

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

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18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19（2007）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) 田中勇悦：ヒト IL-4 産生 SCID マウスを用いた X4 HIV-1 感染実験動物モデルの開発と新規薬剤効果評価系への応用
- (2) 小端哲二：BAFF/APRIL 抗原系の人為的操作による抗 HIV 抗体産生/HIV ワクチン効果の増強を目指して
- (3) 伊藤守：「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
- (4) 山本直樹：NOD/SCID/IL2R γ^{null} マウス (NOG マウス) へのヒト造血幹細胞移植による新しい HIV-1 感染モデル
- (5) 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
山本直樹：NOD/SCID/IL2R γ^{null} マウス (NOG マウス) へのヒト造血幹細胞移植による、新しい HIV-1 感染モデル
- (6) 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、野性株に対する評価

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

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18年度主任研究報告書（総括）

主任研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

研究要旨：ヒト免疫担当細胞を移植した免疫不全マウスを HIV-1 感染個体モデル実験系として、エイズ新規ワクチンや予防治療薬候補を評価するための新たなシステムの研究開発を行なった。最終年度の平成18年度の班研究ではこれまでの2年間の成果を生かし、評価系に新規の改良を加え評価の検証をした。具体的には、(1) ヒト制御性 T 細胞の誘導を可能とする樹状細胞(DC)の新たな分化誘導法の確立と免疫応答の誘導、(2) ヒト IL-4 を分泌する新たな高度免疫不全マウス作出とその CXCR4 HIV-1 感染実験への応用、(3) 多剤耐性 HIV-1 臨床株の分離、(4) ヒト造血幹細胞を移植した免疫不全マウス系の開発とその応用、(5) HIV-1 中和抗体促進のための新規アゴニスト抗体の開発、などに関する研究を行い、班研究としてオリジナリティの高い成果が得られたと考えている。

A. 研究目的

HIV-1 の感染予防やエイズ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期待がかけられている。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ている。エイズ医薬品等の新規開発において、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ことは最低限必要な条件であり、適当な動物感染実験系での検証が必要である。しかしながら、ヒト以外の霊長類（サル）を用いる実験系は人体に一番近い環境を提供する系であると言われているが、高いコストと十分な数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、これらサルの系においては、サルエイズウイルス(SIV)が攻撃ウイルスとして使われるがヒトにのみ病原性をもつ HIV-1 とは性状が必ずしも同じではない。ゆえに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と期待できる。しかも、その評価系では、野生の臨床株ウイルスが感染し病原性を発揮することが望まれる。これらの条件を満たす動物モデルはヒトの免疫担当細胞群を移植した免疫不全マウスである。このようなマウスはヒト化マウスと呼ばれ、我々が班研究で選択した系はヒト末梢血単核球あるいはヒト造血幹細胞を移植したマウスである。後者では、移植する免疫不全マウスは新生児および成獣を用いた。

ヒト末梢血単核球を移植した 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。この免疫応答は CD4+T 細胞を主体とする応答であり、HIV-1 抗原に反応して IFN-gamma 産生と未知の R5 HIV-1 抑制因子の産生を行う。また、若干 B 細胞免疫つまり抗体の産生を伴う。この系を使って種々の HIV-1 感染実験が可能である。つまり様々な培養方法で分化させた DC を HIV-1 抗原や候補ワクチンで感作し、期待する免疫応答を誘導することによりどのような DC と HIV-1 抗原の組み合わせがより有効な免疫応答を誘導できるかを評価できるようになった。また、種々のアジュバントの

効能を評価できる。さらにこの系では、CXCR4 や CCR5 アンタゴニストの感染防御能効果の評価が可能である。本年度の成果で特筆すべきは以下の2点である。

(1) X4 HIV-1 の感染評価をより感度よく評価できる系であるヒト IL-4 産生免疫不全マウスの作製に成功したこと。この系ではこれまで難点であった X4 HIV-1 のバイレミアを再現できるため評価系として有用である。(2) 新たに開発したヒト造血幹細胞を移植した NOG とよばれる新規免疫不全マウス系の開発である。この系では、HIV-1 の感染により長期バイレミアの誘導と数例ではあるが抗体産生誘導を可能とした。さらに多剤耐性の HIV-1 の分離と新たな B 細胞活性化機構の解明にも成功しており、今後の応用が期待される。

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。これまで一般に用いられている DC の培養方法に加えてさらに新たな DC 分化誘導を試みた。つまり、IL-4 と IFN-beta を用いた早期 (3 日間) 誘導方法である。この方法により誘導された DC とアロ CD4+T 細胞とを混合培養し、種々のサイトカインの産生を ELISA で測定した。

(2) 新規 SCID マウス作製においてはヒト IL-4 遺伝子を 2 系統の免疫不全マウスに導入し、IL-4 産生 SCID マウスを新規に開発した。このマウスを用いて CXCR4 アンタゴニストの X4 HIV-1 感染抑制能を評価した。感染後一週間後にマウス腹腔内の細胞と腹腔洗浄液を回収し、感染の状態を新鮮細胞の細胞内 p24 染色、腹腔洗浄液と細胞培養後の培養上清 p24 を ELISA で測定し推定した。

(3) ヒト細胞を構成的にもつヒト化マウスを作製するために、ヒト造血幹細胞を移植したマウスを NOD/SCID/IL2Rg^{null} マウス (NOG マウス) で作製し、そのマウスの HIV-1 感受性や感染病態を比較検討した。

(4) 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、アゴニスト活性をもつ抗体の作製と *in vitro* の研究を行った。

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 と臍帯血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。

C. 研究結果

(1) 田中らの研究。新たな DC の誘導方法として単球を IL-4 と IFN-beta を添加した培養液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た。最終分化には LPS や不活化 HIV-1 の添加が必要であった。GM-CSF/IL-4 由来の DC と比較して高い CD83 発現が見られた。CD80, CD86 の発現は同様であった。アロ naïve CD4+T 細胞との混合培養を行うと、GM-CSF/IL-4 由来の DC と比較して細胞増殖誘導性、IFN-gamma 産生性が低かった。しかし、IL-10 の産生は高く、IL-10 産生性の制御性 T 細胞誘導が確認された。この DC の生体内での機能についてはさらなる研究が必要である。

(2) 伊藤、田中 (共同研究者: 大隈)、西沢らの研究。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我々が考案した方法にヒト IL-4 投与がある。昨年度までの研究で、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を開発した。そして現在、マウス血中に数 ng/ml の IL-4 を持続的に産生する免疫不全マウス系統の作出に成功した。このマウスでは野生型の X4 HIV-1 の感染が促進され感染細胞を細胞内 p24 染色で検出できた。さらに CXCR4 アンタゴニストの投与効果を実証することができた。また、多剤耐性の X4 HIV-1 の感染をアンタゴニストが生体内で阻害することを証明した。用いた多剤耐性 HIV-1 臨床株は、分担研究者の西沢が分離した株である。

(4) 西沢、小端らの研究。DC 免疫法で誘導される Th1 型のヘルパー T 細胞免疫応答に加えて、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。今回は、検出可能なレベルまでに抗体産生を促進させることができなかった。この点の改良法としてヒトB細胞を活性化させるアゴニスティック抗体をすでに樹立しており、今後、新たな方法論が展開できると考えている。すなわち、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である。分担研究者の小端は、B細胞が発現するBAFF/APRIL受容体のTACI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での効果の評価は、今後のTh2誘導性DCの分化誘導法の開発とあわせて進める計画を立てている。

(5) 小柳らの研究。HIV-1感染によるヒト免疫組織の破壊を再現する動物モデルを開発するために、新生児免疫不全(NOG)マウスに造血幹細胞であるCD34⁺細胞を移植し、ヒトT細胞、B細胞やDC細胞が数ヶ月にわたり維持循環するヒト化マウスを確立した。このヒト化マウス(NOG-hCD34)に、HIV-1を感染させると、すべてのマウスにおいてウイルス血症が再現され、そして、ウイルスの分離が可能であること、そして、特にX4 HIV-1感染マウスでは、CD4⁺T細胞の減少が再現された。また、CD4⁺T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。

(6) 山本らの研究。ヒト造血幹細胞移植成獣NOGマウスではヒトB細胞が発生し、その後移植4ヶ月以降にT細胞の顕著な増加がみられた。移植マウスは、R5指向性およびX4指向性両方のHIV-1に高い感受性を示し、感染マウスの血漿中には3ヶ月以上にわたり高いウイルスコピー数が持続されていた。組織染色およびHIV-1のDNAの検出により、脾臓、胸腺、骨髄、肺を含めた全身組織にHIV-1感染が起こっていることが確認された。感染マウスの末梢血と脾臓ではCD4陽性T細胞の割合が経時的に減少し、胸腺内ではCD4/CD8両陽性の未熟T細胞の消失がみられた。高いウイルスコピー数が検出された個体では、HIV-1に対する特異抗体の産生がみとめられた。

D. 考察

平成18年度は本研究班の最終年度であり、これまでの研究成果をもとに、ヒト血液細胞を移植する免疫不全マウスを用いたHIV-1薬剤およびワクチン評価系にさらなる可能性を求めた。最近までのDCの研究により、抗原提示細胞であるDCの機能の違いによって誘導されるヘルパーT細胞の機能に直接的な影響を及ぼすことから、エイズワクチンの評価には多角的なDCの培養分化法を確立し様々な条件でのワクチン評価が必須であると考えられる。今回我々が開発したIL-4/IFN-betaを用いる方法で誘導されたDCは、IL-10産生制御性T細胞(Treg)を誘導することを新たに見いだした。IL-10は免疫応答を負に調節することからこのようなDCを用いたワクチン接種がHIV-1の増殖調節にどのように働くか、今後さらに深く解明する用意が整った。

ヒト化マウスにおけるHIV-1中和抗体の誘導までは到達していない。Th2誘導型DCの培養方法の確立が必須である。まだ前段階ではあるが、コレラトキシンをDC培養系に添加することによってTh2誘導性のDCが分化することを確認しており、さらなる検討を継続している。また、BAFF/TACI受容体TACIを刺激するアゴニスト抗体の応用が可能となったので、hu-PBL-SCIDのみならず血液造血幹細胞移植マウスでの機能検定を進めている。

