

ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成と その応用

所 属 東京医科歯科大学難治疾患研究所
研究者 清水 則夫

研究要旨 ヒト臍帯血造血幹細胞を NOG マウスに移入し、リンパ濾胞を有するヒト型 SCID マウスを作製した。脾臓に胚中心様構造を持つリンパ濾胞が出現したが、FDC はマウス由来で免疫複合体捕捉能、迷路様構造の発達は十分ではなかった。移植マウスは HIV-1 感受性で、持続感染モデルとして使用可能である。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 山本直樹
- (2) 東京医科歯科大学 寺嶋一夫、森尾友宏
- (3) 株式会社リンフォテック 関根暉彬

A. 研究目的

リンパ濾胞樹状細胞 (FDC) を含むリンパ濾胞、胚中心は 1) 中和抗体の有無にかかわらず、感染初期より HIV-1 を特異的に大量に捕捉、蓄積し、2) 胚中心に回遊するリンパ球に効率よく HIV-1 を感染させ、さらに 3) 集積したウイルスは HAART 療法抵抗性で、変異株新生の場を提供し、4) エイズ期においては FDC-network の破綻を来し、免疫不全を招来するなど感染、発症の要であることが報告されている。FDC を介した HIV-1 感染と FDC-network の破綻がエイズ発症の要であり、FDC と HIV-1 の相互作用の解明が新規エイズ薬・ワクチン開発には必須である。しかし、HIV-1 は通常の実験動物には感染せず、またリンパ濾胞を *in vitro* で再構成することもできず、研究の障害となっている。したがって、HIV-1 感染を許容し、かつリンパ濾胞を持つ動物モデルの作成は、エイズ研究にとって非常に重要な課題である。

最近我々が開発したヒト造血幹細胞の生着を許容する免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス: NOG マウス) を用いて HIV-1 感染実験が行われているが、それらはなおリンパ濾胞を欠き、HIV-1 感染の完全なヒト型モデルではない。我々はこの点の克服を目指した研究を行ない、造血幹細胞移植と同時にヒト活性化 T 細胞を投与するとマウス脾臓中にリンパ濾胞様構造が出現することを観察した。本研究では、

リンパ濾胞様構造の詳細な解析とマウスへの HIV-1 感染実験をおこない、エイズ研究の新しいモデルマウスとして確立し、薬剤・ワクチン開発へ応用することを目的とする。そのようなモデルマウスを使用できるようになれば、リンパ濾胞中の HIV-1 感染の阻止を指標とした新規エイズ薬やワクチンの開発・評価が可能となるとともに、他の様々な感染症やプリオン病の感染防止および治療研究に応用することが可能である。また、リンパ濾胞内で起ることが知られている抗体遺伝子のクラススイッチや親和性成熟などの重要な免疫現象の分子機構解明に寄与するとともに、標的抗原に対する親和性成熟を経た高い結合活性を持つ特異抗体の遺伝子を分離し、完全ヒト型抗体医薬開発に応用できる可能性がある。研究1年目の本年度は、安定的にヒト臍帯血造血幹細胞移植 NOG マウスを作出するための研究開発として、マウスへの移植法の検討、移植と同時にヒト臍帯血由来活性化 T 細胞の効率良い増幅法と CD4 陽性 T 細胞の分離法、移植マウスに構築されたリンパ濾胞様構造の解析、移植マウスへの HIV-1 感染とウイルス動態の解析を中心に研究を行った。また、より完全なリンパ濾胞の構築を目指して今後使用を予定している、FDC 様細胞 (分担研究者の寺嶋、森尾が培養に成功) の解析もあわせて行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血 T 細胞の活性化培養法の検討

従来使用している末梢血単核球 (PBMC) 由来の T 細胞培養法 (固相化抗 CD3 抗体 + IL-2 刺激) を参考に CBMC の至適培養法の開発を行った。その際培地 (IL-2 濃度、血清濃度、血清の処理条件など)、培

養期間などの条件を変えて培養し、CBMC に至適な培養条件を検討した。

2. 磁気ビーズを使用した細胞の分離

Dynabeads (ベリタス) を使用し、CD4 陽性 T 細胞の分離を行った。

3. 培養 T 細胞、マウス細胞の表面抗原解析

培養細胞の表面抗原を、蛍光標識抗体 (抗 human CD45, CD3, CD19, CD4, CD8, CD14[Beckman Coulter], CXCR4, CCR5[BD Pharmingen] および mouse CD45[Beckman Coulter]) で染色し Epics-XL (Beckman Coulter) による FCM にて解析した。

4. ヒト臍帯血造血幹細胞細胞の分離と NOG マウスへの造血幹細胞移植

臍帯血を Ficoll で遠心分離し、単核球 (CBMC) 層を回収し、 -80°C で凍結保存した。CBMC は、凍結融解後すぐに MACSCD34+ アイソレーションキット (Miltenyl Biotec) にて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。6-8 週齢の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所にて飼育した。前処置として 300Rad の放射線照射したマウス (実験によっては照射量を減じたり照射なしのマウスも使用) に、 1×10^4 ~ 1.2×10^5 個の CD34 陽性細胞および 2×10^5 個の活性化 CD4 陽性 T 細胞を尾静脈より投与した。

5. 組織免疫染色

凍結包埋した組織から切片を作製し、15 分間アセトンで固定した。切片を抗ヒト CD45, CD68, CD205 (BD Pharmingen), DRC-1, 抗マウス FDC-M1 (DAKO) で反応させた後、ビオチン標識抗マウス二次抗体で反応させ、さらにアルカリフォスファターゼストレプトアビジン (Zymed) で標識し、BCIP/NBT (DAKO) で発色した。HIV-1 投与マウスについては、あらかじめ固定した組織を凍結包埋し、切片作製後、抗 P24 抗体 (DAKO) で染色を行った。

6. HIV-1 感染実験

移植後、102-132 日目のマウスに、SHIV661 (T 細胞指向性) および GFP 導入 HIV-1JRC5F (マクロファージ指向性) をそれぞれ 8 匹ずつ尾静脈より投与した ($100\mu\text{l}/\text{mouse}$)。SHIV661 投与マウス群は、投与後 18 日目と 42 日目にそれぞれ 4 匹ずつ剖検解析した。HIV-1JRC5F 投与マウス群は、投与後 33 日目と 43 日目にそれぞれ 4 匹ずつ剖検解析した。剖検時にそれぞれのマウスから心臓採血を行い、遠心によりプラズマを回収し、ウイルスコピー数を定量した。また、脾臓、リンパ節を回収して一部をフローサイ

トメトリー解析用に処理し、残りを 4%パラホルムアルデヒドで固定して組織免疫染色用とした。

6. プラズマ中の HIV-1 コピー数の定量

回収したプラズマから RNA を QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) にて抽出した。HIV-1 コピー数は、ABI7300 で定量した。

7. Follicular dendritic cell (FDC) like cell (FDCLC) の培養と、hTERT による不死化

FDCLC は collagenase 処理したヒト扁桃から BSA gradient 法を用いて分離し、長期培養を行った。FDCLC にはさらに hTERT expressing retroviral vector を遺伝子導入し、G418 にて選択して、hTERT-FDCLC 細胞株を樹立した。

8. FDCLC に対するモノクローナル抗体の作成

HIV-1 の FDC への感染様式を理解し、またその感染を阻止する方策を模索するため、FDC に対する新たなモノクローナル抗体の作成を行った。抗体は常法に基づき、マウスを FDCLC で免疫したのち、脾臓 B 細胞とミエローマ細胞株 (SP2) を PEG 法によって細胞融合し、HAT 培地によるスクリーニングを行なって 50 以上のクローンを選択した。抗体の特異性は 3 の組織染色によって確認した。

9. サイトカイン測定

ELISA 法により下記サイトカインの測定を行った。IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, sIL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ ,

(倫理面への配慮)

産婦人科より研究用として供給された全ての臍帯血は、新生児より臍帯血の提供を受ける際、研究用としての使用に対して両親より承諾を受けている。供給を受ける際には臍帯血提供者の匿名化が行われ、供給される者には提供者の一切の情報が伝わらない。また、提供者に不利益は生じない。実験に使用した臍帯血 (培養細胞) は手順に従って廃棄し、遺伝子検査は一切行っていない。

東京医科歯科大学では当研究を行うにあたり倫理委員会の承認が得られている。

C. 研究結果

1. 臍帯血 T 細胞の活性化培養法の検討

臍帯血 T 細胞の至適培養法の検討を行った。その結果、培地には 10% ヒト血清と 700U/ml IL-2 を加えた RPMI1640+7 培地を使用し、抗 CD3 抗体固相化フラスコ中で培養すると効率良く増幅できることが明らかとなった。培養プロトコルを下記のように決定した。

- ① CBMC を RPMI1640 培地で 2 倍に希釈し、Ficoll 液に重層し、遠心分離
- ② リンパ球層を回収し、RPMI1640 培地を使用し遠心により洗浄
- ③ 得られた臍帯血リンパ球を培養液 (RPMI1640+7, 10% ヒト血清 [米産, 700U/ml IL-2]) に浮遊し、抗 CD3 抗体固相化フラスコ中で 5 日間程度培養
- ④ 細胞を通常のフラスコに移し、3~4 日間培養
- ⑤ 再び抗 CD3 抗体固相化フラスコへ戻し、3~4 日間培養し実験に使用

2. CD4 陽性細胞の高純度培養の検討

CD4 陽性 T 細胞を高純度に分離することを目的として、使用するビーズの種類、量などを検討した。その結果、下記のプロトコルで CD4 陽性 T 細胞を分離すると高純度な CD4 陽性 T 細胞を調製することが可能だった。

- ① 分離した CBMC から CD8 陽性細胞分離用ビーズを使用して CD8 陽性細胞除去を 2 回行う。その際、CD8 陽性 T 細胞の 2 倍量のビーズを使用する。
- ② その後、CD4 陽性細胞を CD4 陽性細胞分離用ビーズによりポジティブセレクションする。

上記の方法で分離した細胞の CD4 陽性率 95% 以上で CD8 陽性細胞の混入率は 0.2% 以下と僅かであった。

3. 培養細胞の表面抗原解析

臍帯血 T 細胞について培養開始後 0, 7, 14, 21 目に細胞表面抗原解析を行った。T 細胞の活性化マーカーである HLA-DR, CD69 は培養 0 日目ではほとんど発現が認められなかったが、培養 7 日目では発現が認められ、21 日目でその発現率が最も高くなった。培養 T 細胞のナイーブとメモリーの比率を CD4/CD25/CD45RA/CD62L 測定により解析したところ、培養前にはそのほとんどが CD45RA を発現しているナイーブ T 細胞であったが、培養 7 日目ではすでに CD45 陰性、CD62L 陰性のエフェクターメモリー T 細胞だった。

4. 増幅 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン発現の解析
臍帯血 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞を活性化培養し、その培養上清中放出されたサイトカインを定量したところ、下記の結果が得られた。

臍帯血 T 細胞	
IL-2	17,930 pg/ml
IL-4	<15.0
IL-8	543.8
IL-10	<8.0
TNF- α	423.0 pg/ml
IFN- γ	2011 pg/ml

臍帯血 CD4 陽性 T 細胞

IL-2	39588 pg/ml
IL-4	<15.0
IL-8	4026 pg/ml
IL-10	68.0 pg/ml
TNF- α	1486 pg/ml
IFN- γ	5869 pg/ml

5. ヒト CD34 細胞移植した NOD-SCID マウス末梢リンパ組織の FACS 解析

ヒト造血幹細胞移植後、26 日目のマウス血液中でヒト CD45 陽性細胞が 3% 程度確認された。大半が CD19 陽性の B 細胞であり、CD3 陽性の T 細胞は確認されなかった。移植後 9-10 週のマウスでは、血液中でヒト CD45 陽性細胞の割合が <40% まで増加し、脾臓、骨髄中ではヒト CD45+ 細胞が 60% 以上となっていた。この時期でも末梢血、脾臓、骨髄でほとんどが CD19 陽性細胞 (>90%) であったが、CD3 陽性 T 細胞も末梢血や脾臓に確認された (<5%)。その脾臓中の CD19 の約 50% が CD5 陽性の B1 細胞であった。

移植後 4-5 ヶ月のマウスの脾臓では、T 細胞の比率が増加し、ヒト細胞のうち 10-60% を占めていた。骨髄単核球のうち約 80% がヒトリンパ球であった。主には CD19 陽性の B 細胞であり、ほとんどが CD10 陽性 CD38 陽性の preB あるいは mature B 細胞が主体と考えられる。骨髄中に CD16+CD56+ の NK 細胞はほとんど存在しなかった。

胸腺では CD4+CD8+ の double positive T 細胞が 60-80% 存在していた。

脾臓、骨髄中には CD14 陽性の単球が確認された (>10%)。

CD56 陽性の NK 細胞も確認された (<5%)。

移植後7ヶ月頃の脾臓では、CD4陽性T細胞がヒト細胞の50%以上を占め、活性化マーカーであるHLA-DRが陽性であった。

この時期のB細胞はCD45やCD19などの表面マーカーの発現低下がみられた。

6. 移植マウス中のヒトT細胞におけるHIV-1コレセプターの解析

ヒト造血幹細胞移植後、66日目のマウス脾臓中ではマウス白血球を上回るヒトCD4陽性白血球が検出された(図1A)。そのヒト細胞のほとんどはB細胞であり、T細胞はわずかであった。しかし移植後4ヶ月以降はT細胞が増加し、5-7ヶ月後にはB細胞の割合を上回った(図1B)。

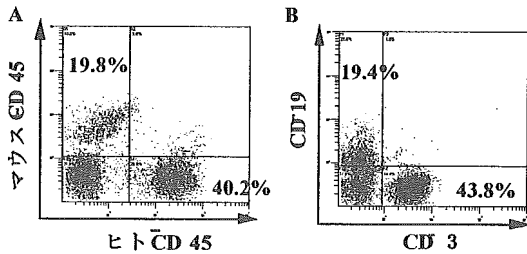


図1.A 移植後66日目のマウス脾臓解析

図1.B 移植後215日目のマウス脾臓解析

ヒト造血幹細胞移植後134日目に脾臓、骨髄におけるHIV-1感染に重要なCD4およびコレセプターの発現を解析した。脾臓中のCD4陽性T細胞のうち、約40%がT細胞指向性のコレセプターCXCR4陽性、約30%がマクロファージ指向性HIV-1のコレセプターCCR5陽性であった(図2.A,B)。CD14陽性単球はCD4弱陽性であり、すべてにCCR5の発現が認められた(図2.B)。骨髄では、CD3陽性T細胞、CD14陽性単球の割合がどちらも1%以下であったが、CD4/CXCR4、CD4/CCR5共陽性の細胞がともに4%程度にみられた(図2.C,D)。移植後139日目のマウス胸腺を解析したところ、CD4陽性T細胞のうち約10%がCXCR4陽性であり、その発現強度は脾臓に比べて高かった(図2.E)。一方、CCR5陽性のT細胞はわずかであった(図2.F)。

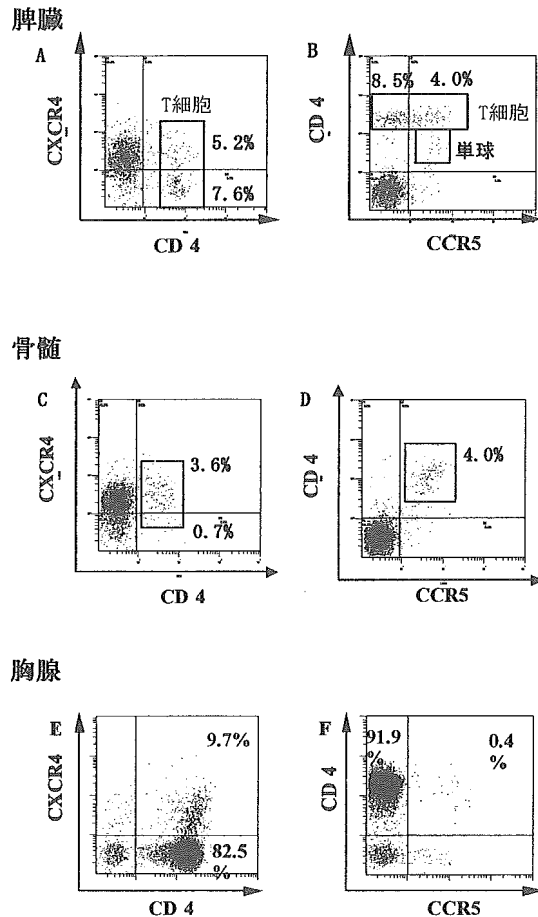


図2.A, B 移植後134日目のマウス脾臓解析

図2.C, D 移植後134日目のマウス骨髄解析

図2.E, F 移植後139日目のマウス胸腺解析

以上のことから、ヒト造血幹細胞移植NOGマウスは、T細胞指向性とマクロファージ指向性HIV-1の両方の感染モデルになりうることが示唆された。

7. ヒトマクロファージ、樹状細胞(DC)、濾胞樹状細胞(FDC)の組織解析

ヒト造血幹細胞移植後123日目のマウス脾臓中のマクロファージ、DC、FDCの存在を組織免疫染色により解析した。マクロファージ、DCは共にHIV-1に対し感染感受性を示すだけでなく、抗原提示に際してT細胞へのHIV-1感染を増大させることで知られている。またFDCは、HIV-1を細胞表面上に大量に捕捉、安定に保持し、T細胞への感染をサポートすることが知られている。免疫染色の結果、ヒトCD45陽性細胞は、脾臓中で集団構造(リンパ濾胞様構造)として観察された(図3.A)。この構造中はT細胞とB細胞が混在していた。CD68陽性マクロファ

ージは、そのリンパ濾胞様構造を含む脾臓全体に点在してみられ (図 3. B)、CD205 陽性 DC は、リンパ濾胞様構造中でクラスターとして存在した (図 3. C)。一方、ヒト FDC マーカーである DRC-1 で染色される細胞は観察されなかったが、リンパ濾胞様構造にマウス FDC マーカーである FDC-M1 で染色される網目状の構造が観察された (図 3. D)。

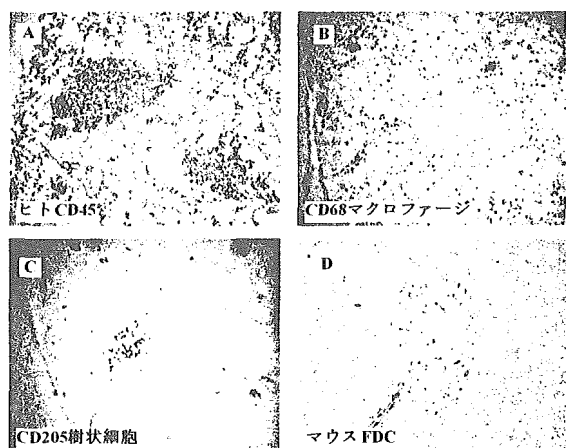


図 3. 移植後 132 日目のマウス脾臓組織解析

以上のことから、ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスは、マクロファージ、DC、FDC を介した HIV-1 感染経路を再現できる可能性が示唆された。

8. HIV-1 感染実験

ヒト造血幹細胞移植後 102~132 日目のマウス 16 匹に対し、SHIV661 (T 細胞指向性) および GFP を導入した HIV-1JRCSF (マクロファージ指向性) をそれぞれ 8 匹ずつ尾静脈より投与した。投与後 18 および 42 日目の SHIV 投与マウス群で脾臓 T 細胞の CD4/CD8 の割合を解析したところ、SHIV 非感染のコントロールマウスに比べてやや CD4 割合の減少がみられたものの、劇的な変化は起こらなかった (表 1)。

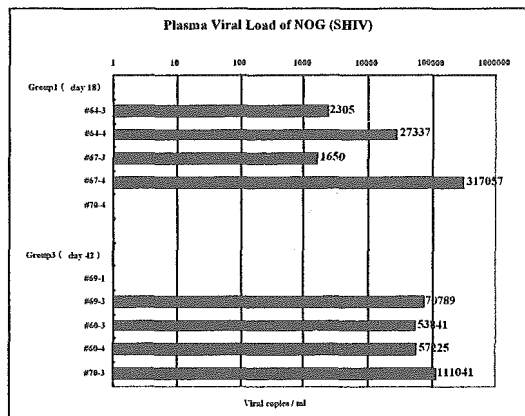
	control	SHIV 投与群				
	#64-3	#64-4	#67-3	#67-4	#70-4	
18日目	4.4	2.0	1.1	1.5	2.5	
	#69-1	#69-3	#70-3	#60-2-3	#60-2-4	
42日目	0.8	0.3	1.3	0.3	0.3	

表 1. SHIV 投与マウス脾臓の CD4/CD8 解析

GFP 導入 HIV-1JRCSF 投与マウス群でフローサイトメーターによる感染細胞の特定を試みたが、特異的蛍光はみられず、感染細胞の特定はできなかった。一方で、プラズマ中の HIV-1 コピー数を測定した結果、SHIV 投与後 18 日目のマウスから $1.6 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^5$ copies / ml、42 日目のマウスからは 5.4×10^4

$\sim 1.1 \times 10^5$ copies / ml の HIV-1 が検出された (表 2A)。HIV-1JRCSF 投与後 33 日目のマウスでは、 $1.6 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^5$ copies / ml、43 日目のマウスからは $2.0 \times 10^5 \sim 4.7 \times 10^5$ copies / ml の HIV-1 が検出された (表 2B)。

A



B

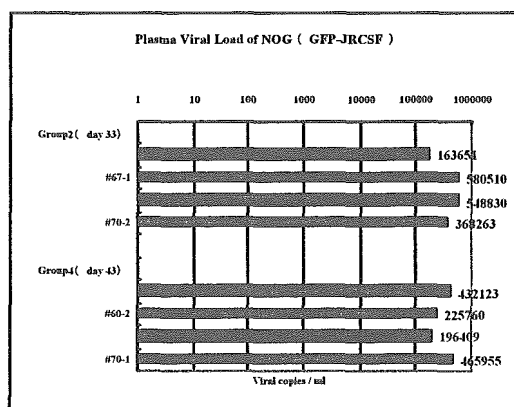


表 2. SHIV 投与マウス群 (A) と HIVJRCSF 投与マウス群 (B) のプラズマ HIV-1 コピー数

このことから、ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスは、T 細胞指向性およびマクロファージ指向性両方の HIV-1 に感染することが示された。

感染したマウスの脾臓、リンパ節を抗 P24 抗体で免疫染色したところ、強く染色される細胞が検出された (図 4)。

これらの細胞に HIV-1 が感染していると考えられるが、その細胞の特定は現在のところできていない。また、本研究のキーポイントである FDC を介した HIV-1 感染についても、FDC 上に HIV-1 が捕捉されているのかどうかを現在電子顕微鏡を用いて解析中である。

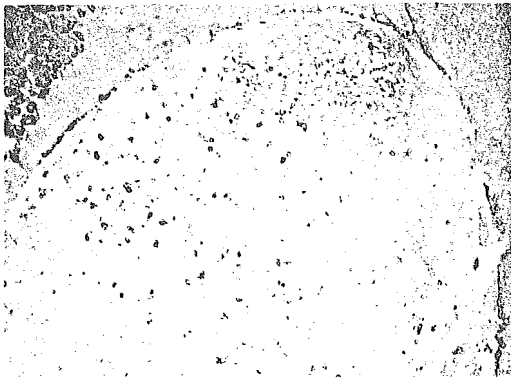


図 4. HIV-1 JRCSF 感染マウスのリンパ節細胞が検出された

9. FDC 様細胞株を用いたモノクロナル抗体の作成

FDC と特異的に反応する抗体を産生する hybridoma を作成した。現在、得られた 50 種類の抗体を用いて FDC 様細胞株の HIV-1 感染増強の抑制効果について検討を行っている。その中のいくつかで FDCLC の CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 感染増強効果を 50% 程度抑制する活性化であった。CD209L の中和による抑制効果は 30% 程度であり、今後抗体産生細胞のクローニングと産生される抗体が認識するエピトープの探索を行う予定である。

D. 考察

ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスでは各種のヒト血球細胞が分化するため、HIV-1、EBV、CMV など血球系の細胞に感染するヒトウイルスの感染モデル動物として有望である。今回は、HIV-1 感染モデル作製の可能性を検討するため、臍帯血幹細胞移植マウスにおいて、HIV-1 レセプターおよびコレセプター発現細胞を検索した。さらに HIV-1 感染の温床がリンパ濾胞にあることをふまえ、組織学的にリンパ濾胞が構築されるか否か、その構成細胞は正常のものと同じものか否かについて検討した。

予備実験として NOG マウスにヒト PBMNC, CBMNC の移入実験も試みたが、胸腺やリンパ節の出現は全く認められず、また組織学的には脾臓にヒト CD45+ 細胞の小集簇が多数、散在性に認められたものの、リンパ濾胞は出現しなかった。本研究ではヒト臍帯血より分離した造血幹細胞を NOG マウスに移植し、リンパ濾胞を備えたヒト型 SCID マウスの作成実験を行った。移植後したマウスの脾臓にはヒト CD45+

の集積塊を認め、濾胞様構造を呈していた。初期のうちにはそれらの大部分は IgM+B 細胞で、その代表的サイトカイン LT や TNF によって、潜在的に存在したマウス FDC 前駆細胞が FDC に分化して、FDC-M1 陽性のマウス FDC の出現が認められた。しかしその分布は正常マウス C57BL/N や BALB/C のそれに比し、分布が疎であり、マウス Fc や補体レセプターは認められず、免疫複合体の捕捉機能なども確認できず、マウス FDC は機能的にも十分とはいえない。明、暗調部の極性、被殻の区別が十分に明確でなく、抗原特異的免疫グロブリンのクラススイッチ、親和性の成熟などはさらに検討を要する。

HIV-1 の感染実験の目的を、リンパ濾胞の外での DC を中心とした T 細胞やマクロファージ Mφなどを介する急性感染の阻止に限定する限りでは、われわれの移植 NOG マウスの実験系はこれまでの hSCID 系を用いた実験よりも、あるいは単なる PBMNC あるいは CBMNC 全体を移入しただけの NOG をふくめた SCID マウスの ex vivo の感染実験よりも遥かに優れた HIV-1 感染モデルといえる。なぜなら、T 細胞、DC、NK 細胞 (CD56&CD57)、NKT 細胞 (CD161)、Mφ、肥満細胞を含めヒト型血液細胞がほぼ出そろっており、特に NOG 以外の SCID マウスでは期待が難しいとされる T 細胞が十分に増殖、分化を遂げていると見なされる。実際の感染実験では、感染後血清中の HIV-1 ゲノムのコピー数が $2 - 5 \times 10^5 / \text{ml}$ に上昇し、p24 の免疫染色陽性像がマクロファージ、リンパ球に認められた。とくには脾臓のリンパ濾胞様構造のなかのリンパ球に多数の陽性顆粒がみつめられ、さらにリンパ節ではマクロファージに傍皮質のリンパ球に加えて、一部のリンパ節のリンパ濾胞の中にも陽性細胞、網状の陽性像が認められた。マウス FDC との二重染色では、FDC の表面上にも陽性像が認められ、濾胞、胚中心内感染が確認された。従って我々の移植 NOG マウスは HIV-1 感染の濾胞外感染のみならず、濾胞内 HIV-1 感染のモデルとしての可能性も期待される。しかし、1) 特異抗体非依存性の HIV-1 ウイルスの FDC への捕捉を介した急性感染拡大 2) 特異抗体依存性の HIV-1 ウイルス免疫複合体の FDC への捕捉 3) それに続く感染の遷延化によるウイルスによる絶え間ない抗原刺激の荷重による FDC の疲弊化、機能不全そして follicle lysis による胚中心機能の廃絶による免疫不全状態にいたる HIV-1 感染に伴う一連の FDC を介する病態を分析し、それに基づいた感染阻止法を開発することが本研究の

目標であることから、ヒト FDC を持つ実験モデルが必要である。今後 1) 移植 NOG マウスに存在するマウス FDC をサイトカインなどの投与により成熟させる、2) FDC の起源は未だ不明であるが、その幹細胞を含む可能性のある Lin-CD34⁻ 幹細胞画分を、直接骨髄へ移入することによって、ヒト FDC を移入、組織化させる、3) 我々がすでに確立したヒト扁桃由来の FDC-like cell (FDCLC) の移入などにより、機能不十分なマウス FDC の機能を補う形でヒト FDC が機能することを目指した研究を行う予定である。

一方、FDCLC を免疫原として得たモノクローナル抗体は FDC を特異的に染色し、FDCLC の持つ抗 HIV-1 抗体非存在下での HIV-1 感染増強効果を阻害する活性がある。したがって、HIV-1 の初感染を阻害する効果が期待され、抗体医薬開発へ応用できる可能性があり、今後抗体が認識するエピトープの解析を行う予定である。

E. 結論

ヒト臍帯血より分離した造血幹細胞を NOG マウスに移植し、HIV-1 感染モデルマウスの作成を試みた。臍帯血由来 CD34 陽性細胞と臍帯血由来の活性化 CD4 陽性 T 細胞を投与したところ、ヒト血液細胞の生着と脾臓にリンパ濾胞様構造の構築が観察された。移植 NOG マウスの CD4 陽性細胞には、T 細胞指向性およびマクロファージ指向性両方のコレセプターが発現しており、T 細胞指向性およびマクロファージ指向性 HIV-1 に感受性だった。HIV-1 感染マウスのプラズマ中には持続的に安定したコピー数の HIV-1 が検出された。これは、ヒト造血幹細胞移植マウスが HIV-1 に感染した初めての例であり、新しい HIV-1 感染モデルとして利用できることを示している。造血幹細胞移植と活性化 CD4 陽性 T 細胞の投与によりリンパ濾胞様の構造ができたが、この構造はまだ不完全であり今後さらに完全なリンパ濾胞の構築を促す条件を検討する必要がある。我々が樹立した FDC 様細胞株の同時投与、造血幹細胞を移植する場所の変更、移植する細胞分画や活性化 CD4 陽性 T 細胞を投与する時期の見直しなどを行う計画である。また、今後、構築されたリンパ濾胞が HIV-1 感染に与える影響、HIV-1 に対する免疫反応に対する影響などを明らかにし、新規抗エイズ薬開発につなげていく必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

主任研究者：清水則夫

1. Yamaguchi T, Bamba K, Kitayama A, Kuroiwa Y, Ogawa K, Sekine T, Shimizu N., Yamamoto N. Long-term intravenous administration of activated autologous lymphocytes for cancer patients does not induce anti-nuclear antibody and rheumatoid factor. *Anticancer Res.* 24:2423-9, 2004.

2. Nagasawa M, Zhu Y, Isoda T, Tomizawa D, Itoh S, Kajiwara M, Morio T, Nonoyama S, Shimizu N, Mizutani S. Analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: platelet is a major source of serum sCD40L. *Eur J Haematol.* 74: 54-6, 2005.

分担研究者：山本直樹

1 Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. *Mol Biol Cell.* 2004 Dec;15(12):5197-5207.

2 Taruishi M, Terashima K, Dewan Z, Yamamoto N, Ikeda S, Kobayashi D, Eishi Y, Yamazaki M, Furusaka T, Sugimoto M, Ishii M, Kitamura K, Yamamoto N. Role of follicular dendritic cells in the early HIV-1 infection: in vitro model without specific antibody. *Microbiol Immunol.* 2004;48(9):693-702.

3 Someya K, Xin KQ, Matsuo K, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. A consecutive priming-boosting vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. *J Virol.* 2004 Sep;78(18):9842-9853.

4 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, 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.* 2005 Feb;79(3):1452-1462.

5 Matsuo K, Puthavathana P, Promkhatkaew D, Balachandra K, Ruxrungtham K, Hamano T, Sutthent R, Sittisombut N, Butraporn R, Sriwanthana B, Boonlong J, Izumi Y, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, Honda M. Chapter 38, Japan's collaboration with Thailand in the development of an HIV/AIDS vaccine. *AIDS in Asia*. Eds. Lu Y and Essex M. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.

6 Tamamura H, Hiramatsu K, Ueda S, Wang Z, Kusano S, Terakubo S, Trent JO, Peiper SC, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Stereoselective synthesis of [L-Arg, L/D-3-(2-naphthyl) alanine]-type (E)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudopeptide analogs of the CXCR4 antagonist FC131. *J Med Chem.*, 2005 Jan 27;48(2):380-391.

7 Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K. and Akira S.: Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature.* 2004;430:218-22.

8 Dewan MZ, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, Ito M, Yamaoka S, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N. Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID/ γ macnull mice. *Cancer Sci.* 2004 Jul;95(7):564-8.

分担研究者：寺嶋一夫

1. Dewan MZ, Terashima K, Ahmed S, Ohba K, Taruishi M, Yamamoto N. Mouse serum factor(s) down-modulate the CD4 and CXCR4 molecules on human T cells conferring resistance to HIV infection in NOG mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2005 Jan 15; [Epub ahead of print]

2. Taruishi M, Terashima K, Dewan Z, Yamamoto N, Ikeda S, Kobayashi D, Eishi Y, Yamazaki M, Furusaka T, Sugimoto M, Ishii M, Kitamura K, Yamamoto N. Role of follicular dendritic cells in the early HIV-1 infection: in vitro model

without specific antibody. *Microbiol Immunol.* 2004;48(9):693-702.

分担研究者：森尾友宏

1. Nagasawa M, Zhu Y, Isoda T, Tomizawa D, Itoh S, Kajiwara M, Morio T, Nonoyama S, Shimizu N, Mizutani S. Analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: platelet is a major source of serum sCD40L. *Eur J Haematol.* 74: 54-6, 2005.

2. Ohtsuka Y, Shimizu T, Nishizawa K, Ohtaki R, Someya T, Noguchi A, Shimura N, Kim H, Sugimoto H, Fujita H, Morio T, Yamashiro Y. Successful engraftment and decrease of cytomegalovirus load after cord blood stem cell transplantation in a patient with DiGeorge syndrome. *Eur J Pediatr.* 163: 747-748, 2004.

3. Chang JH, Ryang YS, Morio T, Lee SK, Chang EJ. *Trichomonas vaginalis* Inhibits Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages by Suppressing NF- κ B Activation. *Mol Cells.* 18: 177-185, 2004.

4. Chae WJ, Lee HK, Han JH, Kim SW, Bothwell AL, Morio T, Lee SK. Qualitatively differential regulation of T cell activation and apoptosis by T cell receptor α chain ITAMs and their tyrosine residues. *Int Immunol.* 16: 1225-1236, 2004.

5. Tomizawa D, Imai K, Ito S, Kajiwara M, Minegishi Y, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S, Mizutani S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for seven children with X-linked hyper-IgM syndrome: A single center experience. *Am. J. Hematol.* 76: 33-39, 2004.

6. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, Yata J, Mizutani S, Ochs HD, Nonoyama S. Clinical Course of Patients with WASP Gene Mutations. *Blood.* 103: 456-64, 2004.

7. Nagasawa M, Tomizawa D, Tsuji Y, Kajiwara M, Morio T, Nonoyama S, Asada M, Mizutani S. Pancytopenia presenting with monosomy 7 which disappeared after immunosuppressive therapy. *Leuk. Res.* 28: 315-9, 2004.

8. Shimasaki N, Mori T, Shimada H, Sugita M, Higuchi M, Mukai M, Morio T, Okamoto S. Epstein-Barr virus-associated posttransplant

lymphoproliferative disorder after a cord blood stem cell transplantation presenting with pulmonary nodules. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26: 124-7, 2004.

9. Nagasawa M. Itoh S. Sawada Y. Morio T. Nonoyama S. Mizutani S. Coagulopathy in a patient with X-linked hyper-IgM syndrome who developed Kaposi's sarcoma. *Am. J. Hematol.* 75: 116-7, 2004.

分担研究者：関根暉彬

1. T. Yamaguti, K. Bamba, A. Kitayama, Y. Kuroiwa, K. Yoshimatsu, T. Shimakawa, K. Ogawa, T. Sekine, N. Shimizu and K. Yamamoto. Long-term intravenous administration of activated autologous lymphocytes for cancer patients does not induce anti-nuclear antibody and rheumatoid factor. *Anti Cancer Research* 24:2434-2430 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし