

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790437

研究課題名（和文）エピジェネティック制御による HIV 潜伏感染維持と破綻機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms HIV viral latency and its reactivation involving epigenetic regulation

研究代表者

今井 健一（IMAI KENICHI）

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60381810

研究成果の概要（和文）：世界中で HIV に対するあらゆる対策がなされる中、HIV 感染症は単一の微生物感染症としては未だに最も多くの死亡者を出している。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する新たな分子の同定と、潜伏感染が細菌感染症によって再活性化される可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the molecular mechanisms involved in the maintenance and breakdown of HIV latency is required for a comprehensive understanding of the pathophysiology of HIV-1 infection and the development of novel therapies. We have examined that epigenetic regulation is involved in the establishment and maintenance of HIV-1 latency and in the reactivation of HIV-1 by butyric acid-producing bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、酪酸、G9a、HDAC、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

HIV の発見から 28 年が経過した現在でも AIDS に対する根治薬や有効なワクチンは開発されていない。その結果、単一の微生物感染症としては、マラリア、結核を上回りいまだに最も多くの死亡者をだしている。わが国は先進国のなかで HIV 感染者が増え続けている

数少ない国のひとつで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に HIV の潜伏感染がある。抗 HIV 化学療法は潜伏感染 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。そのため感染者は、潜伏 HIV が再活性化されることにより感染症憎悪をおこして死に

至る。さらに、耐性ウイルスの出現や重篤な副作用などのため、近年その治療法自体の限界が明確となってきた。AIDS を撲滅するためには、現行の抗 HIV 薬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効果的に抑える新しい治療戦略が必要であると考えられる。しかし、HIV 潜伏感染の分子機構には不明な点が多く、潜伏感染をより理解する事が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

HIV の潜伏感染はエイズ克服において大きな壁となっている。従って、本研究課題では HIV 潜伏感染において未だ明らかとなっていない部分、「ヒストンメチル化酵素の潜伏感染維持への関与」と「細菌感染症による潜伏 HIV 再活性化機構」に焦点をあて、新たな AIDS 治療法開発と予防対策のための基礎的データを蓄積し臨床研究へ発展させることを目的とする。具体的には以下の点に絞って研究を行う。

(1) ヒストンメチル化酵素 G9a の役割： HIV の潜伏感染成立におけるヒストンメチル化の作用はよくわかっていない。G9 はヒストン 3 をジメチル化するとともに、DNA メチル化にも関与しているので、HIV 潜伏感染におけるメチル化の関与がヒストンと LTR の両レベルで明らかとなる。

(2) 酪酸産生菌によるヒストン修飾を介する潜伏 HIV 再活性化機構：腸管と膣は HIV の感染と伝播において主要な部位であるので、同部位における HIV 活性化機構やウイルスと細菌の相互作用の解明など、本課題の遂行により AIDS 発症と進展の新たな基礎的情報が得られる。

## 3. 研究の方法

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) を用いて解析した。また種々の酪酸産生菌を培養後、その上清を回収したものを実験に使用した。酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸の濃度は、ガスクロマトグラフィーにより定量した。

## 4. 研究成果

### (1) HIV 潜伏感染におけるヒストンメチル化酵素 G9a の役割

これまでに、HIV の潜伏感染にかんして抑制因子と HDAC による潜伏感染維持と酪酸産生菌によるその破綻機構を分子レベルで明らかにしてきた。しかしながら、長期間にわたる安定な遺伝子発現の抑制には histone H3 Lysine 9 (H3K9) のメチル化が重要であることが知られているものの HIV の潜伏感染におけるヒストンのメチル化の実態はよくわかっていない。従って HIV 潜伏感染における H3K9 のメチル化、特にその責任酵素である H3K9 ジメチル化酵素 G9a の役割を解析した結果、G9a が HIV の潜伏感染維持に深く関与していることが明らかとなった (Imai et al., J Biol. Chem. 2010)。

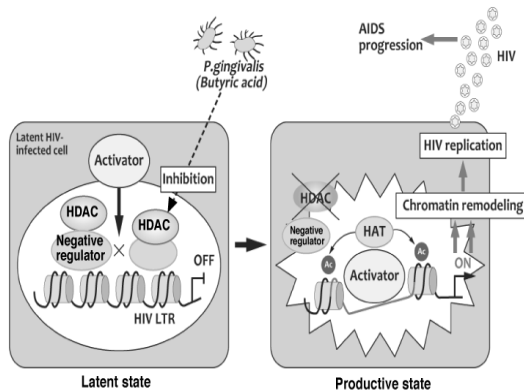
T 細胞に G9a を強発現させると、HIV LTR からの基礎転写および TNF- $\alpha$  や Tat による転写誘導が著しく抑制された。G9a の欠失変異体を用いた実験より、G9a による抑制には H3 のメチル化を担う SET ドメインが必須であることがわかった。また、G9a siRNA の導入によって HIV 転写とウイルスの産生が誘導された。従って、G9a は H3 のメチル化を介して HIV の発現を負に制御していることが示唆された。また、G9a の特異的阻害剤である BIX01294 は、HIV 潜伏感染細胞の H3K9 ジメチル化を特異的に抑制することにより潜伏 HIV の複製を促進した。BIX01294 の潜伏 HIV 活性化に対する作用と HDAC 阻害剤である SAHA や DNA メチル化酵素阻害剤である 5-aza-dC との作用は相乗的に認められた。以上の結果から、HIV の潜伏感染維持にはヒストンの脱アセチル化のみならず、G9a による H3K9 のメチル化も重要であり、両者は相乗的に作用していることが示唆された。

### (2) 酪酸産生菌によるヒストン修飾を介する潜伏 HIV 再活性化機構

酪酸は腸内細菌の主な代謝産物の一つであることから、本研究では再活性化における腸内細菌の影響、併せて膣内細菌についても検討した。その結果、腸内細菌では *Clostridium* 属、*Eubacterium* 属、*Fusobacterium* 属菌株において顕著な HIV 複

製と転写活性化が認められた。臍内細菌の *Anaerococcus tetradius* や *Anaerococcus vaginalis*, *Peptoniphilus asaccharolyticus* なども再活性化を誘導した。活性化の認められた細菌の培養上清からは高濃度の酪酸が検出され、その量は HIV 複製能と相関していた。詳細な活性化機構を検討した結果、酪酸産生菌は HIV LTR のヒストンアセチル化を促進することでクロマチン構造を「不活性化型」から「活性化型」に変換し、HIV の転写と複製を促進することがわかった (Imai et al., Cell. Mol. Life Sci. 2012 in press)。

下図：酪酸産生菌によるヒストン修飾を介する潜伏 HIV 再活性化の模式図



本研究から、腸管や臍など HIV 感染症において重要な器官内の常在菌が潜伏感染 HIV を再活性化することが明らかとなった。酪酸が直接 HIV ゲノムに作用している点は、「微生物間相互作用」の観点から興味深い。HIV 感染の初期段階において、腸管粘膜下でのウイルスの爆発的な増殖に腸内細菌が関与することが報告されている。細菌感染症が日和見感染の誘因であると同時に AIDS の進展にも深く関わっていることが推察され、AIDS の進展阻止において細菌感染症の予防と治療が重要であることが強く示唆された。

##### 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4件)

- ① Imai K, Yamada K, Tamura M, Ochiai K, Okamoto T (2012) Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. Cell. Mol. Life Sci. 査読あり, 2012 in press.
- ② Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T (2011) Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. J Mol Biol., 査読あり, Vol. 410(5), 887-895.
- ③ Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T (2011) Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. FEBS. L., Vol. 査読あり, 685 (7), 1103-1111.
- ④ Imai K, Togami H, Okamoto T (2010) Involvement of histone H3 Lysine 9 (H3K9) methyl transferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. J Biol Chem., 査読あり, Vol. 285 (22), 16538-16545.

[学会発表] (計8件)

- ① 今井健一、HIV 感染症における微生物間相互作用 -酪酸産生常在菌による潜伏感染 HIV-1 の再活性化-、第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 29 日、長崎ブリックホール、長崎
- ② 今井健一、歯周病原細菌による潜伏感染 EBV の再活性化と病態への関与第 45 回日本無菌生物 ノートバイオロジー学会総会、第 45 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2012 年 1 月 13 日、グランデール岐山、岐阜
- ③ 今井健一、Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria、The joint

meeting the 17th international symposium on gnotobiology and the 34th congress of the society for microbial Ecology and disease、2011年11月22日、Yokohama, Japan

- ④ 今井健一、ウイルス感染症における口腔細菌学の影響 -歯周病原菌による潜伏感染 EBV の再活性化機構-、第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2011年9月30日、長良川国際会議場、岐阜
- ⑤ 今井健一、Reactivation of latent HIV-1 infection by butyric acid-producing bacteria involves histone modification、International Union of Microbiological Societies 2011 & Congress concurrently held with the 15th International Congress of Virology held at Sapporo、2012年9月14日、Hokkaido, Japan

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページアドレス：

<http://www.dent.nihon-u.ac.jp/bact/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 健一 (IMAI KENICHI)  
日本大学・歯学部・准教授  
研究者番号：60381810

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし