

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

抗エイズ薬開発のための小動物評価系
の開発と新規治療薬の開発研究
(H16-創薬-007)

平成 16 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 岩倉 洋一郎

(東京大学医科学研究所・教授)

目次

I.研究組織	・・・・・・・・・・1
II.総括研究報告	
抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究	
岩倉 洋一郎・・・・・・・・・・	2
III.分担研究報告	
	岩倉 洋一郎・・・・・・・・・・6
HIV ラット感染モデルの開発	
志田 壽利・・・・・・・・・・	12
造血細胞多植 SCID マウスの HIV モデル動物への応用	
小柳 義夫・・・・・・・・・・	16
Tat による OGGI 発現誘導と HIV のゲノム保持機構	
岡本 尚・・・・・・・・・・	21
抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究	
小糸 厚・・・・・・・・・・	25
生体分子による HIV 複製抑制	
神奈木 真理・・・・・・・・・・	29
IV.研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・・・35
V.研究成果の刊行物・別刷	・・・・・・・・・・45

I.研究組織

研究課題 : 抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と
新規治療薬の開発研究

主任研究者 : 岩倉 洋一郎 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究
センター細胞機能研究分野・教授)

分担研究者 : 志田 壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門・
教授)

小柳 義夫 (京都大学ウイルス研究所エイズ研究施設
感染病態研究施設・教授)

岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所
分子遺伝部門・教授)

小糸 厚 (熊本大学エイズ学研究センター
病態制御分野・講師)

神奈木 真理 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
免疫治療学分野)

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究

主任研究者 岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・教授

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでに至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、小動物を用いた新たなエイズモデルの開発を目指すと共に、抗 HIV 薬の候補分子、標的分子の解析を行った。この中で、(1) 宿主バリアーとなる CyclinT1, CRM1, p32 などをヒト型化するため、ヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作られた。(2) ラットにヒト CRM1 遺伝子を導入すると、HTLV-I の増殖効率が亢進することが示された。(3) HIV Env を MuLV 粒子に取り込ませたシュードタイプウイルスを HIV レセプター発現マウスに感染させる事による新たな評価系が開発された。(4) Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-}新生児マウスに放射線を照射後、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を移植するとヒト T 細胞の増殖が見られることから、HIV の感染系として有望であることが示された。(5) Tat が DNA 修復酵素である OGG1 遺伝子を誘導することがわかり、Tat が宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし HIV の転写を有利にさせる一方で、HIV および宿主のゲノム変異を未然に防止している可能性が示唆された。(6) HIV 抑制活性を持つ CD8 陽性 CTL 株の培養上清から、責任蛋白の精製を試み、活性のある部分精製画分を得ることに成功した。このように小動物エイズモデルの作製を進めると同時に、抗 HIV 薬の候補分子や標的分子の解析を行い、小動物モデルを用いた抗 HIV 薬の開発・評価を行うための基盤研究を押し進めることができた。

主任研究者

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・教授）

分担研究者

志田壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所教授）

小柳義夫（京都大学ウイルス研究所教授）

小糸 厚（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野講師）

岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学教授）

神奈木真理（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学分野教授）

類以外に適当な系がないことは治療薬開発上の大きな障害である。本研究では、HIV-1 (HIV) の小動物における増殖の障壁に関与する宿主因子を探索、同定し、これをヒト型化することにより、抗エイズ薬開発に適した小動物モデルを開発する。また、ヒトリンパ球の増殖により適した SCID-*hu* モデルを開発する。宿主障壁となる宿主因子は新たな抗 HIV 薬の標的として重要であり、これを阻害する小分子化合物のスクリーニングを行う。また、小動物モデルを用いることにより、発症機構を解析すると共に、抗エイズ薬を評価し、評価系としての有用性を検証する事を目的としている。

この中で、

1) 岩倉はマウスでの HIV 増殖の障壁となっている素過程を解析すると共に、細胞障壁となっている既知の宿主因子をヒト型化することにより、HIV 感受性マウスの作製を試みた。また、既に作製してある HIV 持続感染モデル (HIV 遺伝子導入トランスジェニック: HIV-Tg) マウスを用いて、HIV 遺伝子発現調節機構の解析を行った。

2) 志田は HIV ウイルス mRNA 形成に必要な

A. 研究目的

HAART 治療が出現した現在、エイズ治療の次の目標はウイルス負荷を減少させることによって、発症を遅らせると共に新たな耐性ウイルスの出現を抑えることと、最終的には潜伏ウイルスを完全に排除する方法を開発することである。このために必要な動物モデルが、現在霊長

ウイルスの調節因子 Rev/Rex を支持すべきラット因子 rCRM1 が機能しないことが、ラットでの HIV/HTLV-1 の増殖の非効率の 1 原因であることを発見した。さらに、hCRM1 を恒常的に発現させたラット細胞を作成して検討した結果、ヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産されることを明らかにした。そこで、hCRM1 発現による HIV 増殖への効果の詳細な分子機構の解析と Tg ラットの作製と HIV/HTLV-1 の増殖効率を調べた。

3) 小糸は改変した HIV Env を MuLV 粒子に取り込ませ、この HIV/MuLV シュードタイプを HIV レセプター発現マウスに感染させ、種々の治療ストラテジーの効果を個体レベルで検証しうる実用的なモデル系の構築を目指した。またミンクではげっ歯類と比較して宿主域障壁が少ないが、そのメカニズムを明らかにするとともに、この種の小動物の HIV 感染モデルとしての可能性を検討した。さらに最近その存在が明らかにされた HIV に対する自然防御機構が小動物に広く存在するか否かの解析をおこなった。

4) 小柳はこれまでに開発された末梢血を移植した *hu-PBL-NOD-SCID* マウス内で再現されるのは活性化 T 細胞での HIV の感染であり、治療が困難な潜伏持続感染は再現できないことから、血液幹細胞移入によりマウス内でヒトリンパ球の成熟分化を引き起こすことを試み、血液系全般における抗エイズ薬の評価が可能なモデル動物を開発することを目的とした。

5) 岡本は遺伝子発現プロファイル解析を実施し、HIV の増殖に必須の転写活性化因子である Tat により発現制御を受ける遺伝子を包括的に検索した。その結果、酸化ストレスに伴う DNA 傷害の修復酵素 OGG1 遺伝子の誘導が Tat によっておこることを見出した。実際に HIV 感染においても OGG1 の発現誘導が認められたため、Tat による OGG1 発現の詳細な誘導機構と HIV 感染における意義を追求した。

6) 神奈木は免疫 T 細胞が産生する HIV 抑制因子を新たな抗 HIV 予防治療剤候補と位置づけ、その抑制機序解明と同定を目指している。これまでに、健常者由来の CD8+ α ロ特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、抗原非特異的に HIV 複製に抑制能を持つことを見出し、さらにその上清中に抑制活性を示す細胞株を樹立した。この実験系により、HIV 抑制因子を安定供給が可能となったため、CD8+CTL 上清中の HIV 抑制因子の精製を試みた。

B. 研究方法

岩倉：潜伏状態の HIV 遺伝子発現制御機構を解

析するために、NL-4-3-1 から逆転写酵素遺伝子部分を欠失させた遺伝子を導入した HIV-Tg マウスを用いた。このマウスは LPS を投与することにより脾臓細胞で HIV 遺伝子の発現が誘導され、血中に高濃度 (~500 pg/ml) の非感染性 HIV 粒子が生産されることがわかっている。T 細胞における HIV 遺伝子発現を解析する為に、HIV-Tg に LPS を投与し、MACS により T 細胞、B 細胞、マクロファージを分離し、ノーザンブロッティングあるいは RT-PCR により HIV 遺伝子の発現を検討した。また、HIV 感受性マウスを作製するために、Hela 細胞由来の cDNA から PCR によって増幅したヒト CyclinT1, CRM1, p32 遺伝子の cDNA を CAG プロモーターの下流につないだものを C3H/HeN マウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製した。

2) 志田：ラット細胞における Gag/Env 生産の分子機構を解析するために、ヒト細胞、ラット細胞に pNLe-r-Luc, pNLmr(-)pro(-)Flag, pSRaCRM1 を transfection して Gag/Env 蛋白、と mRNA 量を定量した。hcrm1 ゲノムを含む BAC を受精卵にマイクロインジェクションすることによって Tg ラットを作製した。

3) 小糸：HIV-1 Env 細胞質内欠損変異体の発現ベクターを作製し、MuLV ゲノム、pRev とともに MuLV の Gag-Pol 蛋白を発現した GP-293 細胞にトランスフェクトすると、HIV-1 Env に包まれた MuLV 粒子が産生される。この HIV/MuLV シュードタイプウイルスを用いて HIV レセプター発現マウス細胞への感染実験をおこなった。アメリカミンクの近縁、フェレットの HIV 感受性を検討するため、飼育管理をおこない、これらの培養細胞における HIV 複製効率を検討した。また CyclinT1 および APOBEC3 の塩基配列の解析をおこなった。

4) 小柳：NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-} γ c^{-/-}新生児マウスに 2.4 Gy の放射線を照射後、臍帯血より分離した CD34 陽性細胞を肝臓内へ移植した。移植後、6 週目に採血し FACS を用いてヒト細胞の存在を解析した。用いた抗体は抗マウス CD45 単クローン抗体 (mAb)、抗ヒト CD45 mAb、抗ヒト CD19 mAb、抗ヒト CD19 mAb である。

5) 岡本：(1)Tat 被制御遺伝子の同定。新たに樹立した Tat 誘導発現細胞を用いた遺伝子発現プロファイル解析にて行った。(2)HIV 感染実験。ヒト末梢血からリンパ球を採取、HIV-1 を感染後 OGG1 の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。(3)OGG1 発現機構の解析。promoter 解析は、種々の変異型 OGG1 promoter を用いた

Luciferase assayにて、TatとAP4との結合は免疫沈降法、AP4のOGG1 promoterへの結合能に及ぼすTatの作用についてはEMSA法とクロマチン免疫沈降法にて解析した。(4)8-oxo-dG量の測定はHPLC-EC法にて行った。またOGG1に対するsiRNAを合成、細胞に導入後測定した。

6) 神奈木：健康人末梢血由来のアロ特異的CD8+CTLを樹立した。このCTL上清を、試験管内でHIV感染させたPHA刺激CD4+細胞に加え、4日間混合培養後、上清中HIV-1 p24量をELISAにより測定した。また、種々のエンベロープを持つpseudotype HIVを感染させ、CTL上清の抑制活性をルシフェラーゼ活性で測定した。抑制因子の精製には、イオン交換あるいはゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより分画し、活性を有する分画を得た。このようにして部分精製したHIV-1抑制因子をSDS-PAGEあるいは二次元電気泳動で展開し銀染色した後、蛋白スポットをゲルから切り出し、質量分析(トリプシン消化、MALDI-MS)を行った。

C. 研究成果

1) 岩倉らはHIV-Tgを用い、T細胞におけるHIV遺伝子発現制御機構の解析を行った。in vivoでLPS刺激を行ったHIV-Tgの脾細胞からB細胞、T細胞、マクロファージを分離し、HIV発現を調べたところ、B細胞における発現が最も高く、マクロファージからも中程度の発現が見られたが、T細胞からの発現は非常に低いことがわかった。ところが、in vitroでLPS刺激を行ったHIV-Tgの脾細胞におけるHIV遺伝子発現は、これらの細胞間で同程度であった。また、T細胞マイトジェンでT細胞を直接刺激してもLPS刺激時に比べ、HIV発現の効率が非常に悪いことがわかった。HIV感受性マウスを作製する試みとして、CAGプロモーター制御下にヒトCyclinT1, CRM1, p32遺伝子を発現するトランスジェニックベクターをC3H/HeNマウスにマイクロインジェクションした結果、計20系統のトランスジェニックマウスを得た。現在、これらのマウスの系統化および発現解析を行っている。また、これまでMuLV envelopeを用いておこなっていたマウス細胞におけるpreintegration complex (PIC)の核移行阻害を、VSV envelopeを用いたpseudotypeの系においても証明した。

2) 志田らはラット細胞中でhCRM1/rCRM1共にウイルスmRNAを効率よく細胞質に運ぶが、hCRM1で運ばれたmRNAのみ効率よく翻訳されることを示唆する結果を得た。Tgラット

のhCRM1は内在性のrCRM1と同様、胸腺で高発現しており、脾臓での発現は弱かった。通常ラット由来T細胞はHTLV-1をほとんど産生しないのに対し、Tgラット由来のT細胞ではヒトT細胞(MT4細胞)以上の生産がみられた。

3) 小糸らはHIV-1 gp41細胞質内欠損体SF33Dc711, SF33A2Dc711を作製した。この変異HIV-1 EnvをもつMuLV粒子をGP293パッケージング細胞で発生させると、ヒトCD4/CXCR4発現マウスリンパ球(EL4)へのMuLVゲノムの導入が確認された。ヒトCD4/CXCR4トランスジェニックマウスは昨年度までに熊本大学生命資源研究支援センターの中瀆研究室との共同研究で、いつでも同センター内で個体数を増やせる状況をとった。また実験動物としての歴史もあるフェレットでもミンクと同様に宿主域障壁が少ないことを明らかにした(Koito, et al; 論文投稿中)。

4) 小柳らはBalb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウスでは移植後6週目にはヒトCD45陽性細胞群が全単核細胞中の3-7%を占め、その多くはヒトCD19陽性B細胞であること、また、少数ではあるが明らかにヒトCD3陽性T細胞分画も存在することを明らかにした。一方、NOGマウスについて、同様の実験を行ったところ、すべてのマウスが移植後、2週目に死亡し、構築効率などの解析が不可能であった。

5) 岡本はTatによって発現誘導される遺伝子について、以下の結果を得た。(1)遺伝子発現プロファイル解析の結果、OGG1がTatによって最も強く発現誘導を受けていた。(2)OGG1の誘導発現は、HIV感染細胞においても認められた。(3)TatはOGG1 mRNAの安定性や酸化ストレスなどを介さず、直接OGG1の発現を誘導した。(4)TatはOGG1転写の抑制因子であるAP4に結合し、AP4をOGG1プロモーターから遊離させることによって、OGG1発現を誘導していた。(5)酸化修飾によって生ずる8-oxo-dGの量はTat発現によって低下していた。(6)OGG1 siRNAを用いた実験から、TatがOGG1発現を介して8-oxo-dGの蓄積を抑えていることが確認できた。

6) 神奈木は、CD8陽性CTL上清がX4, R5両方の野生株HIV、および、VSV-G, MuLV, HIVのエンベロープを持つpseudotype virusに対し抑制活性を持つことを示した。CTL上清による抑制はX4あるいはR5親和性の両HIV株に対して有効であった。CTL上清のゲル濾過カラムクロマトグラフィーでは14番目付近の分画(60K前後)に、イオン交換クロマトグラフィーでは26番目付近の分画に強いHIV-1抑制活

性が認められた。両クロマトグラフィーを組み合わせて得られた部分精製分画のプロテオーム解析を試みた結果、この分画には多くの FCS 由来蛋白が混入していることが分かったので、さらに FCS を厳密に除去した条件で CTL 上清を再精製し、引き続き解析を行っている。

D. 考察

岩倉は、HIV-Tg マウスの脾臓細胞を T 細胞マイトジェンあるいは CD3 刺激しても T 細胞における HIV の効率的な発現誘導は起こらないが、*in vitro* で脾臓細胞を LPS 刺激すると T 細胞でも発現誘導が起こるということを示した。この結果、T 細胞における効率的な HIV 遺伝子発現誘導には、LPS によって誘導されるサイトカインからのシグナルとともに、LPS の直接刺激によるシグナルが協調的に働く必要があることが示唆された。また、mRNA の核外輸送に関与する宿主因子をヒト型化したマウスを作製したが、今後は PIC の核内輸送に関与する宿主因子のヒト型化を計る予定である。

志田は、rCRM1 で運ばれた mRNA が効率よく翻訳されないことが、ラット細胞における Gag 蛋白の生産量の低下の原因である事を示唆する結果を得た。また、hCRM1 を発現する Tg ラットの作製に成功し、その T 細胞で HTLV-1 が効率よく増殖することを示唆した。この結果は、本 Tg ラットに CD4, CXCR4 と CCR5 を発現させることによって HIV が増殖できるようになることを示唆するものである。

小糸らは、MuLV ベクターを用いた感染システムの開発を行ったが、HIV を含むレンチウイルスベクターの感染は P2 レベル以上での拡散防止措置が必要であるのに対し、このシステムは、自己複製能をもたない MuLV ベクターの接種であるので、通常のマウス施設内で迅速、簡便かつ安全に行うことが可能である。HIV 感染症に対する系統だった基礎研究の推進に貢献できるものと期待される。

小柳は、小動物を用いた HIV 感染実験系のひとつとして、T 細胞 B 細胞に加え NK 細胞も欠損する Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-}新生児マウスにヒト細胞を長期に定着できる実験系を確立した。今後、このマウスへの HIV 感染実験を計画している。また、NOG マウスでは全例、骨髄移植後にマウスが死亡することが判明した。今後の移植実験法の改良が必要である。

岡本は、Tat が宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし、HIV の転写を有利にさせる一方で、あらかじめ OGG1 を誘導することによって DNA レベルでの HIV および宿主のゲノ

ム変異を未然に防止している (feed-forward) 可能性を示唆した。また、最近 APOBEC3G/CEM15 による RNA レベルでの HIV ゲノム変異 (G:C から A:T への transition) を Vif が抑制していることが報告されたが、今回の結果から Tat も Vif とともに HIV ゲノムの安定性に関与していることが推察された。

神奈木は、CD8CTL 由来 HIV 抑制因子について、Pseudotype virus を用いた解析から少なくとも HIV 侵入過程には影響しない事を示唆した。イオン交換とゲル濾過クロマトグラフィーにより、CTL 上清中の HIV 抑制因子を部分精製することに成功したが、活性分画には FCS 由来のアルブミンを主とする成分が含まれておりそれ以上の解析に支障がでることから、現在 CTL 上清の調整条件を改良することを試みている。

E. 結論

マウスやラットの HIV 感受性宿主障壁因子をヒト型化する試みは着実に進んでおり、ほかに、Rag2^{-/-}γc^{-/-hu} マウスや MuLV pseudo virus の系も開発されつつある。また、Tat のウイルス増殖における新たな役割が明らかにされると共に、CTL 由来 HIV 抑制因子を精製、同定するための実験系が整備された。今後、これらの成果を組み合わせ、個体レベルでの抗エイズ薬評価系を構築する予定である。

F. 研究業績

各分担研究報告書に記載した。

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発

分担研究者：岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所）

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでには至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、潜伏ウイルスの活性化機構について検討を加えると共に、新たなエイズモデルの開発を試みた。我々はこれまで HIV 遺伝子導入トランスジェニック（HIV-Tg）マウスを HIV の潜伏感染モデルとして用いることにより、HIV の活性化には LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることを明らかにしてきた。また、マウス細胞における新たな宿主域バリアとして、HIV pre-integration complex (PIC)の核移行過程を同定し、これはインテグラーゼの機能障害に起因することを見いだした。当該年度では HIV-Tg の T 細胞における HIV 遺伝子発現制御機構の解析を行い、T 細胞における効率的な HIV 遺伝子の転写にはサイトカインからのシグナルと LPS の直接刺激によるシグナルの相乗効果が重要であることを示した。また、HIV-Tg のリンパ組織における効率的な HIV 遺伝子発現および HIV 感受性マウスの作製の試みとして、ウイルスの複製後期過程における宿主域バリアとして報告されたヒト CyclinT1, CRM1, p32 のトランスジェニックマウスの作製を行った。更に、これまで MuLV envelope を用いて示されたマウス細胞における PIC の核移行阻害を、VSV envelope を用いた pseudotype の系においても証明した。

