

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07666

研究課題名(和文) 大腸がんにおけるヒト内在性レトロウイルスの発現解析と機能解明

研究課題名(英文) Expression analysis and functional elucidation of human endogenous retroviruses in colorectal cancer

研究代表者

青井 三千代(小柳) (Koyanagi-Aoi, Michiyo)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸がんのがん部と非がん部由来のRNAを用いて長鎖RNA-seqを行うことにより、がん部で非がん部よりも高発現する内在性レトロウイルス様配列(EVE)を3領域同定することができた。また、これらの領域が一部の大腸がん細胞株や人工大腸がん幹細胞(iCSC)でも発現していることを確認した。長鎖RNA-seqデータから得られたEVEの転写領域からタンパク質に翻訳される可能性のある領域を含むコンストラクトを作成し、大腸がん細胞株で強制発現させ、ウエスタンブロットや免疫染色により発現と細胞内での局在を確認した。また、shRNAによるノックダウンを行い、細胞形態の変化を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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偶然感染したことを起源とし、ヒトゲノムの約8%をも占める。しかし、その多くは不活化され、ヒト生体内で機能を有していないものと考えられていたが、近年がんや神経変性疾患など一部の疾患において機能を持つ場合があるとの報告が出てきた。本研究で、新たにかんて発現しているHERVが同定されたことにより、ヒトのがんにおいてHERVが再活性化し、何らかの働きを担っている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：By performing long-chain RNA-seq using RNAs derived from cancerous and non-cancer parts of human colorectal cancer, we identified three endogenous viral elements (EVE) which are more highly expressed in cancerous parts than in non-cancer parts. We confirmed that these regions are also expressed in some colon cancer cell lines and induced colon cancer stem cells (iCSCs).

Next, we created constructs containing regions that could be translated into proteins from the EVE, overexpressed these constructs in colon cancer cell lines and analyzed the expression by Western blotting and immunostaining. Intracellular localization was confirmed. In addition, knockdown by shRNA was performed and cell morphologies were examined.

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 大腸がん

## 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が機能を有する可能性

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偶然感染したことを起源とする。HERV はヒトゲノムの約 8% をも占めるが、その多くは DNA メチル化やヒストン修飾により不活化されているとされており、進化の過程での部分的な欠失や変異の蓄積によるタンパク質の機能喪失が起こっている。これらから、HERV は感染性を失い、ヒト生体内で機能を有していないものと考えられていた。

ところが近年、HERV が我々の生命の維持に寄与していることが示唆されてきた。胎盤や初期胚など一部の組織で HERV が発現していることが明らかにされたほか、最近では、レトロウイルスタンパク質の一つである Gag タンパク質に類似した構造をもつ ARC タンパク質がヒト神経細胞間で RNA を伝達する情報伝達物質として機能しているとの興味深い報告もなされた。これらから、現時点ではその機能が未解明である HERV の中でも、様々なヒトの生命現象において重要な機能を有するものが多く隠されている可能性が考えられる。中でも、がんにおける HERV の発現の意義は大きな興味の対象である。そこで、本研究では、がんにおいて HERV が発現している意義は何か? を学術的な「問い」として研究を始めた。

### (2) がんにおける HERV 研究の技術的問題と対応策

がん症例の臨床検体やがん細胞株で HERV やそれに由来する LTR 領域が活性化しているとの報告は複数ある。しかし、ほとんどの報告において、その機能については明らかにされていない。これは、以下に述べる 3 つの技術的問題によると考えられた。

第一に、HERV はゲノム内に多数の挿入部位を持つ上に、各々の配列が類似しているため、発現部位を特定することが難しい。従来のショートリードの mRNA-seq 解析では HERV や長鎖散在性反復配列(LINE)などの繰り返し配列は、相同性をもつ領域が多数ヒットして信頼性が低くなることから、解析対象からは外すという扱いがなされるのが一般的であった。第二に、上記と同じ理由から、特定の HERV 領域をノックダウンすることや、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により目的の HERV 領域をクローニングすることが難しいため、機能解析の系が構築できていないことが挙げられた。第 1 の問題点については、ロングリードの mRNA-seq を行うことで解決を目指す。また、第三の問題点として、ヒトがんを *in vitro* でよく模倣した実験系が存在しないことが考えられた。従来一般的に使われてきたがん細胞株は量的制約なく実験に供することができるものの、それらに由来する xenograft や sphere などの組織の表現型はヒトがん組織からほど遠いものである。大腸がん細胞株 SW480 に初期化因子 OCT3/4, SOX2, KLF4 を導入し、DNA 結合試薬の排出能力の高い( = 抗がん剤抵抗性を持つがん幹細胞の特徴の一つ)細胞集団を分離した人工大腸がん幹細胞 iCSC は、これまでの研究で、いくつかの HERV 領域の発現が高くなっていることがわかった。我々は、この iCSC が HERV の発現制御機構を解析するための良いツールとして使用できると考え、発現や機能の解析に用いることとした。

## 2. 研究の目的

大腸がんにおいて高発現している HERV 領域をロングリードの RNA-seq によって同定し、同定した HERV 領域を大腸がん細胞株あるいは人工大腸がん幹細胞でノックダウンあるいは強制発現させることで、細胞の機能に影響を与える HERV 領域を見出し、がんにおける HERV の新しい機能を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### 【研究項目 1：大腸がんを高発現するヒト内在性レトロウイルス領域の同定】

従来の短鎖の RNA-seq (HiSeq2000,2500)の解析においては、100-150bp 程度のシーケンス配列からゲノム上で相同性をもつ領域を推定してマッピングを行うため、正確性に欠けるという問題点があった。本研究においては、長鎖の RNA-seq (Nanopore)を用いて、1500bp-15000bp のリード長から正確に発現領域を同定できることを期待した。サンプルは大腸がん臨床検体の RNA 計 6 検体 (がん部 4 検体、非がん部 2 検体)を用いた。ヒトゲノムに存在する HERV 領域については RepeatMasker (Rebase)と RetroTector を組み合わせて使用することによって同定し、蛋白質をコードする可能性は、共同研究者の中川が開発している内在性ウイルス様配列データベース (<http://geve.med.u-tokai.ac.jp>; Nakagawa and Takahashi, *Database*, 2016) を用いて推定した。

#### 【研究項目 2：大腸がん細胞株、人工大腸がん幹細胞 iCSC における、大腸がんを高発現するヒト内在性レトロウイルス領域の発現確認】

【研究項目 1】で同定した大腸がん臨床検体のがん部で非がん部より高発現している HERV 領域について、大腸がん細胞株 6 種 (Colo-320DM, DLD1, HCT116, LOVO, SW480, SW620) での発現を調べた。また、人工大腸がん幹細胞 iCSC における発現についても同様に半定量 RT-PCR により調べた。

#### 【研究項目 3：大腸がんを高発現するヒト内在性レトロウイルス領域から翻訳されうるタンパク質の発現についての検討】

【研究項目 1】で同定した大腸がん臨床検体のがん部で非がん部より高発現している HERV 領域 2 つ (CRC-HERV1, CRC-HERV3) の中に含まれる Open reading frame (ORF)を、長鎖シーケンスのデータをもとに推定し、転写開始点から ORF を含む領域の C 末端に 3-Flag が付加するように pCMV ベクターにクローニングした。作成したコンストラクトを SW480 株にトランスフェクションし、ウエスタンブロットと免疫染色により Flag 抗体と作成した抗体を用いて発現と細胞内局在を確認した。また、各 ORF に含まれる一部のペプチド配列に対して、ウサギを宿主とした抗体を作成し、強制発現したタンパクを detect できるかを検討した。

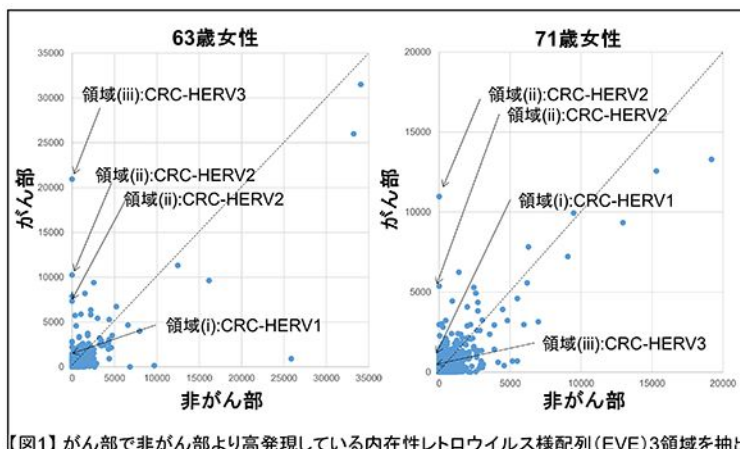
#### 【研究項目 4：大腸がんを高発現するヒト内在性レトロウイルス領域由来の RNA の発現を抑制し、細胞機能への影響を調べる】

【研究項目 1】で同定した大腸がん臨床検体のがん部で非がん部より高発現している HERV 領域の 1 つ CRC-HERV2 の LTR 領域をターゲットとした shRNA を、レトロウイルスベクターを用いて大腸がん細胞株や iCSC 細胞に導入することにより、CRC-HERV2 をノックダウンできるか、また細胞形態や増殖に影響があるかを検討する。

### 4. 研究成果

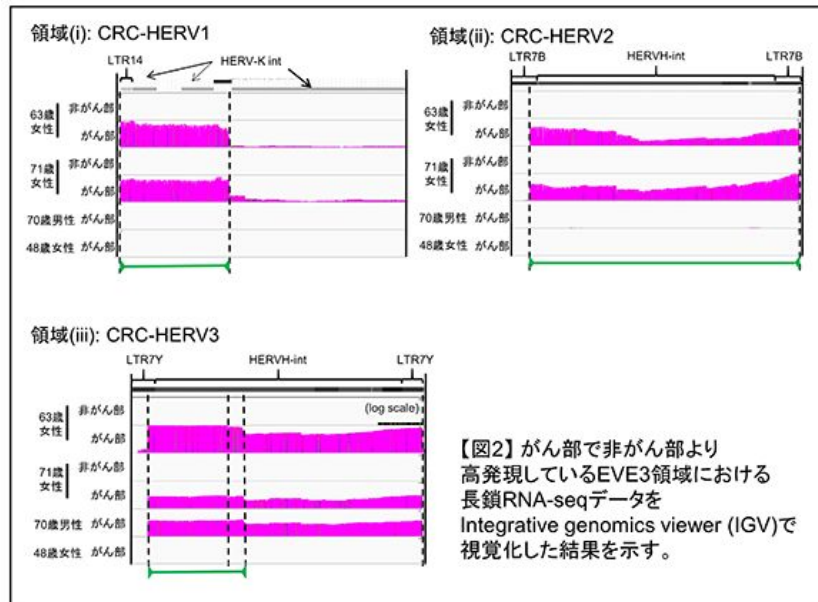
#### 【研究項目 1：大腸がんを発現するヒト内在性レトロウイルス領域を明らかにする】

Origene 社より購入した大腸がん臨床検体の RNA 計 6 検体 (63 歳女性 (ステージ IV がん部、非がん部)、71 歳女性 (ステージ IIIA がん部、非がん部)、70 歳男性 (ステージ IV がん部のみ)、48 歳女性 (ステージ IV がん部のみ))について、Nanopore を用いた長鎖

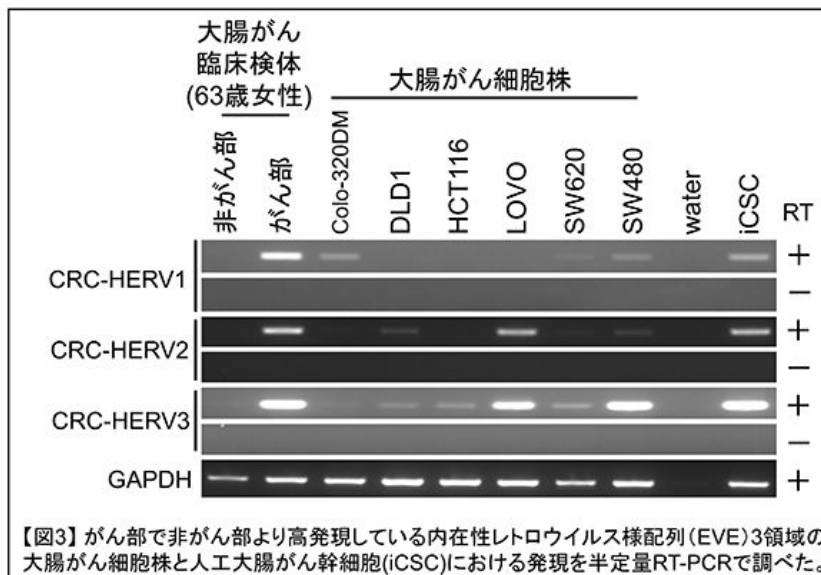


RNA-seq を行った。得られたシーケンスデータを、共同研究者である東海大学 中川が LAST プログラムを用いて解析し、さらに中川が開発した内在性ウイルス様配列データベース ( <http://geve.med.u-tokai.ac.jp>; Nakagawa and Takahashi, *Database*, 2016 ) を用いて、2 名の大腸がん患者 ( 63 歳女性、71 歳女性 ) のがん部、非がん部で発現している内在性レトロウイルス様配列 ( EVE ) を調べ、比較した。その結果を図 1 に示す。

図 1 でプロットされた領域のうち、2 名の大腸がん患者で共通して、がん部で非がん部より高発現していた EVE 3 領域を抽出した。( i ) CRC-HERV1; Chr17 に存在し、HERV-K-int, LTR14 を含む領域、( ii ) CRC-HERV2; Chr20 に存在し、HERV-H-int, LTR7B を含む領域 ( iii ) CRC-HERV3; ChrX に存在し、HERV-H-int, LTR7Y を含む領域 ( これらの領域へ上記 6 検体の長鎖 RNA-seq データのマッピングした結果を Integrative genomics viewer ( IGV ) で視覚化し、図 2 に示す。



【研究項目 2：大腸がん細胞株、人工大腸がん幹細胞 iCSC における、大腸がんで高発現するヒト内在性レトロウイルス領域の発現確認】



研究項目 1 で同定した EVE 3 領域について、大腸がん臨床検体 1 セット ( 63 歳女性 がん部、非がん部 )、大腸がん細胞株 6 種 ( Colo-320DM, DLD1, HCT116, LOVO, SW480, SW620 )、人工大腸がん細胞株 iCSC における発現を半定量 RT-PCR を用いて調べた。その結果を図 3 に示す。逆

転写反応の際に逆転写酵素 (RT) を添加しないサンプルも作成し (RT (-) サンプル )、転写物がゲノム DNA 由来でないことを証明した。iCSC においては EVE3 領域全てが高発現することがわかった。CRC-HERV1 は Colo-320DM 細胞と SW480 細胞で、CRC-HERV2 は LOVO 細胞で、CRC-HERV3 は、Colo-320DM 細胞以外の細胞 5 つの細胞株で発現が確認された。



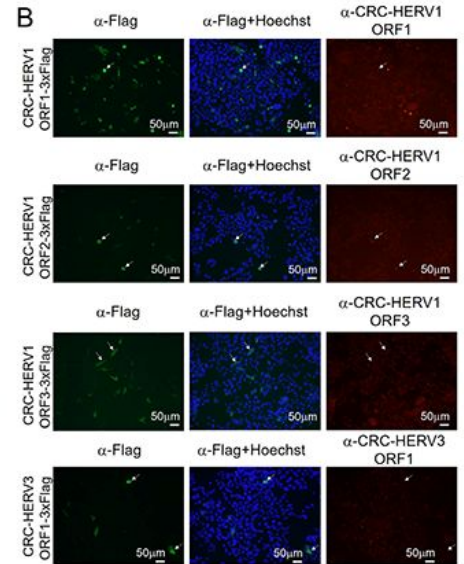
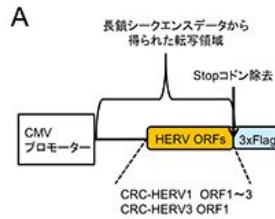
【研究項目 3: 大腸がんで高発現するヒト内在性レトロウイルス領域から翻訳されるタンパク質の発現についての検討】

【研究項目 1】で同定した大腸がん臨床検体のがん部で非がん部より高発現している HERV 領域 2 つ (CRC-HERV1, CRC-HERV3) の中に含まれる Open reading frame (ORF) を、長鎖シークエンスのデータをもとに推定し、

転写開始点から各 ORF を含む領域を C 末端の stop コドンを除いて pCMV ベクターに C 末端に 3xFlag タグが付加されるようにクローニングした (図 4A)。作成したコンストラクトを SW480 株にトランスフェクションし、2 日後にウエスタンブロットと免疫染色により発現と細胞内局在を確認した。CRC-HERV1 については 3 つの ORF、CRC-HERV3 については ORF1 つの結果を示す (図 4B)。

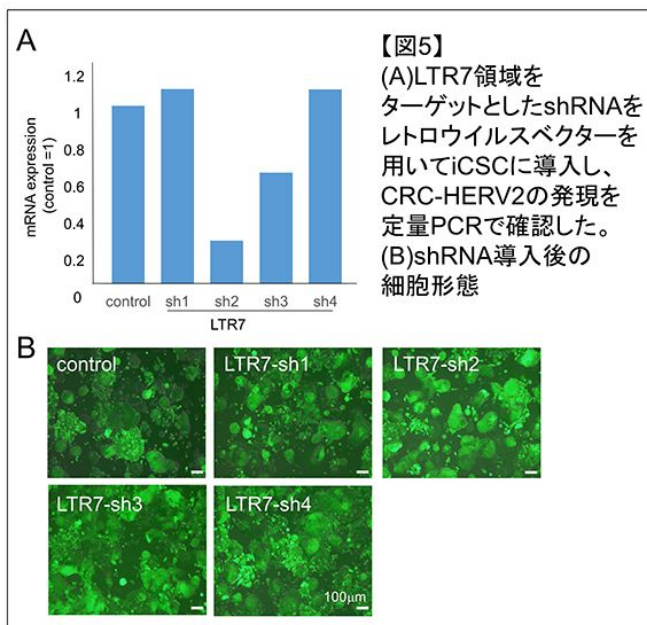
【図4】

各CRC-HERV領域由来のORFを含むコンストラクトを強制発現させ、Flag抗体と新たに作成した抗体で免疫染色した結果



Flag タグでの免疫染色の結果を緑色で、各 ORF に含まれる一部のペプチド配列に対して新しく作成した抗体を用いた結果を赤色で示す。作成した抗体は、すべての領域で目的のタンパク質を detect することができなかった。このため、これらのタンパク質が、実際の大腸がんや細胞株で発現しているかどうかは本研究課題では確認できなかった。

【研究項目 4: 大腸がんで高発現するヒト内在性レトロウイルス領域由来の RNA の発現を抑制し、細胞機能への影響を調べる】



PLAT-A 細胞に pMKO1-LTR-shRNA#1 ~ 4-GFP-T2A-puro をトランスフェクションし、培養上清を iCSC 細胞に感染させた。3 日後から puro 選択を行い、14 日目に RNA を回収して、CRC-HERV2 のノックダウンの有無について定量 PCR を用いて検討した (図 5A)。その結果、LTR-shRNA#2 が最もノックダウン効果が高いことがわかった。また、細胞形態や増殖を観察したところ、特にノックダウンの有無で形態 (図 5B) に違いはみられなかった。これらの結果から、CRC-HERV2 は、細胞形態以外の細胞機能

に影響している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青井（小柳）三千代、青井貴之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 70
3. 書名 "ヒト内在性レトロウイルスと疾患" 医学のあゆみ	

〔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
研究 分 担 者	中川 草  (Nakagawa So)  (70510014)	東海大学・医学部・准教授   (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------