

平成22年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390131

研究課題名（和文） レトロウイルスの病原性発現を規定する責任宿主因子の研究

研究課題名（英文）

Study on host factors associated with retroviruses-induced diseases

研究代表者

西垣 一男 (NISHIGAKI KAZUO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：20401333

研究成果の概要（和文）：フレンドウイルスの env と FV-2 (sf-Stk) が相互作用して細胞を癌化するための重要な活性化分子を明らかにした。癌化を指標に env と相互作用する sf-Stk のアミノ酸領域を決定した。ウイルスの感染により Sf-Stk が PI3 キナーゼと結合することを証明し、その欠損マウスを用いて感染実験を行い、FV-2 および PI3 キナーゼ依存性に脾腫発生が生じていることが判明した。またこの分子はストレス性赤血球造血に関与していることを明らかにした。HTLV-1 の発現が IL-2 除去によるストレスで p38 を介して発現が調節されていることを明らかにした。FeLV によって引き起こされた MDS においてアポトーシス関連分子の上昇が検出された。以上よりレトロウイルス感染における宿主因子の様々な分子について同定し、その機能について研究成果を得た。

研究成果の概要（英文）：The critical amino acid sequences of sf-Stk in which Friend virus gp55 transforms NIH3T3 cells in cooperation with sf-Stk were identified. Several signal molecules were constitutively activated in the transformed cells. PI3-kinase, one of these molecules, was identified to interact with sf-Stk. Splenomegaly induced by Friend virus was depend on Fv-2 and p85 expression status. Furthermore, p85 was shown to involved in stress-induced erythropoiesis. HTLV-1 expression was associated with IL-2 withdrawal in cells and its regulation was due to via p38 stress pathway. Apoptosis-related molecules were elevated in cats with MDS induced by FeLV. These studies identified molecular mechanisms in retroviruses-induced diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性、発癌、レトロウイルス、白血病、抵抗性因子

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスはヒトを含む様々な動物種に感染しリンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群、神経疾患、および免疫不全症を引き起こす。レトロウイルスにはその複製や病原性発現を規定する宿主側の責任因子が数多く知られ明らかになってきている。これらのうち代表的な宿主責任因子として、レトロウイルスの感染、防御にかかわるAPOBEC3ファミリー蛋白、TRIMファミリー蛋白、FV-1やFV-4、免疫反応と関わりのある宿主責任因子Rfv1、FV-3、Rfv2、Rfv3遺伝子、レトロウイルスによる細胞の増殖や分化を規定する宿主責任因子FV5、W(c-kit)、Sl(SCF)、FV-2(Sf-Stk: Short-form Stk/Ron)、xidなどが知られている。フレンドレトロウイルスは感受性マウスに脾腫を引き起こした後、赤白血病を引き起こすレトロウイルスである。このフレンドウイルスの感染や病原性発現を規定する宿主責任因子が、上記に示す分子など、数多く同定されてきている。ウイルスエンベロップ蛋白はエリスロポエチンレセプターやFV-2(Short-form Stk/Ron、Sf-Stk)と共同で細胞をトランスフォームすることが知られている。

2. 研究の目的

(1) env gp55/sf-Stk 複合体によって癌化する場合、活性化する分子の同定:

フレンドレトロウイルスは感受性マウスに貧血(ウイルス A 株)あるいは多血症(ウイルス P 株)をともなった脾腫を引き起こした後、赤白血病を引き起こす。病気を規定する宿主因子としてFV-2が知られているが、FV-2はレセプター型チロシンキナーゼ Ron/Stkの細胞外領域欠損タイプであり、応募者はウイルスエンベロップ蛋白とSf-Stk(FV-2産物)が結合することを見出し明らかにした。また、繊維芽細胞にウイルスエンベロップ(gp55)およびSf-Stkが共発現すると細胞は癌化することを発見した。この癌化した細胞において、どのようなシグナル伝達系が活性化しているのかを検討し、また特異的なインヒビターを用いることによって、癌化(白血病)に重要な分子を同定する。

(2) フレンドウイルスによって引き起こされる赤白血病におけるPI3キナーゼの役割の検討: 上記(1)の研究結果から、恒常的に活性化されている分子について白血病発生との関連性をその分子のノックアウトマウスを用いて検討するが、この場合、PI3キナーゼに着目し、そのサブユニットであるp85 α 分子と白血病発生について明らかにする。

(3) PI3キナーゼと赤血球造血: PI3キナーゼのサブユニットであるp85 α 欠損マウスを用いて、ストレス性の造血について明らかにする。

(4) ウイルスとSf-Stk複合体: env gp55と結合しているSf-Stk分子の結合部位を同定しウイルスとFV-2(Sf-Stk)複合体について明らかにする。

(5) HTLV-1のウイルス発現を調節している分子について: HTLV-1のウイルス発現についてストレスに関連した分子の同定を行うことを目的に、研究を行った。ウイルスはさまざまな刺激に反応してウイルスが発現するが、細胞を飢餓状態にしたときにウイルス発現が上昇することを発見し、その分子機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

(6) MDSと関連する分子の検索: 猫白血病ウイルスクローン33(FeLV clone33)は猫に骨髄異形成症候群(MDS)を引き起こすことが明らかとなったが、そのMDSを発症した猫の骨髄においてMDS発症と関連した分子を同定し、レトロウイルス誘導性MDSにおけるメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) env gp55/sf-Stk 複合体によって癌化する場合、活性化する分子の同定: さまざまなシグナル伝達系に対する抗体を用い、その活性化についてWestern Blot法で評価した。またさまざまなインヒビターを用いることによって重要なシグナル分子の重要性について検討した。

(2) フレンドウイルスによって引き起こされる赤白血病におけるPI3キナーゼの役割の検討: PI3キナーゼのサブユニットであるp85 α 欠損マウスにFV-2依存性ウイルス(SFFV-P、SFFV-A)およびFV-2非依存性ウイルスSFFV BB6の計3株をそれぞれ静脈注射によって接種を行った。接種後2週目においてマウスの脾臓の大きさ(脾腫の程度)、フローサイトメーターを用いて、赤芽球系のマーカーであるTer119陽性細胞の数について評価を行った。

(3) PI3キナーゼと赤血球造血: 85 α 欠損マウスにPHZ(フェノラハイゾラジン)を投与し、溶血性貧血を誘導する。5日目にマウスの脾臓の重量(脾腫の指標)およびTer119陽性細胞をフローサイトメーターによって評価を行った。

(4) ウイルスと Sf-Stk 複合体：ウイルス env gp55 蛋白と協調して働く FV-2(Sf-Stk) の NIH3T3 細胞への共発現は細胞を癌化する。この系において、様々な Sf-Stk の deletion mutants および point mutants を作成し、ウイルスと共に NIH3T3 細胞で発現させることによって、トランスフォーメーションアッセイにより、Sf-Stk の重要な領域およびアミノ酸の決定を行った。

(5) HTLV-1 のウイルス発現を調節している分子について：IL-2 依存性の HTLV 陽性細胞株 (ILT 細胞) を用いて、IL 2 除去後に活性化

する分子について anti-phosphop38, anti-phosphoJNK, anti-phospho MEK を含む様々な抗体を用いて、Western Blot 法で分子の活性化状態を検討した。また、MAPK の p38 のインヒビター

(SB203580 および SB202190) を用いて、p38 の活性化をブロックした。ウイルス発現の定量はフローサイトメーターを用いた gag 蛋白と RT-PCR による gag 遺伝子の発現レベルによって評価を行った。

(6) MDS と関連する分子の検索：MDS を発症した猫の骨髄細胞を採取し、アポトース関連分子 (TNF- α , Fas, Fas-ligand, Survivin) について RT-PCR 法を用いて遺伝子発現を検討した。

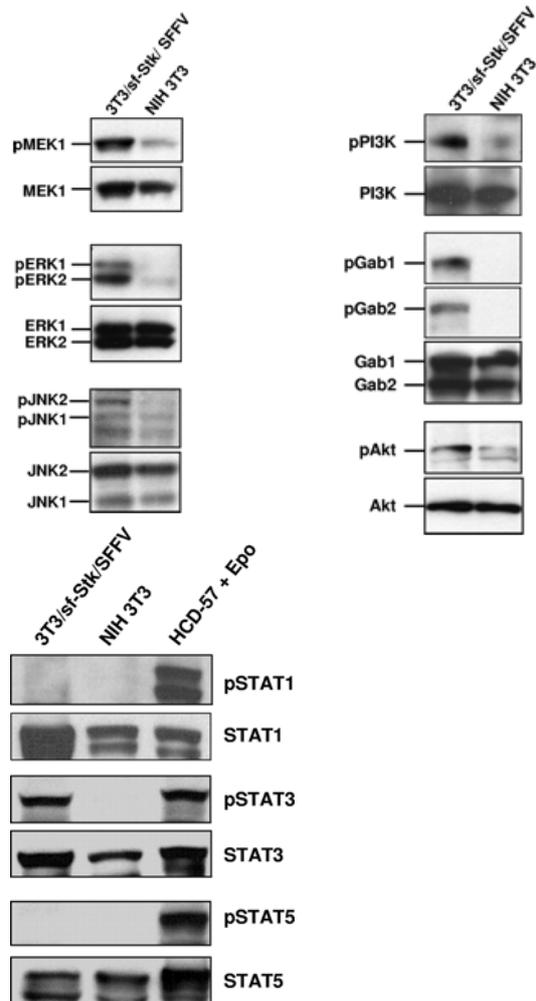
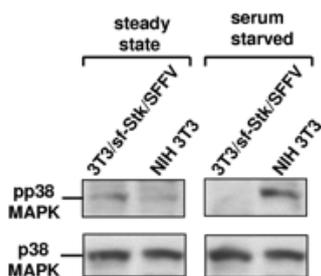
4. 研究成果

(1) env gp55/sf-Stk 複合体によって活性化されるシグナル伝達系の検出

env gp55/sf-Stk の発現により NIH3T3 細胞はトランスフォームするが、この細胞において活性化しているシグナル伝達分子を検討したところ、PI3 キナーゼ/Akt 経路の活性化、PI3 キナーゼと結合している分子である Gab の活性化が検出された。MAP キナーゼ経路については、MEK および JNK の活性化が見られた。P38 に関しては活性が認められず、血清除去による誘導において抵抗性を示した。STAT の活性について調べたところ、STAT1,5 の活性は見られなかったが、STAT3 の活性が検出された。

シグナル分子のインヒビターを用いること

によって、JNK, MEK および PI3K の経路がこの癌化を抑えることが明らかとなった。



(2) フレンドウイルスによって引き起こされる赤白血病における PI3 キナーゼの役割

フレンドウイルスの感染によって PI3 キナーゼが活性化されることが明らかとなったことから、PI3 キナーゼの役割についてマウスを用いて検討した。P85 α 欠損マウスに FV-2(sf-Stk) 依存性ウイルス (SFFV-P、SFFV-A 株) および FV-2 非依存性ウイルス (SFFV BB6) をマウスに接種したところいずれも脾腫を示したがその程度は FV-2(sf-Stk) 依存性ウイルスによって引き起こされた場合において、p85 α 欠損マウスではコントロールマウスに比べて有意に脾腫サイズは減少していた。しかし、FV-2 非依存性株である SFFV BB6 株では脾腫の大きさに違いは認められなかった。このことから PI3 キナーゼの赤白血病における役割は、sf-Stk に依存していることが明らかとなった。

(3) PI3 キナーゼは赤血球造血においてストレス経路を制御している

p85 α 欠損マウスに PHZ を投与し 5 日目にマウスの造血能を検討した。コントロール群では脾腫および赤芽球系マーカーの Ter119 陽

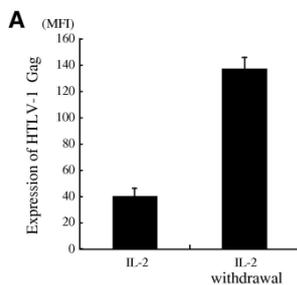
性細胞の顕著な増加が誘導された。しかし、p85 α 欠損マウスでは脾腫およびTer119陽性細胞の増加が著しく誘導されないことから、p85 α は赤血球造血においてストレス造血経路を制御していることが判明し、上記(2)の研究で明らかになったフレンドウイルスによる赤白血病の発生メカニズムにおいて、このストレス経路が関与していることが明らかとなった。

(4) env gp55 と結合している Sf-Stk 分子の結合部位の同定

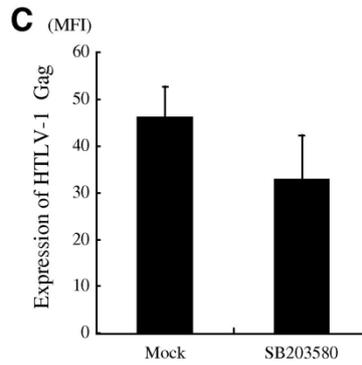
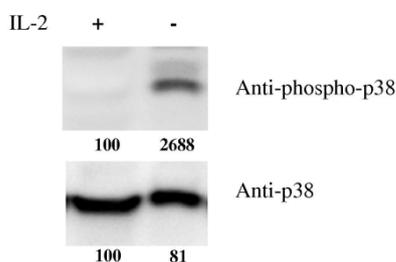
env gp55 と結合している Sf-Stk の領域を細胞のがん化を指標に検討したところ、SFFV-P 株では、sf-Stk のアミノ酸 8 番目のシステインと 19 番目のシステインが重要であり、とくに 19 番目のシステインをアラニンに変換した変異体 sf-Stk C19A では細胞のトランスフォーメーション能が全く失われた。一方 SFFV-A 株では、SFFV-P 株同様、8 番目および 19 番目のシステインが重要であることが明らかとなったが、完全に細胞のトランスフォーメーション能が失われることはなく、これら以外のアミノ酸が SFFV-A env 蛋白と結合している領域が存在する可能性が認められた。この結果は、SFFV-P env/Sf-Stk 複合体と SFFV-A env/Sf-Stk 複合体が構造上異なることが予想された。

(5) MAP キナーゼの p38 が HTLV-1 のウイルス発現に関与している

IL-2 依存性 ILT 細胞を IL-2 を除去することによって HTLV-1 のウイルスの発現が上昇することを見出した。この場合、MAP キナーゼの p38 が上昇することが明らかとなった。p38 インヒビター (SB203580 あるいは SB202190) を細胞に処理したところウイルス発現は抑制された。以上のことからこれらの細胞では少なくとも p38 が HTLV-1 のウイルス発現をコントロールしていることが明らかとなった。



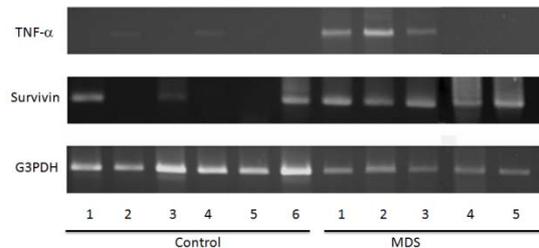
B



(6) FeLV clone33 によって MDS を発症した猫の骨髓中のアポトーシス関連分子の検出

FeLV clone33 は猫に接種

すると MDS を引き起こすことが明らかとなったが、これらの猫において、アポトーシス関連分子 TNF- α , Survivin が高レベルで発現していることが明らかとなり、ウイルスによって引き起こされた MDS の発生に関与しているものと示唆された。



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 6 件)

- ① Daigo Umehara, Shinya Watanabe, Haruyo Ochi, Yukari Anai, Nursarat Ahmed, Mari Kannagi, Charlotte Hanson, Sandra Ruscetti and Kazuo Nishigaki. Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase In Friend Spleen Focus-Forming Virus-Induced Erythroid Disease. J Virol. 2010 査読有、印刷中
- ② Nakamura Y, Nakamura Y, Ura A, Hirata M, Sakuma M, Sakata Y, Nishigaki K, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y. An Updated Nation-Wide Epidemiological Survey of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection in Japan. J Vet Med Sci. 2010 査読有、印刷中
- ③ Obitsu S, Ahmed N, Nishitsuji H, Hasegawa A, Nakahama KI, Morita I,

Nishigaki K, Hayashi T, Mauda T, Kannagi M. Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein. Arch Virol. 154(9):1457-1464. (2009) 査読有

- ④ Hisasue M, Nagashima N, Nishigaki K*, Fukuzawa I, Ura S, Katae H, Tsuchiya R, Yamada T, Hasegawa A, Tsujimoto H. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. Int J Cancer. 124(5):1133-41. (2009) 査読有
- ⑤ Jelacic TM, Thompson D, Hanson C, Cmarik JL, Nishigaki K, Ruscetti S. The tyrosine kinase sf-Stk and its downstream signals are required for maintenance of friend spleen focus-forming virus-induced fibroblast transformation. J Virol. 82(1), 419-427. (2008). 査読有
- ⑥ Washiyama M, Nishigaki K*, Ahmed N, Kinpara S, Ishii Y, Kanzawa N, Masuda T, Kannagi M. IL-2 withdrawal induces HTLV-1 expression through p38 activation in ATL cell lines. FEBS Lett. 581(27), 5207-5212. (2007) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 第 57 回日本ウイルス学会学術集会(2009 年 10 月 27 日、東京)、渡部伸也、西垣一男等、ネコ白血病ウイルスの蔓延および新規ウイルス群への進化
- ② 第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009 年 9 月 26 日鳥取)、西垣一男等、Friend Virus の病原性発現における PI3 キナーゼの役割
- ③ 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(2008 年 10 月 28 日、岡山) 西垣一男等、Friend Virus の病原性発現における PI3 キナーゼの関与
- ④ 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 会期:2007 年 10 月 21 日-23 日 鷲山美幸, 西垣一男等

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.agr.yamaguchi-u.ac.jp/lab/02infectious.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西垣 一男 (NISHIGAKI KAZUO)

山口大学 ・ 農学部 ・ 准教授

研究者番号 : 2 0 4 0 1 3 3 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

