

**RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME
LABORATORY OF VIRUS IMMUNOLOGY**

1) Analyses of HTLV-I *bZIP factor (HBZ)* gene in adult T-cell leukemia (ATL) and HTLV-I-associated inflammatory diseases: J. YASUNAGA, M. YOSHIDA, Y. SATOU, P. MIYAZATO, K. TAKAI, T. ZHAO, J. FAN, J. TANABE, A. KAMAMOTO and M. MATSUOKA.

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) is the first retrovirus that induces diseases in human. HTLV-I causes both a neoplastic disease, adult T-cell leukemia (ATL), and the inflammatory diseases, such as HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and uveitis. HTLV-I belongs to complex retrovirus, which encodes regulatory genes (tax and rex) and several accessory genes, such as *p30*, *p12*, *p13* and *HTLV-I bZIP factor (HBZ)*. Among them, tax is thought to play a central role in transformation of infected cells. However, since it is a major target of cytotoxic T-lymphocytes, its expression is often silenced in ATL cells to escape the host immune system. The *HBZ* gene, which is encoded by the minus strand of HTLV-I, contains a basic leucine zipper domain. Our previous studies showed that 3'LTR is intact and unmethylated in all ATL cells. From our studies, *HBZ* gene was transcribed in all of the ATL cell lines and primary ATL cells, while tax gene transcription was frequently silenced. Our studies indicate that the *HBZ* gene promotes proliferation of HTLV-I infected cells by enhanced expression of E2F1, which is mediated by HBZ RNA. In *HBZ*-transgenic mice, the number of CD4 positive T-lymphocytes was increased, indicating that *HBZ* promotes proliferation of CD4+ T-cells in vivo. Dermatitis is frequently observed in *HBZ* transgenic mice, and in the skin, infiltration of CD4+ T-cells is also found. In addition, CD4+ T-cells infiltrate into alveolar septum. Such infiltration of CD4+ T-cells was reported in HTLV-I carriers, indicating that the phenotype of *HBZ* transgenic mice is similar to that of HTLV-I carriers. These findings suggest that *HBZ* is a critical viral gene for not only leukemogenesis but also other HTLV-I-associated inflammatory diseases.

2) Characterization of the promoter regions for HTLV-I *bZIP factor (HBZ)* gene: M. YOSHIDA, Y. SATOU, J. YASUNAGA and M. MATSUOKA.

The human T-cell leukemia virus type I (*HTLV-1*) basic leucine zipper factor (*HBZ*) gene is encoded by the minus strand of HTLV-1 provirus, and transcribed from 3' long terminal repeat (LTR). However, the promoter region and its transcriptional regulation of *HBZ* gene remain unknown. We have characterized the promoters of the *HBZ* (*HBZ*) genes. The promoters of spliced (*sHBZ*) and unspliced *HBZ* (*usHBZ*) genes were TATA-less, which contained initiators and downstream promoter elements. We found that SP1 was a critical transcription factor for *sHBZ* gene

expression. Chromatin immunoprecipitation assay demonstrated the binding of Sp1 to the promoter region of *sHBZ* gene. We compared the functions of two proteins derived from *sHBZ* and *usHBZ* gene, and found that *sHBZ* showed the stronger suppressive capability to Tax-mediated transcriptional activation through 5'LTR than *usHBZ*. Only the *sHBZ* gene had growth-promoting function for a T-cell line while *usHBZ* did not.

3) Identification of cellular proteins interacting with HBZ and characterization of virological and pathological significance of the interaction: T. ZHAO, J. YASUNAGA, J. FAN, K. HAGIYA, Y. SATOU, and M. MATSUOKA.

We are trying to identify cellular factors interacting with HBZ by using yeast two hybrid or functional analyses of various signaling pathways. In this study, we found that HBZ specifically suppressed kB-driven transcription mediated by p65 and tax but not the alternative NF-kB signaling pathway. Using coimmunoprecipitation, we demonstrated the direct interaction between HBZ and p65, and this physical association abrogated the DNA binding capacity of p65. In other aspect, HBZ induced p65 degradation through ubiquitination-dependent pathway. In addition, HBZ repressed transcription of selected classic NF-kB target genes. This study suggests that this selective binding to p65 modulates Tax mediated NF-kB activation.

4) Electrostatically constrained a-helical peptide enhances its binding to the target: a new design for HIV-1 fusion inhibitors: K. Izumi, E. Kodama, Yasuko Sakagami and M. Matsuoka

Alpha-helical domain of gp41 plays an important role in folding and interaction of proteins, providing therapeutic targets. For instance, enfuvirtide (T-20), a linear region of an a-helical 36 amino acid peptide derived from the HIV-1 gp41 C-terminal heptad repeat (C-HR), inhibits membrane fusion of HIV-1 and cells by preventing 6-helix bundle formation, and has been used for treatment of HIV-1-infected individuals. Although replication of multi-drug resistant HIV-1 variants has been effectively suppressed by T-20, it has been reported that HIV-1 can emerge with the resistance after prolonged therapy. To suppress such resistant variants, we remodeled the C-HR-derived a-helical 34 residues peptide (C34). Hydrophilic amino acids, glutamate and lysine, were introduced at the solvent accessible site to enhance the a-helicity. The modified peptide (SC34EK) showed highly enhanced activity against fusion inhibitor resistant variants as well as wild type viruses. The anti-HIV-1 activity of SC34EK was well correlated with thermostability of their 6-helix bundle, and crystal structure analysis revealed the validity of the modification. Our approach may be applicable to design of a-helical peptides with high efficacy with specificity.

5) Random screening of compounds that inhibit HIV fusion: K. Izumi, K. Shimura, T. Naito, E. Kodama, Y. Sakagami, and M. Matsuoka

We performed random screening of compounds that inhibit HIV-1 replication using HeLa/CD4-LTR-b-Gal indicator cells. The cells are stably transfected with HIV-1 receptor CD4 and long terminal repeat (LTR) driven b-galactosidase, indicating that the cells are permissible for HIV-1 infection and induced b-galactosidase expression with Tat, HIV-1 transactivator protein after HIV-1 infection. Using the cells, we easily examine HIV-1 infectivity within 2 days and apply to random screening for the compounds. Some compounds are commercially available and some have been synthesized in Kyoto University. In 2007, we performed approximately 20,000 compounds and finally identified 27 compounds that inhibit HIV-1 replication over 50% at concentration of lower than 10 μ M. We will reveal the mechanism of action and also perform further screening.

LIST OF PUBLICATIONS

**Research Center For Aquired Immunodeficiency Syndorome
Laboratory of Virus Immunology**

- Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, Matsuoka M, Derse D. Phenotypic and genotypic comparison of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase from infected T-cell lines and patient samples. *J Virol*, 81: 4422-4428, 2007.
- Miyazaki M, Yasunaga JI, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, and Matsuoka M. Preferential Selection of HTLV-1 Provirus Lacking the 5'LTR during Oncogenesis. *J Virol*, 81: 5714-5723, 2007.
- Yasunaga JI, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer Control*, 14: 133-140, 2007.
- Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T and Matsuoka M. Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia*, 21(7): 1594-1596, 2007.
- Matsuoka M and Kuan-Teh Jeang. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Can* 7: 270-280, 2007.
- Satou Y, Matsuoka M. Implication of the *HTLV-I bZIP Factor* Gene in the Leukemogenesis of Adult T-Cell Leukemia. *International Journal of hematology*, 86(2): 107-112, 2007.
- Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng Y-C, Mitsuya H. Antiviral Activity against HIV-1, Intracellular Metabolism, and Effects on Human DNA Polymerases of 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2701-2708, 2007.
- Yasunaga JI, Matsuoka M. Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I. *Rev*

Med Virol, 17(5):301-311, 2007

Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M. Cooperation of NF- κ B2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth transformation of a T cell line. J Virol, 81(21):119000-11907, 2007.

Yoshida M, Kuwahara K, Shimasaki T, Nakagata N, Matsuoka M, Sakaguchi N. GANP suppresses DNA recombination, measured by direct-repeat beta-galactosidase gene construct, but does not suppress the type of recombination applying to immunoglobulin genes in mammalian cells. Genes Cells. 12:1205-1213, 2007

松岡雅雄：成人T細胞白血病発がんの新たな分子機構 Annual Review 血液 2007 183-189 2007.

松岡雅雄：ATL 発がんの分子機構 新しい診断と治療の ABC46/血液 5 潜伏感染ウイルスによる血液疾患 p16-24 2007.

松岡雅雄：ATL の新たな発がん機序 Cancer Frontier 巻1号 63-69 2007.

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型による発がん機構 ウイルス感染症セミナー 第9巻 41-48 2007.

松岡雅雄：HTLV-I とエピジェネティクス Annual Review 2008 免疫 p188-p193 2007.

松岡雅雄：ATL 発症の新たなメカニズム 分子細胞治療 Vol.6, No.6 11-15 2007.

松岡雅雄、飛内賢正、渡邊俊樹、神奈木真理：成人T細胞白血病発見から 30 年—研究・臨床の展望— VIRUS REPORT Vol.4, No.1 10-22 2007.

安永純一郎、松岡雅雄：ATL の臨床病態と発がん機構 VIRUS REPORT Vol.4, No.1 44-50 2007.

佐藤賢文、松岡雅雄：HTLV-I 感染症と HTLV-I 関連肺疾患 Annual Review 呼吸器 2007 112-116 2007.

佐藤賢文、松岡雅雄：成人T細胞白血病(ATL)発症におけるHBZ遺伝子の意義 血液・腫瘍科 54(4) 402-407 2007.

佐藤賢文、松岡雅雄：プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの ATL 細胞に対する抗腫瘍効果 血液・腫瘍科 55(3) 322-326 2007.

櫻井康晃、松岡雅雄：DNA 修復酵素とレトロウイルス感染 放射線生物研究 42(1) 47-58 2007.

Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann M, Matsuoka M, Takiguchi, Gatanaga H, and Oka S. A Novel Mutation, N348I in HIV-1 Reverse Transcriptase Induced by NRTI Treatment, Confers Nevirapine Resistance. 14th conference on retroviruses and opportunistic infections.

Los Angeles, CA, 2007. Feb 25-28.

Matsuoka M. HTLV-I bZIP Factor Gene and Oncogenesis by HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.

Satou Y, Yasunaga JI, Ohshima K, Miyazato P, Yoshida M, Takai K, Zhao T and Matsuoka M. HBZ transgenic mice mimic skin and lung diseases associated with HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.

Yoshida M. Characterization of the promoter region for *HBZ* gene and functional analyses of spliced and unspliced *HBZ* genes. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.

Kodama E. Retroviral integrase inhibitor, elvitegravir (JTK-303/GS9137): Mechanism of action and resistance. The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Jeju, Korea, Dec. 5-7, 2007.

松岡雅雄：HTLV-Iによる発がん機構と移植：第29回日本造血細胞移植学会総会、福岡、2007年2月16-17日

松岡雅雄：Leukemogenesis associated with HTLV-I bZIP factor gene in ATL：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日

松岡雅雄：Molecular mechanism of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I：第12回慶應医学賞記念シンポジウム、東京、2007年12月5日

安永純一郎：欠損型プロウイルスの解析からみた発がんにおける HTLV-I bZIP factor の重要性：69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11日-13日

安永純一郎：HTLV-I bZIP factor (HBZ)によるT細胞増殖促進の分子機構：第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年12月11日-15日

佐藤賢文、片桐晃子、ミヤザトパオラ、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-I bZIP factor 遺伝子のトランスジェニックマウスは HTLV-I 関連皮膚疾患、肺疾患に類似した病態を示す：第37回日本免疫学会総会、東京、2007年11月20-22日

佐藤賢文、ミヤザトパオラ、松岡雅雄：HTLV-I 病原性における HBZ 遺伝子の機能解析：第55回日本ウイルス学会総会、札幌、2007年10月21-23日

Fan Jun、麻生範雄、松岡雅雄：Clustering of hypomethylated DNA regions associated with transcriptional changes in B-CLL：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日

志村和也、児玉栄一、阪上泰子、松崎裕児、渡辺渡、山高一修、佐藤元秀、加納光記、池田了、松岡雅雄：HIV インテグラーゼ阻害剤 Elvitegravir (JTK-303/GS-9137)の抗ウイルス活性および耐性機序の解析：第17回抗ウイルス療法研究会、高松、2007年5月25日-26日

志村和也、児玉栄一、池田了、松岡雅雄：インテグラーゼ阻害剤に対する耐性 HIV の誘導とその複製能の比較：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28日-30日

泉和樹、西川裕輝、伊藤紗織、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性 HIV-1 に対して有効な融合阻害薬の開発：第 17 回抗ウイルス療法研究会、香川、2007 年 5 月 25-26 日

泉和樹、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性変異を利用した融合阻害薬の開発：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28-30 日

趙鉄軍、安永純一郎、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor suppresses canonical pathway of NF- κ B by physical interaction with the p65:第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日

内藤武志、泉和樹、西川裕輝、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：C29 水溶性誘導体 SC29EK の抗 HIV 効果：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28-30 日

嶋根和毅、泉和樹、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 誘導体の抗 HIV 効果：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28-30 日

