

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870367

研究課題名(和文) 多能性幹細胞を用いたヒト内在性レトロウイルスの定量的評価系確立と疾患解析への展開

研究課題名(英文) Establishment of a quantitative evaluation system for human endogenous retrovirus using pluripotent stem cells and application for analyzing diseases

研究代表者

青井 三千代(小柳)(AOI(KOYANAGI), MICHIO)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：90432327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞への分化時に未分化細胞が一部残存する分化抵抗性のヒトES/iPS細胞株で高発現しているヒト内在性レトロウイルス(HERV)関連遺伝子Aについて、様々ながん細胞株における発現を調べたところ、胃、大腸がん細胞株の約半数で発現が認められた。遺伝子AのLTR7プロモーターの下流でGFPが発現するコンストラクトを作成し、特定のがん細胞株における発現細胞の割合を調べたところ、数%の陽性細胞が観察された。今後は各がん細胞株における遺伝子AのLTR7部分の配列の違いを比較することによって、HERV-H関連遺伝子の発現制御機構の一端を明らかにすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In various cancer cell lines, we examined the expression of HERV (human endogenous retrovirus)-H related gene A, which is highly expressed in some human ES / iPS cell lines which retained a significant number of undifferentiated cells even after neural differentiation culture and formed teratoma when transplanted into mouse brains. As a result, expressions were observed in half of stomach and colon cancer cell lines. We created a reporter construct expressing GFP downstream of the LTR7 promoter of gene A and examined the proportion of GFP positive cells. Some GFP-positive cells were observed, but there was a problem. Comparison of the LTR7 sequences of cancer cell lines will clarify a part of the expression control mechanism of HERV-H related genes.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒト内在性レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノム中に存在する内在性レトロウイルス (HERV)

ヒト内在性レトロウイルス (Human Endogenous Retrovirus, HERV) は遠い過去に外来性のレトロウイルスが生殖細胞に感染したことを起源とし、ヒトゲノムの約 8% をも占めていると言われている (Boeke and Stoye, Cold Spring Harbor (NY), 1997; Lander et al, Nature, 2001; Stoye, Nat Rev Microbiol, 2012)。ERV は元来、プロモーターとして機能する LTR に挟まれた領域が gag, pol, env などのタンパク質をコードしている (5'LTR-gag-pro-pol-env-3'LTR) 構造を持つ。胎盤や生殖細胞などでは特定の内在性レトロウイルスが活性化しており重要な機能を担っているとされる (Sin et al, Arch Virol, 2006; Yi et al, Cancer Lett, 2006) が、これら以外の細胞ではほとんどの ERV は進化の過程での部分的な欠失や変異の蓄積により、感染性もその他の機能も有しておらず不活性化状態にある (Seifarth et al, J Virol, 2005)。

(2) 分化抵抗性 iPS 細胞株における内在性レトロウイルスの活性化

研究代表者は、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 10 株とヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 40 株からの神経細胞への分化誘導実験を行った。その結果、7 株のヒト iPS 細胞では分化誘導後も未分化細胞を残存し、マウスの脳への移植後に未分化腫瘍を形成することが分かった。これらの分化抵抗性 iPS 細胞株と、それ以外の iPS 細胞の遺伝子発現およびゲノム DNA メチル化の網羅的解析を行ったところ、分化抵抗性 iPS 細胞株においては未分化状態でヒト内在性レトロウイルス HERV-H の一部の LTR7 配列の DNA メチル化が外れ、活性化していることを見だし、報告した。 (Koyanagi-Aoi M et al, "Differentiation defective phenotypes revealed by large scale analyses of human pluripotent stem cells" Proc Natl Acad Sci U S A, 2013) このことから、HERV の活性化は、iPS 細胞のような培養細胞のみならず、実際にヒト体内に存在する細胞においても、その病的状態と関連している可能性があるとの仮説をたてた。

(3) 疾患と内在性レトロウイルスに関する過去の知見

実際、HERV やそれに由来する LTR の発現がいくつかの疾患でみられたとの報告が散見される。例えば、ある種の癌細胞や癌細胞株で HERV のいくつかのエレメントが発現しているとの報告 (Sin et al, Genes Genet Syst, 2006; Wentzensen et al, Int J Cancer, 2007) や、多発性硬化症患者の多くにおいて HERV が活性化しているとの報告 (Christensen et al, Acta Neurol Scand, 2000)、HERV のエンベローム蛋白が免疫抑制に働くとの報告

(Mangeny et al, J Gen Virol, 2001) などである。ただし、これらの報告のいずれにおいても、HERV が病態形成といかに関連しているかについては明らかにされていない。最近では、HERV の機能そのものよりもむしろ、その LTR が近隣の遺伝子のプロモーターあるいはエンハンサーとして振舞うという現象についての報告がより多くなされている (Cohen et al, Gene, 2009; Sin et al, Genes Genet Syst 2006)。

(4) 内在性レトロウイルスに評価系の問題点：網羅的評価法は未確立

しかし、上記報告はいずれも特定の部位に存在する HERV やそのエレメントについて、特定の疾患や細胞を対象として調べたものであり、HERV に関するゲノムワイドな網羅的評価方法は未だ確立されていない。この理由は、HERV はゲノムの中に大量に挿入されているが、ほとんどが遺伝子座から離れて存在するかイントロンに挿入されているため直接的な影響が見難いことや、ゲノム上の多数の HERV の配列は完全には一致しないものの非常に類似し、かつ反復しているため、転写活性化状態にある HERV の存在部位の特定が難しいこと、などにある。これらの問題を解決し、HERV の網羅的かつ定量的な評価系が新たに確立するならば、それを用いて様々な疾患を系統的に調べることで、種々の病態と HERV の関連についての多くの知見が得られるものと考えられる。

2. 研究の目的

ヒトゲノム中には内在性レトロウイルス (HERV) が多数存在しており、その多くは通常は不活性化状態にある。いくつかの疾患において、HERV の活性がみられることが報告されているものの、病態との関連についての系統的な理解は未だなされていない。その理由は、HERV に関する網羅的評価方法の確立がなされていないことにある。

本研究では、HERV 活性化状態の網羅的かつ定量的な評価系を確立し、様々な疾患 (特にがん) における HERV の系統的検討への展開をめざす。これにより、HERV を中心とした新たな病態理解が生まれ、これに基づいて疾患の新規診断マーカーや新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

まず、複数のがん細胞株における HERV-H 関連遺伝子群の発現を半定量 PCR で調べる。Positive control として、HERV-H 関連遺伝子群が高発現している胚性腫瘍細胞株 2102Ep と神経細胞へ分化させた際に未分化細胞が一部残るヒト iPS 細胞株 108-4f3 株を用いる。

がん細胞株において、HERV-H 関連遺伝

子 A が発現している細胞の割合とその性質を調べるために LTR7 プロモーターの下流に GFP をつないだレポーターコンストラクトを作成する。

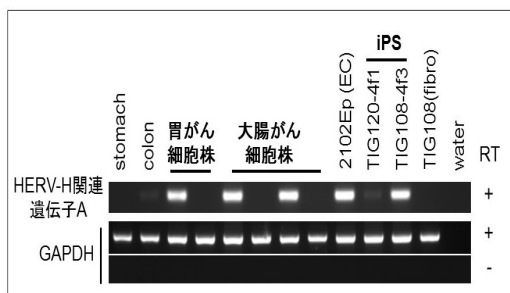
で作成したコンストラクトを HERV-H 関連遺伝子群が発現している細胞株に導入し、陽性細胞の割合と細胞の性質との関係調べる。

様々ながん細胞のみならず、がん細胞に初期化因子を導入することで得られる人工がん幹細胞株や、正常・疾患 iPS 細胞、それらの iPS 細胞から分化した細胞において HERV-H の関連遺伝子の発現を PCR で調べる。

4. 研究成果

複数の胃、大腸がん細胞株における HERV-H 関連遺伝子 A の発現確認

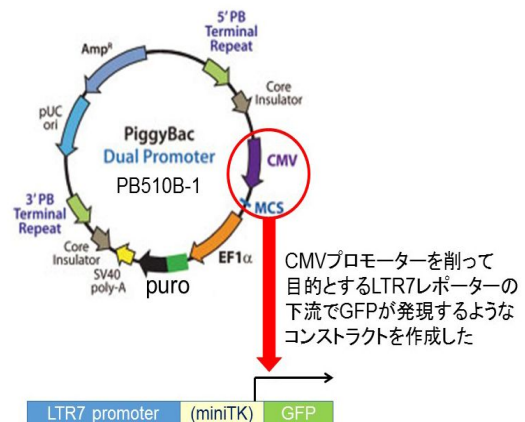
初年度は以前に研究代表者が明らかにした、神経細胞へと分化させた際に一部が未分化細胞として残存する少数のヒト ES/iPS 細胞で HERV-H の LTR7 の低メチル化によって活性化される HERV-H 関連遺伝子 A について、様々な胃、大腸がん細胞株における発現を半定量 PCR によって調べた。その結果、ヒト胚性腫瘍株 2102Ep 細胞においては、調べた胃、大腸がん細胞株の 50% で HERV-H 関連遺伝子 A の発現が認められた。しかしながら、HERV-H 関連遺伝子 A が非常に高い発現量を示すことがわかっているヒト胚性腫瘍株 2102Ep 細胞と比較するとその発現量は低いものであることがわかった。(図 1)



(図1)HERV-H関連遺伝子Aの胃、大腸がん細胞株における発現

HERV-H 関連遺伝子が発現している細胞群を識別するためのレポーターコンストラクトの作成

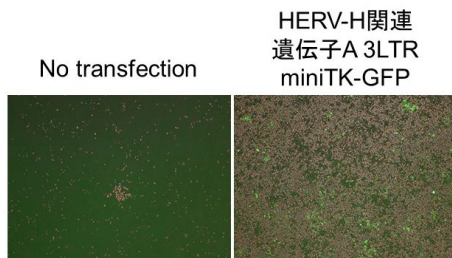
研究期間中には、HERV と多能性幹細胞についての複数の論文報告があり、その中でヒト ES/iPS 細胞の一部の細胞集団において HERV-H が活性化されており、より早い発生段階であることを示す naïve 状態と関連している可能性が示された。研究代表者は、で同定された HERV-H 関連遺伝子 A が発現しているがん細胞株においても、HERV-H が一部の細胞群でのみ発現している可能性を考え、HERV-H 関連遺伝子 A の発現を追跡するためのレポーターコンストラクトの作成を行った。Piggy Bac システムを用いた Dual promoter ベクター (PB-CMV-MCS-EF1-puro cDNA cloning and expression vector) を購入し、目的とする HERV-H 関連遺伝子 A の LTR7 プロモーターの下流で GFP が発現するコンストラクトを作成した。(図 2)



(図2) LTR7レポーターベクターの作成

HERV-H 関連遺伝子の LTR7 レポーターコンストラクトのがん細胞株への導入

作成したレポーターコンストラクトを、HERV-H 遺伝子 A が発現している大腸がん細胞株に導入し、ピュロマイシン選択により、ベクターが導入された細胞のみを選択して観察したところ、一部の細胞が GFP 陽性となることが確認された。しかしながら、HERV-H 関連遺伝子 A が発現していない細胞株においても同様にレポーターベクターを挿入したところ、GFP 陽性細胞が観察された。作成したコンストラクトの LTR7 部分は正常細胞のゲノム DNA からクローニングしたものであったため、今後は、遺伝子 A が発現しているがん細胞株としていない細胞株それぞれのゲノム DNA を鋳型にしてコンストラクトを作成して比較することによって、HERV-H 関連遺伝子の発現制御機構の一端が明らかになるのではないかと期待される。



(図3)HERV-H関連遺伝子Aが発現している大腸がん細胞株にLTR7レポーターベクターを導入しpuro選択をおこなった結果

様々な細胞株における HERV-H 関連遺伝子群の発現の検討

HERV-H 活性化状態の網羅的かつ定量的な評価系の確立の導入として、様々ながん細胞のみならず、がん細胞に初期化因子を導入することで得られる人工がん幹細胞株や、正常・疾患 iPS 細胞、それらの iPS 細胞から分化した細胞において HERV-H の関連遺伝子の発現を半定量 PCR で調べた。その結果、いくつかの細胞群において、HERV-H の発現が確認できた。今後 RNA シークエンスや各細胞の機能との関連を調べることによって、病態と HERV との関わりの解明が期待される。

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)

Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Tanabe K, Ohnuki M, Yokota H, Koyanagi-Aoi M, Okita K, Watanabe A, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y
 “Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity”
Cell Stem Cell, 査読有, 19 巻, 2016 年, 341-54
 10.1016/j.stem.2016.06.019

[学会発表] (計 1 件)

青井 (小柳) 三千代, “iPS 細胞とがんにおけるヒト内在性レトロウイルスの機能を探る”、内在性レトロウイルス様エレメント研究会、2016/12/16, 京都大学

[図書] (計 1 件)

青井 (小柳) 三千代, 青井 貴之 “ヒト多能

性幹細胞株の分化特性とばらつき”日本臨床 73 巻 増刊号 5, p74-79, 2015 年

[産業財産権]

該当無し

[その他]

該当無し

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

青井 (小柳) 三千代

(AOI(KOYANAGI), Michiyo)

神戸大学医学部附属病院・特命助教

研究者番号 : 90432327

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

青井 貴之 (AOI, Takashi)

神戸大学科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号 : 00546997

(4) 研究協力者

該当無し