

2002/242

厚生労働科学研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

小動物モデルを用いた抗エイズ薬

評価スクリーニング系の開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 辻本 元

東京大学大学院農学生命科学研究科

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告

小動物モデルを用いた抗エイズ薬評価スクリーニング系の開発
辻本 元

II. 分担研究報告

1. NOD SCID マウスを用いた臨床 HIV 株の特性の解析とその応用
に関する研究

本多 三男

2. エイズの小動物モデルとしての hu-PBL-SCID マウスにおける
抗 HIV 薬評価系の開発

田中 勇悦

3. 免疫不全マウスの HIV 研究への応用

浅野 敏彦

4. モルモットの免疫応答解析システムの構築

千葉 丈

5. ネコエイズモデルを用いたエイズ治療薬の生体内評価系の開発

辻本 元

6. ネコエイズモデルを用いた免疫不全症のコントロール

長谷川篤彦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

小動物モデルを用いた抗エイズ薬評価スクリーニング系の開発

主任研究者 辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨 マウス、モルモットおよびネコを用いたエイズの小動物モデル系を確立するための一連の研究を行った。マウスの系では、NK 細胞の少ない NOD/SCID マウスを基本とし、完全に NK 細胞を除いた系統や $\beta 2$ ミクログロブリンをノックアウトし系統も利用してヒト末梢血単核球細胞や胎児胸腺細胞の生着率の良いマウス系を開発して HIV 感染系を確立した。これら SCID マウスにおいて、V3 ペプチド連続免疫による交差反応性抗体の誘導、樹状細胞を用いた免疫誘導法、X4 HIV-1 感染系の作出、CXCR4 antagonist の抗ウイルス活性の証明といったエイズ小動物モデル系の活用を進めた。モルモットの系では、BCG ワクチンの評価系確立のため、Th1/Th2 系サイトカインの測定に関する研究を進めた。ネコの系では、ネコ免疫不全ウイルス感染系をエイズの小動物モデルとして活用し、small interfering RNA による抗ウイルス効果を証明するとともに、免疫不全の進行に関与するアポトーシス関連遺伝子の発現変化を検討した。これらエイズ小動物モデル系は、予防および治療に有効な抗エイズ薬の評価スクリーニングに利用可能なシステムを提供するものである。

分担研究者

本多三男・国立感染症研究所エイズ研究センター
第1研究グループ長

浅野敏彦・国立感染症研究所動物管理室長

千葉 丈・東京理科大学基礎工学部教授

田中勇悦・琉球大学医学部教授

長谷川篤彦・日本大学生物資源科学部教授

エイズの動物モデルとしては、サル類を用いた系とマウスなどの小動物を用いた系が存在する。サル類の系においては、HIV を用いた実験には希少動物で動物福祉上も問題のあるチンパンジーを用いなければならず、また SIV や SHIV はその感染、免疫、病原性の面で HIV と異なる点が多く、また多数の個体を用いた研究を行うためには施設や管理に膨大な費用が必要とされる。一方、小動物、とくに hu-PBMC/ SCID マウス や hu-liver-thymus/ SCID マウスの系では、HIV 自体を用いることができ、また多数の個体を用いることによって客観的なデータが得られる研究が可能となった。FIV 感染とネコの系では、HIV と同様、ケモカインレセプター（CXCR4）がウイルスレセプターと機能していること、免疫不全の発症が認められるこ

A. 研究目的

エイズに対する治療法の開発においては、培養細胞を用いた実験結果をヒトの臨床に応用するため、その中間をつなぐ動物モデルの利用が不可欠である。しかしながら、この動物モデル系の研究の遅れが治療薬開発の大きなネックとなっており、とくに我が国では欧米に比べその点の研究開発が遅れている。

と、および日本において百万頭以上のネコがこのウイルスに自然感染していることから、AIDS の小動物モデルとしての有用性が注目されている。また、HIV の rBCG のワクチンの有用性が注目され、その免疫応答の解析にはモルモットの系がきわめて有用であることが示されている。

本研究の目的は、近年の研究の進歩によってその有用性が急速に高まっているエイズの小動物モデル系を確立し、それを抗エイズ薬の評価スクリーニング系に応用することにある。本研究によって確立された小動物モデル系を用いることにより、培養細胞の系で見いだされた新しい治療法や免疫因子の有効性を動物の生体内で検討することができるようになり、エイズ医薬品開発研究において大きな進歩がもたらされるものと考えられる。本研究の成果は、人類にとって世界的な脅威となっているエイズに対する対策を講ずるに当たってきわめて有用であり、多大な社会的貢献をするものである。

B. 研究方法

NOD SCID マウスを用いた HIV 感染モデルの開発 (本多): 種々の NOD SCID マウスを入手し、正常ヒト PBL やその分画をマウスに接種し、ヒトリンパ組織の移植が成立したモデルマウス系を作製した。種々の臨床ウイルス株あるいは野生株を分離しプライマリーウイルス株を作製した。免疫抗原として HIV-1 タイプ B Env V3 領域のアミノ酸配列が明らかになった臨床株を選別し、その配列を用いて V3 ペプチドを作製した。抗原ペプチド C 末端には臨床分離株 6 株を含む 9 種類の V3 エピトープを配置し、N 末端には HIV-1 Env C4 領域由来の T 細胞エピトープを配置した計 9 種類のペプチドを設計した。マウスにおける免疫実験には 6 種あるいは 7 種類のペプチドを免疫原として、1 週間インターバルの連続免疫法によって腹腔と静脈内、ある

