

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08655

研究課題名(和文)古典型カポジ肉腫の自然消退のメカニズムの解明と治療への応用について

研究課題名(英文) Spontaneous regression of classic type Kaposi's sarcoma and therapeutic application for cancer

研究代表者

金城 貴夫 (Kinjo, Takao)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：30284962

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)：カポジ肉腫(KS)はKaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV)により発生する腫瘍であるが、AIDS関連型KSと古典型KSでは臨床像に大きな違いがある。AIDS関連型KSは進行が速く病変は全身に及ぶのに対し、古典型KSは皮膚に局限し、進行が緩やかで自然消退する事さえある。私達はAIDS関連型KSと古典型KSでは、KSHVのK1遺伝子の形質転換能(腫瘍を発生させる能力)に違いがある事を見出した。本研究ではKSHV K1遺伝子の形質転換能に重要な領域を検討し、細胞外ドメインのVR2領域の違いが形質転換能に大きく関わる事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達はKS発生に関わるKSHV K1遺伝子の形質転換能がAIDS関連型と古典型で異なる事を明らかにし報告している。本研究では、さらにK1遺伝子のどの部位が形質転換に寄与するのか検討した。様々な検討の結果、KSHV K1遺伝子の細胞外ドメインのVR2領域の違いが形質転換能に大きく関わる事を明らかにした。KSHV K1遺伝子の形質転換誘導に重要な領域を世界で初めて特定した。将来的にはこの知見を応用し、副作用の無い癌の自然消退療法の開発の基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Kaposi's sarcoma (KS) is intermediate malignant soft tissue tumor caused by Kaposi sarcoma associated herpesvirus (KSHV). Based on clinical presentations, there are four clinical types. Among these subtypes, AIDS-related KS shows rapid and aggressive progression affecting multiple organs. In contrast, classic type KS demonstrates slow and limited clinical presentations and sometimes regress spontaneously. KSHV K1 gene is involved in KS oncogenesis. In previous research, we revealed that transformation activity of K1 gene derive from AIDS-related KS is more potent than that from classic type KS. In this research, we evaluated the important K1 region which is associated with the difference of transformation activity between AIDS-related KS and classic KS. We found that the amino acid sequence of VR2 region in K1 extracellular domain is highly correlated to the transformation activity. These findings gave insight into the precise mechanism of transformation induced by KSHV K1 gene.

研究分野：病理学

キーワード：カポジ肉腫 KSHV 古典型 自然消退

1. 研究開始当初の背景

カポジ肉腫(KS)は KSHV 感染によって発生する腫瘍であるが、臨床像に大きな違いがある。AIDS 関連型 KS は進行が速く病変は全身に及ぶのに対し、古典型 KS は皮膚に局限し、進行が緩やかで自然消退する事さえある。我々は KSHV のゲノムで変異が多い K1 遺伝子に着目し、AIDS 関連型と古典型 KS で比較したところ、アミノ酸配列に多くの違いがある事を見出した (Kamiyama K, Kinjo T et al. J Clin Pathol 2004)。これを基に AIDS 関連型と古典型 KS の臨床像の違いが K1 遺伝子の違いによるという仮説を立てた。そこで AIDS 関連型及び古典型 KS 由来の K1 遺伝子を初代培養細胞に導入し、形質転換能を比較検討したところ、AIDS 関連型 K1 遺伝子は古典型 K1 遺伝子より形質転換能(癌を発生させる能力)が強い事を世界で初めて明らかにした (Tamanaha-Nakasone A, Kinjo T et al. Sci Rep 2019)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、KSHV K1 遺伝子の腫瘍形成に最も重要な領域を特定する事である。本研究プロジェクトは、古典型 KS の自然消退のメカニズムを応用し、副作用の無い癌の自然消退療法の開発を目指している。従って、KSHV K1 遺伝子の腫瘍形成に最も重要な領域を特定し、あらかじめこの領域を腫瘍形成に関与しない領域に組み替える必要がある。そこで本研究では、AIDS 関連型 K1 遺伝子の一部を古典型 K1 遺伝子の相同部に置き換えたクローンを作製し、形質転換能を比較し、K1 遺伝子の腫瘍形成に重要な部位の特定を試みた。

