

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

# 目 次

## 重点研究

### 第1分野

- KA11501 エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究 野崎智義 …… 1
- KA11502 HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（総合研究報告） 石坂幸人 …… 11
- KA11502 HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（平成17年度報告） 石坂幸人 …… 15

### 第2分野

#### 課題番号

- KA21503 HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究 梅田 衛 …… 21

### 第3分野

- KA31504 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 清水則夫 …… 27
- KA31505 HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬 高橋秀宗 …… 35

## 国際研究グラント

- SA14801 多剤耐性HIV-1 変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発 満屋裕明 …… 43
- SA14802 酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発 木曾良明 …… 49
- SA14803 HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析 横田恭子 …… 59
- SA14804 多剤耐性HIV-1 の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究 馬場昌範 …… 67
- SA14805 遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（総合研究報告） 加藤郁之進 …… 76
- SA14805 遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（平成17年度報告） 加藤郁之進 …… 81
- SA14806 HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（総合研究報告） 赤川清子 …… 89
- SA14806 HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（平成17年度報告） 赤川清子 …… 96
- SA14831 エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発 片野晴隆 …… 104

SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤正顯 …… 109
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口雅文 …… 118
SA24809	細胞性免疫誘導型prime/boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本直樹 …… 128
SA24810	CD4+細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森一泰 …… 137
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森亨 …… 144
SA34832	途上国における遺伝子多型に基づいたHIV治療法開発のための基盤整備	岡慎一 …… 148

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

### 第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

## 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 マウスに移植し、リンパ濾胞様構造を有するヒト型マウスを作製した。移植マウスは R5 および X4 指向性 HIV-1 に感受性で、従来不可能だったヒトと同じ慢性・全身性感染をマウスで再現することに初めて成功した。今後新規エイズ薬・ワクチン開発への応用研究を計画している。

### 分担研究者

国立感染症研究所 山本直樹、本多三男  
東京医科歯科大学 寺嶋一夫、森尾友宏  
株式会社リンフォテック 関根暉彬

### A. 研究目的

先進国ではヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1) 感染率が低下しているにも関わらず、我が国では感染が依然として拡大し続けており、今後大きな社会問題となると指摘されている。最近、感染患者に対する薬剤療法 (HAART 療法) の確立により、HIV-1 感染者のエイズ発症を遅延させることが可能になってきたが、薬剤耐性株の出現が多数報告されており、新たなワクチン・抗ウイルス薬剤の開発が急務となっている。しかし HIV-1 は通常の実験動物には感染せず、サルエイズウイルス (SIV) やサルとヒトのキメラウイルス (SHIV) を用いたサルへの感染実験がなされているものの、実験に使用するサルの入手や飼育は難しく、さらに SHIV は HIV-1 とは異なるため完全にヒトの病態を反映しない欠点がある。これまで HIV-1 の感染小動物モデルとして、ヒト胎児肝臓および胸腺を免疫不全マウス (SCID マウス) に移植した SCID-hu (Thy/Liv) やヒト末梢血細胞を移植した hu-PBL-SCID が確立しているが、それらのモデルマウスではヒト細胞の生着が限定され、ヒト免疫系の構築は見られない。そのため、長期の持続感染モデルにはなりえず、HIV-1 の感染動態の研究やワクチンの評価のモデルとしては不十分であった。

一方、リンパ濾胞樹状細胞 (FDC) を含むリンパ濾胞、胚中心は HIV-1 感染およびエイズ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。

我々は、最近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/ $\gamma_c^{null}$  マウス: NOG マウス) を使用すれば、ヒト T 細胞が発生し、さらに脾臓中にリンパ濾胞様構造が出現することを明らかにした。さらに、移植 NOG マウスへの HIV-1 感染に成功し、エイズモデルマウスとして使用できる可能性を示した (平成 16 年度の研究成果)。本年度の研究では、移植 NOG マウスを実用化するため、ヒト造血幹細胞が生着し、さらに慢性感染の実験に使用可能な長期間生存マウスを安定して作成する手法の解析 (清水)、マウス免疫系の解析 (森尾)、形成されるリンパ濾胞様構造の詳細な解析 (寺嶋)、マウスへの HIV-1 感染実験 (山本) をおこない、さらに将来このマウスを利用したエイズ治療薬やワクチン開発 (本多) およびエイズの免疫治療法の研究に使用するための基礎となる研究を行うことを目的として研究を行った。

### B. 研究方法

#### 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、MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi 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。

2 x 10<sup>4</sup>~1.5 x 10<sup>5</sup> 個の CD34 陽性造血幹細胞をマウスの尾静脈より投与した。

#### フローサイトメトリー解析

各組織の細胞を抗ヒト CD45, CD3, CD19, CD4, CD8 抗体および抗マウス CD45 (Beckman Coulter) 抗体で染色し、フローサイトメトリー (Beckman Coulter) で解析した。HIV-1 投与マウスについては、染色後 1%ホルマリンで固定し、解析を行った。B 細胞に関しては、hCD45/CD19/CD27/・, hCD45/CD19/CD27/・ の four color 解析を行って、B 細胞の分化段階を検討した。移植後約 5 ヶ月のマウスの大腿骨から骨髓を採取し、抗ヒト CD45、抗マウス CD45 抗体、以下の抗ヒト抗体 (CD34, CD13, CD33, CD11b, CD14, CD38, CD10, CD19, CD20, CD22, CD5, CD7, CD16, CD56) にて多重染色し、multi-dimensional flowcytometry 法にて解析した。

#### 細胞内サイトカイン測定

移植後約 5 ヶ月のマウス脾臓から単核球を分離し、Brefeldin A を加えて PMA (40ng/ml) + Ca ionophore (1・g/ml) で 5 時間刺激後、ヒト CD45 抗体、ヒト CD4 抗体にて表面染色、その後細胞膜を permeabilize して抗 IL-4 抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体にて細胞内染色を行い、ヒト CD4 細胞分画にゲーティングして Th1 (IFN- $\gamma$  産生)、Th2 (IL-4 産生) 群の算定を行った。

#### HIV-1 感染実験

移植後、122~150 日目のマウスに、HIV-1<sub>JRCSF</sub> (R5 指向性)、HIV-1<sub>MNp</sub> (X4 指向性) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) をそれぞれ 8 匹、11 匹、9 匹ずつ尾静脈より投与した (100ul/mouse)。投与後 2 ヶ月までに定期的に採血を行い、プラズマ中のウイルスコピー数を測定した。また、各ウイルス投与群を投与後 1 ヶ月目と 2 ヶ月目に 3~5 匹ずつ剖検し、プラズマ中のウイルスコピー数の測定と末梢血、脾臓、胸腺における CD4 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

#### 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 (PE Biosystems) で定量した。

#### ELISA

感染マウスにおける HIV-1 に対する特異抗体の産生を ELISA 法で検討した。抗原に recombinant HIV-1<sub>111B</sub> Env gp120、recombinant HIV-1<sub>MN</sub> Env gp120 および recombinant HIV-1<sub>111B</sub> Gag p24

(ImmunoDiagnostics) の 3 種類を用い、96 穴プレートにコーティングしたあと、1:20, 1:60, 1:180 で希釈したマウスの血漿を加え、室温で 1 時間反応させた。二次抗体としては A 1 Alkali phosphatase (AP) 標識 anti-human immunoglobulin (SIGMA) を用い、pNPP Solution (WAKO) で発色したあと、OD405nm の吸光度を測定した。

#### 免疫組織染色

非感染性の移植 NOG マウスの組織は tissue compound に包埋し、ドライアイスアセトンで凍結保存した。感染性の組織は 4% PFA または PLP で室温 2 時間固定したのち、30% Sucrose/PBS に置換したのち、同様に凍結保存した。それぞれを Cryostat で厚さ 3 $\mu$ m の切片を作成し、未固定のものはアセトンで室温、20 分固定した。非特異的結合の阻止にヤギ血清と反応させた後、モノクロナール抗体などの一次抗体を室温 2 時間ないし 4 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させた後、ビオチン標識ヤギ F(ab')<sub>2</sub> 二次抗体を用いて LSAB 法で、peroxidase は AEC、alkaline phosphatase は BCIP で発色した。またマウス FDC-M1 の染色には二次抗体として HRP マウス F(ab')<sub>2</sub> 抗ラット IgG 抗体を用いた間接法で染色した。なお内因性ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ活性の阻止をあらかじめ行った。また STF-固定液で固定後、脱水、パラフィンに包埋し、パラフィン切片を作成し、脱パラ後同様の免疫染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

1. 臍帯血バンクより研究用として供給された全ての臍帯血は、臍帯血の提供を受ける際に研究用としての使用の可能性に対する承諾を受けている。供給を受ける際には臍帯血提供者の匿名化が行われているため、供給を受ける側には提供者に関する情報は一切伝わらないように配慮されている。また、臍帯血の遺伝子解析などは行なわないため提供者に不利益は生じない。実験に使用した残りの臍帯血 (培養細胞) は予め決められた手順に従って確実に廃棄することになっている。
2. 研究を行うにあたり、東京臍帯血バンク、国立感染症研究所、東京医科歯大学倫理委員会の承認が得られている。
3. 動物実験に関して、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネプタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行った。



