

4. HPV ゲノム複製の制御機構と発がん

中原 知美, 清野 透

国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野

高リスク型ヒトパピローマウイルス群 (high-risk human papillomaviruses: HR-HPVs) 感染を要因とするがんは、子宮頸がんをはじめ世界の全がんの約5%、女性では約11%を占める。HPVは子宮粘膜等の重層扁平上皮組織に感染し、基底細胞において持続感染を成立させる。この持続感染は、時に数十年持続することが知られており子宮頸がん発症の背景となっている。HPVの生活環は、重層扁平上皮組織の細胞分化と密接に連動しており、ウイルスゲノムの複製やウイルス遺伝子の発現は、感染細胞の分化に応じて厳密に制御されている。HPVゲノムは、感染直後に一過的に増加した後、基底細胞では一定コピー数に維持される。一方で、感染細胞が分化を始めると爆発的に増加する。HPVゲノム複製がその生活環において3段階に制御される分子機構については長らく不明であった。近年、HPVゲノム複製の制御に、宿主のDNA損傷修復系との相互作用が深く関わることが明らかとなりつつある。本稿では、HPVゲノム複製とDNA損傷修復系との相互作用について解説する。

はじめに

高リスク型ヒトパピローマウイルス (high-risk human papillomaviruses: HR-HPVs) は、子宮頸がん (扁平上皮がん、腺がん) 及びその前駆病変 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) の原因ウイルスである。わが国では、年間約28,000人の子宮頸がん患者 (上皮内がんを含む) が生じ、約2,700人が死亡している⁴⁴⁾。近年、子宮頸がんの罹患率および死亡率はともに若年層で増加傾向にあり、39歳以下の女性では、乳がんの次に罹患率が高い^{43, 44)}。HPVは、重層扁平上皮組織の幹細胞を含む基底細胞に感染することにより、長期間感染病変を維持する。基底細胞におけるウイルス遺伝子の発現は低いが、何らかの原因によりE6・E7の発現が高くなると、同細胞の増殖促進や細胞分化抑制などがおこり、CIN1からCIN2/3へと前駆病変が進行する。さらに、染色体不安定化、ウイルスゲノム

の宿主ゲノムへの組み込み、変異の蓄積などを経て子宮頸がんを発症する (図1)。子宮頸がんの100%近くでE6・E7遺伝子が高発現しており、E6・E7は、子宮頸がんの発がんやがん細胞の増殖に必須であることが示されている。

HPV持続感染の分子機構を明らかにすることは、HPV持続感染へ介入し、感染組織からのウイルス排除を可能にする抗ウイルス薬開発の基盤を得る上で重要である。本稿では、HPV持続感染の成立や維持の基盤となるHPVゲノム複製の制御機構について最新の知見を紹介する。宿主細胞のDNA損傷修復系との相互作用についてを中心に解説したい。なお、E6・E7によるHPV発がんの分子機構の詳細については、拙著や他の素晴らしい総説を参照されたい^{28, 30, 42)}。

パピローマウイルスとがん

乳頭腫 (パピローマ) ウイルス (papillomavirus: PV) は、環状2本鎖DNAをゲノムとし、正二十面体のキャプシドをもつ小型のDNAウイルスであり、感染部位に乳頭腫や疣贅 (いわゆるイボ) などの増殖性の病変を誘発する。これまでに、ヒト、サル、ウシ、ウサギ、イヌ、シカ等の種々の哺乳類の他、鳥類や虫類からもPVが見つかっている。ヒトパピローマウイルスは、1949年に皮膚のミルメシアより電子顕微鏡でウイルス粒子が確認されて以来、乳頭腫・疣贅の原因ウイルスとして知られてきた。子宮頸がんからはウイルス粒子が確認されないため、子宮頸がんはHPV

連絡先

〒104-0045

東京都中央区築地5-1

国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野

TEL: 03-3542-2511

FAX: 03-3543-2181

E-mail: tonakaha@ncc.go.jp

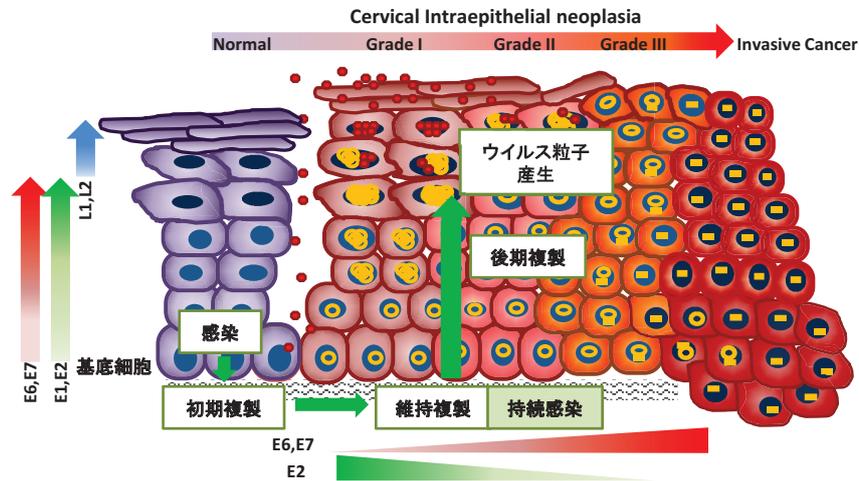


図1 HPV生活環と子宮頸がん

HPV生活環は重層扁平上皮組織の分化と密接に連動している。ウイルスゲノム複製に関わる初期遺伝子E1およびE2（左端：緑矢印）、ウイルスがん遺伝子E6およびE7（左端：赤矢印）、ウイルスキャプシド蛋白質L1およびL2（左端：青矢印）の発現パターンを示した。一方で病変の進行とともに、基底細胞におけるE6・E7（赤）の発現が増加し、E2（緑）の発現は低下する（下段）。E2は子宮頸がん細胞ではほとんど発現していない。

の関係は長らく不明であった。1980年代にHarald zur Hauzen博士らがサザンブロット法を用いることで子宮頸部病変からHPV DNAの検出に成功し、その後の研究でHPVと子宮頸がんの因果関係が確実なものとなった。PVは、ウイルスゲノム塩基配列の相同性に基いて遺伝子型で分類される。ヒトからは既に180種類以上の遺伝子型が報告されているが、皮膚病変から検出されたもの（皮膚型）および粘膜病変から検出されたもの（粘膜型）に大別することができる。そのうち粘膜型HPVは、子宮頸がん等のがん病変からの検出頻度により、高リスク型と低リスク型（low-risk type: LR-HPV）に分類される。代表的なLR-HPVであるHPV6およびHPV11は、約90%の良性の尖圭コンジローマおよびほぼすべての再発性呼吸器乳頭腫症（recurrent respiratory papillomatosis）の原因ウイルスである。HR-HPVのDNAは、ほぼすべての子宮頸がんから検出される。2007年にWHOの下部機関であるIARCは13種類の型（16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66）を確実にがん原性あり（Group 1 carcinogen）と分類したが、2012年には、68型をGroup 2Aに、当初Group 1に分類された66型を含む12種類の型（26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97）をGroup 2Bに、HPV6,11をGroup 3に分類し直した。疫学調査に基づくGroup 1から2Bへのリスク分類は連続的かつ相対的であり、HR-HPVとLR-HPVの間にintermediate-risk HPVの分類を提唱する研究者もいる。従って、筆者らは「約15の型が子宮頸がんから高頻度に見つかりHR-HPVと呼ばれている」といった書き方に留めている。この内HPV16が世界中の子宮頸がんでも高頻度（40-60%）に検出される。世界的

にはHPV18がHPV16に次いで高頻度に検出され、両者を合わせると世界の子宮頸がん全体の約70%の原因であると推定されている。現行のHPV感染予防ワクチンの抗原として、HPV16とHPV18のL1がまず選ばれたのはこのような背景による。日本でも、HPV16が40-50%を占めるが、HPV18よりもHPV52, 58などの頻度が高い。さらに、約90%の肛門がん、40%の膣がん・外陰部がん・陰茎がん、25%程度の頭頸部がんからもHR-HPVゲノムが検出され、これらに占めるHPV16とHPV18の割合はさらに高い。最近、世界的にHPV陽性の中咽頭がんが急増しており、すべて含めてHPV感染を要因とするがんは、世界における全がんの5%以上、女性においては11%以上を占める^{2, 32, 36}。

HPVのゲノム構造とウイルス遺伝子

PVは環状2本鎖ゲノムDNAの片側鎖にのみopen reading frame (ORF)が存在し、非構造蛋白質をコードする初期遺伝子群（E1, E2, E4, E5, E6, E7）（E5は一部のPVのみ）と、キャプシド蛋白質をコードする後期遺伝子（L1, L2）がコードされている。E6ORF上流と、E7ORF内にプロモーターが見つかり、それぞれ初期遺伝子群（初期プロモーター；HPV16ではp97）および後期遺伝子（後期プロモーター；p670）の発現を制御すると考えられている。L1ORFとE6ORF間はlong control region (LCR)またはupstream regulatory region (URR)と呼ばれ、ウイルスゲノム複製起点や、ウイルス遺伝子の発現に関わる様々な転写因子の結合部位がコードされている（図2）。E4を除く初期遺伝子群は、未分化な基底細胞から発現し、

