

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

小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の

予防治療効果評価系の開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 勇悦

琉球大学大学院医学研究科

平成17（2005）年3月

目次

I. 総括研究報告

田中勇悦：

小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発

II. 分担研究報告

- (1) 本多三男：SCID-hu 及び hu-PBL-SCID マウス系 HIV-1 中和抗体・ワクチンの抗 HIV-1 評価
- (2) 小柳義夫：HIV 感染による神経組織破壊のモデル動物の開発
- (3) 西澤雅子：ワクチン感作樹状細胞免疫法および薬剤の HIV-1 臨床株、野生株に対する評価
- (4) 辻本元：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
- (5) 伊藤守：HIV-1 感染増殖と免疫誘導を可能にする新たな高度免疫不全マウス系の開発

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

厚生労働省科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

「小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発」

主任研究報告書

主任研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：エイズワクチンおよびエイズ薬候補の生体内効果を簡便かつ迅速に評価する新たな小型動物エイズ実験系を開発する班研究を本年度よりスタートした。初年度の具体的な研究成果は、本報告書の該当ページに掲載されるが、それぞれの研究のキーポイントを以下に挙げてみる。（１）田中はワクチン検定に用いるヒト樹状細胞(DC)の新たな分化培養法を独自に見だし、hu-PBL-SCID マウスでその免疫誘導能を証明した。さらに DC による不活化 HIV-1 粒子の免疫と CXCR4 アンタゴニスト投与との併用が R5 HIV-1 のみならず X4 HIV-1 感染に対しても感染防御能を賦与することを観察している。（２）本多は、NOD-SCID マウス系統にヒト PBMC や胎児組織を移植することにより、野生型 X4 HIV-1 の感染を再現できるマウス HIV-1 感染モデル系を作製し、HIV-1 ワクチン候補である組換えワクシニア DI_s 株の簡易防御免疫アッセイ法を確立した。（３）小柳は、NOD-SCID マウスを用いてエイズ脳症モデルの作製を試み、hu-PBL-SCID マウスの脳内中枢神経組織にウイルスを侵入させるには LPS などマクロファージを活性化するシグナルが不可欠であることを証明した。（４）西沢は、DC の分化を検討し、hu-PBL-SCID マウスでワクチン候補の評価を試みている。（５）辻本は、ネコの免疫不全モデルを検討し、ウイルス特異的 shRNA の導入による遺伝子治療の可能性を示した。生体を用いた *in situ* 遺伝子導入による遺伝子治療の可能性を示すデータを得ている。（６）伊藤は、hu-PBL-SCID マウスにおいて X4 HIV-1 感染系の改良を目的として、人リンパ球上の CXCR4 の発現を促進する IL-4 に着目し、ヒト IL-4 トランスジェニック SCID マウスの作製を始めた。以上、これらの研究成果は、班会議において活発で具体的な討論がなされており、次年度への弾みとしている。

A. 研究目的

本研究班は、新規エイズ薬およびワクチン候補の生体内における抗ウイルス活性や副作用を、迅速にしかも簡便に評価できる汎用小型動物モデルを開発することにより、エイズ克服のための医薬品開発に寄与することを目的としている。開発目標は、HIV-1 感染に用いるヒト免疫細胞を移植した免疫不全

(SCID)マウスモデルが主体であり、ネコエイズ(FIV)感染に用いるネコモデルも含めた。これらの動物モデルはある程度の基盤が確立されているが、感受性や応用面では未だ不十分である。さらにヒトをシュミレーションしたワクチン評価ということはこれまで不可能であった。そこで、本研究では、最近我が国で開発された高度免疫不全 SCID マウス系統

を用いて、ヒト免疫細胞を移植したキメラマウスを用いることにより、従来よりも高い HIV-1 感受性を持ち、HIV-1 薬剤を評価できる実験系を作ること、ヒトの免疫不全誘導のみならずエイズ脳症を惹起する方法も独自に開発すること、ワクチンによりヒト型の抗 HIV-1 感染防御免疫を効率的に誘導しその評価ができる新たな方法を開発すること、国内で開発されたウイルス感染阻止 CXCR4 アンタゴニスト候補等も評価できる系を作ること、以上を到達目標として研究を進めた。特に、ヒト細胞の移植方法の改良、樹状細胞の分化誘導方法の開発、ワクチン免疫方法の改善、CXCR4 アンタゴニストの評価法の再検討、発生工学を用いた SCID マウスシステムの改良等を行い、現時点の評価系の最適化と簡素化を計ることに重点を置くことにした。また、より自然な環境での薬剤やワクチンのウイルス感染予防効果やエイズ治療効果の判定を可能とするために、薬剤やワクチンの評価実験には感染性ウイルス（臨床株あるいは野性株を含む）を用いた感染実験を行うことを基本姿勢とした。

以下に、主任研究者である田中の平成16年度の研究テーマである樹状細胞免疫及び CXCR4 アンタゴニスト評価に関する研究成果を報告する。分担研究の具体的成果については、本報告書の他ページを参照してもらいたい。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

一般的なヒト DC の培養には、末梢血単核球 (PBMC) から単球を市販キットで抗

体 negative あるいは抗体 positive 法で分離するか、あるいは単球のプラスチック付着性により分離し、その後試験管内で GM-CSF と IL-4 の添加培養により DC に分化させる方法が用いられている。

今回、単球の分離培養の方法として特異的抗体による単球の CCR5 および CXCR4 の架橋を検討した。特異的単クロン抗体は田中が作製したラット IgG 抗体 anti-CCR5 T312 および anti-CXCR4 A120 をプレートにコーティングし、PBMC をその中で数時間培養して付着単球を得た。その単球分画を GM-CSF と IL-4 を含む 5%FCS-RPMI1640 培地で 5~8 日間培養し、最終分化には ヒト IFN-beta を用いた。得られた DC は、AT-2 で不活化した HIV-1 で感作し、hu-PBL-SCID マウスに免疫した。CCR5 や CXCR4 の架橋により単球の HIV-1 感受性がどのように変化するのか、実際の HIV-1 感染実験を行うとともに架橋後の CD4, CCR5, CXCR4 の発現性を FCM で解析した。さらに、CXCR4 アンタゴニスト (T1636 呉羽化学より供与) について、上記の DC-HIV-1 免疫マウスに対して X4 HIV-1 耐性を付与するかどうか、ip 接種後の感染実験を行った。HIV-1 の感染防御判定は、感染動物の血清中の HIV-1p24 量、および腹腔より分離したヒトリンパ球の IL-2 添加培養後の培養上清中の p24 量の測定で判定した。

この動物実験は、琉球大学の動物実験倫理委員会で審査され、許可されている。

C. 研究結果

血液細胞の分化においてケモカインは

重要な役割を果たす。そこで、HIV-1 の標的となる単球や CD4+T 細胞、および DC の前駆細胞ともなる単球において細胞表面上の HIV-1 受容体であるケモカイン受容体 CXCR4 や CCR5 を架橋したらどのような生物学的な変化が起きるのか？このような単純な発想から、田中らがすでに独自に樹立したラット抗ヒト CCR5 N-terminus 抗体 (T-312)、または抗ヒト CXCR4 ECL1&2 抗体 (A120) を固相化したプレート上で PBMC を一晚培養した。驚くべきことに PBMC 中の殆どの CD14+単球がプレートに強く吸着した。興味あることにこれらの吸着単球は外からのサイトカン添加をしなくとも培地だけでマクロファージに分化した。さらに T312 や A120 で刺激した単球やマクロファージでは R5 HIV-1 の感染・増殖が非刺激細胞より低く抑制された。その機序の一つとして単球上の CD4 の down-modulation が FCM 解析で明らかとなった。CD4 リンパ球ではこのような顕著な現象は認められなかった。T312 または A120 刺激単球を GM-CSF+IL-4 または IL-4 のみを加えて培養したところ DC が誘導された (論文作成中)。

この DC を不活化 HIV-1 で感作して hu-PBL-SCID マウスを免疫することによって、R5 HIV-1 抑制因子を誘導することができた。また現在確認中であるが、in vitro のアロ刺激反応において、特に CXCR4 架橋刺激を受けた DC はより強い Th1 応答を惹起する能力があった。

これらのマウスは R5 HIV-1 には耐性であるが、X4 HIV-1 には未だ感受性である。そこで、これらの DC 免疫マウスに十二指腸

吸収性 CXCR4 アンタゴニスト T1636 を投与したらどうであろうか？DC-HIV-1 免疫を施した 5 匹の hu-PBL-SCID マウスに T1636 を腹腔内接種し、R5 および X4 HIV-1 を混合接種による感染が完全に阻止された。T1636 を接種しないマウスでは X4 HIV-1 の感染は阻止できなかった。現在、この観察を確認するため再実験を行っている (論文作成中)。

D. 考察

動物個体において、人の免疫応答をシュミレーションする系は、現在の所 hu-PBL-SCID マウスしかない。我々の研究によって、hu-PBL-SCID マウスに特異的免疫応答を惹起するには DC 免疫が必要であることが明らかにされた。DC を試験管内で機能的に分化する方法に関しては近年様々な競争的工夫がなされてきている。このような中でも、今回、我々が発案した DC の誘導法は様々な意味で独創的である。第一には、単球上のケモカイン受容体であり HIV-1 の coreceptor でもある CCR5 または CXCR4 を特異的抗体で架橋するだけで単球のプラスチックへの接着性が高まり、末梢血単核球分画より単球の分離が簡単で効率よく行えることである。この操作によってドナーによってプラスチック付着能が弱い単球の付着性を促進することができる。第二には、その刺激を受けた単球は M-CSF や GM-CSF などのファクターを加えることなしにマクロファージに分化するのでマクロファージの研究において大量調製が可能となる。この現象は、ケモカイン受容体の刺激が M-CSF 受容体あるいは GM-CSF 受容体の

シグナル伝達系に何らかの影響を及ぼすことを示唆しており、別のテーマとしても機序の解明が急がれる。第三に、この培養系に IL-4 単独または GM-CSF と IL-4 を添加すると DC に分化することであり、さらにこのような DC は、アロ応答において Th1 応答を強く誘導する能力を持つことが示唆されたことである。つまりワクチンによる免疫効果が細胞性免疫の誘導に依存する場合には、CCR5 や CXCR4 刺激で分化培養した DC を使って免疫誘導能を検討すべきことが示唆される。付加的であるが、第四に挙げるべきは、これら CCR5 や CXCR4 で刺激を受けた単球やマクロファージでは、HIV-1 の主受容体である CD4 が著しく down-modulation を受けることにより、R5 HIV-1 の感染が顕著に抑制されたことである。つまり、この方法を使えば HIV-1 感染者からの PBMC 検体からウイルスフリーの DC を誘導できる可能性があり、今後その検証を計画している。今後さらに、DC の培養について CCR5 や CXCR4 以外のケモカイン受容体の関与を調べ、他には costimulation 分子 (OX40L や CD40L) の影響を探ることが必要であろう。

特筆すべき観察結果は、DC による HIV-1 免疫で R5 HIV-1 抑制状態になった hu-PBL-SCID マウスに十二指腸吸収性 CXCR4 アンタゴニスト T1636 を腹腔内投与することにより、マウスが CXCR4 を使用する X4 HIV-1 に対しても感染抵抗性となることである。これまでの研究において、T1636 は DC を用いた免疫誘導には阻害的影響は与えないことが証明されているので (Murakami ら国際エイズ学会 2004)、これら DC による HIV-1 免疫

と CXCR4 アンタゴニスト投与の併用が臨床においても HIV-1 感染防御や治療に応用できる可能性を示唆している。

E. 結論

未だ健常人でも HIV-1 感染者でも末梢血液からの DC の分化誘導は簡単ではない。ヘルパー T 細胞をより強くかつ長期に刺激する活性を持つ機能的 DC の培養方法の確立が急がれる。また DC-HIV-1 免疫方法とケモカインアンタゴニストなど他の薬剤との併用は HIV-1 の完全抑制に向けて今後とも検討する意義があると考えられる。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学医学部で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

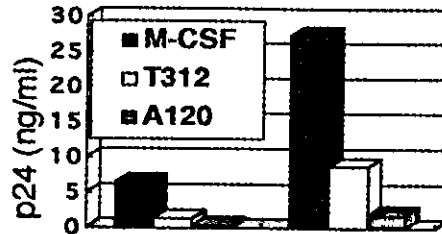
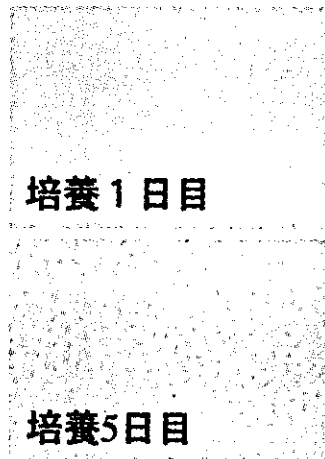
G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshida A, Kodama A, Tanaka R, Yamamoto N, Ansari AA and Tanaka Y. Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppressor factor by human CD4+T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2005. in press.
- (2) Nakayama E, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, and Shioda T. A CCR2-V64I

- polymorphism affects stability of CCR2A isoform. AIDS 18(5): 729-738, 2004.
- (3) Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, and Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. J Immunol. 173(6): 3716-3724, 2004.
2. 学会発表
- (1) Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V641 polymorphism affects stability of CCR2A isoform. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, abstract vol. 2, p 9.
- (2) Tanaka Y, Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Yamamoto N. Heterogeneity of HIV-1 epitopes recognized by a novel HIV-1 suppression factor-producing human CD4+ T cells derived from hu-PBL-SCID mice immunized with HIV-1-loaded autologous DC. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, abstract vol 2, p 319.
- (3) Murakami T, Yoshida A, Kumakura S, Tanaka R, Mitsuhashi S, Hirose K, Yanaka M, Yamamoto N, Tanaka Y. KRH-2731-5HC1: A new potent and orally bioavailable X4 HIV-1-inhibiting CXCR4 antagonist in vivo. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, Program supplement p 30.
- (4) Tanaka Y. Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of R5 HIV-1 suppression factor by human CD4+ T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL-SCID mice and immortalization of the factor-producing CD4+ T cells. Fortieth Anniversary United States-Japan cooperative medical science program, Kyoto 7-10 December 2004, Abstract p375.
- (5) 村上努、田中礼子、山本直樹、田中勇悦 KRH-2731 5Hc1 : 新規 CXCR4 アンタゴニストは経口利用可能な HIV-1 侵入阻害剤である。第 5 2 回日本ウイルス学会総会 横浜 11/21/2004, 抄録 p217
- (6) 吉田篤司、村上努、田中礼子、田中勇悦 CCR5 指向性 HIV-1 感染防御因子(CD4 因子)を産生するヒト CD4+細胞株の樹立と解析。第 3 4 回日本免疫学会総会・学術集会記録 札幌 12/1/2004, 抄録 p91
- (7) Tanaka Y. Protection of hu-PBL-SCID mice against HIV-1 infection by dendritic cell-based immunization. 第 1 8 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 vol.6 No. 4 2004, シンポジウム p 329.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

CCR5 またはCXCR4を架橋した単球は、プレートに強く接着し、培地のみでマクロファージに分化する。しかもR5 HIV-1感染が抑制される



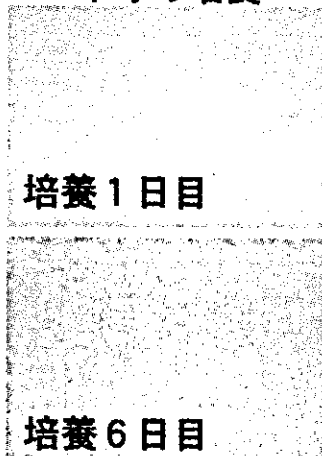
d5 d12
Infection of day 5-Mφ with HIV-1_{JR-FL}

CD4, CCR5の発現抑制が関与すると考えられる。

T312またはA120をコートした培養プレート

CCR5 またはCXCR4を架橋した単球は、IL-4とGM-CSFで培養すると免疫誘導活性を持つDCに分化する

単球の培養



免疫動物血清の抗HIV-1活性

Mouse 血清	HIV-1産生(pg/ml)	
	R5 HIV-1	X4 HIV-1
非免疫	6,400	25,000
コントロールDC	<10	30,080
T312-DC#1	<10	33,170
T312-DC #2	<10	35,350
T312-DC #3	<10	33,130

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（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

SCID-hu および hu-PBL-SCID マウス系 HIV-1 中和抗体・ワクチンの抗 HIV-1 評価

分担研究者 本多三男 エイズ研究センター第一研究グループ グループ長

研究要旨：小動物を用いた HIV/AIDS モデル動物の開発を行い、ワクチンなどの抗エイズ物質に応用する。我々のグループでは NOD scid マウスにヒト PBMC や胎児組織を移植することによりヒトでの HIV 感染を想定したマウス HIV 感染モデル系を作成し利用してきた。ヒト PBMC 感染モデルで見られたこの動物モデルの特徴は野生型ウイルスの感染を再現できることであったが、移植後 naïve 細胞が消失していくため、初期免疫反応を誘導するのが困難であった。しかし、今回行ったヒト胎児胸腺・肝臓組織を移植した NOD scid-hu Thy/Liv マウスは、ヒト PBMC 移植モデルでは消失していく末梢 naïve T 細胞の長期にわたる産生能が確認された。さらに、静注によるウイルス接種で HIV 感染が成立し、CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の減少や、ヒト PBMC 移植マウスで見られた末梢 CD4⁺ T リンパ球の減少と末梢ウイルスコピー数の増加といった HIV 感染時に特徴的に起こる反応が見られた。また、感染マウスの各組織から HIV の proviral DNA が検出できたことより、接種したウイルスは移植組織だけでなく、産生された末梢中の T リンパ球でも感染し、複製していると考えられる。さらに現在このモデルにおける naïve 細胞の長期にわたる産生能より困難であった初期免疫反応の誘導を検討中である。

現在のヒト組織移植動物モデルの開発は、期待されるサブプロジェクトが始まっているが、その完成には数年を要すると予測されるので、現状での一時的なアッセイ系として組換えワクシニア HIV 野生株をチャレンジウイルスとして用いたワクチン評価系の確立を行い、その効果はサルエイズモデルの効果と極めて類似していることから野生型組換えワクシニアを用いたマウスワクチン効果評価系を確立した (Someya et al. J. Virol. 78:9842-53, 2004)。

協力研究者

堀端重男，兼清優，山本直樹(国立感染症研究所・エイズ研究センター)，網康至（国立感染症研究所・動物管理室）

A. 研究目的

現在、HIV/AIDS モデルを完全に再現できる動物モデルはなく、HIV 感染株、特に HIV 野生株の感染の制御が 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 HIV 野生株あるいは臨床株の感染コントロールすることは極めて難しく、HIV 野生株の感染モデルは 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 NOD scid マウスモデルを用いて PBMC などを含めたヒトリンパ組織を移植し、野生株の制御を目的とした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、さらには初期免疫を誘導しうるワクチン評価系の構築、長期感染及び免疫モデルへの改良を目的とする。

B. 研究方法

1. NOD scid マウスへの正常ヒト PBMC の腹腔移植やヒト胎児胸腺・肝臓の腎被膜下移植により、ヒトリンパ組織の移植が成立したマウスを作製する。
2. 移植マウスに HIV 野生株 HIV-1 MNp を Challenge し、感染モデルを構築する。
3. ヒト胎児胸腺・肝臓の腎被膜下へ移植することで得られる NOD scid-hu Thy/Liv マウスのヒト胸腺、末梢リンパ球の HIV 感染時における変化を PBL 移植マウスとの比較を中心に解析し、野生株ウイルスの特性を明らかにする。さらには長期感染及び免疫モデルとしての有効性について検討を行う。

(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いる。動物実験に関しても、各機関での動物実験委員会の規定に従い、実験計画の許可を取って行っている。組換え DNA 実験に関しては、組換え DNA 実験指針に従い、各機関の委員会の許可を得て行っている。ヒトサンプルに関しては個々の病院での倫理委員会の承認、患者の同意を得て行われている。

C. 研究結果

- ① NOD scid マウスにヒト PBMC を腹腔内移植することで移植マウスを作製すると、移植後の経過時間と共に末梢血及び脾臓中のヒト CD4/CD8 の割合が変化し、CD8 細胞が優位になり、また、naïve T 細胞も減少し、最終的に移植後約 4 週でヒトリンパ球のほとんどは memory T 細胞になった。
- ② ヒト胎児胸腺・肝臓移植をマウス腎被膜下に移植した NOD scid-hu Thy/Liv マウスでは腎被膜下での正常なヒト胸腺細胞の増殖・分化が見られた。さらには PBMC 移植系では消失していく naïve T 細胞を血中に放出し、かつ CD4/CD8 の割合もヒト末梢血同様一定であった。

③ ヒト胎児肝臓移植 3 ヶ月以降に末梢血中にヒト細胞が確認されたマウスについては野生株である HIV-1 MNp をウイルス感染力価 1000TCID₅₀ での静注投与によりウイルス感染が成立し、移植組織、脾臓といった臓器からウイルスが分離された。また感染による CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の減少や、ヒト PBMC 移植マウスで見られた末梢 CD4⁺ T リンパ球の減少と末梢ウイルスコピー数の増加といった HIV 感染時に特徴的に起こる反応が見られた。また、感染マウスの各組織から HIV の proviral DNA が検出できた。

④ 末梢血中のヒト T リンパ球において X4-tropic ウイルスである MNp の感染により CXCR4⁺ CD4⁺ T リンパ球、naïve CD4⁺ T リンパ球がまず減少し、次いで CD4⁺ T 細胞自体が枯渇していった。

D. 考察

HIV の感染をコントロールでき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移植後のマウス中でのヒト細胞のサブセット変化により、免疫誘導における免疫一時反応、特に細胞性免疫の誘導が困難であり、二次反応の解析ができなかった。この重要な欠点を克服すべく、ヒト胎児胸腺・肝臓移植 NOD scid マウスの確立を行った。PBMC 移植モデルでは CD4 細胞より CD8 細胞が時間経過とともに優位になっていたのが、このモデルでは一定の割合で存在し、また消失していったヒト naïve T 細胞の産生を末梢血および脾臓中で確認でき、初期免疫を誘導しうるヒト細胞の存在を明らかにし、感染モデルとしての有効性も証明できた。

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 モデルとしてのヒト胸腺肝臓移植 NOD scid マウスで確立することができた。また、このモデルではヒト末梢 T リンパ球の HIV 感染時に起こる特徴的な生体反応を再現し、併せてヒト胸腺とともに細胞レベルで解析可能となったモデルである。さらに、これらの結果より、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免疫一次反応のワクチン効果を評価できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin K-Q, Yamamoto H, Uesaka H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M, Vaccination of rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. *J.Virol* 79:1452-62, 2005..
- (2) Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20 (3):337-340, 2004.
- (3) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental Animals* 53:321-329, 2004

2. 学会発表

- (1) Mitsuo Honda, Kazuhiro Matsuo, Tadashi Nakasone, Kenji Someya, Naoto Yoshino,

Yasuyuki Izumi, Takaichi Hamano, Mari Takizawa, Masaru Kanekiyo, Shigeo Horibata, Mamoru Kawahara, Tomotaka Okamura, Shinichiro Hattori, Shinrai Ohta, Shihoko Komine, Yasushi Ami and Naoki Yamamoto. Update on development of prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and a non-replicating vaccinia virus recombinant. (16th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP 2004 Dec. Kyoto)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

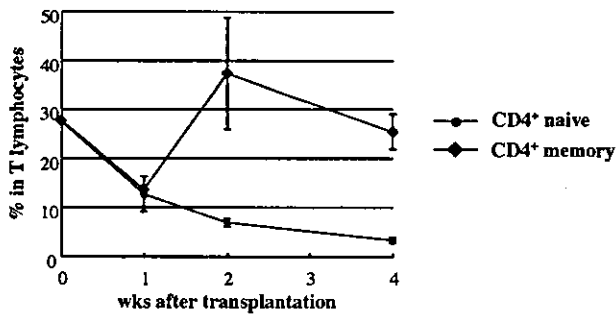


Fig. 1 Naïve/memory ratio in peritoneal lavage cells of hu-PBL-NOD scid mice

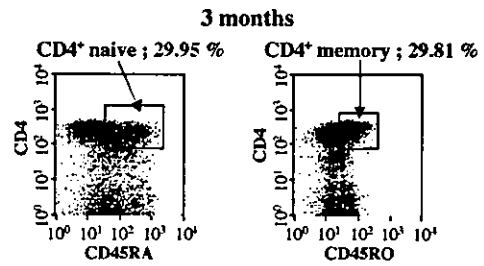


Fig. 2 Human naïve/memory CD4 T lymphocytes in spleen of NOD scid-hu Thy/Liv mouse

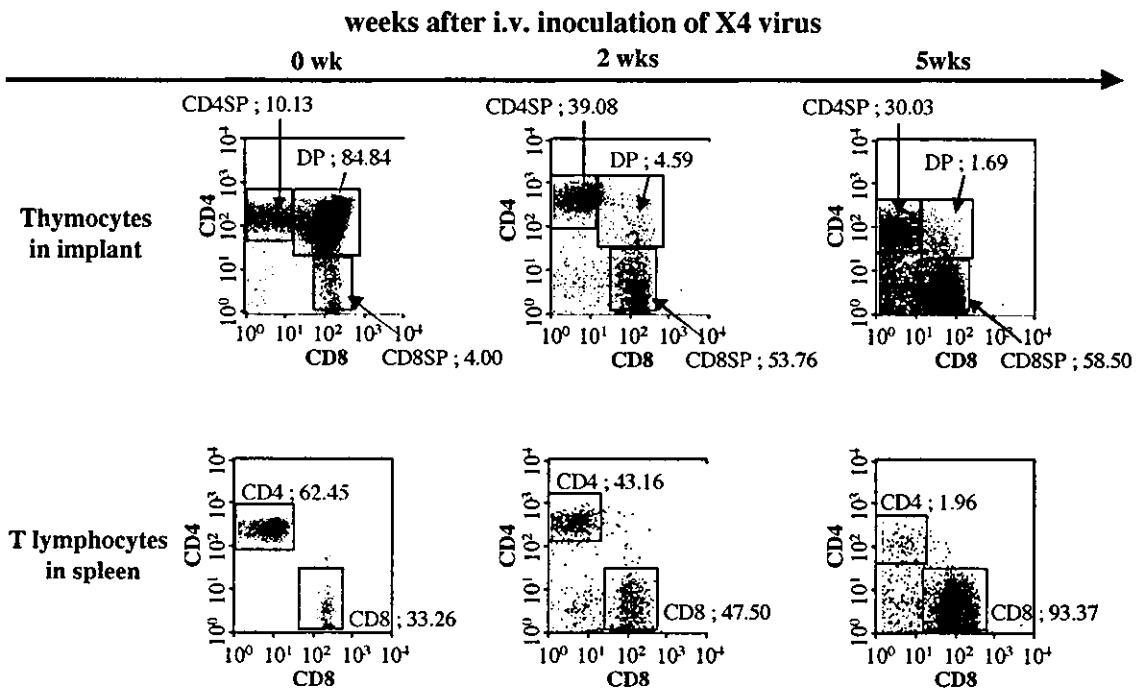
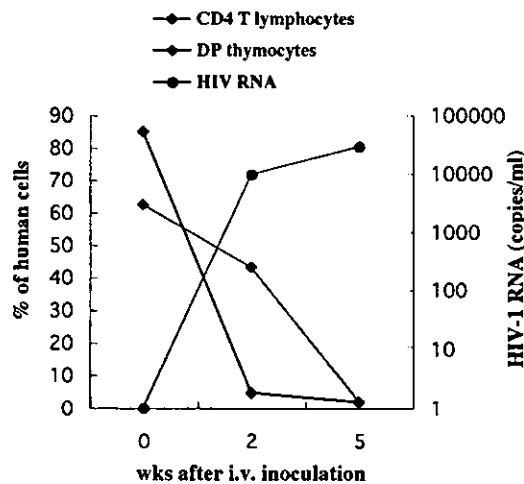


Fig. 3 Relationship between thymocytes and T lymphocyte for HIV-1 infection

Fig. 4 HIV-1 replication involving depletion of each human cells



厚生労働省科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
「小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発」

分担研究報告書：

研究項目：HIV 感染による神経組織破壊のモデル動物の開発

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

共同研究者 三浦 義治 京都大学ウイルス研究所 助手

共同研究者 中畑 龍俊 京都大学医学研究科 教授

研究要旨

HIV 感染による神経組織破壊を再現するモデル系を開発するために免疫不全マウスに末梢血を移植し、HIV-1 感染後、LPS を投与した。このマウスにおいては T 細胞ならびにマクロファージの細胞活性化が生じ、脳へ浸潤していることが強く示唆された。また、この脳内に浸潤した HIV-1 は記憶障害などの神経症状を誘導することはないことがわかった。また、脳内における神経組織破壊をリアルタイムに検討するために海馬スライス培養系を確立した。さらに免疫不全マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウスの実験法としてヒト CD34 陽性細胞移植による方法も検討し、HIV-1 感染実験を行い、このマウスは HIV-1 感受性が末梢血移植マウスでのそれに比べ劣っていた。

A. 研究目的

本研究は小型動物を用いてエイズ薬の治療効果評価が可能なモデル実験系を開発することを目的としている。そのなかでも、特に神経組織破壊を再現するモデル実験系を確立し、エイズの病態のなかで免疫不全症状とともに大きな問題になる脳症のメカニズム解明とそれに有効な治療薬の開発に寄与する研究を目指す。現存の逆転写阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤などの治療薬はすべて中枢神経系への移行は非常に悪く、問題となっている。さらに HIV 感染に伴う脳症の発症メカニズムについてはほとんど解明されていない。それは、HIV はほとんど神経細胞に感染しないこと、中枢神経組織において HIV 感染細胞は脳内に浸潤したマクロファージならびに脳にもともと局在するマクロファージ系細胞であるマイクログリアでありながら、明らかに感染者においては神経細胞の脱落とグリア細胞の増殖 (gliosis) が観察される。今後、抗エイズ薬長期服用者が激増している現状からも、なぜ、HIV が中枢神経組織を破壊するか明らかにし、有効な薬剤を開発する、あるいは、見出す必要がある。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) HIV 感染マウスモデルの作製と免疫染色による解析

ヒト末梢血単核球 (1×10^7 個) を NOD-SCID common γ 鎖ノックアウト (NOG) マウスの腹腔内へ移植し、5 日目に HIV_{JR-FL} を腹腔内に接種し、さらに 7 日目に LPS (Sigma, 100 μ g) を腹腔内に接種した。3 日後にマウス脳や脾臓組織を取り出し、4% periodate-lysine-paraform

aldehyde (PLP) にて固定し、凍結切片を作製する。組織切片を抗 human TNF ウサギポリクローナル抗体 (Endogen, Inc.)、抗 human TRAIL マウス単クローン抗体 (clone RIK-2, 順天堂大学八木田博士より分与)、抗 human HLA-DR マウス単クローン抗体 (NICHIREI Co.) をつかって免疫染色を行った。また、抗 HIV gag p24 ヤギポリクローナル抗体 (ViroStat) を用いて免疫染色を行った。

2) HIV 感染マウスモデルの神経学的試験
短期記憶能を検討できる T-maze continuous alternation task (T-CAT) 試験を施行した。全長 75 センチ、幅 12 センチの T 迷路を作製し、マウスへ 15 回の T-CAT 試験を施行し、左右どちらの迷路を選択するか記録した。

3) 脳組織スライス培養実験
哺乳 7-8 日目のハノーバラットあるいは ICR マウスを断頭し、脳を摘出し海馬を露出させ、McIlwain ティッシュチョッパーにて海馬溝に垂直に厚さ 350 μ m にスライスした。これをあらかじめ準備しておいた 6 ウェル培養プレート内の培養プレートインサート (Millicell-CM:PICM03050, Millipore) 上に 1 ウェルあたり、4-5 枚の密度で培養した。このスライスを凍結切片を作製し、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) ウサギポリクローナル抗体 (DAKO)、あるいは、anti-NeuN ラット単クローン抗体 (Chemicon) を用いて蛍光免疫染色を行った。これら蛍光染色の解析には Leica のレーザー顕微鏡と CCD カメラを使用した。また、さらにヒト末梢血よりマクロファージを分離し、HIV_{JRFL} を感染させ、このスライス培養とトランスウエルを用いて共培養実験を行った。

4) NOG マウスへの臍帯血移植実験と HIV-1 感染実験

臍帯血より autoMACS 自動磁気細胞分離装置により分画した CD34 陽性細胞 (陽性率 95%以上) を選択し、2.4 Gy の放射線照射後、8-10 週齢のオス NOG マウスへ、尾静脈より 2×10^5 個の CD34 陽性細胞を移植した。移植後、3-4 ヶ月後に HIV_{JRCSP} を腹腔内に接種し、感染後 14 日目に解剖し、腹水、末梢血、脾臓、腹水、骨髄を分離後、Ficoll によりヒト細胞を回収した。回収細胞内の HIV-1 遺伝子の量を Real-Time PCR により strong stop DNA を primer binding site と U5 特異的なプライマーを用いて定量した。

(倫理面への配慮)

本動物実験の施行にあたり本学実験施設に設置されている実験動物委員会に動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な実験施行を行うように指導を受け、すべての実験は承認されている。また本学において血液の分与に際し本学医学研究科倫理委員会の承認のもとインフォームドコンセントを得、採血を行い NOG マウスへの移植実験、ならびに、感染実験に使用した。

C. 研究結果

1) HIV 感染細胞の脳組織浸潤モデルマウスの開発

末梢血細胞移植 NOG マウスへのマクロファージ指向性ウイルス (HIV_{JR-PL} 株) を接種し、LPS を投与した。マウスの脳内では、多数の CD3 陽性ヒト T 細胞と HIV-1 gag p24 陽性の HIV 感染細胞の脳実質内への浸潤とともに、血管周囲へ多くの CD68 陽性ヒトマクロファージが細胞浸潤していた (図 1A の模式図)。そのマウス内では全身臓器、特にリンパ臓器において移植したヒト細胞に活性化が起こり、中枢神経組織へ浸潤させているのか明らかにするために、NOG マウス脾臓内の細胞活性化を検討した。図 1B にその結果を示す。ヒト HLA-DR 陽性、あるいは、ヒト TRAIL ならびにヒト TNF α 陽性細胞数があきらかに LPS 処理マウスにおいて極めて増加しており、細胞活性化が生じ、脳へ浸潤していることが強く示唆された。

2) 脳 HIV 感染細胞浸潤モデルマウスの神経学的評価

この細胞活性化による HIV-1 陽性細胞が脳へ浸潤したマウスの神経学的評価検討を行うために T-CAT 試験による短期記憶試験を感染後 LPS 接種を行い 3 日目、5 日目、そして 8 日目に行った (図 2 上段は 5 日目)。この試験は主に海馬機能を評価する実験法である。その結果、HIV-1 感染マウスと非感染マウスの間には優位な差は見出されず、むしろ、HIV-1_{JR-PL} 感染マウ

スにおいて T-CAT 試験の結果記憶能の上昇が見られたが、統計学的に有意なものではなかった (図 2 下段)、われわれの HIV-1 感染細胞浸潤モデル系は神経学的に症状を伴うものではないことが判明した。

3) 脳スライス培養法の確立と HIV 感染実験への応用

脳組織内の組織構築と感染による影響をリアルタイムで把握できる実験系として、3 次元構築された脳組織そのものを培養できるスライス培養系の確立を行い、その培養系をさらに HIV 感染による影響の評価実験を行った。まず、哺乳 7-8 日目のラットあるいはマウスから海馬を取り出し、そのまま、薄切し、ミリポア膜上にて培養を行った。培養直後は層構造も形成されていなかったが、培養 2 週目には中央に CA1 や CA3、そして、dentate gyrus などの神経細胞層と周辺のアストロサイト層が再構築された (図 3-A 左)。そして、免疫染色の結果、これらの神経細胞層 (NeuN 陽性細胞) とアストロサイト層 (GFP) の分布は確認された (図 3-A 右)。現在、この培養系に HIV 感染マクロファージを接種し、このスライス培養された神経組織に対する影響を検討している。予備的実験の結果では、この神経組織構築に影響を与えることを見出している。

4) NOG マウスへの臍帯血移植実験

ヒト末梢血移植 SCID マウスでは移植後数ヶ月目には構築されたヒトリンパ球のなかで Xenoreactive な T 細胞による Graft-Versus-Host Disease (GVHD) が起こり、長期間にわたる感染宿主の経過観察は不可能である。そこで、移植するヒト細胞をより未分化なヒト血液幹細胞を含む CD34 陽性細胞、そして、この GVHD の原因となる Xenoreactive ヒト T 細胞の混入を防ぐ方法が考えられる。そこで、臍帯血より CD34 陽性細胞を分離し、NOG マウスへ骨髄移植実験を行った。その結果、移植後、まず 1 ヶ月後には末梢血においてヒト CD45 陽性の細胞群が出現し、そして、2-3 ヶ月後には CD3 陽性ヒト細胞がおおよそ、10-20%程度まで増えることを認めた。そこで、このヒト細胞構築マウスに HIV を接種し、感染後 2 週目に解剖し、各臓器のヒト細胞回収し、HIV 感染効率を検討した。その結果、HIV-1 陽性細胞が PCR 法により確認された。表 1 は HIV-1 感染実験の典型的一例を示している。しかし、その陽性細胞数は末梢血移植マウスに比べ 100 分の 1 から 1000 分の 1 と非常に少なく、感染効率は現在のところそれほど高くないことがわかった。なお、末梢血移植マウスのように、HIV 感染マウスにおけるヒト CD4 陽性細胞の減少は見られなかった (結果示さず)。また、培養によりウイルスの

分離ができるほどウイルス感染量は多くはなかった。

D. 考察

本研究は小型動物を用いたエイズ薬の治療効果評価系開発のなかで、神経組織破壊を再現するモデル実験系を確立し、HIV 感染による脳症のメカニズム解明とそれに有効な治療薬の開発に寄与する研究の推進である。

まず、なぜ、HIV が脳内に侵入するかも明らかにはなっていない。ウイルスが直接侵入するのか、あるいは、感染細胞が侵入するのか、また、感染細胞の侵入にはなんらかのシグナル分子の刺激が必要であるのか。多くの疑問が残されている。本研究では LPS 投与という操作を加えた。これはヒト細胞の脳内浸潤増強効果を期待したもので、その機序は脳血管内皮細胞における VCAM-1 および E-セレクトインの発現と関与していると考えられている。実際、LPS を腹腔内投与したマウスの脳血管内皮細胞ではこれらの分子の発現増強を確認している。文献上も HIV 感染者および SIV 感染サル脳では、VCAM-1 の発現が脳内浸潤細胞と近接していること、また、LPS は単球系細胞に加え、血管内皮細胞も活性化することが報告されている。実際、ある程度進行した HIV 感染患者もしくはエイズ患者でもこのように末梢血中の血管内皮を活性化させる因子により、単球系細胞と血管内皮細胞が活性化され、脳内細胞浸潤が起こると考えられる。そして、この LPS の処理により血管内皮細胞の活性化とともに浸潤する細胞の強力な活性化が起きていることが、今回の脾臓における HLA-DR 陽性細胞の増加、ならびに TRAIL、そして、TNF- α 陽性細胞の増加から明らかになった。抗 CD3 あるいは CD68 抗体との二重染色の結果、HLA-DR 陽性細胞のほとんどはヒト T 細胞、TRAIL と TNF- α 陽性細胞はヒトマクロファージ細胞であることが確認されている（結果示さず）。そして、この脳内に HIV 感染細胞を浸潤させてマウスにおいて神経細胞にアポトーシスが以前から誘導できることは確認しているので（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 2777-2782, 2003）、この神経細胞死が実際の個体になんらかの兆候を誘導しているか検討した。神経学的検査として今回は T-CAT 試験を施行した。本試験は主に海馬機能を評価する実験法であり、その個体の短期記憶能を検討するものである。しかしながら、感染マウスと非感染マウス間にはこの試験上差異は認められず、神経学的兆候を伴うほど広範なものではないことがわかった。本試験以外に passive avoidance task といわれる電気刺激を記憶しているか否かの検討も行ったが、感染マウスと非感染マウ

ス間には有意な差異は認められなかった（結果示さず）。

3次元に構築された中枢神経組織を顕微鏡下にリアルタイムに観察する方法として脳組織スライス培養系が知られている。本方法は脳海馬組織を 350 μ m 程度にスライスし、その組織そのまま培養しようとするものであり、培養のための回収により組織構築が破壊された海馬組織がふたたび構築され神経細胞層やグリア層が顕微鏡下にて観察されるものである（図 3）。現在、このスライス培養系に種々の HIV 感染細胞とトランスウエルを用いた共培養系実験のなかから、HIV 感染ヒト初代マクロファージと共培養を行うと数日以内に神経細胞層に破壊が誘導されることを見出した。この破壊は他の HIV 感染細胞株との共培養系では見られず、HIV 感染マクロファージが遊離するなんらかの神経阻害因子の存在を疑っている。

免疫不全マウスである SCID マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウスへの HIV 感染実験のひとつとして T 細胞 B 細胞に加え NK 細胞も欠損する NOG マウスにヒト末梢血を移植し、感染実験系を確立した。しかし、2ヶ月以上にわたる長期観察は GVHD のため不可能である。そこでヒト血液幹細胞を含んでいる CD34 陽性細胞の移植によるヒトキメラマウスの構築はなされ、このマウスは6ヶ月以上にわたり問題なく生存し、ヒト細胞が定着していることがわかった。そこでこのマウスへの HIV-1 感染実験を施行した。しかし、末梢血中のヒト細胞は 10^4 個以下と非常に少なく、また、感染効率も現時点では非常にすくないことがわかった。高ウイルス血症も再現されず、ウイルス分離も成功しなかった。今後、移植細胞数、移植時の放射線量、そして、ドナーの年齢等の改良が必要であることが判明した。

E. 結論

小型動物を用いたエイズ脳症治療の効果評価系確立に向けて一定の学問的進歩が得られた。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物委員会、組換え DNA 委員会の規定に基づき、すべて P3 実験施設で行われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Feng J, Misu T, Fujihara K, Misawa N, Koyanagi Y, Shiga Y, Takeda A, Sato S, Takase S, Kohnosu T, Saito H, Itoyama Y. Th1/Th2

balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- α . *J. Neuroimmunol.* 51: 189-194, 2004.

- ② Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes & Infection* 6: 715-724, 2004.
- ③ Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78: 8654-8662, 2004.
- ④ Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J. Virol.* 78: 11352-11359, 2004.
- ⑤ Kamada M, Li RY, Hashimoto M, Kakuda M, Okada H, Koyanagi Y, Ishizuka T, Yawo H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2499-2508, 2004.
- ⑥ Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, Mitsuya H. Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.*, 79: 2087-2096, 2005.
- ⑦ Miura Y, Koyanagi Y. Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev Med Virol*, in press.
- ⑧ Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Human Reproduction*, in press.

2. 学会発表

- ① Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Koyanagi Y. A cDNA library-expressing lentivirus vector system to identify inhibitor gene for human immunodeficiency virus type 1

(HIV-1)-induced cell death. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2004.

- ② Aoki J, Koyanagi Y. Stable inhibition of CXCR4 with siRNA-expressing lentivirus vector. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2004.
- ③ 芳田剛、河野祐治、稗田訓子、青木淳、三浦義治、小柳義夫. cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる HIV 抑制因子の単離 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ④ 稗田訓子、芳田剛、青木淳、三浦義治、河野祐治、田中勇悦、小柳義夫. 生細胞における HIV コレセプター分子の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑤ 三浦義治、小柳義夫. エイズ脳症で起こる神経細胞死には TRAIL 分子が関与する. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑥ 岡田広司 三浦義治 川口寧 西山幸廣 小柳義夫. 中枢神経組織スライス培養系を用いた単純ヘルペスウイルス 1 型の感染様式の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑦ Koyanagi Y, Aoki J, Yoshida T, Ebina H. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004.
- ⑧ Koyanagi Y, Kawano Y, Yoshida T, Jun Aoki. A cDNA library-expressing lentivirus vector system used to clone an inhibitor for HIV-1-induced cell death. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004.
- ⑨ 青木淳、蝦名博貴、小柳義夫. HIV 増殖関連細胞因子の siRNA 発現レンチウイルスベクターによる解析. 第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
- ⑩ 芳田剛、稗田訓子、河野祐治、青木淳、小柳義夫. ゲートウェイ法による効率的 cDNA ライブラリの組換え反応を利用した発現レンチウイルスベクター: HIV 抵抗性遺伝子の単離. 第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.

3. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得状況
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 HIV感染マウスモデルの作製と免疫染色による解析

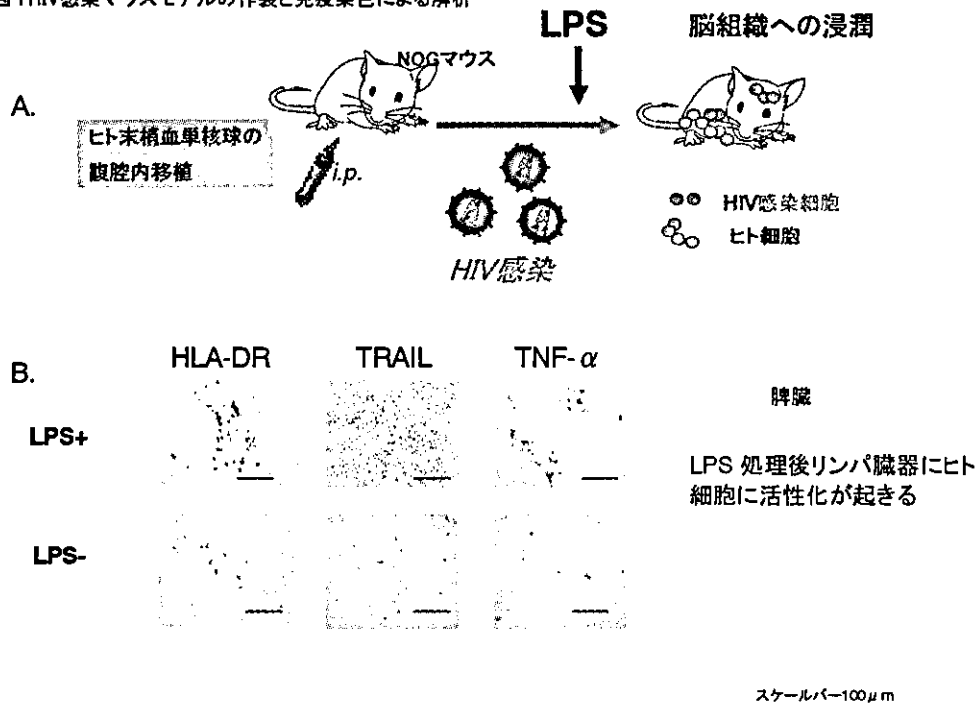


図2. HIV感染マウスモデルの神経学的試験

T-CAT (T-maze continuous alternation task)

