

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460075

研究課題名(和文) ウイルス・マイクロRNAによる宿主細胞の自然免疫反応への対抗機構の解明

研究課題名(英文) Functional roles of SV40 microRNA in host antiviral immunity.

## 研究代表者

土方 貴雄(Hijikata, Takao)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：70189786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではSV40ウイルスのマイクロRNAであるmiR-S1のウイルスDNAの複製や免疫応答における役割について調べた。SV40がコードするmiR-S1-3pとmiR-S1-5pのうち安定した発現や機能を有するのはmiR-S1-3pであるが、このmiR-S1-3pはシード配列を介した作用より全長にわたる相補的配列を介した抑制作用が強くsiRNA様に働く特徴をもつ。SV40ゲノムベクターを導入した細胞内でのウイルスDNA複製や炎症性サイトカインの発現を解析した結果、miR-S1-3pは標的であるT抗原の発現を抑制することで間接的にDNA複製や炎症性サイトカイン発現を調節することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We explored functional roles of miR-S1 encoded by SV40 virus in DNA replication and cytokine expression within HEK293 cells transfected with SV40 genome vectors. Semi-quantitative qPCR analysis showed that miR-S1-3p rather than miR-S1-5p was more abundantly expressed in cells transfected with SV40 genome vectors. Consistently, reporter assays showed that miR-S1-3p had much more repressive effects on luciferase activity than miR-S1-5p did. Replication rate of viral DNA were evaluated by qPCR analysis in various types of cells transfected with SV40 vectors with or without miR-S1 expression. These results indicated that the replication rate increased proportionally to T antigen expression, but was retarded by its excess expression, often observed in transfected cells without miR-S1 expression. Examination of cytokine expressions in HEK293 cells transfected with SV40 vectors revealed that miR-S1 affected the expression of TNFalpha and IL17F through its modulation of T antigen expression.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：マイクロRNA SV40 炎症性サイトカイン DNA複製 miR-S1

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は、多くの真核生物に発現している約 22bp の短い RNA で、複数の mRNA の 3' UTR に相補的に結合することで、標的とするタンパク質の発現を抑制し、細胞の増殖、分化や病態などの様々な現象に関与している。2004 年に初めて、ヒト・ヘルペスウイルスにマイクロ RNA をコードする領域が存在することが見出され、宿主細胞内での発現が確認された (Pfeffer S, et al. Science 2004)。マイクロ RNA サイズが非常に小さいことと一つのマイクロ RNA が複数の遺伝子を標的とし制御できることを考えると、ウイルスにとってマイクロ RNA は、感染した細胞をウイルス増殖に好ましい環境にする理想的道具であると思われる。SV40 がマイクロ RNA をコードしていることは 2005 年に初めて Sullivan らが Nature で報告した。ここでは、このマイクロ RNA、miR-S1 は SV40 ウイルスの T 抗原の遺伝子発現を抑制することで、感染細胞の細胞傷害性 T 細胞による攻撃を減少させると報告された。しかしながら、その後、このマイクロ RNA の機能に関する論文はひとつも見られない。また、他の DNA ウイルスのマイクロ RNA の機能についても十分に明らかにされてはいない。

## 2. 研究の目的

(1) SV40 ゲノムベクターをトランスフェクションした細胞内で、miR-S1 は本来の SV40 後期プロモーターで十分に発現し標的に対して抑制的な機能を果たすのか明らかにする。

(2) T 抗原あるいは SV40 ゲノムを細胞に導入することで NF- $\kappa$ B の経路が活性化され、炎症性サイトカインの産生・発現は起こるのか明らかにする。

(3) T 抗原あるいは SV40 ゲノム導入細胞における炎症性サイトカインの発現に関して、miR-S1 は何らかの影響を及ぼすのか。もし影響があるとすればどのような仕組みであるのかを明らかにする。

(4) 上記炎症性サイトカイン発現への関与以外の miR-S1 の機能的役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

上記の目的に対応した研究方法について以下で同番号のもとに記述する。

(1) SV40 ゲノムベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞からトータル RNA を採取し、この RNA をもとに TaqMan プローブを用いた qPCR により発現しているマイクロ RNA の定量化を行った。また、マイクロ RNA に対して相補的な配列をもつルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、これを SV40 ゲノムベクターとともにトランスフェクションしルシフェラーゼ活性を測定し抑制効

