

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460076

研究課題名(和文) がんウイルス転写調節因子RTAによる免疫抑制サイトカインの制御機構

研究課題名(英文) KSHV K-RTA-mediated regulation of immunosuppressive cytokine

研究代表者

野口 耕司 (NOGUHI, Kohji)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授

研究者番号：80291136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、KSHVウイルスによる直接的な免疫抑制性サイトカインIL-10の発現誘導メカニズムの解明を目的とした。その結果、IL-10遺伝子プロモーター上でのK-RTA反応性のDNA領域が同定された。また、ここに結合すると報告されている他の転写因子がK-RTAと協調的にIL-10プロモーターの活性化を引き起こすことが初めて明らかになった。さらに、間接的な作用として、アセチル化因子による転写複合体がK-RTAのIL-10プロモーター活性化に関与する事が明らかになった。今後はこれらの転写因子とK-RTAとの機能的協調メカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated molecular mechanism involved in KSHV K-RTA-mediated regulation of IL-10. At the specific region on IL-10 gene promoter 256 base upstream from first ATG codon, we identified K-RTA-responsive region, and in addition, we found that some host cell factor(s) seemed to modulate K-RTA-mediated IL-10 promoter activation. We found when K-RTA was co-expressed with some transcriptional factor, synergistic activation of IL-10 promoter was induced, and interestingly, posttranslational modification including protein acetylation had some impact on K-RTA. For protein acetylation modification, there are many members of histone acetylase and deacetylase families known to regulate various transcriptional mechanism so that we would like to determine which molecules were involved in K-RTA-mediated IL-10 promoter activation.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ウイルス 転写因子 サイトカイン インターロイキン KSHV

1. 研究開始当初の背景

KSHV 関連疾患は健常人では稀であるが免疫低下患者でリスクが高いことが知られており、患者の免疫力、抵抗力の回復を誘導することは KSHV 関連疾患治療における本質的なアプローチのひとつと予想される。興味深い事に、KSHV のウイルスが増殖している病態においては、免疫反応に対する抑制性サイトカイン IL-10 の発現上昇が報告されている。従って、KSHV 関連疾患にはヒト免疫系の抗ウイルス活性を抑制するような未知のメカニズムが予想される。一方、KSHV に選択的な抗ウイルス薬は無く、また日和見感染症のカポジ肉腫やリンパ腫の治療においては、アントラサイクリン系薬物やビンクリスチンといった細胞毒性の高い抗がん剤が使用されており、患者の免疫力、抵抗力を損なうような抗がん治療も選択されている。このような患者の免疫力と抵抗力を低下させるような抗がん剤治療は、エイズ関連疾患の治療としては決して望ましいものではない。このような現状において、KSHV 関連疾患の異常性に着目した新しい分子標的治療法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

ヒトがんウイルス KSHV の関連疾患に対する新規分子標的の同定を目指して、本研究課題では、新しい着眼点として KSHV ウイルスによる免疫抑制性サイトカイン IL-10 の発現誘導メカニズムに注目している。研究代表者の未発表のオリジナルデータから、ウイルス分子 K-RTA が IL-10 の発現制御に関わる事が既に見出されており、このウイルス特異的な IL-10 制御メカニズムの解明を目的とする。KSHV 関連疾患は免疫低下患者にリスクが高く、このようなウイルス特異的免

疫抑制性メカニズムの解明が進めば、ウイルス疾患選択的な生体防御反応を回復させる新しい分子標的治療薬開発に大きく貢献すると期待される。

3. 研究の方法

本研究課題においては、KSHV ウイルスによる抑制性サイトカイン IL-10 の誘導機構の解明を目的とし、K-RTA によるヒト IL-10 遺伝子上流プロモーター制御の分子メカニズムの詳細を解析する。具体的には、IL-10 遺伝子プロモーター上での K-RTA 反応性の DNA 領域の決定を行い、K-RTA がどのような分子メカニズムでこの DNA 領域に結合するのかを解析する。また、KSHV 関連疾患における IL-10 発現と K-RTA の機能制御に対するエピジェネティック制御機構の解析まで進め、K-RTA による IL-10 遺伝子発現メカニズムを化学制御する化合物の探索まで試みる。