いは鼻腔にアジュバントとともに投与し、その血清中抗 V3 抗体をモニタリングした。

hu-PBL-SCID マウスを用いた抗 HIV 薬の評価系の開発 (田中): hu-PBL-SCID キメラマウスの作成と HIV-1 感染—SCID マウスとして CB-17 SCID マウスを、また common gamma KO SCID 動物として NOG マウスと RAG-2-g-KO マウスを用いた。C.B-17 SCID マウスは、PBMC 移植 1 日前にマウスのナチュラルキラー細胞(NK)を除去するため、マウスの IL-2 受容体 β に対する抗体 (TM β -1) 1 mg 腹腔内投与でマウスを前処理した。SCID マウスの腹腔に成人 PBMC を 500~1000 万個移植した (通常の hu-PBL-SCID)。hu-PBL-SCID-spl 作製には、TM β -1 処理マウスの脾臓内にヒト PBMC を 300 万個直接接種した。移植してから 1 日~14 日後に HIV-1 を 1000 感染 unit (TCID₅₀) 接種した。感染後 7 日から 14 日後にそのマウスを解剖して得られるヒトの細胞を Flow cytometry で解析し、HIV-1 の感染増殖状態を血清および腹腔洗浄液中の p24 の測定と細胞内 HIV-1 DNA コピー数定量で解析した。X4 HIV-1 の増殖への必要に応じてヒト IL-4 を 0.4 μ g/animal を ip 投与した。短期間 in vivo 感染—腸内吸収が可能な CXCR4 のアンタゴニストである KRH-1636 を投与したマウスに試験管内で刺激培養した PBMC を 500 万個移植し、30 分後に、X4 HIV-1 を感染させた。2 時間後、腹腔洗浄液からヒトリンパ球を採取し、IL-2 を含む培地で培養し、5 日後に血清中の p24 を測定した。

NODscid を用いた HIV 感染モデル動物の検討—口腔粘膜からの感染 (浅野、泉福): ヒト細胞を移植する前に γ 線で NOD/SCID B2m KO マウス (雌、8 週齢) を照射し、 $3 \sim 5 \times 10^7$ PBMC / 500 μ l HBSS をマウス腹腔内に移植後、IL-4 を週に 1 度、計 3 回腹腔内に投与した。IL-4 を最

後に投与してから 1 週から 2 週経過後に、HIV-1 の R5 ウイルスと X4 ウイルスを 100 から 1000 TCID₅₀ まで濃度を変えて口腔内接種した。マウスの歯肉を傷つける群と歯肉を傷つけない群に分け、それぞれ HIV-1 株を口腔内接種した。最終接種してから 1 週後、マウスを屠殺し、脾臓、肺、頸部リンパ節などから DNA を抽出し、*env*、*gag* 遺伝子のプライマーを用いた PCR 解析を行った。さらに、血清中の HIV-1 RNA コピー数の検討を行った。また、マウスの口腔粘膜細胞における HIV-1 のエントリーに関わる表面分子の発現を検討した。

モルモットの免疫応答解析システムの構築（千葉）：Hertley 系モルモットの脾臓からクローニングされた gpIL-2 の cDNA を用いた。フロイント完全アジュバントで免疫された Strain 2 と Strain 13 純系モルモットのリンパ節と脾臓から RNA を抽出し、それらの RNA から調製された cDNA をテンプレートとして用い、PCR によって gpIL-2 遺伝子をクローニングした。次いで、gpIL-4 遺伝子をクローニングするために、マウス・ラット・ヒトの IL-4 に共通の塩基配列によるプライマーおよび各種のほ乳類の IL-4 遺伝子を系統樹により解析して齧歯類に共通の配列から設計されたプライマーを設計し、上記の cDNA をテンプレートとして用いて、PCR によるクローニングを試みた。

ネコエイズモデルを用いたエイズ治療薬の生体内評価系の開発（辻本）：FIV Petaluma 株の *gag* 領域に相同性を有する siRNA (siG1、siG2、siG3、siG4) および対照として哺乳類の遺伝子とは相同性のない siNS を作製した。これら siRNA を FIV Petaluma 株持続感染ネコ線維芽細胞株 (CRFK/FIV) にカチオニックリポソーム法により導入した。導入した siRNA による遺伝子発現抑制能を検討するため、FIV *gag* RNA の発現を real-time sequence detection system によって定

量し、また培養上清中の逆転写酵素活性および細胞質内 FIV p24 蛋白の発現をそれぞれ RT-assay およびフローサイトメトリー法により検出した。

FIV 感染細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現解析（長谷川）：ネコ由来 T 細胞株化細胞 (FT-1) から mRNA を抽出し、cDNA を合成した。ヒトおよびマウスで登録されている Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Caspase 3 のアポトーシス関連遺伝子の塩基配列から相同性領域をもとにプライマーを設計した。PCR 反応を行い、各遺伝子断片をクローニングし、各遺伝子の塩基配列を解析した。各遺伝子の部分塩基配列から、5' および 3' RACE 法を行い、各遺伝子の完全長 cDNA 塩基配列を決定した。ネコ由来 T 細胞株 (Kumi-1) に FIV ウイルスの A 型株 (Sendai-1) 株に感染させ、感染 3、6、8 日後に細胞を回収し、アポトーシスの誘導を TUNEL 染色で確認した。これら細胞において、real-time PCR 法を行い、各遺伝子の発現量を定量した。

（倫理面への配慮）

HIV を用いた病原性ウイルス検討のための動物モデルの検体はすべて P3 レベルの病原体として扱い、個々の研究所、大学、病院のバイオハザード関連委員会において承認を得て行った。ヒトサンプルに関しても個々の病院での倫理委員会の承認を得て行った。動物実験に関しては、個々の研究所、大学、病院での動物実験委員会の規定にしたがい、実験計画の許可を得た上で行った。組換え DNA 実験に関しては、組換え DNA 実験指針にしたがい、各機関の委員会の許可を得て行った。

C. 研究結果

NOD SCID マウスを用いた HIV 感染モデルの開発（本多）：NOD SCID マウスを用いた HIV 感染モデル及び評価法の開発—NOD SCID マウスに PBMC あるいは腎皮膜化脂肪織にヒト胎児の胸腺

及び肝細胞を移植し、移植マウスを作製すると、ウイルス感染が可能となり R5 の強いウイルス血症が誘導できた。この現象はヒト組織の定着によって左右され、その定着は IL-18+IL-4 のコンビネーションによって増幅された。Thy/Liv 移植マウスは naive 細胞を血中に放出することからこのマウスにおけるプライマリーレスポンスの成立が示唆された。したがってワクチン評価モデルとしての有用性が明らかにされた。種々の野生株は R5 Tropic が主であり、それらのモデルマウス系としての NOD SCID の系を確立した。V3 ペプチド連続免疫による交差反応性抗体の誘導—中和抗体産生のためのペプチド抗原をマウスに投与した群においては、血清中 V3 特異的抗体応答が誘導され、免疫に使用した 6 あるいは 7 種類の V3 ペプチドすべてに交差性を示す結合スペクトル広い抗体が得られた。また血清中抗 V3 抗体は 4 カ月以上にわたり高いレベルで維持された。

hu-PBL-SCID マウスを用いた抗 HIV 薬の評価系の開発 (田中) : R5 HIV-1 感染動物モデルとしての hu-PBL-SCID マウス—従来の i.p.接種法と比べ、1/3 量の、つまり 300 万個 PBMC/マウス接種でも十分な T細胞の生着がみられ、マウス肝臓での急激な GVHD が回避され、しかも、腹腔から R5 HIV-1 を感染させたところ i.p.接種群に劣らないウイルスの増殖が観察された。X4 HIV-1 感染動物モデルとしての hu-PBL-SCID マウス—IL-4 を hu-PBL-SCID (C.B-17 SCID)に投与したところ、X4 HIV-1 の増殖が認められた。また他の SCID マウス系統を用いたところ、予想に反し、NOG マウス、RAG-2g-KO マウスにおける X4 HIV-1 の感染効率も C.B-17 系統と比較して低かった。マウス血清 10%の添加により著しい HIV-1 産生抑制が観察されたことからマウス血清中に含まれる何らかの因子が X4 HIV-1 の増殖を抑制することが示唆

された。そこで、マウス体内で感染させ、体外でヒト CD4+T 細胞を増殖させる方法を用い、薬剤の感染初期過程阻害を評価した。試験管内で活性化させた PBMC を CXCR4 アンタゴニスト薬剤で処理したマウス腹腔に移植し、X4 HIV-1 を 30分後に感染させ、その2時間後に腹腔から移植したヒト細胞を回収し、培養した。この方法により CXCR4 アンタゴニスト薬剤は in vivo においても著明に X4 HIV-1 の感染を阻害することを明らかにすることができた。HIV-1 の感染増殖を制御する薬剤の評価—腸内吸収が可能な CXCR4 のアンタゴニストである KRH-1636 が、C.B-17 SCID で作製した hu-PBL-SCID マウス (IL-4 投与) において、著明な X4 HIV-1 の感染増殖を抑制することを明らかにした。現在、薬剤の改良により吸収性の高く、低い濃度でも効果のある薬剤ができつつある。

NOD/SCID を用いた HIV 感染モデル動物の検討—口腔粘膜からの感染 (浅野、泉福) : NOD/SCID B2mKO マウスへ hu-IL-4 を投与すると、マウス歯周組織へのヒト CD45, CD4, CD8 陽性細胞の定着が有意に促進される結果となった。しかし歯周組織に多数のヒト細胞が定着しているマウスを用いたにも関わらず、歯肉を傷つけた群、傷つけなかった群ともに HIV の口腔接種を行っても感染が起らなかった。一方、HIV のエンターリーに重要なガラクトシルセラミドの発現は非白血球細胞に 1.1%しかみられなかった。また HIV-1 のコレセプターの発現も調べたが、マウスの口腔粘膜全細胞中、CXCR4+ 細胞で 15.0%発現していたのに対して、CCR5+ 細胞は 1.7%と発現は少なかった。

モルモットの免疫応答解析システムの構築 (千葉) : Strain 2 モルモットからクローニングされた gpIL-2 cDNA の塩基配列は、Gen Bank に登録されている Hertley 系モルモットの gpIL-2 cDNA の塩基配列と 1カ所異なっており、アミノ酸がスレ

オニン (acc) ではなく、イソロイシン (atc) であった。供与された pX/ GPIL-2 の塩基配列もアミノ酸がイソロイシンであることは、供与者の岩田裕之教授と我々によって別個に確認されたので、この一塩基置換はモルモットのストレインが異なることによる多型ではなく、塩基配列の登録時の誤りであったと思われる。GpIL-4 遺伝子については、さまざまな PCR プライマーを設計し、PCR 反応の条件を変えて、繰り返しクローニングを試みたが、その遺伝子クローニングには成功していない。

ネコエイズモデルを用いたエイズ治療薬の生体内評価系の開発 (辻本) : 0.2 μ M の抗 FIV siRNA を導入することにより、FIV *gag* RNA の発現量はそれぞれ 43.6% (siG1)、54.0% (siG2)、61.5% (siG3)、41.5% (siG4) に低下した。同様に、培養上清中の逆転写酵素活性および細胞質内 FIV p24 蛋白発現量の有意な低下が認められた。これらの結果から siG1 ~ siG4 による FIV 増殖抑制効果が示され、特に siG4 はもっとも強い抑制効果を示した。次に 40 nM、0.2 μ M、1 μ M の濃度にて siG4 を導入したところ、*gag* RNA の発現量、細胞質内 FIV p24 蛋白発現量および培養上清中の逆転写酵素活性のいずれにおいても濃度依存的な抑制効果が認められた。特に、1 μ M の濃度では *gag* RNA の発現は 92.9%、ウイルス複製は 96.3% 抑制された。

FIV 感染細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現解析 (長谷川) : 今回クローニングしたネコのアポトーシス関連遺伝子の完全長 cDNA の塩基配列情報は、既に DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録し、一般に公開した。クローニングしたネコのアポトーシス関連遺伝子 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Caspase 3) について、FIV 感染細胞がアポトーシス誘発時に各遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、感染 3、6、8 日と経過するにつれてアポトーシス細胞数が増加している

ことが TUNEL 染色で確認されたが、アポトーシス誘導遺伝子である Bax および Caspase 3 の発現量の増加は認められなかった。一方で、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が感染 8 日後に非感染細胞の約 2.2 倍以上に増加することが確認された。なおアポトーシス抑制遺伝子の Bcl-xL には変化は認められなかった。

D. 考察

HIV のコントロールにおける動物モデルの確立において現在直面している野生株の特性を明らかにできる感染モデル系は実質的にはヒトの組織を移植した NOD SCID マウスでのウイルス感染系でしか存在しない。したがって、小動物モデルにおける HIV 感染のモデル動物の作製及びそれを用いた野生株の評価は極めて重要な課題としてとらえられる。しかし、このマウス HIV モデル系の欠点として、免疫誘導における免疫一次反応の誘導が困難であり、二次反応の解析ができなかった。本研究ではこの重要な欠点を克服するため、ヒト胎児 Thy/Liv NOD SCID マウスの利用および成熟型 Dendritic Cell を用いた免疫提示効率の促進による一次反応の誘導を行った。本年度の研究において最初の点については naive T 細胞の同定を行うことができ、後者の点についても実際の候補ワクチンとして開発された rDIs Gag ワクシニア抗原に対する Gag 蛋白特異的な細胞性免疫を Elispot 法にて同定した。これらのデータをもとにして NOD SCID マウスをもちいた免疫一次反応を誘導できる目処がたった。

本研究班では動物を用いた HIV/ AIDS モデルの確立をテーマに研究を行ってきた。ワクチン開発とその評価には動物モデルは必須であり、本年度は合成ペプチドワクチンの連続免疫法による免疫応答の評価系を構築し、感染防御ワクチンの可能性について検討した。近年の HIV に対するモノクローナル

抗体の研究から、生体内においても中和抗体のみで感染を制御し得ることが示唆された。本研究で用いた連続免疫法は抗原の多様性を網羅した交差反応性免疫応答が期待されるため、従来の候補ワクチンでは非常に困難とされてきた株非拘束性の感染防御が期待される。またマウスにおける免疫実験の結果から、エピトープワクチンでは指摘されがちな MHC 適合性の問題にも対応しうる結果を得た。粘膜面への免疫では有効な免疫誘導を賦与することができなかったが、免疫原性を強めたリポペプチドワクチンで検討中である。本研究では標的分子を V3 に限局したが、V3 領域はサブタイプ特異的であるため、サブタイプ交差反応性の中和抗体は誘導できないことから、今後サブタイプ交差性の中和領域、例えば中和抗体の誘導が非常に困難と言われる Env gp41 の C 末端領域の ELDKWA エピトープを標的とした連続免疫法の応用を検討中である。

hu-PBL-SCID の作製法として、従来の 1/3 ~ 1/6 量の PBMC (300 万個) を SCID マウス脾臓内に直接接種する方法を開発した(hu-PBL-SCID-spl)。この方法を用いると T 細胞の生着はマウス脾臓に限局することからマウス肝臓や肺での GVHD が回避され、腹腔から感染させた R5 HIV-1 が増殖した。同じドナー由来の PBMC をもつ同一ロットの hu-PBL キメラマウスを多数作製する方法として優れることが明らかとなった。さらに hu-PBL-SCID-spl マウスでは、脾臓内に限局したヒト PBMC の生着が観察され、抗原感作樹状細胞(DC)を用いることにより外来抗原に対するヒト型の免疫応答を誘導することができるので、今後、免疫誘導に対する薬剤毒性の評価にもこの方法が応用できる可能性がでてきた。

いずれのマウス系統でも血清そのものが X4 HIV-1 の増殖抑制に働くことから、マウス血清中には何らかの X4 HIV-1 増殖抑制因子が含まれる

ことが示唆された。マウス血清は、短期間の培養で CEM 細胞の CXCR4 を down-modulation することから、CXCR4 リガンドあるいはヒト細胞の活性化因子様の物質の関与が考えられる。そこで、in vivo での感染後に in vitro に細胞を取り出して、X4 HIV-1 の感染の初期段階の抑制のみを観察する方法を考案した。この方法は IL-4 投与を必要とせず、CXCR4 アンタゴニストの X4 HIV-1 感染の抑制効果を鋭敏に再現した。生体内でプロテアーゼによって瞬時に分解され不活化されてしまうペプチド系の薬剤の in vivo での動向を見るためには最適の方法と考えられる。

FIV 感染細胞における抗 FIV siRNA の FIV 増殖抑制効果は標的とした FIV gag RNA 特異的な遺伝子発現抑制によるものと考えられた。また配列により FIV 増殖抑制効果に差が認められたが、その中の 1 種類 (siG4) は特にその効果が強く、siRNA の臨床応用に際して有効な配列を得ることができた。この配列は、FIV 株間で比較的保存されている領域に設定したものであるが、異なる株間、特に臨床分離株において増殖抑制効果を検討する必要があると考えられた。本研究では、一過性の siRNA 導入であったため持続的なウイルス増殖抑制効果は認められなかった。臨床応用に際しては、生体内における持続的な siRNA の発現が必要と考えられるため、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターによる導入が効果的であると予想される。また、投与方法として静脈内注入および髄内投与が簡便な方法として考えられる。しかし、HIV の主な感染細胞がリンパ球であることを考慮すると、造血幹細胞への *ex vivo* での投与がより標的細胞に的を絞った投与方法であり、有効性も高いと予想される。今後は抗 FIV siRNA 発現レトロウイルスベクターを用いて、遺伝子導入ネコリンパ球を作製し、複数の FIV 株に対する持続的なウイルス増殖抑制効果を検討す

るとともに、FIV 感染ネコへの siRNA 導入法を検討する予定である。

FIV 感染細胞においてはアポトーシス誘導時、アポトーシス誘導遺伝子である Bax および Caspase 3 の発現量に変化は認められなかったが、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が増加することが確認された。これは、矛盾するように考えられるが、興味あることに HIV を株化細胞に感染させ、アポトーシスを誘導させた研究においても同様な結果が報告されている。これはウイルス感染によって一時的にアポトーシスが抑制され、その間にウイルス複製が完成するのではないかと考えられているが、確証はいまのところ得られていない。またアポトーシス誘導には、Caspase 3 作用が重要視されているが、HIV における報告および今回の研究結果から、Caspase 3 に無関係なアポトーシスの誘導系の存在も考えられる。このように FIV 感染細胞のアポトーシス誘導に関する分子機構は、HIV のそれと類似しており、FIV 感染ネコはアポトーシス研究においてもモデル動物とに価値のあることが示唆された。

E. 結論

マウス、モルモットおよびネコを用いたエイズの小動物モデル系を確立するための一連の研究を行った。マウスの系では NOD/SCID マウスを中心とした SCID マウスにヒト細胞を生着させ、HIV 感染系を確立した。これらマウス HIV 感染系において、ペプチド免疫による交差反応性抗体の誘導、樹状細胞を用いた免疫誘導、X4 HIV-1 感染系の作出、CXCR4 antagonist の抗ウイルス活性の証明といったエイズ小動物モデル系の活用を進めた。ネコの系では、FIV 感染系をエイズの小動物モデルとして活用し、siRNA による抗ウイルス効果を証明するとともにアポトーシス関連遺伝子の発現変

化を検討した。これらエイズ小動物モデル系は抗エイズ薬の評価スクリーニングに利用可能なシステムを提供するものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Senpuku H, Asano T, Matin K, Salam A, Tsuha Y,

Horibata S, Shimazu N, Soeno Y, Aoba T, Sata T,

Hanada N, and Honda M. Effects of human IL-18 and

IL-12 treatment on human lymphocyte engraftment in

NOD-scid mouse. *Immunology* 107: 232-42

(2002)

Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam Md A,

Matin K, Shimazu Y, Nakasone T, Horibata S,

Aoba T, Honda M, Amagasa T, Senpuku H.

Assesment of oral transmission using cell-free

HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral

blood leucocytes. *Immunology* In press (2003)

Ichiyama K, Yokoyama S, Tanaka Y, Tanaka R,

Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M,

Niitani Y, Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y,

and Yamamoto N. A duodenally absorbable CXCR4

chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636,

exhibits a potent and selective anti-HIV-1

activity in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

(USA) In press (2003)

Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP,

Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, and

Bangham CRM. Spread of HTLV-I between

lymphocytes by virus-induced polarization of

the cytoskeleton. *Science* in press (2003)

Satoh M, Toma H, Sugahara K, Etoh K, Shiroma Y,

Kiyuna S, Takara M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Nakada K, Fujita K, Kojima S, Hori E, Tanaka Y, Kamihira S, Sato Y, and Watanabe T. Involvement of IL-2/IL-2R system activation by parasite antigen in polyclonal expansion of CD4(+)25(+) HTLV-1-infected T-cells in human carriers of both HTLV-1 and *S. stercoralis*. *Oncogene*, 21(16):2466-2475 (2002)

Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N and Honda M. Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. *Cytometry Research* in press (2003)

Goto, Y., Nishimura, Y., Baba, K., Mizuno, T., Endo, Y., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Association of plasma viral RNA load with prognosis in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 76: 10079-10083 (2002)

Mizuno, T., Goto, Y., Baba, K., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Molecular cloning of feline tumor necrosis factor receptor type I (TNFR I) and expression of TNFR I and TNFR II in Lymphoid cells in cats. *Eur. J. Immunogenetics* 30:107-113 (2003)

2. 学会発表

兼清優、濱武牧子、本多三男 Sequential Immunization を応用した HIV-1 Env C4-V3 ペプチドによる交差反応性抗体の誘導 第 32 回日本免疫学会総会 (12/4-6 2002 東京 京王プラザ)

Tanaka Y, Yoshida A, Tanaka R, Nakamura M, and Yamamoto N. Induction of a protective immune response against R5-HIV-1 in hu-PBL-SCID mice by immunization with autologous mature dendritic cells pulsed with inactivated HIV-1. 第 14 回 国際エイズ学会議 2002 7 月 7 日-12 日: スペイン バルセロナ

田中勇悦、田中礼子、中村正孝、山本直樹 T 細胞補助刺激分子 OX40 を介する HIV-1 増殖促進と制御 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 2002 10 月 16-18 日: 札幌

高橋良明、吉田篤司、田中礼子、中村正孝、田中勇悦 T 細胞補助刺激分子 OX40 を介する T 細胞の凝集とアポトーシス誘導 第 32 回日本免疫学会学術集会 2002 12 月 4-6 日: 東京

馬場英司、森崎隆、山本直樹、菅村和夫、田中勇悦、片野光男 可溶性 OX40 分子のリガンド依存性細胞間移動の検討 第 32 回日本免疫学会学術集会 2002 12 月 4-6 日: 東京

田中勇悦、高橋良明、吉田篤司、田中礼子 活性化ヒト T 細胞における機能的 OX40L 発現 第 32 回日本免疫学会学術集会 2002 12 月 4-6 日: 東京

