

Title	Induction of uterine cervical neoplasias in mice by human papillomavirus type B16 E6/E7 genes.
Author(s)	笹川, 寿之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37957
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	さき がわ とし ゆき 笹 川 寿 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 2 0 4 号
学位授与の日付	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 外科系専攻
学位論文題目	Induction of uterine cervical neoplasias in mice by human papillomavirus type B16 E 6 / E 7 genes. (ヒトパピローマウイルス (HPV) 16型 E 6 / E 7 遺伝子による, マウス子宮, 腔上皮新生物の誘発)
論文審査委員	(主査) 教 授 谷 澤 修 (副査) 教 授 羽 倉 明 教 授 上 田 重 晴

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

ヒト子宮頸癌の発生にヒトパピローマウイルス (HPV) の感染が重要であることが近年明かになりつつある。HPV のうち16型遺伝子はひろく子宮頸癌組織中に検出されることが知られ, HPV 16型初期遺伝子である E 6 / E 7 領域はマウス株化培養細胞をトランスフォームし, ヒト上皮初代培養細胞を不死化させることが判明してきた。しかしながら HPV を用いた動物実験が困難であることより, 現在に至るまで HPV 16型遺伝子の in vivo に於ける機能の解析は進んでいない。本研究では, マウス子宮, 腔部に HPV 16型の E 6 / E 7 遺伝子を組み込んだキメラレトロウイルスを感染させることにより, 子宮, 腔上皮組織に HPV 16型 E 6 / E 7 遺伝子を導入し, その遺伝子の in vivo における発現と上皮性変化の解析を目的とした。またウイルス感染後に MNNG や TP を同組織に処置し, その相乗効果による発癌誘発を試みた。

(方 法)

マウスレトロウイルスベクター pZinpNeoSV (X)1 に HPV 16型 E 6 / E 7 遺伝子を組み込んだ pZipNeoSV(X)1 ベクターそれぞれをマウス Ψ 2 細胞にトランスフェクトした。それらの細胞培養上清よえいキメラレトロウイルス ZE 67 と HPV を含まないコントロールウイルス ZNeo を回収し, 超濾過, 超遠心法により濃縮した。

実験 1) 53 匹の CD-1 nu/nu マウスと 16 匹の C67 BL/6 J マウスを 2 つのグループにわけ, それぞれのウイルス (ZE 67 TOZNeo) を各マウス腔内に週 2 回 Moloney ヘルパーウイルスと共に 1×10^4 G 418^{res} 単位注入した。

実験2) 19匹のCD-1 nu/nu マウスと、25匹 C57BL/6 J マウスに各ウイルスを感染させた後それぞれのマウスに MNNG 50 μ g を2回、TPA 10ng 週2回計6回腔内に処置した。

3箇月毎に各マウスより腔スメア-を採取し、細胞診を行い、CD-1 nu/nu マウスは9箇月、C57BL/6 J マウスは15箇月後に屠殺し組織学的検討を加えた。なお子宮、腔細胞中の HPV DNA の存在は E6 primer による PCR-Southern blotting 法、組織中の E6/E7 mRNA の発現は E6/E7-riboprobe を用いた組織 in situ hybridization 法により検討を行った。

(成績)

細胞診では、実験1) 感染後3箇月以内に ZE67処置群の25例中7例、ZNeo 処置群の25例中2例に軽度異型細胞、一部に koilocyte 様細胞がみられ、9箇月後には ZE67処置群の9例に高度異型細胞を認めしたが、コントロール (ZNeo) 群では高度異型細胞は認めなかった。

実験2) ZE67+MNNG 処置群では約12箇月後2例、15か月後6例に癌細胞の出現を認め、ZE67+YPA 処置群では6箇月後1例、9箇月後2例に癌細胞の出現を認め、一方、ZNeo+MNNG 群や ZNeo+TPA 群では癌細胞は細胞診上認められなかった。

組織学的検討では、実験1) ZE67処置群39例中22例に高度異形成、11例に軽度異形成がみられ、ZNeo 処置群では、30例中1例に高度異形成、8例に軽度異形成を認めたが、ZE67ウイルス処置群ではコントロールウイルス処置群に比べ異形成の発生は有意に増加した ($p<0.001$)。実験2) ZE67ウイルス+MNNG 群では、15例中6例に扁平上皮癌が発生し、ZE67ウイルス+TPA 群では13例中に2例に同種の癌が発生した。一方、ZNeo+MNNG 群では10例中2例に同様の癌が発生したが、ZNeo+TPA 群では癌発生を認めなかった。

HPV 16型 DNA は、実験1) ZE67ウイルス群の異形成22例中17例、正常5例中2例に認められ ZNeo ウイルス群では認めなかった。実験2) ZE67+MNNG、ZE67+TPA 両群の癌細胞全例にこの HPV DNA を認めた。

HPV 16 E6/E7 mRNA の発現は、ZE67ウイルスを処置したマウスの正常上皮や軽度異形成上皮の傍基底部に発現し、基底部の発現はみられず、高度異形成や癌組織では上皮のほぼ全層にわたり発現していたが、基底部や癌巢外側部では発現が低下していた。全体的に癌組織では E6/E7 mRNA の発現増加を認めた。

(総括)

- 1) マウスキメラレトロウイルスを用い、HPV 16 E6/E7 型遺伝子をマウス子宮、腔上皮への in vivo 導入に成功した。その結果、子宮、腔上皮は E6/E7 遺伝子発現により異形成が誘発されるが、癌化には至らないことが判明した。
- 2) 子宮、腔上皮は、HPV と MNNG と TPA などの発癌誘導物質との共同作用により、癌化する可能性が示唆された。
- 3) HPV 16型 E6/E7 mRNA の発現が悪性化に伴って変化したこと、また HPV 遺伝子の導入や発癌誘導物質の処置後、高度異形成や癌細胞の出現までに長い期間が必要であったことより、癌化に至るまでに多くの細胞側遺伝子の変異や修飾が必要と考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、HPV 16型 E6/E7 遺伝子を導入したムスレトロウイルスを作成し、同ウイルスをマウス腔内に感染させることにより、HPV 16型 E6/E7 遺伝子の *in vivo* 導入に成功している。そのほか、E6/E7 遺伝子の作用により子宮、腔上皮に前癌状態である高度異形成が誘発されることを証明し、また TPV や MNNG 等の追加処置により扁平上皮癌の発生がみられることを明らかにしている。この論文は、ヒト子宮頸癌に高率に検出される HPV 16型遺伝子が癌発生にきわめて重要なファクターであることを動物実験で初めて明らかにしたものであり、博士号授与に値するものと考えられる。