ヒトパピローマウイルス (HPV) 16型遺伝子を 導入したヒト喉頭上皮細胞の性質

聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科学教室 (主任: 竹山 勇教授)

岩 武 博 也

CHARACTERIZATION OF HUMAN LARYNGEAL EPITHELIAL CELLS TRANSFECTED WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 DNA

HIROYA IWATAKE, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki

Human papillomaviruses (HPVs) are associated with tumor lesions of the larynx. In order to develop a model for investigating the role of HPV in human laryngeal carcinogenesis, normal human laryngeal epithelial cells (HLEC cells) were transfected with a cloned full-length HPV genome. The HPV type 16 (HPV-16) most often associated with cancer of the larynx induced an extended life-span *in vitro* of HLEC cells by exceeding 100 population doublings, while the HPV-11 that is associated with benign laryngeal papillomas failed to do so. The extended life-span cells (HLEC-16 cells) contained integrated HPV-16 DNA, expressed viral E6 and E7 mRNA, showed anchorage-dependent growth and were non-tumorigenic. Using indirect immunocytochemical staining, nuclear p53 protein was not detectable in any of the HLEC-16 cells, implying that HLEC-16 cells were negative for p53 gene mutations. HLEC-16 cells should be useful for studying mechanisms involved in proliferation, differentiation and neoplastic transformation of HLEC cells.

Key words: ヒトパピローマウイルス, 遺伝子導入
培養ヒト喉頭上皮細胞, p 53

A97-1260-60390

1. はじめに

近年の分子生物学を中心とする腫瘍学の進歩は、発癌へのプロセスが段階的なものであり、それぞれの段階において遺伝子レベルでの変化が生じていることを明らかとしてきた。この多段階発癌説の概念は、イニシエーション、プロモーション、プログレッションという明確に区分された過程を含み、各段階を経るごとに細胞は悪性度を増し、不可逆的な癌化の過程を説明したものである。

喉頭癌の発癌プロセスにおいても、ある特定の因子が各段階において細胞の悪性度を推し進め、それぞれの段階において遺伝子レベルでの変化が起こっているものと推察され、その内の1つとして近年、ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus: HPV) の関与も注目されている^{1)~10)}。

HPV はパポバウイルス科に属し、人間を自然宿主

とする小型の DNA ウイルスであり、現在までに70種類以上の亜型が分離され、良性腫瘍から検出されることが多い良性型 (2, 6, 7, 11型など) と、悪性腫瘍から検出されることが多い悪性型 (5, 8, 16, 18型など) に分類することができる¹¹⁾¹²⁾。また、HPV の感染、発現 (転写)、複製 (増殖) は上皮細胞および臓器に特異性のあることが知られており、HPV 遺伝子は子宮などの特定臓器の上皮に発生する腫瘍から検出されることが多く、子宮頸癌と HPV の関連が最近の研究で明らかとなってきた¹¹⁾¹²⁾。喉頭癌の好発部位である声帯は子宮頸部と同じ重層扁平上皮と他の上皮が接する領域が存在し、扁平上皮化生の好発部位であり、喉頭乳頭腫組織からは主として HPV-11 型遺伝子が¹³⁾、喉頭癌組織からは HPV-16 型遺伝子が検出され⁵⁾、喉頭上皮細胞は HPV 遺伝子発現の標的細胞であることがこれまでの報告で明らかとされてきた¹⁴⁾。

さらに、最近のヒト上皮細胞の培養技術と遺伝子導入法の進歩に伴い、ヒト包皮角化扁平上皮細胞をはじめとするヒトの各種上皮細胞に対する HPV 遺伝子の導入、発現が癌化の必須条件の一つである細胞の無制限増殖能を与えることが報告されてきているが^{18)~20)}、喉頭上皮細胞に関する研究はまだなされていない。

本研究では HPV 感染が喉頭の多段階発癌過程へ関与する可能性を実験的に検討することを目的とし、培養喉頭上皮細胞に HPV 遺伝子を導入し、HPV 遺伝子の発現が増殖特性にどのように関与するのかを観察したので報告する。

