

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 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

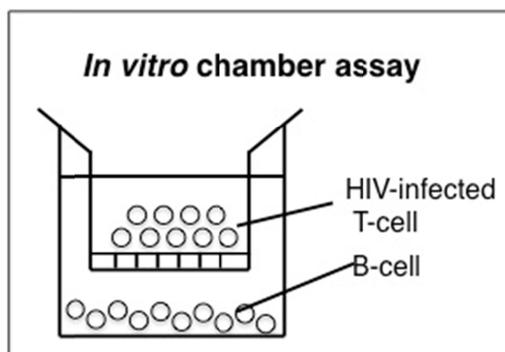
研究要旨 B 細胞と T 細胞の非接触の二重培養環境で、HIV 感染に伴って誘導される Naïve B 細胞の DNA メチル化修飾について解析を行った。感染しない B 細胞においても、T 細胞様の DNA メチル化変動が認められ、感染による何らかの DNA メチル化変動因子が示唆された。

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 Human Methylation 450 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。

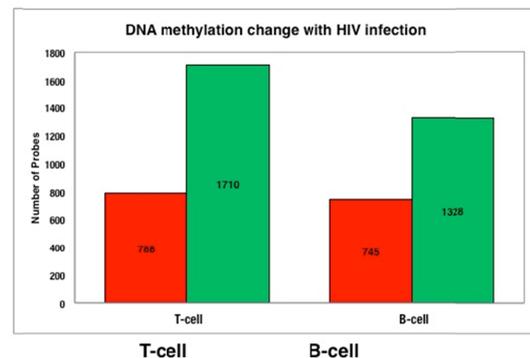
(倫理面への配慮)

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



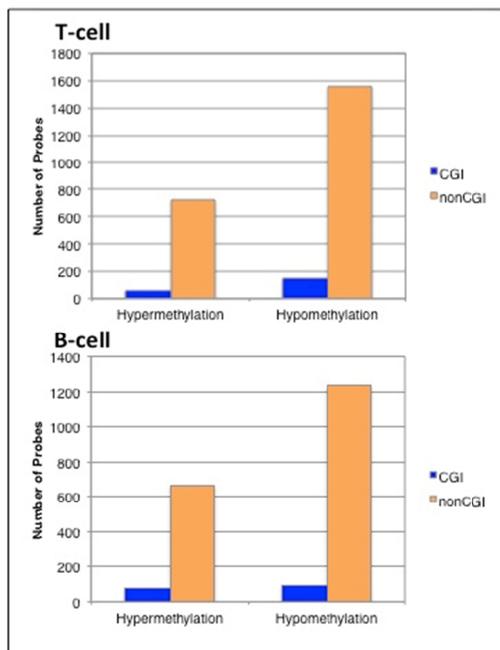
その多くが non-CGI (CpG island) 領域の hypomethylation 傾向であった。

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、CGI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, Yukihiro 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