

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19562

研究課題名(和文) HTLV-1感染細胞の多段階発がん機構における分子シャペロンタンパク質の関与

研究課題名(英文) Involvement of molecular chaperone in multistage carcinogenesis of HTLV-1-infected cells

研究代表者

内藤 忠相(Naito, Tadasuke)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：50455937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1感染細胞の多段階発癌プロセスにおいて、宿主因子である熱ショックタンパク質および転写因子HSF1(Heat shock factor 1)が及ぼす影響を解明するため、プロテオチューナー法を用いてHSF1活性を人為的に制御する系の構築を試みた。その結果、培養細胞内でHSF1の恒常的活性化を維持できるドミナントアクティブ体、およびHSF1の転写活性化を抑制するドミナントネガティブ体の発現を可逆的に誘導させることに成功し、HTLV-1感染時におけるシャペロンネットワーク機能の生物学的意義を解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：To understand the effect of heat shock proteins and HSF1 (Heat shock factor 1) in multistage carcinogenesis of HTLV-1-infected cells, we performed the construction of an in vivo control system of HSF1 function using by ProteoTuner technology. As a result, we succeeded in the establishment of reversible expression system of HSF1-dominant active and HSF1-dominant negative mutants for the analysis of chaperone network function during HTLV-1 infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 分子シャペロン Heat Shock Factor 1 プロテオチューナー法

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 は歴史上はじめてヒトの疾患との関連が示されたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病 (Adult T cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 の感染者は我が国に 100 万人以上存在し、感染者の一部に発症する ATL は深刻な病気であるにもかかわらず、その発症予防法・治療法は確立していない。HTLV-1 は、感染細胞内でのウイルスゲノム複製を抑制しながら感染細胞自体の増殖を誘導することで宿主免疫系による排除メカニズムを回避しつつ、長期間にわたり宿主ゲノムに変異を蓄積していくことで最終的に一部の感染細胞を腫瘍化に導くとされている。すなわち、ATL はゲノム変異の蓄積による多段階発癌機序により発症する。ATL の病型は、低悪性度のくすぶり型、慢性型から予後不良なリンパ腫型、急性型と多様であるが、各病型に特異的な遺伝子、低悪性度から高悪性度への「急性転化」に関連する遺伝子、多段階発癌の各段階で作用する遺伝子についての報告はなく不明である。

近年、強力な細胞保護作用を持つ分子シャペロンタンパク質であり、熱ショックタンパク質群 (HSPs) の 1 つである Hsp90 の阻害剤が HTLV-1 のウイルス複製活性を低下させ、ATL 細胞の増殖を抑制することが報告された。一方申請者らは、テトラサイクリン応答プロモーターの下流に HTLV-1 の転写制御因子 Tax を組込んだプラスミドをヒト細胞株に安定導入し、Tax 発現誘導前後で変動する遺伝子を網羅的に解析した結果、HSPs 遺伝子群が Tax の標的遺伝子であることを明らかにした (未発表データ)。Tax は感染細胞の腫瘍化に関与することから、分子シャペロン機能が HTLV-1 感染細胞の癌形質の獲得に影響している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、HSPs とそのマスターレギュレ

ーターである転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) に着目し、HSPs 及び HSF1 が ATL の多段階発癌プロセスに及ぼす影響を解明するため、「プロテオチューナー法」を用いて細胞内 HSF1 活性を人為的に制御した際の ATL 細胞に対する効果を検証する。

## 3. 研究の方法

申請者らは先行研究の成果として、「プロテオチューナー法」を活用した HSF1 の活性制御系を確立している (Ryno LM, et al, ACS Chemical Biology, 2014)。プロテオチューナー法は、膜透過性リガンド Shield-1 とヒト FKBP12 タンパク質変異体 (FKBP12mut) の機能的結合を応用したシステムであり、FKBP12mut は細胞内に発現させると速やかにプロテアソームで分解される性質をもつが、この不安定化タンパク質に HSF1 を融合させた FKBPmut-HSF1 は、細胞内に発現させても直ちに分解される。一方、FKBP12mut に Shield-1 リガンドを結合させるとタンパク質が安定化し、融合タンパク質 FKBPmut-HSF1 が分解されずに細胞内に急速に蓄積する。この手法の開発により、細胞にストレスを与えずに HSF1 活性を可逆的に、また迅速に制御できることが可能になった。この方法を用いて、人為的に HSF1 の活性化を誘導したときの ATL 細胞の増殖、ウイルス複製効率への影響、宿主ゲノムの異常頻度を調べる。同システムをレトロウイルスベクター発現系に組み込み HTLV-1 感染細胞に導入後、人為的に HSF1 の転写活性化を促し、細胞腫瘍化との因果関係を解析する。

## 4. 研究成果

ヒト HSF1 は全長 529 アミノ酸 (aa) からなり、185~203aa 領域を内部欠損させることでドミナントアクティブ体として機能し、C 末端 379~529aa 領域を欠損させることでドミナントネガティブ体として機能する。以上

のような HSF1 変異体を FKBP12mut に融合し、動物細胞発現用のプラスミドを構築した(図 1 および図 2)。

HTLV-1 感染実験に用いる Jurkat 細胞にプラスミドを導入し、FKBpmut-HSF1 融合タンパク質の発現を確認した。ウイルス感染の影響を検討するには、HSF1 変異体を発現する細胞株を樹立するか、細胞への発現プラスミド導入効率がほぼ 100%の条件下で実験を行う必要がある。Jurkat 細胞を用いて FKBPmut-HSF1 融合タンパク質を発現する細胞株の樹立を試みたが、細胞クローンを得ることができなかった。そのため、Neon Transfection System を用いてプラスミドの導入効率を検討した結果、細胞に 90%程度の効率で遺伝子導入できる条件を見出した。現在は、HSF1 の活性化状態および不活性化状態を維持した細胞にウイルスを感染させ、感染細胞の増殖に与える分子シャペロンの機能意義について検討している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Sakai T, Nishimura SI, **Naito T**, Saito M. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. **Scientific Reports**, vol.7, 45043, 2017, DOI: 10.1038/srep45043. 査読あり
2. **Naito T**, Mori K, Ushirogawa H, Takizawa N, Nobusawa E, Odagiri T, Tashiro M, Ohniwa RL, Nagata K, Saito M. Generation of a genetically stable high-fidelity influenza vaccine strain. **Journal of Virology**, vol.91, e01073-16, 2017, DOI: 10.1128/JVI.01073-16. 査読あり
3. Minakuchi M, Sugiyama K, Kato Y, **Naito T**, Okuwaki M, Kawaguchi A, Nagata K. Pre-mRNA processing factor Prp18 is a stimulatory factor of influenza virus RNA synthesis and possesses nucleoprotein chaperone activity. **Journal of Virology**, vol. 91, e01398-16, 2017, DOI: 10.1128/JVI.01398-16. 査読あり

