

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発症関連因子の同定を試みる。解析の結果、ウイルス感染 T 細胞と共培養したナイーブ B 細胞の DNA メチル化様式が変化すること、また、HIV 感染者末梢血細胞のゲノム DNA のメチル化様式は、健常人とは異なる傾向を示した。ゲノム DNA の低メチル化は、ゲノム不安定性の分子基盤となることが知られている。今後は、低メチル化とがん化の関連性を明らかにするとともに、HIV 感染に伴う低メチル化誘導機序の解明を試みる。

< 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
- ・ 田中紀子 国立国際医療研究センター
難治性疾患研究室・室長
- ・ 山下克美 金沢大学医薬保健研究域・准教授

A. 研究目的

Antiretroviral therapy 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、現在でも死亡原因の約 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歴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 固有の要因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と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示唆された。

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事が知られている。申請者らは、Vpr に着目し、その機能解析を続けてきた。例えば、Vpr リコンビナント蛋白質(rVpr)を 50-100 ng/mL の濃度で、細胞の培養液に添加すると、レトロトランスポジション(RTP)や、ゲノム DNA 二重鎖切断(DSB:DNA double-strand break)を誘導する事から、HIV 感染細胞から産生されるウイルス蛋白質による bystander effects の中でも、Vpr は特にゲノム不安定性を誘導する最重要因子と考えられ、B 細胞の細胞形質転換においても主要な役割を担っている可能性が考えられる。

以上を背景に、本課題では、B 細胞のがん化に関連する特性や、誘導因子を明らかにする。そして、ゲノムの不安定性を惹起するウイルス蛋白質の血中濃度を把握するためのシステムを構築するとともに、ウイルス蛋白質作用を阻害できる中和抗体の作成も試みる。

本研究によって、発がん予測や予防戦略に資する情報が得られるとともに、さらな

る病態理解が可能になる。また、研究成果を積極的に発信することによって、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を通して、エイズ医療の均霑化にも貢献できると思われる。

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、野生型ウイルスを使用した。ヒト健常人の末梢血より未分化 B 細胞 (CD43 陰性細胞=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 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 法により増幅した。また、Infinium HumanMethylation 450 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メチル化の程度に応じて 3 グループに分類し、対象群との比較解析を行った。

b. 臨床検体の解析：健常人ならびに HIV 感染者の末梢血より、上述したように naïve B 細胞とそれ以外の細胞を分離した。それぞれの細胞からゲノム DNA を抽出し、メチル化解析を行った。ヒト健常人 3 名 (T 細胞は 1 名) より得られた DNA メチル化様式の平均値と HIV 感染者個々の様式を比較し、20% 以上メチル化変化を示したターゲットを抽出した。

c. ヒト化抗体の作成：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 Total RNA を調製した。採取した Total RNA より可変領域 (variable region: VH/VL) に相当する部分を cDNA として増幅し、VH と VL 遺伝子断片を連結し再構成することで、scFv (scFv: single-chain variable fragment) 遺伝子発現ライブラリーを作成した。このライブラリー-scFv をファージディスプレイライブラリーとして発現させ、抗原に親和性を示すクローンをパニングで選択した。即ち、rVpr をグルタチン 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、GST-Vpr 蛋白質に吸着させ、回収した。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、マウス IgG の可変領域に組み込むことで、マウス化抗 Vpr 抗体を作成した。

d. 転座 (Myc-IgH) の検出系 (石坂): HIV 陽性患者に見られるパーキットリンパ腫では、第 8 番目と第 14 番目の染色体転座による Myc-IgH の形成が見られることが知られている。そこで、染色体 8-14 転座を保有することが知られている Ramos 細胞を用いて、long distance PCR 法による Myc-IgH の高感度検出系を確立した。陰性対照として、同じく悪性リンパ腫細胞株である Daudi 細胞を用いた。この細胞は、染色体 8-14 転座を保有しているが、Ramos 細胞とは異なる領域に break-point を有している。即ち、Ramos 細胞由来転座は検出できるが、Daudi 細胞では増幅しない PCR プライマーセットで検出した。

e. T 細胞からの癌化誘発因子の検証：一段階増殖 HIV の調製のために、pseudotype ウイルスを用いた。即ち、HIV-1 ADA 株由来 CCR5 指向性エンベロープ (R5) 発現ベクターまたは NL4-3 株由来 CXCR4 指向性 (X4) エンベロープ発現ベクターと、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、ウイルスを作成した。48 時間後に回収し、上清中のウイルス量を p24 antigen capture ELISA (ABL 社) を測定することで、ウイルス価を評価した。調製したヒト血清培養または FBS 培養の静止期 T リンパ球 (2×10^6 個) に、各ウイルスをそれぞれ 60 ng の p24 量で感染させ、感染後 120 時間目に RIPA バッファーで細胞または上清の溶解を行い、ウエスタンブロットを行った。抗カスパーゼ 1 ウサギポリクローナル抗体 (サンタクルズ社) 抗 IL-1 マウスモノクローナル抗体 (R&D 社) を用いた。

f. DNA メチル化で変化した遺伝子を客観的 / 効率的に抽出するための統計学的解析方法の検討 a: 全ゲノム DNA メチル化測定データの分布に基づく個体間差の検出、b: 小サンプルでの複数のバラツキの指標を用いた多群比較法を用いた。

g. Vpr 発現株 MIT-23 細胞：Tet 不含培地で培養した MIT-23 細胞に 1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のドキシサイクリンを添加した。48 時間後に細胞を回収し、検討対象タンパクの発現と DNA 損傷誘発性リ

ン酸化をウエスタンブロット法にて p53、p53(pS15)、CHK1(pS345)、p21 および Vpr を検出した。

(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。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た。また、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. ウイルス感染実験 (徳永)

野生型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。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)

共培養した naïve B 細胞も、T 細胞と同様に、DNA メチル化様式に変動を認めた。さらに今回、naïve B 細胞にウイルスを添加した場合でも、DNA メチル化様式に変動が誘導された。ウイルス添加によるメチル化頻度は共培養した頻度と同程度ではあったが、ターゲットの共通性は、hypermethylation では 40%、hypomethylation では 20%であった。これらから、naïve B 細胞のメチル化変動は、ウイルス添加とは異なり、T 細胞のウイルス感染によって生じる 2 次因子(サイトカイン、ウイルス蛋白質など)が関わっている可能性が考えられた。

c. HIV感染者由来検体でのメチル化様式とゲノム不安定性 (志村)

健常人3例(n=9)から得られたhyper及びhypomethylationのターゲット数を基準として、HIV-1感染者2例(それぞれn=3)で検出された変動を調べた。興味深いことに、HIV感染単核球細胞(主にT細胞)のみでなく、naïve B細胞でも、ゲノムDNAの低メチル化傾向を認めた。さらに、HIV感染者由来検体でのゲノ

ム不安定性試験(CGH)を行い、ゲノム領域のコピー数について調べた。感染者2例のうち、DNAメチル化変動の高い症例では特にゲノムコピー数変動の可能性が示唆された。

d. ヒト化抗体の作成(石坂)

新規単クローン抗体の作成: Vpr ペプチドを2匹のニワトリに免疫した結果、一羽で明確な抗体価の上昇を認めた。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。得られた抗 Vpr 単クローン抗体(B44)と、合成した Vpr ペプチドとの相互作用を分子間相互作用を検出できる BOACORE を用いて検討した結果、Vpr に対して高い Affinity(KD: 5.1×10^{-9})を示す抗体を見出した。8D1、B44 の濃度を変更することにより B44 濃度依存的に合成 Vpr に対して特異的に反応することを確認することが可能になった。今後、より正確に血清中の Vpr を把握するために別のキャプチャー抗体での検討(抗 Vpr 抗体:C 末 PoAb、217)及び、最適化を検討する。

e. Myc-IgH の検出系の条件検討(石坂)

全細胞数 10^6 個中に Ramos 細胞 100 個の条件から調整したゲノム 250ng を用いた PCR において Myc-IgH を検出した。250ng は 10^4 個の細胞数に相当するので、10000 個に 1 個の陽性細胞を検出できることが分かった。Myc 側や IgH 側のブレイクポイントに関する情報をもとに、今後、より高感度に転座を検出できる条件を検討する。

f. T細胞からの癌化誘発因子の検証(徳永)

ヒト血清培養での静止期 T リンパ球の HIV-1 感染により、X4 ウイルスあるいは R5 ウイルスの違いに依らず、陰性対象では全く認められない約 36 kDa のカスパーゼ 1 前駆体が、全てのドナー由来の細胞溶解液のサンプルで検出された。一方で牛胎児血清存在下での HIV-1 感染においては、カスパーゼ 1 前駆体は全く検出されなかった。

g. 変化した DNA メチル化ターゲットを客観的 / 効率的に抽出するための統計学的解析方法の検討 (田中)

個体間差の検出のための混合 分布の当

てはめは、ノイズに非常に敏感であること、計算時間がかかることなどから、実用性は低い可能性が示された。今後実用性の高い別の方法の開発が必要であることが示唆された。候補領域の絞り込みには、検出したい差に基づいた複数の手法の複合的評価基準を設けることが必要であることが示唆された。

h. Vpr による p53 不活性化機構 (山下)

HIV ゲノムにコードされる Vpr 遺伝子の単独発現による DNA 損傷誘発を検出した。即ち、ゲノム損傷応答因子である p53 およびその上流の ATR、p53 の下流の CHK1 のリン酸化が認められ、いずれも活性化されていることが分かった。

D. 考察

a. ウイルス感染に伴う B 細胞ゲノム DNA の低メチル化傾向

試験管内での HIV 感染-共培養実験から、naïve B 細胞のメチル化変動は、T 細胞のウイルス感染によって生じる 2 次因子によって可能性が示唆された。さらに、HIV 感染者の naïve B 細胞においても、ゲノム DNA の低メチル化傾向を認め、生体内でも感染によるメチル化変動が生じている可能性が考えられた。一方、ゲノム DNA の低メチル化傾向とゲノム不安定性の関連性は報告されており、実際、臨床感染検体を用いたゲノム不安定性の解析 (CGH) において、ゲノム異常が生じている可能性を示唆する所見が得られている。今後、micro-satellite instability, PCS, mFISH 等のゲノム不安定性の指標を取り入れながら、低メチル化傾向とのゲノム異常との関連性をより詳細に解析する。

また、低メチル化傾向を惹起する要因を明らかにすることや、低メチル化傾向を示す遺伝子群の中から、将来のがん化を予測できるマーカー分子を同定することは、大変、重要であると思われる。また、ウイルス感染に伴う T 細胞パイロトーシス誘導の結果生じるカスパーゼ 1 の関与も示唆された。次年度以後、引き続き解析する。

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かったことから、これまでその活性を評価する試みは行われていない。しかし、研究代表者は、Vpr が患者血液検体の約 40% で検出されることや、15 例中 6 例の検体で Vpr によると思われるレトロトランスポジション誘導活性を示すことを報告してきた。一方、in vitro 実験において、rVpr を培養細胞の培養液中に添加すると、DSB が惹起される現象も再現性良く見いだしている。以上の結果は、ゲノム不安定性誘導分子として Vpr は無視できない因子であり、血中 Vpr 蛋白質を検出するための ELISA 系や、Vpr 蛋白質機能を中和できる抗体の作成は、次の展開を考える上でも、重要な試みであると思われる。

E. 結論

HIV 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 細胞に対してトランスに作用する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、低メチル化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予定である。

F. 健康危険情報 特記事項無し.

G. 研究発表

1. Otsubo T, Okamura T, Hagi T, Ishizaka Y, Kawamura T, Dohi T. Retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitic cancer model. *PLOS ONE*, 10(2):e0116072, 2015.
2. Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.

3. Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.
4. Kokuryo D, Nakashima S, Ozaki F, Yuba E, Chuang KH, Aoshima S, Ishizaka Y, Saga T, Kono K, Aoki I. Evaluation of Thermo-triggered Drug Release in Intramuscular-transplanted Tumors using Thermosensitive Polymer-modified Liposomes and MRI. *Nanomedicine*, 11(1):229-38, 2015.
5. Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, Mimori A, Ishizaka Y. A novel ACE2 activator reduced monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- β cascades with restored caveolin-1 expression. *Experiment. Lung Res.*, 41(1):21-31, 2015.
6. Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya, N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K, Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J. Virol.* *In press*
7. Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H. Retrotransposition of long interspersed element 1 induced by methamphetamine or cocaine. *J. Biol. Chem*, 289(37):25476-85, 2014.
8. 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.
9. 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.* 184:93-102, 2014.
10. Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA_B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 53:1219-28, 2014.
11. Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., Kameoka, M.: Impact of amino acid substitutions in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 on viral neutralization susceptibility to broadly neutralizing antibodies specific for the CD4 binding site. *Retrovirology* 11:32, 2014.
12. 多田卓哉、徳永研三：抗ウイルス宿主因子BST-2/tetherinとそれに拮抗するウイルス蛋白の分子間対決 Molecular Confrontation between the Host Restriction Factor BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonists . *日本エイズ学会誌 The Journal of AIDS Research.* 16: 126-136, 2014.

2. 学会発表

1. 石坂幸人. トランスポゾン制御破綻による疾病の発症. 日本実験動物科学技術さっぽろ 2014. 2014年5月、札幌.
2. 飯島健太、石坂幸人. HIV-1 VprによるDNA二重鎖切断誘導機構. 第16回白馬シンポジウム in 熊本, 2014年6月, 熊本.
3. 松永章弘、豊岡理人、吉田壘、石坂幸人、田中紀子、志村まり、「B細胞性リンパ腫のゲノムワイドDNAメチル化分布異常に基づいた予後予測」第66回細胞生物学会、奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター、2014年6月、奈良.
4. Tanaka N, Kurosawa T, Inaba Y, Toyo-oka L, Yoshida L, Kawasaki Y. Filtering samples based on eta-Mixture model for DNA methylation data Quantified by Bisulphite microarrays. International Biometric Conference 2014. Florence. Italy. July. 2014.
5. 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明. 第62回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
6. 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：HIV-1 複製前期の抑制に関わる IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子群の解析. 第62回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
7. 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析. 第62回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
8. 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名(立川)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子：恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明. 第62回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
9. 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能の解析. 第28回日本エイズ学会(大阪) 2014. 12.
10. 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 のエントリーを阻害する. 第28回日本エイズ学会(大阪) 2014. 12.
11. 石坂幸人、抗エイズ療法の導入後に残る問題とその克服に向けた挑戦. エイズ・市民公開講座. 第28回日本エイズ学会、2014年12月、大阪.
12. 高品智記、石坂幸人、NCGM 発ペプチドベクター、-現状の説明と今後の展開-シンポジウム、「再生医療とウイルス研究」、第28回日本エイズ学会、2014年12月、大阪.
13. 松永章弘、豊岡理人、吉田壘、石坂幸人、田中紀子、志村まり「B細胞性非ホジキンリンパ腫のゲノムワイド DNA メチル化分布異常に基づいた予後予測の可能性」第37回分子生物学会、パシフィコ横浜、2014年12月、横浜.