2. 研究方法

1) ヒト喉頭上皮細胞の初代培養

ヒト喉頭上皮細胞の初代培養には、喉頭摘出術が施行された摘出標本より組織学的に腫瘍細胞を認めなかった正常声帯扁平上皮を用いた¹⁴⁾。培養方法は Boyce と Ham の方法²¹⁾あるいは Turyk らの方法²²⁾を一部改変して、一辺約 5mm の組織から約 10 万個の扁平上皮細胞のみの初代培養細胞を調整した²³⁾。培養液は上皮細胞用培地として開発された低カルシウム (0.03-0.15mM) MCDB153 培地を基礎に、上皮増殖因子 (EGF: 10ng/ml), グルココルチコイド (0.2 μ M), インスリン (5 μ g/ml), トランスフェリン (10 μ g/ml), ウシ下垂体抽出液 (50 μ g/ml) などの各種増殖因子 (その他にペニシリン, ストレプトマイシン, ファンギゾン) を加えた培地, あるいは Keratinocyte Growth Medium (KGM 培地: クラボウ) を用いた。この初代培養されたヒト喉頭上皮細胞 (Human laryngeal epithelial cells: HLEC 細胞) が扁平上皮由来であることを確認する目的で 13 番ケラチンに対するモノクローナル抗体 (KS-1A3: SIGMA) を用いて蛍光免疫細胞学的に検索した。また、初代培養開始後約 2 週間経過した HLEC 細胞から DNA を抽出し、サザンブロッティング法により HPV-11 型および 16 型遺伝子の存在を検索した。

2) HLEC 細胞への HPV 遺伝子導入

遺伝子導入は Lu らのリポフェクション法²⁴⁾を一部改変し²⁰⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾ TRANSFECTAM (生化学工業) を用いて行った。遺伝子導入前日に HLEC 細胞を継代し、プラスミド DNA (5 μ g/500 μ l の培地/1 皿) を TRANSFECTAM REAGENT (10 μ l/500 μ l の培地/1 皿) と共に細胞 (5 $\times 10^6$ 個/500 μ l/60mm 皿) に加え、

3 時間細胞を処理した後、培地を交換し培養を続けた。導入した遺伝子は HPV-11 型および 16 型遺伝子、活性型 ras 遺伝子 (EJ-ras), および陰性コントロールとしてプラスミド pBR322 のみを各々 15 回導入した。

3) サザンブロッティング法およびノザンブロッティング法

細胞からの DNA および RNA 抽出法とサザンブロッティング法およびノザンブロッティング法は Maniatis の方法に従って行った¹⁴⁾²⁸⁾。制限酵素には *Bam* HI および *Pst* I を用いた。ブロッティングに使用したプローブは HPV-16 型の全遺伝子領域と E6 および E7 領域 (*Hpa* II-*Nco* I 断片) を Random priming kit (BRL 社, Gaithersburg, MD) を用いて ³²P で標識したものをを用いた¹⁴⁾。

4) HPV-16 型遺伝子を導入した HLEC 細胞 (HLEC-16 細胞) の細胞特性

HLEC-16 細胞の特性を検討する目的で以下の実験を行った。

① 約 10,000 個の HLEC 細胞と HLEC-16 細胞を 35mm 培養器に培養し、細胞数の変化を 2 週間比較し増殖率を検討した。

② HLEC-16 細胞および陽性コントロールとして SiHa 細胞 (HPV-16 型遺伝子が細胞遺伝子に組み込まれている子宮癌細胞株) 約 5,000 個を軟寒天培地上で 3 カ月間培養し、増殖能を観察した。

③ HLEC-16 細胞および陽性コントロールとして SiHa 細胞約 3 $\times 10^6$ 個を 3 匹のヌードマウスの皮下に注入後、5 カ月間観察し造腫瘍性の有無を観察した。

④ 培養液に血清 (10% ウシ胎児血清), カルシウム濃度の上昇 (1.2-1.8mM) や TGF- β (50-100pg/ml) などの扁平上皮細胞分化刺激因子を加えて、細胞形態の変化を観察した。

⑤ HLEC-16 細胞の p53 癌抑制遺伝子について免疫細胞化学的に検討した。一次抗体には抗 p53 モノクローナル抗体 (DO-7, DAKO) を用いて Avidin Biotin-peroxidase Complex 法 (ABC 法) で行った。陽性コントロールとして PSV-1 細胞 (SV40; Simian virus 40 で形質転換したヒトケラチノサイト) を用いた。

3. 結果

1) ヒト喉頭上皮細胞の初代培養

無血清培地を用いた初代培養開始後、約 1 週間で最初の細胞コロニーを認めた (図 1; A)。その後、HLEC

図1 A: ヒト喉頭上皮細胞の初代培養後1週目の細胞コロニー (KGM 培地)
B: 扁平上皮細胞に特異的な13番ケラチンの発現
(モノクローナル抗体 KS-1A3: 免疫蛍光法)

細胞は増殖を続け比較的安定に3, 4代の継代が可能であった。

初代培養された HLEC 細胞は13番ケラチンに対するモノクローナル抗体に均一に反応し、明らかに声帯扁平上皮細胞由来であることが確認された(図1; B)。また、サザンブロッティング法の結果、HLEC 細胞では HPV-11 型および16型遺伝子は検出されなかった(図2)。

2) HPV 遺伝子を導入した HLEC 細胞の表現形質

HLEC 細胞に各種プラスミドを導入した結果、HPV-11 型遺伝子を導入した細胞(HLEC-11 細胞)はプラスミド pBR322 を導入した HLEC 細胞と同様に分化し増殖が停止した。一方、HLEC-16 細胞の内、2つの細胞群(HLEC 1-16.2 細胞と HLEC 3-16.8 細胞)は寿命が延長し、無制限増殖能を獲得したものと

図2 サザンブロッティング法による HPV-16 型 DNA の検出
制限酵素として *Bam* HI および *Pst* I を用いた。
HPV-16 型 DNA は *Bam* HI で切断すると 7.9kirobase (kb) にバンドを認める。
HLEC 細胞では HPV-16 型 DNA は検出されない。

表1 各種プラスミド導入による HLEC 細胞の寿命延長

導入プラスミド	寿命の延長/ 遺伝子導入の回数
pBR 322	0/15
HPV-11	0/15
HPV-16	2/15
EJ-ras	0/15

思われた(現在、10カ月以上継続して増殖中)。なお、癌遺伝子の一つである活性型 ras 遺伝子(EJ-ras)の

図3 HLEC細胞およびHLEC-16細胞の形態ならびに扁平上皮細胞分化刺激因子による形態変化
 左側はKGM培地で培養したHLEC細胞(A)およびHLEC-16細胞(C, E)の形態。
 右側は扁平上皮細胞分化刺激因子(高カルシウム: 1.2mMの存在下で10%ウシ胎児血清を加えた)によるHLEC細胞(B)およびHLEC-16細胞(D, F)の形態変化。
 DME: Dulbecco Modified Eagle's-medium

導入ではHLEC細胞の寿命延長は認めなかった(表1)。

HLEC-16細胞の形態はHLEC細胞と大きな相違はなかったがHLEC細胞(図3; A)が敷石状の形態を示したのに対し、HLEC 1-16.2細胞(図3; C)と

HLEC 3-16.8細胞(図3; E)は個々の細胞の大きさに差を認め解離しがちであり、多核細胞が数多く観察された。

3) サザンブロッティング法およびノザンブロッティング法

HLEC-16細胞のDNAをサザンブロッティング法で解析したところ、導入したHPV-16型遺伝子はHLEC 1-16.2細胞とHLEC 3-16.8細胞では異なる部位の細胞遺伝子に組み込まれて存在していた(図2)。また、ノザンブロッティング法の結果、HLEC-16細胞の細胞遺伝子に組み込まれたHPV-16型遺伝子は活発にmRNAを転写していた。さらに、プロ-

ブとしてHPV-16型のE6およびE7領域を用いた結果、HLEC-16細胞において転写されていたHPV-16型mRNAはE6およびE7領域からのメッセージを含むことが確認された(図4)。

4) HLEC-16細胞の細胞特性の検討(表2)

HLEC-16細胞の細胞数の変化を2週間HLEC細胞と比較したが、HLEC 1-16.2細胞、HLEC 3-16.8細胞およびHLEC細胞の増殖率はほぼ同一であった。また、軟寒天培地上ではHLEC-16細胞は増殖できず(足場依存性増殖)、ヌードマウスに皮下注入しても腫瘍を形成しなかった。一方、SiHa細胞は軟寒天培地上で増殖し(足場非依存性増殖)、ヌードマウスに皮下注入すると腫瘍を形成し造腫瘍性を認めた。

扁平上皮細胞分化刺激因子による変化を観察したところ、すべてのHLEC細胞は最終分化し培養器の底から剥がれた。HLEC-16細胞では80%以上の細胞に分化が誘導されたが、この条件下で培養を継続すると(2週間)良好に増殖する細胞が出現した(図3; B, D, F)。

次に、HLEC-16細胞のp53癌抑制遺伝子について免疫細胞学的に検討した結果、p53蛋白は核内蓄積として検出不能であった(図5; B)。

図4 ノザンブロッティング法によるHPV-16型mRNAの検出

HLEC-16細胞から抽出されたmRNAはHPV-16型E6およびE7遺伝子領域からの転写を含むことが確認された(プローブ: *Hpa* II-*Nco* I断片)。

4. 考 察

従来よりHPV感染がヒト上皮細胞の発癌過程に関与する可能性が予想されてきており、1983年にzur Hausenらによって子宮頸癌組織よりHPV-16型、18型が発見されたことに加え、近年の分子生物学的研究の進歩などによりある種の皮膚癌、陰茎癌、喉頭癌などの発症にもHPV感染が重要な役割を担うことが推

表2 HLEC-16細胞の増殖特性、扁平上皮細胞分化刺激因子に対する反応およびp53蛋白の発現

細胞	Virus	A	B	C	D	E
HLEC細胞	—	—	—	+	—	—
HLEC 1-16.2細胞	HPV-16	—	—	+	+	—
HLEC 3-16.8細胞	HPV-16	—	—	+	+	—
PSV-1細胞	SV-40	—	—	+	+	+
SiHa細胞	HPV-16	+	+	—	+	—

A = 足場非依存性増殖。

B = ヌードマウスに対する造腫瘍性。

C = 扁平上皮細胞分化刺激因子による形態変化と増殖抑制。

D = Cに抵抗する細胞の出現。

E = p53遺伝子産物(蛋白)の核内蓄積。

PSV-1細胞: SV-40で形質転換したヒトケラチノサイト。

SiHa細胞: HPV-16型遺伝子が細胞遺伝子に組み込まれている子宮癌細胞株。

図5 モノクローナル抗体 (DO-7) による p53 蛋白の検出

A: PSV-1 細胞では核内蓄積を認める。

B: HLEC-16 細胞では核内蓄積が認められない。

察されている¹¹⁾¹²⁾。本研究では HPV が喉頭の発癌に関与する機序を解明するために、HPV-16 型遺伝子を培養喉頭上皮細胞に導入し、どのような形質転換を誘導するかを観察した。その結果、この外来性のウイルス遺伝子が細胞の変化を引き起こす要因として特定できることを証明し得た。また、HPV-16 型遺伝子を導入した培養喉頭上皮細胞は明らかな寿命延長を示し、癌化する際の必須の性質である無制限増殖能を獲得した 2 つの細胞株を樹立することができたが、他の重要な癌細胞の性質、つまり軟寒天培地やヌードマウス内での増殖能は欠如していた。この結果より、HPV-16 型遺伝子を導入をすることにより喉頭上皮細胞を完全に癌化することはできないが、癌化への発展途上にある細胞に形質転換することは可能であると考えられた。従って本研究で作製した HLEC-16 細胞は、ヒト喉

頭上皮細胞の発癌プロセス解析のために有用な細胞株である点が非常に有意義であると思われた。

HPV-16 型の遺伝子配列はウイルスの性質を発現するための蛋白をコードする初期遺伝子群 (E 領域; E1, 2, 4-7)、ウイルスの殻を形成するための蛋白を発現する後期遺伝子群 (L 領域; L1, 2)、ならびに E および L 領域の転写を制御する Long control region (LCR) からなることが現在明らかとなっている¹¹⁾¹²⁾。これまでの子宮頸癌や喉頭癌組織における HPV の解析結果から HPV 遺伝子が細胞遺伝子に組み込まれていることが報告されてきた。さらに、HPV-16 型陽性の子宮頸癌細胞で発現している HPV 遺伝子の分析や HPV-16 型遺伝子断片を細胞に導入する実験から、HPV-16 型の細胞トランスフォーム活性は E6 および E7 遺伝子が担っていると考えられている¹¹⁾¹²⁾¹⁸⁾²⁰⁾。そこで、HLEC-16 細胞の遺伝子を解析したところ、このトランスフォーミング遺伝子 E6 および E7 領域の発現が確認され、HLEC 細胞においても HPV-16 型遺伝子が安定して存在するためには細胞遺伝子に組み込まれることの重要性が示唆された。

本研究において HPV-16 型遺伝子を導入することによって HLEC 細胞は無制限増殖能を獲得したが、そのメカニズムとしては HPV-16 型の E6 および E7 領域がコードするウイルス蛋白の関与が示唆されている。近年、癌抑制遺伝子の 1 つである p53 遺伝子が注目されているが、HPV-16 型遺伝子の E6 蛋白は p53 遺伝子がコードする蛋白と結合し、速やかに分解する活性のあることが実験的に確かめられ、HPV-11 型遺伝子などの良性型の E6 蛋白にはこのような働きのないことが明らかとされてきている²⁹⁾³⁰⁾。このことから HPV-16 型遺伝子の E6 蛋白が細胞増殖を負の方向へ調節する癌抑制遺伝子産物に結合し、その機能を阻害することで細胞の寿命延長を引き起こしているのではないかと考えられている³¹⁾³²⁾。また、p53 遺伝子には野生型と変異型が存在し、喉頭癌において半数以上の症例で免疫組織化学的に p53 蛋白の核内蓄積として検出され、p53 遺伝子に変異のあることが報告されている³³⁾。しかし、p53 遺伝子の変異は頭頸部悪性腫瘍を含む多くのヒトの癌から樹立された細胞株において非常に普遍的に認められているが³⁴⁾、HPV-16 型遺伝子が細胞遺伝子に組み込まれ E6 蛋白を産生する癌細胞株では全くみられないことが報告されている³⁵⁾。これらのことより、p53 遺伝子が正常であっても、E6 蛋白が存在すれば p53 蛋白と結合することによって、その正

常な機能を不活化してしまうので、E6 遺伝子発現細胞では p53 遺伝子変異は必要ないことが推察される。今回の研究でもこの仮説を裏付けるように、HPV-16 型遺伝子を導入し無制限増殖能を獲得した HLEC-16 細胞に対して、免疫細胞学的に検索したところ p53 蛋白は核内蓄積として検出不能であった。

5. ま と め

HPV 感染が喉頭の多段階発癌過程へ関与する可能性を実験的に検討することを目的として、初代無血清培養された喉頭上皮細胞 (HLEC 細胞) に HPV 遺伝子を導入し、HPV 遺伝子の発現が HLEC 細胞の表現型をどのように変化させるのかを観察し以下の結果を得た。

1. HLEC 細胞に HPV-16 型遺伝子を導入することによって無制限増殖能を示す細胞 (HLEC-16 細胞) を得ることができた。

2. HLEC-16 細胞における HPV-16 型遺伝子は細胞遺伝子に組み込まれており、HPV-16 型 E6 および E7 遺伝子領域の発現が確認された。

3. HLEC-16 細胞の増殖は足場依存性であり、ヌードマウスへの皮下注入によって腫瘍を形成しなかった。また、扁平上皮細胞分化刺激因子によって分化が誘導された。

4. HLEC-16 細胞の p53 蛋白は核内蓄積として検出不能であった。

以上の結果より、HLEC-16 細胞は癌化への発展途上にある細胞と考えることができ、ヒト喉頭上皮の発癌プロセスを解析する際に有効な実験モデルとなるものと思われた。

参 考 文 献

- 1) 竹山 勇: 発癌へのホルモンとウイルスの関与。日耳鼻 93: 1745, 1990.
- 2) Brandsma JL, Steinberg BM, Abramson AL et al: Presence of human papillomavirus type 16 related sequences in verrucous carcinoma of the larynx. Cancer Res 46: 2185-2188, 1986.
- 3) Syrjänen S, Syrjänen K, Mäntyjärvi R et al: Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the larynx demonstrated by *in situ* DNA hybridization. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 49: 175-186, 1987.
- 4) Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N et al: Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. Am J Surg Pathol 13: 221-224, 1989.
- 5) Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H et al: Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. Laryngoscope 100: 647-650, 1990.
- 6) Pérez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Esteban F et al: Presence of HPV 16 sequence in laryngeal carcinomas. Int J Cancer 46: 8-11, 1990.
- 7) Ogura H, Watanabe S, Fukushima K et al: Presence of human papillomavirus type 18 DNA in a pharyngeal and a laryngeal carcinoma. Jpn J Cancer Res 82: 1184-1186, 1991.
- 8) Anwar K, Nakakuki K, Naiki H et al: *ras* gene mutation and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. Int J Cancer 53: 22-28, 1993.
- 9) Shidara K, Suzuki T, Hara F et al: Lack of synergistic association between human papillomavirus and *ras* gene point mutation in laryngeal carcinomas. Laryngoscope, in press.
- 10) 堤 康一郎, 鈴木 毅, 岩武博也, 星川智英, 赤尾一郎 他: 声門上癌間質における基底膜構成成分の発現—p53 蛋白腫瘍細胞核内蓄積及びヒトパピローマウイルス16型感染との関係—. 喉頭 5: 97-101, 1993.
- 11) zur Hausen H: Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 184: 9-13, 1991.
- 12) Howley PM, Schlegel R: The human papillomaviruses. Am J Med 85: 155-158, 1988.
- 13) Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M et al: *In situ* hybridization and immunohistochemical study of human papillomavirus infection in adult laryngeal papillomas. Laryngoscope 99: 80-85, 1989.
- 14) 堤 康一郎, 星川智英, 鈴木 毅, 竹山 勇: ヒトパピローマウイルス遺伝子の喉頭腫瘍組織での発現と正常声帯上皮細胞における転写活性。日耳鼻 96: 767-773, 1993.
- 15) Pirisi L, Yasumoto S, Feller M et al: Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. J Virol 61: 1061-1066, 1987.
- 16) Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Bou-kamp P et al: Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after

- transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1: 251-256, 1987.
- 17) Woodworth CD, Bowden PE, Doniger J et al: Characterization of normal human exocervical epithelial cells immortalized *in vitro* by papillomavirus type 16 and 18 DNA. *Cancer Res* 48: 4620-4628, 1988.
- 18) Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL et al: HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8: 3905-3910, 1989.
- 19) Band V, Zajchowski D, Kulesa V et al: Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 463-467, 1990.
- 20) Tsutsumi K, Narasimhaswamy B, Sun Q et al: Human papillomavirus 16 DNA immortalizes two types of normal human epithelial cells of the uterine cervix. *Am J Pathol* 140: 255-261, 1992.
- 21) Boyce ST, Ham RG: Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media. *J Tiss Cult Meth* 9: 83-93, 1985.
- 22) Turyk ME, Golub TR, Wood NB et al: Growth and characterization of epithelial cells from normal human uterine ectocervix and endocervix. *In Vitro* 25: 544-556, 1989.
- 23) Tsutsumi K, Sun Q, Yasumoto S et al: *In vitro* and *in vivo* analysis of cellular origin of cervical squamous metaplasia. *Am J Pathol* 143: 1150-1158, 1993.
- 24) Lu L, Zeitlin PL, Guggino WB et al: Gene transfer by lipofection in rabbit and human secretory epithelial cells. *Pflugers Arch* 415: 198-203, 1989.
- 25) Sun Q, Tsutsumi K, Kelleher MB et al: Squamous metaplasia of normal and carcinoma *in situ* of HPV 16-immortalized human endocervical cells. *Cancer Res* 52: 4254-4260, 1992.
- 26) Mittal R, Tsutsumi K, Pater A et al: Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: Role of progesterone and glucocorticoid hormones. *Obstetrics & Gynecology* 81: 5-12, 1993.
- 27) Sun Q, Tsutsumi K, Yokoyama M et al: *In vivo* cytokeratin-expression pattern of stratified squamous epithelium from human papillomavirus-type-16-immortalized ectocervical and foreskin keratinocytes. *Int J Cancer* 54: 656-662, 1993.
- 28) Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF: Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp 7. 23-7. 25 and pp 7. 43-7. 45.
- 29) Werness BA, Levine AJ, Howley PM et al: Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79, 1990.
- 30) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM et al: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136, 1990.
- 31) Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM et al: The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J* 11: 5013-5020, 1992.
- 32) Lane DP: p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
- 33) Brachman DG, Graves D, Vokes E et al: Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 52: 4832-4836, 1992.
- 34) Sakai E, Tsuchida N: Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7: 927-933, 1992.
- 35) Scheffner M, Munger K, Byrne JC et al: The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5523-5527, 1991.
-
- 稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科学教室、恩師竹山 勇主任教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し、直接ご指導とご助言をして頂いた堤 康一朗講師に心から感謝の意を表します。さらに、さまざまなご協力、ご援助を下さいました教室員の皆様にお礼申し上げます。最後に、クロン化された HPV ゲノムの授与に対してドイツ癌センターの Dr. H. zur Hausen と Dr. L. Gissmann に深く感謝致します。
- なお、本論文の要旨は第37回日耳鼻新潟県地方部会および第6回日本喉頭科学会において発表した。
-
- (1994年2月7日受稿 1994年5月12日受理 急載)
別刷請求先 〒213 川崎市宮前区菅生2-16-1
聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科学教室 岩武博也