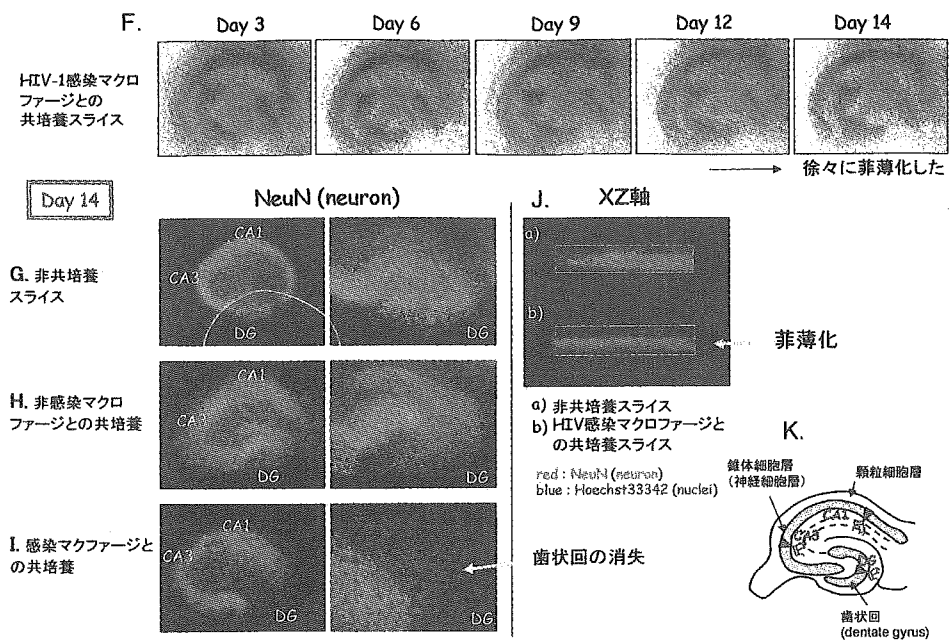


図2. HIV-1感染マクロファージとの共培養による海馬スライスの非薄化と神経細胞の特異的減少(F-K)



「HIV-1 感染増殖と免疫誘導を可能とする新たな高度免疫不全マウスの開発」
に関する研究

研究分担者 伊藤 守 財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室室長

研究要旨：HIV-1 が高率に感染する新規免疫不全マウスの作出を目的として、human IL-4 を分泌する免疫不全マウスの作製を行った。昨年度構築したサイトメガロウイルスプロモータに human IL-4 cDNA を繋いだ遺伝子断片を、CB-17-scid または BALB/cA-RAG2, gC double KO の 2 系統マウスの前核期卵に注入し、免疫不全 Tg マウスの作製を行った。その結果、CB-17-scid マウスでは 3 匹で、BALB/cA-RAG2, gC dKO マウスでは 3 匹で、マウス血清中に hIL-4 が高分泌される Tg マウスが得られた。挿入遺伝子の産子への伝達は良好で、現在、感染実験用マウスの作製を行っている。

A. 研究目的

本研究の目的は、エイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果を調べるための小型動物モデルを作製することである。従来の C.B-17-scid マウスなどの免疫不全マウスにヒトリンパ球を移入し、HIV-1 を感染させる SCID-huPBL モデルでは、移入末梢血単核球の移植性がドナーによってまちまちであること、生着性が良すぎると逆に GVHD 反応でマウスが早期に死亡してしまうことなどが問題点である。また、これらモデルでは R4 type の HIV-1 は比較的感染するが、X4 type は感染し難い。このため、C.B-17 マウスと BALB/cA-RAG2, gC double KO マウスを遺伝的背景とした hIL-4 を分泌する免疫不全トランスジェニックマウスを作製を行い、これら免疫不全 Tg マウスでの、HIV-1 感染性を検討する。

B. 研究方法

human IL-4 を分泌する C.B-17-hIL-4 Tg および BALB/cA-RAG2, gC double KO-hIL-4 Tg マウ

スの作製を行った。まず、ヒト末梢血より分離した単核球 (PBMC) を Pokweed mitogen (PWM) の刺激下で 48 時間培養した。その後、細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した。それをソースとした RT-PCR でヒト IL-4 cDNA を増幅し、その塩基配列を確認した後に、CMV プロモーターで稼働する pCNVb vector (Invitrogen) に挿入した。この DNA を COS-7 に in viro transfection で導入し、培養上清中の hIL-4 を ELISA で定量した。得られた DNA 断片を、当所で交配によって増殖させた BALB/cA-rag2, gc double KO と BALB/cA の間で得られた前核期卵または C.B-17-scid (日本クレア) の前核期卵に顕微注入した。

hIL-4 cDNA は健常人ボランティアから承諾を得て採集した末梢血液を用いた。

C. 研究結果

昨年度構築したサイトメガロウイルスプロモータに human IL-4 cDNA を繋いだ遺伝子断片を、CB-17-scid または BALB/cA-RAG2, gC

double KOの2系統マウスの前核期卵に注入し、免疫不全 Tg マウスの作製を行った。すなわち、CB-17-scid マウス卵 390 個に注入した後に受容体マウスに移植した。その結果、17 匹の産子が得られ、PCR による解析でそのうち 5 匹で遺伝子が挿入されていた。ELISA によるマウス血清中の hIL-4 を測定した結果、うち 3 匹で hIL-4 が高濃度に検出された。すなわち、0.60, 0.59 と 3.04 ng/mL であった。また、BALB/cA-RAG2, gC dKO マウスでは 358 個に注入し、31 匹の産子を得た。そのうち、遺伝子挿入が 4 匹で、うち 3 匹で hIL-4 が血清中に検出された。そのマウス血清中の濃度は 0.70, 1.10 と 5.80 ng/mL であった。これによって両系統とも hIL-4 を高発現するファウンダーマウスが得られた。これら Tg マウスのうちで高発現する各々 2 匹を交配することによって、その導入遺伝子の伝達の確認を行っている。現在までに産子が得られた C.B-17-scid 由来の 2 ファウンダーマウスでは遺伝子の伝達を確認されている。

D. 考察

本研究は、新規 HIV-1 感染小型動物モデルを作るのが目的である。そのために、免疫不全マウス 2 系統 (BALB/cA-rag2, gc double KO マウスおよび C.B-17-scid マウス) に human IL-4 を分泌するトランスジェニックマウスの作製を行い、高濃度産生マウスを得ることができた。前者免疫不全マウスは当研究所で開発したもので、極めて移植性が優れていることが分かっている (Traggiai E, et al, Science. 2004;304:104)。IL-4 が T cell tropic な HIV-1 増殖を up-regulate すること (Li YG, et al. Microbiol Immunol. 2005;49:155) から、これらを組み合わせることによって新たなモデルが開発できると考えられる。

E. 結論

本研究の目的である human IL-4 Tg 免疫不全マウスの作製実験で、CB-17-scid マウスでは 3 匹、BALB/cA-RAG2, gC dKO マウスでは 3 匹のマウス血清中に hIL-4 が高分泌される Tg マウスが得られた。挿入遺伝子の産子への伝達は良好で、現在、感染実験用マウスの作製を行っており、研究は比較的順調に推移していると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究はヒト因子産生 Tg マウスを作製するのが目的であり、感染実験は行っていない。したがって、健康に危険と考えられる実験に相当しないと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

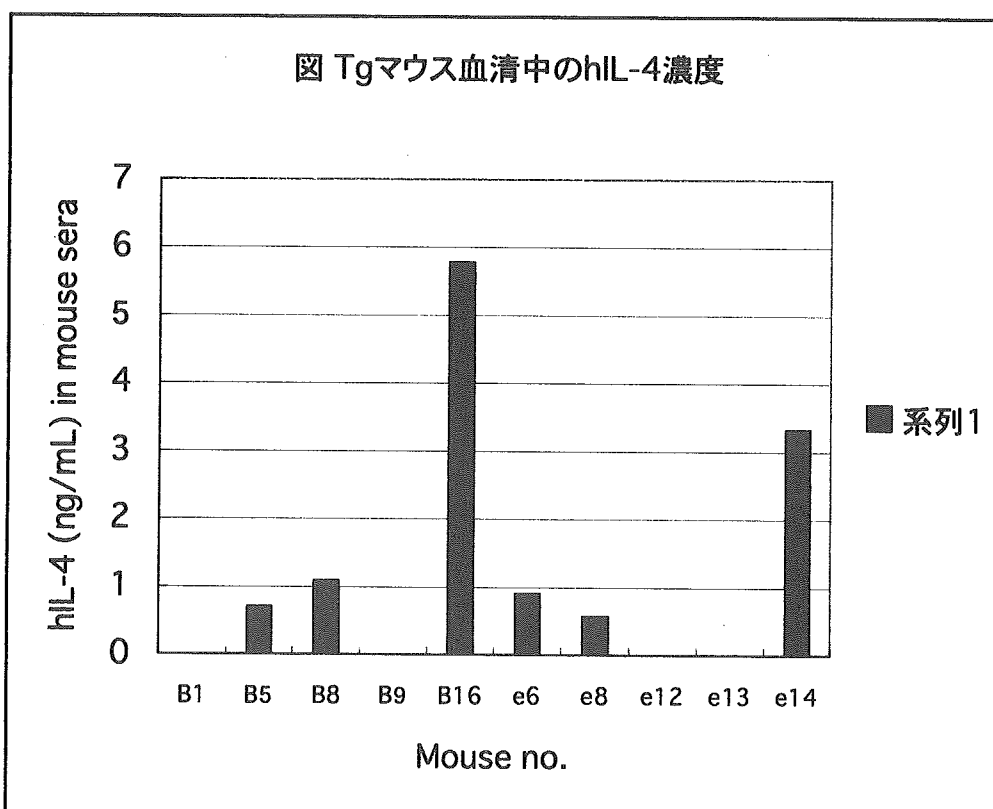
なし

3. その他

特になし

表 マウス血清中にヒトIL-4を分泌する免疫不全Tgマウスの作製

受精卵のマウス系統	操作胚数	移植胚数	出産子数	離乳子数	Tg陽性数	血清中hIL-4産生陽性数
(C.B.-17-scid♂ x C.B.-17-scid♀) F1	390	190	17	16	5	3
(BALB/cA♀ x BALB/cA-dKO)F 1	396	344	31	27	4	3



小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発

分担研究者 小端 哲二 獨協医科大学医学部免疫学講座教授

研究要旨

抗 HIV 抗体の産生増強への応用を目的に、T 細胞非依存性 B 細胞活性化を制御する TNF ファミリー分子 BAFF の受容体に対するアゴニスト単クローン抗体を開発し、その作用機序を解析した。

A. 研究目的

BAFF による T 細胞非依存性 B 細胞活性化系の制御機構の解明を通して、HIV 特異的 B 細胞の生存維持や抗 HIV 抗体の産生増強への応用を図る。今年度は、ヒト BAFF の正の受容体 BAFF-R と負の受容体 TACI に対するアゴニスト単クローン抗体を開発し、その作用機序を解析した。

B. 研究方法

ヒト末梢血 B 細胞に抗ヒト BAFF-R アゴニスト単クローン抗体（8A7）を添加し培養した。B 細胞の増殖と IgG 産生は、それぞれ BrdU の取り込み率ならびに ELISA を用いて測定した。その際、抗ヒト TACI アゴニスト単クローン抗体（11H3）を添加し、8A7 抗体誘導性 B 細胞応答に対する抑制効果を検討した。さらに、8A7 抗体による NF- κ B2 の活性化と 11H3 抗体による抑制効果を、免疫ブロット法により検討した。また、フローサイトメトリーによるアネキシン V 結合能および免疫ブロット法による PKC δ の核内移行度を指標に、11H3 抗体による B 細胞アポトーシスの誘導能を検討した。

（倫理面への配慮）

実験には匿名化された日赤血液センターからの譲渡血を用いるため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1) 8A7 抗体は、B 細胞の増殖、IgG 産生そして NF- κ B2 活性化を誘導した。2) 11H3 抗体は、8A7 抗体により誘導された B 細胞増殖を有意に抑制した。3) 11H3 抗体は、8A7 抗体により誘導された B 細胞 IgG 産生を有意に抑制した。4) 11H3 抗体は、8A7 抗体により誘導された NF- κ B2 活性化を有意に抑制した。5) 11H3 抗体は、B 細胞アポトーシスを誘導した。

D. 考察

BAFF-R による B 細胞活性化シグナルを TACI は少なくとも NF- κ B2 の転写因子レベルで抑制する事が示唆された。また、TACI は B 細胞アポトーシスを誘導できることが明らかとなった。

したがって、BAFF は BAFF-R を介する正のシグナルと TACI を介する負のシグナルを通して NF- κ B2 の活性化と B 細胞アポトーシスを制御し、その結果、B 細胞応答を調節しているようである。今後は、TACI の抑制機序をさらに詳細に解明するために、NF- κ B2 活性化経路の上流に位置するアダプター分子の挙動を解析する。

E. 結論

これらの研究成果により、BAFF による BAFF-R および TACI を介した B 細胞応答を人為的に制御することで、十分な T 細胞機能が期待できない HIV 感染に対する抗体産生系の調節やワクチン効果の増強への応用が期待される

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura, N., Hase H., Sakurai D., Yoshida S., Abe M., Tsukada N., Takizawa J., Aoki S., Kojima M., Nakamura S., and Kobata T.: Expression of BAFF-R (BR3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody. *Virchows Arch.* 447:53-60, 2005.

2. 学会発表

1) BAFF-R 誘導性 NF- κ B2 活性化に対する TACI の働き。櫻井大祐、小嶋英史、小端哲二。第 44 回日本免疫学会。2005 年 12 月 13 日。（横浜）
2) Pivotal roles for the BAFF/BAFF-R and BAFF/TACI axes in B-cell responses: analyzed by new anti-human BAFF-R and TACI agonistic mAbs. Sakurai D., Kanno Y., Hase H., Kojima H., and Kobata T. The 44th Midwinter Conference of Immunologists. January 28, 2006. (Pacific Grove, CA, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

研究要旨：ヒト PBMC 由来 CD14 陽性単球から分化・誘導した樹状細胞(DC)に抗原として AT-2 処理で不活化した HIV-1 をパルスし HIV-1 感作 DC を作製した。これを SCID マウスの脾臓実質内にヒト PBMC と共に移植し hu-PBL SCID マウスを構築した。DC 移植後 21 日目にマウス血漿及びマウス脾臓内のヒト PBMC を回収し、DC によって誘導される抗 HIV 特異的免疫を細胞性免疫と液性免疫について解析を行い不活化 HIV-1 を抗原として作製した DC による抗 HIV 特異的効果について検討した。

A. 研究目的

薬物治療は HIV 感染症治療において大きな効果を上げてきたが、一方で副作用・薬剤耐性による治療失敗が問題となっている。この問題を克服するために新たな治療戦略が求められており、その候補として治療ワクチンによる宿主の抗 HIV 免疫能の増強が検討されている。本研究では HIV タンパクを発現するリコンビナントワクチン及び AT-2 処理不活化 HIV に曝露した樹状細胞(DC)が誘導する抗 HIV 特異的免疫能及び血漿中の特異的抗 HIV 中和抗体について hu-PBL SCID マウスを用いた HIV 感染モデルを用いて解析した。

B. 研究方法

DC 誘導のため健常人 PBMC から CD14 陽性単球を単球分離キット (Mylteni) を用いた磁気ビーズ法で分離した。これを GM-CSF、IL-4 存在下で 5 日間培養して未成熟 DC に分化させた後、IFN- β 存在下で 2 日間培養して成熟 DC とした。NOD SCID common γ 鎖ノックアウトマウス (NOG SCID マウス) の脾臓実質内に 3×10^6 個のヒト PBMC と AT-2 により不活化した HIV を抗原として感作した同一ドナーの DC を 3×10^5 個移植して hu-PBL SCID マウスの構築および DC ワクチンの初回感作を行った。7 日後、再び同じ抗原で感作した成熟 DC を 3×10^5 個脾臓実質内に接種して 2 回目の感作を行った。さらに 1 週間後マウスを屠殺し血漿と脾臓内のヒト PBMC を回収した (図 1)。細胞性免疫の有無については p24 抗原存在下における IFN γ 産生細胞を ELISPOT アッセイ (図 2) により、液性免疫あるいは抗ウイルス活性を持つ活性因子の有無については中和アッセイ (図 3) により評価した。また ELISPOT アッセイの感度を高める目的で、hu-PBL SCID マウス構築に用いた PBMC と同じドナーから B 細胞株を樹立した。B 細胞は

予め rVV/HIV-1 III Bgag に感染させ HIV 由来タンパクを発現させた。これを stimulator として ELISPOT アッセイの際にヒト PBMC と共培養して IFN γ の産生を上昇させ、より高感度な HIV 特異的 IFN γ 産生の検出を試みた。

(倫理面への配慮)

すでにこのような動物実験は、国立感染症研究所の動物実験倫理委員会で審査され、許可されている。

C. 研究結果

(1) ELISPOT アッセイ：AT-2 処理した HIV-1 を抗原感作した DC 免疫群では AT-2 処理 HIV のみで免疫した群と比較して IFN γ 産生細胞の上昇が見られた。しかし感作していない DC のみで免疫した対象群で非特異的な IFN γ 産生細胞の上昇が観察され、今回の結果からは抗原感作 DC による HIV 特異的 IFN γ 産生細胞の上昇が起こるとは結論付けられなかった (図 2)。現在は ELISPOT アッセイの感度を向上させるために hu-PBL SCID マウス構築に用いた PBMC ドナーから B 細胞株を樹立している (図 4)。また hu-PBL SCID マウスを用いた免疫誘導評価系の見直しを行い、追加免疫を初回免疫の 5 日後、また解剖を追加免疫の 5 日後に短縮し、より強い HIV 特異的免疫反応の検出を現在試みている。

(2) 中和アッセイ：抗原暴露した DC を移植した群を陽性コントロール群、抗原暴露を行わない DC を移植した群を陰性コントロール群とした。血漿を 32 倍、64 倍、128 倍及び 256 倍に段階希釈し、5 倍段階希釈した HXB2 と PHA-BLAST の培養液中に加えて 1 週間培養し 2 群間における TCID50 の変動を比較した。その結果抗原暴露群と非暴露群に有意な差は見られず抗原暴露 DC による HIV 特異的な中和抗体の上昇は今回の実験では確認で

きなかった (図5)。

D. 考察

これまでの結果から、不活化 HIV/DC ワクチンによる特異的な液性免疫・細胞性免疫は中和アッセイと ELISPOT アッセイからは確認できなかった。これはマウスの各群の数が不足していて値のばらつきがあった事が関係していると考えられる。そこで現在は各群の数を 5 匹ずつに増やした実験を行っている。また ELISPOT アッセイの感度を高めるために stimulator として B 細胞株を樹立して抗原提示能との確認と ELISPOT アッセイ結果の検討を進めている。また hu-PBL SCID マウスを用いた免疫誘導評価系を見直し初回免疫・追加免疫を初回免疫の 5 日後、解剖を追加免疫の 5 日後とし評価期間を 21 日間から 15 日間に短縮した評価系の検討が現在進行中であるが、初回免疫と追加免疫の期間を短縮したことでより高い HIV 特異的免疫反応の誘導が期待される。

E. 結論

hu-PBL SCID マウスを用いた HIV 感染モデルと抗原提示能を有する DC の誘導法を確立した。中和抗体あるいは抗 HIV 活性を持つ未知の因子の存在は今回確認できなかったが他の細胞系を用いた評価を検討したい。また、今後この系で不活化 HIV/DC ワクチンを評価するため ELISPOT アッセイの条件の最適化及び評価スケジュールの改変を行い、HIV 特異的細胞性免疫の評価をさらに進める。また FACS による細胞内 IFN γ の測定など ELISPOT アッセイ以外の評価法による HIV 特異的細胞性免疫の評価についても検討する。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て国立感染症研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 学会発表

Tomoyuki Ueda, Lay Myint, Teichiro Shiino, Masako Nishizawa, Masakazu Matsuda, Wataru Sugiura. Analysis of Interference and Co-evolution between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. XIV International HIV Drug Resistance Workshop, Quebec, 2005 年 6 月

西澤雅子、加藤真吾、藤野真之、三浦秀佳、山本直樹、杉浦 互. 細胞内における抗 HIV 薬 (プロテアーゼ阻害剤) の薬剤濃度のモニタリング. 第 8 回白馬シンポジウム、鹿児島、2005 年 11 月

松田昌和、有吉紅也、柿沢淳子、西澤雅子、三浦秀佳、千葉智子、植田知幸、大出裕高、星野忠次、杉浦 互. HIV-1 CRF01_AE における Nelfinavir 耐性変異 N88S の耐性化機序の解析. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005 年 11 月

Myint Lay, 植田知幸, 西澤雅子, 松田昌和, 三浦秀佳, 杉浦 互. プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間に見る相互干渉と共進化の解析. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005 年 11 月

西澤雅子, Urvi Parikh, 藤野真之, 松田昌和, 三浦秀佳, 加藤真吾, 山本直樹, 杉浦 互. ヒト末梢血単核球を用いた K65R 獲得 HIV-1 の逆転写酵素阻害剤に対する感受性の解析. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005 年 12 月

Lay Myint, Tomoyuki Ueda, Masako Nishizawa, Teichiro Shiino, Masakazu Matsuda, and Wataru Sugiura. Virological and Statistical Analyses of Interference Between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, 2006 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

各群のマウスにおける抗 HIV-1免疫誘導の評価実験

/head	候補ワクチン群		対照群
Group	1	2	3
Prime	AT-2 HIV DC (1x10 ⁵)	AT-2 HIV	DC (1x10 ⁵)
Boost	AT-2 HIV DC (1x10 ⁵)	AT-2 HIV	DC (1x10 ⁵)

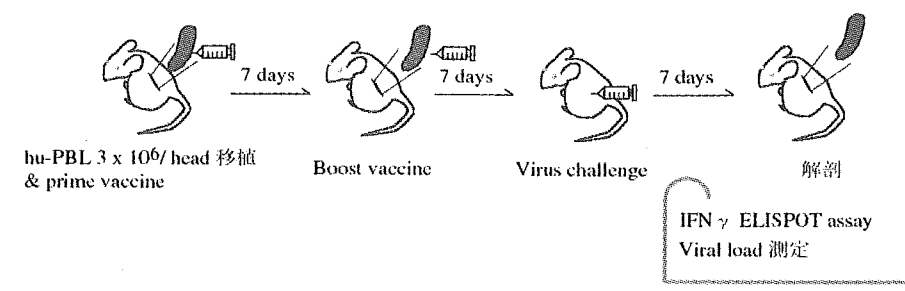
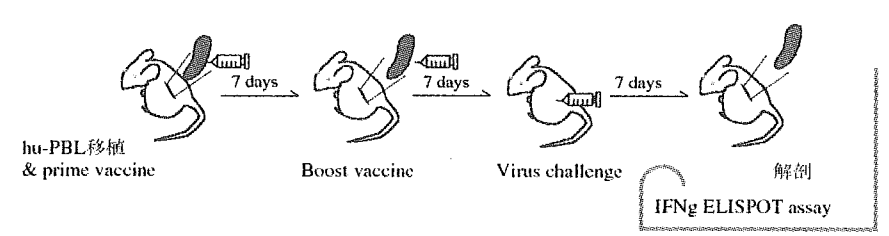


図 1

各群のマウスにおける抗原特異的免疫誘導の評価



/head	候補ワクチン群		対照群
Group	1	2	3
hu-SCID 構築		ヒトPBMC (3x10 ⁶)	
Prime	AT-2 HIV DC (1x10 ⁵)	AT-2 HIV	DC (1x10 ⁵)
Boost	AT-2 HIV DC (1x10 ⁵)	AT-2 HIV	DC (1x10 ⁵)

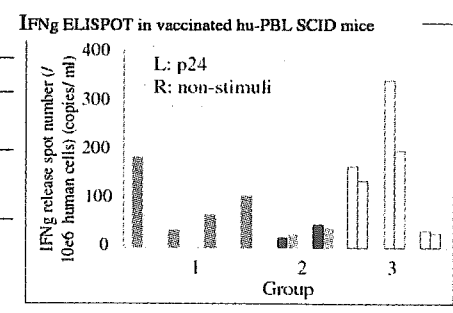


図 2

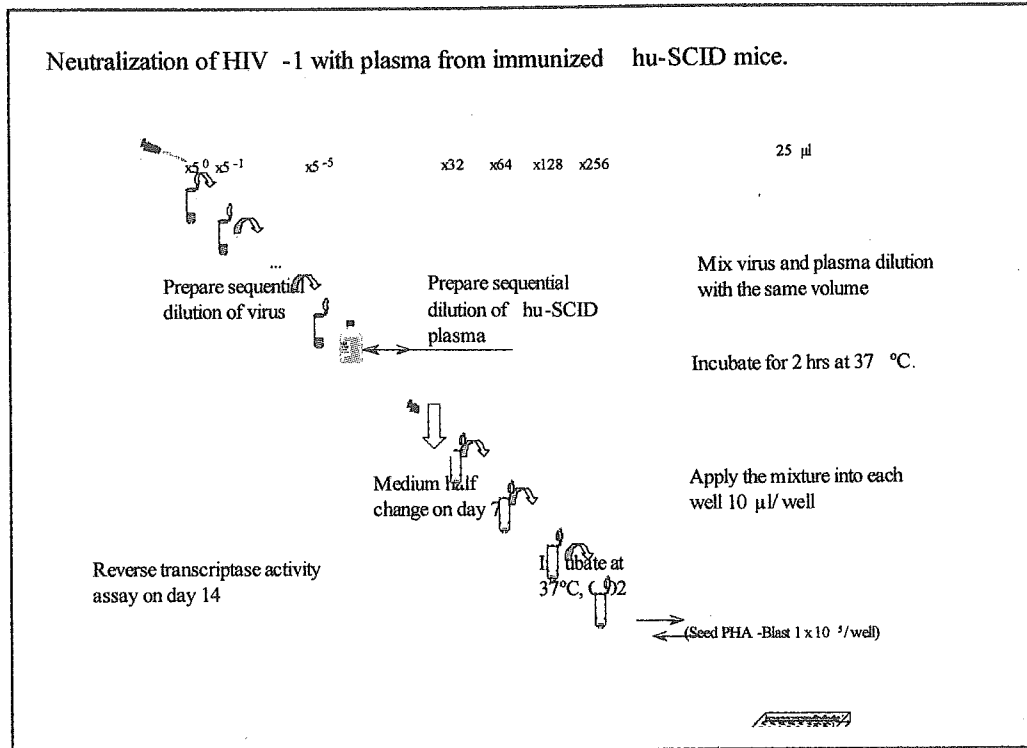


図 3

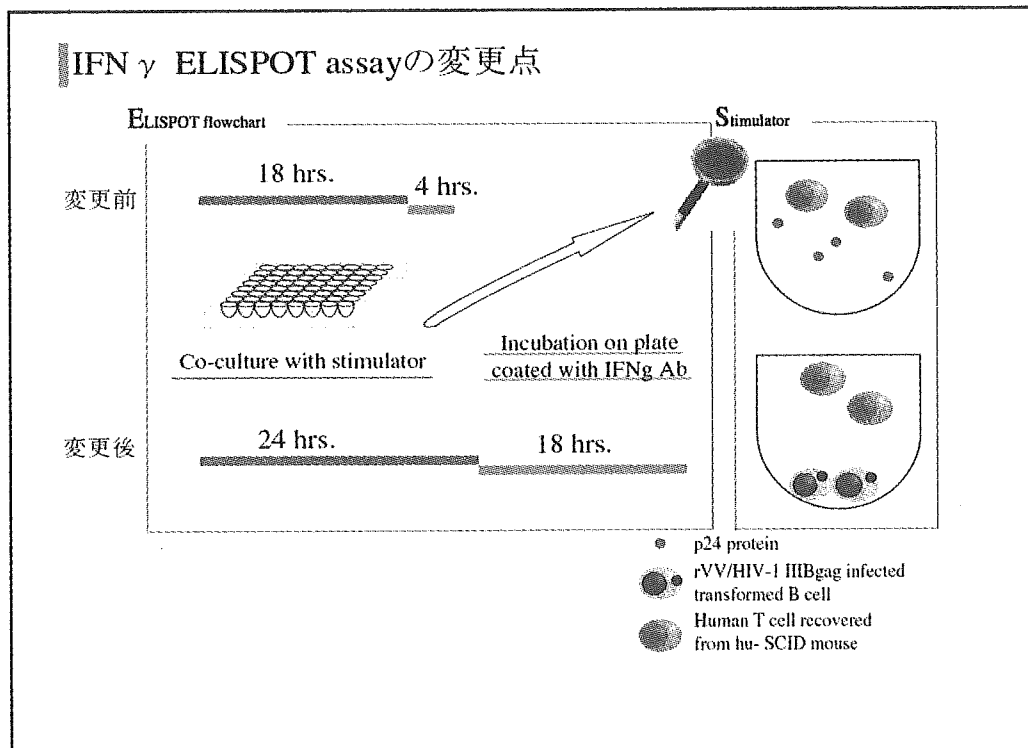


図 4

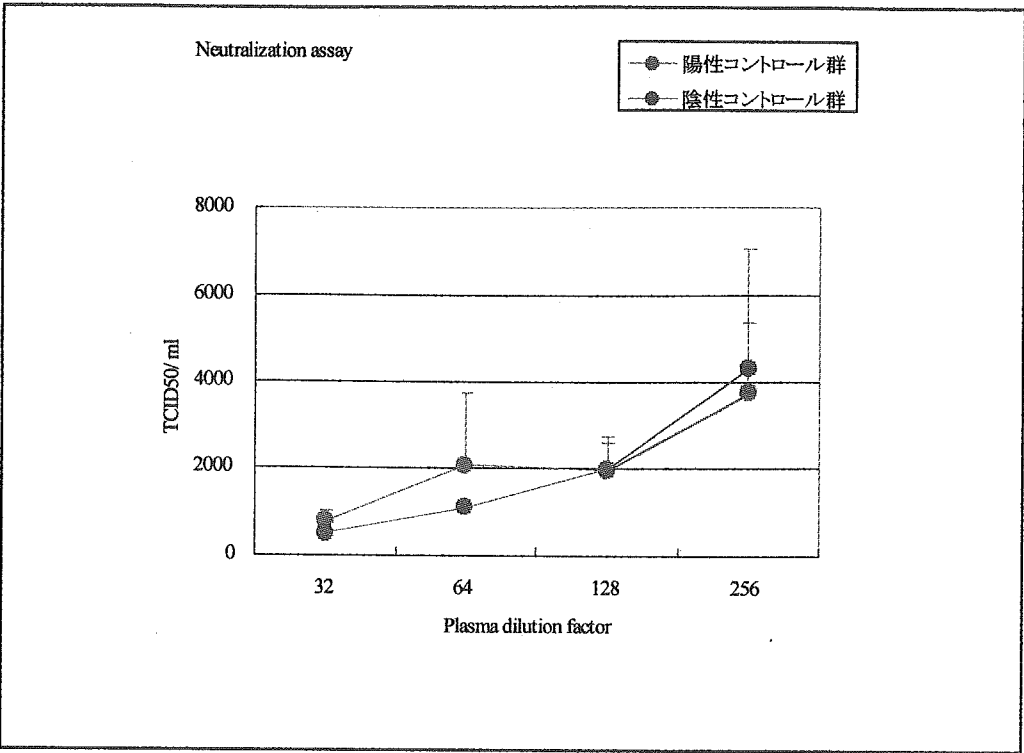


図 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小端哲二	APRIL, BAFF/BLyS	菅村和夫、 宮園浩平、 宮澤恵二、 田中信幸	サイトカイン・ 増殖因子 用語 ライブラリー	羊土社	東京	2005	95-100

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.			2006 in press
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			2006 in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 g-chain-knocked-out AIDS mouse model	J. Virol.	79	2087-2096	2005
Miura Y., and Koyanagi Y.,	Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection.	Rev. Med. Virol.	15	169-178	2005
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Koder 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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura N., Hase H., Sakurai D., Yoshida S., Abe M., Tsukada N., Takizawa J., Aoki S., Kojima M., Nakamura S., and Kobata T.	Expression of BAFF-R(BR3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody.	Virchows Arch.	447	53-60	2005
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Cross-Linking Cell Surface Chemokine Receptors Leads to Isolation, Activation, and Differentiation of Monocytes into Potent DCs

FUMIKAZU NIMURA,*† LI FENG ZHANG,* KAZU OKUMA,* REIKO TANAKA,* HAJIME SUNAKAWA,† NAOKI YAMAMOTO,† AND YUETSU TANAKA*¹

*Department of Immunology and †Department of Oral and Maxillofacial Functional Rehabilitation, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan; and[†]AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Monocytes express on the cell surface several kinds of chemokine receptors that facilitate chemotaxis followed by differentiation in target tissues. In the present study, we found that a large number of monocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) tightly adhered to plastic cell culture plates precoated with a monoclonal antibody (mAb, clone T312) specific for human CCR5 but not an isotype control after overnight incubation. Soluble T312 did not induce such adhesion, indicating that cross-linking of CCR5 is required for the enhanced adhesion of monocytes. The adhesion was blocked by a PI3-K inhibitor and an anti-CD18 blocking mAb. Following the cross-linking of CCR5, monocytes synthesized high levels of M-CSF, RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β associated with a readily detectable downmodulation of CD14, CD4, CCR5, and CXCR4 expression. The T312-enriched monocytes differentiated into dendritic cells (DCs) in the presence of interleukin-4 alone. After maturation with β -interferon, the T312-induced DCs stimulated proliferation of allogeneic naive CD4⁺ T cells accompanied by the synthesis of high levels of γ -interferon *in vitro*. Furthermore, the T312-induced DCs were capable of stimulating antigen-specific human T- and B-cell immune responses in our hu-PBL-SCID mouse system. Finally, screening of other anti-chemokine receptor mAbs showed that select clones of mAbs against CXCR4 and CCR3 were also capable of facilitating enrichment of monocytes similar to T312. These

results show that cross-linking of chemokine receptors on monocytes by appropriate mAbs leads to activation and differentiation of monocytes and that the method described herein provides an alternate simple strategy for adherence-based isolation of monocytes and generation of functional DCs. *Exp Biol Med* 231:000–000, 2006

Key words: dendritic cell; monocyte; chemokine receptor; human immunodeficiency virus (HIV)

Introduction

Peripheral blood monocytes are derived from bone marrow progenitor cells and are recruited to tissues, where they undergo differentiation into macrophages or myeloid dendritic cells (DCs) (1–4). Recruitment of monocytes from the recirculating pool into normal or inflamed tissues involves a series of cascading events, which include the generation of chemokine gradients and the expression of cell adhesion molecules and their cognate ligands (5). Ligation of the chemokine receptors activates β 1- and β 2-integrins (6), which in turn mediate adhesion of monocytes within tissues, where they differentiate into DCs. DCs are potent antigen-presenting cells (APCs) and have a central role in the activation and function of both innate and adaptive immune responses against infectious microorganisms (7). Dysfunction and potential loss of DCs have been associated with decreased antigen-specific T-cell responses and synthesis of lower levels of virus-suppressive Type-1 interferon (8–11).

Results from a number of studies have documented the enhanced potential of DCs to process and present antigen, and thus, DCs have been regarded as natural cellular “adjuvants.” This functional attribute has led to clinical trials of DC-based immunotherapy not only in a number of animal tumor models and human malignancies (12) but also against a number of infectious disease agents. This view is

This work was supported by grants from a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; Research on HIV/AIDS and Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; and the Japan Human Science Foundation.

¹ To whom correspondence should be addressed at Department of Immunology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Uehara 207, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-0215, Japan. E-mail: yuetsu@s4.dion.ne.jp

Received December 13, 2005.
Accepted January 5, 2006.

1535-3702/06/2314-0001\$15.00
Copyright © 2006 by the Society for Experimental Biology and Medicine

highlighted by the recent finding that immunization of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1)-infected patients with autologous DCs sensitized with chemically inactivated autologous HIV-1 led to a marked sustained decrease in viral load (13, 14). Essentially similar data, in terms of decreasing viral loads, were obtained using the simian immunodeficiency virus (SIV)-infected nonhuman primate model of human AIDS following immunization with autologous SIV-pulsed DCs (15); the results of this study were reasoned to be due to enhancement of both T-cell and neutralizing antibody responses. This finding was further supported using the hu-PBL-SCID model, in which human peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-engrafted mice, following immunization with inactivated HIV-1-pulsed human DCs, were shown to generate high levels of HIV-1-specific T-cell and B-cell immune responses sufficient to protect these animals against challenge with virulent HIV-1 isolates (16, 17).

Human DCs for such studies are generally derived from culturing enriched populations of monocytes *in vitro* in media supplemented with varying combinations of cytokines, depending on the nature of the studies to be performed. Evidence has been accumulating in support of the notion that there exist subsets of DCs that differ in their expression of cell surface markers, *in vivo* trafficking patterns, and cytokines synthesized, which influences the quality of the T-cell response that is induced by such DCs (18). Thus, *in vitro* culture of monocytes with recombinant human GM-CSF and interleukin-4 (IL-4) leads to their differentiation into myeloid DCs, and *in vitro* culture of those cultured in media containing GM-CSF and IL-3 leads to their differentiation into lymphoid DCs (19). There also appears to be evidence that a common precursor progenitor cell exists that can give rise to either myeloid or plasmacytoid DC subsequent to Flt-3 ligation (20). In the *in vitro* culture of the monocytes, GM-CSF functions as a survival and differentiation factor, whereas IL-4 induces differentiation of DCs by blocking their differentiation into the macrophage lineage (21, 22).

To study the biology of these DCs and to use them for *in vivo* studies, a large number of monocytes need to be isolated from the peripheral blood. This is accomplished using a variety of techniques, such as elutriation centrifugation (23), use of antibody-conjugated immunobeads (21, 24), and the more simple method of adherence of these cells to plastic (5, 24). Although the purity of the preparations using such procedures varies, it is clear that the former two techniques are expensive, requiring unique instrumentation and/or clinically trained staff, and labor intensive. Although the adherence-to-plastic method is simple, the yield of monocytes in such preparations varies among donors, and the results are difficult to reproduce.

We have previously reported that cross-linking of CXCR4 by a monoclonal antibody (mAb) that recognizes the extracellular loop 3 (ECL-3) region of CXCR4 induces homologous adhesion of T cells and enhances HIV-1

infection (25). Since fresh monocytes express a variety of chemokine receptors on their cell surface (26), we hypothesized that cross-linking of these chemokine receptors by an immobilized mAb might induce monocyte adhesion onto culture plates, providing a simple alternative procedure for the enrichment of monocytes from PBMCs.

Indeed, herein we present data that show that cross-linking the chemokine receptors CCR5, CXCR4, and CCR3 on monocytes by appropriate mAbs enhances adhesion of monocytes to plastic plates and that these adherent monocytes can be induced to differentiate along the macrophage or myeloid DC lineages with the use of distinct recombinant cytokines. This procedure will provide a relatively efficient and a more practical alternative for the isolation and study of monocytes and DC lineages.

Materials and Methods

Animals. SCID mice lacking functional T, B, and natural killer (NK) cells and BALB/c-*rag2*^{-/-} common gamma^{-/-} mice (27) were used in the present study. These mice were kept in the specific-pathogen-free animal facility of the Laboratory Animal Center at the University of the Ryukyus. The protocols for the care and use of the hu-PBL-SCID mice were approved by the Committee on Animal Research of the University of the Ryukyus before initiation of the present study.

Reagents. RPMI-1640 medium was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma Chemical) (referred to as RPMI medium). Serum-free medium, AIM-V, was purchased from Life Technology (NY). Recombinant (r) human GM-CSF and IL-4 were produced in 293T cells transfected with pCMhGM-CSF and pCMhIL-4, respectively (RIKEN Gene Bank, Ibaraki, Japan), using the calcium phosphate method. The total protein and cytokine concentrations of the pooled culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a functional assay, as described previously (16). rIL-2 was provided by the U.S. National Institutes of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program. rIFN- β was purchased from Torey (Tokyo, Japan). rIFN- γ and rM-CSF were purchased from Peprotec (London, UK). The PI3-K inhibitor LY294.002 LPS from *Escherichia coli*, OVA, keyhole limpet hemocyanin (KLH), and bovine serum albumin (BSA, fraction V) were all purchased from Sigma Chemical. FITC-labeled *E. coli*, FITC-fibrinogen, FITC-gelatin, and FITC-collagen were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Monocyte negative isolation kits were purchased from Dynal (Oslo, Norway). Cell proliferation kits were purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). ELISA kits for human IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, tumor necrosis factor (TNF)- α , M-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES were purchased from Biosource (Camarillo, CA). ELISA kits for γ -interferon (IFN- γ) were purchased

from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Naïve CD4⁺ T-cell isolation kit was purchased from MACS (Glabach, Germany).

The mAbs produced in our laboratory included two rat anti-human CCR5 N-terminus clones (clone T312 immunoglobulin [Ig]G1, clone T227 IgG2b); three rat anti-human CXCR4 (clone A145 IgG1, clone A120 IgG2b, clone A80 IgG1) (25); rat anti-HTLV-I (clone LAT-27, IgG2b) (28); rat anti-HCV (clone Mo-8, IgG2b) (29); rat anti-human OX40 (clone W4-54, IgG2b, Tanaka *et al.*, unpublished data), and mouse anti-human OX40L (clone 5A8, IgG1) (30). The other mAbs used included mouse IgG anti-human CD4, SIM-2, and SIM-4 (obtained from the U.S. NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), the clones OKT-4, OKT-8, and 60-bca anti-CD14 (obtained from ATCC, Rockville, MD). These mAbs were purified from SCID mouse ascites fluids by Superdex G-200 gel filtration (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). Commercially available mAbs used were mouse IgG anti-human CD4, CD11c, CD80, CD83, CD86, HLA-DR (Coulter Inc., Hialeah, FL), and mouse IgG anti-human CD11a, CD11b, CD14, CD18, CD29, CD51, and CD61 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Additional anti-human chemokine receptor mAbs, such as anti-CCR1 (mouse IgG2b, Cat #MAB145), CCR2 (mouse IgG2b, Cat #MAB150), CCR3 (rat IgG2a, Cat #MAB155), CCR5 (mouse IgG2b, Cat #MAB180), and CCR8 (rat IgG2b, Cat #MAB1429), were purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN); and the mAbs against CXCR4 (clone 12G5, mouse IgG2a) and CCR5 (clone 2D7, mouse IgG2a) were purchased from BD Pharmingen.

Cultivation of Monocytes. PBMCs were isolated from heparinized (5 U/ml) blood of normal healthy donors by a standard density gradient centrifugation at 400 g using lymphocyte separation medium (Sigma Chemical) for 15 mins at room temperature. The cells at the interface were collected and washed three times in cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% BSA (BSA-PBS). PBMCs were resuspended in RPMI medium or serum-free AIM-V medium at 5×10^6 cells/ml. Then, 1 ml of the cell suspension was dispensed into individual wells of 12-well plates (BD Pharmingen), which were precoated with various mAbs (5 µg/ml) for 1 hr at 37°C. PBMCs were allowed to adhere 2 hrs or overnight at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Nonadherent cells were removed by gentle washing three times in BSA-PBS. The remaining adherent cells were then cultured in RPMI medium. For some experiments, monocytes were purified using a monocyte negative isolation kit and were used at $1-2 \times 10^5$ cells/ml. For the generation of macrophages, adherent or immunomagnetic bead-enriched CD14⁺ monocytes were cultured in the presence of 20 ng/ml M-CSF for 6 days in a 5% CO₂ humidified incubator. For the generation of DCs, the media was supplemented with either GM-CSF (500 ng/ml) and IL-4 (200 ng/ml) or IL-4 (25 ng/ml) alone. Immature DCs were obtained after 5-6 days of culture. For maturation, the

immature DCs were cultured in the presence of human β-interferon (IFN-β) (1000 U/ml) for an additional day. For sensitization with antigens, the immature DCs at Day 6 were cultured in the presence of either 100 µg/ml OVA or KLH for 1 day and then matured with IFN-β for an additional day. Viable cell number was assessed on an aliquot of such cells using staining with 0.1% eosin-Y.

Flow Cytometry. Phagocytosis and cell surface markers were determined using FACS Calibur and Cell Quest software (BD Pharmingen). Cell samples were Fc-blocked by incubation in media containing 2 mg/ml of human IgG in PBS containing 0.1% NaN₃ and 2% FCS (FACS buffer) on ice for 15 mins and were then stained with appropriate fluorescent dye-conjugated reagents on ice for 30 mins, according to the manufacturer's instructions. After washing with FACS buffer, cells were fixed in 1% PFA-containing FACS buffer and analyzed. For quantitation of phagocytosis, sample cells (1×10^6) in 0.2 ml of RPMI medium were cultured in the presence of FITC-labeled *E. coli* at a cell to bacterium ratio of 1:10 to 1:100 for 1 hr at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. After incubation, these cells were washed once in FACS buffer, fixed with 1% PFA, and then analyzed.

There were significant individual variations in the percentage of CCR5-positive cells in PBMCs. The percentages of T312-positive cells were as follows: 6%–14% of CD14⁺ monocytes, 11%–43% of CD3⁺ T cells, 6%–15% of CD3⁺ CD4⁺ T cells, and 5%–14% of CD20⁺ B cells. Overnight incubation of PBMCs in medium alone led to a marked increase in the frequency of monocytes that expressed CCR5 (up to 70%), as detected using the T312 mAb. However, there was no detectable change of CCR5 expression in the other cell subsets (data not shown).

DC Functional Assays. Several assays were employed to determine whether the cell population that was being cultured belonged to the DC lineage. This included quantitation of the levels of IL-12 p70 and IL-10 produced in the culture supernatants of the potential DCs, as determined by ELISA; ability of the cells to induce allo-proliferation; and a unique *in vivo* assay. For the assessment of allo-proliferative potential, the mature or immature DCs to be tested were cultured at 1×10^5 cells/ml in RPMI medium in the presence of LPS (1 µg/ml) and IFN-γ (100 ng/ml) for 24 hrs. The ability to induce allogeneic stimulation was determined by co-culturing naïve CD4⁺ T cells (1×10^5) with these potential DCs (0.5×10^4) in triplicate in a 96-well plate in a final volume of 0.2 ml in RPMI medium containing 20 U/ml IL-2 for 7 days. The level of proliferation of the CD4⁺ T cells was assessed by the bromodeoxyuridine (BrdU)-incorporation ELISA method (31).

The *in vivo* function of DCs was determined using the hu-PBL-SCID mouse system, as previously described (16). Briefly, a SCID mouse received antigen-pulsed mature DCs (5×10^5 cells) with autologous fresh PBMCs (3×10^6 cells) in a final volume of 0.1 ml in RPMI medium injected