

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF GENE ANALYSIS

1) Identification of Novel Physiological Functions of Human Papillomavirus E7: K. SASAKI, S. YOSHIDA, N. KAJITANI, A. SATSUKA, H. NAKAMURA and H. SAKAI

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses which replicate and induce hyperplasia in epithelial cells, both mucosal and cutaneous. HPVs are classified into 'low-risk' types (such as HPV-6 and -11) which cause benign warts and 'high-risk' types (such as HPV-16 and -18) which are associated with malignant tumors, especially cervical carcinomas.

The E7 protein of high-risk HPVs is considered to be one of the oncoproteins encoded by the viruses and has been reported to interact with a number of cellular proteins, including Rb-family proteins (pRb, p107 and p130). These interactions have been suggested to play roles in HPV-mediated cellular transformation or in the viral life cycle.

We carried out a yeast two-hybrid screen and identified MADD (MAP-kinase activating death-domain containing protein) and TRIP (TRAF-interacting protein) as additional binding partners of HPV-18 E7 and HPV-11 E7, respectively. They interacted with both E7s in vitro binding assay. They were previously reported to be involved in TNF signaling, which is one of the cytokine signalings important for the regulation of immune and/or inflammatory responses. We then examined the effects of E7 on TNF signaling and found that E7 promoted TNF-alpha-mediated apoptosis and suppressed TNF-alpha-induced ERK/MAPK and NF-kappa B activation in normal human fibroblasts. We are now investigating the detailed mechanism and physiological roles of those E7's effects.

ref: Nishimura, A. et al., *Microbes Infect.* (in press, 2006)

2) Modulation of HPV-infected Cell Proliferation and Invasion by oncogenic Ras Protein: S. YOSHIDA, K. SASAKI, A. SATSUKA, N. KAJITANI, H. NAKAMURA and H. SAKAI

The Ras proto-oncoprotein is activated in approximately 30% human cancers, and also activated in about 10% cervical cancer. Oncogenic Ras can transform established rodent cell lines but fails to transform primary cells. Transformation of primary cells also requires the cooperation of genes such dominant-defective forms of p53, adenoviral E1A, SV40 large T antigen, which facilitate the immortalization of cells. The expression of Ras in normal fibroblasts results in a G1 arrest that is correlated with an increased expression of p16^{INK4a} and p21^{CIP1/WAF}. The arrest is almost the same as the replicative cellular senescence. Ras is related to the cancer metastasis. Ras induces

matrix metalloproteases, which degrade cell matrix and are activated in aggressive cancer. Ras also activates rac and rho, upregulating cell motility. HPVs are small DNA viruses that require unscheduled S-phase entry in terminally differentiated epithelial keratinocytes for viral genome amplification. The HPV E7 protein binds and degrades pRb, inducing cell cycle progression through the G1-S transition. E7 abolishes G1 arrest induced by DNA damage, epithelial differentiation. E6 protein binds and degrades, cooperating with the ubiquitin ligase E6AP, cell cycle regulator p53.

First, we are investigating how Ras protein regulates cell proliferation and metastasis in the E6 or E7 (or E6/E7) expressed cells. We introduced Ha-ras protein overexpression on in HPV oncoproteins expressed cell lines. The established cell lines are analyzed in regard to the cell growth potential and the regulators for cell cycle checkpoints. We found that E7 expressed keratinocytes escape ras-induced senescence. It was indicated that pRb degradation was important for ras-induced senescence in keratinocytes. Second, we analyzed the effect of ras on the skin formation of HPV oncogenes expressed keratinocytes using the (organotypic) raft culture system. We found that E7 and Ha-ras expressed epidermis invaded basal layer. This invasion results from MMP2 and MT1-MMP induced by Ha-ras and MMP9 induced by E7. This invasion was suppressed by MEK inhibitor and MAPK inhibitor. It is indicated that HPV-infected cell acquires metastasis by ras activation through MAPK pathway.

ref: Ueno, T. et al., *Oncogene* (in press, 2006)

3) Molecular mechanisms of bystander cell death induced by HIV-1 infected cells: H. NAKAMURA, A. SATSUKA, N. KAJITANI, S. YOSHIDA, K. SASAKI and H. SAKAI

Human immunodeficiency virus type 1 is a causative agent for human AIDS. HIV-1 infection induces drastic decrease of CD4-positive T cell, which is considered one of major determinants for AIDS. Although the infection of HIV-1 directly causes the cell death, bystander apoptotic cell death is induced, resulting in the massive loss of CD4-positive T cells in the infected individuals. To clarify the bases of AIDS pathogenesis, it is essential to understand the biological mechanisms of the bystander cell death.

