

201319036A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策 研究事業

「エイズ関連悪性腫瘍誘発機序の理解と抗体療法の有効性評価」  
に関する研究

平成25年度

総括研究報告書

研究代表者 石坂幸人

平成26(2014)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 「エイズ関連悪性腫瘍誘発機序の理解と抗体療法の有効性評価」に関する研究  
石坂幸人 ----- 1

## II. 分担研究報告

1. 「HIV-1ウイルス蛋白質に対する抗体作成と有効性評価」に関する研究  
石坂幸人（国立国際医療研究センター、難治性疾患研究部） ----- 6
2. 「HIV感染末梢血細胞のDNAメチル化アレイ解析」に関する研究  
志村まり（国立国際医療研究センター、難治性疾患研究部） ----- 10
3. 「HIV感染末梢血細胞の形質転換能の検討」に関する研究  
徳永研三 ----- 12

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

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

「エイズ関連悪性腫瘍誘発機序の理解と抗体療法の有効性評価」に関する研究

研究代表者 石坂幸人 国立国際医療研究センター 難治性疾患研究部 部長

研究要旨：HIV-1(以下 HIV)感染者の予後は著しく改善されたが、悪性腫瘍の発症率は依然高い。申請者らの先行研究によって、エイズ B 細胞性リンパ腫が HIV 固有の分子機序で生じる可能性が示唆された。そこで本課題では、ウイルス感染に伴って誘導される DNA メチル化様式の解析を通して、B 細胞の形質転換機序を明らかにし、エイズ悪性リンパ腫の発症に関与する因子の同定を試みる。初年度の解析の結果、T 細胞へのウイルス感染に伴って、共培養した正常 B 細胞の DNA メチル化様式が変化することが明らかとなった。また、患者血液中に存在するレトロトランスポジション誘導活性において、Vpr が主要な要因として関与していることが示唆された。

<研究分担者>

- ・志村まり 国立国際医療研究センター研究所  
難治性疾患研究室・室長
- ・徳永研三 国立感染症研究所  
感染病理部・主任研究官

A. 研究目的

Antiretroviral therapy (ART 療法)が導入され、HIV-1(以下 HIV)感染者の予後は著しく改善されたが、悪性腫瘍の発症率は依然高く、現在も死亡原因の約 30%を占めている。悪性腫瘍の多くは B 細胞性悪性リンパ腫であり、非ホジキンリンパ腫の HIV 感染者における発症リスクは非感染者の 10-100 倍と試算されている。リンパ腫の多くはウイルスが感染しない B 細胞由来であることや、免疫不全状態の既往の無い患者でも悪性腫瘍が発症すること、さらに、究めて稀なバーキットリンパ腫も発症することから、HIV 関連悪性腫瘍の発症には HIV 固有の分子が関与している可能性が疑われる。しかし、その要因は不明であり、発がん阻止に向けた戦略も全く構築できていない。

申請者らは、DNA メチル化アレイ解析を行い、その後の階層的クラスター解析から、HIV 関連リンパ腫と非感染リンパ腫では DNA メチル化パターンが異なることを見いだした。即ち、HIV 関連リンパ腫と非 HIV リンパ腫が異なる分子機序で発症している可能性が考えられる。

HIV が産生するウイルス蛋白質のうち Tat、Nef、Vpr は患者血液中に存在し、細胞外か

ら作用して、形質転換を誘導する可能性が知られている。申請者らは、レトロトランスポジション (RTP) 誘導活性を含め、様々な観点から特に Vpr 機能の解析を続けてきた。その結果、HIV から産生されるウイルス蛋白質の bystander effects として B 細胞の細胞形質転換が誘導される可能性が示唆されるに至った。

そこで以上を背景に、本課題では、癌化に関与する因子を明らかにし、研究期間内に当該分子に対するヒト化単クローン抗体を作成する。そして、この抗体とすでに保有しているマウス単クローン抗体を用いた ELISA を稼働させることで、血中濃度の変動の有無を把握するとともに、ウイルス蛋白質作用の阻害によって、癌化阻止の可能性を検証する。本研究によって、発がん予防に関する戦略が明らかになるとともに、HIV 関連悪性腫瘍に関する情報を一般の臨床医に還元することで、エイズ医療の均霑化やさらなる病態理解が可能になる。

B. 研究方法

a. ウイルス感染に伴うメチル化変化：感染実験に使用するウイルスとして、野生型ウイルスと三種類の変異型ウイルス、即ち、Vpr、Vpu および Nef 変異型ウイルスを作成した。

ヒト健常人の末梢血より未分化 B 細胞 (CD43 陽性細胞=naïve B 細胞) とそれ以外の単核球細胞(主に T 細胞)を分離し、フィルターを介した二層培養を行なった。HIV-1 を T 細胞に感染させ、共培養を 4 日間行なった

後、細胞より回収抽出したゲノム DNA を Bisulfite 処理後、whole genome amplification 法により増幅し。Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, California, USA) を用いて、全ゲノムを対象とした DNA メチル化解析を行った。メチル化プロファイルを 75%メチル化グループ、25-75%メチル化グループ、25%以下メチル化グループの 3 グループに分類し、対象群との比較解析を行った。

b. 患者血中に存在する癌化誘導因子の把握と活性評価：Tat、Nef および Vpr について、RTP 誘導活性評価するとともに、HIV 感染者血清中の RTP 活性の有無と Vpr に対する単クローン抗体 (8D1) による活性阻害効果を検証した。

c. ヒト化抗体の作成：血中 Vpr 濃度の把握するための ELISA 用抗体と Vpr 作用に対する阻害因子として機能する 2 種類の抗体作成をニワトリの系で開始した。

抗原として、96 個のアミノ酸からなる Vpr ペプチドを使用した。免疫後、脾臓から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーをフェージへ組み込み、フェージディスプレイライブラリーを作成した。

d. ウイルス蛋白質作用の検定方法

ウイルス蛋白質による細胞形質転換作用は、DNA 損傷誘導と RTP 誘導能で評価する。

DNA 損傷誘導作用：ウイルス蛋白質を約 100 ng/mL の濃度で細胞培養系に添加し、翌日細胞を回収して、免疫組織化学的解析を行う。DNA 損傷の有無は、リン酸化 ATM および、 $\gamma$ -H2AX に対する抗体で検証する。FACS 解析による DNA 損傷陽性細胞の定量的な評価系は、すでに稼働中である。

RTP 誘導活性：RTP 誘導能をモニターするためのプラスミド DNA である pEF06R を HEK293 細胞に導入する (詳細は、石坂の分担研究報告書に記載、図 1)。

(倫理面への配慮)

臨床検体の使用に関しては、所内倫理委員会に研究計画書を提出し、倫理性について十分な吟味の上で承認を条件に実験を行なう。臨床検体は、患者に研究内容を充分説明し、同意を得た上で収集し、研究に使用する。また、全ての動物実験について、機関内の承認を受け、実施にあたっては“厚生労働省の所

管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関の指針を遵守する。また動物に無用な苦痛を与えないよう、獣医師の指導の下、麻酔薬の投与・保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じて適切な処置を講ずる。

遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関の指針に則って実施する。ウイルス感染実験は、大臣確認実験として行った。

### C. 研究結果

a. ウイルス作成結果 (徳永)：本実験に使用するウイルスとして、野生型及びアクセサリ一遺伝子変異型ウイルスを作成した。ウイルス量を感染力価で合わせるため、各ウイルスの感染性を MAGI アッセイにより定量した。その結果、Nef 変異型ウイルス以外は全て野生型と同じ感染性を示したが、Nef 変異型のみ 8.5 倍低い感染性を示すことが分かった。そこで、Nef 変異型ウイルスは、他のウイルスの 8.5 倍量の p24 量出感染実験に供した。一段階増殖ウイルスを用いたため、感染後の T リンパ球の生存率または形態への影響は認められなかった。

b. ウイルス感染に伴うメチル化変化 (志村)：ウイルス感染に伴って T 細胞の DNA メチル化様式が変化するとともに、感染 T 細胞と共培養した未分化 B 細胞の DNA メチル化パターンにも変動が認められた。特に、脱メチル化傾向 (hypomethylation) が認められた。その多くが non-CGI (CpG island) 領域であった。また、変異型ウイルスを感染させた場合においても、naïve B 細胞と T 細胞は共に、DNA メチル化パターンに変動が認められた。すべての変異型ウイルスに共通するターゲットがある一方、変異型に依存しているターゲットも存在した。即ち、これらの DNA メチル化変化には、ウイルス自体の蛋白質や機能が関わっている可能性が示唆された。

b. 患血中に存在する癌化誘導因子の把握と活性評価 (石坂)：Vpr に加えて、患者血中に存在するとされる Tat および Nef 蛋白質を用いて RTP 誘導能を評価した。その結果、いずれの蛋白質も RTP 誘導活性を示したが、Vpr の活性が最も強い傾向が得られた。

一方、未治療患者血清 15 例について、RTP 誘導活性を調べたところ、6 例が陽性所見を示すことを認め、さらに、8D1 による阻害効果を検証したところ、全例で阻害効果が認められた。8D1 作用後でも RTP 誘導活性が残存する例も認められたが、その作用は、健常人で検出される程度と同程度であった。

c. ヒト化抗体の作成：Vpr ペプチドを 2 匹のニワトリに免疫した結果、一羽で明らかな抗体価の上昇が認められた。この個体の脾臓から cDNA ライブラリーを作成し、ファージディスプレイライブラリーを作成した。得られたライブラリーのタイターは、 $10^8$  オーダーであり、反応性において良好なクローンが得られる可能性が期待される。

#### D. 考察

先行研究において、HIV 感染リンパ腫では非感染のリンパ腫と比較して、hypomethylation 傾向を示す事を見出した。一方、hypomethylation とゲノム不安定性との関連性が報告されている。また、私たちは、HIV 蛋白質である Vpr が様々なゲノム不安定性を惹起すること報告しており、Vpr が hypomethylation を介して、ゲノム不安定性を誘導している可能性が疑われる。

今回、初期感染に伴って惹起される B 細胞のメチル化変化と HIV 感染リンパ腫で検出されるメチル化変化にも差を認めた。HIV 感染リンパ腫の hypomethylation 傾向は、CGI (CpG island) 領域に認められ、遺伝子発現に直接関わる可能性を示唆したが、HIV 感染末梢血細胞では、non-CGI 領域で hypomethylation が誘導される傾向を認めた。non-CGI 領域のメチル化制御と遺伝子発現については、未だ不明の点が多い。正常細胞での non-CGI 領域における hypomethylation の生物学的な意味も不明である。しかし、同様の傾向が再現性良く認められるのであれば、感染の結果惹起される宿主側細胞の反応と考えるべきであり、その感染病態における位置付けを明らかにすることは重要である。また、遺伝子発現制御に関わる CGI 領域におけるメチル化変化は、比較的少数ではあるものの、標的遺伝子の発現変化の解析も重要である。

正常細胞への感染と癌化した細胞の遺伝子修飾を直線的に考えることは難しく、この間には、癌細胞の増殖能力によるクローナリ

ティや選択性が存在している。その変化や変化を誘導する分子機転を捉える事は重要であるが、きわめて難しいと予測される。そこで、次年度では HIV 感染者の末梢血細胞のゲノム DNA の解析を開始し、リンパ腫予備軍を明らかにすることを予定している。DNA メチル化変化に加えて、ゲノム不安定性の指標である CGI や染色体転座 (mFISH) についても平行して、解析する。将来、癌化する可能性を示唆するゲノム変化をバイオマーカーとして応用することの可能性も追求する。

b. 患者血中に存在するゲノム不安定性誘導活性：患者活性中に存在するウイルス蛋白質の生物学的活性を評価することはきわめて重要であるが、ウイルス蛋白質量が微量である事や、高感度な活性評価系が無いことから、これまでその活性を評価する試みは行われてこなかった。申請者は、低濃度の蛋白質でも活性を検出できる評価系として RTP 誘導能に着目し、解析した。その結果、15 例の未治療例の血清の内、6 例に L1-RTP 誘導能を認め、さらに全例で Vpr に対する単クローン抗体の前処理によって活性が低下した。

2007 年、申請者らは 52 例の HIV-1 感染者由来血清について Vpr の検出を試み、20 例で Vpr が検出されとともに、その濃度が数百 pg/mL 程度であることを報告した。今回、解析した 15 例中 6 例において、8D1 (Vpr に対する単クローン抗体) で中和される RTP 誘導活性が検出されたことから、HIV 感染者の約 40% に血中 Vpr が検出され、そのほとんどが活性を示すことが疑われる。

また、RTP 誘導能を認めた 6 例の検体では、いずれも 8D1 の処理によって著しい活性の減弱を認めた。即ち、Tat や Nef にも RTP 誘導活性は認められるが、患者血清中に存在する RTP 誘導能の大半は Vpr 作用によっていることを示唆する。この事実は、本課題で目標とする、「ヒト型単クローン抗体による悪性化阻止」の第一標的として Vpr を設定することの理論的根拠となる。

#### E. 結論

HIV-1 感染 T 細胞との共培養で、B 細胞の DNA メチル化変動がゲノムワイドに認められた。B 細胞に作用するトランス因子がウイルス感染によって産生される可能性が示唆される。今後、ターゲットを同定し、hypomethylation

傾向とゲノム不安定性との関連、メチル化変動の原因、及び、分子機序を解明する。

患者血中に検出される RTP 誘導能の多くが Vpr 作用に起因する可能性が示唆された。引き続き、Vpr に対するヒト化単クローン抗体の作成を試みる。

F. 健康危険情報 特記事項無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Virus Res.* [Epub ahead of print]
- 2) Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Akio Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA<sub>B</sub> receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, in press.
- 3) Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, Ando S, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploiting proliferating CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo*. *PloS Pathogen*, in press.
- 4) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamazaki M, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, Ishizaka Y, Shimura M and Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS*, in press.
- 5) Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T and Ishizaka Y. Retrotransposition of long interspersed element-1 in the kidney by human immunodeficiency virus type-1 Vpr. *Retrovirology*, 10:83, 2013.
- 6) Richard J, Pham TN, Ishizaka Y, Cohen EA. Viral protein R upregulates expression of ULBP2 on uninfected bystander cells during HIV-1 infection of primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Virology* 443:248-56, 2013.

- 7) Matsuyama S, Matsunaga A, Sakamoto S, Iida Y, Suzuki Y, Ishizaka Y, Yamauchi K, Ishikawa T, Shimura M. Metallomics. Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence. *Metallomics* 5: 492-500, 2013 (DOI: 10.1039/C3MT20266F).
  - 8) Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M and Ishizaka Y. DNA damage aids human immunodeficiency virus type 1 infection by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
  - 9) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.: DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
  - 10) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S.: Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect.* 15:280-290, 2013.
  - 11) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Tanaka, Y.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 126:2798-2809, 2013.
  - 12) Tada T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Iwakura, Y.: Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Front. Microbiol.* 4:377, 2013.
  - 13) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. (corresponding author): APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS ONE* 8:e84228, 2013.
2. 学会発表
- 1) 飯島健太、石坂幸. The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotransposition. 第29回放生研・放医研国際シンポジウム. 2013年11月、京都.

- 2) 高品智記、石坂幸人. 新規ペプチドベクターによるウイルスフリーiPS細胞作成技術開発. BIOtech2013 -第12回国際バイオテクノロジー展/技術会議. 2013年5月、東京.
- 3) 高品 智記、石坂幸人. Vpr由来ペプチドベクターによるウイルスフリーiPS細胞作成法の確立と応用. 白馬シンポジウム in 名古屋. 2013年7月、名古屋.
- 4) 高品 智記、石坂幸人. 新規核指向性ペプチドNTPを用いた細胞形質転換方法の開発. 第36回日本分子生物学会年會, 2013年12月、神戸.
- 5) 豊岡理人, 松永章弘, 山崎茉莉亜, 志村まり, 田中紀子. メチル化アレイル測定データの分布に基づくサンプル品質管理及び人種差を考慮したプローブフィルタリングの妥当性の検討. 日本人類遺伝学会第58回大会. 2013年11月、宮城.
- 6) 松永章弘, 比島恒和, 田中紀子, 山崎茉莉亜, 吉田壘, 望月眞, 田沼順子, 岡慎一, 石坂幸人, 志村まり, 萩原將太郎, エピジェネティクス解析によるエイズ関連悪性リンパ腫の病態理解, 第36回日本分子生物学会, 2013年12月, 神戸.
- 7) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Tanaka, Y.: MARCH8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. The 35th Naito Conference: "The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles", Sapporo, Japan, 2013.7.
- 8) Koyama, T., Tada, T., Fujita, H., Tokunaga, K.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 protein inhibits HIV-1 infection. Frontiers of Retrovirology Conference 2013, Cambridge, UK, 2013. 9.
- 9) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三: 新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 感染を抑制する. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (神戸) 2013. 11.
- 10) 張延昭、小山貴芳、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三: SAMHD1 非依存的な HIV-1 複製阻害に関与する IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子の探索. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (神戸) 2013. 11.
- 11) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三: APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (神戸) 2013. 11.
- 12) 亀岡正典、Piraporn Utachee、Panada Isarangkura-na-ayuthaya、徳永研三、生田和良、武田直和: HIV-1 CRF01\_AE 株が gp120 CD4 結合部位を認識する単クローン抗体に対して中和抵抗性を示す分子機構. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (神戸) 2013. 11.
- 13) 大久保麻佳、檜崎彩香、萩森政頼、山口泰史、藤井佑樹、藤原俊幸、徳永研三、藤田英明: 亜鉛輸送体 ZIP14 の細胞内輸送および機能発現制御に関する基礎的解析. 第 30 回日本薬学会九州支部大会 (長崎) 2013. 12.
- 14) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三: 膜貫通蛋白 MARCH8 による HIV-1 感染阻害. 第 36 回日本分子生物学会 (神戸) 2013. 12.
- 15) Koyama, T, Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. Keystone Symposia "Mobile Genetic Elements and Genome Evolution", Santa Fe, USA, 2014. 3.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

発明者: 石坂幸人

発明名称: 新規核指向性ペプチド

日本: 2009-502646

米国: 8455616

欧州 (英国、フランス、ドイツ、スイス): 2130837

2. 実用新案登録 無

3. その他 特許出願

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

「エイズ関連悪性腫瘍誘発機序の理解と抗体療法の有効性評価」に関する研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療研究センター 難治性疾患研究部 部長

研究要旨：HIV-1(以下 HIV)感染者の予後は著しく改善されたが、悪性腫瘍の発症率は依然高いことが臨床上の問題となっている。本研究では、特に血液中に存在するゲノム不安定性誘導能を示すウイルス因子の同定と単クローン抗体を用いた抗体療法の有用性を検証する。申請者らの先行研究で、約 40% の患者血清中にレトロトランスポジション (RTP) 誘導活性を認め、この活性が Vpr に対する単クローン抗体でキャンセルされることを見いだした。今回、Tat および Nef の RTP 誘導活性に関する検証結果をもとに、抗体療法の標的分子について考察した。

A. 研究目的

Antiretroviral therapy (ART 療法) が導入され、HIV-1(以下 HIV)感染者の予後は著しく改善されたが、悪性腫瘍の発症率は依然高く、現在も死亡原因の約 30% を占めている。悪性腫瘍の多くは B 細胞性悪性リンパ腫であり、非ホジキンリンパ腫の HIV 感染者における発症リスクは非感染者の 10-100 倍と試算されている。リンパ腫の多くはウイルスが感染しない B 細胞由来であることや、免疫不全状態の既往の無い患者でも悪性腫瘍が発症すること、さらに、HIV 非感染者では極めて稀なバーキットリンパ腫も発症することなどから、HIV 関連悪性腫瘍の発症には HIV 固有の分子が関与している可能性が疑われる。しかし、その要因は不明であり、発がん阻止に向けた戦略も全く構築できていない。

申請者らは、DNA メチル化アレイ解析を行い、その後の階層的クラスター解析から、HIV 関連リンパ腫と非感染リンパ腫では DNA メチル化パターンが異なることを見いだした。即ち、HIV 関連リンパ腫と非 HIV リンパ腫は異なる分子機序で発症している可能性を考えるに至った。

HIV が産生するウイルス蛋白質のうち Tat、Nef、Vpr はいずれも患者血液中に存在し、細胞形質転換を誘導する可能性が示唆されている。申請者らは、特に Vpr 機能について、以下の事項を明らかにしてきた。即ち、

- a. HIV 感染者の約 40% の血清中に Vpr が検出され、その濃度は ng/mL であること。
- b. 約 40% の患者血清中にレトロトランスポジション (RTP) 誘導活性が検出され、この活性が抗 Vpr 単クローン抗体 (8D1) でキャン

セルされること。さらに、

- c. 培養系に Vpr 蛋白質を添加すると RTP 誘導や DNA 損傷、さらには染色体異常といった様々なゲノム不安定性が惹起された。また、
- d. マクロファージの培養系に添加すると、interleukin-6(IL-6) の産生を誘導することも認めている。

即ち、Vpr だけを例にとっても癌化誘発リスク因子として作用する可能性が示唆される。

以上を背景に本研究では、HIV から産生されるウイルス蛋白質が細胞外から作用することで、B 細胞の細胞形質転換を誘導する可能性を班員の総力を挙げて検証する。また石坂は、そのようなトランスに作用するウイルス蛋白質に対する高親和性単クローン抗体を研究期間内に作成する。そして、この抗体を用いて血中濃度の把握するための ELISA を確立するとともに、ウイルス蛋白質作用を阻止するヒト化単クローンの臨床応用の可能性を明らかにする。

B. 研究方法

- a. 患者血中に存在する癌化誘導因子の把握と活性評価：Tat、Nef および Vpr について、RTP 誘導活性評価するとともに、HIV 感染者血清中の RTP 活性の有無と 8D1 による活性阻害効果を検証した。

- b. ヒト化抗体の作成：Vpr に対する単クローン抗体を作成し、血中 Vpr 濃度の把握するための ELISA を確立する。また、Vpr 作用に対して中和活性を示すクローンを獲得し、その



作用を評価するとともに、ヒト化抗体の臨床応用の可能性を明らかにする。

抗原として、96個のアミノ酸からなる Vpr の全長ペプチドを使用した。ニワトリへ免疫した後、脾臓から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーをファージへ組み込み、ファージディスプレイライブラリーを作成した。通常、ライブラリーのタイターは、 $10^7$ - $10^8$  オーダーである。

Vpr に高い親和性を示すクローンは Vpr の組み替え蛋白質を用いたパニングで選別する。Vpr 蛋白質は、大腸菌に対して毒性を示すため、大量に調整することが難しい。そこで、比較的豊富に回収可能なコムギ胚芽無細胞系で発現させた flag-ストレプトタグ付き Vpr 蛋白質を用いて初期のパニング操作を進め、ついで、グルタチン S 転スフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として大腸菌で発現させた GST-Vpr 蛋白質でパニングを行う。そのファージ DNA から抗原結合部位をコードする cDNA クローンを回収し、ヒト IgG の可変領域に組み込むことで、ヒト型抗 Vpr 抗体を作成する。抗体の中和活性は、後述する DNA 損傷誘導能および、RTP 誘導活性評価系で検証する。

このスクリーニングと平行して、ELISA 用単クローン抗体も準備する。Vpr に対する単クローン抗体である 8D1 をカップリングしたビーズに Vpr を結合させた後、これをベイトにパニングを行う。患者血中 Vpr 濃度の経時的変化を把握することが可能な ELISA 系の確立を試みる。

#### b. ウイルス蛋白質作用の検定方法

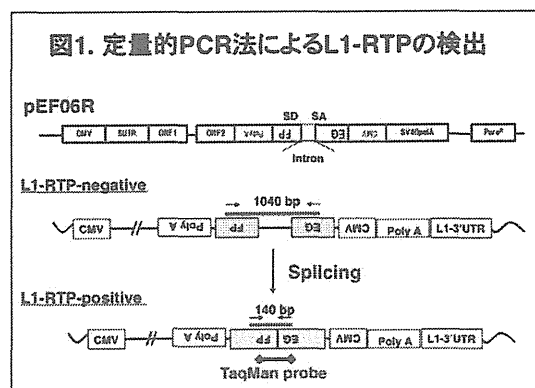
ウイルス蛋白質による細胞形質転換作用は、DNA 損傷誘導と RTP 誘導能で評価する。

**DNA 損傷誘導作用：**ウイルス蛋白質を約 100 ng/mL の濃度で細胞培養系に添加し、翌日細胞を回収して、免疫組織化学的解析を行う。DNA 損傷の有無は、リン酸化 ATM および、 $\gamma$ -H2AX に対する抗体で検証する。FACS 解析による DNA 損傷陽性細胞の定量的な評価系は、すでに稼働中である。

**RTP 誘導活性：**RTP 誘導能をモニターするためのプラスミド DNA である pEF06R (図 1、ピュロマイシン耐性) を HEK293 細胞に導入する。

pEF06R には、ヒト long interspersed element-1 (以下 L1) の 5' 側非翻訳領域、

ORF1 と 2 のコーディング領域に加えて、EGFP の発現ユニットが逆向きに挿入されている。



EGFP cDNA 中には、イントロンが挿入されており、RNA として転写された後、スプライシングによって除去される。0.5  $\mu$ g/mL のピュロシニンで 2 日間選択した後、細胞を剥離し、ウイルス蛋白質を種々の濃度で添加する。さらに 2 日間培養した後、細胞からゲノム DNA を抽出し、EGFP 断片にデザインした 2 つのプライマーを用いて定量的 PCR を行う。RTP の結果生じる約 140 塩基長の PCR プロダクト量を測定することで、RTP 誘導能が評価できる。サンプル中の  $\beta$ -アクチン量も測定し、そのシグナルを内部標準として使用することで、各検体中の L1 コピー数を比較する。

#### (倫理面への配慮)

臨床検体の使用に関しては、所内倫理委員会に研究計画書を提出し、倫理性について十分な吟味の上で承認を条件に実験を行なう。臨床検体は、患者に研究内容を充分説明し、同意を得た上で収集し、研究に使用する。また、全ての動物実験について機関内の承認を受け、実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関の指針を遵守する。また動物に無用な苦痛を与えないよう、獣医師の指導の下、麻酔薬の投与・保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じて適切な処置を講ずる。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関の指針に則って実施する。

#### C. 研究結果

a. 患者血中に存在する癌化誘導因子の把握と

活性評価：Vpr に加えて、患者血中に存在するとされる Tat および Nef 蛋白質を用いて L1-RTP 誘導能を評価した。その結果、いずれの蛋白質も RTP 誘導活性を示したが、Vpr の活性が最も強い傾向を認めた。

一方、未治療患者血清 15 例について、L1-RTP 誘導活性を調べたところ、6 例が陽性所見を示し、さらに、8D1 による阻害効果を検証したところ、全例で阻害効果が認められた。8D1 作用後でも L1-RTP 誘導活性が残存する例も認められたが、その作用は、健常人で検出される程度と同程度であった。

b. ヒト化抗体の作成：Vpr ペプチドを 2 匹のニワトリに免疫した結果、一羽で明らかな抗体価の上昇が認められた。この個体の脾臓から cDNA ライブラリーを作成し、フェージディスプレイライブラリーを作成した。得られたライブラリーのタイターは、 $10^8$  オーダーであった。

#### D. 考察

a. 患者血中に存在するゲノム不安定性誘導活性：患者活性中に存在するウイルス蛋白質の生物学的活性を評価することはきわめて重要であるが、ウイルス蛋白質の濃度が低い事や、高感度な活性評価系が無いことから、これまでその評価は全く行われてこなかった。申請者は、低濃度の蛋白質でも示す活性として L1-RT 誘導に着目して解析した。その結果、15 例の未治療例の血清の内、6 例に L1-RTP 誘導能を認め、その全例が Vpr に対する単クローン抗体の前処理によって活性の低下を認めた。

2007 年、申請者らは 52 例の HIV-1 感染者由来血清について、Vpr の検出を試みた。その結果、20 例で Vpr が検出され、その濃度は数百 pg/mL 程度であることが分かった。今回の解析で、解析した 15 例中 6 例において 8D1 で中和される L1-RTP 誘導活性が検出されたことは、血中に存在する Vpr はほぼ全例が活性を示す可能性を示唆する。

また、L1-RTP 誘導能を認めた 6 例の検体は、いずれも 8D1 によって活性が著しく減弱したことから、Tat や Nef にも L1-RTP 誘導活性が認められるものの、患者血清中に存在する L1-RTP 誘導能の大半は Vpr 作用によるものであると考えられる。この事実は、本課題が目標とするヒト型単クローン抗体による悪性

化阻止の第一標的として Vpr を設定することの理論的根拠となる。

作成できたフェージディスプレイライブラリーは  $10^8$  オーダーの pfu (plaque forming unit) を示した。これは、通常のほぼ 10 であり、優れたクローンが得られるものと期待される。

#### E. 結論

患者血中に検出される L1-RTP 誘導能の多くが Vpr 作用によっている可能性が示唆された。この知見は、抗体療法を試みる際、Vpr が主要な標的となる可能性を支持する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Virus Res.* [Epub ahead of print]
- 2) Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Akio Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA<sub>B</sub> receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, in press.
- 3) Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An D-S, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploiting proliferating CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo*. *PLoS Pathogen*, in press.
- 4) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamazaki M, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, Ishizaka Y, Shimura M and Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS*, in press.
- 5) Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T and Ishizaka Y. Retrotransposition of long interspersed element-1 in the kidney by human immunodeficiency virus type-1 Vpr. *Retrovirology*, 10:83, 2013.

- 6) Richard J, Pham TN, Ishizaka Y, Cohen EA. Viral protein R upregulates expression of ULBP2 on uninfected bystander cells during HIV-1 infection of primary CD4+ T lymphocytes. *Virology* 443:248-56, 2013.
- 7) Matsuyama S, Matsunaga A, Sakamoto S, Iida Y, Suzuki Y, Ishizaka Y, Yamauchi K, Ishikawa T, Shimura M. Metallomics. Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence. *Metallomics* 5: 492-500, 2013 (DOI: 10.1039/C3MT20266F).
- 8) Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M and Ishizaka Y. DNA damage aids human immunodeficiency virus type 1 infection by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) 飯島健太、石坂幸. The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotransposon. 第29回放生研・放医研国際シンポジウム. 2013年11月、京都.
- 2) 高品智記、石坂幸人. 新規ペプチドベクターによるウイルスフリーiPS細胞作成技術開発. BIOtech2013 -第12回国際バイオテクノロジー展/技術会議. 2013年5月、東京.
- 3) 高品智記、石坂幸人. Vpr由来ペプチドベクターによるウイルスフリーiPS細胞作成法の確立と応用. 白馬シンポジウム in 名古屋. 2013年7月、名古屋.
- 4) 高品智記、石坂幸人. 新規核指向性ペプチドNTPを用いた細胞形質転換方法の開発. 第36回日本分子生物学会年, 2013年12月、神戸.
- 5) 豊岡理人, 松永章弘, 山崎茉莉亜, 志村まり, 田中紀子. メチル化アレイ測定データの分布に基づくサンプル品質管理及び人種差を考慮したプローブフィルタリングの妥当性の検討. 日本人類遺伝学会第58回大会. 2013年11月、宮城.
- 6) 松永章弘, 比島恒和, 田中紀子, 山崎茉莉亜, 吉田壘, 望月眞, 田沼順子, 岡慎一, 石坂幸人, 志村まり, 萩原将太郎, エピジェネティクス解析によるエイズ関連悪性リンパ腫の病態理解, 第36回日本分子生物学会, 2013年12月、神戸.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明者：石坂幸人

発明名称：新規核指向性ペプチド

日本：2009-502646

米国：8455616

欧州(英国、フランス、ドイツ、スイス)：

特許番号 2130837

2. 実用新案登録 無

3. その他 特許出願

「HIV 感染末梢血細胞の DNA メチル化アレイ解析」に関する研究

分担研究者 志村 まり 国立国際医療研究センター研究所 難治性疾患研究室・室長

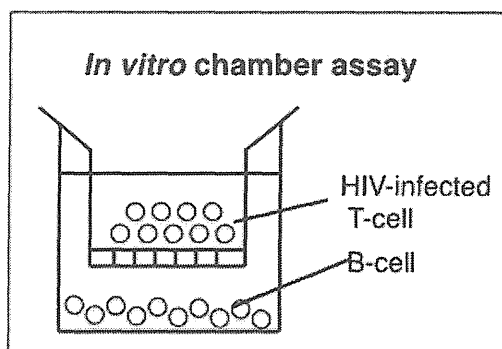
研究要旨 B 細胞と T 細胞の非接触の二重培養環境で、HIV 感染に伴って誘導される Naïve B 細胞の DNA メチル化修飾について解析を行った。感染しない B 細胞においても、T 細胞様の DNA メチル化変動が認められ、感染による何らかの DNA メチル化変動因子が示唆された。

A. 研究目的

HIV 関連リンパ腫は、非感染のリンパ腫と比べて頻度が高く、薬剤耐性、再発率が高いなど、臨床的には異なる病態と認識されていたが、分子生物学的に何が異なるかについては、明らかではなかった。申請者らは、HIV 関連リンパ腫と非 HIV リンパ腫症例を比較し、ゲノムワイドな DNA メチル化アレイ解析を行ったところ、両グループの DNA メチル化パターンは異なり、異なる遺伝子修飾が背景にある可能性を示唆した。そこで、HIV 関連リンパ腫の発症にウイルス感染やウイルス蛋白質の関与を考えるに至った。そこで今回、ウイルス感染 T 細胞と未分化 B 細胞を接触させることなく培養した場合に、HIV 感染による DNA メチル化修飾が誘導されるかどうかを検証した。

B. 研究方法

ヒト健常人の末梢血より未分化 B 細胞 (CD43 陽性細胞=naïve B 細胞) とそれ以外の単核球細胞(主に T 細胞)を分離し、図に示す様に、フィルターを介した二層培養を行なった。



HIV-1をT細胞に感染させ、共培養を4日間行なった後、細胞より回収抽出したゲノムDNAを Bisulfite 処理後、whole genome

amplification法により増幅し、Infinium HumanMethylation450 BeadChip(Illumina, San Diego, California, USA)を用いて、全ゲノムを対象としたターゲットに対するDNAメチル化解析を行った。メチル化プロファイルを75%メチル化グループ、25-75%メチル化グループ、25%以下メチル化グループの3グループに分類し、対象群と比較解析を行った。

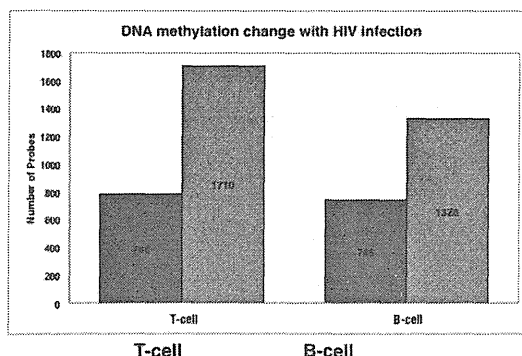
(倫理面への配慮)

臨床検体の使用に関しては、所内倫理委員会に研究計画書を提出し、倫理性について十分な吟味の上で承認を条件に実験を行なった。全ての実験について機関内の承認を受け、実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関の指針を遵守した。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関の指針に則って実施した。

C. 研究結果

a. 患者血中に存在する癌化誘導因子の把握と図のように、未分化 B 細胞は T 細胞同様に、DNA メチル化パターンに変動が見られた。

HIV-1感染に伴った>50% DNAメチル化変化



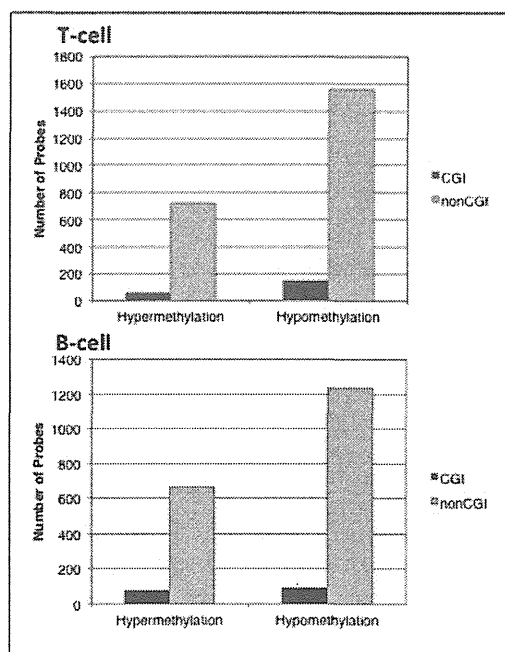
その多くが non-CGI (CpG island) 領域の hypomethylation 傾向であった。

さらに、変異型ウイルスでも、naïve B 細胞は T 細胞共に、DNA メチル化パターンに変動が認められた。すべての変異型ウイルスに共通するターゲットがある一方、変異型に依存しているターゲットも存在することから、これらの DNA メチル化変動には、ウイルス自体の蛋白質や機能が関わっている可能性が示唆された。

#### D. 考察

先行研究では、非感染のリンパ腫と比較して、HIV感染リンパ腫ではhypomethylation傾向を示していた。これまでの論文報告では、hypomethylation傾向はゲノム不安定性との関連が示唆されている。一方、私たちは、HIV感染によるゲノム不安定性を提唱して来ている。

HIV感染リンパ腫と感染実験細胞との相違点もある。HIV感染リンパ腫のhypomethylation傾向は、CGI領域に認められ、遺伝子発現に直接関わる可能性を示唆したが、HIV感染末梢血細胞では、non-CGI領域でのhypomethylation傾向であった。



non-CGI領域のメチル化制御と遺伝子発現については、未だ不明の点が多い。正常細胞でのnon-CGI領域のhypomethylationは、生物学的に何を意味しているのかも不明である。し

かし、繰り返し同傾向が認められるのであれば、感染による生体防御機構との関連等も考慮し、研究を進める方向性もある。一方、遺伝子発現制御に関わるCGI領域は、比べると少数ではあるが、hyper-やhypo-methylationに至ったターゲットの解析は無視できない。

正常細胞への感染と癌化した細胞の遺伝子修飾を、直線的に考えることは無理があり、この間には、癌細胞の増殖能力によるクローナリティや選択性が存在している。そこで、現在、HIV感染者検体を解析中で、リンパ腫予備軍を明らかにすることを試みている。DNAメチル化変動以外に、ゲノム不安定性因子として、CGH (comparative genomic hybridization) や染色体転座 (mFISH) についても平行して、解析する。

今回、観察された DNA の hypomethylation 傾向とゲノム不安定性との関連や、それらの分子機序を明らかにする必要がある。今回の結果は n=3 であるため、さらに実験数を増大し、再現性とデータの確度を上げたい。

#### E. 結論

HIV-1 感染 T 細胞と接触しない条件下で、非感染 B 細胞を共培養すると、DNA メチル化変動がゲノムワイドに認められた。B 細胞には、感染による何らかの DNA メチル化変動因子が作用したことを示唆する。今後、再現性や統計解析が可能となる試料数の感染実験を行い、ターゲット同定、hypomethylation 傾向とゲノム不安定性との関連、メチル化変動の原因、及び、分子機序の解明を行いたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akihiro Matsunaga, Tsunekazu Hishima, Noriko Tanaka, Maria Yamasaki, Lui Yoshida, Makoto Mochizuki, Junko Tanuma, Shinichi Oka, Yukihito Ishizaka, Mari Shimura and Shotaro Hagiwara, DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS* 28. 503-510, 2014.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 該当無し

「HIV 感染末梢血細胞の形質転換能の検討」に関する研究

分担研究者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

研究要旨：エイズ悪性 B 細胞腫は、HIV 感染が誘導する何らかの液性因子が B 細胞に作用することで惹起されるエイズ関連リンパ腫と考えられる。そこで本年度の研究ではまず *in vitro* における T 細胞からの癌化誘発因子について検証すべく、初代培養細胞実験系を用いて、HIV-1 感染 T 細胞から放出される宿主可溶性因子またはウイルス蛋白が B 細胞に及ぼす影響について DNA メチル化レベルで検証することを試みた

### A. 研究目的

エイズ関連悪性リンパ腫は非エイズ悪性リンパ腫とは異なる疾病として考慮する必要性があり、エイズ悪性 B 細胞腫においては HIV 感染に直結した外的因子が B 細胞に作用することによって癌化が惹起される可能性が考えられる。そこで本研究においては、T 細胞からの癌化誘発因子について臨床検体、培養細胞、ならびに動物実験で明らかにする。更に同定された液性因子作用を遮断する中和抗体を作成し、臨床応用の可能性も明らかにする。本年度は、*in vitro* で、末梢血リンパ球由来 T 細胞に HIV-1 を感染させ、そこから放出される可溶性の宿主因子またはウイルス蛋白が、共培養の B 細胞に与える影響について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 初代培養細胞の調製

健康人由来末梢血リンパ球から分離した CD43 陽性細胞（T 細胞、マクロファージ他）を PHA/IL-2 存在下で 72 時間、刺激培養して活性化 T リンパ球を調製した。CD43 陰性細胞（B 細胞）は無刺激で培養した。

#### 2. 各種 HIV-1 変異型ウイルスの調製

一段階増殖 HIV-1 の調製のために、HIV-1 ADA 株由来 R5-Env 発現ベクターと、野生型またはアクセサリー遺伝子 (*nef*, *vif*,

*vpr*, または *vpu*) 変異型で且つ *env* 遺伝子欠損型 HIV-1 プロウイルス DNA を 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA により測定した。調製した各ウイルスを等しい p24 量で、LTR-β-gal 遺伝子が組み込まれている CD4/CCR5 発現 HeLa 細胞 (MAGIC5 細胞) に感染させ、48 時間後に X-gal 染色 (MAGI アッセイ) を行うことによりウイルスの感染力価を定量した。

#### 3. 感染実験

調製した活性化 T リンパ球に、各ウイルスを MOI (multiplicity of infection) 1 で感染させ、メンブレンチャンバーを介して CD43 陰性細胞（未熟 B 細胞）と共培養を行った。48 時間後に培地交換を行い、更に 48 時間培養した後にゲノム DNA を抽出した。

### C. 研究結果

感染に用いる野生型及びアクセサリー遺伝子変異型ウイルスの量を感染力価で合わせるために、各ウイルスの感染性を MAGI アッセイにより定量した。その結果、Nef 変異型ウイルス以外は全て野生型と同じ感染性を示したが、Nef 変異型のみ 8.5 倍低い感染性を示したため、他のウイルスの 8.5 倍量の p24 量のウイルスを用いた。一段階増殖ウイルスを用い

たため、感染後の T リンパ球の生存率または形態への影響は認められなかった。

#### D. 考察

Nef 変異ウイルスのみが他より多いウイルス量で感染に使用されている事の影響を検証する必要がある。IL-2 が B 細胞にメチル化レベルでの影響を与えるとの報告があることから、HIV-1 感染 T 細胞と B 細胞を共培養する際に IL-2 を除いたが、それによる T 細胞の増殖低下が HIV-1 の蛋白発現に与える可能性がある。また今回の感染条件下で実際にどの程度の T 細胞で感染が成立しているかは現時点で不明である。エイズ関連 B 細胞腫における HIV-1 感染の直接的または間接的な影響を DNA メチル化レベルで検討した報告はいまだかつてなく、HIV-1 感染者における B 細胞のメチル化パターンと病態進行の関係を明らかにすることは臨床意義が大きいと考えられる。今後は、感染力価のみならず p24 量で標準化する感染実験も試みる。感染 T 細胞と B 細胞の混合時の IL-2 の有無の影響について検証する。また本実験条件における HIV-1 の感染効率について調べるために p24 間接蛍光抗体法を行う。更に先頃 Nature (505:509-514, 2014) で報告された、静止期 T 細胞への HIV-1 の abortive な感染による pyroptosis — 炎症性 programmed cell death でカスパーゼ 1 の活性化により IL-1 $\beta$  産生が認められる— について、それが B 細胞に与える影響を検証するため、未刺激の静止期 T 細胞への感染実験も試みる。

#### E. 結論

HIV-1 野生型またはアクセサリー変異型ウイルスを、健康人末梢血リンパ球由来の活性化 T 細胞に等力価で感染させて、未熟 B 細胞と混合培養した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.: DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
- 2) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S.: Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect.* 15:280-290, 2013.
- 3) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Tanaka, Y.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 126:2798-2809, 2013.
- 4) Tada T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Iwakura, Y.: Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Front. Microbiol.* 4:377, 2013.
- 5) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. (corresponding author): APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS ONE* 8:e84228, 2013.

##### 学会発表

- 1) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Tanaka, Y.: MARCH8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. The 35th Naito Conference: “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”, Sapporo,

- Japan, 2013.7.
- 2) Koyama, T., Tada, T., Fujita, H., Tokunaga, K.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 protein inhibits HIV-1 infection. *Frontiers of Retrovirology Conference 2013*, Cambridge, UK, 2013. 9.
  - 3) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 感染を抑制する。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
  - 4) 張延昭、小山貴芳、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：SAMHD1 非依存的な HIV-1 複製阻害に関与する IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子の探索。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
  - 5) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三：APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
  - 6) 亀岡正典、Piraporn Utachee、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、徳永研三、生田和良、武田直和：HIV-1 CRF01\_AE 株が gp120 CD4 結合部位を認識する単クローン抗体に対して中和抵抗性を示す分子機構。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
  - 7) 大久保麻佳、檜崎彩香、萩森政頼、山口泰史、藤井佑樹、藤原俊幸、徳永研三、藤田英明：亜鉛輸送体 ZIP14 の細胞内輸送および機能発現制御に関する基礎的解析。第 30 回日本薬学会九州支部大会（長崎）2013. 12.
  - 8) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：膜貫通蛋白 MARCH8 による HIV-1 感染阻害。第 36 回日本分子生物学会（神戸）2013. 12.
  - 9) Koyama, T, Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1

retrotransposition. *Keystone Symposia "Mobile Genetic Elements and Genome Evolution"*, Santa Fe, USA, 2014. 3.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
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

書籍

著者氏名	論文 タイトル	書籍全体 の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版 年	ペ ー ジ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
石坂幸人					
Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R.	Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture.	<i>Virus Res</i>			In press
Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An D-S, Koyanagi Y	HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploiting proliferating CD4 <sup>+</sup> T cells <i>in vivo</i> .	<i>PloS Pathogen</i>			In press
○ Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T and Ishizaka Y.	Retrotransposition of long interspersed element-1 in the kidney by human immunodeficiency virus type-1 Vpr.	<i>Retrovirology</i>	10	83	2013
志村まり					
○ Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamasaki M, Yoshida L,	DNA methylation profiling can classify	<i>AIDS</i>	28	503-510	2014

Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, <u>Ishizaka Y</u> , <u>Shimura M</u> Hagiwara S	HIV-associated lymphomas				
徳永研三					
Koyama, T., Sun, B., <u>Tokunaga, K.</u> , Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.	DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition.	<i>Retrovirology</i>	10	21	2013
Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., <u>Tokunaga, K.</u> , and Suzu, S.	Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.	<i>Microbes and Infection</i>	15	280-90	2013
Fujita, H., Iwabu, Y., <u>Tokunaga, K.</u> ( <u>co-corresponding author</u> ), and Tanaka, Y.	Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor.	<i>Journal of Cell Science</i>	126	2798-809	2013
Tada, T., Kadoki, M., Liu, Y., <u>Tokunaga, K.</u> ( <u>co-corresponding author</u> ), and Iwakura, Y.	Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells.	<i>Frontiers in Microbiology</i>	4	377	2013
Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and <u>Tokunaga, K.</u> ( <u>corresponding author</u> ).	APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition.	<i>PLoS ONE</i>	8	e84228	2013



RESEARCH

Open Access

# Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1

Kenta Iijima<sup>1†</sup>, Noriyuki Okudaira<sup>1,2,11†</sup>, Masato Tamura<sup>1</sup>, Akihiro Doi<sup>1,2</sup>, Yoshikazu Saito<sup>1</sup>, Mari Shimura<sup>1</sup>, Motohito Goto<sup>3</sup>, Akihiro Matsunaga<sup>1</sup>, Yuki I Kawamura<sup>4</sup>, Takeshi Otsubo<sup>4</sup>, Taeko Dohi<sup>4</sup>, Shigeki Hoshino<sup>1</sup>, Shigeyuki Kano<sup>2,5</sup>, Shotaro Hagiwara<sup>6</sup>, Junko Tanuma<sup>7</sup>, Hiroyuki Gatanaga<sup>7</sup>, Masanori Baba<sup>8</sup>, Taku Iguchi<sup>9,12</sup>, Motoko Yanagita<sup>9</sup>, Shinichi Oka<sup>7</sup>, Tadashi Okamura<sup>3,10</sup> and Yukihito Ishizaka<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Viral protein R (Vpr), a protein of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) with various biological functions, was shown to be present in the blood of HIV-1-positive patients. However, it remained unclear whether circulating Vpr in patients' blood is biologically active. Here, we examined the activity of blood Vpr using an assay system by which retrotransposition of long interspersed element-1 (L1-RTP) was detected. We also investigated the *in vivo* effects of recombinant Vpr (rVpr) by administering it to transgenic mice harboring human L1 as a transgene (hL1-Tg mice). Based on our data, we discuss the involvement of blood Vpr in the clinical symptoms of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

**Results:** We first discovered that rVpr was active in induction of L1-RTP. Biochemical analyses revealed that rVpr-induced L1-RTP depended on the aryl hydrocarbon receptor, mitogen-activated protein kinases, and CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ . By using a sensitive L1-RTP assay system, we showed that 6 of the 15 blood samples from HIV-1 patients examined were positive for induction of L1-RTP. Of note, the L1-RTP-inducing activity was blocked by a monoclonal antibody specific for Vpr. Moreover, L1-RTP was reproducibly induced in various organs, including the kidney, when rVpr was administered to hL1-Tg mice.

**Conclusions:** Blood Vpr is biologically active, suggesting that its monitoring is worthwhile for clarification of the roles of Vpr in the pathogenesis of AIDS. This is the first report to demonstrate a soluble factor in patients' blood active for L1-RTP activity, and implies the involvement of L1-RTP in the development of human diseases.

**Keywords:** HIV-1, Vpr, Blood, Retrotransposition, LINE-1, ORF1

## Background

*Viral protein R* (Vpr), an accessory gene of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), encodes a virion-associated nuclear protein of ~15 kDa [1]. Vpr has a variety of biological functions, including cell cycle abnormalities at the G<sub>2</sub>/M phase and apoptosis of T cells and neuronal cells (for a recent review, see ref. [2]). Notably, it was shown that Vpr was present

in the blood of HIV-1-positive patients [3], and we previously reported that 20 of 52 blood samples from HIV-1-positive patients examined were positive for Vpr [4]. Blood Vpr was detected in patients with high titres of HIV-1 and, interestingly, was also detected in patients with low viral titres [4]. On the other hand, purified recombinant Vpr protein (rVpr) functions as a trans-acting factor [5,6], and rVpr activated viral replication in latently infected cells by increasing production of interleukin-6 (IL-6) by monocytes [7]. Further analyses revealed that rVpr-induced IL-6 production depended on p38, a mitogen-activated protein kinase (MAPK), and CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ) [7]. These

\* Correspondence: zakay@ri.ncgm.go.jp

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>1</sup>Department of Intractable Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

Full list of author information is available at the end of the article



observations suggest that blood Vpr could induce various clinical symptoms, but it remained unclear whether blood Vpr is biologically active.

Long interspersed element-1 (LINE-1, L1) and Alu are major endogenous retroelements, accounting for ~17 and ~10% of the human genome, respectively [8,9]. As an autonomous retroelement, L1 can retrotranspose not only itself but also other retroelements, such as Alu and SVA (short interspersed element-variable number tandem repeat-Alu, SINE-VNTR-Alu). Intriguingly, a single human cell contains more than  $5 \times 10^5$  copies of L1, 80–100 of which are competent for retrotransposition (L1-RTP) [10]. During early embryogenesis, L1-RTP incidentally disrupts gene structures, leading to the development of inborn errors [11,12]. Of note, approximately 100 types of inheritable diseases have been identified as sporadic cases caused by mutagenic RTP of L1 or Alu [12]. Although most studies of L1-RTP have focused on early embryogenesis [13–16], recent lines of evidence suggest that L1-RTP is also induced in somatic cells [17–20]. In tumors of epithelial-cell origins and hepatomas, *de novo* L1 insertions were detected in the vicinity of tumor suppressor genes, suggesting that L1-RTP is actively involved in carcinogenesis [21,22]. Because L1-RTP alters cellular properties by causing various genetic alternations, including gene deletions [23,24], DNA damage [25], apoptosis [26] and immune responses [27], deregulation of L1-RTP in somatic cells likely functions as a trigger of various diseases.

Here we present evidence that Vpr is active for induction of L1-RTP, and further demonstrate that 6 of 15 blood samples from HIV-1 patients were positive for Vpr-induced L1-RTP. Interestingly, rVpr reproducibly induced L1-RTP in various organs, including the kidney, when administered to mice that harbored human L1 as a transgene (hL1-Tg mice) [28,29]. Clinically, HIV-1-associated nephropathy (HIVAN), which is mainly observed among African-Americans [30], is an end-stage renal deficiency that is found without apparent correlation with the viral load [31,32]. In view of reports that Vpr is a candidate molecule responsible for HIVAN [33,34], we propose that monitoring blood levels of Vpr is important for determining its involvement in the pathogenesis of HIVAN.

## Results

### rVpr induces L1-RTP

We initially performed a colony formation assay using purified rVpr and pCEP4/L1mneoI/ColE1 (pL1-Neo<sup>R</sup>) (Figure 1A and B) [28,35–37]. When HuH-7 human hepatoma cells were treated with rVpr, L1-RTP occurred in approximately 50 of  $10^5$  cells (Figure 1C,  $P < 0.02$ ). rVpr caused no apparent cytotoxicity (Additional file 1: Figure S1). The activity of rVpr was also confirmed by a PCR-based assay using pEF06R [37,38], in which the

signal intensity of the 140 bp band, which corresponds to a product of L1-RTP, was increased by treatment with rVpr (Figure 1B, lower panel for the rationale of the PCR-based assay and 1D, lane 2). A quantitative PCR (qPCR) analysis was also carried out using a TaqMan probe designed to detect a junction point of two exons of the *EGFP* gene (Figure 1B, bottom; see also Additional file 2: Figure S2 for standard qPCR curves). Data revealed that rVpr significantly increased the frequency of L1-RTP (Figure 1E,  $P < 0.05$ ). Notably, rVpr-induced L1-RTP was completely blocked by 8D1 and C217, monoclonal antibodies (mAbs) against Vpr (Figure 1D, lanes 5 and 6) [4], but not by an irrelevant mAb against a spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (Figure 1D, lane 4, SARS). Vpr-induced L1-RTP was also observed in HEK293T cells, in which the activity of ~1 ng/mL rVpr was detected (Figure 1F, lanes 10–12; Additional file 3: Figure S3).

Taking advantage of the high sensitivity of the PCR-based assay performed using HEK293T cells, we explored the activity of L1-RTP in blood samples from HIV-1-positive patients. Among 15 samples analyzed by a PCR assay, 6 were positive for L1-RTP induction (Figure 2A, upper panel; patients' clinical information is summarized in Additional file 4: Table S1). Notably, L1-RTP activity was selectively blocked by 8D1, indicating that the L1-RTP activity in HIV-1 patients is attributable to Vpr (Figure 2B and C). Interestingly, Vpr-induced L1-RTP was detected in patients with low HIV-1 titres (Figure 2D and Additional file 4: Table S1). To confirm this, we carried out immunoprecipitation followed by Western blot analysis (IP-WB analysis), and successfully detected Vpr in one of two blood samples that were positive for L1-RTP (no. 15; Additional file 5: Figure S4, arrowhead). Estimated concentration of the blood Vpr, when compared to the signals of standard rVpr, would be approximately 5 ng/mL (Additional file 5: Figure S4). In contrast, we could not detect Vpr in another sample (no. 1).

### rVpr induces L1-RTP *in vivo*

To determine the effects of rVpr *in vivo*, we next investigated L1-RTP after administration of rVpr to hL1-Tg mice (Figure 1B, solid line). As shown in Figure 3A, L1-RTP was detected in organs including the lymph nodes, liver, thymus and spleen upon intraperitoneal administration of ~200 ng of rVpr three times every 2 days (Additional file 6: Table S2). Interestingly, the qPCR analysis detected L1-RTP in the kidney after six intravenous administrations of 10 ng of rVpr (Figure 3B). To demonstrate that rVpr-induced L1-RTP was dependent on the reverse transcriptase activity of ORF2 [9], we first carried out *in vitro* experiments to examine whether rVpr-induced L1-RTP was blocked by nucleotide analogue