

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 cause disease in epithelial surfaces, 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, 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. These interactions were also confirmed by in vitro binding assay, and the binding affinities were different among E7s from several HPV types. 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- α -mediated apoptosis and suppressed TNF- α -induced ERK/MAPK and NF- κ B activation in normal human fibroblasts. We are now investigating the detailed mechanism and physiological roles of those E7's effects.

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

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. It is understood that HPV infection alone is not sufficient for cancer formation. Cervical carcinogenesis is considered as the multi-step process accompanied by host mutagenesis. Ras, that is host 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. Ras-induced transformation of primary cells requires the cooperation of genes, such as 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. Mutated Ras is detected in high-grade cervical lesion. Ras induces matrix metalloproteases, which degrade extra-cellular matrix and are activated in aggressive cancer. Ras also activates rac and rho, up-regulating cell motility. We are investigating how Ras protein regulates cell proliferation and metastasis in the E6 or E7 (or E6/E7) expressed cells.

First, we introduced active-form of H-ras expression in primary cells expressing HPV oncoproteins, and analyzed the cell growth potential and the regulators for cell cycle checkpoints. We found that E7 expressed keratinocytes could escape ras-induced senescence. It was indicated that pRb pathway was important for ras-induced senescence in keratinocytes. Second, we analyzed the effect of ras activation on the HPV-infected epidermis using the (organotypic) raft culture system. We found that E7 and H-ras expressed epidermis invaded basal layer. This invasion resulted from up-regulations of MMP2 and MMP9 by H-ras and E7, respectively. This invasion was suppressed either by MEK or MMP inhibitors. E7 and constitutive active MAPK (MEK, MKK7, or MKK6) expressed epidermis did not reproduce the invasion induced by both E7 and H-ras expressions completely. It is suggested that HPV-infected cell could acquire metastasis by ras activation.

3) Molecular mechanism 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 (HIV-1) infection causes rapid depletion of CD4-positive T cells, which is one of the hallmarks of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Although the viral infection directly causes the cell death, it is presumed that bystander apoptotic cell death is also induced by the infected cells, resulting in the massive loss of CD4-positive T cells in infected individuals. Thus, studying the biological mechanisms of bystander effect of infected cells is essential to understand AIDS pathogenesis.

In order to investigate the molecular bases of bystander cell death induced by HIV-1 infected cells, we have developed a novel assay system by which it is possible to analyze an 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

The primary target of HPV infection is the basal cells of the epithelium, and as these cells divide, differentiate, and migrate toward the surface of the epithelium, the virus switches its lifecycle to the late phase of infection; viral genome amplification and virion production. The expression of E4 occurs in the upper layers of the epithelium, coordinating with the onset of virus genome amplification. It has been proposed that disruption of the keratin networks by E4 could facilitate viral egress. It is also known that E4 induces the modification of cell cycle. E5 is a highly hydrophobic membrane-bound protein, and influences cellular signal transduction pathways. But, the details of E4 and E5 function remain unclear. We consider that E4 or E5 is associated with the activities involved in HPV specific lifecycle and with the virus-induced tumor formation, so try to investigate novel functions of E4 or E5. We performed yeast two-hybrid assays and got several candidate proteins as which interacts with E4 or E5. We carry on the analysis about the interactions between the each candidates and E4 or E5.

5) Functional Studies on Differentiation-Dependent 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 of the cancer development has not been fully understood. Furthermore the details of the virus life cycle, especially the regulatory mechanism for the virus 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 life cycle of HPV.

In order to examine the molecular mechanism underlying the HPV life cycle, we established the system that could support HPV replication effectively, then we constructed mutant plasmids for viral regulatory genes with full-length HPV. We try to investigate the HPV life cycle by this system.

6) Growth factor receptor-bound protein 10 inhibits canonical Wnt signaling through interaction with LRP6, the Wnt co-receptor protein: Norio Tezuka and Shin-ichi Yanagawa

Wnt signaling regulates a variety of adult and developmental processes and mutations in

several components of the canonical Wnt pathway are oncogenic. In the canonical Wnt pathway, a key regulatory step is the phosphorylation and degradation of the transcription co-activator β -catenin. Without the stimulation of Wnt, β -catenin is assembled into the Axin complex, where it is phosphorylated before being recruited to the ubiquitin-proteasome pathway for degradation. It is generally accepted that Axin binds to LRP6 in a Wnt-dependent manner and the formation of this LRP6-Axin complex leads to the sequestration of Axin's function in the degradation of β -catenin.

Growth factor receptor-bound protein (GRB) 10, GRB7, and GRB14 constitute a structurally related family of adapter proteins which has no intrinsic enzymatic activity but share numerous motifs associated with protein and lipid binding. These motifs are; the carboxyl (C)-terminal SH2 (src homology 2) domain, the BPS (between the PH and SH2) domain which is unique among this family of proteins, the PH (pleckstrin homology) domain facilitating membrane localization of the proteins, the RA (Ras-association)-like domain, and a proline-rich region. The binding of GRB10 to numerous activated tyrosine kinase receptors, such as insulin receptor, the insulin like growth factor I receptor has been demonstrated thus GRB10 has been implicated in the binding to, and suppression of signals from, the insulin receptor and insulin like growth factor I receptor.

To identify protein partners that regulate LRP6 signaling, we performed a yeast two-hybrid screen with the intracellular domain of LRP6 as bait and found that GRB10 binds to LRP6. GRB10 overexpression severely suppressed Wnt3a-, LRP6-, and Dvl-2-induced but not β -catenin-induced TCF-dependent-reporter activities in HEK293T cells, suggesting that GRB10 functions upstream of β -catenin. Actually, GRB10 overexpression attenuated the Wnt3a-induced accumulation of β -catenin. Furthermore, RNAi-mediated down-regulation of endogenous GRB10 protein stimulated Wnt3a-induced TCF-dependent reporter activities, indicating that GRB10 is indeed a novel negative regulator of the Wnt signaling. To further analyze LRP6-GRB10 interaction, we performed experiments involving a series of progressive deletions of GRB10. Co-immunoprecipitation showed that the central portion of GRB10 constitutes the LRP6-binding site, but a carboxyl-terminal src homology 2 domain as well as the 68 most amino-terminal amino acids of GRB10 are required to inhibit Wnt3a- and LRP6-induced TCF-dependent reporter activities effectively. Upon GRB10 overexpression, the amount of Axin co-immunoprecipitated with LRP6 decreased markedly, suggesting that GRB10 interferes with the binding of Axin to LRP6. This may be the molecular mechanisms of by which the overexpression of GRB10 severely suppresses Wnt3a- and LRP6-induced TCF-dependent reporter activities. These results suggest possible cross-talk between tyrosine kinase receptor-mediated signaling and the canonical Wnt signaling through the adaptor protein GRB10.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology
Laboratory of Gene Analysis

- Nishimura, A., Nakahara, T., Ueno, T., Sasaki, K., Yoshida, S., Kyo, S., Howley, P.M. and Sakai, H.: Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells. *Microbes Infect.* **8**: 987-993, 2006.
- Ueno, T., Sasaki, K., Yoshida, S., Kajitani, N., Satsuka, A., Nakamura, H. and Sakai, H.: Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene* **25**: 4155-4164, 2006.
- Lee, JS., Thomas, DM., Gutierrez, G., Yanagawa, S., and Hinds, PW. HES1 cooperates with pRB to activate RUNX2-dependent transcription. *J Bone Miner Res.* **21**: 921-933, 2006.

-
- 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 遺伝子産物の TNF α シグナル経路への影響. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006.
- 吉田智志, 佐々木健太, 梶谷直子, 佐塚文乃, 中村博保, 酒井博幸 : HPV 感染による多段階発がんモデルの検証, 第 65 回日本がん学会学術総会, 横浜, 2006.
- 吉田智志, 佐々木健太, 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および浸潤能獲得のメカニズムの解析, 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006.

今年度は昨年からメンバーの変更はありませんが、紹介のために、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、大学院生としては生命科学研究科に所属する佐々木健太 (D3), 梶谷直子 (M2), 佐塚文乃 (M2), 手塚紀夫 (M2)、そして医学研究科に吉田智志 (D2), 中村博保 (D2)、合わせて 6 名が在籍しています。そこに昨年度から技術補佐員として実験の手伝いをしてきている田畑さん, 熊谷さん (ともに保健学科 3 回生) が加わっています。

(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場合がほとんどであるが、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「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をすすめるか、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。

E6 と E7 は細胞がん化に関わるが、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 感染症は代表的な STD (Sexually Transmitted Disease : 性感染症) であり、広く蔓延していることが知られている。そのため、HPV 感染による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。我々は既に皮膚モデル培養系を用いて、HPV の複製を組織培養下で再現している。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。また一方で、機能のよく分かっていないウイルス制御遺伝子、特に E4 と E5 に注目し、それらの生物活性の同定をすすめている。これらの遺伝子機能から、ウイルス複製の調節機構を探り、抗ウイルス剤開発の標的を見出したい。

(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個体内での潜伏化、病原性などに関与していると考えられる。

私たちの研究室では HIV の制御遺伝子の生物活性に興味を持ち研究を行っているが、現在は HIV-1 による細胞死誘導機構の解明も進めている。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) 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 I α が β -catenin/Arm をリン酸化し、その分解を促進している事 {EMBO J. 21,32353, (2002), Mol. Cell. Biol., 24, 1212, (2004)} などを明らかにしてきた。柳川、手塚は、2005年に 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。2006年に詳細な解析を行った結果、Grb10 は Wnt の co-receptor である膜貫通タンパク Low density lipoprotein receptor related protein 6 (LRP6)とも結合する事を見出した。Grb10 蛋白は、受容体型チロシンキナーゼ (Insulin, IGF-1 の受容体など)に結合するアダプター分子として見出され、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。Grb10 の主な機能としては、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が知られている。

我々は、Grb10 が Canonical Wnt 経路を強く抑制する事を明らかにしてきた。すなわち

Wnt3a、Dvl2 あるいは LRP6 の強制発現により誘導された TCF 依存性の転写活性化を、Grb10 は強く阻害するが、一方、恒常的活性化型の β -catenin の強制発現による TCF 依存性の転写活性化を全く抑制する事は出来なかった。従って Grb10 の作用点は、 β -catenin より上流であった。この結果と呼応して、Grb10 を強制発現した細胞においては、正常細胞に比べ、Wnt3a 刺激による β -catenin の誘導は著しく押さえられた。さらに RNAi によって Grb10 の発現を抑制すると、Wnt3a より誘導された TCF 依存性の転写活性の高進が見られた。従って Grb10 は正常細胞に於いて、実際に Wnt 経路の負の制御因子として働いている事が明らかになった。LRP6 は Grb10 の分子中央部に結合するのであるが、Grb10 による Wnt 経路の抑制には、その C-末端の SH2 domain 及び N-末端が必要であった。

Wnt 刺激によって、LRP6 の細胞質ドメインに Axin がリクルートされると、Axin は β -catenin 分解複合体の Scaffold としての機能を発揮出来なくなり、その結果、 β -catenin の細胞質内への蓄積が生じる事が知られている。免疫共沈殿法により、我々は、Wnt 依存性の LRP6 への Axin の結合が、Grb10 の強制発現によって阻害される事を見出した。LRP6 の細胞質ドメインを巡って Grb10 と Axin が競合しているものと考えられ、これが Grb10 による Wnt 経路の抑制の分子機構であろうと推測している。