4. 研究成果

本研究課題では、KSHV ウイルスによる直接的な免疫抑制性サイトカイン IL-10 の発現誘導メカニズムの解明を目的とした。

(1)平成 26 年度には、IL-10 遺伝子プロモーター上での K-RTA 反応性の DNA 領域の決定を試みた結果、IL-10 の ORF 上流 256base の領域に K-RTA に応答する部位を見出した。一方、K-RTA は塩基配列特異的な DNA 結合蛋白質であるが、H26 年度に同定した IL-10 遺伝子プロモーター領域上には K-RTA の結合配列は認められなかった。そこで H27 年度には、K-RTA 反応領域 DNA に結合する介在蛋白質の存在を検証した。K-RTA に応答する IL-10 の ORF 上流 256base の領域には複数の他の転写因子の結合可能配列が存在するため、ミュートジェネシス法を利用してその領域内における K-RTA 反応性 DNA 配列を探索したところ、特定の転写因子が認識すると思われる配列が重要な役割を果たしていることが明らか

になった。

(2) H27-28年度には、この転写因子と K-RTA による IL-10 遺伝子プロモーターの活性化相乗効果を見出した。このことから、K-RTA とこの転写因子が機能的な相互作用を持っていることが示唆されたが、詳細な解析を行った結果、K-RTA とその因子との直接的物理的会合は明快には結論できなかった。そこで、第三の因子を介在とする間接的な相互作用の可能性を検討するため、K-RTA による IL-10 プロモーター活性化に影響を与える転写アクチベーターやリプレッサーの関与を探索した結果、K-RTA はアセチル化されていること、HAT である p300 や HDAC 阻害剤が K-RTA の転写活性を増強することが判明した。以上のことから、アセチル化因子による転写複合体が K-RTA の IL-10 プロモーター活性化に関与する事が明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

- ① Noguchi K. Novel Mechanisms of Resistance to Investigational Molecularly Targeted Drugs. *Yakugaku Zasshi*. (査読あり)
Vol 137, 2017, 151-160.
doi: 10.1248/yakushi.16-00229-6.
Noguchi K., Mashima T. Pharmaceutical Sciences Advancing Molecular Cancer Therapeutics ~ To Improve Rationale and Effectiveness of Molecularly Targeted Drugs ~. *Yakugaku Zasshi*. (査読あり)
Vol 137, 2017, 127-128.
doi: 10.1248/yakushi.16-00229-F.
- ③ Noguchi K., Hongama K, Hariki S, Nonomiya Y, Katayama K, Sugimoto Y. Functional effects of AKT3 on Aurora kinase inhibitor-induced aneuploidy. *Journal of Biological Chemistry*. (査読あり)
Vol 292, 2017, 1910-1924.

doi: 10.1074/jbc.M116.747048.

- ④ Katayama K., Fujiwara C, Noguchi K., Sugimoto Y. RSK1 protects P-glycoprotein/ABCB1 against ubiquitin-proteasomal degradation by downregulating the ubiquitin conjugating enzyme E2 R1. *Scientific Reports*. (査読あり)
Vol 6, 2016, 36134.
doi: 10.1038/srep36134.
- ⑤ Nonomiya Y, Noguchi K., Tanaka N, Kasagaki T, Katayama K, Sugimoto Y. Effect of AKT3 expression on MYC- and caspase-8-dependent apoptosis caused by polo-like kinase inhibitors in HCT 116 cells. *Cancer Science*. (査読あり)
Vol 107, 2016, 1877-1887.
doi: 10.1111/cas.13093.
- ⑥ Kondo S, Hongama K, Hanaya K, Yoshida R, Kawanobe T, Katayama K, Noguchi K., Sugimoto Y. Upregulation of cellular glutathione levels in human ABCB5- and murine Abcb5-transfected cells. *BMC Pharmacology and Toxicology*. (査読あり)
Vol 16, 2015, 37.
doi: 10.1186/s40360-015-0038-5.
- ⑦ Katayama K., Noguchi K., Sugimoto Y. Regulations of P-glycoprotein/ABCB1/MDR1 in human cancer cells. *New Journal of Science*. (査読あり)
Vol 2014, 2014, 476974.
Noguchi K., Katayama K, Sugimoto Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. (査読あり)
Vol 7, 2014, 53-64.
doi: 10.2147/PGPM.S38295.
Katayama K., Yamaguchi M, Noguchi K., Sugimoto Y. Protein phosphatase complex PP5/PPP2R3C dephosphorylates P-glycoprotein/ABCB1 and down-regulates the expression and function. *Cancer Letters*. (査読あり)
Vol 345, 2014, 124-131.
doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.007.

[学会発表](計50件)

宮澤雅典, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV RTA の IL-10 プロモーター活性化における Sp3 結合領域の役割.

日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 東北大学 (宮城県・仙台市) 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. HSP90 阻害薬は quizartinib 耐性細胞の増殖を抑制する.

日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 東北大学 (宮城県・仙台市) 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PKC α は Pim-1L の発現を制御する.

日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 東北大学 (宮城県・仙台市) 徳永未来, 加藤優, 杉本芳一, 片山和浩, 野口耕司. 上皮間葉転換に伴って誘導される side population 細胞の性状解析.

日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 東北大学 (宮城県・仙台市) 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. PLK 阻害薬に対する薬剤感受性規定因子の探索.

日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 東北大学 (宮城県・仙台市) 近高木佳奈, 近藤慎吾, 杉本芳一, 片山和浩, 野口耕司. ABCB5 発現細胞における基質化合物の輸送及びメタボローム解析.

日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 東北大学 (宮城県・仙台市) 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. AKT-Myc シグナルは, PLK 阻害剤耐性に関与する.

第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤耐性細胞に於いて, Akt3 は細胞分裂に関する KIF23 を制御する.

第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. RSK は UBE2R1 の自己ユビキチン化を誘導し, P-糖タンパク質の分解を抑制する.

第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PKC α による Pim-1L-Ser65 のリン酸化の機能解析.

第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

宮澤雅典, 野口耕司, 片山和浩, 杉本

芳一. RTA による IL-10 プロモーター活性化に働く協調分子の同定.

第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016 年 9 月 17 日, 東京大学 (東京都・文京区) 伊藤賢司, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. FLT3-ITD の D835 変異による quizartinib 耐性.

第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016 年 9 月 17 日, 東京大学 (東京都・文京区) 針木志織, 本釜圭太, 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Akt は Aurora kinase 阻害剤による細胞の巨核化を抑制する.

第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016 年 9 月 17 日, 東京大学 (東京都・文京区) 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-糖タンパク質による抗がん剤耐性に対する新規治療標的としての RSK の可能性.

第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016 年 5 月 31 日, 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤が誘導する細胞分裂不全に対する Akt3 の作用.

第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016 年 5 月 31 日, 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

石塚周平, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. BET 阻害剤に対する耐性メカニズムの検討.

日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 宮澤雅典, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV RTA による interleukin-10 プロモーターの活性化.

日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 近藤慎吾, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 はグルタチオン合成阻害薬の効果を低下させる.

日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. RSK1 によるユビキチン連結酵素 UBE2R1 のリン酸化と抗がん剤耐性.

日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PKC α による Pim-1L の制御.

日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

②1 野口耕司. 新規がん分子標的薬に対する耐性メカニズムの解明.

