

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15143

研究課題名(和文) STAT3阻害センダイウイルスによる抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Anti-tumor effects by recombinant STAT3-inhibiting Sendai virus

研究代表者

坂口 剛正 (Sakaguchi, Takemasa)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：70196070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞で持続的に活性化されている転写因子STAT3を阻害するセンダイウイルスを作製し、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するという「治療」をおこなうことを目的とした。最近明らかにしたセンダイウイルスC蛋白質とSTAT1の立体構造をもとに、STAT1と近縁のSTAT3と結合する変異C蛋白質の作製を試みたが、期間内に得ることができなかった。野生型C蛋白質もおそらくSTAT1を介してSTAT3阻害するように思えるデータがあったが、これだけでは十分なSTAT3阻害は不可能であった。蛋白質構造予測のin silico実験ではなくファージディスプレイのようなwetな実験によって研究を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：Our purpose is that we generate a recombinant Sendai virus expression the STAT3-interacting C protein to cause apoptosis in tumor cells for cancer gene therapy. We recently determined crystal structure of the complex of the C protein and STAT1. Based on the detailed information of interacting surface, we predicted amino acid mutations that cause binding of the C protein and STAT3, which is closely related to STAT1. However, we could not obtain the STAT3-interacting C protein after several attempts by the collaboration with a crystallographer and a theoretical biologist by the end of research period. The original wild-type C protein seemed to inhibit the STAT3 activation probably through the inhibition of STAT1, but this did not bring sufficient inhibition of STAT3. It is necessary for us to proceed "wet" experiments including phage display, not in silico protein structure prediction.

研究分野：ウイルス学

キーワード：STAT3 センダイウイルス C蛋白質 アクセサリー蛋白質 抗腫瘍効果 癌治療 シグナル伝達機構

1. 研究開始当初の背景

セングダイウイルス (SeV) は、パラミクソウイルス科のプロトタイプであり、マウスなどの齧歯類に呼吸器疾患を引き起こす。SeV では、ウイルスのポリメラーゼ・サブユニットである P 蛋白質の mRNA から、P とはシフトした翻訳フレームを用いて C 蛋白質、また P mRNA の特定部位に RNA editing によって G 塩基が挿入されることで途中からフレームがシフトした V 蛋白質の 2 種類の付加的な蛋白質 (アクセサリー蛋白質) が合成される。

C 蛋白質欠損ウイルスの研究から、SeV の C 蛋白質は宿主のインターフェロン系の阻害を起こすことが知られている。特に転写因子 STAT1 に結合し、インターフェロン α/β あるいはインターフェロン γ からのシグナル伝達を阻害することが明らかになっている。C 蛋白質と STAT1 の結合は、そのための重要な鍵となる。

我々はセングダイウイルス (SeV) の C 蛋白質と転写因子 STAT1 の複合体結晶構造を Spring-8 による放射光を用いて解明し、SeV が、STAT1 二量体を介するインターフェロン γ のシグナル伝達を阻害する分子機構を明らかにした (図 1, 文献②)。これにより C 蛋白質と STAT1 の結合面の性状から、結合に関与するアミノ酸残基が明らかになった。

大腸癌、肝癌、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫などの多くの腫瘍で STAT3 が活性化しており、これによって腫瘍細胞がアポトーシスから逃れていると考えられている。STAT3 は実際に、ある種の抗がん剤の標的になっている。Stat ファミリーのうち、STAT1 には STAT3 がもっとも近縁であるが、共沈殿法で調べると、C は STAT3 とはほとんど相互作用しない (未発表)。しかし、立体構造をもとにデザインすることで、ごくわずかの変異で STAT3 と相互作用する C 蛋白質を作製することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍に対する遺伝子治療を目的として、腫瘍細胞で持続的に活性化されている転写因子 STAT3 抑制活性をもち腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する SeV を作製することを目的とする。

- (1) STAT3 活性化を阻害し、アポトーシスを誘導する C 蛋白質を作製する。
- (2) 変異 C 蛋白質をもつ SeV を作製する。
- (3) 変異 SeV の腫瘍に対する治療効果を、培養細胞レベル、動物レベルで検証する。

STAT1 と STAT3 は比較的相同性が高いので、STAT1-C 複合体結合面の、C 蛋白質のアミノ酸残基に変異を導入することで、STAT3 との結合能を獲得した C 蛋白質をデザインすることが可能であると考えられる。その場合に STAT1 への結合能を保持した変異体あ

るいは消失した変異体の、両方のタイプを得られる可能性がある。

我々の以前の研究から (Irie et al., PLoS One 5:e10719, 2010)、ウイルス RNA 合成に作用して、細胞にインターフェロン誘導ならびにアポトーシス誘導を起こす変異を同定している。これらとともに導入することで、アポトーシス誘導能をさらに高めた C 蛋白質を作製する。

さらに STAT3 結合型および STAT1 結合型、アポトーシス誘導型などの異なる性質をもつ C 変異蛋白質を用いることで、STAT3 活性化および Jak/Stat 経路と腫瘍の増殖・維持に関する知見が明らかになることが期待される。

ムンプスウイルスでは、その V 蛋白質が STAT3 と結合する。STAT3 依存性腫瘍培養細胞にムンプスウイルスを感染させると高度にアポトーシスを誘導することが報告されている (Ulane et al., J. Virol. 77:6385-6393, 2003)。一方で、SeV C 蛋白質は、STAT1 には強く結合するが、STAT3 にはほとんど結合しない。SeV C 蛋白質を STAT3 結合性に変換することで、SeV にも抗腫瘍効果を付与することが可能であると考えられる。

SeV は、表面の膜融合 (F) 蛋白質の開裂活性化を起こすトリプシン様酵素をもつ臓器に増殖が限定される。本実験では、SeV を直接投与する (すでに開裂活性化したウイルスを培養細胞に接種ならびに動物の腫瘍塊に局注する) ことで試験が可能であるが、この効果を高めるために、さらに F 蛋白質の開裂プロテアーゼ認識部位に、腫瘍が高い確率でもっているマトリックス・メタロプロテアーゼの認識配列 (Kinoh et al., Gene Ther. 11:1137-1145, 2004) を導入すれば、腫瘍内でウイルスが広がることで、遺伝子治療の効果がさらに高まることが期待される。このような変異ウイルスの作製も試みる予定である。

SeV はすでに、ヒトに対する遺伝子治療のベクターとして臨床試験が行われている (九州大学、重症虚血肢遺伝子治療製剤)。SeV を腫瘍に対する治療ツールとして実用化する場合のハードルは低いと考えられる。また将来的には、他のウイルスベクター、例えば、より選択的に腫瘍で増殖する水疱性口内炎ウイルスに変異 C 蛋白質を搭載することで、腫瘍抑制活性を高めるといったような応用が可能である。

3. 研究の方法

STAT3 に結合して不活化する SeV C 蛋白質をデザインして作製する。これにさらに既報の変異を加えて、STAT3 依存性腫瘍細胞に高率にアポトーシスを誘導する C 変異蛋白質を作製する。次に、この変異 C 蛋白質をもつ組換え SeV を作製し、培養細胞レベルあるいは動物レベルで腫瘍細胞排除に対する効果を検証する。効果を高めるために、ウイルス

の膜融合蛋白質に変異を導入して、腫瘍細胞で広がりやすいウイルスを作製し、抗腫瘍効果を検証する。

(1) STAT3 と結合する C 蛋白質, アポトーシスを誘導する C 蛋白質のデザインと作製調製

C 蛋白質と STAT1 の立体構造をもとに、C 蛋白質と STAT3 のモデル構造を構築し、ソフトウェア Amber を用いて結合様式を予測する。STAT3 との結合に関わると予測されるアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、STAT3 と結合しない C 蛋白質を作製する。これとともに、ウイルス感染細胞内に異常な RNA が蓄積してアポトーシスを誘導する C 蛋白質変異 (K77R+D80A, D80A; Irie et al., *PLoS One* 5:e10719, 2010) をもつ C 蛋白質も作製する。

これらの C 蛋白質を培養細胞で発現して、STAT3 の阻害活性、アポトーシス誘導活性を検討する。STAT3 依存的な腫瘍由来細胞で、変異 C 蛋白質の導入によってアポトーシスが起るかを検証する。あわせて、Jak/Stat シグナル伝達系阻害活性、ウイルス出芽促進活性などの、C 蛋白質が本来もっている他の機能についても検討する。

(2) 変異導入 C 蛋白質をもつ組換えセンダイウイルスの作製立体構造解明による蛋白質機能、相互作用の解析

上記で性質を解析した C 蛋白質を発現する、組換え SeV を作製する。

C 蛋白質は、P 遺伝子上の P 蛋白質のフレームとシフトしたフレームに、重複してコードされている。従って、C 蛋白質の変異導入によっては P 蛋白質に変異が入る可能性がある。C 蛋白質に自由に変異を導入することができない。C 蛋白質を付加遺伝子として発現して、本来の C 蛋白質を停止コドン挿入によって不活化したゲノム DNA を利用してウイルスを作製する。

このバックボーンのゲノム DNA の合成にすでに成功しており、組換えウイルスの作製については従来から研究室で行っているの技術的な裏打ちがある (Sakaguchi et al., 1997; 1999; Huang et al., 2000; Sakaguchi et al., 2002; Fujii et al., 2002; Fukuhara et al., 2002; Sakaguchi et al., 2003; Miyoshi et al., 2007; Shimazu et al., 2008; Irie et al., 2010a; 2010b)。個別の変異については事前にカルタヘナ法に係る文部科学大臣の確認を取って行く。

(3) 組換えセンダイウイルスの抗腫瘍活性の評価立体構造に基づく自然免疫抑制機構の解析

STAT3 は、Src によって形質転換された腫瘍では常に活性化されている。STAT3 のドミナントネガティブ変異体は形質転換を阻害し、一方、恒常活性型は細胞を形質転換する (Darnell, *Nat. Rev. Cancer*, 2:740-749, 2002)。STAT3 は細胞をアポトーシスから保護してい

ると考えられている。他に多発性骨髄腫ならびにホジキンリンパ腫、肝癌でも活性化がみられる。大腸癌由来の細胞である SW450、HT90 でも STAT3 が活性化している (Lin et al., *Am. J. Physiol.* 167:969-980, 2005)。

腫瘍由来細胞株の中から選んだ、STAT3 依存的な細胞株、例えば SW450 細胞に、変異 C 蛋白質発現組換え SeV を感染させて、腫瘍細胞の増殖が抑制されるか、さらにアポトーシスなどを起こすかどうかを検討する。また、腫瘍細胞をマウスに移植する系を用いて、担腫瘍マウスに対する組換え SeV の治療効果を評価する。

SeV の細胞への伝播には、ウイルス表面の膜融合蛋白質が宿主プロテアーゼによって部分分解されて活性化していることが必須である。変異 C 蛋白質を発現する組換え SeV の抗腫瘍効果を高めるために、F 蛋白質のプロテアーゼ認識部位に、多くの腫瘍が分泌するマトリックス・メタロプロテアーゼ認識配列 (PLG↓MTS など; Kinoh et al., *Gene Ther.* 11:1137-1145, 2004) を導入したウイルスを作製する。腫瘍内でウイルスが広がることで、抗腫瘍効果がさらに高まることが期待される。

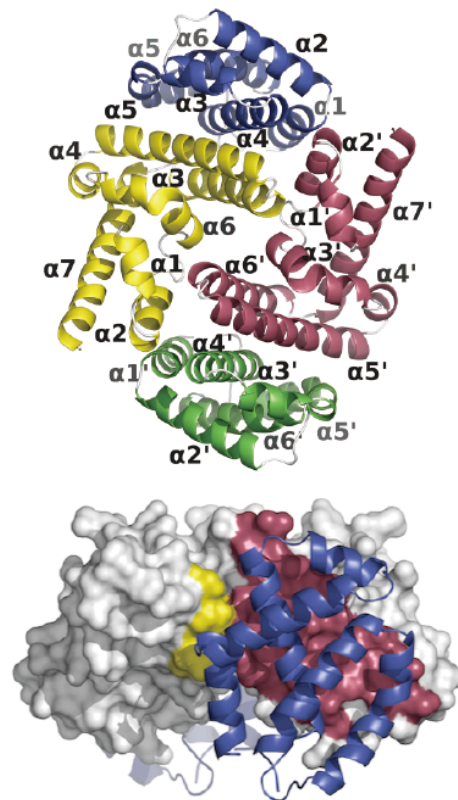


図 1 STAT1 N 末端ドメインと Y3 蛋白質複合体の構造

4. 研究成果

(1) STAT3 と結合し不活化する C 蛋白質のデザイン

小田が Amber 法により、E146Q, E153Q, R157Q の 3 個のアミノ酸変異を推測し、これらの変異を導入した C-3Q を作製した。また、蛋白質構造の理論生物学が専門の静岡県立大学食品栄養科学部助教 中野祥吾博士に INTMSAlign 解析による推測を依頼し、R140E, Q146I, I143T (STAT1 との相互作用を弱め、かつ STAT3 との相互作用を強める可能性)、K135Q, K183Q (STAT3 の Gln との相互作用を形成できる可能性)、T158V (STAT3 の疎水性残基と相互作用を形成できる可能性) の 6 個のアミノ酸変異を推測していただいた。これらをすべて入れた変異 C 蛋白質 C-Nakano を作製した。

これらの変異 C 蛋白質について、STAT1, STAT3 との相互作用を免疫沈降で調べたが、STAT3 への結合、STAT1 への結合消失は認められなかった。さらに STAT3 レポーターアッセイを行ったところ、特に強い阻害は認めなかった (データ示さず)。

このように蛋白質立体構造から特定の蛋白質への結合が変化した蛋白質を作出することは、当初は容易であると考えていたので予想外の結果であった。ファージディスプレイのように、実際に結合する変異体を選択するような実験手法をとるべきであったと考えられる。

(2) 野生型 C 蛋白質の STAT3 結合能

レポーターアッセイでは、変異を導入しない野生型 C 蛋白質でも半分程度から若干の抑制がみられた。これはおそらく STAT1 を抑制し、これを介して STAT3 を抑制していると考えられた。このことから従来の SeV でも腫瘍にアポトーシスを誘導できる可能性が生じた。

そこで STAT3 が過剰に発現しているとき、頻用されている動物培養細胞株 L8M (骨肉腫由来)、MCF7 (乳腺癌由来)、DU145 (前立腺癌由来) を理研セルバンクから入手し、SeV を感染させて変化をみたが、特に強いアポトーシスを認めなかった。

今後は、ファージディスプレイ等の方法で STAT3 に結合する C 蛋白質を得て研究を行う必要がある。ムンプスウイルス V 蛋白質は STAT3 と結合することが示されているので、ムンプスウイルスあるいはこの V 蛋白質を発現する SeV を作製して、抗腫瘍効果の検証をおこなうことを検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Yumikita, Y., Narita, T., Inoue, Y., Sato, G., Kamitani, W., Oka, T., Katayama, K., Sakaguchi, T., and Tohya, Y. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology*, 査読有, Vol. 185, 2016, pp. 62-67.

② Oda, K., Matoba, Y., Irie, T., Kawabata, R., Fukushi, M., Sugiyama, M., and Sakaguchi, T. Structural basis of the inhibition of STAT1 activity by Sendai virus C protein. *Journal of Virology*, 査読有, Vol. 89, No. 22, 2015, pp. 11487-11499.

③ Yoshida, A., Kawabata, R., Honda, T., Tomonaga, K., Sakaguchi, T., and Irie, T. IFN- β -inducing, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA-type-dependent manner. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2015, doi:10.3389/fmicb.2015.00804.

[学会発表] (計 9 件)

① 入江崇, 坂口剛正, センダイウイルス-宿主自然免疫相互作用の解析とその応用展開-アジュバント+ワクチン・ハイブリッドウイルスベクターの可能性、平成 29 年度中四国乳酸菌研究会総会および研究発表会、2017 年 5 月 19 日、ホテルグランヴィア岡山 (岡山市)

② 小田康祐, 的場康幸, 入江崇, 佐藤 衛, 坂口剛正, Structural mechanism for unresponsiveness to interferon-alpha/beta in Sendai virus-infected cells, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~25 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

③ 坂口剛正, ウイルスとインターフェロンの競合: それから考えられる新たな抗ウイルス戦略、平成 28 年度広仁会広島支部総会、2016 年 9 月 24 日、リーガロイヤルホテル広島 (広島市)

④ 坂口剛正, 小田康祐, 入江崇, 福士雅也, センダイウイルス C 蛋白質のウイルス出芽促進作用、第 30 回インフルエンザ研究者交流会、2016 年 6 月 23 日~25 日、山形市保健センター会議室 (山形市)

⑤ 小田康祐, 的場康幸, 入江崇, 佐藤 衛, 坂口剛正, Structural basis of the inhibition of tyrosine phosphorylation in STAT2 by Sendai virus C protei. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~24 日、福岡国際会議場 (福岡市)

⑥小田康祐、大竹里奈、的場康幸、入江崇、坂口剛正、ウイルス増殖に關与するセンダイウイルスCタンパク質の分子基盤解明、第67回日本生物工学会大会、2015年10月26日～28日、城山観光ホテル（鹿児島市）

⑦Takemasa Sakaguchi, Sendai virus C and V proteins, discovered by Dr. Lamb, The Robert Lamb Symposium, 2015年8月27日～28日, Northwestern University (Evanston, USA).

⑧小田康祐、小田 隆、的場康幸、入江崇、佐藤 衛、坂口剛正、センダイウイルスCタンパク質によるSTAT2リン酸化阻害機構の解明、第30回中国四国ウイルス研究会、2015年6月27日～28日、くらしき山陽ハイツ（倉敷市）

⑨坂口剛正、入江崇、センダイウイルスCantell株のインターフェロンβ誘導機構、平成27年度中四国乳酸菌研究会総会および研究発表会、2015年5月15日、ホテルグランヴィア岡山（岡山市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂口 剛正 (SAKAGUCHI TAKEMASA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授
研究者番号：70196070

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

入江 崇 (IRIE TAKASHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授
研究者番号：70419498

福士 雅也 (MASAYA FUKUSHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：50313515

小田 康祐 (ODA KOSUKE)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：60571255