ヒト血液造血幹細胞を移植したマウスではHIV-1の長期感染と、ある個体ではHIV-1に対する抗体の産生が認められた。この系は臍帯血から分離したCD34陽性細胞を移植したNOGマウスを応用する系である。この系は多数の動物を用意することに難点があるが、エイズ治療薬を評価する優れた系として評価できる。〔新聞報道あり〕

また、本年度の特筆すべき研究成果の一つとして、X4 HIV-1の感染抑制の評価ができるhu-PBL-SCIDマウスの作出に成功してことである。特殊マウスはヒトIL-4遺伝子を導入したマウスであり、この系を用いることによって多剤耐性X4 HIV-1の感染がCXCR4アンタゴニストで感染抑制されることを証明した。(クレハ

との共同研究、CROI 2007 で発表)。昨年度までは、ヒト IL-4 を投与する系を用いていたが、それが不要となった。このマウスにおける X4 HIV-1 の感染促進は IL-4 の直接的な CXCR4 の発現促進と関連すると考えている。このマウスを使うことにより、不活化 HIV-1 免疫で誘導される HIV-1 抑制因子と CXCR4 アンタゴニストの併用の相加効果の多剤耐性 HIV-1 に対する評価が可能となった。この方法は今後さらなる一般化が可能であり、HIV-1 の研究のみならず、Th2 の関連するアレルギーなどのヒトの疾病の研究に寄与することと期待される。

E. 結論

改良された免疫不全マウスにヒト PBMC あるいは CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植して、ヒト化マウスを作製した。これらのマウスを使い分けることによって、HIV-1 薬剤やワクチンの短期あるいは長期の詳しい評価の可能性が示唆された。ワクチン評価にはヒト由来の樹状細胞を用いた免疫方法を応用する。ケモカイン受容体アンタゴニスト等の X4 HIV-1 に対する評価には IL-4 産生マウスを用いる。一方、長期感染に対する薬剤の評価はヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウスの利用が不可欠である。今回の研究によりこれまでの小動物を用いた評価系の適用範囲の拡大が計られた。

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* (Maywood) 231(4):431-43, 2006.
- (2) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, and Ansari AA, Tanaka Y:

Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Human Immunology*, 2007, in press.

(伊藤)

- (1) Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Miyoshi H, Okano HJ, Ito M, Tamaoki N, Nomura T, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y: Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1925-1930.
- (2) Yahata T, Yumino S, Seng Y, Miyatake H, Uno T, Muguruma Y, Ito M, Miyoshi H, Kato S, Hotta T, Ando K: Clonal analysis of thymus-repopulating cells presents direct evidence for self-renewal division of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2006;108:2446-2454.
- (3) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 2007;109:212-218.
- (4) Ninomiya M, Abe A, Yokozawa T, Ozeki K, Yamamoto K, Ito M, Kiyoi H, Emi N, Naoe T: Establishment of a myeloid leukemia cell line, TRL-01, with MLL-ENL fusion gene. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;169:1-11.
- (5) Nakamura T, Miyakawa Y, Miyamura A, Yamane A, Suzuki H, Ito M, Ohnishi Y, Ishiwata N, Ikeda Y, Tsuruzoe N: A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2006;107:4300-4307.
- (6) Kametani Y, Shiina M, Katano I, Ito

- R, Ando K, Toyama K, Tsukamoto H, Matsumura T, Saito Y, Ishikawa D, Taki T, Ito M, Imai K, Tokuda Y, Kato S, Tamaoki N, Habu S: Development of human-human hybridoma from anti-Her-2 peptide-producing B cells in immunized NOG mouse. *Exp Hematol* 2006;34:1239-1247.
- (小柳)
- (1) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses *ex vivo* generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 80:5563-5570, 2006.
- (2) Miyazato P, Yasunaga J, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, Matsuoka M. De novo HTLV-I Infection of Human Lymphocytes in Nonobese Diabetic-SCID, Common γ -Chain Knocked-Out Mice. *J. Virol.* 80:10683-10691, 2006.
- (3) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- (4) Futahashi, Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science*, 2007, in press.
- (5) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curt Top Microbiol Immunol*, in press.
- (6) Miura Y, Kitayama H, Andou Y, Koyanagi Y. HIV encephalopathy and neural stem cell virology. *Brain and Nerve*, 58:553-559, 2006.
- (7) Miura Y and Koyanagi Y. HIV encephalopathy. *Japan Medical Association Journal*, 49, 212-218 2006.
- (西澤)
- (1) Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W. New T-Cell-Based Lines with Two Luciferases for Accurately Evaluating Susceptibility to HIV-1 Drugs. *J Clin Microbiol.* 45:477-487, 2007.
- (小端)
- (1) Sakurai, D., Kanno Y., Hase H., Kojima H., Okumura K., and Kobata T.: TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur. J. Immunol.* 37: 110-118, 2007.
- (2) Sakurai, D., Hase H., Kanno Y., Kojima H., Okumura K., and Kobata T.: TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* published online Nov. 21, 2006.
- (山本)
- (1) Tsurutani N, Yasuda J, Yamamoto N, Choi BI, Kadoki M, Iwakura Y. Nuclear Import of the Preintegration Complex Is Blocked upon Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Mouse Cells. *J Virol.* 2007 Jan;81(2):677-88.
- (2) Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated

- primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci.* 2006 Dec;97(12):1381-7.
- (3) Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, Yamamoto N, Inoue J, Tsunetsugu-Yokota Y. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood.* 2006 Nov 15;108(10):3305-12.
- (4) Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol.* 2006 Jun;7(6):598-605.
- (5) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5563-70.
- (6) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N, 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 Apr 20;311(1-2):47-56.
- (7) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ,
- (8) Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1784-95.
- (9) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R{gamma}null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):212-8.
- (10) Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W. New T-Cell-Based Lines with Two Luciferases for Accurately Evaluating Susceptibility to HIV-1 Drugs. *J Clin Microbiol.* 45:477-487, 2007.
2. 学会発表 (国際学会のみ、国内は分担者報告のページを参照)
- (1) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Yamamoto N, and Tanaka Y. Human IL-4-Transgenic SCID Mice: A Novel Animal Model for X4 HIV-1 Infection. 1st International Workshop on Humanized Mice. International house of Japan, Roppongi, Tokyo, Japan. 11-12 October 2006.
- (2) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Sugiura W, Nishizawa M, Yamamoto N, and Tanaka Y. An Improved Animal Model for X4 HIV-1 Infection: Human IL-4-Transgenic hu-PBL SCID Mice. 14TH Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Los Angeles Convention Center, Los Angeles, California, U. S. A. 25-28 February 2007.
- (3) Aoki J, Sato K, Miura Y, Koyanagi Y. Incorporation of HIV-1 Env into virions is regulated by a tetraspanin. *Retroviruses Meeting,*

- Cold Spring Harbor, New York, 2006.
- (4) Yoshida T, Kawano Y, Aoki J, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. A specific modification of the CXCR4 trafficking: Blocking HIV entry. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2006.
- (5) Ito, M. Development of Severely

Immunodeficient Mice Suitable for Humanized Mice, 1st International Workshop on Humanized Mice, Tokyo, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

II. 分担研究報告

「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 18 年度主任研究報告書

「ヒト IL-4 産生 SCID マウスを用いた X4 HIV-1 感染実験動物モデルの開発と新規薬剤効果評価系への応用」

主任研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

（共同研究者 大隈 和、田中礼子、他）

研究要旨：HIV-1 感染の *in vivo* における研究は、HIV-1 感染感受性実験動物モデルの一つである hu-PBL-SCID マウスを用いて精力的に行われてきた。しかし、特に X4 HIV-1 株の研究においては、その感染増殖効率が R5 株に比べ低いため、hu-PBL-SCID マウスの使用には限界があった。そこで本研究では、X4 ウイルスにおけるこのマウスモデルの利用価値を向上させるために、2 種類の SCID マウスに、X4 株の感染増殖性を上げる事が期待されるヒト IL-4 遺伝子の導入を試みた。これらのヒト IL-4 を恒常的に分泌するトランスジェニックマウスを用いて新規の hu-PBL-SCID マウスを作製し、その X4 ウイルスに対する感受性をヒト IL-4 を分泌していない hu-PBL-SCID マウスと比較検討したところ、ヒト IL-4 産生 hu-PBL-SCID マウスにおいて X4 HIV-1 のより顕著に高い感染増殖能を認め、本マウスは X4 ウイルスにとって有用な感染実験モデルになりうる事が分かった。またその感染は新規抗 X4 HIV-1 剤である細胞侵入阻害剤 CXCR4 アンタゴニストにより著明に阻害されたため、本マウスシステムは X4 ウイルス感染に対する薬剤（新規開発医薬品候補）の生体内効果評価系として応用可能である事が示された。

（他共同研究者：財団法人実験動物中央研究所 伊藤守；国立感染症研究所エイズ研究センター 西澤雅子、杉浦互、山本直樹；クレハ生物医学研究所 熊倉成、谷中幹郎）

A. 研究目的

重症複合免疫不全(SCID)マウスの腹腔内にヒトの末梢血単核球(PBMC)を移植して作製される、いわゆる hu-PBL-SCID マウスは、ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)の小型感染実験動物モデルとして極めて有用であり、

特にケモカインレセプターCCR5 分子を補助受容体として利用する HIV-1 R5 株感染においては viremia 状態を再現することも可能である。しかし一方、ケモカインレセプター CXCR4 分子を補助受容体として利用する HIV-1 X4 株においては、少なくとも一つの原因として、hu-PBL-SCID マウス内において

CXCR4 補助受容体の発現が低下しているため、その感染増殖効率が非常に低く、X4 HIV-1 の感染/病原性を詳細に研究するためには、このウイルス感染に高い感受性を示す新たなマウスモデルの開発が必要である。そこで本研究では、その効率の良い感染増殖を可能にする X4 ウイルス高感受性マウスモデルの開発を目的とした。我々は、まずインターロイキン-4 (IL-4) の生物活性に注目した。IL-4 はナイーブ CD4⁺ (ヘルパー) T (Th0) 細胞を 2 型 CD4⁺ T (Th2) 細胞に分化誘導するサイトカインであり、さらにその細胞上の CXCR4 分子の発現を増強することができる。そのため X4 ウイルスは *in vitro* において Th2 細胞に効率良く感染し増殖することが知られている。そこで、我々はまず SCID マウスにヒト IL-4 (hIL-4) 遺伝子を導入することにより hIL-4 を生体内に恒常的に分泌するマウスを作製した。次にそのトランスジェニックマウスを用いて新規の hu-PBL-SCID マウスを作製し、その X4 HIV-1 感染に対する感受性が高まったかどうか (X4 ウイルスの感染増殖効率が向上したかどうか) をコントロールマウスと比較検討した。またこのマウスモデルが、X4 HIV-1 に対する新規薬剤の予防効果評価系として応用できるかどうかを調べるために、X4 実験室適応株や多剤耐性 (MDR) 臨床分離株の感染に対する X4 ウイルス侵入阻害剤、即ち CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 の薬剤効果 (感染防御能) も検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

(1) 健常者の PBMC から mRNA を抽出し、RT-PCR により hIL-4 の cDNA を増幅した。そ

れを一旦 CMV プロモーターを有するプラスミドに挿入し、塩基配列を確認した後、切り出した。その hIL-4 遺伝子を C.B-17 及び BALB/cA-RAG2^{-/-}IL-2R γ ^{-/-} (dKO) SCID マウスに導入して、hIL-4 産生 SCID マウスを作製した。

(2) 1 回の実験あたり 1 グループ 4-6 匹のマウスを使用した。C.B-17 SCID マウスを用いて作製された hIL-4 産生 SCID マウス及び hIL-4 発現のない同系のマウス (コントロール) の腹腔内に (i. p.) Day -2 に抗マウス IL-2R β 抗体 (TM β -1) を 0.5-1 mg/animal 注入し、NK 細胞を枯渇させた。BALB/cA-dKO SCID マウスは NK 細胞枯渇処理を必要としなかった。

(3) Day -1 にマウス腹腔内にヒト PBMC (10⁷/animal) を移植した (hIL-4 産生、或いは hIL-4 非産生 hu-PBL-SCID マウスの作製)。

(4) Day 0 に X4 HIV-1 NL4-3 株、MDR 臨床分離株 (3 株混合)、或いは Mock を約 2,000 IU/animal i. p. 接種した。また CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 の感染抑制効果をみるために、ウイルス感染の一時間前と翌日 (Day 1) に 10 mM KRH-1636 (或いはコントロール薬剤、Mock) 0.1 ml/animal を i. p. 投与した。

(5) Days 6-8 にマウス血清及び腹腔内洗浄液 (PLs) を採取した。PLs から浮遊細胞分画を回収し、その細胞群におけるヒト CD4 及び CXCR4 の発現、さらにヒト CD3 及び細胞内 HIV-1 gag p24 の発現を flow cytometry (FCM) で解析し、残りの細胞を IL-2 添加培地で培養した。血清における hIL-4 の産生を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で、さらにウイルスの感染増殖性 (複

製能)を、血清、PLs、培養上清(Days 7-11)中の p24 を ELISA で定量することによって、比較検討した。

(倫理面への配慮)

本動物感染実験は、琉球大学の動物実験倫理委員会、感染微生物取り扱い安全管理委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会で審査、承認されており、全て P3 実験施設内で行われている。また血液サンプル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。

C. 研究結果

(1) hIL-4 産生 C. B-17 SCID マウスを用いて作製された hu-PBL-SCID マウスの X4 ウイルス感染に対する高感受性：
血清中の hIL-4 の濃度を ELISA で調べたところ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群では顕著な hIL-4 値の上昇を認め、hIL-4 非産生 hu-PBL-SCID (コントロール) マウス群では hIL-4 の産生を認めなかった。これらの事から hIL-4 産生マウス体内における確かな hIL-4 の分泌を確認できた。また移植 PBMC による外因性 hIL-4 の明らかな産生がないことも分かった。PLs から回収されたヒトリンパ球におけるヒト CD4 及び CXCR4 の発現を FCM で解析したところ、コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群からの細胞で著明な CXCR4 及び CD4 の発現の増強を認めた。しかし細胞内 p24 の発現は両群にはあまり認められず、明らかな差も認められなかった。また血清、PLs、培養上清中の p24 の濃度を ELISA で調べたところ、血清及び PLs 中の p24 は低濃度ではあるものの、

コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群の PLs 内により高い p24 濃度を認めた。その差が最も顕著だったのは培養上清中の p24 の濃度で、コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群からの細胞培養上清中に p24 値の著明な上昇(コントロールの約 100 倍)を認めた。以上のことから、*in vivo*においても内因性 hIL-4 の産生によりヒトリンパ球における CXCR4/CD4 の発現が明らかに増強され、その事により(少なくとも一つの理由として) X4 ウイルスのマウス内での感染増殖効率が著明に向上し、hu-PBL-SCID マウスの X4 ウイルス感染に対する感受性がはるかに高まったことが分かった。

