

## **RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS**

A long standing goal of our research group is to elucidate the molecular mechanisms of virus pathogenesis. We have been focusing on two human viruses, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1).

### **1) Molecular Interaction of HIV-1 Infection and Host Factors: T. YOSHIDA, K. SATO, Y. SHINODA, T. KOBAYASHI, T. WATANABE, S. YAMAMOTO, Y. KOYANAGI**

We previously developed a cDNA-library screening system using lentivirus vector and high level of transduction efficiency was obtained for human T cells (*J. Virol.* 78, 11352-11359, 2004). The library-transduced CD4<sup>+</sup> T cells were challenged with CXCR4-using (X4) HIV-1, and cells that acquired resistance to HIV-1-induced cytopathic effect (CPE) were selected. From this screening, we recently found that a CD63 N-terminal deletion-mutant (CD63ΔN) was able to block HIV-1 infection through altering trafficking of CXCR4, but not CCR5 to the plasma membrane, suggesting that a novel anti-HIV-1 gene was discovered (*Traffic*, in press). In addition, we found that CD63, as well as many other tetraspanins (CD9, CD81, CD82, and CD231) are incorporated into the lipid bilayer of viral envelope and that the virion-incorporated tetraspanins have a potential to inhibit HIV-1 Env-mediated infection in a strain-specific manner at post-attachment entry step(s) (*J. Virol.*, 82:1021-1033, 2008). These results suggest that tetraspanins commonly have an unique potential to modulate HIV-1 infection. We are also attempting to identify HIV-associated host factors using a variety of genetics- and protein chemistry-based methods. Candidate of the HIV-associated host factors under investigation are interferon, cytokines, signal molecules, and membrane proteins.

### **2) HIV Pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA, J. CHUANYI NIE, H. KITAYAMA, Y. KOYANAGI**

We developed a small animal model in which human cells (peripheral blood lymphocytes, PBL) are transplanted into a T, B, and NK cell-deficient mouse (NOD/SCID/IL-2R<sup>γ</sup> null mouse, NOG mouse) strain created in collaboration with the Central Institute for Experimental Animals in Kanagawa. In the human PBL-transplanted mice (hu-PBL-NOG-SCID mouse), abundant human CD4 (hCD4) cell killing was reproduced with CCR5-using (R5) HIV-1 infection and HIV-1 induced a neuropathology that resembled HIV encephalopathy observed in human patients. Using the model, we have found that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

but not Fas-ligand (FasL) has critical contribution in the HIV-1-induced CD4<sup>+</sup> T cell bystander killing as well as neuronal apoptosis in the central nervous system (CNS) (*J. Exp. Med.* 193, 651-659, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 2777-2782, 2003). TRAIL could therefore be a potential target for the therapeutic intervention of HIV-induced bystander cell killing in HIV-1-infected patients. However, the chimeric mice transplanted with human PBL are not fully reconstituted with human blood cells. Thus, we recently developed a novel human-chimera mouse model, NOG-hCD34 mice by transplanting newborn NOG mice with hCD34<sup>+</sup> cells via hepatic injection. The longitudinal flow cytometric analyses showed that NOG-hCD34 mice were able to support human hematopoiesis and multilineage differentiation of human leukocytes for at least 44 weeks. When infected with CCR5-tropic or CXCR4-tropic HIV-1, NOG-hCD34 mice reproduced HIV-1-associated complications such as intrathymic infection, sequential decrease in peripheral as well as splenic hCD4/hCD8 ratio and depletion of splenic hCD4<sup>+</sup>hCD45RA<sup>+</sup>hCCR5<sup>+</sup> T lymphocytes. High plasma HIV-1 RNA load was observed in CCR5-tropic HIV-1 infected mice for prolonged period of time. The infected mice were depleted in peripheral hCD45RA<sup>+</sup>hCD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and there were marked peaks in the percentages of peripheral hCD45RA<sup>+</sup>hCD8<sup>+</sup> T lymphocytes after HIV-1 infection. In the splenic T lymphocytes positive for HIV-1 p24, severe down-regulation of hCD4 surface expression was observed. These data suggests that NOG-hCD34 mouse can have variety of application in long-lasting and systemic studies of HIV-1 pathogenesis, as well as in the testing of anti-HIV-1 drug candidates.

### **3) Mechanism of Herpes Virus and HIV-1 Neuropathogenesis: H. KITAYAMA, A. ANDO, Y. MIURA, Y. KOYANAGI**

We generated an *in vitro* Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection model to evaluate virus-induced CNS tissue damages using rat hippocampus slice culture. When a GFP-expressing HSV-1 was inoculated, we were able to visibly follow the infection process. Significant cell damage and neuron-glia cell disarrangement were detected especially in the dentate gyrus (DG) subfield of hippocampus, where intrinsic and spontaneous neurogenesis occur. Using this slice culture, we also found that HIV-1-infected macrophages produce factors that induce impairment of neuronal precursor cell development (*Microbiol. Immunol.* in press), and that soluble viral protein R (Vpr) is one of the viral factors which have the ability to suppress axonal growth. Extracellularly administered recombinant Vpr (rVpr) clearly accumulated in mitochondria where a Vpr-binding protein adenine nucleotide translocator (ANT) localizes, and reduced mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and ATP synthesis. ATP depletion induced the reduction of mitochondrial transport into and within neurites (*J. Virol.* in press). Our results suggest that HSV-1 itself and HIV-1 Vpr are the major factors causing disturbance of neuronal cell development.

## List of Publications

### Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome

#### Laboratory of Viral Pathogenesis

Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, Terunuma H, Kano S, and Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23:391-397, 2007.

Futahashi, Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, and Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science* 98:373-379, 2007.

Miyano-Kurosaki N, Kira J, Barnor JS, Maeda N, Misawa N, Kawano Y, Tanaka Y, Yamamoto N, and Koyanagi Y. Autonomous proliferation of HTLV-CD4<sup>+</sup> T cell clones derived from human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy patients. *Microbiol. Immunol.* 51:235-242, 2007.

---

Koyanagi Y. HIV-1-infection in humanized mice. Innovation forum of Tohoku University US office, San Francisco, 2007.

Sato K, Aoki J, Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., Koyanagi, Y.: Tetraspanin on HIV-1 virions inhibits its infection. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, 2007.

Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y. High level of HIV-1 viremia and CD4 depletion in human CD34<sup>+</sup> cell-engrafted mice. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2007.

Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus-1 Vpr inhibits neurite outgrowth via caspase-3-independent pathway, *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2007.

Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. CD63 and its mutants inhibit fusion of CXCR4-containing vesicles to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry, *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2007.

Sato K, Daikoku E, Sano K, and Koyanagi Y. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity through Incorporation of CD63, *Awaji symposium*, Awaji, 2007.

Koyanagi, Y.: Foundation and Recent Progresses in Retrovirus Research, *Awaji symposium*, Awaji, 2007.

Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction

of mitochondrial dysfunction. 8th AIDS seminar in Kumamoto. 2007.

Koyanagi, Y.: HIV-1 viral protein R inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of HIV-1-induced cell death. 14<sup>th</sup> East Asia symposium, Tokyo, 2007.

Koyanagi, Y.: "Mitochondria and membrane trafficking" implication for HIV infection and pathogenesis. 10<sup>th</sup> Anniversary symposium of Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, 2007.

小柳義夫. HIV-1 感染ヒト造血マウス. 第 31 回阿蘇シンポジウム、熊本.

芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 膜輸送変換による HIV-1 感染阻止ストラテジー. 近畿エイズ研究会、大阪、2007 .

芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. HIV のコレセプターである CXCR4 の細胞内輸送. ウイルス学会湯河原キャンプ、湯河原、2007.

芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. CXCR4 トラフィッキング過程の可視化と遺伝子導入による HIV-1 感染阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007

北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV-1 Vpr 誘導性ミトコンドリア機能障害による神経細胞軸索伸長の阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 .

小柳義夫、三沢尚子、北山裕子、佐藤佳、渡部匡史、Johnny Chuanyi Nie、伊藤守. HIV-1 感染ヒト造血細胞移植マウス内に維持される長期高ウイルス血症. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 .

篠田康彦、田中勇悦、鈴木陽一、三浦義治、小柳義夫. インターフェロンオメガ 1 による HIV-1 感染抑制. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.

安藤良徳、北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. HSV-1 感染による中枢神経組織障害の経時的解析. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.

北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV 感染による認知障害機構：Vpr によるミトコンドリア機能障害による神経前駆細胞分化抑制. 第 21 回日本エイズ学会、広島、2007.

芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 受容体分子の表面発現を輸送小胞レベルで調節する機構；HIV のコレセプター分子の細胞質膜発現を調節する、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.

佐藤佳、山元誠司、小柳義夫. HIV-1 の粒子産生過程における Ral GTPase の機能解析. 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.

平成 19 年 4 月に本学医学研究科博士課程に小林朋子、渡部匡史、佐藤佳が入学、安藤良徳が本学生命科学研究科博士課程に進学した。5 月より Johnny Chuanyi Nie がカナダ British Columbia 大学より非常勤職員として参加した。12 月に三浦義治は退職し、埼玉県総合リハビリテーションセンターに移動した。

以下のテーマについて研究を遂行している。

(1) HIV 感染に関わる宿主因子の解析：HIV を改良したレンチウイルスベクターを用いて HIV 感受性細胞に cDNA ライブラリを発現させ、HIV 感染に耐性を賦与する遺伝子探索実験系を確立した(*J. Virol.* 78, 11352-11359, 2004)。これにより、CD63 の N 末端欠損変異体(CD63ΔN)が、CXCR4 の細胞質膜への移動を特異的に抑制することを見出した(芳田ら、*Traffic*, 印刷中)。さらに、CD63 と同じ分子群に分類される CD9, CD81, CD82, CD231 などのテトラスパニン分子は、ウイルス粒子のエンベロープに取り込まれ、このウイルス粒子の標的細胞との結合後の侵入過程を抑制すること、そして、この抑制作用はウイルス分離株特異的であることを見出した(佐藤ら、*J. Virol.*, 82:1021-1033, 2008)。これらの結果は、テトラスパニン分子がウイルス感染を抑制する活性を有することを示している。テトラスパニンに加え、遺伝学的ならびに蛋白質化学的手法により、新規 HIV 関連宿主因子の探索研究を行っている。現在、その候補分子として解析を行っているのは、インターフェロン、サイトカイン、シグナル分子、膜蛋白質などである。(芳田剛、佐藤佳、篠田康彦、山元誠司、小林朋子、渡部匡史、小柳義夫)

(2) HIV 病原性解析：神奈川の実験動物中央研究所との共同研究により T, B, NK 細胞欠損マウス(NOG マウス)にヒト末梢血リンパ球を移植し、HIV 感受性マウスモデルを確立した。このモデルマウス(hu-PBL-NOG mouse)では、CCR5 を補受容体とする R5 HIV-1 の感染により CD4 細胞の破壊と中枢神経内の神経細胞の細胞死を引き起こすことができる。そして、これらの細胞死は Fas ligand でなく、TRAIL を介することがわかった(*J. Exp. Med.* 193, 651-659, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 2777-2782, 2003)。すなわち、TRAIL に対する抑制薬は、エイズ患者に対する細胞障害治療薬となりうる可能性を示唆している。しかしながら、これらの末梢血移植マウスでは、すべての血液系細胞が構築されているのではない。そこで、新生児 NOG マウスの肝臓内にヒト CD34 陽性血液幹細胞を移植するヒトキメラマウスモデル(NOG-hCD34)を作製した。このマウスのなかでは、ヒト長期造血能、ならびに、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞への分化増殖能が少なくとも 44 週間は維持された。そして、HIV 感染により胸腺細胞の破壊、末梢血ならびに脾臓における CD4/CD8 比の減少、そして、CD4 陽性 CD45 陰性 CCR5 陽性 T 細胞の欠乏が観察された。長期にわたる高ウイルス血症が R5 ウイルス感染により誘導され、CD45 陰性 CD4 陽性 T 細胞の減少と CD45 陰性 CD8 陽性 T 細胞の一過性の増加も観察された。

さらに、脾臓内の HIV 抗原(p24)陽性細胞では、細胞表面上 CD4 分子の発現が極端に減少していた（投稿中）。これらの結果は、NOG-hCD34 マウスが、HIV 持続感染モデルならびに抗 HIV 候補薬の評価実験系となりうることを示唆している。（佐藤佳、三沢尚子、Johnny Chuanyi Nie, 北山裕子、小柳義夫）

(3) ヘルペスウイルスならびに HIV 脳炎の発症メカニズム：ラット海馬培養スライス片に GFP 発現 HSV（東京大学川口博士との共同研究により入手）を感染させると、このウイルスの感染播種の過程を観察できることがわかった。特に、神経幹細胞が局在し、それらの細胞分化が活発な海馬歯状回に対して HSV は強力な細胞障害を引き起こし、神経グリアの組織構成を破壊することがわかった。同じスライス培養法を用いて、HIV 感染マクロファージが神経細胞分化を抑制する因子を遊離していることを見出した（北山ら、*Microbiol. Immunol.* 印刷中）。そして、その中で HIV がコードする Vpr 蛋白質が軸索伸長障害作用を有することがわかった。神経分化培養細胞に組換え Vpr 蛋白質を添加すると、ANT という Vpr 結合性蛋白質が局在するミトコンドリア分画にすばやく移行し、ミトコンドリアの膜電位低下、そして、ATP 産生を抑制する。さらにその ATP 産生低下が神経樹状突起のミトコンドリアへの移行を抑制する結果、軸索は伸長できないことがわかった（北山ら、*J. Virol.* 印刷中）。これらの結果は、HSV それ自身ならびに HIV Vpr 蛋白質は神経細胞分化障害の主な要因となっていることを示唆するものである。（北山裕子、安藤良徳、三浦義治、小柳義夫）