

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サ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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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 68 LTR 中、メチル化シトシンが認められた LTR は 16 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。

#### 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. IV 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. IV 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

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いきたい。

## E. 結論

今年度の研究により明らかになったことは、

1. 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. IV 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。

である。  
以上、本年度の研究により

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. 感染患者検体では、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. 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。

以上3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- $\kappa$ B activation in anaplastic large cell lymphoma.  
Cancer cell. 5(4): 353-64, 2004.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.

6. 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.

### (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.

#### 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

なし。

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 堀江 良一 北里大学医学部第4内科助教授

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。分担研究者、堀江良一は、本年度の研究から、以下2点の結論を得た。

1. 新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤は、*in vitro*において、HIV-1 の複製を抑制する。
2. 新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤はエイズリンフォーマのモデル細胞、LCL の増殖を強く抑制し、細胞死を誘導する。

#### 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- $\kappa$ 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、分担研究者は、3項目について、NF- $\kappa$ B 阻害剤が HIV-1 の複製を *in vitro* において抑制すること。さらに、同 NF- $\kappa$ 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. HIV-1 複製に与える NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果

Molt-4 T 細胞株に HIV-1 NL4-3 株を感染させる実験系に、DHMEQ を加え、放出される HIV-1 粒子を RT アッセイ法を用いて定量化する。

同様に、健常者末梢血を PHA 刺激後 IL-2 によって処理し、この細胞を用いて同様に NL4-3 株を感染させる実験系に DHMEQ を加え、放出される HIV-1 を RT アッセイにて定量化した。

#### 2. 新規 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

#### C. 研究結果

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

新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ は NF- $\kappa$ B の核移行を阻止することにより、NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 活性化状態を経時的に観察し、DHMEQ による NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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持ちいて、詳細な解析を進めて行く計画である。

#### D. 考察

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. 新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤は HIV-1 の複製を *in vivo* で抑制できる
2. 新規 NF- $\kappa$ 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。

#### NF- $\kappa$ B 阻害剤による HIV 複製の抑制

新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ は NF- $\kappa$ B の核移行を阻止することにより、NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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、臨床試験へ向けた動物実験なども計画して行

く。

#### NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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試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. 新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤は HIV-1 の複製を *in vivo* で抑制できる
2. 新規 NF- $\kappa$ 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。

#### 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- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B activation in anaplastic large cell lymphoma.

Cancer cell. 5(4): 353-64, 2004.

5. 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.

6. 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 .

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.

#### 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。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

本年度の、本研究課題における研究成果は現在学術論文として投稿中もしくは投稿準備中である。