果を評価した。

(2) SV40 ゲノムベクターや T 抗原発現ベクターをピューロマイシン耐性遺伝子ベクターと共に HEK293 細胞にトランスフェクションし 8 時間後にピューロマイシンを含む培地に替え 60 時間培養しその後血清を含まない DMEM 培地あるいは 10ng/ml の TNF を含む DMEM 培地で 6 時間培養した。これら処置した細胞から採取した RNA をもとに、炎症性サイトカイン IL8、TNF、IL17F の発現を qPCR により定量化した。

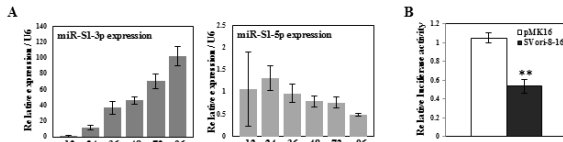
(3) miR-S1 の関与を検討するためにまず miR-S1 の発現が欠損する SV40 ゲノムベクターを作成した。この miR-S1 発現欠損 SV40 ゲノムベクターあるいは miR-S1 の発現がある SV40 ゲノムベクターをピューロマイシン耐性遺伝子ベクターとともに HEK293 細胞にトランスフェクションした。上記 (2) と同じように処置した後、炎症性サイトカイン IL8、TNF、IL17F の発現を qPCR により定量し、miR-S1 発現の有無による炎症性サイトカインの発現を比較検討した。さらに miR-S1 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、同様に炎症性サイトカイン IL8、TNF、IL17F の発現を qPCR により定量し miR-S1 の炎症性サイトカイン発現に対する直接的な作用を評価した。

(4) miR-S1 のウイルス DNA 複製への関与を調べるために、miR-S1 発現欠損 SV40 ゲノムベクターあるいは miR-S1 発現 SV40 ゲノムベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、これら細胞から DNA ならびに RNA を採取した。DNA は DpnI 処理したものと未処理のものに分け、それぞれにおいてウイルス DNA がどれくらい残存しているかを qPCR により定量化し、それをもとに複製割合を算出した。また、RNA からは T 抗原の発現量を qPCR により定量評価した。

## 4. 研究成果

### (1) SV40 ゲノムベクターからの機能的な miR-S1 の発現

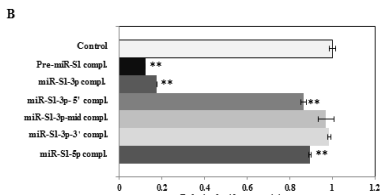
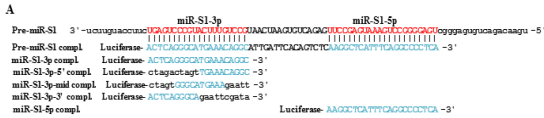
複製ドメインの欠損 SV40 ゲノムベクター SVori-8-16 を HEK293 細胞にトランスフェクションし、発現すると予測される miR-S1-3p と miR-S1-5p の発現を経時的に調べた。その結果、miR-S1-3p の発現は時間経過とともに増加していたが miR-S1-5p の発現では経時変化は見られなかった (図 1A)。次に、これら発現しているマイクロ RNA が機能的なものかどうかをレポーターアッセイにより調べた。SVori-8-16 ベクタートランスフェクションにより、miR-S1 と相補的配列をもつレポーターのルシフェラーゼ活性は有意に低下し (図 1B) SVori-8-16 から発現するマイクロ RNA が抑制効果を示すことが明らかになった。



**図1** マイクロRNAのゲノムベクターからの発現とその抑制効果

**(2) miR-S1の機能活性部位の同定**

miR-S1 が機能することが明らかになったので、miR-S1-5p と-3p のどちらが機能的であるのか、また通常のマイクロRNAのようにシード配列が抑制機能に重要なドメインかを明らかにする目的で、**図2A** で示すような様々な相補的配列をもつレポーターベクターを作成した。これらレポーターベクターとmiR-S1 発現ベクターをトランスフェクションしレポーター活性の抑制効果を評価した。その結果、miR-S1-3p 相補配列をもつレポーターはmiR-S1-5p 相補配列をもつレポーターに比べ活性が著しく抑制された(**図2B**)。また、miR-S1-3p のシード配列と相補的な配列を含むレポーターは有意に抑制されたが、その抑制は非常に小さく全長が相補的である場合の約1/9程度であった。以上のことからmiR-S1-3p がより機能的に働き、その抑制効果は全長が相補的な標的において著しいことが明らかになった。この点はmiR-S1-3p 作用がsiRNA作用に類似することを示している。

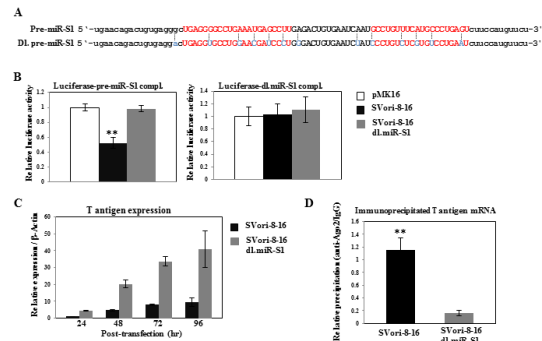


**図2** miR-S1の抑制活性を示す相補的配列

**(3) miR-S1発現の有無によるSV40のT抗原の発現に与える影響**

miR-S1 の発現が導入細胞に与える影響を調べるために、miR-S1 の発現が欠損するSV40ゲノムベクターを作成した。このベクターをレポーター遺伝子とともに導入した結果、抑制効果が見られず機能的マイクロRNAの発現を欠いていることが明らかになった(**図3A,B**)。次に、miR-S1 の発現有無によるSV40ベクターからのT抗原の発現量を調べた結果、miR-S1 の発現欠損SV40ゲノム(SVori-8-16)ベクターからのT抗原の発現は、miR-S1 の発現があるSV40ゲノムベクターからのT抗原の発現に比べ数倍増加していることが明らかになった(**図3C**)。これは、T抗原の相補

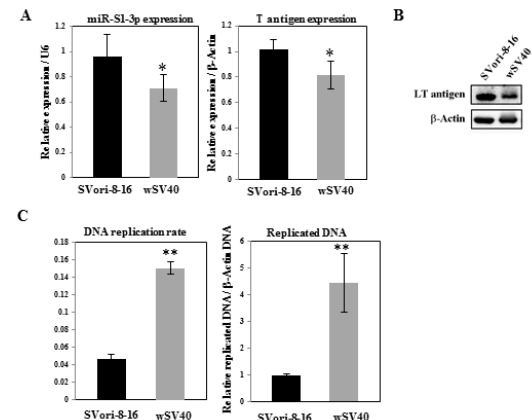
的DNAがmiR-S1をコードしているため、miR-S1がT抗原mRNAに相補的に結合しRISCによりT抗原mRNAを分解しているためと考えられている。そこでこのmiR-S1によるRISCのT抗原mRNAのトラップを確かめるために、抗Ago2抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、miR-S1を発現するSV40ゲノムベクターをトランスフェクションした細胞では、miR-S1発現欠損SV40ゲノムベクターをトランスフェクションした細胞に比べAgo2によりトラップされるT抗原mRNAが著しく増加していることが明らかになった(**図3D**)。この結果は、miR-S1の発現が欠損するとT抗原mRNAの分解が起こらずT抗原の発現量が多くなるとの考えを支持しており、miR-S1発現が欠損するSV40ベクターからのT抗原mRNA発現量が増加していることに矛盾しない。



**図3** miR-S1発現欠損のSV40ゲノムベクターからはT抗原発現が増加

**(4) 複製開始点を修復したSV40ゲノムベクターのT抗原やmiR-S1の発現特性**

miR-S1のSV40のDNA複製に与える影響を調べるために、SVori-8-16ベクターの複製開始点の修復をおこなった。この複製可能なSV40ゲノムベクター(wSV40)を導入した細胞内でのT抗原とmiR-S1の発現を、修復前のSVori-8-16導入細胞のそれと比較した結果、wSV40導入細胞におけるT抗原およびmiR-S1の発現はわずかではあるがSVori-8-16導入細胞内でのそれらの発現に比べ有意に減少していた(**図4A,B**)。



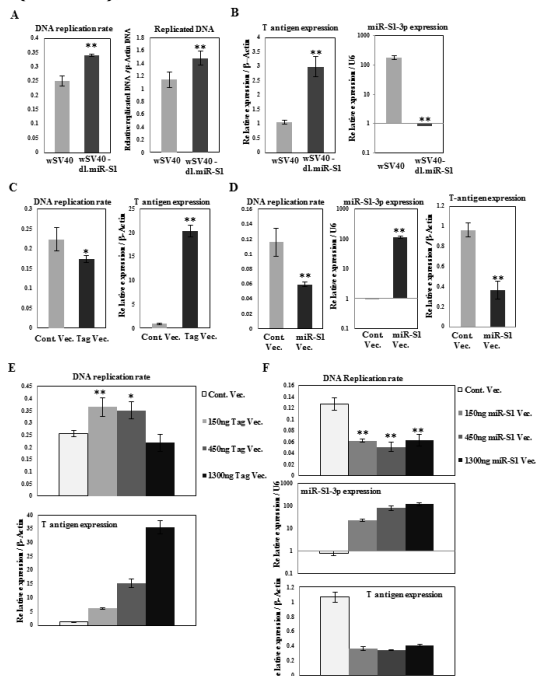
**図4** 複製能を回復前後のwSV40ゲノムベ

## クターの比較

一方、qPCRにより評価した複製割合(DNA replication rate)において、wSV40 導入細胞内での複製割合は SVori-8-16 導入細胞に比べ約3倍の増加がみられた(図4C)。

### (5) T 抗原発現増加により DNA 複製は増加するが、過剰発現は逆に DNA 複製を抑制する。

SV40 の DNA 複製における miR-S1 の役割を検討するために、wSV40 あるいは miR-S1 の発現が欠損する SV40 ゲノムベクター(wSV40-dl.miR-S1)を HEK293 細胞に導入し、SV40 ゲノム DNA の複製を qPCR により定量化した。その結果、miR-S1 発現欠損の SV40 ゲノムベクターにおいて有意に高い DNA 複製が見られた(図5A, B)。この結果は T 抗原が DNA 複製に関与することや wSV40-dl.miR-S1 導入細胞での T 抗原の発現量が多いことから、T 抗原の発現量の増加による複製の増加が考えられた。そこで、wSV40 ベクターとともに T 抗原発現ベクターをコトランスフェクションし、T 抗原発現量と DNA 複製との関係について調べた。その結果、予想に反して T 抗原の発現量が多い方が DNA 複製は低下していた(図5C)。



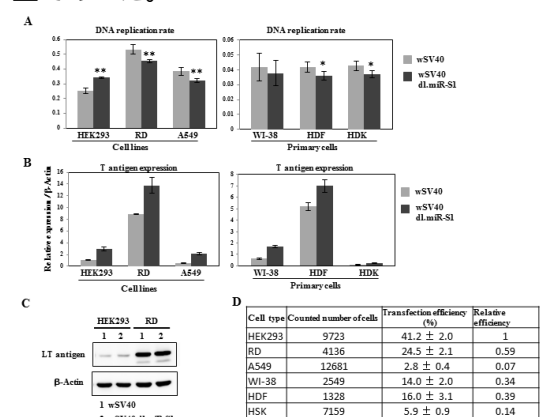
### 図5 miR-S1 発現の有無による DNA 複製に与える影響

そこで、次に miR-S1 の発現が DNA 複製を抑制しているかを wSV40 とともに miR-S1 発現ベクターをコトランスフェクションし miR-S1 発現の DNA 複製への影響を調べた。その結果、miR-S1 の発現は DNA 複製ならびに T 抗原量の発現量とともに低下させていた。この結果は、miR-S1 発現は T 抗原の発現低下を介して間接的に複製割合を減少させていると考えられた。そこで、T 抗原の発現量と複

製割合の相関を調べるために、wSV40 とともに T 抗原発現ベクターを 0ng, 150ng, 450ng, 1300ng 導入し複製割合を qPCR により評価した。その結果、T 抗原の発現量が増えると複製割合も増加するが、さらに T 抗原発現量が増えると逆に低下した(図5E)。同様な方法で、miR-S1 の発現量と複製割合の相関を調べたところ、miR-S1 の発現により T 抗原の発現量も複製割合も抑制されるが、miR-S1 発現量が異なる細胞間での T 抗原発現量や複製割合に違いは見られなかった(図5F)。

### (6) HEK293 細胞以外の細胞内では miR-S1 発現する wSV40 において複製割合が高い。

複製割合は T 抗原の発現量と密接な関係があることが明らかになった。一方、T 抗原の発現量は SV40 ゲノムの初期プロモーターの転写に関与する転写制御因子により異なると考えられるので、細胞によっても T 抗原の発現量は異なると考えられる。そこで、wSV40 あるいは wSV40-dl.miR-S1 を導入した様々な細胞において T 抗原の発現量と複製割合の関係について調べた。その結果、HEK293 細胞での結果とは異なり、調べた細胞種のすべてにおいて wSV40 導入細胞の方が有意に高い複製割合を示した(図6A)。しかしながら、T 抗原の発現量は HEK293 細胞と同様に wSV40-dl.miR-S1 導入細胞において有意に多かった(図6B)。そこで、T 抗原の発現量を細胞間で比較検討した。HEK293 細胞に比べ、RD 細胞や HDF 細胞においてはいずれのベクター導入細胞においても非常に多い T 抗原の発現量を示した(図6B, C)。しかしながら、残りの細胞においては HEK293 細胞とほぼ同じ程度あるいはより少ない T 抗原の発現量であった。



### 図6 様々な細胞における miR-S1 発現の有無の SV40 ゲノムベクター導入細胞の DNA 複製について

qPCR により測定した T 抗原の発現量は当然のことながら細胞間のトランスフェクションの導入効率の差も反映するので、各細胞種においてトランスフェクション効率を調べた。その結果、いずれの細胞においても

HEK293 細胞より低いトランスフェクション効率であった(図6D)。これらトランスフェクション効率を鑑みたT抗原の発現量を算出し比較したところ、いずれの細胞種においても、HEK293 細胞に比べ高いT抗原の発現量がみられた。したがって、これら細胞ではwSV40-dl.miR-S1 導入細胞において過剰なT抗原の発現があるため、効率的な複製が妨げられ低い複製割合を示したことが考えられる。

### (7) wSV40 あるいはwSV40-dl.miR-S1ベクター導入細胞における炎症性サイトカインの発現について

SV40 感染により炎症性サイトカインの発現などの免疫応答性がみられると考えられるが、その応答性における miR-S1 の役割をwSV40 あるいはwSV40-dl.miR-S1 導入したHEK293細胞において調べた。炎症性サイトカインとしてIL8、TNF、IL17Fを選び、その発現をqPCRにより評価した。その結果、wSV40 導入細胞に比べwSV40-dl.miR-S1 導入細胞において、TNF や IL17F の発現量が有意に高い値を示した(図7A)。

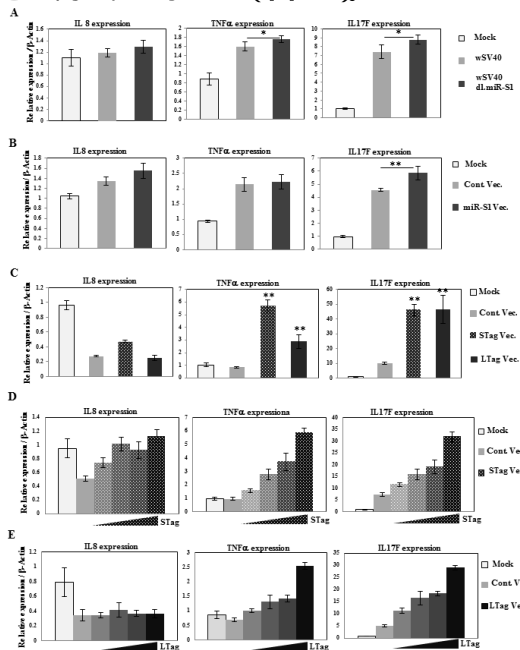


図7 miR-S1 発現有無のSV40ゲノムベクター発現が炎症性サイトカイン発現誘導に与える影響

この結果でみられるwSV40 導入細胞の方がTNF や IL17F の発現量が低いのは、miR-S1 による抑制作用の影響なのかを調べるために、miR-S1 発現ベクターを細胞に導入し炎症性サイトカインの発現量を評価した。その結果、miR-S1 によりIL17F の発現量は逆に増加し、IL8 や TNF の発現量に変化はみられなかった(図7B)。つぎにT抗原(small or large T antigen)の発現量の違いによる炎症性サイトカインの発現応答性について調べた。その結果、T抗原発現ベクターを導入した細胞