(2) hIL-4 産生 BALB/cA-dKO SCID マウスを用いて作製された hu-PBL-SCID マウスの X4 ウイルス感染に対する高感受性：
血清中の hIL-4 の濃度を ELISA で調べたところ、C. B-17 SCID マウスと同様に、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群では顕著な hIL-4 値の上昇を認め、hIL-4 非産生 hu-PBL-SCID (コントロール) マウス群では hIL-4 の産生を認めなかった。PLs から回収されたヒトリンパ球におけるヒト CD4 及び CXCR4 の発現を FCM で解析したところ、コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群からの細胞では著明な CXCR4 及び CD4 の発現の増強を認めた。また興味ある事に、ヒト CD3 陽性細胞における細胞内 p24 発現細胞の出現頻度は、コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群からの細胞において明らかに増加(10 倍以上)していた。また血清、PLs、培養上清中の p24 の濃度を ELISA で調べたところ、血清及び PLs 中の p24

は低濃度ではあるものの、コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群の PLs 内により高い p24 濃度を認めた。培養上清中の p24 の濃度も、コントロールマウス群に比べ、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群からの細胞培養上清中に p24 値の上昇傾向を認めた。

(3) hIL-4 産生 C. B-17 SCID マウスを用いて作製された hu-PBL-SCID マウスにおける、実験室適応株 NL4-3 感染に対する CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 の阻害効果：
KRH-1636 未投与の hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス群において認められた、PLs 及び培養上清中の高い p24 濃度は、KRH-1636 の投与群においてはほぼ完全に抑えられ、本薬剤の高い有効性が示された。

(4) hIL-4 産生 BALB/cA-dKO SCID マウスを用いて作製された hu-PBL-SCID マウスにおける、MDR 臨床分離株感染に対する CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 の抑制効果：
まず 14 種類の MDR 臨床分離株の中から活性化 T 細胞に効率よく感染して増殖する 3 種類を選択した。次にこれらのウイルスの活性化 T 細胞への感染が、*in vitro* において KRH-1636 前処理により抑制できるか調べた。その 3 種類のウイルス感染は 5 μ M KRH-1636 により効率よく阻害された。そこでそれらのウイルスを等ウイルス感染価ずつ混合し計 2,000 IU/animal を hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウスに接種した。感染 1 時間前とその翌日に、KRH-1636 或いはコントロール薬剤の酒石酸を投与してそれらの薬剤効果を比較検討した。ヒト CD3 発現細胞における細胞内 p24 発現細胞の頻度を FCM で調べたところ、酒石酸投与群に比べ、KRH-1636 投与群にお

いてその細胞頻度の顕著な減少が認められた。また血清、PLs、培養上清中の p24 濃度を ELISA で調べたところ、コントロール薬剤投与群に比べ、KRH-1636 投与群において p24 産生の明らかな低下が認められ、KRH-1636 は MDR 臨床分離株に対しても感染防御効果を発揮できる事が示された。

D. 考察

本研究において新規に作製された hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウスは、MDR 臨床分離株を含めた HIV-1 X4 株に対して高感受性であることがわかった。その理由の一つとして、hIL-4 の持続的な産生により、マウス内においてヒトリンパ球における X4 ウイルス受容体の発現が増強維持され、ウイルス感染効率が向上したことが挙げられる。また hIL-4 の効果によりマウス内のヒトヘルパー T 細胞の極性がより Th2 細胞側にシフトしたことがウイルスの感染増殖性を向上させた可能性も考えられる。今後、hIL-4 産生 hu-PBL-SCID マウスにおけるヒトヘルパー T 細胞の極性の変化及びそれによるウイルスの感染増殖性への影響を検討する必要がある。

本マウスシステムは、X4 HIV-1 感染に対する高感受性から、その病原性発現機序等を詳細に研究するための感染実験動物モデルとして非常に有用であることが示唆された。一方、このマウスの R5 HIV-1 感染に対する感受性は、まだ明らかではないが、hIL-4 の作用によりマウス内のヒトヘルパー T 細胞の極性のバランスが変化し、CCR5 補助受容体の発現に影響を与えている可能性があり、その事で R5 ウイルスの hu-PBL-SCID マウスに対する感染増殖性が変化していることも考

えられる。

また本マウスモデルは、CXCR4 アンタゴニスト等の新規抗 X4 HIV-1 薬剤候補の評価系としても用いる事ができることが示された。今後は CXCR4 アンタゴニストばかりでなく、ウイルス複製阻害剤やウイルスベクターによる遺伝子治療の開発、そして特異的細胞性免疫や中和抗体を誘導できる樹状細胞等を用いた予防的或いは治療的ワクチンの開発等への応用の可能性も検討していきたい。

さらに今回用いられた KRH-1636 は、新規 CXCR4 アンタゴニスト候補薬剤の一つとして、多剤耐性株を含めた X4 ウイルスに対する代替的／追加的治療手段として臨床応用できる可能性が示唆された。しかし本薬剤は、今回の実験においては、多剤耐性株の感染に対し明らかな抑制効果を示したものの、完全には阻害できなかつたため、エスケープしたウイルス株の詳細な検討が必要であると思われる。また今後はより実質的な臨床応用に向けた研究を進めるため、より投与が平易な経口投与や経筋肉内、経粘膜投与といった各種投与ルートの検討も必要であり、それらの接種方法が十分可能な本薬剤の新規誘導体の開発も現在すでに進行中である。

E. 結論

ヒト IL-4 遺伝子を導入した SCID マウスを利用して作製された新規 hu-PBL-SCID マウス（ヒト IL-4 産生 hu-PBL-SCID マウス）は、X4 HIV-1 に対し、従来のマウスモデルに認められなかつた高い感受性を示し、X4 ウイルスの感染／病原性（エイズ）発現機構の研究においてばかりでなく、このウイルスに対する新規薬剤の生体内評価系としても

活用できる事が分かつた。特に本マウスシステムは、X4 HIV-1 の実験室適応株だけでなく、臨床分離株（特に MDR）の感染・増殖及び薬剤効果判定も可能であることから、より臨床治験に近い感染モデル系・新薬の予防治療効果評価系を提供できると考えられる。以上のことから、本研究は、HIV-1 感染実験動物モデルとしての hu-PBL-SCID マウスの価値／有用性をさらに高め、簡便で迅速な抗 X4 HIV-1 薬剤の *in vivo* 効果評価系を確立することができたと考えられる。今後ヒト IL-4 産生 hu-PBL-SCID マウスが *in vivo* における X4 ウイルス感染の基礎的な研究や新規予防・治療戦略の開発等に大きく資することが期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nimura F, Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N, Tanaka Y. Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation, and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(4):431-43, 2006.
- (2) Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion

- lymphoma cells. *Cancer* 97(12):1381-7, 2006.
- (3) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, and Ansari AA, and Tanaka Y: Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Human Immunology*, 2007, in press.
- (4) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curt Top Microbiol Immunol*, 2007, in press.
2. 学会発表〔国際〕
- (1) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Yamamoto N, and Tanaka Y. Human IL-4-Transgenic SCID Mice: A Novel Animal Model for X4 HIV-1 Infection. 1st International Workshop on Humanized Mice. International house of Japan, Roppongi, Tokyo, Japan. 11-12 October 2006.
- (2) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Sugiura W, Nishizawa M, Yamamoto N, and Tanaka Y. An Improved Animal Model for X4 HIV-1 Infection: Human IL-4-Transgenic hu-PBL SCID Mice. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Los Angeles Convention Center, Los Angeles, California, U.S.A. 25-28 February 2007.
3. 学会発表〔国内〕
- (1) 佐藤佳, 青木淳, 大黒恵里子, 佐藤浩一, 田中勇悦, 小柳義夫: テトラスパニン分子の過剰発現による HIV-1 の感染価抑制. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 40.
- (2) 吉居廣朗, 神山陽香, 大石和徳, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直: HeLa 細胞における CD4 非依存性 HIV-1 の細胞侵入抑制機構. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 47.
- (3) 張陰峰, 山本典生, 田中勇悦, 山本直樹, 間陽子: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 pre-mRNA splicing by Vpr enhances viral production. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 48.
- (4) 三沢彩, 鴨居功樹, 山本啓裕, 三宅在子, 石田尚臣, 田中勇悦, 望月學, 渡邊俊樹: Tax-SUV39H1 相互作用による HTLV-1 LTR プロモーター活性抑制機構の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 50.
- (5) 篠田康彦, 田中勇悦, 三浦義治, 鈴木陽一, 小柳義夫: CCR5 指向性 HIV-1 感染防御因子 (CD4 因子) 産生細胞株に特異的な発現遺伝子の探索. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 50.
- (6) 神山陽香, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 四童子好廣, 久保嘉直: ビタミン A 類似体 Geranylgeranoic acid (GGA) による

- HIV-1 感染の抑制. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 53.
- (7) 大隈和, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦: CXCR4 コレセプター使用 HIV-1 株の感染を阻害する新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3140 の hu-PBL-SCID マウスにおける経口投与効果. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 11. 19: 名古屋. プログラム, 54.
- (8) 村上努, 大隈和, 熊倉成, 田中礼子, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹: 新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3166 は経口投与可能な高活性抗 HIV-1 剤である. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 11. 30: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:211(39).
- (9) 大隈和, 田中礼子, 伊藤守, 田中勇悦: ヒト IL-4 産生 SCID マウスの X4 HIV-1 感染への応用. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 1: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:219(47).
- (10) 佐藤佳, 青木淳, 大黒恵理子, 佐野浩一, 田中勇悦, 小柳義夫: テトラスパニン分子の過剰発現による HIV-1 感染抑制作用. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 1: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:219(47).
- (11) 近藤佳代, 張麗峰, 児玉晃, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: T 細胞の OX40L による HIV-1 増殖調節. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 2. 東京. 日本エイズ学会誌, 8:230(58).
- (12) 田中勇悦, 田中礼子, 大隈和: CCR5, CXCR4 架橋による R5 及び X4 HIV-1 の感染制御. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 2: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:231(59).
- (13) 児玉晃, 近藤佳代, 張麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: HIV-1 による樹状細胞の分化誘導阻害. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 2: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:231(59).
- (14) 山下篤哉, 照沼裕, トウ学文, 高嶋能文, 三間屋純一, 花房秀次, 岡慎一, 酒井道生, 白幡聡, 藤井輝久, 石川正明, 高橋義博, 池田柊一, 三浦琢磨, 松田重三, 田中勇悦, 葛西宏威, 加藤伊陽子, 山本直樹, 伊藤正彦: HIV-1 感染者由来 CD4 陽性 T 細胞株の産生する抗 HIV-1 液性因子. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 2: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:235(63).
- (15) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: 樹状細胞を用いて誘導した IL-10 産生 Treg 細胞のマクロファージへの R5 HIV-1 感染抑制. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 12. 2: 東京. 日本エイズ学会誌, 8:235(63).

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)
なし

BAFF/APRIL 抗原系の人為的操作による抗 HIV 抗体産生/HIV ワクチン効果の増強を目指して

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 抗体の産生増強および HIV ワクチンの効果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/APRIL の受容体 TACI の機能解析を、開発したアゴニスト単クローン抗体を用いて行った。その結果、TACI は BAFF に対しては負の制御受容体として、APRIL に対しては正の制御受容体として機能することが明らかとなった。

A. 研究目的

BAFF/APRIL 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、抗 HIV 抗体の産生増強および HIV ワクチンの効果増強への応用を図る。今年度は、開発したヒト BAFF/APRIL の受容体 TACI に対するアゴニスト単クローン抗体を用いて、その作用機序を解析した。

B. 研究方法

ヒト末梢血 B 細胞に対して、siRNA 技術を用いて TACI 発現の抑制ならびにヘパリチナーゼ処理によりヘパラン硫酸ペプチドグリカン(HSPG)を変性し、BAFF/APRIL との結合を阻害した。BAFF または APRIL 刺激による B 細胞増殖と IgG および IgA 産生は、それぞれ DNA 合成能ならびに ELISA を用いて測定した。活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現およびプロテインキナーゼ A (PKA) のリン酸化の程度を免疫プロット法にて検討した。同時に抗ヒト TACI アゴニスト単クローン抗体 (11H3) を添加しその効果を検討した。(倫理面への配慮)

実験には匿名化された日本赤十字社血液セン

ターからの研究用譲渡血を用いるため、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

1) TACI siRNA は、BAFF により誘導された B 細胞増殖と IgG および IgA の産生を有意に増強した(図 1)。2) TACI siRNA は、APRIL により誘導された IgA 産生を有意に抑制したが B 細胞増殖や IgG 産生には影響しなかった(図 1)。3) ヘパリチナーゼ処理は、APRIL により誘導された B 細胞増殖と IgG および IgA の産生を有意に抑制したが BAFF によるものには影響しなかった(図 1)。4) 特異抗体を用いた HSPG 刺激により AID の発現が誘導され、次に 11H3 抗体の添加により PKA のリン酸化が誘導された結果、IgA の産生が誘導された(図 2)。

D. 考察

TACI は BAFF-BAFFR 相互作用による B 細胞活性化を抑制し、APRIL-HSPG 相互作用による IgA 産生を誘導することが示唆された。また、HSPG は APRIL による B 細胞活性化に必須であることが示唆された。したがって、TACI は BAFF に対しては負の受

容体として、APRIL に対しては正の受容体として

E . 結論

受容体 TACI は、その単独刺激では B 細胞アポトーシスを誘導するだけだが、結合するリガンドによって B 細胞応答を正にも負にも調節し得る。したがって、TACI を標的とした人為的操作によって抗体産生/ワクチン効果の増強を図ることは必ずしも容易ではない。よって、BAFFR (T 細胞非依存性) および CD40 (T 細胞依存性) シグナルの増強を中心に抗体産生/ワクチン効果の増強を図るのがより現実的と考える。

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

1) Sakurai, D., Kanno Y., Hase H., Kojima H., Okumura K., and Kobata T.: TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. Eur. J. Immunol. 37: 110-118, 2007.

2) Sakurai, D., Hase H., Kanno Y., Kojima H., Okumura K., and Kobata T.: TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. Blood published online Nov. 21, 2006.

2. 学会発表

1) 菅野由美子、櫻井大祐、長谷英徳、小嶋英史、小端哲二. PKC δ transition in TACI-mediated B cell death. 2006 年 12 月 12 日. (大阪)

2) 櫻井大祐、菅野由美子、長谷英徳、小嶋英史、小端哲二. TACI positively regulates APRIL-induced IgA production in concert with HSPG. 第 36 回日本免疫学会. 2006 年 12 月 13 日. (大阪)

3) 小端哲二、菅野由美子、長谷英徳、小嶋英史、

機能していることが明らかとなった。

櫻井大祐. TACI can antagonize BAFF-R- and CD40-mediated non-canonical NF- κ B activation in B cells. 第 36 回日本免疫学会. 2006 年 12 月 13 日. (大阪)

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし。