

図1 TACI siRNA およびへパリチナーゼ処理の BAFF/APRIL 誘導 B 細胞応答に対する効果

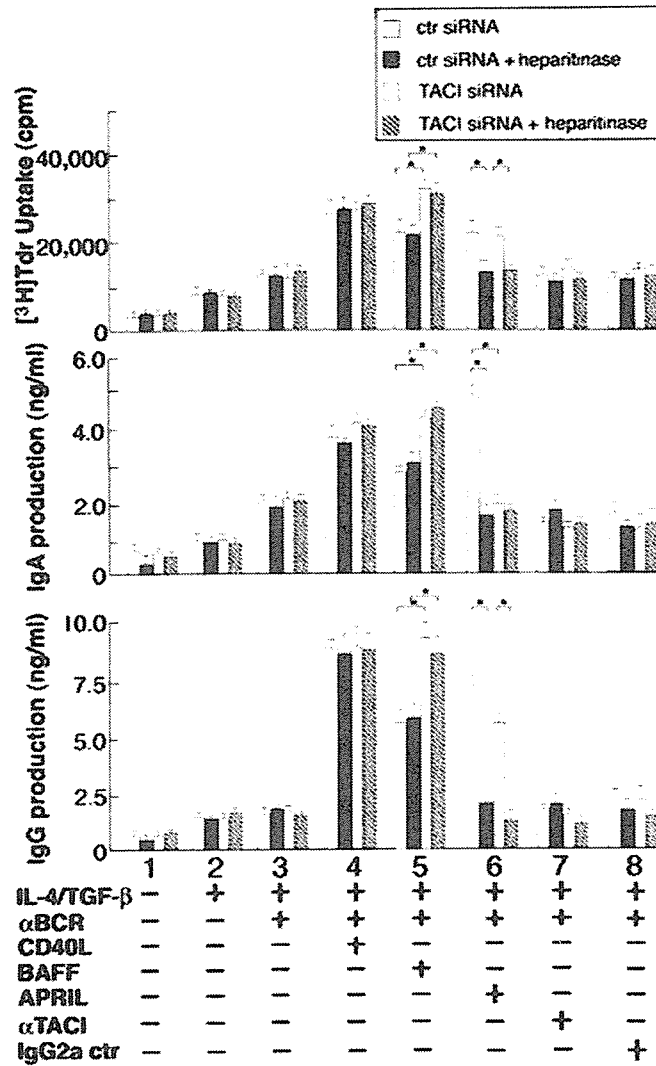
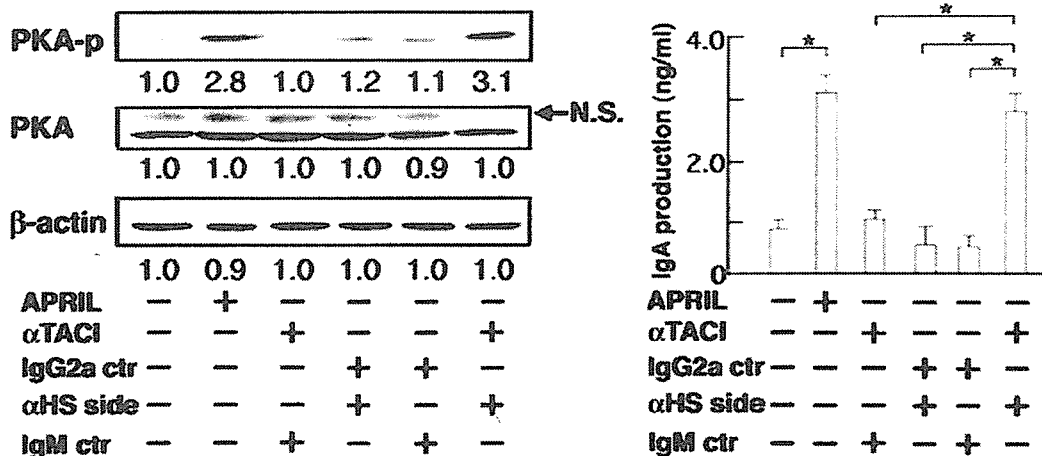


図2 TACI および HSPG 刺激による PKA リン酸化と IgA 抗体産生の誘導



「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。CB-17-scid と BALB/cA-RAG2, gC double KO の 2 系統免疫不全マウスで各々高発現、低発現の 2 ライン、計 4 ラインの Tg マウスラインを確立した。それら Tg マウスの HIV-1 感染実験のために CB-17-scid-hIL-4 Tg マウスを 82 匹、BALB/cA-RAG2, gC double KO-hIL-4 Tg マウスを 86 匹の計 166 匹を作出した。また、新たに NOD/Shi-scid, gC double KO (NOG) マウスに hIL-4 遺伝子を導入した Tg マウスの作製を、NOD または(NOD x NOG)F1 前核期受精卵への遺伝子注入することによって行なった。得られた産子 53 匹のうち 3 匹で遺伝子の挿入が認められ、各々血中濃度 656.5、321.5、73.92 pg/mL の hIL-4 が検出された。現在、この NOG-hIL-4 Tg マウスのライン化を行なっている。

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 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の作製を行い、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

昨年度作製した human IL-4 を分泌する C.B-17-scid-hIL-4 Tg マウス 3 匹（血清濃度が各々

0.60, 0.60 と 3.04 ng/mL）および BALB/cA-RAG2, gC double KO-hIL-4 Tg マウス 3 匹（血清濃度が各々 0.70, 1.10 と 5.80 ng/mL）から各々低濃度および高濃度の Tg マウス系統の樹立を行なった。樹立と並行して、HIV-1 感染実験のための生産も行なった。さらに、新たな hIL-4 Tg マウスとして、NOD/Shi- gC double KO (NOG) -hIL-4 Tg マウスの作製も行なった。これらマウスは重度の免疫不全であるため、系統育成・生産は全てビニールアイソレーターで実施した。

C. 研究結果

C.B-17-scid-hIL-4 Tg マウスでは、低発現系（平均 480 pg/ml）と高発現系（平均 2,270 pg/ml）の 2 ラインを樹立し、各々 26 匹、56 匹、計 82 匹の Tg マウスを作製した（表 1）。BALB/cA-RAG2, gC double KO-hIL-4 Tg マウスでは、低発現系（平均 271 pg/ml）と高発現系（平均 1,815 pg/ml）の 2 ラインを樹立し、各々 38 匹、48 匹、計 86 匹の Tg マウスを作製した（表 2）。これら Tg マウスの遺

伝子伝達率は、C.B-17-scid の低発現系で 51%、高発現系で 56%、BALB/cA-RAG2, γ C double KO の低発現系で 40%、高発現系で 44%、後者で若干低い傾向が認められたが、いずれのラインでも十分生産、供給できる伝達率であること考えられた。これら 2 種類の免疫不全マウス系統に加えて、新たに NOD/Shi- gC double KO (NOG) -hIL-4 Tg マウスの作製も行なった。前者 2 系統に用いたと同様の遺伝子断片を、NOD または(NOD x NOG)F1 前核期受精卵に注入して Tg マウスを得た。すなわち、前核期卵 277 個に便日注入し、80 匹の産子を得、その離乳子 53 匹から、3 匹の Tg マウスが得られた。これら Tg マウスは ELISA によって、マウス血清中に 656.5、321.5、73.92 pg/mL の濃度で hIL-4 が検出された。

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。前年度までに免疫不全マウス 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。これら founder マウスから、各々 2 系統の遺伝子の伝達 (hIL-4 濃度が均一) が良好な計 4 ラインを得ることができ、生産効率も良好であることが判っている。BALB/cA-rag2, gc double KO 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。また、今回作製を開始した NOD/Shi- scid, gC KO (NOG) マウス系統は、同じく我々が開発した免疫不全マウスで、このマウスに臍帯血 CD34+ 細胞を移入することによって、

ヒト T、B 細胞が分化増殖することで現在極めて注目されているマウスである (Ito, M. et al., 2002, Blood, 100, 3175-82)。また、最近このヒト化マウスで HIV-1 が感染することが報告された (Watanabe S et al, Blood 2006)。

このマウスに hIL-4 を分泌させることにより、さらに感染性が増すことが期待できる。

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と確立を行なった結果、CB-17-scid マウス系統から、BALB/cA-RAG2, gC dKO マウス系統から血清中に hIL-4 を低濃度、高濃度で分泌する各々 2 ライン、計 4 ラインを確立することができた。これらマウスは安定して生産供給が可能で、現在これらマウスを研究代表者の田中勇悦教授のところで感染実験が行われ、良好な結果が得られている。さらに、NOD/Shi- scid, gC KO (NOG) での hIL-4 Tg マウスの作製を試みた結果、3 匹の Tg マウスを得ることができた。現在、前者 2 系統の安定生産と後者のラインの樹立を行っている。

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) 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.
- 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

1. 特になし

表 1. CB-17-scid-hIL-4 Tg マウスの伝達と生産匹数

	No. of Tg mice	(%)	Total no. of mice	Serum hIL-4 level (mean, pg/mL)
Low expression Tg	26	51.0	51	480
High expression Tg	56	56.0	100	2,270
Total	82	54.3	151	

表 2. BALB/cA-RAG2, gC double KO-hIL-4 Tg マウスの伝達と生産匹数

	No. of Tg mice	(%)	Total no. of mice	Serum hIL-4 level (mean, pg/mL)
Low expression Tg	38	40.4	94	271
High expression Tg	48	44.4	108	1,815
Total	86	42.6	202	

表 3. NOD/Shi- gC double KO (NOG)- hIL-4 T g 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
NOD	149	97	46	28	1
NOG x NOD	128	105	34	25	2

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

分担研究者：山本直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター長）

研究要旨：

ヒト造血幹細胞を移植した NOD/SCID/IL2R γ ^{null} マウス（NOG マウス）を用い、新しい HIV-1 長期慢性感染モデルが確立された。感染したマウスでは、末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の消失などエイズに類似の症状がみられ、エイズ発症モデルとしてさまざまな研究に利用できると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 の世界規模での感染拡大が問題とされている中で、未だ有効なワクチンは実用化されていない。一方、エイズ発症を遅延させるのに有効な化学療法は達成されているものの、この方法ではウイルスの根治は望めない。さらに薬剤耐性やコストの問題もあり、新たな抗ウイルス薬剤、さらにはワクチンの開発が急務となっている。しかし HIV-1 は通常の実験動物には感染せず、サルエイズウイルス (SIV) やサルとヒトのキメラウイルス (SHIV) を用いたサルへの感染実験がなされているものの、入手や飼育の困難さ、高価格などが問題となるうえ、HIV とは異なるウイルスであるために必ずしもヒトの病態を反映しない。これまで HIV-1 の感染小動物モデルとして、ヒト胎児肝臓および胸腺を SCID マウスに移植した SCID-hu (Thy/Liv) やヒト末梢血細胞を移植した hu-PBL-SCID が確立されている。しかし、それらのモデルでは、ヒト細胞の生着や発生が限定され、ヒト免疫系が構築されない。そのため、長期の慢性感染系にはなりえず、HIV-1 の感染動態の研究やワクチンの評価のモデルとしては不十分であった。

最近開発された NOG マウスは、ヒト造血幹細胞の生着に優れ、従来の SCID マウスでは難しいとされていたヒト T 細胞を含む各種の血球細胞の発生が起こることがわかっている。我々はこの点に着目し、このマウスを用いることで、よりヒトに近い状態を反映した HIV-1 感染モデルができるのではないかと考えた。本研究では、この NOG マウスで移植後出現するヒト細胞の詳細な解析、HIV-1 感染後のウイルス動態および病態の解析を行い、HIV-1 感染モデルとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

6-10 週齢の NOG マウスに、3.0Gy 放射線照射後もしくは照射せずに $1 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$ 個のヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を尾静脈より移植した。

移植後 1-8 ヶ月のマウスから血液および各組織を採取し、発生したヒト細胞の解析を行った。移植後 4-5 ヶ月のマウスについて、R5 および X4 HIV-1 実験株を尾静脈より投与した。投与後、血漿中および全身組織のウイルスコピー数の検出を行った。さらに、血液およびリンパ組織における CD4 陽性 T 細胞の変動を解析した。HIV-1 特異抗体は、ELISA 法にて検出を試みた。

（倫理面への配慮）

ヒト臍帯血を入手する際には国立感染症研究所の倫理審査委員会が決めた手順に従い、提供者のインフォームド・コンセントを書面により得ている。動物モデルは必要最小限の数をを用い、本研究所が定める実験動物取扱（倫理）規定を遵守し、動物に痛みを伴わないよう飼育・実験を行っている。今後、動物実験の新たな展開が必要になる場合には、必要に応じておいて生命倫理・安全面の配慮をすべく必要な申請を行い、審査を受け承認を得てから研究に従事するものとする。

C. 研究結果

ヒト幹細胞移植マウスには、まず初めにヒト 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。脾臓中には、ヒト T 細胞の他、ヒト単球/マクロファージや樹状細胞など HIV-1 の感染に重要なヒト細胞群も観察された。脾臓、胸腺、骨髄などのリンパ組織中には、HIV-1 コレセプターである CXCR4 や CCR5 を発現する CD4 陽性細胞がみとめられた。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-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 共陽性の未熟 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

本研究により、ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスで、R5 および X4 指向性両方の HIV-1 に対し、高い viremia が長期間持続する慢性的な感染が確立された。感染したマウスでは、CD4 陽性 T 細胞の経時的な減少がみられた。また、HIV-1 に対する免疫誘導能をもつことが明らかとなった。このことから、このマウスの新しい HIV-1 感染モデルとしての有用性を以下のように考える。

1. R5 指向性および X4 指向性両方の HIV-1 感染モデル

HIV-1 感染患者において、感染初期のほとんどの患者では R5 指向性 HIV-1 が優位に増殖し、エイズ発症時になると患者の約半数で X4 指向性 HIV-1 がドミナントであることが統計的に示されている。このため R5 から X4 タイプの移行がエイズ発症を早める一つの要素であると考えられている。これまでの HIV-1 感染マウスモデルにおいて、SCID-hu (Thy/Liv) マウスは主に X4 指向性 HIV-1 に感染し、hu-PBL-SCID マウスは主に R5 指向性に高い感染感受性を示すことが知られている。ナイーブ T 細胞は CCR5 の発現が弱く、活性化 T 細胞は CCR5 を強発現する。このため、主に胸腺 T 細胞の HIV-1 感染に限定される SCID-hu (Thy/Liv) マウスでは X4 指向性 HIV-1 に感染し、GVH により T 細胞の活性化が起こる hu-PBL-SCID マウスでは R5 指向性 HIV-1 に感受性が高くなる。本研究の NOG マウスは、両方の HIV-1 に高い感受性を示し、それぞれの HIV-1 の感染形態やエイズ発症に及ぼす影響を研究することに有用であると思われる。

2. 長期の抗 HIV-1 薬、ワクチンの評価モデル

現在抗 HIV-1 薬の評価として多用されている hu-PBL-SCID マウスは、操作や材料の入手が簡便である反面、HIV-1 の検出レベルが 2-3 週間をピークとし、感染が持続しないマイナス面があった。本研究で用いたヒト造血幹細胞移植 NOG マウスは、感染後 3 ヶ月以上も血漿中に高いコピー数が検出されており、長期の治療薬の評価に非常に適していると思われる。また、このマウスが HIV-1 に対して免疫誘導能をもつことが示され、ワクチンの評価モデルとしても有用であると考えられる。

3. エイズ発症メカニズムの解析モデル

HIV-1 感染患者におけるエイズ発症は、骨髄、胸腺など造血組織の破壊や follicle lysis に代表されるリンパ組織の破壊などさまざまな要因に

より引き起こされると考えられている。本研究の NOG マウスで末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の消失がみられ、エイズ発症メカニズムの解明に役立つことが期待される。

4. 長期未発症に関連する遺伝子の検索や遺伝子治療のモデル

マウスへのヒト造血幹細胞移植により HIV-1 感染が可能となったため、遺伝的に感染関連遺伝子が欠損しているドナー幹細胞の移植や RNAi などの遺伝子操作を行った造血幹細胞の移植を行うことにより、感染関連遺伝子の検索や造血幹細胞の遺伝子治療のモデルとして有用であると考えられる。

E. 結論

本研究により、ヒト造血幹細胞移植マウスを用いた新しい HIV-1 長期慢性感染モデルが確立された。感染したマウスでは、末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の消失などエイズに類似の症状がみられ、エイズ発症モデルとしてさまざまな研究に利用できると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, 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.

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.

2. 学会発表

渡辺哲、寺嶋一夫、太田信頼、堀端重男、清水則夫、本多三男、山本直樹。NOG マウスを利用した HIV-1 慢性感染系の確立。第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集

G. 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
なし

厚生労働省科学研究費補助金（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」

分担研究報告書：

研究項目：HIV 感染による神経組織破壊のモデル動物の開発
分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
共同研究者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 研究補助員
共同研究者 篠田 康彦 京都大学ウイルス研究所 大学院生

研究要旨

HIV 感染による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)マウスに造血細胞である CD34⁺細胞を移植し、ヒト T 細胞、B 細胞、DC 細胞が、末梢血、そして脾臓などに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、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 細胞の減少を再現できた。これらの事実は、新たに HIV-1 感受性のマウスを確立したことを意味する。今後、エイズワクチンモデルとなりうるか検討が必要である。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。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) は、その宿主域がヒトあるいは霊長類に限られる。そして HIV-1 はヒトに対して強力な病原性を発揮し、感染後成人の場合は平均 8 年、小児の場合はわずか 2-3 年後に CD4⁺T 細胞の欠乏による免疫不全症を誘導させる。小柳は、ヒト末梢血移植免疫不全マウス(hu-PBL-SCID マウス)は HIV 感染により、エイズ患者と同じように CD4⁺T 細胞の減少と脳神経細胞のアポトーシスがマウス内に再現できること、そして、1-2 週間の短期投与により抗 HIV 薬の評価が可能であることを明らかにしてきた。しかし、この hu-PBL-SCID マウス内に構築される細胞環境はすべて強力に活性化された T 細胞であり、生体内における本来のウイルス感染病態を反映するものではなかった。すなわち、このマウスでは造血能は維持されておらず、ウイルスに対する免疫反応も限られたものであった。さらに、このマウスの生存期間は移植後に生ずる移植片対宿主病 (GVHD) により組織障害が起こるために 2 ヶ月程度であり、長期観察は困難である。そこで、長期にわたり、ヒト T ならびに B 細胞を維持し、そして、HIV 感染による CD4⁺細胞の減少を再現するモデル動物の確立、さらに、このマウス個体内における免疫反応が誘導できる実験系の完成が期待されている。また、田中らが発見した不活化 HIV プライム DC 細胞誘導性の R5 HIV-1 に対する抑制因子の同定単離の試みを行った。

B. 研究方法

1) 新生児免疫不全マウスへの臍帯血移植実験

臍帯血より miniMACS 磁気細胞分離キットにより分画した CD34 陽性細胞（陽性率 98%以上）を選択し、放射線照射 (0.1 Gy) 新生児免疫不全マウス (NOD-SCID と コモン gamma 鎖ノックアウトマウス : NOG) の肝臓へ $1-2 \times 10^5$ 個の CD34⁺細胞を移植した。移植後、8 週目に採血し、血液中の CD45 陽性細胞率によりヒト細胞移植効率を flow cytometry により判定した。ヒト B 細胞ならびに、ヒト T 細胞の同定には抗 CD19 ならびに抗 CD3 単クローン抗体を用いた。また、T 細胞の分化過程を解析するために、CD45RA, CD4, CD8 に対する単クローン抗体、そして、DC マーカーである CD11c, CD123 分子に対する単クローン抗体を用いて、染色し、flow cytometry にて解析した。

2) HIV 感染実験

ヒト細胞の構築が確認されたマウス (NOG-hCD34) の腹腔に 10^5 tissue culture infectious dose₅₀ (TCID₅₀) のウイルスを接種し、感染後に解剖し、脾臓、胸腺、骨髄、末梢血を採取し、細胞、ならびに、血漿を分離した。そして、細胞を上述の染色にて染色し、flow cytometry にて解析した。一方、血漿からは HIV-1 RNA を分離し、アンプリコアキットにより HIV-1 RNA 量を測定した。

3) CD4 細胞由来の HIV 抑制因子の探索

田中らにより報告された CD4T 細胞由来の R5 ウイルス特異的抑制因子 (J. Virol. 77:8719-8727) の単離を目標として、培養上清中に R5 ウイルス特異的抑制因子を放出するクローン細胞 (AT-2 不活化 HIV-1 で感作した mDC をプライムした hu-PBL-SCID-spl マウス内で誘導された CD4 陽性 T 細胞から HTLV-1 により不死化された CD4 陽性 T

細胞クローン) から RNA を抽出し、アフィメトリクス社のマイクロアレイ GeneChip Human Genome U133 Plus2.0 並びに Gene spring GX 7.3 解析ソフトウェアを用いて解析を行い、候補遺伝子を抽出した。さらにこれらの遺伝子過剰発現細胞上清を CD3CD28 刺激 T 細胞に添加し、R5 ウイルス感染抑制活性を検討した。

C. 研究結果

1) 免疫不全マウスにおけるヒト T 細胞造血実験系の開発

NOG 新生児マウスへ臍帯血由来の CD34⁺細胞を肝臓内へ移植した。その結果、移植後 8 週目には末梢血においてヒト CD45 陽性の白血球細胞群が出現した(表 1)。ヒト細胞構築の確率は、55 匹中 53 匹にはみられることがわかり、極めて成功率が高いことがわかった。さらにそのマウスの中には、その時点において、あるいは、その後に CD4, あるいは CD8 陽性のヒト T 細胞が、およそ 10-50% 程度まで増えることを認めた(表 1、図 1A)。移植後、12 週目以降においては、ヒト T 細胞は末梢血と脾臓において、5-10% 以上存在し、胸腺においては数%の CD4 ならびに CD8 single positive (SP) 細胞、そして、80% 以上は CD4 ならびに CD8 double positive (SP) 細胞が産生されていること、さらに、骨髄においては CD34 陽性の未分化造血細胞が定着していることがわかった(図 1A)。また、これら末梢血と脾臓の CD4⁺ならびに CD8⁺T 細胞は、多くは CD45RA 分子の発現がある、ナイーブ細胞であることがわかった。一方、HIV-1 の補助受容体である CCR5 は発現していた(図 1A)。また、

胸腺においては CD69 陽性の細胞群があり、胸腺内において活発な細胞分裂が起きており、positive selection が誘導されていることが示唆された。

また、骨髄においては CD11c 陽性、あるいは、CD123 陽性、そして、HLA-DR 強陽性の DC 細胞と思われる細胞群が検出された(結果示さず)。

2) HIV-1 感受性マウスの作製

本実験の目的である HIV-1 に対する本マウスの感受性について検討した。ヒト CD34⁺細胞の移植後、8 週目に末梢血における有核細胞になかでヒト細胞 (CD4/CD8) の割合を検討すると CD4 は 0.2-14.4%、CD8 は 0.1-8.6% を占めていた。これらのマウスに R5 HIV-1 である JR-CSF ウイルスを接種し、感染後、6 週から 8 週の間に解剖した。図 2A に示すように、その血漿中の HIV-1 RNA 量は 10^3 から 10^5 コピー以上の存在が確認され、さらに、ウエスタンブロッティングの結果、HIV-1 に対する抗体はほとんど検出されなかったが、一例においては陽性検体と判定された。また、マウス脾臓細胞よりウイルス分離を試みたところ、前例の

検体よりウイルスが検出された。一方、末梢血における CD4/CD8 の割合を flow cytometry にて解析したところ、明らかな CD4 細胞減少は見出されなかった。それに比べ、X4 HIV-1 である NL4 ウイルスを NOG-hCD34 マウスに接種した場合には、同レベルのウイルス血症が見出されるとともに、非感染マウスのそれに比べ、明らかに CD3 ならびに CD4 陽性細胞の減少が観察された(図 2B)。

3) CD4 細胞由来の HIV 抑制因子の探索

ヒト CD4⁺細胞由来の HIV-1 抑制遺伝子の探索をマイクロアレイ法を用いて解析して候補遺伝子を抽出し、ウイルス抑制活性を検討した結果、6 候補遺伝子が否定的であったが、インターフェロン群および糖鎖関連分子が候補になり得る事が考えられた(図 3)。

D. 考察

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

免疫不全マウスのひとつである NOG マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウス (NOG-hCD34 マウス) を確立した。その結果、マウス体内にヒト T, B, DC, マクロファージ細胞の新生を再現でき、HIV 感染が可能であることが判明した。そして、マウス体内に HIV-1 感染によるウイルス血症と CD4⁺細胞の減少を再現できることが可能となり、ウイルス感染に伴うエイズ発症メカニズムの解明研究に、このモデル実験系が寄与することは間違いない。現在まで、図 4 に示すように、このマウスを含めると 3 種類の HIV-1 感染モデルが開発されてきた。それは、ヒト末梢血腹腔内移植 hu-PBL-SCID マウス、ヒト胎児胸腺組織と肝臓組織片をマウス腎臓の皮膜下に移植する SCID-thy/liv マウス、そして、成獣 NOG マウスに臍帯血由来の血液幹細胞を移植する hNOG マウスあるいは今回の新生児 NOG マウスに臍帯血由来の血液幹細胞を移植する NOG-hCD34 マウスである。図 4 に示すように、hu-PBL-SCID マウス内に定着する細胞は、マウスの抗原に対して反応性の T 細胞であり、すなわち、活性化された T 細胞である。実際、CCR5 というメモリー細胞のマーカー分子を高発現しているため、R5 ウイルスの増殖には最適であり、極めて高レベルのウイルス血症が再現される。一方、SCID-thy/liv マウスは局所にヒト胸腺組織を構築するものであり、実際ウイルスの感染は直接胸腺に接種することが必要であり、感染後もウイルス血症はほとんど見出されていない。そして、今回報告した NOG-hCD34 マウスは血液系のほとんどすべて細胞がマウス内に構築されており、極めて有力なモデル実験系と考えられる。

今後、このマウス内において、ウイルス感染に伴う、免疫反応が再現できるのか、あるいは、抗ウイルス剤の評価実験系として利用は可能であるのか明らかにすることが必要である。

E. 結論

小動物であるマウスに HIV-1 に感受性を付与し、感染モデルとして作製することに成功した。有意義な成果が得られた。

F. 健康危険情報

(倫理面への配慮)

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

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 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.
 3. 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*, in press.
 4. Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curt Top Microbiol Immunol*, in press.
 5. Miura Y, Kitayama H, Andou Y, Koyanagi Y. HIV encephalopathy and neural stem cell virology. *Brain and Nerve*, 58:553-559, 2006.
 6. Miura Y and Koyanagi Y. HIV encephalopathy. *Japan Medical Association Journal*, 49, 212-218 2006.
- #### 2. 学会発表
1. 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.
 2. 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.
 3. 佐藤佳、青木淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫. 宿主因子の過剰発現による HIV-1 Env タンパク質のペリオンへの取り込み抑制. 近畿エイズ研究会、大阪、2006.
 4. 北山裕子、三浦義治、安藤良徳、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. エイズ脳症における神経細胞の軸索伸張障害メカニズムの解析近畿エイズ研究会、大阪、2006.
 5. Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. The axon outgrowth of neuron was inhibited by HIV-1 infected macrophage. *East Asia symposium*, Soul, 2006.
 6. Sato K, Aoki J, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Reduced infectivity of HIV-1 released from CD63-overexpressed cells. *Kumamoto AIDS seminar*, Aso, 2006.
 7. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Koyanagi Y, Ishizaka Y. Detection of serum Vpr in HIV-1-positive patients and the mode of viral reactivation from latently infected cells. *Kumamoto AIDS seminar*, Aso, 2006.
 8. 星野重樹、孫賓蓮、古西満、小柳義夫、石坂幸人. HIV-1 Vpr のウイルス再活性における役割. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 9. 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、名古屋、2006.
 10. 北山裕子、三浦義治、安藤良徳、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV-1 感染マクロファージによる神経細胞の軸索伸張障害メカニズ

- ムの解析. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
11. 安藤良徳、三浦義治、北山裕子、岡田広司、川口寧、小柳義夫. HSV-1 に感染したラット脳海馬スライス培養系における神経系細胞の解析. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 12. 小柳義夫、三沢尚子、佐藤佳、伊藤守. HIV 感染モデル動物としてのヒト造血細胞移植 SCID マウスの開発. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 13. 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 の感染価抑制. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 14. Koyanagi Y. Roles of tetraspanin in HIV-1 infection. Japan-German joint AIDS conference, Bohem, 2006.
 15. 小柳義夫、三沢尚子、佐藤佳、伊藤守. 新規 HIV 感染小動物モデルの開発: ヒト造血細胞移植 SCID マウス. 第 20 回日本エイズ学会、東京、2006.
 16. 佐藤佳、青木淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫. 第 20 回日本エイズ学会、東京、2006.
 17. 芳田 剛、河野 祐治、佐藤 佳、安藤 良徳、三浦 義治、田中勇悦、小柳義夫. CXCR4 の細胞質膜移行を制御する分子. 分子生物学フォーラム. 名古屋. 2006.
 18. 山元誠司、小川加那子、小柳義夫、鈴木陽一. Tandem affinity purification 法によるレトロウイルスキャプシド結合性因子の探索. 分子生物学フォーラム. 名古屋. 2006.
 19. Yoshida T, Koyanagi Y. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. Japan-US joint meeting, Kagoshima, 2006.
 20. Miura Y. Efficient HSV-1 infection in neural stem cells in vitro. 第 2 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、京都.
 21. 三浦義治、北山裕子、安藤良徳、小柳義夫. HIV 脳症における中枢神経系内宿主因子群の解析. 第 47 回日本神経学会総会、東京.
 22. Miura Y, Andou Y, Kitayama H, Koyanagi Y. Stem cell neurovirology: comparative analyses of neural stem cells in HIV-1 and HSV-1 infection. 第 29 回日本神経科学大会、京都.
 23. 三浦義治 安藤良徳 北山裕子 佐野浩一 川口寧 小柳義夫. 単純ヘルペスウイルス 1 型に感染した neurosphere 形成培養系の解析. 第 21 回ヘルペス研究会 (白川郷) .
 24. Miura Y. HIV encephalopathy and neural stem cell virology. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2006.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

表1. ヒト臍帯血CD34⁺細胞移植NOGマウスの構築

緒帯血ロット #43	放射線量グレイ 0.13	細胞数 140000	性別 ♀	マウス 1	blood 6/9(8W)	%HLA 22.3	%CD4/%CD8 5.0/3.3	構築 positive
			♀	2		24.7	2.1/1.2	positive
			♀	3		85.14	27.4/23.9	positive
			♂	1		26.0	6.3/4.9	positive
			♂	2		0.5	0.1/0.0	positive
			♂	3		15.7	2.4/1.3	positive
			♂	4		29.1	3.6/1.3	positive
			♂	5		15.5	2.4/0.5	positive
			♂	6		15.9	2.1/1.8	positive
#19, #36	0.12	93000	♀	1	6/9(8W)	65.2	19.9/17.3	positive
			♀	2		9.4	1.4/1.5	positive
			♀	3		18.5	11.0/5.0	positive
			♀	4		8.8	0.6/0.9	positive
			♀	5		15.8	1.9/1.8	positive
			♂	1		0.0	0.1/0.0	negative
			♂	2		6.3	0.9/1.7	positive
			♂	3		0.4	0.0/0.0	positive
#13, #15, #38	0.15	48000	♀	1	6/9(8W)	4.9	0.6/0.6	positive
			♀	2		4.7	0.1/0.0	positive
			♀	3		6.2	0.2/0.1	positive
			♀	4		18.3	14.4/4.5	positive
			♀	5		5.0	1.1/2.7	positive
			♀	6		22.4	6.9/8.6	positive
			♂	1		9.0	0.8/1.6	positive
			♂	2		4.6	0.1/0.2	positive
			♂	3		14.4	11.3/1.9	positive

現在のところNOGマウス55匹中53匹にはヒト細胞が構築された(2006年末)

図1A. ヒトCD34⁺移植NOGマウスのヒト細胞の分布。
 PBL (末梢血)、BM(骨髄)、spleen(脾臓)、thymus(胸腺)をそれぞれ採取し、
 ヒト特異的抗体にて染色後、flow cytometryにて解析した。

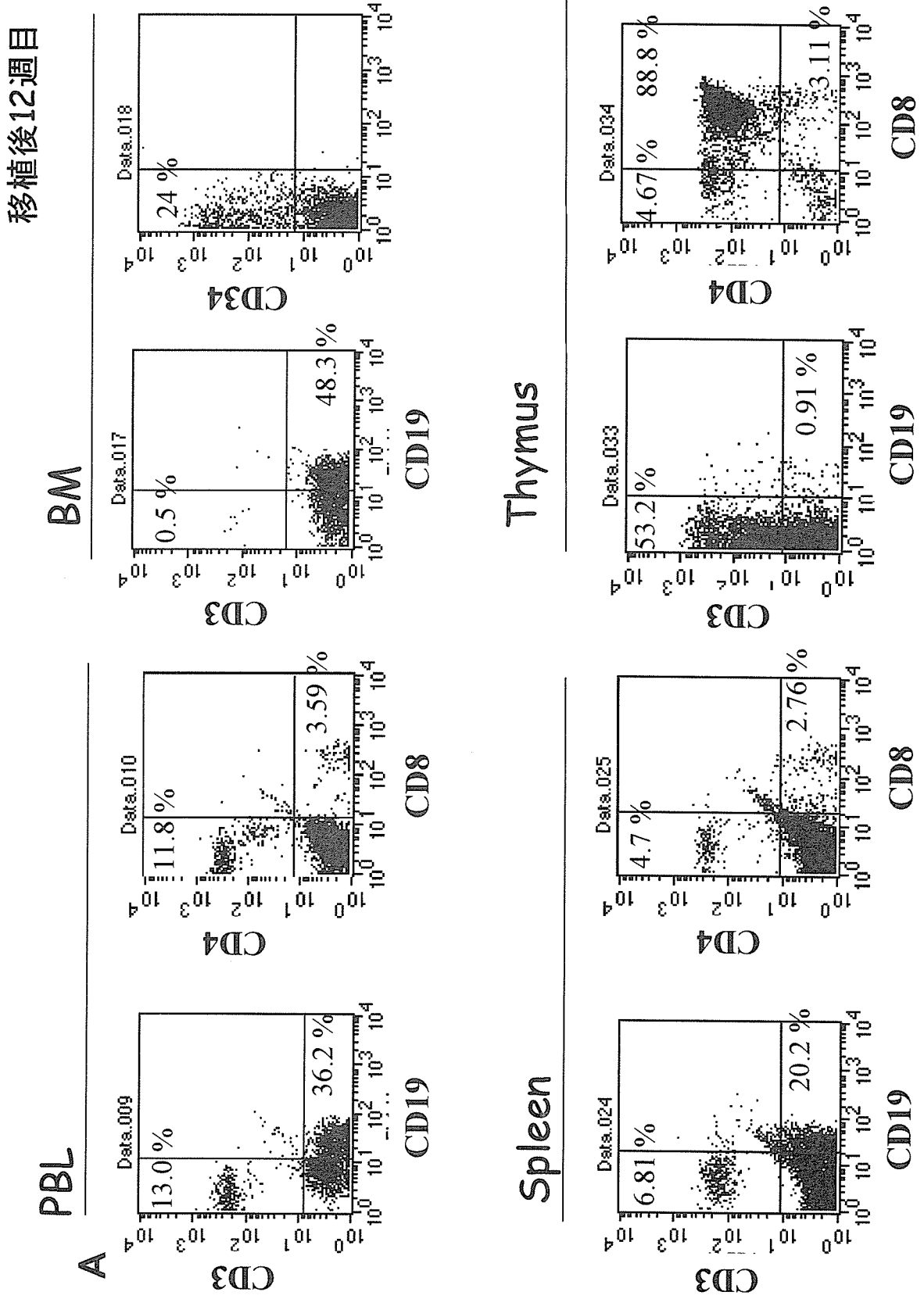
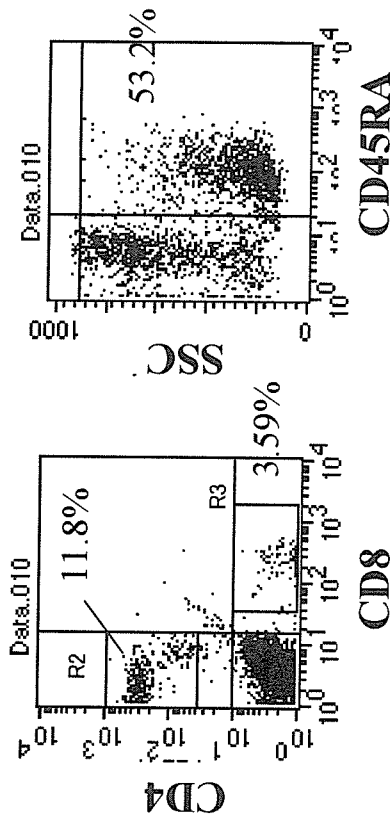


図1B. ヒトCD34+移植NOGマウスにおけるナイーブT細胞の構築.

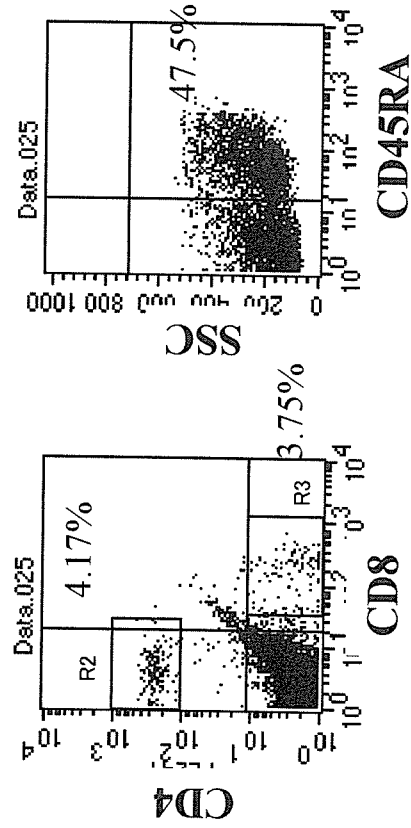
PBL



CD4+CD45RA+
: 57.8%

CD8+CD45RA+
: 94.2%

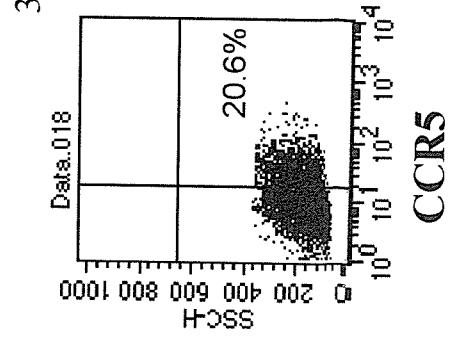
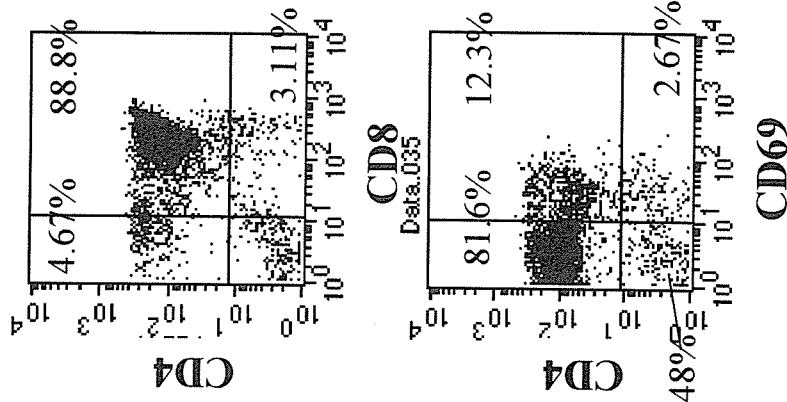
Spleen



CD4+CD45RA+
: 82.2%

CD8+CD45R+
: 88.1%

Thymus

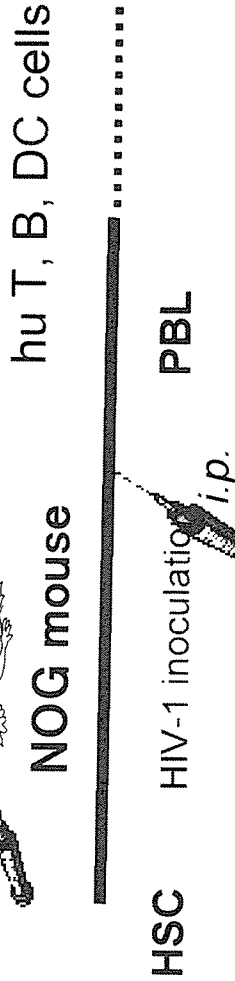


- Reconstitution of naïve T cells in NOG mouse
- Human thymopoiesis in mouse
- Persistence of T and B cells in PBL and spleen
- Long term maintenance of bone marrow function

図2A. ヒトCD34+移植NOGマウスにおけるR5 HIVの感染成立.

Hematopoietic stem cells (HSC) from CBL

Intra hepatic injection into neonate mouse



NOG-hCD34 is susceptible for HIV-1 infection

R5 HIV-1_{JR-CSF}の接種

Strain	CD34 細胞数 x 10 ⁴	放射線量 (Gy)	8 週目 (%CD4/CD8)	9 週目	15 週目	17 週目	20 週目	ウイルスRNA Western copies/ml (Ab)	HIV 分離	
NOG	4.8	0.1	0.2/0.1	NT	NT	NT	4.04/0.72	<1.6 x 10 ³	< 100	+
NOG	4.8	0.1	14.4/4.5	NT	NT	1.97/2.15		4.14 x 10 ⁴	< 100	+
NOG	4.8	0.1	1.1/2.7	NT	NT	NT	3.91/1.83	3.29 x 10 ⁴	< 100	+
NOG	4.8	0.1	6.9/8.6	3.85/9.04				1.66 x 10 ⁵	Positive?	+
NOG	4.8	0.1	0.8/1.6	NT	NT	36.1/4.11		7.22 x 10 ³	< 100	+

blood Sacrify/blood

Viremia was reproduced.
No CD4 depletion was found in R5 HIV infection

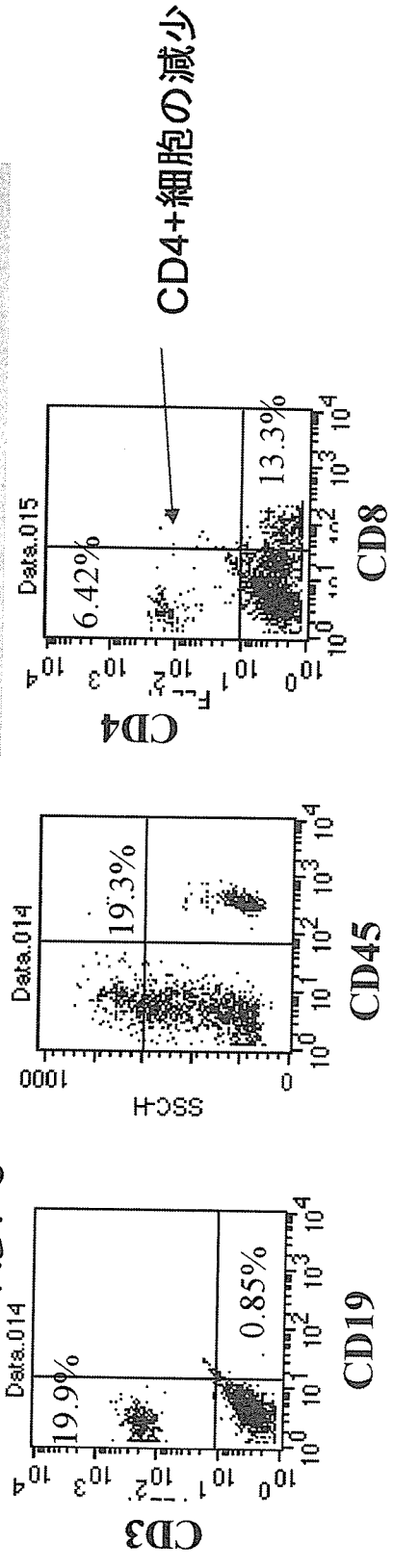
NT; not tested

図2B. ヒトCD34+移植NOGマウスにおけるX4 HIVの感染成立.
 Mouse PBL X4HIV-1(NL4-3)接種ご4週目

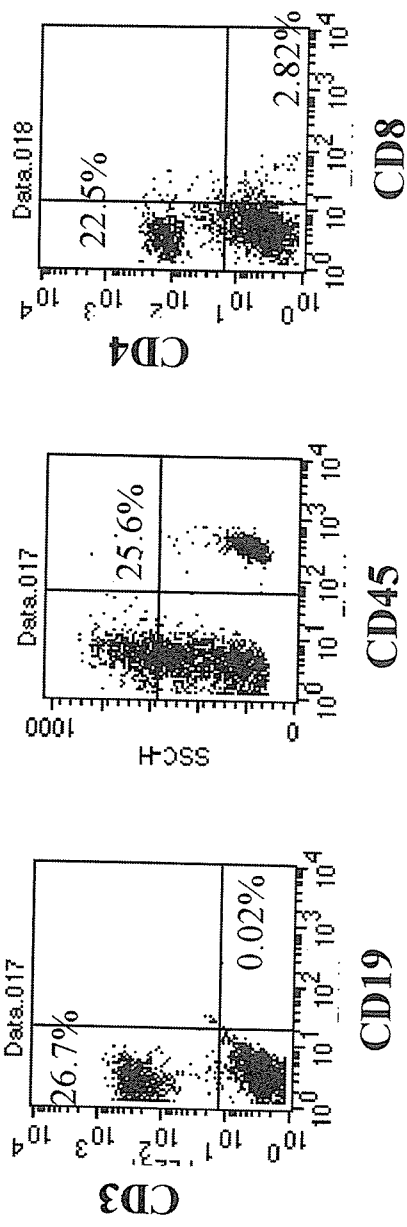
移植後13週目

X4 HIV-1 NL4-3 -infected

Viral load 4.5×10^4 copies/ml



Uninfected



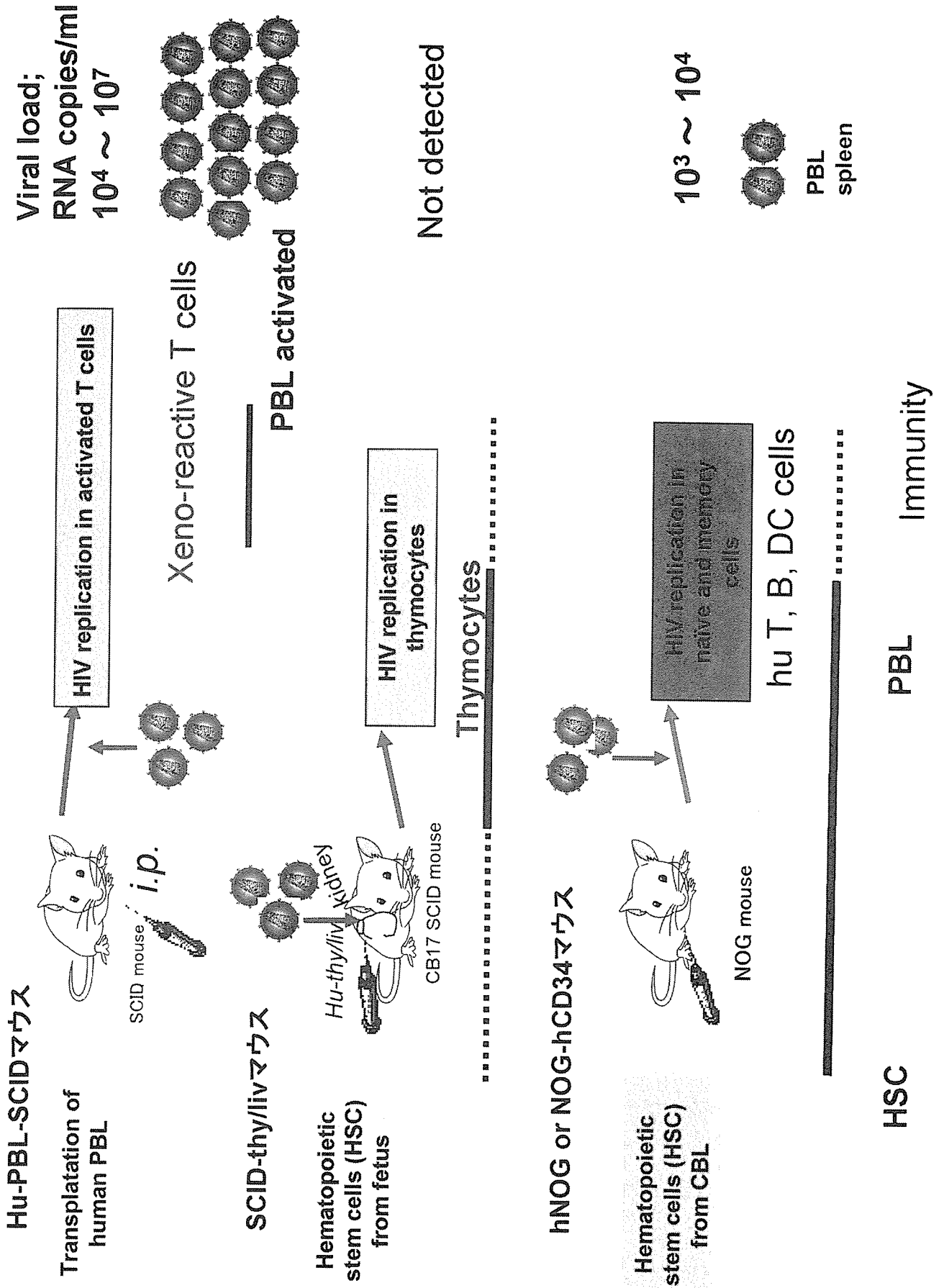
Viremia was reproduced.
 CD4 depletion was found in X4 HIV infected mice

図3. CD4細胞由来のHIV抑制因子の探索マクロアレイ解析

Gene Name	Fold change	Other Gene Name	Fold change
繊維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリー		Antigen p97 (MF12)	4.96
Fibroblast growth factor 1	2.02	Bactericidal / permeability increasing protein-like 2	2.92
Fibroblast growth factor 4	2.54	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide a	14.40
Fibroblast growth factor 5	2.02	Cartilage intermediate layer protein	6.26
Fibroblast growth factor 7	5.56	Cartilage linking protein 1	1.96
Fibroblast growth factor 9	11.02	Cdc42 effector protein 1	1.94
Vascular endothelial growth factor	12.34	Chorionic somatomammotropin hormone 2	1.53
Vascular endothelial growth factor B	1.47	☆ Coagulation factor II (thrombin)	1.63
		☆ Coagulation factor X	2.25
ケモカインリガンドファミリー		Collagen type IV a3	4.35
CCL14	2.69	Collagen type VI a2	2.76
CCL15	3.38	Collagen type VI a3	10.39
CCL18	3.18	Collagen type IX a1	1.67
CCL19	2.00	Collagen type XIX a1	3.97
CCL23	17.02	Defensin b 126	8.14
CXCL6	8.00	Ficolin 3	2.02
CXCL13	82.00	Fms-related tyrosine kinase 1	2.08
Platelet factor 4 variant 1	28.33	Follistatin	2.87
		Frizzled-related protein	1.75
インターロイキンファミリー		GL1 pathogenesis related 1	2.39
IL-1b	5.97	Glutathione peroxidase 3	3.39
IL-1 family, member 8	1.67	☆ Granulysin	262.10
IL-5	33.19	Growth differentiation factor 2	3.02
IL-6 receptor	7.44	Hemopexin	3.55
IL-11	7.64	Insulin-like 3	4.04
IL-16	3.65	Integrin-binding sialoprotein	1.98
		Jagged 1	1.74
インターフェロンファミリー		Kallikrein 14	2.52
IFN-a10	4.10	Keratin associated protein 1 - 3	4.72
IFNT1	2.88	KIAA1500 variant 4 (FRAS1)	4.17
		Luteinizing hormone b polypeptide	4.97
TNF レセプターファミリー		Matrix Gla protein	5.90
☆ TNF receptor super family member 7	6.94	Motilin	2.64
		Mucin	3.76
インスリンライクグロースファクター結合タンパクファミリー		NEL-like 2	37.10
Insulin-like growth factor binding protein 5	7.37	Norrie disease	3.46
Insulin-like growth factor binding protein 7	28.79	Orosomucoid 1	1.90
		Pancreatitis-associated protein	1.62
アポリポプロテインファミリー		Prokineticin 2	8.34
Apolipoprotein A-IV	6.35	Pro-melanin-concentrating hormone like 1	3.69
Apolipoprotein D	6.18	☆ Properdin P factor, complement	3.00
		Proprotein convertase subtilisin / kexin type 5	10.40
		Prostasin	5.11
糖鎖関連分子		Retinol binding protein 3	1.78
Biglycan	1.53	RNase family 7	1.96
Chitinase 1	1.40	S100 Ca binding protein A9	5.32
Chitinase 3 - like 2	2.06	Sema3F	2.87
Galectin 8L	74.86	Somatostatin	3.20
Proteoglycan 2 , Bone marrow	2.97	Spondin 1	1.55
		Submaxillary gland androgen regulated protein 3 homolog A	1.90
		Superoxide dismutase 3	3.42
		Tesican 2 (SPOCK2)	15.72
		Type X collagen	1.71
		Urotensin 2	264.10
		Uveal autoantigen	1.43
		von Willebrand factor (vWF)	1.67
		WAP 4 disulfide core domain 1	3.38
		Wnt3	1.84

その他

図4. 3種類のヒト化SCIDマウスのHIV-1感受性



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：HIV 感染症治療に効果的な DC ワクチンの開発・評価を目的とし AT-2 処理で不活化した HIV-1 を抗原とした 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 13 日目に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について検討した。

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) によって、HIV 感染症治療は大きな効果を上げてきた。現在では使用できる薬剤の数も増え、また強力な抗 HIV 効果を持つものも開発されてきている。その一方で、これらの抗 HIV 薬に対して耐性を持つ多剤耐性ウイルスの出現や抗 HIV 薬の引き起こす強い副作用が HAART 療法を行う上で大きな妨げとなっている。また HAART に用いられる抗 HIV 薬が高価なことから、先進国以外での薬剤療法の継続が困難であることも少なくない。以上のことから効果的で安価な HIV ワクチンの開発が求められている。本研究では HIV を抗原として感作した樹状細胞 (DC) を DC ワクチンとして用いることにより、その抗 HIV 効果について hu-PBL SCID マウスの系で評価した。

B. 研究方法

1) DC 培養法

健康人 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。

3) hu-PBL SCID マウス構築法

成熟 DC は AT-2 によって不活化した HIV-1 を抗原として感作させ、DC ワクチンとした。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 と抗原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。5～7 日後、再び同じ抗原で感作した成熟 DC を $1 \sim 3 \times 10^5$ 個脾臓実質内に接種して 2 回目の感作を行った。感染後 7～8 日後マウスを屠殺し血漿と脾臓内のヒト PBMC を回収した。細胞性免疫の有無について p24 抗原存在下における IFN γ 産生細胞を ELISPOT アッセイにより評価した。また ELISPOT アッセイには、hu-PBL SCID マウスを構築する際に用

いた PBMC や DC と同じドナー由来の B 細胞から樹立した B 細胞株を stimulator として使用した。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。この系を用いて 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

PBMC と抗原感作 DC を 1×10^5 個移植後 7 日後に再び抗原感作 DC をさらに 1×10^5 個移植して boost し、さらに 7 日後マウスをと殺し脾臓から回収したヒト PBMC を用いて ELISPOT アッセイで IFN γ 産生細胞を検出した。その結果 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 1)。そこで 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、これを APC として用いた。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 8 日後に変更し、より強い HIV 特異的免疫反応の検出を試みた。また DC ワクチンとして接種する DC の数を 1×10^5 個から 3×10^5 個に変更した。その結果、AT-2 処理した HIV-1 を抗原感作した DC 免疫群 5 匹のうち 1 匹のみだったが抗原特異的な IFN γ 産生細胞の上昇を確認できた (図 2)。

D. 考察

DC ワクチンを細胞性免疫で評価したが、DC ワクチン接種群で抗原特異的な IFN γ 産生細胞の増加が見