

図3. 海馬スライス培養系の確立と評価、そして、HIV-1感染細胞との共培養実験

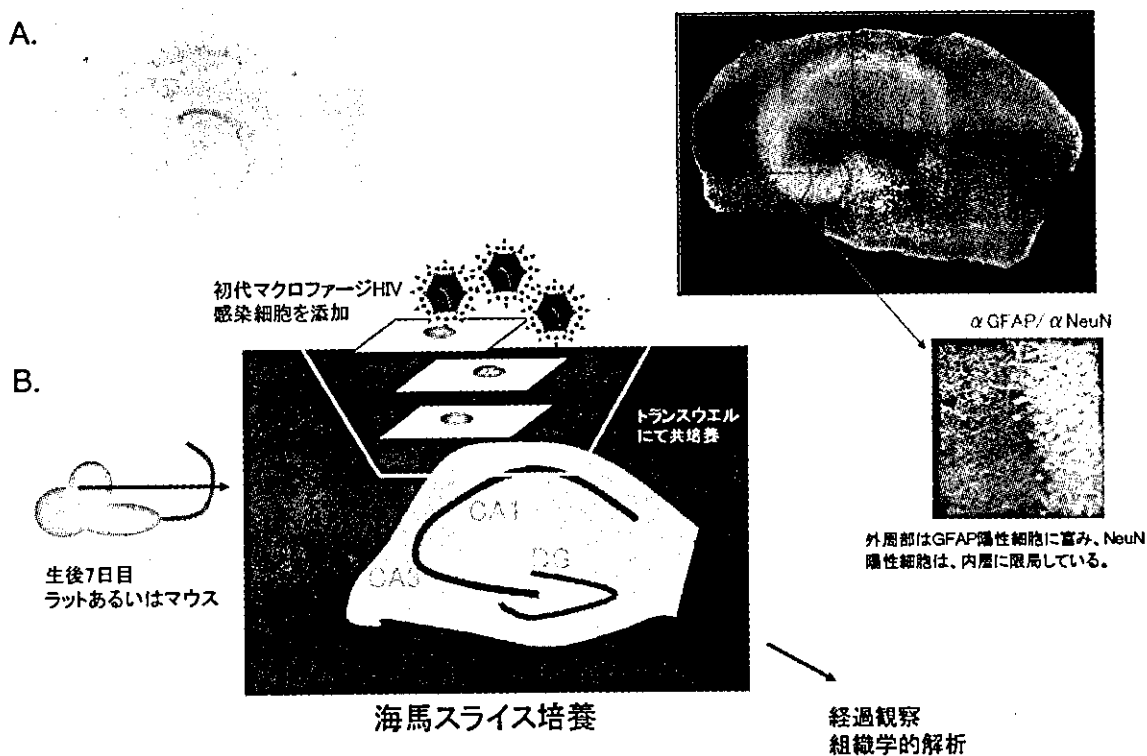


表1. NOGマウスへの臍帯血移植実験とHIV-1感染実験

NOG マウス ♂

8週齢  $1.2 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> cells移植

移植後12週 CD3; 16.2-25 %, CD19; 27.5-30 %

移植後20週目 HIV-1感染

JRCSF 8000 TCID<sub>50</sub> (腹腔内接種)

感染後14日目に解剖

摘出臓器 HLAABC陽性

回収ヒト細胞数

腹水	$2.2 \times 10^5$	PCR 陽性
血液	$0.5 \times 10^4$	
肝臓	$1.2 \times 10^5$	PCR陽性
脾臓	$1.2 \times 10^6$	PCR強陽性
		800コピー/ $10^5$ cells
骨髄	$8 \times 10^5$	PCR 陰性

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

ワクチン感作樹状細胞免疫法および薬剤の HIV-1 臨床株、野性株に対する評価

分担研究者 西澤雅子 国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ厚生労働技官

研究要旨：ヒト PBMC から CD14 陽性単球を分離し樹状細胞を培養分化・誘導する実験系を構築した。樹状細胞 (DC) の分化誘導に必要なサイトカインを検討した結果 GM-CSF、IL-4、IFN- $\beta$  の組み合わせにより、形態学的に DC 特有の形状を示す細胞（ギムザ染色後顕微鏡下で分葉核と樹状突起を持つ）が多数観察出来た。細胞表面マーカー解析においても成熟 DC マーカーである CD86、HLA-DR、CD83 の発現上昇が確認された。DC の抗原提示能の解析では、抗原特異的に誘導される CD4 陽性 T 細胞による [ $^3$ H]thymidine 取り込みが確認できた。DC の抗原提示能を *in vivo* で評価するために、hu-PBL SCID マウスの系を構築し、不活化 HIV/DC ワクチンによる抗 HIV 効果の hu-PBL SCID マウスでの評価を試みた。

A.研究目的

HIV-1 感染症の薬物治療において副作用と薬剤耐性は治療を妨げる大きな障害となっている。このような症例を救済するためには薬物を使用しない、あるいは服薬量を減量できる新たな治療戦略が必要であり、その候補として治療ワクチンによる宿主の抗 HIV 免疫能の増強が考えられている。本研究では HIV タンパクを発現するリコンビナントワクシニアあるいは AT-2 処理不活化 HIV に曝露した樹状細胞が誘導する抗 HIV 特異的の免疫能を hu-PBL SCID マウスを用いた HIV 感染モデルを用いて評価することを目的とする。平成 16 年度は DC ワクチンに用いる DC の培養法の検討、DC 表面マーカーの解析、DC の抗原提示能解析及び hu-PBLSCID マウス感染モデルでの DC ワクチンの抗 HIV 効果について検討し実験系の最適化を図った。

B.研究方法

DC 培養法：健常人 PBMC から CD14

陽性単球を monocyte isolation kit (Mylteni) を用いた磁気ビーズ法で分離した。これを GM-CSF、IL-4 存在下で 5 日間培養して未成熟 DC に分化させた後、IFN- $\beta$  存在下で 2 日間培養して成熟 DC とした。DC 抗原提示能解析：PPD 抗原を 18 時間感作させた DC を、自己の  $1 \times 10^5$  個の CD4 陽性 T 細胞に対して  $1.25 \times 10^3$  個、 $2.5 \times 10^3$  個、 $5 \times 10^3$  個、 $1 \times 10^4$  個(各々の DC : T 細胞の比率は 1 : 80、1 : 40、1 : 20、1 : 10)の割合で加えて共培養し、培養開始後 3 日後、4 日後、5 日後に [ $^3$ H]thymidine の取り込み量を各々測定して抗原提示能について解析した。Stimulation index は、PPD 感作した細胞に取り込まれた [ $^3$ H]thymidine の量 (cpm) を感作していない細胞に取り込まれた [ $^3$ H]thymidine の量で割って算出した。hu-PBL SCID マウス構築法及び DC ワクチン免疫法：NOD SCID common  $\gamma$  鎖 K.O. マウス (NOG

SCID マウス)の脾臓実質内に  $3 \times 10^6$  個のヒト PBMC と抗原で感作した自己のヒト DC を  $3 \times 10^5$  個移植して hu-PBL SCID マウスの構築および DC ワクチンの初回免疫を行った。7 日後、再び抗原で感作した成熟 DC を  $3 \times 10^5$  個脾臓実質内に接種して追加免疫を行い、さらに 7 日後にマウスの腹腔内に HIV-1 JR-CSF を 1000TCID<sub>50</sub>/head でチャレンジした。チャレンジ 7 日後解剖し、マウス血漿中ウイルス量をアンプリコアで定量した。対照群として、AT-2 処理して不活化した HIV-1 のみを脾臓内に初回免疫/追加免疫した群、抗原を感作していない DC を脾臓内に初回免疫/追加免疫した群、培養液のみを脾臓内に初回免疫/追加免疫した群を作製した。

(倫理面への配慮)

すでにこのような動物実験は、国立感染症研究所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

ヒト PBMC から CD14 陽性細胞を磁気ビーズ分離法を用いて分離した。FACS で確認した結果 CD14 陽性細胞の比率は約 80% であった。約 20% の T、B 細胞等の混入が認められたが GM-CSF、IL-4、IFN- $\beta$  による培養後、顕微鏡下で樹状突起を持つ形態学的に DC と矛盾しない細胞が多数観察された。この細胞を回収しギムザ染色による塗抹標本作製し観察を行った。その結果分葉核と樹状突起を持つ DC 特有の形状を示す細胞が多数観察された。細胞表面マーカーによる解析では CD83、CD86、HLA-DR 等の成熟 DC マーカーの発現増強が認められた。誘導した細胞の抗原提示能の解析では抗原特異的に誘導される CD4 陽性 T 細胞による [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込みが観察された。DC:T 細胞の比率が 1:10

の時に [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込みの stimulation index は最も高くなった。DC による T 細胞への抗原提示・活性化が誘導されている事が示唆された。hu-PBL SCID マウスを用いた DC ワクチン評価は今回の試験では実験群と対照群の間に血漿中 HIV RNA copy 数の差は認められなかった(図 1)。

#### D. 考察

今回、抗原提示細胞として機能する樹状細胞を培養する事に成功した。In vitro における DC の抗原提示能は確認できたが、hu-PBL SCID マウスでの DC ワクチンの抗 HIV 効果は評価できなかった。DC の PBMC に対する比率が重要である可能性について今後検討を行う。また、ELISPOT の最適化を行い、DC ワクチンによって誘導される防御免疫についてさらに検討したい。

#### E. 結論

ヒト PBMC 由来 CD14 陽性単球からの成熟 DC の培養法が確立できた。また in vitro における DC の T 細胞への抗原提示能についても確認された。hu-PBL SCID マウスを用いた DC ワクチン評価については、実験系の最適化が今後の課題として最も重要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て国立感染症研究所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) H Yan, T Chiba, Y Kitamura, M Nishizawa, M Fujino, N Yamamoto and W Sugiura: Novel Small - Molecule Compounds which

inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase. *Antiviral Therapy*. 9:S6, 2004

- (2) W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatakem, T Ueda, M Fujino, K Yamada and N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan.
- 2.学会発表
- (1) H Yan, T Chiba, Y Kitamura, M Nishizawa, M Fujino, N Yamamoto and W Sugiura: Novel Small – Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase. 13th International HIV Drug Resistance Workshop. Tenerife, Canary Islands, Spain. 2004.6.8-6.12
- (2) W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatake, T Ueda, M Fujino, K Yamada and N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan. 13th International HIV Drug Resistance Workshop. Tenerife, Canary Islands, Spain. 2004.6.8-6.12
- (3) W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, M Nishizawa, J Kakizawa, T Ueda, M Hamatake, M Fujino, K Yamada, N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2002) in Japan. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- (4) H Yan, T Chiba, M Nishizawa, Y Kitamura, N Yamamoto, W Sugiura: Inhibition of HIV-1 integrase strand transfer activity by Carbazole derivatives. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- (5) T Chiba, M Takizawa, M Matsuda, M Honda, M Nishizawa, Z Matsuda, N Yamamoto, W Sugiura: A novel HIV-1 reporter cell line for rapid and accurate drug resistance phenotyping. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- (6) M Nishizawa, S Kato, H Miura, M Fujino, Y Yamamoto, W Sugiura: Comparison of Intracellular Protease Inhibitor Concentration and Kinetics in Different Cell Types. Fifth HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance. Virginia, USA. 2004.11.14 - 11.17
- (7) 植田知幸、有吉紅也、三浦秀佳、松田昌和、千葉智子、巖馬華、Lay Myint、柿澤淳子、濱武牧子、西澤雅子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 基質領域の相互干渉に関する解析. 第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- (8) 巖馬華、千葉智子、三浦秀佳、西澤雅子、野村伸彦、北村義浩、山本直樹、杉浦 互: 新規化合物カルバゾール誘導体による HIV-1 インテグラーゼ活性抑制機序の解析. 第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- (9) 松田昌和、Yan Hua、植田知幸、Urvi Parikh、

