

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590352

研究課題名（和文）APOBEC3 欠損によるリンパ腫発生機構の解析-内在性レトロウイルスとの関連性-

研究課題名（英文） The role of mouse APOBEC3 in the regulation of endogenous retrovirus

研究代表者

河原 佐智代 (KAWAHARA SACHIYO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60297629

研究成果の概要（和文）：マウス APOBEC3 は外来性のレトロウイルスの複製を制御する宿主因子であり、レトロウイルス自然抵抗性の C57BL/6 (B6) 系統では、抗ウイルス活性の高い APOBEC3 バリエントが多く発現している。B6 マウスでは生後 1 年までにがんを発症することは稀であるが、APOBEC3 欠損下では雌個体の一部で乳癌とリンパ性白血病の発症を認め、それら発症マウスでは内在性乳癌ウイルス mouse mammary tumor virus (MMTV) の転写産物が多く発現していた。本研究は、APOBEC3 が内在性レトロウイルスの発現を制御することでがん発症を抑制している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Mouse APOBEC3, a host factor that restricts the replication of exogenous retrovirus, is abundantly expressed in virus-resistant C57BL/6 (B6) mice. We have found that loss of APOBEC3 causes spontaneous mammary carcinoma and T cell lymphomas in B6 mice. The transcripts of endogenous mouse mammary tumor virus are abundant in the tumor cells prepared from APOBEC3-deficient mice. These results suggest that APOBEC3 contributes to the control of activated endogenous retrovirus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：発がん制御・内在性レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスは、自らの逆転写酵素によりゲノム RNA を DNA に逆転写させ、それをプロウイルスとして感染細胞のゲノ

ムに挿入することで複製する。またその組み込みが生殖細胞に起これば、それは内在性レトロウイルスとして子孫にまで伝わることとなる。哺乳動物はこのレトロウイルス

の侵入を阻止するための複数の手段を獲得しており、その一つが DNA 変異誘導酵素 Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) 蛋白群である。

APOBEC3 はレトロウイルスの逆転写過程で形成されるマイナス鎖の一本鎖 DNA を標的としてシトシン塩基をウラシルに置換する。その結果プラス鎖 DNA には G から A への変異が生じ、この G-to-A 変異が集積したレトロウイルスの複製能は低下する。しかし、レトロウイルスがこの APOBEC3 を回避する手段を獲得したために、APOBEC3 蛋白には同種由来のレトロウイルスに対抗する活性はないと考えられてきた。これに対して我々は、マウスレトロウイルスに対して自然抵抗性を示す C57BL/6 (B6) 系統マウスでは、APOBEC3 のある特定のスプライズバリエント(第 5 エキソンを欠く $\Delta 5$)を多量に発現していることを見出し、このバリエントが試験管内でも生体内でも同種由来レトロウイルスの複製を強く抑制することを示し、マウス APOBEC3 は外来性同種由来レトロウイルスの制御に機能する生理的な感染抵抗因子であることを明らかにした。

ヒトでは染色体のおよそ 8%が、マウスでは 10%が内在性レトロウイルスで占められている。ヒトにおいては、内在化したレトロウイルスから一部の蛋白が発現するものの感染性のウイルス粒子が形成されることはないと考えられている。しかし、内在性レトロウイルスと疾患との関連は未だ不明な点を多く残している。マウスでは、その染色体上にウイルス粒子を形成できるほど完全な内在性レトロウイルスのプロウイルスが数十コピー存在しており、少なくともその一部はウイルス粒子を発現することがわかっている。実際、がんを自然発症する系統の中には、内在性レトロウイルスの再活性化とプロウイルスの再組込みが認められている。一方、B6 などの系統では内在性レトロウイルスの発現を巧みにコントロールすることで宿主細胞はそれら寄生体とうまく共生していると考えられている。

APOBEC3 が intracisternal A-particles (IAP) や MusD のレトロトランスポゾンの移動を抑制できることは、培養細胞を用いた実験により証明された。また、染色体上に内在性レトロウイルスのプロウイルスを持ち、白血病を自然発症する AKR マウ

スでは、APOBEC3 の発現が極めて少ないことがその発症原因の一つであると推測されている。しかしながら、APOBEC3 が生体内で内在性レトロウイルスの発現やそれによる発がんを制御しているかは不明である。

我々は、APOBEC3 の発現を欠いた B6 マウスでは野生型に比べてがん発症の頻度が高いことを見出した。強い抗レトロウイルス活性を持つ APOBEC3 バリエントを多く発現する B6 マウスでは、内在性レトロウイルス再活性化の制御に APOBEC3 が強く関与していると推定された。

2. 研究の目的

本研究では、APOBEC3 が内在性レトロウイルスの発現を制御することで細胞の遺伝子変異を抑制する生理活性を持つことを、下記方法により明らかにする。

(1) がん発症に至る APOBEC3 遺伝子欠損マウスの個体条件を判定し、どのような細胞種に変異が生じているかを解析する。

(2) APOBEC3 欠損下におけるがん発症に内在性レトロウイルスの再活性化が関与しているかを明らかにするために、発症マウスの腫瘍部位や各臓器における内在性レトロウイルス (或いはその組換え型ウイルス) の発現を解析する。

(3) プロウイルスの繰り返し感染ががん化に関係しているかを明らかにするために、個体の週齢に伴う内在性レトロウイルスの発現量、および染色体上プロウイルスのコピー数の変化を解析する。

(4) 発症マウスでの内在性レトロウイルスの染色体挿入部位を特定し、がん化に関係する遺伝子を同定し、それら遺伝子産物の発現や活性等を検定する。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、本研究では 3 年の実施期間中に以下の解析を実施した。

(1) APOBEC3 遺伝子欠損 B6 マウスで発生するがんの種類と同定と、発症に至る個体条件の判定 (生後 1 年間観察)

APOBEC3 欠損下でどの細胞が異常となりがん発生に至るかを、免疫学的及び形態学的解析により判定する。性差、週齢、出産の有無などの違いが APOBEC3 欠損マウスのがん発症にどのように影響するかを観察する。また、発症個体から仔への伝達の有無も判定する。

(2) 発症マウスにおける内在性レトロウ

ウイルスの発現量とプロウイルスの染色体再挿入頻度の解析

内在性レトロウイルスの再活性化（発現と染色体への再組込み）が細胞のがん化と関連しているかを明らかにするために、腫瘍部位、および *APOBEC3* 発現の高い脾臓・骨髄・胸腺の臓器・器官における内在性レトロウイルス（或いはその組換え型ウイルス）の転写レベルを RT-PCR と quantitative PCR 法により、蛋白発現を特異抗体を用いた細胞染色により解析する。染色体上のプロウイルス量は細胞ゲノム DNA を用いた PCR 法により測定する。

（3）発症マウスの各臓器に発現する内在性レトロウイルスの塩基配列決定

発症マウスの各臓器から採取した RNA を用いて、再活性化した内在性レトロウイルスの塩基配列を解析する。

（4）*APOBEC3* 欠損マウスにおける個体週齢に伴う内在性レトロウイルスの転写産物発現レベルの変化

内在性レトロウイルスの転写レベルが個体の週齢と共に変化するかを上記（2）の方法で検討する。

4. 研究成果

（1）*APOBEC3* 遺伝子欠損 B6 マウスにおける乳癌と白血病の発症

生後 7 カ月から 1 年の経産個体で脇や鼠径部に腫瘍を生じるものがあり、組織切片を作成して HE 染色を行ったところ、乳癌の発症を認めた（図 1 A、B）。個体によっては乳癌の他に、胸腺、脾臓またはリンパ節の腫大を示すものがあり、それらのマウスでは T 細胞腫の発生を認めた。未經産雌では乳癌を発症する個体はなかったが、一

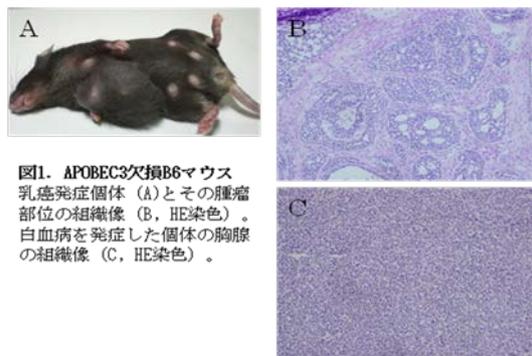


図1. *APOBEC3*欠損B6マウス乳癌発症個体 (A)とその腫瘍部位の組織像 (B, HE染色)。白血病を発症した個体の胸腺の組織像 (C, HE染色)。

部で T 細胞性白血病を発症した。野生型 B6 マウスの経産雌、また *APOBEC3* 欠損の雄個体では生後 1 年までにがんの発症は認めなかった。

（2）発症個体における内在性乳癌ウイルス mouse mammary tumor virus (MMTV)

の発現亢進

発がんマウスにおける内在性レトロウイルスの発現を調べたところ、乳癌発症個体の腫瘍部位、および脾臓・胸腺では MMTV 転写産物の発現が顕著に高かった（図 2）。白血病発症個体のリンパ節や脾臓においても MMTV 転写の増加を認めた。一方、細胞ゲノム上のプロウイルスコピー数については、発症マウスと野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった。

発症雌の仔の発がん率が高いことから、*APOBEC3* 欠損マウスでは再活性化された MMTV が垂直伝播、或いは乳汁を介した水平伝播をすると考えられた（5 世代までの伝達を観察した）。

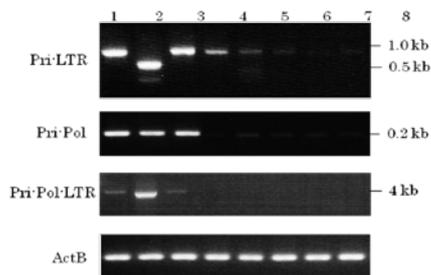


図2. 内在性MMTVの転写産物
1. 乳癌発症マウスNo.37 (脾臓), 2. 乳癌発症マウスNo.55 (胸腺), 3. No.55 (乳癌部位), 4. *APOBEC3*欠損♂3カ月齢, 5. 未經産♀8カ月齢, 6. 未經産♀3カ月齢, 7と8. 野生型B6♀3カ月齢. 4から8は脾臓細胞を解析した。MMTVのLTR領域、Pol領域、Pol-3'LTR領域、およびactinを増幅するプライマーを使用した。

（3）*APOBEC3* 遺伝子欠損による内在性白血病ウイルス murine leukemia virus (MuLV) 発現への影響

発がん個体における内在性 MuLV の発現を特異抗体を用いた細胞染色法により解析したが、MuLV の発現は野生型 B6 マウスと同様に *APOBEC3* 欠損個体でも検出されなかった。

（4）リンパ器官における LTR 変異型 MMTV の発現

胸腺や脾臓などのリンパ組織では、LTR 領域の一部を欠損した変異型 MMTV の転写産物が検出された（図 2）。これは外来性 MMTV の感染時に、T 細胞腫を誘発する LTR 変異株が出現するという報告に一致した。がんの発症を認めない *APOBEC3* 欠損マウスにおいても、生後半年を過ぎてから胸腺・脾臓で LTR 変異型 MMTV を発現する個体があった。

APOBEC3 はリンパ球にも乳腺上皮細胞にも発現しており、外来性 MMTV による乳癌発症過程には T 細胞での繰り返し感染が関与していることが示唆されている。本研究結果は、T 細胞における内在性

MMTV の再活性化を APOBEC3 が抑制することで細胞の遺伝子変異を阻止している可能性を示した。

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 7 件)

- ① Miyazawa M. Molecular evolution of physiologically functioning anti-retroviral APOBEC3 deaminases. *Uirusu*. 査読無 62 : 27-38. 2012. <http://dx.doi.org/10.2222/jsv.62.27>
- ② Li J, Hakata Y., Takeda E, Liu Q, Iwatani Y, Kozak CA, Miyazawa M. Two genetic determinants acquired late in mus evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog.* 査読有 8(1):e1002478. 2011. 10.1371/journal.ppat.1002478
- ③ Miyazawa M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Retrovirology*. 査読有 8 (Suppl. 2):O30, 2011. 10.1186/1742-4690-8-S2-O30
- ④ Ogawa T*, Tsuji-Kawahara S*, Yuasa T, Kinoshita S, Chikaishi T, Takamura S, Matsumura H, Seya T, Saga T, Miyazawa M. Natural killer cells recognize friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in Vivo. *J Virol.* 査読有 85:5423-35. 2011. 10.1128/JVI.02146-10. *equal contribution
- ⑤ Hayasaka N, Aoki K, Kinoshita S, Yamaguchi S, Wakefield J. K, Tsuji-Kawahara S. Horikawa K, Ikegami H, Wakana S, Murakami T, Ramabhadran R, Miyazawa M. and Shibata S. Attenuated Food Anticipatory Activity and Abnormal Circadian Locomotor Rhythms in *Rgs16* Knockdown Mice. *PLoS ONE*. 査読有 6: e17655. 2011. 10.1371/journal.pone.0017655
- ⑥ Tsuji-Kawahara S. Chikaishi T., Takeda E., Kato M., Kinoshita S., Kajiwara E., Takamura S., and Miyazawa M. Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic APOBEC3 and BAFF-R loci in Friend virus-infected mice. *J. Virol.* 査読有 84:6082-95. 2010. 10.1128/JVI.02516-09
- ⑦ Takamura S, Tsuji-Kawahara S. Yagita H, Akiba H, Sakamoto M, Chikaishi T, Kato,

M, Miyazawa M. Premature terminal exhaustion of friend virus-specific effector CD8(+) T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J Immunol.* 査読有 184:4696-707. 2010. 10.4049/jimmunol.0903478

[学会発表] (計 6 件)

- ① Miyazawa M., Tsuji-Kawahara S. *et al.* Rapid production of virus-neutralizing IgM antibodies and protection against lethal retroviral infection in mice deficient of activation-induced cytidine deaminase (AID). 24th Workshop on Retroviral Pathogenesis, Oct 24, 2012. Philadelphia PA
- ② Miyazawa M., Tsuji-Kawahara S. *et al.* A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Frontiers of Retrovirology*. Oct.3-5, 2011. Amsterdam, The Netherlands.
- ③ Miyazawa M., Tsuji-Kawahara S. *et al.* Host immune responses determine integration of either F-MuLV alone or F-MuLV plus SFFV in Friend virus leukemogenesis. The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis. Nov. 2-5, 2011. Montpellier, France.
- ④ Tsuji-Kawahara S. *et al.* Polymorphisms in mouse APOBEC3 influence the production of virus-neutralizing antibodies by altering the levels of retrovirus-induced B-cell dysfunction. 第 14 回国際免疫学会 2010 年 8 月 26 日 神戸市
- ⑤ Takamura S., Tsuji-Kawahara S., Miyazawa M. *et al.* Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8+ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. 第 14 回国際免疫学会 2010 年 8 月 26 日 神戸市
- ⑥ Hakata Y. *et al.* Rac2 が発揮する抗 HIV-1 活性の分子機構 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月 7-9 日 徳島市

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 佐智代 (KAWAHARA SACHIYO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60297629

(2) 研究分担者

宮澤 正顯 (MIYAZAWA MASA AKI)

近畿大学・医学部・教授
研究者番号：60167757
博多 義之 (HAKATA YOSHIYUKI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：30344500

(3)連携研究者

なし