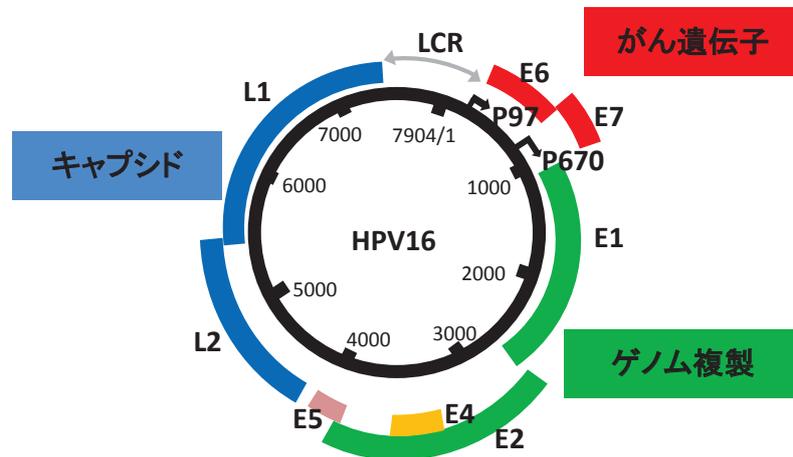


図2 HPV16 ゲノムの構造

E4 および後期遺伝子 L1, L2 は感染細胞の分化に応じて発現が誘導される。E1 は ATP 依存的な DNA ヘリカーゼであり、ウイルスゲノムの増幅に必須である。E2 は、ウイルスゲノム上の特異的塩基配列 (E2 binding sites; E2BS) に結合する転写調節因子として機能する他、ウイルスゲノム増幅時に E1 を複製起点にリクルートしたり (後述)、細胞分裂時の娘細胞へのウイルスゲノム分配にも重要な役割を果たすことが知られている。E6, E7 はがん遺伝子として知られているが、それぞれ p53, Rb 蛋白質の分解を促進し、ウイルスゲノムの増幅に適した細胞環境をもたらすと考えられている。E5 は、リガンド依存的な EGF シグナルを増強することが知られている。L1, L2 はウイルス粒子を構成するキャプシド蛋白質であり、宿主細胞への吸着・侵入に関わる。E4 は、感染組織の分化した層において大量に発現が観察される後期遺伝子であり、角化細胞のケラチンネットワーク形成の崩壊や細胞周期調節を行うことが知られている⁶⁾。

HPV の生活環

HPV の生活環は、感染宿主である生殖器粘膜等の重層扁平上皮の分化 (角化) と密接に連動している。小さな傷などを通して基底細胞に侵入した HPV は、ゲノムの一過的な複製 (初期複製) を経て 50-200 コピー程度の核内エピソームとなり、ウイルス増殖を伴わない潜伏持続感染状態になる。基底細胞におけるウイルス遺伝子発現は制限されており、ごく低レベルの初期遺伝子群が発現している。ウイルスゲノムは細胞の DNA 合成期 (S 期) におよそ一回複製され、細胞分裂時に娘細胞に分配されることにより一定のコピー数に維持される (維持複製)。感染細胞が最終分化を始めると、ウイルス初期遺伝子群の発現が増加し、ウイルスゲノムは数千倍以上に増幅する (後期複製)。続いて L1 および L2 発現が誘導され、細胞核内で子孫ウイ

ルス粒子を形成する。重層扁平上皮組織の表層は、脱核し死んだ角化細胞が重層化した角質層で覆われており、子孫ウイルス粒子は、角質層の脱落と共に放出される (図 1)。HPV の増殖は、感染組織の分化の進んだ上層に限られ、感染細胞の溶解やウイルス血症を伴わない。このような生活環は、免疫による排除を回避し、長期的な持続感染を成立させるウイルス側の戦略であると考えられている。一方で、HPV は、分化により細胞分裂を停止し本来は DNA 合成をおこなわない細胞において増殖する。HPV ゲノム複製は宿主の DNA 合成機構に依存するため、ウイルス遺伝子 (E4, E5, E6, E7) の働きを介して細胞周期の制御機構に干渉し、ウイルスゲノム複製に必要な細胞内環境を整えている (図 1)⁶⁾。

ウイルスゲノムの複製機構

PV のゲノム複製には、E1・E2 および宿主の DNA 合成因子が必須である。E1・E2 による HPV ゲノム複製の基本的な分子機構については、E1 および E2 の発現ベクターと、ウイルスゲノムの LCR 領域をコードするプラスミド (minimal replicon) を、293 細胞などに一過的に遺伝子導入する transient replication assay 系や、細胞抽出液を用いた in vitro 複製系によりこれまで明らかされてきた。ウイルスゲノム複製の最初のステップは、E1 および E2 が共調して LCR 内の複製起点近傍へ結合することである。LCR には E1 特異的結合塩基配列 (E1BS), E2BS および複製起点がコードされており、2 量体を形成した E2 が、E1 および E2BS の両者に結合することにより、E1 の E1BS への結合を促す。次に、さらなる E1 分子の結合と E2 の乖離がおこり、ATP の加水分解に依存して複製起点を挟んで 2 つの E1 六量体が形成される。この E1 六量体により、複製起点周辺の DNA が巻き戻され双方向性にゲノム複製が開始する。さらに、E1 は宿主の複製因子である

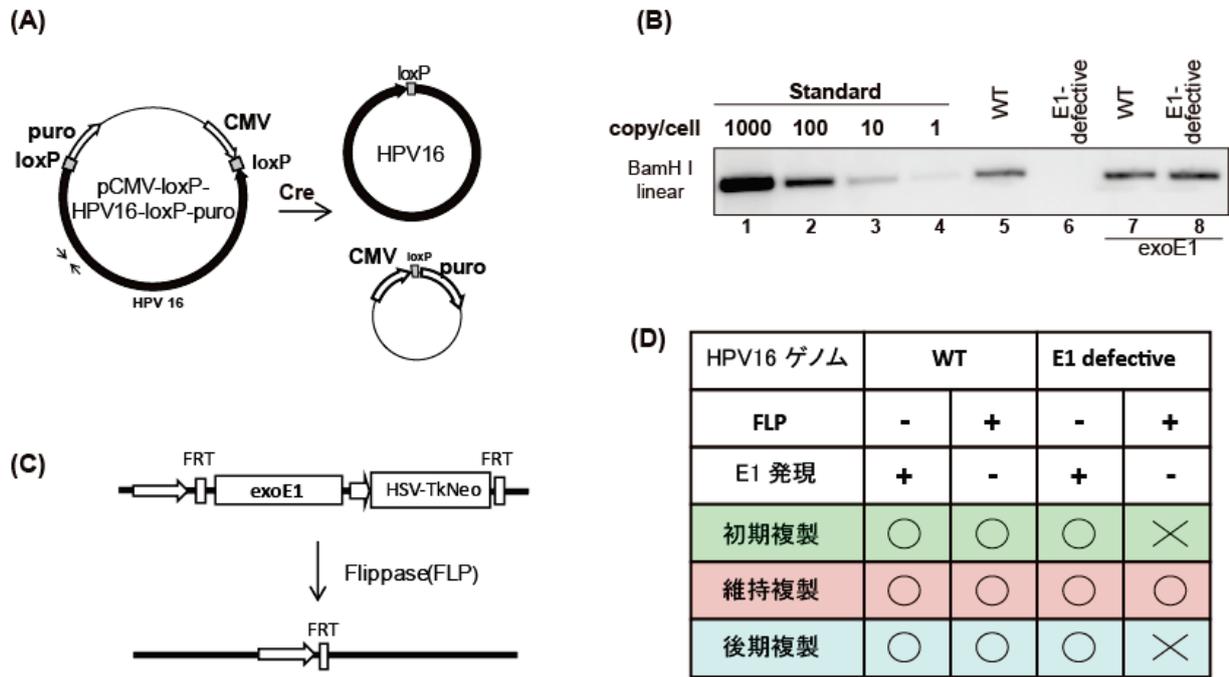


図3 HPV16 生活環における E1 の役割

(A) Cre-loxP 組み換え反応による HPV16 ゲノム再環状化の模式図

(B) E1 defective HPV16 ゲノムおよび野生型ゲノムを角化細胞に導入して、外来性 E1 発現 (ExoE1) の存在下および非存在下において、それらが核内エピソームとして成立したかどうか検討した結果。

(C) FLP-FRT 組み換え反応による E1 発現カセット除去の概要

(D) 実験結果のまとめ

replication protein A, DNA polymerase α primase, topoisomerase I をリクルートすることが知られている^{16,25)}。

HPV ゲノム複製は、ウイルス生活環において初期複製、維持複製、後期複製の3段階に調節されるが、その制御機構についてはあまり解明されていない。Flores と Lambert らは、CIN1 病変より樹立された細胞株で、HPV16 および HPV31 ゲノムをエピソームとして維持する W12 細胞 (HPV16) および CIN612 細胞 (HPV31) では、ウイルスゲノム複製は、細胞が未分化な状態では双方向性複製パターンを示し、細胞分化を誘導するとローリングサークル型の複製パターンへ変化することを報告している¹⁰⁾。興味深いことに、松尾らは、HPV16 レプリコンを用いた *in vitro* 複製系において、分化した角化細胞の抽出液を用いるとローリングサークル型複製が観察されることを報告した¹⁹⁾。Epstein Barr Virus (EBV) などのヘルペスウイルス類は、溶解感染時にローリングサークル型ゲノム複製により増幅することが知られており、HPV の後期複製もローリングサークル型複製によるかもしれない。しかしながら、HPV ではローリングサークル型複製により増幅したゲノムを、単位長ごとの環状2本鎖ゲノムへ再環状化する機構が今のところ報告されていない。したがって、ローリング

サークル型ゲノム複製のウイルス生活環における意義は不明であり、非常に限られた条件下でしか起こらない可能性も考えられる。現状では、HPV ゲノム複製は、初期、維持、後期複製を通じて双方向性に進むというモデルが広く受け入れられている。

E1 依存的複製と E1 非依存的複製

我々の研究室では、HPV16 を維持する持続感染の培養モデルを作成し、HPV16 生活環における E1 ヘリカーゼの役割について検討した (図3)。両端に loxP 配列を付加した全長 HPV16 ゲノムを挿入したプラスミドと、Cre 組換え酵素発現プラスミドを、不死化した皮膚由来角化細胞に導入し、Cre-loxP 組換え反応によって細胞内で環状2本鎖 HPV16 エピソームを再現させ、HPV16 エピソームを100コピー程度維持する角化細胞を樹立した (図3A)。E1 を発現しない E1 defective HPV16 ゲノムを同様に導入して調べたところ、核内エピソームとして定着しなかった (図3B)。つまり、HPV16 ゲノムが核内エピソームとして樹立あるいはさらに維持されるためには、E1 によるゲノム複製が必要であることが示唆された。さらに、ウイルスゲノム複製が E1 に完全に依存するかどうか、初期、維持、後

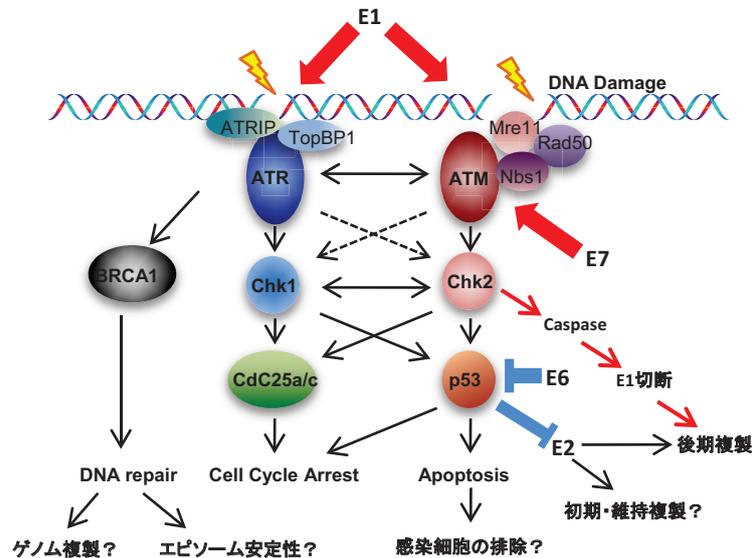


図4 DNA 損傷修復系の概略と HPV ウイルス遺伝子およびゲノム複製との関係

期複製の各段階について個別に検討するため、以下の培養系を作製した。E1 およびその下流に挿入したヘルペスウイルスのチミジンキナーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子 (HSV-TKneo) の発現カセットを FRT 配列で挟んだレトロウイルスベクターを用い、E1 を恒常的に発現する角化細胞を用意した。この細胞に flippase (FLP) 発現を導入すると、FLP-FRT 組換え反応により E1 および HSV-TKneo 発現カセットを除去できる (図 3C)。野生型および E1 defective HPV16 ゲノムを導入し、それらのゲノム複製が、外来性 E1 発現の有無に依存するかどうか調べた。結果、E1 defective HPV16 は、外来性の E1 発現がなくとも野生型と同程度の効率で維持複製された (図 3D)。すなわち、E1 は初期および後期複製には必須であるが、維持複製には必要ないことが判明した⁹⁾。

Hoffman らは、W12 細胞における HPV16 ゲノムの維持複製は、宿主の DNA 合成と完全に一致して S 期に一度しか起こらないという結果を報告している¹³⁾。我々の結果と考え合わせると、PV ゲノムの維持複製は E1 に依存せず、宿主の DNA 合成機構つまり origin recognition complex (ORC) および minichromosome maintenance (MCM) 複合体により行われる可能性が高い。Hoffmann らの解析によると、W12 細胞に外来性プロモーター由来の E1 を発現させると、一部のゲノムが S 期に複数回複製される random choice 機構によって一定コピー数に維持される複製パターンに変化した。これらの結果から、Hoffmann らは、HPV16 の維持複製には S 期に一回あるいは random choice 機構の二つの複製モードがあり、E1 発現の有無もしくは発現量や活性の多寡により、いずれかの複製モードが選択されるというモデルを提示した。E1 発現の有無や多寡には、細胞内環境や外的ストレスが関わる可能性が考えられる。

一方で、CIN612 細胞では、HPV31 ゲノムは random choice 機構によって維持されていることも示した。CIN612 細胞における HPV31 の維持複製が、E1 依存的な random choice 機構であったことは、PV の型特異性よりはむしろ細胞内環境の違いに起因しているかもしれない。以前に、ウシのパピローマウイルス *Bos taurus Papillomavirus1* (BPV1) の温度感受性 E1 変異体を用いた解析から、BPV1 ゲノムの初期複製には E1 は必須であるが、維持には必要ないという結果が報告されている^{18, 33)}。我々は最近、E1 発現のコントロールに NF κ B の活性化が関与する可能性を見出した (未発表)。

DNA 損傷修復系の概要

DNA 損傷修復系の中心的役割を果たすのは PI3KK (phosphoinositide 3-kinase like kinases) ファミリーに属する ataxia telangiectasia mutated (ATM)、ATM and Rad3-related (ATR) および DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) の 3 つのリン酸化酵素である。これらの酵素は DNA 損傷の発生に応じて活性化し、標的蛋白質をリン酸化することによりシグナル伝達を惹起し、DNA 修復蛋白質群の活性化および細胞周期の停止を誘導する。一方で損傷の修復が不可能な場合は、アポトーシスを誘導して損傷した DNA を持つ細胞を排除する。ATM および DNA-PK は主に二本鎖切断により活性化し、ATR は複製フォークの停止や一本鎖 DNA の暴露により活性化する (図 4)^{4, 20)}。最近、DNA 損傷修復系の活性化が HPV ゲノム複製の制御に密接に関わることが分かってきた。

ATM 経路の活性化と HPV ゲノム複製

Laimins および Moody らの一連の研究により、HPV31 の後期複製に ATM 経路の活性化が必須であることが明らかとなった。彼らは、まず、HPV31 エピソームを維持する角化細胞では、ATM および checkpoint kinase 2 (CHK2) が活性化していることを見出した。そして、ATM の特異的な阻害薬である KU55933 存在下における HPV31 の維持複製と後期複製を調べた結果、ATM や CHK2 の活性化は、HPV31 ゲノムの維持複製には関与しないが、後期複製には必須であることを報告した²⁷⁾。一方で、HPV31 維持細胞に分化を誘導すると caspase が活性化すること、さらに *in vitro* において、caspase によって HPV31 E1 の N 末端 50 アミノ酸程度のペプチドが切断されることを示した。変異を導入して caspase による切断抵抗性となった E1 をコードする HPV31 変異体ゲノムを角化細胞に導入すると、野生型と同様にエピソームとして定着・維持されたが、細胞の分化を誘導してもそのコピー数はほとんど増加しなかった。また、E7 を単独で発現させると、ATM および CHK2 の活性化が誘導された²⁶⁾。以上の結果から、Moody らは、E7 による ATM および CHK2 の活性化は、caspase 活性化を介して E1 を切断活性化し、後期複製を促進するというモデルを提示した (図 4)。E1 の DNA 結合ドメインや、ATP 結合ドメインは中央および C 末端側に存在し、N 末端側の欠損は、*in vitro* 複製系におけるゲノム複製に影響しない^{37, 40)}。一方で transient replication assay 系では、E1 の N 末端欠損変異体は野生型と比べ機能が低下することが報告されており²⁹⁾、後期複製時に、E1 の N 末端側が切断されることにより活性化するというモデルとは一見矛盾している。E1 の発現量や活性は、細胞分化の度合いなどに応じて、数段階に厳密に調節されている可能性が推測され、今後の詳細な解析が待たれる。さらに、分化した細胞では、HPV31 ゲノムと ATM や DNA 修復の相同組み換えに関わる RAD51 および breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) などが共局在していることが報告され、HPV31 の後期複製に DNA 修復因子が直接関わる可能性も示唆されている¹²⁾。

二つのグループから、種々の HPV 由来の E1 を、角化細胞を含む数種の細胞に単独で発現させると、ATM 経路の活性化と細胞周期 S 期の遅延が起こることが報告された。つまり、HPV 後期複製時には、E1 によっても ATM 経路が活性化し、後期複製を促進している可能性がある^{11, 35)}。

ATR 経路の活性化と HPV ゲノム複製

Ustav らは、U2OS 細胞を用いた HPV 複製モデルにおいて、HPV18 ゲノム複製時には、E1 および E2 の発現に依存して、ATM 経路だけでなく ATR 経路が活性化することを報告した。さらに、HPV18 ゲノムと、ATR 活性化に重要

な ATR-interacting protein (ATRIP) および topoisomerase II β binding protein (TopBP1) との共局在を示した。ATR 活性化の HPV ゲノム複製における意義はいまのところ不明である³⁴⁾。

p53 と HPV ゲノム複製

In vitro で再環状化した E6 を発現しない HPV16、31 および HPV18 は、角化細胞に導入しても核内エピソームとして定着しないことが報告されており、E6 は HPV ゲノムの初期あるいはまた維持複製に関わることが示唆されている^{23, 38)}。一方で、HPV18 に関しては、前述の Cre-loxP 組み換えを利用した方法で角化細胞に導入すると、E6 を発現しない E6-defective genome であっても核内エピソームとして定着・維持されることが報告されている^{17, 39)}。E6-defective HPV18 ゲノムを維持する角化細胞に分化を誘導しても後期複製は起こらない。HPV16 や HPV31 の E6 defective mutant の後期複製については今のところ報告がない。p53 の shRNA や、dominant negative p53 をあらかじめ導入しておく、初期から維持および後期複製のいずれにおいても、E6-defective HPV の複製が回復したことから、E6 による p53 の不活性化が HPV ゲノム複製の制御に関わることが示された。p53 は ATR や ATM 経路の下流で活性化され、アポトーシスや細胞周期の停止を誘導することが知られている (図 4)。E6 による p53 の不活性化は、初期および後期複製時に、E1 や E7 による ATM や ATR 経路活性化の結果として誘導され得るアポトーシスを回避する役割を果たす可能性が高い。一方で、p53 は BPV1 および HPV16 の E2 と直接結合することにより、ゲノム複製を抑制することも報告されている^{3, 22)}。さらに、E2 は維持複製時の娘細胞へのゲノムの分配に重要な役割はたすことから、p53 活性化はウイルスゲノムの分配を抑制する可能性も示唆されている²⁵⁾。

HPV 持続感染と DNA 損傷修復系

HR-HPV 感染が発がんへ向かうには、基底細胞における E6・E7 の高発現が必要であり、多くの場合、持続感染病変において維持複製中の HPV ゲノムが、宿主ゲノムへ組み込まれることによりもたらされる。HPV ゲノムの宿主染色体への組み込みは、基本的には稀でランダムな事象であると考えられている^{1, 5)}。最近 W12 細胞に、ATR および checkpoint kinase 1 (CHK1) の siRNA や阻害薬を処理すると、エピソームコピー数が減少することが報告された。ATR や CHK1 は、維持複製における HPV エピソームの安定性に関わる可能性がある⁸⁾。また、W12 細胞に、非同組組み換えに関わる DNA 損傷修復系因子である Ku70 の siRNA を長期的に処理すると、染色体 2 本鎖切断の頻度が増加し、結果として HPV ゲノムの染色体への組み込みが亢進することが報告されている⁴¹⁾。

子宮頸がん細胞である SiHa 細胞や HeLa 細胞に、E1 および E2 を発現させると、染色体に組み込まれた HPV ゲノム上の複製起点から双方向性のゲノム複製が開始し、onion skin 型ゲノム複製が起こることが報告されている。この onion skin 型ゲノム複製が誘導された細胞では、HPV ゲノムとその周辺部の宿主配列を含む DNA フラグメントの切り出しや新規の組み込みが増加し、ゲノム不安定性が亢進していた¹⁴⁾。さらに、onion skin 型ゲノム複製誘導時には、ATM、ATR および DNA-PK の活性化と染色体上の HPV ゲノムへの集積が観察されることから、DNA 損傷修復経路の働きにより、HPV ゲノムの染色体へのさらなる組み込みや再構成が増加したと考えられた¹⁵⁾。HPV ゲノムの組み込みが一コピーでも発生すると、組み込まれた HPV ゲノムとエピソーム HPV ゲノムが同一細胞において一時的に共存し、エピソームからの E1・E2 の発現によって onion skin 型ゲノム複製が惹起され、2 次的な HPV ゲノムの組み込みや再構成が亢進すると考察される。最近発表された全ゲノム解析によっても、HPV ゲノムの組み込み部位周辺の遺伝子増幅が確認されている³¹⁾。HeLa 細胞では、HPV18 の LCR と E6・E7 を含むゲノム断片が、細胞あたり約 50 コピー MYC 遺伝子と共に増幅していることが知られている²¹⁾。すなわち HPV 持続感染中の基底細胞における DNA 損傷修復系の活性化は、HPV ゲノムの宿主への組み込みを促進することにより、感染細胞のがん化を促進する可能性がある。

おわりに

ATM 経路の活性化は、分化した角化細胞においては HPV 後期複製に有益である一方で、基底細胞においては、細胞増殖の抑制やウイルスゲノムの染色体への組み込みの亢進につながる可能性があり、HPV の増殖にとって不利益である。E1 による ATM および ATR 経路活性化の分子機構の詳細は明らかではないが、筆者らは、基底細胞において、E1 非依存的な複製により HPV ゲノムが維持される要因のひとつであると考えている。約 90% の HPV 感染病変は 3 年以内に消失することから、被感染者全体において HPV 持続感染が長期化する割合はさほど高くないと考えられてきた。しかし、近年ウサギの粘膜型 PV 動物感染モデルより、感染病変消失後も長期にわたって PV ゲノムが検出されることが示された^{7, 24)}。HPV 感染においても、病変を伴わない潜伏持続感染への移行の割合は、以前の推測よりもっと高いかもしれない。E1 や他のウイルス遺伝子による DNA 損傷修復系活性化と HPV ゲノム複製の分子機構の詳細を解明することは、HPV 持続感染の分子基盤の全貌を明らかにするために必須であり、今後のさらなる研究の発展が期待される。

参考文献

- 1) Alazawi, W., et al., Genomic imbalances in 70 snap-frozen cervical squamous intraepithelial lesions: associations with lesion grade, state of the HPV16 E2 gene and clinical outcome, *Br J Cancer*, 91(12), 2063-2070, 2004.
- 2) Bosch, F.X., et al., Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia, *Vaccine*, 26 Suppl 10(K1-16), 2008.
- 3) Brown, C., et al., P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein, *Virology*, 5(5), 2008.
- 4) Cimprich, K.A. and D. Cortez, ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8), 616-627, 2008.
- 5) Dall, K.L., et al., Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions, *Cancer Res*, 68(20), 8249-8259, 2008.
- 6) Doorbar, J., et al., The biology and life-cycle of human papillomaviruses, *Vaccine*, 30(F55-F70), 2012.
- 7) Doorbar, J., Latent papillomavirus infections and their regulation, *Current opinion in virology*, 3(4), 416-421, 2013.
- 8) Edwards, T.G., et al., Human papillomavirus episome stability is reduced by aphidicolin and controlled by DNA damage response pathways, *J Virol*, 87(7), 3979-3989, 2013.
- 9) Egawa, N., et al., The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome, *J Virol*, 86(6), 3276-3283, 2012.
- 10) Flores, E.R. and P.F. Lambert, Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle, *J Virol*, 71(10), 7167-7179, 1997.
- 11) Fradet-Turcotte, A., et al., Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response, *J Virol*, 85(17), 8996-9012, 2011.
- 12) Gillespie, K.A., et al., Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers, *J Virol*, 86(17), 9520-9526, 2012.
- 13) Hoffmann, R., et al., Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance, *J Virol*, 80(9), 4431-4439, 2006.
- 14) Kadaja, M., et al., Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery, *EMBO J*, 26(8), 2180-2191, 2007.
- 15) Kadaja, M., et al., Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses, *PLoS Pathog*, 5(4), e1000397, 2009.
- 16) Kadaja, M., et al., Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability, *Virology*, 384(2), 360-368, 2009.
- 17) Kho, E.Y., et al., HPV-18 E6 mutants reveal p53 modulation of viral DNA amplification in organotypic cul-

- tures, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), 7542-7549, 2013.
- 18) Kim, K. and P.F. Lambert, E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication, *Virology*, 293(1), 10-14, 2002.
 - 19) Kusumoto-Matsuo, R., T. Kanda, and I. Kukimoto, Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts, *Genes Cells*, 16(1), 23-33, 2011.
 - 20) Lavin, M.F., Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(10), 759-769, 2008.
 - 21) Lazo Pedro A., D.J.A., Popescu Nicholas C., Amplification of the integrated viral transforming genes of human papillomavirus 18 and its 5'-flanking cellular sequence located near the myc protooncogene in HeLa cells., *Cancer Res.*, 49(15), 4305-4310, 1989.
 - 22) Lepik, D., et al., p53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplification, *J Virol*, 72(8), 6822-6831, 1998.
 - 23) Lorenz, L.D., J. Rivera Cardona, and P.F. Lambert, Inactivation of p53 rescues the maintenance of high risk HPV DNA genomes deficient in expression of E6, *PLoS Pathog*, 9(10), e1003717, 2013.
 - 24) Maglennon, G.A., P. McIntosh, and J. Doorbar, Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression, *Virology*, 414(2), 153-163, 2011.
 - 25) McBride, A.A., et al., Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(7), 820-825, 2012.
 - 26) Moody, C.A., et al., Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49), 19541-19546, 2007.
 - 27) Moody, C.A. and L.A. Laimins, Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation, *PLoS Pathog*, 5(10), e1000605, 2009.
 - 28) Moody, C.A. and L.A. Laimins, Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nat Rev Cancer*, 10(8), 550-560, 2010.
 - 29) Morin, G., et al., A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication, *J Virol*, 85(11), 5287-5300, 2011.
 - 30) Narisawa-Saito, M., et al., A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS, *Carcinogenesis*, 33(4), 910-917, 2012.
 - 31) Ojesina, A.I., et al., Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas, *Nature*, 506(7488), 371-375, 2014.
 - 32) Parkin, D.M. and F. Bray, Chapter 2: The burden of HPV-related cancers, *Vaccine*, 24 Suppl 3(S3/11-25), 2006.
 - 33) Ravnán, J.B., et al., Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines, *J Virol*, 66(12), 6946-6952, 1992.
 - 34) Reinson, T., et al., Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication centers during the initial amplification, *J Virol*, 87(2), 951-964, 2013.
 - 35) Sakakibara, N., R. Mitra, and A.A. McBride, The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci, *J Virol*, 85(17), 8981-8995, 2011.
 - 36) Stanley, M.A., Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus, *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 215-222, 2012.
 - 37) Sun, Y., H. Han, and D.J. McCance, Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication, *J Gen Virol*, 79 (Pt 7)(1651-1658), 1998.
 - 38) Thomas, J.T., et al., Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15), 8449-8454, 1999.
 - 39) Wang, H.K., et al., Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes, *Genes Dev*, 23(2), 181-194, 2009.
 - 40) White, P.W., et al., Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain, *J Biol Chem*, 276(25), 22426-22438, 2001.
 - 41) Winder, D.M., et al., An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events, *J Pathol*, 213(1), 27-34, 2007.
 - 42) Yugawa, T. and T. Kiyono, [Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses], *Uirusu*, 58(2), 141-154, 2008.
 - 43) がん研究振興財団, がんの統計 '13, 2013.
 - 44) 国立がん研究センターがん対策情報センター, 最新がん統計, 2014.

Regulation of Human papillomavirus (HPV) genome replication in the viral life cycle and its association with the viral persistence and cancer development.

Tomomi NAKAHARA, Tohru KIYONO

National Cancer Center Research Institute, Division of Virology
5-1-1 Tsukiji, Chu-o-ku, Tokyo 104-0045
tonakaha@ncc.go.jp

High-risk human papillomavirus (HR-HPV) infections account for more than 5% of all cancers (11% in women) such as cervical cancer worldwide. HPVs infect to basal cells of the stratified squamous epithelium and establish persistent infection within the basal compartment. HR-HPV infections can persist more than a decade, leading to development of cancers. The life cycle of HPVs is tightly associated with the differentiation processes of the stratified squamous epithelium; the replication of the viral genome and the expression of the viral genes are strictly regulated depending on differentiation of the host keratinocytes. The viral genome is transiently amplified immediately following infection and then maintained at constant copy numbers in the basal cells. In terminally differentiating keratinocytes, the viral genome is drastically amplified. However, molecular mechanisms underlying switching these three stages of viral genome replication in the viral life cycle are poorly understood. Recently, it has become evident that DNA damage response pathways are involved in the regulation of HPV genome replication. In this review, we would like to introduce recent findings describing the associations of DNA damage response with HPV genome replication.

