

平成 21 年 3 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790342  
 研究課題名（和文） 肺癌ウイルスエンベロープ細胞内領域の構造機能相関  
 研究課題名（英文） Structure and function of lung cancer-inducing virus envelope protein  
 研究代表者  
 前田 直良（MAEDA NAOYOSHI）  
 九州大学・デジタルメディスン・イニシアティブ・助教  
 研究者番号：80444800

## 研究成果の概要：

ラット上皮細胞株 RK3E を用いたトランスフォーメーションアッセイにおいて、jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)、及び enzootic nasal tumor virus (ENTV) のどちらのエンベロープも、Ras-MEK-MAPK 経路、PI3k-Akt-mTOR 経路、及び Rac1 を活性化して細胞をトランスフォームすることが示唆された。また、JSRV エンベロープ細胞内領域の Y590 遺伝子に変異を導入したウイルスゲノムを持つウイルス粒子の接種は、ヒツジ個体内で肺癌を発症しなかったことから、Y590 を含めた細胞内領域の重要性が *in vivo* において初めて確認された。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 0       | 1,900,000 |
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 420,000 | 3,720,000 |

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：レトロウイルス、癌、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

ヒツジに肺腺癌 (ovine pulmonary adenocarcinoma [OPA]) を引き起こすウイルスとして、jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) が知られている。JSRV はレトロウイルス科ベータレトロウイルス属に分類され、構造タンパク質をコードする *gag*、*pro-pol*、及び *env* から成る単純レトロウイルスである。また、肺細胞にのみ特異的に発現し、肺癌を発症させるという点で大変ユニークである (Palmarini *et al.*, J. Virol. 2000)。OPA はヒト細気管支肺胞上皮癌

(Bronchioloalveolar carcinoma [BAC]) に病理学的に類似していることから、OPA は BAC の唯一の動物モデルとして有用と考えられてきた。近年 JSRV の infectious molecular clone pJSRV<sub>21</sub> の分離によって、培養細胞を用いた解析が可能となった (Palmarini *et al.*, J. Virol. 1999)。更に、哺乳類細胞で発現するように、pJSRV<sub>21</sub> の 5' 側 U3 領域を CMV プロモーターに置換した pCMV2JSRV<sub>21</sub> が作成され、ヒト 293T 細胞中での強制発現によって産生したウイルス粒子の接種により、ヒツジに肺癌が発症したことから、JSRV 自体が肺癌を

発症する因子であることが証明された (Palmarini *et al.*, J. Virol. 1999)。しかしながらその肺発癌機構に関しては未解析であり、長く不明であった。本研究代表者は、JSRVの肺発癌機構を解析する目的で、pCMV2JSRV<sub>21</sub>をマウス線維芽細胞NIH-3T3、及びラット線維芽細胞Rat6 にトランスフェクションした結果、細胞上にフォーカス形成を観察し、JSRV自体にげっ歯類線維芽細胞株をトランスフォームする能力があることを発見し、また同手法にて、*env*遺伝子領域にコードされる全長のエンベロープタンパク質にトランスフォーメーション活性が存在することを発見した (Maeda *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001)。本研究代表者は、更にRas-MEK-MAPK、PI3k-Akt-mTOR、及びp38のシグナル伝達経路が、NIH-3T3、あるいはラット上皮細胞株RK3Eのトランスフォーメーションに関与していることを見出した (Maeda *et al.*, J. Virol. 2003, Maeda *et al.*, J. Virol. 2005)。また、JSRVエンベロープタンパク質単独の発現により、ヒツジ個体内で肺癌が誘導されることが示された (Caporale *et al.*, J. Virol. 2006)。すなわち、JSRVエンベロープタンパク質は、癌遺伝子産物として機能することが、*in vitro*、ならびに*in vivo*で証明された。その一方で、内在性ヒツジレトロウイルス(enJSRV)のエンベロープタンパク質は、げっ歯類線維芽細胞をトランスフォームする能力が欠失していることが示された (Palmarini M, Maeda N, *et al.*, J. Virol. 2001)。JSRVエンベロープ(615アミノ酸)とenJSRVエンベロープ(611アミノ酸)のアミノ酸配列を比較すると、C末端の細胞内領域44アミノ酸は、JSRVとenJSRVの間で保存されていない。JSRVの細胞内領域44アミノ酸の全てを、一つ一つアラニンに置換して解析するアラニンスキャニング法により、トランスフォーメーションに関与するアミノ酸と、関与しないアミノ酸にすみ分けされた (Hull and Fan, J. Virol. 2006)。したがって、トランスフォーメーションにおけるJSRVエンベロープタンパク質細胞内領域の重要性が強く示唆された。本研究代表者によるJSRVエンベロープを介したトランスフォーメーション発見後、JSRVと相同性が高く、同じベータレトロウイルスであるenzootic nasal tumor virus (ENTV)のエンベロープタンパク質によるトランスフォーメーションが報告された (Dirks *et al.*, J. Virol. 2002)。JSRVとENTVのエンベロープタンパク質は、どちらもげっ歯類線維芽細胞株をトランスフォームするが、JSRVが宿主であるヒツジ個体内で肺癌を誘導する一方で、ENTVはヒツジ個体内では鼻腔内腫瘍を誘導する。自然宿主内での腫瘍発生部位はJSRVとENTVでそれぞれ異なるが、免疫不全マウス

においてはどちらのエンベロープも肺癌を誘導することが報告されており、JSRVとENTVの宿主病原性は非常に類似していることが示唆されていた (Wootton *et al.*, J. Virol. 2006)。興味深いことに細胞内領域のアミノ酸配列は両者においても保存されていない。したがって、トランスフォーメーションにおけるJSRVとENTVのエンベロープ細胞内領域の比較検討が、最も重要な課題となっていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺癌発症の分子機構におけるJSRVエンベロープタンパク質細胞内領域の重要性を更に検討する目的で、ENTVエンベロープを比較対象として用い、*in vitro*にて両エンベロープによるシグナル伝達経路の解析を行った。

## 3. 研究の方法

JSRVエンベロープ発現プラスミド pCMV3JSRV<sub>21</sub>ΔGP (JSRV)、及びENTVエンベロープ発現プラスミド pCMV3JSRV<sub>21</sub>ΔGP (ENTV)をそれぞれラット上皮細胞株RK3Eにトランスフェクションし、培養液中にMEK阻害剤 (PD98059)、mTOR阻害剤 (rapamycin)、Ras阻害剤 (FTI-277)、Rac1阻害剤 (NSC23766)、及びp38阻害剤 (SB203580)をそれぞれ添加することにより、トランスフォーメーションへの影響を検討した。

## 4. 研究成果

RK3E細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイにおいて、MEK、mTOR、Ras、及びRac1に対する特異的阻害剤が、JSRVエンベロープによるトランスフォーメーションと同程度にENTVエンベロープによるトランスフォーメーションも効率よく阻害したことから、どちらのエンベロープもRas-MEK-MAPK経路、PI3k-Akt-mTOR経路、及びRac1を活性化して細胞をトランスフォームすることが示唆された (Maeda and Fan, Virus Genes 2008)。また、p38に対する特異的阻害剤が、JSRVエンベロープによるトランスフォーメーションと同程度にENTVエンベロープによるトランスフォーメーションも増大させたことから、p38経路がトランスフォーメーションを負に制御していることが示唆された。一方でこれまでの研究成果から、JSRVエンベロープチロシン残基Y590変異体は、培養細胞株をトランスフォームする活性を失うことが報告されており、Y590を含めたエンベロープ細胞内領域のトランスフォーメーションにおける重要性が示唆されてきていた。野生型ウイルス、及びY590遺伝子に変異を導入したウイ

ルスゲノムを持つウイルス粒子をそれぞれヒツジに接種した結果、野生型ウイルスでは肺癌が誘導された一方で、Y590 変異体ウイルスでの肺癌誘導は観察されなかった (Cousens C, Maeda N, *et al.*, Virology 2007)。したがって、Y590 を含めた細胞内領域の重要性が *in vivo* において初めて確認された。以上の結果から、JSRVエンベロープはY590 を含めたその細胞内領域を介して複数のシグナル伝達経路を活性化し、病原性を発現しているという当初の仮説が、*in vitro*、ならびに *in vivo* にて証明された。本研究代表者は、これまでに得られた研究成果を、レトロウイルスエンベロープが関与する新しいタイプの発癌メカニズムとして、日本ウイルス学会誌、及び国際ウイルス学雑誌にて提唱した (前田 & 吉開、日本ウイルス学会誌ウイルス 2007、Maeda et al., Rev. Med. Virol. 2008)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Maeda N, Fan H, and Yoshikai Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. Reviews in Medical Virology. 2008;18:387-405. 査読有

② Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada A, Kinoshita T, and Yoshikai Y. Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine secreting interleukin-15/antigen 85B fusion protein in providing protection against Mycobacterium tuberculosis. Journal of Infectious Diseases. 2008;197:1263-1274. 査読有

③ Maeda N, and Fan H. Signal transduction pathways utilized by enzootic nasal tumor virus (ENTV-1) envelope protein in transformation of rat epithelial cells resemble those used by jaagsiekte sheep retrovirus. Virus Genes. 2008;36:147-155. 査読有

④ Kagimoto Y, Yamada H, Ishikawa T, Maeda N, Goshima F, Nishiyama Y, Furue M, and Yoshikai Y. A regulatory role of interleukin 15 in wound healing and mucosal infection in mice. Journal of Leukocyte Biology. 2008;83:165-172. 査読有

⑤ Cousens C, Maeda N, Murgia C, Dagleish

MP, Palmarini M, and Fan H. In vivo tumorigenesis by Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) requires Y590 in Env TM, but not full-length orfX open reading frame. Virology. 2007;367:413-421. 査読有

⑥ Miyano-Kurosaki N, Kira J, Barnor JS, Maeda N, Misawa N, Kawano Y, Tanaka Y, Yamamoto N, and Koyanagi Y. Autonomous proliferation of HTLV-CD4<sup>+</sup> T cell clones derived from human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy patients. Microbiology and Immunology. 2007;51:235-242. 査読有

⑦ 前田直良、吉開泰信  
ウイルス発癌の新しい分子機構—レトロウイルス由来構造タンパク質エンベロープを利用した細胞トランスフォーメーション  
日本ウイルス学会誌ウイルス 2007;57(2): 159-170. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

① Naoyoshi Maeda, Ce Tang, Kensuke Shibata, Momoe Itsumi, Hisakata Yamada, Tetsuo Kase, Yasunobu Yoshikai  
A crucial role of IL-15 in acute lung injury induced by influenza virus infection in mice  
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)  
平成 20 年(2008) 12 月 1-3 日

② Takahiro Ishikawa, Hisakata Yamada, Naoyoshi Maeda, Yukihiro Nishiyama, Yasunobu Yoshikai  
A protective role of Fas/FasL-mediated signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 infection in mice  
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)  
平成 20 年(2008) 12 月 1-3 日

③ 後藤和人、田中芳彦、錦見昭彦、前田直良、石川天洋、稲吉あゆみ、吉開泰信、福井宣規  
The role of DOCK2 in migration and activation of plasmacytoid dendritic cells  
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)  
平成 20 年(2008) 12 月 1-3 日

④ 前田直良、広瀬義隆、加瀬哲男、吉開泰信  
乳酸菌加熱死菌体 HK-LP のインフルエンザウイルス感染防御効果  
第 4 回日本食品免疫学会学術大会 (東京)  
平成 20 年 5 月 13-14 日

⑤ Naoyoshi Maeda, Hiromi Muta, Hisakata

Yamada, Kazuhiko Nakamura, Ryoichi Takayanagi, Yasunobu Yoshikai  
CD30-mediated growth inhibition of cells derived from patients with adult T-cell leukemia  
第 37 回日本免疫学会総会・学術集会（東京）  
平成 19 年 11 月 20-22 日

⑥前田直良

ウイルス感染による肺疾患の動物モデル  
(1) ヒツジレトロウイルスエンベロープタンパク質による肺癌発症の分子機構、(2) インフルエンザウイルス急性感染における IL-15 の役割  
北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー  
平成 20 年 12 月 18 日（札幌）

⑦前田直良

ENTV は JSRV と類似したシグナル伝達経路を用いて細胞をトランスフォームする  
九州大学・東京大学医科学研究所合同シンポジウム 2008（福岡）  
平成 20 年 2 月 22 日

⑧前田直良

ウイルス表面膜たんぱく質と発癌  
日本ウイルス学会後援第 6 回みちのくウイルス塾（仙台）  
平成 19 年 7 月 15 日

[図書]（計 0 件）

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.dimi.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 直良 (MAEDA NAOYOSHI)  
九州大学・デジタルメディスン・イニシアティブ・助教  
研究者番号：80444800

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし