

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トランスフェラーゼ(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の変換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

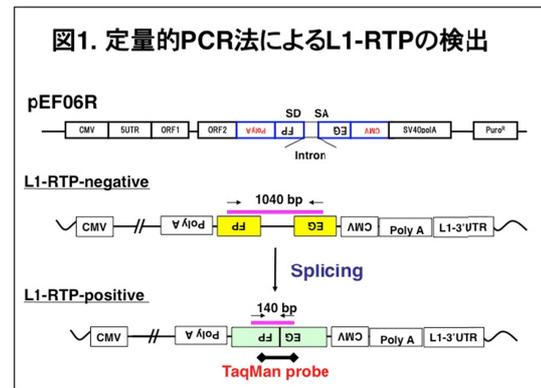
ウイルス蛋白質による細胞形質転換作用は、DNA損傷誘導とRTP誘導能で評価する。

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、 γ -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 μ g/mLのピュロシンで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 β -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。

作成できたファ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_B 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⁺ 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、石坂幸人. 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