

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV の潜伏・再活性化のエピジェネティック制御機構を標的とした根治療法開発の
基礎研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成16(2004)年 4月

目次

I. 総括研究報告

HIV の潜伏・再活性化のエピジェネティック制御機構を標的とした根治療法開発の基礎研究

渡邊 俊樹 1

II. 分担研究報告

石田 尚臣 16

堀江 良一 26

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 30

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

HIV の潜伏・再活性化のエピジェネティック制御機構を標的とした根治療法開発の基礎研究

主任研究者 渡邊 俊樹 東京大学医科学研究所助教授

研究要旨

潜伏感染 HIV に対する有効な治療戦略が存在しない現在、感染個体からの HIV の排除、再発を防止することは未だに困難である。我々は HIV 潜伏感染と再活性化の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を可能にする基礎的知見を得ることにより、潜伏感染 HIV の制御を目指した根治療法開発の基礎を形成することを研究の目的とする。研究方法は、ウイルス遺伝子発現のエピジェネティックス制御という観点から、*in vivo* におけるプロウイルス LTR のメチル化の有無、ヒストンの化学修飾によるクロマチン構造制御、エピジェネティック制御機構による治療戦略の基礎の3点について、分子生物学的手法を主に、細胞生物学、免疫学等の手法を取り入れ解析を進めた。本年度の研究から、1) *in vivo* における潜伏感染には2通りの潜伏様式が考えられる。すなわち、「DNAメチル化依存型潜伏様式」と「DNAメチル化非依存型潜伏様式」である。2) 「DNAメチル化非依存型潜伏様式」の本体は「抑制型ヒストン化学修飾によるクロマチン構造制御」であることが強く示唆された。3) DNA 標的 siRNA は、明確に HIV-1 の発現が抑制できる。4) 新規 NF- κ B 阻害剤を用いた HIV 感染症治療戦略についてはより詳細な解析が必要である。5) 再活性化に果たす NF- κ B の機能についてはより詳細な解析結果が必要である。以上5つの結論を得た。

分担研究者氏名：

石田尚臣・東京大学医科学研究所助

手

堀江良一・北里大学助教授

A. 研究目的

HAART 療法導入後直ちに明らかになった、HIV の潜伏感染リザーバーの存在と既存の治療法に対するその抵抗性は、AIDS 治療に対する楽観

論を一掃した。しかし、現在に至るまで潜伏感染 HIV に対する有効な治療戦略は未だに存在せず、感染個体からの HIV の排除、再発を防止することは未だに困難である。従って、HIV 潜伏感染と再活性化の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を可能にする基礎的知見を得ることは急務である。本研究計画は、ウイルス遺伝子発現のエピジェネティクス制御という観点から、潜伏感染 HIV の制御を目指した根治療法開発の基礎となる知見を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、主任研究者らのこれまでの研究実績を背景に、3年間の研究期間内に以下の3点について検討するとした。

1. *in vivo* リザーバープールの HIV プロウイルス CpG メチル化の有無を、SHIV 感染モデルのサル検体と、シドニーの Cooper 博士らのコホートで集積されている検体を用いて明らかにする。

2. 潜伏感染成立と維持に関わるエピジェネティクス制御機構をヒストンの化学修飾を介したクロマチン構造制御＝ヒストンコードの観点から明らかにする。

3. DNA 標的 siRNA および新規 NF- κ B 阻害剤を利用した、潜伏・

再活性化のエピジェネティクス制御の試みを検討する。

以上の検討事項について、具体的な研究方法を記す。

1. DNA メチル化解析は Bisulfite Genomic PCR 法を用いる。この方法は、Genome DNA を Sodium Bisulfite を用いて処理すると、メチル化シトシンは修飾を受けずシトシンのまま存在するが、非メチル化シトシンは修飾を受けてウラシルに変換されることを応用するものである。この変換 DNA を鋳型とし PCR によってプロウイルス LTR 領域を増幅し、増幅産物を大腸菌ベクターへサブクローンして、個々の配列を決定することにより、メチル化・非メチル化シトシンを区別することが可能である。

2. プロウイルス LTR を含むヒストンの化学修飾の解析は、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) 解析を用いる。この方法は、ホルムアルデヒドを用いて DNA-ヒストンを固定し、超音波により、ヌクレオソームを切断し、化学修飾ヒストン特異的な抗体を用いて、ヒストンを DNA と共に免疫沈降し、沈降物中の DNA を鋳型に PCR を行い、プロウイルス LTR が存在すれば、PCR 陽性となることにより、LTR を含むヒストンがどのような化学修飾を受けているか明らか

かにする方法である。

3. DNA 標的 siRNA の効果についての研究課題は、シドニー St.Vincent Hospital, Center for Immunology の Cooper 博士、Suzuki 博士らとの共同研究として遂行している。具体的な方法は、HIV-LTR を標的とした siRNA を作成し、HIV-1 を感染させた CD4/HeLa 細胞に導入し、HIV-1 の発現抑制が認められるか否かを判定することにより、抑制効果を検討する。

4. 新規 NF- κ B 阻害剤による再活性化阻害実験は、*in vitro* で培養する慢性 HIV 感染細胞株を用い、TNF α 等による再活性化を誘導し、薬剤の存在下において、その再活性化が阻害されるか否かにより検討する。

上記 1、2 の研究は分担研究者・石田が、また 3 については、同様に石田が東京の研究室とシドニーの研究室において Suzuki 博士と共同して実験を遂行した。4 については、分担研究者・堀江が主に担当し遂行した。

(倫理面への配慮)

臨床検体：研究協力に基づき検体供給をしてもらうシドニーコホートスタディは、St. Vincent Hospital の Research Ethics Committee の承認を得て、全ての参加者から書面での

インフォームドコンセントが得られている。

サル感染モデル検体：研究協力に基づき検体供給をしてもらう京都大学ウイルス研究所・速水正憲教授らの実験は、実験動物への動物愛護上の配慮を含めて、倫理審査委員会での承認を得ている。

C. 研究結果

in vivo における LTR のメチル化解析

今年度の研究では 2 通りの解析を遂行した。

(1) SHIV 感染モデルサルの検体解析

京都大学ウイルス研究所・速水正憲教授の研究グループとの共同研究により、SHIV 感染サルの検体（5 頭分）を供与していただき、*in vivo* における LTR のメチル化解析を試みた。ウイルス接種から 12 週、24 週、48 週、72 週目に採血したサンプルから末梢血単核球（PBMC）を分離し、Genomic DNA を抽出したものと、感染後 72 週目に屠殺し採取した各リンパ組織より抽出した Genomic DNA を解析対象とした。5 頭の SHIV 感染個体の特徴は、SHIV 感染後 24 週までウイルス血漿を呈し、その後 48 週から血中ウイルス RNA が検出されなくなった個体であ

る。また各リンパ組織から DNA の抽出にあたっては、速水教授の研究対象として使用したため、5頭のうち1個体からの組織 DNA は解析不可能であった。

末梢血 PBMC を用いた解析

(結果) ウイルス RNA の検出された12週、24週の PBMC 検体においてメチル化された LTR を認めることはできなかった。ウイルス RNA の検出できなくなった48週、72週の検体において、メチル化された LTR を検出することができた。5検体それぞれ10 LTR Clones を解析し、全50LTR 中メチル化 CpG を認めた LTR の割合は、48週の検体で8%、72週の検体で17.5% (1検体解析不能であったため、72週の検体は全40LTR 中) であった。メチル化が認められた LTR 中、メチル化を受けていた CpG は、全9カ所解析対象に対し、1ないし2カ所であり、9カ所全てメチル化された LTR は検出されなかった。

各リンパ組織におけるメチル化解析

(結果) 解析対象は、PBMC 検体と同じ個体4個体分の各リンパ組織から抽出した Genomic DNA である。全28組織中27検体が Bisulfite Genomic PCR により PCR 産物を得ることができた。各組織について1

0 LTR を解析した結果、配列決定可能であった全209LTR 中メチル化された LTR は38LTR であり、約17%の LTR がメチル化を認めた。特徴的であったのは、CpG のシトシン残基のメチル化は少なく、CpXpG もしくは CpHpH のシトシン残基のメチル化が認められた。最もメチル化されていた LTR は、解析した配列中7カ所のシトシン残基がメチル化されていた。一方、解析した全体の LTR の注目すると、多くは1ないし2カ所のシトシン残基のメチル化が認められた。特徴的であったのは2番目の CpG site と3番目の CpG site、4番目の CpG site の20bp 上流、7番目の CpG site の10bp 下流域に存在する CT rich な配列中のシトシン残基のメチル化が高頻度に認められた。

以上2つの実験結果から、*in vivo* における LTR のメチル化が存在することが証明された。しかし、その多くが1ないし2カ所のシトシン残基のメチル化であり、「DNA メチル化依存型」の転写抑制機構が *in vivo* で機能している可能性は低いと考えられた。一方、メチル化されたシトシン残基の多くが、ほ乳類細胞で認められる CpG 配列以外のシトシン残基であったことは、CpXpG が *in vitro*

の解析から *de novo* DNA メチル化酵素の標的配列として知られること、植物細胞において、*de novo* DNA メチル化酵素の標的配列がおもに CpHpH 配列であることなどの知見から、ほ乳類細胞において *de novo* でメチル化される配列は CpG 以外にも存在し、植物細胞以外にも CpHpH 配列のメチル化が存在することを示唆している。このことは、これまでの蓄積された DNA メチル化のモデルとして提唱されている、ヒストンの化学修飾による抑制型クロマチン構造による転写抑制 (DNA メチル化非依存型転写抑制機構) を安定化させるための DNA メチル化が、*in vivo* においても存在すること、すなわち我々の解析結果は、まさに「DNA メチル化非依存型」の転写抑制から「DNA メチル化依存型」の転写抑制に変化する過程を検出したと考えている。