1. 研究目的

抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスの作製と共に、HIV キャリアーマウスの作製を試みている。また、これらのマウスを用いて、HIV の増殖機構や発症機構を解析すると共に、病態形成に関与する種々の宿主因子について、その生理

的、病理的役割を明らかにすることを目指している。

1) HIV-Tg の T 細胞における HIV 遺伝子発現制御機構の解析

我々はこれまで HIV キャリアーモデルマウスとして HIV 遺伝子導入トランスジェニックマウス(HIV-Tg)を作製し、このマウスの脾臓では

LPS 刺激に伴い HIV 遺伝子の発現誘導が起こるということを示してきた。また、IL-1 あるいは TNF- α を欠損させることによりこの発現誘導は約 50%抑制されるものの、完全に抑えることはできず、これらのサイトカイン以外の因子を介したシグナルが関与している可能性が示唆されていた。更に、LPS による HIV-Tg の発現誘導は脾臓細胞全体を用いて解析を行っていた為、HIV 本来の標的細胞である T 細胞における LPS 刺激の影響は不明なままであった。そこで本年度はより現実の患者に近い状況を解析する為に、LPS 刺激に伴う HIV-Tg の発現誘導における T 細胞の寄与を解析するとともに、LPS 以外の T 細胞マイトジェン刺激による HIV-Tg の活性化機構の解析を行った。

2) ヒト CyclinT1, CRM1, p32 トランスジェニックマウスの作製

近年、tat 依存的な HIV 遺伝子の転写に必須のコファクターとして同定された CyclinT1、rev 依存的な HIV-mRNA の核外輸送に関与する CRM1、および HIV-mRNA の過剰な巣プライシングを抑制する宿主因子として同定された p32 遺伝子が HIV 複製後期過程のヒト-マウス間宿主域バリアとなっていることが報告された。前述の HIV-Tg においても HIV 遺伝子の非効率的な転写、過剰なスプライシングおよびそれに伴う rev 依存的な mRNA 量の減少が見られている。そこで、HIV-Tg における効率的なウイルス複製の実現、および HIV 感受性モデルの作製を目的として、これらの宿主因子をヒト型化したトランスジェニックマウスの作製をおこなった。

3) マウス細胞における HIV 宿主域バリア過程の解析

これまで、MuLV envelope を用いた pseudotyped-HIV の系で、マウス細胞では PIC の核移行が阻害されていることを示した。この結果が、envelope の影響によるものなのか、envelope によらない普遍的な現象であるのかを検討する為に、VSV-G envelope による pseudotyped-HIV の系 PIC の核移行過程を検討した。

2. 研究方法

1) HIV-Tg の T 細胞における HIV 遺伝子発現制御機構の解析

LPS 刺激時の T 細胞における HIV 遺伝子発現を解析する為に、HIV-Tg に 100ug/mouse の LPS を腹腔投与し、48 時間後に脾臓を回収し MACS により T 細胞 (抗 Thy1.2 抗体)、B 細胞 (抗 B220 抗体)、マクロファージ (抗 CD11b 抗体) を分離し、分離した後それぞれの細胞集団から RNA を抽出後ノーザンブロットング解析あるいは RT-PCR 解析により HIV 遺伝子の発現を検討した。また、未刺激の HIV-Tg から回収した脾細胞を *in vitro* で LPS 刺激を行い、48 時間後に、同様の方法で T 細胞、B 細胞、マクロファージを分離後 RNA を抽出し発現解析を行った。

更に、T 細胞マイトジェン刺激時の HIV 遺伝子の発現を検討する為に、HIV-Tg の脾細胞を *in vitro* でコンカナバリン A (ConA)、抗 CD3/CD28 抗体、PMA/ionomycin、あるいは PHA/IL-2 刺激し、24,48,72 時間後に RNA を回収しノーザンブロットング解析を行った。

ConA刺激に関しては、更に刺激後 3, 6, 12, 96

時間後における HIV 遺伝子の発現を検討した。また 5-azacytidine 共存下でも刺激を行い、ConA 活性化における DNA メチル化の影響を検討した。

2) ヒト CyclinT1, CRM1, p32 トランスジェニックマウスの作製

Hela 細胞由来の cDNA から PCR によって増幅したヒト CyclinT1, CRM1, p32 遺伝子の cDNA を CAG プロモーターの下流につないだ DNA ベクターを、C3H/HeN マウスの受精卵にマイクロインジェクション法により導入しトランスジェニックマウスを作製した。導入遺伝子の有無はサザンブロット法によりスクリーニングを行った。

3) マウス細胞における HIV 宿主域バリア過程の解析

293T 細胞に NL-luc (env-)プラスミドおよび VSV-G envelope プラスミドを co-transfection し得られた培養上清をウイルス液として、NIH3T3 および Hela 細胞に感染させ、感染 24 時間後の逆転写産物および核移行産物の DNA をリアルタイム PCR 法により定量した。

(動物実験について)

マウスの飼育・実験はそれぞれの所属機関の動物実験指針に従い行うものとする。各々の施設はよく整備されており、マウスは病原体汚染のない状態で飼育されている。動物実験においては動物愛護の精神に基づき、動物の使用数を最小限にとどめると共に、使用にあたっては苦痛を最小限にとどめるため、ネンプタールなどの麻酔薬を用いるものとする。また最終処分は

ネンプタールの過剰投与あるいは炭酸ガスにより行う。

4. 結果と考察

1) HIV-Tg の T 細胞における HIV 遺伝子発現制御機構の解析

in vivo で LPS 刺激を行った HIV-Tg の脾細胞から分離した T 細胞における HIV 遺伝子の発現を、ノーザンブロット解析により非 T 細胞における発現と比較した結果、T 細胞の HIV 遺伝子発現は非 T 細胞の約 10 分の 1 程度であった。脾細胞を B 細胞、T 細胞、マクロファージに分離し、RT-PCR 法により HIV 発現細胞を更に詳細に解析した結果、B 細胞における発現が最も高く、マクロファージからも中程度の発現が見られたが、T 細胞からの発現は非常に低レベルであった。一方、*in vitro* で LPS 刺激を行った HIV-Tg の脾細胞では B 細胞、T 細胞、マクロファージ間で発現量に差は見られなかった。

更に、HIV-Tg の脾細胞を種々の T 細胞マイトジェンで刺激し、HIV 遺伝子の発現解析を行った結果、調べた全ての刺激および時間で HIV 遺伝子の発現誘導は見られなかった。また、5-azacytidine 存在下で ConA 刺激を行い HIV 遺伝子の発現を調べた結果、若干の発現上昇は見られたものの、LPS 刺激時の 25 分の 1 以下の発現量であり TCR を介したシグナルでは、たとえ DNA のメチル化が外れた状態にあっても、T 細胞における HIV 遺伝子の効率的な発現誘導は起こらないことがわかった。

以上の結果から、T 細胞マイトジェンあるいは *in vivo* の LPS 刺激では HIV-Tg の T 細胞

における効率的な発現誘導は起こらないが、*in vitro* の LPS 刺激では他の細胞種と同等の発現誘導が起こるということがわかった。これは、HIV-Tg の T 細胞における効率的な HIV 遺伝子発現誘導には、LPS によって誘導されるサイトカインからのシグナルとともに、LPS の直接刺激によるシグナルが協調的に働く必要があり、サイトカインシグナルや TCR を介したシグナル単独では不十分であるということを示唆している。現在、この活性化メカニズムを更に詳細に解析中である。

2) ヒト CyclinT1, CRM1, p32 トランスジェニックマウスの作製

CAG プロモーター制御下にヒト CyclinT1, CRM1, p32 遺伝子を発現するトランスジェニックベクターを C3H/HeN マウスにマイクロインジェクションした結果、計 20 系統のトランスジェニックマウスを得た。現在、これらのマウスの系統化および発現解析を行っている。

3) マウス細胞における HIV 宿主域バリア過程の解析

リアルタイム PCR の結果、NIH3T3 細胞では Hela 細胞と比較して核移行産物 DNA の量が約 2 分の 1 に減少していることが示された。

結論

HIV-Tg の T 細胞における HIV 遺伝子発現制御機構の解析を行うことにより、HAART 療法下において問題となっている潜伏感染細胞の再活性化方法および長期的なウイルスの抑圧方

法開発の糸口となることが期待される。また、ヒト CyclinT1, CRM1, p32 トランスジェニックマウスを HIV-Tg あるいは HIV 受容体のトランスジェニックマウスと交配させることにより、より効率的な感染モデルの樹立や HIV 感受性マウスの作製が期待される。

6. 研究発表

1) 論文発表

Ishihara, K., Sawa, S.I., Ikushima, H., Hirota, S., Atsumi, T., Kamimura, D., Park, S.J., Murakami, M., Kitamura, Y., Iwakura, Y., and Hirano, T. The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-I pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis. *Int. Immunol.*, 16, 455-465 (2004).

Asahi-Ozaki, Y., Yoshikawa, T., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Tamura, S., Kurata, T., and Sata, T. Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus. *J. Med. Virol.*, 74, 328-335 (2004).

Horai, R., Nakajima, A., Habiro, K., Kotani, M., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Saijo, S., Kotaki, H., Sudo, K., Okahara, A., Tanioka, H., Ikuse, T., Ishii, N., Schwartzberg, P. L., Abe, R., and Iwakura, Y. TNF- α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 114, 1603-1611 (2004).

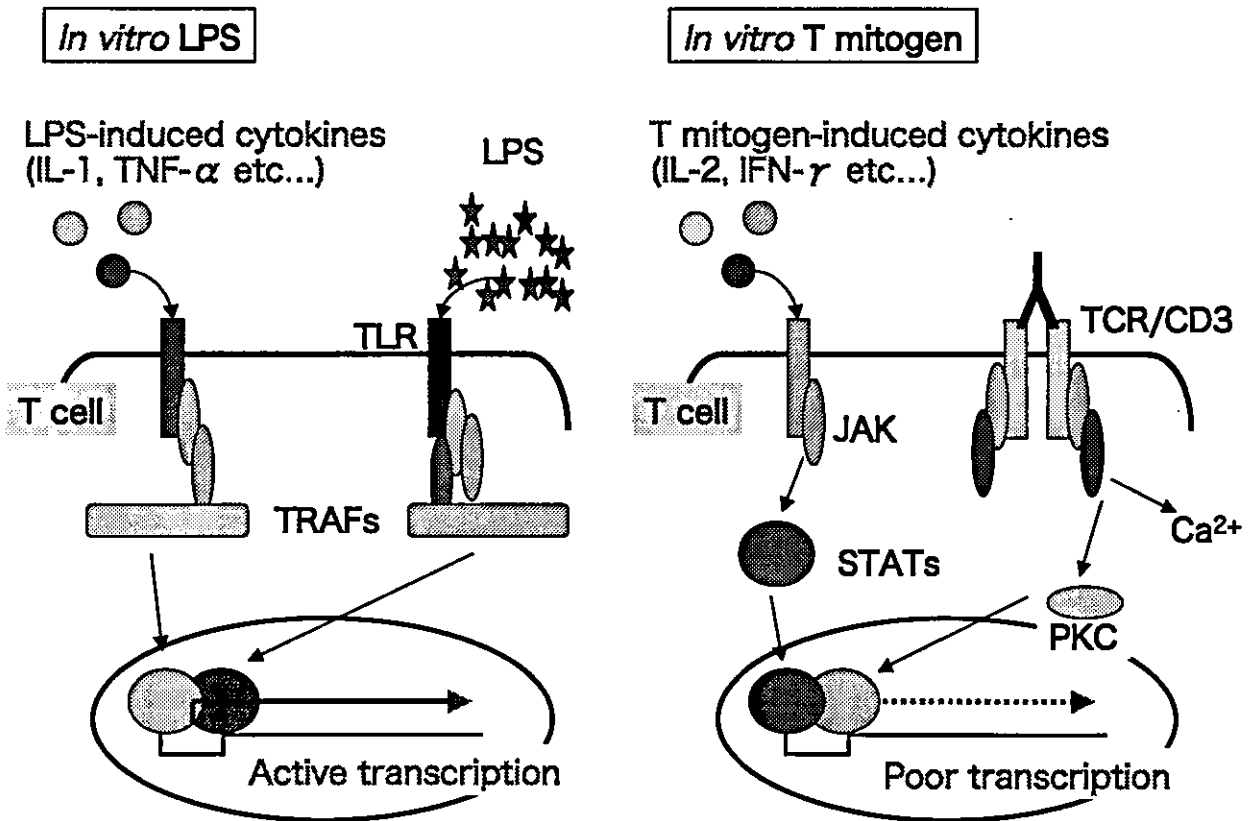
Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Matsuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and Iwakura, Y. The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. In "*Cytokines as Potencial Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Disease*", (eds. Numerof, R., Dinarello, C.A., and Asadullah, K.), Ernst Schering Research

Foundation Workshop series, in press.

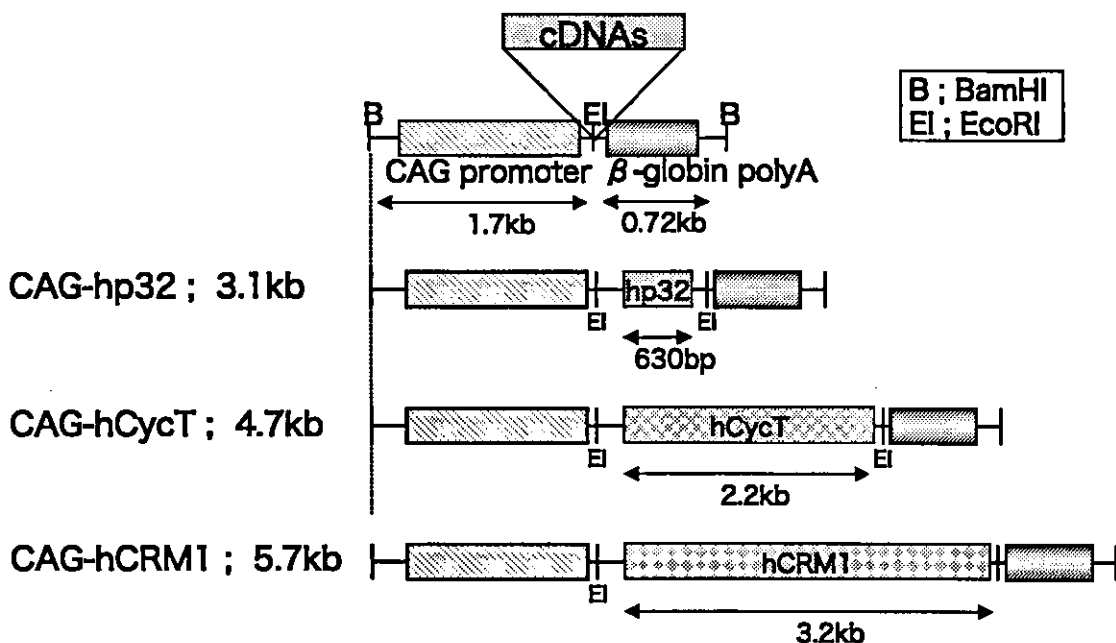
2) 学会発表

Naomi Tsurutani, Motohiko Kadoki, Yoichiro Iwakura: CHARACTERIZATION OF A SPECIES-BARRIER IN MURINE CELLS FOR HIV-1 INFECTION, poster presentation, *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Programs (Cold Spring Harbor, NY, May 25-30,2004)

LPSとサイトカイン刺激が共に入るとHIVの強い発現誘導が起こるが、サイトカイン刺激、あるいはTCR刺激単独では活性化の程度が弱い。



Transgenic construct of hp32/hCycT/hCRM1 Tg mice



HIV ラット感染モデルの開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 HIV ラット感染モデルを作製するために、ラット細胞における Gag/Env 蛋白の合成効率を調べた。その結果、gag mRNA は効率よく細胞質に運搬されるが、翻訳効率が低いとの示唆を得た。ヒト hCRM1 を発現させることにより Gag 蛋白の生成量が回復することから、hCRM1 を発現するトランスジェニック(Tg)ラットを作製した。Tg ラットから調製した T 細胞内で、HIV と共通の増殖様式を持つ HTLV-1 が効率よく増えた。

A 研究目的

エイズウイルス(HIV)は累計で7千万人(内4千万人が生存)に感染し、昨年には500万人が新規感染した。特に中国、インドネシアなど近隣国で感染が急拡大し、このままでは、2010年までにアジアで数千万人が感染すると予想されている。エイズ感染の拡大を防ぐためにワクチン開発が望まれているが、遅々として進んでいない。その1つの原因は使いやすい HIV 感染モデルが存在しないことである。しかし、ヒトの CD4 とケモカイン受容体を発現させてやれば、HIV がわずかに増殖することからラットは良いモデルに改良しうる可能性を秘める。

我々は、ウイルス mRNA 形成に必要なウイルスの調節因子 Rev を支持すべきラット因子 rCRM1 が機能しないことが、HIV の増殖の非効率の1原因であることを発見した。さらに、hCRM1 を恒常的に発現させたラット細胞を作成して検討した結果、①内在性の rCRM1 は dominant-negative に働かない、②hCRM1 の発現でラット細胞の増殖阻害は

起こらない、③ウイルス粒子形成段階での非効率はない、④ヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産される、ことを明らかにした。ウイルスの侵入以降ゲノムの組み込み、転写などの各段階での効率は低くないとの他からの報告も、hCRM1 の発現こそがラット細胞での HIV 増殖のための key であることを支持している。このことは、ヒト対応因子である hCRM1 を発現させたトランスジェニック(Tg)ラットが良い感染動物モデルになることを示唆している。

他方、ラット細胞において hCRM1 の発現が key であることを HTLV-1 感染においても我々は示してきた。そこで、HIV と HTLV-1 の研究を平行して行うことは、それぞれの感染を理解するための相乗効果を生むと思われる。

そこで、hCRM1 発現による HIV 増殖への効果の詳細な分子機構の解析と Tg ラットの作製と HIV/HTLV-1 の増殖効率を調べることを本年度の目的とした。

B 研究方法

細胞：ヒト細胞として HeLa, CD4-HeLa 細胞を、ラット細胞として ER1,W31 細胞を用いた。

プラズミド：Gag 発現のために pNLe-r-Luc, pNLmr(-)pro(-)Flag, CRM1 発現のために pSR α CRM1, 感染性 HIV 全長ゲノムを持つプラズミドとして pNL432 を用いた。

C 研究成果

ラット細胞における Gag/Env 生産の分子機構

ラット細胞での Rev 活性が弱いことを確認するためにラット細胞とヒト細胞での Gag/Env 産生の詳細な分子機構を解析した。その結果 gag/env mRNA の核外輸送効率は両細胞間で大きく変わらないことが分かった。しかし、Gag, Env 蛋白はラット細胞でヒト細胞の 1/100 しか生産されることが分かった。hCRM1 を一過性に発現させることにより、gag/env mRNA の細胞質への分布はほとんど変わらなかったが、Gag 蛋白は約 10 倍増加した。rCRM1 の発現ではこの増強効果は見られなかった。このことは hCRM1, rCRM1 共に Rev と協力して gag/env mRNA を効率よく細胞質に運べること、hCRM1 は rCRM1 にはない細胞質における機能を有することを示唆している。

次に、hCRM1 の細胞質での機能を調べた。Gag mRNA の翻訳の効率化と Gag 蛋白の安定化が考えられる。Gag 蛋白の安定性を調べるために、pNLmr(-)pro(-)Flag (ミリスチル化-, プロテアーゼ-のために、Gag は 55kDa の分子量のまま細胞質にとどまる) を transfection することにより Gag を発現させた。S³⁵メチオニン/システインで短時間パルスラベルした後、チェ

ースすることで Gag 蛋白の安定性を調べた。その結果、ヒト及びラット細胞中で Gag 蛋白は同様に安定であることが示唆された。このことは、hCRM1 が Gag mRNA の効率的な翻訳に関与していることを示唆している。

hCRM1 を発現する Tg ラットの作製

CRM1 をラットで発現させるために以下の点に留意する必要がある。①CRM1 の発現量はリンパ球の活性化に伴い制御される。②CRM1 は細胞の増殖維持に必須の因子である。従って、hCRM1 の過剰発現はラットの発生過程と生存に悪影響があるかもしれない。

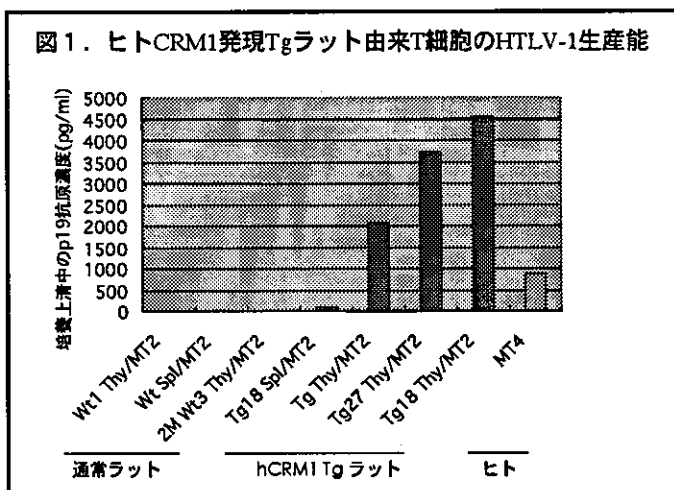
つまり、Tg ラットを作製するためには natural な制御様式の下で CRM1 を発現させることが必要であると考えられる。そこで、我々は crm1 ゲノム全域を含む BAC をクローニングした。約 450 個の卵に BAC を打ち込み、生まれてきた 2 匹のラットが全長の hcrm1 ゲノムを有していた。うち 1 匹が hCRM1 蛋白を発現していた。各臓器での hCRM1 の発現量を Western blotting で調べたところ、胸腺で高発現であり、脾臓での発現は弱かった。内在性の rCRM1 と同様の発現であった。このことから、hCRM1 は natural な発現制御を受けていると推察された。

HTLV-1 の感染

HIV を本 Tg ラットに感染できるようにするためには、受容体であるヒト CD4 とヒト CCR5(又は CXCR4)をさらに発現させる必要がある。しかし、HTLV-1 の場合には受容体レベルでの宿主域の制限はなく、本ラットでの増殖を調べてみる事ができる。HIV と共通の増殖様式をとるために、HTLV-1 の結果は HIV の前触れとも考えら

れる。そこで、本 Tg ラット、通常ラットの脾臓と胸腺から T 細胞を採取してきて HTLV-1 を感染させて、不死化した持続感染細胞を作製した。HTLV-1 Gag 蛋白の一種である p19 ELISA によって HTLV-1 産生量を測定したところ、通常ラット由来 T 細胞はほとんど産生しないのに対し、Tg ラット由来の T 細胞はヒト T 細胞(MT4 細胞)以上の p19 を生産した (図 1)。また、p19 の生産量と hCRM1 の発現量は相関していた。

図 1. ヒト CRM1 発現 Tg ラット由来 T 細胞の HTLV-1 生産能



D 考察

今年度、我々は hCRM1 と rCRM1 の HIV Gag/Env 蛋白の生産への関与の分子機構を調べた。その結果、hCRM1/rCRM1 共にウイルス mRNA を効率よく細胞質に運ぶが、hCRM1 で運ばれた mRNA のみが効率よく翻訳されることを示唆した。hCRM1 は核内でのみ Rev を含んだ mRNA 輸送複合体を形成しているので、翻訳に関わる因子を核内でリクルートしてることが予想される。rCRM1 はこの仮定上の因子をリクルートできないために、gagmRNA が効率よく翻訳されない。それがラット細胞における Gag 蛋白の生産量の低下の原因であると考えられる。しかし、

結論を得るためには、さらに実験を積み重ねる必要がある。

また、我々は hCRM1 を発現する Tg ラットの作成に成功し、その T 細胞で HTLV-1 が効率よく増殖することを示唆した。Tg ラット生体に HTLV-1 を感染させて、長期追跡を初めている。HIV の感染系とするために本 Tg ラットにヒト CD4 とヒト CCR5 (又は CXCR4) をさらに発現させるとことを現在試みている。

E 結論

我々は Gag/Env 蛋白合成における hCRM1 と rCRM1 の関与する分子機構を検討した。また、hCRM1 を発現する Tg ラットの作成に成功し、その T 細胞で HTLV-1 が効率よく増殖することを示唆した。これは、本 Tg ラットに CD4, CXCR4 と CCR5 を発現させることによって HIV が増殖できるようになることを示唆している。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kidokoro, M, Tashiro, M, and Shida H. : Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. Proc. Natl. Acad. Sci. In press.
- (2) Sakurai, A, Yasuda, J, Tanaka, Y, Hatakeyama, M, and Shida H. (2004): Regulation of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4. Microbes and Infection 6:150-156

2. 学会発表

志田壽利、大藤邦彦、金澤剛志、博多義之：
ヒト免疫不全ウイルス遺伝子発現における
RNA 輸送因子 CRM1 の新機能、日本分子
生物学会 2004, 神戸

志田壽利：hCRM1 発現によるラット細胞
での HIV-1 増殖の増強、日本エイズ学会 2
004, 静岡

浦田秀造、博多義之、志田壽利：hCRM1
発現によるラット細胞での HIV-1 増殖の増
強、日本ウイルス学会 2004, 横浜

張陝法、博多義之、志田壽利:Human CRM1
is sufficient to support HTLV-1 replication
and infectivity in rat cells、日本ウイルス学
会 2004, 横浜

北嶋正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、
鮫島由紀恵、村井深、水野喬介、木所稔、
志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：
ワクシニアウイルス弱毒株 LC16m8 株を
用いた SARS ワクチンの開発、日本ウイル
ス学会 2004, 横浜

木所稔、田代真人、志田壽利：遺伝的安定
性に優れた高度弱毒天然痘ワクチン株の開
発、日本ウイルス学会 2004, 横浜

北嶋正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、
鮫島由紀恵、村井深、水野喬介、木所稔、
志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：
SARS 遺伝子組み換えワクシニアウイルス
によるワクチン効果の検討、日本免疫学会
2004, 札幌

G 知的所有権の取得状況

1. 名称:組み換えウイルス及びその用
途(特願 2004-296734) 発明者志田壽利
他、出願日:2004年10月8日、出
願人:国立大学法人北海道大学 他
2. 名称:齧歯類での人免疫不全ウイルス
増殖に必要なヒト遺伝子(特願
PCT/JP2004/005607), 発明者:志田
壽利、出願日:2004年5月11
日、出願人:北海道ティー・エル・
オー株式会社

分担研究報告書：

研究項目：造血細胞移植 SCID マウスの HIV モデル動物への応用

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 中畑 龍俊 京都大学医学研究科 教授

研究要旨

HIV 感染による生体内における病態モデルと新規治療薬の評価系として免疫不全マウスへのヒト造血細胞移植によるヒトキメラマウスの実験法開発を試みた。移植される動物として新規免疫不全マウスである NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} の新生児マウスにヒト CD34 陽性細胞を肝臓内に移植し、ヒト細胞の構築効率を検討した。その結果、移植後 6 週目には Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスの末梢血においてヒト白血球細胞の出現を認めた。しかし、個体の免疫不全状態がより重篤であるためにきわめて効率的なヒト細胞の移植が可能であると考えられている NOG マウスに移植を行ったが、すべてのマウスが移植後 2 週目には死亡し、移植法の改善が必要であることがわかった。

A. 研究目的

本研究は抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発を目的としている。現在まで我々が開発した末梢血を移植した hu-PBL-NOD-SCID マウス内で再現されるのは活性化 T 細胞での HIV の感染であり (Miura, & Koyanagi, *JEM*, 2001, Nakata, & Koyanagi, *JV*, 2005)、治療が困難な潜伏持続感染は再現できない。潜伏持続感染は HIV 感染者では少なくとも DR 陰性の静止期 CD4 陽性 T 細胞で起きていることが知られている。しかし、これらの細胞への感染機構はほとんど解明されていない。そこで、我々が T B 細胞欠損だけでなくコモンγ鎖遺伝子のノックアウトにより NK 細胞を欠損する新たな免疫不全マウスを作出し、血液幹細胞移入により 4 ヶ月以上にわたりマウス内にヒトリンパ球の成熟分化が可能であることを見出した (Ito, Koyanagi, & Nakahata, *Blood*, 2002) 実験系を利用する試みである。臍帯血由来血液幹細胞移植技術を用いて、血液系全般における抗エイズ薬の評価が可能なモデル動物を研究開発することを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) NOG ならびに Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスへの臍帯血移植実験と HIV-1 感染

実験

NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスに出産後 24 時間以内に 2.4 Gy (2 回に分けて) の放射線を照射後、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、1-4 x 10⁵ 個) を肝臓内へ移植した。移植後、6 週目に眼窩静脈より採血し FACS を用いてヒト細胞の存在を解析した。用いた抗体は APC 標識抗マウス CD45 単クローン抗体 (mAb), FITC 標識抗ヒト CD45 mAb, PE 標識抗ヒト CD19 mAb, PC5 標識抗ヒト CD19 mAb である。すべて DAKO 社 (京都) より購入した。

(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。また臍帯血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、採血を行いマウスへの移植実験に使用した。

C. 研究結果

1) 新生児免疫不全マウスへの臍帯血移植実験

ヒト末梢血移植免疫不全

(hu-PBL-NOD-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、免疫不全マウスへ骨髓移植実験を行った。一方、昨年報告 (*Science* 304:104-107, 2004) により、新生児期に骨髓移植された免疫不全マウス個体内では、ウイルス感染などに対するヒト獲得免疫反応系が構築されていることが示されている。そこで、本研究ではまず、免疫機構が未熟な新生児に対して骨髓移植実験を行った。移植レシピエントとして T B 細胞欠損に加え NK 細胞を完全欠損する NOG、あるいは、上述の論文 (*Science* 304:104-107, 2004) で使用された Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスを用いた。その結果、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスでは移植後 6 週目にはヒト CD45 陽性細胞群が全単核細胞中の 3-7% を占め、その多くはヒト CD19 陽性 B 細胞であること、また、少数ではあるが明らかにヒト CD3 陽性 T 細胞分画も存在することが判明した (図 1 A, B)。これまで経験からこの CD3 陽性 T 細胞分画は移植後、時間をへると明らかに増えることは知られている。

一方、NOG マウスについて同様の実験を行ったところ、すべてのマウスが移植後、2 週目に死亡し、構築効率などの解析が不可能であった (図 2)。

D. 考察

本研究は小型動物を用いた抗エイズ薬の治療効果評価系開発のなかで、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 Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒトキメラ実験系を確立した。これまでの末梢血細胞移植による HIV 感受性マウス構築法 (Koyanagi, *JV*, 1997, Miura, & Koyanagi, *JEM*, 2001, Miura, & Koyanagi, *PNAS*, 2003)

では、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に成功し、現在まで 2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。そこで今後、このマウスへの HIV-1 感染実験を計画している。

ところで、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスに比べ、NOG マウスでは全例、骨髓移植後にマウスが死亡することが判明した。本移植実験はレシピエントが新生児であることより、実験施行中の親マウスによる食殺、ならびに、放射線障害などの課題があり、今後、検討すべきである。これまで、レシピエントマウスとして NOG マウスがもっとも優れている点は我々の実験からヒト T 細胞 (Ito, Koyanagi, & Nakahata, *Blood*, 2002)、ヒト卵巣組織 (Sato et al. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 67-72, 2003)、ヒト子宮組織 (Matsuura-Sawada R et al. *Human Reprod.*, in press) 移植実験系でも証明されており、今後の移植実験法の改良により、現在の Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスを使ったキメラマウスより優れた移植効率が得られる可能性を考えている。

E. 結論

小型動物を用いた抗エイズ薬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

移植マウスへの 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., and 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., and 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., and 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., and 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, R.Y., Hashimoto, M., Kakuda, M., Okada, H., Koyanagi, Y., Ishizuka, T., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and Aoki, J. A cDNA