

700500993 A

厚生労働科学研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の

予防治療効果評価系の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 勇悦

琉球大学大学院医学研究科

平成18 (2006) 年3月

目次

(I) 総括研究報告

田中勇悦：小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発

(II) 分担研究報告

- (1) 本多三男：SCID-hu 及び hu-PBL-SCID マウス系 HIV-1 中和抗体・ワクチンの抗 HIV-1 評価
- (2) 小柳義夫：HIV 感染による神経組織破壊のモデル動物の開発
- (3) 伊藤守：HIV-1 感染増殖と免疫誘導を可能にする新たな高度免疫不全マウスの開発
- (4) 小端哲二：抗 HIV-1 抗体産生促進に関する基盤研究
- (5) 西澤雅子：ワクチン感作樹状細胞免疫法および薬剤の HIV-1 臨床株、野生株に対する評価

(III) 研究成果の刊行に関する一覧表

(IV) 研究成果の刊行物・別刷

I . 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発

平成17年度主任研究報告書（総括）

主任研究者 琉球大学医学部 教授 田中勇悦

研究要旨：ヒト免疫担当細胞が生着したマウスである hu-PBL-SCID マウスをヒト個体モデル実験系として、エイズの新規ワクチンや予防治療薬剤の生体内効果を簡便かつ迅速に評価するための新たなシステムの研究開発を行なっている。2年目の平成17年度の班研究では、それまでに開発した評価系プロトタイプを改良するために以下の研究を行なった。（1）ヒト Th1 免疫応答誘導を可能とする樹状細胞(DC)の新たな分化誘導法について、HIV-1 免疫誘導能を検討した。（2）新たな高度免疫不全マウスとして、ヒト IL-4 を分泌するトランスジェニックマウスを開発した。（3）感染実験に用いる HIV-1 パネルの充実のため、種々の HIV-1 臨床株を分離した。（4）SCID-hu および hu-PBL-SCID マウス系で HIV-1 中和抗体・ワクチンの抗 HIV-1 誘導能について評価を行なった。（5）新規経口投与 CXCR4 アンタゴニストの評価を行なった。（6）HIV-1 中和抗体産生を促進する新規 B 細胞補助刺激法の可能性を *in vitro* の実験より理論的に探った。（7）HIV-1 感染による免疫ならびに神経組織破壊のモデル動物での再現を試みた。班会議ではこれらの研究成果を十分に討論した上で総括し、最終年度研究への基盤とした。

A. 研究目的

今日も HIV-1 の感染予防やエイズやエイズ関連疾患の治療を目的とするワクチンならびに抗 HIV-1 薬剤の開発には多くの研究者の力が注がれている。しかしながら、現時点でも有効なワクチンは開発されておらず、また臨床で広く使われている種々の抗 HIV-1 薬においては耐性ウイルスの出現や副作用など様々な問題が浮上してきた。エイズ医薬品等の開発において、ヒトへの応用の可能性が期待できる候補を絞る上で、それが実際に生体内でウイルスの増殖や病原性を抑制する効果を発揮するのかどうかを確認する動物感染実験が必要である。ヒト以外の霊長類を用いる実験系は人体に一番近い環境を提供すると言われているが、高いコストと動物の供給に難点があり、多数の検体の評価には不向きである。また、これらサル系の系においてサルエイズウイルス(SIV)がヒトに病原性をもつ HIV-1 とは性状が必ずしも同じではないため、得られるデータの応用性には制限がある。

このような背景の中で、ワクチンを含めた新規抗エイズウイルス活性を持つ新

規医薬品候補が、種々の臨床 HIV-1 株に対し感染予防ならびに治療効果をもつのかどうかをより簡便に評価できる小型実験動物モデルを開発することは、HIV-1 感染症克服の全体目標に大いに寄与する。その評価系では、野生ウイルスが感染し病原性を発揮することが望まれる。なぜなら、基礎研究においては、感染実験こそがエイズ医薬品の実効性について決定的なデータを導き出すからである。これらの条件を満たす動物モデルはヒトの免疫細胞群を移植した SCID マウス (hu-PBL-SCID および SCID-hu) である。特に hu-PBL-SCID マウスでは、私達が開発した独自の方法を用いることによって、マウス体内においてヒトの HIV-1 免疫応答を誘導することができる。また、抗 HIV-1 感染防御が期待される CXCR4 や CCR5 アンタゴニスト等の感染防御能の評価が可能である。さらにエイズ脳症モデルの作製も可能である。

この研究で開発される評価系を用いて得られる新たな知見をエイズ研究に広く役立てることにより、エイズ克服を目的としたわが国の新規エイズ医薬品の開

発に弾みがつくことを期待している。本年度の研究では現在の評価系をさらに改良することを目標とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

(1) SCID マウスにヒト末梢血単核球 (PBMC) を移植する hu-PBL-SCID マウス系で、コントロール抗原 (OVA や KLH) そして不活化 HIV-1 粒子で感作した自家樹状細胞でマウスを免疫することにより抗原特異的なヒトの免疫応答を誘導した（論文発表済み）。これまで一般に用いられている DC の培養方法に替えて、次の方法を用いた。つまり、種々の抗ケモカイン受容体抗体を用いて、プレート上で単球が発現するケモカイン受容体を架橋し、培養を行なった。この方法で得られた DC の免疫刺激性を *in vitro* でのサイトカイン産生能と *in vivo* での免疫誘導能の測定で検討した。また、さらに新たな DC 分化誘導の試みとして、IL-4 と IFN-beta を用いた早期（3日間）誘導方法も試した。不活化 HIV-1 で感作した DC を免疫する系では、中和抗体の誘導能も検討した。

(2) より高度な免疫細胞生着 SCID マウスを作製する試みとして、移植する材料としてヒト幹細胞を用い、マウス肝臓への移植を試み、その分化および生着性を FCM 等で解析した。

(3) CXCR4 アンタゴニストの評価では、hu-PBL-SCID マウスに新規経口投与可能なアンタゴニスト（クレハ）の HIV-1 感染阻害効果を hu-PBL-SCID マウスで試した。X4 HIV-1 感染促進のためには、1 ug/animal の IL-4 を 2 回投与した。感染後一週間後にマウス腹腔内の細胞に感染したウイルス量を、細胞培養後の p24 測定方法で推定した。

(4) さらに新規 SCID マウス作製においてはヒト IL-4 遺伝子導入を目指し、IL-4 産生 SCID マウスの新規開発を試みた。

(5) エイズ脳症の動物モデル作製を目的に *in vitro* での脳組織培養を試み、HIV-1 感染マクロファージ培養上清中の脳障害活性を組織染色方法で検討した

(6) HIV-1 に対する B 細胞免疫応答を促進する方法の可能性を BAFF 受容体に求め、*in vitro* の研究から始めた。

（これらの実験は、各施設の動物実験倫理委員会・感染実験安全委員会等で審査され許可されている。また、PBMC の供与にあたってはドナーに十分な実験の説明を行い、承諾を得ている。）

研究結果

(1) 昨年度に報告したように、新たな DC の誘導方法として特異的な単クローン抗体を用いて単球のケモカイン受容体を架橋することにより、IL-4 の添加のみで単球が Th1 誘導性 DC に分化する。この DC は IFN-beta で成熟させると同時に不活化 HIV-1 で感作することにより、*in vivo* で免疫刺激活性をもつ DC となり、実際にこの DC は HIV-1 抑制性 CD4 因子を誘導した。つまりこの免疫 hu-PBL-SCID マウスは R5 HIV-1 感染に耐性となる。しかし、このマウスは X4 HIV-1 感染には感受性を持つ。そこで DC-HIV-1 免疫 hu-PBL-SCID マウスに CXCR4 アンタゴニストを投与したところ、R5 HIV-1 にも X4 HIV-1 にも感染を免れる状態が誘導できた。機序は、CD4 因子による R5 HIV-1 感染阻止、CXCR4 アンタゴニストによる X4 HIV-1 の感染阻止であると示唆される。今回使用した CXCR4 アンタゴニストは経口投与不可の T-1637 である。経口投与可能新規 CXCR4 アンタゴニストとして KRH-3955 と KRH-3140 が開発されている（クレハ：特許制限のため構造式は非公開）。そこでクレハの協力をうけ、これら両者の X4 HIV-1 感染抑制効果を hu-PBL-SCID で証明した。（本成果は、エイズ関連の国際学会 CROI 2006 で late breaker 口頭発表に選ばれた）。

一方、研究段階ではあるが、単球を IL-4 と IFN-beta で培養することにより短期間で抑制的機能を持った DC を誘導できることを見つけている。さらに詳細な培養条件を検討している。

(2) 上述したように hu-PBL-SCID マウスで X4 HIV-1 の感染増殖を促進する方法としてヒト IL-4 投与がある。そこで分担研究者の伊藤は高度免疫不全マウスとして、ヒト IL-4 を分泌するトランスジェニックマウスの開発を手がけた。そして現在まで、マウス血中に数 ng/ml の IL-4 を

持続的に産生する SCID マウスを作製した。その感染実験はこれからである。

(3) このように hu-PBL-SCID マウスでは X4 HIV-1 の感染増殖が弱い、他の臨床株を用いれば現在使用している X4HIV-1 株 (IIIB、NL4-3) よりもより高い感染増殖を期待できるかもしれない。そこで分担研究者の本多は MNp 株がこの系でよく増殖することを明らかにした。

(4) 今後、さらに HIV-1 パネルの充実が求められることから、分担研究者の西澤は、種々の HIV-1 臨床株の分離に着手している。

(5) 分担研究者の本多と西澤らは、免疫誘導される Th1 ヘルパー免疫応答の誘導に加えて、hu-PBL-SCID マウス系で HIV-1 中和抗体誘導についても研究を進めている。今後、これを成功させるには env 抗原の選択と Th2 型免疫応答誘導性 DC の培養方法の確立が必須である。

(6) 中和抗体を誘導する方法として、中和抗体を産生する B 細胞を直接刺激する方法が考えられることから、分担研究者の小端は、B 細胞が発現する BAFF 受容体の刺激を考案し、in vitro ではあるが、ヒト B 細胞の刺激を可能とする新規のアゴニスト抗体の作製に成功した。In vivo での効果の評価を計画している。

(7) 分担研究者の小柳は、HIV-1 感染による神経組織破壊のモデル動物を作製する目的で脳の器官培養法を確立し、HIV-1 感染マクロファージが神経細胞を障害する因子を産生する事実をつかんでいる。

D. 考察

hu-PBL-SCID マウスを HIV-1 感染症のモデルとして広く応用できるような系にするために、様々な試行錯誤と検証を行なっている。この系でワクチンによる T 細胞免疫応答と B 細胞免疫応答の誘導能を検討するには、同じドナーの単球から分化培養した DC の共移植が不可欠である。最近までの DC の研究により、DC の機能の違いがどのタイプのヘルパー T 細胞を誘導するかを決定することが明らかにされているので、hu-PBL-SCID マウスの系でも用いる DC の性状が最終の免疫応答を決めることが示唆される。このことは、つま

り、ワクチン開発に、DC との関連において行なわなければならないことを暗示する。免疫応答の最適化のため、多角的な DC の培養法の検討が必要である。昨年度より、ケモカイン受容体の架橋と IL-4 の添加により GM-CSF の刺激を介さない機能的 DC の誘導方法を新たに開発した。この DC は、自家 T 細胞からの IFN-gamma 産生をより強く誘導できるので、T 細胞誘導を主目的とするワクチン候補の評価に応用できると考えている。他方、現在開発中の IL-4/IFN-beta を用いる短期 DC 誘導方法の有用性にも期待を持っている。

