

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790427

研究課題名（和文） XMRV感染の腫瘍悪性度への効果の解析

研究課題名（英文） The effect of XMRV-infection on the malignancy of tumor cells

研究代表者

佐久間 龍太（SAKUMA RYUTA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50547429

研究成果の概要（和文）：

2006年に前立腺癌患者組織からヒト新規ガンマレトロウイルス XMRV が同定された。この新しいウイルスが前立腺がんの病態に影響するかを調べることを本研究の目的とし、XMRV 感染が腫瘍細胞の悪性度に影響するかを主に解析した。その結果、XMRV 感染によって腫瘍細胞の足場依存性や低血清濃度での増殖能などの悪性度に関わる指標に変化は認められなかった。これは、他の複数の報告とも合致しており、XMRV 感染が腫瘍悪性度に影響しないという結論を強く支持する。

研究成果の概要（英文）：

XMRV is a newly identified human gamma-retrovirus cloned from a prostate cancer tissue sample. Since there was no evidence to show that XMRV infection could be a possible trigger of prostate cancer generation, we assessed if XMRV-infection increased tumor malignancy. Both the anchorage dependency of tumor cells and a cell growth efficacy under lower serum concentration was not affected by XMRV infection. Then we concluded that XMRV infection did not affect a tumor malignancy. These data agreed with some other reports published from our group and others, recently.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1200000	360000	1560000
2011 年度	1700000	510000	2210000
年度			
年度			
年度			
総 計	2900000	870000	3770000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性・XMRV

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は北米での成人男性の死因の上位に位置し、日本国内では前立腺癌による死者数は今後も増加傾向をたどると考えられており、2020年には国内の成人男性の癌による死因第二位になるという試算も報告されている。前立腺癌が高頻度に発生する家系を調べたところ RNase L 遺伝子に R462Q 変異が多く存在したため、前立腺癌と RNase L 遺伝子との関連が疑われている。RNase L は抗ウイルス活性を持つ細胞内免疫因子として知られており、R426Q 型の RNase L は野生型よりも低い抗ウイルス活性を示す。その為、一部の前立腺癌はウイルス性のものではないかと予想されていた。2006 年 Urisman らによって RNase L R462Q を持つ前立腺癌の臨床検体よりレトロウイルスの構造遺伝子が発見され、それらのつなぎ合わせとして新規ヒトガンマレトロウイルスが同定された。(Urisman A. et al. PLoS Pathog. 2006) ゲノムの塩基配列が Xenotropic Murine Leuchemia Virus (MLV) と高い相同性を示した事から、Xenotropic Murine Leuchemia Virus-Related Virus (XMRV) と命名された。その後、複数のヒト前立腺癌由来細胞株より自己増殖型の XMRV が単離され、XMRV は前立腺癌発癌の一因ではないかと考えられている。

XMRV は Xenotropic MLV と同じ XPR1 をそのレセプターとして用いていると考えられており、我々の試験でも 293T 細胞、HeLa 細胞などのヒト由来細胞へは感染し、NIH3T3 細胞への感染は認められなかった。一方で、同じ齧歯類のラット由来 Rat-1 細胞では効率の良い感染・増殖が認められた。また我々は当時、XMRV の発見者の一人である Silverman 博士のグループとの共同研究として、既存の抗レトロウイルス薬（逆転写阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、組み込み酵素阻害剤）の XMRV 感染における効果を検証し報告した。(Sakuma R et al. Virology. 2010) またその過程で、XMRV の Gag/Pol、Env の各遺伝子を効率よく検出する定量 PCR の系も樹立した。

XMRV 発見の報告後、我々を含む多くの研究者がウイルス発癌の可能性を検証しているが、未だに XMRV が発癌ウイルスであることを示す具体的な報告は無い。また、XMRV からは Oncogene は見つかっておらず、MLV と同様に Insertional Mutagenesis による発癌が疑われている。しかしながら、臨床検体での XMRV ゲノム検出率は高くても 10% 程度、ウイルスタンパク質の検出率も

約 30% であり、既知の機構によるウイルス性発癌とは考えにくい。

更に 2009 年 10 月号のサイエンス誌上にて慢性疲労性症候群の患者中 67% が XMRV に感染していることが報告された。この報告での健常人の感染率は約 3% と、XMRV 感染と慢性疲労性症候群との関連も強く示唆された。したがって、生体内で XMRV 感染によって引き起こされる効果・影響に関する研究は当該ウイルス感染と発病との関連を理解する上で喫緊のものである。

2. 研究の目的

XMRV の発見後、我々を含む多くの研究者がウイルス発ガンの可能性を検証していたが、2010 年当時 XMRV が発ガンウイルスであることを示す具体的な報告は無かった。また、XMRV からは Oncogene は見つかっておらず、MLV と遺伝的に非常に近い LTR を持つことから、Insertional Mutagenesis による発ガンが疑われていた。しかしながら、臨床検体での XMRV ゲノム検出率、ウイルスタンパク質の検出率は低く、既知の機構によるウイルス発ガンとは考えにくい。また、XMRV が検出されるのは主要周辺組織である事が多い事も知られていた。また、HIV-1 Nef, Tat, Vpr などのウイルスタンパク質は感染細胞で合成された後血中に放出されて周辺に存在する非感染細胞の機能、活性を低下させると考えられている。そこで我々は XMRV 感染は腫瘍化よりもむしろ、腫瘍化後の悪性化・悪性度に関与しているのではないかと予想した。そこで、本研究では XMRV 感染によって腫瘍の悪性度が影響を受けるのかを検証する事を目的とし、具体的には以下の 2 点を本研究計画の目標として掲げた。

1. XMRV 感染培養細胞における腫瘍悪性度の変化を観察する
2. XMRV 感染培養細胞接種による腫瘍の変化を観察する

また、上記目標に到達する為の細目として以下の 5 ステップを挙げた

1. XMRV 全長のシーケンス解析および新規オープンリーディングフレーム (ORF) の検討
2. Insertional mutagenesis を検討する為の XMRV ベクターの構築
- 3.ウイルスタンパク質発現による腫瘍悪性化の検討
4. XMRV のマウス接種による生体内分布と発ガン性の検討
5. XMRV 感染細胞のヌードマウス接種による悪性度試験

ヒト癌組織より同定された新規ガンマレトロウイルス XMRV の感染メカニズムを明らかにし、その発癌性に関する知見を得ることは意義深く、対象ウイルスの新規性故に、病原性、病体の増悪能の有無すら不明であり、その点を理解する為の情報収集は非常に重要な研究課題と考えられる。

3. 研究の方法

(1) XMRV 全長のシーケンス解析
既知の XMRV ゲノム全長の配列上に有る ORF 解析は DNA Dynamo software を用いてセンス、アンチセンスの全てのリーディングフレームについて行った。また、シーケンス解析はウイルスタンパク質クローニング用に設計したプライマーと BigDye1.1 を用いて行い、読みきれなかった領域に関して順次新規プライマーを設計し、全長を解析しなおした。

(2) ウイルス構造タンパク質発現プラスミドの作製

①Gag、および Gag-Pol 発現プラスミドの作製

XMRV ゲノム上で Gag、および Gag-Pol をコードする領域を PCR にて増幅し pcDNA3.1 の CMV プロモーターの下流に挿入した。VP62 と比較して変異の挿入が無いことをシーケンス解析により確認した後、所属研究室の吉仲由之先生よりご分与頂いた抗 MLV CA 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い確認した。また、機能的な発現で有ることは及び後述のベクターレスキューアッセイにて行った。

②Env 発現プラスミドの作製まず、Env をコードする領域のみを PCR にて増幅し、pcDNA3.1 に挿入した。ついでこのプラスミドに XMRV 由来の 5' LTR-SD 領域、SA-Env 領域を挿入したものを作製した。残念ながら、これらから Env の発現を認めることはできなかった。そこで、XMRV-VP67 のプロウイルス DNA を HincII と NheI で切断し、Env を含む約 2.3Kb の断片を回収 pCAG プラスミドのイントロンの下流にクローニングした。(図 1A)

