

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17558

研究課題名（和文）細胞競合を介した新たな癌ウイルス排除機構の解析

研究課題名（英文）Analysis for new elimination mechanism against virus-induced cancer cells through the cell competition with normal cells.

研究代表者

大庭 賢二（Ohba, Kenji）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20759576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では癌に対する細胞競合研究から得られた知見を基に、ウイルス感染初期に細胞競合によって非感染正常細胞群が感染細胞を排除すること、ならびにウイルス感染初期の細胞競合現象に関わる分子メカニズムの解析を行った。期間中に実施した研究から、ウイルス感染初期に細胞競合によって、非感染正常細胞群が感染細胞を分子免疫的な反応を介して排除していることが明らかとなった。この研究によって他のウイルス感染時においても同様に、ウイルス感染初期に上皮組織がウイルス感染細胞を排除する感染防御機構が存在する可能性が示唆され、他のウイルス感染に対する今後の発展的な研究が大いに期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、新たに感染の初期にがんウイルス感染細胞に対して正常細胞が引き起こす細胞競合による感染細胞の排除機構が存在し、細胞競合が様々なウイルス感染の超初期段階に生体の防御機構として働いている可能性が示された。この機構はがん細胞については報告がなされてきたが、ウイルス感染に対しての報告は殆ど無く、ウイルス感染に対する生体の新たな防御機構として学術的意義は非常に大きい。また、新たな生体防御機構の可能性が示されたことで、ウイルス感染に対する予防・治療法の確立のための新しいアプローチが可能となり、今後のウイルス感染症対策に大きな役割を担えることから社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In present study, we investigated whether viral infected cells were eliminated from normal epithelial layers by cell competition at early stage of viral infection, and performed analyses for molecular mechanism during cell competition, along the knowledge based on cell competition against cancer cells. From the results by experiments performed during grant supported term, it was revealed that viral infected cells were eliminated from normal epithelial layers through a kind of molecular immunological reaction which is induced by cell competition. This study suggests the possibility that other viral infected cells may be eliminated from normal epithelial layers by cell competition at early stage of infection. Therefore, there are much expectation that the mechanism of cellular defense through cell competition against other viruses will be revealed in future.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス感染 がん 細胞競合 細胞間相互作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 科学の発展と共に人の Quality of Life は向上しているが、癌やウイルス感染症は今もなお世界的に大きな問題となっている。癌ならびに感染症の克服にはその病態メカニズムや免疫機構といった事象を理解し、それに即した治療薬の開発や治療法の確立が必須である。生体は主に免疫細胞を中心とした生体防御系によって生体の恒常性を維持していると考えられているため、免疫細胞による生体防御機構を考慮した治療法が現在の主流となっている。しかし、免疫系は複雑に制御されているため、効率的かつ有効な治療法確立の妨げとなっている。そのため、新たな革新的なアプローチによる治療法の確立が待たれている。

(2) 近年我々は、当初ショウジョウバエにおいて発見された「劣勢細胞が優勢細胞により組織から淘汰・排除される細胞競合現象」(Morata et al., Dev. Biol., 1975)が哺乳類でも起こり、正常上皮細胞が癌細胞を感知し、管腔側へ排除することで癌から生体を防御している事を証明した(図1)。この新規の生体防御機構は、宿主の癌タンパク質 RasV12 や Src の発現で誘導され、癌変異細胞が有する何らかの「違い」を正常細胞が感知することで癌細胞の排除が起こると考えられている。また、細胞極性に関わる *Scribble* 遺伝子の欠損によっても細胞競合が誘導され、細胞死を伴って変異細胞が管腔側へ排除される。この細胞競合による異常細胞排除機構は、1つの癌細胞が発生すると同時に排除する、超初期生体防御機構と言える。

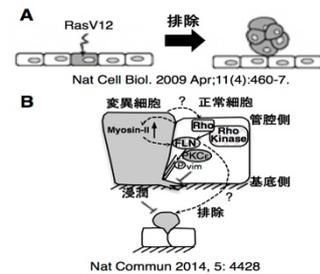


図1 正常上皮細胞による癌細胞排除機構

(3) 一方、ウイルスは正常組織中に感染して自身の複製を行う。この時、初期の感染細胞数は非常に少なく、感染細胞は正常細胞に囲まれた状態であり、前述の癌細胞排除時と似た状態といえる。つまり、ウイルス感染においても超初期段階では細胞競合による生体防御機構が働いている可能性がある。さらに、ウイルスは宿主の様々なシステムを利用して複製を行うために、細胞内をウイルス複製に適した状態に変化させることが知られている。特に癌ウイルスにおいては、ウイルス因子が複製時に細胞極性を変化させていることが知られている(表1)。具体的にはヒトパピローマウイルス(HPV)の癌遺伝子である E6 タンパク質は *Scribble* タンパク質に作用して感染細胞の細胞極性を変化させる。さらには、胃癌の原因病原体であるヘリコバクターピロリでは癌誘導担当遺伝子 *CagA* 発現細胞が管腔側に抜け出ている可能性も報告されている(Saddat et al., Nature, 2007; Murata-Kamiya et al., Cell Host Microbe, 2010)。これらはウイルスなどの感染時においても生体の超初期防御機構として正常上皮細胞が隣り合う感染細胞の極性変化といった「違い」を感知し、異常細胞を排除している可能性を示唆している。

表-1 細胞極性に影響を与える主なウイルス因子

	ウイルスタンパク質	極性関連因子
Epstein-Barr virus (EBV)	LMP1	E-cadherin , CDC42, SNAIL, plakoglobin, TWIST
	EBNA1	β -catenin
	LMP2A	β -catenin, E-cadherin
Kaposi's sarcoma Herpesvirus (KSHV, HHV-8)	LANA	β -catenin
	K5	VE-cadherin
	K15	miR31, FAT4
	K1, vGPCR	Rac1
Papilloma virus (HPV)	E6	Scribble , E-cadherin , DLG1, MAGI, PATJ, MPDZ
	E7	E-cadherin
Hepatitis B/C virus (HBV, HCV)	HBx(HBV)	GSK3 β , β -catenin
	Core (HCV)	E-cadherin , β -catenin
	NS5A	β -catenin

(4) しかしながら、ウイルス感染時に細胞競合を介した超初期生体防御機構によって感染細胞が正常細胞群から排除されているという報告は殆どない。

2. 研究の目的

本研究では癌に対する細胞競合研究から得られた知見を基に、ウイルス感染初期に細胞競合によって非感染正常細胞群が感染細胞を排除することを世界で初めて明らかにすると共に、ウイルス感染初期の細胞競合現象に関わる分子メカニズムの全容を解明し、予防・治療薬開発といった今後の発展的研究を行う礎を作ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ① テトラサイクリン誘導性 HPV E6/E7 遺伝子安定発現ヒト細胞の樹立

既に MDCK 細胞を用いて示した E6/E7 発現細胞(疑似感染細胞)の正常上皮細胞層からの排除をヒト細胞系を用いて検証するために、テトラサイクリン誘導性プロモーターで遺伝子発現タイミングを制御できる緑色蛍光タンパク質 *GFP* 遺伝子と *E6* または *E7* 遺伝子を融合させたコンストラクトを作製する。その後、それらを MCF10A 細胞ならびに *hTERT* と *CDK4* 遺伝子の過剰発現により不死化させたヒト(子宮)上皮初代培養細胞に導入し、テトラサイクリン誘導性 E6/E7 安定発現 MCF10A ならびにヒト上皮初代培養細胞を作製する(図2)。

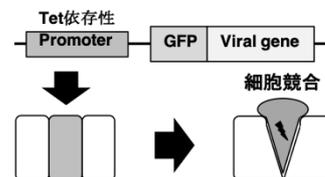


図2 誘導型E6/E7発現細胞を用いた細胞競合系

② 二次元培養系による正常細胞群による HPV E6/E7 発現細胞の排除率の定量

正常細胞と E6/E7 安定発現細胞を 50:1 でコラーゲンゲル上にコンフルエントになるように撒いた 6 時間後にテトラサイクリン刺激を与え、安定発現細胞中で E6 または E7 の発現を誘導する。その後 12-48 時間、共焦点顕微鏡で細胞を観察し、経時的に正常細胞群からの排除細胞と未排除細胞数をカウントし、全 E6 または E7 発現細胞からみたそれぞれの割合を算出することで排除効率を解析する。

③ 三次元管腔形成培養法を用いた HPV E6/E7 発現細胞排除機構の解析

MCF10A 細胞やヒト子宮上皮初代培養細胞をマトリジェル内で培養する三次元培養法によって生体により近い管腔構造を形成させ、その中で正常上皮細胞中の E6/E7 発現細胞が排除されるかを解析する系を構築する。具体的には、タモキシフェン依存性 Cre を発現するカセットと loxP-Stop-loxP で CMV プロモーターと E6/E7 遺伝子が隔てられたカセットをそれぞれレンチウイルスベクターに導入する (図 3A)。それらを MCF10A 細胞とヒト子宮上皮初代培養細胞に導入し、安定発現細胞を樹立する。その後、樹立された細胞をマトリジェル内にて 10-14 日間培養することで管腔構造を形成させる。次に少量のタモキシフェン添加によって一部の細胞でのみ Cre レコンビナーゼを活性化させ、loxP 配列同士での組換え頻度を調節することで管腔内でモザイク状に E6/E7 発現細胞を出現させる。その後 12-48 時間、経時的に共焦点顕微鏡で観察し、細胞競合によって E6/E7 発現細胞が正常細胞群から排除されるかを検証し、その割合を算出することで排除効率を解析する (図 3B)。

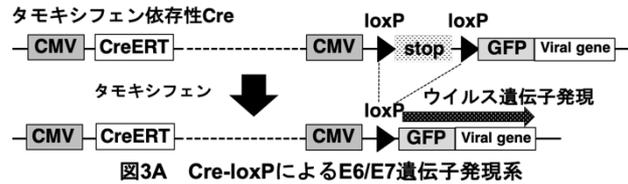


図3A Cre-loxPによるE6/E7遺伝子発現系

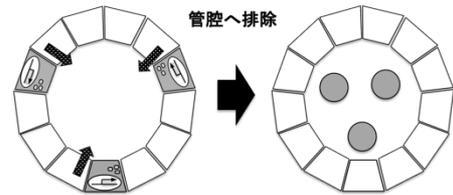


図3B 三次元培養細胞競合モデル

(2) 細胞競合に関与する様々な宿主因子の同定

正常細胞群から E6/E7 発現疑似感染細胞が排除されるメカニズムを詳細に解析するために、1) 共培養下特異的に増減する因子探索のための RNA シークエンス、2) 細胞競合を起こしている細胞に対する 1 細胞質量分析による細胞内分子変化の解析、3) 細胞競合必須因子探索のための宿主因子に対する shRNA ライブラリ、または CRISPR-Cas9 ライブラリを用いたノックダウン/ノックアウトによる 3 種の包括的なスクリーニングを行う (図 4)。

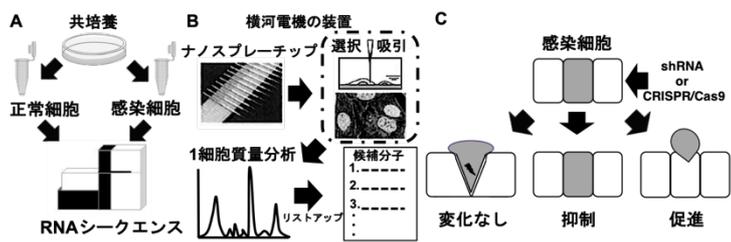


図4 細胞競合関連因子のスクリーニング

① 共培養下特異的に増減する因子探索のための RNA シークエンス

正常細胞と E6/E7 発現細胞の共培養から E6/E7 遺伝子に融合した GFP の蛍光を指標にセルソーティングを行い、分離した正常細胞と E6/E7 発現細胞群から mRNA を抽出する。単独培養の正常細胞あるいは E6/E7 発現細胞からの mRNA をコントロールとして RNA シークエンス解析を行い、共培養条件下特異的に増減する因子を同定する (図 4A)。

② 細胞競合を起こしている細胞に対する 1 細胞質量分析による細胞内分子変化の解析

近年、横河電機が開発した 1 細胞質量分析法 (Fujii et al., Nat. Protoc., 2015) を用いて顕微鏡下で共培養中の細胞競合を起こしている E6/E7 発現細胞を選別し、細胞中の任意の部位や器官をナノスプレーチップに回収する。そのチップを質量分析機に接続し、1 細胞内での分子変化を解析することで細胞競合に関わる分子の同定とその変化を解析する。 (図 4B)

③ shRNA/CRISPR-Cas9 ライブラリを用いたノックダウン/ノックアウトによる細胞競合関連因子の探索

E6/E7 発現細胞または正常細胞内の細胞競合必須因子を同定するために、宿主因子に対する shRNA または CRISPR/Cas9 ライブラリを E6/E7 発現細胞または正常細胞のみに導入し、ランダムに宿主因子がノックダウン/ノックアウトされた細胞を作製する。その後 96 ウェルプレート上で共培養実験を行い、E6/E7 発現細胞排除が抑制される細胞と促進される細胞を高速撮像共焦点顕微鏡で GFP の蛍光を指標に選定する。細胞競合の強弱に変化のみられた細胞内のノックダウン/ノックアウト遺伝子を解析し、E6/E7 発現細胞排除機構に必要な宿主因子を同定する (図 4C)。

スクリーニング後に個々の因子について過剰発現系の構築などを行い、その因子の細胞競合における関与を裏付けるとともにその分子シグナルを詳細に解析する。

(3) 疑似感染細胞競合モデルマウスの構築と *in vivo* での解析

上皮細胞で特異的に発現するサイトケラチン (CK)19 のプロモーターとタモキシフェン依存的 Cre-loxP の組換えを利用して、上皮細胞層にモザイク状に E6/E7 遺伝子を発現制御できる疑似感染細胞競合モデルマウスを作製する (図 5)。そのマウスの子宮を中心とした臓器から細胞を抽出し、*ex vivo* でオルガノイド培養した後にタモキシフェンで組換えを起こさせ、E6/E7 発現細胞が正常細胞層から排除されるかを検証する。さらには、マウスに直接タモキシフェンを投与し、生体内で Cre による組換えを起こさせた後に、共同研究先のカン研究所が有するマウスの *in vivo* ライブイメージング技術を行って E6/E7 発現細胞が生体内で正常細胞層から排除されるかを検証する。その後、先に同定された細胞競合関連遺伝子を shRNA レンチウイルス、または CRISPR/Cas9 でノックダウン/ノックアウトしたマウスを作製し、同様にオルガノイド培養ならびに *in vivo* イメージングを用いて発見された分子メカニズムの証明を生体でもおこなう。

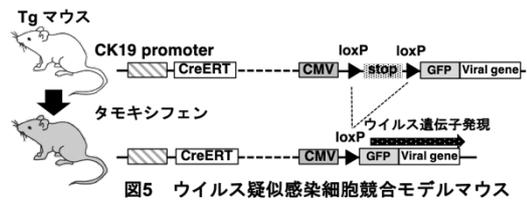


図5 ウイルス疑似感染細胞競合モデルマウス

4. 研究成果

(1) 細胞競合条件下でテトラサイクリンで発現が誘導できる HPV 遺伝子発現細胞と正常細胞による反応を解析したところ、正常細胞が HPV 遺伝子発現細胞の出現を認識し、細胞非自律的に HPV 遺伝子発現細胞に細胞死を誘導して排除していることを確認した (図 6A)。この排除機構は主に HPV の E6 遺伝子発現による変化を正常細胞が認識することによって誘導されていることがわかった。細胞競合条件下で E6 発現細胞の排除を経時的に共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングで解析したところ、E6 遺伝子の発現誘導刺激から約 9 時間後程度から排除が開始されることが確認された。また誘導された細胞死は Caspase3 陽性であったことから、アポトーシスが誘導されていることがわかった (図 6B)。

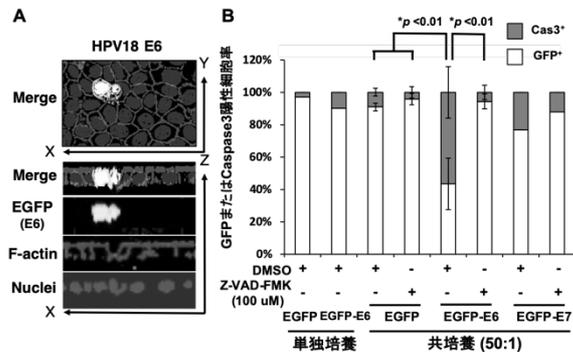


図6 正常細胞との細胞競合によるE6発現細胞の細胞死

(2) 細胞競合条件下でテトラサイクリン誘導性 HPV E6 発現細胞に誘導されるアポトーシスを介した排除機構の解析を行うために、テトラサイクリン刺激から 16 時間後の細胞群を EGFP-E6 の蛍光を利用した Cell sorting によって、E6 発現細胞を細胞競合条件下から分離した。その後、次世代シーケンスにより RNA シークエンス解析を行ったところ、約 100 種の遺伝子に発現上昇が、約 80 種の遺伝子に発現減少が生じていることが分かった。その中で、約 10 遺伝子がアポトーシスと何らかの関連がある遺伝子であった (図 7)。

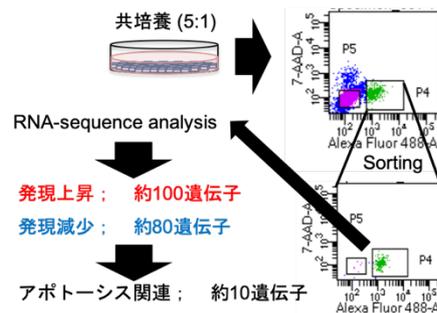


図7 細胞競合時のE6発現細胞内における遺伝子発現変化

(3) アポトーシスとの関連が強い 3 因子の関与を解析するために、E6 発現細胞にそれぞれの遺伝子特異的な shRNA を導入し、細胞競合特異的な E6 発現細胞の細胞死への影響を観察した。すると、それぞれの因子に対する shRNA の導入によって、一定程度のアポトーシスの減少が観察された。アポトーシスの減少度が大きかった 1 種の遺伝子は生体防御反応時に放出される因子によって惹起される遺伝子であった。

(4) 詳細な分子機構の解析を行うために、次世代シーケンス結果を踏まえた追加実験を行ったところ、E6 発現細胞に対する細胞競合による排除機構は、正常細胞が異常細胞を認識したことによって端を発した、古典的な免疫反応に関わる分子機構が関与している可能性が示唆された。

(5) 古典的な免疫反応特異的に変化する遺伝子のプロモーター活性をルシフェラーゼレポーターを用いて解析したところ、正常細胞やE6発現細胞の単独培養ではあまり活性化しておらず、細胞競合条件下特異的にE6発現細胞内においてプロモーター活性が上昇していることが分かった(図8)。

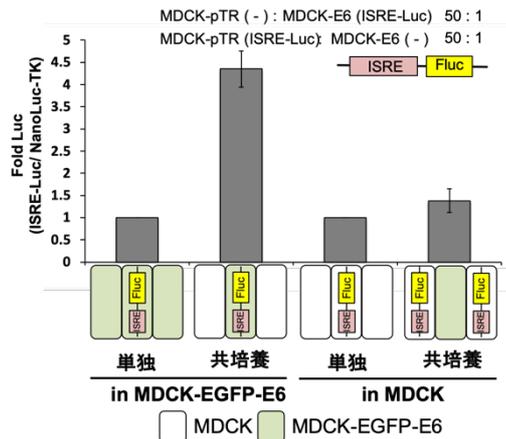


図8 細胞競合時のISREプロモーター活性の変化

(6) この排除機構を促進する可能性がある物質を添加したところ、HPV発現細胞の排除が亢進した。

(7) 共焦点顕微鏡を用いた1細胞サンプリングシステムを用いた解析系の構築を開始した。当初は質量分析を行う事になっていたが、感度やサンプル量の問題から1細胞サンプリングシステムを用いたRNAシーケンス解析へと変更した。条件検討が概ね完了し、細胞競合条件下でE6発現細胞を取り囲む正常細胞を1細胞ずつサンプリングすることが可能になった。また、1細胞からcDNAの合成にも成功し、細胞競合下の任意の細胞の1細胞RNAシーケンスが行える可能性を示すことができた。

(8) ランダムライブラリーを用いた解析は高価であるために実施が難しいと判断し、代替として細胞競合時の細胞表面因子の変化をファージ抗体でスクリーニングできる系の立ち上げを行い、E6発現細胞やE6/正常上皮細胞の境界を認識しているような染色画像が得られるファージ抗体の候補群が得られた。

(9) HPVに対する細胞競合を*in vivo*で解析するために、Rosa26にCre酵素特異的に組換えを誘導し、EGFP, E6, E7, E6/E7遺伝子を発現できるベクターを構築し、それらのベクターを安定的に保持するマウスES細胞を樹立した。そしてモデルマウスの構築を行った。

(10) 研究代表者の研究期間内での異動が生じたため、モデルマウスの構築やスクリーニングシステムの構築において、当初の計画からの遅れが生じてしまった。しかしながら今後、本研究に基づいた解析が進むことで、新たながん・ウイルス感染の予防・治療法が確立していくことが大いに期待される。

(11) 本研究によって、ウイルス感染初期に細胞競合によって非感染正常細胞群が感染細胞を排除することが明らかとなった。また、ウイルス感染初期の細胞競合現象に関わる分子メカニズムの一端が解明された。この研究によって、他のウイルスにおいても同様にウイルス感染初期にウイルス感染細胞が上皮組織から排除される感染防御機構が存在する可能性が示唆されるため、他のウイルスに対する今後の解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大庭賢二、酒向宏明、藤田恭之
2. 発表標題 変異細胞または正常/変異細胞の境界を認識する膜表面分子の探索
3. 学会等名 新学術領域研究－細胞競合－ 細胞社会を支える適者生存システム－ 第5回領域班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Ohba, Yasuyuki Fujita
2. 発表標題 Elimination of oncoviral factor-expressing cells via cell competition
3. 学会等名 3rd International Symposium on Cell competition, Cell Competition in Development and Cancer (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大庭賢二、酒向宏明、掛布真愛、藤田恭之
2. 発表標題 ファージ抗体ライブラリを利用した細胞競合制御因子の探索
3. 学会等名 第7回 細胞競合コロキウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究に関連する論文は投稿準備中であるため、掲載が確定され次第に申請する。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤田 恭之 (Fujita Yasuyuki)		
研究協力者	丸山 剛 (Maruyama Takeshi)		