

図3 TACI siRNA およびヘパリチナーゼ処理の BAFF/APRIL 誘導 B 細胞応答に対する効果

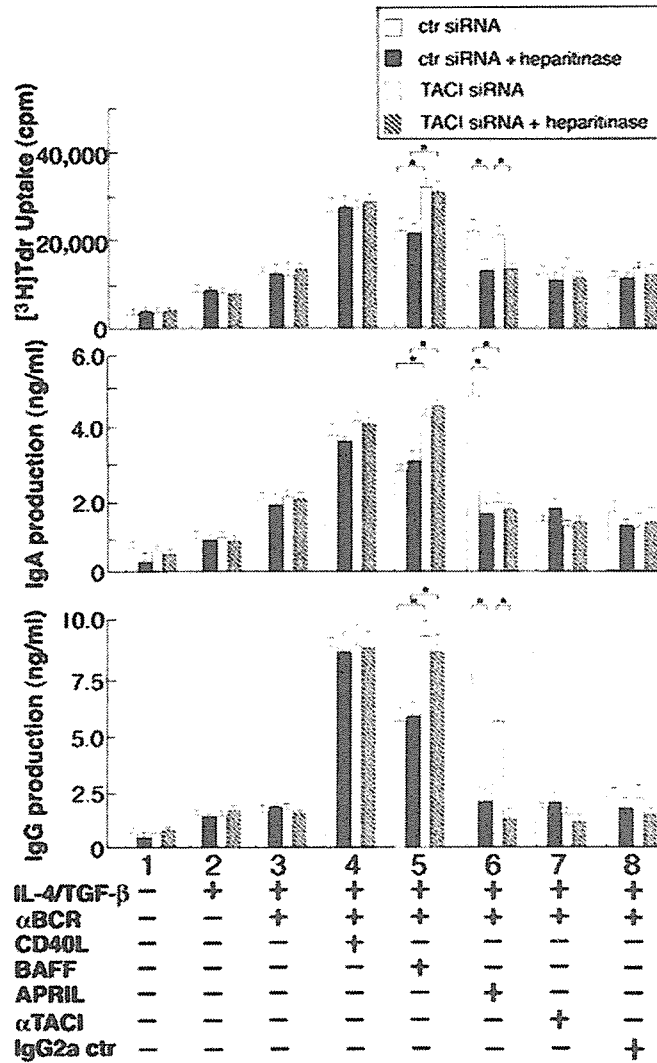
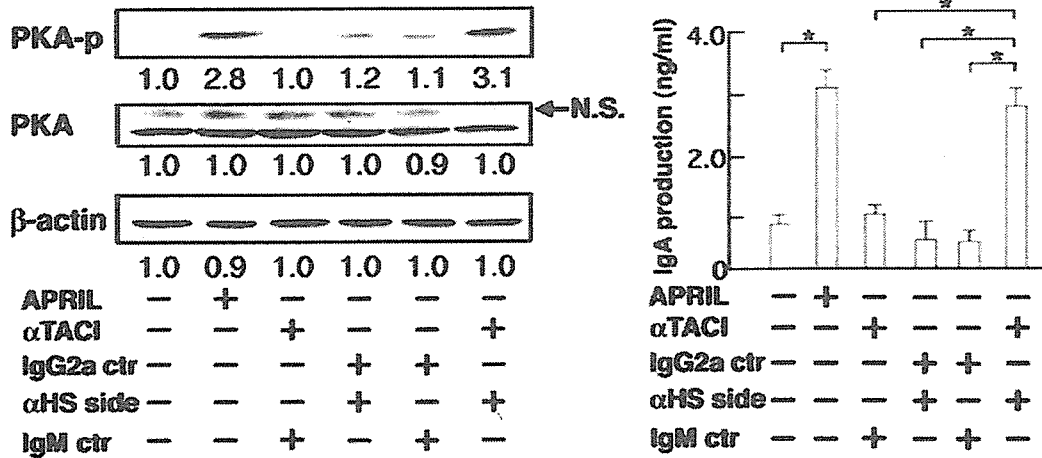


図4 TACI および HSPG 刺激による PKA リン酸化と IgA 抗体産生の誘導



「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：ヒトリンパ球の生着が高く、GVHD を引き起し難く、かつ 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。ヒト IL-4 cDNA をクローニングし、サイトメガロウイルスプロモーターの後位に配置した導入用 DNA の作製を行い、CB-17-scid、BALB/cA-RAG2, gC double KO および NOD/Shi-scid, gC KO (NOG)マウスの 3 系統免疫不全マウス、またはそれら背景近交系マウス前核期受精卵に顕微注入して、免疫不全トランスジェニック (Tg) マウスを作製した。CB-17-scid、BALB/cA-RAG2, gC double KO 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。NOG マウスに関しては、各々血中濃度 656.5、321.5、73.92 pg/mL の hIL-4 が検出された founder mice の 3 匹を得た。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。

### A. 研究目的

本研究の目的は、エイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果を調べるための小型動物モデルを作製することである。従来の C.B-17-scid マウスなどの免疫不全マウスにヒトリンパ球を移入し、HIV-1 を感染させる SCID-huPBL モデルでは、移入末梢血単核球の移植性がドナーによってまちまちであること、生着性が良すぎると逆に GVHD 反応でマウスが早期に死亡してしまうことなどが問題点である。また、これらモデルでは R4 type の HIV-1 は比較的感染するが、X4 type は感染し難い。このため、C.B-17 マウスと BALB/cA-RAG2, gC double KO マウスを遺伝的背景とした hIL-4 を分泌する免疫不全トランスジェニックマウスの作製を行い、これら免疫不全 Tg マウスでの、HIV-1 感染性を検討する。加えて、臍帯血 CD34+ 幹細胞を移植することによって、GVHD を起さずかつヒト T 細胞分化が可能な NOD/Shi-scid, gC

KO (NOG)マウスに hIL-4 を分泌させることで、GVHD を起さず、HIV-1 感染が容易な免疫不全マウスの開発も行った。

### B. 研究方法

ヒト IL-4 Tg 免疫不全マウス作製のための導入用遺伝子断片の構築を行った。健康人ボランティアから承諾を得て採集したヒト末梢血より分離した PBMC を PWM の刺激下で 48 時間培養し、それより RNA を抽出後、定法に従い、cDNA 合成、RT-PCR によって、ヒト(h) IL-4 を得た。得られた h IL-4 の塩基配列を決定後、pCMVb vector (Invitrogen)の CMV promoter の後位に挿入する。この DNA の COS-7 細胞株への in vitro transfection により、その培養上清中の hIL-4 を ELISA で確認した。その遺伝子断片を、C.B-17-scid、BALB/cA-RAG2, gC double KO または NOG マウスの、またはそれら背景近交系マウスとの F1 の

前核期受精卵に顕微注入した。得られた産子を PCR で確認し、かつ ELISA によってマウス上清中の hIL-4 の検出を行った。得られた founder Tg マウスをそれぞれの系統マウスと交配して、各々系統で、血中 hIL-4 が高発現するライン、低発現のライン 2 ラインを樹立し、各々について感染実験のための生産を行った。これら動物作製のために実験動物中央研究所、遺伝子組換え安全委員会の承認、動物実験安全委員会の承認を得た上で、実験動物中央研究所の「実験動物の飼育管理のための作業手順」に沿って行われた。動物は全て、SPF 下のアイソレーターで育成された。

### C. 研究結果

図 1 に示すような hIL-4 cDNA を挿入した発現 vector を作製した。この遺伝子を *in vitro* transfection で導入した COS-7 細胞株の培養上清中で hIL-4 が分泌されることが確認された(図 2)。この発現 vector を XhoI と HindIII の制限酵素で切断後に切り出して直鎖としたものを、C.B-17-scld、BALB/cA-rag2, gc double KO および NOG マウスまたはその背景近交系の前核期に導入して、各々 3 匹の Tg founder を得ることができた(表 1)。これら Tg founder マウスでの血清中の hIL-4 濃度は表 2 に示すように様々で、そのうち低濃度および高濃度の hIL-4 を分泌する founder マウスからラインを樹立した。最終的に 2 系統マウス、すなわち C.B-17-scld-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 3)。BALB/cA-RAG2,  $\gamma$ C 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 4)。これら Tg マウスの遺伝子伝達率は、C.B-17-scld

の低発現系で 51%、高発現系で 56%、BALB/cA-RAG2,  $\gamma$ 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と考えられた。NOG -hIL-4 Tg マウスは現在ラインの樹立を行っている。

### D. 考察

本研究は、新規 HIV-1 感染小型動物モデルを作ることが目的である。本研究期間に免疫不全マウス 2 系統 (BALB/cA-rag2, gc double KO マウスおよび C.B-17-scld 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、NOD/Shi-scld, 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、GVHD が全く認められずに、HIV-1 の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-scld 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- scld, 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、HIV-1 感染動物モデルの作出のためにヒト因子産生 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。また、ヒト IL-4 cDNA 増幅のためのヒト末梢血液は、健康人より informed consent を得ている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, 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 gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J Virol* 2005;79:2087-2096.
- 2) Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K: Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2005;20:1477-1484.
- 3) Yahata T, Ando K, Miyatake H, Uno T, Sato T, Ito M, Kato S, Hotta T: Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gammac(null) mice. *Mol Ther* 2004;10:882-891.
- 4) Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 2006;107:1878-1887.
- 5) Dewan MZ, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood*. 2006;107:716-724
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Kametani Y, Shiina M, Katano I, Ito R, Ando K, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Toyama K, Tsukamoto H, Matsumura T, Saito Y, 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 1) Kametani Y, Shiina M, Katano I, Ito R, Ando K, 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.
2. 学会発表
1. Ito, M. Development of Severely Immunodeficient Mice Suitable for Humanized Mice, 1st International Workshop on Humanized Mice, Tokyo, 2006.
- 10) 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特になし

図 1. hIL-4 cDNA を挿入した発現ベクター

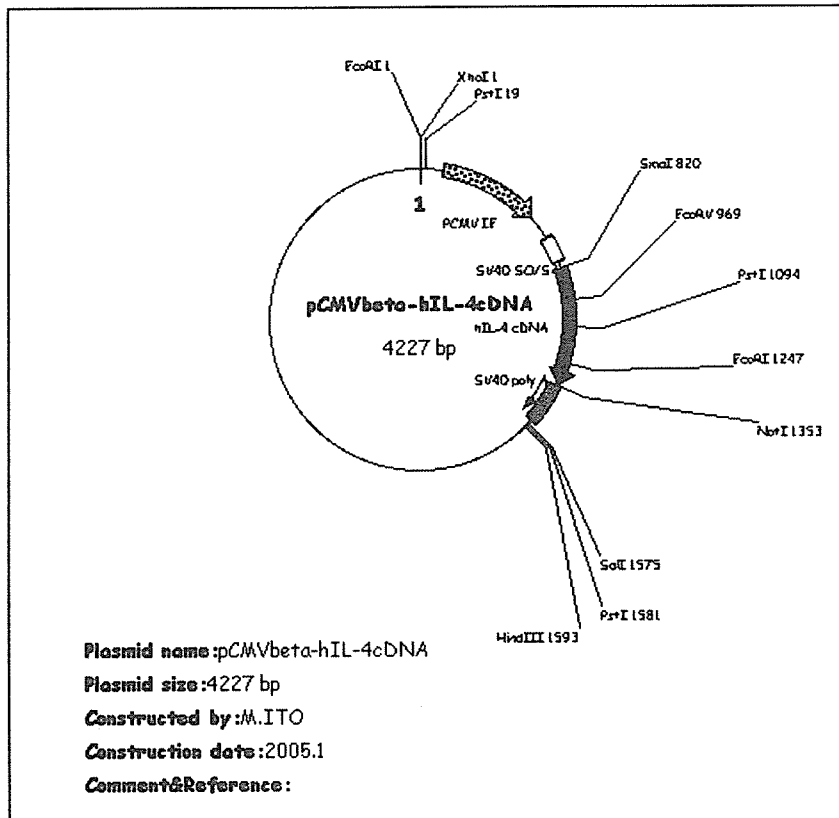


図 2. Transfection による COS-7 細胞でのヒト IL-4 産生

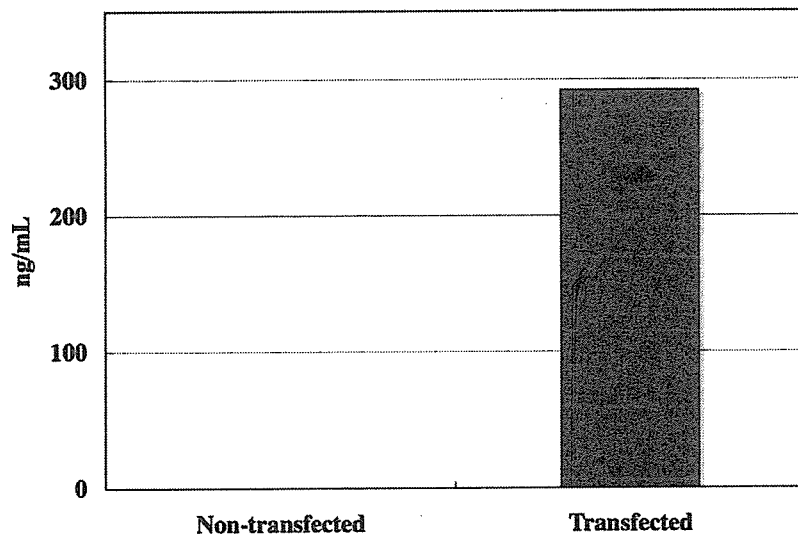


表 1. 前核期受精卵への遺伝子導入による Tg マウスの作製結果

免疫不全マウス系統	受精卵の マウス系統	操作胚 数	移植胚数	出産子数	離乳子数	Tg陽性 数	血清中hIL-4 産生陽性数
C.B-17-scid	(C.B.-17-scid ♂ x C.B.- 17-scid♀) F1	390	355	17	16	5	3
BALB/cA- RAG2, gC d KO	(BALB/cA ♀ x BALB/cA- dKO)F1	396	344	31	27	4	3
NOD/Shi-scdi, gC KO (NOG)	NOD	149	97	46	28	1	3
	NOG x NOD	128	105	34	25	2	

表 2. Founder マウスの血清中 hIL-4 濃度

免疫不全マウス系 統	Tg数	血清中hIL-4濃度 (pg/mL)	系統樹立
C.B-17-scid	3	594	NO
		603	YES
		3,044	YES
BALB/cA-RAG2, gC d KO	3	700	YES
		1,095	NO
		5,840	YES
NOD/Shi-scdi, gC KO (NOG)	3	74	YES
		322	YES
		657	YES

表 3. 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 4. 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	



NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> 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 $\gamma$ <sup>null</sup> 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 三浦 義治 京都大学ウイルス研究所 助手  
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 北山 裕子 京都大学ウイルス研究所 大学院生  
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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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、ラット脳海馬由来のスライス培養系の確立を試み、HIV-1 感染マクロファージの共培養により神経組織構築障害、特に HIV-1 感染マクロファージによる神経細胞障害現象を再現できた。この組織障害病理像はエイズ脳症患者のそれに類似していたことより、この評価系の確立により小動物を用いたエイズウイルスの神経病原性の評価が可能であることが分かった。さらに、CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。さらに、現在大きな問題に

なりつつある脳症のメカニズム解明とそれに有効な治療薬の開発に寄与する研究を目指す。現存の逆転写阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤などの治療薬はすべて中枢神経系への移行は非常に悪く、問題となっている。そして、HIV 感染に伴う脳症の発症メカニズムについてはほとんど解明されていない。それは、HIV はほとんど神経細胞に感染しないこと、中枢神経組織において HIV 感染細胞は脳内に浸潤したマクロファージならびに脳にもともと局在するマクロファージ系細胞であるマイクログリアでありながら、明らかに感染者においては神経細胞の脱落とグリア細胞の増殖 (gliosis) が観察される。今後、抗エイズ薬長期服用者が激増している現状からも、なぜ、HIV が中枢神経組織を破壊するか明らかにし、有効な薬剤を開発する、あるいは、見出す必要がある。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う。

## 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

ス：NOG)の肝臓へ $1-2 \times 10^5$ 個のCD34<sup>+</sup>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 $10^6$  tissue culture infectious dose<sub>50</sub>(TCID<sub>50</sub>)のウイルスを接種し、感染後に解剖し、脾臓、胸腺、骨髓、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、アンプリコアーキットによりHIV-1 RNA量を測定した。

#### 3) 脳神経組織培養実験系

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

#### 4) 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をブライムしたhu-PBL-SCID-spl1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<sup>+</sup>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、骨髓においては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、骨髓においては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<sup>+</sup>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、ウエスタンブローディングの結果、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) HIV 誘導神経組織障害の評価系確立

脳組織内の組織構築とウイルス感染による影響をリアルタイムに把握できる実験系として、3次元構築された脳海馬組織そのものを維持培養できる海馬スライス培養系の確立を行った。そして、その培養系をさらに、HIV 誘導神経組織障害の評価系として利用可能か検討した。まず、哺乳 7-8 日目のラットあるいはマウスから海馬を取り出し、そのまま、薄切し、ミリポア膜上にて培養を行った。培養直後は生体内の層構造がいったん破壊されるが、培養 2 週目には中央に CA1 や CA3、そして、dentate gyrus などの神経細胞層と周辺のグリア層が再構築された。そして、免疫染色の結果、これらの神経細胞層 (NeuN 陽性細胞) とアストロサイト層 (GFP) の分布は確認された (結果示さず)。この培養系に HIV 感染マクロファージを接種し、HIV 誘導神経系障害の評価系となりうるか検討した。まず、培養開始時からウイルス感染マクロファージとの共培養を行うとスライス培養開始後に見られる神経系組織の再構築反応が明らかに阻害されることが判明した。次に、培養後 2 週目に神経細胞層と周辺のグリア層の再構築が完了し、維持可能になっている海馬スライス培養にウイルス感染マクロファージとの共培養を行うと、スライス内の神経細胞全般に脱落が見出されるとともに、特に CA3 領域から歯状回の神経細胞層に特に際立った脱落が観察された。一方、神経細胞の脱落とは対照的にアストロ細胞ならびにマイクログリア細胞の形態変化からこれらの細胞の活性化が推測された (結果示さず)。

### 4) CD4<sup>+</sup>T 細胞由来の HIV 抑制因子の探索

ヒト CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。

脳内に HIV 感染細胞を浸潤させてマウスにおいて神経細胞にアポトーシスが誘導できることは確認している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 2777-2782, 2003) ので、今回は 3 次元に構築された中枢神経組織を顕微鏡下にリアルタイムに観察する方法として脳組織スライス培養系を利用した。本方法は脳海馬組織を 350  $\mu$ m 程度にスライスし、その組織そのまま培養しようとするものであり、培養のための回収により組織構築が破壊された海馬組織がふたたび構築され神経細胞層やグリア層が顕微鏡下にて観察されるものである。このスライス培養系に種々の HIV 感染細胞とトランスウエルを用いた共培養系実験のなかから、HIV 感染ヒト初代マクロファージと共培養を行うと、海馬スライス再構成能に対する影響と再構成後も特に神経細胞に対する障害活性が誘導されることを見出した。この再構成抑制ならびに神経組織破壊活性は他の HIV 感染細胞株との共培養系では見られず、HIV 感染マクロファージが遊離するなんらかの神経障害因子の存在を疑っている。さらに、この HIV 感染マクロファージとの共培養により見出された組織所見として、神経細胞の脱落とグリア細胞の活性化はエイズ脳症

患者組織において見出されている典型的病理組織所見であり、この培養系が HIV 誘導神経系障害の評価系と応用可能であると強く示唆するものである。また、神経系細胞のなかで特に神経細胞に対する障害活性が明らかであることより、その細胞分化に対する抑制活性を評価する実験系として、この海馬スライス培養系に神経幹細胞を新たに静置し、神経系細胞分化に対する HIV 感染による影響も検討した（結果示さず）。その結果、神経幹細胞から神経細胞への分化は HIV 感染マクロファージの存在下においては明らかに阻害されるが、同じ細胞からアストロサイトへの分化はほとんど阻害されないことが明らかになった。

#### 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とラット脳海馬スライス培養系を用いて HIV-1 脳症に類似の病理像を再現する実験系の確立に成功した。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. Feng J, Misu T, Fujihara K, Misawa N, Koyanagi Y, Shiga Y, Takeda A, Sato S, Takase S, Kohnosu T, Saito H, Itoyama Y. Th1/Th2 balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- $\alpha$ . *J. Neuroimmunol.* 51: 189-194, 2004.
2. Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes & Infection* 6: 715-724, 2004.
3. Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78: 8654-8662, 2004.
4. Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J. Virol.* 78: 11352-11359, 2004.
5. Kamada M, Li RY, Hashimoto M, Kakuda M, Okada H, Koyanagi Y, Ishizuka T, Yawo H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2499-2508, 2004.
6. Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, 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  $\gamma$ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.*, 79: 2087-2096, 2005.
7. Miura Y., and Koyanagi Y.: Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol.* 15: 169-178, 2005.
8. 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.
9. Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., Koyanagi Y., Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 4:325-330, 2005.
10. 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.
11. Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T.: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 106:3449-3456, 2005.
12. 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.
13. 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.
  14. 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.
  15. Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curt Top Microbiol Immunol*, in press.
  16. Miura Y, Kitayama H, Andou Y, Koyanagi Y. HIV encephalopathy and neural stem cell virology. *Brain and Nerve*, 58:553-559, 2006.
  17. Miura Y and Koyanagi Y. HIV encephalopathy. *Japan Medical Association Journal*, 49, 212-218 2006.
2. 学会発表
1. Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Koyanagi Y. A cDNA library-expressing lentivirus vector system to identify inhibitor gene for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced cell death. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2004.
  2. Aoki J, Koyanagi Y. Stable inhibition of CXCR4 with siRNA-expressing lentivirus vector. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2004.
  3. 芳田剛、河野祐治、稗田訓子、青木淳、三浦義治、小柳義夫. cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる HIV 抑制因子の単離 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
  4. 稗田訓子、芳田剛、青木淳、三浦義治、河野祐治、田中勇悦、小柳義夫. 生細胞における HIV コレセプター分子の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
  5. 三浦義治、小柳義夫. エイズ脳症で起こる神経細胞死には TRAIL 分子が関与する. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
  6. 岡田広司 三浦義治 川口寧 西山幸廣 小柳義夫. 中枢神経組織スライス培養系を用いた単純ヘルペスウイルス 1 型の感染様式の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
  7. Koyanagi Y, Aoki J, Yoshida T, Ebina H. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004.
  8. Koyanagi Y, Kawano Y, Yoshida T, Jun Aoki. A cDNA library-expressing lentivirus vector system used to clone an inhibitor for HIV-1-induced cell death. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004.
  9. 青木淳、蝦名博貴、小柳義夫. HIV 増殖関連細胞因子の siRNA 発現レンチウイルスベクターによる解析. 第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
  10. 芳田剛、稗田訓子、河野祐治、青木淳、小柳義夫. ゲートウェイ法による効率的 cDNA ライブラリの組換え反応を利用した発現レンチウイルスベクター: HIV 抵抗性遺伝子の単離. 第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
  11. 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.
  12. Aoki J, Koyanagi Y. Suppression of HIV-1 release through CD63-overexpressed plasma membrane. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2005.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.



18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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タンパク質のビリオンへの取り込み抑制. 近畿エイズ研究会、大阪、2006.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Koyanagi Y. Roles of tetraspanin in HIV-1 infection. Japan-German joint AIDS conference, Bohem, 2006.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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).
50. 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<sup>+</sup>細胞移植NOGマウスの構築

緒帯血ロット	放射線量グレイ	細胞数	性別	マーク	blood	%HLA	%CD4	%CD8	構築
#43	0.13	140000	♀	1	6/9(8W)	22.3	5.0	3.3	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
#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
#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<sup>+</sup>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。

