

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670222

研究課題名(和文) ストレス顆粒によるウイルス感染防御機構

研究課題名(英文) Regulation of antiviral innate immunity by stress granules

研究代表者

藤井 雅寛 (Fujii, Masahiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30183099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：USP10はストレス顆粒のコンポーネントである。我々はUSP10欠損マウスを樹立した。USP10欠損マウスは骨髄不全による重度の貧血を発症した。その際、USP10はサイトカイン除去によって誘導される造血幹細胞のアポトーシスを抑制し、造血幹細胞の生存・維持ならびに胎児および成人の血液系細胞の分化・維持に必須の役割を果たした。USP10の造血幹細胞に対する活性とストレス顆粒の形成能との関連は示されなかった。以上の結果は、USP10が造血幹細胞の生存と維持を促進することによってウイルス免疫に関与することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：USP10 is a component of stress granules. We established systemic USP10-knockout (KO) mice. USP10-KO mice developed bone marrow failure and severe anemia. Bone marrow failure in these USP10-KO mice was associated with reductions of hematopoietic stem cells (HSCs). Such USP10-KO HSCs exhibited enhanced apoptosis. These results suggest that USP10 is essential for hematopoiesis and functions by inhibiting apoptosis of HSCs, thereby regulating anti-viral immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：stress granules HTLV-1 Tax USP10 G3BP1

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレス顆粒はウイルス感染によって一過性に形成される RNA を含む複合体であり、インターフェロン産生を含む多様な抗ウイルス作用に重要な役割を果たしている。研究代表者は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の癌蛋白 Tax に結合する宿主因子として USP10 を同定した。USP10 はストレス顆粒に局在し、酸化ストレスによる活性酸素の産生と活性酸素に依存したアポトーシスを抑制した。一方で、Tax は USP10 と結合することによってストレス顆粒の形成を抑制し、活性酸素の産生を上昇させ、HTLV-1 感染細胞にアポトーシスを誘導した。また、申請者らは、ストレス顆粒の形成に G3BP1 と G3BP2 が必須の役割を果たすことを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、USP10、G3BP1、G3BP2 およびストレス顆粒の抗 HTLV-1 活性を明らかにするために、以下を明らかにする。

(1) USP10 のノックアウトマウスを作成し、USP10 の生体内における機能を明らかにする。

(2) Tax による T 細胞の異常増殖における USP10 の役割を明らかにする。

(3) G3BP1 および G3BP2 のノックアウトマウスを作製し、G3BP1 と G3BP2 の生体内機能を明らかにする。

(4) ストレス顆粒の形成における USP10 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) USP10 のノックアウトマウスを作成し、その表現系を解析した。

(2) HTLV-1 の Tax は T 細胞株 CTLL-2 を IL-2 依存性増殖から IL-2 非依存性増殖へトランスフォームする。USP10 と結合できない Tax 変異体を用いて CTLL-2 に対するトランスフォーム活性を定量した。

(3) G3BP1 および G3BP2 のノックアウトマウスの作製を進めた。

(4) USP10 のノックダウン (ノックアウト) 細胞および USP10 の過剰発現細胞を用いてストレス顆粒の形成能を定量した。

4. 研究成果

(1) USP10 欠損マウスでは造血幹細胞が著減する。CRE レコンビナーゼにより、USP10 のエクソン 3 を欠損できる誘導性の USP10 改変マウスを樹立した (図 1)。このマウスを TLCN-Cre マウスと交配し、全身性の USP10 欠損マウスを樹立した (図 2)。このマウスが

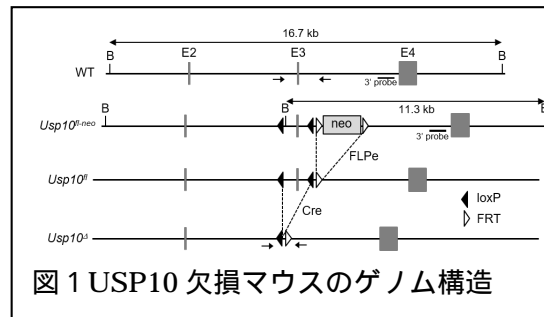


図 1 USP10 欠損マウスのゲノム構造

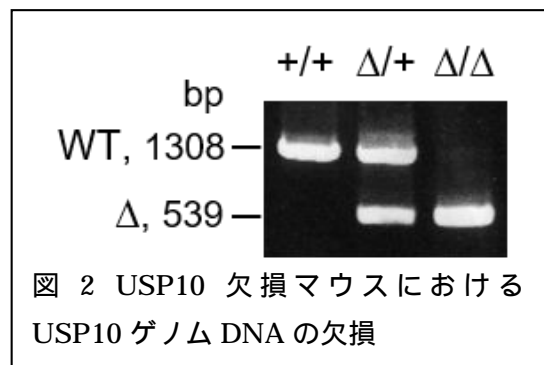


図 2 USP10 欠損マウスにおける USP10 ゲノム DNA の欠損

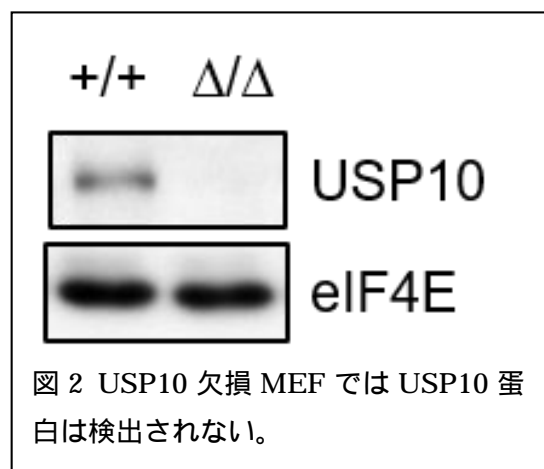


図 2 USP10 欠損 MEF では USP10 蛋白は検出されない。

ら繊維芽細胞株 (MEF) を樹立し、USP10 蛋白の発現を確認した。USP10 欠損 MEF における USP10 蛋白の発現は、2 種類の USP10 抗体によって検出されなかった (図 3)。この USP10 欠損マウスは期待される割合で生まれたが、1 日以内にすべてのマウスが死亡した。すなわち、USP10 はマウスの生後直後の生存に深く関与する遺伝子であることが示された。そこで、生後直後の致死性を回避するために、系統の異なる USP10 ヘテロ欠損マウス (BALB/c, B6) を交配し、USP10 欠損 F2 ハイブリッドマウスを樹立した。この USP10 欠損 F2 ハイブリッドマウスは生後 4 週でも生存した。ただし、その生存率 (WT:HET:KO=56:148:35) は野生型マウスよりも低かった。これらの USP10 欠損マウスは、生後直後は野生型マウスとほとんど変わらなかったが、生後 2 週頃から様々な異常を示した。USP10 欠損マウスは野生型マウスよりも低体重であった。生後 5 週頃から USP10 欠損マウスの中から死亡するマウスが現れた。

また、すべての USP10 欠損マウスが 300 日以内に死亡した。このような早期死亡は USP10 ヘテロ欠損マウスでは観察されなかった。注目すべきことには、死亡直前の USP10 欠損マウスはいずれも貧血であった。病理学的解析から、USP10 欠損マウスの骨髄では生細胞が著減し、その代わりに脂肪組織が増え、骨髄不全の状態であった。加えて、USP10 欠損マウスでは高頻度に脳出血と小脳出血が観察された。下記に示すように、USP10 欠損マウスは造血不全であることから、これらの脳出血も血小板の減少に起因すると考えられた。

次に、骨髄、脾臓ならびに胸腺における白血球数を継時的に定量した。8 週と 16 週齢の USP10 欠損マウスでは骨髄、脾臓および胸腺の白血球数が野生型マウスに比べて著明に減少していた。その際、骨髄では B 細胞、マクロファージおよび好中球数が減少し、脾臓では B 細胞、T 細胞およびマクロファージが減少していた。次に、造血幹細胞(HSC)数を検討した。8 週齢の USP10 欠損マウスの骨髄では、LK(Lin- c-Kit+) LSK(Lin- Sca-1+ c-Kit+ 細胞および Long Term(LT)-HSCs (LSK CD150+ CD48-、長期造血幹細胞)を含む未熟な造血細胞が著しく減少していた。造血幹細胞の減少は胎生 14.5 日の胎児肝で既に始まっていた。USP10 欠損マウスの胎児肝臓を調べたところ、USP10 を欠損すると、造血幹細胞のアポトーシスが昂進することが示された。造血幹細胞による活性酸素(ROS)の過剰産生が造血幹細胞数の減少に関与することが知られている。USP10 欠損胎児肝における造血幹細胞の減少は ROS の産生量には依存していなかった。

造血幹細胞の機能を調べるために、胎児肝細胞を造血幹細胞用の造血因子(SCF, TPO, FLT3-ligand, IL-3, and IL-6)の存在下で培養した。USP10 欠損細胞も野生型細胞と同様に増殖した。また、USP10 欠損細胞の造血コロニー形成能も野生型細胞と同レベルであった。しかしながら、造血幹細胞造血因子の量を低下させると、USP10 欠損細胞は野生型細胞よりも強いアポトーシスを示した。従って、造血幹細胞のアポトーシス昂進が USP10 欠損マウスにおける造血不全の原因であると結論した。この USP10 欠損造血幹細胞に USP10 遺伝子を導入し、アポトーシスの抑制に関与する USP10 の機能領域を解析した。USP10 の脱ユビキチン化活性がアポトーシスの抑制に必須であることが示唆された。一方で、ストレス顆粒への局在および G3BP1 と PABP1 との結合領域は USP10 によるアポトーシスの抑制には必須ではなかった。

USP10 欠損マウスにおける造血幹細胞数の減少が造血幹細胞自体の異常なのか、ニッチ側の問題なのかを検査するために、細胞の移植実験をおこなった。USP10 欠損マウスの胎児肝細胞を野生型マウスに移植しても白血球数などの造血は回復しなかった。一方、

野生型マウスの骨髄細胞を USP10 欠損マウスに移植すると、白血球数を含む造血が回復した。これらのことから、USP10 欠損マウスでは、造血幹細胞自体に機能異常があることが示された。

USP10 欠損造血幹細胞を用いて、グルコース除去によって誘導されるストレス顆粒の形成能を定量した。USP10 欠損はストレス顆粒の形成をむしろ少し増強した。従って、ストレス顆粒の形成能は USP10 欠損造血幹細胞のアポトーシスの昂進には関与しないと結論した。

USP10 欠損マウスの表現系については、我々のマウスが最初の報告である。USP10 が造血幹細胞の生存・維持に必須の役割を果たすことが明らかになったことは、自然免疫における USP10 の機能の点から重要な成果である。USP10 の脱ユビキチン化酵素活性が造血幹細胞のアポトーシスの抑制に関与することが示唆された。今後、標的となる USP10 の基質蛋白の同定が重要な課題である。

(2)HTLV-1 の Tax は T 細胞株 CTLL-2 を IL-2 依存性増殖から IL-2 非依存性増殖へトランスフォームする。USP10 に結合できない Tax 遺伝子は CTLL-2 をトランスフォームし、その活性は野生型 Tax と同等であった。従って、USP10 との結合は Tax による CTLL-2 のトランスフォーム活性には不要であることが示された。

(3)G3BP1 欠損マウスおよび G3BP2 欠損マウスの作製を進めている。これらのマウスを解析することにより、ストレス顆粒、G3BP1 および G3BP2 の自然免疫における役割が明らかになることが期待できる。

(4)ストレス顆粒の形成能が USP10 をノックダウンすると低下し、USP10 を過剰発現すると低下した。従って、USP10 は、ストレス顆粒形成に対して正と負の両方の作用を持つことが示された。

(5)USP10 の変異体を用いて、ストレス顆粒形成の抑制に働く USP10 の機能領域を検討した。USP10 の N 末端領域がストレス顆粒形成の抑制に関与することが示された。この USP10 の N 末端領域には G3BP1 との結合領域が存在することから、USP10 は、G3BP1 との結合を介して、ストレス顆粒の形成を抑制することが示唆された。

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 9 件)

Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M. Induction of Cell

Death in Growing Human T-Cells and Cell Survival in Resting Cells in Response to the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax. *PLoS One*, 11(2):e0148217, (2016). 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0148217

Motai Y, Takahashi M, Takachi T, Higuchi M, Hara T, Aoyagi Y, Terai S, Tanaka Y, Fujii M.

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. *Virus Genes*, 52(1): 4-13, 2016. 査読有
DOI:10.1007/s11262-015-1277-7

Maeda N, Ohashi T, Chagan-Yasutan H, Hattori T, Takahashi Y, Harigae H, Hasegawa H, Yamada Y, Fujii M, Maenaka K, Uede T. Osteopontin-integrin interaction as a novel molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia. *Retrovirology*, 12:99, (2015) 査読有
DOI:10.1186/s12977-015-0225-x

Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K.

Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF- κ B pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATL and other cancer development. *Sci Rep*, 5:12841, (2015) 査読有

DOI:10.1038/srep12841

Shigemura T, Shiohara M, Kato M, Furuta S, Kaneda K, Morishita K, Hasegawa H, Fujii M, Gorlach A, Koike K, Kamata T.

Superoxide-Generating Nox5 Is Functionally Required for the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Induced Cell Transformation Phenotype. *J Virol*, 89(17):9080-9089, (2015) 査読有

DOI:10.1128/JVI.00983-15

Hara T, Mizuguchi M, Fujii M, Nakamura M. Kruppel-like factor 2 represses transcription of the telomerase catalytic subunit hTERT in human T cells. *J Biol Chem*, 90(14):8758-8763, (2015). 査読有

DOI:10.1074/jbc.M114.610386

Saito S, Kawamura T, Higuchi M, Kobayashi T, Yoshita-Takahashi M, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Kanda

Y, Kawamura H, Jiang S, Naito M, Yoshizaki T, Takahashi M, Fujii M. RASAL3, a novel hematopoietic RasGAP protein, regulates the number and functions of NKT cells. *Eur J Immunol*, 45(5):1512-1523, (2015). 査読有
DOI:10.1002/eji.201444977

Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green PL, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. *Cancer Sci*, 106(4):461-465, (2015). 査読有
DOI:10.1111/cas.12618

Higuchi M, Takahashi M, Tanaka Y, Fujii M. Downregulation of proapoptotic Bim augments IL-2-independent T-cell transformation by human T-cell leukemia virus type-1 Tax. *Cancer Med*, 3(6):1605-1614, (2014). 査読有
DOI:10.1002/cam4.329

〔学会発表〕(計 7 件)

Masahiro Fujii, Yosuke Motai, Masaya Higuchi, Toshifumi Hara, Masahiko Takahashi. HTLV-1 Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年、11 月 22-24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Masaya Higuchi, Hiroki Kawamura, Toshifumi Hara, Masahiko Takahashi, Masahiro Fujii. Ubiquitin Specific Protease 10 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16-18 日、ホテル日航金沢(石川県金沢市)

Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K. Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF- κ B pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATLL development. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 - 10 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

藤井雅寛、罇陽介、原敏文、高橋雅彦。HTLV-1 の Tax1 は HTLV-2 の Tax2 とは異なる細胞遺伝子の発現を NF- κ B を介して誘導する、第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2015 年 8 月 22 - 23 日、東京大学医科学研究所(東京都港区)

齋藤卓、樋口雅也、藤井雅寛、新規 RasGAP 蛋白 RASAL3 の生体内機能解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
水口真理子、樋口雅也、藤井雅寛、中村正孝、HTLV-1 Tax による細胞周期依存的な遺伝子発現の解析、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）
藤井雅寛、高橋真奈美、原敏文、樋口雅也、高橋雅彦、USP10 はボルテゾミブによる ATL 細胞のアポトーシスを抑制する、第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2014 年 8 月 22 日～2014 年 8 月 24 日、東京大学医科学研究所（東京都港区）

研究者番号：

(4) 研究協力者

樋口 雅也 (HIGUCHI, Masaya)

高橋 雅彦 (TAKAHASHI, Masahiko)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/vir/welcome.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 雅寛 (FUJII, Masahiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30183099

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()