

200400652A

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成17(2005)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 32

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 東京大学大学院新領域創成科学研究科教授

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、以下4点の結論を得た。

1. シドニーコホート検体の *in vivo* におけるメチル化解析から、HIV 感染患者の感染細胞中にもメチル化 LTR が存在する。
2. 感染患者検体で認められたメチル化シトシンは、non-CpG 配列のメチル化である。
3. サル感染モデル系、シドニーコホート検体いずれの *in vivo* メチル化解析から、プロウイルス LTR のメチル化は *de novo* DNA メチル化酵素が関与することが強く示唆された。
4. 新規 NF- κ B 阻害剤は HIV-1 の複製を抑制する。エイズリンフォーマのモデル細胞の増殖を強く抑制し、細胞死を誘導する。

分担研究者氏名：

石田尚臣・東京大学大学院新領域創
成科学研究科助手

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。

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。

本年度は、1の項目について、シドニーコホート検体の *in vivo* メチル化解析が成功し、2項目については、*in vivo* ChIP 法の確立、3項目については NF- κ B 阻害剤のエイズリンパ腫治療への応用が強く示唆されるデータを得た。

以下に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。

In vitro の細胞株を用いた実験では、比較的容易に実施可能であった本方法であるが、臨床検体や感染モデルサル検体を用いた場合、用いた組織に対する感染細胞の割合が検体によって異なる事や、割合が比較的低いために、免疫沈降に用いる Lysate の量などのパラメータの検討が必要となる。

3. 新規 NF- κ B 阻害剤のエイズリンパ腫治療への応用の検討

EB ウイルス感染させた健常人ボランティア4人の末梢血より LCL を樹立、この LCL をエイズリンパ腫瘍細胞のモデル細胞とした。この細

胞に対し、DHMEQ を処理し、溶媒処理細胞と、1、NF- κ B 活性に対する影響、2、細胞増殖に対する影響、3、細胞死誘導能、の3点について比較検討した。

上記1、2の研究は分担研究者・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。3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。

C. 研究結果

in vivo における LTR のメチル化解析

昨年度、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) の *in vivo* における LTR のメチル化解析を行った。感染サル末梢血 PBMC を用いた解析結果では、ウイルス RNA の検出された12週、

24週 of 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が、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。メチル化が認められた LTR 中、メチル化を受けていたシトシン残基は、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では、各組織について10 LTR を解析した結果、配列決定可能であった全209 LTR 中メチル化された LTR は38 LTR 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事である。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のではないかと考えた。

以上のような感染モデルの解析結果をふまえ、本年度は、シドニーコホート検体を用いた *in vivo* メチル化解析を行った。

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 10^2 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。Bisulfite Genomic PCR によって得られた PCR 産物を TA ベクターにサブクローンし、塩基配列の決定を行った。

(結果)

解析対象の 18 検体で Bisulfite Genomic PCR が成功した検体は 11 検体であった。それ以外の 7 検体では、サイズの異なる DNA 増幅が認められたが、塩基配列を決定すると、HIV-LTR/Bisulfite 変換/配列以外の配列であり、非特異的増幅産物であると結論した。

250 copy/ μ g DNA 以下のプロウイルスロードを持つ検体では、Bisulfite Genomic PCR による LTR 配列の増幅は認められなかった。また、比較的プロウイルスロードの高い検体 (4,500~8,000copy/ μ g) において

も、Bisulfite Genomic PCR が成功しなかった検体が存在した。

塩基配列の決定できた 6 8 LTR 中、メチル化シトシンが認められた LTR は 1 6 LTR 存在した。感染モデルサル検体と同様、メチル化シトシンの多くは CpG 配列以外のシトシン残基のメチル化であった。

メチル化を受けるシトシン残基の LTR 上の位置に特異性は認められなかった。臨床データと比較し、血中 HIV RNA 量とメチル化の頻度に関して、相関性が認められなかった。

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、昨年度「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、再活性化前の HIV-1 LTR 上のヒストンの化学修飾状態が、*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にした。この結果をふまえて、今年度は、*in vivo* におけるヒストン化学修飾状態を解析する、*in vivo* ChIP 法の確立を目指した。

In vivo における解析で、最も困難で

ある点は、標的 DNA であるプロウイルスが、全体の数パーセント以下の臨床検体あるいは感染個体組織であることである。すなわち、感度が通常の ChIP アッセイの数パーセントとなるということである。高感度のアッセイを求められるため、感染細胞株 OM10.1 に対し、HIV 非感染の Jurkat 細胞株を用いて段階希釈し、感度検定を行った。その結果、1/10 希釈で PCR の増幅は認められなくなり、それ以下ではサザン法による検定が必要である事がわかった。

現在、感染モデルサルでの *in vivo* 検体を用いて条件検討を行っているが、組織を用いた解析では成功しておらず、免疫沈降の効率や、PCR の感度など、さらなる改善が必要であると思われる。

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

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、DHMEQ 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。昨年度の研究から、DNA メチル化依存型潜伏を示す ACH-2 において、DHMEQ の存在、非存在で HIV の再活性化には全く変化はなかった。一方、DNA メチル化非依存型潜伏を示す OM10.1 においては、DHMEQ は不完全ではあるが HIV の再活性化を抑制した。我々は、この結果より、潜伏様式の違いによって再活性化に与える NF- κ B の寄与の程度が異なるのではないかと考えた。HIV の再活性化時の NF- κ B 活性化状態を経時的に観察し、DHMEQ による NF- κ B の活性化阻害状況の経時的観察の結果と合わせ、より詳細な実験を今後進めて行きたい。

今年度は、HIV 複製に与える DHMEQ の効果を検討した。Molt-4 に HIV-1 NL4-3 株を感染させ、放出される HIV を RT アッセイにて評価する感染実験系に、DHMEQ を加え、HIV 複製に対する効果を評価した。

感染4日後に DHMEQ を加えた群では、HIV の放出が抑制される事が明らかとなった。

しかし、Molt-4 細胞株は若干の NF- κ B の構成的活性化が認められる細胞株で、そのような細胞株に対して DHMEQ は増殖抑制、ならびに細胞死誘導能がある事は、我々の研究か

ら明らかになっており、細胞死が誘導されない低濃度の実験で認められた HIV 複製抑制の効果を効率よく観察する事ができなかった。そこで PBMC に対する感染実験系に DHMEQ を加えて、評価する事とした。

その結果、感染4日後に DHMEQ を作用させた実験において、HIV-1 の増殖を濃度依存的に抑制する事が明らかとなった。

今後、より詳細に実験を進め、DHMEQ の HIV 複製に与える効果を評価して行きたい。

今年度は、DHMEQ を用いて、エイズリンパ腫治療への応用可能な実験結果を得た。前述した通り、構成的 NF- κ B の活性化の認められる腫瘍由来の細胞株に対し、DHMEQ は増殖抑制と細胞死誘導能のあることが、様々な細胞を用いて明らかになっている。

エイズリンパ腫の多くが EB ウイルス感染した B 細胞由来であることが知られ、免疫抑制との関係が示唆されている。EB ウイルスによって株化された B 細胞は、EB ウイルス蛋白の一つ LMP1 などによって、構成的 NF- κ B の活性化が認められる。我々は、この性質に注目して、EB ウイルス感染によって株化した LCL (Lymphoblastoid cell line) をエイ

ズリンパ腫のモデル細胞として DHMEQ の効果を検討した。

4 人の健常人ボランティアより PBMC を回収し EB ウイルスを感染させて LCL を樹立した。4 株とも有為に NF- κ B の活性化が誘導され、これに対し DHMEQ はその活性を完全に抑制した。

24 時間、48 時間、72 時間後の生細胞数を溶媒対照群と比較すると、24 時間後から有為な増殖抑制が観察され、72 時間後には生細胞はほぼ 0 となった。この細胞群をアネキシン V の結合性をフローサイトメトリによって観察すると 90% 以上の細胞が陽性細胞となっていた。以上の結果は、DHMEQ は LCL の構成的 NF- κ B の活性化を抑制し、増殖抑制および細胞死誘導能を有していることを示唆している。今後、樹立した LCL を SCID マウスに移植し、*in vivo* での造腫瘍能の抑制効果や、実際の臨床分離されたリンパ腫細胞などをもちいて、詳細な解析を進めて行く計画である。

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. HIV 感染患者末梢血単核球中 (PBMC) のプロウイルス LTR にメチル化シトシンが存在した。
2. HIV 感染患者プロウイルス LTR

のメチル化は低頻度であった。

3. HIV 感染患者プロウイルス 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. 新規 NF- κ B 阻害剤は HIV-1 の複製を *in vivo* で抑制できる
5. 新規 NF- κ B 阻害剤はエイズリンパ腫のモデル細胞 LCL の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。

昨年度、我々は、SHIV の感染モデル系を用いて、*in vivo* においては、「DNA メチル化非依存型」の潜伏機構が主に重要で、DNA のメチル化は、その状態を定着する機能があるというモデルにそった結果であると考察した。我々は *in vitro* の解析から LTR のメチル化は 5'LTR が選択的にメチル化されていることを明らかにし、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% となり、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る。つまり、65% の 5' LTR は全くメチル化を受けていないと考えられ、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

があると考えたからである。

今年度、我々は、シドニー St. Vincent's Hospital、D. Cooper 博士らとの共同研究により HIV 感染患者末梢血単核球を用いたメチル化解析を行い、サル感染モデル検体とほぼ同様の結果を得る事ができた。この結果は、*in vivo* においてメチル化を受ける LTR は存在するものの、その転写抑制に寄与する可能性が弱い事を示していると考えられる。一方、LTR 中に見いだされるメチル化シトシンの数は、サルモデル系に比べて比較的多く、「抑制型ヒストン修飾」から「DNA メチル化による定着」モデルを示唆する結果であると考えている。

In vivo におけるメチル化シトシン残基は、その多くが non-CpG 配列に見いだされた。この事は、*de novo* DNA メチル化酵素の関与が示唆されると前述した。*In vitro* では、このような non-CpG のメチル化は見いだされなかった。我々はこの事実から、ゲノムに組み込まれたプロウイルスを認識して *de novo* DNA メチル化酵素によってメチル化を受ける際、メチル化酵素自身はヒストン H3 Lys9 のメチル基を認識して DNA に近接し、近傍のシトシン残基をメチル化する。これは、前年度の感染サルモデルを使った解析から、考察し

たことである。メチル化シトシンはメチル DNA 結合蛋白質を介して、DNA メチル化酵素を呼び込み、近接するシトシン残基をメチル化する。この繰り返しによってメチル化シトシンがこの領域に蓄積する。In vitro の細胞は、分裂を繰り返し起こすため、メチル化シトシンは、シンメトリックな CpG 配列に濃縮され、結果的に CpG 配列のメチル化しか検出されない、のではないかと考えている。

我々が、昨年、本年と明らかにした *in vivo* におけるプロウイルス LTR のメチル化が、HIV 遺伝子発現の抑制にどの程度寄与しているかを再現して解析することは、困難である。RNA の発現がどの程度だったのかを一つ一つの感染細胞について確認する事はできなく、その細胞のメチル化状態を解析することも不可能だからである。解析結果のメチル化状態を *in vitro* で作成する事も、現状では困難である。したがって、感染実験系などによって、プロウイルス LTR にどのようなタイムコースでメチル化が誘導されてくるかを実験的に確認し、間接的な実験結果と事実を積み重ねていくことで、検証して行く事が必要だと思われる。

今年度、HIV 感染患者検体を用いた解析によって、明らかに *in vivo* において HIV プロウイルス LTR にメ

チル化が存在する事が証明された。さらにこのメチル化は *de novo* DNA メチル化酵素の関与が示唆される。現在、DNA メチル化酵素として、Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の3種が知られ、さらに一旦は否定された Dnmt2 にもメチル化活性が存在する報告がなされ、実際には4種存在する可能性がある。このうち、生化学的に酵素の性質が明らかにされている、前3種については、その機能分担が明らかにされている。すなわち Dnmt1 はメンテナンス DNA メチル化酵素と呼ばれ、DNA 複製の際、鋳型鎖のメチル化シトシンを認識して新製鎖のシトシン残基にメチル基を導入する酵素である。一方、Dnmt3a、および b は、*de novo* の DNA メチル化酵素と呼ばれ、全くメチル化されていない状態の DNA を基質としメチル基を導入する活性を担う。我々の解析は、*de novo* DNA メチル化酵素 Dnmt3a および b が LTR のメチル化を担う事を示唆している。この事はすなわち、Dnmt3 が、HIV 感染症治療の標的分子となる可能性を示唆しているといえる。

In vivo ChIPs 実験系は、サルモデル系において、確立が急務であるが、プロウイルスロードが低い状況において解析が困難な状況である。共沈した DNA を鋳型とした PCR の感度

をあげる方法として、nested-PCR や、ハイブリによる検出などを試みているが、安定していない。感染初期において、ヒストン修飾による遺伝子発現の抑制がリザーブプールの形成に重要であろう事は *in vivo* メチル化解析から示唆された事であり、来年度中にはこの系を立ち上げ、サル感染モデル系の検体を用いて明らかにして行きたい。

NF- κ B 阻害剤による HIV 複製の抑制

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、DHMEQ 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。現在まで、*in vitro* の感染実験系において、感染後 DHMEQ を加えた群に置いて、HIV の放出が抑制されている事が明らかになっている。これは、細胞死誘導などによるものではなく、おそらく HIV の mRNA 合成を抑制する事によると思われる。今後は、より詳細な感染実験系と生化学的解析を進めていく。この結果は、DHMEQ が HIV 感染症治療薬と

しての可能性を示唆しており、重要な知見である、詳細を詰めた後、特許の申請視野にいれ、臨床治験へ向けた動物実験なども計画して行く。

NF- κ B 阻害剤によるエイズリンパ腫治療の可能性

HAART 導入により HIV 関連の腫瘍（カポジ肉腫、リンパ腫）も抑制可能かと思われたが、慢性化した HIV 感染から HAART によっても十分免疫の回復が認められないケースも多くあり、こうしたケースから腫瘍が発生するケースも報告され、依然として HIV 感染症の重要な問題となっている。我々は、構成的 NF- κ B の活性化を伴う多くの血液腫瘍において DHMEQ が細胞死誘導能を示し、治療薬としての可能性を持っている事を示して来ている。エイズリンパ腫の主な腫瘍細胞は EB ウイルス感染の B 細胞性のリンパ腫で、臨床材料においてどの程度存在するのか不明であるが多くのケースで NF- κ B の構成的活性化が認められると予想できる。これは、EB 陽性の B リンパ腫の共通した特徴であるからである。そのような経緯から、我々は、健常人ボランティア 4 人より樹立した LCL (Lymphoblastoid cell line) をエイズリンパ腫腫瘍細胞のモデル細胞とし、DHMEQ の効果について検討し、

増殖抑制と細胞死誘導能を明らかにした。

現在 DHMEQ はその臨床応用に向けた臨床治験の準備段階に入っている。動物実験では、顕著な副作用は認められておらず、臨床応用は視野に入っている薬剤である。この薬剤が、前項に示した、HIV 複製の抑制効果とエイズリンパ腫への応用に期待が持たれば、新たな治療戦略の可能性を示していると言えよう。

E. 結論

今年度の研究により明らかになったことは、

1. HIV 感染患者末梢血単核球中 (PBMC) のプロウイルス LTR にメチル化シトシンが存在した。
2. HIV 感染患者プロウイルス LTR のメチル化は低頻度であった。
3. HIV 感染患者プロウイルス 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. 新規 NF- κ B 阻害剤は HIV-1 の複製を *in vivo* で抑制できる
5. 新規 NF- κ B 阻害剤はエイズリンパ腫のモデル細胞 LCL の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。

である。

以上、本年度の研究により

1. HIV 感染患者末梢血においてもプロウイルス LTR のメチル化は存在する。
2. メチル化シトシンが典型的 CpG 配列ではなく non-CpG 配列で認められる事から、Dnmt3 の関与が明らかとなった。
3. 新規 NF- κ B 阻害剤により HIV-1 複製抑制が認められた。
4. 新規 NF- κ B 阻害剤はエイズリンパ腫モデル細胞の増殖抑制と細胞死誘導能を有する。

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. Iwata S. Souta-Kuribara A. Sasaki T. Kobayashi H. Yamakawa A. Hososno O. Kawasaki H. Tanaka H. Nam H Dang. Watanabe T. Arima N. Yamaoka S. Morimoto C. HTLV-1 Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocytic type (Cas-L). *Oncogene*. 24(7): 1262-71, 2005.
2. Watanabe M. Dewan Z. Okamura

- T. Sasaki M. Itoh K. Higashihara M. Mizoguchi H. Honda M. Sata T. Watanabe T. Yamamoto N. Umezawa K. Horie R. A novel NF- κ B inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer.* 114(1): 32-8, 2005.
3. Dewan MZ. Watanabe M. Terashima K. Aoki M. Sata T. Honda M. Ito M. Yamaoka S. Watanabe T. Horie R. Yamamoto N. Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID/gammacnull mice. *Cancer Sci.* 95(7): 564-8, 2004.
4. 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.* 5(4): 353-64, 2004.
5. 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- κ B. *EMBO. Journal.* in press
6. 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.
7. 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 .
8. 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.

9. 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.

10. Horie R. Higashihara M.
Watanabe T. Hodgkin's lymphoma
and CD30 signal transduction.

International Journal of
Hematology. 77(1):37-47, 2003.

11. Horie R. Watanabe T. Ito K.
Morishita 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.

12. 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.

13. 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.

(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.

発明者：堀江良一、渡邊俊樹、梅沢一夫

(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.

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

国内学会

1) 石田 尚臣、濱野 章子、Kazuo Suzuki、David Cooper、渡邊 俊樹
「HIV-1 プロウイルス LTR の in vivo メチル化解析」 日本ウイルス学会
2004 年、横浜

2) 石田 尚臣、濱野 章子、Kazuo Suzuki、David Cooper、渡邊 俊樹
「HIV-1 プロウイルス LTR の in vivo メチル化解析」 日本エイズ学会
2004 年、静岡

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

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 東京大学大学院新領域創成科学研究科 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。研究分担者、石田尚臣は、本年度の研究から、以下3点の結論を得た。

1. ドニーコホート検体の *in vivo* におけるメチル化解析から、HIV 感染患者の感染細胞中にもメチル化LTRが存在する。
2. 染患者検体では、サルモデル感染系と同様に、メチル化は典型的 CpG 配列ではなく、non-CpG 配列のメチル化である。
3. サル感染モデル系、シドニーコホート検体いずれの *in vivo* メチル化解析から、プロウイルス LTR のメチル化は *de novo* DNA メチル化酵素が関与することが強く示唆された。

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* リザーブプールの 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。

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。

本年度は、1の項目について、シドニーコホート検体の *in vivo* メチル化解析が成功し、2項目については、*in vivo* ChIP 法の確立、3項目については NF- κ B 阻害剤のエイズリンパ腫治療への応用が強く示唆されるデータを得た。

以下に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ニングして、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。

In vitro の細胞株を用いた実験では、比較的容易に実施可能であった本方法であるが、臨床検体や感染モデルサル検体を用いた場合、用いた組織に対する感染細胞の割合が検体によって異なる事や、割合が比較的低いために、免疫沈降に用

いる Lysate の量などのパラメータの検討が必要となる。

(倫理面への配慮)

臨床検体：研究協力に基づき検体供給を
してもらお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。

C. 研究結果

in vivo における LTR のメチル化解析
昨年度、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 感染サル検体（5頭分）
の *in vivo* における LTR のメチル化解
析を行った。感染サル末梢血 PBMC を
用いた解析結果では、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が、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。メチル化が認め
られた LTR 中、メチル化を受けていた
シトシン残基は、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 は検出されなかつ
た。

各リンパ組織におけるメチル化解析結
果では、各組織について10 LTR を解

析した結果、配列決定可能であった全2
09LTR 中メチル化された LTR は38
LTR 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事である。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