

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24501308

研究課題名(和文) HIV-1 感染によるゲノム不安定性

研究課題名(英文) Genomic instability by HIV-1 infection

研究代表者

志村 まり (Shimura, Mari)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・難治性疾患研究部・室長

研究者番号：90226267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗エイズ療法の普及によりHIV-1感染者の予後は改善されたが、発癌率は非感染者より高いことが、近年明らかになっている。特に、悪性リンパ腫は感染者の約20%と高率に報告されていることから、発症前に感染によるゲノム不安定性(異常)が存在する可能性を考えた。本研究では、感染に関わる細胞株や未発癌の感染者のリンパ球B細胞に染色体異常を認めた。これらから、HIV感染での発癌リスクの潜在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The incidence of tumors in HIV-infected individuals are still high compared to non-infected population, although longevity of HIV-infected individuals had been prolonged due to the development of anti-HIV drug and therapy. Especially, B-cell lymphoma was reported as 20% of HIV-infected individuals, which is very high incidence. Therefore, we hypothesized that genomic instability might be potentially existed in HIV-infected individuals before the tumorigenesis. In this study, we found genomic instability both in experiments using cell lines and in prematured B-cell lymphocytes using clinical samples from HIV-1 patients without malignancies, suggesting potential risks of malignancy.

研究分野：細胞生物学、細胞イメージング

キーワード：HIV-1 ゲノム不安定性 染色体異常 HIV関連リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染者の免疫不全は、抗エイズ療法の普及により改善された。一方、感染者の発癌率は数十倍から千倍程度高く、感染者の予後を左右している。悪性リンパ腫では、感染者の約 20%に報告されている。感染者の悪性腫瘍は多様で進行が早いことが特徴である（文献 1-2）。私たちも、HIV 感染に伴う悪性腫瘍は、非感染の悪性腫瘍と同じ病理診断であっても異なる疾患であることを、分子生物学的手法により明らかにし、報告している（文献 3）。しかしながら、感染者の高頻度発がんの理由は、未だ明らかになっていない。これまで、感染者の発癌機序には、免疫不全に伴う癌ウイルス感染が関連していると云われてきたが、必ずしも癌ウイルス陽性とは限らない。感染者数が減少しない現状からも、早急な説明が望まれている。

2. 研究の目的

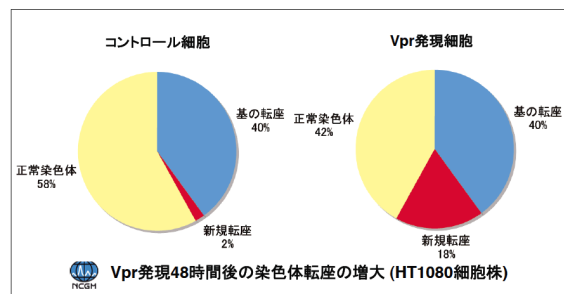
本研究では、HIV 感染には、発癌前にゲノム異常（不安定性）が潜在すると考え、詳細研究を行うこととした。

3. 研究の方法

染色体転座解析は、multi-FISH 法を既存のプロトコールに従って準備し、100 個程度の細胞について観察した。Multi-FISH 法は、染色体毎に色分けできるシステムで、異なる色からなる染色体は、異なる染色体が融合（転座）したことを視覚的に示すことができる。遺伝子欠損および増幅解析は、ゲノム DNA を抽出精製後、外部機関でのゲノム解析を依頼した。姉妹染色分体の早期分離異常（PCS）は、染色体スプレッド作成後ギムザ染色を行い、100-200 個の細胞について顕微鏡観察を行った。臨床検体については、機関内倫理委員会の審査承認（NCGM-G-001615-01; NCGM-G-001708-00; NCGM-A-000218-01）を経て行った。

4. 研究成果

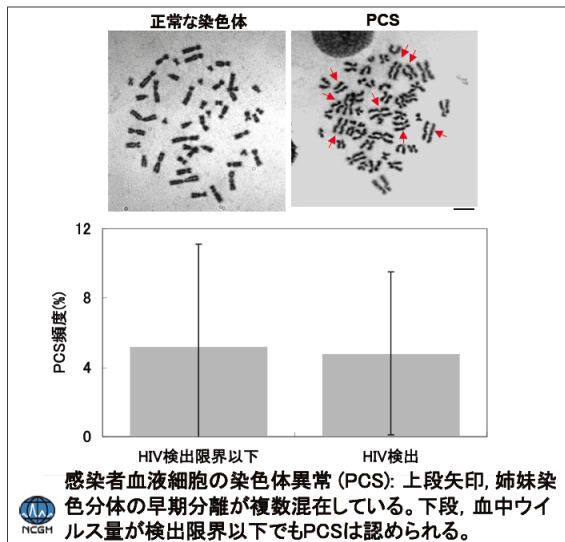
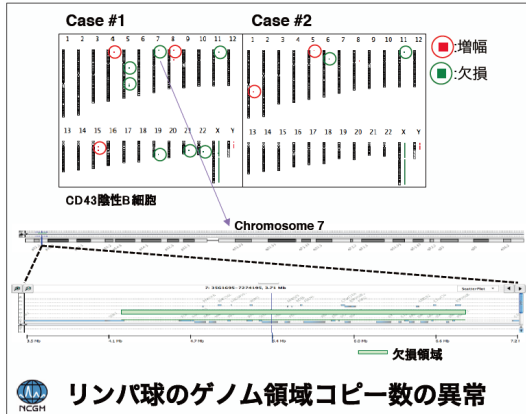
(1) 培養細胞株での染色体異常：Vpr は HIV 特有の蛋白質であり、これまでに私たちは、Vpr 発現細胞や HIV 感染において、姉妹染色分体の早期分離異常（PCS）を報告している（文献 4, 5）。PCS は、細胞分裂時には染色体の不均衡分配を経て、染色体数の異常を誘導する。PCS は、ゲノム不安定性の指標として知られ、多くのがん細胞で PCS は認められている。今回、Vpr 発現 48 時間で約 20%の細胞に染色体転座を再現よく認めた（下図）。使用した細



胞株はがん細胞由来株であることから、基から存在する染色体転座はコントロール細胞にも認められるが、Vpr 発現 48 時間後には、新規転座は明らかに増大していた。染色体転座は、一般にがん細胞に高頻度認められる現象であり、細胞機能を損ね、または、細胞増殖が増大することもあり、癌の悪性化にも関連する。興味深いことに、DNA 転写活性阻害剤でこの染色体転座は減少、PCS を伴う細胞では増大傾向を得ている。先行研究で、Vpr による DNA 転写因子の異常な染色体局在が PCS の原因であることを明らかにしたが（文献 5）、染色体転座においても同様に DNA 転写活性との関連性が示唆された。現在、Vpr による染色体転座機序について、解析を進めている。

2) 臨床検体を用いた染色体異常：上述の染色体転座解析を、HIV 感染者のリンパ球検体でも行った。数年間本解析を継続したが、末梢血 T 細胞、B 細胞共に染色体転座は認めなかった。培養細胞実験とは異なり、染色体転座を有する細胞の増殖や生存にも関わるため、その頻度は培養細胞実験より相当に低いことが予想される。さらに、臨床検体からの

解析細胞数が 100 個程度に限定されたことから、本法は検出できない可能性は高い。そこで、同検体について PCS や検出感度が期待されるゲノム増幅や欠損を詳細に調べてみた。HIV 感染者末梢血中リンパ球細胞では、28 例中 7 例でゲノム増幅や欠損の異常、15 例中 7 例で PCS を示した（下図）。



抗エイズ療法により良好にウイルス量がコントロールされている症例でも、PCS やゲノム増幅や欠損が起きていることは、注目すべき点である。以上より、抗エイズ治療下でも、染色体不安定性を示す症例が潜在することが示唆された。

3) 並行して行ったゲノムワイドなエピゲノム解析(他の研究費)では、リンパ腫発症の数年前より、エピゲノム変動(ゲノム修飾による機能制御の変動)が存在することを、全例(3/3)に見いだした。現在、論文準備中である。

HIV 感染者の染色体転座、PCS、ゲノム欠損増幅、そして、エピゲノム変動などゲノム不安定性が強く示唆された。抗エイズ療法により、血液中のウイルス量は制御されていても、抗エイズ薬が到達できない脳やリンパ節、骨髄などには、ウイルスが多く存在し、ウイルスの温床となっている可能性が、今日指摘されている。今回の結果から、温床に存在するウイルス自体が染色体異常を誘導する説、ウイルスが産生するなんらかの分子が、間接的に染色体異常を誘導する説が考えられた。ゲノム不安定性は発癌と同義ではないが、リスク因子である。分子機序解明、新薬の開発、そして、特にリンパ腫の早期診断のためのバイオマーカー探索への発展研究が望まれる。

- 1) 引用文献：1. Lewden et al. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiviral therapy: emergin role of hepatitis and cancers, persistent role of IDS. *Internat. J. Epideiol* 34; 121, 2005. 2. Guech-Ongey et al. AIDS-related Burkitt lymphoma in the united states: what do age and CD4 lymphocyte patterns tell us anbout etiology and/or biology. *Blood* 116: 5600, 2010. 3. Matsunaga et al. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS*, 28. 503-510, 2014. 4. Shimura M, et al, Premature sister chromatid separation in HIV-1infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS*. 19,1434-1423, 2005. 5. Shimura M, et al, Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation, *JCB*, 194 : 721-735, 2011.

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 11 件)

- 1) Sasaki A, Ide S, Kawamoto Y, Bando T, Murata Y, Shimura M, Yamada K, Hirata A, Nokihara K, Hirata T, Sugiyama H, Maeshima K. Telomere Visualization in Tissue Sections using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes. *Scientific Report*, (査読有), 6, 2016, 29261. doi: 10.1038/srep29261.
- 2) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamasaki M, Yoshida L, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, Ishizaka Y, Shimura M* and Hagiwara S,

DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS*, (査読有), 28, 2014, 503-510. doi: 10.1097/QAD.0000000000000120.

- 3) Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Doi A, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Kawamura YI, Otsubo T, Dohi T, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1. *Retrovirology* (査読有), 10, 2013, 83. doi: 10.1186/1742-4690-10-83.
 - 4) Takata H, Hanafusa T, Mori T, Shimura M, Iida Y, Ishikawa K, Yoshikawa K, Yoshikawa Y, Maeshima K, Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLoS ONE*, (査読有), 8, 2013, e75622. doi:10.1371/journal.pone.0075622. eCollection 2013.
 - 5) Hagiwara S, Matsunaga A, Shimura M & Ishizaka Y, DNA methylation profiling in HIV-associated lymphomas, 臨床血液 (0485-1439), (査読有), 53, 1364, 2012. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/rinketsu/53/9/_contents/-char/ja/
- [学会発表] (計 37 件)
- 1) Mari Shimura, et al, HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation, *JSCB* 64th, 神戸, 5月, 2012.
 - 2) 志村まり, 豊田雄介, 木ノ本正信ら, Vpr は染色分体の束ねを緩める, 第14回白馬シンポジウム, 京都, 6月, 2012.
 - 3) 志村まり, HIV-1感染で観られる姉妹染色分体の早期分離, 教育講演, 日本第53回日本臨床細胞生物学会, 幕張, 6月, 2012.
 - 4) Mari Shimura, HIV-1 pathogen loosens chromatid ties. *Mardis de l' IAB*, Inst. Albert Bonniot INSERM/U823, Grenoble, France, 9月, 2012.
 - 5) 松永章弘, 比島恒和, 田中紀子ら, HIV感染者に観られる非ホジキンリンパ腫の特異的DNAメチル化パターン, 第35回日本分子生物学会, 福岡, 12月, 2012.
 - 6) 志村まり, Vprは姉妹染色分体の束ねを緩める, 日本第85回日本生化学会シンポジウム, 福岡, 12月, 2012.
 - 7) 志村まり, 特別講義, 名古屋大学, 名古屋, 8月, 2013.
 - 8) 豊岡理人, 松永章弘, 山崎茉莉亜, 志村まり, 田中紀子, メチル化アレイ測定データ

の分布に基づくサンプル品質管理及び人種差を考慮したプローブフィルタリングの妥当性の検討, 日本人類遺伝学会第58回大会, 宮城, 11月, 2013.

- 9) 松永章弘, 比島恒和, 田中紀子, 山崎茉莉亜, 吉田壘, 望月眞, 田沼順子, 岡慎一, 石坂幸人, 志村まり, 萩原将太郎, エピジェネティクス解析によるエイズ関連悪性リンパ腫の病態理解, 第36回日本分子生物学会, 神戸, 12月, 2013.
- 10) 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, 2013年, 奈良.
- 11) 志村まり, HIV-1感染とゲノム不安定性/がん, 教育講演, 明海大学研修会, 埼玉, 10月23日, 2014
- 12) 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.
- 13) 松永章弘ら, 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, 奈良, 2013.
- 14) 松永章弘, 志村まり, 柳川泰昭, 岡慎一, 石坂幸人, 萩原将太郎, HIV関連リンパ腫のエピジェネティクス解析, 第17回白馬シンポジウム鳥取大学, 6月, 2015.
- 15) 松永章弘, 志村まり, 石坂幸人, DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas, 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場10月, 2015.
- 16) 松永章弘, 吉田壘, 豊岡理人, 村田行則, 石坂幸人, 田中紀子, 萩原将太郎, 志村まり, B細胞性非ホジキンリンパ腫のDNAメチル化分布変化に基づいた予後予測の可能性, 第38回分子生物学会, 神戸ポートアイランド, 12月, 2015.
- 17) 松永章弘, 岡雅子, 石坂幸人, 志村まり, A subgroup of HIV-patients shows a DNA methylation profile similar to HIV-associated lymphoma, 第75回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 10月, 2016.

18) 松永章弘、岡雅子、柳川泰昭、梶野富輝、今留健一、瀧永博之、岡慎一、萩原槨太郎、石坂幸人、志村まり、HIV感染者末梢血DNAのメチル化変動を指標としたHIV悪性リンパ腫早期診断の可能性 第18回白馬シンポジウム小淵沢、10月、2016.

19) 松永章弘、吉田壘、豊岡理人、村田行則、石坂幸人、田中紀子、萩原槨太郎、志村まり、DNAメチル化分布変化によるB細胞性リンパ腫の予後予測、第39回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、11月、2016

〔図書〕(計5件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/individual/lab05/en/project/saibou.html>

<http://www.rincgm.jp/individual/lab05/en/project/hivkansen.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志村まり (Shimura, Mari)

国立国際医療研究センター・研究所・難治性疾患研究部・難治性疾患研究室・室長

研究者番号：90226267

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

松永章弘 (Matsunaga, Akihiro)

国立国際医療研究センター・研究所・難治性疾患研究部・難治性疾患研究室・上級研究員

研究者番号：60623816