

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700863

研究課題名（和文） HTLV-1 感染による宿主 NMD の攪乱が ATL 多段階発癌プロセスに及ぼす影響

研究課題名（英文） The implication of NMD disruption by HTLV-1 infection in cellular transformation

研究代表者

中野 和民 (Nakano Kazumi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：60549591

研究成果の概要（和文）：これまでの研究結果より、レトロウイルス HTLV-1 の感染が宿主 NMD を抑制し、その現象は主にウイルス mRNA 結合たんぱく質の Rex の働きによることが確認された。我々は Rex の過剰発現により NMD の抑制が起き、HTLV-1 ゲノム RNA の安定化されることを示し、Rex による NMD の抑制がウイルスの自己複製に有利に働くことを示した。一方で内在性 NMD 標的 *nik* mRNA の安定化も観察され、本来 NMD によって分解されるべき異常 mRNA や内在性標的 mRNA の発現量が影響を受ける可能性が示唆された。HTLV-1 関連細胞株では NMD が抑制状態にあること、ATL 細胞では多くの NMD 標的 mRNA の発現量が上昇していることが確認され、HTLV-1 感染時に Rex によって引き起こされる NMD 異常が、宿主細胞の不死化および癌化と関連している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we demonstrated that HTLV-1 infection induces the suppression of the host NMD activity, and that HTLV-1 Rex, the viral post-transcriptional regulator, is responsible for the NMD inhibition. Overexpression of Rex resulted in decreased NMD activity and increased stability of the viral genomic RNA. Moreover, Rex stabilized a native NMD target mRNA, such as *nik* mRNA. These results suggest that NMD inhibition by Rex is beneficial for the viral replication, but also can influence on the expression levels of aberrant mRNAs as well as native mRNAs targeted by NMD. We demonstrated that HTLV-1 infected T-cell lines have lower NMD activities than HTLV-1 uninfected T-cell lines. Also, gene expression microarray analyses showed that PBMCs from ATL patients have elevated NMD target mRNAs compared with those from healthy donors. Taken together, these results proposed a possibility that NMD disruption by Rex at the time of HTLV-1 infection may implicate in the immortalization and transformation of infected cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

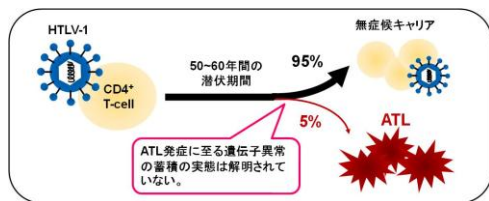
科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん遺伝子・ヒト白血病ウイルス

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病(ATL)は HTLV-1(Human T-cell Leukemia Virus TypeI)の感染によって引き起こされる T 細胞性白血病である。50~60 年という長い潜伏期間に、HTLV-1 感染不活化 T 細胞に複数のゲノム異常が蓄積し、腫瘍化すると考えられている。現在日本では約 120 万人の HTLV-1 感染者がおり、毎年およそ 1000 人の感染者が ATL を発症すると報告されているが、前述のとおり無症候潜伏期が非常に長く、さらに感染者の一部にのみ発症するため、実際の感染者数は把握しきれていない。ATL 治療の現場では一般的な多剤併用化学療法に加え、CCR4 抗体療法、AZT/IFN 併用療法など、ATL 特異的な治療法も開発されつつあるが、薬剤耐性細胞の出現などにより再発を抑えることができず、未だに予後は極めて不良である(1)。

HTLV-1 は主に母乳によって母から新生児に母子感染すると考えられている。レトロウイルスである HTLV-1 は感染後速やかにヒトゲノムに組み込まれ潜伏期に入る。そのため一度感染が成立すると、体内からウイルスを駆除することはほとんど不可能である。よって感染が成立する前にウイルスを駆除することが最も望ましいが、新生児期より前の胎児期にすでに母体内で感染が起っている可能性も示唆されており、HTLV-1 感染の分子メカニズムは解明が困難である。加えてヒト・レトロウイルスである HTLV-1 を用いた感染実験は、免疫不全マウスモデルなどでは完全な再現が難しく、HTLV-1 の感染時に T 細胞内外で起る事象に関しては、ほとんど明らかにされていない。我々基礎研究に携わる者の役目として、HTLV-1 の感染および ATL の発症機序を明らかにし、その情報を医療現場にフィードバックすることが期待されている。

