

厚生労働科学省研究費補助金（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

hu-PBL-SCID マウスを用いた抗 HIV 薬の評価系の開発

分担研究者 田中勇悦 琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター 教授

研究要旨

正常ヒト末梢血単核球(PBMC)を移植したヒトキメラスキッドマウス(hu-PBL-SCID)ではヒトのT細胞が生着増殖することにより、R5 HIV-1 が産生的に感染し、CD4+T 細胞の枯渇を伴う病原性を発揮する。現在、市販され広く使用されている C. B-17 系統の SCID マウスの他に、NK 細胞を完全に除いた 2 系統の common gamma chain KO マウスである NOG (NOD scid 由来)および RAG-2g-KO (RAG-2 scid 由来)、が日本で開発されている。本研究では、これらスキッドマウスの HIV-1 感染評価系への応用性を検討した。これまで X4 HIV-1 の hu-PBL-SCID マウスでの感染実験は困難であったが、in vivo での短期感染後 CD4+T 細胞の in vitro 培養により X4 HIV-1 が増殖し、また、1 週間程度の in vivo 長期感染期間内でもヒト IL-4 を連続的に投与することにより X4 HIV-1 の感染維持が可能であった。つまり、R5 HIV-1 のみならず、不完全ではあるが X4 HIV-1 の感染を制御する薬剤の評価が可能になった。この方法を用いて、製薬会社との共同研究において開発された CXCR4 antagonist である KRH-1637 が腸管吸収性を持ち、X4 HIV-1 感染を hu-PBL-SCID で有意に抑制することを証明した(PNAS 2003. 3、3月12日付けの日経新聞で紹介)。さらに、日本でキャリアの多い HTLV-I の感染モデルとして本 hu-PBL-SCID マウスを応用できる可能性を示すデータを得ており、HIV-1 との重感染についても研究発展の可能性が示唆された。また、樹状細胞を用いて hu-PBL-SCID マウスでヒトの免疫応答を誘導する方法を確立したことにより、HIV-1 の病原性の指標を CD4+T 細胞の枯渇のみでなく免疫誘導不全としてもとらえることが可能になり、今後、さらに方法に工夫を加えることにより、抗 HIV 薬の評価系の奥行きを深めることができると考えている。

A. 研究目的

HIV-1 は活性化された CD4+細胞つまり CD4+T リンパ球およびマクロファージで増殖することによって宿主の免疫不全を引き起こす。これらの免疫担当細胞における HIV-1 の増殖を制御する薬剤を細胞および動物個体レベルで評価できる

実験系を作製することは、エイズ制御を達成する上で極めて重要である。本研究は、個体レベルで HIV-1 の増殖を抑制あるいは促進する薬剤や免疫因子のスクリーニングを可能にする小動物、特に hu-PBL-SCID マウスを用いる実験系を確立することであり、最終的には HIV-1 感染防御、AIDS 発症予防戦略展開のための新たな基盤

を確立することである。

## B. 研究方法

- (1) 細胞調製と *in vitro* 感染：PBMC はフィコール比重遠心分離法で調製した。*in vitro* 刺激は、固相化 CD3 抗体あるいは CD3/CD28 抗体を結合させたダイナビーズとの混合培養により IL-2 存在下で行った。マクロファージ親和性 R5 HIV-1 として主に JR-CSF 株、T 細胞株親和性 X4 HIV-1 として主に NL4-3 株を使用した。
- (2) HIV-1 定量と病原性の判定：産生された HIV-1 p24 を ELISA キットで定量することによって HIV-1 の増殖を推定し、細胞数計測とリンパ球サブセット染色法により HIV-1 の細胞に対する病原性を比較した。
- (3) SCID マウス：CB-17 SCID マウスは日本クレアから購入した。また実験動物中央研究所から common gamma K0 SCID 動物として NOG マウスと RAG-2-g-KO マウスを導入し、琉球大学医学部動物実験施設内 P3 実験室のアイソレーター内で飼育し感染実験に用いた。
- (4) hu-PBL-SCID キメラマウスの作製と HIV-1 感染：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  $\beta$  に対する抗体 (TM  $\beta$ -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 hu-PBL-SCID)。hu-PBL-SCID-spl 作製には、TM  $\beta$ -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 0.4ug/animal を ip 投与した。

- (5) 短期間 *vivo* 感染：試験管内で刺激培養した PBMC を 500 万個をすでに薬剤投与されたマウスに移植し、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 日後に上清中の p24 を測定した。
- (6) hu-PBL-SCID マウスの HTLV-I 感染：NOG マウスにヒト PBMC と MMC 処理した HTLV-I 産生細胞 ILT-8M2 細胞を同時に接種し、1~2 週間後に細胞を採取、4~8 日間培養後に細胞内の tax 抗原を特異的単クローン抗体を用いる方法で間接標識し、FCM で解析した。

(倫理面への配慮は、動物を扱うため、琉球大学の動物実験委員会の承認を得ている。)

## C. 研究結果

- (1) R5 HIV-1 感染動物モデルとしての hu-PBL-SCID マウス

SCID マウス腹腔に PBMC を移植した通常 hu-PBL-SCID では、R5 HIV-1 が増殖し、バイレミアを起こすと同時に著明な CD4<sup>+</sup>T 細胞の枯渇をひき起こす。C.B-17 系統より RAG-2g-KO 系統が、それより NOG 系統のマウスがより R5 HIV-1 の増殖を許容する。hu-PBL-SCID マウス実験系にはまだまだ改良されるべき問題点が多く残っている。第一は、成人の末梢血液材料から PBMC を調製しマウスに移植するが、同じロットの hu-PBL-SCID を数多く作製するのが難しいという点である。なぜならマウス 1 匹に 1 千万個から 2 千万個の PBMC を移植

するので、例えば 200 ml の血液からは 10～20 匹の hu-PBL-SCID しか作製できない。第二に、適性ドナーの選択と GVHD 回避の問題がある。そこで、昨年度より少ない PBMC をマウス脾臓(spl)への直接移植する方法を試みている。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。これらの結果は、脾臓内接種法が、より少ない PBMC サンプルの移植によって同じドナー由来の hu-PBL-SCID マウスの多数作製を可能にする方法として HIV-1 感染実験に役立つことを示している。

一方、私達はこれまで hu-PBL-SCID マウスを用いて、ヒト型の HIV-1 感染免疫応答の誘導に成功した(2002 年バルセロナ国際エイズ会議発表)。試行錯誤しながら開発したこの方法は、強力な免疫誘導活性をもつ樹状細胞 (DC) を試験管内で培養成熟させ、不活化 HIV-1 粒子抗原で感作後に、同じドナー由来の新鮮 PBMC とともにマウスの脾臓に接種する方法である。一次免疫後、5 日目に再度 DC+HIV-1 で免疫するとこれらの HIV-1 で免疫したマウスは HIV-1 攻撃接種に抵抗性を獲得する。抗原コントロールとして DC+卵白アルブミン(OVA) で免疫したマウス群は、OVA に対する免疫応答が誘導されているにも拘わらずすべてのマウスにおいて HIV-1 が増殖する。つまり、キメラマウスという特殊な環境ではあるが、私達の開発した hu-PBL-SCID マウスの免疫法は、生体内で機能する抗 HIV-1 感染防御応答を含め抗原特異的な免疫応答を誘導することが証明された。したがって、この方法を用いれば、ある薬剤の免疫応答誘導に及ぼす影響も評価することができると考えられる。今後、新

たな指標の一つになるであろう。

## (2) X4 HIV-1 感染動物モデルとしての hu-PBL-SCID マウス

そのメカニズムは未だに明らかにされていないが、hu-PBL-SCID マウス体内では X4 HIV-1 は増殖できない。その原因の一つとして、hu-PBL-SCID マウス体内ではヒト CD4+T 細胞が X4 HIV-1 の第二受容体である CXCR4 をあまり強く発現しないことにあると示唆されている。昨年度からの新たな試みとして CXCR4 の発現を促進する組換えヒト IL-4 を hu-PBL-SCID (C.B-17 SCID) に投与したところ、X4 HIV-1 が増殖し弱いながらもバイレミアを起こした。ただし、R5 HIV-1 に比べ 1/100 以下の増殖である。しかしながら、条件付きではあるが、X4 HIV-1 の動物個体感染実験は可能であることがあきらかにされた。本研究で新たにためたことは、他の SCID マウス系統での X4 HIV-1 の増殖である。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。特に RAG-2g-KO マウスで低く、低感染効率は、PBMC のマウス脾臓内接種でも改善されず、また IL-4 投与の効果もなかった。そこで、現在ある 3 種類の SCID マウス系統に PBMC を移植し、X4 HIV-1 感染 1 週間後の CD4+T 細胞上の CXCR4 の発現量を特異的単クロン抗体を用いた FCM で調べた。どのマウスのヒト CD4+T 細胞も同程度の CXCR4, CCR5, CD4 を発現していた。また、得られたリンパ球を培養に移したところマウス血清 10% の添加により著しい HIV-1 産生抑制が観察された。この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。この因子の活性または濃度が C.B-17 マウスでは低いのかかもしれない。

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使えば、少なくとも新たな薬剤の感染初期過程阻害を評価できるはずである。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。

### (3) HIV-1 の感染増殖を制御する薬剤の評価

東京医科歯科大、企業との共同研究であるが、腸内吸収が可能な CXCR4 のアンタゴニスト 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 (PNAS inpress)。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。

### (4) HTLV-I 感染 hu-PBL-SCID マウスの作製

HTLV-I トランスフォーム能の高い細胞株である ILT-8M2 細胞を MMC 処理し、PBMC とともにマウス脾臓に接種し、1~2 週間後に回収された細胞を培養し、tax 発現の有無を anti-tax mAb, Lt-4, による染色方法で調べた。回収細胞には tax 陽性細胞はなかったが *in vitro* での培養により CD4 および CD8+T 細胞集団に明らかに tax 陽性細胞の存在が確認された。このマウスへの HIV-1 接種により HTLV-I と HIV-1 の重感染が研究できると期待できる。

## D. 考察

私たちは昨年度より hu-PBL-SCID の作製

法として、従来の 1/3~1/6 量の PBMC (300 万个) 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。

一方、X4 HIV-1 の hu-PBL-SCID での増殖は R5 HIV-1 と比べて非常に悪い。C.B-17 SCID マウスでは IL-4 の添加によりやや改善が見られたが、根本的な解決策は未だ不明である。NK 細胞を遺伝的に持たない K0 マウスではさらに悪い X4 HIV-1 の増殖効率が観察され、現在のところ C.B-17 SCID 系統のマウスが、X4 HIV-1 の感染には最も適していることが初めて明らかにされた。

ど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。

さらに、日本でキャリアの多い HTLV-I の感染モデルとして本 hu-PBL-SCID マウスを初めて使ったが、HTLV-I 感染細胞の移入により in vivo で HTLV-I に感染した CD4+T および CD8+T 細胞が存在することを実証できた。今後、HTLV-I 感染が HIV-1 との重感染においてどのような影響を与えるのかについても研究してゆきたい。

#### E. 結論

本研究により SCID マウスの種々の系統を目的に応じて的確に選択し、ヒト細胞を腹腔あるいは脾臓へ移植することにより、hu-PBL-SCID マウスとして R5 HIV-1 感染にはそのまま、X4 HIV-1 感染には IL-4 投与によりエイズウイルス感染感受性動物モデルとしてエイズ薬の評価に応用できることが示された。さらに、樹状細胞を用いる免疫誘導がこの hu-PBL-SCID マウスで可能となったことから、抗エイズ薬の評価に新たな指標を補充することができるであろう。また hu-PBL-SCID マウスにおいて HTLV-1 と HIV-1 の重感染系における薬品評価も期待される。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 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 CXC

chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity in vitro and in vivo.

Pro.Natl.Acad.Sci (USA) 2003 in press.

- (2) 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. 2003 in press.
- (3) Saito M, Braud VM, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, and Bangham CRM. Low frequency of CD94/NKG2A-positive T lymphocytes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers. Blood. 2003 in press.
- (4) Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, and Morikawa S. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. Leuk Res. 27(3):275-283, 2003.
- (5) Hiraiwa N, Yabuta T, Yoritomi K, Hiraiwa M, Tanaka Y, Suzuki T, Yoshida M, and Kannagi R. Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 tax through a variant cAMP-responsive element. Blood. 2002 in press
- (6) Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, and Fujii M. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappa B and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Blood, 100(5):1828-1834, 2002.

- (7) Wang X, Miyake H, Okamoto M, Saito M, Fujisawa J, Tanaka Y, Izumo S, and Baba M. Inhibition of the tax-dependent human T-lymphotropic virus type I replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative k-37. *Mol Pharmacol*, 61(6):1359-1365, 2002.
- (8) Mori N, Fujii M, Hinz M, Nakayama K, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Kashanchi F, Tanaka Y, Tomonaga M, and Yamamoto N. Activation of cyclin D1 and D2 promoters by human T-cell leukemia virus type I tax protein is associated with IL-2-independent growth of T cells. *Int J Cancer*, 99(3):378-385, 2002.
- (9) 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.
- (10) Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, and Bangham CRM. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood*, 99(9):3335-3341, 2002.
- (1) 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年7月7日-12日:スペイン パルセロナ.
- (2) 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年10月16-18日:札幌.
- (3) 栗原清, 増田貴夫, 朝長万左男, 宇都宮興, 増田昌夫, 田中勇悦, 神奈木真理 成人T細胞白血病細胞の短期培養による HTLV-I および costimulatory 分子の発現誘導 第50回日本ウイルス学会学術集会 2002年10月16-18日:札幌.
- (4) 高橋良明, 吉田篤司, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦 T細胞補助刺激 TNF 受容体ファミリー分子 OX40 の HIV-1 感染促進と制御 第16回日本エイズ学会学術集会 2002年11月28-30日:名古屋.
- (5) 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年12月4-6日:東京.
- (6) 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年12月4-6日:東京.
- (7) 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

2. 学会発表

発現 第32日本免疫学会学術集会 2002 12  
月4-6日：東京.

(8) 栗原清, 長谷川温彦, 原嶋奈々江, 大橋  
貴, 増田貴夫, 田中勇悦, 神奈木真理 成人 T  
細胞白血病細胞の短期培養による HTLV-I およ  
び costimulatory 分子の発現誘導 第32回日  
本免疫学会学術集会 2002 12 月4-6日：東京.

(9) 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

NOD/SCID マウスを用いた HIV 感染モデル動物の検討：口腔粘膜からの感染

国立感染症研究所動物管理室 浅野敏彦

国立感染症研究所細菌第一部 泉福英信

**研究要旨** ヒト細胞移植 SCID マウスにおいて HIV の口腔粘膜からの感染系を作製するため、ヒトの末梢血単核細胞を $\beta 2$  ミクログロブリンノックアウト NOD/SCID マウスに移植し、IL-4 を投与した後、R5 および X4 HIV-1 を腹腔内または口腔内に接種した。移植後、歯周組織および口腔粘膜においてヒト CD45, CD4, CD8 細胞の定着が認められた。HIV を腹腔内に接種した場合には脾臓および肺に HIV 感染が認められたが、口腔内のヒトリンパ球への感染は認められなかった。また HIV を口腔内に接種した場合には HIV の感染は成立しなかった。

**A. 研究目的：** SCID マウスは、成熟した T, B 細胞を有しておらず、ヒト細胞を移植させることのできる動物として HIV-1 の感染実験に使用されている。しかし、NK 細胞を有しているために、 $\gamma$ 線照射や抗 NK 細胞抗体や抗 IL-2 レセプター抗体を利用して、SCID マウスを処理しないと効率のよいヒト細胞の定着状態を維持することができない。NOD/SCID マウスは、SCID マウスよりも NK 細胞が少ないという点でヒト末梢血単核細胞（PBMC）の定着が 5 倍から 10 倍高いとされている。よって、SCID マウスに代わり NOD/SCID マウスが、ヒト細胞を移植したモデル動物として使用されるようになってきた。さらに近年では、NOD/SCID $\beta 2$  ミクログロブリン

ノックアウト（NOD/SCID B2mKO）マウスが開発され、この MHC class I の構成成分である $\beta 2$  ミクログロブリンが発現されていない NOD/SCID マウスは、CD8 細胞などの細胞性免疫応答に関与する免疫系細胞が活性化されず、NOD/SCID マウスよりもさらにヒト細胞の定着がよいと考えられている。

HIV-1 の感染モデル実験は全身感染の系はあるものの、粘膜感染のモデル系は十分に確立されていない。近年では SIV を用いたサルの実験で、SIV を口腔から接種して口蓋扁桃 MALT(粘膜関連リンパ性組織)から SIV が侵入する研究が報告された。しかし SCID や NOD/SCID マウスを用いる実験系では、マウス粘膜組織にヒトリンパ

球を十分に定着させることに主眼が置かれていなかったためにこれらのマウスを用いた HIV の粘膜感染実験系は確立されていない。そこで本年度は NOD/SCID マウスを用いた HIV の感染モデル動物の検討の一環として口腔粘膜からの HIV 感染が成立するかどうか、このヒト PBMC を移植した NOD/SCID B2mKO マウスを用いることによって検討を行った。マウスは霊長類のように発達した扁桃を持たないため、経口的に接種した HIV-1 が扁桃以外のルートで感染するのかどうかを調べるとともに、歯周病といった口腔疾患を想定し、マウスの歯肉に傷をつけた場合、感染するのかどうかについてもあわせて検討した。HIV-1 感染細胞は、細胞を含まない cell-free HIV-1 に比べて感染効率が高いことが知られているが、本研究では SIV の口腔感染実験でも用いられた cell-free の形で、X4 ウイルスと R5 ウイルスについて感染実験を試みた。

**B. 研究方法:** 健康なヒトの末梢血からフィコール溶液を用いて単核細胞 (PBMC) を分離後、HBSS を用いて細胞浮遊液を調製した。ヒト細胞を移植する前に 2.2Gy の  $\gamma$  線で NOD/SCID B2mKO マウス (雌、6~9 週齢) を照射し、 $3 \sim 5 \times 10^7$  PBMC / 500 $\mu$ 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。サイトカイン IL-4 の投与がマウスにおける hu-PBL の定着に影響を与えるかどうかを、hu-PBL 移植後 5 週目におけるマウス脾臓細胞のフローサイトメトリーと歯周組織の免疫組織化学染色にて検討した。