3. 研究の方法

KSHV K1 遺伝子産物は、膜貫通蛋白であり、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインを有する。AIDS 関連型 K1 遺伝子と古典型 K1 遺伝子のアミノ酸の違いは、細胞外ドメインに集中しており、膜貫通ドメインや細胞内ドメインにはアミノ酸の違いは見られない。この事から AIDS 関連型 K1 遺伝子と古典型 K1 遺伝子の形質転換能の違いは細胞外ドメインにある事を想定し、細胞外ドメインを N 末端領域 (NT)、多変領域 1 (VR1)、中間領域 (IR)、多変領域 2 (VR2) の 4 領域に区分した。

AIDS 関連型 K1 遺伝子の細胞外ドメインの 4 領域の一つを古典型 K1 遺伝子の相同領域に組み換え、4 つの組換え K1 遺伝子を作製した (図 1)。4 つの組み換え K1 遺伝子をそれぞれマウス初代培

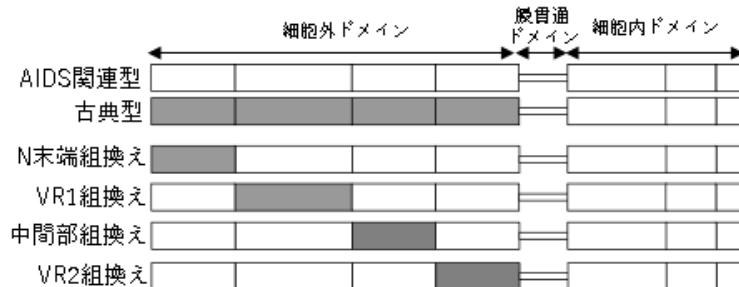


図1 組換えK1遺伝子の構築

養線維芽細胞に導入し、N末端領域組み換え K1 発現細胞株 (NTc)、多変領域 1 組み換え K1 発現細胞株 (VR1c)、中間領域組み換え K1 発現細胞株 (IRc)、多変領域 2 組み換え K1 発現細胞株 (VR2c) を樹立した。この 4 種類の組み換え K1 遺伝子発現細胞株に加えて、AIDS 関連型 K1 遺伝子発現細胞株 (AK1) と古典型 K1 遺伝子発現細胞株 (CK1) 及び K1 遺伝子を発現していない細胞株 (mock) を用いて、形質転換能を比較した。具体的には、増殖能、アポトーシスへの抵抗性、足場非依存性増殖と細胞内シグナル伝達を細胞株間で比較した。

4. 研究成果

本研究により得られた主な成果を以下に記す。

(1) 形質転換能の比較

培養癌細胞は正常細胞に比べて、1) 増殖能が高く、2) アポトーシスに抵抗性を示し、3) 足場非依存性増殖 (培養フラスコ底部に接着しなくても増殖できる性質で、癌細胞の重要な特徴の一つ) を示す。そこでこの 3 つの指標について、4 つの組み換え K1 細胞株、AK1, CK1, mock を用いて比較検討した。

増殖能

私達はこれまでに、AK1 は最も増殖能が高く、CK1 は mock よりもやや増殖能が高い事を報告した。組み換え K1 細胞株について細胞増殖能を検討すると、VR2c は増殖能が低く、mock と同程度であった。他の 3 つの細胞株 (NTc, VR1c, IRc) は AK1 と CK1 の中間の増殖能を示した (図 2)。細胞周期関連の遺伝子の発現を検討すると、VR2c は他の細胞株に比べて、細胞周期進行に関わる cyclin D1 の発現が低く、さらに細胞周期進行を抑制する p27 の発現が高い事が示され、細胞増殖曲線の結果と相関していた。

アポトーシス抵抗性

通常、強い細胞障害ストレスが加わると細胞はアポトーシスという細胞死の

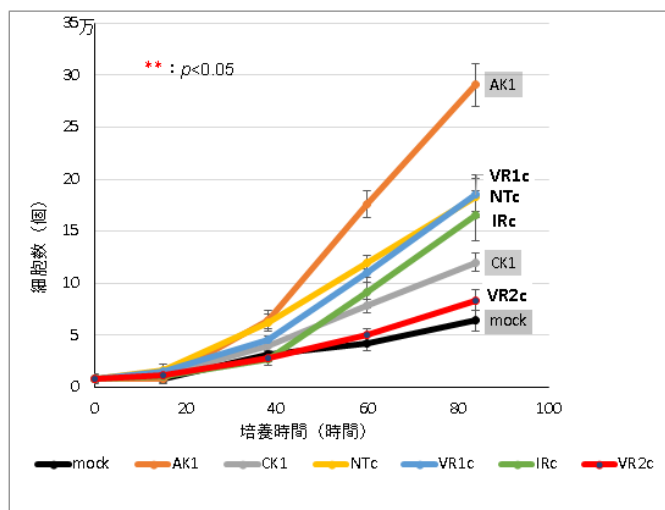


図2 組換えK1の増殖能の比較

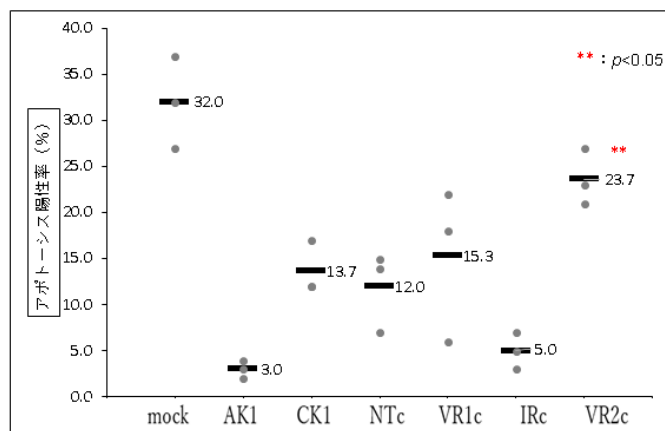


図3 組換えK1のアポトーシスの比較

形態を示すが、癌細胞は強いストレス下でもアポトーシスが誘導されない。これは癌細胞の治療抵抗性を示す特性を表している。無血清培地処理で6つの細胞株に強いストレスを加え、アポトーシスの誘導を比較検討した。Mockは32%もアポトーシスを起こす細胞が見られたのに対して、AK1はわずか3%、CK1も14%であり、K1発現によりアポトーシス抵抗性を示していた。組み換えK1遺伝子発現株については、NTcとVR1cはCK1と同程度、IRcはAK1と同程度のアポトーシス抵抗性を示したが、VR2cのみ24%とアポトーシスに陥った細胞が増加していた(図3)。

足場非依存性増殖

足場非依存性増殖は、培養癌細胞の重要な特徴の一つで、正常細胞ではフラスコ底部に付着しないと増殖できないのに対して、癌細胞ではフラスコ底部から浮遊した状態でも増殖する事が可能である。そこで各細胞株を寒天培地で浮遊した状態で培養し、コロニー形成を観察した。この検討では、mockを陰性コントロール、LMP-1と16E6二重発現細胞(癌細胞)を陽性コントロールとした。Mockは全くコロニーを形成しないのに対して、AK1は約40個、CK1は約10個程度のコロニーを形成した。組み換えK1細胞株はNTcとIRcがAK1とCK1の中間、VR1cとVR2cがCK1と同程度のコロニー形成を示した(図4)。

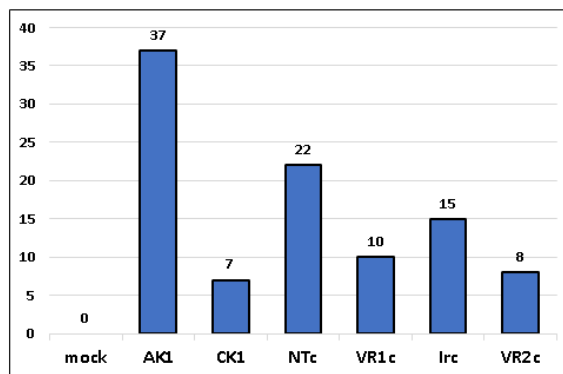


図4 組み換えK1のコロニー形成数の比較

Mockは全くコロニーを形成しないのに対して、AK1は約40個、CK1は約10個程度のコロニーを形成した。組み換えK1細胞株はNTcとIRcがAK1とCK1の中間、VR1cとVR2cがCK1と同程度のコロニー形成を示した(図4)。

(2) 組み換えK1遺伝子発現株の細胞内シグナル伝達活性

K1遺伝子はNF-kBやAktを活性化することで形質転換を誘導する。これまでの私達の研究で、AK1はCK1よりNF-kBとAktの活性が高く、AK1の強い形質転換能と相関している事を見出している。組み換えK1遺伝子発現株におけるNF-kB活性を比較したところ、全ての組み換えK1遺伝子発現株のNF-kB活性は、AK1の三分の一以下であり、NTc、IRc、VR1cはいずれもCK1と同程度の活性を示した。しかし、VR2cはNF-kB活性が最も低く、AK1の七分の一程度であった(図5)。

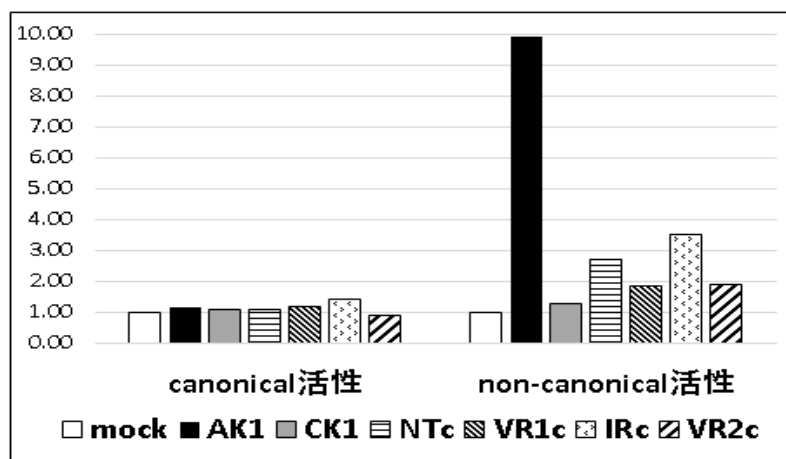


図5 組み換えK1のNF-kB活性の比較

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

私達はこれまでの研究で、KSHV の K1 遺伝子の形質転換能はサブタイプにより異なり、AK1(A型)はCK1(C型)より形質転換能が高い事を報告した(Tamanaha-Nakasone A, Kinjo T et al. Sci Rep 2019)。本研究では、AK1 と CK1 の形質転換能の違いが、K1 遺伝子の細胞外ドメインの VR2 領域にある事を明らかにした。K1 遺伝子の構造と機能については、K1 遺伝子産物は膜貫通蛋白で、細胞膜上でオリゴマーを形成する事で、細胞内ドメインを介して NF- κ B や Akt シグナル伝達経路を活性し、形質転換を誘導する事が知られている。K1 遺伝子は細胞外ドメインに多くの変異があるが、膜貫通ドメインや細胞内ドメインは良く保存されている。この事から私達は、細胞外ドメインによるオリゴマー形成の強さが形質転換能と関連するのではないかという仮説の基に本研究を行った。本研究で明らかになった細胞外ドメインの VR2 領域の違いはオリゴマー形成の影響を与える部位である事が想定される。本研究で得られた成果は、KSHV K1 遺伝子の構造と機能の関連を明らかにし、K1 遺伝子による腫瘍発生のメカニズムの解明に貢献する。さらに本研究成果は、癌治療への臨床応用への可能性を秘めている。

今後の展望

古典型 KS の自然消退のメカニズムの解明を目的とした一連の研究で、KSHV K1 遺伝子のサブタイプにより形質転換能が異なる事、サブタイプによる形質転換能の違いは、KSHV K1 遺伝子の細胞外ドメインの VR2 領域にある事を特定した。これにより KS 発生のウイルス側の因子が明らかになったが、KS 発生は宿主の免疫能も大きく関与する。そこで今後は宿主の免疫能がどの程度低下した状態で KS が発生するか、また古典型 KS の自然消退には、どの程度免疫能が回復し、どの様な免疫細胞が関わるのか明らかにする。

参考文献

Kamiyama K, [Kinjo T](#), Chinen K, Iwamasa T, Uezato H, Miyagi J-i, Mori N, Yamane N. Human herpesvirus 8 (HHV 8) sequence variations in HHV 8 related tumours in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol*. 2004. 57; 529-535.

Tamanaha-Nakasone A, Uehara K, Tanabe Y, Ishikawa H, Yamakawa N, Toyoda Z, Kurima K, Kina S, Tsuneki M, Okubo Y, Yamaguchi S, Utsumi D, Takahashi K, Arakawa H, Arasaki A, [Kinjo T](#). K1 gene transformation activities in AIDS-related and classic type Kaposi 's sarcoma: Correlation with clinical presentation. *Sci Rep*. 2019. 9: 6416.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42763-0>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kinjo T, Saitoh I, Watanabe M	4. 巻 3
2. 論文標題 Mutations in the C1 element of the insulin promoter lead to diabetic phenotypes in homozygous mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s 42003-020-1040-z	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 Shimada M, Yamashita A, Saito M, Ichino M, Kinjo T, Mizuki N, Klinman DM, Okuda K	4. 巻 10
2. 論文標題 The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s 41598-020-71134-3	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 Kina S, Kawabata-Iwakawa R, Miyamoto S, Arasaki A, Sunakawa H, Kinjo T.	4. 巻 29
2. 論文標題 A molecular signature of well-differentiated oral squamous cell carcinoma reveals a resistance mechanism to metronomic chemotherapy and novel therapeutic candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Drug Target.	6. 最初と最後の頁 1118-1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1061186X.2021.1929256.	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 Uehara K, Tanabe Y, Hirota S, Higa S, Toyoda Z, Kurima K, Kina S, Nakasone T, Arasaki A, Kinjo T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Co-expression of low-risk HPV E6/E7 and EBV LMP-1 leads to precancerous lesions by DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-021-08397-0.	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 Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Saitoh I, Watanabe M.	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo evaluation of GG2-GG1/A2 element activity in the insulin promoter region using the CRISPR-Cas9 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 20290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99808-6.	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 Sugisawa A, Toyoda Z, Tanabe Y, Uehara K, Oshiro A, Yamazato R, Sakamoto C, Yogi S, Kurima K, Kina S, Sakiyama M, Kinjo T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Cytological characteristics of premalignant cervical epithelial lesions in postmenopausal women based on endocrine indices and parakeratosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Menopause	6. 最初と最後の頁 193-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GME.0000000000002125.	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山川奈津子、金城貴夫、上原佳里奈
2. 発表標題 AIDS関連型及び古典型カポジ肉腫に由来するKSHV K1遺伝子の形質転換能の比較
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川晴菜、金城貴夫、上原佳里奈
2. 発表標題 沖縄県のカポジ肉腫症例におけるKSHV遺伝子型及び生物学的特性の検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山川奈津子、上原佳里奈、喜名振一郎、新崎章、金城貴夫
2. 発表標題 口腔癌細胞株におけるPARP活性とシスプラチン感受性について
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原佳里奈、広田信太郎、前原博樹、金城貴夫
2. 発表標題 沖縄県の軟骨肉腫におけるIDH変異と酸化ストレス及びDNA損傷の関連
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田勝、山下暁朗、金城貴夫、市野素英、奥田研爾
2. 発表標題 ヒトパピローマウイルスE6蛋白がアポトーシス誘導因子(AIF)の作用に関する研究
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金城貴夫
2. 発表標題 AIDS関連型カポジ肉腫と古典型カポジ肉腫に由来するHHV-8 K1遺伝子の形質転換能の違いについて
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大城彩、広田信太郎、金城貴夫
2. 発表標題 軟骨肉腫症例におけるIDH変異とHIFシグナルとの関連について
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 与儀翔平、金城貴夫
2. 発表標題 沖縄県のカボジ肉腫におけるHHV-8遺伝子型別特性の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂元千知、大城彩、与儀翔平、金城貴夫
2. 発表標題 乳癌のルミナルサブタイプにおける遺伝子発現と生物学的特性に関する研究
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大城彩、坂元千知、金城貴夫
2. 発表標題 Luminal乳癌症例の上皮間葉転換及び癌幹細胞マーカーの発現と予後との関連について
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山里玲生、与儀翔平、金城貴夫
2. 発表標題 AIDS関連型及び古典型カポジ肉腫に由来するKSHV K1遺伝子の腫瘍形成能について
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 与儀翔平、金城貴夫
2. 発表標題 沖縄県のカポジ肉腫における KSHV 遺伝子型別特性の解明
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	田中 勇悦 (Tanaka Yuetsu) (30163588)	琉球大学・医学部・非常勤講師 (18001)	
研究分担者	上原 佳里奈 (Uehara Karina) (30782594)	琉球大学・医学部・助教 (18001)	
研究分担者	喜名 振一郎 (Kina Shinichiro) (40422422)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	荒川 博文 (Arakawa Hirofumi) (70313088)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長 (82606)	
研究 分 担 者	高橋 健造 (Takahashi Kenzo) (80291425)	琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (18001)	

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