

200924043A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトT細胞白血病ウイルス1型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と
発症危険群へのアプローチ

(H21-3次がん一般-004)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成22 (2010) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の 同定と発症危険群へのアプローチ-----	1
研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	

II. 分担研究報告

1. 松田 文彦（京都大学医学研究科・教授）-----	4
2. 齊藤 峰輝（琉球大学医学部・准教授）-----	5
3. 野坂 生郷（熊本大学大学院医学薬学研究部・助教）-----	12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）-----	13
2. 齊藤 峰輝（琉球大学医学部・准教授）-----	55
3. 野坂 生郷（熊本大学大学院医学薬学研究部・助教）-----	71

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と
発症危険群へのアプローチ

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) のみならず HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を引き起こし、その発生には家族内集積性があることが知られている。全ゲノム関連解析 (GWAS) を用いてこれらの疾患感受性遺伝子多型を明らかにすることを目的としている。ATL、HAM 検体の収集を精力的に進めると共に、全ゲノム関連解析を進め、それぞれの疾患に関して候補遺伝子多型を同定した。

A. 研究目的

本邦におけるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染者数は約 100 万人と推定されており世界最大の蔓延地域であり年間約 1000 名のキャリアが成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症している。また HTLV-1 は脊髄の炎症性疾患である HTLV-1 脊髄症 (HAM) も引き起こす。ATL は予後不良であり HAM も有効な治療法が無い。ATL では家族内発症が認められ遺伝的背景が密接に関連していることが明らかであるが、その解析は進んでいない。本研究では ATL および HAM 発症に関与する遺伝子多型を解析し発症危険群を同定することで将来の発症予防法確立につなげる。

ヒトゲノムの塩基配列には、個人間、人種間で微妙な違いが多数存在する。これら塩基の個体差を多型と呼び、疾患と個人の遺伝的素因の関係を調べる有用なツールとなっている。そのうち一塩基の多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) はヒトゲノム上で数百塩基に一箇所の割合で存在するが、必ずしもその全てが疾患と関係するわけではない。近年では DNA チップの開発により全ゲノム関連解析 (GWAS) が可能になった。患者と対照群について数十万個の SNP 遺伝子型データを一度に決定し、両群で有意差を認める SNP を探索することにより疾患発症に重要な影響を及ぼす遺伝子多型が同定可能である。本研究は GWAS を用いて、ATL と、HAM における感受性遺伝子多型を同定し、その情報を基に高危険群診断法の確立を目的とする。

B. 研究方法

SNP を用いた全ゲノム関連解析を行い、疾患関連 SNP を同定する。さらに、疾患関連

SNP の生物学的活性の解析：同定された疾患感受性 SNP が発症を促進する機序を明らかにするため、SNP がその分子に付与する機能について解析する。

(倫理面への配慮)

本研究は全て国の倫理指針に基づいた倫理委員会での審議、許可を得ている。また、検体は全て匿名化する。

C. 研究結果

1) 全ゲノムジェノタイプピング

我々はイルミナ社の Human610k-Quad BeadChip を用いて熊本で収集された ATL 患者 258 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 182 検体 (Set1)、鹿児島で収集された HAM 患者 296 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 100 検体 (Set2) の GWAS を行った。タイプピング結果の品質管理として患者、対照群両群に関してアッセイ成功率が 90% 以上、マイナーアレル頻度が 0.01 以上、対照群のジェノタイプ分布がハーディー・ワインバーグ平衡に達しているもの ($p > 10^{-7}$) を選び、条件を満たした 477,250 SNPs のみを解析にまわした。サンプルの品質管理後 (タイプピング成功率が 90% 以上、さらに PLINK で遺伝的近縁度を推定後、近縁度が高いペアは片方を除去し、条件を満たした検体のみを統計にまわした)、最終的に ATL 患者 238 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 165 検体 (Set1)、HAM 患者 278 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 97 検体 (Set2) を統計解析した。選択された SNPs に関して、患者と対照群の間で、アレル頻度、ジェノタイプ分布を考慮に入れた統計解析を行い、患者集団内での頻度が統計学的有意に達する SNP があるか検討した。また、患者を病態で分類した複数のサブグループ間での比較解析に着手し、HTLV-1 感

染と疾患の発症のどの段階でどのような遺伝子が関与しているかを詳細に調べている。

2) 二次スクリーニング (再現性の検証)

有意差の得られた SNPs については、それを含むハプロタイプの頻度に差があるか否かを検討し、その結果 Set1 に関しては、 $p=2.50 \times 10^{-7}$ をはじめとして、 $p < 1 \times 10^{-5}$ の SNP が 29 個、Set2 に関しては $p=2.00 \times 10^{-6}$ をはじめとして、 $p < 1 \times 10^{-5}$ の SNP が 52 個得られた。一次スクリーニングで得られた結果の再現性を確認するため、候補 SNPs について新たな検体を用いて二次スクリーニングを行う (Taqman 法)。詳細な臨床情報を伴う ATL、HAM、および無症候性 HTLV-1 感染者の DNA が各 153、67、210 検体、既に収集されているが、さらに検体数の増加に努める。結果をデータベースに取り込み統計解析を行い、一次スクリーニングと同じ基準でデータの品質管理を行う。

3) 疾患感受性遺伝子/多型の同定

二次スクリーニングでも関連性が確認された SNP の連鎖不平衡 (r^2 および D') を調べ、さらに、我々が既に所有するデータベースおよび国際 HapMap 計画データベースから、連鎖不平衡ブロック (LD ブロック) を特定する。特定した LD ブロック内に存在する (可能な限りの) 全多型を同定するため、日本人 32 検体を用いて SNP 同定を行う。遺伝子の調節領域、エクソンおよびその周辺領域内を特異的プライマーによって増幅し塩基配列を再決定する。得られた塩基配列のデータを SNP 同定のソフトウェアで解析し、SNP 同定を行う。同定された新しい SNP の情報は、当研究室の遺伝子データベースに収め、遺伝子内の各多型の位置、頻度、多型間の連鎖不平衡、遺伝子毎のハプロタイプと集団における推定頻度などのデータを蓄積する。その結果を用いて詳細な多型地図を作成し各候補遺伝子の主要ハプロタイプ (頻度 5% 以上) を区別可能な SNPs (タグ SNPs) を選択する。シーケンス法、もしくは TaqMan 法を用いて患者および対照群全て (既存の検体に加え、追加で収集した検体全てを用いる) のジェノタイプングを実施する。遺伝子型を決定した後、連鎖不平衡地図ならびにハプロタイプ地図を作成し、相関解析、ハプロタイプ解析を実施して最も信頼性の高い遺伝子座を明らかにする。

D. 考察

HTLV-1 によって起こる ATL と HAM は家

族内発症が多いことが、疾患発見当初から報告されていた。この臨床的観察は両疾患の発症に遺伝的なバックグラウンドが重要な役割を担っていることを示している。これまで ATL、HAM に関連する SNP に関して、いくつかの報告があったが解析数も限られており十分な解析がなされていなかった。今回の研究では既に 500 例以上の ATL サンプル、300 検体の HAM サンプルを集めている。今年度の解析で既に疾患感受性遺伝子候補を同定できた。これらの多型は、疾患感受性遺伝子の候補となるものであるが、独立した集団の検体を用いた再現性検証が必須である。そのため、新たに収集された検体を用いた候補多型のタイプングを行い、結果の比較を通して、真の感受性遺伝子の同定を目指す。

E. 結論

今年度の解析で ATL、HAM の疾患感受性と関連するゲノム上の多型の候補を複数個同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood** 113: 2755-2764, 2009.
2. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- β signal in gastric cancer cells. **J Biol Chem** 284: 3334-3344, 2009.
3. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis

- (HAM/TSP). **Retrovirology** 6:19, 2009.
4. Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogawa T, Matsuoka M, Matsumoto T, Mesnard JM, Yasukawa M. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol*, 90:1806-1811, 2009.
 5. Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, Washio K, Takano M, Takata K, Morito T, Huang X, Tamura M, Kitamura Y, Ohara N, Ouchida M, Ohshima K, Shimizu K, Tanimoto M, Takahashi K, Matsuoka M, Utsunomiya A, Yoshino T. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Am J Pathol* 176: 402-415, 2010.
 6. Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Matsuoka M. APOBEC3G generates nonsense mutations in HTLV-1 proviral genomes *in vivo*. *J Virol*, (in press), 2010.

2. 学会発表

1. Matsuoka M. The Roles of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Oncogenesis. The 14th International Conference on Human Retrovirology:HTLV and related retroviruses. Salvador, Brazil, July 1-4,2009.
2. Zhao T, Yasunaga J, Fuji M, Matsuoka M, Nakao M. HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. September, 13-14, 2009.
3. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構：第 49 回日本リンパ網内系学会総会、淡路、2009 年 7 月 9-11 日
4. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現機構：第 76 回発生病学・疾患モデル研究会例会、東京、2009 年 9 月 17 日
5. 松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による発がん機構：第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
6. 萩屋啓太、佐藤賢文、安永純一朗、松岡雅雄：ATF3 は HTLV-1 bZIP factor と相互作用し、ATL 細胞の増殖に寄与する：第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
7. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん：第 14 回遺伝子実験施設セミナー、熊本、2009 年 10 月 16 日
8. 佐藤賢文、安永純一朗、吉田美香、宮里パオラ、趙鉄軍、高井健、清水桂、大島孝一、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ)遺伝子トランスジェニックマウスは慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 71 回日本血液学会学術集会、京都、2009 年 10 月 23-25 日
9. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：レトロウイルス感染における DNA 修復酵素の新たな役割：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
10. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：CD 4 陽性 T 細胞での HBZ 発現は IFN- γ 産生を抑制し、Listeria monocytogenes 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
11. 田口奈々絵、佐藤賢文、Paola Miyazato、片桐晃子、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor トランスジェニックマウスにおける炎症性疾患の解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
12. 佐藤賢文、MIYAZATO Paola、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ)遺伝子トランスジェニックマウスは Foxp3+制御性 T 細胞の機能及びホメオスタシスの異常を示し、慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月 2 日-4 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と
発症危険群へのアプローチ

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター 松田文彦

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により惹起される成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の感受性遺伝子多型の同定を、SNP を用いた全ゲノム関連解析 (GWAS) を用いて試みた。その結果、それぞれの疾患に関して、候補遺伝子多型を複数個同定した。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により惹起される成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の感受性遺伝子多型を解析し発症危険群の同定を目的とする。

B. 研究方法

SNP を用いた全ゲノム関連解析を行い、疾患関連 SNP を同定する。さらに、疾患関連 SNP の生物学的活性の解析：同定された疾患感受性 SNP が発症を促進する機序を明らかにするため、SNP がその分子に付与する機能について解析する。

（倫理面への配慮）

本研究は全て国の倫理指針に基づいた倫理委員会での審議、許可を得ている。また、検体は全て匿名化する。

C. 研究結果

熊本で収集された ATL 患者 258 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 182 検体 (Set1)、鹿児島で収集された HAM 患者 296 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 100 検体 (Set2) の全ゲノム関連解析 (GWAS) を行った。その結果 Set1 に関しては、 $p=2.50 \times 10^{-7}$ をはじめとして、 $p < 1 \times 10^{-5}$ の SNP が 29 個、Set2 に関しては $p=2.00 \times 10^{-6}$ をはじめとして、 $p < 1 \times 10^{-5}$ の SNP が 52 個得られた。

D. 考察

これらの多型は、疾患感受性遺伝子の候補となるものであるが、独立した集団の検体を用いた再現性検証が必須である。そのため、新たに収集された検体を用いた候補多型のタイピングを行い、結果の比較を通して、真の感受性遺伝子の同定を目指す。

E. 結論

ATL、HAM の疾患感受性と関連するゲノム上の多型の候補を複数個同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

HTLV-1 関連脊髄症患者検体バンクの確立と Tax 標的遺伝子の病態作用機序解析

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：琉球大学医学部 齊藤 峰輝

研究要旨： HAM 患者の疾患感受性遺伝子多型解析に用いる検体を可能な限り多く確保し、多型同定後の病態における役割の解明に資するため、臨床情報と検体バンクの整備を試みた。一方、HAM 感受性遺伝子と病態との関連を解析する方法を確立するため、例として HTLV-1 の転写制御因子 Tax により転写活性化される T 細胞副刺激分子 OX40 (CD134) について、HAM 病態形成における意義を明らかにするための解析を試みた。各種ヒト T 細胞株、HAM 患者末梢血単核球における発現量を比較し、HAM 患者剖検脊髄組織の病変局所浸潤細胞における発現の有無を検討した。HAM 患者 PBMC を短時間培養して Tax を発現誘導する系を用いて発現誘導の有無を検討した。その結果、OX40 は非感染 T 細胞株と比較して HTLV-1 感染 T 細胞株において mRNA、蛋白とも高発現していること、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していること、Tax 陽性細胞特異的に発現することを見いだした。これらの解析法は今後明らかにされる新規 HAM 疾患感受性遺伝子の病態における役割の解明に有用であると考えられる。

A. 研究目的

HTLV-1 は世界ではじめてヒト疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) および成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。昨年国立感染症研究所から報告された約 20 年ぶりの全国調査によると、我が国にはいまだに先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、従来多かった九州・沖縄では減少しているものの、都市部では増加していることが明らかになっている。最も予後不良の白血病の一つである ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では約 40%が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。本研究の目的は、HAM 患者の疾患感受性遺伝子多型解析に用いる検体を可能な限り多く確保し、多型同定後、その HAM 病態における役割の解明に資するための研究資源と病態解析法を整備することである。

B. 研究方法

鹿児島大学病院脳神経センター神経内科の協力のもと、合計 100 例の HAM 患者の臨床情報を収集した。同時に、十分な説明と書面による同意を得たのちに末梢血を採取し、血漿、リンパ球 (viable stock)、ゲノム DNA、cDNA を分離・保存した。リンパ球は Histopaque (Sigma) を用いて密度勾配遠

心法にて分離し、AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用してゲノム DNA と total RNA を同時に抽出した。さらに PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写反応を行い鋳型 cDNA を合成した。

一方、ウイルスの転写制御因子 Tax により転写活性化される T 細胞副刺激分子 OX40 (CD134) の HAM 病態形成における意義を明らかにするため以下の実験を行った。まず、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 (MT-1, MT-2, MT-4, C5MJ, HUT102, SLB1)、非感染ヒト T 細胞株 (CEM, Molt-4, Jurkat) および HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) における OX40, OX40L mRNA・蛋白の発現量を RT-PCR・ELISA・フローサイトメトリーで比較した。また、メタロチオネインプロモーター下流に Tax 遺伝子を導入した JPX9 細胞に CdCl₂ を添加して Tax を発現誘導し、その前後で OX40 が Tax 発現に伴って発現誘導されるかどうかについても検討した。さらに、HAM 患者の PBMC を短時間培養して Tax 蛋白を発現誘導する系を用いて、HTLV-1 感染細胞への OX40 発現誘導の有無と抗 OX40 モノクローナル抗体の HTLV-1 感染細胞に対する効果について検討した。最後に、HAM 患者剖検脊髄組織の病変局所浸潤細胞に OX40 が発現しているかどうかについて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は参加各施設の倫理委員会の承諾を得た後に施行した。十分な説明と同意のもと、書面による研究協力承諾書が得られた被験者から採取した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。臨床情報と検体とは非連結匿名化した。

C. 研究結果

100 症例の HAM 患者から主治医の協力のもと匿名で臨床情報を収集した。同時に各患者から末梢血を採取した後に、血漿、リンパ球、ゲノム DNA、cDNA を分離、保存した。リンパ球は viable stock とした。分離したゲノム DNA は HAM 患者の疾患感受性遺伝子多型解析に用いる予定である。また、収集した臨床情報のデータベースは現在作成中であり、各種臨床検査所見・免疫学的検査所見なども含めて充実させる予定である。

一方、HAM 患者における OX40 (CD134) の解析から以下のことを明らかにした。フローサイトメトリーによる解析では、OX40 は HTLV-1 感染細胞株のうち C5MJ, HUT102, MT-2, MT-4, SLB1 に、OX40L は C5MJ, MT-2 に高発現していた (図 1)。JPX9 細胞では、フローサイトメトリー解析で Tax 発現に伴って Tax 陽性細胞特異的に OX40 の発現誘導が認められた (図 2)。一方、ELISA の結果から OX40 は Tax 発現に伴って細胞表面に発現誘導されるのみならず、細胞外にも soluble form として放出されることが明らかになった (図 3)。さらに、HAM 患者の PBMC を短時間培養して Tax 蛋白を発現誘導したところ、JPX9 細胞同様に、OX40 は HAM 患者 PBMC においても HTLV-1 感染細胞特異的に発現誘導が認められた (図 4)。HAM 患者の PBMC 短時間培養系における Tax 蛋白発現誘導に対する抗 OX40 モノクローナル抗体の効果を検討したところ、コントロール抗体と比較して有意に CD4+Tax+細胞の頻度 (図 5) と CD4+細胞中 HTLV-1 プロウイルス量の減少 (Real Time PCR にて定量) を認めた (図 6)。OX40 は未培養の HAM 患者 PBMC には発現が認められなかったが、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していた (図 7)。

D. 考察

OX40 は TNF 受容体スーパーファミリーに

属し、T 細胞活性化の初期段階に誘導される分子である。T 細胞上に発現した OX40 は、抗原提示細胞上の OX40L と結合することで T 細胞と抗原提示細胞間の共刺激分子として機能しており、活性化 T 細胞の effector 機能発現、memory T 細胞誘導等に働いていると考えられている。興味深いことに近年、過剰な OX40-OX40L 結合が Treg の抑制機能を破綻させることで自己免疫疾患を惹起することが報告されており、自己免疫疾患様の慢性炎症性疾患である HAM の病態形成への関与が推測される。今回、OX40 が Tax により HTLV-1 感染細胞に選択的に発現誘導され、HAM 脊髄病変局所浸潤細胞に高発現していたことから、OX40 陽性細胞が HAM の病態形成に積極的な役割を果たしていることが考えられる。また、抗 OX40 モノクローナル抗体により HAM 患者の HTLV-1 感染細胞を in vitro で減少させることが可能であったことから、OX40 は HAM を含む HTLV-1 関連疾患の有望な治療標的分子となりうる可能性が示された。

E. 結論

100例のHAM患者から臨床情報およびに末梢血を採取し、血漿、リンパ球 (viable stock)、ゲノムDNA、cDNAを分離、保存した。OX40 は HAM の病態形成に積極的な役割を果たしており、HAM の有望な治療標的分子となりうる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] Saito M. Immunogenetics of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Inflammation and Regeneration**. 2009 29: 310-316.

[2] Saito M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type 1- (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 2010 Article ID 478461.

[3] 齊藤峰輝
HAM/TSP の病態に関する最近の考え方

2. 学会発表

[1] 第 50 回日本神経学会総会 2009, 5. 仙台
齊藤峰輝、斎藤孔良、大原義朗：HAM, ATL
治療標的候補分子 Bcl-3 の HTLV-1 感染に
よる高発現機構の解析と制御法の検討

[2] 第 49 回日本リンパ網内系学会総会
2009, 7. 淡路

齊藤峰輝：シンポジウム「ATL と HTLV-1
研究の最前線」HAM/TSP の病態

[3] 第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議
2009, 8. 東京

齊藤峰輝、田中礼子、松崎敏男、梅原藤雄、
田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) に
おける OX40 陽性 T 細胞の意義

[4] 第 57 回日本ウイルス学会学術集会
2009, 10. 東京

齊藤峰輝、田中礼子、田中勇悦：HTLV-1
関連脊髄症 (HAM/TSP) における OX40 陽
性 T 細胞の意義

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

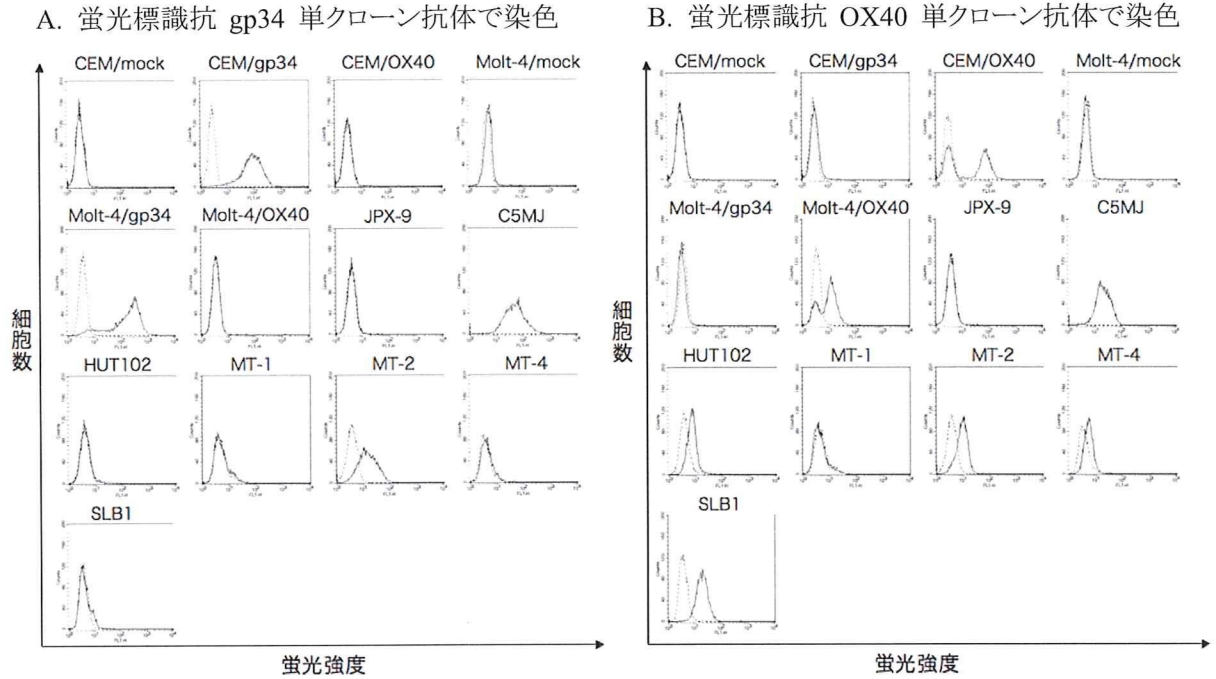
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1: HTLV-1 感染 T 細胞株における OX40 および OX40L (= gp34) の高発現

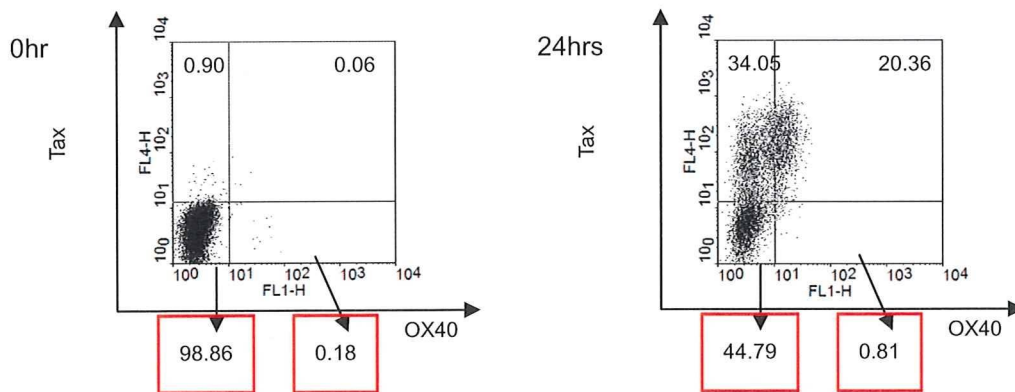


CEM/gp34, CEM/OX40, Molt-4/gp34, Molt-4/OX40: CEM または Molt-4 を親株とした gp34 または OX40 の安定発現細胞株 (stable transformant) - 陽性コントロールとして使用。

破線: Control 抗体 実線: 抗 OX40 or OX40L 抗体

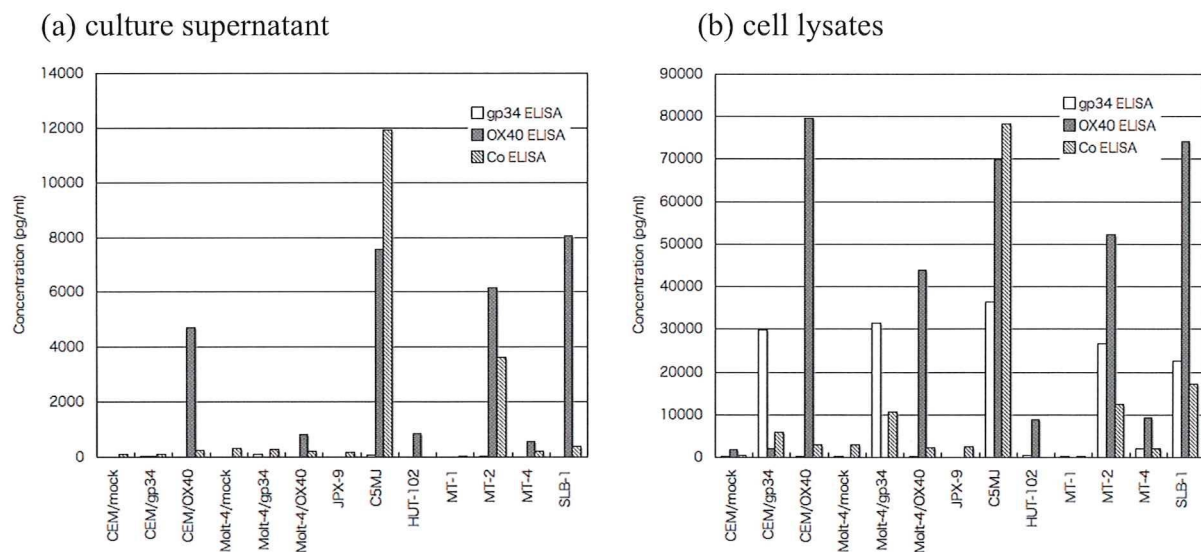
OX40 は HTLV-1 感染細胞株のうち C5MJ, HUT102, MT-2, MT-4, SLB1 に、OX40L は C5MJ, MT-2 に高発現している。

図 2: JPX9 細胞株における OX40 の発現



メタロチオネインプロモーター下流にウイルスの転写制御因子 Tax 遺伝子を導入した JPX9 細胞に CdCl₂ を添加して Tax を発現誘導し、その前後で OX40 が Tax 発現に伴って発現誘導されるかどうかについて検討した。JPX9 細胞では、Tax 発現に伴って Tax 陽性細胞特異的に OX40 の発現誘導が認められた。

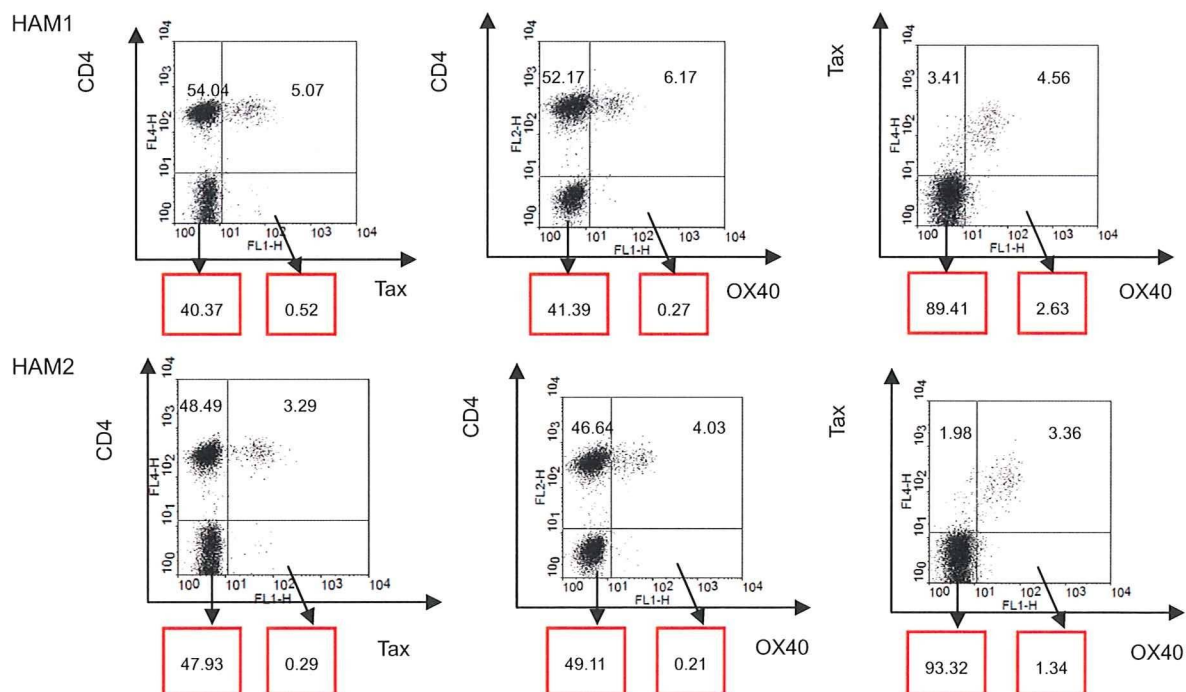
図 3: 各種 T 細胞株における OX40 の発現 (ELISA)



Co ELISA: OX40-OX40L (gp34) complex ELISA (複合体を検出)

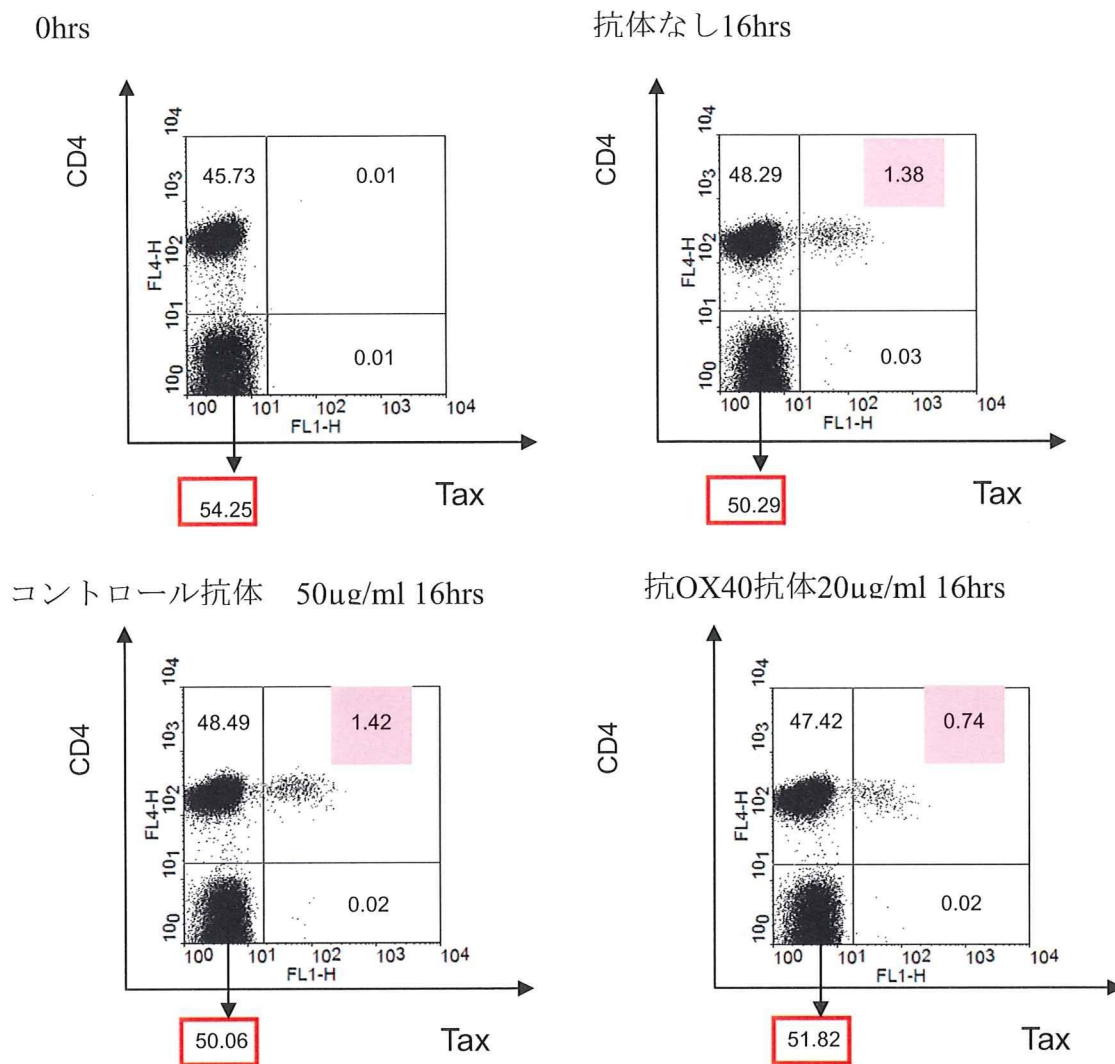
OX40 は Tax 発現に伴って誘導され細胞表面に発現するのみならず、細胞外(培養上清中)に soluble form として放出される。一方、OX40 (gp34) は細胞外(培養上清中)にはほとんど放出されない。

図 4: 各種 T 細胞株における OX40 の発現 (ELISA)



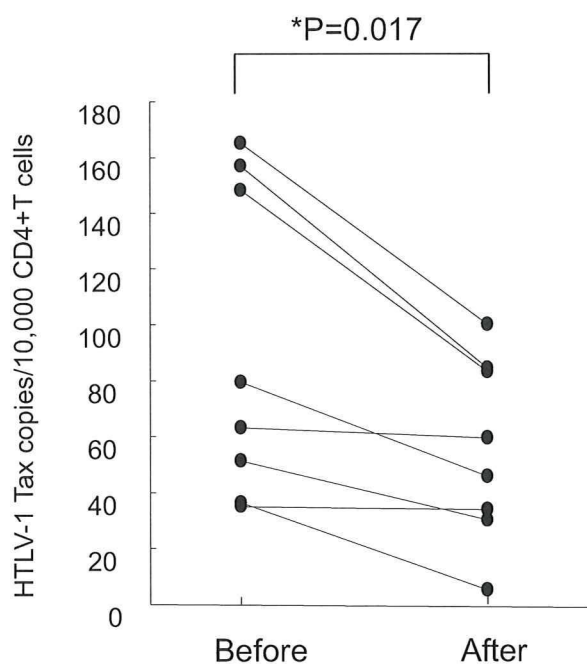
HAM 患者の PBMC を 16 時間培養して Tax 蛋白を発現誘導したところ、OX40 は JPX9 細胞と同様に HAM 患者 PBMC においても HTLV-1 感染細胞特異的に発現誘導される。

図 5: HAM 患者 PBMC in vitro 培養系における抗 OX40 抗体による Tax 発現の抑制



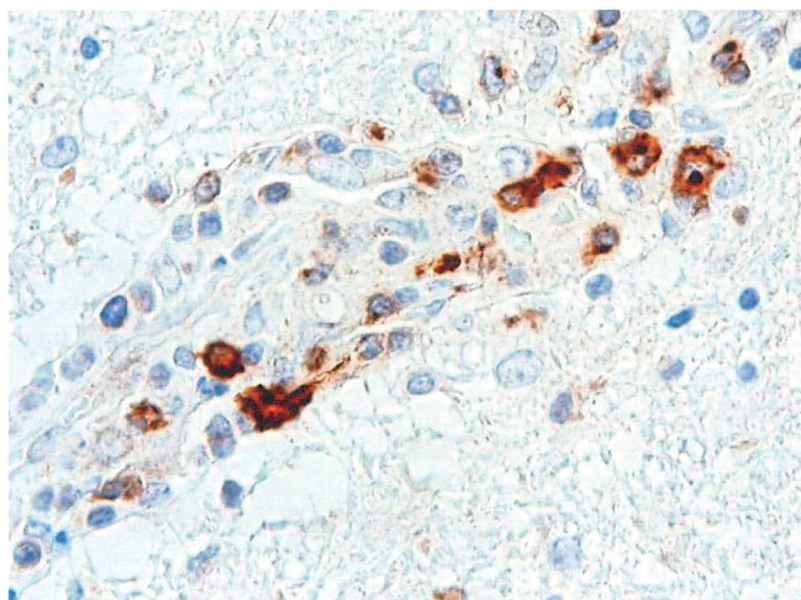
HAM 患者の PBMC を 16 時間培養すると、主に CD4 陽性 T リンパ球に Tax 蛋白発現が誘導される。この系に抗 OX40 モノクローナル抗体を添加すると、コントロール抗体 (抗 HIV-1 p24 抗体) と比較して CD4+Tax+細胞 (HTLV-1 感染細胞) が減少した。

図 6: HAM 患者 PBMC 短時間培養系における抗 OX40 抗体による感染細胞数の減少



HAM 患者 PBMC を 16 時間培養し、その前後で CD4+T 細胞を分離して HTLV-1 プロウイルス量を Real Time PCR 法で定量した。*: Wilcoxon signed-ranks test で検定。

図 7: HAM 患者脊髄病変・血管周囲の浸潤細胞における OX40 の強発現



OX40 は未培養の HAM 患者 PBMC には発現が認められなかった (data not shown) が、HAM 患者剖検脊髄標本の免疫組織染色では病変局所浸潤細胞に強発現していた。

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と
発症危険群へのアプローチ

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：熊本大学医学部附属病院 野坂 生郷

研究要旨

成人 T 細胞白血病の発症危険群の同定に関与すると考えられる免疫機構の解析として成人 T 細胞白血病細胞と制御性 T 細胞の違いについて解析した。制御性 T 細胞は腫瘍細胞とは違う集団もあることが示唆され、細胞免疫の制御の可能性が考えられた。

A. 研究目的

HTLV-I 感染によって惹起される成人 T 細胞白血病は、その発症率の低さより宿主因子の遺伝的背景あるいは免疫状態の違いがあると考えられ、その解明は発症危険群の同定に近づくことができる可能性はあると考える。成人 T 細胞白血病細胞と制御性 T 細胞の違いについて解析した。

B. 研究方法

成人 T 細胞白血病患者より抽出した単核球を使い、各病型における制御性 T 細胞の検出、ウイルス蛋白である Tax の発現を解析し、制御性 T 細胞の割合と免疫機構の一つである細胞障害性 T 細胞の機能について検討した

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言、臨床研究における倫理指針を遵守し、当施設の倫理委員会の承認を受け、患者に説明文書を使い、説明を行い、同意を得た。

C. 研究結果

制御性 T 細胞のマーカーである FoxP3 の発現頻度と CD25 の発現程度は成人 T 細胞白血病症例では関連性が認められなかった。また慢性型の症例の長期経過における解析では、CD4 陽性、CD25 陽性細胞の増減、さらに CD4 陽性、FoxP3 陽性細胞は一定であった。また、FoxP3 の発現頻度は細胞障害性 T 細胞の機能に対して制御的に機能することがわかった。

D. 考察

HTLV-I 感染から成人 T 細胞白血病発症ま

での発症機序についてはまだ不明なところが多く、特に宿主の遺伝的背景や発症危険における免疫的な解明が必要である。今回、宿主の免疫機構の一つの現象であると考えられる FoxP3 の発現を解析することで、腫瘍細胞との違いが示唆され、細胞免疫の制御を司っている可能性が考えられた。

E. 結論

制御性 T 細胞は腫瘍細胞とは違う集団もあることが示唆され、細胞免疫の制御の可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

臨床検体は数 mL の末梢血採取のみであり、貧血等が起る可能性はなく、また通常の検査採血と同時に行った。本研究における健康危険はないものとする。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toulza F, Nosaka K, et al. FoxP3+ regulatory T cells are distinct from leukemia cells in HTLV-I-associated adult T-cell leukemia Int J Cancer 125; 2375-82, 2009

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, <u>Matsuoka M.</u>	Human T-cell leukemia virus type 1 bZ IP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B.	Blood	113	2755-2764	2009
Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, <u>Matsuoka M.</u> , Ohara Y.	In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).	Retrovirology	6	19	2009
Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogasawa T, <u>Matsuoka M.</u> , Matsumoto T, Mesnard JM, Yasukawa M.	HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes.	J Gen Virol	90	1806-1811	2009
Sato H, Oka T, Shinou Y, Kondo T, Washio K, Takanoto M, Takata K, Morito T, Huang X, Tamura M, Kitamura Y, Ohara N, Ouchida M, Oshima K, Shimizu K, Tanimoto M, Takahashi K, <u>Matsuoka M.</u> , Utsunomiya A, Yoshino T.	Multi-step aberrant CpG island hypermethylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL).	Am J Pathol	176	402-415	2010

Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B

Tiejun Zhao,¹ Jun-ichirou Yasunaga,¹ Yorifumi Satou,¹ Mitsuyoshi Nakao,² Masahiko Takahashi,³ Masahiro Fujii,³ and Masao Matsuoka¹

¹Laboratory of Virus Control, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto; ²Department of Regeneration Medicine, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto; and ³Division of Virology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

Adult T-cell leukemia (ATL) is a highly aggressive T-cell malignancy caused by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1). The activation of NF- κ B by Tax has been reported to play a crucial role in HTLV-1-induced transformation. The HTLV-1 bZIP factor (HBZ), which is encoded by an mRNA of the opposite polarity of the viral genomic RNA, is involved in both T cell proliferation and suppression of Tax-mediated viral gene transcrip-

tion, suggesting that HBZ cooperates closely with Tax. In the present study, we observed that HBZ specifically suppressed NF- κ B-driven transcription mediated by p65 (the classical pathway) without inhibiting the alternative NF- κ B signaling pathway. In an immunoprecipitation assay, HBZ bound to p65 and diminished the DNA binding capacity of p65. In addition, HBZ induced p65 degradation through increasing the expression of the

PDLIM2 gene, which encodes a ubiquitin E3 ligase for p65. Finally, HBZ actually repressed the transcription of some classical NF- κ B target genes, such as *IL-8*, *IL2RA*, *IRF4*, *VCAM-1*, and *VEGF*. Selective suppression of the classical NF- κ B pathway by HBZ renders the alternative NF- κ B pathway predominant after activation of NF- κ B by Tax or other stimuli, which might be critical for oncogenesis. (Blood. 2009;113:2755-2764)

Introduction

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is an oncogenic retrovirus that causes adult T-cell leukemia (ATL).¹⁻⁴ A unique sequence was found in the viral genome between *env* and the 3' long terminal repeat (LTR). Denoted the pX region, this sequence encodes the regulatory and accessory genes: *tax*, *rex*, *p12*, *p13*, and *p30*.⁵ Among the proteins encoded by these genes, Tax has been thought to play a central role in the leukemogenesis of ATL because of its pleiotropic actions.^{6,7} Another gene, the HTLV-1 bZIP factor (*HBZ*) gene, is encoded by an mRNA of the opposite polarity of the viral genomic RNA.⁸⁻¹⁰ Two major isoforms of the *HBZ* gene transcript have been reported: spliced *HBZ* (*sHBZ*) and unspliced *HBZ* (*usHBZ*).¹¹⁻¹³ Only *sHBZ* is abundantly expressed.¹⁴ *HBZ* was found to inhibit Tax-mediated transactivation of viral transcription from the 5'LTR by heterodimerizing with c-Jun and CREB2.¹⁵⁻¹⁷ In addition, *sHBZ* RNA promotes proliferation of ATL cells.¹¹

Tax-mediated nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation plays a pivotal role in the transforming activity of HTLV-1.¹⁸ Activation of NF- κ B by Tax involves both the classical and alternative pathways, which use the NF- κ B precursor proteins p105 (NF- κ B-1) and p100 (NF- κ B-2), respectively. These proteins are processed to the mature p50 NF- κ B-1 and p52 NF- κ B-2 proteins that heterodimerize with other members of the NF- κ B family, RelA (p65), c-Rel, or RelB. Tax activates the classical pathway by interacting with IKK γ ,^{19,20} which stimulates the phosphorylation of IKK α and IKK β ; phosphorylated IKK α and IKK β then induce the degradation of I κ B by the proteasome,²¹ leading to the release of p50/p65 from I κ B. Tax also triggers activation of the alternative pathway downstream of NF- κ B-

inducing kinase (NIK) by activating IKK α via IKK γ and recruiting IKK α to p100, resulting in enhanced processing to p52.²² In both pathways, the mature dimeric NF- κ B proteins translocate to the nucleus and activate genes involved in anti-apoptosis, cell proliferation and angiogenesis. Although NF- κ B-1 and NF- κ B-2 have similar structures, recent studies strongly suggest that the classical and alternative pathways are involved in the expression of different genes: the classical pathway is mostly involved in innate immunity and inflammatory responses, while the alternative pathway is involved in adaptive immunity and the organogenesis of peripheral lymphoid tissues.^{23,24}

NF- κ B is activated in many viral infections, and is thought to be important in the protective response of the host to the viral pathogens. Thus, many viruses have evolved distinct strategies to attenuate NF- κ B activation. Known mechanisms of NF- κ B suppression in virus-infected cells include (1) inhibition of the IKK activity and I κ B phosphorylation,²⁵ (2) inhibition of the NF- κ B nuclear translocation,²⁶ (3) induction of the caspase-mediated cleavage of the RelA subunit,²⁷ and (4) inhibition of NF- κ B RelA transcriptional activation through protein-protein interaction.²⁸

Although NF- κ B activation by Tax has been reported, it remains unknown whether other viral proteins act on the NF- κ B pathway. In this study, we report that HBZ inhibits NF- κ B activity by inhibiting p65 DNA binding capacity and promoting expression of PDLIM2 E3 ubiquitin ligase, which results in p65 degradation. This HBZ mediated suppression of the classical NF- κ B pathway results in decreased expression of some genes associated with innate immunity and inflammatory responses.

Submitted June 5, 2008; accepted November 19, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 8, 2008; DOI 10.1181/blood-2008-06-161729.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

The online version of this article contains a data supplement.

© 2009 by The American Society of Hematology

Methods

Cell culture

Jurkat cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Jurkat and Kit 225 cells stably expressing sHBZ were maintained as described previously.¹¹ 293FT and HeLa cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418.

Plasmids

The κB -Luc construct contains 5 tandem repeats of an NF- κB binding site from the IL-2R α -chain gene linked to the firefly luciferase gene. The AP-1-Luc construct contains 2 copies of the IL-8 AP-1 binding site upstream of the IL-8 enhancer-less core promoter linked to the luciferase gene.²⁹ pSRF-Luc was purchased from Stratagene (Heidelberg, Germany). pRL-TK was purchased from Promega (Madison, WI). Expression vectors for usHBZ and sHBZ deletion mutants were generated by PCR using pME18Sneo-HBZ as a template.¹¹ These fragments were subcloned into pME18Sneo and pcDNA3.1/myc-His(-) (Invitrogen, Carlsbad, CA). The coding region of IKK γ and p50 were amplified by RT-PCR from total RNA derived from Jurkat cells and cloned into the vector pCMV-HA. To construct vectors expressing wild type and deletion mutants of p65, we amplified the coding sequence from Jurkat cell cDNA and subcloned it into the pCMV-Tag 2 vector. The pEF-p52 expression vector, pCGN-HA-ubiquitin, pCG-Tax, pCG-Tax M47 (Tax mutant unable to activate the CREB/ATF pathway), and pCG Tax M22 (Tax mutant defective for NF- κB activation) were described elsewhere.³⁰⁻³²

Luciferase assay

Jurkat cells were plated on 6-well plates at 3.5×10^5 cells per well. After 24 hours, cells were transfected with the indicated luciferase reporter plasmid and expression plasmid, and/or empty expression vector (to normalize the DNA dose) mixed with Transfectin (Bio-Rad, Hercules, CA). After 48 hours, cells were collected and luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Luciferase values were normalized to renilla luciferase and expressed as the mean of a triplicate set of experiments plus or minus SD.

Measurement of phosphorylation of I κ B α

The FunctionELISA I κ B α assay was performed according to the manufacturer's instructions (Active Motif, Carlsbad, CA) using 100 μg freshly prepared cytoplasmic protein extract from the samples.

Immunoprecipitation and immunoblotting

To examine protein-protein interaction in 293FT cells, subconfluent cells were transfected with the indicated combinations of expression vectors. Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer 48 hours later (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.5% Nonidet P-40, and protease inhibitors). Lysates were pre-cleared by incubation with 20 μl of 50% slurry of protein G-agarose (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) for 30 minutes at 4°C. Pre-cleared cell lysates were incubated with anti-HA (clone 3C2) (MBL, Nagoya, Japan), anti-c-Myc (clone 9E10, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) antibodies for 1 hour at 4°C, and immune complexes were collected by incubation for 1 hour at 4°C with protein G-agarose. After extensive washing, immunoprecipitated proteins were resolved by 5% to 20% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with HRP-conjugated anti-FLAG (Sigma-Aldrich), anti-His-Tag (PM002, MBL), anti-Tax or anti-HA (Sigma-Aldrich) antibodies. Membranes were developed with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare Life Sciences). Other antibodies used were as follows: anti-mouse ImmunoglobulinG (IgG) and anti-rabbit IgG were from GE Healthcare Life Sciences; anti-Sp1 and anti-lamin B were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Immunofluorescence analysis

HeLa cells were transfected with expression vectors using Lipofectamine LTX (Invitrogen). Thirty-six hours after transfection, cells were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) plus ionomycin for 8 hours. sHBZ protein was detected using anti-c-MYC Cy3 (clone 9E10³ Sigma-Aldrich). p65 was detected using anti-Flag-biotin (Sigma-Aldrich) and secondary Streptavidin-Alexa 488 antibody (Invitrogen). Fluorescence was observed with a $63\times/1.4\text{-}0.60$ HCX PL APO objective on a DMIRE2-TCS SP2 AOBs confocal microscope system (Leica, Wetzlar, Germany) as described.¹⁷ Images were acquired and analyzed using LCS 2.61 (Leica) and processed using Photoshop CS2 (Adobe Systems, San Jose, CA).

NF- κB DNA-binding activity assay

Nuclear extracts were prepared using the NucBuster Protein Extraction Kit (Novagen, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The DNA-binding activity of NF- κB was assayed colorimetrically, using the NoShift Transcription Factor Assay Kit and NoShift NF- κB (p65) reagents (Novagen) according to the manufacturer's instructions. To assess sequence-specific binding activity, we incubated 15 μg of nuclear extract with various combinations of biotinylated NF- κB wild-type dsDNA, specific NF- κB competitor dsDNA lacking biotin end labels, and nonspecific, nonbiotinylated dsDNA with a mutant NF- κB consensus binding motif. All assays were performed in triplicate.

Measurement of apoptotic cell death

For detection of apoptosis, the annexin V-binding capacities of the treated cells were examined by flow cytometry using an annexin V-PE Apoptosis Detection Kit (Biovision, Mountain View, CA), according to the manufacturer's instructions.

Ubiquitination assay

To analyze the ubiquitination of p65, we transfected 293FT cells with expression plasmids encoding FLAG-tagged p65, HA-tagged ubiquitin and mycHis-tagged wild type or mutant sHBZ. Extracts were incubated with anti-FLAG antibodies plus protein G-agarose, washed 5 times, and analyzed by immunoblot with anti-HA antibody.

Synthesis of cDNA and semiquantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using Trizol Reagent (GIBCO, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. We reverse transcribed 1 μg of total RNA into single-stranded cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Using the forward (F) and reverse (R) primers specific to the target genes, the cDNA was amplified by increasing number of PCR cycles. The primers used for this study are shown in Table S1 (available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). The intensity of PCR-amplified band was quantified using ATTO densitography 4.0 (Atto Instruments, Tokyo, Japan). The mRNA level of each product was normalized to the level of *GAPDH* and calculated as a ratio to the level of the control. Representative results of 3 independent experiments are shown.

Small interfering RNA (siRNA) transfection

siRNA targeted to human *PDLIM2* was synthesized according to a previous report.³³ 293FT cells were transfected with expression vectors and siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Western blotting with anti-PDLIM2 antibody (Abnova, Taipei, People's Republic of China) detected PDLIM2 protein 48 hours after transfection.

sHBZ transgenic mice

Transgenic mice expressing the spliced *HBZ* gene under control of CD4 specific promoter/enhancer/silencer have been reported previously.¹¹ CD4⁺ cells were isolated from mice thymus using anti-mouse CD4 particles-DM (BD Biosciences, San Jose, CA) according to the manufacturer's instructions. The experiments and protocols used were approved by the

Animal Use and Care Committee of the Institute for Virus Research at Kyoto University.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the unpaired Student *t* test.

Results

HBZ inhibits the classical NF-κB signaling pathway

To analyze the possible involvement of HBZ in several signaling pathways in ATL, we first evaluated whether HBZ could influence the AP-1, SRF and NF-κB pathways, which are activated by the Tax protein,^{34,35} using a transient transfection assay. There are 2 isoforms of the *HBZ* gene: spliced and unspliced *HBZ*. In most of the experiments, we used *sHBZ*, because the protein derived from *sHBZ* is more abundant and potent than that of *usHBZ*.¹⁴ As shown in Figure 1A, the expression of *sHBZ* did not affect Tax-mediated effects using SRF reporter. Consistent with the previous report, *sHBZ* has ability to suppress Tax-induced AP-1 activation, and its inhibitory effect was more significant than that of *usHBZ* (Figure 1B). In addition, *sHBZ* suppressed p65 mediated NF-κB activation in a dose-dependent manner (Figure 1C).

Tax has been reported to activate NF-κB by several mechanisms.³⁶ *sHBZ* might have a negative regulatory effect on Tax-mediated NF-κB activation. When co-expressed, *sHBZ* dramatically repressed κB-Luciferase expression activated by wild type Tax and Tax M47 mutant (Figure 2A,B). However, because Tax M22 mutant did not activate NF-κB, HBZ expression had no effect. The NF-κB suppressive effect mediated by *usHBZ* was much weaker than that mediated by *sHBZ*. Although we previously reported that *sHBZ* RNA was responsible for growth-promoting activity,¹¹ *sHBZ* RNA did not influence NF-κB (Figure 2A, TTG-HBZ), indicating that HBZ protein has the suppressive function on NF-κB. On the other hand, overexpression of Tax overcame the *sHBZ*-mediated suppression of NF-κB transcriptional activation (Figure 2C).

It has been reported that activation of the classical NF-κB pathway by Tax is mediated by its ability to physically bind to IKKγ, which results in enhanced phosphorylation and subsequent degradation of IκB.²¹ We analyzed whether *sHBZ* could modulate the Tax-driven phosphorylation of IκBα using a FunctionELISA kit (Figure 2D). No effects on the Tax-up-regulated phosphorylation level of IκBα were observed when cells were cotransfected with *sHBZ*. In addition, we investigated whether HBZ influenced the interaction between Tax and IKKγ. 293FT cells were transfected with various combinations of Tax, HA-tagged IKKγ and mycHis-tagged *sHBZ* expression vectors. As shown in Figure 2E, *sHBZ* did not interfere with the formation of Tax/IKKγ complexes, and there was no obvious binding of *sHBZ* to IKKγ or Tax.

Two main pathways control the nuclear translocation of NF-κB: the classical and alternative NF-κB pathways.³⁶ Recently, constitutive activation of the alternative NF-κB pathway has been reported in several lymphoid malignancies, where it may play a critical role.³⁷ We next analyzed the effect of *sHBZ* on the alternative (p52 mediated) pathway of NF-κB activation. Figure 3A demonstrates that *sHBZ* was not capable of suppressing p52-mediated NF-κB activation. In addition, *sHBZ* had no remarkable effect on Tax-mediated up-regulation of p52 and its precursor protein p100 (Figure 3B). Thus, HBZ-mediated suppression of NF-κB activation occurs via inhibition of the classical pathway.

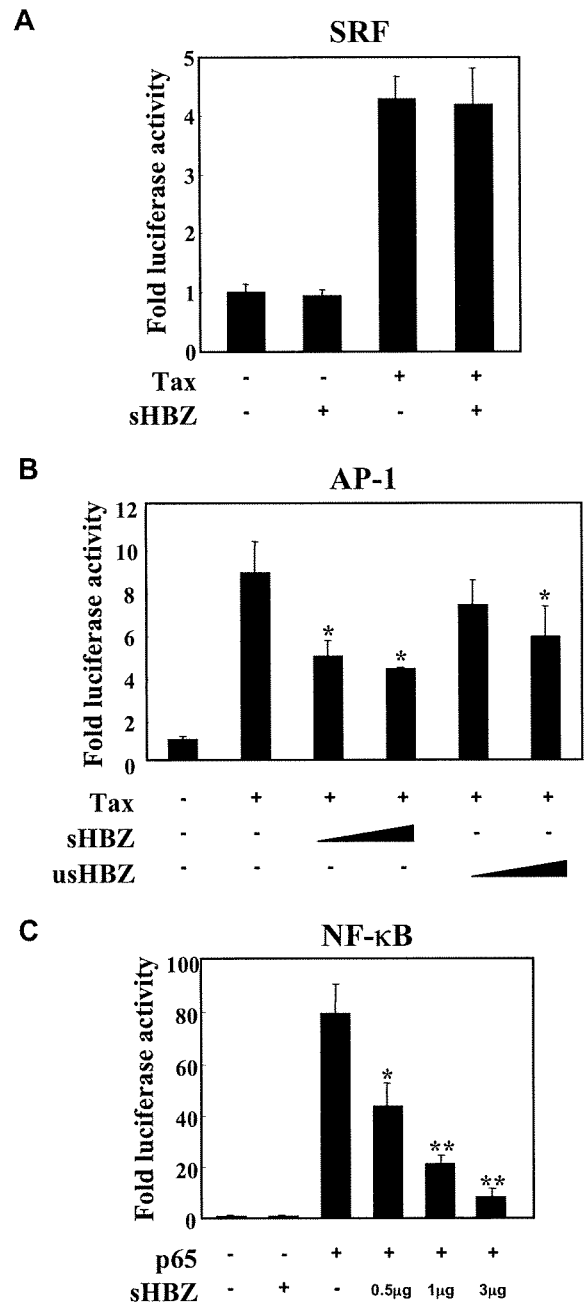


Figure 1. sHBZ inhibited NF-κB and AP-1 activation but did not influence the SRF pathway. Jurkat cells were cotransfected with pRL-TK and reporter plasmid pSRF-Luc (A), AP-1-Luc (B), or κB-Luc (C), respectively, with or without 1 or 3 μg pME18Sneo-sHBZ and 1 μg pCG-Tax (A,B) or 1 μg pCMV-Tag 2-p65 (C). The total amount of DNA for transfection was equalized by adding empty vectors. After 48 hours, a dual luciferase reporter assay was performed as described in "Methods." All the data shown are relative values of firefly luciferase normalized to Renilla luciferase and expressed as mean of a triplicate set of experiments (± SD). **P* < .05; ***P* < .01.

Domains of sHBZ responsible for suppression of NF-κB p65

Next, we sought to identify the region of *sHBZ* responsible for the repression of NF-κB activation. To this end, we tested the *sHBZ* deletion mutants shown in Figure 4A. As shown in Figure 4B, wild-type *sHBZ* dramatically down-regulated p65-mediated NF-κB activation. Compared with other mutants, only the *sHBZ*-AD+bZIP mutant exhibited weak suppressive activity.

Accumulating evidence shows that the interaction between bZIP proteins and Rel family proteins affects their subcellular

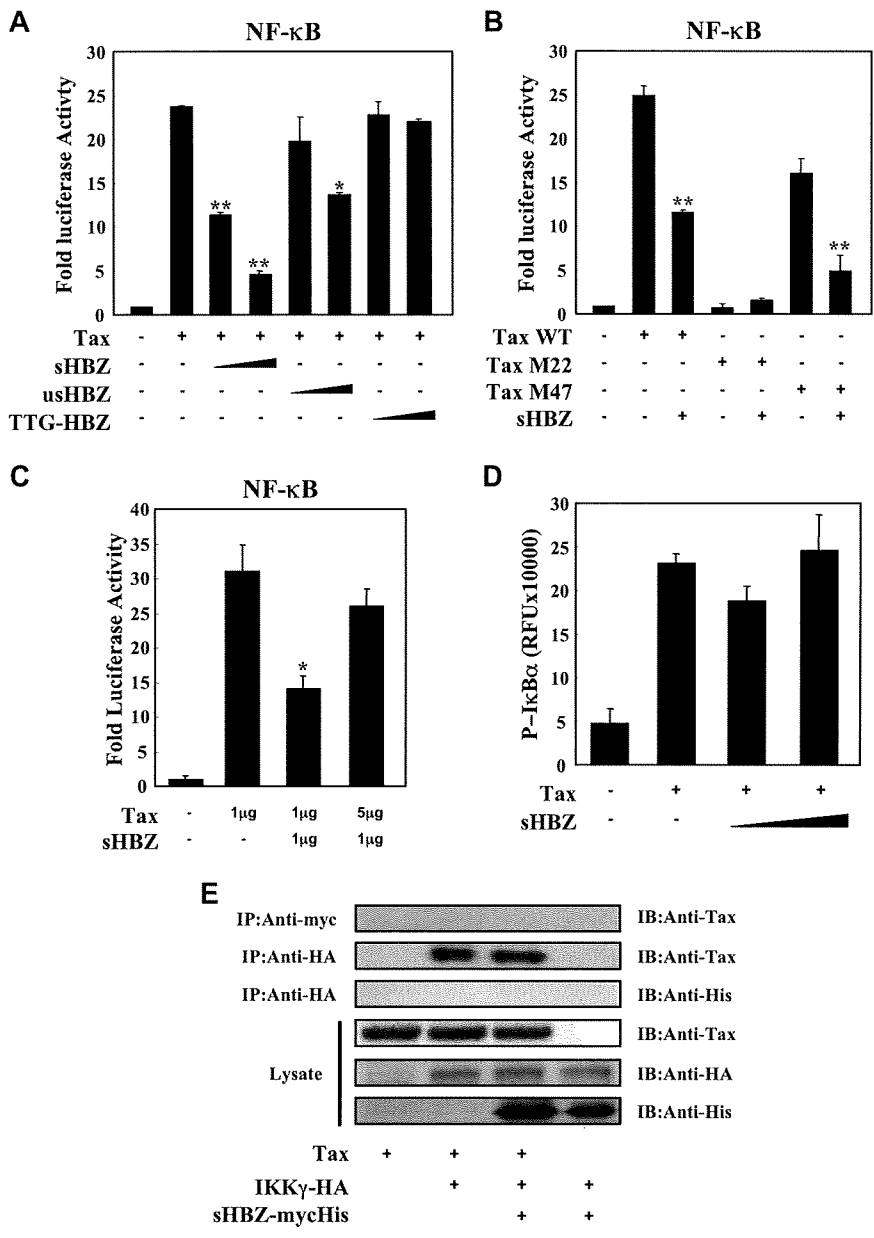


Figure 2. sHBZ suppressed Tax-mediated NF-κB activation but did not interfere with the Tax/IKKγ complex. (A,B) sHBZ repressed Tax-induced NF-κB activation. Jurkat cells were cotransfected with κB-Luc and phRL-TK, with or without 1 μg pCG-Tax, pCG-Tax M47, pCG Tax M22, and with 1 or 3 μg pME18Sneo-sHBZ, usHBZ, or TTG-HBZ. After 48 hours, luciferase activity was measured. (C) Tax overexpression overcame sHBZ-mediated suppression of NF-κB activation. Jurkat cells were cotransfected with κB-Luc and phRL-TK, with or without pCG-Tax and pME18Sneo-sHBZ. The total amount of DNA was equalized by adding empty vectors. (D) sHBZ could not modulate the Tax-driven phosphorylation of IκBα. Jurkat cells were transfected with pCG-Tax and pME18Sneo-sHBZ. Cell lysates were subjected to FunctionELISA IκBα assay. (E) sHBZ did not influence the interaction between Tax and IKKγ. 293FT cells were transfected with the indicated cDNA expression constructs. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-c-Myc and anti-HA followed by immunoblotting (IB) using anti-Tax or anti-His, respectively. The expression levels of Tax, IKKγ and sHBZ were analyzed. **P* < .05; ***P* < .01.

localization and modulates transcription activation.^{38,39} Therefore, we investigated whether sHBZ can physically interact with NF-κB p65. 293FT cells were transfected with vectors expressing sHBZ and p65. Figures 4C through E illustrate the physical binding between sHBZ and p65 or p50. HBZ has 3 domains, an activation domain (AD), a central domain (CD) and a basic leucine zipper domain (bZIP). To determine which portion of sHBZ is necessary for the binding with NF-κB p65 protein, we performed a coimmunoprecipitation assay. Three mutants (sHBZ-ΔAD, sHBZ-ΔbZIP, and sHBZ-AD+bZIP) could bind to p65 (Figure 4C), indicating that at least 2 of 3 main domains in sHBZ were necessary for the binding between sHBZ and p65. However, only sHBZ-AD+bZIP could suppress NF-κB activation as shown in Figure 4B, indicating the significance of AD and bZIP domains for binding with p65.

To determine which part of p65 protein is necessary for binding with sHBZ, we tested the ability of a series of FLAG-tagged truncated p65 proteins to interact with the full length of sHBZ (Figure 4D). The p65 (313-551) mutant, which did not contain the

Rel homology domain, was incapable of interacting with the sHBZ protein. The truncated p65, 1 to 320, which lacked the transactivation domain but remained the Rel homology domain, still interacted efficiently with sHBZ. We conclude that sHBZ interacts with the Rel homology domain of p65. Next, we studied the binding of sHBZ to p50 by immunoprecipitation. As shown in Figure 4E, HBZ did not bind to p50, and did not interfere with the binding between p65 and p50.

The HBZ-p65 interaction was further investigated by confocal microscopy. HBZ exhibited a granular speckles pattern as previously reported¹⁵ (Figure 4Fi). After stimulating with PMA/ionomycin, the cotransfected cells showed nuclear spots representing colocalization of sHBZ and p65 (Figure 4F iii-v, vi-viii).

Because sHBZ interacts with p65, we studied whether sHBZ inhibits the ability of p65 to bind the κB binding site. As expected, sHBZ dramatically decreased p65 DNA binding capability (Figure 4G). Furthermore, analysis using deletion mutants of sHBZ revealed that sHBZ-AD+bZIP could also decrease the binding of

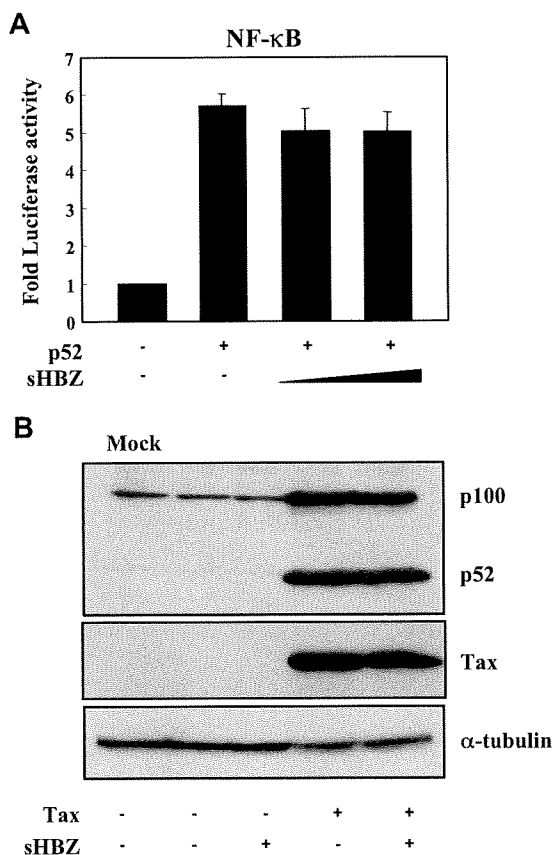


Figure 3. sHBZ did not affect alternative NF- κ B pathway. (A) The effect of sHBZ on p52-mediated alternative NF- κ B activation. Jurkat cells were cotransfected with κ B-Luc, pRL-TK, pEF-p52, and pME18Sneo-sHBZ. Luciferase levels were measured after 48 hours. (B) sHBZ did not influence p52 and p100 expression. Jurkat cells were cotransfected with vectors that express Tax and sHBZ. After 48 hours, cell lysates were then subjected to immunoblot with anti-p52, Tax, and α -tubulin.

p65 protein to DNA. The suppressive effects of deletion mutants lacking AD or bZIP were not statistically significant. This result suggests that both AD and bZIP domains are important for the inhibition of p65 binding to its target sequence, and coincides with the results of the luciferase assay.

Taken together, these observations demonstrate that sHBZ represses p65-induced transcription through direct physical association between sHBZ and p65 via the AD and bZIP domains, and this interaction inhibits the binding of p65 to target sites in DNA.

HBZ promotes p65 degradation through a ubiquitination-dependent pathway

A previous report showed that HBZ could bind to c-Jun, and decrease c-Jun protein via proteasome dependent mechanism.¹⁷ Therefore, we analyzed whether sHBZ could also affect the turnover of NF- κ B p65 protein. Expression of sHBZ repressed the level of p65 protein in a dose-dependent manner (Figure 5A). To determine which domain of sHBZ is responsible for the down-regulation of p65 protein levels, we analyzed the level of p65 when co-expressed with each of the sHBZ mutants (Figure 5B). The level of p65 was slightly decreased when the sHBZ-AD+bZIP mutant was expressed, again suggesting that the AD and bZIP domains of sHBZ are required for suppression of p65. By semiquantitative RT-PCR, we confirmed that the level of p65 mRNA did not differ when co-expressed with sHBZ and its mutants (Figure 5B). Taken together, these results demonstrated that sHBZ reduced the level of p65 protein by acting at a posttranscriptional level.

To further elucidate the mechanism by which sHBZ reduces the amount of p65, we measured p65 levels after blocking caspase activity because caspase-mediated cleavage of the NF- κ B p65/RelA subunit has been reported as a mechanism of decreasing p65 levels.²⁷ The activity of z-VAD-fmk caspase inhibitor was confirmed by the finding that z-VAD-fmk could block apoptosis induced by TNF α (Figure 5C). Treatment with z-VAD-fmk caspase inhibitor did not change the down-regulation of p65 by sHBZ (Figure 5C top panel), indicating that caspase-mediated cleavage of p65 was not involved in this inhibitory effect.

Protein ubiquitination is a crucial modification, which induces degradation of proteins in the proteasome and controls the activity of many signaling molecules, including transcription factors such as p53, c-Jun, and p65.⁴⁰⁻⁴² We therefore studied whether expression of sHBZ could induce the polyubiquitination of p65 and trigger the degradation of p65 protein. Immunoprecipitation studies showed that expression of sHBZ induced heavy ubiquitination of p65 (Figure 5D). In the presence of a proteasome inhibitor, sHBZ remarkably accelerated the ubiquitination of p65 (Figure 5D). This effect was far stronger than that of usHBZ (Figure 5E). Analysis of sHBZ deletion mutations showed that only sHBZ-AD+bZIP induced polyubiquitination of p65, while other mutants had no effect on p65 ubiquitination (Figure 5E).

Several ubiquitin E3 ligases have been shown to specifically induce the ubiquitination of p65, including *SOCS-1*, *Cul2*, *Elongin B/C*, and *PDLIM2*.^{41,43-45} To identify the ubiquitin E3 ligase responsible for polyubiquitination of p65 in Kit 225 cells, we analyzed transcriptional profiles of these ubiquitin E3 ligase genes in sHBZ-transfected and control cells. Expression of these candidate genes was analyzed by semiquantitative RT-PCR with different cycles of amplification, which indicated that transcription of the *PDLIM2* gene was up-regulated in sHBZ-transfected Kit 225 and 293FT cells (Figure 6A).

To confirm whether increased PDLIM2 expression is associated with degradation of p65, we suppressed PDLIM2 expression by siRNA. When PDLIM2 expression was inhibited, p65, decreased by sHBZ, partially recovered, indicating that PDLIM2 acts in the degradation of p65 induced by sHBZ (Figure 6B). A previous report showed that PDLIM2 targets p65 to discrete intranuclear compartments (insoluble nuclear fraction) where polyubiquitinated p65 is degraded by the proteasome.⁴¹ We measured p65 levels in soluble and insoluble nuclear fractions of 293FT cells transfected with p65 and sHBZ expression vectors. The down-regulation of p65 protein in the insoluble nuclear fraction was more significant than that in the soluble fraction. Moreover, p65 levels in the insoluble fraction, but not in the soluble fraction, were partially restored by MG132 treatment (Figure 6C). These observations suggested that the insoluble p65 mainly underwent proteasomal degradation and were consistent with the idea that sHBZ acts on p65 levels via PDLIM2. It remains to be elucidated whether HBZ accelerates the ubiquitination of p65 by PDLIM2 in addition to increasing the expression of the *PDLIM2* gene.

sHBZ partially represses selected classical NF- κ B target genes

It is well established that the activation and translocation of NF- κ B is associated with increased transcription of genes encoding chemokines, cytokines, adhesion molecules, and inhibitors of apoptosis. Recent studies showed that the classical and alternative pathways of NF- κ B influence the expression of different sets of genes.²⁴ Because HBZ suppresses the classical NF- κ B pathway, we checked the effect of sHBZ on the expression of p65-specific target genes using Jurkat cells stably expressing sHBZ. Expression of