柿澤淳子、西澤雅子、濱武牧子、藤野真之、三浦秀佳、Lay Myint、山本直樹、杉浦 互: 本邦における薬剤耐性 HIV-1 の動向と変遷に関する考察. 第 18 回 日

本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市

H. 知的財産権の出願・登録状況 無し

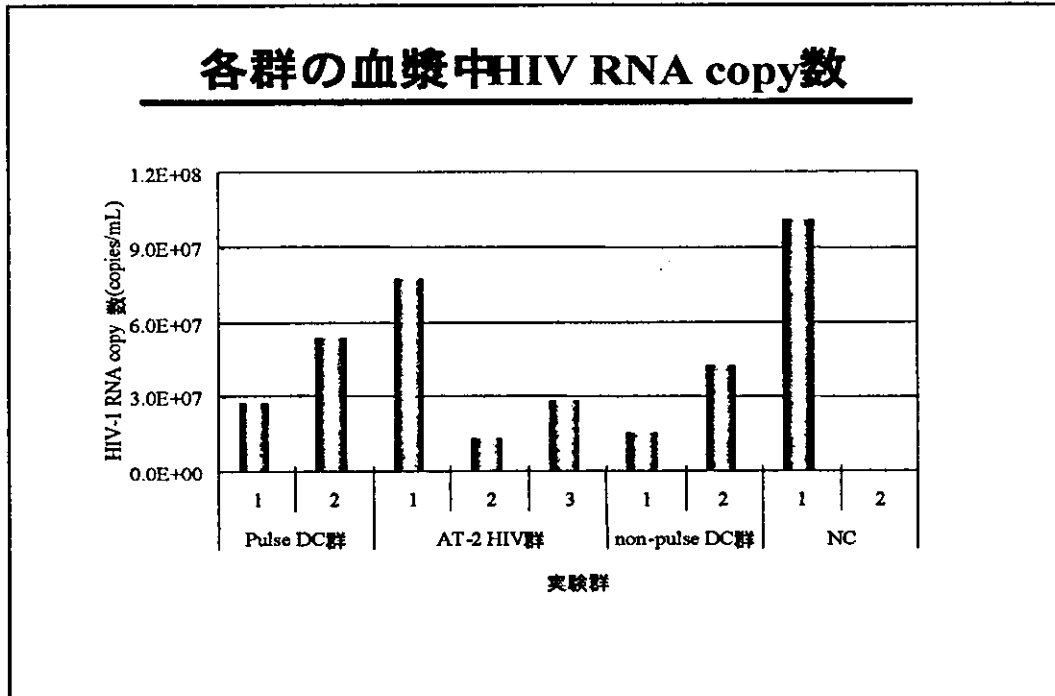


図 1

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」  
分担研究報告書

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 short hairpin RNA (shRNA) を用いた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ネコ免疫不全ウイルス (FIV) 遺伝子に特異的な shRNA による FIV 増殖抑制効果を培養細胞系を用いて検討した。その結果、shRNA による FIV 増殖抑制効果が認められ、臨床応用への可能性が示唆された。また、ネコ骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターの実験的投与を行い、*in situ* 遺伝子導入法の有用性を検討した。また、樹状細胞 (DC) を用いた新規抗エイズ療法の開発を目的とし、FIV 非感染ネコおよび FIV 感染ネコの末梢血より単球を分離し、*in vitro* での DC への分化を試み、その性状解析を行った。

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 感染症においては血漿中のウイルス RNA 量と病期の進行に相関があることを明らかにしてきた。ヒト免疫不全ウイルス (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応用されているが、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。

short hairpin RNA (shRNA) はループ構造を有する RNA であり、プラスミド DNA および各種ウイルスベクターを用いて細胞内に持続的に発現させることができる。近年、*in vitro* において shRNA による持続的な HIV 遺伝子の発現抑制効果が示され、新規の抗エイ

ズ療法として期待されている。本研究においては、ヒトのエイズにおける shRNA を用いた新規抗エイズ療法の開発小動物モデル系として FIV 感染症のシステムを用い、FIV に特異的な shRNA を発現するレトロウイルスベクターをネコ T リンパ系細胞株に感染させ、そのウイルス増殖抑制効果を検討した。また、*in situ* 遺伝子導入法の有用性を検討するため、実験用ネコの骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターを投与し、ネコ体内における導入遺伝子の検出を行った。

樹状細胞 (dendritic cell, DC) は抗原をプロセッシングして naïve T 細胞に作用を及ぼす唯一の抗原提示細胞 (Antigen presenting cell, APC) であることから、DC を用いた新規免疫療法の開発が注目されている。また、この細胞治療は、自己の細胞を投与することから副作用の少ない有効な治療と

期待されている。現在、腫瘍の分野では DC による免疫療法研究が進み、臨床試験が進行中であるが、実用化には至っていない。その理由として、DC に取込ませる抗原の種類や方法によってその効果は大きく左右され、また免疫寛容を誘導してしまう可能性もある。一方、感染症、自己免疫疾患、移植などにおいてはまだ基礎研究の段階に留まっている。ウイルス感染症治療における DC の有用性を示す基礎研究は報告されているが、それに続く抗原の選択やアジュバントの検討などの実用化に向けた研究は、未だ発表されていない。今回我々は、樹状細胞 (DC) を用いた新規抗エイズ療法の開発を目的とし、FIV 非感染ネコおよび FIV 感染ネコの末梢血より単球を分離し、*in vitro* での DC への分化を試み、その性状解析を行った。

## B. 研究方法 (倫理面への配慮)

shRNA 発現レトロウイルスベクターによる抗ウイルス療法の開発:FIV Petaluma 株の *gag* 領域に相同性を有する shRNA および対照として哺乳類の遺伝子とは相同性のない shNC を発現するレトロウイルスベクターを作製した。FIV Petaluma 株持続感染ネコ T リンパ系細胞株 (FL4) にこれらレトロウイルスベクターを感染させ、安定導入細胞を得た。その後、これら shRNA 導入細胞における FIV の増殖を検討した。一方、FIV 非感染ネコ T リンパ球系細胞株 (Mya-1) に本レトロウイルスベクターを感染させた後、FIV 感染に対する抵抗性を検討した。さらに、実験用ネコの骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターを投

与し、ネコ体内における導入遺伝子を PCR 法により検出した。

DC を用いた抗ウイルス療法の開発: AC 期の FIV 感染ネコ 6 頭および非感染健常ネコ 8 頭の血液から末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) を採取し、DC の前駆細胞である単球を分離した。これらの細胞を、組換えネコ IL-4、GM-CSF、および非働化自己血漿を加えた培地で培養し、*in vitro* で DC への分化を試みた。さらに対照群として、サイトカインを添加しない条件でも培養をした。培養後、一週間目に LPS により刺激を与え、成熟の状態にした。DC の同定は、phenotype、endocytosis assay、および mixed lymphocyte reaction (MLR) assay によって検討した。

## (倫理面への配慮)

本研究は東京大学動物実験委員会の定める動物実験実施規則に基づいており、倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

shRNA 発現レトロウイルスベクターによる抗ウイルス療法の開発:FIV 持続感染 T リンパ系細胞株に FIV 特異的 shRNA を導入した結果、FIV mRNA の発現量は著しく減少しており、細胞内 FIV p24 蛋白発現および培養上清中の逆転写酵素活性も著しく低下した (図 1)。以上の結果から、FIV 産生 T リンパ系細胞に FIV 特異的 shRNA を安定に導入することにより、明らかな FIV 増殖抑制効果が得られることが示された。一方、FIV 非感染ネコ T リンパ球系細胞株に本レトロウイルスベクターを感染させた後、FIV Sendai-1 株ま

たは Shizuoka 株を接種した結果、いずれの場合においても FIV 特異的 shRNA 安定導入細胞における FIV の増殖抑制は認められなかった。また、実験用ネコの骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターを投与した結果、ベクター遺伝子に由来するプロウイルスを有する細胞が接種後少なくとも 28 日目まで体内に存在していたことが示された (表 1)。

DC を用いた抗ウイルス療法の開発：感染ネコおよび非感染ネコの単球由来付着細胞は、いずれも IL-4、GM-CSF 存在下で樹状突起を呈し、DC に特徴的な形態を示した。また、これらの細胞は APC に特徴的な表面形質を示し、マンノース受容体に依存するデキストラン捕食能を持ち、MLR 誘導能を呈したことから、DC に分化しているものと考えられた (図 2)。FIV 感染ネコ由来細胞では、非感染ネコ由来細胞と比べて CD1a の発現が低下していたが、形態及び機能では両者の間に差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究では、レトロウイルスベクターを用いて FIV 持続感染 T リンパ系細胞に抗 FIV shRNA を安定導入することによりウイルス増殖抑制効果が認められた。しかし、新たな FIV 感染に対して抵抗性を示す T リンパ系細胞を作製することはできなかった。その原因として、本細胞株では shRNA の発現量が不十分であった可能性、および導入 shRNA の塩基配列と完全な相同性を持たないウイルスが存在した可能性が考えられた。本研究により、FIV 感染症に対する治療的遺伝子導入法

の有効性が示されたが、予防的遺伝子導入法の確立のためには発現効率やウイルス遺伝子の多様性に対する対応などについてさらなる検討が必要と考えられた。また、レトロウイルスベクターの骨髄腔内直接投与により、ネコ生体内の細胞への遺伝子導入が可能であることが明らかとなったが、その導入・発現効率に問題があることが示され、遺伝子導入法の改良を行う必要があるものと考えられた。今後は静止期の細胞にも遺伝子導入可能なレンチウイルスベクターを用いて抗 FIV shRNA 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 shRNA 導入法を検討する予定である。

FIV 非感染ネコおよび FIV 感染ネコの末梢血より単球を分離し、*in vitro* での DC への分化を試み、その性状解析を行った。その結果、FIV 感染ネコにおいても健常ネコと同様に DC の分化誘導が可能であることが示された。よって、FIV 感染症において自己の DC を移入することによって新規免疫療法を開発できる可能性が示唆された。今後、DC を用いた抗ウイルス療法の開発を目的とし、細胞障害性 T リンパ球を誘導可能な DC を誘導する予定である。

#### E. 結論

エイズに対する新規治療法を開発するため、猫の FIV 感染モデルにおいて shRNA および DC を用いた新しいシステムを立ち上げた。これらシステムにおいて新規抗ウイルス療法の有効性を明らかにすることにより、



ヒトのエイズに応用可能な新規治療法の有効性を検証できるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

マウス白血病ウイルス由来レトロウイルスベクターの遺伝子導入実験およびウイルスの保管は全て東京大学組替えDNA実験安全専門委員会の定める遺伝子組換え生物等の使用等実施規則に基づき、P2実験施設で行われている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Baba, K., Mizukoshi, F., Setoguchi, A., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by RNA interference in a cell line chronically infected with the virus. *Virology* (submitted for publication)
- (2) Mizukoshi, F., Baba, K., Horiuchi, H., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Characterization of monocyte-derived dendritic cells from cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (submitted for publication)
- (3) Mizuno, T., Baba, K., Goto, Y., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Alternatively spliced transcripts of Fas mRNAs in feline lymphoid cells. *Eur. J. Immunogenetics* 31: 159-166 (2004).
- (4) Yamazaki, J., Hasebe, N., Nagafuchi, S., Baba, K., Tsujimoto, H., Kano, R. and Hasegawa, A. Expression of apoptosis-related gene mRNAs in

feline T-cells infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Vet. Microbiol.* 101:1-8 (2004).

- (5) Endo, Y., Uema, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Tsujimoto, H., Yoneda, K. and Kai, C. Prevalence of canine distemper virus, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in captive African lions (*Panthera leo*) in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1587-1589 (2005).

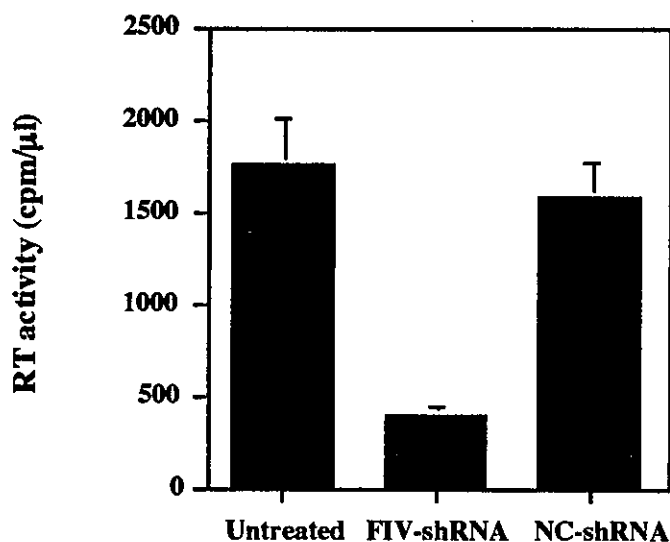
##### 2. 学会発表

- (1) Baba K, Mizukoshi F, Ohno K, Tsujimoto H. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus (FIV) by retroviral vector-mediated expression of short hairpin RNA (shRNA) in chronically FIV-infected cells. 7<sup>th</sup> International Feline Retroviral Research Symposium, Pisa 11-15 September 2004, abstract p 31.
- (2) Mizukoshi F, Baba K, Horiuchi H, Ohno K, Tsujimoto H. Characterization of monocyte-derived dendritic cells from cats infected with feline immunodeficiency virus. 7<sup>th</sup> International Feline Retroviral Research Symposium, Pisa 11-15 September 2004, abstract p 17.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

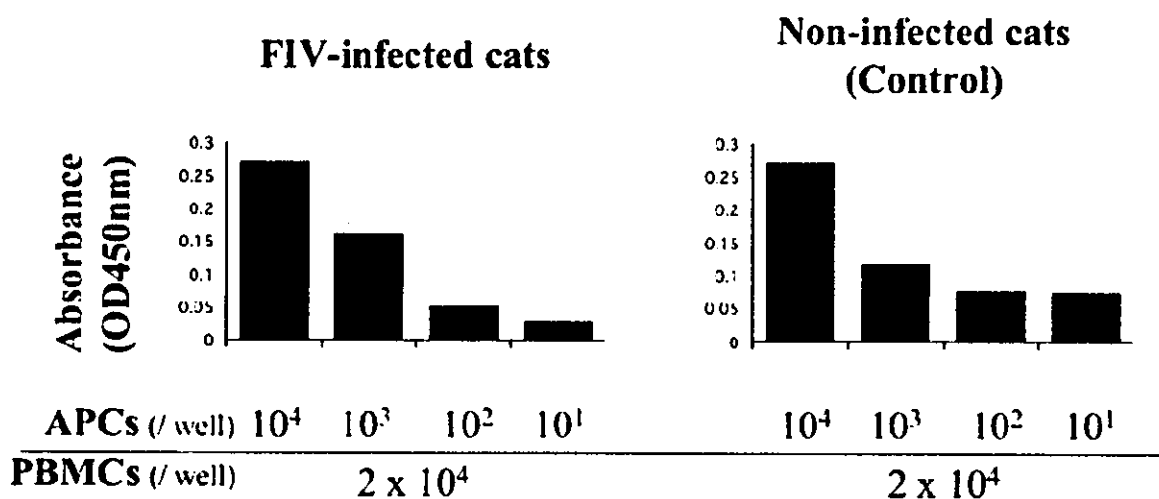
(図1) 抗FIV shRNA 安定導入細胞におけるFIVの増殖抑制



(表1) レトロウイルスベクターの骨髄腔内投与後におけるプロウイルス DNA の検出

(Days after infection)	Peripheral blood				Bone marrow			Other tissues
	3	7	14	28	7	14	28	28
Cat #1	+	+	-	-	+	-	-	Kidney
Cat #2	+	+	-	-	-	-	+	Spleen, Liver, Small intestine, Skeletal muscle
Cat #3	+	-	-	-	+	-	+	Lymph node, Spleen, Liver, Small intestine, Lung

(図2) allogenic PBMCs に対する DCs の混合リンパ球反応



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

伊藤 守 （財）実験動物中央研究所 免疫研究室 室長

研究要旨：「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」という分担課題で、ヒトリンパ球による GVHD を回避し、かつ HIV-1 が高率に感染する新規 SCID マウスの作出を目的として、human IL-4 Tg-免疫不全マウスの作製を開始した。すなわち、Human IL-4 cDNA を cloning し、cytomegalovirus promoter の後位に配置した導入用 DNA の作製を行った。同時に、この DNA の injection のための前核期胚を得るために、BALB/cA-RAG2 KO, NOG(NOD-scid, IL2Rg KO)マウスの増産を開始した。

A. 研究目的

現有の免疫不全マウスを用いた SCID-huPBL モデルでは、ヒト末梢血リンパ球を導入することにより、免疫不全の程度が重度になればなるほど、重篤な GVHD を引き起こす。また、R4 type のウィルスに比べ、X4type の感染が成立し難い事などが挙げられている。本研究の目的は、上記の問題点を克服し、GVHD が起き難くかつ X4 type の感染が容易に成立する免疫不全マウスを作製することである。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

上記の目的のために、本年度はヒト IL-4 Tg 免疫不全マウスの作製を開始した。すなわち、ヒト末梢血より分離した PBMC を PWM の刺激で 48 時間培養し、それより RNA を抽出後、常法に従い、cDNA の合成、それをソースとした RT-PCR でヒト IL-4 cDNA を増幅する。増幅した hIL-4 cDNA の塩基配列を確認した後、CMV promoter で駆

動する pCMVb vecor (Invirogen) に挿入した pCMVb-hIL-4 の作製を行う。この DNA を、COS-7 等に in vitro transfection により導入し、培養上清中の hIL-4 を ELISA で確認した後、C.B-17-scid、BALB/cA-Rag2 KO や NOG マウスなどの免疫不全マウスの前核期卵への microinjection による Tg マウスの作製を行う。そのために、BALB/cA-RAG2 KO、NOG マウスを交配によって増産を行う。本動物実験は、（財）実験動物中央研究所の動物実験安全委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の許可を得て、行われている。

C. 研究結果

現在までに、前核期卵への導入用の pCMVb-hIL-4 の作製を終了した。現在、培養細胞での hIL-4 の発現をチェックしている。

D. 考察

IL-4 は Th2 T cell subtype に発現、

または Th2 への偏重を来す主要な cytokine である。一方で、CXCR4 を受容体に使う X4 HIV-1 は Th2 cells で好んで感染、増殖し、病原性を示すことが知られている。このことから、hIL-4 を高発現する免疫不全マウスでは、移入ヒトリンパ球が Th2 cells に偏り、結果として X4 HIV-1 が高感染するマウスとなることが期待できる。

#### E. 結論

Human IL-4 を発現する免疫不全トランスジェニックマウス作製のための DNA の構築を行い、免疫不全マウスの増産も含め、Tg マウス作製の準備がほぼ整った。

#### F. 健康危険情報

本研究は、動物モデル作出のための免疫不全トランスジェニックマウス作製が目的であり、HIV-1 の感染実験は当研究所では行わない。また、Human IL-4 cDNA 増幅のためのヒト末梢血液は、健康人より informed consent を得て、実施している。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 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 gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J Virol.* 2005;79:2087-2096

- (2) Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira JI, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K.

Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod.* 2005

- (3) Yahata T, Ando K, Miyatake H, Uno T, Sato T, Ito M, Kato S, Hotta T. Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gammac(null) mice. *Mol Ther.* 2004;10:882-891

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
Yoshida A, Kodama A, Tanaka R, Yamamoto N, Ansari AA and Tanaka Y.	Identification of HIV-leptopes 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			in press
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
Someya K, Cecilia D, Ami Y, Nakasone T, Matsuo K, Burda S, Yamamoto H, Yoshino N, Kaizu M, Ando S, Okuda K, Zolla-Pazner S, Yamazaki S, Yamamoto N, and Honda M,	Vaccination of rhesus macaques with recombinant mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin 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
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
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	321-9	2004

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 gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model.	Journal Virology	79	2087-2096	2005
Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira JI, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K.	Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice.	Human Reproduction			in press
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- $\alpha$	Journal of Neuroimmunology	151	189-194	2004
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
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	Journal of Virology	78	8654-8662	2004
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	Journal of Virology	78	11352-11359	2004
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	European Journal of Neuroscience	20	2499-2508	2004
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 g-chain-knocked-out AIDS mouse model	Journal of Virology	79	2087-2096	2005
Miura Y, Koyanagi Y	Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection	Reviews in Medical Virology			in press

H Yan, T Chiba, Y Kitamura, M Nishizawa, M Fujino, N Yamamoto and W Sugiura	Novel Small – Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase.	Antiviral Therapy	9	S6	2004
W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatakem, T Ueda, M Fujino, K Yamamda and N Yamamoto	Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan.	Antiviral Therapy	9	S6	2004
Mizuno, T., Baba, K., Goto, Y., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H.	Alternatively spliced transcripts of Fas mRNAs in feline lymphoid cells.	Eur. J. Immunogenetics	31	159-166	2004
Yamazaki, J., Hasebe, N., Nagafuchi, S., Baba, K., Tsujimoto, H., Kano, R. and Hasegawa, A.	Expression of apoptosis-related gene mRNAs in feline T-cells infected with feline immunodeficiency virus (FIV).	Vet. Microbiol.	101	1-8	2004
Endo, Y., Uema, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Tsujimoto, H., Yoneda, K. and Kai, C.	Prevalence of canine distemper virus, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in captive African lions ( <i>Panthera leo</i> ) in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	66	1587-1589	2004
Yahata T, Ando K, Miyatake H, Uno T, Sato T, Ito M, Kato S, Hotta T.	Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gamma c (null) mice.	Molecular Therapy	10	882-891	2004



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppressor factor by human CD4<sup>+</sup> T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice

Atsushi YOSHIDA, Akira KODAMA, Reiko TANAKA, Naoki YAMAMOTO \*,

Aftab A. Ansari <sup>II</sup> and Yuetsu TANAKA <sup>1</sup>

Running title: DC-based HIV-1 vaccination

Department of Immunology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan,

\*National AIDS Research Center, National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan

and <sup>II</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine and Department of Microbiology and Immunology, Emory University School of Medicine, Georgia, U.S.A.

Keywords: AIDS, HIV-1, vaccination, dendritic cells, HIV-1 suppression, epitopes, Th

<sup>1</sup>The corresponding author

Dr. Yuetsu TANAKA, Department of Immunology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Uehara 207, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-0215, Japan

Phone: +81-98-895-1202

Fax: +81-98-895-1437

E-mail address: [yuetsu@ma.kcom.ne.jp](mailto:yuetsu@ma.kcom.ne.jp)

## Abstract

We have previously reported that immunization of the severe combined immunodeficiency (SCID) mice reconstituted with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (hu-PBL-SCID mice) with inactivated human immunodeficiency virus type-1-pulsed (HIV-1)-autologous dendritic cells (HIV-DC) elicits HIV-1-reactive CD4<sup>+</sup> T cells that produce an as yet to be defined novel soluble factor *in vitro* with anti-viral properties against CCR5 tropic- (R5) HIV-1 infection. These findings led us to perform studies designed to identify the lineage of the cell that synthesizes such a factor *in vivo* and define the epitopes of HIV-1 protein that have specificity for the induction of such anti-viral factor. Results of our studies show that this property is a function of CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells. Human CD4<sup>+</sup> T cells were thus recovered from the HIV-DC-immunized hu-PBL-SCID mice and were re-stimulated *in vitro* by co-culture for 2 days with autologous adherent PBMC as antigen presenting cells (APC) previously pulsed with inactivated HIV-1 in IL-2-containing medium to expand HIV-1-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. Aliquots of these re-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells were then co-cultured with similar APCs that were previously pulsed with 10 µg/ml of a panel of HIV-1 peptides for an additional 2 days, and their culture supernatants were examined for the production of both the R5 HIV-1 suppression factor and IFN-γ. The data presented herein show that the HIV-1 primed CD4<sup>+</sup> T cells produced the R5 suppression factor in response to a wide variety of HIV-1 gag, env, pol, nef or vif peptides, depending on the donor of the CD4<sup>+</sup> T cells. Simultaneous production of human interferon (IFN)-γ was observed in some cases. These results indicate that human CD4<sup>+</sup> T cells in PBMC of HIV-1 naive donors have a wide variety of HIV-1 epitope-specific CD4<sup>+</sup> T cell precursors that are capable of producing the R5 HIV-1 suppression factor upon DC-based vaccination with whole inactivated HIV-1.

## Introduction

Virus specific CD4<sup>+</sup> helper T (Th) cell responses have been shown to play an essential role in the maintenance of effective immune responses in a variety of animal models (Battegay et al. 1994; Janssen et al. 2003; Matloubian et al. 1994; Shedlock and Shen 2003; Sun and Bevan 2003). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection is associated with a progressive loss of total CD4<sup>+</sup> Th cells by both direct and indirect mechanisms (McCune. 2001; Oxenius et al. 2000; Rosenberg et al. 1997, 2000; Rowland-Jones 1999). In particular, memory CD4<sup>+</sup> Th cells become more susceptible to the cytopathic effects of HIV-1 than naive CD4<sup>+</sup> Th cells after activation (Chun et al. 1997). Several lines of evidence strongly suggest that HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> Th cells are critical for control of HIV-1 in part by maintaining HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses (Kafams et al. 1999; Krowka et al. 1989; McMichael and Rowland-Jones 2001; Migueles et al. 2002; Planz et al. 1997; Rosenberg et al. 1997). Highlighting the complexity of HIV-1 infection was the finding that HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> Th cells were in fact preferentially infected by HIV-1 *in vivo* (Douek et al. 2002). It was reasoned that such mechanisms may indeed contribute to an impairment in the control of not only HIV-1 but also opportunistic infections.

While such CD4<sup>+</sup> Th cell depletion continues to occur with variable kinetics in HIV-1 infected patients, a significant frequency of HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> Th cells are detectable in most of these individuals with a higher frequency in long-term nonprogressors (LTNP) than in subjects during progressive disease (Betts et al. 2001; Rosenberg et al. 1997; Wahren et al. 1987; Wilson et al. 2000). In addition to the traditional function of CD4<sup>+</sup> Th cells in facilitating the generation of HIV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cells and the synthesis of antibodies, CD4<sup>+</sup> Th cells from HIV-1 infected patients have also been shown to exert anti-viral effects not only by direct lysis of HIV-1 infected target cells by HIV-1 gag specific CD4<sup>+</sup> Th cells (Lotti et al. 2002) but also by the secretion of a variety of HIV-1 suppression factors (Abdelwahab et al. 2003; Kinter et al. 1996; Saha et al. 1998; Zhou et al. 1997). These findings together suggest that CD4<sup>+</sup> Th cells from HIV-1 infected and/or immunized individuals have acquired a series of unique anti-viral activity which may contribute to the control of viremia and the detailed studies of the mechanisms by which such activity is acquired and induced thus appears warranted.

We have previously reported that SCID mice engrafted with HIV-1-naive human PBMC together with autologous DC pulsed with inactivated whole HIV-1 virion became subsequently completely resistant to R5 HIV-1 challenge *in vivo* (Yoshida et al., 2003). The resistance to infection was specific since it was only seen in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated R5 or X4 HIV-1 virions, but not ovalbumin or keyhole limpet hemocyanin. Studies of the mechanisms by which these mice were protected led to the discovery of a novel soluble anti-viral factor produced in the serum of these HIV-DC immune hu-PBL-SCID mice. While this factor synthesized by human CD4<sup>+</sup> T cells from the immune hu-PBL-SCID HIV-1 mice was unable to neutralize HIV-1 *in vitro*, it was capable of inhibiting R5, but not X4, HIV-1 infection of primary macrophages and activated PBMC which was not secondary to the down regulation of either CCR5 or CD4 and appeared to act prior to viral integration. Of interest was also the finding that the factor was not effective in controlling R5 HIV-1 infection of CCR5-expressing CD4<sup>+</sup> T cell lines.

Since the generation of the suppressor factor appeared to be specifically induced by HIV-1

immunization of the hu-PBL-SCID mice, it was reasoned that the delineation of the epitopes of the HIV-1 encoded proteins that induce the generation of such factors would be appropriate and informative. Results of such studies are the basis of this report.

## Materials and Methods

### *Mice*

SCID mice lacking functional T, B and natural killer cells (NK), BALB/c-*rag2*<sup>-/-</sup> *γc*<sup>-/-</sup> (Ohteki et al. 1999), were used in the present study. The mice were kept in a SPF and BSL-3 animal facilities of the Laboratory Animal Center, University of the Ryukyus. The protocols for the care and use of hu-PBL-SCID mice have been approved by the committee on animal research of University of the Ryukyus.

### *Reagents*

RPMI 1640 medium (SIGMA, St. Louis, MO) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/ml of penicillin and 100 μg/ml of streptomycin (hereinafter called RPMI medium), serum free medium (AIM-V) and Iscove's medium (Lifetechnology, NY) supplemented with 10% FCS with the antibiotics (hereinafter called AIM-V medium and Iscove's medium) were utilized as sources of media. Soluble recombinant human IL-4 and GM-CSF were produced in 293T cells transfected with pCMhIL4 and pCMhGM (RIKEN Gene Bank, Ibaraki, Japan), respectively, by the calcium phosphate method (Subramani et al. 1981) and cultured in Iscove's medium. Concentrations of human IL-4 and GM-CSF in the culture supernatants were determined using commercial ELISA kits (BioSource, Camarillo, CA). Human recombinant IL-2 was kindly supplied by the NIH AIDS Research and Reference Program.

Blocking monoclonal antibodies (mAb) against human MIP-1α, human MIP-1β and human RANTES were purchased from R&D systems (Rockville, MD). To maintain their blocking activity, these antibodies in a lyophilized form were reconstituted in accordance with the manufacturer's instructions, and aliquots were kept at -80°C until use. Heparin-Sepharose (Pharmacia, Sweden) was used to absorb beta chemokines as described previously (Yoshida et al. 2003).

HIV-1 peptides were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Program, including the complete sets of the HIV-1 HXB2 gag peptides (Cat#5107 and Cat#3992), HIV-1 MN env peptides (Cat#6451), HIV-1 HXB2R pol peptides (Cat#4358), HIV-1 clade B nef peptides (Cat#5189), HIV-1 consensus B vif peptides (Cat#6446), HIV-1 consensus B rev peptides (Cat#6445), HIV-1 BRV nef peptides (Cat#6441) and HIV-1 consensus vpu peptides (Cat#6444). Each peptide was dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml, and then diluted in RPMI medium at 10 μg/ml prior to use.

### *Viruses*

HIV-1<sub>JR-CSF</sub> (Koyanagi et al. 1987) and HIV-1<sub>NL4-3</sub> (Adachi et al. 1986) viral stocks were each produced in the 293T cells by transfection with the appropriate HIV-1 infectious plasmid DNA utilizing the calcium phosphate method (Subramani et al. 1981) and cultivation in RPMI medium. HIV-1<sub>IIIB</sub> was harvested from Molt-4/IIIB cell cultures. The 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) was determined by an endpoint infectious assay using PBMC stimulated with anti-CD3/anti-CD28-mAb conjugated DynaBeads (Dyna, Oslo, Norway). HIV-1 preparations were inactivated with Aldrithiol-2 (AT-2), as originally described by Rossio et al. (1998).

### *Generation of HIV-1 pulsed mature DC's from monocytes*

Fresh PBMC at 5 X 10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI medium were dispensed into individual wells of 12-well plates (1 ml/well), which had been precoated with autologous plasma for 30 min at 37°C. The PBMC cultures were allowed to incubate at 37°C for 1 h. The non-adherent cells were removed by gentle washing with serum-free RPMI 1640 medium and the remaining adherent cells were cultured in Iscove's medium (2 ml/well) containing human GM-CSF (500 ng/ml) and IL-4 (200 ng/ml) for 5 days. The resulting immature DC cultures were depleted of contaminating lymphocytes by using the monocyte-negative isolation kit (Dyna, Oslo, Norway), and the enriched population of DC's were further cultured at 2 X 10<sup>6</sup> cells/ml in the presence of human IFN-β (1,000 U/ml; Toray, Tokyo, Japan) and AT-2 inactivated whole HIV-1 (containing 50 ng/ml p24) for 2 days to obtain mature DC pulsed with HIV-1, as described previously (Yoshida et al. 2003).

### *Transplantation and immunization*

HIV-1-pulsed mature DC (5 X 10<sup>5</sup> cells) mixed with 3 X 10<sup>6</sup> autologous fresh PBMC, or PBMC depleted of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells by a magnetic beads method (Dyna, Oslo, Norway) in a final volume of 100 μl in RPMI medium were injected into the spleen of SCID mice. Five days later, the same number of DC pulsed with the same dose of inactivated HIV-1 were inoculated into the peritoneal cavity. Five days later, the mice were sacrificed and human lymphocytes were recovered from the spleen and the peritoneal cavity by lavage.

### *in vitro re-stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells*