

平成 20 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19590485
研究課題名 (和文) HIV インテグレーションとリンパ腫発症に関する研究
研究課題名 (英文) HIV integration and lymphomagenesis
研究代表者
片野 晴隆 (KATANO HARUTAKA)
国立感染症研究所 感染病理部 室長
研究者番号：70321867

研究成果の概要：

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の宿主細胞へのインテグレーションとリンパ腫発症との関連について、エイズ関連リンパ腫 20 例を検索した。HIV インテグレーションが示唆されたのは 1 例のみで、リンパ腫発症との関連は不明であった。これにより、エイズ関連リンパ腫では HIV インテグレーションはまれであることが分かった。また、エイズ関連リンパ腫では一般に STAT3 の発現が亢進していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 20 年度	1,300,000	0	1,300,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ウイルス学 6912

キーワード：HIV、インテグレーション、リンパ腫、STAT3

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫はエイズ患者における重要な死因の一つである。抗レトロウイルス療法により体内の HIV 量を劇的に抑制することで、ニューモシスチス肺炎やカンジダ症、サイトメガロウイルス感染症などの主要な日和見感染症についてはその発症率が減少しているが、悪性リンパ腫やカポジ肉腫のような悪性疾患は本邦では減少しておらず、むしろ、数的には増加傾向にある。かつて、エイズ関連リンパ腫のほとんどは、ヘルペスウイルスの一種であるエプスタイン・バーウイルス Epstein-Barr virus (EBV) の感染が認められる、びまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫 diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) であることか

ら、エイズ関連リンパ腫は EBV の日和見腫瘍と見られていた。しかし、近年のわれわれの調査から、日本に抗レトロウイルス療法が導入された 1997 年以降は EBV 陰性の症例が増加していることが判明した (Microbes Infect 2006, 8, 1301-7)。これら EBV 陰性リンパ腫の発症機構はよく分かっていない。そうした中、われわれは HIV インテグレーションがリンパ腫発症に直接関連したと考えられる症例を見出した。この症例では HIV が STAT3 遺伝子上流にインテグレーションすることで、下流の STAT3 が恒常的に発現し、リンパ腫が発症したと考えられた。この症例から、HIV インテグレーションとリンパ腫発症の関連について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では human immunodeficiency virus (HIV) の宿主細胞へのインテグレーションとリンパ腫発症との関連を明らかにし、エイズ関連リンパ腫の新たな発症機構を提示することを目的とする。具体的には (1) エイズ関連リンパ腫症例において HIV はどの程度検出されるか、(2) その中で、HIV インテグレーションが起こる頻度、(3) HIV のインテグレーションの部位、(4) STAT3 の高発現とリンパ腫発症の関連、などを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 検体

診断用に採取され、国立感染症研究所感染病理部に冷凍保存してある症例及び東京地区のエイズ拠点病院から提供された症例、合計 20 症例のエイズ関連リンパ腫組織を用いた。組織型はすべて diffuse large B cell lymphoma であり、生検、または剖検時に採取し、凍結保存後、通法のフェノールクロロホルム法にて DNA 抽出を行った。

(2) 免疫組織化学

リンパ腫における STAT3 の発現を免疫組織化学で検討した。STAT3 および pSTAT3 に対する抗体 (Santa Cruz) を一次抗体として labeled avidin-biotin 法を用いた。また、HIV-p24 についても同様に免疫組織化学を行った。

(3) 定量的 PCR 法

EBV, ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8)、HIV を検出する定量的 PCR は ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて行った。

(4) ゲノムウォーキング

HIV のインテグレーション部位は Gene Walker Kit (BD Clontech, Palo Alto, CA) を用いて決定した。4 つの異なる制限酵素 (DraI, EcoRV, PvuII and SspI) を用いて、DNA を消化した後にリンカーをライゲーションし、リンカーと HIV LTR の配列を持ったプライマーで PCR を行った。PCR 産物を鋳型に nested PCR を行い、得られたバンドを TA クローニングし、DNA 遺伝子配列を決定した。配列は ENSEMBLE (<http://www.ensembl.org>) により、ヒト染色体上の位置を決定した。

(倫理面への配慮)

サンプルはすべて匿名化された状態で使用され、研究計画は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会による承認を受けた (承認番号 156, 157)。

