

20. CpGメチル化によるHIVの潜伏感染と再活性化制御の解析

協力研究者 渡邊俊樹

東京大学医科学研究所病理学研究所 助教授

研究要旨：HIVの潜伏感染と再活性化におけるCpGメチル化の意義を検討した結果、LTRの転写活性がCpGメチル化により著明に抑制され、慢性感染細胞やHIVトランスジェニックマウスにおけるウイルス遺伝子の発現レベルがLTRのメチル化の程度と相関すること、活性化刺激によりCpGの脱メチル化が誘導されることなどを明らかにした。更に、HIVトランスジェニックマウスでのウイルス遺伝子再活性化には細胞周期の進行=DNA合成が必要条件であることを見出し、活性化刺激による脱メチル化が維持メチル化酵素Dnmt1の活性阻害を介することを明らかにした。さらに、この誘導に際して、LTRU3内のCREB/AP-1配列内のCpGが特異的に脱メチル化されること、この部位に非メチル化CpG配列特異的に結合する因子の存在を明らかにした。

A. 研究目的

HAART療法はAIDS発症予防には有効だが、潜伏感染HIVには無効であることが明らかにされた。従って、潜伏感染HIVの排除が根治的治療法の開発における重要課題である。

細胞への感染後にウイルス遺伝子の発現が抑制され潜伏するのは、多くのウイルスに見られる基本的ライフサイクルである。しかし潜伏感染の成立機序とその再活性化制御機構に関する知見は乏しい。本研究では、広く遺伝子発現の制御に関与するDNAのCpGメチル化が、HIVの潜伏感染においても重要な意義を持つとの仮説に基づき、HIVの再活性化の分子機構は、細胞外からのシグナルによるstable repression complex (MeCP2-mSin3A-HDACs複合体)の解除と、脱メチル化誘導によることを示すと共に、その分子機序を明らかにする事を目指す。

B. 研究方法

in vitroのHIVLTR-Lucの系を用いてCpGメチル化がプロモーター活性に与える影響を検討する。U1細胞などのHIV潜伏感染細胞株およびHIV transgenic mouseの脾臓細胞を用いて、bisulfite modification法でCpGメチル化の部位とレベルを明らかにし、発現レベルとの関連を検討する。さらに再活性化刺激による発現誘導とメチル化との関連を明らかにする。

C. 研究結果：

- 1) transient transfection系において、in vitroでSss1 methylaseによってCpGをメチル化されたHIV LTRは基礎転写活性のみならずTNF- α などの活性化刺激に対する反応性が数十分の一に著しく低下した。
- 2) HIV慢性感染細胞株U1, ACH2, Molt20-2等を用いた解析の結果、ウイルス遺伝子発現のレベルがLTR U3領域のCpGメチル化の程度と相関した。
- 3) 慢性感染細胞株をTNF- α で処理することによりウイルス遺伝子発現誘導すると、U3領域のCpG脱メチル化が認められた。
- 4) HIV transgenic mouseでの各臓器におけるウイルス遺伝子発現レベルと LTR U3領域のCpG siteメチル化レベルが相関した。
- 5) LPS処理による脾臓細胞でのウイルス遺伝子発現誘導に伴いU3領域の一ヶ所のCpG site (CREB/AP-1 motif内)で特異的に脱メチル化が進行した(図1)。
- 6) 上記の部位に非メチル化プローブ特異的に結合する因子の存在を明らかにした(図2)。
- 7) LPSやTNF- α による潜伏ウイルスの発現誘導には細胞周期の進行=DNA合成を必要とした。

D. 考察

以上の結果は、HIVの潜伏感染成立におけるCpGメチル化の重要性を示すと共に、再活性化刺激が脱メチル化を誘導すること、その際にDNA合成を必要とするこ

とから、その作用点はメチル化維持酵素Dnmt1の機能阻害であることを示している。また、再活性化に伴い、特定のCpGの脱メチル化が進行することは、メチル化による遺伝子発現の制御はそのdensityによるとする既存の概念と異なる知見である。さらにその部位がCREB/AP-1 motifにあることは、再活性化にはp38MAPKの関与があるとの知見と合わせて興味深い。

E. 結論

CpGメチル化がHIVLTR活性・ウイルス遺伝子発現の抑制に関与しており、再活性化刺激がメチル化維持酵素の機能阻害を介してCpG脱メチル化すること、また特異的な脱メチル化部位とそこに結合する因子の存在を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし(現在投稿準備中)

2. 学会発表

- 1、日本ウイルス学会第47回学術集会・総会ワークショップ「潜伏HIV再活性化におけるLTRのCpGメチル化制御」石田尚臣、小岩 司、長井正江、相沢繁美、岩倉洋一郎、渡邊俊樹
- 2、第22回日本分子生物学会年会「潜伏HIV再活性化刺激によるLTRのCpGメチル化制御」渡邊俊樹、小岩 司、長井正江、相沢繁美、岩倉洋一郎、石田尚臣
- 3、第29回日本免疫学会総会・学術集会「潜伏HIV再活性化におけるLTRのCpGメチル化制御」渡邊俊樹、石田尚臣、小岩 司、長井正江、相沢繁美、岩倉洋一郎

図1

Demethylation sensitive site is located in the CREB/AP-1 motif

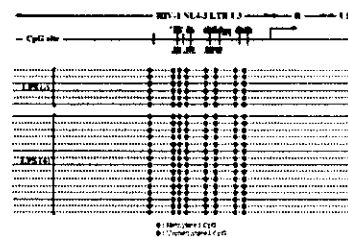
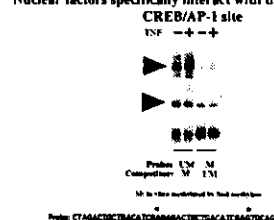
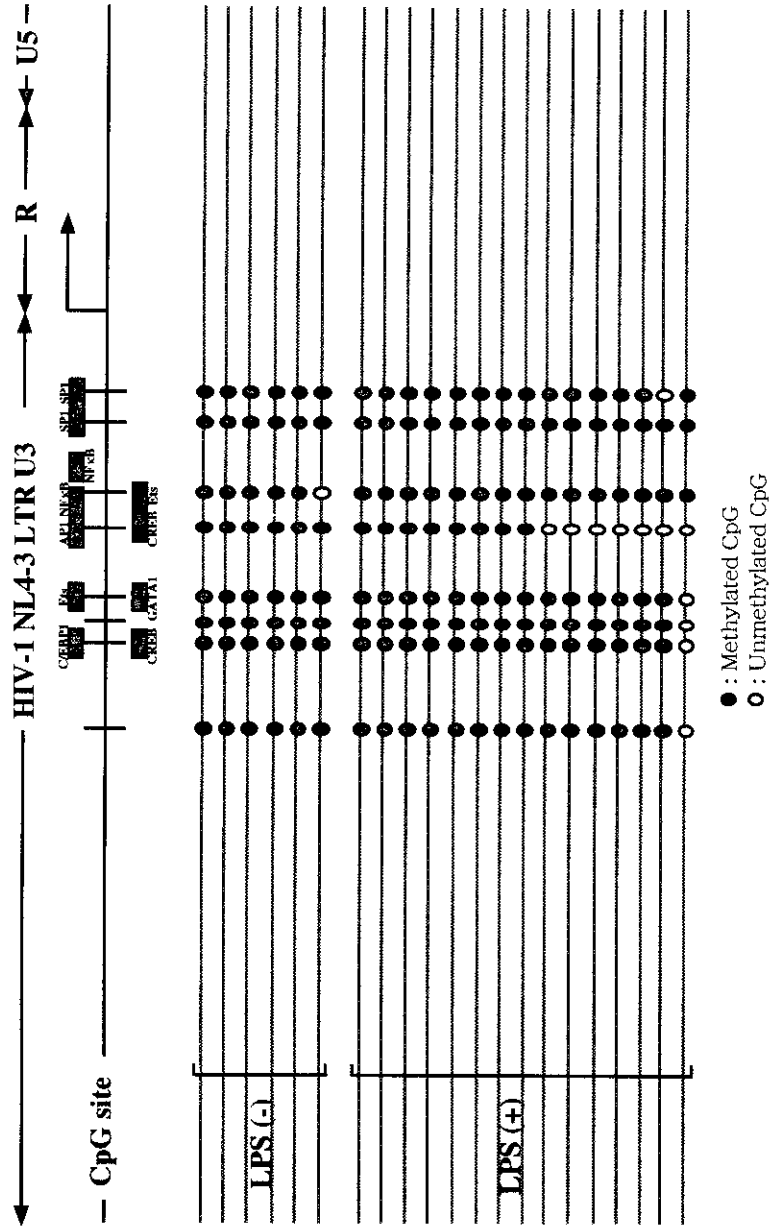


図2

Nuclear factors specifically interact with the unmethylated CREB/AP-1 site

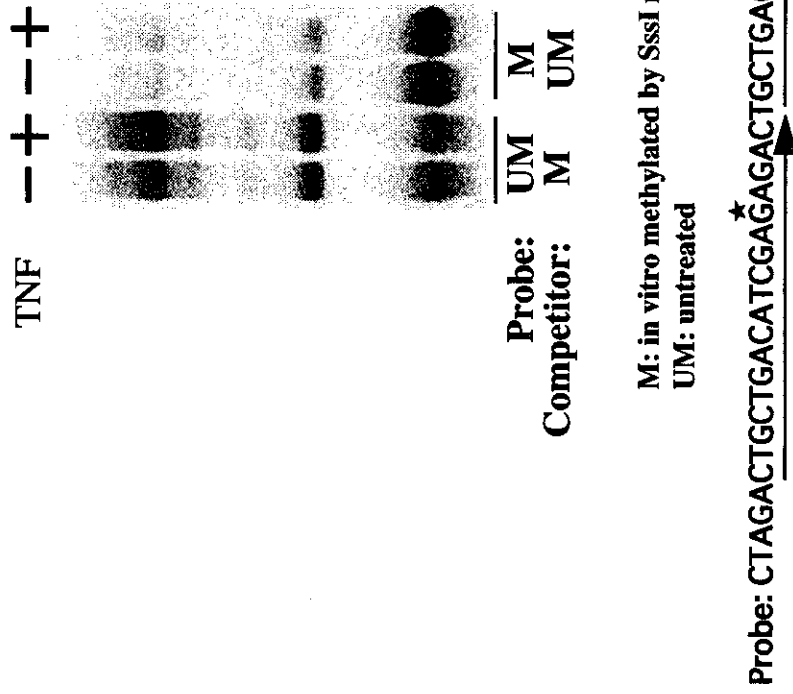


Demethylation sensitive site is located in the CREB/AP-1 motif



2

Nuclear factors specifically interact with the unmethylated CREB/AP-1 site



21. 微生物感染と HIV

主任研究者 森内浩幸 長崎大学医学部小児科

研究要旨 種々の微生物感染に伴う微生物側の因子と宿主側の因子の双方の影響により、宿主細胞の HIV 感染に対する感受性が変動し、病期の進行やウイルスの再活性化が起こりうる事が示唆された。

分担研究者 森内昌子
長崎大学医学部小児科 助手

A. 研究目的

HIV 感染のリスクや予後を決める因子のうち、他の微生物の感染の併発は極めて重要な役割を果たしている可能性がある。例えば、種々の性行為感染や絨毛膜羊膜炎（胎盤の細菌感染）の合併はそれぞれ HIV の水平感染や母児感染のリスクを高めると考えられている。また様々な微生物感染に際してみられる免疫系の活性化が HIV の増殖を促すことも示唆されている。本研究では種々の微生物感染が HIV 感染に与える影響について分子生物学的および細胞生物学的に調べる。

B. 研究方法

微生物感染のうち、HIV との相互反応が強く示唆されるもの[例えば単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒト成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV) など]及びその影響が不明な物(例えばマラリア)の双方について、(1) 感染細胞から分泌される液性因子が周囲の細胞に与える影響(ここでは主に HIV への感受性や抵抗性の変化)、(2) 宿主細胞や HIV の生物学的特性の違いが与える影響、(3) ケモカインやそのレセプターの発現に焦点を当てて検討する。

C. 研究結果

①HTLV 感染が与える影響

- HTLV 感染細胞から分泌される液性因子によって、潜伏している HIV (特に CXCR4 を利用するタイプのもの) が再活性化してくる事を明らかにした(図 1)。
- この効果にはウイルス因子 (Tax 及び Env) と宿主因子 (種々のサイトカイン) の双方が重要である事を明らかにした(表 1)。

- この際に CD8 陽性 T 細胞が再活性化の防止に働く事を明らかにした(図 2)。

②HSV 感染が与える影響

- HSV が既に HIV に感染しているマクロファージに重感染すると、HIV の発現を高める事を明らかにした(図 3)。
- HSV 感染マクロファージが分泌する液性因子によって、T 細胞に潜伏している HIV が再活性化してくる事を明らかにした(表 2)。
- これらの効果の発現に HSV の増殖は不必要であり、不活化した HSV 粒子や HSV 糖蛋白のみでも発現しうる事を明らかにした(表 2、図 4)。

D. 考察

様々な微生物感染に伴い、微生物側の因子と感染防禦の為に誘導される宿主側の因子(主に免疫学的なもの)の双方の働きによって、宿主細胞の HIV 感染に対する感受性が変動する。その結果、HIV の増殖が助長されたり、潜伏化しているウイルスの再活性化を促してしまう事になってしまう。またこうした効果は特に CXCR4 を coreceptor として利用するウイルスにおいて顕著に起こり、患者の体内のウイルスの生物学的特性の変移、そしてそれに伴う予後の悪化にも寄与している可能性がある。

E. 結論

微生物感染のコントロールは HIV 感染者の予後改善の為に、また伝播の抑制の為に重要であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

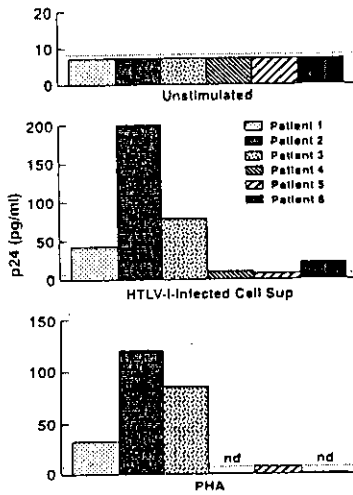
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A. S. 1997. NF- κ B potently upregulates expression of RANTES, an anti-HIV

chemokine. *J. Immunol.* 158:3483-91.

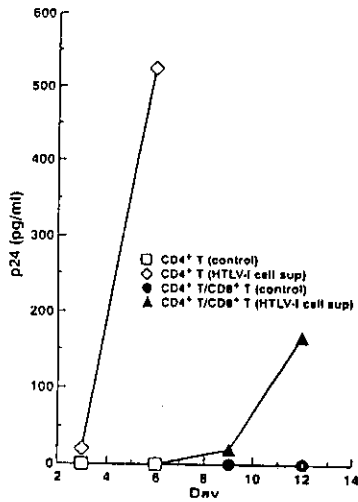
- Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W., and Fauci, A. S. 1997. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J. Immunol.* 159:4322-9.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A. S. 1997. Cloning and analysis of the promoter region of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *J. Immunol.* 159:5441-9.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., Arthor, J., Hoxie, J., and Fauci, A. S. 1997. Promonocytic U937 cell clones expressing CD4 and CXCR4 are resistant to infection with and cell-to-cell fusion by T-tropic HIV-1. *J. Virol.* 71:9664-71.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A. S. 1998. Differentiation of promonocytic U937 subclones into macrophage-like phenotypes regulates cellular factor(s) which modulate fusion/entry of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:3394-3400.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., and A. S. Fauci. 1998. Factors secreted by HTLV-I infected cells can enhance or inhibit replication of HIV-1 in HTLV-I uninfected cells: implication for in vivo coinfection with HTLV-I and HIV-1. *J. Exp. Med.* 187:1689-1698.
 - Cohen, O. J., S. Paolucci, S. M. Bende, M. Daucher, H. Moriuchi, M. Moriuchi, R. T. Davey, Jr., B. Baird, and A. S. Fauci. 1998. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long term non-progressive HIV infection: lack of association with mutations other than CCR5-Δ32. *J. Virol.* 72:6215-6217.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W., and Fauci, A. S. 1998. Exposure to bacterial products renders macrophages highly susceptible to T-tropic human immunodeficiency virus type 1: implications for in vivo coinfections. *J. Clin. Invest.* 102:1540-1550.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., Margolis, D. M., and Fauci, A. S. 1999. USF/c-Myc enhances, while YY1 suppresses the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV entry. *J. Immunol.* 162:5986-5992.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., and Fauci, A.S. 1999. GATA-1 transcription factor transactivates the promoter for CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *Blood* 93:1433-1435.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., and Fauci, A. S. 1999. HTLV-I Tax activation of the CXCR4 promoter by association with nuclear respiratory factor 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15:821-827.
 - Moriuchi, H., and Moriuchi, M. 1999. Dichotomous effect of macrophage-derived chemokine on HIV infection. *AIDS* 13:994-996.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A.S. 1999. Induction of HIV-1 replication by allogeneic stimulation. *J. Immunol.* 162:5982-5992.
2. 学会発表
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A. S. Resistance to infection of promonocytic U937 subclones with T cell-tropic HIV-1 occurs at the level of fusion/entry. 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, D.C., January 1997.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., and Fauci, A. S. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a co-receptor for HIV-1 entry. 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, D.C., January 1997.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A. S. Dichotomous effects of B7-1 and B7-2 costimulation on HIV-1 infection. Institute of Human Virology 1998 Annual Meeting, Baltimore, MD, September 1998.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., Margolis D. M., and Fauci, A. S. USF/c-Myc enhances, while YY1 suppresses the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. Institute of Human Virology 1998 Annual Meeting, Baltimore, MD, September 1998.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., Mizell S.B., Ehler, L.A., and Fauci, A.S. In vitro reactivation of HIV-1 from latently infected, CD4+ T cells upon stimulation with

- microbial co-infections. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, IL, February 1999.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A.S. In vitro reactivation of HIV-1 from latently infected, CD4+ T cells by allogeneic stimulation. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, IL, February 1999.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., and Fauci, A.S. Transcription factors Oct-2 and GATA1 upregulate CCR5 promoter activity. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, IL, February 1999.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., Mizell S.B., Ehler, L.A., and Fauci, A.S. In vitro reactivation of HIV-1 from latently infected, resting CD4+ T cells upon stimulation with microbial co-infections. Japan-US Cooperative Medical Science Program. 11th Joint Meeting of AIDS Panel, Toyama, Japan. March 17-19, 1999.
 - Moriuchi, M., Moriuchi, H., and Fauci, A.S. HTLV-I Tax activation of the CXCR4 promoter by association with nuclear respiratory factor 1. 9th International Congress on Human Retrovirology: HTLV, Kagoshima, Japan, April 1999.
 - Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A.S. In vitro reactivation of HIV-1 from latently infected, resting CD4+ T cells by HTLV-I infected cell-derived soluble factors. 9th International Congress on Human Retrovirology: HTLV, Kagoshima, Japan, April 1999.
 - Moriuchi, H., and Moriuchi, M. HTLV-I Tax transactivates promoters for CXCR4 and CCR5, co-receptors for HIV-1 entry. 1st International Congress on Cytokines/Chemokines in Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA. September 8-10, 1999.
 - Moriuchi, M., and Moriuchi, H. Octamer transcription factors upregulate the expression of CCR5, a co-receptor for HIV-1 entry. 1st International Congress on Cytokines/Chemokines in Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA. September 8-10, 1999.
 - 森内浩幸、森内昌子：単純ヘルペスウイルスはマクロファージに感染した HIV-1 の発現を促す：第 47 回日本ウイルス学会学術集会：1999 年 11 月、横浜
 - 森内昌子、森内浩幸：Resting CD4 陽性 T 細胞に潜伏する HIV-1 は HTLV-I の共感染に伴い再活性化される：第 47 回日本ウイルス学会学術集会：1999 年 11 月、横浜
 - 森内浩幸、森内昌子：Induction of HIV-1, but not HTLV-I, replication by allogeneic stimulation：第 29 回日本免疫学会学術集会：1999 年 12 月、京都
 - 森内昌子、森内浩幸：Dichotomous effects of macrophage-derived chemokine on HIV infection：第 29 回日本免疫学会学術集会：1999 年 12 月、京都
 - 森内浩幸、森内昌子：Cathepsin G increases susceptibility of macrophages to acute HIV-1 infection：第 13 回日本エイズ学会：1999 年 12 月、東京
 - 森内昌子、森内浩幸：Octamer transcription factors upregulate the expression of HIV-1 and its co-receptor CCR5：第 13 回日本エイズ学会：1999 年 12 月、東京

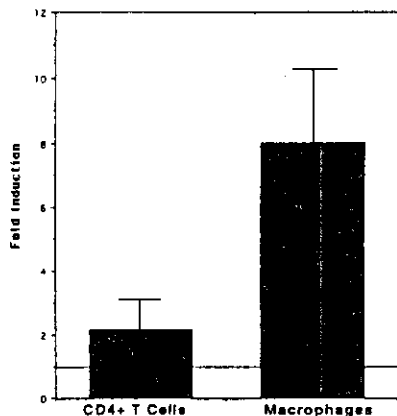
(图 1) HTLV-I Induces *In Vitro* Reactivation of HIV-1 from Latently Infected, Resting CD4+ T Cells



(图 2) Autologous CD8+ T Cells Suppress Reactivation of HIV-1 upon HTLV-I Co-Infection



(图 3) Exposure to HSV Virions Efficiently Induces HIV Expression in Macrophages



(表 1) Effects of HTLV-I-Infected Cell-Derived Factors on the Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected, Resting CD4+ T Cells¹

Stimulation	p24 (pg/ml)			
	Patient 1	Patient 4	Patient 2	Patient 3
No stimulation	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8
HTLV-I-infected cell sup				
(Crude)	98.2	11.8	nd ²	nd
(Tax-depleted)	10.0	<7.8	nd	nd
(HTLV-I virion-depleted)	<7.8	<7.8	nd	nd
(TNF/IL-1/IL-6-depleted)	20.4	<7.8	nd	nd
Heat-inactivated HTLV-I virions	nd	nd	15.7	26.2
GST	nd	nd	<7.8	<7.8
GST-T ₁₀	nd	nd	50.8	9.6
Coculture with BSC-1 cells				
(vWT-infected)	nd	nd	<7.8	<7.8
(vHTLV-I-Env-infected)	nd	nd	43.0	26.9

¹Highly enriched, resting CD4+ T cells derived from patients 1 through 4 shown in Table 1 were either unstimulated or stimulated as indicated. HIV-1 p24 antigen levels were determined for cell-free supernatants on days 4, 8, and 12, and peak p24 titers are shown. ²nd, not done.

(表 2) Cytokine Concentrations in HSV-Exposed MDM Supernatants

	TNF- α	IL-1 β	RANTES	MIP-1 α
Control MDM	92	121	180	85
MDM exposed to:				
intact HSV-1	1630	830	920	6100
inactivated HSV-1	1990	1320	890	8210
intact HSV-2	1650	870	820	3880
inactivated HSV-2	2010	900	950	4670

(表 3) Effects of HSV-Exposed Macrophage-Derived Soluble Activity on the Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected, Resting CD4+ T Cells

Patient	CD4 (/mm ³)	p24 (pg/ml)			PHA
		Unstimulated	Ctrl MDM Sup	HSV-MDM Sup	
1	303	<7.8	<7.8	<7.8	21.6
2	238	<7.8	<7.8	125	10.8
3	601	<7.8	<7.8	18.0	19.6
4	1163	<7.8	<7.8	<7.8	20.0