吉田篤司、高橋良明、田中礼子、田中勇悦 hu-PBL-SCID マウスにおけるヒト型抗 HIV-1 免疫応答の誘導 第 31 回日本免疫学会学術集会 2001 12 月 11-13 日: 大阪

中尾龍馬、天笠光雄、浅野敏彦、花田信弘、本多三男、泉福英信、hu-PBL を移植したマウスの HIV-1 経口感染に対する抵抗性、第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 11 月 28 日~11 月 30 日 p. 385 (#226) 2002

馬場健司、水越文徳、堀内弘司、増田健一、大野 耕一、辻本 元 small interferi (siRNAs) による FIV 特異的遺伝子発現抑制 第 135 回日本獣医学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

NOD SCID マウスを用いた臨床 HIV 株の特性の解析とその応用に関する研究

分担研究者 本多 三男 国立感染症研究所エイズ研究センター第1研究グループ長

研究要旨

HIV/AIDS の病態を再現できる完全なサルエイズモデルが無く、開発の目処が全くたっていないことから、HIV 感染のエイズモデルとしてヒト組織を移植した NOD SCID マウスの重要性が明らかにされてきた。本研究はこの NOD SCID マウスの有用性に着目し、エイズ動物モデルとしての NOD SCID マウスを用いたモデル系の開発、整備、さらにこの系でしか行うことのできない臨床ウイルス株の特性や感染細胞の HIV 感染における病原性について検討する。臨床ウイルス株あるいは野生株の特性の解析は現在求められている緊急課題の一つとなっている。本研究では野生株のコントロールを目的とした液性因子による能動免疫及び受動免疫を行う。

HIV-1 Env V3 領域を標的とした新規ペプチドワクチンの構築と連続免疫法による感染制御を目的として、マウス及びカニクイサルでの免疫誘導評価系を確立した。本研究では、背景として KLH コンジュゲート V3 ペプチドの連続免疫法により極めて交差反応性の高いモノクローナル抗体が作製されていることから、そのストラテジーを応用した能動免疫による中和抗体指向型ワクチンの開発を行った。V3 ペプチドを T 細胞エピトープとコンジュゲーションさせることにより免疫原性を向上させ、キャリア蛋白を用いない合成ペプチドワクチンを作製しその免疫誘導能の解析を行ったところ、マウス、カニクイサルの双方においても非常に結合スペクトルの広い抗 V3 抗体産生が誘導された。このことから連続免疫法の応用は、極めて抗原性の低い領域に対しても交差反応性抗体が得られること、さらに T 細胞エピトープを付加することでより安全なアジュバント効果が得られることが示唆された。

協力研究者

兼清優，堀端重男，吉野直人，濱武牧子，山本直樹(国立感染症研究所・エイズ研究センター)，網康至，須崎百合子(国立感染症研究所・動物管理室)，泉福英信(国立感染症研究所・細菌第一部)，村上利夫(化学及血清療法研究所)，西澤俊樹，矢野明(国立保健医療科学院・口腔保健部)，西島正広(国立感染症研究所・細胞化学部)

A. 研究目的

HIV 感染株、特に HIV 野生株さらには HIV-1 CCR5 指向型ウイルスの感染の制御が HIV 感染における最重要課題となっている。しかし、in vivo における R5 ウイルス感染モデルは NOD SCID マウスのみが評価できるモデルとしてとらえられる。本研究では野生株の制御を目的とした R5 ウイルス感染モデル系の確立とその制御法の開発のためのマウスモデルを確立することを目的とする。

1. NOD SCID マウスの R5 Tropic 及び X4 Tropic ウイルスのスクリーニング系を確立する。
2. NOD SCID マウスを用いたヒトリンパ系組織移植マウスを作製し、これまで不可能であった免疫の一時反応つまり、ワクチン効果の評価法を確立する。
3. これらのマウス系や、さらにはサルモデルを用いて野生株の特性を明らかにし、そのコントロール法の開発の目処をつける。

HIV 感染のコントロールには、病態解析の結果、より効果的な中和抗体の産生が効果

的であることが示唆されてきた。しかし、これまでのワクチン戦略では野生株を中和できる交差反応性の高い高親和性抗体の産生は困難となっている。本研究ではペプチド抗原の連続免疫法(Sequential Immunization)による交差反応性抗 HIV 抗体を誘導することを目的として、液性免疫誘導型 HIV ワクチンの開発を進めている。近年、HIV-1 ENV V3 領域を標的とし KLH コンジュゲート V3 ペプチドを用いた連続免疫法によって極めて交差反応性の高いモノクローナル抗体が作製され、この方向性の研究の妥当性は明らかとなり、同時に能動免疫による中和抗体志向型ワクチン開発研究の妥当性も明らかとなった。従って、本研究では V3 エピトープの抗原性を向上させる目的で T 細胞エピトープとコンジュゲーションさせ、キャリア蛋白を必要としない合成ペプチドワクチンを作製し、その免疫応答を評価する系を確立することを目的とする。さらに、ペプチド末端に脂肪酸を修飾することによって、より抗原性の強いアジュバントフリーの第 2 世代ワクチンの開発をすることで、ヒトへの応用を考慮したワクチン開発研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 種々の NOD SCID マウスを入手し、正常ヒト PBL やその分画をマウスに接種し、ヒトリンパ組織の移植が成立したモデルマウス系を作製する。
2. 種々の臨床ウイルス株あるいは野生株を分離しプライマリーウイルス株を作製する。

3. 免疫抗原として HIV-1 タイプ B Env V3 領域のアミノ酸配列が明らかになった臨床株を選別し、その配列を用いて V3 ペプチドを作製する。
4. さらにワクチン抗原としては哺乳類細胞で増殖しないワクシニア DIs 株をベクターに用いて発現させたリコンビナント gag 抗原を作製する。
5. 抗原ペプチド C 末端には臨床分離株 6 株を含む 9 種類の V3 エピトープを配置し、N 末端には HIV-1 Env C4 領域由来の T 細胞エピトープを配置した計 9 種類のペプチドを設計した。さらに設計したアミノ酸配列にはプロセッシング効率の向上を図る目的で Cathepsin B の切断モチーフを両エピトープ間に挿入した。すべてのペプチドは F-moc 法により合成し液体クロマトグラフィーで精製後、接種抗原として使用する。
6. マウスにおける免疫実験には 6 種あるいは 7 種類のペプチドを免疫原として、1 週間インターバルの連続免疫法によって腹腔と静脈内、あるいは鼻腔にアジュバントとともに投与し、その血清中抗 V3 抗体をモニタリングする。コントロール群は T 細胞エピトープ不含の V3 ペプチドを投与する群、及び単一のペプチドを繰り返し投与する群とした。また複数の MHC ハプロタイプのマウス系統を用いることでペプチド抗原の MHC 拘束性について検討する。
7. カニクイサルにおける免疫実験では 7 種類のペプチドを免疫原として、フロイ

ントの不完全アジュバント(IFA)とともに背部皮下、最終免疫においては静脈内に投与する。免疫スケジュールは 2 週間インターバルとする。各抗原の接種時、及び計 7 回免疫後から経時的に血清中抗 V3 抗体をモニタリングする。また末梢血単核球における V3 特異的インターフェロン γ 産生細胞を ELISPOT アッセイにて測定し、細胞性免疫応答についても検討する。ペプチド末端の脂肪酸付加は C 末端のリジン残基をパルミチン酸で修飾されたリジン残基に置換し合成することで抗原性の増強を試みる。

(倫理面への配慮)

サル及び動物実験については全ての各研究者の研究施設における倫理規定に従って研究を行う。感染研における臨床サンプルの取扱いについては感染研の倫理規定に従って研究を行うが、既に医学研究倫理審査会の承認を得ている。また、動物実験に関しては動物の倫理問題を含めて実験計画が動物実験委員会で検討されるので全ての動物実験は動物実験委員会の承認を得て行う。さらに、ワクチンの構築等に関しては倫理問題も加味して、科学技術庁、感染研の組換え DNA 安全委員会の承認が得られておりそれによって遂行する。

C. 研究結果

1. NOD SCID マウスを用いた HIV 感染モデル及び評価法の開発

NOD SCID マウスに PBMC あるいは腎皮

膜化脂肪織にヒト胎児の胸腺及び肝細胞を移植し、移植マウスを作製すると、ウイルス感染が可能となり R5 の強いウイルス血症が誘導できた。

この現象はヒト組織の定着によって左右され、その定着は IL-18+IL-4 のコンビネーションによって増幅される。

Thy/Liv 移植マウスは naive 細胞を血中に放出することからこのマウスにおけるプライマリーレスポンスの成立が示唆された。したがってワクチン評価モデルとしての有用性が明らかにされた。

種々の野生株は R5 Tropic が主であり、それらのモデルマウス系としての NOD SCID の系を確立した。

ヒト組織の免疫不全マウスへの定着は炎症性サイトカインである IL-18, IL-4, IL-12 等のサイトカインによって左右された。サイトカインによるウイルス増幅の制御がこのマウスにおいて示唆される。

2. 中和抗体産生の為のペプチド抗原は純度 70%以上に精製され、可溶性抗原として水あるいは PBS に溶解して動物に接種した。
3. マウス腹腔(静脈)投与群においては、それぞれ MHC ハプロタイプの異なる BALB/c 及び C3H/HeN の双方においても血清中 V3 特異的抗体応答が誘導され、免疫に使用した 6 あるいは 7 種類の V3 ペプチドすべてに交差性を示す結合スペクトル広い抗体が得られた。また血清中抗 V3 抗体は 4 カ月以上にわたり高いレベルで維持された。さらに MHC ハプロタイプの不均一な CD-1 系統においても免疫応答が見

られた。なおコントロール群においてはいずれの群でも、免疫群と比較して抗体価及び交差反応性は低いものとなった。

またマウス鼻腔投与群においてはアジュバントの有無に関わらず、有効な免疫応答は検出されなかった。

4. カニクイサルにおいては免疫群に用いた 3 頭すべてに血清中抗 V3 抗体が産生され、最終免疫 1 週後の時点では免疫には用いていない株を含む多数の V3 ペプチドに対して非常に高力価の抗体が検出された。また、末梢血単核球を用いた ELISPOT アッセイでは 3 頭中 1 頭で複数の V3 ペプチド刺激に対して多数のインターフェロン γ 産生細胞が検出された。現在は抗血清の中和能に関して多数のウイルスを使って検討中であり、SHIV を用いた攻撃的接種実験も予定している。
5. ヒトへの応用を考慮した上、ペプチド抗原をアジュバントフリーの形で有効に免疫誘導することを目的に脂肪酸付加ペプチド抗原を作製した。すでに有効性の示唆されているパルミチン酸付加リジン残基をペプチド C 末端のリジン残基と置換し合成した。現在はこのリポペプチドを用いて、マウスを使った投与ルートの検索及び免疫原性の評価を行っている。

D. 考察

HIV のコントロールにおける動物モデルの確立において現在直面している野生株の特性を明らかにできる感染モデル系は実質的にはヒトの組織を移植した NOD SCID マウスでの

ウイルス感染系でしか存在しない。したがって、小動物モデルにおける HIV 感染のモデル動物の作製及びそれを用いた野生株の評価は極めて重要な課題としてとらえられる。しかし、このマウス HIV モデル系の欠点として HIV 感染のウイルス血症を再現することができるが特に免疫誘導における免疫一時反応の誘導が困難であり、二次反応の解析ができなかった。本研究ではこの重要な欠点を克服すべく以下の二つの方向から検討した。

- 1) ヒト胎児 Thy/Liv NOD SCID マウスの確立
- 2) 沖縄琉球大学田中研との共同研究による成熟型 Dendritic Cell を用いた免疫提示効率の促進による一次反応の誘導を行った。本年度の研究において最初の点については naiveT 細胞の同定を行うことができ、さらに後者の点についても実際の候補ワクチンとして開発された rDIs Gag ワクチンニア抗原に対する Gag 蛋白特異的な細胞性免疫を Elispot 法にて同定した。これらのデータをもとにして NOD SCID マウスをもちいたプラオマリーリスポンズの反応を誘導できる目処がたった。

本研究班では動物を用いた HIV/AIDS モデルの確立をテーマに研究を行ってきた。ワクチン開発とその評価には動物モデルは必須であり、本年度は合成ペプチドワクチンの連続免疫法による免疫応答の評価系を構築し、感染防御ワクチンの可能性について検討した。近年の HIV に対するモノクローナル抗体の研究から、サルモデルにおいては高力価中和抗体の受動免疫によるウイルスの感染防御が

成立することが明らかとなり、生体内においても中和抗体のみで感染を制御しようと示唆された。

本研究で用いた連続免疫法は抗原の多様性を網羅した交差反応性免疫応答が期待されるため、従来の候補ワクチンでは非常に困難とされてきた株非拘束性の感染防御が期待される。またマウスにおける免疫実験の結果から、エピトープワクチンでは指摘されがちな MHC 適合性の問題にも対応しうる結果を得た。粘膜面への免疫では有効な免疫誘導を賦与することができなかったが、免疫原性を強めたリポペプチドワクチンで検討中である。

カニクイサルにおける免疫実験では、免疫群の 3 頭いずれにも免疫開始 4 週以降で強い液性免疫応答が誘導され、免疫開始 18 週目の現在においても抗体価は高いレベルで維持されている。このことはモノクローナル抗体の受動免疫に比較して、多大なアドバンテージであると考えられる。また本研究では 3 頭中 1 頭で細胞性免疫応答が誘導されたが、V3 領域には CTL エピトープも多数存在することから、細胞性免疫のモニタリングも今後の検討課題となる。一方トレランスの面においては接種局所の硬結がみられるものの全身状態に変化はなく、硬結感も次第に快方に向かっている。しかしながら IFA の実用化は困難であり、アジュバントの選択に関してヒトへの応用が始まりつつある Montanide ISA アジュバントへの変更を検討している。今回作製したリポペプチドワクチンは既にマラリアワクチンとして研究が行われていて、優れた CTL 誘導が可能なフォーマットであり、

今後 CTL に関してもマウスで検討予定である。

本研究では標的分子を V3 に限局したが、V3 領域はサブタイプ特異的であるため、サブタイプ交差反応性の中和抗体は誘導できないことから、今後サブタイプ交差性の中和領域、例えば中和抗体の誘導が非常に困難と言われる Env gp41 の C 末端領域の ELDKWA エピトープを標的とした連続免疫法の応用を検討中である。

E. 結論

HIV 感染の最も重要な課題となっている HIV 野生株の特性を *in vivo* モデルとしての NOD SCID ヒト組織移植マウスで確立することができた。さらにこれまで不可能であったワクチン効果の評価法としてのマウスモデルとして NOD SCID マウスに Thy Liv を移植したマウスあるいは成熟 Dentic Cell を抗原とまぜることにより免疫一次反応としてのワクチン効果の評価できる系を確立することができた。

HIV-1 Env V3 領域を標的とした合成ペプチドワクチンの連続免疫法によって、マウス及びカニクイサルにおいて非常に結合スペクトルの広い抗 V3 抗体産生が誘導されることを明らかにした。またサルにおける抗体産生は 4 カ月以上経った現在も高いレベルで維持されている。エピトープワクチンの欠点でもある MHC 拘束性も T 細胞エピトープの付加によりほとんど問題にならないことが明らかになった。

本研究により連続免疫法の応用は極めて抗

原性の低い領域に対しても交差反応性抗体が得られること、さらに T 細胞エピトープを付加することでより安全なアジュバント効果が得られることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Senpuku H, Asano T, Matin K, Salam A, Tsuha Y, Horibata S, Shimazu N, Soeno Y, Aoba T, Sata T, Hanada N, and Honda M. Effects of human IL-18 and IL-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. (*Immunology* 2002 Oct; 107(2): 232-42.)
- 2) Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam Md A, Matin K, Shimazu Y, Nakasone T, Horibata S, Aoba T, Honda M, Amagasa T, Senpuku H. Assesment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocytes. (*Immunology* 2003 in press)
- 3) Eda Y, Murakami T, Takizawa M., Maeda H., Kimachi K., Yonemura H., Koyanagi S., Shiosaki K., Higuchi H., Makizumi K., Nakashima T., Osatomi K.,

Tokiyoshi S., Matsushita S.,
Yamamoto N. and Honda M. A
sequential immunization of the V3
peptides from field HIV-1 produces
broadly cross-neutralizing
antibodies against CCR5-tropic
primary isolates. (J. Immunol.
2003, submitted)

2. 学会発表

兼清優、濱武牧子、本多三男
Sequential Immunization を応用
した HIV-1 Env C4-V3 ペプチド
による交差反応性抗体の誘導 第 32
回日本免疫学会総会 (12/4-6
2002 東京 京王プラザ)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

図 1：免疫カニクイサルの血清中抗 V3 抗体価の上昇

免疫群 3 頭の免疫前及び免疫開始 13 週後経過時における血清中抗 V3, 抗 C4 抗体価を ELISA 法で測定した。SP は V3 ペプチドを括弧内は由来株を表し, 下にはアミノ酸配列を

表記した。赤字で示したものは免疫には用いていない株由来あるいは合成リピート配列の V3 に対する抗体価である。

