

(2009) *PLoS Pathog.*, e1000362.

- 13) Soehnlein, O., Weber, C., & Lindbom, L. (2009) *Trends Immunol.*, 30, 538–546.  
 14) Rittner, H.L., Brack, A., & Stein, C. (2008) *Br. J. Anaesth.*, 101, 40–44.

小林 芳郎<sup>1</sup>, 佐々木 宗一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東邦大学理学部生物分子科学科分子医学部門,

<sup>2</sup> 金沢大学がん進展制御研究所分子生体応答研究分野)

A novel function of neutrophils via opioid peptides: maintenance of estrous cycle and regulation of pain

Yoshiro Kobayashi<sup>1</sup> and Soichiro Sasaki<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Division of Molecular Medicine, Department of Biomolecular Science, Faculty of Science, Toho University, 2-2-1, Miyama, Funabashi 274-8510, Japan; <sup>2</sup>Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan)

## 難病発症に関わる内在性レトロエレメントの活性化とその機構

### はじめに

これまでの生命科学は、主としてタンパク質をコードする遺伝子とその産物の機能解析を基本として行われてきた。しかし2001年にヒトゲノムの全配列が明らかにされ、タンパク質をコードする領域はヒトゲノムの高々約1%で、残りの99%は非翻訳領域から構成されていることがわかった<sup>1)</sup>。すなわち、いわゆる「遺伝子」の解析だけでは生命現象の全貌を理解することは難しいことが容易に想像される。一方、「動き回りうる因子」(TPエレメント: トランスポゾン)は全ゲノムの約半分を占め(~45%), 非翻訳領域の主要な構成要素である。TPエレメントは繰り返し構造をとるため、これまでのゲノム解析ではいわゆる“ジャンク配列”と隅に追いやられてきた感があるが、近年、TPエレメントの動きが様々な疾病発症に関与する可能性が提唱されるようになった<sup>2,3)</sup>。そこで本稿では、TPエレメントの一つである long interspersed element-1 (LINE-1 以下 L1) について、特に体細胞における動きに関与する細胞内外の因子について述べるとともに、疾患発症における L1 の関与の可能性について紹介する。

#### 1. ヒトゲノム中に最も多く存在する L1

L1 は全ゲノムの 17% を占め、一細胞中に約 52 万コ

ピー存在する<sup>4)</sup>。ほとんどの L1 は構造変異を有しているため、機能性を示す L1 はきわめて少ない。しかし、機能性を保持した L1 が一細胞あたり 80~100 コピー存在することも報告されており、これらは「コピー&ペースト」によってゲノム間を動くことができる。特にこのうちの 10% はより機能的で、L1 全体の動きの約 80% をカバーすると試算されている。そして、正常細胞内で L1 の動きは約 100 回の出生に 1 回程度の頻度であると考えられている [レトロトランスポジション (retrotransposition), 以下 RTP]<sup>5)</sup>。L1-RTP により、ゲノム構造や遺伝子発現様式は変化し、出現した新しい遺伝形質はゲノム内に保存され次世代に伝播される<sup>6)</sup>。

L1 がヒトゲノム中を動くという事実は、血友病 A の原因である血液凝固第 VIII 因子遺伝子の解析で発見された<sup>1)</sup>。その後、血液凝固第 VIII 因子遺伝子以外でも、L1 挿入による遺伝子変異はこれまで多数見いだされており、疾患発症との関連性も指摘されている。例えば、筋ジストロフィーや慢性肉芽腫症をはじめとする伴性劣性遺伝形質を示す疾患の発症に L1-RTP が関与していることが報告された (図 1A)。ヒトにおける L1 が血友病 A 疾患の突発例に見いだされたことから、これまで L1 の動きに関する解析は、主として胚細胞や胎生初期の胎児組織を対象に行われてきた。しかし、近年、様々なヒト腫瘍で L1-RTP が誘導されている例が見いだされ、特に大腸がんや乳がん組織において、がん抑制遺伝子である APC やがん遺伝子である c-myc 遺伝子内に、L1 が挿入されていることが報告された (図 1A)<sup>1)</sup>。発がんとの関連では、腫瘍細胞の L1 の 5' 非翻訳領域 (untranslated-region: UTR) が脱メチル化状態になっていることや、L1 の発現を抑制すると腫瘍細胞の増殖や分化能が低下することが知られている。

#### 2. L1 の構造と転移機構

L1 は全長約 6 kB からなり、約 900 塩基の 5' 側プロモーター領域である UTR と二つのタンパク質である ORF1 および ORF2 (open reading frame: ORF) をコードする。L1 は 5' UTR 上の RNA pol II プロモーターから mRNA が転写された後、ORF1 と 2 の作用に依存して逆転写され、新たなゲノム部に挿入される<sup>4)</sup>。ORF1 は塩基性に富むタンパク質で、RNA と複合体 (RNP) を形成し、核内へ運搬する。一方、ORF2 のエンドヌクレアーゼ活性によってゲノム上の 3'-A/TTTT-5' 配列部位が切断されると、L1 mRNA のポリ A テールが切断部位のポリ T ストレッチにアニールし、ORF2 の逆転写酵素活性によって逆

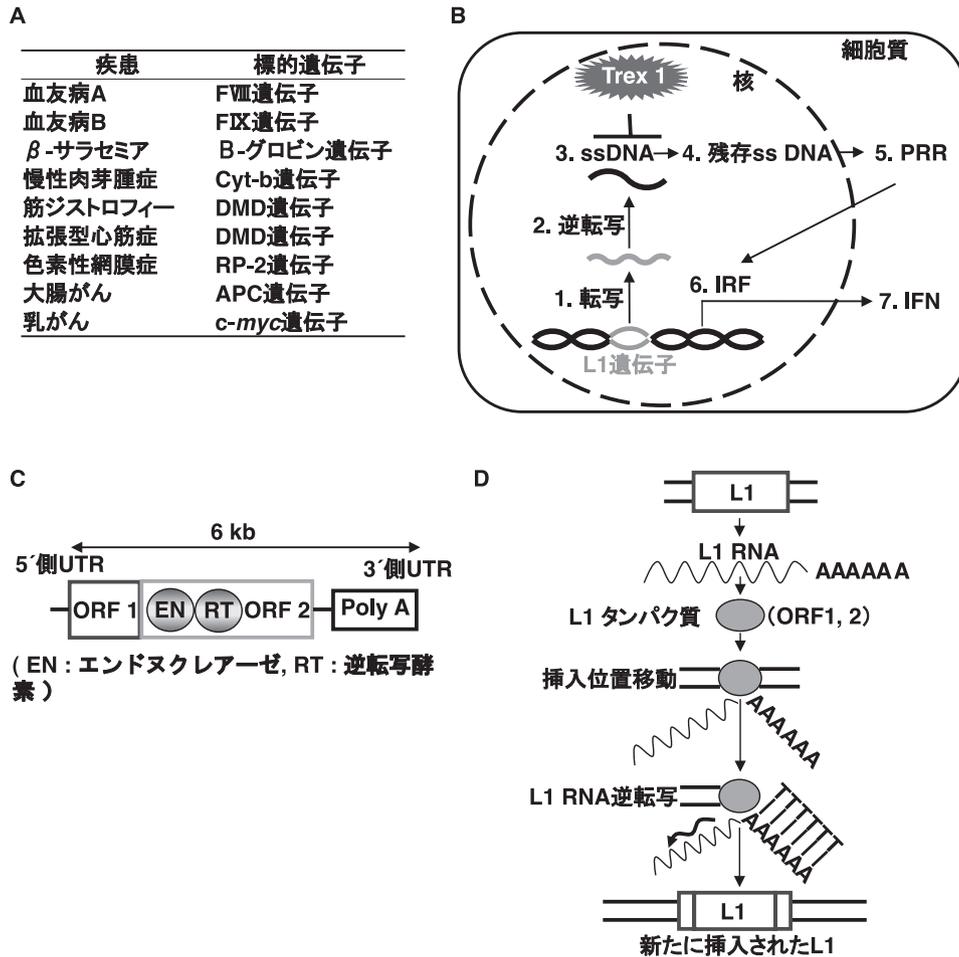


図1 L1の特性

(A) 伴性劣性遺伝を示す形質はL1-RTPの標的となる<sup>1)</sup>。(B) L1-RTPはインターフェロン(IFN)を産生して傷害性T細胞を誘導し、自己免疫疾患発症の原因となる。L1遺伝子が転写、逆転写されてssDNAが産生されるとTrex1が働き、ssDNAを分解する。しかし、遺伝的にTrex1が機能しない場合、ssDNAが処理されず、PRRがそれを認識してIFNを産生するシグナルが活性化する。ssDNA: 一本鎖DNA, Trex1: Three prime repair exonuclease 1, PRR: Pattern recognition receptor, IRF: Interferon regulatory factor。(C) L1の構造。ORF1とORF2の二つのタンパク質から構成されている。(D) L1のtarget-DNA primed reverse transcription (TPRT)によるゲノム挿入機構。

転写される。相補鎖が合成され、次いでゲノムに挿入されるとL1-RTPは完了する。このようなL1-RTPの機構は、target primed reverse-transcription (TPRT)と呼ばれ、カイコ *Bombyx mori* のレトロトランスポジションについて明らかにされた(図1D)<sup>4)</sup>。

L1-RTPはDNA二重鎖切断(DNA double strand break, 以下DSB)、金属イオンによる酸化ストレスやL1の5'UTRの脱メチル化で誘導されることが知られている。しかし、どのような細胞内シグナルに依存して、L1-RTPが

誘導されるのかについては明らかにされていない。

一方、L1の動きと自己免疫疾患に関する新しい知見が報告された(図1B)<sup>7)</sup>。すなわち、正常細胞には、内在性レトロエレメントに由来したDNAを処理する作用が存在し、これが破綻すると、一本鎖DNA(single strand DNA: ssDNA)などの余剰の核酸によってI型インターフェロンの産生と細胞傷害が誘導され、自己免疫疾患の発症誘因となる可能性が考えられる<sup>7)</sup>。

### 3. FICZによるL1の活性化機構

筆者らは、どのような細胞内シグナルでL1-RTPが誘導されるのかを明らかにするため、L1-RTP検出システムを立ち上げ、培養細胞系で様々な発がん物質、環境因子、生体内物質によるL1-RTP誘導能を解析した。その中でも、FICZ (6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole) について詳細な解析を行った<sup>8)</sup>。FICZは、トリプトファンが紫外線照射を受けて生成される化合物であり、basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) 型の転写因子に含まれる芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor: AhR) の生理的リガンドであると考えられており、実際、ヒト尿中に検出される<sup>9)</sup>。FICZは、AhR依存的に薬物代謝酵素のCYP1A1の発現を転写レベルで誘導することが知られている。また、FICZはCD4<sup>+</sup>T細胞の一つであるTh17の分化誘導を促進する。

培養細胞を用いた実験から、FICZはピコモルレベルという非常に低濃度でL1-RTPを誘導し、その頻度は10<sup>4</sup>から10<sup>5</sup>個の細胞に1個程度であった。ヒト体内にはトリプトファンが70 μM存在し<sup>10)</sup>、蛍光灯のもとで作業を続けると、μMオーダーものFICZが体内で産生される。さらに、阻害剤やsiRNAを用いた実験を行った結果、FICZのL1-RTP誘導機序は、AhR依存的ではなくAhR核輸送タンパク質1 (ARNT1) 依存的に誘導することが示

唆された。また、FICZはmitogen-activated protein kinase (MAPK) とcAMP-responsive element-binding protein (CREB) 依存的にL1-RTPを誘導することが示唆された。さらに、FICZはL1のORF1とARNT1を相互作用させ、L1-RTP誘導時にはMAPK依存的にORF1のクロマチンリクルートを誘導した。このように、FICZはARNT1と相互作用し、その下流のMAPKを活性化してL1-RTPを誘導することが考えられた (図2A)<sup>8)</sup>。

### 4. 発がん過程でL1は活性化される

筆者らは、L1を導入したL1トランスジェニックマウス (hL1-EGFPマウス) を作製した<sup>11)</sup>。そして、hL1-EGFPマウスに7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)/12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を塗布して皮膚がんを形成させ、腫瘍を解析すると15個の腫瘍中13個でL1-RTPが誘導されていることを認めるとともに、免疫組織化学解析で腫瘍マーカーのphosphorylated signal transducer and activator of transcription (p-Stat3) とL1-RTPの指標であるEGFPの発現が同一の細胞で検出されることを報告した。すなわち、がん細胞内でL1-RTPが誘導されることが明らかになった。また、siRNAを用いた培養細胞の実験から、DMBAのL1-RTPは、AhR, ARNT1依存的であるが、TPAはAhR, ARNT1依存的ではないことが示唆された。TPAのL1-RTPは上皮増殖因子受容体 (epidermal growth

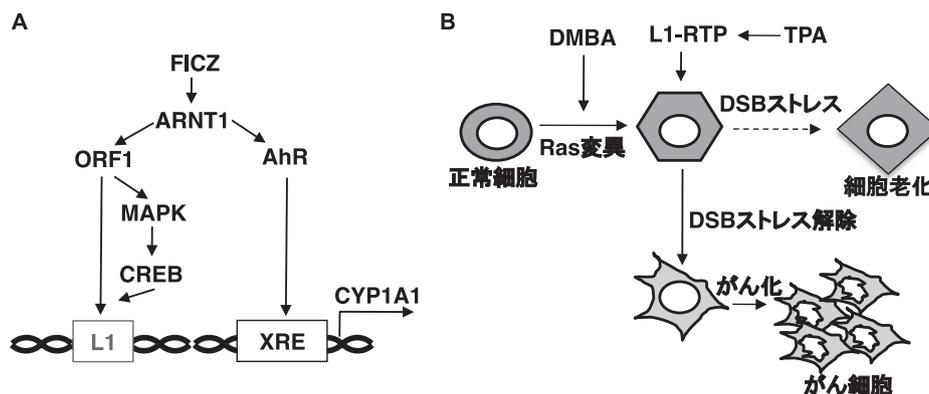


図2 L1-RTPシグナル機序と発がん過程への関与

(A) FICZのL1-RTP誘導機序。FICZはAhRやARNT1と複合体を形成し、薬物代謝酵素CYP1A1を誘導することが知られている。FICZのL1-RTP誘導はARNT1依存的に誘導され、ORF1とARNT1が会合し、MAPKや下流のCREBを活性化してL1-RTPを誘導する。(B) DMBA/TPAによる二段階発がんの機構。DMBAはRas変異を誘導し、細胞を形質転換された後に、DMBAによるDSBストレス(ATM依存的なDNA損傷シグナル)が持続すると、細胞は老化する。DSBストレスが解除されると、細胞はがん化する。TPAはこのDSBストレスをL1-RTPを誘導することで解除し、がん化を促すプロモーターになっている可能性が示唆される。

factor receptor : EGFR) と細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase : ERK) 依存的に誘導された<sup>11)</sup>。

DMBA/TPA 二段階発がん実験から、発がん過程に L1 の活性化が関与することが示唆された。重要なこととして、正常細胞における Ha-ras 遺伝子の活性化は、血管拡張性失調症変異 (ataxia telangiectasia mutated : ATM) 依存的に細胞の増殖停止を誘導する<sup>12,13)</sup>。ATM 依存的なシグナルの活性化 (DSB シグナル) は、細胞の老化現象を誘導し、がん化には DSB シグナルの解除が必要であると考えられる<sup>12,13)</sup>。マウスの発がん実験過程では、DMBA をマウスの皮膚に 1 回塗布し、1 週間後から週 2 回 TPA の塗布を継続することで、皮膚がんが形成される。一方、DMBA をマウスの皮膚に、週 1 回塗布あるいは TPA を週 2 回塗布した同一個体のマウスの皮膚を 1 週間後に解析すると、DMBA 塗布群では L1-RTP の誘導を認めなかったが、TPA 塗布群では L1-RTP 誘導が検出された。この事実は、DMBA/TPA によって誘導された腫瘍組織の L1-RTP は、TPA 塗布によって誘導されたことを示唆する (図 2B)<sup>11)</sup>。

筆者らは、bHLH/PAS ファミリーに含まれる AhR のリガンド物質によって誘導される L1-RTP を解析した。環境汚染物質で発がん性の 3-MC (3-methylcholanthrene) や B[a]p (benzo[a]pyrene) も AhR 依存的に L1-RTP を誘導した<sup>11)</sup>。加熱食品中に存在する発がん物質である 2-amino-1-methyl-6-phenyl-4,5-bisimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) や 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) も AhR 依存的に L1-RTP を誘導した (未発表データ)。AhR の代表的リガンド物質であるダイオキシン TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) は L1-RTP を誘導しなかった。筆者らの解析結果から、L1-RTP を誘導する発がん性物質は全て AhR 依存的に L1-RTP を誘導することが示唆された。L1 と AhR はともに幅広い生物種に保存されており、生命現象に深く関与している。大変興味深いことに、L1 の構成タンパク質の一つである ORF1 は、AhR と恒常的に相互作用することを免疫沈降による解析で見いだした (未発表データ)。発がん物質が作用することで、L1 と AhR より下流のシグナル経路が活性化され、ゲノム再編が誘導されることが考えられる。

## 5. L1-RTP とゲノム不安定性

ヒトゲノムには、L1 以外にも SINE-VNTR-Alu (SVA) や Alu 配列などの内在性レトロエレメントが存在し、L1 が活性化されると、これらのレトロエレメントも転移能が活

性化することが知られている<sup>14)</sup>。通常、体細胞ではエピジェネティックな抑制と転写後の抑制が働いて、レトロエレメントの動きは抑制されている。筆者らの発見した発がん物質や低分子化合物によって、L1 が活性化されると、SVA や Alu も活性化し、ゲノム全体の再編や不安定性が誘導されることで、疾患発症に関与することが考えられる。また、Alu-Alu 間での組換えや、非対立遺伝子相同組換えによって、ゲノム異常が誘導されることも示唆されている<sup>15)</sup>。このように、我々のゲノムの大半を占めるレトロエレメントは、ゲノムの恒常性維持と疾患発症に密接に関連している。

## おわりに

L1-RTP は様々な低分子化合物や発がん物質によって誘導されることがわかり、自己免疫疾患発症や発がんとの関連性も、今後の実験によって明らかになることが期待される。筆者らの研究によって、化合物ごとに、それぞれ異なる因子を L1-RTP 誘導時に必要としていることが明らかになった。ランダムに転移すると考えられていた L1 や他のレトロエレメントは、外来因子や幹細胞の多様性獲得時に様々なシグナル経路を使って、遺伝子発現機能調節のために部位特異的に転移する可能性が考えられる。今後、L1 挿入箇所の解析を発がん機序や自己免疫疾患発症、神経機能発達など、機能ごとに明らかにする必要がある。これまで、“ジャンク配列”とされてきたレトロエレメントは、様々な生命現象や疾患発症に関与することが明らかになってきた。様々な機能をもった遺伝子の発現制御を統率しているのは、このようなレトロエレメントである可能性も考えられる。我々のゲノムに存在するレトロエレメントは、何百万年も前から良く保存されてきた。ヒトのレトロエレメントは、神経幹細胞の分化多様性に関与する一方で、難治疾患発症にも密接に影響する。今後もレトロエレメントが、我々の生命現象に及ぼす影響を詳細に解析する必要性がある。

- 1) Bannert, N. & Kurth, R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Suppl.* 2, 14572-14579.
- 2) Muotri, A.R., Chu, V.T., Marchetto, M.C., Deng, W., Moran, J. V., & Gage, F.H. (2005) *Nature*, 435, 903-910.
- 3) Coufal, N.G., Garcia-Perez, J.L., Peng, G.E., Yeo, G.W., Mu, Y., Lovci, M.T., Morell, M., O'Shea, K.S., Moran, J.V., & Gage, F.H. (2009) *Nature*, 460, 1127-1131.
- 4) Goodier, J.L. & Kazazian, H.H. Jr. (2008) *Cell*, 135, 23-35.
- 5) Brouha, B., Schustak, J., Badge, R.M., Lutz-Prigge, S., Farley, A.H., Moran, J.V., & Kazazian, H.H. Jr. (2003) *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA.*, **100**, 5280–5285.
- 6) Han, J.S., Szak, S.T., & Boeke, J.D. (2004) *Nature*, **429**, 268–274.
  - 7) Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., & Medzhitov, R. (2008) *Cell*, **134**, 587–598.
  - 8) Okudaira, N., Iijima, K., Koyama, T., Minemoto, Y., Kano, S., Mimori, A., & Ishizaka, Y. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 18487–18492.
  - 9) Kewley, R.J., Whitelaw, M.L., & Chapman-Smith, A. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 189–204.
  - 10) Suzuki, Y., Suda, T., Furuhashi, K., Suzuki, M., Fujie, M., Hahimoto, D., Nakamura, Y., Inui, N., Nakamura, H., & Chida, K. (2010) *Lung Cancer*, **67**, 361–365.
  - 11) Okudaira, N., Goto, M., Yanobu-Takanashi, R., Tamura, M., An, A., Abe, Y., Kano, S., Hagiwara, S., Ishizaka, Y., & Okamura, T. (2011) *Cancer Sci.*, **102**, 2000–2006.
  - 12) Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C.L., Dyrskjot, L., Ørntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J., & Gorgoulis, V.G. (2006) *Nature*, **444**, 633–637.
  - 13) Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garré, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G., & d'Adda di Fagnana, F. (2006) *Nature*, **444**, 638–642.
  - 14) Hancks, D.C. & Kazazian, H.H. Jr. (2010) *Semin. Cancer Biol.*, **20**, 234–245.
  - 15) Belancio, V.P., Roy-Engel, A.M., & Deininger, P.L. (2010) *Semin. Cancer Biol.*, **20**, 200–210.

奥平 准之, 石坂 幸人

(国立国際医療研究センター研究所難治性疾患研究部)

Activation and mechanism of endogenous retroelement in intractable diseases

Noriyuki Okudaira and Yukihito Ishizaka (Department of Intractable Diseases, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)