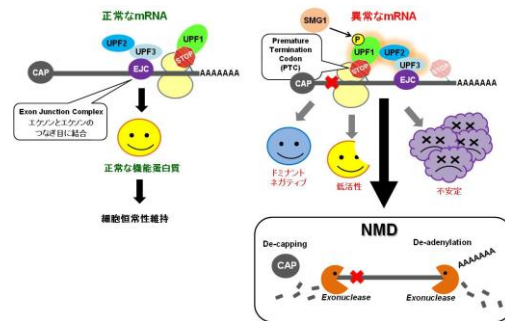


<図 1. HTLV-1 の感染と ATL 発症>

2. 研究の目的

これまで我々の研究室では、HTLV-1 の感染成立および感染細胞の腫瘍化の基盤となる宿主細胞内での恒常性の攪乱の一つとして、HTLV-1 感染による宿主 mRNA 品質管理機構、Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) の機能不全に注目してきた。NMD は真核生物細胞に普遍的に存在し、細胞にとって有害となる異常 mRNA を排除する機構である。正

常な mRNA のストップコドンは最終エクソンにあるため最も 3'側のエクソン・ジャンクション・コンプレックス(EJC=スプライシングによりエクソンとエクソンのつなぎ目に形成されるコンプレックス)の下流に位置する。しかし point deletion mutation などによるフレームシフトなどによって本来の位置よりも上流、つまり 3'EJC より上流にストップコドン(premature termination codon=PTC)を持つ異常な mRNA が生じることがある。



<図 2. NMD の仕組み>

このような異常 mRNA からは C 末を欠いた不完全な構造を持つタンパク質が翻訳され、細胞恒常性維持に有害な dominant-negative form のタンパク質を生じたり、本来の構造を維持出来ず、aggregation を引き起こしたりする。NMD 経路では mRNA の翻訳時にストップコドン上に結合する UPF1 が、ストップコドンと EJC の位置関係をチェックし、異常な mRNA を選択的に RNA 分解系に引き渡す(図 2)。NMD の標的 mRNA には本来の構造が NMD 標的になるものも多数存在する。例えば 5'UTR に本来の ORF とは別に小さな ORF を有するもの、alternative splicing によって PTC を生じるもの、そして 3'UTR に intron 領域を含むものなどがある(2)。これらの内在的な NMD 標的には細胞周期や細胞増殖の調節に関わるものが多く、通常は NMD によって正常な発現量が保たれている。よって NMD の正常な機能は細胞の恒常性と正常な機能の維持に不可欠である。

HTLV-1 を含むレトロウイルスゲノム RNA は、9kb 弱の短い領域に 10 を超えるウイルス構造タンパク質および機能タンパク質をコードしている。それは 3つの reading frame と 2 回のスプライシングを組み合わせることで可能となるが、このような複雑な構造をした mRNA は真核細胞には本来存在しない。加えて、近年フレームシフトシグナルそのものが NMD の標的となること、そして alternative splicing form を持つ遺伝子の約 1/3 が NMD 標的であることが報告された(3,4,5,6,7)。それにも関わらず、HTLV-1RNA は排除されることなく宿主ゲノムに組み込まれるが、その分子機構は明らかになっていない。

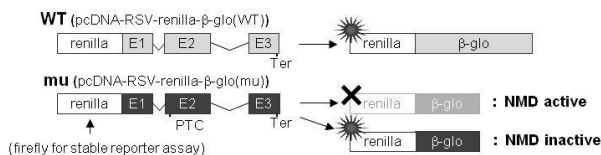
これまで我々は、ATL 患者の腫瘍細胞と HTLV-1 関連細胞株において、NMD の内部標的遺伝子の発現が上昇していること、そして NMD レポーターアッセイ系による NMD 活性の測定の結果、NMD 活性が有意に抑制されていることを見出し、ATL 細胞または HTLV-1 感染細胞において NMD に異常が起こっている可能性を提唱してきた。また、HTLV-1 ゲノム RNA が宿主 NMD の標的であり、一方で HTLV-1 の機能タンパク質の一つである Rex が NMD の活性を抑制していることを示した。このことから感染直後に Rex が NMD を抑制することにより、ウイルスゲノム RNA の安定化を図り、感染成立を促進していると考えている。しかしながら Rex が網羅的かつ普遍的な mRNA 品質機構のどのステップに作用し抑制効果をもたらすのか、その分子メカニズムはまだ明らかになっていない。また HTLV-1 感染によって引き起こされた NMD 異常が、どのように感染 T 細胞の恒常性を乱し、不死化や腫瘍化に関わっているかも不明である。そこで本研究では、Rex による宿主 NMD 抑制の分子メカニズムの解明、そして NMD 機能不全が細胞の癌化に及ぼす影響の解明を目的に実験を行う。

3. 研究の方法

<平成 22 年度>

1. Rex による NMD 抑制機構の解明

我々はこれまで、wt-β-globin(NMD 標的にならない)と、Premature Termination Codon (PTC) を導入した mu-β-globin(NMD 標的になる) minigene の発現量を、dual-luciferase assay によって比較することにより、NMD 活性をモニターする系を用いて実験を行ってきた (図 3)。このモニター系を応用し、以下のような実験を行った。



<図 3. NMD 活性測定レポーターの構造>

① HeLa 細胞で図 3 の WT と mu の NMD レポーター両方を stable に発現する細胞株を樹立する(sHeLa)。

② GST-pulldown assay 法により、NMD の中心的制御タンパク質である UPF1 と HTLV-1 Rex の相互作用を確認する。

③ Rex はリン酸化により活性化されることが知られているが、Rex のリン酸化が NMD 抑制効果に関わっているか、Rex のリン酸化阻害剤 H-7 を用いて検証する。

2. HTLV-1 以外のレトロウイルスが NMD 活性に及ぼす影響の検討

HTLV-1 と同様の complex retrovirus である HIV-1 は、やはりヒト CD4⁺ T 細胞に感染し、AIDS を発症する。その生活環と病原性は HTLV-1 と異なる部分が多いが、ゲノム RNA の構造は共通して複雑であり、HTLV-1 Tax に対する HIV-1 Tat、HTLV-1 Rex に対する HIV-1 Rev のような機能が共通したウイルス機能タンパク質をコードしている。そこで我々は、HIV-1 においても宿主 NMD を抑制する機能を持つタンパク質が存在する可能性を検証するため、sHeLa 細胞に Tat と Rev を過剰発現させ、NMD 活性に対する影響を検討した。

<平成 23 年度>

1. ATL 細胞での NMD 機能不全の把握と細胞のがん化への影響

我々はこれまで、52 名の ATL 患者の血液検体と 21 名の健常人血液検体について網羅的遺伝子発現マイクロアレイ解析を行い、ATL の遺伝子発現異常を明らかにするとともに、ATL 患者では多くの NMD 標的遺伝子の発現が増加していることを示した。これらの結果より、HTLV-1 感染細胞および ATL 細胞で NMD 異常が起こっている可能性を提唱してきた。そこで ATL 患者での NMD 機能不全の実態を把握し ATL 発症との関わりを明らかにするため、以下の実験を行った。

① 上記の ATL 遺伝子発現解析結果と NMD 標的遺伝子群との比較により、内在性の NMD インディケーター遺伝子に適しており、さらに細胞恒常性の維持に重要な役割を果たす遺伝子を複数選出する。

② 複数の ATL 由来細胞株や ATL 患者検体において①の NMD 標的遺伝子の発現量を real-time PCR によって測定し、発現量の増加つまり NMD の機能不全が見られるか検討する。

③ ①で選出した NMD 標的遺伝子の異常な発現上昇が、細胞の恒常性攪乱に及ぼす影響を、個々の過剰発現系などを用いて検討する。

2. HTLV-1 感染細胞および ATL 細胞での NMD 機能不全の原因の究明

これまでの研究により、Rex の過剰発現が宿主 NMD を抑制することを見出した。そこで現実的な実験の場で、HTLV-1 の感染後に Rex がどのように宿主 NMD に作用しているのかを観察するため、以下のような実験を計画した。

① HTLV-1 infectious clone FLMT-2 (熊本大

学 大杉剛生先生の御供与による)を元に、point mutagenesis によって Rex ATG を CTG に置換した Rex(-) FLMT2 を作成する。sHeLa に wt-FLMT2 または FLMT2(Rex-) を導入し、NMD 活性を測定することにより、Rex の有無が HTLV-1 感染による NMD 阻害効果を規定している要因であることを、より明確にする。

② これまでは HeLa 細胞を用いた実験が中心であったが、HTLV-1 の感染の減少をより現実的に再現するため、HTLV-1 無細胞感染系の確立を目指す。これにより、T-細胞株、あるいはヒト PBMC への HTLV-1 感染実験が可能となり、HTLV-1 がリンパ球系細胞に幹線した時の、NMD 抑制を含む現象を、より現実的かつ詳細に観察できると考える。また、NMD が抑制されたときの細胞への影響についても、実際に HTLV-1 が感染し病原性を示す血球系細胞を用いることにより、より正しい評価ができるものと期待する。

4. 研究成果

<平成 22 年度>

1. Rex による NMD 抑制機構の解明

① NMD の中心因子 UPF1 と Rex の相互作用を GST-pulldown で検討した結果、UPF1 と Rex が相互作用していることが分かった。また両者は NMD の場である p-body で共局在しさらに会合していることが分かった。

② Rex のリン酸化状態と NMD 阻害機能の関係を検討した。HeLa 細胞でβ-globin mRNA 構造を利用した NMD レポーターを stable に発現する細胞株を樹立し(sHeLa)、これに Rex を過剰発現させ H-7 (リン酸化阻害) によって Rex のリン酸化を抑制すると、Rex の NMD 阻害機能は低下した。

以上の結果から Rex と UPF1 が NMD の場である p-body で会合し、Rex のリン酸化状態が NMD 阻害効果に影響することが分かった。今後これらのことと Rex による NMD 阻害機構との関係を検討する。

2. HTLV-1 以外のレトロウイルスが NMD 活性に及ぼす影響の検討

① HTLV-1Rex の counterpart である HIV-1 Rev の NMD 阻害機能を調べた。その結果 HIV-1Rev は NMD を阻害しなかったが、HIV-1 Tat によって NMD 阻害が引き起こされた。よって HTLV-1、HIV-1 とも NMD を阻害する機能を持つ蛋白質を持つが、HIV-1 ではウイルス転写制御因子の Tat がより強くその機能を持つことが示唆された。Rex と Tat はウイルス生活環では異なる機能を持つが、mRNA 結合蛋白質であるという共通点から NMD に対して類似した影響を持つかもしれない。

<平成 23 年度>

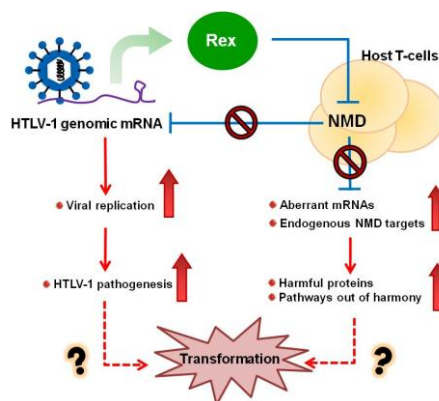
1. ATL 細胞での NMD 機能不全の把握と細胞のがん化への影響

我々はこれまで、遺伝子発現マイクロアレイ解析により ATL 患者の遺伝子発現異常を明らかにしてきた。アレイデータを詳細に解析し、さらに確認実験を行うことにより、IL2Rα, NIK, IL15 mRNA など、ATL 細胞で過剰発現しているマーカー遺伝子産物が NMD の標的 mRNA であり、NMD 不全が上昇の一要因となりうる可能性を見出した。

2. HTLV-1 感染細胞および ATL 細胞での NMD 機能不全の原因の究明

これまでの研究により、我々は HTLV-1 の感染初期に、HTLV-1 Rex が宿主 NMD を抑制すること、そして腫瘍化した ATL 細胞でも NMD の異常があることを示した。この実験では HTLV-1 感染および Rex によって引き起こされた NMD 異常が細胞にどのような影響を与えるのかを検討した。そのためには HTLV-1 感染の場を再現するモデル実験系が必要と考え、ウイルス産生細胞株 MT2 との共培養感染や Rex (+/-) infectious clone を用いた擬似感染系を確立した。目下これらの系を用いて、Jurkat や Molt4 などの T 細胞株に HTLV-1 を感染したときの NMD 活性の変化と細胞形質の変化を解析中である。

以上の結果より、我々は NMD を介した新たなウイルス-宿主相互作用が存在し、HTLV-1 においては、Rex が NMD の抑制に重要な役割を担っていると考えている (図 4)。



<図 4. HTLV-1 と宿主 NMD>

<参考資料>

1. 「HTLV-1 と疾患」渡邊、上平、山口編、文光堂、2007.
2. Mendell et al. (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. Nat.Gen.36: 1073-1078.

3. Plant et al. (2004) A programmed -1 ribosomal frameshift signal can function as a cis-acting mRNA destabilizing element. *Nuc. Acid. Res.* 32: 784-790.
4. Lewis et al. (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 189-192.
5. Cuccurese et al. (2005) Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 33, 5965-5977.
6. McGlinchy and Smith, C. W. (2008) Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* 33 (8), 385-393.
7. Saltzman et al. (2008) Regulation of Multiple Core Spliceosomal Proteins by Alternative Splicing-Coupled Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Mol Cell Biol* 28 (13), 4320-4330.

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)

[学会発表] (計6件)

1. Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D, Watanabe T. (2011). A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA. 第4回 HTLV-1 研究会・合同班会議 (2011年9月19日、東京)
2. Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D, Watanabe T. (2011). A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases (Sept. 16th, 2011, Tokyo).
3. Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T. (2011). A Novel Function of HTLV-1 REX in Inhibition of the Host mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA. The XV International Congress of Virology (Sept. 13th, 2011, Sapporo).
4. Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T. (2011). A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host

mRNA Surveillance Mechanism (NMD) for Protection of the Viral Genomic mRNA. The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses (June 5th, 2011, Leuven, Belgium)

6. Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T. (2010). HTLV-1 Rexの新しい機能：宿主Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)の抑制 日本ウイルス学会総会 (2010年11月8日、徳島)

5. Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T. (2010). A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host NMD, the mRNA Surveillance Mechanism. *Viruses, Genes, and Cancer 2010* (Sept. 30th, 2010, Venice, Italy).

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 和民 (Nakano Kazumi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：60549591