

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780288

研究課題名(和文) 犬の悪性腫瘍における内在性レトロウイルスの発現解析

研究課題名(英文) Expression analysis of endogenous retroviral elements in canine malignant tumors.

研究代表者

馬場 健司 (BABA KENJI)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：90452367

研究成果の概要(和文)：犬のゲノムに組み込まれている新規の内在性レトロウイルスエンベロープ遺伝子を同定した。予想されるアミノ酸配列から、この遺伝子はベータレトロウイルス属に分類され、機能的なエンベロープ蛋白をコードしていると考えられた。また、このエンベロープ遺伝子の mRNA は、犬の悪性黒色腫細胞株において発現していることが明らかになった。本研究から、本分子が犬の悪性黒色腫における腫瘍抗原である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An endogenous retroviral envelope gene was newly identified in canine genome. The predicted amino acid sequence indicated that the retroviral element belonged to the genus *Betaretrovirus* and encoded a functional envelope protein. The expression of the envelope mRNA was shown in canine malignant melanoma cell lines. This study indicated that the newly identified retroviral envelope may be a tumor antigen in canine malignant melanoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：臨床獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：内在性レトロウイルス、悪性腫瘍、犬

1. 研究開始当初の背景

内在性レトロウイルス(Endogenous Retrovirus、以下ERVと表記)とは、過去に生殖細胞に感染し、そのゲノム中に組み込まれたレトロウイルスであり、すべての体細胞に存在する。しかし、ERVの大半は変異や欠失によりオープンリーディングフレーム(Open Reading Frame:ORF)が損なわれており、ほとんどの正常細胞ではその転写自体も

抑制されていることが多い。しかし、中には蛋白として発現が認められるものも存在し、ヒトにおいては、特に悪性腫瘍細胞において過剰発現している場合も少なくない。そのため、ERV蛋白が腫瘍抗原として癌免疫療法の標的となり得ることが示唆されている。一方、犬においては、ORFを保持したERVエレメントは同定されておらず、悪性腫瘍におけるその発現や病態への関与も未知である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、犬の悪性腫瘍で高発現するイヌ内在性レトロウイルス (CERV) エlementを同定し、癌免疫療法の標的腫瘍抗原としての可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト、マウス、ネコ、ヒツジの既知のレトロウイルスの遺伝情報 (レトロウイルスの gag および env 領域) をもとに犬ゲノムデータベース (National Center for Biotechnology Information; NCBI) の BLAST サーチを行い、犬のゲノムに組み込まれている ORF が保持された ERV エlementを抽出した。また、犬のゲノム DNA を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により本遺伝子のクローニングと塩基配列解析を行った。

(2) 犬の悪性黒色腫 (4 例)、低悪性度黒色腫 (1 例) および正常口腔粘膜の組織 (1 例) から total RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ (Affymetrix 社製 GeneChip® Canine Genome 2.0) 解析を行った。これにより、自然発症の悪性黒色腫において高発現する ERV エlementをスクリーニングした。

(3) 犬の腫瘍細胞株 (悪性黒色腫由来細胞株およびリンパ腫由来細胞株) における CERV エlementの mRNA の発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により解析した。

(4) クローニングした CERV 蛋白の性状解析および特異抗体の作製を行うため、本遺伝子を pcDNA3.1-MycHis ベクターに組み込み、293T 細胞にトランスフェクション後、ウェスタンブロット法および免疫染色法によりその発現を検討した。同様に、本遺伝子を pFastBac HT ベクターに組み込み、バキュロウイルス発現システムを用いて組み換え蛋白の作製を試みた。

(5) 抗 CERV ペプチド抗体を作製するため、予想されるアミノ酸配列をもとに、抗原性が高いと推察される領域に匹敵する 2 種類のペプチドを合成し、ウサギに免疫後 ELISA 法を用いて血清抗体価を測定した。

4. 研究成果

(1) バイオインフォマティクス解析により、ORF が保持された一種類のレトロウイルスエンベロップ (*env*) 遺伝子を同定した。予想されるアミノ酸配列から、このエンベロップ蛋白は 643 アミノ酸残基をコードしており、機能的なレトロウイルスのエンベロップ蛋白に特徴的なモチーフ (シグナルペプチド、surface unit [SU] 領域、transmembrane [TM]

領域、furin cleavage site、CXXC モチーフ、CX7C モチーフ、fusion peptides) がすべて保存されていると考えられた (図 1)。また、TM 領域の分子系統樹解析を行った結果、同定した CERV は、ベータレトロウイルス属に分類され、ヒツジの内在性レトロウイルスである endogenous jaagsiekte sheep retrovirus (enJSRV) と最も近縁であることが明らかとなった。さらに、ヒトの内在性レトロウイルスの一種であり、悪性腫瘍で発現が認められている HERV-K と最も近縁であることが明らかとなった (図 2)。

```
MRTPRAGSRSDGVDSSPLRRRLANLTTIRQQKRRRRRL  
PSYCWARIRELINQAISLAEQTQPNESLLTILLTVLAI  
TTPPVGEEAAVYWAYLPDPPTIRPVTWDDPTQIHTNMT  
EYFGGSSDDMEVANHSINWTLGLAAQVPMCFQLPLCDQ  
KPVNGCLVQVPVPHIVTYLSEMEKNENPPSRNLNMLER  
WIVVEVTGDTPPSDPQQGRRRPPGYPCPNLTYAISGP  
IWTECLQKTPLVISPHGIEPFSITDWSRMRKEPLRYI  
AYPPGRPMHNVTIPGGVFSTVGYEMHAELWKLVTAMGP  
AKRQMAKSGYTNKDFNLTIQACVPKPFLVVGYGTTN  
FSFMQNNGTDMLELFGCKNCLVLTNCLPVLHSPSPQTGPI  
TIFLTMQPPYLLLPVEIEGPWYANYGYQFAVELQLQK  
RLKRFLGLLITAGIAALVALIATAAASVALSQGIQTAQ  
YVNNLAKNVSYALSTQERIDQKILSCLDGLGEEVVKFLG  
NQLSQLKTQMSLVCHGGFQHICVTPMKATNVTWGQVKK  
HLQGIWFHSNMSLDLLELQKEISSISHSQRGMTNPAEI  
MAHILDGLHGFNPGNLLKHSFWMFLIIFLTIVMILFFAW  
CVVQAKARQHRFNMDAQLHFLNLKTKKGMWTVMD
```

図1 CERVエンベロップ蛋白のアミノ酸配列

灰色: シグナルペプチド、青: SU領域、黒: TM領域、赤: Furinの cleavage site、緑: CXXCおよびCX7Cモチーフ、下線: fusion peptide

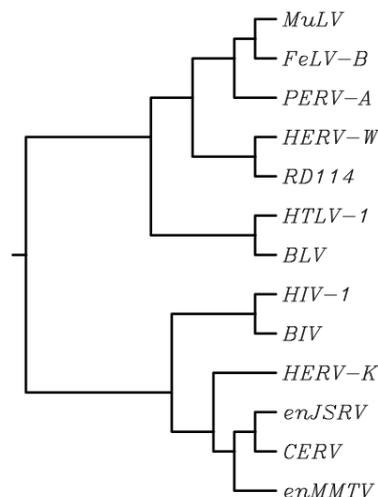


図2 TM領域の系統樹解析

(2) 次に、犬の自然発生悪性黒色腫の検体を用いた cDNA マイクロアレイ解析を行った。本解析から、既知の癌関連遺伝子を含めたいくつかの遺伝子について発現の増加または低下が示唆されたが、本研究課題の目的である内在性レトロエレメントについては、対照検体と比較して明らかな発現量の差は認められなかった。その要因として、検体数（悪性黒色腫 4 検体、低悪性度黒色腫 1 検体、正常組織 1 検体）が不十分であったこと、正常組織の混入、犬種の差異、用いたマイクロアレイで解析可能なレトロエレメントが限られていることなどが考えられた。

(3) (1) でクローニングした CERV *env* 遺伝子について、犬の腫瘍細胞株における mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。その結果、4 種類の犬の悪性黒色腫由来細胞株のすべてにおいて、CERV *env* mRNA の発現が確認された。一方、2 種類のリンパ腫細胞株では、その発現は認められなかった (図 3)。このことから、本遺伝子は、悪性黒色腫に特異的に発現している可能性が考えられた。

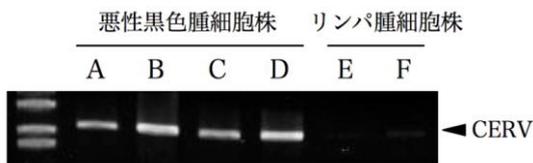


図3 犬の悪性黒色腫細胞株におけるCERV *env* mRNAの発現

(4) 哺乳類培養細胞および昆虫培養細胞系を用いた CERV エンベロープ蛋白の発現を試みたが、いずれもウェスタンブロット法および蛍光免疫法で目的とする蛋白の発現は認められなかった。このことから、CERV エンベロープ蛋白の発現には、適切な発現ベクターと培養細胞の組み合わせの検討と発現調節領域の同定が必要と考えられた。

(5) CERV エンベロープ蛋白由来ペプチドを免疫したウサギから採取した血清において、免疫したペプチドに対する高い抗体価が示された (図 4)。今後、この抗血清の本エンベロープ蛋白に対する特異性を確認することにより、悪性腫瘍組織における免疫組織化学的解析が可能になると考えられた。

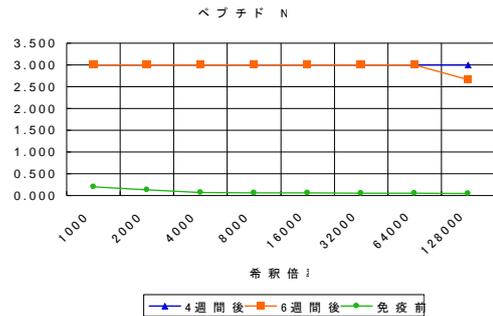
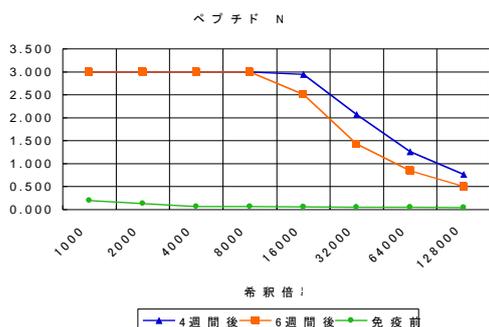


図4 抗ペプチド抗体価

以上の通り、本研究では、犬のゲノムに組み込まれた内在性レトロウイルスのエンベロープ遺伝子を同定した。これまでに、ORF を保持した犬の内在性レトロエレメントは同定されておらず、本遺伝子が世界で初めてである。しかし、同定したエンベロープ蛋白の培養細胞における発現には至らなかったため、作製した抗ペプチド抗体の本エンベロープ蛋白への反応性は不明であった。また、腫瘍組織における発現についても解析には至らなかった。今後は、本エンベロープ蛋白の発現系および検出系を確立し、犬の腫瘍抗原としての有用性を検討する必要があると考えられた。

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1件)

① Baba K, Nakaya Y, Shojima T, Muroi Y, Kizaki Y, Hashizume K, Imakawa K, Miyazawa T. Identification of novel endogenous betaretroviruses which are transcribed in the bovine placenta. *Journal of Virology*, Feb; 85 (3), 2011, pp. 1237-1245, 査読有

[学会発表] (計1件)

① Baba K, Shojima T, Miyazawa T. Identification of Novel Bovine Endogenous Retrovirus Envelopes and Putative Accessory Proteins. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2009, Sep. 14, Italy Ciocco Hotel and Rerort Lucca.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 健司 (BABA KENJI)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：90452367

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし