

研究課題：エイズ発症阻止に関する研究

課題番号：H15 - エイズ - 011

主任研究者：岩本愛吉（東京大学医科学研究所・教授）

分担研究者：塩田達雄（大阪大学微生物病研究所・教授）、三間屋純一（静岡県立こども病院・血液腫瘍科・科長）、渡辺慎哉（東京医科歯科大学・助教授）、宮澤正顯（近畿大学医学部・教授）、滝口雅文（熊本大学エイズ学研究センター・教授）、松下修三（熊本大学エイズ学研究センター・教授）、竹森利忠（国立感染症研究所・部長）、小柳義夫（京都大学・教授）、田中勇悦（琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター・教授）、石坂幸人（国立国際医療センター研究所・部長）

1. 研究目的

抗 HIV 薬の併用（HAART）によって HIV 感染者の治療状況は大幅に改善された。しかし、長期間の HAART によってもウイルスは排除できず、薬剤耐性や HAART の長期毒性などの諸問題が既に明らかとなっている。エイズ発症阻止のためには、HAART の代替治療あるいは HAART を補填する治療法の開発が必須である。われわれは、(1) ヒトゲノム多型性（SNPs）及びトランスクリプトーム、(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫、(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子、などの研究を通じて新しい視点からエイズ発症阻止を目指した総合的な研究を行った。

2. 研究方法

核酸の解析や細胞培養は常法にて行った。タイ国ランパンのコホートに登録された HIV-1 感染者 595 名について、2003 年 10 月までの追跡調査を行い、Kaplan-Myer 解析をおこなった（塩田）。感染時期の特定できる日本人 HIV 感染血友病者のコホート研究を行った（三間屋・渡辺）。マウス・フレンド白血病ウイルス（Fv）感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子をバッククロス実験等により同定した。イタリアの HIV 暴露非感染を含むコホート研究と共同し、ヒトの相同位置にある遺伝子座の連鎖不平衡から HIV 感染抵抗性遺伝子を同定した（宮澤）。臨床試験名「ヒト免疫不全ウイルス感染症に対する特異的免疫療法と計画的抗ウイルス薬の中断（第 I 相試験）」を東京大学医科学研究所附属病院内で実施し、経時的なサンプルを解析した。参加症例は MHC Class I の遺伝子型が A*2402 の HIV 感染者で、抗 HIV 療法により過去 6 ヶ月間の血中 HIV RNA 量が 400 コピー/ml 未満の者 4 例（岩本）。

（倫理面への配慮）

文部科学省、厚生労働省、経済産業省合同の『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』および文部科学省、厚生労働省合同の『疫学研究に関する倫理指針』に該当する研究においてはこれらを遵守する。本研究の成果をヒトに臨床応用する場合には研究担当者の所属する機関の承認を得、研究対象者から必ず文書によるインフォームドコンセントを得た上で、安全に細心の注意を払う。動物を用いる実験に関しては、動物愛護の精神に則って研究を行う。

3. 研究結果

(1) ヒトゲノム多型性（SNPs）及びトランスクリプトーム

タイ国ランパン県の HIV-1 感染者コホートにおいて RANTES プロモーターの遺伝的多型 RANTES -403A を持つ HIV 感染者の死亡率が、この多型を持たない感染者の死亡率よりも有意に高いことを見出した。また、同じコホートにおいて IL4-589T のホモ接合の感染者は、ヘテロ接合や多型を持たない感染者と比べて未治療の時期において死亡率が低いことが明らかになった。（塩田）。これまでのサンプル調製方法（末梢血由来のリンパ球を培養して使用）にかえ、末梢血 2 ml を出発材料として mRNA を増幅して解析する系の構築を行った。LTNP を含む症例の末梢血サンプル（非培養）の遺伝子発現解析を行えるようになった（渡辺）。前年度マウスの系で、中和抗体産生陽性と陰性の系統間に発現差を認めた遺伝子のうち、抗体産生能に最も関係があると考えられた候補遺伝子を、B10.A 系統の cDNA クローンからレンチウイルス発現ベクターに組み込み、A/WySn マウス受精卵に導入した。得られた数系統のトランスジェニック個体について、B リンパ球数の増加など表現型を確認した。一方ヒト側については、第 2 染色体 HIV 感染抵抗性候補領域に存在する単一塩基多型（SNPs）の遺伝子型決定を行い、D22S272 のやや上流にある一つの coding SNP と、それに連鎖した SNPs について、イタリアコホートとタイコホートの両方で、曝露非感染者群と HIV 感染者群間に有意な頻度差を見出した。さらに、イタリアコホートではこの SNP のすぐ上流にある二つの遺伝子が、曝露非感染者群でのみ HIV 抗原刺激後に高い発現を示すことを発見した。そこで、この領域のヒトゲノム塩基配列とマウスゲノム塩基配列を比較して、相同性の高い領域二ヶ所を見出したが、それらは何れも遺伝子発現調節のエンハンサー領域と考えられた。これら領域の塩基配列を決定し、曝露非感染者で頻度が高い新規の SNP を発見した（宮澤）。

(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

日本人の約 70%が発現する HLA-A24 によって提示される HIV 上の CTL エピトープ 4 箇所、7 ペプチドを患者末梢血から分離誘導した自身の樹状細胞（DC）にパルスして、HAART 治療中の患者に“治療ワクチン”として投与した 4 名中 2 名で Nef138 エピトープに特異的に反応する CD8 陽性細胞の増加が見られた。また、1 名では HAART 中止後 4 週目に PI 耐性変異株（M36I）が

一過性に出現したが、6週目にはこの耐性株は消失した(岩本)。HLA-B*3501陽性患者のHIV遺伝子配列解析からCTLによる選択圧の結果と思われる特異変異を見出した(滝口)。HIV感染後10年以上未治療・未発症のHIV-1感染血友病患者では、HLA-B*1507の頻度が高く、HLA-B*5401の頻度が低いことが明らかとなった(三間屋)。in vitroにおけるKD247中和エスケープ変異株の性質を明らかにした。本年度は特に長期非進行症例より新たな人型中和単クローン抗体を複数作成した(松下)。

(3) HIVの病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子
CD63dN分子の作用メカニズムを明らかにするために細胞科学的実験を行った。その結果、CD63dNによりCXCR4の細胞膜への移行が完全に抑制され、細胞内での破壊が亢進すること、CXCR4のC末端セリン残基が必須であること、そして、CD63dNは細胞内においてCXCR4と結合していることが判明した。すなわち、CXCR4には特異的な別個の細胞内移行経路があることがわかった。さらに、HIV-1感染マクロファージの神経病原性を検討したところ、新たに神経細胞の軸索突起伸張過程に対して強力な抑制活性があることが判明した(小柳)。Nef発現によりT細胞の表現型がヘルパー型から抑制型に変化する可能性が示されたが確認にいたらなかった。Nef発現T細胞はヘルパー活性が低下し、nefによるCD4発現抑制が原因と考えられた(竹森)。Vprによって染色体DNAの二重鎖切断(以下DSB: double strand breaks)が誘導されることを明らかにした。HIV-1改変ベクターで作成したウイルスを培養細胞に感染させた後、パルスフィールド電気泳動法で解析すると、X線照射された細胞と同様に、感染細胞のゲノムDNAの断裂を認めた。DSBに伴って惹起される細胞内シグナルがVpr発現に伴って誘導された。一方、患者血漿中にVprを検出した。VprのN末及びC末側をそれぞれ認識するマウス単クローン抗体を作成し、免疫沈降後、ウェスタン法による解析を行い、約15kDaの蛋白質を検出した。その濃度は約数100pgから1ng/ml程度だった。血中ウイルスRNAコピー数が高い症例にVprが検出される傾向が認められた(石坂)。ケモカイン受容体架橋を受けて分化し不活化HIV-1粒子で感作したDCは、R5 HIV-1抑制因子を産生するCD4+T細胞を誘導した。また、このDC免疫hu-PBL-SCIDマウスにCXCR4アンタゴニストを投与することにより、CCR5指向性株とCXCR4指向性株の重感染に抵抗性を賦与できることが明らかとなった(田中)。

4. 考察

(1) ヒトゲノム多型性(SNPs)及びトランスクリプトーム
本研究班の分担研究者らが見出した遺伝子多型のうち、平成16年度のRANTES -28Gに加え、本年度IL4 -589Tの遺伝子多型もHIV感染症の進行を遅らせることがわかった。

(塩田)。リンパ球を培養して行った発現解析では期待した結果が得られず、より少量の末梢血から培養を介さず解析できる系の樹立が必要である(渡辺)。HIV暴露非感染者と感染パートナーとで対立遺伝子頻度の異なるマイクロサテライトマーカーとSNP遺伝子座を発見した(宮澤)。

(2) HIV特異的細胞性及び液性免疫

“治療ワクチン”によって特異免疫を誘導できなかった2症例はHAART開始前の最低CD4数が低く(50及び2/ μ l)、いったん免疫が荒廃した感染者ではワクチン効果がより不良である可能性が示唆された(岩本)。発症促進の可能性が認められたHLA-B*5401は、欧米人には少ないが日本人や中国人では頻度の高いアレルである(三間屋)。高い交差中和抗体活性を持つLTNPから新規の中和抗体を樹立しその中和メカニズムを研究する必要がある(松下)。

(3) HIVの病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子
CD63とその変異体のHIV増殖調節機序が明らかになることより、新たなHIV抑制法が開発されることが期待される(小柳)。血清中のVprが測定できるようになったことで、HIV感染病態とVprの関係が新たな側面から解析できる。Vprによるクロマチンリモデリングが静止期の細胞へのHIVの感染能力やエイズにおける悪性腫瘍の多発に関連している可能性がある(石坂)。効率的なDC誘導法とR5ウイルス及びX4ウイルス双方に対し抵抗性を付与する実験系が確立できた。単球上のケモカインレセプターを架橋することによりTh1誘導性DCを培養誘導できることを発見した。これらの実験系を使って未知のR5 HIV抑制性CD4ファクターを発見できた(田中)。

5. 自己評価

IL4およびRANTESのプロモーターにおける遺伝子多型と病態進行の関わりに民族差が存在するか否か、という当初の目的は達成できた(塩田)。LTNPは主治医と強い信頼関係にある。主治医をつなぐコホートを維持し、情報の共有と研究を進めていくことは極めて重要であり、その基盤が形成できた(三間屋)。マウス受精卵にレンチウイルスベクターで遺伝子導入できる系が開発できた。HIV感染抵抗性遺伝子の一つを同定できた可能性が高く、国際的に評価される独自の成果である(宮澤)。アジュバンドなどHIV感染者におけるワクチンの免疫誘導効果の上昇を高める方法の開発が重要である(岩本)。HIV感染に重要な新規の宿主因子が同定できた(小柳)。Th1誘導性DCを培養誘導する系の確立と新たなCD4ファクターの発見は極めて評価できる(田中)。

6. 結論

HIV抵抗性遺伝子やSNPsの同定、治療ワクチンの臨床応用研究等で成果を挙げた。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

研究課題：HIV の潜伏感染・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

課題番号：H15・エイズ・012

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）

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）、堀江 良一（北里大学医学部 助教授）

1. 研究目的

HAART 療法の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。サイトカインの併用や治療中断による発現誘導などを利用し、既存の薬物を用いた潜伏感染リザーバーの HIV 排除の試みが報告されているが、十分な成果が得られているとは言い難い。つまり、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確立せず、感染個体からの HIV の排除、再発を防止する有効な治療法は存在しないと考えられる。従って、HIV 潜伏感染の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を確立することが急務である。事実、HIV 研究が急速に進む米国の対 HIV 戦略には、「ワクチン開発」はもちろんの事、「潜伏感染細胞の制御」も重要な研究領域と認識されている。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オリジナルな観点から、潜伏感染 HIV の制御を目指した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。

2. 研究方法

本研究では、申請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、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。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の観点から明らかにする。③DNA 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ック制御の試みの3点について検討する。以上の検討事項について、メチル化解析は Bisulfite Genomic PCR 法を、ヒストン化学修飾の解析にはクロマチン免疫沈降法 (ChIPs) を用い解析する。再活性化阻止実験には慢性感染細胞株を TNF α で再活性化誘導の実験系を用いる。

(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うシドニーの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。

3. 研究結果

慢性感染細胞株の解析から、プロウイルス LTR のメチル化による潜伏化と抑制型ヒストン化学修飾系による潜伏化の2通りの分子機構の重要性が示唆された。SHIV 感染モデルサルの末梢血単核球およびリンパ組織を用いて、*in vivo* のメチル化解析を行った。その結果、1；メチル化シトシンの多くは non-CpG 型である。2；メチル化の認められる LTR 中のメチル化の密度は低い。3；多くの LTR ではメチル化は認められない。の3点に結果を集約できた。シドニーコホートの HIV 感染者検体の *in vivo* メチル化を行ない、サルとほぼ同様の結果を得る事ができた。Bisulfite Genomic PCR が成功していない例も残されているが、*in vivo* のウイルスには *in vitro* で認められた高密度の CpG メチル化は存在しないことが強く示唆された。

SHIV 感染モデルサル組織を用いて、*in vivo* クロマチン免疫沈降 (ChIPs) の確立を目指した検討により、*in vivo* のヒストン化学修飾状況の解析が実行可能である事が示された。しかし、感染初期におけるウイルス動態は様々であり、今後の検討を有すると思われた。一部、感染性ウイルスの減少が認められる検体において、時間経過とともに抑制型ヒストン化学修飾が強まる傾向が認められた。

共同研究者の Suzuki らは、LTR 標的 dsRNA が HIV の転写を抑制し、その際転写調節領域に重度な DNA メチル化を誘導することを発見した。現在、その詳細な分子機構について我々と共同研究を行ない、解析している。

NF- κ B 阻害剤は、エイズリンパ腫のモデル細胞である EB プラストに細胞死を誘導することが示され、有望な治療薬として考えられる事を示した。さらに、*in vitro* の感染系において、感染性ウイルスの放出を抑制する事も明らかにした。

4. 考察

これまでの研究から、*in vivo* におけるプロウイルスの DNA メチル化の頻度は低く、低密度の non-CpG 型のメチル化が存在する事が明らかにされた。この事は、*in vitro*

とは異なり、in vivo においては、抑制型ヒストン化学修飾による発現抑制がより重要であると考えられ、in vivo における転写抑制されたウイルス遺伝子は細胞外刺激に呼応して容易に再活性化されうる事を示唆している。今後、in vivo ChIPs 実験系の立ち上げが成功した事から、抑制型ヒストン化学修飾の重要性を検討して行きたい。また、ウイルスリザーバーの制御の方向として、潜伏感染細胞の再活性化誘導による殲滅戦略と、DNA メチル化誘導などによる再活性化阻止の2つの戦略が考えられる事を示す事が可能となった。

NF- κ B 阻害剤の有効性はエイズリンパ腫のみならず、HIV ウイルス複製にも重要な影響を及ぼす事を示す事ができた。詳細な分子機構を解析する事により、転写抑制誘導型の新薬としての可能性を提供できるのではないかと考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

我々の研究から、潜伏感染様式として、in vivo においては、抑制型ヒストン化学修飾系が重要である事が強く示唆された。この事から、潜伏感染細胞の制御に向けて、

1. 再活性化誘導による潜伏感染細胞の殲滅、2. 安定なクロマチン構造誘導による再活性化阻止の2つの戦略を示す事ができた。これまで示された、リザーバー制御の試みは、潜伏感染の分子機構の詳細が不明のまま、in vitro で得られた知識の導入によって、行なわれてきたといっても過言でない。我々の解析結果は、有望な戦略の基礎を提供したと考える。

siRNA については、共同研究者 Suzuki らが最初の論文を発表したが、ほ乳類細胞では DNA メチル化誘導能に意見の相違が認められる現状であり、我々との共同研究を通して詳細な分子機構を今後示して行く必要があると思われる。この知見は非常に重要で、前述した潜伏感染細胞の制御の戦略として、「安定なクロマチン構造の誘導による再活性化阻止」の具体的な方法を提供する可能性が大きいからである。この戦略目標を達成できる戦術としての siRNA を用いたエピジェネティック制御法の確立は次の研究課題の重要な柱として考えている。

NF- κ B 阻害剤の有効性については、特にエイズリンパ腫への応用が期待される。今後、カポジ肉腫等への応用性を含めて検討したい。抗 HIV 複製効果については、今後さらに詳細を詰めて行く必要があると思われる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今年度の研究から、in vivo におけるウイルス遺伝子転写抑制に DNA メチル化依存的な制御機構よりむしろ抑

制型ヒストン化学修飾状況が重要である事を示す事ができるとは、今後の HIV ウイルスリザーバー制御の視点に立った抗 HIV 戦略の基礎を提供できたと考える。これらのことは、HAART 療法に限界が示された昨今の HIV 治療戦略に新たな視点を投げかけただけでなく、高額な薬剤を永続的に投与しなければならないこの療法を経済的な理由によって受ける事ができない途上国の莫大な感染者に、我が国の国策としての公衆衛生向上と援助の方向を示せる可能性を提供したと考える。

3) 今後の展望について

本研究班は、今年度をもって終了するが、これまでの研究で得られた、エピジェネティクスによるウイルスの潜伏化とその分子機構についての知見と結果から、in vivo における潜伏感染ウイルス動態を世界で初めて示す事ができた。この事により将来エピジェネティクスを利用した潜伏感染細胞の制御の可能性を示す事ができたと考えている。我々研究班は、来年度から、エピジェネティクス制御の基礎を固め、応用性を含めた新たな応用研究に、本研究を生かして行く考えである。

6. 結論

HIV の潜伏感染の分子機構として、プロウイルス LTR の DNA メチル化の重要性と抑制型ヒストン化学修飾系の重要性を示す事ができた。In vivo において、抑制型ヒストン化学修飾系が重要である事を示す事ができた。

これらの事はエピジェネティック制御によるウイルスの潜伏化をエピジェネティック制御を応用して制御する事が可能であることを示唆し、今後の潜伏感染細胞の制御戦略を示す事が可能となった。HIV LTR 標的 dsRNA は、安定なクロマチン構造形成による再活性化阻止の戦略上重要な戦術として考慮する必要がある。NF- κ B 阻害剤は、エイズリンパ腫への応用が期待できる。またウイルス複製阻害効果も認められた。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

○特許申請

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、梅澤一夫。

本特許に、エイズリンパ腫を加えて申請予定。

さらに、同薬剤が HIV 複製抑制に機能しうることから、新たな特許申請を行なう予定。

研究課題：HIV の潜伏感染・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

課題番号：H15-エイズ-012

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）

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）、堀江 良一（北里大学医学部 助教授）

1. 研究目的

HAART 療法の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。サイトカインの併用や治療中断による発現誘導などを利用し、既存の薬物を用いた潜伏感染リザーバーの HIV 排除の試みが報告されているが、十分な成果が得られているとは言い難い。つまり、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確立せず、感染個体からの HIV の排除、再発を防止する有効な治療法は存在しないと考えられる。従って、HIV 潜伏感染の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を確立することが急務である。事実、HIV 研究が急速に進む米国の対 HIV 戦略には、「ワクチン開発」はもちろんの事、「潜伏感染細胞の制御」も重要な研究領域と認識されている。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オリジナルな観点から、潜伏感染 HIV の制御を目指した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。

2. 研究方法

本研究では、申請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、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、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の観点から明らかにする。③DNA 標的 siRNA および新規 NF-κB 阻害剤を利用した潜伏・再活性化のエピジェネティック制御の試みの3点について検討するとした。今年度は、昨年度始めた HIV 感染患者検体の引き続いた *in vivo* メチル化解析を進行させ、さらに、SHIV 感染モデル系を用いた *in vivo* クロマチン免疫沈降法の確立を行なった。また抗 NF-κB 剤の HIV 複製阻害効果の検討も行った。以上の検討事項について、メチル化解析は Bisulfite Genomic PCR 法を、ヒストン化学修飾の解析にはクロマチン免疫沈降法 (ChIPs) を用いた。抗 NF-κB 剤の効果解析には NL-43 (足立教授：徳島大) を用いた *in vitro* 感染系を用いた。

(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の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っ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。

3. 研究結果

シドニーコホートの HIV 感染者検体の *in vivo* メチル化を行ない、サルとほぼ同様の結果を得る事ができた。Bisulfite Genomic PCR が成功していない例もまだ残されているが、*in vivo* のウイルスには *in vitro* で認められた高密度の CpG メチル化は存在しないことが強く示唆された。

SHIV 感染モデルサル組織を用いて、*in vivo* クロマチン免疫沈降 (ChIPs) の確立を目指した検討により、*in vivo* のヒストン化学修飾状況の解析が実行可能である事が示された。しかし、感染初期におけるウイルス動態は様々であり、今後の検討を有すると思われた。一部、感染性ウイルスの減少が認められる検体において、時間経過とともに抑制型ヒストン化学修飾が強まる傾向が認められた。この際、プロウイルス LTR のメチル化状態を検討したが、時間経過とともにメチル化 LTR は増加したが、3年経過した検体 (1検体) では全くメチル化 LTR は認められず、しかし、抑制型ヒストン修飾の典型である H3K9 のトリメチル化が強く検出された。この傾向については、同様の長期未発症の別のサル個体を用いて解析を行ない、再現性を見てみたい。

共同研究者の Suzuki らは、LTR 標的 dsRNA が HIV の転写を抑制し、その際転写調節領域に重度な DNA メチル化を誘導することを発見した。現在、その詳細な分子機構について我々と共同研究を行ない、解析している。

NF-κB 阻害剤は、エイズリンパ腫のモデル細胞である EB プラストに細胞死を誘導することが示され、有望な治療薬として考えられる事を示した。

in vitro の感染系において、本薬剤は、感染性ウイルスの放出を抑制する事が明らかとなった。この効果について、転写抑制であるかどうかの基礎的な検討を加えて、さらに詳細に実験を進行させる予定である。

4. 考察

これまでの研究から、*in vivo* におけるプロウイルスの DNA メチル化の頻度は低く、低密度の non-CpG 型のメチル化が存在する事が明らかにされた。この事は、*in vitro*

とは異なり、in vivo においては、抑制型ヒストン化学修飾による発現抑制がより重要であると考えられ、in vivo における転写抑制されたウイルス遺伝子は細胞外刺激に呼応して容易に再活性化されうる事を示唆している。今後、in vivo ChIPs 実験系の立ち上げが成功した事から、抑制型ヒストン化学修飾の重要性を検討して行きたい。また、ウイルスリザーバーの制御の方向として、潜伏感染細胞の再活性化誘導による殲滅戦略と、DNA メチル化誘導などによる再活性化阻止の2つの戦略が考えられる事を示す事が可能となった。

NF- κ B 阻害剤の有効性はエイズリンパ腫のみならず、HIV ウイルス複製にも重要な影響を及ぼす事を示す事ができた。詳細な分子機構を解析する事により、転写抑制誘導型の新薬としての可能性を提供できるのではないかと考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度の研究から、潜伏感染様式として、in vivo においては、抑制型ヒストン化学修飾系が重要である事が強く示唆された。この事から、潜伏感染細胞の制御に向けて、1. 再活性化誘導による潜伏感染細胞の殲滅、2. 安定なクロマチン構造誘導による再活性化阻止の2つの戦略を示す事ができた。これまで示された、リザーバー制御の試みは、潜伏感染の分子機構の詳細が不明のまま、in vitro で得られた知識の導入によって、行なわれてきたといっても過言でない。我々の解析結果は、有望な戦略の基礎を提供したと考える。

siRNA については、共同研究者 Suzuki らが最初の論文を発表したが、ほ乳類細胞では DNA メチル化誘導能に意見の相違が認められる現状であり、我々との共同研究を通して詳細な分子機構を今後示して行く必要があると思われる。この知見は非常に重要で、前述した潜伏感染細胞の制御の戦略として、「安定なクロマチン構造の誘導による再活性化阻止」の具体的な方法を提供する可能性が大きいからである。この戦略目標を達成できる戦術としての siRNA を用いたエピジェネティック制御法の確立は次の研究課題の重要な柱として考えている。

NF- κ B 阻害剤の有効性については、特にエイズリンパ腫への応用が期待される。今後、カポジ肉腫等への応用性を含めて検討したい。抗 HIV 複製効果については、今後さらに詳細を詰めて行く必要があると思われる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今年度の研究から、in vivo におけるウイルス遺伝子転写抑制に DNA メチル化依存的な制御機構よりむしろ抑制型ヒストン化学修飾状況が重要である事を示す事ができ

ことは、今後の HIV ウイルスリザーバー制御の視点に立った抗 HIV 戦略の基礎を提供できたと考える。これらのことは、HAART 療法に限界が示された昨今の HIV 治療戦略に新たな視点を投げかけただけでなく、高額な薬剤を永続的に投与しなければならないこの療法を経済的な理由によって受ける事ができない途上国の莫大な感染者に、我が国の国策としての公衆衛生向上と援助の方向を示せる可能性を提供したと考える。

3) 今後の展望について

本研究班は、今年度をもって終了するが、これまでの研究から、エピジェネティクスによるウイルスの潜伏化とその分子機構についての知見と結果から、in vivo における潜伏感染ウイルス動態をある程度示す事ができた。この事により将来エピジェネティクスを利用した潜伏感染細胞の制御の可能性を示す事ができたと考えている。我々研究班は、来年度から、エピジェネティクス制御の基礎を固め、応用性を含めた新たな応用研究に、本研究を生かして行く考えである。

6. 結論

HIV の潜伏感染の分子機構として、プロウイルス LTR の DNA メチル化の重要性と抑制型ヒストン化学修飾系の重要性を示す事ができた。In vivo において、抑制型ヒストン化学修飾系が重要である事を示す事ができた。これらの事はエピジェネティック制御によるウイルスの潜伏化をエピジェネティック制御を応用して制御する事が可能であることを示唆し、今後の潜伏感染細胞の制御戦略を示す事が可能となった。HIV LTR 標的 dsRNA は、安定なクロマチン構造形成による再活性化阻止の戦略上重要な戦術として考慮する必要がある。NF- κ B 阻害剤は、エイズリンパ腫への応用が期待できる。またウイルス複製阻害効果も認められた。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

○特許申請

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、梅澤一夫。

本特許に、エイズリンパ腫を加えて申請予定。

さらに、同薬剤が HIV 複製抑制に機能しうることから、新たな特許申請を行なう予定。