(1) HTLV-I bZIP factor (HBZ) の成人T細胞白血病およびHTLV-I 関連炎症性疾患における役割

HTLV-I はヒトの疾患との関連がはじめて示されたレトロウイルスである。造血器腫瘍である成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や HTLV-I 関連脊髄症などを引き起こす。HTLV-I は complex retrovirus に属しており、*tax*、*rex*、*p30*、*p12*、*p13*、*HBZ* などの調節・修飾遺伝子群をコードしている。その中で *tax* は HTLV-I 感染細胞の不死化に中心的な役割を果たしていると考えられているが、その反面で細胞傷害性 T リンパ球の主要な標的分子でもあり、ATL 細胞においてはしばしば発現が抑制され宿主免疫を回避している。HBZ は HTLV-I のマイナス鎖にコードされ、塩基性ロイシンジッパー構造を有している。我々は ATL 細胞において Tax の発現はしばしば抑制されているのに対し HBZ mRNA は全ての細胞で発現していることを見出した。さらに HBZ 変異体を用いた解析から HBZ は蛋白としてではなく RNA として増殖促進作用を発揮することが示唆された。HBZ トランスジェニックマウスを用いた解析では、野生型マウスと比較して脾臓中の CD4 陽性細胞が増加していること、胸腺細胞における抗 CD3 抗体に対する反応性が增強していることが明らかとなった。HBZ トランスジェニックマウスは皮膚炎や間質性肺炎を自然発症し、炎症組織では CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認め、HTLV-I 感染者に類似の病態を示すことが分かった。これらの所見は HBZ が ATL のみならず HTLV-I 関連炎症性疾患の発症にも重要である可能性を示唆している。現在その作用機序の詳細について解析を進めている。

(2) HTLV-I bZIP factor (HBZ) のプロモーター解析

HBZ は HTLV-I のマイナス鎖にコードされるウイルス遺伝子であり、その転写開始点は 3' LTR に存在する。本研究ではこれまで不明であったプロモーター領域の同定と、転写制御機構の解明を目的とし解析を進めている。HBZ 遺伝子にはスプライス (sHBZ) と非スプライス (usHBZ) の 2 つの転写が存在し、どちらのプロモーターも TATA-less であった。ルシフェラーゼを用いたプロモーター解析やクロマチン免疫沈降解析の結果から、スプライス sHBZ のプロモーター活性には Sp-1 が重要であることが明らかとなった。Tax による 5' LTR 転写活性化を抑制する機能は sHBZ が usHBZ より顕著であった。一方、T 細胞株増殖促進作用は sHBZ では認めたが、usHBZ では認めなかった。

(3) HBZ 分子と相互作用する宿主側タンパクの同定、及びそのウイルス病原性における意義の検討

我々は yeast two hybrid や種々の細胞内シグナル伝達経路に関する機能的解析を行い HBZ と相互作用する宿主側因子の同定を行っている。そして HBZ が p65 や Tax による NF- κ B の活性化

を抑制することを見いだした。免疫沈降解析により HBZ と p65 が結合し、p65 の DNA への結合能が低下することを明らかにした。その一方で HBZ がユビキチン依存的な p65 の分解を促進することが判明した。HBZ を発現させた T 細胞株では古典的 NF- κ B 経路の標的遺伝子発現抑制を認めた。以上のことから HBZ と p65 の相互作用は Tax による NF- κ B の活性化を調節している可能性が示唆された。

(4) 新規 HIV 融合阻害剤の作用機序の解明

我々は新たな抗 HIV 剤の標的部位としてウイルス-標的細胞間の膜融合に注目して研究を行っている。この膜融合メカニズムを概説すると三量体で存在する HIV-1 外被タンパク gp41 が標的細胞にアンカリングした後、gp41 に存在する 2 つの α -helix 領域(HR1, HR2)が逆並行型に相互作用することで HIV と標的細胞の膜が接近し膜融合が成立すると考えられている。この HR2 領域に由来する 36 残基のペプチドである enfuvirtide (T-20)はこの融合を阻害し、欧米において臨床使用されている。しかし T-20 耐性を獲得したウイルスも既に報告されており、これら耐性ウイルスを抑制する新たな融合阻害剤の開発が急務となっている。そこでこの HR 間結合を増強させるために HR2 ペプチドの溶媒接触面に親水性アミノ酸である Glu, Lys を規則的に導入し、これらの側鎖間相互作用による α -helix 性の増大を目指した。本概念に基づいて合成したペプチド SC34EK は野生株 HIV-1 だけでなく T-20 耐性株に対しても強力な抗 HIV 作用を示した。実際 SC34EK は T-20 耐性変異を有する HR1 との結合性が向上していた。また結晶構造を X 線解析によって解析したところ溶媒接触面に Glu, Lys が規則的に配置し側鎖間で静電的相互作用を形成するという知見が得られた。以上より、SC34EK は T-20 耐性株に対しても強力な抗 HIV 活性を示し、T-20 耐性 HIV に有効な第二世代膜融合阻害剤の候補となりうると考えられた。

(5) 抗 HIV 剤候補のランダムスクリーニング

本学薬学研究科では本学で合成された化合物ライブラリーを構築している。これまで各研究室で化合物を合成、その研究を独自に行ってきたが、一部の化合物には当初考えられていた標的以外にも作用を有すると考えられる。これらの有用な資源を有効利用するために我々は薬学研究科と共同研究でこれら化合物の抗 HIV 活性を検討した。現在までに約 20000 の化合物を調べてみたところ、27 化合物に中程度以上の抗 HIV 活性が認められた。今後これらの化合物の作用機序や医薬品への応用の可能性について研究をおこなう予定である。