抗体免疫応答の誘導については未だ中和抗体の誘導まで到達していない。Th2 誘導型 DC の培養方法の確立が必須である。これに関しては、DC 上に OX40L を強く発現させる方法を検討中である。また、BAFF 受容体を刺激するアゴニスト抗体の補助的投与についても研究を進めたい。

今回の研究成果の一つとして、経口投与可能な CXCR4 アンタゴニストの評価を行ない、国際的に注目を集めた (クレハとの共同研究、CROI 2006 で発表)。この研究を成功させたキーポイントは、ヒト IL-4 の共投与である。なぜなら、IL-4 は X4 HIV-1 受容体である CXCR4 の発現を促進し、hu-PBL-SCID マウスに移植されたヒト CD4+T 細胞の CXCR4 の down-modulation を抑制するからである。この方法を一般化するには、しかしながら高価な IL-4 を購入する必要がある。そこで IL-4 を定常的に産生する SCID マウスの作製にとりかかった。現在、目的とする IL-4 産生マウスの作出に成功しているので、その実用性を検証する段階に来ている。

IL-4 を共投与しなくても X4 HIV-1 の感染実験を可能にする他の方法として、少ない CXCR4 を足場に感染する HIV-1 株を現在のストックからあるいは野生株からスクリーニングして用いる方法がある。今回、MNp 株が hu-PBL-SCID マウスでよく増殖したことは、この株が目的とする株である可能性がある。しかし、CCR5 や他のケモカイン受容体の使用能と CXCR4 アンタゴニストへの感受性を明らかにする必要がある。

DC-HIV 免疫で誘導される HIV-1 抑制因子として、我々は CD4 因子を見つけた。

この因子は、R5 HIV-1 の感染を抑制する。しかし、X4 HIV-1 の感染は抑制できない。そこで、DC 免疫と CXCR4 アンタゴニストの併用の相加効果について試したところ、予想通り hu-PBL-SCID マウスにおいて R5 HIV-1 と X4 HIV-1 の感染が制御された。今後、R5 および X4 HIV-1 の重感染における種々の CXCR4 アンタゴニストのスクリーニングも可能となった。

HIV-1 脳症をシミュレーションするモデルとなる可能性が高いのは分担研究者の小柳らが開発した方法で修飾した hu-PBL-SCID マウスである。この前実験として脳の器官培養系を立ち上げた。この系では、R5 HIV-1 感染ヒトマクロファージの培養上清に神経細胞障害因子が確認され、in vivo での追試とその制御の開発が期待される。

E. 結論

ヒト免疫細胞移植マウスにおいて、ワクチンの評価を可能とする樹状細胞免疫方法を確認し、さらに種々のケモカイン受容体アンタゴニスト等の単体あるいは DC 免疫法との併用の効果を検証することが可能となった。班研究を始めて 2 年が経過したが、班員がそれぞれに独創的発想と専門技術をもって研究を進めてきており、最終的な班全体の成果には大きな期待をもっている。研究目的から見た達成度は、小型動物を用いたエイズの新規ワクチンや薬剤の評価を可能にする新たなシステム開発となる基盤の原形はすでにできており、そのさらなる最適化と応用への検証の段階にきた。今後、ワクチンを感じた樹状細胞免疫を介する免疫応答の誘導方法と中和抗体の誘導方法の改良、マウスの遺伝的改変により応用範囲の広いマウスの作出、HIV-1 感染増殖環境の人為的最適化、免疫不全に付随する脳症モデルの作出をも含め残された期間で目的達成にむけて努力を続けてゆきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(田中)

(1) Nimura F, Zhang L, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N and Tanaka Y.: Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent DC's. *Exp. Biol. Med.* 2006, in press.

(本多)

(1) Someya K., Ami Y., Nakasone T., Izumi Y., Matsuo K., Horibata S., Xin K. Q., Yamamoto H., Okuda K., Yamamoto N., and Honda M.: Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J. Immunol.* 176:1784-1795, 2006.

(2) Kawahara M., Matsuo K., and Honda M.: Intradermal and oral immunization with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin. Immunol.* in press, 2006.

(3) Takizawa M., Chiba J., Haga S., Asano T., Yamazaki T., Yamamoto N., and Honda M.: Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J. Immunol. Methods* in press, 2006.

(小柳)

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

(2) Miura Y., and Koyanagi Y.: Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol.* 15: 169-178, 2005.

(3) 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. *Hum Reprod.* 20:1477-1484, 2005.
- (4) Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., Koyanagi Y., Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 4:325-330, 2005.
- (5) Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N., and Kawai G.: Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers. *J. Biochem.*, 138:583-592, 2005.
- (6) Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T.: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 106:3449-3456, 2005.
- (伊藤)
- (1) Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M., Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 107 (5): 1878-1887, 2006.
- (2) Dewan MZ, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M., Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* 107 (2): 716-724, 2006.
- (小端)
- (1) Nakamura, N., H. Hase, D. Sakurai, S. Yoshida, M. Abe, N. Tsukada, J. Takizawa, S. Aoki, M. Kojima, S. Nakamura and T. Kobata. Expression of BAFF-R (BR3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody. *Virchows Arch.* 447: 53-60, 2005.
- (西澤)
- (1) Yan H, Mizutani TC, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antivir Chem Chemother.* 16:363-73, 2005
2. 国際学会発表
- (1) Tanaka Y., Okuma K, Tanak R, Kumakura S, Shimoyamada A, Hirose K, Yanaka M, Murakami T, and Yamamoto N. Development of Novel Orally Bioavailable CXCR4 Antagonists, KRH-3955 and KRH-3140: Binding Specificity, Pharmacokinetics, and Anti-HIV-1 Activity in vivo /in vitro. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, Feb. 2006. (アブストラクトは次ページ)
- (2) Myint L, Ueda T, Nishizawa M. Shiino T, Matsuda M, and Sugiura W. Virological and Statistical Analyses of Interference Between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, Feb. 2006.

49LB

Development of Novel Orally Bioavailable CXCR4 Antagonists, KRH-3955 and KRH-3140: Binding Specificity, Pharmacokinetics and Anti-HIV-1 Activity *in vivo* and *in vitro*

Yuetsu Tanaka¹, R. Okuma¹, R. Tanaka¹, S. Kumakura², A. Shimoyamada³, K. Hirose¹, M. Yanaka², T. Murakami³, and N. Yamamoto¹
¹Univ of the Ryukyus, Okinawa, Japan; ²Kureha Corp Tokyo, Japan; and ³Natl Inst of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

50LB

Execution of a High Throughput HIV-1 Replication Screen and the Identification of a Novel Small Molecule Inhibitor that Targets

Background: In the late stage of HIV-1 infection, HIV-1 with phenotype of CXCR4 co-receptor tropism has been linked to a rapid progression to AIDS. Thus, an ART in combination with a CXCR4 antagonist that can interfere with the X4 HIV-1 infection may be advantageous in preventing AIDS. In this study, we have generated 2 orally bioavailable CXCR4 antagonists, KRH-3955 and KRH-3140, that showed extremely long and normal remaining time *in vivo*, respectively. Using a hu-PBL-SCID mouse model, we found that single oral administration with KRH-3955 or daily administration with KRH-3140 in drinking water was capable of protecting the animals from X4 HIV-1 infection.

Methods: Antagonist activity and specificity of the drugs were determined using various chemokine receptor-expressing cells and their ligands. The binding sites of the antagonists on CXCR4 were estimated using a library of anti-human CXCR4 monoclonal antibodies. Their pharmacokinetic properties were determined in rats by ARG. Preliminary *in vitro* anti-X4 HIV-1 activity was determined by using MT-4 cells and HIV-1_{89.6}. For *in vivo* study, C.B-17 SCID mice reconstituted with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used. KRH-3955 was administered by mouth, once (10 mg/kg), while KRH-3140 was administered daily by mouth in drinking water (15 to 20 mg/kg/day). The drug-treated hu-PBL-SCID mice were challenged with 5000 IU HIV-1_{89.6}/animal intraperitoneally. 1 day after PBMC reconstitution. After 7 days from infection, cells were obtained from peritoneal lavage and cultured *in vitro* in IL-2-containing medium for determination of HIV-1 infection by p24 ELISA.

Results: KRH-3955 and KRH-3140 specifically inhibited the binding of SDF-1 to CXCR4-expressing cells but not those of the other chemokines to their receptors. The binding sites of KRH-3955 and KRH-3140 were localized to first, second, and/or third, and first and/or second extracellular loops, respectively. EC₅₀ of KRH-3955 and KRH-3140 against X4 HIV-1 infection *in vitro* were 0.2 nM and 2.2 nM, respectively. The *in vivo* remaining time after oral administration of KRH-3955 was very long and that of KRH-3140 was normal. Single or daily administration of KRH-3955 and KRH-3140, respectively, efficiently protected hu-PBL-SCID mice from X4 HIV-1 infection.

Conclusions: KRH3955 and KRH-3140 are orally bioavailable CXCR4 antagonists with potent anti-X4 HIV-1 activities *in vivo*, indicating that these drugs may be desirable additives to an anti-HIV-1 therapy.

Background: All drugs currently approved to treat HIV-1 infection target 1 of 3 steps in the HIV-1 replication cycle. Given that viruses resistant to one drug of a particular class often exhibit cross-resistance to other drugs in the same class, therapeutic options for treatment-experienced patients are often limited. One way to address this problem is to identify HIV-1 inhibitors directed against new targets in the HIV-1 replication cycle. As part of an effort to search for inhibitors targeting new mechanisms, a high throughput HIV-1 full-replication screen (HIV Rep) was executed resulting in the identification of a novel HIV-1

主任研究者田中ら : 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, Feb. 2006.

II. 分担研究報告

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

分担研究者 本多三男 エイズ研究センター第一研究グループ グループ長

研究要旨：小動物を用いた HIV/AIDS モデル動物の開発を行い、ワクチンなどの抗エイズ物質に応用する。現在この NOD scid-hu Thy/Liv マウスモデルにおける naïve 細胞の長期にわたる産生能より困難であった初期免疫反応の誘導を検討中である。現在のヒト組織移植動物モデルの開発は、期待されるサブプロジェクトが始まっているが、その完成には数年を要すると予測されるので、現状で一時的なアッセイ系として組換えワクシニア HIV 野生株をチャレンジウイルスとして用いたワクチン評価系の確立を行い、その効果はサルエイズモデルの効果と極めて類似していることから野生型組換えワクシニアを用いたマウスワクチン効果評価系を確立した。この系は同じレジメンで行われたサルエイズモデルにおける防御免疫の誘導と関連していることからマウスワクチン効果評価系の有用性を明らかにした。

協力研究者

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

A. 研究目的

マウスモデルの欠点である長期におけるプライマリーレスポンスの誘導を可能にする SCID マウス系を確立しワクチン評価モデルとして使用可能かどうかを検討する。さらに、モルモットはその遺伝的な背景の解析が進むにつれて種々の病原体に対する反応がヒトに近いことが明らかにされている。したがって、これまで不明な点が多かったモルモットの免疫解析法をマウスと比較して確立し、マウス・モルモットの小動物エイズモデルとしての有効性を明らかにする。

B. 研究方法

能動免疫による中和抗体の産生とその野生株ウイルスに対する防御効果の評価が動物モデルに期待されているが、現在までのところサルでは不可能であるのでマウスを用いた naïve T 細胞モデルの確立とプライマリーレスポンスの可能なマウスモデルの確立が次の重要な課題となる。本研究では

- 1) NOD scid マウスへの正常ヒト PBMC の腹腔移植やヒト胎児胸腺・肝臓の腎被膜下移植により、ヒトリンパ組織の移植が成立したマウスを作製する。
- 2) 移植マウスに HIV 野生株 HIV-1 MNp あるいは JR-CSF を Challenge し、感染モデルを構築する。
- 3) ヒト胎児胸腺・肝臓の腎被膜下へ移植することで得られる NOD scid-hu Thy/Liv マウスのヒト胸腺、末梢リンパ球の HIV 感染時における変化を PBL 移

植マウスとの比較を中心に解析し、野生株ウイルスの特性を明らかにする。さらには長期感染及び免疫モデルとしての有効性について検討を行う。

- 4) マウスとサルエイズモデルとの T 細胞免疫パラメーターの比較を行い、マウスの有用性を検討する。

(倫理面への配慮)

HIV を用いた病原性ウイルス検討のための動物モデルの検体はすべて P3 レベルの病原体として扱い、個々の研究所、大学、病院のバイオハザード関連委員会において承認を得ている。動物実験に関しても、各機関での動物実験委員会の規定に従い、実験計画の許可を取って行っている。組換え DNA 実験に関しては、組換え DNA 実験指針に従い、各機関の委員会の許可を得て行っている。ヒトサンプルに関しては個々の病院での倫理委員会の承認、患者の同意を得て行われている。

C. 研究結果

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

の割合もヒト末梢血同様一定であった。

- 3) ヒト胎児肝臓移植 3 ヶ月以降に末梢血中にヒト細胞が確認されたマウスについては野生株である HIV-1 MNp をウイルス感染力価 1000TCID₅₀ での静注投与によりウイルス感染が成立し、移植組織、脾臓といった臓器からウイルスが分離された。また感染による CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の減少や、ヒト PBMC 移植マウスで見られた末梢 CD4⁺ T リンパ球の減少と末梢ウイルスコピー数の増加といった HIV 感染時に特徴的に起こる反応が見られた。また、感染マウスの各組織から HIV の proviral DNA が検出できた。
- 4) 末梢血中のヒト T リンパ球において X4-tropic ウイルスである MNp の感染により CXCR4⁺ CD4⁺ T リンパ球、naïve CD4⁺ T リンパ球がまず減少し、次いで CD4⁺ T 細胞自体が枯渇していった。
- 5) BALB/c マウスをワクチンで免疫し、野生型 HIV でチャレンジするマウスを用いた評価系と、サルエイズモデル評価系を免疫学的パラメータの点から比較検討し両者に相関があることから、マウスモデルの評価系がワクチンの評価に使えることを明らかにした。(Fig. 2, 3)
- 6) NOD SCID マウス-PBL 感染系を用いてヒト型中和抗体と抗ウイルス物質の in vivo 評価の有用性を明らかにした。

D. 考察

HIV の感染をコントロールできる感染モデル系は実質的にはヒトの組織を移植した NOD scid マウスでのウイルス感染系でしか存在しな

い。したがって、小動物モデルにおける HIV 感染のモデル動物の作製及びそれをを用いた野生株の評価は極めて重要な課題としてとらえられる。しかし、このマウス HIV モデル系の欠点として HIV 感染のウイルス血症を再現することができるが移植後のマウス中でのヒト細胞のサブセット変化により、免疫誘導における免疫一時反応、特に細胞性免疫の誘導が困難であり、二次反応の解析ができなかった。この重要な欠点を克服すべく、ヒト胎児胸腺・肝臓移植 NOD scid マウスの確立を行った。PBMC 移植モデルでは CD4 細胞より CD8 細胞が時間経過とともに優位になっていたのが、このモデルでは一定の割合で存在し、また消失していったヒト naïve T 細胞の産生を末梢血および脾臓中で確認でき、初期免疫を誘導しうるヒト細胞の存在を明らかにし、感染モデルとしての有効性も証明できた。

E. 結論

HIV 感染の最も重要な課題となっている HIV 野生株の特性を in vivo モデルとしてのヒト胸腺肝臓移植 NOD scid マウスで確立することができた。このモデルではヒト末梢 T リンパ球の HIV 感染時に起こる特徴的な生体反応を再現し、併せてヒト胸腺とともに細胞レベルで解析可能となった。これらの結果より、これまで不可能であったワクチン効果の評価法としてのマウスモデルとして免疫一次反応の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Someya K., Ami Y., Nakasone T., Izumi Y., Matsuo K., Horibata S., Xin K. Q., Yamamoto H., Okuda K., Yamamoto N., and Honda M. : Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus *gag/pol*. *J. Immunol.* 176:1784-1795, 2006.
- (2) Kawahara M., Matsuo K., and Honda M. : Intradermal and oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin. Immunol.* in press, 2006.
- (3) Takizawa M., Chiba J., Haga S., Asano T., Yamazaki T., Yamamoto N., and Honda M. : Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J. Immunol. Methods* in press, 2006.

2. 学会発表

無し

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

Fig. 1

CD4 細胞の枯渇時における X4 ウイルスの増幅の同定

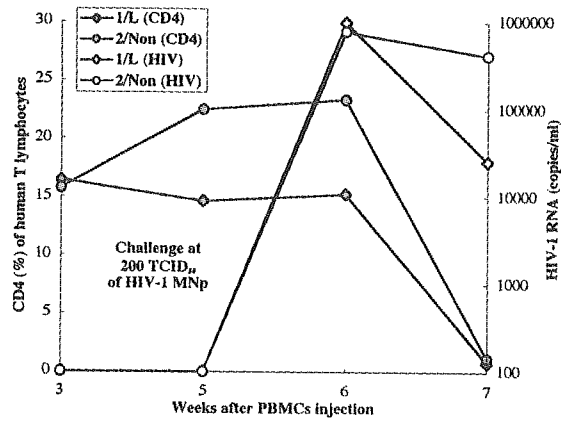


Fig. 2

マウスを用いた HIV ワクチンの感染防御能と CD8 及び CD4 反応との相関

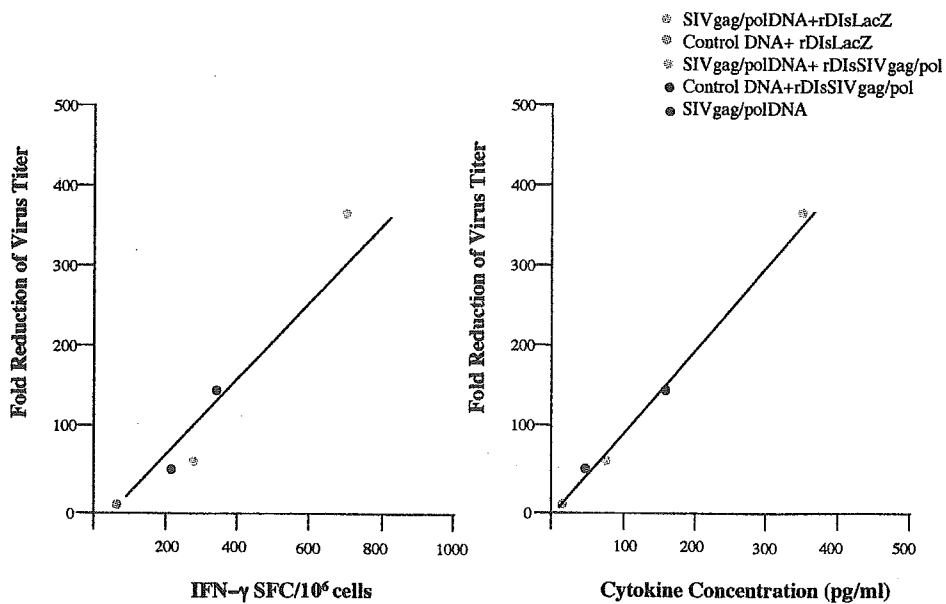
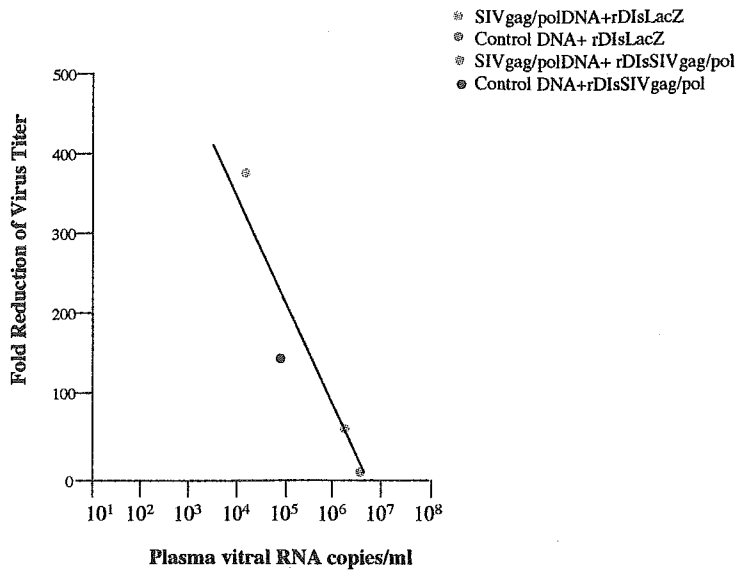


Fig. 3

マウスモデルとサルモデルの相関



分担研究報告書：

研究項目：HIV 感染による神経組織破壊のモデル動物の開発
分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
共同研究者 三浦 義治 京都大学ウイルス研究所 助手
共同研究者 北山 裕子 京都大学ウイルス研究所 大学院生

研究要旨

HIV 感染による組織破壊を再現するモデル系を開発するために、免疫不全マウスに血液幹細胞移植する実験系、ならびに、マウスやラット脳海馬由来のスライス培養系の確立を試みた。前者の実験系への HIV-1 感染実験への応用にはまだ成功していないが、後者の海馬スライス培養系への HIV-1 感染マクロファージの共培養により神経組織構築障害、特に HIV-1 感染マクロファージによる神経細胞障害現象を再現できた。この組織障害病理像はエイズ脳症患者のそれに類似していたことより、この評価系の確立により小動物を用いたエイズウイルスの神経病原性の評価が可能であることが分かった。また、CD4T 細胞由来のエイズウイルス抑制因子の候補遺伝子の探索を継続している。

A. 研究目的

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

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) 新生児免疫不全マウスへの臍帯血移植実験
臍帯血より autoMACS 自動磁気細胞分離装置により分画した CD34 陽性細胞（陽性率 95%以上）を選択し、放射線照射（1.2~2.4 Gy）新生児免疫不全マウス（RAG2 ノックアウトマウス、あるいは、NOD-SCID とコモン gamma 鎖ノックアウトマウス：NOG）の肝臓へ $4\sim 8 \times 10^5$ 個の CD34

陽性細胞を移植した。移植後、1.5~3 ヶ月後に採血し、血液中の CD45 陽性細胞率によりヒト細胞数を flow cytometry により測定した。ヒト B 細胞ならびに、ヒト T 細胞の同定には抗 CD20 ならびに抗 CD3 単クローン抗体を用いた。

