

<特集「子宮頸がん診療における最新の話題」>

ヒューマンパピローマウイルスの最新の話題

中 屋 隆 明*

京都府立医科大学大学院医学研究科感染病態学

Research Topics on Human Papilloma Viruses

Takaaki Nakaya

Department of Infectious Diseases,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

感染症が関係する悪性腫瘍は実に17.8%に上る(2002年調べ)ことが報告されている¹⁾。その中で、約3割がヘリコバクターピロリ感染であるが、B型およびC型肝炎ウイルス感染による肝臓がん(27.5%)以上に多いのがヒトパピローマウイルス(human papilloma virus:HPV)感染(29.2%)によるがんである¹⁾。HPVは皮膚または粘膜の上皮に乳頭腫(papilloma)あるいは異形成(dysplasia)を誘発する²⁾³⁾。本稿では、HPVの最新の話題の中で、腫瘍原性に関係するウイルスタンパク質であるE6の立体構造解析とHPVのメタゲノム研究を取り上げて紹介する。

キーワード: ヒトパピローマウイルス, E6 タンパク質, オンコプロテイン, メタゲノム。

Abstract

An estimated 17.8% of the total global cancer, in the year 2002, may have been caused by microbe infections¹⁾. The most frequent cause is the bacterium *Helicobacter pylori* (about 30%), and other major agents are two viral infections, human papilloma viruses (29.2%) and hepatitis B and C viruses (27.5%)¹⁾. HPV's have been well-characterized as causative agents of cervical cancer³⁾, and almost all cervical carcinomas contain genome-integrated HPV expressing E6/E7 oncoproteins⁴⁾. Two topics of recent HPV research: structural analysis of HPV-E6⁴⁾⁵⁾ and metagenomic research on viral infection in healthy humans⁶⁾⁷⁾, are selected in this article.

Key Words: Human papilloma virus, E6, Oncoprotein, Metagenome.

HPVの粒子構造と生活環

HPVは約8,000塩基のゲノムを持つ環状2本鎖のDNAウイルスで、非エンベロープ性の正二十面体のキャプシド構造を有する比較的小型のウイルスである。HPVゲノムは複製起点やプロモーター配列を含むURR (upstream regulatory region) と呼ばれる制御領域、初期遺伝子領域、および後期遺伝子領域より構成されている²⁾。全ORFは片方のDNA鎖(センス鎖)上に存在しており、初期遺伝子領域にはウイルスの増殖に役割を持つ6個の遺伝子(E1, E2, E4, E5, E6, E7)がコードされ、後期遺伝子領域にはウイルスキャプシド蛋白(L1, L2)がコードされている²³⁾。

遺伝子型は多様であり、これまでに176型のHPVが分離され、HPVデータベース (<http://pave.niaid.nih.gov>, <http://www.hpvcenter.se>) に登録されている⁷⁾。その中で疫学的にがんとの関連が指摘されている高リスク型 (high risk HPV: hrHPV) は16および18型を含む約30タイプであり、主としてHPVの2つの遺伝子E6とE7が発がんに関与すると考えられている²³⁾。一方、尖圭コンジローマ等の良性病原形成にとどまる低リスク型 (low risk HPV: lrHPV) と区別される²³⁾。

HPVは重層扁平上皮組織の中で唯一分裂能を有する基底細胞に感染し、感染巣を形成する。その感染細胞では50~100コピー(分子)程度のウイルスゲノムが核内エピゾームとして複製維持され、基底細胞層の上皮幹細胞において潜伏感染状態を維持すると考えられている²³⁾。感染細胞内では、上述したオンコプロテインであるE6とE7を含めたウイルス遺伝子発現は低く維持されている²³⁾。しかしながら、宿主細胞が上層へと移行し分化するのに伴い、ウイルス遺伝子発現量が数百倍から数千倍に増加する²³⁾。このような分化細胞はDNA合成(S)期が存在せず、細胞周期を逸脱している²³⁾。それに対して、DNAポリメラーゼなど複製に必要な因子を宿主に依存しているHPVは、宿主の細胞周期に対して様々な関与を行うことによってS期を確保

し、自らの複製を行うと考えられている²³⁾。

そのウイルス側因子の一つとして挙げられるのが約150アミノ酸から構成されるE6タンパク質であり、hrHPVのE6はp53⁸⁾やE3ユビキチンリガーゼE6AP⁹⁾と相互作用する。その結果、E6とE6APおよびp53と複合体を形成し、E6APの基質特異性を変化させることにより、プロテアソームによる(ユビキチン化による)p53の分解を促進し、アポトーシスを抑制する¹⁰⁾¹¹⁾。また、E6はE6APの関与なくp53を分解すること¹²⁾や、それはユビキチン化によるプロテアソーム分解とは異なるメカニズムによること¹³⁾も報告されている。このp53の分解はhrHPVに共通に見られ、他の遺伝子型のHPVではほとんど見られないことから⁴⁾、がん化との関連が強く示唆される。さらに、E6はp53の転写共役因子であるCBP/p300とも結合し、その機能を抑制することでp53経路を二重に遮断していると考えられている²³⁾。さらにE6は上述した作用以外にも、アポトーシス誘導に関与するBak¹⁴⁾、FADD24¹⁵⁾およびpro-caspase 8¹⁶⁾¹⁷⁾と結合することによって、これらの働きを阻害することが報告されている²³⁾¹⁸⁾。

加えて、E6タンパク質はテロメラゼを直接活性化あるいは間接に活性化(E6がテロメラゼ逆転写酵素(TERT)プロモーターの転写抑制因子を分解)することが報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。TERT発現誘導は、テロメア長の維持による不死化の必要条件の1つである。その一方で、湯川博士らは、TERT発現のウイルス学的意義として、1つの感染細胞から肉眼病変を形成し長期間維持するために有利に働く可能性と、テロメア長非依存的に細胞増殖を活性化する可能性、の双方を指摘している²⁾。

HPVの構造と生活環の詳細については、本稿でも引用した湯川恭至・清野透博士らの日本語総説²⁾ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374192>)を参考にされたい。

HPVのE6タンパク質の立体構造解析

E6はそれ自身に酵素活性はないものの、上記以外にも様々なタンパク質と相互作用(結合)することが近年次々と明らかにされており¹⁸⁾、

その多機能性および結合様式に注目が集まっている。E6はシステインリッチなタンパク質であり、各々 zinc-binding (亜鉛結合) ドメインを有する E6N と E6C と呼ばれる領域から構成されている。E6 (E6C) は E6AP に存在する LxxLL (x は任意のアミノ酸) などのロイシンリッチモチーフを介して結合する⁹⁾²¹⁾。このような E6 の結合様式は、E6AP 以外のインターフェロン制御因子 3 (interferon regulatory factor-3c²²⁾ や notch のコ・アクチベーターである MAML 1²³⁾²⁵⁾ などでも報告されている。また、hrHPV の E6 は、PDZ (PSD95-DlgA-Zo1) ドメインを持つ PDZ タンパク質 [以前は DHR (Dlg homologous region) や GLGF (glycine-leucine-glycine-phenylalanine) と表記] と C 末端の PDZ 結合モチーフ (PDZ-BM) を介して相互することが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。

最近になって、E6 と LxxLL モチーフならびに PDZ ドメインとの結合に関する構造解析の報告が相次いだ²⁾⁴⁾⁵⁾²⁸⁾。フランスの 2 つの研究機関 (IGBMC/INSERM およびフランス国立科学研究センター) と米国ヴァージニア大学の研究者らは HPV16 の E6 と E6AP の LxxLL モチーフ (12 アミノ酸: E¹L²T³L⁴Q⁵E⁶L⁷L⁸G⁹E¹⁰E¹¹R¹²) との結合、ならびに (HPV16 と同じくがんを誘発する) ウシパピローマウイルス 1 型 (BPV1) とパキシリン LxxLL モチーフ (10 アミノ酸: M¹D²D³L⁴D⁵A⁶L⁷L⁸A⁹D¹⁰) との結合を結晶化し、X 線回折による立体構造の解明に成功した⁵⁾。これまでに E6N および E6C の構造解析は、(同研究グループも含めた) 複数の報告があるもの²⁸⁾²⁹⁾、タンパク質全体 (と LxxLL モチーフとの結合) の結晶化はその自己集合性ゆえに困難であった。研究者らは、LxxLL にマルトース結合タンパク質をキャリアとして結合させ、また E6 の二量体化を抑制するアミノ酸変異を E6 に導入するなどこれまでの知見を基盤とした試行錯誤を積み重ねることにより、大腸菌を用いた組換えタンパク質 (モノマー) の可溶性に成功した⁵⁾ことがこの成果につながった。構造解析の結果、E6AP およびパキシリンの LxxLL は、E6 の LxxLL 結合ポケット (LxxLL-binding pocket) と呼ばれる窪みにはまり込み、その構造は異なる

二つの (がんを誘引する) パピローマウイルス (HPV16 と BPV1) 間で類似していることが明らかとなった⁵⁾。したがって、この LxxLL 結合ポケットが腫瘍原性に重要であり、治療薬の標的となることが示唆された⁵⁾。

一方、ドイツのフリッツリップマン研究所 (Leibniz Institute for Age Research-Fritz Lipmann Institute) の研究グループは NMR を用いて hrHPV の一つである HPV51 の E6 (E6C) と PDZ タンパク質であるヒト Dlg (hDlg1/SAP-97) との結合構造を明らかにした⁴⁾。上記したフランス-米国の研究グループは自己集合性を抑える変異 (F47R) を E6 に導入したが、この変異タンパク質は p53 結合性が欠損するなど、腫瘍原性につながる機能を失活していた。そこでドイツの研究グループは“野生型”の E6 タンパク質の構造を基に E6 の PDZ-BM と hDlg の PDZ ドメイン 2 との結合を解析し、PDZ-BM 構造の hrHPV-E6 間での共通性と個々のウイルス間での特異性を見出した⁴⁾。

これらの知見を併せ、E6 タンパク質の標的分子との結合性が解明されつつあり、E6 の C 領域に位置する LxxLL 結合領域と PDZ 結合モチーフ、および E6 の N 領域に存在する自己集合 (p53 結合に必要な) 領域は各々重なることがない (おそらく同時にそれぞれ標的因子と結合する) ことが明らかとなった⁵⁾。

HPV のメタゲノム研究

最近、米国ニューヨーク大学の研究グループは、NIH のヒトマイクロバイオームプロジェクト (Human Microbiome Project: HMP) のデータベースを用いて HPV 関連疾患の病歴がない、103 名のボランティアの微生物叢 (マイクロバイオーム: 通常は細菌を指すことが多いが、ここではウイルスを標的としている) のメタゲノム解析を行った⁷⁾。HMP は、健康状態にあるヒトのマイクロバイオームを解析することを目的としている (<http://commonfund.nih.gov/hmp/index>)。

以下にその概要について紹介する。ボランティアの検体 (男性 129 名: 15 か所, 女性 113 名:

18か所)より抽出したDNAから、ヒト遺伝子断片も含めた全ゲノムを断片化した非特異的なショットガンシーケンスを行う。加えて、細菌ゲノムのタイピングをより正確に行うために、16SリボゾームRNA(16SrRNA)のvariable領域をPCRにて増幅し(増幅には16SrRNAのユニバーサルプライマー:高度保存領域を用いる)、そのPCR産物を次世代シーケンサー等を使ってハイスループット(超並列的)に遺伝子配列を解読し、NCBIなどの遺伝子バンクに登録された遺伝子と照合(相同性検索)することにより、細菌の属、あるいは種を同定するものである(<http://www.nih.gov/news/health/jun2012/nhgri-13.htm>)。

HMPのデータベースは1,000塩基以下の塩基配列のデータであることが多く、同研究グループは、これらショットガンシーケンス解析方法にて得られた塩基配列の中から、HPVと相同性の高い塩基配列をHPVとして解析した。その結果、HPVの陽性率は皮膚が最も高く(61.3%)続いて膣(41.5%)、口腔(30%)、および腸管(17.3%)と続いた⁷⁾。これまでのPCRによる遺伝子診断では、北米の健常女性の膣からのHPV検出率は約20~45%³⁰⁾、口腔における陽性率は平均11%(0~81%)⁷⁾という報告があり、これらの結果に比べると高い数字となっている。その原因として著者らは、1)これまでの検査より多い部位を検査対象とした(3~4器官から8か

所程度)ことにより検出率が上昇した可能性、および、2)メタゲノム解析ではPCR検出領域(あるいはPCRプライマーが結合する遺伝子配列)以外のウイルスゲノムも検出対象とするために検出率が上昇した可能性、を考察している⁷⁾。その一方で、当該研究で検出した109に上るHPVの多くは、(臨床検査で用いられている)hrHPV陰性の検体由来であったことなどから、著者らは検出したHPVの多くは、「HPVの持続的な感染」というよりは、「一過性のHPV暴露」である可能性や同一感染者複数の器官・部位に感染した検体(の解析が重複することにより)検出率を上げている可能性もあると考えている⁷⁾。

もし、上述したような“non-oncogenic”なHPVが多くのヒトに感染しているとなると、そのようなウイルス(集団)がhrHPVの感染を増長(免疫システムの不活化等)させるのか、あるいは減少(交差免疫応答やウイルス干渉等)させるのか⁷⁾について興味を抱くところである。本稿で紹介したようなメタゲノム研究は、近年急速に発展した次世代シーケンサーの普及、能力の向上によるところを大きく、新しいデータ解析法も次々と提案されている⁶⁾。今後、メタゲノム研究方法のデータ集積およびその検証と改良が進むにつれ、HPV感染のより詳細な姿が明らかになると考えられる。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year. *Int J Cancer* 2002; 118: 3030-3044.
- 2) Yugawa T, Kiyono T. [Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses]. *Uirusu* 58: 141-154.
- 3) Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009; 19: 97-113.
- 4) Mischo A, Ohlenschlager O, Hortschansky P, Ramachandran R, Gorlach M. Structural in-sights into a wildtype domain of the oncoprotein E6 and its interaction with a PDZ domain. *PLoS One* 2013; 8: e62584.
- 5) Zanier K, Charbonnier S, Sidi AO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontagne P, Cura V, Brimer N, Babah KO, Ansari T, Muller I, Stote RH, Cavarelli J, Vande Pol S, Trave G. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science* 2013; 339: 694-698.
- 6) Dimon MT, Wood HM, Rabbitts PH, Arron ST. IMSA: integrated metagenomic sequence analysis for identification of exogenous reads in a host genomic