### C. 研究結果

#### 1. マウスへの造血幹細胞前の前処置法の検討

NOG マウスへのヒト造血幹細胞移植と HIV-1 感染に成功しているが、この実験系を創薬などへの応用に実用化するためには、安定して移植マウスを作出し、さらに実験期間中マウスを安定して生存させる必要がある。これまでに行なった実験では移植マウスを 200 日程度生存させ、HIV-1 の持続感染を再現することは可能だったが、マウスの生存日数にバラツキが大きく、安定した実験系ではなかった。この点を改善するために死亡したマウスを詳しく解析したところ、マウスの死因は消化管出血が多いことが明らかとなった。原因として GVHD や感染の他、放射線による障害の可能性も考えられたため、移植前の前処置として行なっている放射線照射 (300rad) の線量を変える実験を行なった。その結果、照射線量を落としてもヒト造血幹細胞の生着には大きな変化はなく、全く放射線照射による前処置なしでも、安定してヒト造血幹細胞が生着し、さらに安定して長期間生存させることが可能であることが示された (図 1)。したがって、以後の実験に際しては移植前の放射線照射は行なわなかった。

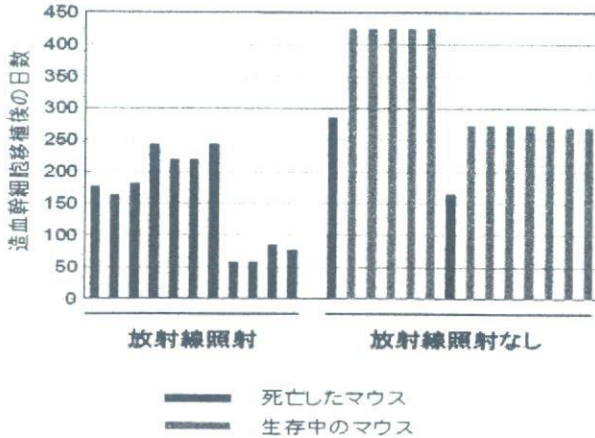


図 1 : マウスへ造血幹細胞移植を行なう際の放射線照射の有無と移植後の生存日数 (照射線量は 300rad)

#### 長期生存マウス中のヒト細胞の経時的解析

移植後 1~8 ヶ月における末梢血のヒト白血球 (CD45)、B 細胞 (CD19)、T 細胞 (CD3) の割合を解析した結果、移植後 2 ヶ月では発生したヒト細胞のほとんどが B 細胞であったが (図 1. A)、4 ヶ月以降にははっきりとした T 細胞の集団が確認されるようになり (図 2. B)、6 ヶ月後には B 細胞の割合を上回

った (図 2. C)。マウス 102 匹の解析結果では、ヒト白血球の割合は移植後 8 ヶ月まで安定していたが、ヒト T 細胞の割合は移植後 5 ヶ月後に急増するのがみられた。移植後 8 ヶ月のマウスの一部には、脱毛や赤皮、脾臓肥大など GVHD とと思われる症状が観察された。以上のことから、ヒト造血幹細胞移植後 4~5 ヶ月が HIV-1 投与に適した時期だと考えた。

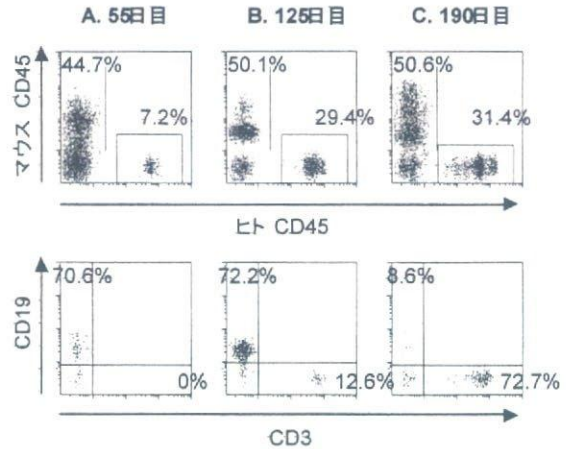


図 2. ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスで発生するヒト細胞の経時的解析

- A. 移植後 55 日目のマウス末梢血解析
- B. 移植後 125 日目のマウス末梢血解析
- C. 移植後 190 日目のマウス末梢血解析

#### HIV-1 感染後のプラズマ中ウイルスコピー数の変動

造血幹細胞移植後 122~150 日目のマウス 28 匹に対し、HIV-1 実験株 HIV-1<sub>JRCSF</sub> (R5 指向性) および HIV-1<sub>MNp</sub> (X4 指向性)、HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) を尾静脈より投与した。投与後 63 日目までのプラズマ中のウイルスコピー数を測定したところ、R5 指向性 HIV-1<sub>JRCSF</sub> 投与後 23 日目のマウスから  $1.2 \times 10^3 \sim 4.8 \times 10^4$  / ml のコピー数が検出され、投与後 2 ヶ月まで  $4.2 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^5$  / ml の安定したウイルスコピー数が検出された (図 3 A)。一方 X4 指向性 HIV-1<sub>MNp</sub> および HIV-1<sub>NL4-3</sub> 投与マウスのウイルスコピー数は、投与後 22 日目ではそれぞれ  $0 \sim 1.7 \times 10^6$  / ml (図 3 B) と  $3.2 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^7$  / ml (図 3 C) であり、個体によるばらつきがみられたが、投与後 2 ヶ月までにそれぞれ  $1.7 \times 10^4 \sim 4.4 \times 10^6$  / ml と  $5.5 \times 10^3 \sim 7.7 \times 10^6$  / ml のコピー数が検出されるようになった。このことから、ヒト造血幹移植 NOG マウスでは、R5 指向性および X4 指向性両方の HIV-1 において、2 ヶ月以上高い viremia が持続する慢性感染が成立していることが明らかとなった。

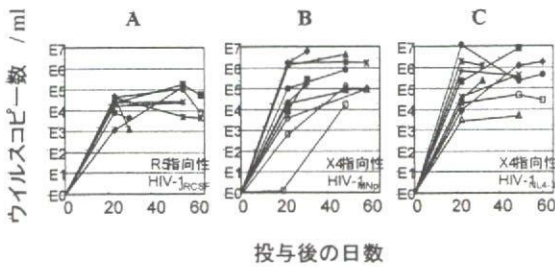


図3. R5、X4 指向性の HIV-1 コピー数の変動  
 A. R5 指向性 HIV-1<sub>JRCSF</sub> 投与マウス群  
 B. X4 指向性 HIV-1<sub>MN</sub> 投与マウス群  
 C. X4 指向性 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 投与マウス群

### 3. HIV-1 感染後の病態解析

感染マウスの病態を解析し、エイズ発症の可能性を検討した。図4Aは、HIV-1<sub>NL4-3</sub> 投与後 32 日目にプラズマ中に  $1.2 \times 10^6$  / ml のウイルスコピー数が検出されたマウスの解析結果を示している。このように高い viremia を示すマウスでは、同ドナー同時期の非感染コントロールマウス (図4B) に比べ、末梢血と脾臓中で CD4 陽性 T 細胞の割合の激減、胸腺内では CD4CD8 共陽性の未熟 T 細胞の消失がみられた。

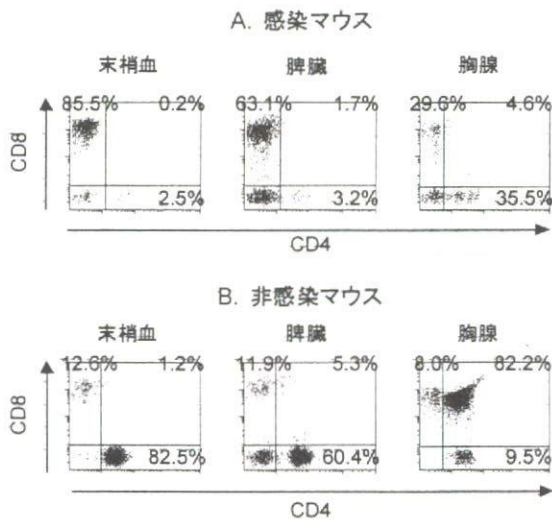


図4. HIV-1 感染マウスの CD4/CD8 のフローサイトメトリー解析

- A. HIV-1<sub>NL4-3</sub> 投与後 32 日目のマウス  
 B. 同ドナー同時期のコントロールマウス

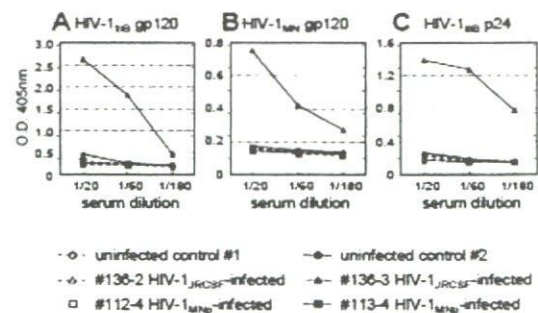
剖検した 23 匹の感染マウスについてまとめると、同時期の非感染マウスに比べて末梢血、脾臓における CD4/CD8 の割合、胸腺内での CD4CD8 共陽性細胞の割合に明らかな減少がみとめられた。これは、ヒ

トの末期エイズ患者の病態を反映したものであり、エイズ発症モデルとしてそのメカニズム解明の研究に利用できることを示している。個々のマウスに着目すると、病理学的には感染後 1 ヶ月でエイズ様の病態を示すマウスや 2 ヶ月を経てもなお顕著な症状が現れないマウスがみとめられた。現在、より長期の感染実験を継続し、その病態の解析を進めている。

### HIV-1 感染マウスにおけるリンパ組織中のプロウイルス量の解析と HIV-1 特異抗体の検出

ヒト造血幹細胞移植後 126~146 日目のマウス 9 匹に対し、HIV-1<sub>JRCSF</sub> (R5 指向性) および HIV-1<sub>MN</sub> (X4 指向性) を感染させ、プラズマ中のウイルスコピー数およびリンパ組織中のプロウイルス DNA コピー数を定量 PCR により解析した。低感染価の HIV-1<sub>JRCSF</sub> を投与した 4 匹中の 2 匹、低感染価の HIV-1<sub>MN</sub> を投与した 3 匹中 2 匹で感染が確認された。リンパ組織中のプロウイルス量の解析から、HIV-1<sub>JRCSF</sub> 感染マウスでは主に脾臓、骨髄中で、HIV-1<sub>MN</sub> 感染マウスでは主に脾臓、胸腺で感染が成立していることが明らかとなった。一方、高感染価 HIV-1<sub>JRCSF</sub> を投与した 2 匹では低感染価 HIV-1<sub>JRCSF</sub> よりも高い viremia が得られ、特に #136-3 マウスでは、脾臓、骨髄、胸腺で多くのプロウイルス量が検出された。これら 9 匹のマウスで、HIV-1 特異抗体の検出を試みたところ、#136-3 マウスにおいて HIV-1<sub>IIIb</sub> Env gp120、HIV-1<sub>MN</sub> Env gp120 および recombinant HIV-1<sub>IIIb</sub> Gag p24 に対して強い特異抗体が検出された (図6)。#136-3 マウスには高い viremia がみとめられており、体内での感染増大が HIV-1 に対する免疫反応を引き起こしている可能性が示唆された。現在、長期の感染実験を行っており、マウスの病態と免疫誘導の相関を解析中である。

### HIV-1 特異抗体の検出



## エイズ患者への免疫治療法の開発に関する研究

固相化抗 CD3 抗体+IL-2 刺激 (CD3-AT 法) により末期エイズ患者の末梢血 T 細胞を HIV-1 の増幅陰性の状態で活性化増幅できることをすでに報告している。この手法を用いたエイズ患者への免疫療法を行う基盤とするため、HIV-1 感染 NOG マウスを使用した免疫療法の実験系の構築を目指し、まず初めにヒト造血幹細胞が生着したマウスの末梢血 T 細胞を CD3-AT 法により活性化増幅し、マウスへ投与する研究を行った。移植マウスから眼底採血し、CD3-AT 法により活性化培養を行なったところ、ヒト T 細胞が選択的に増幅した。増幅細胞の TCR を含めた各リンパ球サブセットについて FACS 解析を行ったところ、増殖した細胞は増殖前に存在した全ての TCR レパトアがほぼ同様の比率で活性化増幅していることが確認され、ヒト末梢血を活性化培養した場合と比べて顕著な差異を認めなかった。

臍帯血より活性化・増幅した CD4 陽性 T 細胞を移植 NOG マウス投与したところ、皮膚・臓器ともに GVHD 様症状は観察されず、また死亡するマウスも認められなかった。

### 移植 NOG マウスの免疫組織学的解析

ヒト幹細胞移植前のマウスでは脾臓では白色髄は細胞性に乏しく、中心動脈を囲んでストローマ細胞と少数の類円形細胞の集簇巣が見られるに過ぎない。胸腺、腸間膜リンパ節、頸部リンパ節、腋窩リンパ節、パイエル板などは肉眼的に確認できない。ヒト幹細胞移入後 3-5 ヶ月では脾臓に濾胞様リンパ球の集積をみとめ、胸腺も一対の直径約 1mm の球体として、腸間膜根部などに 1-2 個の直径 2mm 位の球体、頸部には直径 1mm の球体が、腋窩には脂肪組織に包まれて直径 1-2mm の円盤状リンパ節が認められた。しかしながら Peyer 板は肉眼的ばかりか顕微鏡的にも全く認められなかった。

幹細胞移入後 5 ヶ月の脾臓で B 細胞の集積と共にリンパ濾胞が認められ、DRC-1 や CD21 陽性のヒト型の FDC はみとめられなかったが、モノクロナール抗体 FDC-M1 で染出されるマウス FDC が、濾胞遠位側に繊細なネットワークとして、そして、中心動脈の周皮細胞の陽性像と連続して、正常 C57BL マウスに於ける陽性像と比較するとより疎なネットワークとしてみとめられた。濾胞全体に IgM 陽性細胞が大部分を占め、ときにきわめてうすい IgD 陽性、bc1-2 陽性の小リンパ球よりなる比較を伴っていた。多くの濾胞において明調部、暗調部あるいは

germinoblasts, germinocytes の棲み分けは、あるいは暗調部における tingible body macrophage または macrophages の分布の確認は困難であったが、希に典型的ではないがそれらの存在を示唆する濾胞も認められた。なおこの様なリンパ濾胞は脾臓の横断面切片上、1-2 個をみとめるに過ぎない。また CD38 陽性像が濾胞外の赤色髄に分布する形質細胞細胞に加えて濾胞中心部にも繊細な陽性像を呈する大型細胞が散在性に認められた。

またヒトリンパ組織では FDC の分化の早期から最も特異的に良く検出出来るモノクロナール抗体とされる CNA. 42 陽性細胞は濾胞内に少数認められ、濾胞外の赤色髄にも散在性にみとめられ、正常ヒトリンパ組織に於ける分布と異なっていた。

さらに FDC の免疫複合体捕捉能を PAP ( peroxidase:anti-peroxidase rabbit IgG soluble immune complex) を *i. v.* して 3 時間ほどして脾臓を摘出し、脾臓のリンパ濾胞を peroxidase 反応して検討したが、これまでのところその捕捉能を確認できていない。

幹細胞移植後 8-10 ヶ月の脾臓リンパ濾胞の多くには多数の大型 T 細胞がみとめられ、時には濾胞と言うよりは大型 T 細胞の浸潤増殖巣と言った感じの結節を形成しており、それら細胞の増殖は濾胞に限らず、赤色髄にも多数の小集簇巣として散在に認められた。しかしながら、IgM を染色する事により、IgM 陽性の濾胞様構造が確認でき、狭小化した中心部には IgM 陽性リンパ球はむしろ疎で、被殻に相当する小リンパ球層が IgM 陽性である。

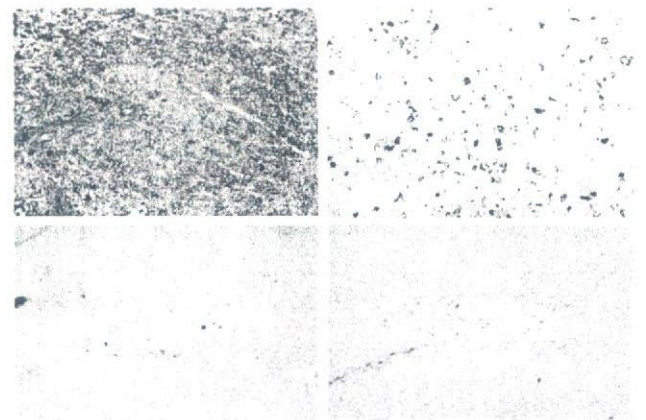


図 7. 幹細胞移植 8 ヶ月の脾臓リンパ濾胞

IgM+IgD<sup>low</sup> の被殻様構造が認められるが中心部に IgM+細胞が少なく、T 細胞が多くを占めている。CNA. 42 細胞も認められるが 濾胞の外にも認められる (左上: IgM, 右上: CNA. 42)。FDC-M1 で染出され

るマウス FDC の陽性像( 左下)は移植 6 ヶ月のもの(右下)に比し、著明に減少している。

同部は IgD も極めて繊細な陽性像を呈し、bcl-2 も陽性である。なお bcl-2 陽性細胞はこのリンパ濾胞被殻に相当する部位のみならず、濾胞外に散在するリンパ球の小集族巣も陽性であった。ヒト FDC に相当する DRC-1、CD21 陽性細胞は全く認められず、マウス FDC 特異的 FDC-M1 陽性像は移植後 4-5 ヶ月に見られた典型的なネットワークパターンとしては認められなかったが、痕跡的な陽性 network が認められ、中心動脈の周皮細胞ないし外膜に陽性像を呈する濾胞構造が少なくない。なお脾臓内には IgG 陽性細胞は希であり、IgA 陽性細胞も少ない、それに反してリンパ節のあるものでは 皮質、傍皮質、髄索の区別は明瞭ではないが、被膜よりにしばしば CD21、CNA42 陽性の大型不定形な細胞が少数ながら散在し、またあるリンパ節では門部に、ないし髄索に IgA、IgG 陽性細胞が散在しているものもみとめられた。

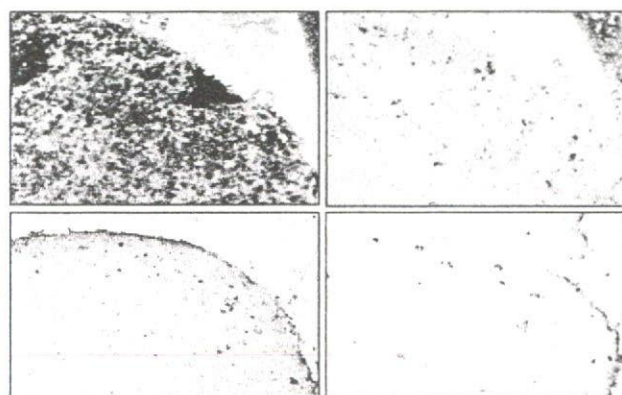


図 8. 幹細胞移植後 8 ヶ月のリンパ節：脾臓と同様に T 細胞(CD3)の増生と B 細胞(CD20)の減少が見られるが、一部のリンパ節では皮質に CD21 や CNA. 42 陽性細胞の局在が認められ、FDC の存在を示唆している。

#### D. 考察

##### 1. 放射線により前処置

これまで移植マウスを安定して長期間生存させることが難しかったが、今回の実験からその原因として移植前の前処置がその原因と考えられた。NOG マウスは SCID マウスがベースとなっている。リンパ球が分化し、機能を獲得する際には T 細胞受容体あるいは免疫グロブリン遺伝子が一度切断され、必要

な遺伝子の断片が繋ぎ直されること (V(D)J 再構成) が必要であるが、SCID マウスではこの繋ぎ直しの過程に不全があり、切れた DNA 断片が再結合できないため免疫機能が獲得できない。この SCID マウスは、放射線に高感受性で、放射線誘発 DNA 二本鎖切断の再結合にも欠陥がある。この SCID 変異は DNA 依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット (DNA-PKcs) をコードする遺伝子におきた突然変異であることが報告されており、移植前処置とし放射線照射を行なうと安定して長期間維持できない原因のひとつと考えられる。

##### 2. R5 および X4 指向性の HIV-1 感染モデル

HIV-1 感染患者では、感染初期に R5 指向性 HIV-1 が増殖し、エイズ発症時になると患者の約半数で X4 指向性 HIV-1 が有意になることが示されており、この R5 から X4 タイプの移行がエイズ発症を早める一つの要素であると考えられている。これまでのマウスモデルでは、SCID-hu (Thy/Liv) マウスは主に X4 指向性 HIV-1 に感染し、hu-PBL-SCID マウスは主に R5 指向性に高い感染感受性を示すことが知られている。ナイーブ T 細胞は CCR5 の発現が弱く、活性化 T 細胞は CCR5 を強発現する。このため、主に胸腺 T 細胞の HIV-1 感染に限定される SCID-hu (Thy/Liv) マウスでは X4 指向性 HIV-1 に感染し、GVH 反応により T 細胞の活性化が起こる hu-PBL-SCID マウスでは R5 指向性 HIV-1 に感受性が高くなると考えられる。移植 NOG マウスは、両方の HIV-1 に高い感受性を示し、末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の消失がみられた。このことは、エイズ発症に関わるそれぞれの HIV-1 が及ぼす影響を研究することにおいて有用である。

##### 3. 長期の抗 HIV-1 薬の評価モデル

現在抗 HIV-1 薬の評価に多用されている hu-PBL-SCID マウスは、HIV-1 の検出レベルが 2-3 週間をピークとして減少し、感染が持続しない欠点があった。本研究で用いた移植 NOG マウスは HIV-1 感染後 2 ヶ月以上末梢血中に高いコピー数が維持され、薬剤の長期評価に適している。

##### 4. エイズ発症メカニズムの解析モデル

HIV-1 感染患者におけるエイズ発症は、骨髄、胸腺など造血組織の破壊や follicle lysis に代表されるリンパ組織の破壊などさまざまな要因により引き起こされる。HIV-1 を感染した移植 NOG マウスは、末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の消失がみられ、エイズ発症メカニズムの解明に役

立つと期待される。

#### 5. 移植 NOG マウスの造血細胞系・免疫系再構築

移植 NOG マウスでは、1. 骨髄における造血の主体はヒト由来細胞であり、骨髄球系、単球系細胞の分化経路は正常である、2. 骨髄においてB細胞の主体はpreB細胞であり、成熟したB細胞が極めて少ない、3. 末梢組織においては、まずB細胞が主体となり、引き続いてT細胞が出現する、4. 主体となるB細胞はナイーブB細胞でありクラススイッチする能力は高くないことが予想される、5. B細胞はしかしIgMを分泌し、一部ではIgGも産生するようになる、6. CD4T細胞はTh1タイプがほとんどであり、抗体産生をヘルプするTh2タイプの細胞は少ない、などが明らかになりB細胞からの抗体産生を促進する方法を考案することが可能になった。例えば、ex vivoで誘導したTh2細胞を輸注することなどがその1つである。またHIV-1感染マウスではB細胞がナイーブからメモリータイプに移行している可能性もあり、今後の検討課題である。

