

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08250

研究課題名(和文) 宿主細胞トランスフォーメーションにおけるウイルス・マイクロRNAの役割の解明

研究課題名(英文) A study of functional roles of SV40 microRNA in cell transformation.

研究代表者

土方 貴雄 (Hijikata, Takao)

武蔵野大学・薬学部・教授

研究者番号：70189786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染により細胞が腫瘍化し不死化することは知られているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、ウイルスが発現している小さなRNA(マイクロRNA)の細胞不死化への関与とその作用機序を明らかにした。ヒト細胞では、テロメアの短縮あるいは短縮を抑制するテロメラーゼの減少が最終的には細胞死につながる。本研究で、テロメラーゼの減少はヒト細胞がもつマイクロRNAのmiR-1266により生じること、さらにこのmiR-1266によるテロメラーゼ減少はSV40ウイルスのマイクロRNAであるmiR-S1がmiR-1266に相補的に結合することで抑えられることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染による腫瘍化について、これまでウイルス・タンパク質が腫瘍化要因として詳細な研究が行われてきた。例えばSV40のlarge T抗原やパピローマウイルスのE6、E7はがん抑制に働くP53やpRbへの結合を介して細胞を腫瘍化するとされている。本研究ではウイルス感染による腫瘍化にはマイクロRNAも関与すること、さらに細胞がもつマイクロRNAと結合することで細胞内の標的タンパク質発現量に影響を与えることを示したことに学術的な意義がある。本研究に基づきウイルスが誘導する癌に対し、将来的にウイルスマイクロRNAのアンチセンスRNAを用いた治療につながれば社会的意義にもなりうる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that SV40 viral infection transforms and immortalizes human cells, but the underlying mechanism of cell immortalization by the virus remains fully elucidated. The present study showed that SV40 microRNA, miR-S1 complementarily bound to an intracellular microRNA, hsa-miR-1266 and antagonized the effect of hsa-miR-1266 which decreased telomerase proteins. Besides, forced miR-S1 expression reduced cell apoptosis which occurred naturally or was induced by doxorubicin. These findings suggest that viral microRNA also contribute to cell transformation and immortalization via its interaction with host intracellular microRNAs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SV40 マイクロRNA トランスフォーメーション テロメラーゼ 腫瘍化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SV40 の T 抗原は、感染細胞の形質転換を引き起こす分子として広く知られている。また、この感染細胞では T 抗原のコード領域から逆行性に SV40-miR-S1 も発現している事が明らかになっている。miR-S1 は感染細胞内の T 抗原発現調節機能と免疫回避機能が見出されているが、宿主形質転換に与える機能に関しては不明のままである。そこで、申請者は細胞の形質転換、すなわち不死化や増殖促進にも機能しているのではないかと仮説を立て、事前検討を行った。その結果、miR-S1 と相溶性が高い配列を持つヒト miRNA を見出し、その中でも hsa-miR-1266-3p が miR-S1-3p と非常に高い相溶性 (80%) を示していた (図 1)。miR-1266-5p はテロメラゼ (TERT) の発現を抑制する miRNA である事が報告されている点から、恐らく miR-1266-3p と相溶性の高い miR-S1-3p が miR-1266-5p と相補的に結合し二本鎖 RNA を形成し、RNA-induced silencing complex (RISC) へリクルートされ分解される事で、結果として miR-1266-5p の機能抑制 (TERT 発現抑制の解除による不死化や細胞増殖) をもたらずのではないかと考えられた。

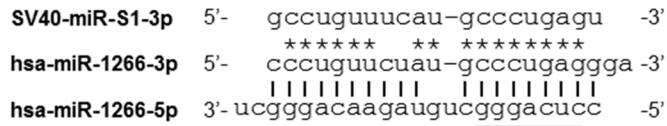


図 1 SV40-miR-S1 と has-miR-1266 の塩基配列 (下線: シード配列)

2. 研究の目的

本研究の目的は、ポリオーマウイルスの T 抗原遺伝子に逆行性にコードされている miRNA (SV40-miR-S1 または MCV-miR-M1) の役割を明らかにする事である。具体的には、これらの miRNA が不死化を含む形質転換に関与する分子機序の解明を行い、ウイルスによる感染細胞の腫瘍化におけるウイルス miRNA の役割、ウイルスによる腫瘍化の予防法・治療法の確立に資する情報の提示を目指す。

3. 研究の方法

まずは作業仮説の「SV40-miR-S1 は TERT 発現を抑制する has-miR-1266 を吸着隔離し RISC で分解する事により TERT タンパクの発現量や TERT 活性を上げる」を実証するため、使用する細胞種の選定と、miR-S1、miR-1266、TERT コード領域、TERT 3' UTR 配列等を挿入したレポーターベクターや発現ベクターを利用したレポーターアッセイ、定量 RT-PCR、ウエスタンブロッティング、抗 Ago2 抗体を用いた免疫沈降、TERT 活性測定等の実験を駆使し、仮説の実証を試みる。

4. 研究成果

細胞の選定として、数種類の癌細胞株ならびに正常細胞について TERT と miR-1266 の発現解析を行い、TERT と miR-1266 の発現が共に高い、もしくは片方のみが突出して高い細胞として HEK293 (ヒト胎児腎由来)、A549 (ヒト肺癌由来)、BxPC3 (ヒト膵臓癌由来)、HDF (ヒト皮膚由来繊維芽細胞) を見出し、これらの細胞を以後の解析に使用した。

まず、miR-1266 発現ベクターと TERT-3' UTR レポーターベクターを HEK293 にコトランスフェクションし、レポーター活性を測定したところ、miR-1266 導入細胞でレポーター活性が有意に減少した。この結果に対応して、3' UTR を含む TERT 発現ベクターと miR-1266 発現ベ

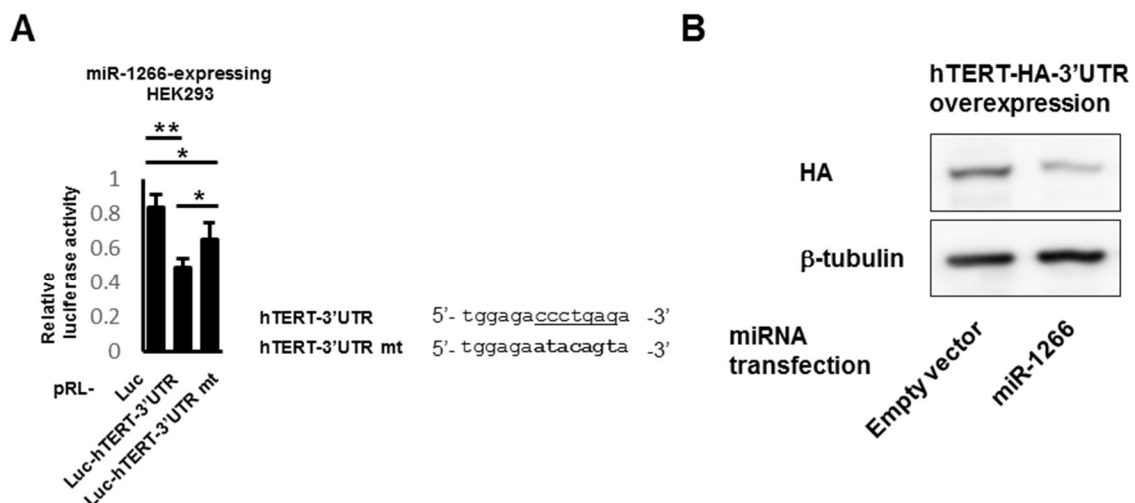


図 2 (A)miR-1266 は TERT-3' UTR のレポーター活性を抑制する。(B)miR-1266 は TERT タンパク発現を抑制する。

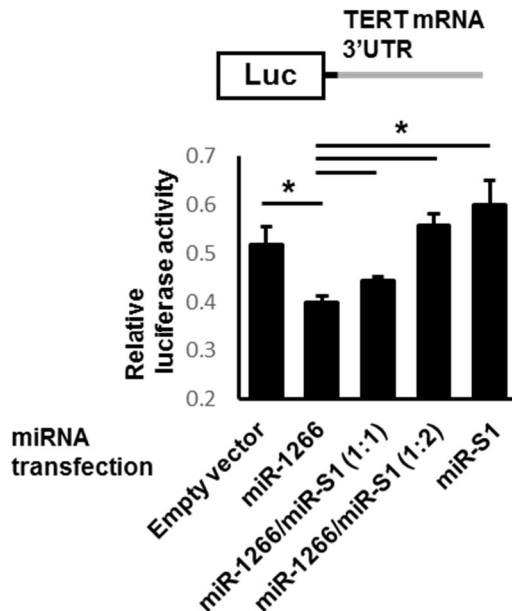


図3 miR-1266によるTERT-3' UTRのレポーター活性の抑制は、miR-S1によって競合的に阻害される。

クターをコトランスフェクションすると、タンパクレベルでも TERT 発現の抑制が確認された(図2)。これより、miR-1266 は確かに TERT mRNA に作用してその発現を抑制する事が示された。続いて、HEK293 に TERT-3' UTR レポーターベクターおよび miR-1266 発現ベクター、miR-S1 発現ベクターをコトランスフェクションし、レポーター活性を測定したところ、miR-S1 導入群では miR-1266 によるレポーター活性の減少は有意に抑制され、この抑制は導入したベクター量に依存していた(図3)。また、BxPC3 (TERT、miR-1266 共に高レベルに発現)に miR-S1 発現ベクターを導入すると、TERT タンパクレベルが上昇していた。A549 (TERT に比して、miR-1266 発現レベルが低い)においては、miR-1266 発現ベクターの単独導入で TERT タンパクレベルは減少したが、この減少は miR-1266 発現ベクターと miR-S1 発現ベクターをコトランスフェクションすると、miR-1266 によるタンパクレベル減少は抑制された(図4)。この結果は、miR-S1 が miR-1266 の機能を競合的に抑制し、TERT 発現に影響を与える事を示唆するものと考えられた。

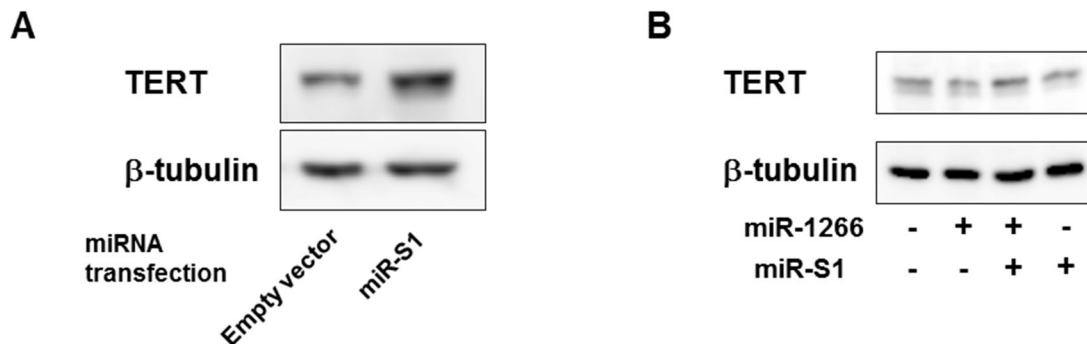


図4 (A)BxPC3細胞において、miR-S1はTERTタンパク発現を増加させる。(B)A549細胞において、miR-1266によるTERTタンパク発現減少はmiR-S1により抑制される。

次に、miR-S1によるTERT活性への影響と、細胞増殖能、抗癌剤に対する感受性へ与える影響を検討した。BxPC3とA549へmiR-S1単独導入、またはmiR-S1とmiR-S1を同時に導入した後、Telomeric repeat amplification protocol法により、細胞内TERT活性を比較した。その結果、いずれの細胞においてもTERT活性化によるテロメアリピートの増加が若干見られたが、明らかな活性上昇とは言い難い程度であった(図5)。HDFへレトロウイルスベクターを用いてmiR-S1を恒常的に発現させ、この細胞を利用して細胞増殖能と抗癌剤(ドキシソルピシン)に対する感受性へmiR-S1がどのような影響をもたらすか検証した。HDFは正常細胞なので、事前検討として継代培養(5日に一回)が可能な期間が変化しているのか確かめたところ、少なくとも15回分の継代培養期間(passage 15; p15)はコントロール細胞と同様に増殖する事が認められたので、p10のコントロール細胞とmiR-S1発現細胞を用いて検討を行った。WST-8法により細胞増殖速度の比較をしたところ、コントロール細胞では測定開始後48時間で吸光度がピークに達し、その後の上昇は見られなかった。対してmiR-S1発現細胞では、吸光度上昇のペースはコントロール細胞より遅かったものの、上昇の頭

打ちは見られず、最終的な吸光度の最大値はコントロール細胞よりも高くなった(図6A)。この測定法は吸光度と細胞数が対応するため、この結果はコントロール細胞で見られる接触阻害による増殖停止がmiR-S1導入によって解除される、すなわち形質転換がもたらされる可能性を示唆するものと考えられた。続いて、Annexin V と propidium iodide (PI) を用いたフローサイトメトリー解析で、ドキシソルビシン処理により誘発されるアポトーシス細胞数の上昇を測定した。コントロール細胞では、ドキシソルビシン処理によって Annexin V 陽性細胞数が約40%上昇した。一方、miR-S1 発現細胞では Annexin V 陽性細胞数の上昇は約16%にとどまった(図6B)。この結果より、miR-S1 導入はドキシソルビシンに対する薬剤耐性の獲得を促す事が示された。また、ドキシソルビシン未処理のエタノール固定細胞を用いたPI染色によりアポトーシス細胞数を計測すると、コントロール細胞に比べ、miR-S1 導入細胞では僅かながらアポトーシス細胞の減少が認められた(7.5% 5%)。以上より、miR-S1 の機能として細胞内のアポトーシス誘導シグナル経路のどこかに抑制的に干渉する点を示唆された。

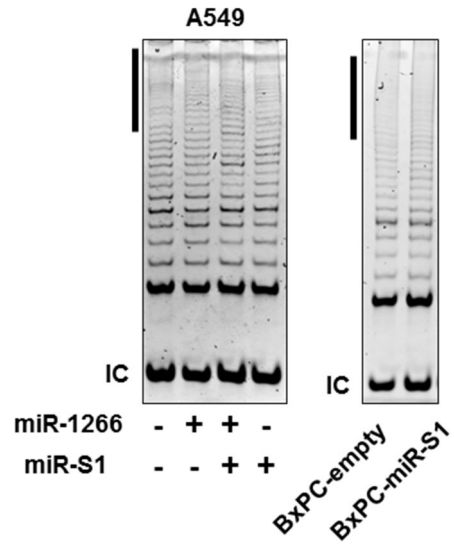


図5 A549とBxPC3にmiR-S1/miR-1266 またはmiR-S1を導入後、TERT活性を評価した。いずれの細胞においてもmiR-S1導入によるTERT活性の明らかな上昇は認められなかった。IC: internal control, 縦線: TERTによるテロメアリピート。

続いて、miR-S1 と miR-1266 が直接的に結合して RISC に移行するののかという点を実験的に証明する事を試みた。結合能の解析には、レポーターアッセイとアビジン-ビオチン結合を利用したプルダウン/qPCR を用いた。HEK293 に miR-S1 と miR-1266-5p レポーターベクターをコトランスフェクションし、レポーター活性を測定したところ、miR-S1 導入細胞でレポーター活性が有意に減少した(図7A)。これは、miR-S1 がレポーター遺伝子の miR-1266-5p 配列に結合した事を示唆するものである。次に、ビオチン化 miR-S1-3p を BxPC3 と HDF に導入し、その後、細胞溶解物をアビジン化磁気ビーズでプルダウンした。得られた沈降物から RNA を回収し、miR-1266-5p を qPCR で検出した。その結果、両細胞においてビオチン化 miR-S1-3p 導入群でのみ miR-1266-5p が検出された(図7B)。この結果は、miR-S1-3p が miR-1266-5p と直接結合する事のみならず、その結合が内因性 miR-1266-5p に対しても認められる、すなわちこれまでの結果がアーティファクトな結果ではない事を強く示唆するものと考えられた。最後に、結合した miR-S1-3p/miR-1266-5p 複合体が RISC 内へ移行しているかを検討した。BxPC3 に miR-S1 発現ベクターを導入し、4-thiouracil 処理と UV クロスリンク処理を行った後、細胞溶解物を抗 Ago2 抗体で免疫沈降した。得られた沈降物から RNA を回収し、miR-1266-5p を qPCR で検出した。その結果、コントロール細胞と miR-S1 導入細胞間で miR-1266-5p レベルに差は見られなかった(図7C)。この結果は、miR-S1-3p/miR-1266-5p 複合体は RISC へは移行していない点を示すものである。以上の結果より、

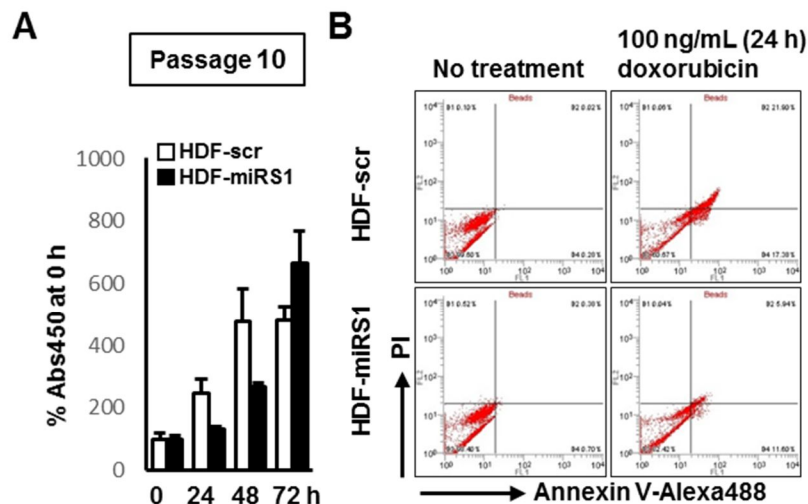


図6 HDFにウイルスベクターを用いてHDFにmiR-S1を導入した。その後10回継代培養した細胞では、(A)増殖速度は遅くなるが、コントロール細胞で見られる細胞数の頭打ちが見られなくなった。(B)ドキシソルビシンによるアポトーシス誘発に抵抗性を示すようになった。

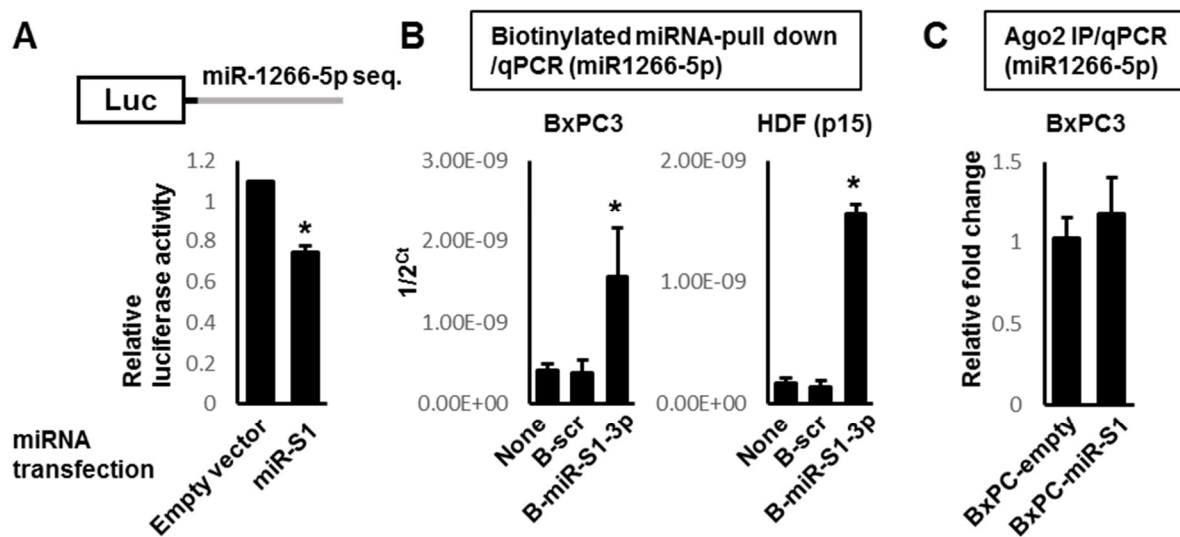


図7 (A)miR-S1は、miR-1266-5pと結合する事でレポーター活性を抑制した。(B)ビオチン化miR-S1-3pは内因性miR-1266と結合した。(C)RISC内 (Ago2免疫沈降による濃縮画分) ではmiR-S1/miR-1266複合体は検出できなかった。

miR-S1 は miR-1266 と直接的に結合するが、miR-1266 の機能抑制作用は、複合体が RISC 内へ移行して分解されるのではない事が示された。

これまで記した研究計画に沿った検討に加え、実際に形質転換が起こる際に miR-S1 がどのような機能をするのかを、すでに確立されている形質転換モデルにおいて検討を行った。モデルとしては、マウス繊維芽細胞(MEF)に SV40 を感染させ、形質転換を誘導するモデルを使用した。C57BL/6J 胎児 (妊娠 14 日) より MEF に、野生型 SV40 (wSV) および miR-S1 発現ができないよう遺伝子改変した変異型 SV40 (wSV/TAD) を感染させ、HEMA コーティング容器を使用した浮遊培養 (48 時間) を施した。その後、通常の培養条件で再培養して増殖可能なクローンを選別・回収し、これらをウイルス感染によって形質転換 (anchorage independency 獲得) を起こした株として以後の検討に使用した。wSV、wSV/TAD を感染させたいずれの MEF (MEF-wSV、MEF-wSV/TAD) においても形質転換株が得られたため、SV40 による形質転換誘導に関する miR-S1 の寄与は無い、あるいは非常に小さいと考えられた。ゲノム DNA および培養上清から抽出した DNA を鋳型にした qPCR により、いずれも large T antigen (LTag) が検出された事から、どちらの株においても感染が持続し、ウイルス粒子を細胞外に放出している点が見られた。また、MEF-wSV、MEF-wSV/TAD の miR-S1-3p 発現量を qPCR により検出したところ、想定通り MEF-wSV/TAD では miR-S1-3p 発現量が顕著に低下していた。続いて、MEF-wSV、MEF-wSV/TAD の培養上清でアフリカミドリザル腎由来 CV-1 細胞を 2 週間培養し、ゲノム DNA を鋳型にした qPCR を行ったところ、いずれの培養群でも LTag が検出された。これは、MEF-wSV、MEF-wSV/TAD から放出されたウイルス粒子がいずれも感染能を保持している事、すなわち miR-S1 は SV40 の宿主への感染には影響を及ぼさない事を示すと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋徹行、岡山由紀子、土方貴雄
2. 発表標題 SV40-miR-S1の内因性テロメラーゼ発現に対する影響
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土方貴雄、高橋徹行
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高橋 徹行 (Takahashi Tetsuyuki) (00403692)	武蔵野大学・薬学研究所・講師 (32680)	