

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策 研究事業

「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

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 石坂幸人

平成27(2015)年5月

目 次

I . 総括研究年度終了報告

- 「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
石坂幸人 ----- 1

II . 分担研究年度終了報告

- 1 . 「HIV-1ウイルス蛋白質に対する抗体作成と有効性評価」に関する研究
石坂幸人（国立国際医療研究センター、難治性疾患研究部） ----- 7
- 2 . 「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
志村まり（国立国際医療研究センター、難治性疾患研究部） ----- 12
- 3 . 「エイズ悪性B細胞腫誘発機序のウイルス学的解析」に関する研究
徳永研三（国立感染症研究所、感染病理部） ----- 16
- 4 . 「小サンプルのIn vitro実験による全ゲノムDNAメチル化
データから、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」
田中 紀子 国立国際医療研究センター医学統計研究室長 ----- 19
- 5 . 「Vpr による p53 不活性化機構」
山下 克美 金沢大学医薬保健研究域・准教授 ----- 22

- III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

- IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 25

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.

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)

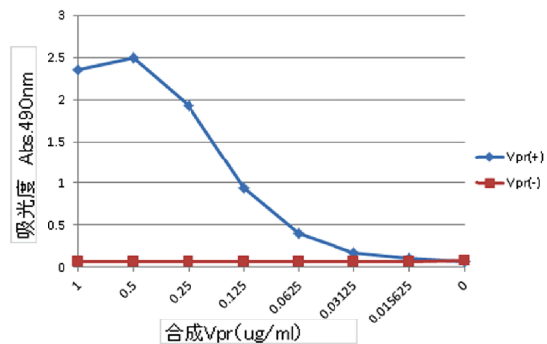
健常人末梢血を使用するにあたり、倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得た。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関内承認実験として行った。

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- β 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_B 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

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)。

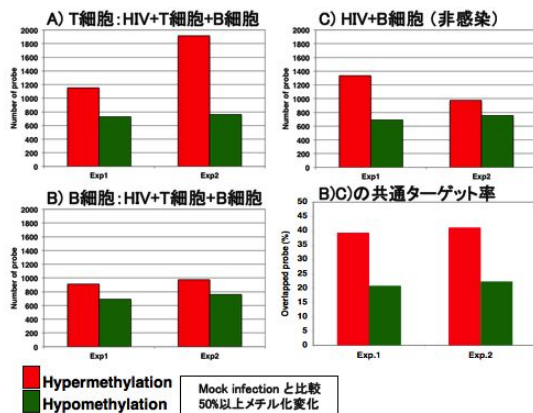
(倫理面への配慮)

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。これらから、ウイルス添加とは異なる共培養による影響が、

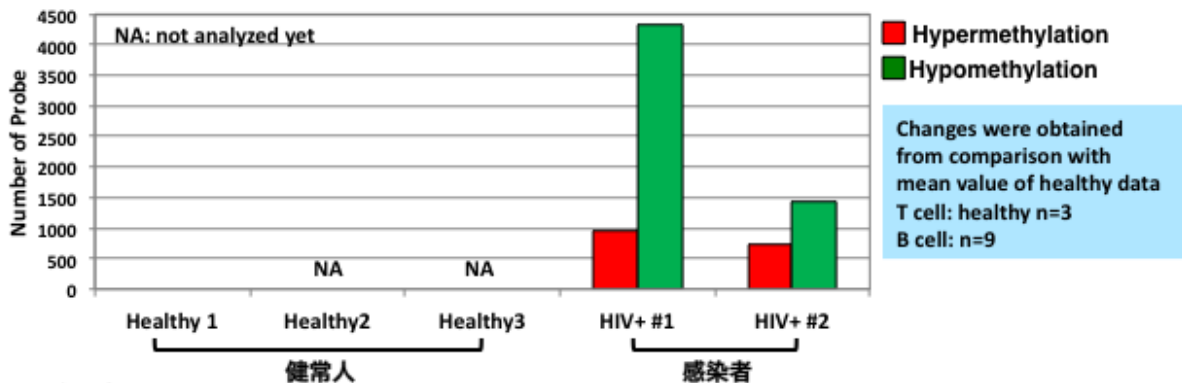
特に naïve B細胞の hypomethylation において存在する可能性が示唆された。即ち、これらのDNAメチル化変動には、ウイルス感染によって生じる2次因子(サイトカイン、ウイルス蛋白質など)が関わっている可能性が考えられた。

HIV感染者由来検体でのメチル化様式：健康人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。

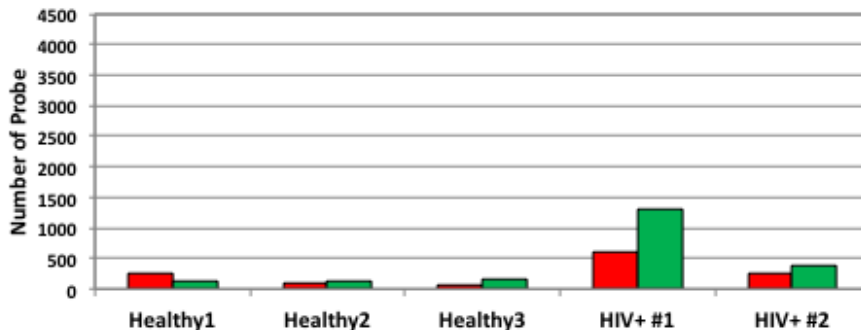
HIV感染者由来検体でのゲノム安定性試験(CGH)：ゲノム領域のコピー数について調べた。興味深いことに、感染者2例のうち、DNAメチル化変動の高い症例では特にゲノムコピー数変動の可能性が示唆された。今後、遺伝的に存在する各個人コピー数パターンを除き、実質的なゲノムコピー変動を明らかにできるよう、T細胞でのコピー数変動や検出シグナルの閾値設定を行う。図は、感染者例の明らかに欠失したゲノム箇所の

HIV患者の末梢血B細胞でもDNAメチル化変化が見られる

T細胞

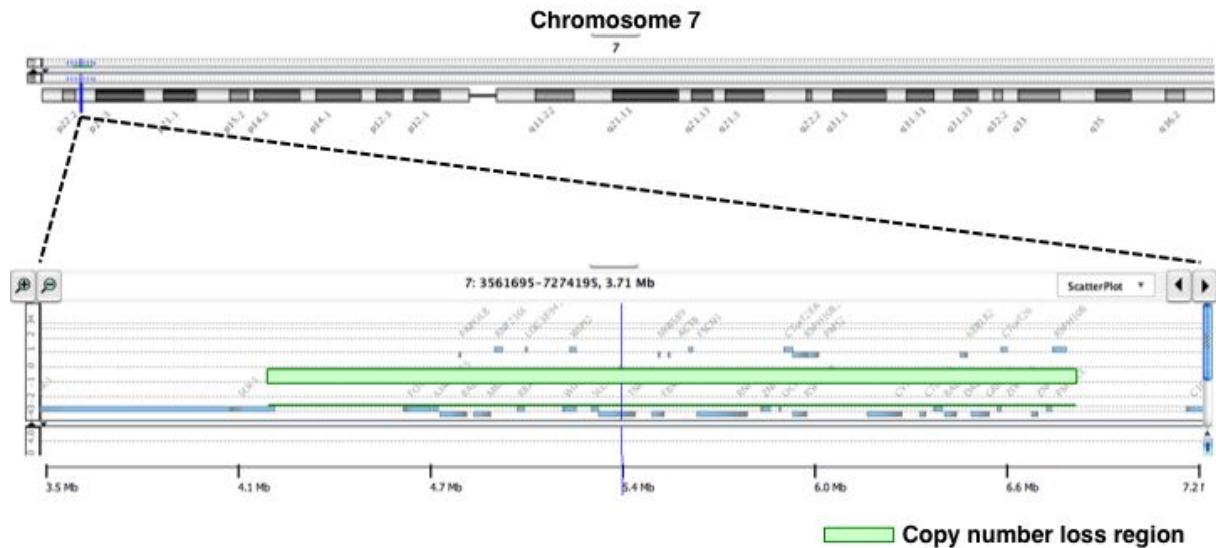


B細胞



20%以上メチル化変化

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 hypomethylation 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 hypomethylation 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

エイズ悪性 B 細胞腫誘発機序のウイルス学的解析

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官
研究分協力者 多田 卓哉 国立感染症研究所感染病理部 流動研究員
研究分協力者 張 延昭 国立感染症研究所感染病理部 研究生

研究要旨：エイズ悪性 B 細胞腫は、HIV 感染が誘導する何らかの液性因子が B 細胞に作用することで惹起されるエイズ関連リンパ腫と考えられる。本研究では *in vitro* における T 細胞からの癌化誘発因子について検証する。初代培養細胞実験系を用いて、HIV-1 感染 T 細胞から放出される宿主可溶性因子またはウイルス蛋白が B 細胞に及ぼす影響を T 細胞パイロトーシスという観点から検討することを試みる。本年度は末梢血単核球由来の静止期 T 細胞を用いて実際にパイロトーシスを再現できるか否かについて、異なるトロピズムを持つエンベロープを用いて感染実験を行い、パイロトーシスの指標である細胞内カスパーゼ 1 と培養上清中のインターロイキン 1 β の産生を検討した。

A. 研究目的

エイズ病態進行に伴う CD4 陽性 T 細胞の急激な減少は、静止期 T 細胞への HIV-1 の abortive な感染により休止した逆転写産物が、カスパーゼ 1 を活性化して、それに続く炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 β (IL-1 β) が産生することによって起こる、パイロトーシス (炎症性 programmed cell death) が原因であることが、昨年、Nature 誌上で報告された (Nature, 505:509-514, 2014)。その実験はリンパ節・扁桃腺由来のヒトリンパ球凝集培養 (HLAC) 法によるものであったが、末梢血リンパ球を用いた簡易法でパイロトーシスが再現されるか否か、またウイルスのトロピズムが影響するか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 初代培養細胞の調製

3 人の健常人由来末梢血リンパ球から CD14 陽性細胞を、CD14 マイクロビーズ (ミリテニー社) を用いた MACS カラムで単離した後、フロースルーの陰性画分から CD4 陽性細胞 (T 細胞) を Dynabeads CD4 Positive Isolation Ki (ライフテクノロジ社) を用いて単離した。得ら

れた CD4 陽性 T 細胞は PHA/IL-2 による刺激は行わずに、10% ヒト AB 型血清 (シグマ社) またはウシ胎児血清 (FBS; シグマ社) 存在下で培養を行った。

2. 各種 HIV-1 変異型ウイルスの調製

一段階増殖 HIV-1 の調製のために、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、ヒト AB 型血清または FBS 存在下で培養を行い、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 antigen capture ELISA (ABL 社) により測定した。

3. 感染実験及びウエスタンブロット法

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った。各サンプルを 12% の SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルを PVDF メンブレンに転写後、細胞溶解液には抗カスパーゼ 1 ウサギポリクローナル抗体 (サンタクルズ社) を用いて、上

清溶解液には抗 IL-1 β マウスモノクローナル抗体 (R&D 社) を用いて一次抗体処理、次にペルオキシダーゼ結合抗ウサギまたは抗マウス抗体で二次抗体処理した。ECL (バイオラッド社) により化学発光を行い、LAS3000 (富士フィルム社) を用いて、細胞内カスパーゼ 1 と上清中 IL-1 β の検出をそれぞれ試みた。

C. 研究結果

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。IL-1 β 前駆体のプロセッシングにより IL-1 β 産生を惹起する 10 kDa の活性化型カスパーゼ 1 は今回の条件では認められなかった。一方で FBS 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。また、ヒト血清培養あるいは FBS 培養に依らず、X4 ウイルスと R5 ウイルスのどちらの感染においても、上清中の IL-1 β を検出することが出来なかった。

D. 考察

昨年 Nature 論文における HLAC 法は技術的困難さ及び検体入手の困難さが伴うためか、現時点で HIV-1 感染による T 細胞パイロトーシスを再現した報告は一報もない。今回我々はより簡便な健常人末梢血単核球由来の静止期 T 細胞を用いた方法によって、HIV-1 感染特異的かつウイルストロピズム非依存的にカスパーゼ 1 前駆体の発現が誘導されることを明らかにした。しかしながら、活性化型カスパーゼ 1 のバンドが細胞溶解液で検出されない事に矛盾せず、上清中への IL-1 β の産生がウエスタンレベルで認められなかった。これについては、もし微量の活性化型カスパーゼ 1 が細胞内に存在する場合、蛋白レベルで検出限界以下の IL-1 β が上清中には存在する可能性が考えられる。そこで今後は、静止期 T 細胞への HIV-1 感染後に細胞からトータル RNA を抽出し、それを用いて IL-1 β を標的とした定量 RT-PCR を試みる。尚、今回の実験において、FBS で培養を行った場合には、カスパーゼ 1 前駆体の発現

すら認められなかったことから、以前から言われている通り、FBS による培養は静止期 T 細胞に何らかの刺激を与えてしまい、T 細胞が実際には静止状態でなくなっている可能性が考えられた。以上、今回の我々の実験条件においては、パイロトーシスの指標となる活性化型カスパーゼ 1 を HIV-1 感染下で検出できなかったが、その前駆体の発現は確認できたことから、実験条件を改善して、活性化型及び IL-1 β の検出を試みる。尚、後者については定量 RT-PCR による検出も行う。来年度は更に、本研究班の主題であるエイズ悪性腫瘍誘発機序に、パイロトーシス関連の現象が関与するか否かについて、感染 T 細胞と B 細胞の混合培養後のメチル化または発現プロファイルを解析していく予定である。

E. 結論

健常人由来末梢血単核球由来の静止期 T 細胞のヒト血清を用いた培養における HIV-1 感染によって、パイロトーシスに関与するカスパーゼ 1 前駆体の発現誘導が認められた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 論文発表

- 1) 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.
- 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) 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 (co-corresponding author), Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. J. Virol. In press.
- 4) 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.
- 7) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K (speaker): Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. XX International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 2014. 7. (Late breaker's oral abstract)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし

学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

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：小サンプルの In vitro 実験による全ゲノム DNA メチル化データから、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

研究分担者 田中 紀子 国立国際医療研究センター医学統計研究室長

研究要旨

一般的に統計学を用いた研究仮説の検証は大標本理論をもとにした要約統計量を求めることにより群間比較や要因分析により行われる。DNA メチル化データの統計学的解析方法においても、広く適用されているものはこの大標本理論に基づいたものがほとんどである。しかしながら、網羅的ゲノム解析は現在もコストがかかることにより大標本を得ることは難しく、効率的な研究デザインおよび小サンプルでの仮説探索が不可欠となる。今回の研究のように In vitro で特に制御された環境下においては実験デザインの工夫により環境要因による分散成分を限りなく小さくしていくことにより効率を上げていくことが可能である。さらに、臨床検体を用いた先行研究より、メチル化状態が真に変化していると考えられる個体あるいは遺伝子に関しては、全体よりかなりはずれた値を示すことが示され、より小さいサンプルサイズにより変化をとらえることの可能性が示されたことを踏まえ、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 DNA メチル化感受性遺伝子の検出方法の検討を行うこととする。a については、臨床検体を用いた先行研究データを用いて適切なデータの視覚化および、パラメトリックおよびノンパラメトリックな分布当てはめと形状パラメタの推定のためのプログラムを R を用いて開発する。b については、IQR(四分位差)、MAD (中央値絶対差) など正規性からの逸脱に頑健なスケールパラメタによりなるべくバラツキが小さく、平均群間差の大きいあるいは群間でのメチル化状態のバラツキ具合自体に差のある遺伝子領域を選択できる指標を GEO にて公開済みのデータを用いて検討した。その結果、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、実用性に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。

A. 研究目的

一般的に統計学を用いた研究仮説の検証は大標本理論をもとにした要約統計量を求めることにより群間比較や要因分析により行われる。DNA メチル化データの統計学的解析方法においても、広く適用されているものはこの大標本理論に基づいたものがほとんどである。しかしながら、網羅的ゲノム解析は現在もコストがかかることにより大標本を得ることは難しく、効率的な研究デザインおよび小サンプルでの仮説探索が不可欠となる。今回の研究のように In vitro で特に制御された環境下においては実験デザインの工夫により環境要因による分散成分を限りなく小さくしていくことにより効率を上げていくことが可能である。さらに、臨床検体を用いた先行研究より、メチル化状態が真に変化していると考えられる個体あるいは遺伝子に関しては、全体よりかなりはずれた値を示すことが示され、より小さいサンプルサイズにより変化をとらえることの可能性が示されたことを踏まえ、本研究では、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パラッキの指標を用いた多群比較法を用いたDNAメチル化感受性遺伝子の検出方法の検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

目的 a および b について用いた実データはすでに出版済みの HIV とリンパ腫との関連を検討したイルミナ 450K チップにより測定されノーマライゼーション済みの 28 検体分、375639 プローブのデータである。

目的 a および b について用いたシミュレーションデータは、全ゲノムメチル化データが 2 ~ 3 混合ベータ分布に従うことから以下のようないくつかのパラメータを設定して発生させた。

Scenario 1 (two-peaks model): $a_1=1$, $b_1=12$, $a_2=13$, $b_2=2$, $w_1=0.4$, $w_2=0.6$;

Scenario 2 (three-peaks model): $a_1=7.0$, $b_1=43.6$, $a_2=2.6$, $b_2=3.9$, $a_3=14.0$, $b_3=1.8$, $w_1=0.26$, $w_2=0.31$, $w_3=0.43$;

Scenario 3 (four-peaks model): $a_1=5$, $b_1=70$, $a_2=8$, $b_2=26$, $a_3=45$, $b_3=25$, $a_4=64$, $b_4=6$, $w_1=0.35$, $w_2=0.15$, $w_3=0.16$, $w_4=0.34$.

データの発生には R vers.2.15 を用いた。目的 a については、臨床検体を用いた先行研究データを用いて適切なデータの視覚化および、パラメトリックおよびノンパラメトリックな分布当てはめと形状パラメータの推定のためのプログラムを R を用いて開発した。シミュレーションデータについては真の分布の混合数がわかっているが、実データについては真の混合数が分からないため、データを視覚化した際に観測されるピーク数を数えることで、真の混合数を設定した。尚、観測者によるバイアスを除去するために、ピーク数の数え上げは独立した場所で 3 人によって行われ、多数決によって真の混合数が決定された。3 人とも回答が異なった場合は、判定不能とした。

目的 b については、まず本年度は、2 群比較のみを行うこととした。一般的に適用されている t 検定 (群ごとの分散が等しいという仮定のもとで平均値の比較)、ウィルコクソン順位和検定 (群ごとの分布形が等しいという仮定のもとでノンパラメトリックな中央値の比較) に加え、ノンパラメトリックな F 検定に対応する Ansari-Bradley 検定 (群ごとの分布型が等しいという仮定の下でノンパラメトリックな分散の比較) および、分布型も分布の代表値も違うことを検出するためのコルモゴロフスミルノフ検定を実データに適用し、選択される候補領域にどのくらい差があるのかを観察した。

C. 研究結果

a 前年度において、多次元 分布を各サンプルのメチル化測定データに当てはめて、個体間での分布比較が可能かどうかについて実データおよびシミュレーションデータで検討を行った結果、感度が 70~90% と比較的良好であったが、特異度が 0~50% と低い値であった。そこで、測定の生データは分布に従うことが理論的に示されているが、変数変換することで、漸近的に多次元正規分布に従うと考えられるため、サンプ

ルごとに変数変換後多次元正規分布を当てはめ、再度感度・特異度についてプレリミナリーな検討を行った結果、感度・特異度ともに 分布で検討するよりも高い結果となった。

b 4つの検定手法を NCGM データに適用した結果、たとえば、p 値の小さい順 20 プローブを選択するとした場合、375639 プローブ中 66 プローブが選択された。このうち 12 プローブが二つの手法で選択されていたが、そのうち 9 プローブはウィルコクソン順位和検定とコルモゴロフスミルノフ検定で選択されていたものであった。t 検定やウィルコクソン順位和検定で検出されず、コルモゴロフ検定で検出されたものに関して分布型を検討した結果、コントロール群で比較的標準的な単法性の分布型であるのに、ケース群（今回は HIV 感染群）で 2 峰性をとっているものなど、分子生物学的には重要そうな差を検出している可能性が示唆された。

D. 考察

a について

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、実用性に低い可能性が示された。多次元正規分布を当てはめることで、個人のメチル化分布の差の検出が可能であることが示されたが、さらに、多次元正規分布に従わないようなノイズの多い分布が実データでは発生することも考えられるため、ノンパラメトリックに核関数で分布を推定し、分布のピークを数え上げることで分布の個人間差を検討する方法についても同様に性能評価を行うこととした。

b について

今後は、どのくらいのサンプルサイズで漸近性が保たれるのか、あるいはある程度分布型が異なる場合においても t 検定でも十分検出されるようになるのかなどをシミュレーションデータで検討することも必要と考える。また、検定手法によって検出したい差が異なるので、複合的評価基準を設

けることで候補領域を見逃さない手法の提案を行う必要があると考えられた。

A. 結論

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、実用性に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。

B. 研究発表

(学会発表)

Tanaka N, Kurosawa T, Inaba Y, Toyo-oka L, Yoshida L, Kawasaki Y. Filtering samples based on Beta-Mixture model for DNA methylation data Quantified by Bisulphite microarrays. International Biometric Conference 2014. Florence. Italy. July. 2014.

C. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

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

Vpr による p53 不活性化機構

研究分担者 山下 克美 金沢大学医薬保健研究域・准教授

研究要旨 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、ゲノム損傷応答因子 p53 およびその上流の ATR、p53 の下流の CHK1 について、活性化の指標であるリン酸化を、ウエスタンブロットにより検出した。その結果、いずれの因子も活性化されている事が判明した。

A．研究目的

近年、長期にわたる感染者において、腫瘍の発生が報告されている。細胞の癌化においてゲノム不安定化が必須な役割を演じていることは周知の事実である。

本研究の主任研究者である石坂らは、HIV ゲノムコードされる Vpr タンパク質が DNA 損傷を誘発することを発表し、Vpr が HIV 感染細胞におけるゲノム不安定化の誘因となり、ひいては HIV 感染者における腫瘍発生の重要な原因因子である可能性を示した。

本研究ではこの仮説に基づき、Vpr 誘発性のゲノム損傷応答系のエンドポイントの一つである、癌抑制遺伝子 p53 の動態を解明することが目的である。その成果を成果を基盤として、p53 の動態を直接的または間接的に抑制する低分子化合物の探索等、HIV 感染細胞における Vpr を標的とした癌化抑制法の開発を目指す。

B．研究方法

本研究では、Vpr 発現モデルとして石坂らによって開発された、テトラサイクリン (Tet) 添加により Vpr タンパクが発現される HT1080 細胞 (MIT-23 細胞) を使用した。

Tet 不含培地で培養した MIT-23 細胞に 1-5 μ g/mL のドキシサイクリン (Dox : Tet 誘導体) 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検討した。

検討対象のタンパク質は、p53、p53(pS15)、CHK1(pS345)、p21 および Vpr である。

(倫理面への配慮)

現段階では培養細胞を使用する研究のため、倫理面への配慮は不要である。

C．研究結果

p53 の発現誘導: 3 μ g/mL と 5 μ g/mL の Dox 処理において、発現上昇が認められたが、それ以下の濃度では検出不能であった。

p53(S15) のリン酸化: p53 の発現と同様に、3 μ g/mL と 5 μ g/mL の Dox 処理においてのみリン酸化が検出された。

CHK1(S345) のリン酸化: p53 発現および S15 のリン酸化と同様に、3 μ g/mL と 5 μ g/mL の Dox 処理においてのみリン酸化が認められた。

p21 の発現: p21 は p53 の転写ターゲットであるため、p53 発現が認められる Dox dose での発現が期待されたが、発現は確認できなかった。

Vpr の発現: Dox 添加による Vpr の発現は、すべての dose において検出できなかった。

D．考察

本研究では、p53 関連の応答と CHK1 のリン酸化が検出された。p53 の転写標的である p21 の誘導は検出できなかったが、検出に使用した抗体が原因の可能性があり、今後の検討課題である。また、DNA 損傷を惹起する Vpr の発現誘導も検出できていないが、過去の石坂らの実験では Vpr タンパク質が検出されているため、条件検討で問題が解決する可能性が高い。

Vpr の発現に関しては、p53 の発現誘導、p53S15 のリン酸化ならびに CHK1S345 のリン酸化が認められているため、現時点では検出できていないが、発現はされているものと考えられる。

Vpr 誘発性の DNA 損傷リスポンス (DDR: DNA damage response) の一経路として p53 が誘導されることは (本研究では p21 の検出をできなかったが)、p53 の下流の細胞応答が引き起こされていることが強く示唆される。Vpr は DDR のみならず、多様な細胞変化を誘導し、細胞がん化の誘因となる

可能性が示されており、今後は p53 活性化の下流の遺伝子発現の解析等が、Vpr の発がんにおける機能を明らかにする上で重要である。

Vpr は細胞周期において、G2 期から M 期への進行および、M 期の進行遅延を引き起こすことも知られており、これらのイベントが染色体不安定化の原因となることも示されている。一方、DNA 損傷によって G2 から M 期への進行遅延が引き起こされることは周知の事実である。これらの事実は、Vpr が誘発する DNA 損傷が M 期侵入遅延および M 期進行の攪乱の原因である可能性も示唆する。

Vpr 誘発性 DDR としての p53 の動態ならびに、DDR としての細胞周期進行遅延の解明は、AIDS 関連性の悪性腫瘍誘発の分子機序の理解に重要な情報をもたらすことが期待されるため、DDR と細胞周期進行の関連を追求することが今後の重要な課題となる。

E . 結論

今年度の研究では、Vpr の発現によって誘発される DDR を検出することを試みた。その結果、p53 の発現誘導、リン酸化、CHK1 の活性化を示すリン酸化等が検出された。

本研究では、p53 の重要な下流因子である p21 の

発現が検出できなかった。さらに、Vpr タンパク質も検出できなかったため、Vpr 誘導発現系の改良が求められる。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表

なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

特記すべき事なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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., <u>Tokunaga, K</u> (co-corresponding author), Miura, T.	Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers	J. Virol.	89	4992-5001	2015