(2) シドニーコホート検体を用いた *in vivo* メチル化解析

オーストラリア、シドニー市にある St. Vincent Hospital Center for Immunology の Cooper 博士の研究室には、シドニー市を中心とした HIV 感染者の末梢血 PBMC の検体サンプルが多数存在する。この検体の内訳は、HAART 療法の臨床実験の治療

前後の検体や、ウイルス感染前後の検体などとともに、全ての検体の臨床知見データがそろった、膨大なコホート研究の検体である。我々は、感染初期に成立すると考えられる HIV のリザーバーの本体が、潜伏化した HIV をもつ感染細胞の集団であり、その分子メカニズムはエピジェネティックな制御であると考えている。このコホート検体を利用する目的は、感染前後に採取した貴重なサンプルを解析することにより、感染初期に成立する潜伏感染の分子機構がいかなるものであるのかあきらかにすることが可能であると考えたからである。この貴重なサンプルを利用する前に、実際に保存されている検体 PBMC が、われわれの実験手法により解析可能か否かを判断するため、HAART 療法の臨床治験検体の一部をサンプリングし、メチル化解析を試みた。

Cooper 博士、Suzuki 博士らの協力のもと、血中ウイルス RNA のレベルが高いもの、中程度のもの、検出限界以下のものを分別し、HAART 療法前後のサンプルが残っているものをできるだけ選択し、24 検体をサンプリングした。

この検体より、Genome DNA を抽出し、プロウイルスロードをリアルタイム PCR によって測定した。理論的

には 10^5 copy/ μ g DNA 以上の検体は Bisulfite Genomic PCR による解析が可能であると判断し、24 検体中 18 検体を解析対象とした。このうち、プロウイルスロードが比較的高く、血中ウイルス RNA 量の多いものと少ないものに分別し、6 検体を最初の解析対象とした。

この結果、6 検体すべてで、Bisulfite Genomic PCR が成功し、PCR 産物を得ることができた。現在、この配列を順次決定中である。

ヒストン化学修飾による抑制型クロマチン構造と HIV の潜伏化に関する研究

in vivo の DNA メチル化解析から示唆された通り、感染初期において、潜伏化の分子機構は、「DNA メチル化非依存型」の、「ヒストン化学修飾による抑制型クロマチン構造制御」による可能性が考えられる。われわれは、種々の慢性 HIV 感染細胞株の LTR メチル化解析から、HIV の潜伏化には「DNA メチル化依存的潜伏様式」と「非依存的潜伏様式」の二通り存在することを明らかにした。この「DNA メチル化非依存的潜伏様式」の分子機構の説明する最も適切と思われる仮説が 2000 年に報告された。*de novo* DNA メチル化酵素、*dnmt3a* および *dnmt3b* のノッ

クアウトマウスの胚性繊維芽細胞に対し、*in vitro* で組換えマウス白血病レトロウイルスを感染させる実験系において、LTR の DNA メチル化が起きないのも関わらず、レトロウイルスの発現は抑制され、その分子機構として、ヒストンの化学修飾による抑制型クロマチン制御機構が密接に関係していると結論した。この報告から、われわれが見いだした HIV の「DNA メチル化非依存的」潜伏様式の本体が、ヒストンの化学修飾による抑制型クロマチン制御機構ではないかと考えた。そこで、「DNA メチル化非依存的」潜伏様式を示す慢性 HIV 感染細胞株 OM10.1 を材料に、LTR 上のヒストン化学修飾状態をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析した。

(結果) TNF α による再活性化前後における HIV-1 LTR のヒストン化学修飾状態を ChIP 解析したところ、再活性化前において、LTR 上のヒストンは、アセチル化ヒストン H3 の存在は低く、メチル化ヒストン H3 が多く存在し、アセチル化ヒストン H4 が多く存在していた。またヒストン H1 が LTR 上に存在していた。再活性化後、ヒストン H3 のアセチル化が高進し、メチル化 H3 が減弱し、アセチル化 H4 の頻度は変化が無く、ヒストン H1 が LTR 上から乖離して

いた。再活性化前の HIV-1 LTR 上のヒストンの化学修飾状態は、*in vitro* の感染モデルで示された転写抑制型の化学修飾状態に一致し、モデル系ではなく実際の感染細胞系において「抑制型ヒストン化学修飾」によるクロマチン構造制御機構を介した転写抑制が存在することが明らかとなった。一方、LTR のクロマチン構造が、再活性化前後において抑制型の固い構造から、促進型のゆるんだ構造へ変換していることを、Ligation-Mediated PCR 法によって明らかにした。以上の結果から、HIV-1 の感染初期における潜伏化の分子機構として、「抑制型ヒストン化学修飾」によるクロマチン構造制御機構が重要な役割を果たしていることが予測された。

DNA 標的 siRNA による HIV-1 転写抑制

本研究はシドニー市 St. Vincent Hospital, Center for Immunology の Suzuki 博士の独自の研究テーマから得られた知見を、われわれの DNA メチル化解析手法とヒストン化学修飾状態の解析手法を用いることにより、DNA 標的 siRNA の効果に関する分子機構を明らかにすることを、本研究の目的とした。Suzuki 博士の独自の研究結果は、HIV 感染症の、エピ

ジェネティック制御を応用した全く新しい治療戦略の提示であり、また、ほ乳類細胞を用いた世界初の DNA 標的 siRNA の成功例として、重要な知見でもあり、現在投稿中である。本研究は、この結果をさらに発展させるため、DNA 標的 siRNA が、種々の HIV-1 のサブタイプを共通して抑制できること、またこの分子機構がエピジェネティックなクロマチン構造制御と密接に関係していることを証明しつつあり、Suzuki 博士らの次の論文として発表準備中である。

新規 NF- κ B 阻害剤を用いた HIV-1 の再活性化阻止能に関する研究

本研究は分担研究者である堀江良一が主に担当した。

新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は NF- κ B の核移行を阻止することにより、NF- κ B 依存性の転写を抑制する新規化合物である。HIV-1 の転写活性は、宿主細胞の NF- κ B の活性化に依存することは広く知られているところである。われわれは、NF- κ B 阻害剤を用いることにより潜伏 HIV-1 の再活性化を阻害することが可能かどうかを検討した。

(結果) ACH-2 および OM10.1 細胞株 5×10^6 細胞を前処理として、DHMEQ を 10 ng/ml の濃度で培地

に添加して1時間処理し、TNF α (10 ng/ml)による再活性化刺激を加えた。24時間後細胞を回収し全 RNA を抽出して Northern Blotting による HIV-1 ウイルス遺伝子発現状態を解析した。

まず、DHMEQ による NF- κ B の核移行阻害が、対象細胞株で認められるか否か、またその効果は培地に添加してどの程度の時間継続するかを、再活性化刺激を加え各抽出液中の NF- κ B 認識配列をもつオリゴヌクレオチドをプローブとしたゲルシフトアッセイにより検討した。その結果、両細胞株とも、通常培養においても中程度の NF- κ B の核移行が認められること、TNF α 添加により数十倍の結合活性化が認められること、DHMEQ は通常培養時の NF- κ B の核移行活性を完全に抑制し、TNF α による活性化も完全に抑制すること、この効果は6時間経過した後も持続すること、DHMEQ 添加と同時に TNF α を加えても完全な NF- κ B の阻害活性が認められることなどが明らかとなった。

以上の結果を踏まえ、HIV-1 の再活性化阻害実験を試みた。再活性化刺激に呼応し、陰性コントロール群 (DHMEQ の溶媒である DMSO) では、ACH-2 で約 20 倍の、OM10.1 では約 70 倍のウイルス遺伝子発現を認めた。DHMEQ を添加した群では、

ACH-2 で約 18 倍、OM10.1 で約 25 倍の遺伝子発現を認めた。

この結果から DHMEQ の再活性化阻止能は OM10.1 に対しては比較的有効であるが、ACH-2 に対しては有効ではないことを示している。OM10.1 と ACH-2 細胞株では、HIV-1 の潜伏様式が異なり、OM10.1 は「DNA メチル化非依存型」、ACH-2 細胞株では「依存型」である。DNA メチル化依存型の潜伏様式では、NF- κ B の再活性化への寄与が薄く、DNA メチル化非依存型の OM10.1 では高いという推察ができる。詳細は来年度以降の解析となるが、再活性化に対し、NF- κ B の寄与は、これまで考えられた以上に高いものではないことが示唆された。

D. 考察

我々の今年度の研究から明らかになった点は以下のとおりである。

1. *in vivo* において、プロウイルス LTR の DNA メチル化は存在する。
2. *in vivo* における LTR のメチル化は低頻度である。
3. *in vivo* における LTR のメチル化シトシン残基は CpG 配列より、CpXpG 配列や、CpHpH といった *de novo* DNA メチル化酵素の標的配列が主である。

4. *in vitro* の感染実験から示された「抑制型ヒストン化学修飾」による遺伝子発現抑制が HIV-1 の潜伏化に寄与している。
5. DNA 標的 siRNA により、明確に HIV-1 の発現が抑制できる。
6. 新規 NF- κ B 阻害剤が再活性化を抑制できる場合とできない場合がある。

1 から 3 は、SHIV の感染モデル系から明らかになったことである。

我々は、以前からプロウイルス LTR のメチル化が、潜伏感染に重要な役割を果たしていることを発表してきた。その中で、我々は、プロウイルスゲノムの両端に存在する LTR を区別せず解析を行うとメチル化された LTR の割合が 50%以上にならないことに気がついた。この結果を我々は、5'および 3'LTR のメチル化状態に偏りが生じている結果と仮定し、5'および 3'LTR 特異的なメチル化解析を行い、5'LTR が選択的にメチル化されていることを証明した。この結果を踏まえ *in vivo* のメチル化解析の結果を考察すると、メチル化 LTR の割合は 17.5%である。5' LTR 選択的にメチル化が行われているとすれば、約 35%の 5' LTR がメチル化されている計算となり、65%の 5' LTR は全くメチル化を受けていないと考えら

れる。この理論値から、メチル化依存的に HIV-1 の転写が抑制されていると考えるのは無理があると言える。従って、今回解析対象とした SHIV 感染サルの潜伏化に関わる分子機構は LTR の「DNA メチル化非依存的」な分子機構により恒常的な遺伝子の発現抑制が存在することが考えられた。

興味深いことに、メチル化シトシン残基の位置を LTR 上に順次プロットすると約 60bp ごとにメチル化シトシンが現れることに気がついた。ヌクレオソーム構造は、ヒストン 8 量体に巻き付く DNA の長さは 146bp と算出され、約 50bp のリーダー DNA が存在し次のヒストン 8 量体に DNA が巻き付く構造をとることが知られている。このことから、ヒストンに巻き付く DNA の約 60bp はどのような位置関係にあるのか推定した。この結果、ヒストン 8 量体を円とすると外接する正三角形の頂点が約 60bp となることがわかった。正三角形の頂点は 1 つのヒストン 8 量体には 2 カ所ないし 3 カ所存在する計算となり (はじめのメチル化シトシンがどこにあるかに依存する)、LTR 上にプロットされたメチル化シトシンは解析した 256bp 中 2 つのまとまりとして 3 カ所づつ現れる。SHIV の LTR は SIV の LTR を利用しており、SIV

LTR のヌクレオソーム構造は明らかになっていないので、推定の域を出ないが、解析した LTR は1つのヌクレオソームに巻き付く DNA 領域であると考え、都合6箇所のメチル化シトシンが正三角形の頂点に存在する格好であることがわかる。しかし、今回明らかになった結果からは1つの LTR に対して、多くの場合1カ所ないし2カ所のシトシンのメチル化であるから、このメチル化の位置の問題は、アクセスしてくる *de novo* DNA メチル化酵素がどのシトシン残基をメチル化するのかという問題としてとらえることができる。詳細な解析は、来年度以降の結果を待たねばならないが、「ヒストンの化学修飾による DNA メチル化非依存的転写抑制状態」を認識してアクセスする DNA メチル化酵素複合体の動的制御機構の解明につなげていきたいと考えている。

4の結果から、我々は、世界に先駆けて「ヒストン化学修飾を介した抑制型クロマチン構造」による転写抑制、潜伏感染が存在することを明らかにしたと考える。1から3の結果により、感染初期におけるウイルス遺伝子の転写抑制は「DNA メチル化非依存的な転写抑制機構」であることが示唆された。このことは、す

なわち、*in vivo* においても「ヒストン化学修飾を介した抑制型クロマチン構造」による転写抑制機構が存在し、HIV の潜伏化に寄与している可能性を強く示唆するものである。来年度以降の解析は、*in vivo* におけるヒストン化学修飾状態を明らかにしようとして計画中であるが、このことはすなわち、HIV の感染初期に形成するリザーバープールがどのような分子機構により成立するのかを直接明らかにすることにつながると考えている。

5の結果は、明確に DNA 標的 siRNA が HIV の発現を抑制可能であることを示している。我々は、感染細胞からの HIV-1 産生をエピジェネティックな制御機構により封じ込めることが可能と考えており、DNA 標的 siRNA は、この考えを実践する方法として提供できるのではないかと考えている。この結果は、シドニー St. Vincent Hospital の Suzuki 博士の独自の研究であり、現在我々と共同研究として、DNA 標的 siRNA が効果的であることの分子機構の詳細を研究中である。エピジェネティックな制御の重要な点は、DNA の一次情報による転写制御と異なり、レトロウイルスのような外来から運ばれた遺伝子の発現調節を恒常的に行うこと

ができる点にある。すなわち、一度運命が決定された遺伝子の発現は、強力な発現誘導が持続的に起こらない限り、その運命を変えることができない点にある。従って、DNA 標的 siRNA が我々の仮説通り、あるいは植物細胞の分子機構と同様のメカニズムで転写制御が行われるとすれば、強力で恒常的な再活性化抑止力を発揮するであろうと思われる。今後、Suzuki 博士らとの共同研究を通じ、詳細な分子機構を解明することにより、我々の仮説が証明できると確信している。

一方、この結果は、HIV-1 発現抑止の方法としてではなく、DNA 標的 siRNA がほ乳類細胞でも機能しうることを世界で初めて証明した実験であり、今後この分野での革新的な結果として評価される可能性を持っている。我々との共同研究を通じて明らかにされるであろう詳細な分子機構は、HIV 感染症のみならず、様々な疾病の有効な治療法を確立する基盤を提供できると考える。

