

Z00500995 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

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

平成 17 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 岩倉 洋一郎

(東京大学医科学研究所・センター長・教授)

平成十八年三月

目次

I.研究組織	・・・・・・・・	1
II.総括研究報告		
エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究		
岩倉 洋一郎	・・・・・・・・	2
III.分担研究報告		
エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発		
岩倉 洋一郎	・・・・・・・・	6
HIV ラット感染モデルの開発		
志田 壽利	・・・・・・・・	10
SCID マウスの HIV モデル動物への応用		
小柳 義夫	・・・・・・・・	14
転写因子 AP-4 による HIV 発現抑制機構		
岡本 尚	・・・・・・・・	20
抗エイズ薬開発のためのマウス個体への感染系開発		
小糸 厚	・・・・・・・・	25
生体分子による HIV 複製抑制		
神奈木 真理	・・・・・・・・	30
IV.研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・	35
V.研究成果の刊行物・別刷	・・・・・・・・	43

I.研究組織

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

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

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

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

岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所
分子遺伝部門・教授)

小糸 厚 (熊本大学エイズ学研究センター
病態制御分野・講師)

神奈木 真理 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
免疫治療学分野)

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究

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

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでに至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、小動物を用いた新たなエイズモデルの開発を目指すと共に、抗 HIV 薬の候補分子、標的分子の解析を行った。この中で、(1) マウスの宿主障壁の一つに PIC の核移行阻害があることを見いだしていたが、今回ヒト LEDGF の導入によりマウス細胞内でもインテグラーゼが正常に核移行することがわかった。(2) ラット T 細胞で hCRM1 と hCyclinT1 を共発現させることによって HIV-1 の増殖が数十倍となることがわかった。(3) HIV Env を MuLV 粒子に取り込ませたシュードタイプウイルスを HIV レセプター発現マウスに感染させる事による新たな評価系を開発した。(4) NOG マウスの新生児肝臓内にヒト血液幹細胞を移植すると B 細胞および T 細胞の増殖が見られたことから、HIV の感染系として有望であることが示された。(5) 転写因子の AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻止し、同時に HDAC をリクルートすることによって HIV プロウイルスからの転写を抑えることを明らかにした。(6) CD8 陽性 CTL 株の培養上清から HIV 増殖抑制蛋白の精製を試み、Mycoplasma 由来の arginine deiminase である事を明らかにした。このように小動物エイズモデルの作製を進めると同時に、抗 HIV 薬の候補分子や標的分子の解析を行い、小動物モデルを用いた抗 HIV 薬の開発・評価を行うための基盤研究を押し進めることができた。

主任研究者

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・教授）

分担研究者

志田壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所教授）

小柳義夫（京都大学ウイルス研究所教授）

小糸 厚（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野講師）

岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学教授）

神奈木真理（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学分野教授）

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

この中で、

1) 岩倉は抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスの作製とともに、HIV キャリアーマウスの作製を試みる。また、これらのマウスを用いて、HIV の増殖機構や発症機構を開発する共に、病態形成に関与する種々の宿主因子について、その生理的、病理的役割を明らかにすることを目指す。
2) 志田は HIV ウイルス mRNA 形成に必要なウイルスの調節因子 Rev/Rex を支持すべきラ

A. 研究目的

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

ット因子 rCRM1 が機能しないことが、ラットでの HIV/HTLV-1 の増殖の非効率の 1 原因であることを発見した。さらに、hCRM1 を恒常的に発現させたラット細胞を作成して検討した結果、ヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産されることを明らかにした。そこで、受容体と hCRM1 を共発現する Tg ラットを作成すると共に、ラット T 細胞株におけるヒト因子の要求性と抑制因子をさらに検討し、同定された因子を発現する Tg ラットを作成することを目的とした。

3) 小糸は、APOBEC3(APO3)が逆転写の際 first-strand DNA に作用して感染性を抑制するが、HIV Vif はヒト APO3 にのみ対抗し、マウス由来のものには作用せず、HIV の宿主域がきわめて狭いことの一因となっている可能性があることから、この HIV に対する自然防御機構がげっ歯類に広く存在するか否かを明らかにするため、ラット由来 APO3 をクローニングし、その活性を検討した。

4) 小柳はヒト末梢血を移植した SCID マウス内で再現される活性化 T 細胞における HIV の感染から、その経時的な解析からウイルス産生量や病態の推移、そして候補薬剤の体内における抗ウイルス作用など多くの情報を得る技術を開発する。さらに、血液幹細胞を移植した SCID マウスを開発し、静止期 CD4 陽性 T 細胞で起きている潜伏持続感染を再現できないか検討することを目的とした。

5) 岡本は bHLH-Zip 型の転写因子である AP-4 に注目した。TGF- β や caspase 9, angiotensinogen などの遺伝子プロモーターにその結合配列が存在するが、詳細な制御機構は不明である。HIV LTR の TATA box 近傍にも AP-4 の結合配列が存在し、種々の HIV サブタイプにおいてこの結合部位がよく保存されている。そこで、HIV 発現に対する AP-4 の作用と作用機構を解明することを目的とした。

6) 神奈木は免疫 T 細胞が産生する HIV 抑制因子を新たな抗 HIV 予防治療剤候補と位置づけ、その抑制機序解明と同定を目指している。これまでに、健常者由来の CD8+ α ロ特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、抗原非特異的に HIV-1 複製抑制能を持つことを見出した。これらは主に細胞接触依存性に HIV-1 抑制活性を示すが、1 株だけは上清も HIV-1 抑制活性を示した。本年度はこの上清中の液性因子について分離同定を試みた。

B. 研究方法

岩倉：潜伏状態の HIV 遺伝子発現制御機構を解析するために、NL-4-3-1 から逆転写酵素遺伝

子部分を欠失させた遺伝子を導入した HIV-Tg マウスを用いた。マイトジェン刺激に対する HIV-Tg リンパ球の活性化状態を解析するために、野生型マウスおよび HIV-Tg の脾臓から、MACS により B 細胞(抗 B220 抗体)および T 細胞(抗 Thy1.2 抗体)を精製し、*in vitro* で B 細胞は LPS, 抗 IgM 抗体 /IL-4, PMA/ionomycin、T 細胞は ConA、抗 CD3/CD28 抗体、PMA/ionomycin により刺激した。また、マクロファージにおける HIV 発現を解析するために、4% TGC を HIV-Tg の腹腔に投与し 3 から 5 日後にマクロファージを回収し、プレート上で 4 時間接着培養を行った後に非接着細胞を PBS で洗浄することによって除き、LPS, polyI:C, R837, CpG-ODN あるいは TNF- α によって刺激した。これらのサンプルから 24 時間後に RNA を回収しリアルタイム PCR 解析を行った。

さらに、マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程を解析するために、Hela 細胞および NIH3T3 細胞に GFP-IN および pCAG-hLEDGF (ヒト LEDGF 発現ベクター)、pCAG-mLEDGF (マウス LEDGF 発現ベクター)または pCXN2 (コントロールベクター)を co-transfection し、48 時間後に共焦点顕微鏡により細胞内局在を解析した。核染色は DAPI またはヘキスト染色により行った。

2) 志田：ラット CD4⁺T 細胞株において HIV-1 の増殖に必用なヒト因子を検索するために、FPM1 細胞をレトロ/レンチベクターで transduce し、ヒト CD4 / CCR5 / CRM1 / CyclinT1 を恒常的に発現する細胞を作成した。一過性の発現は nucleofector を用いた electroporation によった。HIV の増殖は p24 ELISA によって測定した。hCCR5/hCXCR4 ゲノムを含む BAC を受精卵にマイクロインジェクションすることによって Tg ラットを作製した。

3) 小糸：Fisher, SD, Wistar ラット脾臓細胞より APO3 cDNA 全長を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。C 端に HA タグを付加して発現ベクターに組み込み、抗 HIV 活性を解析した。また逆転写産物の env 領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定、G to A mutation の導入を検討した。さらにラット APO3 の HTLV-I, MuLV の感染性への影響を検討した。

4) 小柳：ヒト末梢血移植 NOG マウスとしては、6 週齢の NOG マウスに末梢血由来単核球を腹腔内に移植後、経時的に採血し flow cytometry を用いてヒト細胞の存在を解析した。また、ヒト血液幹細胞移植 SCID マウスでは、

NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスに放射線を照射後、臍帯血より分画した CD34 陽性細胞を肝臓内へ移植した。移植後、眼窩静脈より採血し flow cytometry を用いてヒト細胞の存在を解析した。

5) 岡本： AP-4 による TBP の TATA box 結合性の変化を EMSA 法で調べた。AP-4 部位に変異を加えた種々の HIV LTR 変異体を作成し、AP-4 による HIV-1 転写に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにて定量的に調べ、siRNA によって AP-4 をノックダウンした時の効果を調べた。潜伏感染細胞内での HIV LTR DNA への AP-4, TBP, HDAC, RNA pol II などの結合をクロマチン免疫沈降法 ChIP で調べた。

6) 神奈木： HPLC を用いて CTL-3 上清をゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにより分画し、各分画について HIV-1 抑制活性を指標にスクリーニングを行った。HIV-1 抑制活性のある分画を電気泳動で展開し、切り出した蛋白バンドについてマトリックス支援レーザー励起イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いた解析を行った。

C. 研究成果

1) 岩倉らは HIV-Tg を用い、T、B 細胞、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析を行った。HIV-Tg のリンパ球は活性化刺激に対して、正常に応答できることがわかった。しかしながら、HIV 遺伝子発現は、LPS 刺激を行った B 細胞でのみ効率的に起こり、T 細胞は全ての刺激で活性化されず、B 細胞も IgM/IL-4 刺激では活性化されなかった。また、抗原特異的 T 細胞刺激を行っても、HIV 遺伝子の活性化は全く起こらなかった。この結果から、T 細胞における非効率的な HIV 発現は T 細胞サブセットの影響によるものではないことがわかった。マクロファージにおける HIV 発現は、全ての TLR リガンド及び TNF-α 刺激で効率的に見られ、発現量は LPS 刺激を行った B 細胞と同程度かそれ以上であった。一方、Hela、NIH3T3 とともに、ヒトあるいはマウス LEDGF を co-transfection することにより GFP-IN は強い核局在を示した。

2) 志田らはラット T 細胞での HIV-1 の増殖は hCRM1 と hCyclinT1 の単独発現では数倍の増強にすぎないが、共発現によって数十倍の相乗的な増強が見られることを明らかにした。また、ヒト CD4/CCR5/CRM1/CyclinT1 の 4 種を発現するラット T 細胞ではヒト molt4CCR5 の 1/3~1/10 の p24 が生産された。cyclosporinA が存在すると 5 ~ 10 倍感染効率が上がった。hCCR5/hCXCR4 を発現する Tg ラットを作成し

た。

3) 小糸らはラット APO3 のアミノ酸配列の同一性はマウス APO3 に対して 70%と、げっ歯類間でも高度の多型性を有していることを明らかにした(マウス/ヒト間の同一性は 30%程度である)。HIV の感染性は、ラット由来 APO3 存在下では Vif 非依存性に著明(100 分の 1 以下)に低下した。G to A hypermutation の導入が高頻度に確認され、deaminase 活性の存在が示唆された。HTLV-I はラット APO3 の抑制活性に対して比較的、抵抗性であった。MuLV に対してはラット APO3 は全く抑制活性を示さなかった。

4) 小柳らはヒト末梢血移植 NOG マウスではマウス血中の 60%以上が CD3 陽性 T 細胞により占められるほど効率よく構築されることを明らかにした。また、ヒト血液幹細胞をマウス新生児肝臓内に移植すると 6 週目には B 細胞を、そして、10 週目以降には T 細胞を産生することがわかった。しかし、その成功率は低かった。そこで、照射線量を増すなどの改良を行ったところ、効率的よくヒト CD3 陽性 T 細胞の産生が見られた。さらに、NOG マウスへの移植により CD3 陽性 T 細胞の構築がみられたが、その後死亡した。

5) 岡本は AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻止し、同時に HDAC をリクルートすることによって HIV プロウイルスからの転写を抑えることを明らかにした。この結果は、siRNA による AP-4 ノックダウンおよび HIV フルサイズ DNA クローンへの AP-4 結合部位欠失変異体の作成によって確認した。潜伏感染細胞株では刺激前では、AP-4 部位に AP-4 と HDAC が結合しているが、活性化により離脱し、TBP, RNA pol II がリクルートされることを証明した。

6) 神奈木は、イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにより HIV-1 抑制活性のある分画を部分精製した。この分画に含まれる複数の蛋白のうち抑制分画特異的と思われるバンドを SDS ゲルから切り出し、質量分析 (MALDI MS) によりこの蛋白をマイコプラズマ由来の arginine deiminase と同定した。CTL-3 を抗マイコプラズマ剤 MC210 で処理すると、上清による HIV-1 抑制効果は消失したが、CTL-3 細胞と自己感染細胞との共培養による HIV-1 抑制活性は温存された。

D. 考察

岩倉は、HIV-Tg マウスのリンパ球は野生型マウスのリンパ球と同様に活性化されるにも関わ

らず、HIV 遺伝子の効率的な活性化させるためには、おそらく TLR を介したシグナルが必須であり、BCR や TCR を介した抗原受容体シグナルでは不十分であることを示した。また、この非効率な活性化は転写伸長段階ではなく、転写開始段階で起こっている可能性が示唆された。これに対して、マクロファージにおける潜伏感染機構はリンパ球におけるものとは異なっている可能性が示唆された。一方、NIH3T3 における GFP-IN の細胞内局在は、ヒト LEDGF のみならずマウス LEDGF の過剰発現によっても核局在を示したことから、NIH3T3 細胞で見られた GFP-IN の細胞質局在は LEDGF の発現不足あるいはマウス LEDGF と HIV-IN の相互作用が弱いことによる可能性が示唆された。今後、ヒト LEDGF のマウス細胞における過剰発現が HIV 感染へ及ぼす影響、ヒト・マウス LEDGF と HIV-IN の相互作用の解析を行う予定である。

志田は、ラット T 細胞株を用いて HIV-1 の増殖に必需なヒト因子として CRM1 以外に CyclinT1 を同定した。さらに、CsA 感受性の阻害因子の存在を示唆した。従って、HIV-1 感受性のラットを作成するためには、hCRM1 と hCyclinT1 を発現し、CsA 感受性の阻害因子をノックダウンした Tg ラットを作成する必要がある。

小糸らは、ラット由来 APO3 にも Vif で阻害されない抗 HIV 活性が存在することを明らかとし、発生工学手法によりげっ歯類を HIV の感染モデルとするための重要な情報を得た。APOBEC を介したレトロウイルス感染制御機構はげっ歯類でも広く保存されているようであるが、MuLV はげっ歯類の deaminase に対して抵抗性のウイルスとして進化してきたと思われる。マウスとラットの分岐後、内因性レトロウイルスなど何らかの選択圧に対して net charge 変化を伴うアミノ酸配列の急速な変化が APO3 におこっているようであるが、その機構解明は今後の課題である。

小柳は、末梢血細胞移植による HIV 感受性マウス構築では複数の採血が同一個体より可能であり、Flow cytometry 解析により、ヒト細胞の経時的解析が可能であることを示した。ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の SCID マウスへの移植実験の結果、定着率の改善が可能であることがわかった。その中で NOG マウスでは CD3 陽性 T 細胞の定着が見られた。しかし、マウスの成育不全と維持が非常に困難であり、今後、さらなる検討が必要である。

岡本は、AP-4 結合部位は多くの HIV-1 サブタイプ間で共通に保存されているが、AP-4 がレトロウイルス転写を抑制する分子機構を明らかに

した。実際に、潜伏感染状態では AP-4 と HDAC 複合体が HIV プロウイルス LTR に見いだされることは、このような現象が *in vivo* でも起こっていることを強く示唆した。これらの結果は、HIV 潜伏感染の分子機構の一端を明らかにするものであり、将来の治療法への重要な示唆を与えた。

神奈木は、散発的に CTL 上清に認められた HIV-1 抑制効果は培養中に混在した *Mycoplasma* 由来の arginine deiminase の効果であることを示した。MC210 の添加により上清の HIV-1 抑制効果は消失したが、CTL の細胞接触依存性の HIV-1 抑制効果は温存されたことから、細胞接触依存性の HIV-1 抑制効果は *mycoplasma* とは無関係の別の機序によるものと考えられる。Arginine deiminase は、arginine 依存性の悪性腫瘍に対する抗がん剤として臨床応用が試みられている。本研究結果から、本酵素抗 HIV-1 剤としての応用可能性が示された。

E. 結論

マウスやラットの HIV 感受性宿主障壁因子をヒト型化する試みは着実に進んでおり、ほかに、NOG-*hu* マウスや MuLV pseudo virus の系も開発されつつある。また、HIV ウイルスゲノムの転写における AP-4 の役割が明らかにされると共に、CTL 由来 HIV 抑制因子の精製、同定も進んでいる。今後、これらの成果を組み合わせ、個体レベルでの抗エイズ薬評価系を構築する予定である。

F. 研究業績

各分担研究報告書に記載した。

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発

所属 東京大学医科学研究所 ヒト疾患モデル研究センター 細胞機能研究分野
分担研究者 岩倉 洋一郎

研究要旨

エイズ治療はHAART治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでには至っていない。本研究では、新しい治療法の開発に資するため、潜伏ウイルスの活性化機構について検討を加えるとともに、新たなエイズモデルの開発を試みた。我々はこれまで、HIV遺伝子導入トランスジェニックマウス (HIV-Tg) をHIVの潜伏感染モデルとして用いることにより、HIVの主要な標的細胞であるT細胞及びマクロファージにおけるHIV遺伝子発現制御機構について解析した。その結果、HIV-Tg T細胞のmitogenに対する反応性は野生型マウスと同じく正常に活性化されるにも関わらず、T細胞ではほとんどHIV遺伝子の活性化が起こらないことがわかった。一方、HIV-Tgのマクロファージにおいては、LPSの他、polyI:Cやimidazoquinoline, CpG-ODNなどほぼ全てのTLRリガンド及びTNF- α などのサイトカインによりHIV遺伝子の発現誘導が見られた。また、B細胞のLPS刺激時におけるHIV発現はDNAメチル化阻害剤である5-アザシチジン进行处理することにより上昇するが、マクロファージでは影響がなかった。これらの結果から、HIV-Tgにおける潜伏感染のメカニズムは細胞種ごとに異なる可能性が示唆された。また、我々はマウス細胞における新たな宿主域バリアとして、HIV pre-integration complex (PIC) の核移行過程が障害されていることを見いだしているが、本年度はインテグラーゼの核移行に関与することが示唆されている宿主因子の一つのLEDGFをヒト型化することにより、マウス細胞内でもインテグラーゼが正常に核移行することを示した。

A. 研究目的

抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスの作製とともに、HIV キャリアーマウスの作製を試みている。また、これらのマウスを用いて、HIV の増殖機構や発症機構を開発する共に、病態形成に関与する種々の宿主因子について、その生理的、病理的役割を明らかにすることを目指している。

1) HIV-Tgのリンパ球、マクロファージにおけるHIV遺伝子発現制御機構の解析

我々はこれまで、HIVキャリアーモデルマウスとしてHIV遺伝子導入トランスジェニックマウス(HIV-Tg)を作製し、このマウスの脾臓ではLPS刺激に伴いHIV遺伝子の発現誘導が起き、これには細胞増殖に依存したLTRU3中のCREB/ATF結合領域のCpG脱メチル化が重要な役割を果たしているということを示してきた。この時、HIV遺伝

子の発現細胞を調べたところ、ほとんどはB細胞に起因するもので、T細胞からの寄与はB細胞の1/10程度しかないと明らかにした。また、HIV-Tgの脾細胞を種々のT細胞マイトジェンで刺激しても、発現誘導はほとんど起きず、これはDNAメチル化阻害剤の5-アザシチジン (5-AC)存在下でも同様であった。このことから、HIV-TgのT細胞ではHIV遺伝子の発現抑制が起こっている可能性が示唆された。そこで本年度はHIV-Tgリンパ球のマイトジェン刺激に対する応答性を更に詳細に解析することを目的として、HIV-Tgリンパ球の刺激に対する応答性を野生型マウスと比較するとともに、HIV-Tg活性化に重要なシグナル経路を明らかにするためにHIV-TgのB細胞およびT細胞の種々の刺激に対する活性化機構の解析を行った。更に、HIVの主要な標的細胞の一つであるマクロファージにおけるHIV遺伝子発現制御機構の解析を行った。

2) マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程の解析

これまで、マウス細胞においてはインテグラーゼが核局在せずこれが PIC の非効率的な核移行の原因である可能性を示した。本年度はインテグラーゼの核局在に關与することが報告されている LEDGF の、マウス細胞におけるインテグラーゼの細胞内局在に対する影響を検討した。

B. 研究方法

1) HIV-Tg のリンパ球、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

マイトジェン刺激に対する HIV-Tg リンパ球の活性化状態を解析するために、野生型マウスおよび HIV-Tg の脾臓から、MACS により B 細胞(抗 B220 抗体)および T 細胞(抗 Thy1.2 抗体)を精製し、*in vitro*で B 細胞は LPS, 抗 IgM 抗体/IL-4, PMA/ionomycin, T 細胞は ConA, 抗 CD3/CD28 抗体, PMA/ionomycin により刺激し、24 および 48 時間後にそれぞれの増殖活性をトリチウムチミジンの取り込みにより評価した。HIV-Tg の B 細胞および T 細胞の種々のマイトジェンに対する HIV 遺伝子発現を解析するために、脾臓から MACS により精製した B 細胞および T 細胞を *in vitro* でマイトジェンで刺激し、3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後に RNA を回収し、リアルタイム PCR 解析を行った。また、48 時間後の培養上清について、p24 ELISA を行い、ウイルス粒子の産生を計測した。

HIV-Tg のメモリー T 細胞の抗原特異的な刺激に対する HIV 遺伝子発現を解析するために、HIV-Tg の足跡をメチル化 BSA/完全フロイドアジュバントで感作し、その一週間後に単径および膝下のリンパ節を回収しリンパ節細胞を調製し、*in vitro* でメチル化 BSA 存在下で培養し、24, 48, 72 時間後に RNA を回収しリアルタイム PCR 解析を行った。また、48 時間後の培養上清について、p24 ELISA を行い、ウイルス粒子の産生を計測した。

UV 照射が HIV-Tg のリンパ球における HIV 遺伝子発現へ及ぼす影響を解析するために、脾臓から MACS により精製した B 細胞および T 細胞を 1mJ/cm² の UV 照射後、無刺激あるいは IgM/IL-4 (B 細胞)、LPS (B 細胞)、抗 CD3/CD28 抗体 (T 細胞) 存在下で 48 時間後に RNA および培養上清を回収し、リアルタイム PCR 解析および p24 ELISA 解析を行った。

マクロファージにおける HIV 発現を解析するために、4% TGC を HIV-Tg の腹腔に投与し 3 から 5 日後にマクロファージを回収し、プレート上で 4 時間接着培養を行った後に非接着細胞を PBS で洗浄することによって除き、

LPS, polyI:C, R837, CpG-ODN あるいは TNF- α によって刺激した。24 時間後に RNA を回収しリアルタイム PCR 解析を行った。HIV 発現の経時変化を解析するために、LPS 刺激後 1.5, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後の RNA を回収し、リアルタイム PCR 解析を行った。また、マクロファージでの HIV 発現における DNA メチル化の影響を解析するために、5-AC 存在下で LPS 刺激を行い 6 時間後の HIV 発現をリアルタイム PCR 解析により検討した。

2) マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程の解析

Hela細胞および NIH3T3細胞に GFP-IN および pCAG-hLEDGF (ヒト LEDGF 発現ベクター)、pCAG-mLEDGF (マウス LEDGF 発現ベクター) または pCXN2 (コントロールベクター) を co-transfection し、48 時間後に共焦点顕微鏡により細胞内局在を解析した。核染色は DAPI または ヘキスト染色により行った。

C. 研究結果

1) HIV-Tg のリンパ球、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

野生型マウスと HIV-Tg の B 細胞および T 細胞のマイトジェンに対する反応性をトリチウムチミジンの取り込みで比較したところ、両者は同様の増殖傾向を示した。このことから、HIV-Tg のリンパ球は活性化刺激に対して、正常に応答できることがわかった。

しかしながら、HIV-Tg のリンパ球のマイトジェン刺激による HIV 遺伝子発現は、LPS 刺激を行った B 細胞でのみ効率的に起こり、T 細胞は全ての刺激で活性化されず、B 細胞も IgM/IL-4 刺激活性化されなかった。

また、メチル化 BSA による抗原特異的 T 細胞刺激を行っても、HIV 遺伝子の活性化は全く起こらなかった。この結果から、T 細胞における非効率的な HIV 発現は T 細胞サブセットの影響によるものではないことがわかった。

さらに、UV 照射が HIV 遺伝子発現に及ぼす影響を解析したところ、B 細胞に UV 刺激とともに LPS 刺激を行ったものでは LPS 単独の時と比較して約 2 倍の活性化が見られたものの、T 細胞からの活性化は全ての刺激で見られなかった。

マクロファージにおける HIV 発現は、全ての TLR リガンド及び TNF- α 刺激で効率的に見られ、発現量は LPS 刺激を行った B 細胞と同程度かそれ以上であった。

LPS 刺激による HIV 遺伝子の発現は脾細胞および B 細胞においては 24 から 48 時間後にピークに達したのに対し、

マクロファージでは6時間後にピークに達した。

LPS刺激によるマクロファージからのHIV発現は5-AC処理群と未処理群で同程度の活性化を示した。

2) マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程の解析

Hela, NIH3T3 とともに、ヒトあるいはマウス LEDGF を co-transfection することにより GFP-IN は強い核局在を示した。

D. 考察

1) HIV-Tg のリンパ球、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

UV 照射は、HIV 遺伝子の転写伸長因子である P-TEFb の抑制因子である 7SK-RNA の P-TEFb からの解離を促進し、P-TEFb の活性化を誘導する刺激であることから、LPS 以外の刺激で HIV 遺伝子の発現誘導が非効率的なのは転写伸長以前、恐らく転写開始の障害である可能性が示唆された。以上のことから、HIV-Tg のリンパ球は野生型マウスのリンパ球と同様に活性化されるにも関わらず、HIV 遺伝子の効率的な活性化させるためには、LPS おそらく TLR を介したシグナルが必須であり、BCR や TCR を介した抗原受容体シグナルでは不十分であることが示唆された。また、この非効率的な活性化は転写伸長段階ではなく、転写開始段階で起こっている可能性が示唆された。従来、マウス細胞における非効率的 HIV 遺伝子の転写は伸長段階の障害によるものであり、これはヒト cyclinT1 を導入することにより回復することが培養細胞レベルで示されてきた。今回 HIV-Tg で見られた結果は、LPS 刺激時のみヒト cyclinT1 非依存的に効率的な転写伸長が起こったという可能性も排除できない。現在、ヒト cyclinT1 トランスジェニックマウスと HIV-Tg を交配させたダブルトランスジェニックマウスを用いて、HIV-Tg 活性化におけるヒト cyclinT1 依存性を解析している。

一方、マクロファージにおける HIV 発現は LPS を含め全ての TLR リガンド刺激によって効率的に誘導された。更に、HIV-Tg のリンパ球ではほとんど HIV 発現を誘導できない TNF- α によっても TLR リガンドと同等の HIV 遺伝子発現誘導が見られたとともに、5-AC 処理が LPS 刺激時の HIV 発現に影響を及ぼさなかったことから、マクロファージにおける潜伏感染機構はリンパ球におけるものとは異なっている可能性が示唆された。

2) マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過

程の解析

NIH3T3 における GFP-IN の細胞内局在は、ヒト LEDGF のみならずマウス LEDGF の過剰発現によっても核局在を示したことから、NIH3T3 細胞で見られた GFP-IN の細胞質局在は LEDGF の発現不足あるいはマウス LEDGF と HIV-IN の相互作用が弱いことによる可能性が示唆された。現在、ヒト LEDGF のマウス細胞における過剰発現が HIV 感染へ及ぼす影響、ヒト・マウス LEDGF と HIV-IN の相互作用の解析を行っている。

E. 結論

1) HIV-Tg のリンパ球、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

HIV-Tg では、宿主ゲノム中の同じ場所に HIV 遺伝子が挿入されているにもかかわらず、リンパ球とマクロファージ、あるいはリンパ球の中でも B 細胞と T 細胞で全く異なる HIV 誘導能が見られた。これは、潜伏感染および再活性化のメカニズムを考える上で非常に興味深い。今後、これら細胞種ごとの潜伏・再活性化のメカニズムを詳細に分子レベルで解明することにより、HAART 療法下の問題点である潜伏感染細胞や薬剤耐性ウイルスを標的とした新たな抗 HIV 薬開発が期待される。

2) マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程の解析

マウス細胞に LEDGF を過剰発現させることにより、HIV-IN はヒト細胞と同様に核に局在するようになった。このことは、LEDGF の過剰発現がマウス細胞における非効率的な HIV 感染能を上昇させる可能性を示唆している。このような細胞あるいはマウスを作成することにより、よりヒトに近い HIV 感受性マウスが得られるものと期待される。

F. 研究業績

論文発表

1. Tanabe, M., Matsumoto, T., Shibuya, K., Tateda, K., Miyazaki, S., Nakane, A., Iwakura, Y., and Yamaguchi, K. Compensatory response of IL-1 gene knockout mice after pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 7-13 (2005).
2. Wakabayashi, T., Hu, D. L., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Iwakura, Y., Hanada, K., and Nakane, A. IFN- γ and TNF- α are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice. *Immunol. Cell Biol.*, **83**, 18-24 (2005).

3. Kohu, K., Sato, T., Ohno, S., Hayashi, K., Uchino, R., Abe, N., Nakazato, M., Yoshida, N., Kikuchi, T., Iwakura, Y., Inoue, Y., Watanabe, T., Habu, S., and Satake, M. Over-expression of the Runx3 transcription factor increases the proportion of mature thymocytes of the CD8 single positive lineage. *J. Immunol.*, **174**, 2627-2636 (2005).
4. Isoda K, Sawada S, Ayaori M, Matsuki T, Horai R, Kagata Y, Miyazaki K, Kusuhara M, Okazaki M, Matsubara O, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty-liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice. *J. Biol. Chem.*, **280**, 7002-7009 (2005).
5. Shinohara, H., Inoue, A., Toyama-Sorimachi, N., Nagai, Y., Yasuda, T., Suzuki, H., Horai, R., Iwakura, Y., Yamamoto, T., Karasuyama, H., Miyake, K., and Yamanashi, Y. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J. Exp. Med.*, **201**, 333-339 (2005).
6. Horino, T., Matsumoto, T., Uramatsu, M., Tanabe, M., Tateda, K., Miyazaki, S., Nakane, A., Iwakura, Y., and Yamaguchi, K. Interleukin-1-deficient mice exhibit high sensitivity to gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cytokine*, **30**, 339-346 (2005).
7. Matsuki, T., Isoda, K., Horai, R., Nakajima, A., Aizawa, Y., Suzuki, K., Ohsuzu, F., and Iwakura, Y. Involvement of TNF α in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation*, **112**, 1323-1331 (2005).
8. Zhou, F., He, X., Iwakura, Y., Horai, R., and Stuart, J. M. Arthritis in mice that are deficient in IL-1 receptor antagonist is dependent on genetic background. *Arth. Rheum.*, **52**, 3731-3738 (2005).
9. Shimizu, M., Shimamura, M., Owaki, T., Asakawa, M., Fujita, K., Kudo, M., Iwakura, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J. Immunol.*, in press.
10. Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Araki, M., Ishi, T., Ishida, Y., Tanuma, S., Tanabe, K., Toma, Horai, R., Iwakura, Y., and Abe, R. Presence of CD28-dependent and independent pathways in autoimmune arthritis developed in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arth. Rheum.*, **54**, 473-481 (2006).
11. Deng, X., Yu, Z., Funayama, H., Shoji, N., Sasano, T., Iwakura, Y., Sugawara, S., and Endo, Y. Mutual augmentation of the induction of the histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, between alendronate and immuno-stimulants (IL-1, TNF, and LPS), and its prevention by clodronate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press.
12. Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, **18**, 399-407 (2006).
13. Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and Iwakura, Y. The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. Ernst Schering Res. Found. Workshop, **56**, 129-153 (2006).
14. Vonk, A. G., Netea, M. G., van Krieken, J. H., Iwakura, Y., van der Meer, J. W. M., and Kullberg, J. B. Endogenous interleukin-1 α and interleukin-1 β are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*, in press.
15. Chida, D., Osaka, T., Hashimoto, O., and Iwakura, Y. Combined IL-6 and IL-1 deficiency causes obesity in young mice. *Diabetes*, in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

HIV ラット感染モデルの開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

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

A 研究目的

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

我々は、ウイルス mRNA 形成に必要なウイルスの調節因子 Rev を支持すべきラット因子 rCRM1 が機能しないことが、HIV の増殖の非効率の1原因であることを発見した。そして、平成16年度において、ラット上皮細胞株に hCRM1 を恒常的に発現させて検討した結果、①内在性の rCRM1 は dominant-negative に働かない、②hCRM1

の発現でラット細胞の増殖阻害は起こらない、③ウイルス粒子形成段階での非効率はない、④ヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産される、ことを明らかにした。また、hCRM1 を発現させたトランスジェニック(Tg)ラットを作成して、ex vivo の T 細胞に HTLV-1 を感染させたところ、ヒト T 細胞と同等に増殖することが分かった。このことは hCRM1 トランスジェンがラット体内でも機能し、hCRM1 Tg ラットに受容体を発現させることによって HIV が増殖できるようになる可能性を示唆している。

そこで今年度は上記の Tg ラットを作成すると共に、ラット T 細胞株におけるヒト因子の要求性と抑制因子をさらに検討し、同定された因子を発現するトランスジェニックラットを作成することを目的とした。

B 研究方法

細胞：ヒト T 細胞として Jurkat, Molt4CCR5 細胞を、ラット T 細胞として FPM1 細胞を用いた。

プラスミド：Gag 発現のために pNLΔpol,

CRM1 発現のために pSR α CRM1, h&rCyclinT1 発現のために pCN2h & r cyclinT1, 感染性 HIV 全長ゲノムを持つプラズミドとして pNL432, pNL43AD8GFP と pJR-CSF を用いた。

遺伝子導入：一過性の発現には nucleofector を用いた electroporation 法によった。FPM1 には program T-03, Jurkat には C-16, Molt4CCR5 には A-30 で行った。遺伝子導入細胞株を作成するために MX レトロベクター、CS レンチベクターを用いた。

C 研究成果

ラット T 細胞における Gag 生産に必要な因子の検討

ラット CD4⁺T 細胞株で HIV-1 の増殖に必要なヒト因子を検索するために HTLV-1 で transform された FPM1 細胞を用いた。まず、レトロベクターを用いて hCRM1 を恒常的に発現する FPM1hCRM1 細胞を作成した。この細胞は HTLV-1 の Gag 蛋白質を親株の約 1000 倍産生するようになり、導入した hCRM1 が十分機能している。次いでヒト T 細胞の Jurkat, FPM1, FPM1hCRM1 細胞にヒト又はラット CyclinT1 を electroporation で導入することにより、HIV-1 の Gag 蛋白質の生産を p24 ELISA 法によって測定した (図 1)。

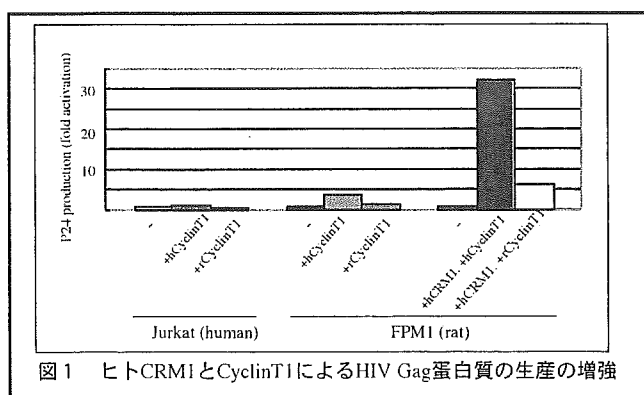


図 1 ヒト CRM1 と CyclinT1 による HIV Gag 蛋白質の生産の増強

その結果、hCRM1 と hCyclinT1 の単独発現では数倍の増強にすぎないが、共発現によって数十倍の相乗的な増強が見られた。

次に、これらの細胞にレトロとレンチベクターを用いてヒト CD4 と CCR5 を恒常的に発現させ、HIV-1 JR-CSF 株を感染させてウイルスの生産を Gag p24ELISA によって測定した (図 2)。その結果、ヒト CD4/CCR5/CRM1/CyclinT1 の 4 種を発現するラット T 細胞はヒト molt4CCR5 の 1/3~1/10 の p24 を生産することが分かった。

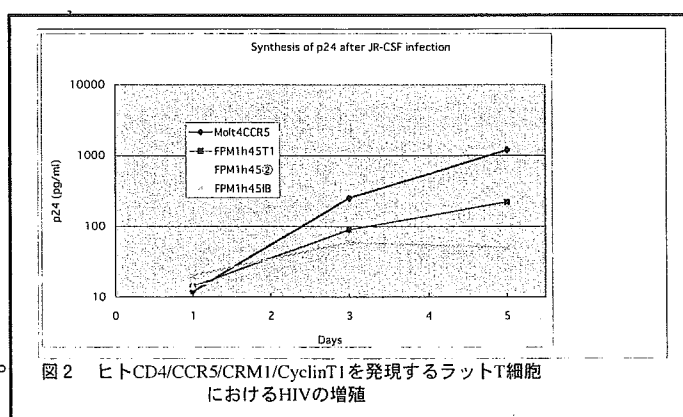
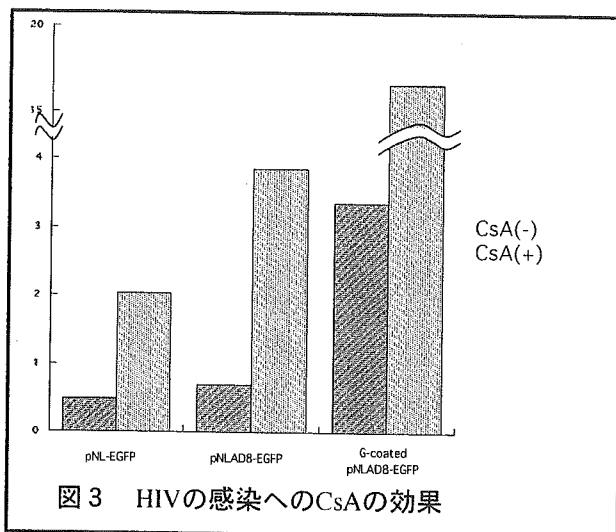


図 2 ヒト CD4/CCR5/CRM1/CyclinT1 を発現するラット T 細胞における HIV の増殖

HIV-1 感染の阻害因子の検討

猿細胞において HIV-1 感染の阻害因子 Trim5 α が報告されている。Trim5 α は cyclophilinA と共同して働くために、cyclosporinA (CsA) を添加することによって猿細胞に HIV-1 が感染できるようになる。そこで、感染時における CsA の効果を調べた。感染すると GFP を発現する NL43AD8GFP ウイルスを用い、GFP⁺ 細胞数を FACS でカウントすることによって感染効率を測定した (図 3)。その結果、CsA が存在すると 5~10 倍感染効率上がる事が分かった。



トランスジェニックラットの作成

受容体である CCR5 はメモリーT細胞と DC/マクロファージに多く発現し、CXCR4 はナイーブT細胞にも発現している。この違いがエイズの発症を引き起こすウイルスとしての X4 型と初期感染の責任ウイルスとしての R5 型の性質を規定していると言われている。従って CCR5/CXCR4 のヒトと同様の発現をラット内でも再現することが望ましい。そこで発現制御領域を全て含むと予想されるそれぞれの BAC クローンをマイクロインジェクションすることによって Tg ラットを作成した。脾臓や末梢血中の T細胞においてそれぞれのトランスジェンの発現を確認した。

D 考察

今年度はラット T細胞株を用いて HIV-1 の増殖に必要なヒト因子として CRM1 以外に CyclinT1 を同定した。さらに、CsA 感受性の阻害因子の存在を示唆した。従って、HIV-1 感受性のラットを作成するためには、hCRM1 と hCyclinT1 を発現し、CsA 感受性の阻害因子をノックダウンした Tg

ラットを作成する必要がある。

E 結論

HIV-1 感受性のラットを作成するためには、hCRM1 と hCyclinT1 を発現し、CsA 感受性の阻害因子をノックダウンした Tg ラットを作成する必要がある。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kidokoro, M, Tashiro, M, and Shida H. (2005): Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 4152-4157.
- (2) Zhang, X, Hakata, Y, Tanaka, Y, and Shida H. : CRM1, an RNA transporter, is a major species-specific restriction factor of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) in rat cells. Microbes and Infection. In press

2. 学会発表

高柳亮、大橋貴、志田壽利 : hCRM1 トランスジェニックラットにおける HTLV-1 増殖の解析、日本ウイルス学会 2005, 横浜

張 險 法、志田壽利 : CRM1, an RNA transporter, is a major species-specific barrier of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)、日本ウイルス学会 2005, 横浜

岡村智崇、志田壽利、長谷川篤彦、山本直樹、本多三男 : 高発現型ワクシニア Promoter を用いた高度弱毒化ワクシニア DIs の至適化、日本ウイルス学会 2005, 横浜

木所稔、田代真人、志田壽利： Novel genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8.、国際ウイルス学会2005、サンフランシスコ

北島正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井深、水野喬介、木所稔、

志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法： SARS コロナウイルスの全構造蛋白質発現型遺伝子組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討、日本ウイルス学会2005、横浜

G 知的所有権の取得状況
無し

分担研究報告書：

研究項目：SCID マウスの HIV モデル動物への応用
分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

HIV 感染による生体内における病態モデルと新規治療薬の評価系として免疫不全 (SCID) マウスへのヒト末梢血ならびに造血細胞移植によるヒトキメラマウスの実験法開発を試みた。ヒト末梢血単核球を生後 6 週の NOG マウス腹腔内に、あるいは、ヒト CD34 陽性細胞を NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウス新生児肝臓内に移植し、ヒト細胞の構築効率を検討した。その結果、ヒト末梢血移植 NOG (hu-PBL-NOG) マウスでは、移植後 4 週目まで、マウス血中の 60%以上が CD3 陽性 T 細胞により占められるほど効率よくヒト細胞が構築され、それらの細胞は CCR5 強陽性 CD4 陽性 T 細胞群であることがわかった。また、ヒト CD34 陽性細胞を NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウス新生児肝臓内に移植後 6 週目には Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスの末梢血において CD19 陽性 B 細胞を、そして、10 週目以降には CD3 陽性 T 細胞を産生するマウスが得られた。しかし、その成功率は 26 匹中わずか 4 匹ときわめて低かった。そこで、移植 CD34 陽性細胞と放射線照射量の増加を行ったところ、15 週目までにはほとんどのマウスにきわめて効率的よくヒト CD3 陽性 T 細胞の産生が見られたが、これらのヒト細胞は 6 ヶ月以上の長期にわたり定着していることはなかった。さらに、NOG 新生児マウスに移植を行った。ほとんどすべてのマウスに 10 週目には CD3 陽性 T 細胞の構築がみられたが、移植後 15 週目から 21 週目までには死亡し、移植法の改善が必要であることがわかった。

A. 研究目的

本研究は抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発を目的としている。現在まで我々が開発した末梢血を移植した hu-PBL-NOD-SCID マウス内で再現されるのは活性化 T 細胞における HIV の感染であり (Miura, & Koyanagi, *JEM*, 2001, Nakata, & Koyanagi, *JV*, 2005)、さらに、その経時的な解析からウイルス産生量や病態の推移、そして候補薬剤の体内における抗ウイルス作用など多くの情報を得ることができると考えられる。

しかし、一方 hu-PBL-NOD-SCID マウスでは移植後 2 ヶ月目には構築されたヒトリンパ球により Graft-Versus-Host Disease (GVHD) が起こり、長期間にわたる感染宿主の経過観察は不可能である。また、治療が困難な静止期 CD4 陽性 T 細胞で起きている潜伏持続感染を再現できない。そこで、ヒト血液幹細胞移植マウスの確立も必要であ

ると考えた。潜伏持続感染は HIV 感染者血液を使った研究から、少なくとも DR 陰性の静止期 CD4 陽性 T 細胞で起きていることが知られているが、これらの細胞への感染機構はほとんど解明されていない。そこで、我々が T B 細胞欠損だけでなくコモンγ鎖遺伝子のノックアウトにより NK 細胞を欠損する新たな免疫不全マウスを作出し、血液幹細胞移入により 4 ヶ月以上にわたりマウス内にヒトリンパ球の成熟分化が可能であることを見出した (Ito, Koyanagi, & Nakahata, *Blood*, 2002) 実験系をさらに利用することとした。最終目的は、長期にわたり抗エイズ薬の評価が可能なモデル動物を研究開発することである。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

- 1) ヒト末梢血移植 NOG マウス (hu-PBL-NOG マウス)
6 週齢の NOG マウスにヒト正常人末梢血

由来単核球 (1×10^7 個) を腹腔内に移植後、経時的に眼窩静脈より採血し flow cytometry を用いてヒト細胞の存在を解析した。用いた抗体は APC 標識抗マウス CD45 単クローン抗体 (mAb), FITC 標識抗ヒト CD45 mAb, PE 標識抗ヒト CD19 mAb, PC5 標識抗ヒト CD19 mAb である。すべて DAKO 社 (京都) より購入した。

2) ヒト血液幹細胞移植 SCID マウス

NOG、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} 新生児マウスに出産後 24 時間以内に 1.2, 2.4 あるいは 3.5 Gy の放射線を照射後、臍帯血より autoMACS 自動磁気細胞分離装置により分画した CD34 陽性細胞 (陽性率 95% 以上、 $1-4 \times 10^5$ 個) を肝臓内へ移植した。移植後、6 週目に眼窩静脈より採血し flow cytometry を用いてヒト細胞の存在を解析した。用いた抗体は上記の APC 標識抗マウス CD45 mAb, FITC 標識抗ヒト CD45 mAb, PE 標識抗ヒト CD19 mAb, PC5 標識抗ヒト CD19 mAb である。

(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、採血を行いマウスへの移植実験に使用した。

C. 研究結果

1) ヒト末梢血移植 NOG マウスの経時的解析

hu-PBL-NOD-SCID マウスに移植後 9 日、16 日、24 日、31 日目に経時的にマウス末梢血のヒト細胞構築効率を検討したところ、16 日以降は構築されるヒト細胞はほとんど CD3 陽性 T 細胞であった (図 1)。そして、このヒト細胞の構築は新鮮血にかぎらず、凍結末梢血単核球の移植によっても得られることがわかり (結果示さず)、一定の実験を繰り返し施行できることがわかった。また、これらの細胞のなかで CD4 陽性 T 細胞はほとんど CCR5 強陽性の細胞群であった (結果示さず)。

2) 新生児免疫不全マウスへの臍帯血移植実験

未分化なヒト血液幹細胞を含む CD34 陽性細胞、そして、GVHD の原因となる Xenoreactive ヒト T 細胞の混入を防ぐ方法として、臍帯血より CD34 陽性細胞を分離し、免疫不全マウスへ骨髄移植実験を行った。移植レシピエントとして T B 細胞欠損に加え NK 細胞を完全欠損する NOG、あるいは、Manz らの研究グループの報告 (*Science* 304:104-107, 2004) で使用された Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスを用いた。その結果、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスでは移植後 6 週目にはヒト CD45 陽性細胞群が全単核細胞中の 3-7% を占め、その多くはヒト CD19 陽性 B 細胞であること、さらに、10 週目以降には CD3 陽性 T 細胞が構築されることがわかった。しかし、その構築成功例は 26 匹中わずか 4 匹ときわめて低いことがわかった (表 1 A の Exp1-6)。そこで、照射量を 3.5 Gy に増量、移植臍帯血 CD34 陽性細胞数も増量し 8.25×10^5 個として、実験を行ったところ、7 匹中 5 匹において、効率的なヒト細胞の構築がみられた (表 1A の Exp7)。さらに、15 週目に CD3 陽性 T 細胞も 0.6-6.2% となった (表 1B)。さらに、長期的なヒト細胞の維持が可能か明らかにするために、移植後 28 週あるいは 45 週目のマウス末梢血におけるヒト細胞陽性率を検討したところ、28 週では 7 匹中 1 匹のみが、45 週ではヒト細胞陽性マウスは見出すことができなかった (表 1B)。

一方、NOG 新生児マウスに照射量を 1.2 Gy に減量し、同様の実験を行ったところ、マウスが移植後、5 匹中すべてに移植後 15 週までにヒト CD3T 細胞を含むヒト細胞の構築がみられたが、15 週から 21 週目までには生育不全を呈し、すべて衰弱死した (表 1 A と表 2)。

D. 考察

本研究は小型動物を用いた抗エイズ薬の治療効果評価系開発のなかで、免疫不全マウスである SCID マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウスへの HIV 感染実験のひとつとして T 細胞 B 細胞に加え NK 細胞

も欠損する NOG マウス、あるいは、Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} マウスにヒト細胞を移植し、ヒトキメラ実験系を確立させたものである。

末梢血細胞移植による HIV 感受性マウス構築法 (Koyanagi, *JV*, 1997, Miura, & Koyanagi, *JEM*, 2001, Miura, & Koyanagi, *PNAS*, 2003) では、2ヶ月以上にわたる長期観察は GVHD のため不可能である。しかし、今回の結果より、この GVHD を起こす前の期間内であれば複数の採血が同一個体より可能であり、採血試料の Flow cytometry 解析により、ヒト細胞の経時的解析が可能であることが分かった。

しかし、このヒト末梢血移植 SCID マウスではさらに長期にわたるヒト細胞の解析は不可能であることより、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の SCID マウスへの移植実験を行った。これまで報告がある Balb/c Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウスでは、ヒト細胞の定着率がきわめて低いこと、さらに放射線量と移植細胞数の増加により、定着率の改善が可能であることがわかった。しかし、ヒト T 細胞産生が認められたマウス個体においても、3 から 6 ヶ月以上にわたるヒト細胞の維持は得られなかった。この系統マウスに比べ、NOG マウスではきわめて効率よく CD3 陽性 T 細胞を含むヒト細胞の定着が見られた。しかし、マウスの成育不全ならびに維持が非常に困難であり、15 週から 21 週目までには死亡した。おそらく、移植時の放射線による発育障害と考えられる。今後、放射線量のさらなる検討と移植法の改良が必要である。

E. 結論

小型動物を用いた抗エイズ薬の効果評価系確立に向けて一定の学問的進歩が得られた。

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

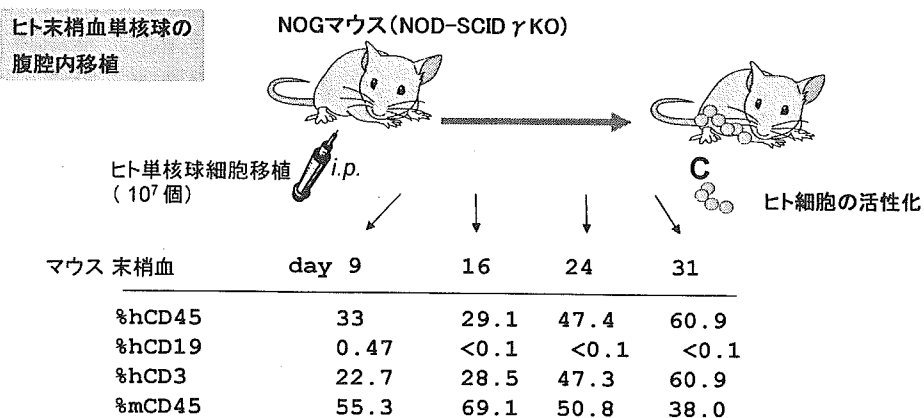
G. 研究発表

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/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* **79**, 2087–2096 (2005).
 - 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.* **21**, 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., Koderia 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

図1. Hu-PBL-NOGマウスのヒト細胞の経時的変化



hCD45:ヒトCD45陽性細胞率
 hCD45:ヒトCD19陽性細胞率
 hCD45:ヒトCD3陽性細胞率
 mCD45:マウスCD45陽性細胞率

2週目以降はT細胞のみで占められている

表1. A
 SCIDマウスへ
 CD34陽性細胞の移植実験

Transplantation protocol						Analysis after transplantation			survival weeks
Exp.#	ID#	Strain	cell numbers	radiation dose (Gy)	pup sex	Percent of huCD45 ⁺ cells at indicated weeks			
Exp.1	1	Rag2KO	40,000	2.4	♂	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 45
	2	Rag2KO	40,000	2.4	♀	7.4	12	24	> 45
	3	Rag2KO	40,000	2.4	♀	0.4	< 0.01	< 0.01	> 45
Exp.2	4	Rag2KO	40,000	2.4	♀	0.5	1	0.4	44
	5	Rag2KO	40,000	2.4	♀	3.2	4	3	44
	6	Rag2KO	40,000	2.4	♀	0.5	< 0.01	< 0.01	38
	7	Rag2KO	40,000	2.4	♀	< 0.01	< 0.01	< 0.01	44
Exp.3	8	Rag2KO	37,500	2.4	♀	4.4	14	15.5	36
	9	Rag2KO	37,500	2.4	♀	0.3	1	0.6	37
	10	Rag2KO	37,500	2.4	♀	< 0.01	< 0.01	< 0.01	37
	11	Rag2KO	37,500	2.4	♀	1	0.6	< 0.01	37
Exp.4	12	Rag2KO	15,000	2.4	♂	0.5	< 0.01	0.5	35
	13	Rag2KO	15,000	2.4	♂	< 0.01	< 0.01	< 0.01	35
	14	Rag2KO	15,000	2.4	♂	0.5	1	< 0.01	34
	15	Rag2KO	15,000	2.4	♂	0.8	< 0.01	< 0.01	34
	16	Rag2KO	15,000	2.4	♀	2.4	1.1	0.2	> 37
Exp.5	17	Rag2KO	20,000	2.4	♂	0.5	0.8	0.8	33
	18	Rag2KO	20,000	2.4	♂	1	1.2	0.3	33
	19	Rag2KO	20,000	2.4	♂	1	2.4	0.3	> 37
	20	Rag2KO	20,000	2.4	♂	< 0.01	0.7	0.2	> 37
	21	Rag2KO	20,000	2.4	♀	1	6.1	5.6	33
Exp.6	22	Rag2KO	75,000	2.4	♂	< 0.01	< 0.01	ND	13
	23	Rag2KO	75,000	2.4	♂	2.4	4	1.1	> 36
	24	Rag2KO	75,000	2.4	♀	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 36
	25	Rag2KO	75,000	2.4	♀	1	2.6	0.9	> 36
	26	Rag2KO	75,000	2.4	♀	1	2	0.5	> 36
Exp.7	27	Rag2KO	82,500	3.5	♂	7.5	13.4	0.9	> 28
	28	Rag2KO	82,500	3.5	♂	1.1	3.6	6.3	> 28
	29	Rag2KO	82,500	3.5	♂	2	1.3	3.0	> 28
	30	Rag2KO	82,500	3.5	♂	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 28
	31	Rag2KO	82,500	3.5	♂	11.3	10.9	19.4	> 28
	32	Rag2KO	82,500	3.5	♀	< 0.01	< 0.01	< 0.01	26
	33	Rag2KO	82,500	3.5	♀	17.1	19	8.8	26
	34	NOG	38,000	1.2	♂	1.2	0.5	ND	15
Exp.8	35	NOG	38,000	1.2	♂	6.2	8.2	11.3	21
	36	NOG	38,000	1.2	♂	7.9	9.3	NT	17
	37	NOG	38,000	1.2	♂	9.3	9.8	11.8	18
	38	NOG	38,000	1.2	♀	NT	0.5	1.4	18

ND: Not done NT: Not test