

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03150

研究課題名(和文) 共生レトロウイルスの抗腫瘍ポテンシャルの解明と有効活用

研究課題名(英文) Studies on anti-tumor potential of symbiotic retroviruses and their therapeutic applications

研究代表者

宮沢 孝幸 (Miyazawa, Takayuki)

京都大学・医生物学研究所・准教授

研究者番号：80282705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miRNA)は、様々な代謝系やウイルスの増殖環を制御している。現在までに、多くのDNAウイルス、およびレトロウイルスを含む比較的少数のRNAウイルスが、miRNAをコードし、感染細胞内で発現することが報告されている。少数のレトロウイルスがmiRNAを発現することが示されており、フォーミーウイルス(FV)は当初、計算機解析によってmiRNAをコードする領域をもつことが予測されていた。その後、サルやウシのFVに関する研究で、機能的で生物学的に活性なmiRNA発現カセットの存在が確認された。我々は、低分子RNAディープシーケンス解析を用いて、ネコFV由来のmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非病原性のウイルスであり、多くの動物に持続感染しているフォーミーウイルスは、そのゲノム中にマイクロRNA(miRNA)をコードしている。フォーミーウイルス感染細胞からは大量のmiRNAが産生されている。そのmiRNAの中には腫瘍の形成を抑えるものがあることが我々のわかった。今後、フォーミーウイルスを用いた腫瘍抑制性のベクターの開発や、フォーミーウイルスベクターを用いて大量のmiRNAを産生する株化細胞を作出し、miRNAを産生する細胞の培養上清中のエクソソームを回収・精製し、がんの治療に応用できる可能性が開けた。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) classified as non-coding RNAs regulate various metabolic systems and viral life cycles. To date, numerous DNA viruses, many of which are members of the herpesvirus family, and a relatively small number of RNA viruses, including retroviruses, have been reported to encode and express miRNAs in infected cells. A few retroviruses have been shown to express miRNAs, and foamy viruses (FVs) were initially predicted by computational analyses to possess miRNA-coding regions. Subsequent studies on simian and bovine FVs confirmed the presence of functional and biologically active miRNA expression cassettes. We herein identified feline FV-derived miRNAs using a small RNA deep sequencing analysis. We confirmed their repressive functions on gene expression by dual-luciferase reporter assays. We found that the seed sequences of the miRNAs identified in the present study were conserved among all previously reported FFV isolates.

研究分野：ウイルス学

キーワード：マイクロRNA 腫瘍 レトロウイルス フォーミーウイルス がん治療 トランスクリプトーム解析 ネコウシ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) レトロウイルス科のスプーマウイルス亜科に属するフォーミーウイルス (FV) は、オルソウイルス亜科の他のレトロウイルスとは対照的に、腫瘍や他の疾患を引き起こさない。FV のゲノムは、5'末端と3'末端に2つの長い末端反復 (LTR) を含み、レトロウイルスの3つの標準的なタンパク質、群特異的抗原 (Gag)、ポリメラーゼ (Pol)、エンベロープ (Env) タンパク質、アクセサリタンパク質である Bet、および制御タンパク質である Tas をコードする。FV は霊長類 (ヒトを除く)、ウシ、ウマ、家ネコ、野生のネコ科動物に感染し、数百万年にわたって安定した FV-宿主の共種分化が行われてきた。サル FVs (SFVs) では、宿主とウイルスの系統樹の間に、分岐パターンにおける強固で実質的な類似性が実証されている。

マイクロ RNA (miRNA) はノンコーディング RNA と定義される。標的 mRNA の3'非翻訳領域 (UTR) に相補的に結合し、その切断を誘導したり、翻訳を抑制したりする。RNA pol II または RNA pol III によって転写された後、一次 (pri) -miRNA は、Drosha/DiGeorge 症候群染色体領域 (DGCR) 経路などの複数の経路によって前駆体 (pre) -miRNA にプロセッシングされる。プレ miRNA はその後、Dicer 複合体によって切断され、成熟 miRNA となり、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) で標的 mRNA に結合する。細胞 miRNA は、細胞の運命、抗ウイルス防御、形態形成、免疫応答など、様々な生理的プロセスを制御することが報告されている。

