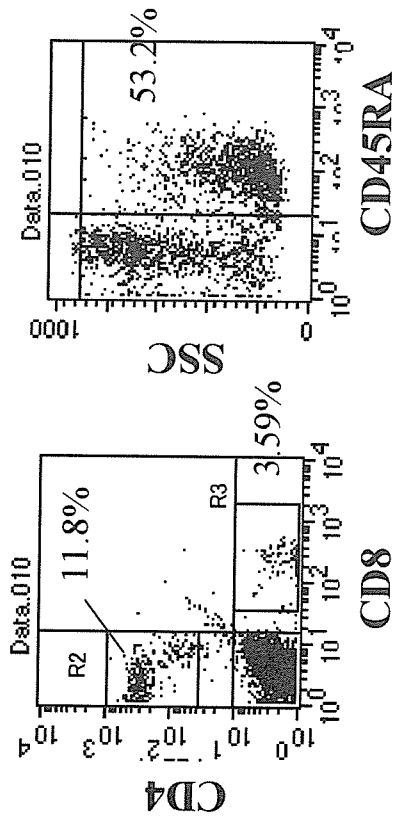


図1B. ヒトCD34+移植NOGマウスにおけるナイーブT細胞の構築.

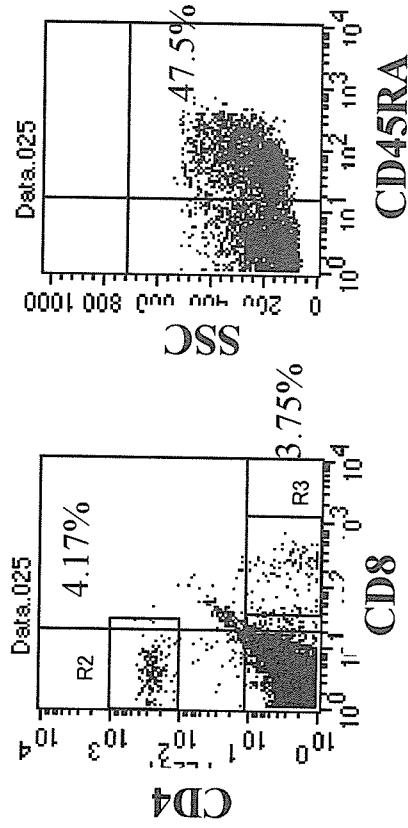
PBL



CD4+CD45RA+
: 57.8%

CD8+CD45RA+
: 94.2%

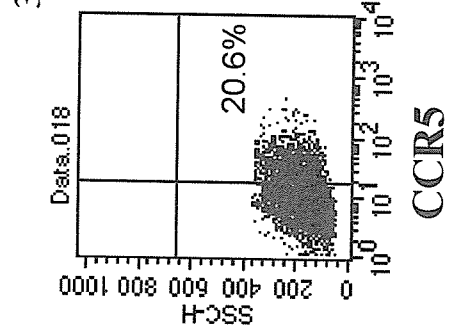
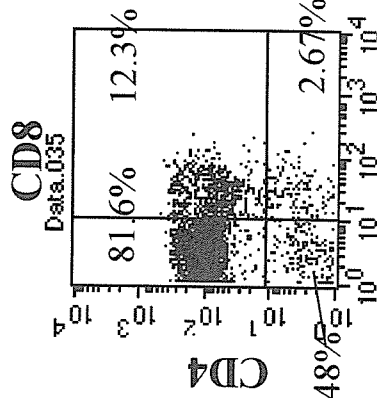
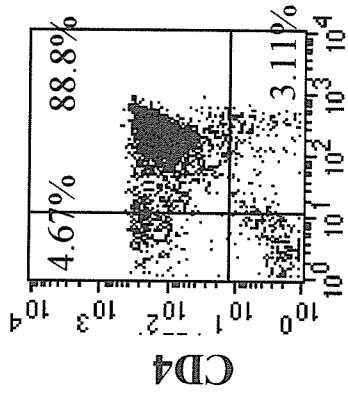
Spleen



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.

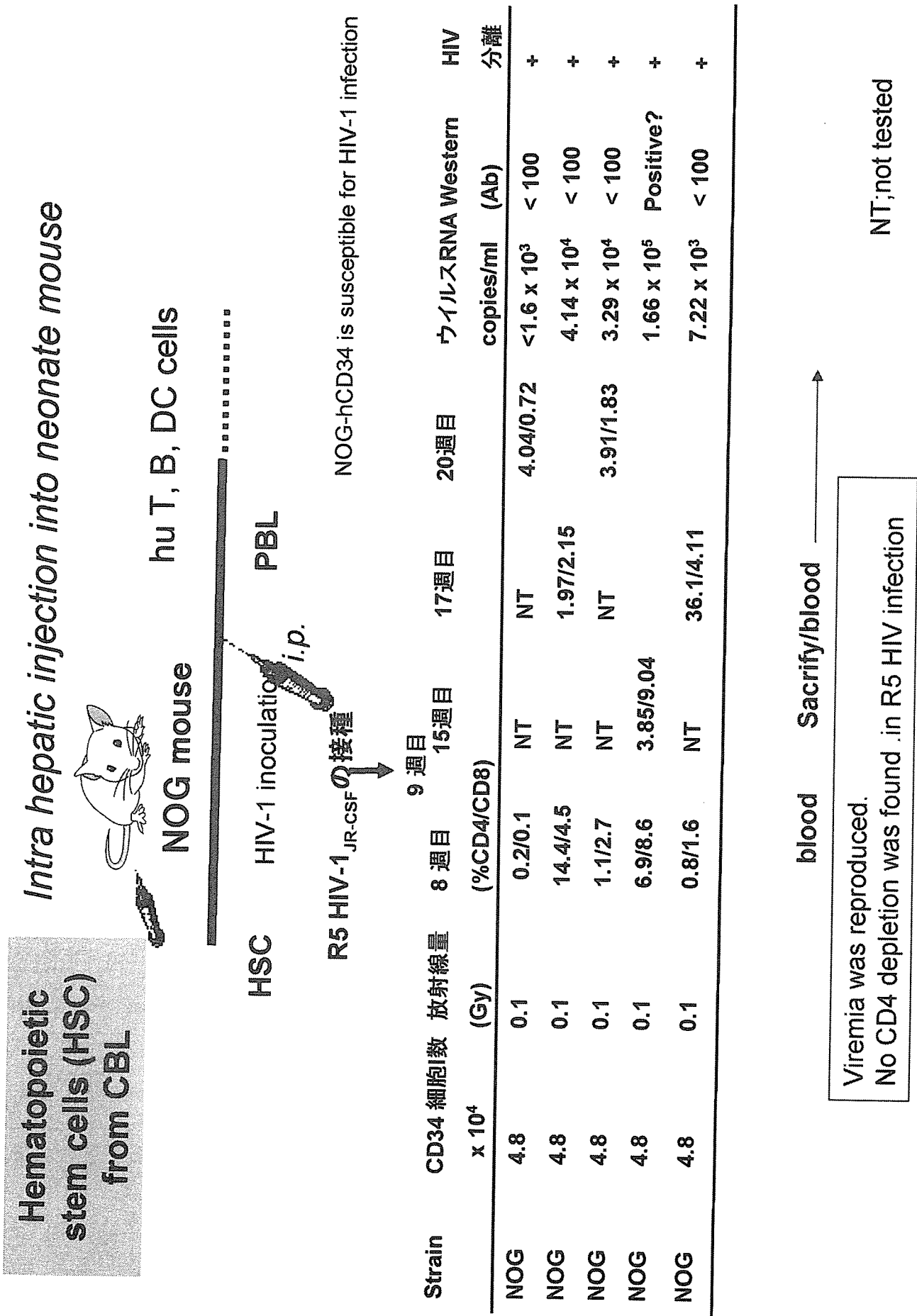
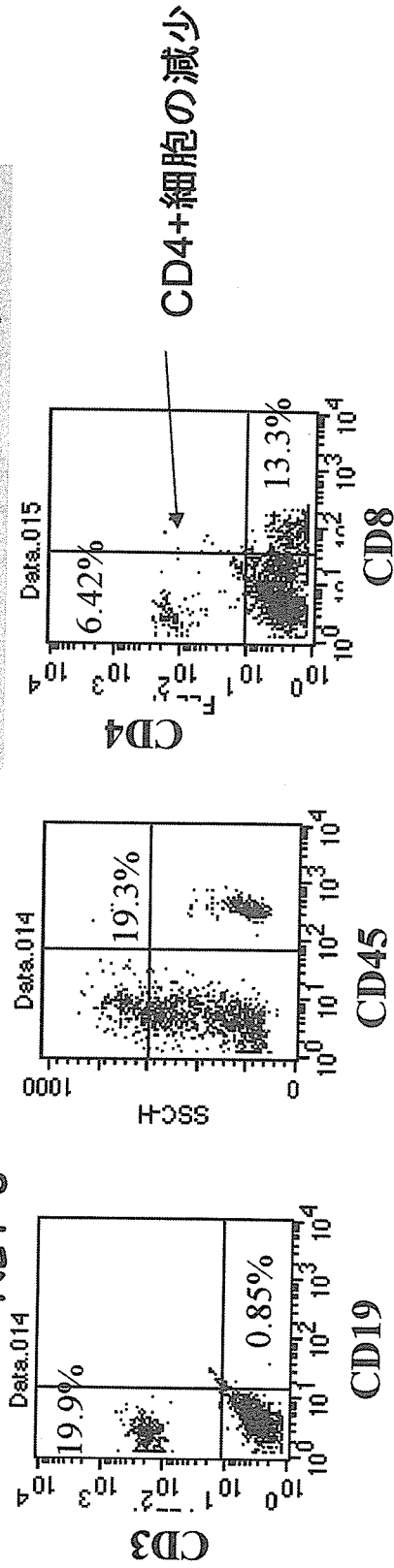


図2B. ヒトCD34+移植NOGマウスにおけるX4 HIVの感染成立.
 Mouse PBL X4HIV-1(NL4-3)接種ご4 週目

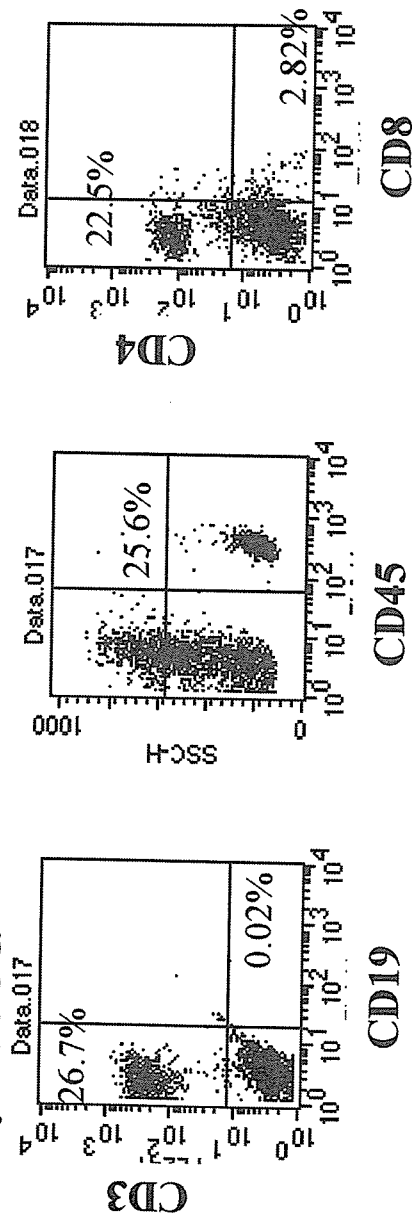
移植後13週目

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	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		GLI 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
インターフェロニンファミリー		Kallikrein 14	1.74
IFN-a10	4.10	Keratin associated protein 1 - 3	2.52
IFNT1	2.88	KIAA1500 variant 4 (FRAS1)	4.72
		Luteinizing hormone b polypeptide	4.17
TNF レセプターファミリー		Matrix Gla protein	4.97
☆ TNF receptor super family member 7	6.94	Motilin	5.90
		Mucin	2.64
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	3.76
Insulin-like growth factor binding protein 5	7.37	Norrrie disease	37.10
Insulin-like growth factor binding protein 7	28.79	Orosomucoid 1	3.46
		Pancreatitis-associated protein	1.90
アポリポroteinファミリー		Prokineticin 2	1.62
Apolipoprotein A-IV	6.35	Pro-melanin-concentrating hormone like 1	8.34
Apolipoprotein D	6.18	☆ Properdin P factor, complement	3.69
		☆ Properdin convertase subtilisin / kexin type 5	3.00
		Prostasin	10.40
糖鎖関連分子		Retinol binding protein 3	5.11
Biglycan	1.53	RNase family 7	1.78
Chitinase 1	1.40	S100 Ca binding protein A9	1.96
Chitinase 3 - like 2	2.06	Sema3F	5.32
Galactin 8L	74.86	Somatostatin	2.87
Proteoglycan 2 , Bone marrow	2.97	Spondin 1	3.20
		Submaxillary gland androgen regulated protein 3 homolog A	1.55
		Superoxide dismutase 3	1.90
		Tesican 2 (SPOCK2)	3.42
		Type X collagen	15.72
		☆ Urotensin 2	1.71
		Uveal autoantigen	264.10
		von Willebrand factor (vWF)	1.43
		WAP 4 disulfide core domain 1	1.67
		Wnt3	3.38
			1.84

その他

図4. 3種類のヒト化SCIDマウスのHIV-1感受性

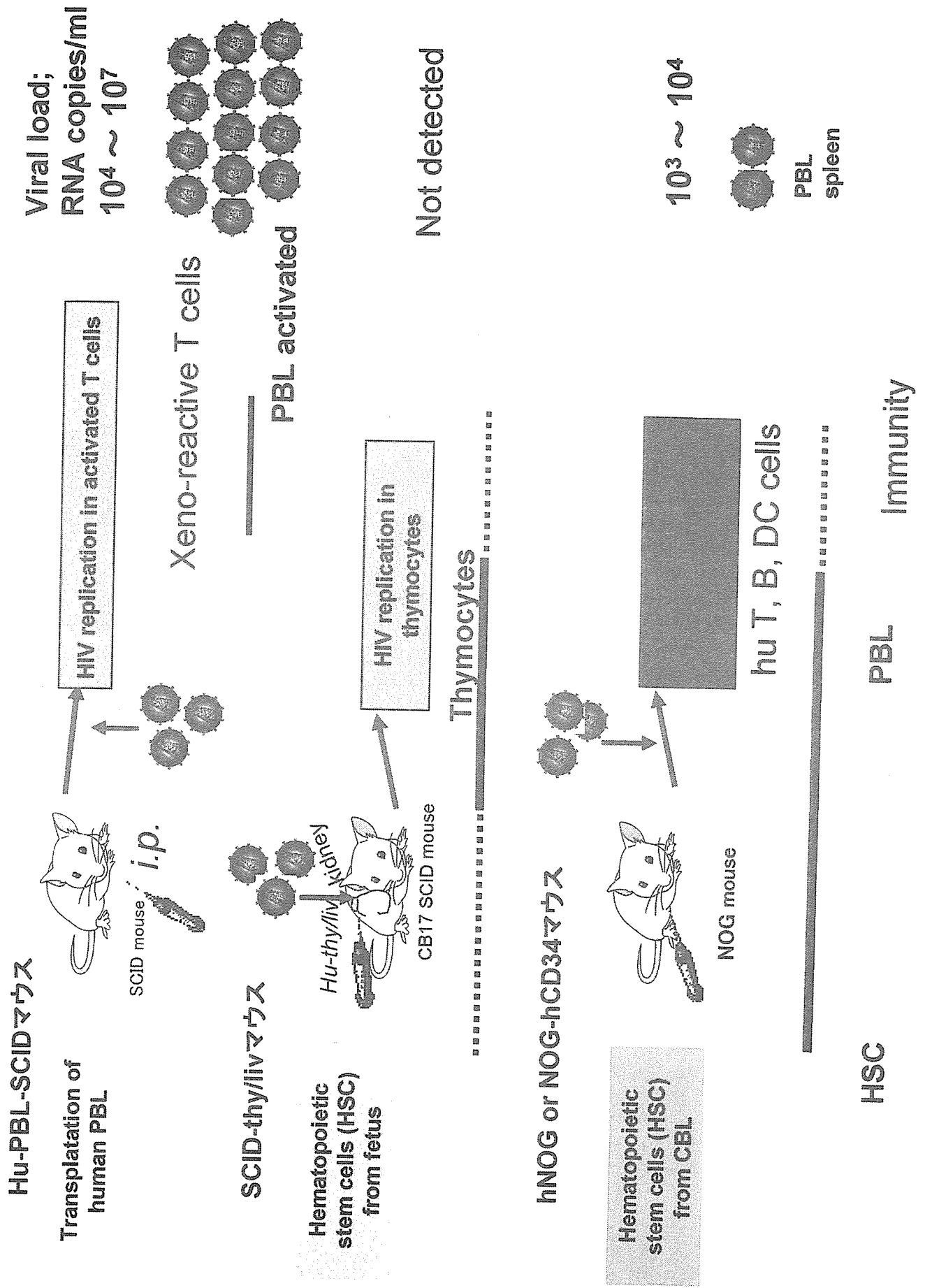
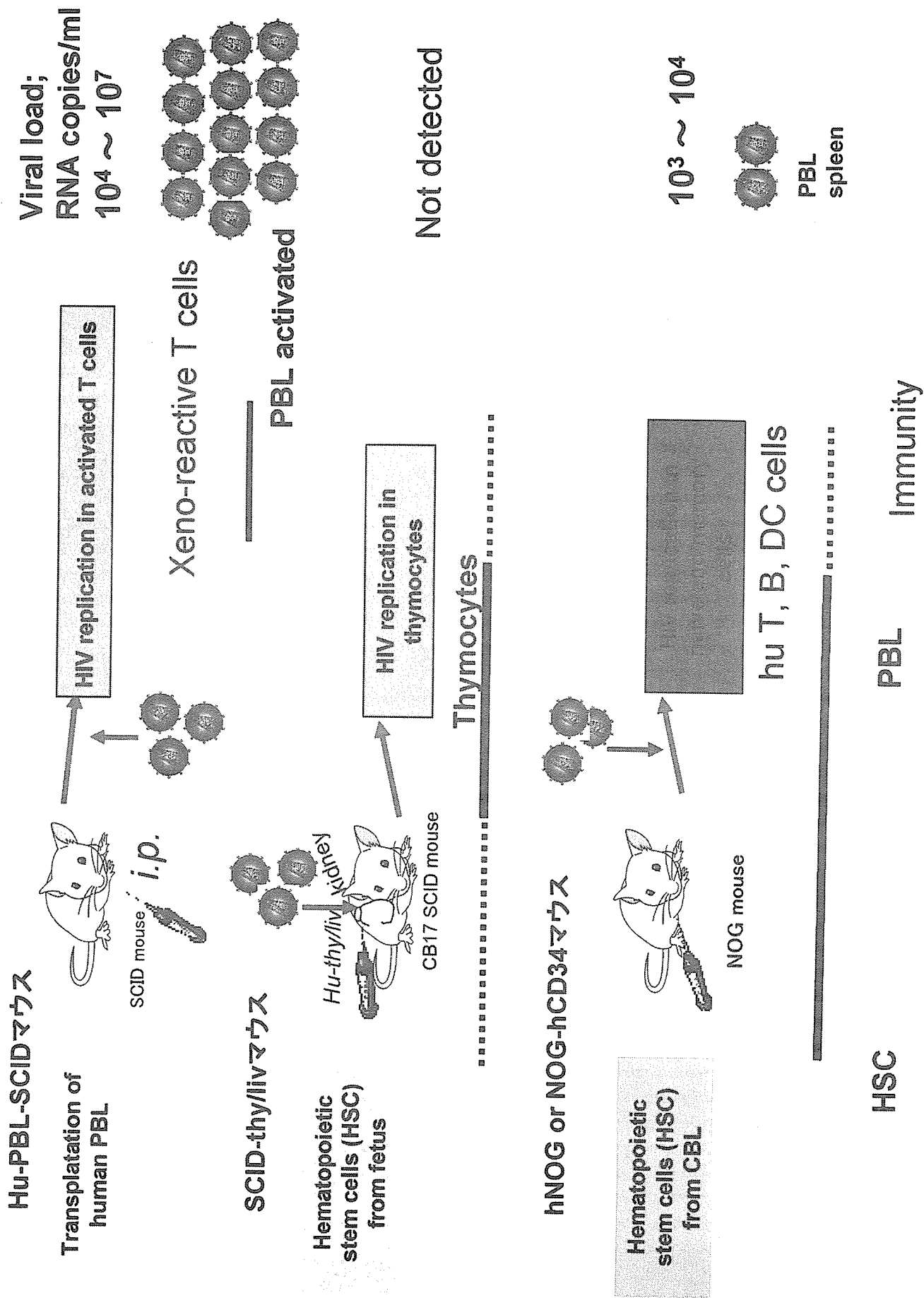


図4. 3種類のヒト化SCIDマウスのHIV-1感受性



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」

総合研究報告書 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

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 ワクチンの開発を目的としてヒト PBMC 由来 CD14 陽性単球から樹状細胞 (DC) を分化・誘導した。これに AT-2 処理で不活化した HIV-1 を抗原として HIV-1 感作 DC を作製した。これを SCID マウスの脾臓実質内にヒト PBMC と共に移植し hu-PBL SCID マウスを構築した。DC 移植後 21 日目にマウス血漿及びマウス脾臓内のヒト PBMC を回収し、DC によって誘導される抗 HIV 特異的免疫を細胞性免疫と液性免疫について検討した。

A. 研究目的

HIV 感染症治療には現在抗 HIV 薬剤による多剤併用療法 (HAART) が広く用いられているが、この薬剤治療では薬剤耐性ウイルスの出現が治療の大きな妨げとなる。また薬剤の価格が高価な為先進国以外の国では治療の継続が難しい。そのため HIV に対する効果的なワクチンの開発が急務となっている。本研究では HIV タンパクを発現するリコンビナントワクシニア及び AT-2 処理不活化 HIV に曝露した樹状細胞 (DC) が誘導する抗 HIV 特異的免疫能及び血漿中の特異的抗 HIV 中和抗体について hu-PBL SCID マウスを用いた HIV 感染モデルにより解析した。

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。分離した CD14 陽性細胞と DC の表面マーカー CD14、CD83、CD86、HLA-DR の発現変化を解析し分化を確認した。

2) DC 抗原提示能

また成熟 DC の抗原提示能は PPD 抗原を 18 時間感作させた DC を、自己の 1×10^5 個の CD4 陽性 T 細胞に対して 1.25×10^3 個、 2.5×10^3 個、 5×10^3 個、 1×10^4 個 (各々の DC : T 細胞の比率は 1 : 80、1 : 40、1 : 20、1 : 10) の割合で加えて共培養し、培養開始後 3 日後、4 日後、5 日後に [^3H] thymidine の取り込み量を測定して抗原提示能について解析した。

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 を抗原として関与させた。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 と抗原感作した同ドナーの DC を $1 \sim 3 \times 10^5$ 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 (図 1)。感染実験では 2 回目の感作後 7 日後に、この hu-PBL SCID マウスに HIV-1 JR-CSF を $1000\text{TCID}_{50}/\text{head}$ で i. p. で感染させた。感染後 1 週間後マウスを屠殺し血漿と脾臓内のヒト PBMC を回収した。細胞性免疫の有無については p24 抗原存在下における IFN γ 産生細胞を ELISPOT アッセイにより、液性免疫あるいは抗ウイルス活性を持つ活性因子の有無については中和アッセイにより評価した。また ELISPOT アッセイの感度を高める目的で、hu-PBL SCID マウス構築に用いた PBMC と同じドナーから B 細胞株を樹立した。B 細胞は予め rVV/HIV-1 IIIIlgag に感染させ HIV 由来タンパクを発現させた。これを stimulator として ELISPOT アッセイの際にヒト PBMC と共培養して IFN γ の産生を上昇させ、より高感度な HIV 特異的 IFN γ 産生の検出を試みた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 抗原提示能を有する DC の作製：ヒト PBMC から単離した CD14 陽性細胞を GM-CSF、IL-4、IFN- β 存在下で培養し細胞表面マーカーを解析した結果、CD83、CD86、HLA-DR 等の成熟 DC マーカーの発現増強が認められた (図 2)。また誘導した DC の抗原提示能の解析では、抗原特異的に誘導される CD4 陽性 T 細胞による [^3H] thymidine 取り込みが観察された。DC : T 細胞の比率が 1 : 10 の時に [^3H] thymidine 取り込みの stimulation index は最も高くなった。この事から誘導した DC は T 細胞への抗原提示・活性化を誘導できる事が示された (図 3)。

(2) マウス HIV 感染モデルにおける DC ワクチンの評価：血漿中のウイルス量がこの DC ワクチンによ

て低下するかどうかの評価については実験群と対照群の間に血漿中 HIV RNA copy 数の差は認められなかった(図 4)。

(3)ELISPOT アッセイ: 始めに、PBMC と抗原感作 DC 移植後 7 日後に再び抗原感作 DC を移勅して 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 ELISOT 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 5)。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 として用いて再度解析を行った。しかしこの系でも AT-2 処理した HIV-1 を抗原感作した DC 免疫群で抗原特異的な IFN γ 産生細胞の上昇を検出することが出来なかった。そこで 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。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 匹のみで抗原特異的な IFN γ 産生細胞の上昇を確認できた(図 6)。

(4)中和アッセイ: 抗原暴露した DC を移植した群を陽性コントロール群、抗原暴露を行わない DC を移植した群を陰性コントロール群とした。血漿を 32 倍、64 倍、128 倍及び 256 倍に段階希釈し、5 倍段階希釈した HXB2 と PHA-BLAST の培養液中に加えて 1 週間培養し 2 群間における TCID₅₀ の変動を比較した。その結果抗原暴露群と非暴露群に有意な差は見られず抗原暴露 DC による HIV 特異的な中和抗体の上昇は今回の実験では確認できなかった(図 7)。

D.考察

ヒト PBMC から分離した CD14 陽性細胞を元にして作製した DC は T 細胞に対して抗原提示能を持ち、また NOG SCID マウスの脾臓実質内に PBMC と DC を移植することで hu-PBL SCID マウスを作製できることが確認できた。またこの hu-PBL SCID マウスに HIV-1 JR-CSF を感染させる事でマウス HIV 感染モデルを構築できた。しかしマウスの血漿中ウイルス量は DC ワクチンの摂取によって減少が見られなかった。これはマウスに感染させた HIV の力価が高かった為マウスの体内で HIV が急激に増加し DC ワクチンの効果を評価するのが難しかったと考えられた。そ

こで DC ワクチンを細胞性免疫と液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られたが、抗原のみ接種した群でも非特異的な IFN γ 産生細胞の増加が見られた為、初回ワクチン接種から boost までの期間を 7 日間から 5 日間に短縮して再度解析した。その結果 DC ワクチン群で抗原特異的に IFN γ 産生細胞の増加が見られた個体があった。しかし同じ群でも結果にばらつきがあり、1 群あたりの匹数が少なかった為と考えられた。今後はこの抗原特異的免疫反応が見られた個体の液性免疫や血漿中の HIV 特異的抗体の検出を行う。

E.結論

ヒト PBMC から分離した CD14 陽性細胞を元にして、抗原提示能を持つ DC のさに成功した。また NOG SCID マウスの脾臓実質内に PBMC と DC を移植することで hu-PBL SCID マウスを作製できた。またこの hu-PBL SCID マウスに HIV-1 JR-CSF を感染させる事でマウス HIV 感染モデルを構築できた。しかし hu-PBL SCID マウスを用いた抗 DC ワクチンの評価では、一部のマウスで抗原特異的な免疫誘導を確認できた。さらに正確な評価を行う為には、初回 DC ワクチン接種と boost の期間や boost 後の期間を 5 日間からさらに短縮して解析するのが有効と考えられた。

F.健康危険情報

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

G.研究発表

1) 論文

Yan H, Mizutani TC, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antivir Chem Chemother.* 16:363-73, 2005

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

H Yan, T Chiba, Y Kitamura, M Nishizawa, M Fujino, N Yamamoto and W Sugiura: Novel Small - Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase. 13th International HIV Drug Resistance Workshop. Tenerife, Canary Islands, Spain. 2004. 6. 8-6. 12

W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatake, T Ueda, M Fujino, K Yamada and N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan. 13th International HIV Drug Resistance Workshop. Tenerife, Canary Islands, Spain. 2004. 6. 8-6. 12

W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, M Nishizawa, J Kakizawa, T Ueda, M Hamatake, M Fujino, K Yamada, N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2002) in Japan. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004. 7. 11-7. 16

H Yan, T Chiba, M Nishizawa, Y Kitamura, N Yamamoto, W Sugiura: Inhibition of HIV-1 integrase strand transfer activity by Carbazole derivatives. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004. 7. 11-7. 16

T Chiba, M Takizawa, M Matsuda, M Honda, M Nishizawa, Z Matsuda, N Yamamoto, W Sugiura: A novel HIV-1 reporter cell line for rapid and accurate drug resistance phenotyping. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004. 7. 11-7. 16

M Nishizawa, S Kato, H Miura, M Fujino, Y Yamamoto, W Sugiura: Comparison of Intracellular Protease Inhibitor Concentration and Kinetics in Different Cell Types. Fifth HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance. Virginia, USA. 2004. 11. 14 - 11. 17

植田知幸、有吉紅也、三浦秀佳、松田昌和、千葉智子、巖馬華、Lay Myint、柿澤淳子、濱武牧子、西澤雅子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と

Gag 基質領域の相互干渉に関する解析. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-12-11. 静岡県静岡市

巖馬華、千葉智子、三浦秀佳、西澤雅子、野村伸彦、北村義浩、山本直樹、杉浦 互: 新規化合物カルバゾール誘導体による HIV-1 インテグラーゼ活性抑制機序の解析. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-12-11. 静岡県静岡市

松田昌和、Yan Hua、植田知幸、Urvi Parikh、柿澤淳子、西澤雅子、濱武牧子、藤野真之、三浦秀佳、Lay Myint、山本直樹、杉浦 互: 本邦における薬剤耐性 HIV-1 の動向と変遷に関する考察. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-12-11. 静岡県静岡市

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

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

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

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

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

Lay Myint, Tomoyuki Ueda, Masako Nishizawa, Teiichiro Shiino, Masakazu Matsuda, and Wataru

Sugiura. Virological and Statistical Analyses of Interference Between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver、2006年2月

T Ueda, M Itaya, K Tsuge, K Fujita, M Matsuda, M Nishizawa and W Sugiura. Reconstruction of HIV-1 full genome clones with Bacillus subtilis. XV International HIV Drug Resistance Workshop, 2006年6月

柴田潤子、西澤雅子、松田昌和、長谷川直紀、吉田いづみ、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博. 抗HIV剤治療下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析. 第54回日本ウイルス学会、2006年11月

三浦秀佳、千葉智子、滝澤万里、松田昌和、西澤雅子、本多三男、杉浦 互. ヒト T 細胞由来レポーター細胞 MARRBLE を用いた臨床分離株薬剤感受性の評価. 第54回日本ウイルス学会、2006年11月

J. Shibata, M. Nishizawa, M. Matsuda, W. Sugiura, F. Ren, and H. Tanaka. Analysis of Co-Evolution Between Mutations in Protease Inhibitor Resistance and in Gag. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006年11月

西澤雅子、加藤真吾、三浦秀佳、山本直樹、杉浦互. 細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤の薬剤濃度のモニタリング. 第20回日本エイズ学会、2006年12月

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1)特許取得
該当なし
- 2)実用新案登録
該当なし
- 3)その他 該当なし

hu-PBL SCIDマウスモデルを用いた HIV感染モデルの構築及びDCワクチンの評価

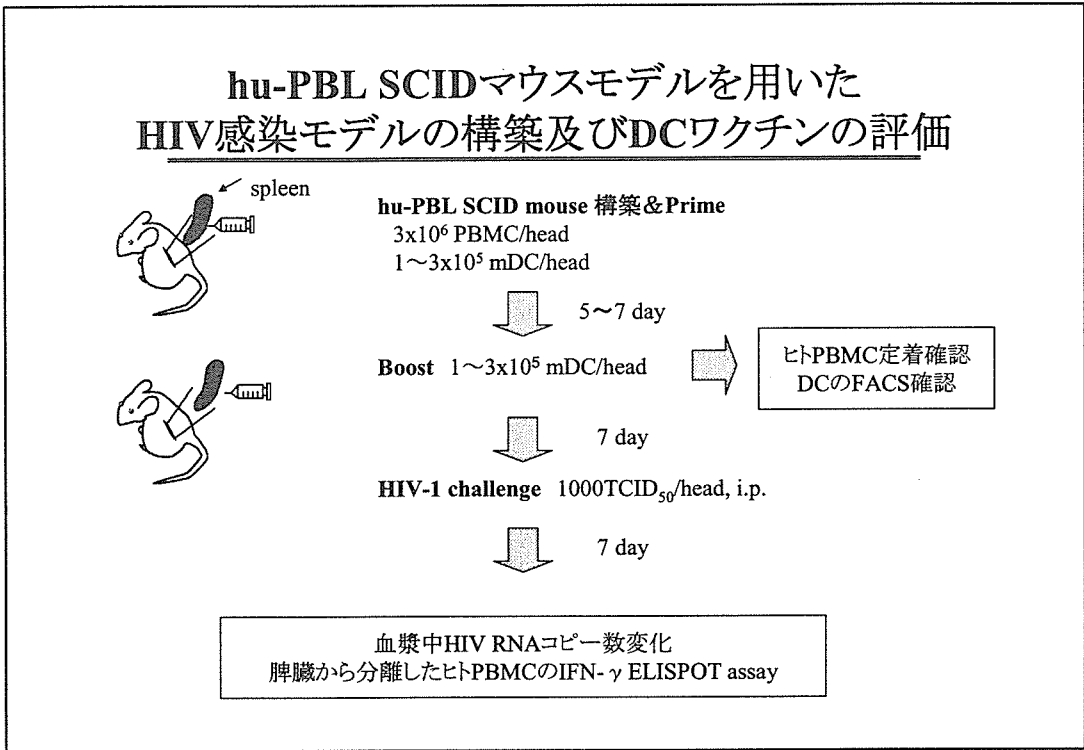


図 1

接着細胞培養法の解析結果

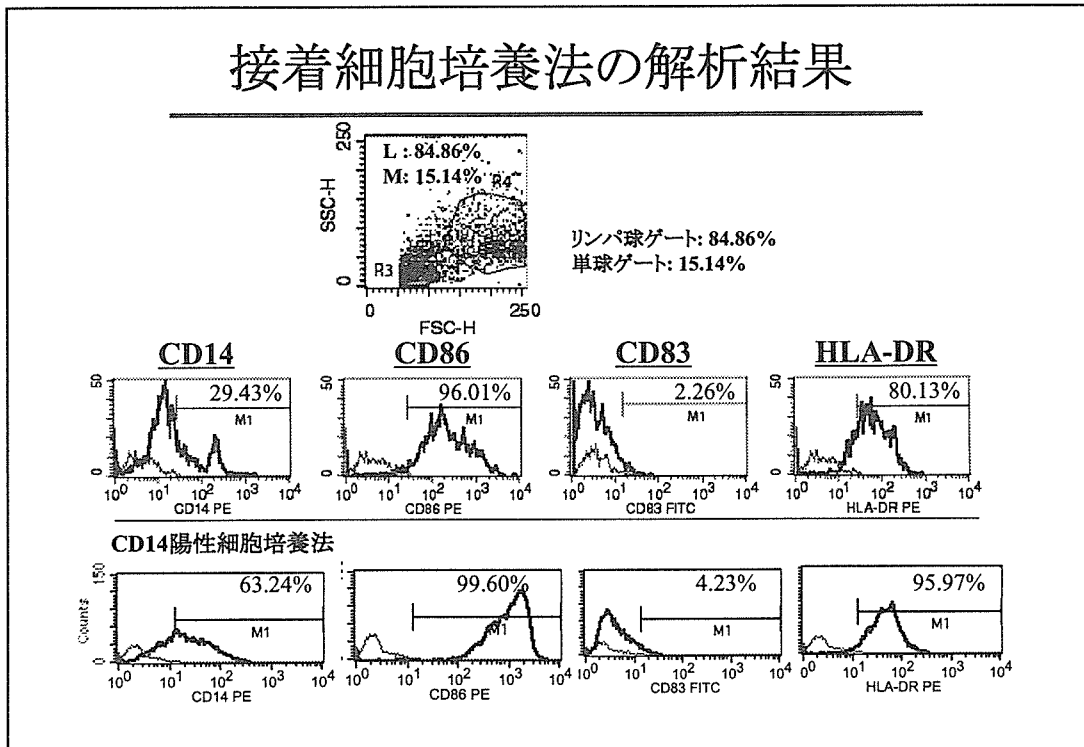


図 2

樹状細胞抗原提示能の解析(1)

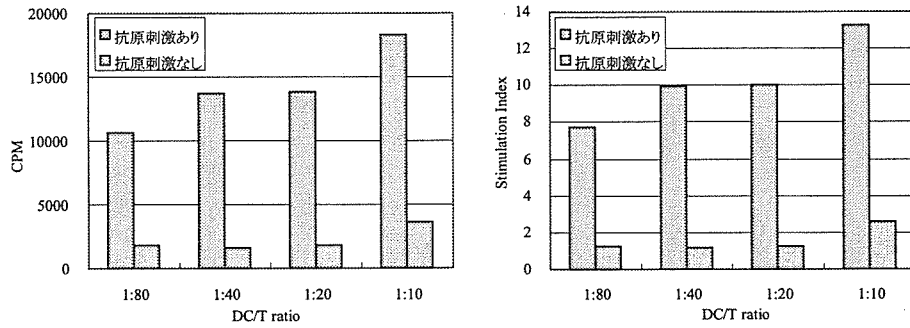


図 3

各群の血漿中HIV RNA copy数

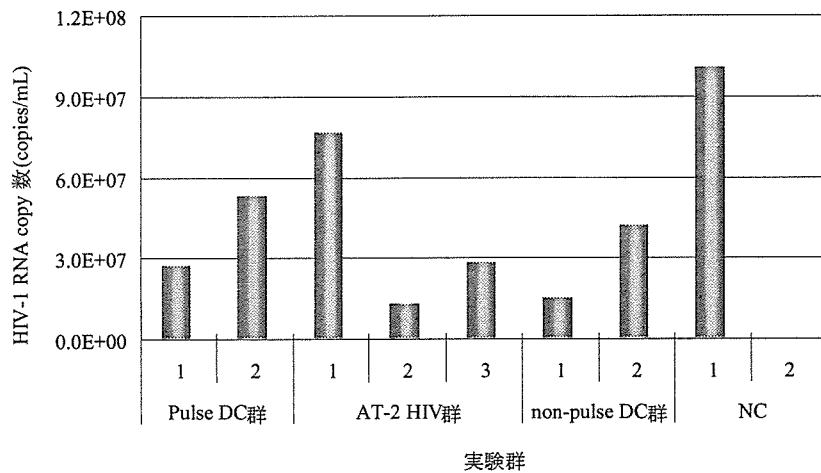
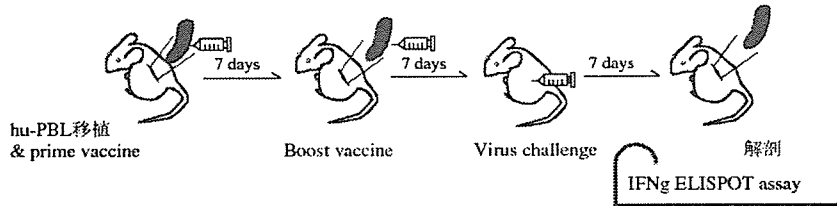


図 4

各群のマウスにおける抗原特異的免疫誘導の評価



/head	候補ワクチン群		対照群
Group	1	2	3
hu-SCID 構築		ヒトPBMC (3×10^6)	
Prime	AT-2 HIV DC (1×10^5)	AT-2 HIV	DC (1×10^5)
Boost	AT-2 HIV DC (1×10^5)	AT-2 HIV	DC (1×10^5)

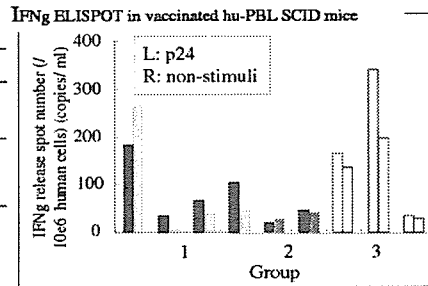
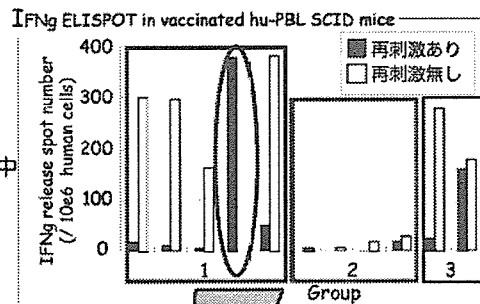


図 5

抗原特異的免疫誘導の評価
~Neutralization assay~

/head	候補ワクチン群		対照群
Group	1	2	3
Prime	AT-2 HIV DC (3×10^5)	AT-2 HIV	DC (3×10^5)
Boost	AT-2 HIV DC (2×10^5)	AT-2 HIV	DC (2×10^5)



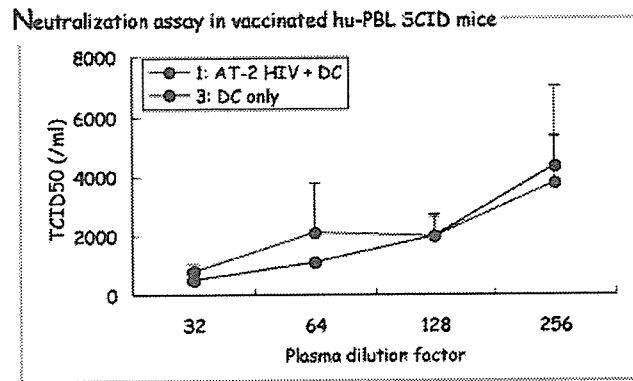
○抗原特異的免疫誘導が得られた
個体を中心に液性免疫応答を解析中

○血漿中HIV-1特異的抗体の検出

図 6

抗原特異的免疫誘導の評価～Neutralization assay～ NOG9

/head	候補ワクチン群		対照群	
Group	1	2	3	4
Prime	AT-2 HIV	AT-2 HIV	DC (1x10 ⁵)
	DC (1x10 ⁵)			
Boost	AT-2 HIV	AT-2 HIV	DC 1x10 ⁵)
	DC (1x10 ⁵)			



☒ 7

SCID-hu および hu-PBL-SCID マウス系 HIV-1 中和抗体・ワクチンの抗 HIV-1 評価

分担研究者 本多三男 エイズ研究センター第一研究グループ グループ長

研究要旨：小動物を用いた HIV/AIDS モデル動物の開発を行い、ワクチンなどの抗エイズ物質に応用する。現在この NOD scid-hu Thy/Liv マウスモデルにおける naïve 細胞の長期にわたる産生能より困難であった初期免疫反応の誘導を検討中である。現在のヒト組織移植動物モデルの開発は、期待されるサブプロジェクトが始まっているが、その完成には数年を要すると予測されるので、現状での一時的なアッセイ系として組換えワクシニア HIV 野生株をチャレンジウイルスとして用いたワクチン評価系の確立を行い、その効果はサルエイズモデルの効果と極めて類似していることから野生型組換えワクシニアを用いたマウスワクチン効果評価系を確立した。この系は同じレジメンで行われたサルエイズモデルにおける防御免疫の誘導と関連していることからマウスワクチン効果評価系の有用性を明らかにした。

協力研究者

堀端重男, 兼清優, 山本直樹(国立感染症研究所・エイズ研究センター), 網康至(国立感染症研究所・動物管理室)

能動免疫による中和抗体の産生とその野生株ウイルスに対する防御効果の評価が動物モデルに期待されているが、現在までのところサルでは不可能であるのでマウスを用いた naïve T 細胞モデルの確立とプライマリーレスポンスの可能なマウスモデルの確立が次の重要な課題となってくる。本研究では

A. 研究目的

マウスモデルの欠点である長期におけるプライマリーレスポンスの誘導を可能にする SCID マウス系を確立しワクチン評価モデルとして使用可能かどうかを検討する。さらに、モルモットはその遺伝的な背景の解析が進むにつれて種々の病原体に対する反応がヒトに近いことが明らかにされている。したがって、これまで不明な点が多かったモルモットの免疫解析法をマウスと比較して確立し、マウス・モルモットの小動物エイズモデルとしての有効性を明らかにする。

- 1) NOD scid マウスへの正常ヒト PBMC の腹腔移植やヒト胎児胸腺・肝臓の腎被膜下移植により、ヒトリンパ組織の移植が成立したマウスを作製する。
- 2) 移植マウスに HIV 野生株 HIV-1 MNp あるいは JR-CSF を Challenge し、感染モデルを構築する。
- 3) ヒト胎児胸腺・肝臓の腎被膜下へ移植することで得られる NOD scid-hu Thy/Liv マウスのヒト胸腺、末梢リンパ球の HIV 感染時における変化を PBL 移

B. 研究方法

植マウスとの比較を中心に解析し、野生株ウイルスの特性を明らかにする。さらには長期感染及び免疫モデルとしての有効性について検討を行う。

- 4) マウスとサルエイズモデルとの T 細胞免疫パラメーターの比較を行い、マウスの有用性を検討する。

(倫理面への配慮)

HIV を用いた病原性ウイルス検討のための動物モデルの検体はすべて P3 レベルの病原体として扱い、個々の研究所、大学、病院のバイオハザード関連委員会において承認を得ている。動物実験に関しても、各機関での動物実験委員会の規定に従い、実験計画の許可を取って行っている。組換え DNA 実験に関しては、組換え DNA 実験指針に従い、各機関の委員会の許可を得て行っている。ヒトサンプルに関しては個々の病院での倫理委員会の承認、患者の同意を得て行われている。

C. 研究結果

- 1) NOD scid マウスにヒト PBMC を腹腔内移植することで移植マウスを作製すると、移植後の経過時間と共に末梢血及び脾臓中のヒト CD4/CD8 の割合が変化し、CD8 細胞が優位になり、また、naïve T 細胞も減少し、最終的に移植後約 4 週でヒトリンパ球のほとんどは memory T 細胞になった。(Fig. 1)
- 2) ヒト胎児胸腺・肝臓移植をマウス腎被膜下に移植した NOD scid-hu Thy/Liv マウスでは腎被膜下での正常なヒト胸腺細胞の増殖・分化が見られた。さらには PBMC 移植系では消失していく naïve T 細胞を血中に放出し、かつ CD4/CD8

の割合もヒト末梢血同様一定であった。

- 3) ヒト胎児肝臓移植 3 ヶ月以降に末梢血中にヒト細胞が確認されたマウスについては野生株である HIV-1 MNp をウイルス感染力価 1000TCID₅₀ での静注投与によりウイルス感染が成立し、移植組織、脾臓といった臓器からウイルスが分離された。また感染による CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の減少や、ヒト PBMC 移植マウスで見られた末梢 CD4⁺ T リンパ球の減少と末梢ウイルスコピー数の増加といった HIV 感染時に特徴的に起こる反応が見られた。また、感染マウスの各組織から HIV の proviral DNA が検出できた。
- 4) 末梢血中のヒト T リンパ球において X4-tropic ウイルスである MNp の感染により CXCR4⁺ CD4⁺ T リンパ球、naïve CD4⁺ T リンパ球がまず減少し、次いで CD4⁺ T 細胞自体が枯渇していった。
- 5) BALB/c マウスをワクチンで免疫し、野生型 HIV でチャレンジするマウスを用いた評価系と、サルエイズモデル評価系を免疫学的パラメータの点から比較検討し両者に相関があることから、マウスモデルの評価系がワクチンの評価に使えることを明らかにした。(Fig. 2, 3)
- 6) NOD SCID マウス-PBL 感染系を用いてヒト型中和抗体と抗ウイルス物質の in vivo 評価の有用性を明らかにした。

D. 考察

HIV の感染をコントロールできる感染モデル系は実質的にはヒトの組織を移植した NOD scid マウスでのウイルス感染系でしか存在しな

い。したがって、小動物モデルにおける HIV 感染のモデル動物の作製及びそれを用いた野生株の評価は極めて重要な課題としてとらえられる。しかし、このマウス HIV モデル系の欠点として HIV 感染のウイルス血症を再現することができるが移植後のマウス中でのヒト細胞のサブセット変化により、免疫誘導における免疫一時反応、特に細胞性免疫の誘導が困難であり、二次反応の解析ができなかった。この重要な欠点を克服すべく、ヒト胎児胸腺・肝臓移植 NOD scid マウスの確立を行った。PBMC 移植モデルでは CD4 細胞より CD8 細胞が時間経過とともに優位になっていたのが、このモデルでは一定の割合で存在し、また消失していったヒト naïve T 細胞の産生を末梢血および脾臓中で確認でき、初期免疫を誘導しうるヒト細胞の存在を明らかにし、感染モデルとしての有効性も証明できた。

E. 結論

HIV 感染の最も重要な課題となっている HIV 野生株の特性を in vivo モデルとしてのヒト胸腺肝臓移植 NOD scid マウスで確立することができた。このモデルではヒト末梢 T リンパ球の HIV 感染時に起こる特徴的な生体反応を再現し、併せてヒト胸腺とともに細胞レベルで解析可能となった。これらの結果より、これまで不可能であったワクチン効果の評価法としてのマウスモデルとして免疫一次反応の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20 (3):337-340, 2004.
- (2) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental Animals* 53:321-329, 2004
- (3) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin K-Q, Yamamoto H, Uesaka H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M. Vaccination of rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. *J. Virol* 79:1452-62, 2005..
- (4) Someya K., Ami Y., Nakasone T., Izumi Y., Matsuo K., Horibata S., Xin K. Q, Yamamoto H., Okuda K., Yamamoto N., and Honda M. : Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J. Immunol.* 176:1784-1795, 2006.
- (5) Kawahara M., Matsuo K., and Honda M. : Intradermal and oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin. Immunol.* 119:67-78, 2006.
- (6) Takizawa M., Chiba J., Haga S., Asano T.,

Yamazaki T., Yamamoto N., and Honda M. : Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/ SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. J. Immunol. Methods 311:47-56, 2006.

2. 学会発表

- (1) Mitsuo Honda, Kazuhiro Matsuo, Tadashi Nakasone, Kenji Someya, Naoto Yoshino, Yasuyuki Izumi, Takaichi Hamano, Mari Takizawa, Masaru Kanekiyo, ShigeoHoribata, Mamoru Kawahara, Tomotaka Okamura, Shinichiro Hattori, Shinrai Ohta, Shihoko Komine, Yasushi Ami and Naoki Yamamoto. Update on development of prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and a non-replicating vaccinia virus recombinant. (16th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP 2004 Dec.Kyoto)

H.知的所有権の出願・取得状況

なし

「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」

分担総合研究報告書

ネコエイズモデルを用いたエイズ治療薬の生体内評価系の開発

分担研究者 辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

研究要旨：ヒトエイズにおける short hairpin RNA (shRNA) を用いた新規抗エイズ療法の開発を目的とし、その小動物モデル系としてネコ免疫不全ウイルス (FIV) 遺伝子に特異的な shRNA による FIV 増殖抑制効果を培養細胞系を用いて検討した。その結果、shRNA による FIV 増殖抑制効果が認められ、臨床応用への可能性が示唆された。また、ネコ骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターの実験的投与を行い、*in situ* 遺伝子導入法の有用性を検討した。また、樹状細胞 (DC) を用いた新規抗エイズ療法の開発を目的とし、FIV 非感染ネコおよび FIV 感染ネコの末梢血より単球を分離し、*in vitro* での DC への分化を試み、その性状解析を行った。

A. 研究目的

ネコ免疫不全ウイルス (FIV) はネコに感染し、ヒトエイズと同様の免疫不全症候群を引き起こすウイルスである。これまでに我々は、FIV 感染症においては血漿中のウイルス RNA 量と病期の進行に相関があることを明らかにしてきた。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症においては、逆転写酵素阻害薬およびプロテアーゼ阻害薬等を中心とした抗エイズ療法が臨床応用されているが、薬剤耐性変異株の出現が問題となっており、新規の抗ウイルス療法の開発が必要とされている。

short hairpin RNA (shRNA) はループ構造を有する RNA であり、プラスミド DNA および各種ウイルスベクターを用いて細胞内に持続的に発現させることができる。近年、*in*

vitro において shRNA による持続的な HIV 遺伝子の発現抑制効果が示され、新規の抗エイズ療法として期待されている。本研究においては、ヒトのエイズにおける shRNA を用いた新規抗エイズ療法の開発小動物モデル系として FIV 感染症のシステムを用い、FIV に特異的な shRNA を発現するレトロウイルスベクターをネコ T リンパ系細胞株に感染させ、そのウイルス増殖抑制効果を検討した。また、*in situ* 遺伝子導入法の有用性を検討するため、実験用ネコの骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターを投与し、ネコ体内における導入遺伝子の検出を行った。

樹状細胞 (dendritic cell, DC) は抗原をプロセッシングして naïve T 細胞に作用を及ぼす唯一の抗原提示細胞 (Antigens

presenting cell, APC)であることから、DCを用いた新規免疫療法の開発が注目されている。また、この細胞治療は、自己の細胞を投与することから副作用の少ない有効な治療と期待されている。現在、腫瘍の分野では DC による免疫療法研究が進み、臨床試験が進行中であるが、実用化には至っていない。その理由として、DC に取込ませる抗原の種類や方法によってその効果は大きく左右され、また免疫寛容を誘導してしまう可能性もある。一方、感染症、自己免疫疾患、移植などにおいてはまだ基礎研究の段階に留まっている。ウイルス感染症治療における DC の有用性を示す基礎研究は報告されているが、それに続く抗原の選択やアジュバントの検討などの実用化に向けた研究は、未だ発表されていない。今回我々は、樹状細胞 (DC) を用いた新規抗エイズ療法の開発を目的とし、FIV 非感染ネコおよび FIV 感染ネコの末梢血より単球を分離し、*in vitro* での DC への分化を試み、その性状解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

shRNA 発現レトロウイルスベクターによる抗ウイルス療法の開発:FIV Petaluma 株の *gag* 領域に相同性を有する shRNA および対照として哺乳類の遺伝子とは相同性のない shNC を発現するレトロウイルスベクターを作製した。FIV Petaluma 株持続感染ネコ T リンパ系細胞株 (FL4) にこれらレトロウイルスベクターを感染させ、安定導入細胞を得た。その後、これら shRNA 導入細胞における FIV の増殖を検討した。一方、FIV 非感染ネコ T リンパ球系

細胞株 (Mya-1) に本レトロウイルスベクターを感染させた後、FIV 感染に対する抵抗性を検討した。さらに、実験用ネコの骨髄腔内に shRNA 発現レトロウイルスベクターを投与し、ネコ体内における導入遺伝子を PCR 法により検出した。

DC を用いた抗ウイルス療法の開発:AC 期の FIV 感染ネコ 6 頭および非感染健常ネコ 8 頭の血液から末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) を採取し、DC の前駆細胞である単球を分離した。これらの細胞を、組換えネコ IL-4、GM-CSF、および非働化自己血漿を加えた培地で培養し、*in vitro* で DC への分化を試みた。さらに対照群として、サイトカインを添加しない条件でも培養をした。培養後、一週間目に LPS により刺激を与え、成熟の状態にした。DC の同定は、phenotype、endocytosis assay、および mixed lymphocyte reaction (MLR) assay によって検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学動物実験委員会の定める動物実験実施規則に基づいており、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

shRNA 発現レトロウイルスベクターによる抗ウイルス療法の開発:FIV 持続感染 T リンパ系細胞株に FIV 特異的 shRNA を導入した結果、FIV mRNA の発現量は著しく減少しており、細胞内 FIV p24 蛋白発現および培養上清中の逆転写酵素活性も著しく低下した (図 1)。以上の結果から、FIV 産生 T リンパ系細