

<平成 26 年度助成>

ポリフェノール類のウイルス性子宮頸癌抑制効果

芳賀 猛

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

1. 背景・目的

女性で最も多い癌の一つである子宮頸癌の原因がヒトパピローマウイルス (HPV) であることが明らかとなり、癌化を誘導しやすい高リスク型 HPV を標的にした子宮頸癌ワクチンが我が国でも実用化されている。しかしこのワクチンは、HPV 感染後には効果がないことや対象となる HPV の型も限定されていることなど、課題がある。高リスク型 HPV は、持続的な感染と、それに伴う癌関連のウイルス蛋白である E6 および E7 の高発現により、上皮細胞の癌抑制因子の働きを抑えることで発癌を誘導する。しかし疫学および分子生物学的研究により、悪性化には追加の因子が必要であり、これまで我々もサイトカインや特定の染色体変異が HPV 疾患の悪性化に関与することを示してきた¹⁻³⁾。

近年、エピジェネティックな変化も発癌に関連することが明らかになりつつある⁴⁾。DNA のメチル化は最も研究が行われているエピジェネティック修飾の一つであり、シトシンとグアニンが隣り合った二塩基配列 (CpG) のシトシン塩基に起こる。DNA メチル基転移酵素により、シトシン塩基が変換された 5-メチルシトシンは、遺伝子発現に関与する転写因子タンパクが結合する部位を物理的に遮断したり、クロマチン構造を変化させて転写を阻害したりすることで、遺伝子発現に重要な影響をもたらす⁵⁾。子宮頸癌においては、メチル化状態が悪性化と関連するとの知見が蓄積され、バイオマーカーの有力候補として注目されている^{6,7)}。

一方、ポリフェノール類の抗ウイルス効果や癌抑制効果についてはよく知られており、ポリフェノー

ルの経口摂取で子宮頸部の HPV が排除され病変が改善されるという報告もある^{8,9)}。また、細胞レベルでの増殖抑制の報告もあるが、その機序については不明な点が多い。

こうした背景から、本研究では、代表的なポリフェノール類の一つであるクルクミンを用いて、HPV 感染により癌化した細胞の増殖抑制を解析する。さらにその過程において、発癌に関与する因子や細胞のメチル化状態の変化を解析することで、ポリフェノール類のウイルス性発癌抑制効果と、その分子生物学的メカニズムを探ることを目的とする。

2. 材料と方法

2.1. 細胞増殖抑制試験

代表的なヒト子宮頸癌細胞である HeLa (HPV18 型陽性)、SiHa (HPV16 型陽性)、CaSKi (HPV16 型陽性)、C33a (HPV 陰性) の 4 株を用いた。そのうち特に HeLa 細胞を用いて、詳細な解析を行った。クルクミン粉末 [1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -1E-heptadiene-3, 5-dione] (Cayman Chemical Company) を DMSO に溶解し、40 mM のクルクミン DMSO として遮光下で室温保存した。クルクミンは水溶液中で分解しやすいため、クルクミン DMSO は使用直前に培養用メディアに添加した。

増殖抑制試験は、 1.2×10^6 個の HeLa 細胞を 10cm シャーレで 20 時間、前培養を行った後、実験に用いた。Control 用シャーレには DMSO を 12.5 μ L 添加し、他のクルクミン添加の培養液も、同じ DMSO 濃度となるように調整した。試験開始時と、

24 時間および 48 時間後に、control と各クルクミン濃度のシャーレの総細胞数、生細胞数、生存率を、Trypan Blue (BIO-RAD) 染色後に、TC20™ 全自動セルカウンター (BIO-RAD) により測定した。

2.2. 定量 RT-PCR

HeLa 細胞から抽出した RNA を用いて、Prime Script™ RT reagent Kit (TaKaRa) のプロトコールに従い、オリゴプライマーによる cDNA 合成を行った。解析に用いたプライマーは表 1 に示す。プライマー 18E6_F/R¹⁰⁾ により HPV18 型 E6、プライマー 18E7_F/R¹⁰⁾ により HPV18 型 E7、また、プライマー RAR β _F/R¹¹⁾ により、ヒトの癌抑制遺伝子である RAR β の cDNA を増幅した。内因性コントロールとして、ヒト β アクチンの cDNA を増幅するプライマー、Human β -actin_184F/R¹²⁾ を使用した。定量 PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa) で解析した。

2.3. Bisulfite 処理

HeLa 細胞、SiHa 細胞、CaSKi 細胞、C33a 細胞の 4 種の細胞から抽出し、EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (ZYMO RESEARCH) のプロトコールに

従って DNA を Bisulfite 処理した。Bisulfite (重亜硫酸ナトリウム) を含む CT Conversion Reagent により一本鎖 DNA 上のシトシンをスルホン化した後、加水脱アミノ化反応し、引き続き脱スルホン化することでウラシルに変換した。

2.4. RAR β のメチル化特異的 PCR 解析

クルクミンで変化が見られたとの報告があるヒト癌抑制遺伝子 RAR β のメチル化状態¹³⁾ を調べるため、メチル化特異的 PCR を行った。解析に用いたプライマーは表 2 に示す¹³⁾。まず、HeLa 細胞、SiHa 細胞、CaSKi 細胞、C33a 細胞の 4 種の細胞をそれぞれ 10 cm シャーレで培養した後、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) にて DNA を抽出した。Bisulfite 処理をした DNA を用いて、メチル化特異的プライマーあるいは非メチル化特異的プライマーにより PCR を行い、それぞれの産物の量を電気泳動後のバンドで確認をした。

2.5. HPV の URR についての PCR 解析

解析に用いたプライマーは表 3 に示す⁶⁾。Bisulfite 処理をしていない DNA、ならびに Bisulfite 処理を行った DNA について、それぞれ至適な条件で PCR

表 1：定量 PCR プライマー情報

プライマー名	対象遺伝子	配列
18_E6	HPV18 E6	forward 5'- CTATAGAGGCCAGTGCCATTCG -3' reverse 5'- TTATACTTGTGTTTCTCTGCGTCG -3' ¹⁰⁾
18_E7	HPV18 E7	forward 5'- TAATCATCAACATTACCAGCCCCG -3' reverse 5'- CGTCTGCTGAGCTTTCTACTACTA -3' ¹⁰⁾
RAR β	ヒト RAR β	forward 5'- TTTGACTGTATGGATGTTCTG -3' reverse 5'- TACTCTGTGTCTCGATGGATT -3' ¹¹⁾
Human β -actin_184	ヒト β -actin	forward 5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC -3' reverse 5'- TCGTGACACAACCGCATGTC -3' ¹²⁾

表 2：メチル化特異的 PCR プライマー情報

プライマー名	対象	配列
RAR-M	メチル化 DNA	forward 5'- TCGAGAACGCGAGCGATTTCG -3' reverse 5'- GACCAATCCAACCGAAACGA -3' ¹³⁾
RAR-U	非メチル化 DNA	forward 5'- TTGAGAATGTGAGTGATTTGA -3' reverse 5'- AACCAATCCAACCAAAACAA -3' ¹³⁾

表3：PCR プライマー情報

プライマー名	対象遺伝子	配列	位置	増幅産物
Msp6	HPV18 URR	forward 5'- AATTATTAGTTTGGTGGATATATAT -3'	f: 6845-6869	340bp ⁶⁾
		reverse 5'- AAAACATACAAACACAACAATAAATA -3'	r: 7186-7161	
Msp8	HPV18 URR	forward 5'- TGTTTAATATTTTGTATTATTTTAATATG -3'	f: 7753-7781	291bp ⁶⁾
		reverse 5'- TATCTTACAATAAAATATTCAATTCC -3'	r: 186-161	

を行った。PCR 産物をクローニング後、DH5 α にトランスフォームし、増殖したプラスミドを NucleoSpin Plasmid QuickPure (TaKaRa Bio) で精製した。

2.6. シークエンス解析

BigDye (Thermo) の反応液を用いてシークエンス反応を行い、シークエンサー (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) にて塩基配列を解析した。

3. 結果

3.1 細胞増殖抑制試験

Fig. 1 に細胞増殖抑制試験の結果を示す。クルクミン濃度 50 μ M で、24 時間後 (P<0.05) および 48 時間後 (P<0.01) に有意な増殖抑制がみられた。クルクミン濃度 10 μ M、20 μ M では、48 時間後 (10 μ M : P<0.01、20 μ M : P<0.05) に細胞の有意な増殖抑制がみられた (Fig. 1 A)。生存率は 50 μ M で、24 時間後 (P<0.05) および 48 時間後 (P<0.05) に有意に低下した (Fig. 1 B)。細胞の形態は 20 μ M

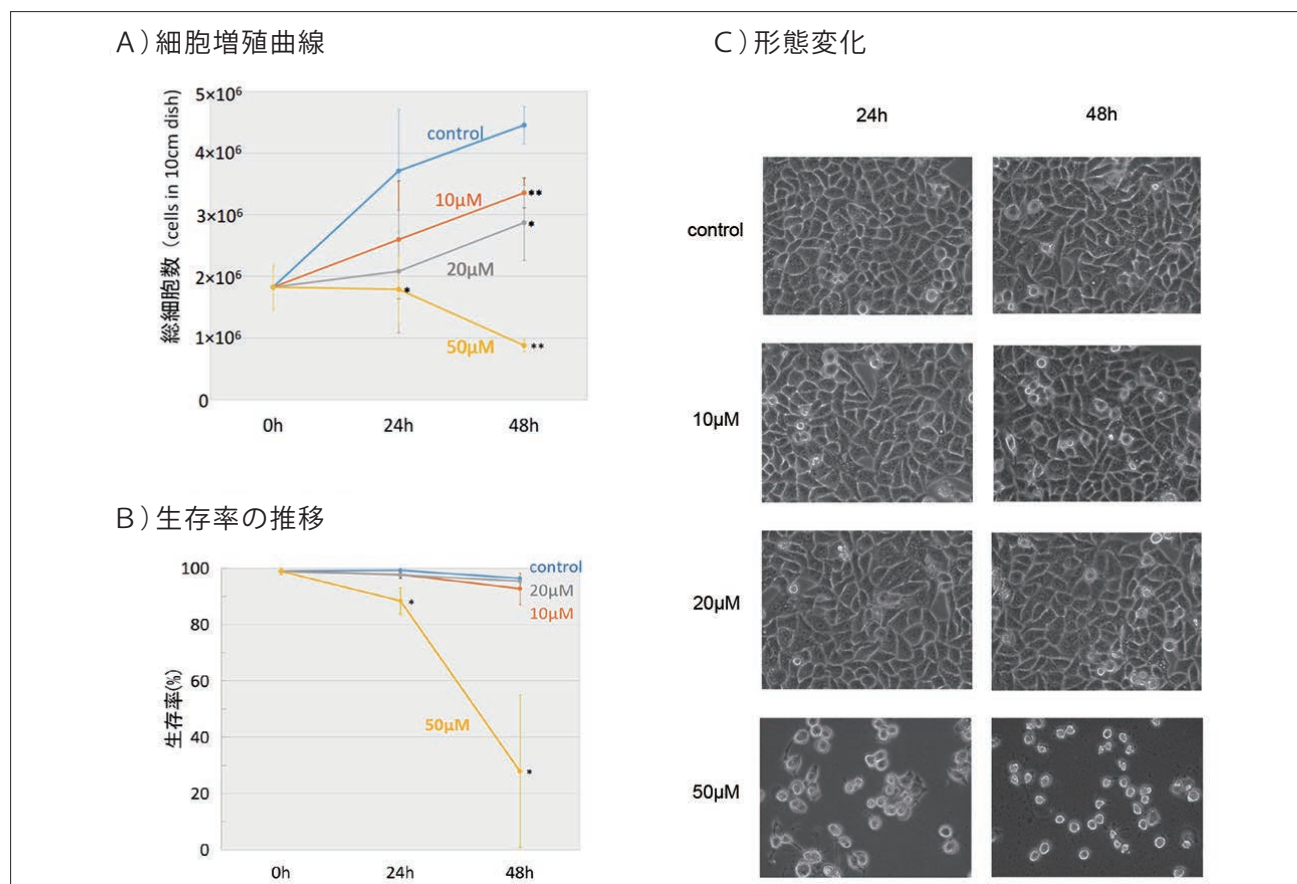


Fig. 1：細胞増殖抑制試験：control (クルクミン 0 μ M) ,クルクミン 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M での HeLa 細胞の培養
A) 細胞増殖曲線、B) 生存率の推移、C) 細胞形態の変化

以下では変化がなく、50 μ M では 24 時間後および 48 時間後に細胞の円形化と収縮がみられた (Fig. 1 C)。

3.2. 癌関連遺伝子発現の解析

クルクミン添加後の HeLa 細胞における癌関連遺伝子の発現量を、 β -アクチンを内部対照とした mRNA の相対量で測定した。HeLa 細胞における E6 および E7 の mRNA 量は、クルクミン 50 μ M を添加してから 24 時間後 (E6 : $P < 0.01$, E7 : $P < 0.01$) および 48 時間後 (E6 : $P < 0.01$, E7 : $P < 0.01$) に、クルクミン添加前に比べて有意に減少したが、RAR β の mRNA 量に有意な変化はみられなかった (Fig. 2)。

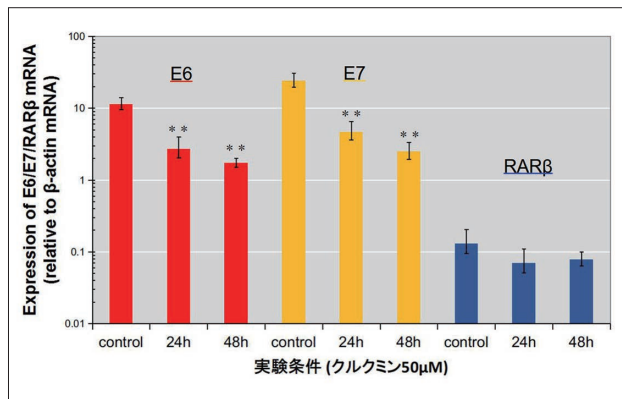


Fig. 2 : クルクミン添加後の HeLa 細胞における癌関連遺伝子の発現量変化 : β -アクチンと比較した mRNA の相対量。HPV の癌遺伝子タンパクである E6, E7 は、24 時間後、48 時間後で、コントロール (培養開始時) と比較し、有意に発現量が低下 ($P < 0.01$) したのに対し、RAR β の発現量は、有意な変化はみられなかった。

3.3. メチル化特異的 PCR による RAR β のメチル化解析

代表的な子宮頸癌 4 細胞株において、RAR β のメチル状態を比較した。その結果、メチル化の頻度は、高い方から HeLa, CaSki, SiHa, C33a の順で、低くなっていた (Fig. 3A)。次に、クルクミン 50 μ M 添加 HeLa 細胞において、添加前、添加後 24 時間、48 時間の解析を行ったが、RAR β のメチル化状態に大きな変化はみられなかった。 (Fig. 3B)

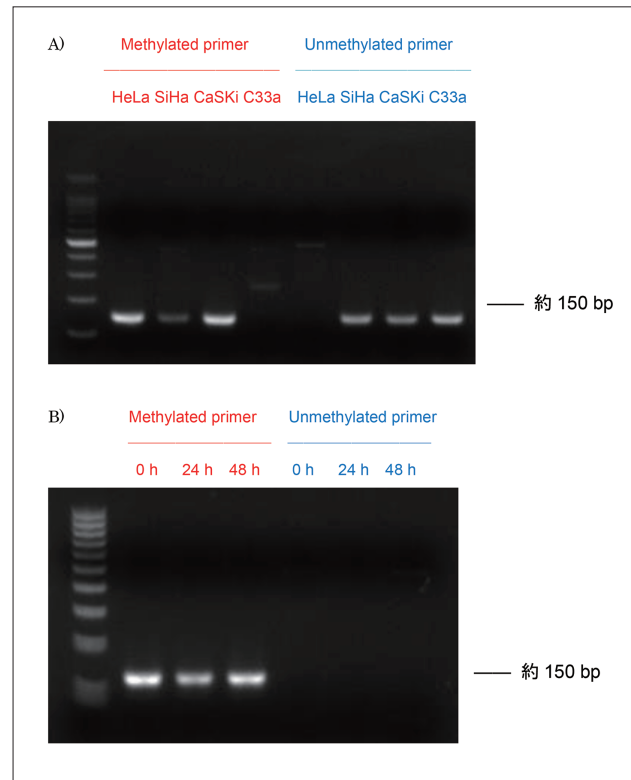


Fig. 3 : RAR β メチル化特異的 PCR A) 代表的な子宮頸癌 4 細胞株における比較 : メチル化の頻度は、高い方から HeLa, CaSki, SiHa, C33a の順で、低くなっていた。B) クルクミン 50 μ M 添加 HeLa 細胞における経時変化 : 培養後、24 時間、48 時間で大きな変化はみられなかった。

3.4. HPV18 URR (L1 3' part) におけるメチル化解析

HeLa 細胞の HPV18 URR (L1 3' part) において、メチル化可能な 11 箇所 (HPV の複製起点 ori を 1 とした塩基番号 6870, 6916, 7011, 7038, 7041, 7062, 7068, 7090, 7110, 7116, 7122) のシトシン (CpG) におけるメチル化状態を、各サンプルのバイスルファイト処理後のクローンをシーケンスすることにより解析した。培養前、クルクミン 50 μ M 添加 24 時間後、48 時間後の各箇所のメチル化状態の解析 (Fig. 4A) の結果、各箇所のメチル化の割合は、培養時間別に比較しても、大きな変化はみられなかった (Fig. 4B)。

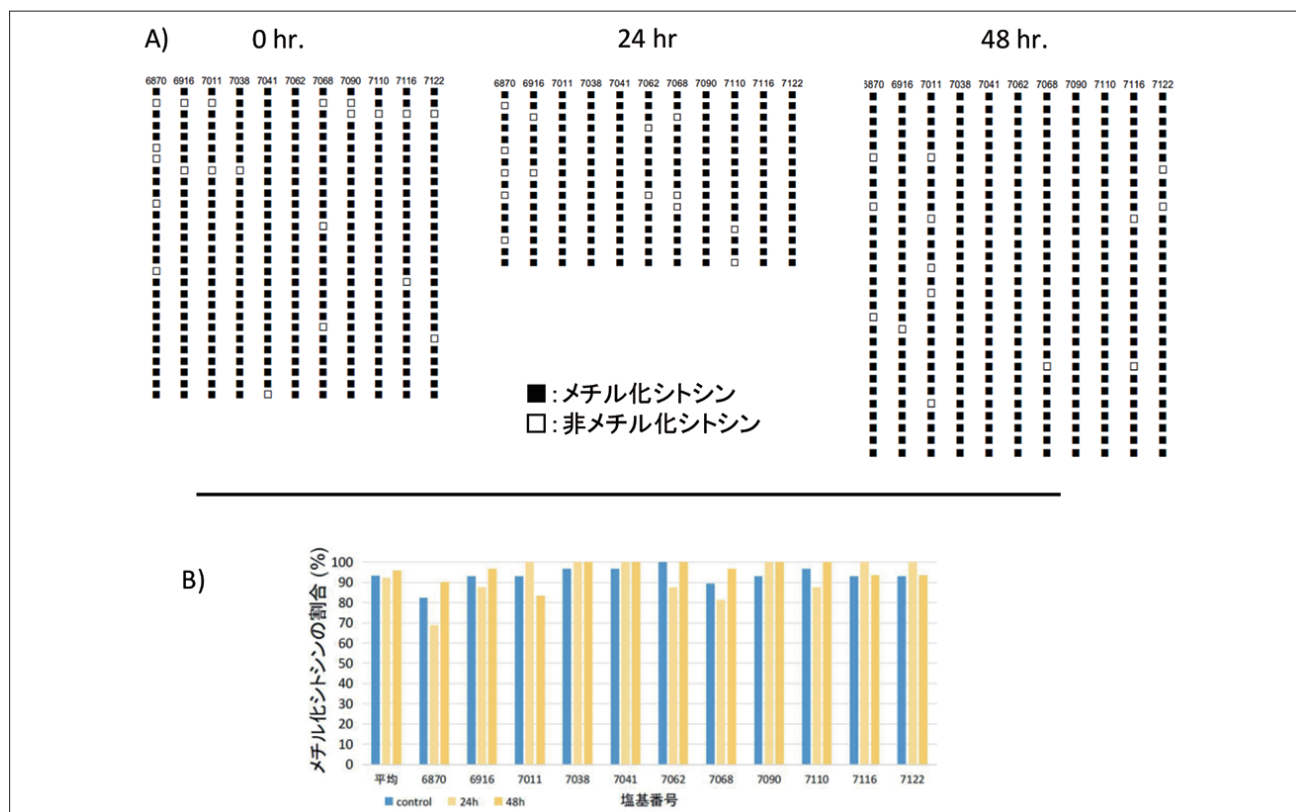


Fig. 4 : HeLa 細胞の HPV18URR (L1 3' part) におけるメチル化可能な 11 箇所 (塩基番号 6870, 6916, 7011, 7038, 7041, 7062, 7068, 7090, 7110, 7116, 7122) のシトシン (CpG) におけるメチル化状態。A) クルクミン 50 μ M で培養 0, 24, 48 時間後の各箇所のメチル化状態。B) 各箇所のメチル化の割合をクルクミン 50 μ M での培養時間別に比較。

4. 考察と今後の展望

HeLa 細胞をクルクミン 50 μ M の濃度で培養することにより、細胞増殖の抑制ならびに生存率の低下が観察された。この機序を解析するために、HPV の癌関連タンパクである E6, E7、および細胞の癌関連タンパク RAR β の mRNA 発現を解析したところ、RAR β の発現量は変化がなかったのに対し、E6, E7 の発現は低下しており、これが細胞増殖抑制に関与していることが示唆された。クルクミンはメチル化転移酵素阻害効果があると考えられ、クルクミン処理により RAR β プロモーター領域のメチル化状態の変化や発現量変化が報告されている¹³⁾ が、HeLa 細胞を用いた本研究では、観察できなかった。また、HPV 遺伝子発現に影響する可能性がある、HPV の URR でのメチル化状態を解析したが、特に変化は認められなかった。近年、これらの領域のメチル化は、HPV に起因する子宮頸癌の悪性度を見るためのバイオマーカーとして注目されているが、クルクミンに

よる癌細胞増殖抑制の機序につながるデータは得られず、今後さらなる解析が必要である。

クルクミンを食品中の成分として考えた場合、口腔内では、比較的高濃度のクルクミンに暴露されることが想定できる。HPV は、口腔癌との関連も指摘されてきている。高リスク型 HPV の関与する口腔癌は、性行動の多様化によってアメリカでは増加しており、ワクチンの対象拡大にもつながっている。今回の知見は、口腔内での HPV 感染細胞においても、同様にクルクミンが E6 や E7 といった HPV 由来の発癌因子を抑制する可能性も示唆する¹³⁾ ことから、今後、口腔内細胞を用いた効果を検討する価値があると思われる。

本研究によって、食品成分として古くから使われてきたクルクミンが、HPV の癌関連タンパク E6 や E7 の発現抑制や HPV 関連癌細胞の増殖抑制を示す基礎データが得られた。社会的に意義のある情報を提供できたと考えている。

謝 辞

本研究の実施にあたり、研究助成をいただきました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深く感謝いたします。また、当研究に従事していただいた東京大学獣医学専修 大川愛絵さん、ならびにご協力いただいた感染制御学研究室 上間亜希子特任助教はじめ、獣医微生物学研究室 堀本泰介教授、村上晋助教、獣医病理学研究室 内田和幸准教授、チェンバーズ ジェームズ助教、原稿に有意義なコメントをいただいた感染制御学研究室 島倉秀勝特任研究員に、心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Haga, T., et al., Papillomavirus Research, 2017. 3: p. 1-6.
- 2) Haga, T., et al., J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. 26(3): p. 256-62.
- 3) Haga, T., et al., Apoptosis, 2008. 13: p. 97-108.
- 4) Steenbergen, R.D., et al., Nat Rev Cancer, 2014. 14(6): p. 395-405.
- 5) Herman, J.G. and S.B. Baylin, N Engl J Med, 2003. 349(21): p. 2042-54.
- 6) Turan, T., et al., Virology, 2006. 349(1): p. 175-83.
- 7) Clarke, M.A., et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. 21(12): p. 2125-37.
- 8) Basu, P., et al., Asian Pac J Cancer Prev, 2013. 14(10): p. 5753-9.
- 9) Thomasset, S.C., et al., Int J Cancer, 2007. 120(3): p. 451-8.
- 10) Paulraj, F., et al., Molecules, 2015. 20(7): p. 11830-60.
- 11) Albino-Sanchez, M.E., et al., Exp Cell Res, 2016. 346(1): p. 40-52.
- 12) Wang, S., et al., Cell Death Dis, 2013. 4: p. e556.
- 13) Jiang, A., et al., Phytother Res, 2015. 29(8): p. 1237-45.
- 14) Mishra, A., et al., Ecancermedicalscience, 2015. 9: p. 525.

Inhibitory effect of polyphenol on human papillomavirus-associated cervical cancer

Takeshi Haga

Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo

The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of curcumin, one of the polyphenols, on HPV positive cervical cancer cells, and to analyze the expression of cancer-related genes, as well as their methylation status in order to obtain a further understanding of its mechanism.

Curcumin exhibited an inhibitory effect on the growth of HPV-positive HeLa cells at 50 μ M [24 hours post incubation (hpi) ($p < 0.05$) and 48 hpi ($p < 0.01$)]. A real-time RT-PCR analysis revealed that the expressions of E6 and E7, major HPV oncoproteins, were down-regulated after 24 hpi and 48 hpi with 50 μ M curcumin ($p < 0.01$). Retinoic acid receptor β (RAR β), one of the cellular tumor suppressors, was previously reported to be up-regulated after exposure to curcumin; however, the expression level of RAR β remained unchanged, in this study.

Methylation status was analyzed at the Upstream Regulatory Region (URR) of HPV18 in HeLa cells via sequencing after bisulfite treatment of the extracted DNA. No clear differences were observed in methylation status at the 11 potential sites. These results suggest that the inhibitory effect of curcumin on HeLa cell growth is associated with the down-regulation of E6 and E7, but not with RAR β expression or the methylation status of HPV18 URR.

Considering curcumin as a food containment, the oral cavity may be exposed to high concentrations of curcumin. As the possible involvement of HPV in oral cancer has recently been addressed, the need for an evaluation of the effect of curcumin on HPV-related oral cancer is indicated. Further studies are required to elucidate such possibilities, as well as the mechanism underlying the down-regulation of E6 and E7 by curcumin.