

課題番号 : 25指111

研究課題名 : HIV-1 感染によるクロマチンゲノムメンテナンスとゲノム不安定性

主任研究者名 : 志村 まり

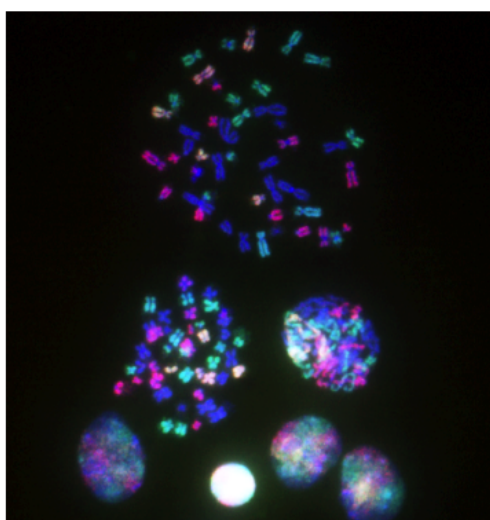
分担研究者名 : 該当 なし

キーワード : HIV 感染、ゲノム不安定性、再構成ヌクレオソーム、ウイルス蛋白質 Vpr、染色体異常

研究成果: 抗エイズ薬の普及により、HIV 感染者の死亡例は激減した。一方、悪性腫瘍の増大が注目されるようになってきている。感染者予後に大きな影響を与える悪性腫瘍の原因解明が期待されるが、現時点では不明な点が多い。HIV 関連リンパ腫は非感染リンパ腫と比べて、遺伝子制御が異なる可能性を、昨年、論文及び新聞発表した(Matsunaga et al, *AIDS*, 2014)。特に感染者 DNA のプロモーター領域の hypomethylation 傾向が特徴的である。DNA の hypomethylation はゲノム不安定性との関連が示唆されていることから、感染者のクロマチンゲノムメンテナンスは通常と異なる可能性が考えられた。本研究では、染色体異常を誘導する HIV-1 蛋白質 Vpr の分子機序について、クロマチン動態へ焦点を絞り解明している。申請者は、Vpr は細胞核の不溶画分、染色体上に強い結合で存在すること、Vpr は DNA と結合することを明らかにしている(Shimura et al, *JCB*, 2011; Tachiwana et al, *Can Res*, 2006)。これらの仮説を基に、Vpr のクロマチン(核)局在様式、さらに、HIV 感染によるゲノム不安定性が許容されるクロマチン動態を明らかにしたい。

【結果】本研究では、以下の点が再現明らかとなった。

- 1) 再構成ヌクレオソーム(試験管内で作製した精製ヌクレオソーム)を確立できた。
- 2) 再構成ヌクレオソーム(試験管内で作製した精製ヌクレオソーム)とリコンビナント HStag-Vpr での結合実験を試みた。再構成ヌクレオソームは monomer, 12mer、さらに H3H4 からなる subnucleosome (細胞内ヌクレオソーム構成時に存在するフォーム)について、それぞれ Vpr との結合実験を行った。いずれにおいても、Vpr は再構成ヌクレオソームと結合を示唆した。HStag に対する抗 M2 抗体によりスーパーシフトが確認されたため、Vpr と再構成ヌクレオソームは直接結合すると考える。
- 3) HH4-GFP の安定発現細胞株では、Vpr 発現下において H4 の異常な細胞質局在を認めた。
- 4) ゲノム不安定性: Vpr による染色体転座は、Vpr 発現安定株、および一過性強制発現細胞においても、再現よく得られた。
- 5) ゲノム不安定性について臨床検体での検討(下図): 抗エイズ治療下において HIV 感染者末梢血細胞において、染色体異常(PCS)を高頻度に検出した。



mFISH in PBL from HIV-1 Patient
Ethics Committee approval (NCGM-G-001615-01)

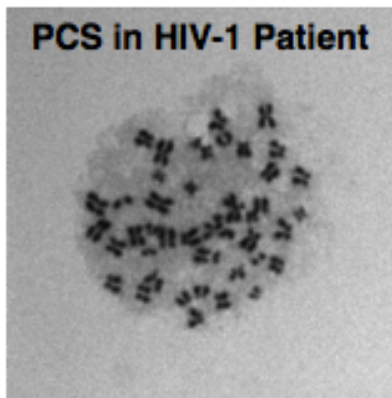
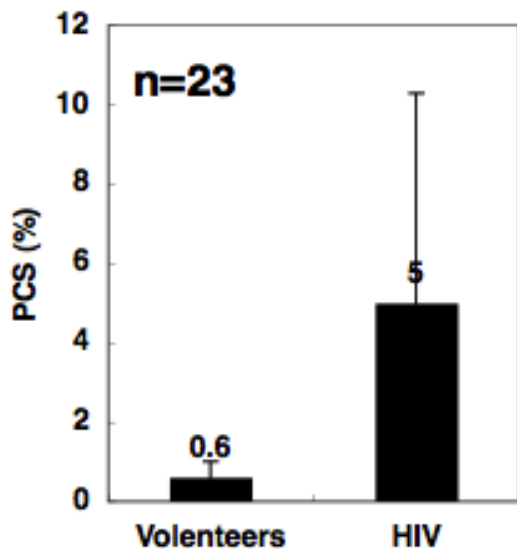
- 6) ゲノム不安定性について臨床検体での検討: HIV 感染者末梢血細胞(非感染 premature B 細胞)においても、DNA メチル化変動が健常者より多く認められた。

【考察】

- 1) 再構成ヌクレオソームを用いた試験管内実験より、Vpr は直接的にクロマチンに結合し作用することが示唆された。また、既に Vpr が DNA と直接結合、DNA 障害することから(Tachiwana et al, *Can Res*, 2006)、Vpr がヌクレオソームを構成している DNA を足場としている可能性は否定しない。HH4-GFP の安定発現細胞株の異常な細胞質への集積は、Vpr 発現によりなんらかの H4 の局在異常が生じ、ヌクレオソーム複合体の局所の構造への影響が推測され

る。

2) 本研究では新たに、クロマチンへの影響として、Vpr による染色体転座が示唆された。Vpr が試験管実験のように、ヌクレオソームに結合することと染色体転座との関連を明らかにする必要がある。これまでのところ、Vpr による染色体転座の hot spot は認められず、ランダムに染色体転座が起きていると考えている。ランダムであれば、1 番染色体が最も大きいことから、1 番染色体に染色体転座が多いはずであるが、染色体長で換算すると 21 番の転座が多い。また、頻度が高い HIV 関連リンパ腫で認められる c-myc-IgH 間の転座は 300 個の染色体 spread を検討したが、認められなかった。しかし、これらは、Vpr 発現細胞として使用している HT1080 細胞のがん細胞としての背景は否定できない。興味深いことに、僅か 48 時間内で染色体転座は、調べた染色体の約 10-20% に至ることである。Vpr 発現細胞は 48 時間内に 50% が G2/M に集積するため、1 回の細胞分裂、或は、分裂しない細胞集団が考えられる。転座後に複製 (S 期) があるもの (同じ転座が 2 対ある) は僅かであることから、概ねの染色体転座は G2/M で起きている可能性が高い。染色体転座のメカニズムは、一般に不明な点が多い。染色体転座は染色体単位での断裂、融合が伴うため、ダイナミックな両極分離を伴う分裂後期 (anaphase) は候補の一つである。染色体分離時に誘導される姉妹染色分体の絡み合いから起きる Chromatin bridge は転座を誘導する。Vpr 発現細胞でも否定はできない。Vpr 発現細胞で頻繁に認められる小核は、分裂時に切れた DNA の固まりであること (Shimura M et al, *FASEB J*, 1999)、本研究では Chromosome minutes (小さな染色体の断片) も染色体転座と共に mFISH により認められたことから、DNA が切れやすい染色体構造が推測されるために、Sister chromatid exchange や Holiday junction などの DNA 修復がおきやすい。これらはいわゆる姉妹染色分体の絡みである。さらに、染色体転座は姉妹染色分体の早期異常 (PCS) が伴っていることが多いことが明らかになっている。Vpr 発現に依る PCS の機序は、上述のヒストンアセチル化によるヘテロクロマチン HP1 の喪失に依る (Yamagishi et al, *Nature* 2009; Shimura et al, *JCB*, 2011)。PCS を伴っている細胞は、染色体の



不均等分配や aneuploidy が知られている。姉妹染色分体が早期に解離してしまうため、1 本の染色体の動原体に対して 2 本の分裂期紡錘体が両極より結合する確率が高くなる。Vpr 発現細胞でも良く観察される、分裂期に染色体が往來を繰り返す現象 (Lagging chromosome) が起きる。その結果、奇数個の染色体数の aneuploidy 細胞の出現を多く認める (Shimura M et al, *FASEB J*, 1999)。Vpr による転座は、DNA が切れやすい染色体構造に原因があり、さらに Lagging chromosome などの機械的力によって起きていると推測している。これらの分裂期での染色体転座機序解明は、今後の課題となる。以上より、Vpr による複数機序の総合が、クロマチン構造異常のトリガーとなり、染色体断裂や転座が誘導される可能性を推測している。

3) 本研究では HIV 感染者抹消血を用いた研究も行った (感染者 n=24, 非感染者 n=12)。上述の PCS は、高頻度に感染者に認められた (左図)。染色体転座解析は現在進行中であるが、上述の様に、PCS が認められる症例には染色体転座が伴っている可能性は高い。CD4 感染細胞や総白血球数との逆相関は認められたことから、PCS と病態との関連が示唆される。興味深い点は、概ねの感染者は抗エイズ療法において、末梢血中のウイルス価は検知

以下に抑制されているため、PCS との相関は認められない。脳、骨髄、リンパ節には抗エイズ薬が

到達しないという報告がある。そのため、ウイルス自体が末梢血に存在しなくとも、ウイルス蛋白質やサイトカイン等が存在している可能性が考えられ、それらが PCS を誘導している可能性は否定できない。また、同症例について、末梢血細胞のゲノムワイドな DNA メチル化変動が健常者より多く認められることが明らかになった。感染 T 細胞では、非感染者との相違は明らかである。一方、非感染 premature B 細胞においても、変動の高いグループが全体の 20% で認められた。非感染細胞のメチル化変動においても、ウイルス自体ではなく、ウイルス蛋白質やサイトカイン等が関与している可能性が否定できない。メチル化変動は遺伝子制御を伴うことがあり、特に感染者に多い悪性リンパ腫や肺がんとの関連に注目している。DNA メチル化変動とゲノム不安定性との関連が報告されているが、これまでのところ、感染症例の PCS とゲノムワイドな DNA メチル化変動との関連は認められなかった。ゲノム不安定性に関与するイベントは単一ではなく、複数存在していると考えられる。抗エイズ薬が普及する中、感染者の 25% 程度がリンパ腫になるという報告があるように、感染者の予後は癌の制御となりつつある。同一症例を追跡すると、DNA メチル化異常変動が 2 年以上続いている症例、変動が増大する症例が認められている。臨床チームとの連携を図りながら、前向き研究の継続の必要性がある。原因因子や機序解明は今後の課題である。

以上の基礎および臨床研究より、HIV 感染によるクロマチンやゲノムへの影響が明らかにされつつある。特に、近年問題となっている発癌との関連は否定できない。HIV 感染では他の癌ウイルス (EBV や HPV) 感染が伴うこともあり、HIV 感染が発癌を直接誘導する報告はこれまでも無い。しかし、本研究より、ゲノム不安定性や DNA 修飾異常 (DNA メチル化) を誘導していることは否定できない。発癌は一般に、複数の因子が重なった際に起きると考えている。HIV 感染症では、その確率を下げるのが肝要であると考えられる。本研究で得られた結果を展開し、HIV 関連発がんに対するリスクマーカーの提案を目標に研究を継続する。

Subject No. : 25-indicated-111

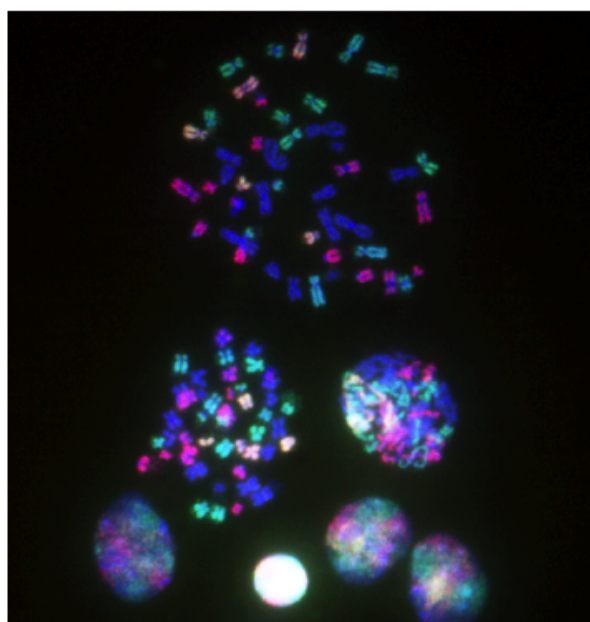
Title : HIV-1 induced chromatin genome maintenance and genomic instability

Researchers : Mari SHIMURA

Key word : HIV-1, genomic instability, Vpr, chromatin, reconstitutive nucleosomes

Abstract : HIV-1 infection becomes chronic infection after the introduction of anti-retrovirus therapy, which can be used to control viral production for extended periods, improving patient prognosis. However, malignant tumors have frequently reported in HIV-1-infected patients. Malignant tumor extremely decreases a quality of life of HIV-1-infected patients. Clarifying a mechanism of HIV-1 related malignancy became one of the major issues to overcome. Recent studies including ours findings suggested that HIV-1 infection caused different gene regulation in B-cell lymphomas (Matsunaga et al, *AIDS*, 2014). Especially, DNA hypomethylation tendency in CG islands of promotor region was characteristically observed with HIV-infected cases. Previous findings suggested that DNA hypomethylation was related to genomic instability as well as maintenances on chromosome structures. In this study, we focused chromatin maintenances by HIV-1 Vpr, which induces chromosome abnormalities, such as DNA double strand breaks and centromere abnormality resulting in premature sister chromatid separation (Tachiwana et al, *Can Res*, 2006; Yamagishi et al, *Nature* 2009; Shimura et al, *JCB*, 2011). These findings suggested that Vpr tightly attached to chromatin in insoluble fraction, and recently we figured out that Vpr bound to histones in insoluble fraction.

The first year of this project, we performed a study for a binding ability *in vitro* between reconstitutive nucleosomes and recombinant ST-tagged-Vpr. We prepared subnucleosomes, monomer and 12-mer of nucleosomes. Vpr bound to all kinds of nucleosomes. Addition of anti-tag antibody (M2) to nucleosome-Vpr mixture showed band supershift clearly, suggesting that Vpr directly bound to nucleosomes. Our data suggested that Vpr bound to DNA of nucleosomes or to nucleosomes via DNA.



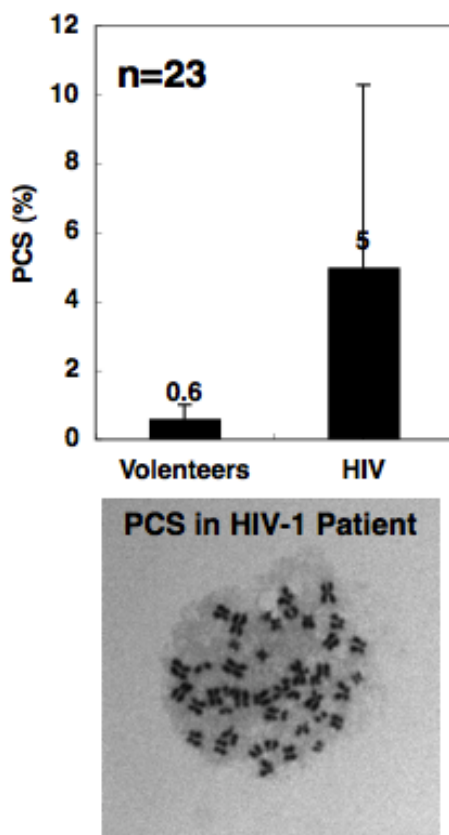
mFISH in PBL from HIV-1 Patient
Ethics Committee approval (NCGM-G-001615-01)

The second year of this project, we established cell lines, which expressing histone H3-EGFP or H4-EGFP in Vpr stable transfectant (MIT-23) or its mock transfectant. We found H4 abnormal localization at cytoplasm and chromosome translocation in Vpr stable transfectant (MIT-23). Our data suggested that Vpr might bind to DNA of nucleosomes or to nucleosomes via DNA. We further hypothesize that Vpr could alter nucleosomes structure. This could be happened locally, since relatively large amount of histones are existed at nuclei. Our previous finding indicated that Vpr especially localized at centromere region, and eliminated kinetochore proteins and centromere heterochromatin protein HP1. Vpr-induced

Researchers には、分担研究者を記載する。

chromosome structural abnormality may potentially exist, which answers centromere abnormality, resulting in PCS and DNA double strand breaks. Elimination of HP1, centromere proteins and mislocation of H4 seems to be related to instability of chromosome structure. Common mechanism of these missing or alternation by Vpr is essential to be clarified.

The third year of this project, we found Vpr-induced chromosomal translocation. We made sure both in Vpr-transient expressed and Vpr-stable transfectant (MIT-23 cells). Vpr-induced chromosomal translocation seemed happened randomly in chromosomes, and there is no hot spot for chromosomal translocation. If it is happened randomly, chromosome # 1 might have it most, since chromosome #1 is the lonest one. In fact, we estimated chromosome # 21 had chromosomal translocation most per length. We also examined myc-IgH translocation, which is well observed in HIV-related lymphoma cases, however, we could not find it among over 300 chromosome spreads. These might be related to a cell origin, fibrosarcoma used for these experiments (HT1080). Surprisingly, Vpr-chromatin association was observed 10-20 % of chromosome spread examined only after 48 hr after DOX -induced Vpr expression. Fifty percent of cell population accumulated at G2/M in Vpr-expressing cells, and cells have one mitotic phase during 48 hr. As there were only a few of paired-chromosomal translocation, which were supposed to be via DNA replication at DNA synthetic phase, most chromosomal translocation may be occurred during at G2/M with high probability. Although molecular mechanism of chromosomal translocation is not known well, mitotic phase (anaphase) is one of the candidates, since chromosomal translocation associates dynamic chromosome breaks and fusion. Chromatin bridges has



suggested as one of the factors of chromosomal translocation at mitotic phase. In the case of Vpr-expressing cells, we observed micronuclei (Shimura M, et al, FASEB J, 1999), chromosome minutes and sister chromatid exchanges (unpublished data), suggesting Vpr-induced chromatin unstable and potentiality for chromatin bridges. Furthermore, we found premature sister chromatid separation (PCS) is highly associated with chromosome translocation. Vpr-induce PCS is depending on histone H3-K9 hyperacetylation due to Vpr recruited p300/HAT and loss of HP1 protein at centromere region (Yamagishi et al, *Nature* 2009; Shimura et al, *JCB*, 2011). PCS generally associated lagging chromosome during mitosis, prolonged mitotic phase, producing unequal chromosome separation and aneuploidy. Vpr-induced chromosome translocation may be related to unstable chromatin structure and mechanical force during mitotic phase.

The third year of this project, we collected peripheral blood lymphocytes from HIV patients (n=24) and healthy volunteers (n=12), and examined PCS, chromosome translocation and genome-wide DNA methylation. PCS was highly observed in HIV patients under the anti-retrovirus therapy, which is mostly control of virus production in

peripheral blood (PBL). PCS was not correlated with virus mRNA copies in PBL, however, negatively correlated with CD4 and total white blood cells, suggesting that PCS is related to HIV-pathogen. These data suggested that proteins besides virus such as virus protein or cytokines from brain, bone marrow, lymphnodes, where anti-retrovirus therapy cannot reach enough, might be related to PCS. As PCS was associated with chromosome translocation as mentioned the above, chromosome translocation may be detected in PBMC in HIV patients. We also found genome-wide DNA methylation has influenced and changed both in infected cells (CD4 included) and uninfected cell population (premature B cells). These data also suggested that proteins besides virus such as virus protein or cytokines might be related to DNA methylation in uninfected cell population. Prospective study and follow-up the cases are necessary to reveal the consequence of abnormal DNA methylation, since changes in DNA methylation are related to malignancy. The mechanism of abnormal DNA methylation and DNA methylation target as risk a marker also has to be clarified.

Our data suggested HIV infection altered chromosome maintenance and induced genomic instability. We believe that prevention of genomic instability by HIV infection may contribute to the reduction of risks in tumorigenesis.

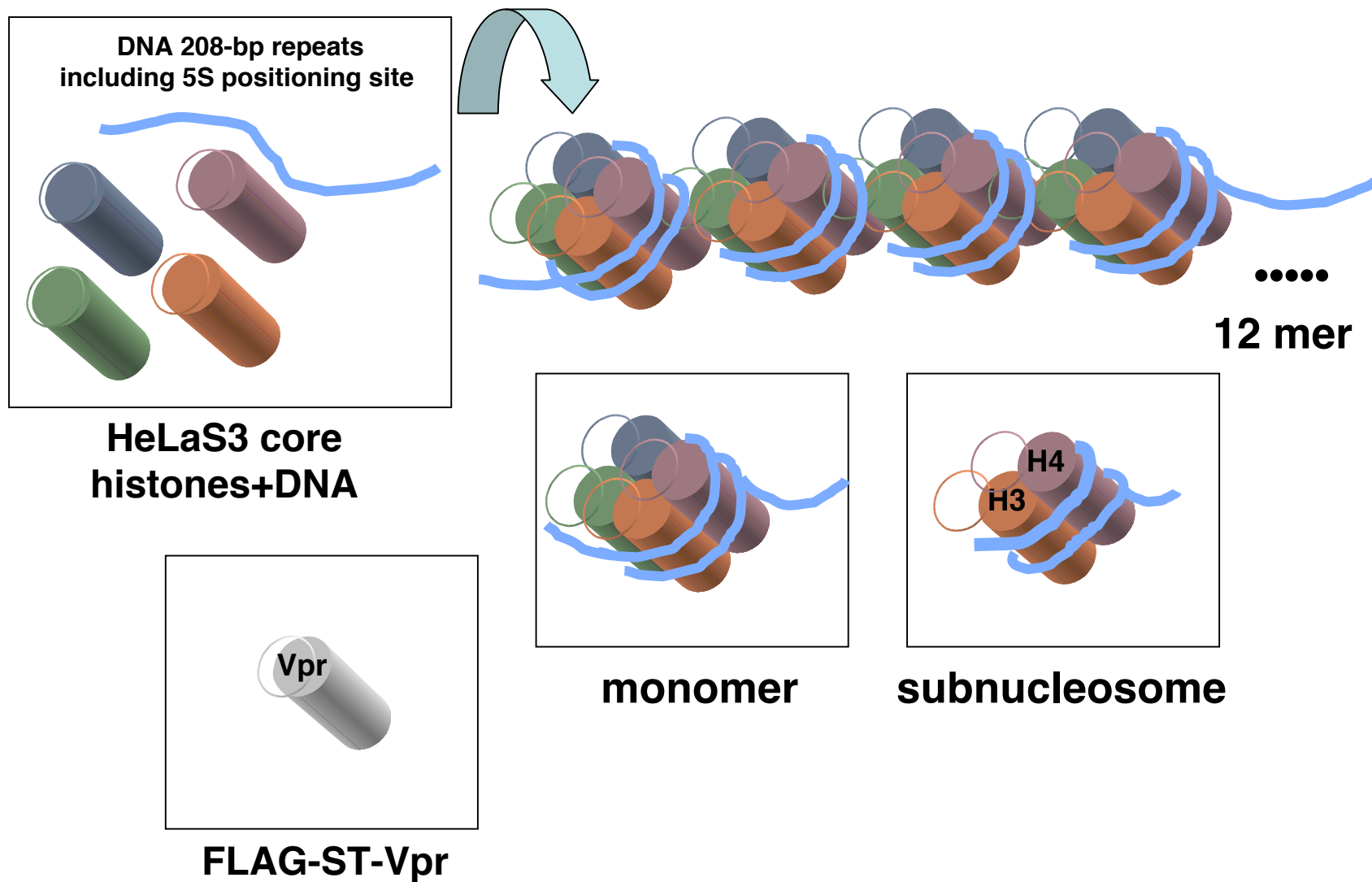
HIV-1感染によるクロマチンゲノム メンテナンスとゲノム不安定性

25指111

研究所難治性疾患研究室

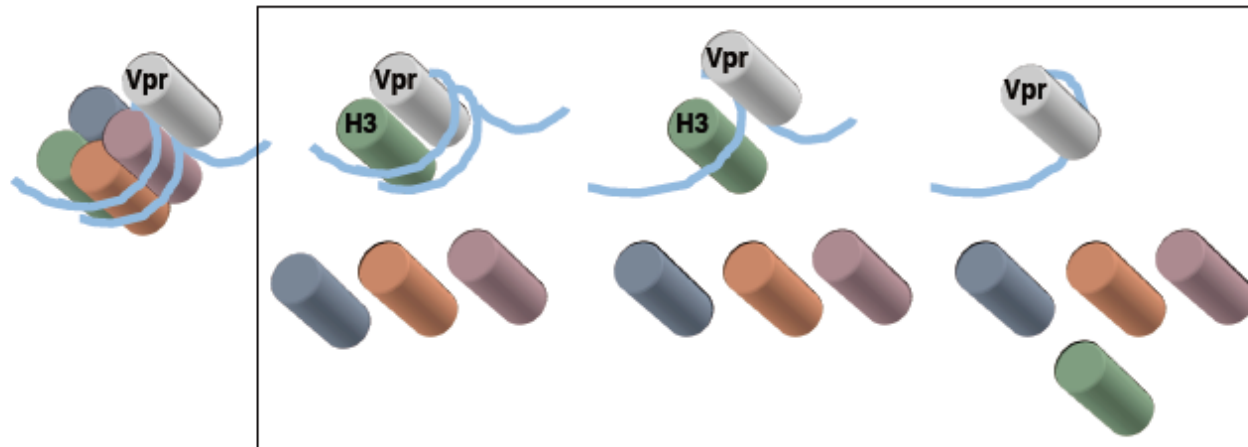
志村まり

再構成ヌクレオソームの作成

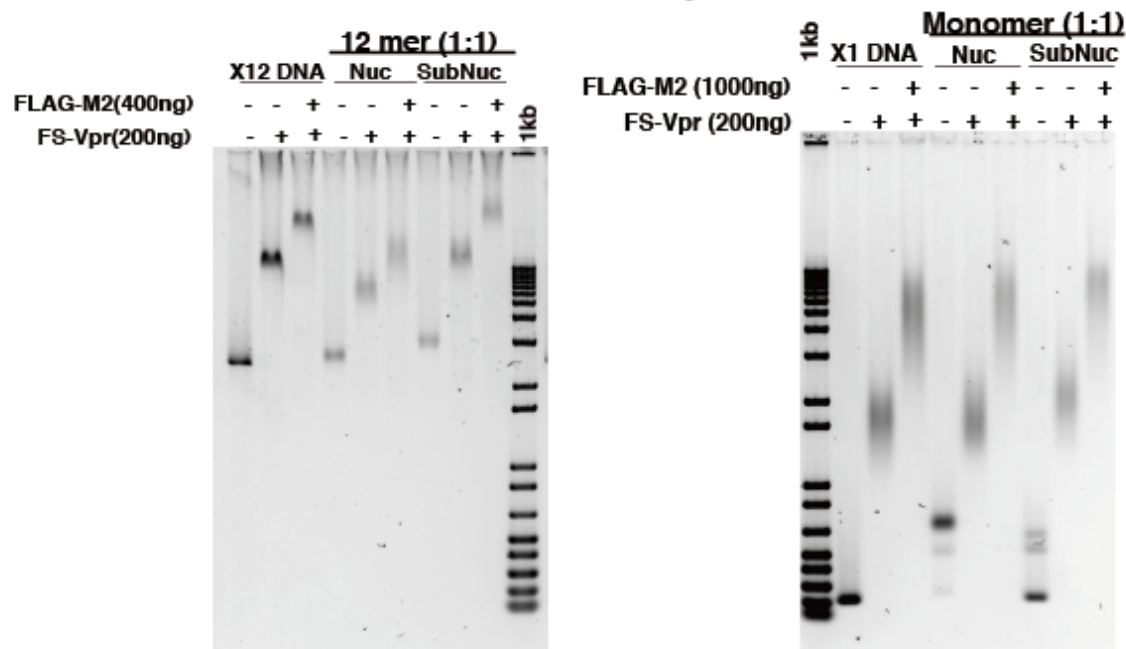


Under the guidance of Ura K., Osaka Univ.

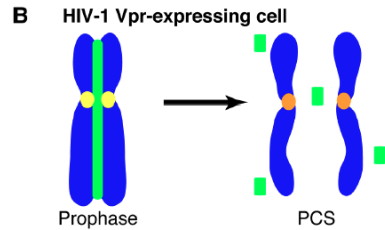
再構成ヌクレオソームとVpr の結合 (仮説)



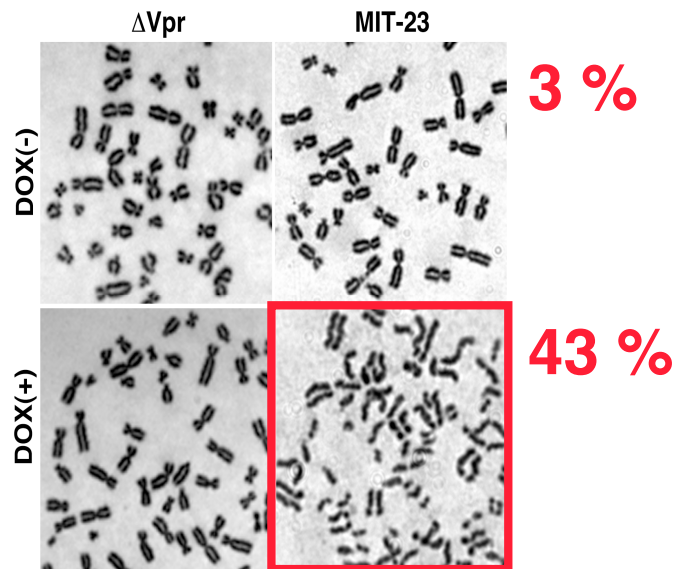
再構成ヌクレオソームとVpr の結合実験



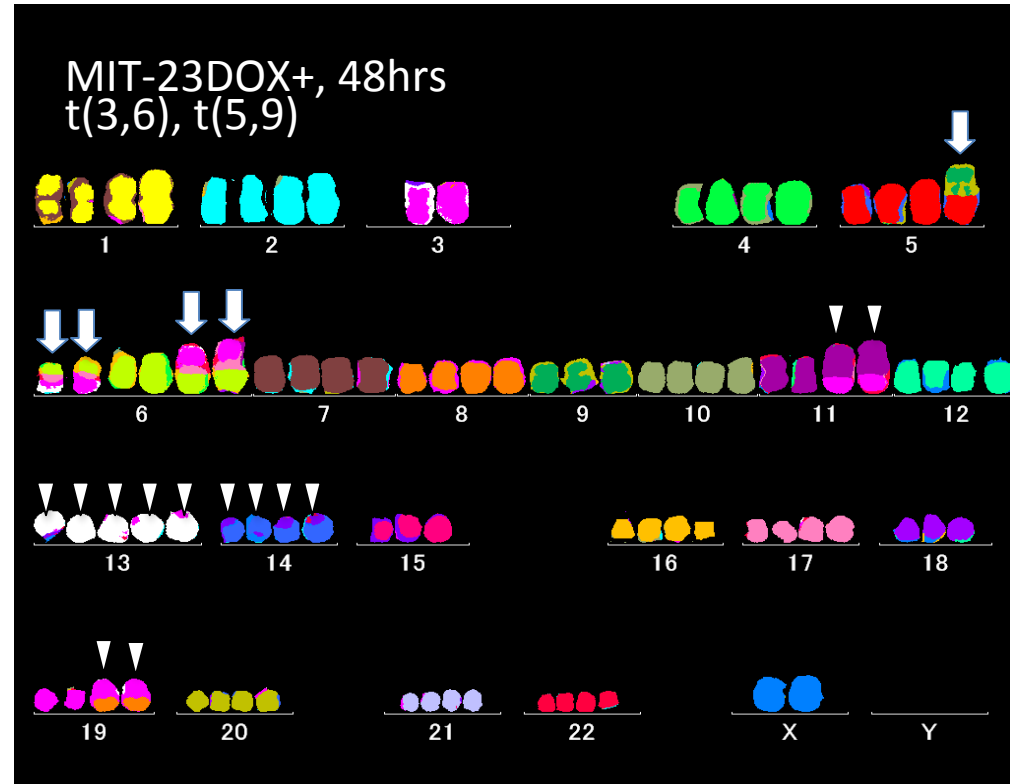
PCS and Chromosome Translocation by Vpr



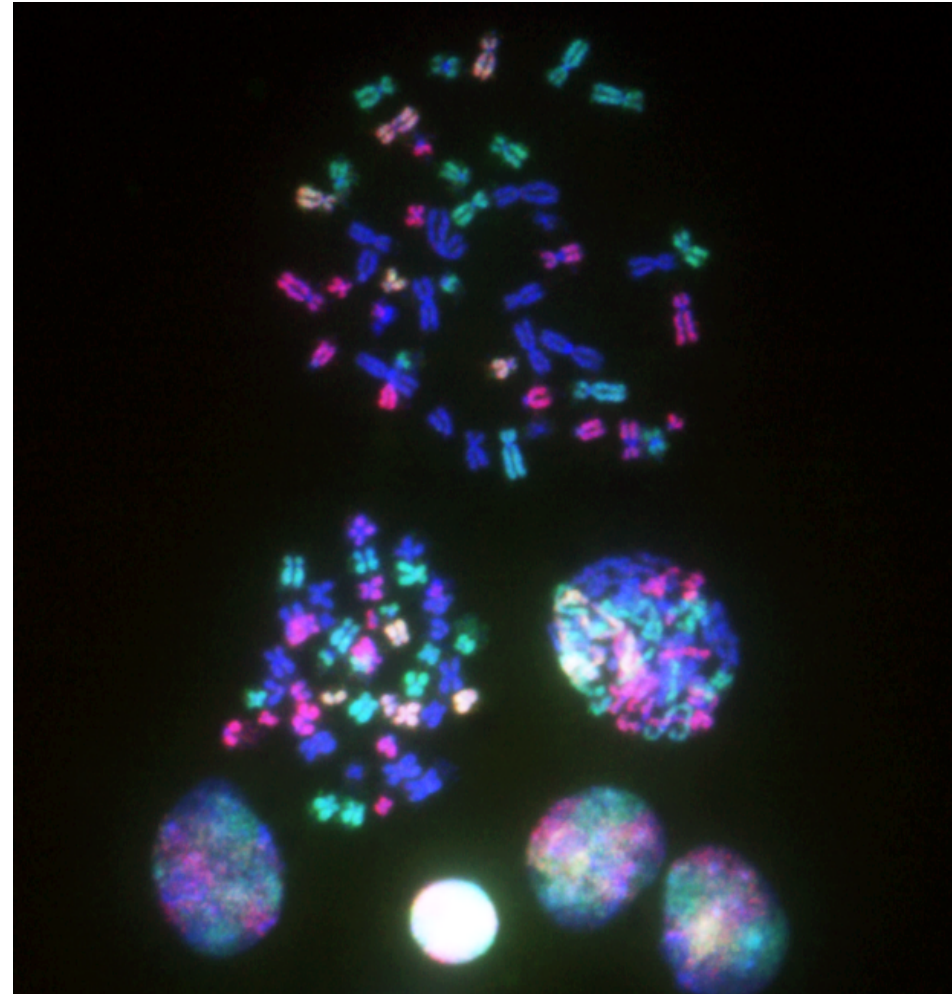
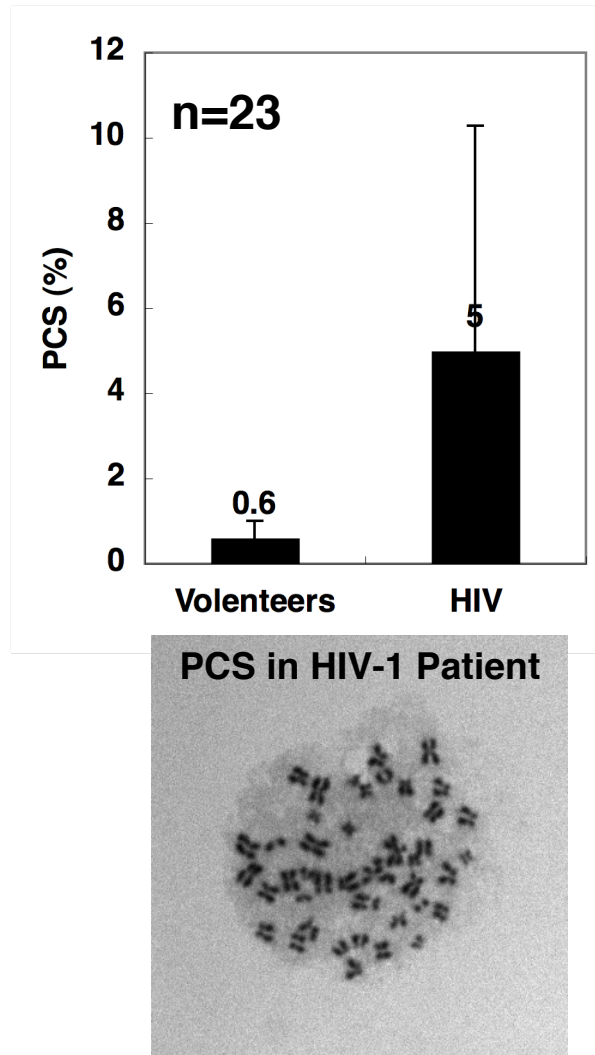
Histone acetylation by Vpr induced PCS
(Shimura, et al, JCB, 2011)



48 hrs



HIV-1 Patients with High PCS may have Chromosome -Clinical Study has Started-



mFISH in PBL from HIV-1 Patient
Ethics Committee approval (NCGM-G-001615-01)

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 25指111

研究課題名： HIV-1感染によるクロマチンゲノムメンテナンスとゲノム不安定性

主任研究者名： 志村 まり

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Telomere Visualization in Tissue Sections using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes	Sasaki A, Ide S, Kawamoto Y, Bando T, Murata Y, Shimura M, Yamada K, Hirata A, Nokihara K, Hirata T, Sugiyama H, Maeshima K	Scientific Report	in press	2016
DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas.	Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamasaki M, Yoshida L, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, Ishizaka Y, Shimura M, Hagiwara S.	AIDS	28:503-510	2014

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
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	松永章弘, 志村まり他	第37回日本分子生物学会	横浜	12月, 2014
HIV関連リンパ腫のエピジェネティクス解析	松永章弘, 志村まり他	第17回白馬シンポジウム鳥取大学	鳥取	6月, 2015
DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas	松永章弘, 志村まり他	第74回日本癌学会学術総会	名古屋	10月, 2015
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	松永章弘, 志村まり他	第38回分子生物学会	神戸	12月, 2015

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当無し				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。