図1 プロテオチューナー法を応用したHSF1の活性化および不活性化

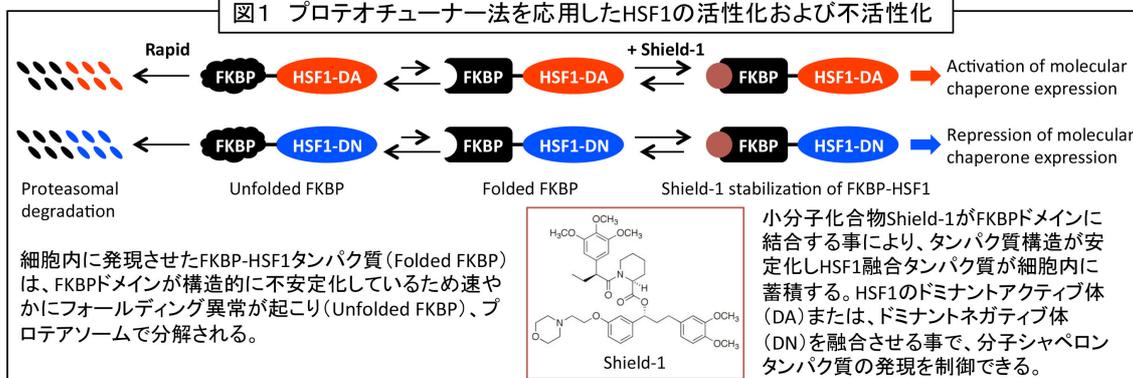
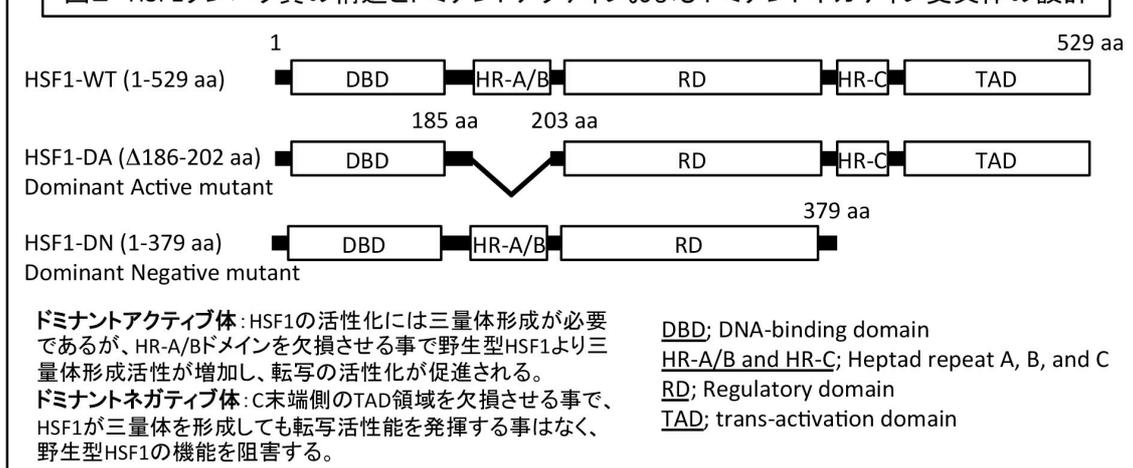


図2 HSF1タンパク質の構造とドミナントアクティブおよびドミナントネガティブ変異体の設計



4. Ushirogawa H, Naito T, Tokunaga H, Tanaka T, Nakano T, Terada K, Ohuchi M, Saito M.  
Re-emergence of H3N2 strains carrying potential neutralizing mutations at the N-linked glycosylation site at the hemagglutinin head, post the 2009 H1N1 pandemic.  
**BMC Infectious Diseases**, vol.16, 380, 2016, DOI: 10.1186/s12879-016-1738-1. 査読あり
5. Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, Fukushima T, Tanaka Y, Saito M.  
Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status.  
**Retrovirology**, vol.13, 29, 2016, DOI: 10.1186/s12977-016-0263-z. 査読あり
6. Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E.  
Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain.  
**Vaccine**, Vol. 34, 328-333, 2016, DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.11.050. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. 内藤 忠相、齊藤 峰輝  
Molecular analysis of HTLV-1 subgroups associated with the development of HAM/TSP. 18th International Conference on Human Retrovirology, HTLV and Related Viruses.  
2017年3月8日、ホテルグランドアーク半蔵門(東京都千代田区)
2. 内藤 忠相  
ウイルスポリメラーゼの高忠実化誘導による変異の入りにくいインフルエンザワクチン母体株の開発  
5th Negative Strand Virus-Japan Symposium.  
2016年1月26日、ホテルモントレ沖縄(沖縄県国頭郡)
3. 内藤 忠相、水戸部 悠一、安間 恵子、松岡 雅雄、齊藤 峰輝  
HAM 発病関連ウイルス型が Tax および HBZ の標的遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析  
第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2015 年 8 月 23 日、東京大学医科学研究所(東京

都港区)

4. 内藤 忠相、後川 潤、齊藤 峰輝  
高忠実化ポリメラーゼ誘導による低抗原変異性インフルエンザワクチン母体株の開発  
第 56 回日本臨床ウイルス学会、2015 年 6 月 14 日、岡山大学(岡山県岡山市)

[その他]

報道関連情報

発表論文 # 2 (Generation of a genetically stable high-fidelity influenza vaccine strain) の研究成果が、山陽新聞 (2017 年 1 月 25 日朝刊)、テレビせとうち (2017 年 1 月 27 日 TSC ニュース 5 金曜版)、朝日新聞 (2017 年 1 月 30 日朝刊)、読売新聞 (2017 年 2 月 6 日朝刊)、中四国医事新報 (2017 年 2 月号) によって報道された。

ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 忠相 (NAITO Tadasuke)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 50455937