においてTNF とIL17Fの発現が有意に高くなった(図7C)。T抗原の発現がTNF やIL17Fの発現を誘導することが明らかになったので、次にT抗原の発現量と炎症性サイトカインの発現量との相関関係を、導入するT抗原発現ベクターの量を変え、それに対応したサイトカイン発現量を評価した。その結果、T抗原の発現が増加するとTNF やIL17Fの発現量も増加することが明らかになった(図7D,E)。以上の結果から、miR-S1はT抗原の発現を抑制することでTNF やIL17Fの発現応答性を低く抑えていると考えられた。

### (8) wSV40 あるいはwSV40-dl.miR-S1ベクター導入細胞のTNF存在下における炎症性サイトカイン発現応答性について

炎症状態におけるSV40感染細胞の細胞応答性を調べるために、SV40ゲノムベクター導入細胞のTNF存在下における炎症性サイトカインの応答性について調べた。TNF存在下では、IL17FのみがwSV40-dl.miR-S1導入細胞においてwSV40ベクター導入細胞より発現量が多かった(図8A)。これはやはりT抗原の発現量の違いを反映していることが、T抗原の発現量の増加によりIL17Fの発現量も増加することから示唆された(図8D,E)。TNF存在下では、T抗原やmiR-S1がIL8やTNFの発現に与える影響が非存在下に比べやや異なっていた。miR-S1の発現により、IL8の発現は有意に増加し、small T抗原の発現によりTNFの発現は有意に減少した(図8B,C)。しかしながら、large T抗原の発現ではTNFの発現に有意な変化はみられなかった(図8D,E)。

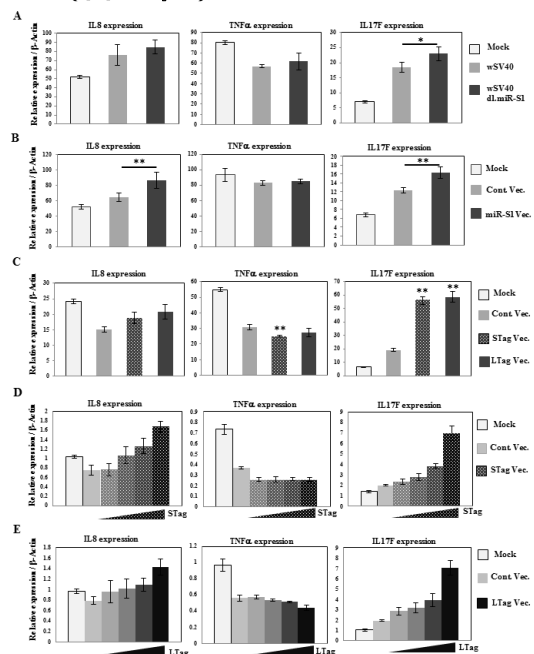


図8 TNFの存在下におけるmiR-S1発現有無SV40ゲノムベクターの発現が炎症性サイトカイン誘導に与える影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) SV40-miR-S1 の機能解析  
土方貴雄、岡山由紀子、高橋徹行  
日本薬学会第 136 年会、(平成 28 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜、横浜)
- 2) SV40 による細胞の不死化のメカニズム：SV40-miRS1 はテロメラーゼ発現を抑制する miR-1266 を隔離する  
岡山由紀子、高橋徹行、土方貴雄  
日本薬学会第 136 年会、(平成 28 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜、横浜)
- 3) SV40 ウイルスタンパク質による感染細胞の自然免疫応答の調節  
土方貴雄、高橋徹行  
日本薬学会第 137 年会、(平成 29 年 3 月 27 日、仙台国際センター、仙台)
- 4) SV40-miR-S1 の内因性テロメラーゼ発現に対する影響  
高橋徹行、岡山由紀子、土方貴雄  
日本薬学会第 137 年会、(平成 29 年 3 月 25 日、仙台国際センター、仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土方 貴雄 (HIJIKATA TAKAO)  
武蔵野大学・薬学研究所・教授  
研究者番号：70189786

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

高橋 徹行 (TAKAHASHI TETSUYUKI)  
武蔵野大学・薬学研究所・講師  
研究者番号：00403692

### (4) 研究協力者

( )