細胞の同定と、発癌・分化機構の解明 (課題番号: 22K16853)」 (研究代表者 河田啓) の支援により実施されました。

用語解説

(注 1) 子宮頸癌

子宮頸部から発生する癌です。ヒトパピローマウイルスの感染が原因とされています。

(注 2) ヒトパピローマウイルス (HPV: Human papillomavirus)

子宮頸癌をはじめ、頭頸部癌などさまざまな癌の原因となるウイルスです。子宮頸癌では性交渉を契機に感染が樹立するとされます。

(注 3) NPM3 (ヌクレオフォスミン (NPM: Nucleophosmin))

ヒストンシャペロン蛋白のひとつ。未分化な細胞での発現が高いという報告があります。

(注 4) オルガノイド

これまでの基礎研究はヒト由来の不死化された細胞株やマウスなどの代替生物を利用する方法が主流でしたが、近年、患者由来オルガノイド培養という新たな手法が開発されました。患者由来組織を用いた特殊な細胞培養方法で、従来法より人体に近い環境での細胞培養が可能です。

(注 5) 次世代シーケンサー

DNA/RNA の配列を読み取る技術です。

(注 6) シングルセル解析

次世代シーケンサーの技術革新により、ひとつひとつの細胞ごとの DNA/RNA 配列を読み取ることができる技術です。

(注7) ヒストンシャペロン蛋白
遺伝子であるDNAが格納されるヒストンと呼ばれる蛋白の解離会合に関連する補助的な蛋白。

問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学医学部附属病院

女性診療科・産科 届出研究員 田口 歩 (たぐち あゆみ)

女性外科 准教授 曾根 献文 (そね けんぶん)

* 本研究に関すること

早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

教授 竹山 春子 (たけやま はるこ)

* 解析技術に関すること

<広報担当連絡先>

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター

担当：渡部、小岩井

Tel : 03-5800-9188 E-mail : pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

早稲田大学 広報室 広報課

担当：猪俣、時任

Tel : 03-3202-5454 E-mail : koho@list.waseda.jp