

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」研究

分担課題：「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、および HIV 感染臨床検体について解析を行った。ウイルス添加のみでも naïve B 細胞は、DNA メチル化変動が認められたが、感染 T 細胞との二重培養環境とは、メチル化ターゲットは必ずしも一致しない。HIV 感染臨床検体 naïve B 細胞でも、DNA メチル化変動は認められ、hypomethylation 傾向を示した。これらより、HIV 感染により naïve B 細胞のメチル化変動は誘導されることが示唆された。

A. 研究目的

HIV-1(以下 HIV)感染者における悪性腫瘍の発症リスクは健常人よりも高く、HIV 感染者のリンパ腫は非感染者の腫瘍よりも悪性度が高い。そのため、両者の病態は異なる可能性が推測されるが、病理診断では差違は明らかでない。私たちは、ゲノムワイドな DNA メチル化様式について、HIV 関連リンパ腫と非 HIV 感染リンパ腫を比較した。その結果、2 つのグループに分類できる可能性を論文発表した (Matsunaga et al. *AIDS*, 2014)。すなわち、ゲノムワイドな DNA メチル化様式の解析が、HIV 関連リンパ腫研究では有用であり、分生生物学的に非 HIV 感染リンパ腫とは異なり、転移や血管新生等に関わるいくつかのターゲット遺伝子がより発現する傾向を示唆している。そして、着目すべき点として、HIV 関連リンパ腫は非感染リンパ腫と比較して、圧倒的に hypomethylation 傾向を示したことである。これまでの報告では、hypomethylation はゲノム安定性との関連が深いことから、本年度は、HIV 感染実験および HIV-1 感染臨床検体について、ゲノムワイドな DNA メチル化変動解析、ゲノム不安定性解析も行い、HIV 感染者におけるリンパ腫傾向を明らかにする。

B. 研究方法

ヒト健常人の末梢血を用いた感染実験：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-1野生型株をT細胞に感染させた後、共培養を4日間行なった。細胞より

回収抽出したゲノムDNAをBisulfite処理した後、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。50%以上のメチル化様式の変化を示す標的遺伝子と数を抽出した。臨床検体の解析：健常人ならびにHIV感染者の末梢血より未分化B細胞とそれ以外の細胞を分離し、それぞれの細胞からゲノムDNAを抽出し、上述のように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。抽出したgDNAよりゲノムコピー数変動を調べた(CGH)。

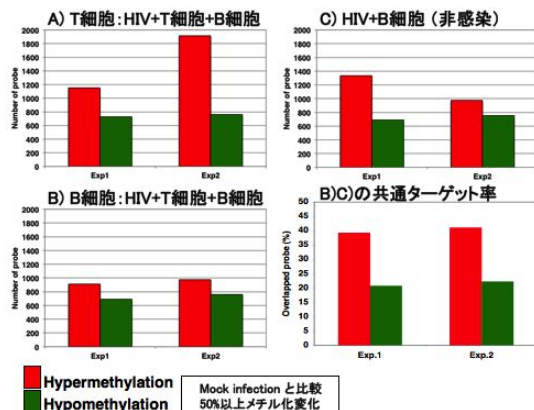
（倫理面への配慮）

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. B 細胞におけるメチル化様式：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

感染実験によるB細胞のDNAメチル化変動(2)



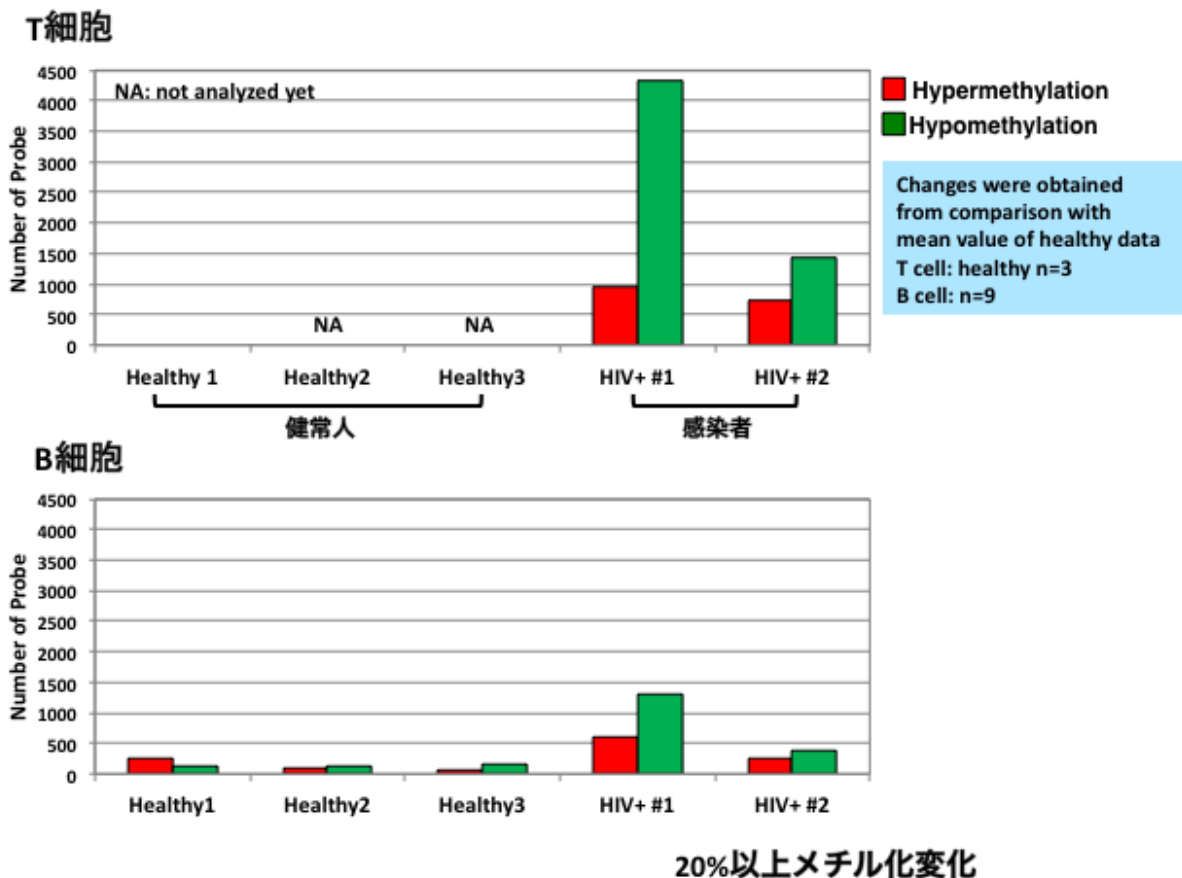
めた。しかし、実験ウエル毎のメチル化のばらつきは否めなかった。さらに今回、naïve B 細胞にウイルスを添加した場合でも、DNA メチル化様式に変動が認められた。メチル化頻度(図 B, C)は共培養した頻度と同程度であったが、ターゲットの共通性は、hypermethylation では 40%、hypomethylation では 20%であった。これから、ウイルス添加とは異なる共培養による影響が、

特に naïve B 細胞の hypomethylation において存在する可能性が示唆された。即ち、これらの DNA メチル化変動には、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。

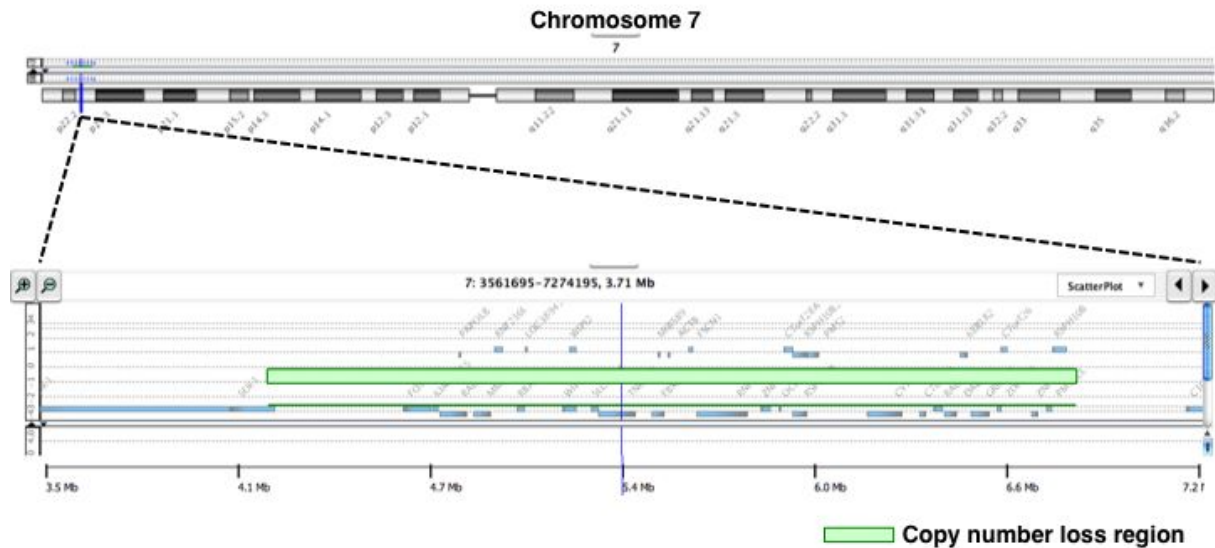
HIV感染者由来検体でのメチル化様式：健常人3例(n=9)から得られたhyper及びhypomethylationのターゲット数の平均値を基準として、HIV-1感染者2例(それぞれn=3)で検出された変動を調べた。興味深いことに、HIV感染単核球細胞(主にT細胞)のみでなく、naïve B細胞でも、Hypomethylation傾向のDNAメチル化パターンに変動を認めた。

HIV感染者由来検体でのゲノム安定性試験(CGH)：ゲノム領域のコピー数について調べた。興味深いことに、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。今後、遺伝的に存在する各個人コピー数パターンを除き、実質的なゲノムコピー変動を明らかにできるよう、T細胞でのコピー数変動や検出シグナルの閾値設定を行う。図は、感染者例の明らかに欠失したゲノム箇所の

HIV患者の末梢血B細胞でもDNAメチル化変化が見られる



HIV Patient #1患者にみられた7番染色体のゲノム領域欠損



詳細を示した。

D. 考察

複数の感染実験により、naïve B 細胞において、DNA メチル化様式の変化が存在することが明らかになった。これには、ウイルスの接触によるもの、T 細胞感染との共培養によるものの両者の可能性が考察される。実験ウエル毎のメチル化変動のばらつきについては、細胞培養条件、感染効率に起因している可能性が否めない。培養条件は、メチル化変動は敏感に影響を与えることから、徹底した実験条件を設定する必要がある。HIV 臨床検体では、naïve B 細胞において、DNA メチル化の hypometylation 傾向が存在し、変動の大きい症例は、ゲノム領域のコピー数変動が大きい傾向を示したことは、論文報告で示唆されているような、DNA メチル化 hypometylation 傾向とゲノム不安定性との関連を示唆する可能性がある。今後、臨床検体数を増大し、DNA メチル化変動、ゲノム不安定性試験 (CGI, microsatellite instability, PCS, mFISH) を解析検討する。

E. 結論

HIV 感染に伴った naïve B 細胞では、DNA メチル化が変動する。感染 T 細胞から何らかの液性因子が B 細胞に作用している可能性が再度示唆された。今後、ゲノム不安定性因子を解析することで、HIV リンパ腫予備軍の早期診断に貢献したい。

F. 研究発表

1 口頭発表

国内

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、奈良。

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、横浜。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 該当無し