- background. *PLoS One* 2013; 8: e64546.
- 7) Ma Y, Madupu R, Karaoz U, Nossa CW, Yang L, Yooseph S, Yachinski PS, Brodie EL, Nelson KE, Pei Z. Human Papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of HMP (human microbiome project) shotgun sequencing datasets. *J Virol* 2014; 88: 4786-4797.
 - 8) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
 - 9) Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4918-4927.
 - 10) Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75: 495-505.
 - 11) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.
 - 12) Massimi P, Shai A, Lambert P, Banks L. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene* 2008; 27: 1800-1804.
 - 13) Camus S, Menendez S, Cheok CF, Stevenson LF, Lain S, Lane DP. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papilloma-virus protein E6. *Oncogene* 2007; 26: 4059-4070.
 - 14) Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 6): 1513-1517.
 - 15) Tungteakkhun SS, Filippova M, Neidigh JW, Fodor N, Duerksen-Hughes PJ. The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain. *J Virol* 2008; 82: 9600-9614.
 - 16) Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, Williams K, Duerksen-Hughes PJ. The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* 2007; 81: 4116-4129.
 - 17) Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1915-1926.
 - 18) Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 2013; 445: 115-137.
 - 19) Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384: 324-334.
 - 20) Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R, Schlegel R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 18780-18785.
 - 21) Chen JJ, Hong Y, Rustamzadeh E, Baleja JD, Androphy EJ. Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6. *J Biol Chem* 1998; 273: 13537-13544.
 - 22) Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998; 12: 2061-2072.
 - 23) Rozenblatt-Rosen O, Deo RC, Padi M, Adelmant G, Calderwood MA, Rolland T, Grace M, Dricot A, Askenazi M, Tavares M, Pevzner SJ, Abderazzaq F, Byrdsong D, Carvunis AR, Chen AA, Cheng J, Correll M, Duarte M, Fan C, Feltkamp MC, Ficarro SB, Franchi R, Garg BK, Gulbahce N, Hao T, Holthaus AM, James R, Korkhin A, Litovchick L, Mar JC, Pak TR, Rabello S, Rubio R, Shen Y, Singh S, Spangle JM, Tasan M, Wanamaker S, Webber JT, Roecklein-Canfield J, Johannsen E, Barabasi AL, Beroukhim R, Kieff E, Cusick ME, Hill DE, Munger K, Marto JA, Quackenbush J, Roth FP, DeCaprio JA, Vidal M. Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins. *Nature* 2012; 487: 491-495.
 - 24) Brimer N, Lyons C, Wallberg AE, Vande Pol SB. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene* 2012; 31: 4639-4646.
 - 25) Tan MJ, White EA, Sowa ME, Harper JW, Aster JC, Howley PM. Cutaneous beta-human papillomavirus E6 proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: E1473-1480.
 - 26) Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaic V, Massimi P, Nagasaka K, Kranjec C, Gammoh N, Banks L. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene* 2008; 27: 7018-7030.

- 27) Muench P, Hiller T, Probst S, Florea AM, Stubenrauch F, Iftner T. Binding of PDZ proteins to HPV E6 proteins does neither correlate with epidemiological risk classification nor with the immortalization of foreskin keratinocytes. *Virology* 2009; 387: 380-387.
- 28) Zanier K, OuldM'hamedou Sidi A, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Trave G. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure* 2012; 20: 604-617.
- 29) Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibling AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* 2006; 21: 665-678.
- 30) Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297: 813-819.

著者プロフィール



中屋 隆明 Takaaki Nakaya

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科感染病態学・教授

略 歴：1990年3月 北海道大学 農学部卒業

1995年2月 同大学 大学院医学研究科 博士課程中退

1995年3月 同大学免疫科学研究所血清学部門助手

1998年4月 アメリカ合衆国 マウントサイナイ医科大学留学

2002年4月 京都府立医科大学医学部微生物学教室助手

2005年9月 大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター 特任助教授

2011年12月 京都府立医科大学 大学院医学研究科 感染病態学教授

現在に至る

専門分野：ウイルス学, 感染症メタゲノム学

- 主な業績：1. Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Kawashita N, Ramadhany R, Yang CS, Yasunaga T, Iida T, Horii T, Ikuta K, Nakaya T. Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010. *PLoS ONE* 2012; e30946.
2. S Ueda M, Daidoji T, Du A, Yang CS, Ibrahim MS, Ikuta K, Nakaya T: Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca²⁺ influx, leading to apoptosis in avian cells. *J Virol.* 2010; 84: 3068-78.
3. Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T: Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PLoS ONE.* 2009; 4: e4219.
4. Daidoji T, Koma T, Du A, Yang CS, Ueda M, Ikuta K, Nakaya T: H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells. *J Virol.* 2008; 82: 11294-307.