6の結果は、DHMEQ の条件的応用性を示唆したデータと思われる。

「DNA メチル化非依存型」潜伏機構を呈する OM10.1 細胞株では、その再活性化能が 35%程度に抑制されている。一方で、「DNA メチル化依存

型」潜伏機構を呈する ACH-2 細胞株においては、ほとんど再活性可能を抑制できていなかった。このことは、すなわち、潜伏様式の差異が DHMEQ の再活性化抑制効果の差異として表現されていることを示唆している。何故、「DNA メチル化依存型」潜伏様式を呈する HIV-1 の再活性化に NF- κ B 阻害剤が効果的でなかったのかは明らかにできていない。しかし明確に、「DNA メチル化依存型」潜伏様式を呈する HIV-1 の再活性化には、NF- κ B 以外の転写制御因子が関与しており、再活性化時にはそれらの転写制御因子が優位に機能することを示唆している。来年度以降の解析として、これらの疑問を解決する実験を展開したいと考えている。

さらに、我々は、構成的 NF- κ B の活性化を示す様々な腫瘍細胞が、DHMEQ により細胞死することを示してきている。従って、DHMEQ の NF- κ B の阻害活性については疑う余地がない。こうした状況を踏まえると、これまで HIV-1 の転写制御因子として NF- κ B の重要性が示されてきたが、再活性化において NF- κ B が果たす役割について、より慎重な解析が必要であることを示唆している。

E. 結論

今年度の研究により明らかになっ

たことは、

1. *in vivo* において、プロウイルス LTR の DNA メチル化は存在する。
2. *in vivo* における LTR のメチル化は低頻度である。
3. *in vivo* における LTR のメチル化シトシン残基は CpG 配列より、CpXpG 配列や、CpHpH といった *de novo* DNA メチル化酵素の標的配列が主である。
4. *in vitro* の感染実験から示された「抑制型ヒストン化学修飾」による遺伝子発現抑制が HIV-1 の潜伏化に寄与している。
5. DNA 標的 siRNA により、明確に HIV-1 の発現が抑制できる。
6. 新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は再活性化を抑制できる場合とできない場合がある。

である。

以上、本年度の研究により

1. *in vivo* における潜伏感染には2通りの潜伏様式が考えられる。すなわち、「DNA メチル化依存型潜伏様式」と「DNA メチル化非依存型潜伏様式」である。この両者は互いに密接に関係し合い、「DNA メチル化非依存型潜伏様式」は、時間経過とともに「DNA メチル化依存型潜伏様式」へと変化し、より安定した

ウイルス発現抑制状態を形成すると考えられる。

2. 「DNA メチル化非依存型潜伏様式」の本体は「抑制型ヒストン化学修飾によるクロマチン構造制御」であることが強く示唆された。
3. DNA 標的 siRNA は、明確に HIV-1 の発現が抑制できる。
4. 新規 NF- κ B 阻害剤による再活性化阻止能についてはより詳細な解析が必要である。
5. 再活性化に果たす NF- κ B の機能についてはより詳細な解析結果が必要である。

以上5つの結論を得た。

F. 健康危険情報

当該研究の結果およびその課程から、本項目に該当する知見は得られていない。

G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. Horie R. Watanabe M. Ishida T. Koiwa T. Aizawa S. Higashihara M. Kadin M, Watabnabe T. The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF- κ B activation in anaplastic large cell lymphoma. Cancer cell. In press.

2. Habelhah H. Takahashi S. Cho SG. Kadoya T. Watanabe T. Ronai Z.
Ubiquitination- dependent translocation of TRAF2 to the insoluble cellular fraction is required for its activation of JNK but not p38 or NF-kB.
EMBO. Journal. in press
3. Ohsugi T. Yamaguchi K. Kumasaka T. Ishida T. Horie R. Watanabe T. Sakio N. Fujimoto T. Sakamoto N. Urano T.
Rapid tumor death model for evaluation of new therapeutic agents for adult T-cell leukemia.
Laboratory Investigation. 84(2):263-6, 2004.
4. Watanabe M. Ogawa Y. Ito K. Higashihara M. Kadin ME. Abraham LJ. Watanabe T. Horie R.
AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells.
American Journal of Pathology. 163(2):633-41, 2003 .
5. Tanaka J. Ishida T. Choi BI. Yasuda J. Watanabe T. Iwakura Y.
Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle -dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR.
AIDS. 17(2):167-75, 2003.
6. Koiwa T. Hamano-Usami A. Ishida T. Okayama A. Yamaguchi K. Kamihira S. Watanabe T. 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo.
Journal of Virology. 76(18):9389-97, 2002.
7. Horie R. Higashihara M. Watanabe T. Hodgkin's lymphoma and CD30 signal transduction.
International Journal of Hematology. 77(1):37-47, 2003.
8. Horie R. Watanabe T. Ito K. Morisita Y. Watanabe M. Ishida T. Higashihara M. Kadin M. Watanabe T.
Cytoplasmic aggregation of TRAF2 and TRAF5 proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg cells.
American Journal of Pathology. 160(5):1647-54, 2002.

9.Horie R. Watanabe T. Morishita Y. Ito K. Ishida T. Kanegae Y. Saito I. Higashihara M. Mori S. Kadin ME. Watanabe T.

Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.

Oncogene. 21(16):2493-503, 2002.

10.Satoh M. Toma H. Sugahara K. Etoh K. Shirohata Y. Kiyuma S. Takara M. Matsuoka M. Yamaguchi K. Nakada K. Fujita K. Kojima S. Hori E. Kamihira S. Sato Y. Tanaka Y. Watanabe T.

Involvement of IL-2/IL-2R system activation by parasite antigen in polyclonal expansion of CD4+25+ HTLV-1-infected T-cells in human carriers both HTLV-1 and S.stercoralis.

Oncogene 21: 2466-2475. 2002.

11.Koike R. Iizuka T. Watanabe T. Miyasaka N

The GOR gene product cannot cross-react with hepatitis C virus in humans

Clinical Experimental Immunology

12: 429-434, 2001.

(イ) 学会発表

国際学会

(1) Koiwa T. Hamano A. Ishida T. Okayama A. Yamaguchi K. Kamihira S. Watanabe T. " 5'-LTR-selective CpG methylation of latent HTLV-1 provirus in vitro and in vivo," International meeting of the institute of human virology. 2002. U.S.A.

(2) Ishida T. Hamano A. Koiwa T. Watanabe T. "5'-LTR selective methylation of latently infected HIV provirus that is demethylated by reactivation signals." International meeting of the institute of human virology. 2002. U.S.A.

(3) Ishida T. Koiwa T. Watanabe T. "Extracellular signal-mediated reactivation of latent HIV requires CpG demethylation in LTR region." International meeting of the institute of human virology. 2001. U.S.A.

国内学会

1) 石田尚臣、小岩司、濱野章子、伊吹謙太郎、三浦智行、岡山明彦、山

口一成、上平憲、速水正憲、渡邊俊樹 「ヒトレトロウイルス潜伏化と CpG メチル化」 日本ウイルス学会 2003 年、京都

2) 石田尚臣、濱野章子、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹「SHIV 感染アカゲザル個体における SHIV-LTR の *in vivo* メチル化解析」 日本エイズ学会 2003 年、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2002-217536

出願日：2002 年 7 月 26 日

発明の名称：リンパ系悪性腫瘍の予防・治療剤

発明者：堀江良一、渡邊俊樹、梅沢一夫

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV の潜伏・再活性化のエピジェネティック制御機構を標的とした根治療法開発の基礎研究

分担研究者 石田 尚臣 東京大学医科学研究所助手

研究要旨

潜伏感染 HIV に対する有効な治療戦略が存在しない現在、感染個体からの HIV の排除、再発を防止することは未だに困難である。我々は HIV 潜伏感染と再活性化の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を可能にする基礎的知見を得ることにより、潜伏感染 HIV の制御を目指した根治療法開発の基礎を形成することを研究の目的とする。研究方法は、ウイルス遺伝子発現のエピジェネティックス制御という観点から、*in vivo* におけるプロウイルス LTR のメチル化の有無、ヒストンの化学修飾によるクロマチン構造制御、エピジェネティック制御機構による治療戦略の基礎の3点について、分子生物学的手法を主に、細胞生物学、免疫学等の手法を取り入れ解析を進めた。分担研究者・石田尚臣は、主に *in vivo* メチル化解析とヒストンの化学修飾によるクロマチン構造制御の解析を担当した。本年度の研究から、1) *in vivo* における潜伏感染には2通りの潜伏様式が考えられる。すなわち、「DNA メチル化依存型潜伏様式」と「DNA メチル化非依存型潜伏様式」である。2) 「DNA メチル化非依存型潜伏様式」の本体は「抑制型ヒストン化学修飾によるクロマチン構造制御」であることが強く示唆された。3) DNA 標的 siRNA は、明確に HIV-1 の発現が抑制できる。以上3つの結論を得た。

A. 研究目的

HAART 療法導入後直ちに明らかになった、HIV の潜伏感染リザーバーの存在と既存の治療法に対するその抵抗性は、AIDS 治療に対する楽観論を一掃した。しかし、現在に至るまで潜伏感染 HIV に対する有効な治療戦略は未だに存在せず、感染個体からの HIV の排除、再発

を防止することは未だに困難である。従って、HIV 潜伏感染と再活性化の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を可能にする基礎的知見を得ることは急務である。本研究計画は、ウイルス遺伝子発現のエピジェネティックス制御という観点から、潜伏感染 HIV の制御を目指した根治療法開発の基礎となる知見を

明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本分担研究では、分担研究者のこれまでの研究実績を背景に、3年間の研究期間内に以下の点について検討するとした。

1. *in vivo* リザーバープールの HIV プロウイルス CpG メチル化の有無を、SHIV 感染モデルのサル検体と、シドニーの Cooper 博士らのコホートで集積されている検体を用いて明らかにする。

2. 潜伏感染成立と維持に関わるエピジェネティック制御機構をヒストンの化学修飾を介したクロマチン構造制御=ヒストンコードの観点から明らかにする。

以上の検討事項について、具体的な研究方法を記す。

1. DNA メチル化解析は Bisulfite Genomic PCR 法を用いる。この方法は、Genome DNA を Sodium Bisulfite を用いて処理すると、メチル化シトシンは修飾を受けずシトシンのまま存在するが、非メチル化シトシンは修飾を受けてウラシルに変換されることを応用するものである。この変換 DNA を鋳型とし PCR によってプロウイルス LTR 領域を増幅し、増幅産物を大腸菌ベクターへサブクローンして、個々の配列を決定することにより、メチル化・非メチル化シトシンを区別することが可能である。

2. プロウイルス LTR を含むヒストンの化学修飾の解析は、クロマチン免疫沈

降法 (ChIP) 解析を用いる。この方法は、ホルムアルデヒドを用いて DNA-ヒストンを固定し、超音波により、ヌクレオソームを切断し、化学修飾ヒストン特異的な抗体を用いて、ヒストンを DNA と共に免疫沈降し、沈降物中の DNA を鋳型に PCR を行い、プロウイルス LTR が存在すれば、PCR 陽性となることにより、LTR を含むヒストンがどのような化学修飾を受けているか明らかにする方法である。

3. DNA 標的 siRNA の効果についての研究課題は、シドニー St.Vincent Hospital, Center for Immunology の Cooper 博士、Suzuki 博士らとの共同研究として遂行している。具体的な方法は、HIV-LTR を標的とした siRNA を作成し、HIV-1 を感染させた CD4/HeLa 細胞に導入し、HIV-1 の発現抑制が認められるか否かを判定することにより、抑制効果を検討する。

(倫理面への配慮)

臨床検体：研究協力に基づき検体供給をもらうシドニーコホートスタディは、St. Vincent Hospital の Research Ethics Committee の承認を得て、全ての参加者から書面でのインフォームドコンセントが得られている。

サル感染モデル検体：研究協力に基づき検体供給をもらう京都大学ウイルス研究所・速水正憲教授らの実験は、実験

動物への動物愛護上の配慮を含めて、倫理審査委員会での承認を得ている。

C.研究結果

*in vivo*におけるLTRのメチル化解析今年度の研究では2通りの解析を遂行した。

(2) SHIV 感染モデルサル of 検体解析

京都大学ウイルス研究所・速水正憲教授の研究グループとの共同研究により、SHIV 感染サルの検体（5頭分）を供与していただき、*in vivo*におけるLTRのメチル化解析を試みた。ウイルス接種から12週、24週、48週、72週目に採血したサンプルから末梢血単核球（PBMC）を分離し、Genomic DNAを抽出したものと、感染後72週目に屠殺し採取した各リンパ組織より抽出したGenomic DNAを解析対象とした。5頭のSHIV感染個体の特徴は、SHIV感染後24週までウイルス血漿を呈し、その後48週から血中ウイルスRNAが検出されなくなった個体である。また各リンパ組織からDNAの抽出にあたっては、速水教授の研究対象として使用したため、5頭のうち1個体からの組織DNAは解析不可能であった。

末梢血PBMCを用いた解析

（結果）ウイルスRNAの検出された12週、24週のPBMC検体においてメチル化されたLTRを認めることはで

きなかった。ウイルスRNAの検出できなくなった48週、72週の検体において、メチル化されたLTRを検出することができた。5検体それぞれ10LTR Clonesを解析し、全50LTR中メチル化CpGを認めたLTRの割合は、48週の検体で8%、72週の検体で17.5%（1検体解析不能であったため、72週の検体は全40LTR中）であった。メチル化が認められたLTR中、メチル化を受けていたCpGは、全9カ所解析対象に対し、1ないし2カ所であり、9カ所全てメチル化されたLTRは検出されなかった。

各リンパ組織におけるメチル化解析

（結果）解析対象は、PBMC検体と同じ個体4個体分の各リンパ組織から抽出したGenomic DNAである。全28組織中27検体がBisulfite Genomic PCRによりPCR産物を得ることができた。各組織について10LTRを解析した結果、配列決定可能であった全209LTR中メチル化されたLTRは38LTRであり、約17%のLTRがメチル化を認めた。特徴的であったのは、CpGのシトシン残基のメチル化は少なく、CpXpGもしくはCpHpHのシトシン残基のメチル化が認められた。最もメチル化されていたLTRは、解析した配列中7カ所のシトシン残基がメチル化されていた。一方、解析した全体のLTRに注目すると多くは1ないし2カ所のシト