

厚生労働科学研究研究費補助金
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17年度 総括研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成18(2006)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、以下2点の結論を得た。

1. レンチウイルスの潜伏化にはプロウイルス LTR のメチル化による制御よりむしろ抑制型ヒストン化学修飾が深く関与している。
1. NF- κ B 核移行阻害剤は、HIV-1 の複製を阻害する。

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。

A. 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およびサル感染モデル系の *in vivo* メチル化解析の結果がまとめられ、2項目については、*in vivo* ChIP 法を確立してサル感染モデルから得られたリンパ組織を用いた解析を行なった、3項目については NF- κ B 核移行阻害剤が HIV の複製を阻害する効果を持つ事を明らかにした。

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. NF- κ B 核移行阻害剤の HIV 複製に与える効果の検討

末梢血単核球を用いた *in vitro*

HIV-1 感染実験系に、NF- κ B 核移行阻害剤を処理し、その HIV-1 複製活性に対する影響を調べ、2、細胞増殖に対する影響、感染初期過程に与える影響等の解析を行ない、プロウイルスの転写過程阻害活性を有する事を明らかにした。

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・堀江とリサーチアシスタント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。

A. 研究結果

in vivo における LTR のメチル化

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) 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 1 2 週、2 4 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 4 8 週、7 2 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 1 0 LTR を解析した結果、配列決定可能であった全 2 0 9 LTR 中メチル化された LTR は 3 8 LTR であり、約 1 7 % 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。

元来、感染モデルサルを用いた解析は、HIV 感染患者個体を直接解析することが、理論的に困難である事を想定して開始した状況であり、この解析結果を HIV 感染患者に適応することが可能かどうかの疑問は残存した。昨年度開始した、シドニーコホート検体を用いた *in vivo* メチル化解析は、サルモデルを用いた *in vivo* メチル化解析の実験系を応用し、さらに莫大な検体数を誇るシドニーコホート検体は、比較的プロウイルス量の多い検体を選ぶ事が可能であったことが、成功した鍵であった。

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。

プロウイルスロードをリアルタイム PCR によって測定、 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て 24 検体中 18 検体を解析対象とした。その結果、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。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 LTR は低頻度に認められ、認められても低密度であった。また、同様にメチル化シトシンの多くは non-CpG 配列のシトシン残基のメチル化であった。本年度は、さらに解析を進めたが、結果は同様に、高頻度、高密度のメチル化 LTR は存在しなかった。

サル感染モデル系、シドニーコホート検体を用いた解析系の双方の *in vivo* メチル化解析から、*in vivo* において、レンチウイルスプロウイルス LTR の高頻度/高密度メチル化 LTR は存在しないと結論した。このことは、*in vivo* において、LTR 周辺の抑制型ヒストン化学修飾が、レンチウイルスの潜伏に関与する可能性を強く示唆している。これらの事から、*in vivo* におけるヒストン化学修飾状態を解析する、*in vivo* クロマチン免疫沈降法 (*in vivo* ChIP 法) の確立を目指した。

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、*in vivo* においては「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」による潜伏化の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、「DNA メチル化非依存的潜伏様式」の分子機構の正体は、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あろうと考えられている。この考えに基づき、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、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。この実験系を *in vivo* において適応するための条件検討を昨年度から開始した。

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と同時に、PCR 系に強い定量性を持たせる必要がある。これらの条件は相反する事柄であり、これらを Taqman probe を用いた定量 PCR 系を導入することにより解決することを目指した。

京都大学ウイルス研究所速水教授の研究グループより、SHIV 感染サルより摘出したリンパ組織を提供していただき (感染初期、中期 (AIDS 発症サル/未発症サル)、後期 (ウイルス血症なし) のそれぞれの個体より摘出した凍結組織)、これらを材料に *in vivo* ChIP 解析の実験系を立ち上げ、解析の実際を行なった。

In vivo においては、ウイルスの複製が起きている感染細胞や、潜伏化した感染細胞など様々な状態の感染細胞が存在している。このため、*in vivo* ChIP 解析では、出てきたデータの解

釈が困難であると、当初から予測していた。実際、転写活性化状態のヒストンマークと抑制型のマークが、ほぼ拮抗する組織がほとんどである事がわかった。この中で、差の明確な組織に注目してみると、感染初期において、一過性にウイルス増殖が認められ、その後ウイルス放出が減少する検体における、ソケイリンパ節および脾臓において、ウイルス放出減少に伴って、抑制型ヒストンマークが優勢となることがあきらかになった。さらに、感染中期において、AIDS 発症サル脾臓では、明らかに活性化型ヒストンマークが優勢となり、感染3年目のウイルス血症が認められない感染サルのリンパ節では、強い抑制型ヒストンマークだけが検出されるようになる。

これらの結果は、*in vivo* において、プロウイルスの発現制御にエピジェネティクス制御が深く関与することを強く示唆したものと考えられる。

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。

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、潜伏感染 HIV の再活性化シグナル伝達系を解析するなかで、DHMEQ が HIV の複製を阻害することを見いだした。ヒト T 細胞株に HIV を *in vitro* において感染させる実験系に、濃度を変化させ、また加える時期を変化させて、本薬剤の抗 HIV 活性を培地中に放出される RT 活性を定量することにより評価した。DHMEQ は高感度の抗 NF- κ B 活性を有し、多くの腫瘍細胞が NF- κ B の構成的活性化による抗細胞死能を獲得していると考えられ、多くの腫瘍細胞株が本薬剤により細胞障害を受けることが示されている。本実験系においてもヒト T 細胞株自体に細胞障害活性が現れ、実験系として成立させる事が困難であった。このためヒト末梢血単核球を分離し、PHA 刺激を加え IL-2 存在下で培養した活性化ヒト T 細胞を用いた。この結果、HIV-1NL-43 株を用いた実験において、有為な抗 HIV-1 複製活性を認めた。活性化 T 細胞では、NF- κ B の活性化が認められるが、HIV が感染すると、さらに活性化が顕著に認められ、本薬剤はその活性化を明確に抑制する。本薬剤の抗 HIV 複製活性が、転写抑制にあることを今後解析して証明し、本薬剤が新たな

な抗 HIV 剤としての有効性を示していきたい。

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. レンチウイルスプロウイルス LTR の *in vivo* におけるメチル化状態は、低頻度、低密度である。
1. レンチウイルスプロウイルス LTR 近傍のヒストン化学修飾系は、プロウイルス転写制御に関与し、潜伏化に重要な役割を担っていることが強く示唆された。
1. NF- κ B 核移行阻害剤は、HIV-1 の複製を阻害する。

SHIV 感染サル検体、シドニーコホート検体による *in vivo* のメチル化解析から明らかになった事は、LTR にメチル化を受けたシトシン残基は存在するが、その頻度は低く、また LTR 中においても低密度であるということである。このことは、一般的に *in vivo* におけるレンチウイルスプロウイルス LTR は *in vitro* で検出されたような高密度で高頻度にメチル化を受けると示唆している。

ヒトに感染するレトロウイルスとしてヒト T 細胞性白血病ウイルス (HTLV-1) が知られる。我々は過去

に、このウイルスに感染し白血病 (ATL) を発症した患者末梢血の HTLV-1 LTR のメチル化解析を行ない、5'-LTR 選択的に高密度にメチル化されることを見だし報告した。ATL を発症していない HTLV-1 の感染者 (無症候性キャリア) の末梢血においても間接的解析ではあるが、高密度なメチル化を認めている。In *vitro* においては、HIV もほぼ同様な高密度、5'-LTR 選択的メチル化を見いだしているが、*in vivo* では全くその様子が異なっていた。これらの事は、高密度の LTR のメチル化が、細胞増殖と密接に関係していることを示唆していると考えている。すなわち、白血病を発症した HTLV-1 の感染細胞は、*in vivo* において強力に増殖していると考えられ、また無症候性キャリアにおいても、弱いながらも増殖性を獲得していると考えられる。一方、HIV の場合、*in vitro* で培養されている場合は当然増殖し続けているが、*in vivo* の感染細胞は、HTLV-1 の感染細胞とは全くその増殖性が異なると考えられるからである。こうしたことは、主要な DNA メチル化酵素が DNA 合成装置と共役して機能することが知られていることに一致する。ウイルスの潜伏化の分子機構を考える上で、これらの差異は興味深い。

In vivo においてレンチウイルスでは、LTR のメチル化依存的な転写抑制機構よりむしろ、LTR 近傍の抑制型ヒストン化学修飾の重要性が示唆された事は、今後のリザーバー戦略に重要な知見をもたらした。すなわち、潜伏化した HIV は、再活性化されやすいということである。一般に、抑制型ヒストン化学修飾による転写抑制状態をより強固なクロマチン構造へと変換するために DNA メチル化が誘導されると考えるモデルがあり DNA メチル化による転写抑制は、その領域からの転写はほぼ完全に抑制されている。従って、抑制型ヒストンマークによって一過性に抑制状態が形成され、その後 DNA メチル化によって、完全な転写抑制構造であるヘテロクロマチンが形成されるのである。この考え方に則れば、潜伏化した HIV は、一時的な抑制状態にあると考えられ、サイトカインや増殖因子等による細胞外刺激に容易に呼応して再活性化しうる事が予測される。臨床的にもそのような現象は観察され、計画的に HAART を中断する事により、ウイルスリザーバーを除去し患者の免疫系の再構築を誘導する試みの中で、リバウンドするウイルスは、時間経過とともにより古いウイルス（野生型）が再活性化す

るという報告がある。こうしたことは、我々の考察を強くサポートする現象と考える。すなわち感染後早期に潜伏化した野生型のウイルスは、より長期間転写抑制状態に有り、可能性としてより強固なクロマチン構造による転写抑制状態にあるが故に、HAART 中断では容易に再活性化されず、一方、時間経過をへていない若いウイルスでは、より緩いヒストンマークによる転写抑制を受けており、HAART 中断時に容易に再活性化されうるのである。

我々の仮説が正しければ、HIV の対リザーバー戦略は、次のような2通りの戦略をとることが有効と思われる。1) 安定な転写抑制状態の誘導：DNA メチル化の誘導による強固なクロマチン構造を誘導し、再活性化されない安定な転写抑制状態を誘導する。2) 安全な再活性化誘導によるリザーバーの縮小。

共同研究者である、オーストラリアシドニー市 St. Vincent's Hospital 免疫研究部の Suzuki 博士は、プロモーター標的 siRNA により、HIV-1 LTR に高頻度/高密度の DNA メチル化の誘導に成功し、強力な転写抑制の誘導による HIV の複製を完全に抑制することに成功した。この方法を有効性を確認し、in vivo への応用性を確立する事により、1) の戦略は実行

可能となるであろう。一方、近年、対リザーバー戦略として、IL-2 の投与や TNF α の投与などが臨床治験され、治験者の死亡が報告されるなど、これらの再活性化誘導には問題があると言わざるを得ない。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による再活性化誘導の報告もあるが、その後の報告がなされていない。再活性化に関わる細胞内情報伝達系などの解析を通し、より安全な再活性化誘導の経路を発見する事により2) の戦略も実行可能となると思われる。

NF- κ B 阻害剤による HIV 複製の抑制

再活性化シグナル伝達系の解析中に、NF- κ B 阻害剤が HIV の複製を阻害する事を見いだした。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り、抗 HIV 複製活性は、転写レベルによるものと考えている。実際、HIV 感染により誘導される NF- κ B は本薬剤により強く核移行が阻害されている。現在シングルラウンドの感染系を用いて、複製阻害活性が転写レベルであることを確認しているが、新しい抗 HIV 薬と

して十分期待できるのではないかと考えている。

E. 結論

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. レンチウイルスプロウイルス LTR の *in vivo* におけるメチル化状態は、低頻度、低密度である。
1. レンチウイルスプロウイルス LTR 近傍のヒストン化学修飾系は、プロウイルス転写制御に関与し、潜伏化に重要な役割を担っていることが強く示唆された。
1. NF- κ B 核移行阻害剤は、HIV-1 の複製を阻害する。

以上、本年度の研究により

1. レンチウイルスの潜伏化にはプロウイルス LTR のメチル化による制御よりむしろ抑制型ヒストン化学修飾が深く関与している。
1. NF- κ B 核移行阻害剤は、HIV-1 の複製を阻害する。

以上2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. Uchihara JN, Matsuda T, Okudaira T, Ishikawa C, Masuda M, Horie R, Watanabe T, Ohta T, Takasu N, Mori N. Transactivation of the ICAM-1 gene by CD30 in Hodgkin's Lymphoma. *Int J Cancer. In press 2005.*
2. Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamihira S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K, Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood. 106:2462-71.2005.*
3. Ohsugi T, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Horie R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K. In vitro and in vivo antitumor activity of the NF-kappaB inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I-infected cell line, HUT-102. *Leuk Res. 30(1):90-7 2005.*
4. Watanabe M. Sasaki M. Itoh K. Higashihara M. Umezawa K. Kadin ME. Abraham LJ. Watanabe T. Horie R. JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Research. 65:7628-34, 2005.*
5. Dewan MZ. Watanabe M. Ahmed S. Terashima K. Horiuchi S. Sata T. Honda M. Ito M. Watanabe T. Horie R. Yamamoto N. Hodgkin's lymphoma cells are efficiently engrafted and tumor marker CD30 is expressed with constitutive nuclear factor-kappaB activity in unconditioned NOD/SCID/gammac(null) mice. *Cancer Science. 96:466-73, 2005.*
6. Ohsugi T. Horie R. Kumasaka T. Ishida A. Ishida T. Yamaguchi K. Watanabe T. Umezawa K. Urano T. In vivo antitumor activity of the NF-kappaB

inhibitor
dehydroxymethylepoxyquinomicin
in a mouse model of adult T-cell
leukemia. *Carcinogenesis*.
26:1382-8, 2005.

7. Nonaka M. Horie R. Itoh K.
Watanabe T. Yamamoto N.
Yamaoka S. Aberrant NF-
kappaB2/p52 expression in
Hodgkin/Reed-Sternberg cells and
CD30-transformed rat fibroblasts.
Oncogene. 24:3976-86, 2005.

8. Watanabe M. Dewan MZ.
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-kappaB
inhibitor DHMEQ selectively targets
constitutive NF-kappaB activity and
induces apoptosis of multiple
myeloma cells in vitro and in vivo.
International Journal of Cancer.
114:32-8, 2005.

9. Iwata S. Souta-Kuribara A. Sasaki
T. Kobayashi H. Yamakawa A.
Hosono 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
lymphocytoid type (Cas-L).
Oncogene. 24(7): 1262-71, 2005.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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

14. 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.

15. 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 .

16. 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.

17. 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.

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

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

19. 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.

20.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.

21.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.

(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、伊吹 謙太郎、濱野 章子、三宅 在子、Kazuo Suzuki、三浦 智行、David Cooper、速水 正憲、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 2005 年、横浜
2)三宅 在子、石田 尚臣、深澤 嘉伯、伊吹 謙太郎、三浦 智行、速

水 正憲、渡邊 俊樹

「SHIV感染サル検体を用いた感染後期および後期におけるプロウイルスLTR上のヒストン化学修飾状態の解析」 日本ウイルス学会 2005年、横浜

3)石田 尚臣、Kazuo Suzuki、David Cooper、渡邊 俊樹「HIV-1 プロウイルス LTR のメチル化解析」 日本エイズ学会 2005年、熊本

4)三宅 在子、石田 尚臣、堀江 良一、梅沢 一夫、渡邊 俊樹

「新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ による HIV-1 増殖抑制効果の検討」 日本エイズ学会 2005年、熊本

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。本年度の研究から、以下の結論を得た。

「レンチウイルスの潜伏化にはプロウイルス LTR のメチル化による制御よりむしろ抑制型ヒストン化学修飾が深く関与している。」

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。

分担研究者である石田は、本年度は、1の項目について、シドニーコホート検体およびサル感染モデル系の *in vivo* メチル化解析の結果がまとめ、2項目については、*in vivo* ChIP 法を確立してサル感染モデルから得られたリンパ組織を用いた解析を行なった。

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。

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お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
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2

09 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