日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

②2 Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. RSK1

- regulates a ubiquitin-conjugating enzyme E2 R1 that is associated with multidrug resistance in cancer cells. Tenth AACR-JCA Joint Conference, "Breakthroughs in Cancer Research: From Basic to Therapeutics", 2016/2/16, Maui, HI, USA.
- ②③ Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. AKT3 expression modulates chemosensitivity to aurora kinase inhibitors. AACR-NCI-EORTC International Conference, Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2015/11/07, Boston, MA, USA.
- ②④ 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. RSK は P-糖タンパク質 / ABCB1 のユビキチン化酵素 UBE2R1 をリン酸化する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 10 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ②⑤ 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤感受性に及ぼす AKT3 の効果. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ②⑥ 近藤慎吾, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 遺伝子導入細胞の BSO 耐性機構. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ②⑦ 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-glycoprotein の発現を制御する FLT3/Pim-1 シグナル経路における protein kinase C の役割. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ②⑧ 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Plk 阻害剤耐性細胞における細胞死メカニズムの変化. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ②⑨ 氣谷晋太郎, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. BCRP による抗がん剤耐性に対する 2 量体フラボノイドの効果. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ③⑩ 近藤慎吾, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 は細胞内グルタチオンを変動させる. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 日本大学 (千葉県・習志野市)
- ③⑪ 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Polo-like kinase 阻害剤耐性細胞における耐性形質の解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 日本大学 (千葉県・習志野市)
- ③⑫ 本釜圭太, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. AKT3 は Aurora kinase 阻害剤に対する抵抗性を付与する. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 日本大学 (千葉県・習志野市)
- ③⑬ 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PKC 阻害剤は P-gp 発現を低下させる. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 日本大学 (千葉県・習志野市)
- ③⑭ 石塚周平, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Bromodomain-containing protein 4 阻害剤の耐性形質の解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 日本大学 (千葉県・習志野市)
- ③⑮ 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤に対する薬剤感受性規定因子の探索. 第 19 回日本がん分子標的治療学会, 2015 年 6 月 12 日, 松山全日空ホテル (愛媛県・松山市)
- ③⑯ 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-糖タンパク質 / ABCB1 のプロテアソーム分解における RSK の関与. 第 19 回日本がん分子標的治療学会, 2015 年 6 月 11 日, 松山全日空ホテル (愛媛県・松山市)
- ③⑰ 本釜圭太, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤耐性細胞の解析. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- ③⑱ 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 由来 RTA に応答するヒト IL-10 遺伝子プロモーター領域の解析. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 27 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- ③⑲ 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. MAPK 系による P-糖蛋白質 / ABCB1 の分解制御. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 27 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- ④⑰ 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. FLT3/Pim-1 系路による P-gp の発現調節. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- ④⑱ 加藤優, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. EMT に伴って誘導された SP 細胞の性質の検討. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- ④⑳ 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV 由来 RTA/ORF50 による IL-10 プロモーター活性化.

- 第 62 回日本ウイルス学会学術集会,
2014 年 11 月 11 日, パシフィコ横浜
(神奈川県・横浜市)
- ④③ 加藤優, 石川宣明, 片山和浩, 野口耕
司, 杉本芳一. ヒト結腸がん細胞の
上皮間葉転換による抗がん剤感受性
の変動.
第 58 回日本薬学会関東支部大会,
2014 年 10 月 4 日, 昭和薬科大学 (東
京都・町田市)
- ④④ 本釜圭太, 野口耕司, 片山和浩, 杉本
芳一. Aurora kinase 阻害剤効果予測
因子の探索.
第 58 回日本薬学会関東支部大会,
2014 年 10 月 4 日, 昭和薬科大学 (東
京都・町田市)
- ④⑤ 笠垣貴大, 田中伯享, 野口耕司, 片山
和浩, 杉本芳一. caspase-8 の siRNA の
導入が Polo like kinase 阻害剤の効果
に与える影響.
第 58 回日本薬学会関東支部大会,
2014 年 10 月 4 日, 昭和薬科大学 (東
京都・町田市)
- ④⑥ 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉
本芳一. Polo-like kinase 阻害剤耐性因
子の探索.
第 58 回日本薬学会関東支部大会,
2014 年 10 月 4 日, 昭和薬科大学 (東
京都・町田市)
- ④⑦ 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. プロ
テアソーム阻害剤は MEK 阻害による
P-glycoprotein/ ABCB1 の発現低下を抑制する.
第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9
月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)
- ④⑧ 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. PLK
阻害剤耐性細胞の樹立と耐性形質の
解析.
第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9
月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)
- ④⑨ 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. MEK
阻害剤による P-糖タンパク質 /
ABCB1 の発現低下におけるプロテア
ソーム分解の関与.
第 18 回日本がん分子標的治療学会,
2014 年 6 月 26 日, 仙台市情報・産業
プラザ (宮城県・仙台市)
- ⑤⑩ 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一.
Polo-like kinase 阻害剤に対する薬剤
感受性規定因子の探索.
第 18 回日本がん分子標的治療学会,
2014 年 6 月 26 日, 仙台市情報・産業
プラザ (宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし

取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ:
<https://www.youtube.com/watch?v=AgmSFTnZHo4&t>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口耕司 (NOGUCHI Kohji)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80291136

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし