

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

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、血液中に存在し、ゲノム不安定性を誘導するウイルス因子に着目し、悪性化への可能性の有無を検証する。今年度は、約 40%の患者血清中に検出されるウイルス蛋白質で、レトロトランスポジション活性を示すことが証明されている Vpr に対して、新たに単クローン抗体を作成し、これを用いた ELISA の機能性を評価した。

A. 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から、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。こ

れまでに、申請者らは Vpr の機能について、

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 レベルであること。

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 rVpr 蛋白質を添加すると RTP 誘導や DNA 損傷 (DSB:DNA double-strand break)、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ること。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。

を認めている。

即ち、Vpr 一つを例にとっても、がん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、B 細胞の細胞形質転換を誘導する可能性を検証する。平成 25 年度の解析で、約 40%の患者血液中に RTP 誘導活性が検出され、これが Vpr に対する単クローン抗体で中和されることを報告した。即ち、RTP 誘導能を指標にすると、血中に認められ

るゲノム不安定性誘導能の多くが、Vpr によっていることが示唆された。そこで、今年度は、Vpr に着目して研究を進め、Vpr に対するトリ由来単クローン抗体の作成を行った。ニワトリを宿主とすることで、抗原に対して高い選択性を示す抗体が得られることが知られている。

また、Vpr によって誘導される DNA 損傷によつて転座が誘導される可能性が考えられるため、B 細胞性リンパ腫で認められる Myc-IgH 間の転座検出系を構築した。

## B. 研究方法

抗 Vpr 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) に相当する部分の 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、VH と VL から成る 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 遺伝子をファージミドベクターである M13 へ導入し、免疫ファージディスプレイライブラリーを作成した。通常、 $10^7$ - $10^8$  オーダーのタイターを示すライブラリーが作成できることが知られている。

Vpr に親和性を示すクローンは rVpr の組み換え蛋白質を用いたパニングで選別した。rVpr 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、まず、比較的豊富に回収できるコムギ胚芽無細胞系で flag-ストレプトタグ付き rVpr 蛋白質を発現させ、これを用いて初回のパニング操作を進めた。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

を行った。選別されたファージ DNA から抗原結合部位をコードする cDNA クローンを回収し、マウスやヒト IgG の可変領域に組み込むことで、マウスまたは、ヒト型抗 Vpr 抗体を作成できる。抗体の中和活性は、DNA 損傷誘導能に対する中和能で検証した。

### rVpr の精製：

flag-ストレプトタグ付き Vpr 蛋白質をコムギ胚芽無細胞系で発現させたのち、ストレプト tag を認識する strep-tactin ビーズと flag tag を認識する M2 抗体ビーズを用いて 2 段階精製を行い、純度の高い rVpr 蛋白質を得た。rVpr の活性の評価はヒト線維肉腫細胞を用いた。rVpr による DNA 損傷誘導能を指標に検討した。

### 染色体転座 (Myc-IgH) の検出系：

B 細胞のリンパ腫では、様々な転座がみられる。中でも、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 融合遺伝子が形成され、パーキットリンパ腫の検査項目の一つにもなっている。そこで本研究では B 細胞の不死化培養細胞や健常ヒト末梢血由来の naive B 細胞に rVpr を添加し、Myc-IgH の転座が誘導されるかについて検討し、rVpr による B 細胞の悪性化の機序を明らかにすることを試みた。パーキットリンパ腫由来のヒト培養細胞の中から Myc-IgH のブレイクポイントがすでに明らかになっている Ramos 細胞を用い、Long distance PCR 法によって Myc-IgH の検出を試みた。

### Vpr によるゲノム不安定性：

B 細胞性悪性リンパ腫で認められる染色体転座は、抗体産生の際に生じるクラススイッチリコンビネーションの際、同時に惹起される DSB 部位との融合によって誘導される可能性が考えられる。即ち、ゲノム不安定性の誘導は、転座形成の駆動として作用する可能性が示唆される。そこで、まず、rVpr を B 細胞培養条件下に添加することで、DSB が誘導されるか可能性を検証した。

(倫理面への配慮)

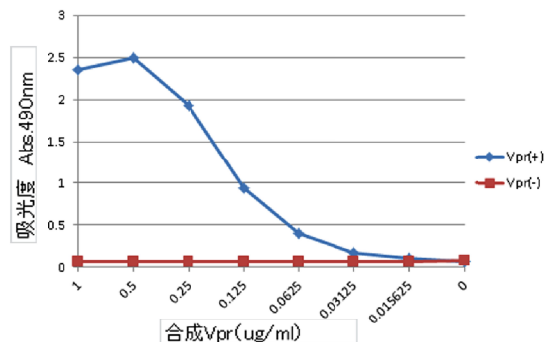
健常人末梢血を使用するにあたり、倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得た。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関内承認実験として行った。

### C. 研究結果

新規単クローン抗体の作成：Vpr ペプチドを 2 羽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。

2 種類のリコンビナント rVpr を用いた複数回のパニングを経て、回収された抗 Vpr 単抗体産生クローンの内、最初に調製できたクローン (B44) と合成 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 BIACORE を用いて検討した。その結果、Vpr に対して高い親和性 ( $KD:5.1 \times 10^{-9}$ ) を示すことが分かった。既存のマウス単クローン抗体である 8D1 を固相化抗体として使用し、B44 を検出抗体としてサンドイッチ法で解析した。その結果、B44 の濃度依存的に rVpr を検出するこ

とが可能になった (図 4 参照)。今後、より正確に血清中の Vpr 量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、最適化を検討する必要がある。



捕捉抗体：抗Vpr抗体8D1 5ug/ml  
検出抗体：新規抗Vpr抗体B44 1ug/ml

図4：8D1とB44 によるサンドイッチELISA

### Myc-IgH の検出系の条件検討：

全細胞数  $10^6$  個当たり、Ramos 細胞を  $10^5$  個混和した状態から、10 倍希釈系列を作成し、Long distance PCR 法を用いて検討した。この際、同じくバーキットリンパ腫由来の細胞で、異なるブレイクサイトを持つ Daudi 細胞を細胞数の補正に用いた。用いた Myc 側 PCR プライマーは、Myc 遺伝子の Exon2 の 5' 末端に、IgH 側 PCR プライマーは、 $C\mu$  領域に設定した。

全細胞数  $10^6$  個あたり 100 個の Ramos 細胞が含まれる細胞集団より抽出したゲノム DNA で Myc-IgH のバンドが検出された。PCR に供した DNA 量は 250ng 相当で、これは約  $10^4$  個の細胞に由来する DNA 量であることから、今回稼働した系は、10000 個あたりに 1 個の陽性細胞を検出できることが示唆された。

### Vpr によるゲノム不安定性：

ゲノム不安定性は DNA 損傷修復の際に誘導される DSB にて検出を行うことが一般的で

ある。よって rVpr 蛋白質をヒト末梢血由来の naiveB に添加し 24 時間後に DSB マーカーである gH2AX で染色し、FACS 解析にて検討を試みたが、検出感度の問題で有意な差を検出できなかった。今後、細胞免疫染色、コメットアッセイなど、他の DSB の検出方法での検討を行う必要がある。

#### D. 考察

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-ng/mL であることが分かった。平成 25 年度の検討で、解析した 15 例の患者血漿中 6 例において RTP 誘導活性が検出され、全例が、Vpr に対する単クローンで中和された。即ち、40%の頻度で患者血中に検出される Vpr はほぼ全例が RTP 誘導活性を示す可能性が示唆された。

一方、*in vitro* の実験では、リコンビナント Tat や Nef にも RTP 誘導活性を認めたが、患者検体中の RTP 誘導活性は 8D1 の作用で、ほぼ完全に中和された。即ち、患者血清中に存在する 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。

新たな抗体として得た B44 を用いたサンドイッチ ELISA 法にて、数百 pg/mL の Vpr が測定できる可能性が得られている。血清中に存在する Vpr を測定できる検出系の確立は、重要であり、今後、B44 以外のトリ由来単クローン抗体の機能性を評価しながら、種々のクローンを組み合わせることで、ELISA 検出系の最適化を図る予定である。

B 細胞リンパ腫の中でもバーキットリンパ腫などに見られる染色体転座の検出系は、が

ん化の可能性の早期から把握する上で大変重要である。今後、HIV 陽性患者の血中における Vpr 濃度のモニターと、Myc-IgH などの染色体転座の検出を平行して進めることで、エイズ関連悪性腫瘍の誘発機序の理解が可能になるとともに、新規創薬の可能性も明らかになるものと思われる。

#### E. 結論

Vpr に対するニワトリ由来単クローン抗体を作成し、血液中に存在する Vpr を検出するための ELISA 系の準備が出来つつある。次年度で、Vpr-ELISA の有効性を評価する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文

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) 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.

3) 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- $\beta$  cascades with restored caveolin-1 expression. *Experiment. Lung Res.*, 41(1):21-31, 2015.

4) 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.

5) 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.

6) Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA<sub>B</sub> receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 53:1219-28, 2014.

7) Doi A, Iijima K, Kano S, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition and upregulates glutamate synthesis by the signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathway. *Microbiology and Immunology*, in press.

## 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) 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.

4) 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 特許出願無