エプスタイン・バーウイルスが発現する miRNA が発見されたのに続き、ヘルペスウイルスやポリオーマウイルスなど、多くの DNA ウイルスが miRNA をコードしていることが示されている。DNA ウイルスに比べて報告頻度は低いですが、ウイルス由来の miRNA は、レトロウイルスを含む RNA ウイルスでも同定されている。2012 年、Kincaid らは、RNA pol III による miRNA の転写を予測するために計算機解析を行った。彼らは、ウシ白血病ウイルス (BLV) といくつかの FV が、RNA pol III によって転写される miRNA 様配列をもっていることを発見した。小分子 RNA ディープシーケンス解析により、BLV、ウシ FV (BFV)、アフリカミドリザル (*Chlorocebus aethiops*) 由来の SFVcae、ニホンザル (*Macaca fuscata*) 由来の SFVmfu が miRNA を発現していることが明らかになった。SFVcae、SFVmfu、および BFV において、ウイルス由来の miRNA は、それぞれインターフェロン応答、固形腫瘍、および炎症性シグナル伝達に関与する遺伝子を抑制することが示されている。

BFV、SFVcae、SFVmfu 由来の miRNA は、LTR U3 領域にコードされており、いくつかの pri-miRNA は、互いに隣接し、少ない塩基で挟まれた2つの pre-miRNA からなるユニークなダンベル型構造を形成している。ネコの FV (FFV) とウマの FV (EFV) も、ダンベル構造を形成する miRNA を発現すると予測されている。しかし、FV 由来の miRNA の発現は、これらの FV に感染した細胞を用いて検証されていない。そのため、各 FV 由来 miRNA の発現レベルの違いや機能的活性は未知のままである。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Crandell-Rees feline kidney (CRFK) 細胞と呼ばれる家ネコ細胞株を FFV 単離株 159 に感染させ、small RNA ディープシーケンス解析を行い、8つの成熟 miRNA を同定した。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより、これらの FV 由来 miRNA が標的レポーター遺伝子に対して抑制活性を示すかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 塩基配列決定と系統解析

DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を用いて CRFK/FFV 持続感染細胞からゲノム DNA を抽出した。ウイルスゲノムの塩基配列は、市販の DNA 塩基配列決定会社 (FASMAC) により、PCR ベースのサンガー塩基配列決定を用いて決定された。この FFV の配列は、FFV 単離株 159 (GenBank アクセション番号: MW389244) として GenBank に寄託されている。系統関係は、RAxML v7.2.8 を用いた最尤法により推定した。最適な置換モデルを推論するために、Env には FLU アミノ酸置換モデルを、FFV 分離株の Pol には、ProtTest 3 によるベイズ情報量基準スコアが最も低く、ガンマ分布の速度不均一性と不変部位の割合が推定される HIVb アミノ酸置換モデルを選択した。

(2) プラスミドの構築

未感染 CRFK 細胞および CRFK/FFV 持続感染細胞から、QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は、miRNA 発現プラスミドを構築するための鋳型として用いた。miRNA 発現部位をクローニングするために、miRNA の予測される制御配列を含む、miRNA の上流/下流の数十塩基から数百塩基の配列に対してプライマーを設計した。PCR は KOD-Plus-Neo (東洋紡) を用い、製造元の指示に従って行った。PCR では、200 μ L の薄肉チューブと C1000 サーマルサイクラー (BioRad Laboratories) を用いた。FFV-mir-F1 および FFV-mir-F3 の増幅断片を HindIII/BamHI で消化した pUC18 にクローニングし、それぞれ pUC18/FFV-mir-F1 および pUC18/FFV-mir-F3 とした。

ホタルルシフェラーゼレポータープラスミドシリーズをホタルルシフェラーゼの 3' 末端に挿入して構築した。簡単に言うと、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) エンハンサー/プロモーターを pGL3-basic (Promega) の NheI / HindIII 部位にクローニングして pGL3-hCMV とした。各成熟 miRNA (FFV-miR-F1-3p または FFV-miR-F3-3p) の複製相補配列を、合成オリゴをアニーリングおよび伸長することによって調製し、pGL3-hCMV/ FFV-miR-F1-3p または pGL3-hCMV/ FFV-miR-F3-3p を構築するために、NEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolab) を用いて pGL3-hCMV の XbaI 部位にクローニングした。

(3) 小分子 RNA シーケンス解析

CRFK 細胞および CRFK/FFV 持続感染細胞について、小分子 RNA 配列決定とトランスクリプトーム解析を行った。全 RNA は、RNAzol (Promega 社製) を用いて細胞から抽出し、続いて熱不活性化工程を経ずに DNase I (Roche 社製) 処理を行い、RNAzol を用いて再抽出した。再抽出した RNA は、市販の次世代シーケンシング会社 (Novogene 社) でさらに処理した。配列決定ライブラリーは、鎖特異的小分子 RNA ライブラリーを生成する NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolab) を用いて全 RNA から構築した。cDNA ライブラリーのサイズ選択 (18~40 nt) は、ネイティブポリアクリルアミドゲル (12%) -電気泳動を用いて行い、miRNA 由来の cDNA を含む画分を分離した。その後、シングルエンド 50-bp シーケンスを Illumina HiSeq 2500 プラットフォームで行った。Trimomatic (ver.0.38) に続いて Fastp (ver.0.19.4) を用いて、前処理したリードからシーケンスアダプター配列をトリミングした (Bolger et al.)。その後、Bowtie2 (ver.2.3.4.3) (Langmead and Salzberg, 2012) を用いて FFV 単離株 159 (GenBank アクセション番号: MW389244) のウイルスゲノムにリードをマッピングし、Samtools (ver.1.9) を用いて bam ファイルに変換した。Bam ファイルを bed ファイルに変換し、Bedtools (ver.2.28.0) を用いてカバレッジ深度を算出した。miRNA の二次構造は

RNAfold を用いてデフォルトのパラメータで予測した。Coverage depth は Microsoft Excel (ver. 16.28) を用いて可視化した。得られたリードは miRDeep2 でも処理され、以前のネコ miRNAome 研究で同定された 271 のネコ miRNA 前駆体および 475 の成熟配列を使用して、宿主由来の miRNA によって割り当てられたリードの数をカウントした。miRDeep2 は、ショートリードアライナー Bowtie および Vienna RNA パッケージ 2.0 の RNA 二次構造予測ツール RNAfold を含む他のツールを使用した。

(4) デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

miRNA 発現プラスミドが目的の miRNA を産生することを確認するために、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。コラーゲンコートした 24 ウェルプレート (IWAKI 製) で増殖させた CRFK 細胞に、Avalanche®-Everyday Transfection Reagent (EZ Biosystems 社製) を用いて、40 μ g のホタルルシフェラーゼレポータープラスミド、4 μ g の pRL-TK (レニラルシフェラーゼレポータープラスミド) (Promega 社製) および 456 μ g の各発現プラスミドを、製造者の指示に従って共導入した。トランスフェクションから 48 時間後に細胞を回収し、Lumat LB9507 (Berthold) を用いて Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) によるルシフェラーゼアッセイを行った。差の有意性は Student's *t*-test を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) FFV は 4 つのウイルス由来 pri-miRNA を発現する

FFV 感染細胞における miRNA を同定するために、FFV 単離株 159 に持続感染した CRFK 細胞の small RNA シーケンス解析を行った。低分子 RNA リードを FFV 単離株 159 にマッピングし、LTR の U3 領域にマッピングされた 8 つの成熟 miRNA を同定した。FFV 感染時の miRNA 発現プロファイルを観察するため、CRFK 細胞および CRFK/FFV 持続感染細胞の small RNA 割り当てを調べた。以前の miRNAome 解析で同定された miRNA 配列データを用いて、宿主由来の miRNA リード数を計算した。得られた結果から、CRFK/FFV 持続感染細胞では、8 つの FFV 由来 miRNA が全小分子 RNA リードのわずか 0.38% に寄与していることが示された。全 small reads に占める FFV 由来 miRNA の割合は、FFV 由来 small RNA の割合 (0.40%) とは若干異なっていた。これは、アラインメントされた small RNA reads には、FFV ゲノム全体にランダムに分布する分解産物が含まれていたためである。一方、以前の研究では、ウイルス由来の miRNA の割り当ては、SFVmfu と BFV でそれぞれ約 32% と 73% であったと報告されている。miRNA が RNA pol III に由来する他の FV に関する先行研究と一致して、FFV の miRNA カセットは RNA pol III のプロモーターである A/B ボックス配列を含んでいた。これらの結果は、ダンベル構造をもつ SFVcae、SFVmfu、BFV など、これまでに同定された FV 由来の pri-miRNA の一部とは一致しなかった。

次に、これらの miRNA が FFV 分離株間で標的遺伝子を認識するのに必要なシード配列を保存しているかどうかを調べた。miRNA の配列は高度に保存されており、家ネコ (*Felis catus*) 由来の FFVfca 分離株 5 株、ピューマ (*Puma concolor*) 由来の FFVpco 分離株 2 株、NCBI データベースで入手可能なヒョウモンカゲモドキ (*Prionailurus bengalensis*) 由来の FFVpbe 分離株 2 株、および本研究で解析した分離株 159 株において、すべてのシード配列 (seed6: 成熟 miRNA の 2 番目から 7 番目の塩基で、シードタイプにおいて最も重要である) が同一であった。これらの結果から、これらの miRNA の機能は、家ネコだけでなくピューマやヒョウモンカゲモドキ由来の miRNA にも共通していることが示唆された。

(2) FFV 由来の miRNA は遺伝子発現を抑制する

同定された miRNA のうち、FFV-miR-F1-3p と FFV-miR-F3-3p の発現が高かった。次に、これらの miRNA の機能解析を試みた。pUC18/FFV-mir-F1 および pUC18/FFV-mir-F3 をそれぞれ用いて、これらの miRNA が遺伝子発現を抑制するかどうかを調べるために、CRFK 細胞でデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。高感度な検出を確実にするため、成熟 miRNA の完全に相補的な 2 つの配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に挿入し、それらをレポーターとして用いた。予想通り、どちらの miRNA 発現細胞でもルシフェラーゼ遺伝子の発現レベルは約 75% 低下した。これらの結果は、FFV-miR-F1-3p と FFV-miR-F3-3p が、3' UTR に相補的配列をもつ mRNA に対してサイレンシング機能をもつことを示している。

(3) 考察

4 種類の pri-miRNA の発現は、RNA pol III プロモーター配列に基づいて推測された。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、FFV-miR-F1-3p と FFV-miR-F3-3p が標的配列に対して遺伝子発現を抑制する miRNA として機能することを示した。BFV、SFVcae、SFVmfu の同様の実験との比較において、FFV miRNA は中程度の抑制しか達成しなかったことに注目することが重要である。これは、BFV について以前に示されたように、FFV における miRNA 発現がフランキングゲノム配列によって阻害されるためかもしれない。FFV-miR-F2 および FFV-miR-F4 は、本研究で同定された新規の FFV 由来 miRNA である。これらの FFV 由来 pri-miRNA はすべてシングルヘアピン構造をもつと予測されたため、SFVmfu、SFVcae、および BFV で観察されたダンベル構造をもたなかった。

FFV 単離株 159 と、ピューマおよびヒョウモントカゲモドキ由来の FFV を含む他の 9 つの FFV 単離株との塩基配列比較から、成熟 miRNA 配列は高度に保存されており、シード配列は完全に保存されていることが示された。この結果は、FFV 由来の miRNA がネコと他のネコ種で共通の機能をもつことを示唆している。FFV による多くの種間感染が報告されていることから、FFV 由来の miRNA はピューマやヤマネコなど他のネコ科動物でも機能している可能性がある。一方、SFVmfu および SFVcae 由来の miRNA のシード配列は保存されていないことから、各霊長類種における SFV の感染には異なる miRNA が関与していることが示唆される。

miRNA の標的遺伝子は多様であり、RNA ディープ解析とヒト由来 miRNA の架橋免疫沈降解析を組み合わせた標的遺伝子予測では、miRNA 1 個あたり平均 90 個の標的遺伝子が予測された。したがって、miRNA の生物学的に重要な標的遺伝子を特定するには、遺伝子機能に関する包括的な知識の蓄積と miRNA 標的遺伝子の正確な予測ツールが不可欠である。しかし、家ネコの miRNA 標的遺伝子の予測ツールが不足しているため、FFV 感染に重要な標的遺伝子の特定には困難が伴う。miRNA の標的遺伝子は多様であり、RNA ディープ解析とヒト由来 miRNA の架橋免疫沈降解析を組み合わせた標的遺伝子予測では、miRNA 1 個あたり平均 90 個の標的遺伝子が予測された。したがって、miRNA の生物学的に重要な標的遺伝子を特定するには、遺伝子機能に関する包括的な知識の蓄積と miRNA 標的遺伝子の正確な予測ツールが不可欠である。しかし、家ネコの miRNA 標的遺伝子の予測ツールが不足しているため、FFV 感染に重要な標的遺伝子の特定には困難が伴う。今後、予測ツールが改良されれば、もっと正確に標的遺伝子が特定できるようになるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aso Shiro, Kitao Koichi, Hashimoto-Gotoh Akira, Sakaguchi Shoichi, Miyazawa Takayuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of Feline Foamy Virus-derived MicroRNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME21055	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SUMIYOSHI Aoi, KITAO Koichi, MIYAZAWA Takayuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Genetic and biological characterization of feline foamy virus isolated from a leopard cat (Prionailurus bengalensis) in Vietnam	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 157 ~ 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0550	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mekata Hirohisa, Okagawa Tomohiro, Konnai Satoru, Miyazawa Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular epidemiology and whole-genome analysis of bovine foamy virus in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1017 ~ 1017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13061017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Aso, S., Kitao, K., Miyazawa T
2. 発表標題 Construction of deletion mutants of miRNAs from a molecular clone of simian foamy virus and analysis of their infection dynamics.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 麻生志郎、北尾晃一、宮沢孝幸
2. 発表標題 ネコフォーミーウイルス由来miRNAの同定及び遺伝子発現抑制機能の探索
3. 学会等名 環境ウイルス研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉葵、北尾晃一、宮沢孝幸
2. 発表標題 ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウイルスの遺伝学的性状解析
3. 学会等名 環境ウイルス研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 麻生志郎、後藤暁、北尾晃一、宮沢孝幸
2. 発表標題 ネコフォーミーウイルス由来miRNAの同定及び機能解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉葵、北尾晃一、宮沢孝幸
2. 発表標題 ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウイルスの感染性分子クローンの作製と遺伝学的性状解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉葵、宮沢孝幸
2. 発表標題 ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウイルスの遺伝学的系統解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 宮沢 孝幸	4. 発行年 2023年
2. 出版社 P H P 研究所	5. 総ページ数 232
3. 書名 なぜ私たちは存在するのか	

1. 著者名 宮沢 孝幸	4. 発行年 2021年
2. 出版社 P H P 研究所	5. 総ページ数 224
3. 書名 京大 おどろきのウイルス学講義	

〔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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	目堅 博久 (Mekata Hirohisa) (90633264)	宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・准教授 (17601)	

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