2) 脳神経組織培養実験系

哺乳 7-8 日目のハノーバラットあるいは ICR マウスを断頭し、脳を摘出し海馬を露出させ、McIlwain ティッシュチョッパーにて海馬溝に垂直に厚さ $350 \mu\text{m}$ に薄切したスライスを培養プレートインサート（Millicell-CM:PICM03050, Millipore）上に 1 ウェルあたり、4-5 枚の密度で静置し、培養した（海馬スライス培養）。さらに正常人末梢血由来のマクロファージに MOI 1 にて HIV_{JRFL} を感染させ、このスライス培養とトランスウェルを用いて共培養実験を行った。このスライスの凍結切片を作製し、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) ウサギポリクローナル抗体(DAKO)、あるいは、anti-NeuN ラット単クローン抗体(Chemicon)を用いて蛍光免疫染色を行った。これら蛍光染色の解析には Leica のレーザー顕微鏡と CCD カメラを使用した。

3) CD4 細胞由来の HIV-1 抑制因子の探索

田中らにより報告された CD4T 細胞由来の R5 ウイルス特異的抑制因子 (*J. Virol.* 77: 8719-8728, 2003) の単離のために、培養上清中に R5 ウイルス特異的抑制因子を放出するクローン細胞とその活性がないクローン細胞（田中未発表）の transcriptome 解析を行い、数種の候補遺伝子を同定した。さらに、これらの遺伝子過剰発現細胞上清を CD3CD28 刺激 T 細胞に添加し、R5 ウイルス感染抑制活性を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 免疫不全マウスにおけるヒトT細胞新生実験系の開発

RAG2 ノックアウト新生児マウス、あるいは、NOG新生児マウスへ臍帯血由来のCD34陽性細胞を肝臓内へ移植した。その結果、いずれの系統でも移植後、まず1ヶ月後には末梢血においてヒトCD45陽性の白血球細胞群が出現し、そして、2-3ヶ月後にはCD3陽性のヒトT細胞が、およそ10-20%程度まで増えることを認めた。しかし、NOGマウスのすべてにおいて移植後の成育不全があり、4ヶ月以上の生存が認められず、HIV感染実験まで至らなかった。RAG2ノックアウトマウスにおいては、移植後の成育不全はなかったが、ヒトT細胞が新生されたマウスの成功率は5%以下と非常に少なく、これもHIV感染実験まで至らなかった。

2) 小動物に由来する海馬スライス培養によるHIV誘導神経組織障害の評価系確立

脳組織内の組織構築とウイルス感染による影響をリアルタイムに把握できる実験系として、3次元構築された脳海馬組織そのものを維持培養できる海馬スライス培養系の確立を行った。そして、その培養系をさらに、HIV誘導神経組織障害の評価系として利用可能か検討した。まず、哺乳7-8日目のラットあるいはマウスから海馬を取り出し、そのまま、薄切し、ミリポア膜上にて培養を行った。培養直後は生体内の層構造がいったん破壊されるが、培養2週目には中央にCA1やCA3、そして、dentate gyrusなどの神経細胞層と周辺のグリア層が再構築された(図1Aと図2A)。そして、免疫染色の結果、これらの神経細胞層(NeuN陽性細胞)とアストロサイト層(GFP)の分布は確認された(結果示さず)。この培養系にHIV感染マクロファージを接種し、HIV誘導神経系障害の評価系となりうるか検討した(図1)。まず、培養開始時からウイルス感染マクロファージとの共培養を行うとスライス培養開始後に見られる神経系

組織の再構築反応が明らかに阻害されることが判明した(図2C)。次に、培養後2週目に神経細胞層と周辺のグリア層の再構築が完了し、維持可能になっている海馬スライス培養にウイルス感染マクロファージとの共培養を行うと、スライス内の神経細胞全般に脱落が見出されるとともに、特にCA3領域から歯状回の神経細胞層に特に際立った脱落が観察された(図2F, I, J)。一方、神経細胞の脱落とは対照的にアストロ細胞ならびにマイクログリア細胞の形態変化からこれらの細胞の活性化が推測された(結果示さず)。

4) CD4抑制因子の探索

CD4T細胞由来のR5ウイルス抑制因子の探索のため、候補遺伝子発現細胞の培養上清のウイルス抑制活性を検討した結果、活性が弱いながら、明らかにR5ウイルスの感染増殖抑制活性が見出された。

D. 考察

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

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RAG2ノックアウトマウス、ならびに、NOGマウスにヒト血液幹細胞を移植し、マウス内にヒトT細胞の新生を再現できる実験系を確立した。しかし、構築効率が優れているNOGマウスではマウスの成育不全のため6ヶ月以上にわたる長期観察は不可能であった。今後、マウス系統の選択、移植細胞数、移植時の放射線量などの改良が必要であることが判明した。今後検討を予定している。

脳内にHIV感染細胞を浸潤させてマウスにおいて神経細胞にアポトーシスが誘導できることは確認している(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 2777-2782, 2003)ので、今回は3次元に構築された中枢神経組織を顕微鏡下にリアルタイムに観察する方法として脳組織スライス培養系を利用した。本方法は脳海馬組織を350 μ m程度にスライスし、その組織そのまま培養しようとするものであり、培養のための回収により組織構築が破壊された海馬組織がふたたび構築され神経細胞層やグリア層が顕微鏡下にて観察されるものである。このスライス培養系に種々のHIV感染細胞とトランスウエルを用いた共培養系実験のなかから、HIV感

染ヒト初代マクロファージと共培養を行うと、海馬スライス再構成能に対する影響(図2C)と再構成後も特に神経細胞に対する障害活性(図2I, J)が誘導されることを見出した。この再構成抑制ならびに神経組織破壊活性は他の HIV 感染細胞株との共培養系では見られず、HIV 感染マクロファージが遊離するなんらかの神経障害因子の存在を疑っている。さらに、この HIV 感染マクロファージとの共培養により見出された組織所見として、神経細胞の脱落とグリア細胞の活性化はエイズ脳症患者組織において見出されている典型的病理組織所見であり、この培養系が HIV 誘導神経系障害の評価系と応用可能であると強く示唆するものである。また、神経系細胞のなかで特に神経細胞に対する障害活性が明らかであることより、その細胞分化に対する抑制活性を評価する実験系として、この海馬スライス培養系に神経幹細胞を新たに静置し、神経系細胞分化に対する HIV 感染による影響も検討した(結果示さず)。その結果、神経幹細胞から神経細胞への分化は HIV 感染マクロファージの存在下においては明らかに阻害されるが、同じ細胞からアストロサイトへの分化はほとんど阻害されないことが明らかになった。

CD4T 細胞由来の R5 ウイルス抑制因子の探索実験は予備的な実験結果でありながら、抑制活性を有する遺伝子が単離されており、これらが本当に R5 ウイルス抑制因子であるか今後の検討が必要である。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

1. 論文発表

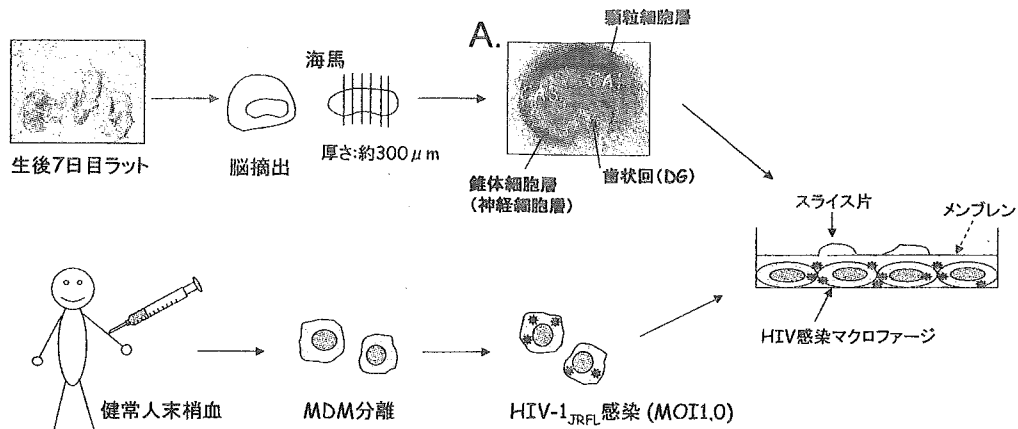
- ① Nakata H., Maeda K., Miyakawa T., Shibayama S., Matsuo M., Takaoka Y., Ito M., Koyanagi Y., and Mitsuya H.: Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ON04128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell

nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096, 2005.

- ② Miura Y., and Koyanagi Y.: Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol.* 15: 169-178, 2005.
 - ③ 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. *Hum Reprod.* 20:1477-1484, 2005.
 - ④ Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., Koyanagi Y., Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 4:325-330, 2005.
 - ⑤ Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N., and Kawai G.: Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimmers. *J. Biochem.*, 138:583-592, 2005.
 - ⑥ Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T.: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 106:3449-3456, 2005.
2. 学会発表
- ① Yoshida T., Hieda K., Kawano Y., Aoki J., Misawa N., Miura Y., Tanaka Y., Koyanagi Y., A truncated form of CD63-deletion mutant blocks X4-HIV-1 entry through dislocalization of CXCR4. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005.*
 - ② Aoki J., Koyanagi Y. Suppression of HIV-1 release through CD63-overexpressed plasma membrane. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005.*
 - ③ 青木淳、小柳義夫. CXCR4 を標的とした siRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた悪性腫瘍の遺伝子治療. 第 64 回日本癌学会、札幌、2005.
 - ④ 安藤良徳. 芳田剛. 小柳義夫. 生細胞における CXCR4 分子のイメージング解析. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.

- ⑤ 青木淳、佐藤佳、佐野浩一、大黒恵理子、小柳義夫. CD63 過剰発現による HIV-1 粒子の感染性抑制. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑥ 北山裕子、三浦義治、小柳義夫. HIV 感染マクロファージによる中枢神経系未分化細胞群への障害. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑦ 篠田康彦、稗田訓子、小柳義夫. 薬剤誘導性発現レンチウイルスベクターの開発. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑧ 佐藤佳、青木淳、北山裕子、小柳義夫. がん細胞転移抑制性レンチウイルスベクターの開発. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑨ 三浦義治、青木淳、北山裕子、佐野浩一、川口寧、小柳義夫. 神経幹細胞は単純ヘルペスウイルス 1 型感染細胞として重要である. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑩ 北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. 中枢神経組織内における抗 HSV 因子の探索. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑪ 芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 抗 HIV 因子の単離: CXCR4 細胞膜移行阻害分子の同定. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑫ 中田浩智、前田賢次、宮川寿一、河野祐治、柴山史郎、高岡義和、小柳義夫、満屋裕明. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005.
- ⑬ 三浦義治、北山裕子、小柳義夫. HIV 脳症における中枢神経系未分化細胞群関与の検討. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005.
- ⑭ 青木淳、佐藤佳、大黒恵理子、佐野浩一、小柳義夫. テトラスパニン分子による HIV-1 粒子の感染性抑制. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005.
- ⑮ 芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 特定の細胞膜表面分子に対する細胞膜移行阻止因子の単離: CXCR4 発現阻止因子. 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005.
- ⑯ 星野重樹、志村まり、田口崇、小柳義夫、石坂幸人. HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生における Vpr の機能. 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005.
3. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得状況
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. HIV-1感染マクロファージ - ラット脳海馬スライス共培養系



ラット脳海馬スライス培養系は、生後7日目哺乳ハノーバットから海馬部分を切り出し、メンブレン上で培養し作製した。
 ヒト末梢血単球由来のマクロファージ(MDM)を分離し、HIV-1_{JRFL}をMOI1.0にて感染させ、メンブレンを介して海馬スライスと14日間共培養した。

図2. 海馬スライス組織の再構築実験 (A-E)