IL-4 を最後に投与してから 1 週から 2 週経過後に、cell-free の HIV-1 の R5 ウイルスと X4 ウイルスを 100 から 1000 TCID<sub>50</sub> まで濃度を変えて口腔内接種した。また歯周病を想定して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 nested PCR 解析を行った。さらに、血清中の HIV-1 RNA コピー数の検討も行った。マウスの口腔粘膜を剥離し細かく刻んだ後、トリプシン EDTA による処理を施して細胞を分離し、フローサイトメトリーにてマウス口腔粘膜細胞における GalCer や CCR5 などの HIV-1 のエンタリーに関連する分子の発現状況についても調べた。

**C. 研究結果:** 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。特に CD4 陽性細胞が骨髄、歯髄、歯根膜の他、口腔粘膜の特に基底膜直下に豊富に観察された (図 1)。X4 や R5 ウイルスを腹腔内投与したものは、脾臓あるいは肺における HIV-1 プロウイルス DNA の存在が確認され、血清中の HIV-1 RNA コピー数も増加しており、HIV-1 による感染が確認できた。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、傷つかなかった群ともに HIV の口腔接種を行っても感染が起らな

かった (図 2、3)。一方、HIV のエント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。

D. 考察: 今回我々は、脾臓や歯周組織にヒト細胞を豊富に定着させる事が可能な、IL-4 の修飾を加えた hu-PBMC 移植 NOD/SCID B2mKO マウスの粘膜感染系を確立した。IL-4 はキラー細胞や NK 細胞を主体とする Th1 を抑制するため、移植されたヒト細胞は細胞性免疫やアポトーシスから免れ、定着が促進されたものと考えられた。また IL-4 が元来有する T 細胞の増殖促進活性をもって、マウスでのヒト細胞の定着促進に働いたという事も考えられる。

このようなマウスを用いて口腔感染実験を行なったが、我々が用いた各種無細胞 HIV-1 で口腔感染は成立しなかった。SIV を用いたサルでの口腔感染実験においては、扁桃が HIV-1 の侵入部位になるという。この HIV-1 侵入に重要と考えられる扁桃は、齧歯類であるマウスには発達していない。マウスモデルにおいて口腔感染が成立しなかったのは、逆を返せば、扁桃が HIV-1 のターゲットとして有力であることを示唆するのかもしれない。マウス口腔粘膜における CD4、CXCR4、CCR5、GalCer の発現をフローサイトメトリーにて調べた。消化管上皮細胞株では、CCR5、GalCer はそれ

ぞれ 12.3%、11.9%と比較的高い発現を示したのに対し、口腔粘膜において CCR5、GalCer は全細胞中それぞれ 1.7%、1.2%と低い発現にとどまった。今回、感染が成立しなかった理由として、マウスの口腔粘膜細胞に GalCer と CCR5 の発現が弱かったということも考えられた。

E. 結論: HIV-1 伝播の背景を明らかにする上で、客観的な裏付けに乏しくなりがちな疫学研究や、高コストで扱いが困難な霊長類モデルに対して、優れた HIV-1 感染動物モデルの開発が望まれている。本研究で初めて行われた hu-PBMC 移植 NOD/SCID B2mKO マウスを用いた HIV-1 口腔感染実験は再現性のある有用な vivo 実験法と考えられた。このような口腔粘膜のヒト免疫系を再現した本マウスモデルを用いて、さらに高力価の HIV-1 や HIV-1 感染細胞を用いた粘膜感染実験などへの発展が可能になる。

#### F. 研究発表:

##### [学会発表]

1. 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.

##### [誌上発表]

1. H. SENPUKU, T. ASANO, K. MATIN, S. Md. ABDUS, Y. TSUHA, Y. HORIBATA, N.

SHIMAZU, Y. YOENO, T. AOBA, T. SATA, N. HANADA, and M. HONDA. Effects of human IL-18 and IL-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. Immunology 107: 232-242. 2002.

2. R. NAKAO, N. HANADA, T. ASANO, T. HARA, Md A. SALAM, K. MATIN, Y. SHIMAZU, T. NAKASONE, S. HORIBATA, T. AOBA, M. HONDA, T. AMAGASA, H. SENPUKU. Assessment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leukocyte. Immunology 2003 in press.

3. 松本直子、中尾龍馬、武内博朗、花田信弘、泉福英信：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 11；口腔疾患研究に利用できるモデル動物、デンタルダイヤモンド. 385: 50 - 54. 2002.

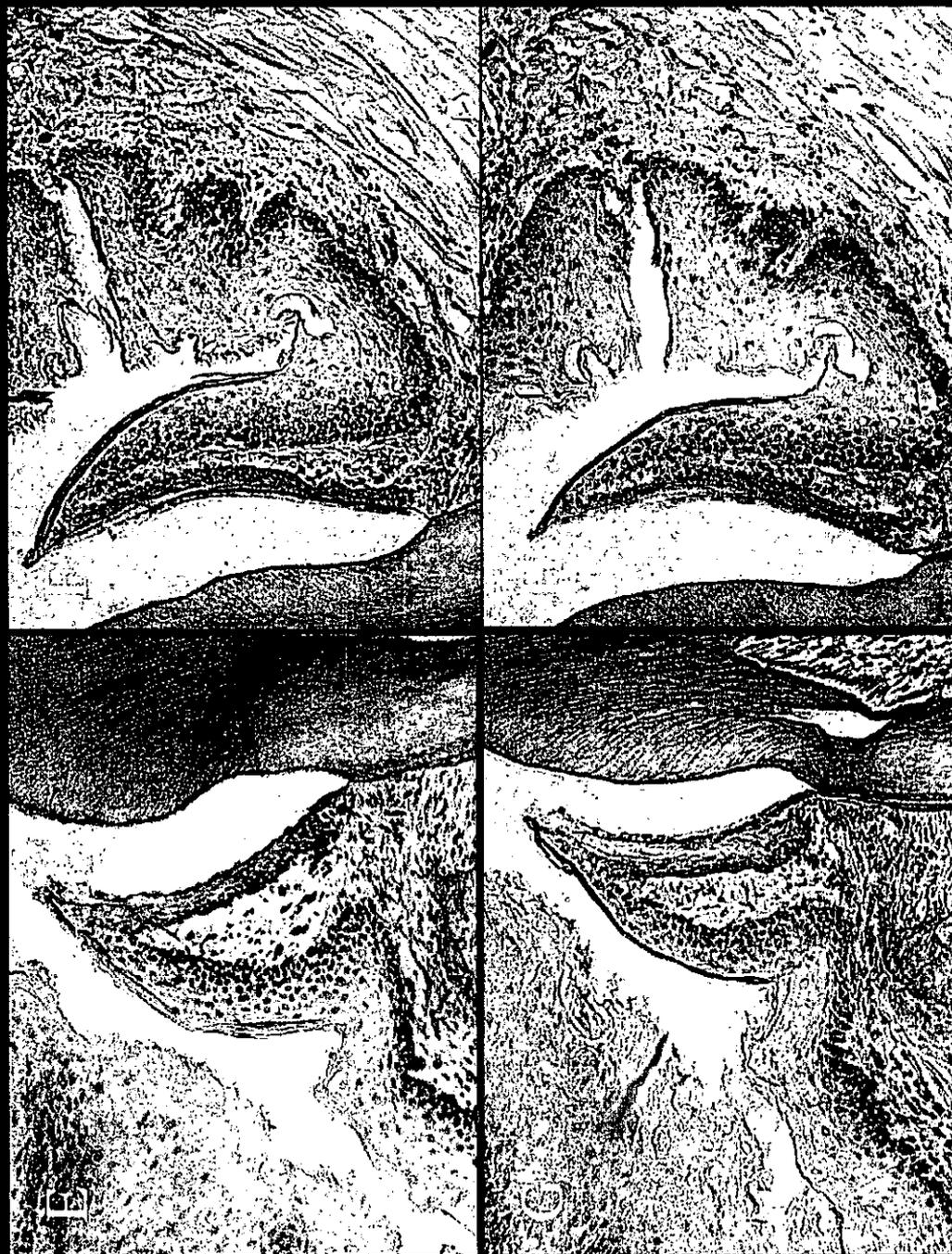
#### G.知的所有権取得状況

特になし

図1 ヒトPBMCを移植したNOD/SCID  $\beta$ 2mKOマウスの  
の歯周組織 (CD4とCD8)

Hu-IL-4

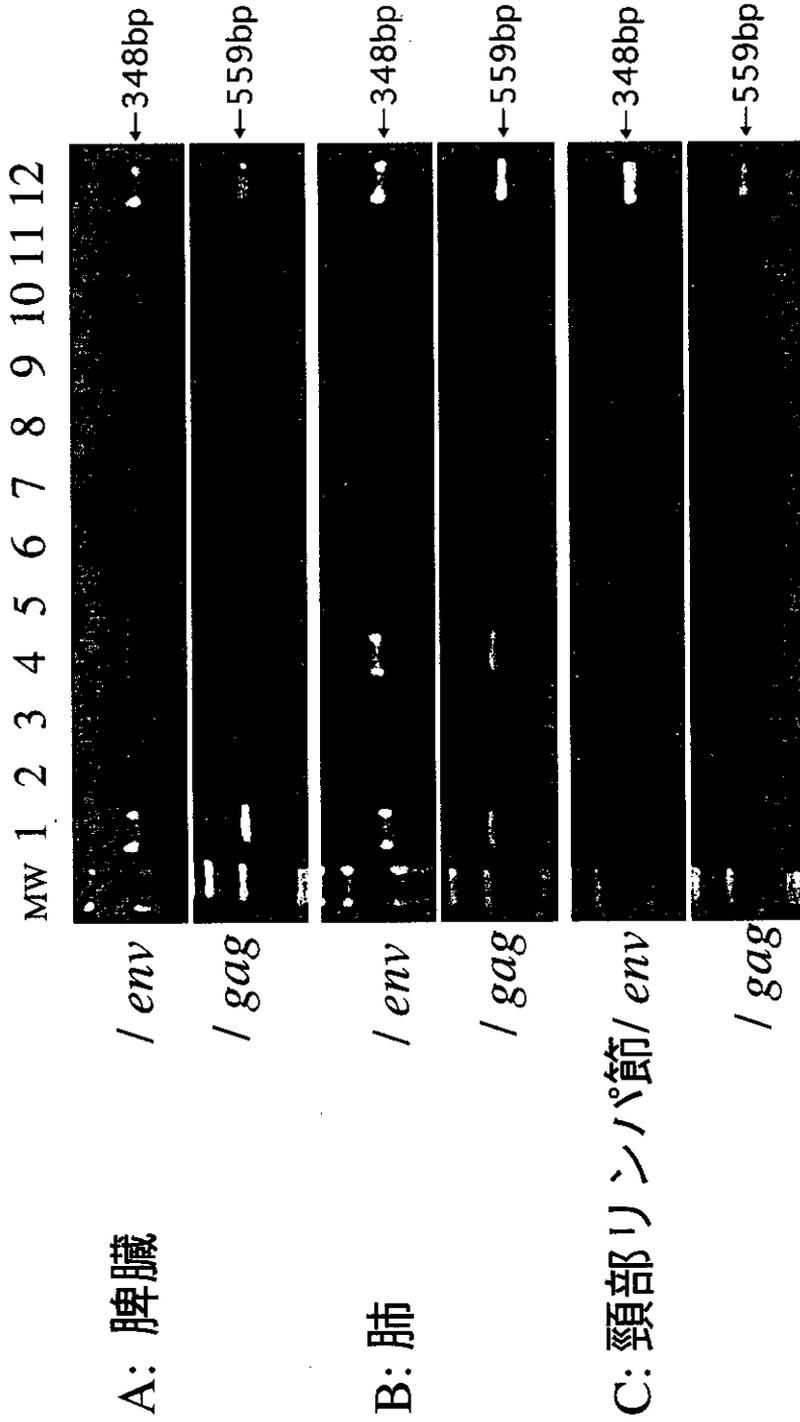
PBS



Hu-CD4

Hu-CD8

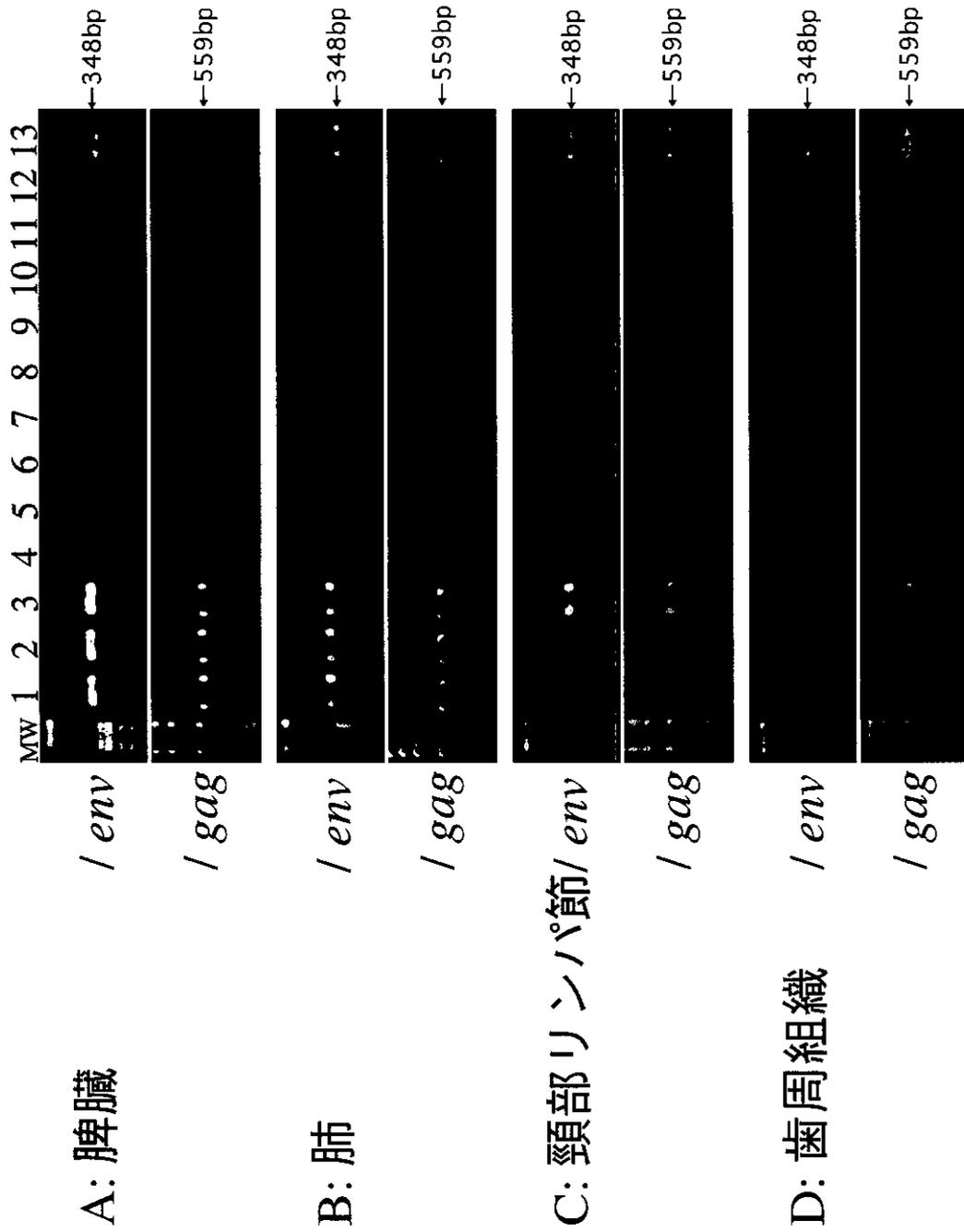
図2 HIV-1 の口腔接種実験 (X4ウイルス)



RNA copy number

lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
dose of HIV (X4 virus)	100TCID <sub>50</sub>		500TCID <sub>50</sub>		1000TCID <sub>50</sub>		1000TCID <sub>50</sub>		no HIV		pc	
route of inoculation	腹腔	傷、口腔	口腔	腹腔	傷、口腔	口腔	傷、口腔	口腔	no cell	no HIV	no tem	pc
RNA copy number	6842	ND	ND	2205	ND	ND	ND	ND	ND	ND	no tem	pc

図3 HIV-1 の口腔接種実験 (R5ウイルス)



RNA copy number

lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
dose of HIV (R5 virus)				100TCID <sub>50</sub>				1000TCID <sub>50</sub>					
route of inoculation	腹腔-1	腹腔-2	腹腔-3	傷、口腔-1	傷、口腔-2	口腔-1	口腔-2	傷、口腔	po	no cell	no HIV		
RNA copy number	15928	16728	17494	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	no tem	pc

モルモットの免疫応答解析システムの構築  
—BCG ワクチンの評価系の確立を目指して—

分担研究者 千葉 丈 東京理科大学基礎工学部教授

研究要旨

モルモットの免疫応答を解析する実験系を構築する目的で、モルモットの Th1 ヘルパーT 細胞と Th2 ヘルパーT 細胞の指標となるサイトカインの遺伝子クローニングとそれらに対するモノクローナル抗体の作製を目指した。すでにクローニングされて塩基配列情報が既知である gpIL-2 の遺伝子については、その遺伝子を登録研究者から入手するとともに、独自に Strain 2 モルモット脾細胞の cDNA からクローニングを行い、統一されていなかった塩基配列情報の問題を解決した。これまで、多くの研究者が試みて失敗しているモルモットの IL-4 遺伝子 (gpIL-4) については、多数の動物の IL-4 遺伝子の塩基配列を系統進化的に解析するなどして、さまざまなプライマーを設計して PCR の条件検討を行ったが、gpIL-4 遺伝子のクローニングには成功していない。

A. 研究目的

細胞性免疫応答を強力に誘導できる BCG ベクターを用いて、HIV-1 の Core や Env タンパク質などを発現する BCG ベクター-HIV-1 ワクチン候補が開発されてきている。そのため、このワクチンをはじめとする細胞性免疫応答の増強を目指したワクチンを評価するための小動物の開発が求められている。

モルモットは BCG に対して非常に良く応答し、ヒトの PPD に対する遅延型の皮膚過敏症反応と類似の反応を示すことから結核菌ワクチンの開発研究に古くから用いられてきたので、BCG ワクチンの評価のための小動物としてはモルモットが最適の動物と考えられる。

しかしながら、モルモットを用いた免疫学は 19

80 年の前半にピークとなり、その後の免疫学研究はマウスを実験動物として発展したことから、モルモットの免疫応答を解析するシステムは不備であって、BCG ワクチンを詳細に評価するためにはそのシステムを改めて整備する必要がある。モルモットの Th1 ヘルパーT 細胞と Th2 ヘルパーT 細胞の指標となるサイトカインの遺伝子クローニングとそれらに対するモノクローナル抗体の作製を目指した。Th1 ヘルパーT 細胞の指標となるサイトカインの代表として IL-2 遺伝子を、Th2 ヘルパーT 細胞の指標となるサイトカインの代表として IL-4 遺伝子をクローニングすることを目的とした。

B. 研究方法

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 ( ) は、その塩基配列登録 ( ) を行った研究者の一人である山口大学農学部岩田裕之教授より供与された。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て、PCR によって gpIL-2 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定して登録されている配列と比較した。gpIL-4 遺伝子をクローニングするために、以下の PCR 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。(1) 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。(2) 各種のほ乳類の IL-4 遺伝子を系統樹により解析し、齧歯類に共通の配列から設計されたプライマー。

#### C. 研究成果

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、番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 の塩基配列も番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。

#### D. 考察

gpIL-2 cDNA の塩基配列が確定できたので、gpIL-2 に対する抗体の作製が可能になった。DNA 免疫用のプラスミドベクターに gpIL-2 cDNA を組み込んで、DNA 免疫を開始している。GpIL-4 遺伝子は、これまでいくつかの研究グループがそのクロー

ニングを試みているが失敗しており、部分配列さえも明らかにされていない。リンパ節や脾臓での発現が極端に低い可能性があるので、mRNA の精製を再度行うとともに、genomic PCR によるクローニングを試みる必要があるかもしれない。

#### E. 結論

モルモットの Th1 ヘルパーT 細胞と Th2 ヘルパーT 細胞の指標となるサイトカインの遺伝子クローニングとそれらに対するモノクローナル抗体の作製を目指した。gpIL-2 cDNA の塩基配列を確定し、gpIL-2 に対するモノクローナル抗体の作製に着手した。gpIL-2 をはじめとするさまざまなサイトカインを産生する細胞を定量する ELISPOT アッセイを確立し、昨年までの研究で作製されたモルモットの免疫グロブリンのアイソタイプ特異的モノクローナル抗体や、モルモットの Fc レセプターなどの免疫系細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体を利用することで、モルモットの BCG ベクター HIV-1 ワクチンに対する免疫応答を解析できるようになると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究成果

##### 1. 原著論文

Mari Takizawa, Joe Chiba, Shinji Haga, Toshihiko Asano, Naoki Yamamoto and Mitsuo Honda: Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. Cytometry Research, in press.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

分担研究者 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** ヒトエイズにおける新規抗エイズ療法の開発を目的とし、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)感染系において small interfering RNA (siRNA)の抗ウイルス効果を検討した。siRNA は FIV 持続感染細胞において FIV mRNA およびタンパクの発現を抑制し、逆転写酵素活性を低下させ、そのウイルス増殖抑制効果は siRNA の濃度に依存的であった。このことから、siRNA による抗ウイルス療法を臨床的に応用できる可能性が示唆された。

協力研究者 大野耕一、馬場健司、水越文徳、

堀内弘司

### A. 研究目的

ネコ免疫不全ウイルス (FIV) はネコに感染し、ヒトエイズと同様の免疫不全症候群を引き起こすウイルスである。これまでに我々は、FIV 感染症において血漿中ウイルス RNA 量と病期の進行の間に相関があることを明らかにしてきたが、現在のところウイルス増殖を効果的に抑制する治療法は獣医臨床に應用されていない。ヒトの HIV 感染症においては逆転写酵素阻害薬およびプロテアーゼ阻害薬等を中心とした抗エイズ療法が臨床應用されているが、薬剤耐性変異株の出現が問題となっており、新規の抗ウイルス療法の開発が必要とされている。

small interfering RNA (siRNA) は 3' 末端に 2 塩基のオーバーハングを有する約 20 塩基からなる 2 本鎖 RNA である。siRNA は RISC と呼ばれる蛋白複合体とともに相補的な mRNA と 2 本鎖を形成し、

標的 mRNA を特異的に切断する。近年、siRNA による各種遺伝子の発現抑制効果が *in vitro* において報告され、新規の特異的な遺伝子発現抑制療法として期待されている。本研究においては、ヒトエイズにおける新規抗エイズ療法の開発を目的とし、その小動物モデル系として FIV 感染系を用い、FIV 遺伝子に特異的な siRNA によるウイルス増殖抑制効果を培養細胞系において検討した。

### B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

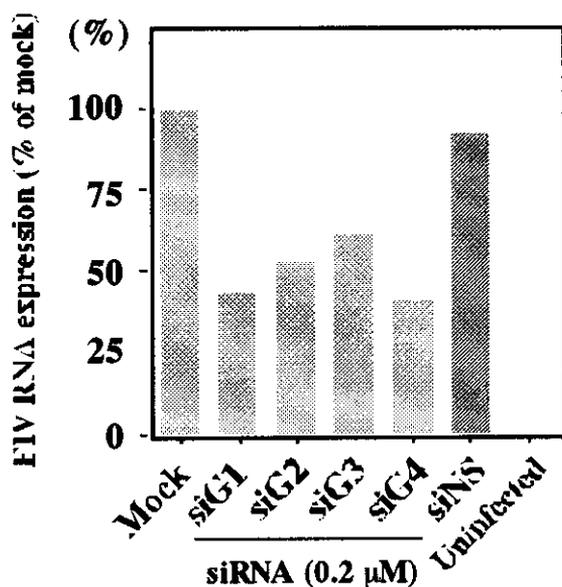
本研究においてはヒトおよびその他動物を直接対象とした方法ではなく、倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

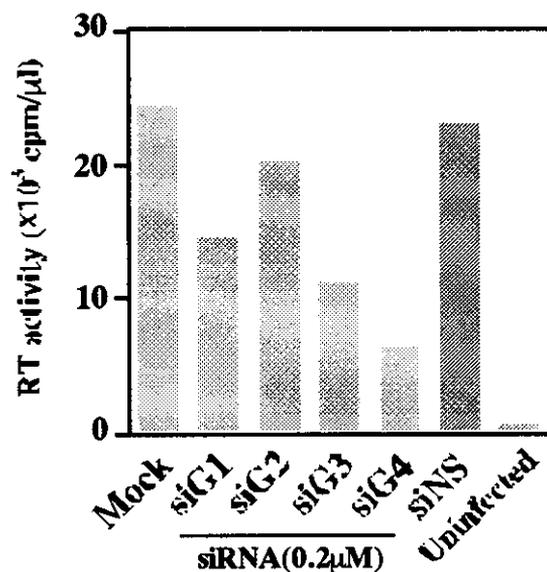
0.2 μM の抗 FIV siRNA を導入することにより、FIV *gag* RNA の発現量はそれぞれ 43.6% (siG1)、54.0% (siG2)、61.5% (siG3)、41.5% (siG4) に減少した (図 1)。同様に、培養上清中の逆転写酵素活性

(図 2) 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、とくに siG4 は最も強い増殖抑制効果を示した。

次に 40 nM、0.2 μM、1 μM の濃度の 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 (図 3) 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。とくに 1 μM の濃度では *gag* RNA の発現は 92.9%、ウイルス複製は 96.3% の抑制が認められた。

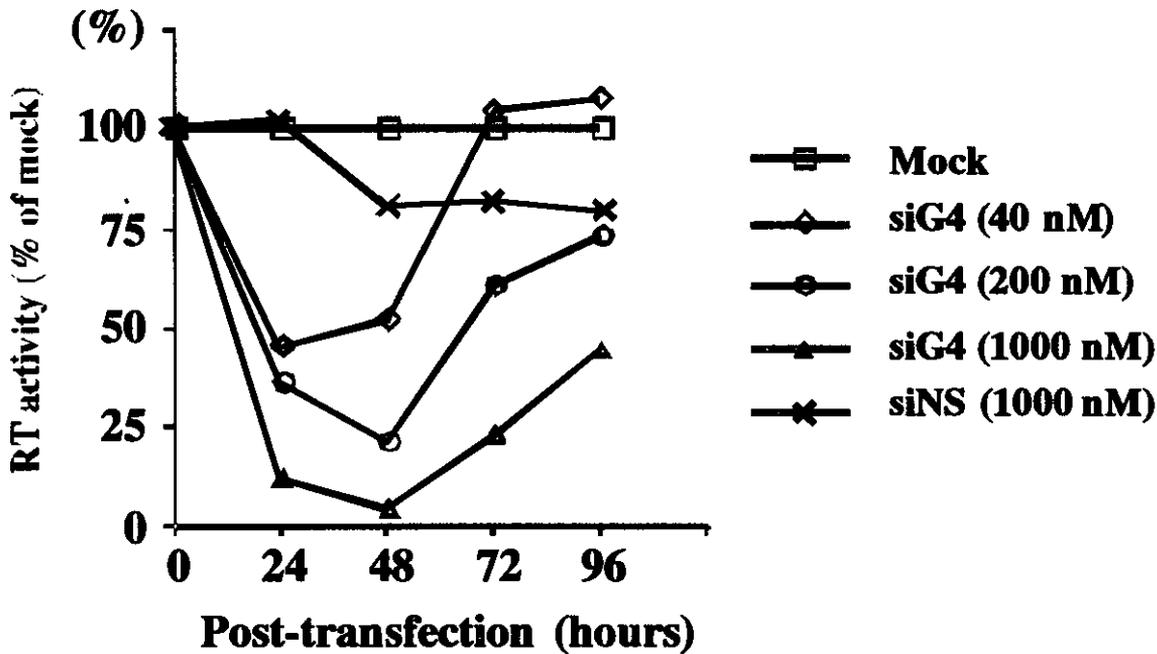


(図 1) siRNA による FIV RNA 発現抑制効果



(図 2) siRNA による FIV 増殖抑制効果

(図3) siRNAによる濃度依存的なFIV増殖抑制効果



#### D. 考察

今回検討した抗 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) はとくにその効果が強く、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、サブタイプの異なる株、とく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 導入をおこなっている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骨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、FIV 感染ネコへの siRNA 導入法を検討する予定である。

## E. 結論

FIV 感染系において siRNA は顕著なウイルス増殖抑制効果を示し、その効果は siRNA の濃度

## F. 健康危険情報

健康危険情報に該当する事項はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mizuno, T., Goto, Y., Baba, K., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. TNF-alpha-induced cell death in feline immunodeficiency virus-infected cells is mediated by the caspase cascade. *Virology* 287: 446-455 (2001).

2. Fujino, Y., Mizuno, T., Masuda, K., Ohno, K., Satoh, H. and Tsujimoto, H. Assignment of the feline Fas ligand gene (TNFSF6) to chromosome F1q12-->q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 94(1-2): 92-93 (2001).

3. Fujino, Y., Mizuno, T., Masuda, K., Ohno, K., Satoh, H. and Tsujimoto, H. Assignment of the feline Fas (TNFRSF6) gene to chromosome D2p13-->p12.2 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 95(1-2): 122-124 (2001).

4. 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).

に依存的であった。このことから、siRNA による抗ウイルス療法を臨床的に応用できる可能性が示唆された。

1. 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(2): 107-113 (2003).

### 2. 学会発表

1. small interfering RNAs (siRNAs) による FIV 特異的遺伝子発現抑制  
馬場 健司、水越 文徳、堀内 弘司、  
増田 健一、大野 耕一、辻本 元  
(第 135 回 日本獣医学会)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：該当事項なし

2. 実用新案登録：該当事項なし

3. その他：該当事項なし