

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07523

研究課題名(和文) ヒツジ肺腺腫発症因子レトロウイルスエンベロープの構造決定とがん化シグナル解析

研究課題名(英文) Structural and functional analyses of oncogenic signal-inducing retrovirus envelope in ovine pulmonary adenocarcinoma

研究代表者

前田 直良 (MAEDA, Naoyoshi)

北海道大学・薬学研究院・特任准教授

研究者番号：80444800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で初めてENTV-2エンベロープのがん遺伝子活性を見出し報告した。ENTV-2エンベロープでトランスフォームした線維芽細胞を樹立し、MEK-MAPK、PI3k-Akt、およびp38が活性化していることを見出した。またRac1特異的阻害剤による線維芽細胞フォーカス形成の阻害などから、細胞の運動性に関与している分子を見出した。またENTV-2エンベロープ細胞外領域に変異を導入することにより、トランスフォーメーションにおける細胞外領域の重要性が示唆された。JSRV、およびENTV-2エンベロープでトランスフォームした208F細胞をヌードマウスに皮下接種することで腫瘍形成を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンベロープは本来、標的細胞への侵入の際に機能するウイルス膜タンパク質であるが、JSRV/ENTVエンベロープはがん遺伝子としても機能することで呼吸器系の上皮細胞を腫瘍化し、腺がんを発症させる極めてまれな題材であり、腫瘍ウイルス学の発展に寄与することができる学術的価値を有している。またJSRVとENTVのエンベロープは、GPIアンカー型分子Hyal-2を受容体として細胞侵入時に使用するにもかかわらず、ヒツジ個体で腫瘍発生器官を異にすることから、「ウイルス感染 細胞指向性 発がん」を研究する上で理想的なモデルになる。また、エンベロープの構造機能相関の解明は、有効な治療法やワクチン開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Enzootic nasal tumor virus type 2 (ENTV-2) and jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) are known to be causative agents of enzootic nasal adenocarcinoma in goats and ovine pulmonary adenocarcinoma in sheep, respectively. We found that ENTV-2 envelope could induce oncogenic transformation of rat cell lines; inhibitor experiments revealed that MEK-MAPK and PI3K-Akt signaling pathways are involved in the ENTV-2 envelope-induced cell transformation. In addition, multiple assays were performed to confirm activation of several molecules including Rac1 that comprise signaling pathways involved in cell adhesion and motility. These results indicated that ENTV-2 envelope, like the JSRV and ENTV-1 envelopes, could induce oncogenic transformation by similar signaling pathways. In the mutational analyses, several amino acids in the SU domain of ENTV-2 envelope resulted in reducing transformation activity. Further, the ENTV-2 envelope-transformed clone cells were capable of forming tumors in nude mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レトロウイルス JSRV ENTV トランスフォーメーション 腫瘍 タンパク質 構造解析 宿主因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒツジ伝染性肺腺腫 ovine pulmonary adenocarcinoma(OPA)は、オーストラリアやニュージーランドを除いた国々(アメリカ、イギリス、カナダなど)で発生が認められる伝染性の肺腺癌である。II 型分泌上皮細胞の悪性腫瘍化を示し、近傍リンパ節への転移も見られる。感染群の隔離や、臨床症状を示した感染ヒツジの除去により、疾病の発生率を低減させることは可能であるが、いまだに有効な治療法やワクチンが存在しないことから、現時点で根絶は困難である(前田直良, 分担執筆, めん羊・山羊(ウイルス病)「羊肺腺腫」p.143, 動物の感染症<第四版>, 2019/3, 近代出版)。

OPA はヒツジレトロウイルス jaagsiekte sheep retrovirus(JSRV)感染に起因する。JSRV は既存のがん遺伝子をもたない単純ベータレトロウイルスであるが、*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が、マウスやラットの線維芽細胞をトランスフォームする、すなわちがん遺伝子として機能する(Maeda N *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:4449-4454)。またマウス線維芽細胞やラット上皮細胞のトランスフォーメーションでは、Ras-MEK-MAPK、PI3k-Akt-mTOR、および p38 が活性化している(Maeda N *et al.*, J Virol. 2005;79:4440-4450)。

一方、ヒツジ・ヤギの伝染性地方病性鼻腔内腫瘍 enzootic nasal adenocarcinoma(ENA)は、病理組織学的には腺癌で分泌型上皮細胞に由来し、鼻腔内の篩骨鼻甲介部分から一側性、あるいは両側性に腫瘍が形成される(前田直良, 獣医畜産新報 2013;66:662-666)。ヒツジ ENA はレトロウイルス enzootic nasal tumor virus type 1 (ENTV-1)感染により発症する。その ENTV-1 エンベロープも線維芽細胞や上皮細胞をトランスフォームする活性がある、すなわち ENTV-1 エンベロープもがん遺伝子として機能する。また ENTV-1 エンベロープによるマウス線維芽細胞やラット上皮細胞のトランスフォーメーションでも、JSRV と同様に Ras-MEK-MAPK、PI3k-Akt-mTOR、および p38 が関与している(Maeda N *et al.*, Virus Genes 2008;36:147-155)。一方ヤギ ENA は、ENTV-1 に近縁である ENTV-2 の感染により発症するとの報告があるが、その発がん機構については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、レトロウイルスエンベロープによるヒツジ・ヤギ呼吸器系腫瘍発症機序の全貌解明に向けて、細胞トランスフォーメーションにおける JSRV、および ENTV エンベロープの構造と機能の相関性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ENTV-2 エンベロープ遺伝子をヤギ ENA から分離しクローニングした。ラット 208F 細胞、ならびに RK3E 細胞にトランスフェクションし、フォーカス形成の有無でがん遺伝子活性を評価した。ENTV-2 エンベロープでトランスフォームした 208F 細胞の溶解液を用いて、シグナル伝達経路に関わる分子の活性化を検討した。また、それら分子の阻害剤を用いて、トランスフォーメーションにおけるシグナル伝達分子の役割を検討した。

(2)ENTV-2 エンベロープ細胞外領域に変異を導入したコンストラクトを作製した。ラット 208F 細胞にトランスフェクションし、フォーカス形成の増減によりトランスフォーメーションにおける変異アミノ酸の関与を検証した。

(3)JSRV、および ENTV-2 エンベロープでトランスフォームした 208F 細胞をヌードマウスに皮下接種し、腫瘍の形成を検討した。

4. 研究成果

(1)本研究で初めて ENTV-2 エンベロープタンパク質にもがん遺伝子活性を見出し報告した(Maeda N *et al.*, Virus Genes 2021;57:50-59)。ENTV-2 エンベロープでトランスフォームした線維芽細胞を樹立し、エンベロープ下流のシグナル伝達経路について解析し、JSRV エンベロープと同様に MEK-MAPK、PI3k-Akt、および p38 が活性化していることを見出した。208F 細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの際に、MEK、および PI3k に対する阻害剤を添加した結果、ENTV-2 エンベロープによるフォーカス形成に対して濃度依存的な阻害効果が観察された。一方 p38 に対する阻害剤を添加した結果、ENTV-2 エンベロープによるフォーカス形成を促進する効果が観察された。さらに 208F 細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの際に、Rac1 に対する阻害剤を添加した結果、ENTV-2、ならびに JSRV エンベロープによるフォーカス形成に対して濃度依存的な阻害効果が観察された。また、Focal adhesion kinase やグアニンヌクレオチド交換因子 VAV2 のリン酸化から、これら分子の恒常的活性化が細胞トランスフォーメーション、特に細胞の運動性に関与していることを見出した(第 69 回日本ウイルス学会学術集会)。

(2)ENTV-2 エンベロープ細胞外領域に変異を導入することにより、208F 細胞のトランスフォーメーション効率が著しく減少したことから、エンベロープ細胞外領域が細胞トランスフォーメーションに関与していることが示唆された(第 68 回日本ウイルス学会学術集会)。

(3)JSRV、および ENTV-2 エンベロープタンパク質でトランスフォームした 208F 細胞をヌードマウスに皮下接種することで腫瘍形成を確認した(第 68 回日本ウイルス学会学術集会)。この腫瘍モデルは、今後 *in vivo* でのエンベロープの機能解析や、トランスフォーメーションに関する分子に対する阻害薬の効果を検討する上で有用と考えている。

本研究では、新たにヤギ ENA 由来 ENTV-2 エンベロープをクローニングしその機能を解析することで、JSRV エンベロープとの違いを比較、検証した。JSRV エンベロープのみならず、ENTV-2 エンベロープのがん遺伝子機能についても多くの成果を得ることができたので、これらの結果をもとに、今後もレトロウイルスエンベロープによるヒツジ・ヤギ呼吸器系腫瘍発症機序の全貌解明に向けて、構造・機能研究を継続し発展させていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeda N, Inoshima Y, de las Heras M, Maenaka K.	4. 巻 57
2. 論文標題 Enzootic nasal tumor virus type 2 envelope of goats acts as a retroviral oncogene in cell transformation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Genes	6. 最初と最後の頁 50-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11262-020-01808-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Maeda N, Matsuda A, Otsuguro S, Takahashi M, Fujii M, Maenaka K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Antitumor effect of sugar-modified cytosine nucleosides on growth of adult T-cell leukemia cells in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines8040658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe H, Kuroki K, Yamada C, Saburi Y, Maeda N, Maenaka K.	4. 巻 81
2. 論文標題 Therapeutic effects of soluble human leukocyte antigen G2 isoform in lupus-prone MRL/lpr mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 186-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humimm.2019.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田直良、猪島康雄、前仲勝実
2. 発表標題 Signaling pathways in oncogenic transformation of cells by caprine and ovine retrovirus envelope proteins
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田直良、猪島康雄、前仲勝実
2. 発表標題 Oncogenic transformation of cells by enzootic nasal tumor virus type 2 envelope protein
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------