In order to investigate the molecular bases of the bystander cell death induced by HIV-1 infected cells, we have developed a novel assay system by which it is possible to analyze a effect of a single infected cell on the adjacent cells. By using the assay system, the key viral and/or cellular factors involved in the bystander cell death will be elucidated.

4) Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4 or E5: N. KAJITANI, A. SATSUKA, S. YOSHIDA, H. NAKAMURA, K. SASAKI and H. SAKAI

HPV infection begins in the basal cells of the epithelium, and as these cells divide, differentiate, and migrate toward the surface of the epithelium, the virus is able to complete its life cycle. The expression of E4 occurs in the upper layers of the epithelium, coordinating with the onset of virus genome amplification. E4 can induce the collapse of the cytokeratin filament networks, and it has been proposed that disruption of the keratin networks could facilitate viral egress. It is also known that E4 induce the modification of cell cycle. E5 is a highly hydrophobic membrane-bound protein, and influences signal transduction pathways. In addition to the major oncoproteins E6 and E7, E5 possesses weak oncogenic properties. But, it is not understood well about details of E4 and E5. We consider that E4 or E5 is associated with the activities involved in HPV specific lifecycle and with the transformation of the cells, so try to investigate novel functions of E4 or E5.

ref: Nakahara, T. et al., *J. Virol.* **76**: 10914-20, 2002; Nakahara T., et al., *J. Virol.* **79**: 13150-65, 2005

5) Mechanism of HPV life cycle: A. SATSUKA, N. KAJITANI, S. YOSHIDA, H. NAKAMURA, K. SASAKI and H. SAKAI

The tumorigenesis induced by human papillomavirus (HPV) infection is one of the models for multistage cancer development. However, the molecular mechanism has not been fully understood. Furthermore the details of the regulatory mechanisms for the HPV replication and gene expression in differentiating epithelium remains unclear, even by using an organotypic culture system (raft culture) that is used as a system capable of reproducing the differentiation dependent replication cycle of HPV.

In order to examine the molecular mechanism underlying the HPV replication and the cancer development, we construct the high risk and low risk HPV plasmid with high expression ability, and then analyze the viral replication and its effects on the host cells.

6) Regulation of canonical Wnt signaling pathway by Grb10, an adaptor protein for receptor tyrosine kinases----a likely mediator for interaction between Wnt signaling and growth factor-mediated signaling: N. TEZUKA, and S. YANAGAWA.

The canonical Wnt signaling pathway is highly conserved throughout the animal kingdom and controls a number of developmental processes. In addition, numerous mutations in components of the Wnt pathway, such as *apc*, *axin*, *b-catenin*, are oncogenic. The Grb10 protein (growth factor receptor-bound protein 10), on the other hand, is a cellular adapter protein, which can bind to numerous receptor (and non-receptor) tyrosine kinases, as well as several intracellular proteins. Grb10 has distinctive structural features including src-homology 2 (SH2)-, pleckstrin-homology

(PH)-, and RA-like-domains. Like other adapters, Grb10 have been shown to mediate the coupling of various cell surface receptors with specific downstream signaling pathways.

With yeast two hybrid screen using mouse Dvl2 (mouse homologue of *Drosophila Dishevelled*, major positive regulator of Wnt/wingless signaling pathway) as a bait, we have identified the Grb10 as a novel interacting protein of Dvl2. Indeed, interaction of Dvl2 and Grb10 was confirmed by co-immunoprecipitation experiments in tissue culture cells. Tcf-dependent luciferase reporter assay (specific assay for canonical Wnt pathway) in HEK293T cells revealed that overexpression of Grb10 protein severely suppresses Wnt3a-, LRP6 (low-density lipoprotein receptor related protein 6, a co- receptor for Wnt)-, and Dvl2- induced elevation of luciferase activities. In contrast, Tcf reporter activity induce by b-catenin was not affected by Grb10 expression, suggesting that Grb 10 functions upstream of b-catenin. Further more, the binding of Grb10 with LRP6 was found, indicating a molecular mechanisms underlining how Grb10 inhibit Wnt signaling. Upon stimulation with growth factors (such as insulin EGF, HGF etc), recruitment of Grb10 to intracellular domain of receptor tyrosine kinases are well documented. Thus we are exploring interaction between Wnt signaling and growth factor-mediated signaling through Grb10 adaptor protein.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology

Laboratory of Gene Analysis

柳川伸一，手塚紀夫：アダプター蛋白 Grb10 による Canonical Wnt シグナル伝達経路の制御. 第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005.

佐々木健太，吉田智志，中村博保，梶谷直子，佐塚文乃，酒井博幸：HPV 制御遺伝子の TNF α シグナル経路への影響に関する解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会，横浜，2005.

吉田智志，佐々木健太，上野孝治，酒井博幸：HPV 感染による多段階発がんモデルの検証. 第 64 回日本癌学会学術総会，札幌，2005

吉田智志，佐々木健太，上野孝治，梶谷直子，佐塚文乃，中村博保，酒井博幸：HPV 感染細胞における過形成誘導及び浸潤能獲得のメカニズムの解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会，横浜，2005

はじめに現在の研究室の構成を記載しておきます。スタッフは酒井・柳川の二人で、大学院生としては以前より研究室に在籍している佐々木君（生命 D2）、吉田君（医科学 D1）に加え、新しく中村君（医科学 D1）、梶谷さん（生命 M1）、佐塚さん（生命 M1）、手塚君（生命 M1）が参加することになりました。そこに技術補佐員として田畑さん、熊谷さん（ともに保健学科 2 回生）が加わっています。昨年度、生命 D3 だった上野君は、現在名市大で研究生として活躍しています。全体としては学生が増え、ずいぶん賑やかになりました。

本年度の大きな変化としては学生が増えたことの他に、研究室の引っ越しがありました。これまでは分子棟の 2 階に研究室があったのですが、現在は本館の 2 階に移動しています。昔からある古い機器やよく分からない試薬があり、研究室全員で大変な思いをしましたが、幸い他の多くの人の助力もあり、無事完了することが出来ました。今は新しい環境にも慣れ、各自いつも通りに実験に取り組んでいます。

（1）ヒトパピローマウイルス（HPV）感染による悪性腫瘍形成機構の解明

HPV は皮膚や粘膜などの上皮組織の基底細胞に感染し、感染部位に疣贅やコンジローマなどの腫瘍を誘発する病原因子である。感染した場合でも不顕性感染となる場合が多く、誘発された腫瘍も自然治癒する 경우가ほとんどであるが、まれに悪性腫瘍に進展することが知られている。特に子宮頸癌では、ほとんどの発症例で HPV の感染が確認され、HPV 感染は子宮頸癌発症の主要なリスクファクターであると考えられている。その他に、上咽頭がんや舌がんなどの HNSCC (head & neck squamous cell carcinoma) 発症への関与も注目されており、HPV はヒトを標的とした代表的な発がんウイルスの一つである。

HPV 感染による悪性腫瘍形成には、ウイルスのコードする E6 と E7 という二つの transforming gene が重要な役割を果たしている。それには主に、これらの遺伝子産物が細胞の主要ながん抑制遺伝子産物である p53 と pRb を不活化する機能が関与している。p53 と pRb は、いずれも細胞周期チェック機構に関与しており、DNA 損傷や過剰な増殖刺激、ストレスなどに応じて、細胞分裂を停止させ適切な細胞内環境の回復に機能し、若しくは細胞死を誘導することで異常細胞を除去する機構に関与している。E6 と E7 によりこれらのがん抑制機構が失われていることで、HPV 感染細胞は染色体異常の蓄積や、過剰な増殖刺激に対して寛容になり、その結果、変異を持った細胞が多く感染部位に蓄積し、その中から悪性形質を獲得した細胞が出現するものと考えられる。

感染初期に見られる良性腫瘍形成は、感染細胞数の増加を誘導し、ウイルス複製に有利に働いているが、同時に悪性形質の獲得にも重要な働きを持つ。我々は HPV の制御遺伝子を発現させたヒト角化細胞 (keratinocyte) で皮膚モデル培養系 (organotypic raft culture) を組立て、過形成誘導に関わる責任因子を検索した。その結果、E7 に強い活性が認められ、

またその機能には pRb の不活化が主に関与していることを示した。しかし、pRb 以外のポケットタンパクである p130 の発現抑制も上皮過形成の誘導にかかわっていることが明らかとなった。

HPV 感染細胞は悪性化するまでに 10 年以上の長い期間を要することが多い。この間に宿主遺伝子の変異が蓄積し、悪性形質を獲得すると考えられるが、主な責任遺伝子は同定されていない。我々はがん細胞で多く変異が認められる ras に注目し、ras 経路の活性化による悪性形質の獲得に関して検討した。通常の角化細胞で ras 経路を活性化すると premature senescence が誘導され、細胞増殖が停止する。この senescence は E7 による pRb 経路の不活化により回避することが可能であった。E7 と活性化 Ras を発現する皮膚モデル培養系では、上皮細胞の浸潤が確認できた。この浸潤能の獲得には MAPK 経路を介した MMP の活性化が関与している可能性が示された。

HPV 感染による細胞がん化を防ぐためには、HPV の感染・複製を抑制することが効果的であると考えられる。しかし HPV の複製・遺伝子発現の制御は、上皮細胞の分化に強く依存しており、通常の組織培養では HPV の生活環を再現できないために、その制御機構はほとんど分かっていない。我々は E6 や E7 以外の制御遺伝子、特に E4 と E5 に注目し、それらの生物活性の同定を薦めている。E4 に関しては、細胞周期調節に関与することを報告しているが、その分子機構は不明である。これらの機能を調べる上で、HPV の生活環を再現することが重要であり、我々は既に皮膚モデル培養系を用いて、HPV の複製を確認している。この系をさらに発展させるべく、独自の HPV レプリコンを構築し、効率よく HPV の複製・遺伝子発現機構を解析する手法を検討している。

(2) HIV-1 の病原性発現機構の解析

HIV-1 はヒトのエイズの主要な病原因子である。HIV-1 はレトロウイルスの仲間であるが、そのプロトタイプといえる MuLV (マウス白血病ウイルス) に比べると、多くの制御遺伝子を余分にコードしている。これらの遺伝子と宿主側因子の相互作用が、HIV-1 の標的細胞の規定や潜伏化、病原性などに関与していると考えられる。

現在は HIV-1 感染細胞による細胞死誘導機構の解明を進めている。特に、感染細胞周辺の CD4 陽性細胞が apoptosis 誘導によって細胞死する、Bystander cell death と呼ばれる細胞障害機構に関して、そのウイルス側の要因を明らかにすると同時に、そこに関与する宿主側因子の同定を目指した研究を行っている。ウイルス側の要因としては、Env, Nef, Vpr, Tat などが考えられており、そのなかで Vpr と Nef に関して検討を加えている。Nef に関しては当研究室で Vpu との機能的な関連が示されているので、Vpu に関しても、その機能発現メカニズムを解析している。

(3) 受容体型チロシンキナーゼのアダプター蛋白 Grb10 による Canonical Wnt シグナル伝達経路の制御

Wnt シグナル伝達経路は、動物の発生や形態形成あるいは癌化の過程において、重要な

役割を果たしている。柳川は、主に Canonical Wnt 経路の解析を行い、Casein kinase Ia が b-catenin/Arm をリン酸化し、その分解を促進している事 (EMBO J. 2002, Mol. Cell. Biol., 2004)などを明らかにしてきた。 本年は、Wnt 経路の構成員 Dvl2 を Bait とした Yeast two hybrid screen を行い、Dvl2 結合蛋白として新たに Growth factor receptor bound protein 10 (Grb10) 蛋白を同定した。Grb10 蛋白は、受容体型チロシンキナーゼ (Insulin, IGF-1, EGF, FGF, HGF の受容体など)に結合するアダプター分子であり、Pro-rich region, Ras-associated-like domain, 蛋白の膜局在を促進する Pleckstrin homology (PH) domain,そしてホスホチロシンに結合する SH2 domain など特徴的な機能ドメインを持つ。しかし Insulin や IGF-1 による細胞増殖シグナルの負の制御因子である事を除けば、Grb10 の機能は不明な点が多く、それ故 Grb10 は、謎のアダプター分子と呼ばれている。今回この Grb10 が Canonical Wnt 経路を強く抑制する事を初めて明らかにした。すなわち Wnt3a, Dvl2 あるいは Wnt の co-receptor LRP6 の強制発現により誘導された TCF 依存性の転写の活性は、Grb10により強く阻害されるが、一方、恒常的活性化型の b-catenin による TCF 依存性の転写活性化は Grb10 による影響を全く受けなかった。従って Grb10 の作用点は、明らかに b-catenin より上流であった。また Grb10 による Wnt 経路の抑制には、その SH2 domain が必要であること、そしてさらに Grb10 は LRP6 とも結合する事も見出した。現在 Grb10 を介して Wnt 経路と他の分化増殖因子のシグナル伝達経路とが、クロストークしている可能性につき詳細に解析している。



(前列左より) 酒井, 佐々木, 梶谷, 佐塚, (上段) 手塚, 柳川, 中村, 吉田