(3) ベクターレスキューアッセイ

我々の以前の研究より、XMRV ゲノム RNA のパッケージングシグナルは MLV のものと比べて高度に保存されており、MLV ベクターのゲノムはそのまま XMRV 粒子に取り込まれることが示された。そこで、作製したプラスミドからの XMRV 構造タンパク質の機能的な発現を検証するために、293T 細胞

もしくは MLV の Env を発現している Plat-E 細胞に各発現プラスミド及び、MLV-luc、もしくは MLV-GFP ベクタープラスミドを co-transfection し 48 時間後に培養上清に放出されたウイルスベクターを 293T 細胞へ感染させ、力価を測定した。

4. 研究成果

(1) XMRV 全長のシーケンス解析

XMRV は近年単離された新規レトロウイルスであることから、その分子生物学的な特性についても未知の部分が多い。よって、MLV における Glyco-Gag などのようにごく少量しか産生されないタンパク質の発現の可能性を探るため、ウイルス全長のシーケンスを再度解析し、未知のオープンリーディングフレームが存在しているのかを検討する。XMRV ゲノムをセンス、アンチセンス方向で解析したが、機能的なタンパク質発現に十分な長さを持つものは見つけれなかった。また、以後のウイルスタンパク質クローニングの際に標準配列として利用すること、データベース上幾つかのバリエーションが見られることから XMRV のシーケンスを解析しなおしたところ、既報の VP62 標準配列には数カ所のエラーがあることが明らかとなった。この結果を基に再度 XMRV の ORF 解析を行ったところ、XMRV 標準株 VP62 では Glyco-Gag の開始コドンは存在するものの、その直後に 1 塩基の欠損変異があり Glyco-Gag としては発現しないことがわかった。

(2) XMRV ベクターの作製

XMRV をベクター化するにあたり Trans にウイルス構造タンパク質を供給するための発現プラスミドを作製した。

①Gag/pol 発現プラスミドの作製

XMRV の各ウイルスタンパク質の遺伝子を一過性の発現プラスミドへクローニングし、Gag タンパク質の発現は抗 MLV CA 抗体を用いて検出した。また、発現したタンパク質が機能的なものかを MLV-GFP ベクターレスキューアッセイにて確認した。

②Env 発現プラスミドの作製

ゲノム上で Env をコードする領域をそのまま pcDNA3.1 にクローニングしても Env の発現は認められなかった。MLV の Env 発現では mRNA がスプライシングを受ける事が重要である事が分かっていたため、XMRV の Env でも同様なのではないかと考え、キメリックイントロンを持つ発現プラスミドを作製したが、Env の発現は認められなかった。そこで、ウイルス由来の SD と SA を挿入し、

XMRV 本来のスプライスを模倣したが、やはり XMRV Env の機能的発現は認められなかった。そこで、Env 領域のみならず SA を含む周辺領域を同時にイントロンを持つ発現プラスミドに挿入したところ、Env の機能的な発現がみとめられるようになり、Env の発現調整には RNA のスプライシングのみならず、ウイルス由来の塩基配列による何らかの調整が必要だということが示唆された。(図 1)

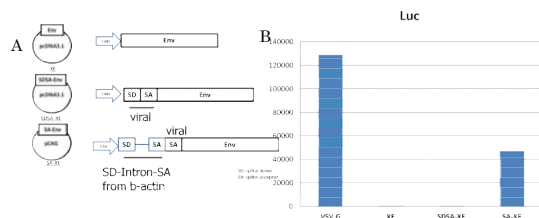


図 1. 機能的 Env の発現

(A) 作製した Env 発現コンストラクトの詳細を示した模式図 (B) A で示した Env 発現プラスミドを用いたレスキューアッセイの結果を示す。最も左がコントロールの VSV-G で最も右が今回作製した機能的発現可能なコンストラクト

(3) ピューロマイシン薬剤選択マーカーを持つ XMRV の作製
XMRV 感染細胞を用いた動物実験を考えた際に、非感染細胞の混入をさける必要がある。そこで、XMRV のゲノム上に IRES により発現するピューロマイシン耐性遺伝子を挿入したウイルスの作製を試みた。XMRV のゲノム上で Gag と Pol は繋がっており、Env は Pol のフレームと一部重複していることから、Env の下流に IRES-Puro を挿入する事とした。ウイルス 3' フラグメント中でのピューロマイシン耐性遺伝子発現カセットを Transfection した 293T 細胞が薬剤耐性を獲得することを確認して (図 2A)、ウイルスゲノムに戻し、薬剤選択マーカー発現プロウイルスクローンとした。このコンストラクトからの感染性ウイルス産生はベクターレスキューアッセイによって確認されたが (図 2B)、ウイルス産生細胞、感染細胞ともにピューロマイシン耐性を獲得したものはごく一部だった。そのため、ウイルス産生細胞内での XMRVGag タンパク質の発現をウエスタンブロットにて確認したところ、親株である VP62 と同等の発現が認められた (図 3)。この結果、および Env 発現プラスミド作製の経験から、XMRV Env 周辺は MLV と比較しても高度に発現制御されている重要な領域であることが示唆された。

(4) ウイルス感染細胞の解析

XMRV 腫瘍悪性度の評価する際、研究代表者はウイルス学を専門としているため、広く説得力の有るデータを得るためにがん研究に

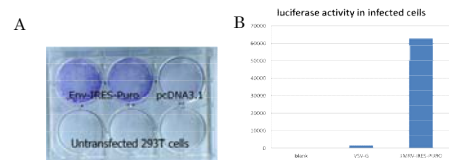


図 2. XMRV-IRES-puro ウイルスの作製

(A) Env-IRES-Puro カセットを Transfection し、ピューロマイシンで選択後、生き残った細胞をクリスタルバイオレッドにて染色した。

(B) A で示した Env-IRES-Puro を XMRV へ載せ替えて作製した XMRV-IRES-Puro によるレスキューアッセイ

豊富な経験を有する、所属研究室主宰、山岡昇司教授にご助言を頂き、腫瘍浸潤性・転移能の指標として足場非依存性を、また腫瘍細胞の増殖能の指標として低血清濃度での増殖スピードを評価することとした。

①足場依存性の解析

XMRV 感染細胞の足場依存性を調べる為の細胞として接着細胞である Rat1 細胞を選択した。XMRV でレスキューされた MLV-GFP ベクターを Rat1 に感染させたところ、48 時間後にルシフェラーゼ活性を認め Rat1 は XMRV 感受性の細胞である事が示された。次いで Rat1 細胞に野生型の XMRV を感染させ、感染 Rat1 細胞に軟寒天培地を重層し 2 週間培養したが、XMRV 感染 Rat1 細胞の軟寒天培地中に足場非依存性を獲得したコロニーの出現を認めなかった。

②低血清濃度での増殖能の解析

既報のコホートの結果より XMRV は慢性疲労生症候群の患者血中から検出されていることから、低血清濃度試験にはヒト血球細胞である SupT1 細胞を用いた。XMRV を Jurkat 細胞、SupT1 細胞へ感染させた後、7 日後に培養上清中に産生されたウイルスの RT 活性を認め、XMRV のプロダクティブな感染の成立を確認した。その後、1%血清を含む RPMI で感染細胞を培養し、細胞の増殖をモニターした。1%血清存在下では、通常の 10%血清条件よりも増殖の遅れを認めたが、XMRV 感染、非感染細胞間での違いは認められなかった。(図 4)

以上より、本研究計画を通してヒトの発ガン・悪性化という観点において XMRV の関与は考えにくいという結論に達し、研究の目標であった XMRV 感染による腫瘍悪性化への影響に関しては一定の評価を終えることができた。しかしながら、実験計画遂行中に本研究計画で主たる対象であった XMRV の自然界での存在そのものが否定されてしまった。先ず、2011 年 5 月に出席したレトロウイルス国際会議 (NY 州・米国) において、

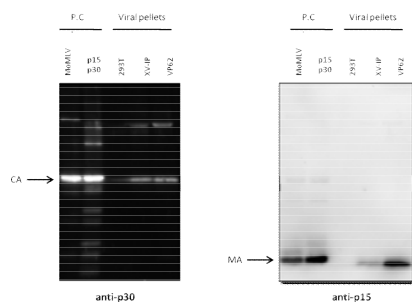


図 3. XMRV-IRES-Puro からの XMRVGag の発現

トランスフェクション後のウイルス産生細胞ライセートのウェスタンブロット。左が抗 CA 抗体を用いた結果で、右が抗 MA 抗体を用いた結果を示す。レーン左からポジティブコントロールとして、MoMLV 感染細胞のライセート、組み換えタンパク質が流れており、次いでトランスフェクションしていない 293T 細胞の、XMRV-IRES-Puro、もしくは VP62 をトランスフェクションした細胞のライセートが得移動されている。

XMRV が 2 種類のネズミの内在性レトロウイルスの掛け合わせであることが示された。これ以降、複数の報告・論文によって、XMRV の存在が否定され、発見した研究グループも当該論文を取り下げた。現在当該領域の研究者間では XMRV の発見は「繰り返してはならない不幸な過ちであった」という認識が一般的となった。また、その際に、患者由来腫瘍の初代継代細胞をヌードマウスで継代したことによって内在性レトロウイルス間での組み換えが発生し XMRV が作られたと報告された。その為、当初計画していた動物実験の実施は新たな組替えウイルスを誘導してしまう危険性、及び動物を犠牲とした発がん性の評価の対象として適切であるかなどの倫理面の問題から実施を見合わせた。これは研究計画立案当初、また本研究計画採択時では予想し得なかったことであり、2 カ年計画の 2 年目に起こったため、上記のような研究環境の大きな変化に対応する形で方向転換を加えることができなかったことを申し添えておく。

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 No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan.

Furuta RA, Miyazawa T, Sugiyama T, Kuratsune H, Ikeda Y, Sato E, Misawa N, Nakatomi Y, Sakuma R, Yasui K, Yamaguti K, Hirayama F.

Retrovirology. 2011 Mar 17;8:20.

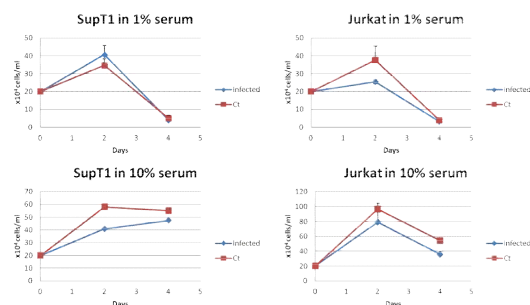


図 4. XMRV 感染細胞の低血清濃度での増殖

上段が低血清濃度で、下段が通常の血清濃度で培養した結果。左の 2 枚のパネルが SupT1 細胞を右が Jurkat 細胞を示す。また、赤いライン (Ct) がコントロールの非感染細胞を、青いライン (infected) が XMRV 感染細胞の増殖曲線を示す。

査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

① Ryuta Sakuma, Saori Shikama, Sayaka Sukegawa, Shoji Yamaoka
DEVELOPMENT OF REPLICATION-COMPETENT XENOTROPIC MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS CARRYING THE PUROMYCIN RESISTANCE GENE
IUMS2011 2011 年 9 月 14 日 札幌

② 松永智子、小島良績、澤崎達也、森下了、佐久間龍太、岩谷靖雅、杉浦互、山本直樹、梁明秀
コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新規ガンマレトロウイルス XMRV プロテアーゼの解析
第 58 回 日本ウイルス学会 2010 年 11 月 9 日 徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 龍太 (サクマ リュウタ)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50547429

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：