

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790345

研究課題名（和文）転写因子 AP-4 による HIV 潜伏感染維持と破綻機構の解明

研究課題名（英文）Role of transcriptional factor AP-4 in the maintenance of HIV-1 latency

研究代表者

今井 健一 (IMAI KENICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60381810

研究成果の概要：AIDS 患者は全世界で約 3300 万人存在し、年間約 210 万人もの人が亡くなっている。先進国の中で感染者数が増え続けているのは日本だけである。AIDS の治療を困難にしている大きな理由に HIV の潜伏感染があるがその分子機構はよくわかっていない。今回の研究では、潜伏感染の成立とその破綻機構の解明を試みた。その結果、HIV 潜伏感染の成立に関与しうる新たな分子の同定と、潜伏感染が歯周病原菌によって再活性化されることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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

キーワード：HIV/AIDS、潜伏感染、AP-4、HDAC、転写、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、抗 HIV 薬に耐性のウイルスが激増し、HIV の発見から約 25 年が経過した今日でも有効なワクチンは開発されていない。その結果、今なお HIV 感染者数は増え続け、全世界で約 3300 万人のエイズ患者が存在し、年間約 210 万人もの人が亡くなっている。我が国は先進国のなかで感染者が増え続けている唯一の国でもあり、早急な対策が必要とされる。AIDS の治療を困難としている大きな理由の一つに

HIV の潜伏感染がある。抗 HIV 化学療法は AIDS の発症を遅延させることができても潜伏感染 HIV には無効であるため体内からウイルスを完全に除去することはできない。そのため潜伏 HIV が再活性化することにより感染者は死に至る。また、耐性ウイルスの出現や重篤な副作用などのため、近年その治療法の限界が明確となってきた。従い AIDS を撲滅するためには、現行の薬剤療法に加えて潜伏感染細胞からのプロウイルスの発現をより効果的に抑

える新しい戦略が必要であると考えられるが、潜伏感染は不明な点が多く、その前段階として HIV 潜伏感染を分子レベルで理解することは喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

HIV の潜伏感染が転写レベルで制御されていることが明らかになりつつある。以前申請者は、HIV 潜伏感染の維持に転写因子 AP-4 が関与していることを報告した。AP-4 はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を HIV LTR にリクルートすることにより HIV の転写を抑制する。しかしながら、AP-4 などの抑制因子による HIV の転写抑制機構には不明な点が多い。また潜伏感染の破綻(再活性化)機構に至っては情報が無い。従って、AP-4 をはじめとする抑制因子によるクロマチンレベルでの詳細な HIV 転写の抑制機構と抑制解除のメカニズムの解明は、長らく不明であった HIV 慢性潜伏感染維持と破綻の分子機構を転写レベルで追求出来る可能性があると考えられる。本研究課題の遂行により、潜伏感染が転写レベルでより明らかになれば、AIDS 患者における潜伏ウイルスの再活性化、もしくは抑制を人為的にコントロールしうる可能性が期待出来る。また、AP-4 など HIV 潜伏感染に関わる因子やその結合蛋白、または結合配列などをターゲットとする新たな AIDS 発症予防薬・治療薬の開発につながる可能性も期待される。

3. 研究の方法

(1) DNA-蛋白相互作用解析を行うことにより HIV 潜伏感染に関わる新たな分子の同定を試みた。具体的には、LTR DNAカラムを作成後、Hela細胞の核抽出液と反応させDNAとタンパクの複合体を得る。溶出液をSDS PAGE後銀染色を行い、得られたバンドを切り出したのち質量分析(MALDI-TOF/TOF mass spectrometer AB4700 ABI社製使用)を行うことにより HIV LTR、AP-4に結合する新規分子を同定した。

(2) HIV転写と複製に関する実験は主に分子生物学的手法(Luciferase assay、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法、p24 ELISA法等)を用

いて解析する。

4. 研究成果

(1) 研究結果

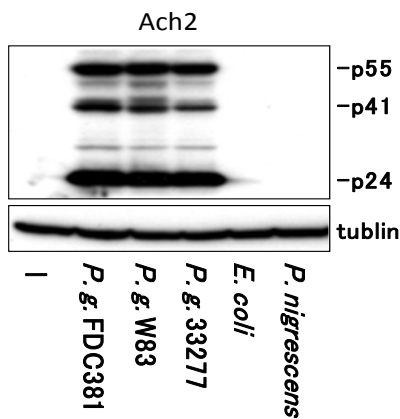
①HIV LTR に結合する AP-4 を含む複合体や新たな HIV 抑制因子と作用機構の解析

HIV 潜伏感染に関わる新たな分子の同定のために、LTR DNA カラムと Hela 細胞の核抽出液を用いた DNA-蛋白結合実験を行った。LTR 配列、AP-4 などの結合配列を変異させた変異 LTR オリゴを作成後、DNA 結合ビーズを作成、Handee Mini-Spin Column を用いて DNA 結合ビーズと核抽出液をインキュベーションし相互作用反応を試みた。その結果、LTR と AP-4 に結合しうる因子として数本のバンドが確認できた。反応・泳動条件の再検討と追試実験の後、同様の結果が得られたバンドを切り出し、質量分析計を用いて分子の同定を行った。同定された分子の中には HIV の転写に関与する可能性がある興味深い因子が含まれており、実際に HIV の複製を抑制するデータも得られた。現在、詳細な転写制御機構について研究を進めている。また、本研究を遂行する過程で、T-cell 分化等に関わる Schnurri-2 が LTR 内の NF- κ B サイトに結合し、NF- κ B の活性化を阻害することで HIV の複製を抑制していることを見出した。さらに、HIV の抑制因子である RAI が Sp1 を抑制することにより胎盤の分化に関わっていることを報告した。(Endocrinology. 148(12), 2007)

②グラム陰性菌による潜伏感染 HIV の再活性化

潜伏感染の成立機構が次第に明らかとなってきた一方で、5年から20年にわたる HIV の潜伏感染がいつ、またはどのような状況(病態)で起こるかについては、潜伏 HIV の再活性化は HIV 感染者を死にいたらしめるため多くの研究者の注目を集めるところであるが良くはわかっていなかった。申請者はグラム陰性菌が butyric acid(酪酸:HDAC 阻害作用を有する)を放出することに着目し研究を行った結果、成人の多くが罹患している

歯周病の原因菌 *Porphyromonas gingivalis* が酪酸を放出することでヒストンのアセチル化とともに脱メチル化も促進しクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に変換することにより、潜伏感染 HIV を再活性化することを見出した (Imai et al, J. Immunol, . 186(6), 2009)。HIV 潜伏感染細胞に *P. gingivalis* 菌体や LPS など様々な病原因子を添加しても HIV の活性化は誘導されなかったが、*P. gingivalis* の培養上清を添加した場合、HIV の複製が著しく活性化された。詳細な解析の結果、HIV の再活性化は、培養上清中に高濃度に存在する“酪酸”が担っていることが明らかとなった (下図参照)。



(図) *P. gingivalis* 菌の培養上清による HIV 潜伏感染細胞 (Ach2) の活性化。細菌による HIV 活性化は酪酸産生菌のみに見られた。

すなわち *P. gingivalis* が産生した酪酸は、HIV 潜伏感染細胞に作用し、AP-4 などによって LTR にリクルートされた HDAC を直接阻害することによりヒストンの脱アセチル化を解除する。その結果、クロマチン構造が弛緩し LTR 領域に NF- κ B 等の活性化因子や HAT (ヒストンアセチル化酵素) が作用できるようになり HIV 遺伝子の増幅が誘導されたと考えられる。

(2) 国内外における位置づけとインパクト

申請者らの研究成果を含む HDAC を介する潜伏感染維持に関する研究がもととなり、潜伏感染細胞を標的として、HDAC 阻害剤を使用した新たな AIDS 治療法の可能性が提示され

た (Lehrmam et al., Lancet, 366: p549, 2005)。休止期 T 細胞に感染している HIV を再活性化することを preclinical/clinical に試みた結果、潜伏感染細胞が有意に減少したとして、潜伏感染細胞を標的とした治療の可能性を示した。本研究課題で行った、AP-4 を含む HIV 転写の阻害メカニズムの解明は新規の抗 AIDS 療法に重要な情報を提示しうるものと考えられる。またグラム陰性菌による潜伏感染破綻機構に関する研究は、歯周病原菌が大量の酪酸を放出すること、その酪酸が HDAC 阻害効果を有することに着目し発想されたきわめて創造性に富んだ仕事であり、世界の多くの国々の報道機関やインターネットサイトで紹介された

(AFP 通信, yahoo, ABC, FOX, Forbes, 中国日報など)。この研究がきっかけとなり、細菌感染症と HIV/AIDS との関連性に関する研究が始まろうとしている。酪酸産生菌は口腔以外にも腸管と膣といった HIV 感染症においてきわめて重要な部位にも常在している。HIV 感染の初期段階におけるウイルスの爆発的な増殖には、腸管粘膜内の T 細胞に感染した HIV が腸内細菌によって活性化されることが重要であることも報告されている。(Brenchley et al, *Nature Med.*, 12: p1365, 2005)。申請者らの研究成果と考え合わせると酪酸産生菌が AIDS の進展に影響を及ぼしていることが推察される。このことは、ある種の細菌感染症を予防することで、エイズの発症と進展を阻止できうるという可能性を示唆しており、本課題の遂行は新たな予防・治療対策とエイズ啓蒙のための重要な手がかりを提示できる可能性も含んでいると考えられる。

HIV の潜伏感染は AIDS 撲滅のために解明しなくてはならない難題であるが、本研究のさらなる進展はそのブレイクスルーとなる可能性を秘めており基礎的興味のみならず、臨床現場や啓蒙活動に至るまでもたらすインパクトは大きいものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Imai, K., Ochiai, K. and T. Okamoto.

Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. *J. Immunol.* Vol. 182 (6): p.3688-3695, 2009. 査読有

- ② Asamitsu K, Yamaguchi T, Nakata K, Hibi Y, Victoriano AF, Imai K, Onozaki K, Kitade Y, Okamoto T. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Blocking IκB Kinase with Noraristeromycin. *J Biochem.* Vol. 144 (5): p.581-589, 2008. 査読有
- ③ Minekawa, R, M. Sakata, Y. Okamoto, M. Hayashi, A. Isobe, T. Takeda, T. Yamamoto, M. Koyama, M. Ohmichi, K. Tasaka, K. Imai, Okamoto. T, and Y. Murata. Involvement of RelA-associated inhibitor (RAI) in regulation of trophoblast differentiation via interaction with transcriptional factor Sp1. *Endocrinology.* Vol. 148 (12): p.5803-5810, 2007. 査読有
- ④ 今井健一, 岡本 尚 : HIV 転写調節機構とその治療制御の可能性. 蛋白質・核酸・酵素, Vol.52(10) p.1121-1127, 2007. 査読無

[学会発表] (計 14 件)

- ① T. Okamoto and K. Imai. Microbe interactions leading to AIDS development: Interaction between HIV and *Porphyromonas gingivalis*, a causative agent of periodontitis. 4TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM, 2009 年 3 月 23-24 日, Horsaalzentrums, St. Josef Hospital, Bochum, Germany
- ② Imai, K., Togami, H. and T. Okamoto. Involvement of histone 3 lysine 9 (H3K9) dimethyl transferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. 4TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM, 2009 年 3 月 23-24 日, Horsaalzentrums, St. Josef Hospital, Bochum, Germany

- ③ 今井健一、落合邦康、岡本尚 : 歯周病による AIDS 進展の可能性 (1) —*P. gingivalis* によるヒストン修飾を介する潜伏 HIV の賦活化—. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12 日-14 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市) .
- ④ 落合邦康、今井健一、岡本尚 : 歯周病による AIDS 進展の可能性 (2) —各種歯周病原菌の潜伏感染 HIV 活性化に及ぼす影響—. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12 日-14 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市) .
- ⑤ 今井健一、岡本尚 : クロマチンリモデリングを介するグラム陰性嫌気性菌感染症による潜伏 HIV の賦活化. 第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸ポートアイランド (神戸市) .
- ⑥ 今井健一、岡本尚 : クロマチンリモデリングを介するグラム陰性嫌気性菌感染症による潜伏 HIV の賦活化. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008 年 11 月 26-28 日, 大阪国際交流センター (大阪市) .
- ⑦ 今井健一、岡本尚 : グラム陰性嫌気性菌感染症による HIV の転写レベルでの賦活化. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2008 年 10 月 26 日-28 日, 岡山コンベンションセンター (岡山市) .
- ⑧ 今井健一、落合邦康、岡本尚 : 歯周病とエイズの密接な関係 —*P. gingivalis* の産生する酪酸がクロマチン修飾を介して HIV-1 転写を活性化する. 第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2008 年 10 月 18-19 日, 四日市市文化会館 (四日市市) .
- ⑨ 落合邦康、今井健一、岡本尚 : 歯周病原菌の潜伏感染 HIV-1 賦活化におよぼす影響. 第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2008 年 10 月 18-19 日, 四日市市文化会館 (四日市市) .
- ⑩ 落合邦康、今井健一、岡本尚 : 歯周病による潜伏感染 HIV-1 賦活化の可能性. 第

9 1 回日本細菌学会関東支部総会, 2008 年 10 月 23-24 日, 生命の森リゾート (千葉) .

- ⑪ 今井健一、落合邦康、岡本尚：歯周病による HIV の転写レベルでの賦活化 —*P. gingivalis* の産生する酪酸がクロマチン修飾を介して HIV-1 転写を活性化する—。第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008 年 9 月 23-25 日, TOC 有明コンベンションホール (東京) .
- ⑫ 落合邦康、今井健一、岡本尚：潜伏感染 HIV-1 に対する種々の歯周病原細菌の賦活化作用。第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008 年 9 月 23-25 日, TOC 有明コンベンションホール (東京) .
- ⑬ T. Okamoto, K. Imai, K. Ochiai. Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. The 21st. Meeting Japan-USA Cooperative Medical Program /AIDS Panel. 2008 年 9 月 11-12 日 Awaji and Tokyo (兵庫県立淡路夢舞台国際会議場・国立感染症研究所), Japan
- ⑭ 今井健一、朝光かおり、岡本尚：Positive involvement of Cyclin T1 in the protein stability of Tat. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2007 年 11 月 28-30, 広島国際会議場 (広島市) .

[その他]

歯周病原菌による HIV 活性化の研究成果が毎日新聞、AFP 通信 (2009 年 2 月 11 日) にて報道された後、yahoo, ABC, FOX, Forbes, 中国日報などのネットニュースにも取り上げられた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 健一 (IMAI KENICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60381810

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岡本 尚 (OKAMOTO TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40146600