4. 研究成果

(1) エイズ関連リンパ腫における HIV の検出と HIV インテグレーションの頻度

20 例のエイズ関連リンパ腫サンプルを

HIV env を標的とする PCR を行ったところ、6 例で陽性のバンドが検出された。同時にを行った EBV, HHV-8 の検出では EBV は 18 例が陽性、HHV-8 はすべて陰性であり、ウイルスごとに陽性率が異なる結果となった。6 例の HIV 陽性例につき、HIV 量を詳細に検討したところ 1 例では 1 細胞当たり 3 コピー程度のウイルス量が検出された。他の症例はすべて、1 細胞当たり、0.01 コピー以下であり、リンパ腫発症との関連は薄いものと考えられた。高コピー数の HIV が検出された症例につき、免疫組織化学により HIV-p24 の発現を検索した。本症例は肺に発症したエイズ関連リンパ腫であったが、HIV-p24 の発現はリンパ腫周辺の肺胞マクロファージに強く認められ、リンパ腫細胞には明らかな染色像は認められなかった。HIV のインテグレーション部位を決定するために、ゲノムウォーキングを行った結果、ヒト X 染色体 q28 にインテグレーションが確認された。HIV-LTR に続く配列はポリ A 配列を含んでいたが、ENSEMBLE での検索の結果では周辺に既知の遺伝子は登録されていない。未登録遺伝子の open reading frame が近傍にあり、その 3' 末端にインテグレーションしている可能性が示唆された。HIV インテグレーションは免疫組織化学の結果からマクロファージ内で起こっている可能性が高く、リンパ腫における HIV インテグレーションはきわめてまれな現象であることが示唆された。

(2) STAT3 の発現とエイズ関連リンパ腫

われわれが見出した、HIV が STAT3 上流にインテグレーションしていたリンパ腫症例では免疫組織化学で STAT3 がリンパ腫細胞の核内に高発現していることが分かっている (Microb Infect 9: 1581-1589, 2007)。これまで HIV がインテグレーションしているリンパ腫の報告はわれわれの症例を除くと 3 例あり、この 3 例は c-fes/fps proto oncogene の近傍にインテグレーションしている (Cancer Res 54: 2069-72, 1994)。c-fes/fps の下流では STAT3 が活性化する経路があることから、STAT3 の活性化がエイズ関連リンパ腫では重要な役割を果たしている可能性があると考え、STAT3 の発現をエイズ関連リンパ腫、および健常者に発症したリンパ腫 (非エイズ関連リンパ腫) のサンプルで検討した (表)。

STAT3 に HIV インテグレーションが認められた症例 1 例を含むエイズ関連リンパ腫 10 例、非エイズ関連リンパ腫 15 例につき検討したところ、7 例のエイズ関連リンパ腫では STAT3 が細胞質に発現しており、一方、非エイズ関連リンパ腫では STAT3 の発現はほとんど見られなかった (表、及び図)。これらの結果から、HIV のインテグレーションはエイズ関連リンパ腫ではきわめてまれな現象であるが、STAT3 の核内、または細胞質にお

ける貯留はエイズ関連リンパ腫の発症と何らかの関連があることが示唆された。

(表) エイズ関連および非エイズ関連リンパ腫における STAT3 の発現

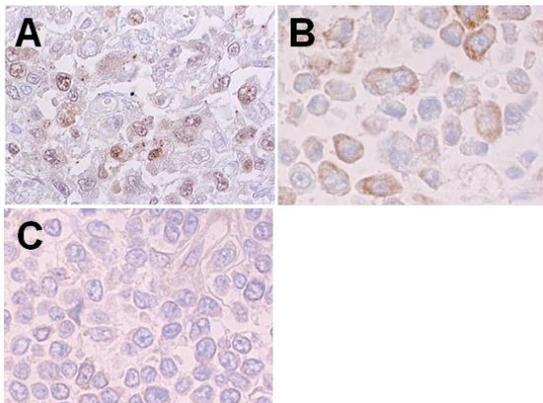
STAT3発現	エイズ関連*	非エイズ関連**
核内	1***	0
細胞質	7	1
発現なし	2	14
合計	10	15

*エイズ関連リンパ腫には8つのEBV関連リンパ腫と2つのホジキンリンパ腫を含む。

**非エイズ関連リンパ腫にはEBV関連リンパ腫12例とホジキンリンパ腫3症例を含む。

***HIVインテグレーションが認められた症例(発表論文9)

(図) STAT3の免疫組織化学



A. STAT3遺伝子へのHIVインテグレーションが証明されているリンパ腫。STAT3の発現は核内に認められる。B. STAT3の発現が細胞質に認められるリンパ腫。C. STAT3の発現が認められないリンパ腫。

以上の結果から、エイズ関連リンパ腫ではHIVインテグレーションが関連する発症機構はきわめてまれであり、HIVが直接リンパ腫形成に関連する機会はいわゆる少ないと考えられる。しかし、HIVが宿主細胞のゲノムにインテグレーションする以上は近傍遺伝子の発現に影響を与える可能性がある。本研究で明らかにされたリンパ腫におけるインテグレーション部位であるX染色体q28はこれまでに報告のあるインテグレーション部位とは異なるものの、その近傍にはやはりHIVインテグレーションが報告されている。

HIVのインテグレーションはactiveな遺伝子にアトランダムに起こるとされている(Cell 110: 521-29, 2002)が、中には未知のORFを含む遺伝子発現に影響を及ぼしているものも含まれている可能性がある。いずれにせよ、症例は少ないものの、HIVインテグレーションにより発症したリンパ腫症例はHIVによる腫瘍形成という、HIVの新たな病原性を示唆するものである。今後はHIVの検出をエイズ関連リンパ腫で継続して行い、新たな症例の発見に努めるとともに、エイズ関連リンパ腫はそのほとんどがB細胞性リンパ腫であり、HIVがどのようにしてB細胞に感染するかといった、基礎的な課題が残されている。

STAT3はもともとIL-6の下流のシグナル伝達に重要な役割を果たす分子であるが、STAT3の恒常的な活性化は細胞を形質転換させることが示されている(Cell 1999 98, 295-303)。本研究ではエイズ関連リンパ腫では非エイズ関連リンパ腫に比べ、STAT3の発現が亢進していることが示された。STAT3上流にHIVインテグレーションが証明されたリンパ腫ではHIVインテグレーションがSTAT3の発現亢進の原因と考えられるが、他のリンパ腫では今のところ不明である。リンパ腫の発症機構としてSTAT3を活性化する機構が存在する可能性があり、エイズ関連リンパ腫に限らず、リンパ腫の一般的な発症機構として、今後明らかにされることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- 1) Shintaku M, Kaneda D, Tada K, Katano H, Sata T. Human herpes virus 6 encephalomyelitis after bone marrow transplantation: Report of an autopsy case. Neuropathology. 2009:(in press).
- 2) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. Int J Cancer. 2009 124:622-9.
- 3) Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H, Tsutsui Y, Sato Y, Yamada S, Inami Y, Nakamura K, Yokoi M, Kurane I, Inoue N. Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. Virology. 2008 379:45-54.
- 4) Liem NT, Nakajima N, Phat LP, Sato Y,

- Thach HN, Hung PV, San LT, Katano H, Kumasaka T, Oka T, Kawachi S, Matsushita T, Sata T, Kudo K, Suzuki K. H5N1-Infected Cells in Lung with Diffuse Alveolar Damage in Exudative Phase from a Fatal Case in Vietnam. *Jpn J Infect Dis.* 2008 61:157-60.
- 5) Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, Yamamoto N, Morishita K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol.* 2008 82:11958-63.
- 6) Ueno T, Mitsuishi T, Kimura Y, Kato T, Hasegawa H, Katano H, Sata T, Kurane S, Kawana S. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. *Eur J Dermatol.* 2007 17:539-40.
- 7) Kuhara T, Yoshikawa T, Ihira M, Watanabe D, Tamada Y, Katano H, Asano Y, Matsumoto Y. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2007 144:79-85.
- 8) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect.* 2007 9:183-91.
- 9) Katano H, Sato Y, Hoshino S, Tachikawa N, Oka S, Morishita Y, Ishida T, Watanabe T, Rom WN, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect.* 2007 9:1581-9.
- 10) Ishak Mde O, Martins RN, Machado PR, de Souza LL, Machado LF, Azevedo VN, Katano H, Sata T, Hasegawa H, Vallinoto AC, Ishak R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. *J Med Virol.* 2007 79:1537-44.

[学会発表] (計9件)

- 1) 片野晴隆、佐多徹太郎. エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器における多種類ウイルスの定量. 第22回日本エイズ学会学術集会 2008年12月、大阪.
- 2) 片野晴隆、中村智之、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎. KSHV感染におけるKSHV全遺伝子発現プロファイルの解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山.

- 3) 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆. RTA発現レベルの異なるKSHV感染細胞におけるウイルス感染維持 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山.
- 4) 片野晴隆、加納基史、中村智之、菅野隆行、浅沼秀樹、佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイルの解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山.
- 5) 片野晴隆、菅野隆行、佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第97回日本病理学会総会 2008.4 金沢
- 6) 片野晴隆. エイズ関連悪性腫瘍の感染病理に関する研究. 第53回日本病理学会秋期特別総会 2007年12月、東京
- 7) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器におけるDNAウイルスの感染プロファイル. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月、札幌.
- 8) 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆. サイトカインによるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)遺伝子の誘導. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月、札幌.
- 9) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器におけるヒトヘルペスウイルスの定量. 第22回ヘルペスウイルス研究会 2007年6月、福岡.

[図書] (計0件)

なし。

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし。

○取得状況 (計0件)

なし。

[その他]

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

片野 晴隆 (KATANO HARUTAKA)
国立感染症研究所 感染病理部 室長
研究者番号：70321867

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

佐多徹太郎 (SATA TETSUTARO)

国立感染症研究所 感染病理部 部長
研究者番号：00162397

菅野隆行 (KANNO TAKAYUKI)
国立感染症研究所 感染病理部 主任研
究官
研究者番号：50272563

中村智之 (NAKAMURA TOMOYUKI)
国立感染症研究所 感染病理部 研究生
研究者番号：なし。