

む)

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきこ

平成25年度 厚生労働科学省研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発」  
課題番号：H23-新興-一般-028  
分担研究報告書

分担研究課題：ZFNによるヒトゲノム毒性評価にかかる実験系の構築

研究分担者 武田 哲 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

**研究要旨** HTLV-1 感染症に対して根本的な治療法は存在しない。プロウイルスウイルスを不可逆的に不活化する方法があれば新たな治療法の基盤を提供できると考えられる。前年度までに我々はHTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素 ZFN が根治を達成する可能性を秘めた分子であることを実証してきた。作用機序の詳細を解析し治療効果を増強させるためには同調的な発現制御系の確立が欠かせない。本年度はこれを達成するための実験系構築を目指した。小分子化合物による発現制御系として代表的な Tet on 系を利用し、ZFN1 と ZFN2 が ATL 由来細胞株で同調的に発現するパイロット系を作出した。発現量と比率が適量ではないため、ZFN の生物活性が十分発揮されない可能性が判明した。これを改善するためにはより厳密な遺伝子発現制御が可能な系の利用が必要である。

## A. 研究目的

現在日本の HTLV-1 感染者数は増加していると危惧されている。これに対し、治療法としては対症療法が存在するが予防法や根治療法は存在しない。医療経済学的見地からは、治療より発症を防止する方が負担は少ない上、感染者に対する身体的負担も小さいことから総合的にみて優れていると思われる。予防するためにはワクチンによる発症予防や感染予防がある。これに対して、感染したウイルスを体内から取り除く事ができれば上記手法のみでは治療効果が得られない場合に非常に有用であると考えられる。

我々は HTLV-1 の潜伏感染に介入して発症を遅延させる方法の確立を目指す。これを達成するためには HTLV-1 のプロウイルスを除去するか、不可逆的に不活性化する方法が望ましい。

特に後者においてはエピジェネティックな遺伝子発現抑制ではなく、プロモーターの機能破壊による不活性がより望ましい。ZFN はこの目的に非常に適していると考えられる。

本研究においては酵母系にて選択された2組の治療分子候補 ZFN について、ほ乳類細胞系で治療分子としての機能を評価する。ZFN にはプロウイルスを除去する活性（標的 DNA 削除活性または targeted deletion 活性）が期待される。本年度は、レポーターアッセイ系を利用してヒト細胞で感度よく定量的にプロウイルスを除去する活性の評価を試みた。

ZFN は標的部位に2本鎖 DNA 切断（double strand break, DSB）を導入する。近傍に導入された2つの DSB が修復系によって再結合される際には2カ所の DSB で挟まれた部分が除去されて再結合をうける。そこで、治療分子持つ標

的 DNA 削除活性に依存してシグナルするレポーター遺伝子を2種類作出して活性評価を行った。また、DSBの導入は細胞にDSB-induced apoptosisを惹起することが期待される。従って、ZFNを導入すればHTLV-1感染細胞の増殖は特異的に抑制されることが期待される。昨年までに我々は基本的な治療活性を明らかにし、ZFNの有用性を明確にした(Tanaka A, et al. Leukemia 2013)。しかし、治療分子の効果を向上させるためには、より詳細に作用機序を明らかにし、相乗効果を再現高く評価できる実験系の確立が求められる。昨年度までの研究では、ペアのZFNを順次MLVにて導入し、2種類の薬剤で順次選択し、樹立した細胞を実験に用いてきた。ZFNの効果は十分に確認できたが、導入効率が低いために高感度かつ短期間で活性を評価することは容易ではなかった。ZFN作用機序を解析し、活性を改善するためには、ペアのZFN発現を同調させた発現系が必要である。これを達成するため、今年度は、簡便な操作で同調的にATL細胞にZFN1とZFN2が発現する実験系の構築を試みた。

## B. 研究方法

1. 同調的ZFN発現系の構築および発現確認  
本実験では厳密な発現制御が可能なTetOnシステム(Clontech社)を採用した。pRetroX-Tight-Purベクターを購入した。IRES配列、ZFN1およびZFN2をそれぞれ制限酵素配列を付したprimerでPCRを行い、ベクターのNotI/EcoRIサイトにIRES配列をクローニングし、さらにNotIサイトにZFN1、EcoRIサイトにZFN2をクローニングした(pRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2)。作製したベクターをpRetroX-Tet-On-Advancedベクターと共に293T細胞にDoxycycline存在下で

transfectionした。ZFN1およびZFN2にはFLAG配列が負荷されているため、抗FLAG抗体により検出が可能である。Transfectionの翌日に細胞からタンパク質を回収し抗FLAG抗体を用いてWestern BlotでZFN1およびZFN2の発現確認を行った。

### 2. ZFN発現細胞の樹立および発現確認

pRetroX-Tet-On-Advancedベクター、VSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionし、自立増殖能欠損MLVを回収した。平行してpRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2とVSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionし、自立増殖能欠損MLVを回収した。これら2種類のMLVを、順次HTLV-1プロウイルスをコピーのみ持つATL由来細胞株であるED-およびTL-OmI細胞に感染させた。PuromycinおよびG418にてそれぞれ選択培養を行い、増殖してきた細胞を回収する。細胞を2つに分け、Doxycyclineの有無で培養し、翌日細胞からタンパク質を回収し、Western blotによりZFN1およびZFN2の発現確認を行った。

### 3. 同調的ZFN発現系の生物活性試験

ZFN1およびZFN2を同調させた発現調節系を導入したED-およびTL-OmI細胞を2つに分け、Doxycycline有無で培養した。培養中、顕微鏡下で観察して細胞の状態を観察した。1週間後、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega社)により生細胞数を定量した。さらにDoxycyclineと同時にDNA repair inhibitorを加えて同様の実験を行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

1. 同調的ZFN発現系の構築および発現確認

IRES配列、ZFN1、ZFN2をクローニングした pRetroX-Tight-Purベクターについて、挿入したそれぞれの配列はシークエンスを行い、配列に問題ないことを確認した。pRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2ベクターと pRetroX-Tet-On-Advancedベクターを293T細胞にco-transfectionし、Doxycyclineの有無で培養し、翌日回収したタンパク質を用い、ZFN1およびZFN2の発現確認を行った(図1)。Doxycycline非存在下でも若干の発現が確認されたが、Doxycyclineによる発現増強は確認され、このベクター系の機能が確認された。ZFN1とZFN2の発現比率はZFN1のほうが有意に高かった。

### 2. ZFN発現細胞の樹立および発現確認

pRetroX-Tet-On-Advancedベクター、VSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionして得た自立増殖能欠損MLVをED-およびTL-OmI細胞株に感染させ、G418にて選択培養を行った。増殖してきた細胞株に、pRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2ベクター、VSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionして得た自立増殖能欠損MLVを感染させ、G418と puromycinにて選択培養を行い、両抗生物質存在下でも増殖可能な細胞株を樹立した。この細胞株をDoxycycline有無で培養を行い、ZFNの発現を検出を行ったところ、これらの細胞株ではDoxycycline非存在下では、ZFNの発現は確認されず、Doxycycline存在下でZFN1およびZFN2の発現が同調して誘導されていることが確認された(図2)。ZFN1とZFN2の発現比率はZFN1のほうが有意に高かった。

### 3. 同調的ZFN発現系の生物活性試験

Doxycycline存在下で、ZFN1およびZFN2の同調した発現が確認できたED-およびTL-OmIを

用い、ZFN発現誘導による生物活性の検出を試みた。細胞を2分し、Doxycycline有無で1週間培養したところ、樹立して比較的早い時期に実施した施行においては顕微鏡下でDoxycycline存在下にて細胞の増殖が一過性に低化することが観察された。Doxycycline添加後一週間後に生細胞数の定量を行ったところ、Doxycyclineの有無で生細胞数に差は認められなかった。

## D. 考察

DoxycyclineによりZFN1とZFN2を同時に発現調節できる細胞株の樹立に成功した。しかし、今回行った増殖抑制試験では、生物活性が検出限界以下となった。今回、ベクター構築時、および細胞樹立時にDoxycyclineによるZFN1およびZFN2の発現をWestern blotにて確認したが、発現量は単独で発現させるベクターよりも少ないことが確認された。さらに、IRES配列の下流にクローニングしたZFN2の発現量がIRES配列の上流にクローニングしたZFN1の発現量に比べ少ないことも確認された。ペアのZFNは1:1で活性を示す。従って、ZFNペアの発現量と比率が生物活性の示現に重要な要素であることが示唆された。TetOn系を利用する際には、IRESを使用せずにZFN2の恒常的発現細胞に対し、ZFN1の発現誘導系を導入するなどの工夫が必要と思われる。また、TetOff系の適応、他の発現誘導系の検討をあわせ、系統的な実験系の試験が重要と思われた。ZFNが低レベルで発現することにより治療標的が変異を受けている可能性、ZFNの活性が低化した変異体が選択された可能性も否定できない。しかし、HTLV-1 LTRを検査したところintactであったことから、前者の可能性は否定的である。今後、実験系を構築するために基盤情報を収集することが出

来た。

ムの解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日. 神戸

## E. 結論

治療分子として本研究で構築した ZFN を、ペアで小分子によって同調的に発現を制御する実験系の樹立に成功した。本系は治療効果の増幅や作用機序の解明に大きな貢献が期待される。生物活性の検出に関しては系の改良の余地があることが判明した。

## F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J\*. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. **Leukemia**. 2013, 27:1621-1627.

2. Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J\*. Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by Epstein-Barr virus type III latency that upregulates CD150/Signaling lymphocytic activation molecule. **Cancer Science**. 2014, Epub ahead of print.

### 2. 学会発表

(国内学会)

1. 駒野 淳、田中 淳、武田 哲、岡田誠治. HTLV-1 プロウイルスを標的とした Zinc Finger Nuclease による ATL 腫瘍原性の抑制. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日. 横浜

2. 武田 哲、上林大起、倉田貴子、吉山裕規、駒野 淳. Epstein-Barr virus III 型潜伏感染による Measles virus 感染感受性増強メカニズ

## H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

特記すべきことなし

### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし

### 3. その他

特記すべきことなし

図1. 293T細胞へのTransient transfectionによるpRetroX-Tet-On-Advancedベクター由来ZFN1/2発現確認

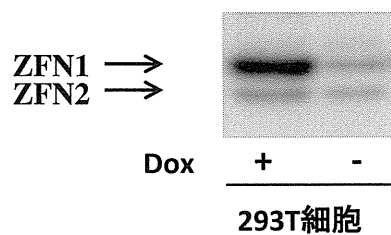
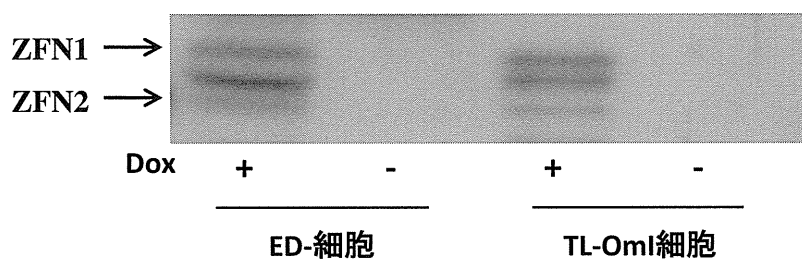


図2. ATL細胞株におけるDoxycycline誘導性ZFN1/2の同調的発現



分担研究課題：ZFN 耐性細胞における HTLV-1 プロウイルス機能の減弱

研究分担者 田中 淳 大阪大学微生物病研究所・特任講師

**研究要旨** ATLやHAMの原因となるHTLV-1に対する効果的かつ特異的な治療法は存在しない。プロウイルスウイルスを特異的に認識して感染細胞を障害する方法があれば、ウイルス抗原を表出しない潜伏感染細胞を含めた全てのウイルス感染細胞に対し有効で、新たな治療法の基盤を提供できると考えられる。我々はHTLV-1プロウイルスゲノム特異的DNA破壊酵素ZFNを合成し、HTLV-1陽性ヒトT細胞株の増殖を阻害する活性を見いだした。本年はZFNに対する耐性を与えるプロウイルスの変異がウイルス遺伝子機能に与える影響を細胞レベルで検討した。ZFN耐性変異派LTRの正と負の転写機能を低化させることを明らかにした。従って、仮に本治療分子に対する耐性が生じたとしても、ウイルス遺伝子の発現が減弱するためにウイルスの複製能や病原性を損なうために治療効果が維持することが期待される。

## A. 研究目的

ヒトレトロウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染によって引き起こされる成人T細胞白血病(ATL)の日本での年間発症数は約千例と推測されており、またHTLV-1の感染者数は約108万人と推定されいまだ多数存在している。ATLには、予後の悪い急性型、リンパ腫型に加え、慢性型、くすぶり型の4病型が知られているが、慢性型およびくすぶり型ATLの大多数も経過中に急性転化し、その長期予後は不良となる。

ATLの治療には主に多剤併用化学療法が行われるが、ATL細胞は化学療法にしばしば抵抗性を示し、寛解が得られたとしても再発率は非常に高く、根治療法とはならず満足できるものではない。また近年、ATLに対する根治療法として同種造血幹細胞移植療法が注目されてい

るが、ATLの病勢がコントロールできない増悪例の場合や、65歳以上の高齢の場合、同種移植は、拒絶反応や合併症の頻度が高くなるため実施が非常に困難であり、さらに高齢の患者では兄弟間でHLA一致のドナー候補者を得ることも困難な状況である。

今後は高齢者のキャリアを中心に持続的にATLの発症が懸念されるが、ATLの効果的な予防・治療法がないことが問題である。これまでに明らかとなったATL発症に関わるリスク因子では、特に末梢血リンパ球の高ウイルス量（感染細胞数）のATL発症への関与が示唆されている。このことからHTLV-1感染細胞数を減少させることがATL発症を抑えるのに重要であると考えられる。

本研究班ではATL細胞のゲノムに挿入されたHTLV-1遺伝子を得意的に認識し切断でき

るジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用い、ZFNがHTLV-1感染 transformed cell line および ATL-derived cell line の増殖を抑制するかを検討し、極めて良好な治療分子活性を認めた (Tanaka A et al, Leukemia 2013)。ZFNを導入した HTLV-1 陽性細胞の 80-95%は死滅したが、一部の細胞は ZFN による細胞死誘導を回避した。これらには治療分子に対する耐性を有獲得したプロウイルスの存在が示唆された。本年は ZFN 導入細胞から得られた治療体制細胞から回収された変異 LTR について機能解析を行い、治療分子の採用メカニズムを明らかにすると同時に耐性ウイルスの持つ性質の解明を目指した。

## B. 研究方法

HTLV-1感染ATL-derived cell line S1T細胞にレトロウイルスベクターを利用してZFNは1/2とZFN3/4ペアをそれぞれ導入した。レトロウイルスベクターはネオマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子をもつものを利用し、それぞれペアとなる2種類のZFNを発現するS1T細胞を薬剤選択により樹立した。2種類目のZFN導入後、96ウェルプレートに5~100 cells/wellの密度で細胞を播種し、クローニングした。クローニングされたS1T細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRによりLTRを増幅して核酸配列を決定した。このデータ解析に関しては平成24年度の駒野分担研究者の報告書を参照されたい。

PCRで増幅したLTR領域の機能を測定するために、増幅断片をレポータープラスミドにクローニングしてレポーターアッセイを実施した。使用したプラスミドはホタルルシフェラーゼをコードするプラスミドベクターpGL3ベシックに標準的なプロウイルス配列として知

られるD13784におけるnt1-756に相当するHTLV-1LTRをNheI/XhoIサイトにクローニングしたものである。このベクターのNheI/SacIサイトに逆向きにウミシイタケrenillaルシフェラーゼ配列をクローニングした(pRluc-LTR-luc)。これにより、HTLV-1 LTR promoterのforward, reverseそれぞれの向きのpromoter活性を測定することが可能となった。Taxの発現にはpCG-Taxを利用した。レポータープラスミドを単独で、またはpCG-Taxと同時に293T細胞に導入して、48時間後にfireflyとrenillaルシフェラーゼ活性を測定した(Dual-GLO assay kit, Promega)。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

転写の+鎖方向に関してはホタルルシフェラーゼ活性を、-鎖方向をウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定することにより、それぞれの向きの promoter 活性を測定することが可能な pRluc-LTR-luc を基に、樹立された ZFN 導入 S1T 細胞クローンから得られた変異型 HTLV-1 LTR と組み換えを行った。変異型 HTLV-1 LTR を NdeI/XhoI サイトを付加した primer で増幅し、pRluc-LTR-luc ベクターの同サイトと組み換えを行った。ZFN1/2 ペアについては6種類、ZFN3/4 ペアについては6種類、計13種類のベクターを構築した ( pRluc-LTR-luc-ZFN(1+2)-f-1, a-1, b-3, pRluc-LTR-luc-ZFN(2+1)-b-1, b-2, b-4, pRluc-LTR-luc-ZFN(3+4)-a-1, c-1, pRluc-LTR-luc-ZFN(4+3)-a-1, a-2, b-1, b-2, c-1)。これらを HTLV-1 tax 発現プラスミドと同時または単独で 293T 細胞に transfect し、ホタルルシフェラーゼ活性およびウミシイタ



ケルシフェラーゼ活性を pRluc-LTR-luc のそれぞれの活性と比較することで、それぞれの LTR 変異が promoter 活性にどのように影響を及ぼすか検討した。

HTLV-1 tax による各変異型 HTLV-1 LTR からのルシフェラーゼの活性は ZFN1/2 ペアで誘導された変異の 6 クローン中 5 クローンで +/−両方向の転写減少が観察された。転写が増大するクローンはなかった。一方、ZFN3/4 ペアで誘導された変異では、7 クローン中 2 クローンで + 方向の、5 クローンで − 方向の転写減少が観察された。しかし、7 クローン中 4 クローンで + 方向の、1 クローンで − 方向の転写増加が観察された。中でも 1 つのクローンでは − 方向の転写が 4 倍に増大した。いずれのクローンも Tax による転写増大は野生型 LTR と同様に認められた。Tax 非依存的転写においては明確な活性変動を認めなかった。

#### D. 考察

我々の用いた ZFN が認識し切断する箇所は HTLV-1 tax が作用するエンハンサー領域や、転写開始のためのプロモーター領域ではないため、ZFN による変異の導入が HTLV-1 LTR からの RNA の転写量に直接関与するとは考えにくかった。しかしながら今回の我々の結果は転写される RNA の非コード領域に導入された変異が転写産物量の変化を誘導できることを示した。

ZFN1/2 ペアにより認識され切断される領域は HTLV-1 LTR の R 領域にある。HTLV-1 LTR から転写された RNA の R 領域から U5 領域前半にかけては internal ribosome entry site(IRES)を形成する配列を有することや、転写された RNA の安定化に寄与することがこれまでに報告されている。ZFN1/2 ペアにより誘

導されたこの領域での欠損により、転写された RNA の安定化に寄与する 2 次構造の破壊または IRES 構造の破壊が生じたものと考えられ、このことがルシフェラーゼ産生量の減少を誘導したものと考えられた。

ZFN3/4 ペアにより誘導された変異（欠損）を持つ LTR では + 鎖方向からのルシフェラーゼの産生量増加が多く、クローンで観察され、特に最も多い欠損(38bp)のあった LTR クローンからのルシフェラーゼの産生はもとの LTR と比べ 3~4 倍と高かった。ZFN3/4 ペアの認識する非コード領域の 2 次構造は続くコード領域の翻訳を負に制御していると考えられる。

これまでの ZFN 導入による細胞死の誘導において ZFN1/2 ペアの導入が ZFN3/4 ペアの導入よりも効果的であったことより、治療分子としては ZFN1/2 の方が優れていると思われる。また、HTLV-1 感染細胞の生存性において LTR からの転写産物の関与の可能性が考えられる。これらをさらに検証するため今後は転写される RNA 量の比較と、樹立できた各細胞クローンでの HTLV-1 関連蛋白質量の詳細な検討が必要である。

#### E. 結論

我々の作製した ZFN のターゲット配列は多くの HTLV-1 株で高度に保存されていた領域である。今回の研究により ZFN1/2 がより優れた治療分子候補であること、ZFN による変異導入による HTLV-1 RNA の非コード領域での 2 次構造の変更が HTLV-1 感染細胞での効果的な細胞死を誘発する因子である可能性が示唆された。HTLV-1 RNA の非コード領域にあるこれらの領域が HTLV-1 感染細胞の増殖において、厳密な制御を司っている可能性が示唆さ

れた。

また本研究は ZFN をデザインするにあたり、遺伝子発現制御に関連する RNA の非コード領域の 2 次構造形成部位がウイルス株間で高度に保存されている場合に、疑似種 (quasispecies) からなるウイルスにおいてこの領域をターゲット配列とする ZFN のデザインは有効であることを示している。

## F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. *Leukemia*. 27(8) 1621-7.2013
2. Islam S, Shimizu N, Hoque SA, Jinno-Oue A, Tanaka A, Hoshino H. CCR6 functions as a new coreceptor for limited primary human and simian immunodeficiency viruses. *PLoS One*. 2013 Aug 29;8(8):e73116.
3. Jinno-Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Mori T, Sugiura N, Kimata K, Isomura H, Hoshino H. Inhibitory effect of chondroitin sulfate type E on the binding step of human T-cell leukemia virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013 Mar;29(3):621-9.

### 2. 学会発表

(国際学会)

特記すべきことなし

(国内学会)

1. 駒野 淳、武田 哲、田中 淳、岡田 誠治。  
Inhibition of ATL tumorigenicity by ZFN targeting HTLV-1 provirus. 第 71 回日本癌学会学術総会。2013 年 10 月 3-5 日。横浜

## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

特記すべきことなし

### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし

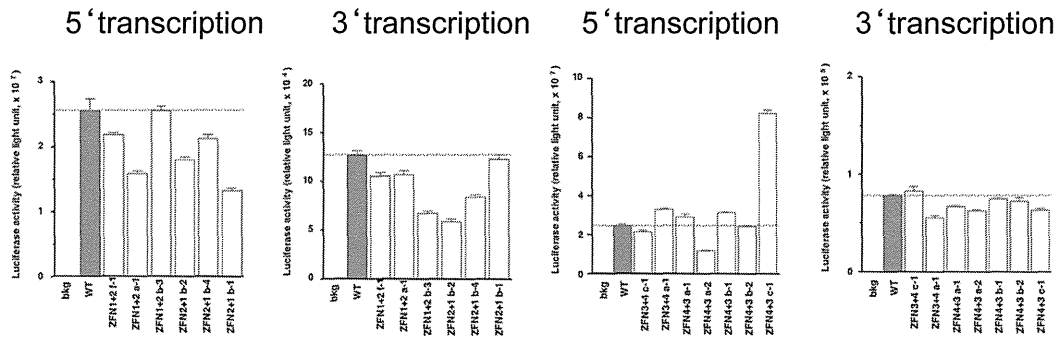
### 3. その他

特記すべきことなし

## ☒ 1 . Effect of mutations on LTR-driven transcription

### Mutants by ZFN1/2

### Mutants by ZFN3/4



The Tax-augmented transcription of the positive strand was reduced by most of the mutations introduced by ZFN1/2 (4/6 clones, Fig. 3D). Similarly, the negative strand transcription was also reduced by ZFN1/2-induced mutations (5/6 clones). On the other hand, increased positive strand transcription was observed in 4/7 LTR mutants recovered from ZFN3/4-transduced cells. By contrast, many of the LTR mutants showed modestly reduced negative strand transcription.

### III. 平成25年度 業績一覽

研究成果の刊行に関する一覧表

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
<b>駒野 淳</b>					
Kurata T, Kanbayashi D H, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, <u>Komano J</u> , Kase T, Takahashi K.	Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report.	<i>American Journal of Medicine</i>			In press.
Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, <u>Komano J</u> .	Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by EBV type III latency that up-regulates CD150/SLAM.	<i>Cancer Sci.</i>			In press.
Kawabuchi-Kurata T, Misaki T, Suehiro Y, <u>Komano J</u> , Kase T, Takahashi K.	Longitudinal study on respiratory viral co-infections in 0- to 2-year-old infants with or without clinical manifestations.	<i>Jpn J Infect Dis.</i>			In press.
Urano E, Morikawa Y, <u>Komano J</u> .	Novel role of HSP40/DNAJ in the regulation of HIV-1 replication.	<i>J Acquir Immune Defic Syndr.</i>	64(2)	154-62	2013
Hiroi S, Morikawa S, Takahashi K, <u>Komano J</u> , Kase T.	Molecular epidemiology of human adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010.	<i>Jpn J Infect Dis.</i>	66(5)	436-8	2013

Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Ureano E, Métifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, <u>Komano JA</u> , Murakami T, Tamamura H.	Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products.	<i>ACS Chem Biol.</i>	8(10)	2235-44	2013
Lee H, <u>Komano J</u> , Saitoh Y, Yamaoaka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Tirakeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, Akira S.	Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	110(30)	12379-84	2013
Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, <u>Komano J</u> .	A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus.	<i>Leukemia.</i>	27(8)	1621-7	2013
Kojima Y, Kawahata T, Mori H, Furubayashi K, Taniguchi Y, Iwasa A, Taniguchi K, Kimura H, <u>Komano J</u> .	Prevalence and epidemiological traits of HIV infections in populations with high-risk behaviours as revealed by genetic analysis of HBV. <i>Epidemiol Infect.</i>	<i>Epidemiol Infect.</i>	141(11)	2410-7	2013
<b>岡田 誠治</b>					
Vaeteewoottacharn K, Seubwai W, Bhudhisawasdi V, <u>Okada S</u> , *Wongkham S.	Potential targeted therapy for liver fluke associated cholangiocarcinoma.	<i>J Hepatobiliary Pancreat Sci.</i>			In press.
Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, and * <u>Okada S</u> .	Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced Vgamma9Vdelta2 T cells against primary effusion lymphoma.	<i>Cancer Lett</i>			In press.

Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Kawano Y, Niuro H, Iino T, Hata H, <u>Okada S</u> , Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, and Okuno Y.	PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells.	<i>Blood</i>				In press
Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, <u>Okada S</u> , Komano J.	A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus.	<i>Leukemia</i> .	27(8)	1621-7		2013
Goto H and <u>Okada S</u> .	New approaches to treating Primary Effusion Lymphoma.	<i>Expert Opin Orphan Drugs</i>	1(12)	1019-1029		2013
Kudo E, Taura M, Matsuda K, Shimamoto M, Kariya R, Goto H, Hattori S, Kimura S, and <u>*Okada S</u> .	Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells.	<i>Bioorg Med Chem Lett</i>	23(1)	606-609		2013
*Hagiwara S, Yotsumoto M, Odawara T, Ajisawa A, Uehira T, Nagai H, Tanuma J, and <u>Okada S</u> .	Non-AIDS-defining hematological malignancies in HIV -infected patients: an epidemiological study in Japan.	<i>AIDS</i>	27(2)	279-283		2013
Tsuruoka N, Arima M, <u>Okada S</u> , Sane-kamoto A, Hatano M, Arguni E, O-Wang J, Jing-Hua Y, Sekiya S, Shozu M, and Tokuhisa T.	ADAR1 induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6-deficient cells.	<i>J Bio Chem</i>	288(2)	826-836		2013
Terahara K, Ishige M, Ikeno S, Mitsuki Y, <u>Okada S</u> , Kobayashi K, and Tsunetsugu -Yokota, Y.	Evaluation of a Humanized NOD/SCID/JAK3 <sup>null</sup> Mouse Model: Expansion of CD4 <sup>+</sup> T cells with a Th Activated Memory Phenotype Affects Infectivity of CCR5-Tropic HIV-1 <i>in vivo</i> .	<i>PLoS ONE</i>	8(1)	e53495		2013

星野 忠次					
Fujii, Y., <u>Hoshino, T.</u> , Kumon, H.	Molecular Simulation Analysis of the Structure Complex of C2 Domains of DKK Family Members and $\beta$ -propeller Domains of LRP5/6	<i>Acta Medica Okayama</i>			In press
Nakagawara, A., Nakamura, Y., Suganami, A., Fukuda, M., Hasan, M-K., Yokochi, T., Takatori, A., Sato, S., <u>Hoshino, T.</u> , Tamura, Y.	Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma,	<i>Cancer Medicine</i>	3	25-35	2014
Suzuki, M., <u>Hoshino, T.</u> , Neya, S.	Skeletal Recombination Reaction of N-Fused Pentaphyrin(1.1.1.1.1) via Bromination	<i>Org. Lett.</i> ,	16 (2)	327-329	2014
Neya, S., Suzuki, M., <u>Hoshino, T.</u> , Kawaguchi, A. T.	Relaxation Analysis of Ligand Binding to the Myoglobin Reconstituted with Cobaltic Heme	<i>Inorg. Chem.</i>	52	7387-7393	2013
<u>Hoshino, T.</u> , Mahmood, Md-I., Mori, K., Matsuzaki, K.	Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid $\beta$ -Peptides Onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane,	<i>J. Phys. Chem. B</i>	117(27)	8085-8094	2013
Md. Iqbal Mahmood, Xinli Liu, Saburo Neya, <u>T. Hoshino</u>	Influence of lipid composition on the structural stability of G-protein coupled receptor	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	61(4)	426-37	2013



T. Hoshino, Md. I. Mahmood, K. Mori, K. Matsuzaki	Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid $\beta$ -Peptides Onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane	<i>J. Phys. Chem. B</i>	117(27)	8085-94	2013
Mahmood, Md.-I., Liu, X-L., Neya, S., Hoshino, T.	Influence of lipid composition on the structural stability of G-protein coupled receptor,	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	61(4)	426-437	2013
<b>武田 哲</b>					
Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J.	Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by EBV type III latency that up-regulates CD150/SLAM.	<i>Cancer Sci.</i>			In press.
Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J.	A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus.	<i>Leukemia.</i>	27(8)	1621-7	2013
<b>田中 淳</b>					
Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J.	A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus.	<i>Leukemia.</i>	27(8)	1621-7	2013
Islam S, Shimizu N, Hoque SA, Jinno-Oue A, Tanaka A, Hoshino H.	CCR6 functions as a new coreceptor for limited primary human and simian immunodeficiency viruses.	<i>PLoS One.</i>	8(8)	e73116	2013
Jinno-Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Mori T, Sugiura N, Kimata K, Isomura H, Hoshino H.	Inhibitory effect of chondroitin sulfate type E on the binding step of human T-cell leukemia virus type 1.	<i>AIDS Res Hum Retroviruses.</i>	29(3)	621-9	2013

## IV. 平成25年度 刊行物別冊（抜粋）

## ORIGINAL ARTICLE

# A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus

A Tanaka<sup>1</sup>, S Takeda<sup>2</sup>, R Kariya<sup>3</sup>, K Matsuda<sup>3</sup>, E Urano<sup>2</sup>, S Okada<sup>3</sup> and J Komano<sup>2,4</sup>

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), which causes adult T-cell leukemia (ATL) in humans, establishes a life-long latent infection. Current therapies are not very effective against HTLV-1-associated disorders. A novel therapeutic approach may help to combat HTLV-1 infection. A molecular therapy that targets the proviral genome is favorable because the therapeutic effect occurs specifically in HTLV-1-infected cells, regardless of whether they express viral genes. In this proof-of-concept study, we developed a therapeutic molecule based on zinc finger nuclease (ZFN) to achieve this goal. We designed a ZFN that specifically recognized conserved region of HTLV-1 long terminal repeat (LTR) and introduced it into various HTLV-1-positive human T-cell lines, including HTLV-1-transformed and ATL-derived cell lines. The ZFN disrupted the promoter function of HTLV-1 LTR and specifically killed HTLV-1-infected cells. We also showed a potential approach of this therapeutic molecule to remove the proviral genome from HTLV-1-infected cells, something that has not been possible before. The therapeutic effect of ZFN was confirmed in an *in vivo* model of ATL. This strategy may form the basis of a therapy that can eradicate HTLV-1 infection. Similar approaches can be used to target other malignancy-associated viruses.

*Leukemia* (2013) 27, 1621–1627; doi:10.1038/leu.2013.46

**Keywords:** Human T-cell leukemia virus type 1; zinc finger nuclease; molecular therapy; adult T-cell leukemia

## INTRODUCTION

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) is a retrovirus that causes adult T-cell leukemia (ATL) and the neurological disorder, HTLV-1-associated myelopathy, in humans.<sup>1–3</sup> HTLV-1 establishes a life-long latent infection because the viral genome is integrated into the host cell DNA. HTLV-1 undergoes the lytic phase of the viral life cycle in some infected cells, whereas most of the other cells remain latently infected. Once the viral genes are expressed, the host immune system can remove infected cells; however, it is difficult to eradicate HTLV-1-positive cells completely from infected individuals because latently infected cells do not actively transcribe the viral genes. No cell surface markers have been identified that distinguish HTLV-1-infected cells from uninfected cells. No effective vaccine has yet been developed, and HTLV-1-associated disorders respond poorly to current therapies.<sup>4,5</sup> Thus, a molecular therapy is urgently needed. Considering the phenomenon of viral latency, it is reasonable to target the provirus. Here, we used artificial endonuclease technology to achieve this goal.

Zinc finger nuclease (ZFN), a synthetic endonuclease, introduces a double strand break (DSB) into its cognate DNA site, thereby activating DNA damage-induced apoptosis.<sup>6–8</sup> Therefore, we hypothesized that targeting the HTLV-1 provirus with ZFN should kill HTLV-1-infected cells by DSB-induced apoptosis, resulting in the elimination of provirus-positive cells from the virus-infected individuals (Supplementary information S1). Some of the DNA strand break sites are repaired by DNA damage-response mechanisms such as non-homologous end joining, which ligates the broken ends of the chromosomal DNA. When

this occurs, the original DNA sequence is disrupted. The integrated retroviral genome has two identical copies of a sequence known as the viral long terminal repeat (LTR). Targeting the LTR is advantageous because the number of therapeutic targets per provirus is doubled (no other part of the viral genome has two copies). The LTR acts as a viral promoter; therefore, even if cell death is not induced, the proviral DNA should be irreversibly damaged, thereby reducing expression of the viral genes and subsequent pathogenicity. Furthermore, ZFN removes a DNA fragment from the chromosome.<sup>1</sup> This is possible when two DSBs are introduced into the chromosomal DNA proximal to each other. The DSB repair system ligates the DNA ends and removes the short DNA fragment generated by the two DSBs (a process termed as targeted deletion activity; Supplementary information S1). Thus, it should be possible to delete the proviral gene if a repetitive element, such as the LTR, which is positioned at either ends of the provirus, is targeted by ZFN. Therefore, we conducted a proof-of-concept study in which we used ZFN to damage the HTLV-1 provirus in infected cells and inhibit cell proliferation of virus-infected cells. It was possible to design a ZFN molecule with the required properties because the endonuclease has high-substrate specificity, and the HTLV-1 LTR has limited sequence diversity compared with the LTR of human immunodeficiency virus.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells and transfection

All T-cell lines were maintained in RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Japan Bioserum, Tokyo, Japan),

<sup>1</sup>Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; <sup>2</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan and <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan. Correspondence: Dr J Komano, Department of Infectious Diseases, Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 3-69, Nakamachi, 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan.

E-mail: komano@iph.pref.osaka.jp

Received 1 February 2013; accepted 11 February 2013; accepted article preview online 15 February 2013; advance online publication, 12 March 2013

penicillin and streptomycin (Invitrogen, Tokyo, Japan). Dulbecco's modified eagle medium (Sigma) was used to culture the 293T cells. Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or FuGENE6 transfection reagents (Roche, Tokyo, Japan). The S1T and ED cell lines were generous gifts from Drs Baba (Kagoshima University) and Matsuoka (Kyoto University).

**Plasmids and the murine leukemia virus vector**

ZFN genes were purchased from Sigma. The retroviral plasmids pQC, pCMMP and pMX were constructed using standard molecular cloning techniques. The Tax-expressing plasmid, pCGtax, and pHTLV LTR-luciferase are kindly provided by Dr Watanabe (Tokyo University). The production of, and infection by, murine leukemia virus (MLV) vectors has been described previously.<sup>9-11</sup>

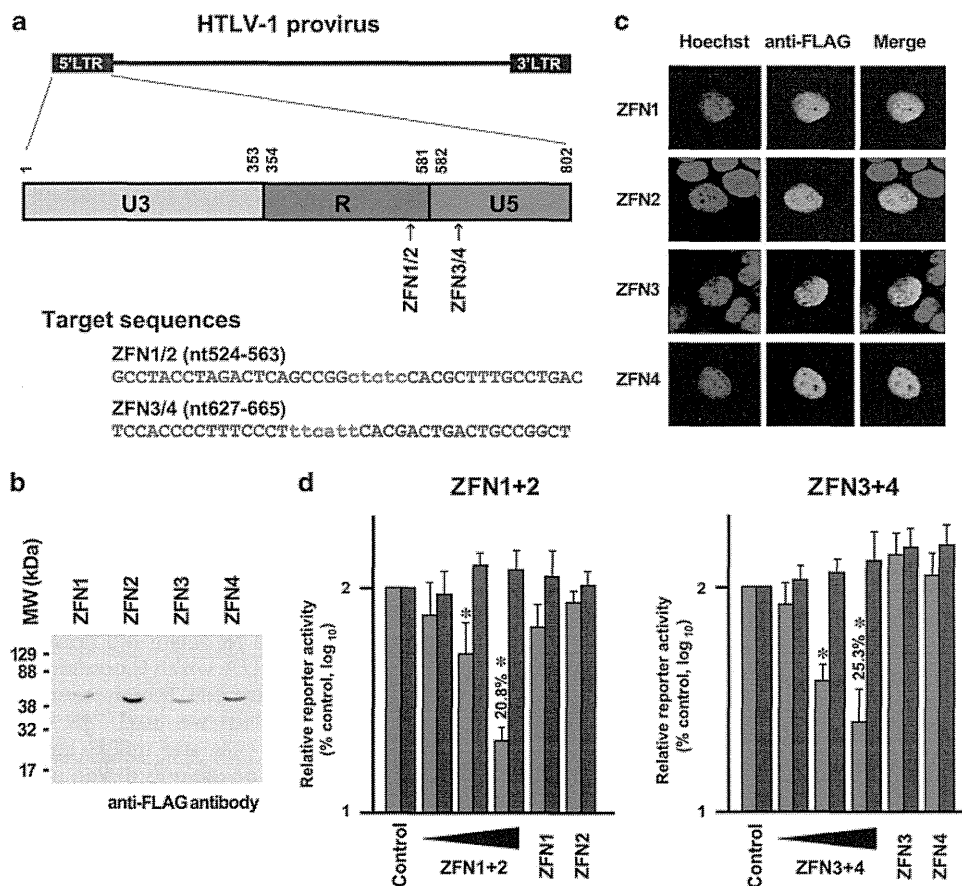
**Cell imaging**

Cells were imaged by confocal fluorescence microscopy (LSM510 Meta ×40 NA 1.4 lens, Carl Zeiss Microimaging Inc., Tokyo, Japan) or fluorescence microscopy (Olympus IX70, Tokyo, Japan).

**Table 1.** Targeted deletion activity of ZFN.

Reporter	Effector	No. of colonies <sup>a</sup>	No. of white colonies	% of white colonies
ZFN1 + 2-specific deletion reporter	None	6562	2	0
	ZFN1	3050	9	0.3
	ZFN2	2268	6	0.3
	ZFN1 + ZFN2	905	75	8.3
ZFN3 + 4-specific deletion reporter	None	5379	1	0
	ZFN3	3959	13	0.3
	ZFN4	3206	14	0.4
	ZFN3 + ZFN4	1722	38	2.2

Abbreviation: ZFN, zinc finger nuclease. <sup>a</sup>Number of bacterial colonies emerged on a 10-cm Luria-Bertani agar plate containing x-Gal.



**Figure 1.** Characterization of ZFN function using reporter constructs. (a) Structure of the HTLV-1 provirus and the targets of ZFN1/2 and ZFN3/4. The nucleotide number coordinates are derived from GenBank accession number D13784. The uppercase letters in blue represent the ZFN recognition sequence and the lowercase letters in red represent the linker into which DSBs are introduced. (b) Confirmation of ZFN expression in transfected 293 T cells by western blotting of cell lysates with an anti-FLAG antibody. (c) Immunofluorescence assay showing the distribution of ZFNs in 293 T cells transfected with each expression plasmid. ZFNs detected with an anti-FLAG antibody are green and the Hoechst 33258-stained nuclei are blue. Magnification is × 400. (d) Transient transfection assay to examine the effect of ZFN on Tax-augmented LTR transcription. The ZFN expression vectors (20, 100 or 500 ng; containing each subunit alone or an equal amount of each subunit (1/2 or 3/4), Tax (100 ng) and a reporter plasmid encoding the LTR-luciferase cassette (200 ng) were cotransfected into 293 T cells, and the luciferase signals were detected at 2 days post transfection (red). The expression vector containing GFP was used as the control. The total amount of transfected plasmid was adjusted using a plasmid-expressing GFP. A CMV-driven luciferase expression vector (50 ng) was used for comparison (blue). The average and standard deviation of the luciferase signals relative to that of the control is shown from four independent experiments. Statistically significant differences between each plasmid and the corresponding CMV control were analyzed using a two-tailed Student's *t*-test (asterisk denotes *P* < 0.01).