#### 6. HIV-1 に対するワクチン開発

これまでに HIV-1 の感染小動物モデルとして用いられている、SCID-hu (Thy/Liv) マウスや hu-PBL-SCID マウスでは、ヒト細胞の生着や発生が限定され、ヒト免疫系が構築されないという欠点があった。一方、私たちが用いたヒト造血幹細胞移植 NOG では、免疫反応、とりわけB細胞を活性化し特異抗体産生を促進させるのに重要なリンパ濾胞様構造が脾臓中に構築されていることを突き止めており、このマウスが HIV-1 のワクチン開発に有用なモデルになりうる可能性を考えていた。

本研究において、HIV-1 に感染したマウスで特異抗体が検出され、このマウスが HIV-1 に対して免疫誘導能をもつことが示された。抗体産生がみられたマウスは高い viremia を示し、脾臓、骨髄、胸腺などリンパ組織中で高いプロウイルス量が検出されることから、体内での活発なウイルス産生が HIV-1 に対する免疫反応を引き起こしている可能性がある。より高感染価の HIV-1 を用いることで、安定したマウスへの感染、特異抗体産生が成立できると考えられる。抗体産生を促進するような CD4 T細胞の移入も1つの方策として考えられる。

#### 6. 濾胞樹状細胞 (FDC) の重要性と今後の課題

FDC 上に捕捉されたウイルス粒子は、HAART 療法でウイルスコピー数が検出されなくなった時点でも、且つ中和抗体の存在下で免疫複合体となっても、その感染性を長期にわたって維持していることが報告されており (Banki Z et al. 2005)、また血中抗体価があがらない時点でも、感染初期から FDC 上に

HIV-1 ウイルスは捕捉されることも最近明らかになった。その場合、遭遇した T 細胞などを感染させ、T 細胞単独に感染した場合の 10 倍以上のウイルス産生を惹起させる (Taruishi M et al. 2004)。このような FDC に捕捉されたウイルスは長期にわたり、胚中心を往来するリンパ球を感染させ、とくに遺伝子再構成の頻繁なリンパ球に感染した場合には、FDC は変異ウイルス発生の温床とも成りうる。今後作成したエイズモデルマウスを利用し、FDC のウイルス感染拡大に果たす役割を追求する必要がある。

FDC に関する今後の課題として、1) 5 ヶ月目前後には末梢血中では血液細胞の大部分を占めるヒト B 細胞の浸潤に伴って、NOG マウスの FDC 前駆細胞がマウス FDC に対するモノクロナール抗体に染出されるようになり、FDC ネットワークを形成していた。しかしその後 T 細胞の過増殖、B 細胞の減少により、マウス FDC の機能抗原分子の発現がおさえられ、わずかに中心動脈を中心にした血管周皮細胞に陽性像が認められるのみであった。

今後、免疫抑制剤を用いるなどの処理により過剰な T 細胞の増殖を抑制することが必要と考えられる。

2) 過剰なヒト型 T 細胞の濾胞内増殖がマウスの FDC に対する GVH 類似の反応の結果である可能性もあり、ヒト型 FDC の導入も試す必要がある。ヒト FDC を導入するには、その前駆細胞は CD34+細胞分画に含まれず CD34+, CD133+細胞分画などに含まれる可能性を検討する必要がある。また、我々が樹立したヒト FDC 様細胞 (FDCLC) を移入すれば、移植した部位に B 細胞、T 細胞などが集積してきて、新しいリンパ濾胞が形成される事が期待される。

#### 7. 移植 NOG マウスからの T 細胞培養と性状解析

エイズ患者の免疫機能の回復を図るため、患者の末梢血 T 細胞を活性化増幅して移入する治療法の開発を行ため、移植 NOG マウスの末梢血 T 細胞を活性化増幅後に投与して副作用や治療効果を検証する研究を計画している。今回の予備的検討により、移植マウスの末梢血は十分に活性化増幅可能であり、健康人の末梢血 T 細胞の培養結果と比較して、増幅率、T 細胞サブセット、レパトアなどに際立った相違は認めなかった。今後、HIV-1 感染移植 NOG マウスを使用した治療研究を行う計画である。

#### E. 結論

6～8 週令の NOG マウスに放射線による前処置なしにヒト造血幹細胞移植を移植することによりヒト型リンパ濾胞様構造を持つマウスを安定して作成することが可能になった。得られたマウスは R5 および X4 指向性両方の HIV-1 に感受性で、マウス体内でヒトと同じ HIV-1 の慢性・全身性感染を再現することに初めて成功した。感染マウスでは、CD4T 細胞の減少も確認され、エイズの発症モデルとなる可能性もある。さらに、感染マウスの一部には抗 HIV-1 抗体が検出され、今後の HIV-1 に対する新規薬剤やワクチン開発に対する応用が期待できる。

F. 健康危険情報      なし

G. 研究発表            論文発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

な し

---

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書  
国際研究グラント事業 研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社