

令和 6 年 4 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05930

研究課題名(和文) 内在性レトロウイルス由来RNA核外輸送タンパク質の生理学的機能の解明

研究課題名(英文) Molecular function of RNA binding protein of endogenous retroviruses

研究代表者

仲屋 友喜 (Nakaya, Yuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00713562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)由来遺伝子の機能解析を行った。Rec1はHERVの一種であるHML-2がコードする核外輸送タンパク質であるが、HML-2(10q24.2)は、Recと類似の肝組織特異的選択的スプライシング産物(HML-2-X)を産生していた。正常肝組織で高発現を示したHML-2-Xの発現量は、肝がん組織では顕著に減少していた。さらに、HML-2-X導入細胞では、WNT/ $\beta$ -cateninシグナルを含むがんシグナル経路が阻害され、結果として増殖能と遊走能が抑制された。以上のことから、HML-2-Xは肝がん・肝がん進展抑制機能を有していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトゲノムには多数のHERVが組込まれているが、ほとんどのHERVの役割が明らかにされておらず、その解明が望まれている。また、近年、肝炎ウイルス感染に起因する肝がんは減少傾向にあるものの、肝炎ウイルス感染を伴わない肝がんが増加傾向にある。そのため、これらの予防と治療へ向けた、肝細胞のがん化機構に関する基礎研究の重要性が大きくなりつつある。本研究成果は、HERV由来遺伝子による肝がん抑制機構という、ウイルス学や進化学など基礎学術分野において、非常に興味深い新たな分子機構を提唱するものである。加えて、肝がんの予防法や治療法の発展に向け、新たな洞察を与えるものであり、臨床医学への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the investigator analyzed the molecular function of a newly identified gene which was derived from a human endogenous retrovirus (HERV). The HERV possessed a gene, HML-2-X, which is generated by an alternative splicing of its envelope gene. HML-2-X was preferentially expressed in the normal liver tissues and primary human hepatocytes, PXB-cells, that were derived from chimeric mice with human hepatocytes. On the other hand, the expression level of HML-2-X was significantly decreased in the liver cancer tissues and hepatocellular carcinoma cell lines (HCCs). Oncogenic signaling pathways such as WNT/ $\beta$ -catenin signaling were inactivated in HCCs stably transfected with HML-2-X, which resulted in the attenuation of cellular growth kinetics and migration activity. Here the investigator demonstrated a novel function of HERV that HML-2-X potentially suppresses the development of liver cancer by modulating the cellular signaling pathways.

研究分野：ウイルス学

キーワード：内在性レトロウイルス HML-2 肝臓 組織特異的発現 スプライシング 核外輸送タンパク がん シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスは1本鎖RNAをゲノムに持ち、宿主細胞へ侵入後、逆転写によって自らのゲノムをDNAに変換し、宿主ゲノムに組み込むことで感染する。宿主の生殖細胞へ感染したレトロウイルスは、宿主ゲノムの一部となり、遺伝によって子孫に受け継がれていく。このようなレトロウイルスを内在性レトロウイルス(ERV)と呼ぶ(図1)。ERVは哺乳類ゲノムの約10%を占めるが、その多くは変異や欠失によって複製能やタンパク質

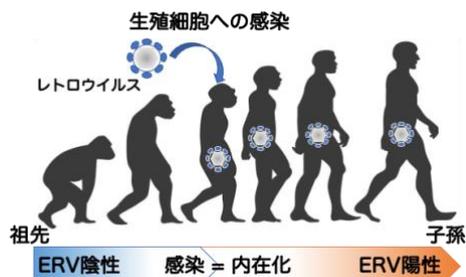


図1. 内在性レトロウイルスの獲得

産生能を失っている(1)。しかし、一部保存されたERVはタンパク質を産生し、宿主の生理機能を担うことが知られている。ヒト内在性レトロウイルス(HERV)の中でも、human mouse mammary tumor virus-like(HML)-2は特に新しいERVに分類されており、遺伝子配列が完全に保存されているものが多い(2)。これまで、HML-2由来遺伝子は、正常細胞では発現抑制されているが、がん細胞で顕著な高発現を示すことが報告されており、発がんやがん進展に寄与していると考えられてきた(3)。HML-2由来遺伝子の中でも、エンベロープ遺伝子(env)の選択的スプライシングによって産生されるRecは、RNA核外輸送タンパク質としてHML-2転写産物の核外輸送を促進し、HML-2由来タンパク質の発現に有利な環境を作る(4)。その結果、細胞の生理機構が変化し、発がんやがん進展につながっているものと考えられている。ところが、近年の研究により、Recを始めとするHML-2由来遺伝子が、初期胚や正常成体組織で発現していることが明らかとなった(5,6)。しかし、これら正常組織におけるHML-2由来遺伝子の役割は未解明である。ヒトは進化の過程で多くのHERVを取り込むことで、環境への耐性を獲得してきたと考えられている。ところが、ほとんどのHERVの具体的な機能は明らかになっておらず、ウイルス学および進化学において重要な課題であることから、それらの解明が望まれている。

## 2. 研究の目的

正常肝組織で特異的に発現するHML-2転写産物に着目し、その機能を解明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

肝特異的に発現するHML-2転写産物をクローニングし、当該転写産物の配列と由来するHML-2の遺伝子座を同定した。当該転写産物のタンパク質産生能を調べるため、当該転写産物にFLAGタグ配列を付与し、発現プラスミドに移し替え、FLAGタグ付きタンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。当該転写産物とがんとの関連性を調べるため、上記発現プラスミドを肝がん由来細胞株に強制発現させ、細胞のがん化に伴い変化する指標である、細胞の増殖能と遊走能に与える影響を、それぞれCCK-8とトランスウエルを用いて解析した。さらに、当該転写産物が細胞のトランスクリプトームに与える影響を、RNA-seqにより解析した。また当該転写産物のRNA核外輸送活性を測定するため、ルシフェラーゼを指標としたRNA核外輸送活性測定用プラスミドを作製し、肝細胞株であるHuh-7細胞およびHepG2細胞に導入し、解析した。

## 4. 研究成果

肝特異的に発現するHML-2転写産物の配列を確認したところ、第10番染色体上のHML-

2(10q24.2)に由来するものであることが、明らかとなった。転写産物がコードするアミノ酸配列を確認したところ、N末端側はエンベロープタンパク質と一致するものの、C末端側は Rec と一致する、両者のハイブリッド配列を有していた。当該転写産物のタンパク産生能を解析するため、N末端に FLAG タグを付与した発現プラスミドを導入し、FLAG タグを標的としたウエスタンブロットを行った。その結果、予想分子量の 20–25 kDa 付近にバンドが検出されたことから、当該転写産物がタンパク産生能を有していることが明らかとなった (図 2)。そこで、本研究では、便宜的に当該転写産物を HML-2-X と表すこととした。

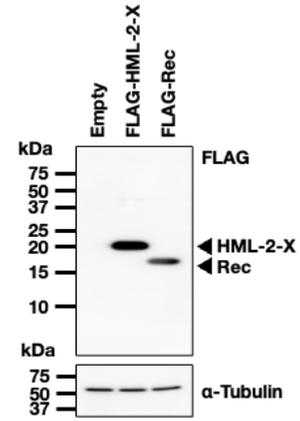


図 2. HML-2-X のウエスタンブロット

次に、HML-2-X 遺伝子は Rec と類似するアミノ酸配列を有するため、HML-2-X とがんとの関連性を解析した。まず、同一個体の肝臓の、がん部と非がん部における HML-2-X 遺伝子の発現量を比較したところ、がん部で顕著な発現量の減少が見られた。また、HML-2-X 遺伝子は、肝がん細胞の中でも、HLE 細胞や SK-Hep-1 細胞など、低分化な状態である細胞ほど、発現量が顕著に減少していた。そこで、HML-2-X を HLE 細胞に安定発現させ、各細胞の増殖能や遊走能を解析したところ、HML-2-X 導入細胞の増殖能と遊走能が有意に低下した (図 3)。このことから、HML-2-X は肝細胞のがん化を抑制する機能があると予測された。HML-2-X がトランスクリプトームに与える影響を調べるため、HML-2-X を安定発現させた HLE 細胞の遺伝子発現の変化を RNA-seq によって解析した。その結果、HML-2-X の導入により、WNT/ $\beta$ -catenin シグナル経路を含む多くのがん関連シグナル経路が抑制されていた (図 4)。本研究において、HML-2-X ががん関連シグナルを抑制する、詳細な分子機構は明らかにしていないが、HML-2-X は Rec と同様に RNA 核外輸送活性を有していた (図 5) ことから、Rec と類似の機構で、宿主遺伝子の調節を行い、肝細胞のがん化やがんの進展を抑制する (恒常性を維持する) 役割を担っているのではないかと考えられる。

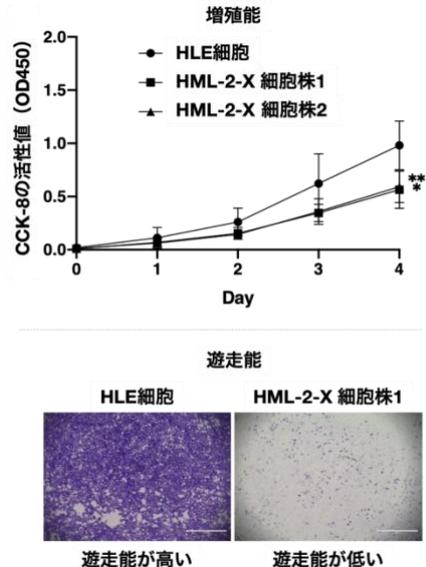


図 3. HML-2-X による増殖能と遊走能の変化

本研究成果は、ERV の新たな役割を提唱し、ウイルス学および進化学の発展に大きく資するものである。また、肝がんの発症機序に関し、新たな洞察を与えるものであり、肝がんの予防法や治療法の発展に向けた、臨床医学への応用が期待される。

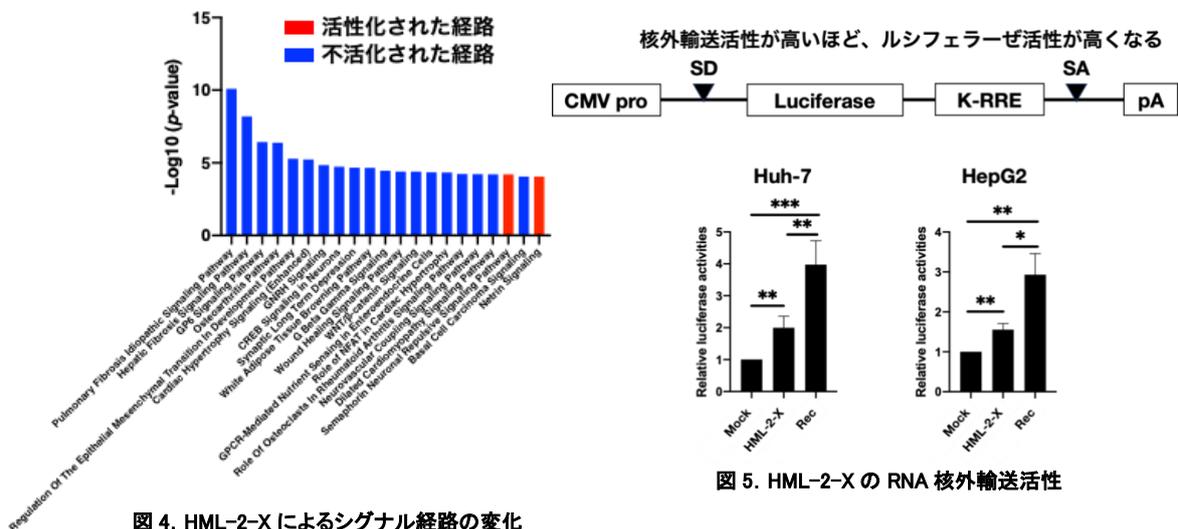


図 4. HML-2-X によるシグナル経路の変化

図 5. HML-2-X の RNA 核外輸送活性

<参考文献>

- (1) Gifford R, Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26:291–315, 2003.
- (2) Grandi N, Tramontano E. Human Endogenous Retroviruses Are Ancient Acquired Elements Still Shaping Innate Immune Responses. *Front Immunol* 9:2039, 2018.
- (3) Gao Y, Yu XF, Chen T. Human endogenous retroviruses in cancer: Expression, regulation and function. *Oncol Lett* 21:121, 2020.
- (4) Denne M, Sauter M, Armbruester V, Licht JD, Roemer K, Mueller-Lantsch N. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol* 81:5607–5616, 2007.
- (5) Schmitt K, Heyne K, Roemer K, Meese E, Mayer J. HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. *Mob DNA* 6:4, 2015.
- (6) Grow EJ, Flynn RA, Chavez SL, Bayless NL, Wossidlo M, Wesche D, Martin L, Ware C, Blish CA, Chang HY, Reijo Pera RA, Wysocka J. Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature* 522:221–225, 2015.

## 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 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasuura Masato, Nakaya Yuki, Ashiba Hiroki, Fukuda Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Investigation on the applicability of a long-range reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction assay for the rapid detection of active viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-022-02723-7	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 -

1. 著者名 Nakaya Yuki, Nishizawa Tsutomu, Nishitsuji Hironori, Morita Hiromi, Yamagata Tomoko, Onomura Daichi, Murata Kazumoto	4. 巻 13
2. 論文標題 TRIM26 positively affects hepatitis B virus replication by inhibiting proteasome-dependent degradation of viral core protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-40688-3	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 -

1. 著者名 Shimizu Ryogo, Murai Kazuhisa, Tanaka Kensuke, Sato Yuga, Takeda Naho, Nakasyo Saki, Shirasaki Takayoshi, Kawaguchi Kazunori, Shimakami Tetsuro, Nio Kouki, Nakaya Yuki, Kagiwada Harumi, Horimoto Katsuhisa, Mizokami Masashi, Kaneko Shuichi, Murata Kazumoto, Yamashita Taro, Honda Masao	4. 巻 8
2. 論文標題 Nucleos(t)ide analogs for hepatitis B virus infection differentially regulate the growth factor signaling in hepatocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 e0351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/hc9.0000000000000351	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲屋友喜、村田一素
2. 発表標題 宿主免疫逃避機構の抑制による抗HBV効果の解析
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲屋友喜、本多政夫、村田一素
2. 発表標題 肝細胞特異的に高発現する内在性レトロウイルス由来因子の肝癌抑制機能
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Nakaya, Kazumoto Murata
2. 発表標題 TRIM26 helps HBV replication by inhibiting proteasome-dependent degradation of HBV core protein
3. 学会等名 JDDW2023
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

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