

政策創薬総合研究事業  
政策創薬総合研究推進事業

平成18年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

# 目 次

## 重点研究

### 課題番号

KA11501	エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究	野崎 智義 ……	1
KA21503	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	22
KA31504	ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成とその応用	清水 則夫 ……	32
KA31505	HIV-1およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬	高橋 秀宗 ……	45

## 国際研究グラント

SA14801	多剤耐性HIV-1変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発	満屋 裕明 ……	57
SA14802	酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発	木曾 良明 ……	71
SA14803	HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析	横田 恭子 ……	88
SA14804	多剤耐性HIV-1の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬場 昌範 ……	103
SA14831	エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発	片野 晴隆 ……	116
SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤 正顕 ……	122
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口 雅文 ……	157
SA24809	細胞性免疫誘導型prime/boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本 直樹 ……	174
SA24810	CD4+細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森 一 泰 ……	193
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森 亨 ……	206
SAC4861	HIV転写制御機構の解明と新規治療法の開発	岡本 尚 ……	216
SAC4862	霊長類モデルを用いたエイズ腸管病態形成機構の解明と治療への応用	三浦 智行 ……	221

## ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成と その応用

所 属 東京医科歯科大学難治疾患研究所  
研究者 清水 則夫

**研究要旨** ヒト造血幹細胞をNOGマウスに移植し、リンパ濾胞様構造を有するヒト化マウスを作製した。ヒト化マウスはHIV-1に感染後3ヶ月以上ウイルス血症が持続し、CD4陽性T細胞の経時的減少が観察された。エイズに対する免疫療法の研究に使用するため、ヒト化マウスを使用したEBV感染実験系を作成した。

### 分担研究者

国立感染症研究所 山本直樹  
東京医科歯科大学 寺嶋一夫、森尾友宏  
株式会社リンフォテック 関根暉彬

### A. 研究目的

ヒト免疫不全症ウイルス（HIV-1）感染率は殆どの先進国で低下しているにも関わらず、日本では感染者数が依然として拡大を続けており、今後感染者が激増する事態に至ることが懸念されている。最近、HIV-1感染者へ複数の薬剤を同時投与するHAART療法（Highly active ant-retrovirus therapy）の確立により、エイズは治療可能な慢性感染症との認識が高まってきたが、依然としてウイルスを排除して根治することは不可能であり、薬剤耐性株の出現や薬剤の副作用の問題がクローズアップされてきている。したがって、副作用が少なく薬剤耐性ウイルスにも有効な新たな抗ウイルス剤や感染を防止する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、実験に使用するサルの入手や飼育は難しく、さらにSHIV感染は完全にヒトの病態を反映しない欠点がある。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免疫不全マウス（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が研究に用いられているが、ヒト細胞の生着が限定され、ヒト免疫系が構築されない欠点があった。そのため、長期のHIV-1持続感染モデルにはなりえず、HIV-1の*in vivo*におけるウイルス動態の解析や抗ウイルス剤・ワクチンの評価モデ

ルとしては不十分である。

一方、リンパ濾胞、胚中心はHIV-1感染およびエイズ発症の要であることが報告されている。なかでも、濾胞樹状細胞（FDC）を介したHIV-1感染とFDC-networkの破綻がエイズ発症には極めて重要と考えられており、FDCとHIV-1の相互作用の解明が新規エイズ薬・ワクチン開発には必須である。しかし、リンパ濾胞を*in vitro*で再構成することは困難であり、HIV-1は実験動物には感染しないことが研究の障害となっている。したがって、HIV-1感染を許容し、かつリンパ濾胞を持つ動物モデルの作成は、エイズ研究にとって非常に重要な課題である。我々は、最近開発されたヒト造血幹細胞の生着を許容する免疫不全マウス（NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$ マウス：NOGマウス）を使用すれば、ヒトT細胞が発生し、脾臓中にはリンパ濾胞様構造が出現することを見出した。ヒト造血幹細胞幹細胞移植マウス（ヒト化マウス）はHIV-1感染に感受性で、エイズモデルマウスとして使用できる可能性を示した（平成16年度の研究成果）。そして、ヒト化エイズモデルマウスとして使用するため、造血幹細胞の至適な移植法と長期間維持する手法を開発し、慢性感染症としてのエイズをマウスに再現することを可能にした。

（平成17年度の研究成果）。本年度は、エイズ患者への免疫療法開発へのエイズモデルマウスの応用（清水、関根）、マウス免疫系の解析（森尾）、形成されるリンパ濾胞様構造の詳細な解析（寺嶋）、マウスへのHIV-1感染実験とウイルス動態の解析（山本）をおこない、将来このマウスを利用したエイズ治療薬、ワクチン開発、免疫療法の開発へ応用する基盤を作成することを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

ヒト臍帯血造血幹細胞の分離とNOGマウスへの移植  
臍帯血をFicollで遠心分離し、単核球(CBMC)層を回収し、MACS CD34+ アイソレーションキット(Miltenyi Biotec)にてCD34陽性造血幹細胞を分離した。6~8週齢のNOGマウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所にて飼育した。2 x 10<sup>4</sup>~1.5 x 10<sup>5</sup>個のCD34陽性造血幹細胞をマウスの尾静脈より投与した。

### フローサイトメトリー解析

各組織の細胞を抗ヒトCD45, CD3, CD19, CD4, CD8抗体および抗マウスCD45(Beckman Coulter)抗体で染色し、フローサイトメトリー(Beckman Coulter)で解析した。HIV-1投与マウスについては、染色後1%ホルマリンで固定し、解析を行った。B細胞に関しては、hCD45/CD19/CD27/+, hCD45/CD19/CD27/-のfour color解析を行って、B細胞の分化段階を検討した。移植後約5ヶ月のマウスの大腿骨から骨髓を採取し、抗ヒトCD45、抗マウスCD45抗体、以下の抗ヒト抗体(CD34, CD13, CD33, CD11b, CD14, CD38, CD10, CD19, CD20, CD22, CD5, CD7, CD16, CD56)にて多重染色し、multi-dimensional flowcytometry法にて解析した。

### HIV-1感染実験

移植後、122~150日目のマウスに、HIV-1<sub>JRCSF</sub>(R5指向性)、HIV-1<sub>MN</sub>(X4指向性)およびHIV-1<sub>NL4-3</sub>(X4指向性)をそれぞれ8匹、11匹、9匹ずつ尾静脈より投与した(100ul/mouse)。投与後2ヶ月までに定期的に採血を行い、プラズマ中のウイルスコピー数を測定した。また、各ウイルス投与群を投与後1ヶ月目と2ヶ月目に3~5匹ずつ剖検し、プラズマ中のウイルスコピー数の測定と末梢血、脾臓、胸腺におけるCD4陽性T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

### プラズマ中のHIV-1コピー数の定量

回収したプラズマからRNAをQIAamp Viral RNA Mini kit(QIAGEN)にて抽出した。HIV-1コピー数は、ABI7300(PE Biosystems)で定量した。

### ELISA

感染マウスにおけるHIV-1に対する特異抗体の産生をELISA法で検討した。抗原にrecombinant HIV-1<sub>IIIB</sub> Env gp120, recombinant HIV-1<sub>MN</sub> Env gp120およびrecombinant HIV-1<sub>IIIB</sub> Gag p24(ImmunoDiagnostics)の3種類を用い、96穴プレートにコーティングしたあと、1:20, 1:60, 1:180

で希釈したマウスの血漿を加え、室温で1時間反応させた。二次抗体としてはA1 Alkali phosphatase(AP)標識 anti-human immunoglobulin(SIGMA)を用い、pNPP Solution(WAKO)で発色したあと、OD405nmの吸光度を測定した。

### 免疫組織染色

非感染性の移植NOGマウスの組織はtissue compoundに包埋し、ドライアイスアセトンで凍結保存した。感染性の組織は4%PFAまたはPLPで室温2時間固定したのち、30%Sucrose/PBSに置換したのち、同様に凍結保存した。それぞれをCryostatで厚さ3μmの切片を作成し、未固定のものはアセトンで室温、20分固定した。非特異的結合の阻止にヤギ血清と反応させた後、モノクロナール抗体などの一次抗体を室温2時間ないし4℃で12時間反応させた後、ビオチン標識ヤギF(ab')<sub>2</sub>二次抗体を用いてLSAB法で、peroxidaseはAEC、alkaline phosphataseはBCIPで発色した。またマウスFDC-M1の染色には二次抗体としてHRPマウスF(ab')<sub>2</sub>抗ラットIgG抗体を用いた間接法で染色した。なお内因性ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ活性の阻止をあらかじめ行った。またSTF-固定液で固定後、脱水、パラフィンに包埋し、パラフィン切片を作成し、脱パラ後同様の免疫染色を行った。

### ヒト化マウスへのEBV感染と解析

ヒト造血幹細胞を移植したNOGマウスへ、移植後3ヶ月目および6ヶ月目にAkat株(10<sup>3.6</sup>TD<sub>50</sub>/0.25ml)あるいはB95-8株(10<sup>3.1</sup>TD<sub>50</sub>/0.15ml)EBVをマウス尾静脈から接種した。マウス尾静脈から経時的に採血し、感染マウスの尾静脈から末梢血を採取し、分離したプラズマからDNAをQIAamp Viral DNA Mini kit(QIAGEN)にて抽出した。EBVゲノムコピー数は、ABI7300 Real-Time PCR system(PE Biosystems)で定量した。また、病変を生じたと思われるマウスを解剖し、腫瘍臓器のEBVゲノムコピー数の定量、リンパ球表面マーカー解析および組織免疫染色によりリンパ腫発生の有無を検討した。また、EBV感染細胞におけるEBV遺伝子発現(EBNA-1, -2, LMP-1, -2A, -2B)をRT-PCR法により解析した。

### CD3-AT法による活性化T細胞の調製

造血幹細胞移植マウス尾静脈から採取した末梢血を抗CD3抗体を固相化フラスコに加え、RPMI1640に10%非動化ヒト血清、700U/ml組換えヒトIL-2を添加した培地中で5%炭酸ガス、37℃の環境下で活性化培養した。7日目に細胞を回収し、通常のフラス

コ中でさらに7日間培養した。

(倫理面への配慮)

1. 臍帯血バンクより研究用として供給された全ての臍帯血は、臍帯血の提供を受ける際に研究用としての使用の可能性に対する承諾を受けている。供給を受ける際には臍帯血提供者の匿名化が行われているため、供給を受ける側には提供者に関する情報は一切伝わらないように配慮されている。また、臍帯血の遺伝子解析などは行なわないため提供者に不利益は生じない。実験に使用した残りの臍帯血(培養細胞)は予め決められた手順に従って確実に廃棄することになっている。

2. 研究を行うにあたり、東京臍帯血バンク、国立感染症研究所、東京医科歯大学倫理委員会の承認が得られている。

3. 動物実験に関して、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行った。

C. 研究結果

1. 長期生存する移植マウス中のヒト白血球と T 細胞の経時的解析

HIV-1 感染とそれに伴うエイズ発症モデルの確立には、マウスの安定した長期生存が不可欠である。我々は、ヒト造血幹細胞の移植方法の改良を行い、移植後 300 日以上安定したマウスの生存を可能とした。移植後 1-8 ヶ月における末梢血のヒト白血球 (CD45)、B 細胞 (CD19)、T 細胞 (CD3) の割合を解析した結果、移植後 2 ヶ月では発生したヒト細胞のほとんどが B 細胞であったが (図 1. A)、4 ヶ月以降に T 細胞の増加がみられ (図 1. B)、6 ヶ月後には B 細胞の割合を上回った (図 1. C)。

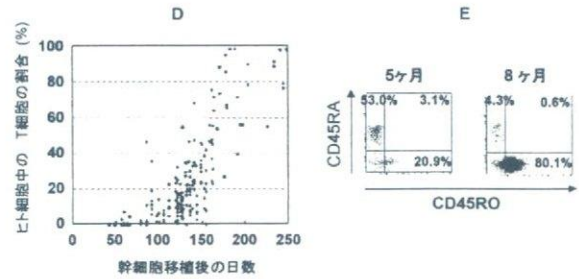
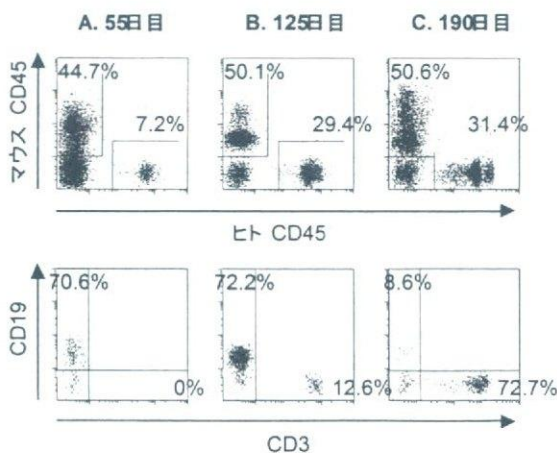


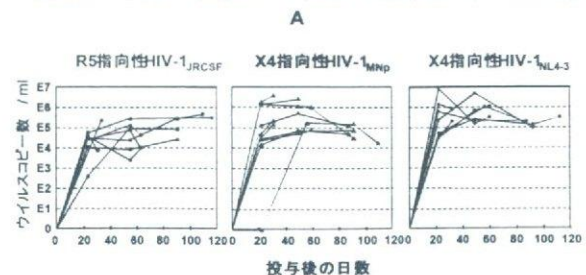
図 1. ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスで発生するヒト T 細胞の解析

- A. 移植後 55 日目のマウス末梢血解析
- B. 移植後 125 日目のマウス末梢血解析
- C. 移植後 190 日目のマウス末梢血解析
- D. マウス末梢血中のヒト T 細胞の割合
- E. ヒト T 細胞のナイーブ/メモリー解析

マウス 220 匹の解析結果をまとめると、移植後 100 日以降にヒト T 細胞の顕著な増加がみられた (図 1. D)。これらの T 細胞は、移植後 4-5 ヶ月目では CD45RA 陽性のナイーブ形質が多くみられたが、7-8 ヶ月目になると CD45RO 陽性のメモリー形質の細胞が増加した (図 1. E)。HIV-1 感染実験は、CD45RA 陽性 T 細胞の多くみられる移植後 4-5 ヶ月のマウスを用いて行った。

2. HIV-1 感染後のウイルス動態および病態の解析

移植後 122-150 日目のマウス 29 匹に対し、HIV-1<sub>JRC5F</sub> (R5 指向性) および HIV-1<sub>MND</sub> (X4 指向性)、HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 116 日目までのプラズマ中のウイルスコピー数を測定したところ、すべてのマウスで感染が成立し、血漿中には投与後 3 ヶ月以上高いウイルスコピー数 ( $<7.8 \times 10^6$  copies/ml) が持続する慢性感染が成立した (図 2. A)。図 2B は、HIV-1<sub>NL4-3</sub> 投与後 32 日目にプラズマ中に  $7.7 \times 10^5$  / ml のウイルスコピー数が検出されたマウスの解析結果である。同臍帯血ドナー同時期の非感染コントロールマウスに比べ、末梢血と脾臓中で CD4 陽性 T 細胞の割合が明らか減少していた。また、胸腺内では CD4CD8 共陽性の未熟 T 細胞の特異的な消失がみられた。



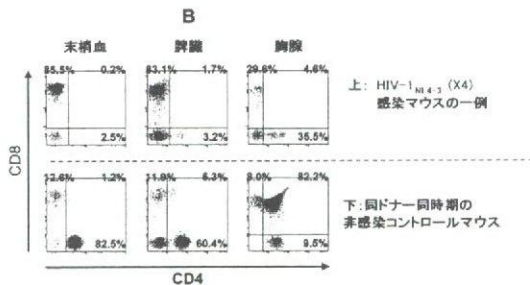


図2 HIV-1投与後の血漿中ウイルスコピー数の変動 (A) と感染マウスにおける CD4/CD8 解析

全身組織における HIV-1 感染を定量した結果、脾臓、骨髄、胸腺、リンパ節などのリンパ組織で高いプロウイルス DNA が検出された (表 1)。これらの組織では、R5 指向性 HIV-1 は主に脾臓と骨髄に感染し、X4 指向性 HIV-1 は脾臓と胸腺に多く感染する傾向がみられた。その他の組織でも、肺、肝臓、卵巣、皮膚などで高いコピー数が検出され、感染が全身性のものであることが示された。

	プロウイルスコピー数 / 100ng DNA		
	HIV-1 <sub>JRC5F</sub> (R5)	HIV-1 <sub>MNp</sub> (X4)	HIV-1 <sub>NL4-3</sub> (X4)
末梢血	20	6	undetected
脾臓	4,321	1,143	2,115
骨髄	3,107	656	584
胸腺	951	2,074	17,374
リンパ節	663	942	2,115
肺	329	145	177
肝臓	108	49	12
小腸	16	6	9
卵巣	307	122	10
直腸	not done	16	11
心臓	1	undetected	undetected
皮膚	undetected	undetected	138
脳	21	2	undetected
眼球	27	25	undetected
血漿中ウイルスコピー数	252,381	1,710,855	457,467

表 1. 全身の組織の HIV-1 プロウイルス DNA の解析

### 3. CD4 陽性 T 細胞減少の経時的解析

CD4 陽性 T 細胞の減少についてさらに詳しく解析した。造血幹細胞移植後 120-151 日目のマウス 24 匹について、非感染コントロールマウスと感染マウスにおける末梢血 CD4/CD8 の割合および CD4 陽性 T 細胞の絶対数の変動を感染と同時に経時的に追跡した。CD4/CD8 の割合は、非感染コントロールマウス (7 匹) では、時間の経過と共にやや増加する傾向があるのに対し、X4 指向性 HIV-1<sub>MNp</sub> (5 匹) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (5 匹) に感染した 2 つの個体群では経時的な減少がみられ、感染後 10 週目にはゼロに近い値まで低下した (図 3. A)。一方、R5 指向性 HIV-1<sub>JRC5F</sub> (7 匹) 感染マウスでは比較的早期に減少

するものの、その値は感染後 10 週目まで低いまま維持された (図 3. A)。

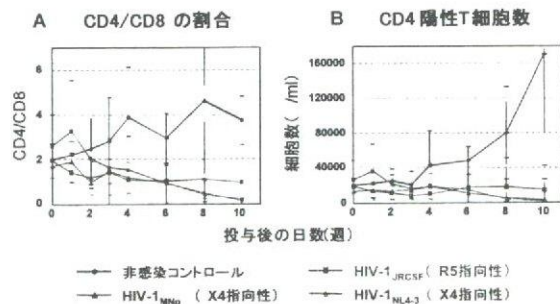


図 3. HIV-1 感染マウスの末梢血における CD4/CD8 比および CD4 陽性 T 細胞数の変動 A. CD4/CD8 比 B. CD4 陽性 T 細胞数

末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の絶対数についても同様な傾向がみられ、非感染コントロールマウスでは、時間の経過と共に細胞数が増加していくのに対し、X4 指向性 HIV-1 に感染した 2 つの個体群では細胞数が経時的に減少し、感染後 10 週目にはほとんど検出されないレベルまで低下した (図 3. B)。

一方、R5 指向性 HIV-1<sub>JRC5F</sub> に感染した個体群では、細胞数が感染後 10 週目まで低いまま維持された (図 3. B)。以上の結果から、このマウスがエイズモデルとしてさまざまな研究に応用できる可能性が示された。

### 4. HIV-1 に対するヒト抗体の検出

ヒト造血幹細胞移植後 126-146 日目のマウス 14 匹に、HIV-1<sub>JRC5F</sub> (R5 指向性) および HIV-1<sub>MNp</sub> (X4 指向性) を感染させ、HIV-1 に対する抗体産生を ELISA 法で解析した 8 匹マウスを解析したところ、2 個体において、HIV-1<sub>JRC5F</sub> Env gp120、HIV-1<sub>MNp</sub> Env gp120、recombinant HIV-1<sub>JRC5F</sub> Gag p24 に対する特異抗体が検出された。これらのマウスは、他の感染マウスと比較して血漿中に極めて高いウイルスコピー数が検出されており、リンパ組織中にも高いプロウイルス DNA 量が認められた。

このことから、活発なウイルス産生が起こっている個体では、HIV-1 に対する免疫反応が誘導される可能性が示された。

### 5. ヒト化マウスへの EBV 感染とリンパ腫発症

ヒト造血幹細胞移植後 3 ヶ月目 (ヒト B 細胞は多数検出されるが、ヒト T 細胞は殆ど検出されない時期) に EBV を投与した群のマウス末梢血中には  $10^5$  から  $10^6$  コピー/ $\mu$ gDNA と非常に高いコピー数の EBV ゲノムが検出され、脾臓、骨髄、リンパ節からも同程度

のコピー数の EBV ゲノムが検出された。マウスの脾臓、腎臓、肝臓、リンパ節には肉眼的に白色の病変が認められ、組織学および免疫組織学的解析により、CD20 陽性 B 細胞リンパ腫であることが判明した (図 4)。

一方、移植後 6 ヶ月目 (ヒト B 細胞および T 細胞が多数検出されるが、むしろ T 細胞が優位) に EBV を接種した群では、末梢血中の EBV ゲノムコピー数は 3 ヶ月目に投与した場合の 10~100 分の一程度と低値で肉眼的にも組織学的にもリンパ腫の発生は認められなかった。

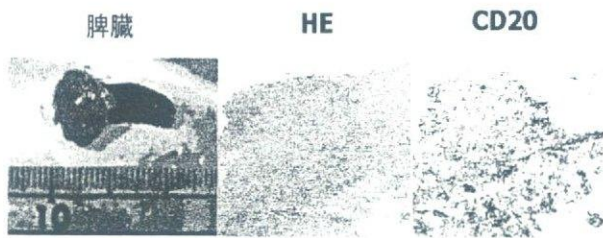


図 4 EBV 感染マウスの脾臓に発生した CD20 陽性の B 細胞リンパ腫

#### 6. HIV-1 感染ヒト化マウス末梢血の培養と解析

移植後 4 日月後の T 細胞が末梢血に出現する時期に HIV-1 を感染し、経時的に尾静脈から末梢血を採取し CD3-AT 法により活性化培養を行なった。その結果、何れの時期に採取した末梢血 T 細胞も活性化増幅することが可能だった。活性化 T 細胞中の HIV-1cDNA は、一過性に増加したが、培養を続けるうちにその量は減少し、何れの場合にも 3 週間の培養終了後に得たサンプルからは HIV-1cDNA が検出されなかった。臍帯血単核球では Treg マーカーはほとんど発現していなかったのに対し、活性化培養後の細胞では、そのほとんどの CD4 陽性細胞群は CD25、FoxP3、CTLA-4 を発現する Treg 様細胞であった。またこの後、抗 CD3 抗体での刺激を外して培養を行うと、各 Treg マーカーの発現は低下していた。GITR もまた、FoxP3・CTLA-4 同様、抗 CD3 抗体+IL-2 存在下での培養期間では高発現していたが、抗 CD3 抗体での刺激を外し IL-2 存在下のみで培養を行うと、その発現は低下した。

#### 7. ヒト化マウスに於ける FDC

NOG mice は T, B 細胞、NK 細胞を欠き、DC は有るものの機能不全の状態とされ、胸腺、腸間膜を含むリンパ節、Peyer's patches を欠き、リンパ濾

胞も認められない。ヒト CBMC 由来 CD34+ cells 移植後、2-4 ヶ月後にヒト B 細胞が出現、増加するに伴い、B 細胞が集積し、dormant になっていた FDC の前駆細胞からヒト B 細胞の産生する lymphotoxin alpha によって、FDC に対するモノクローナル抗体 FDC-M1 で染出される FDC、FDC-network が出現し、脾臓ではリンパ濾胞様構造が出現する。しかし免疫組織学的にわずかな IgD 性細胞の輪郭が認められるものの被殻と IgM 陽性細胞、IgM-network よりなる胚中心との区別は十分でなく、電子顕微鏡的にもそのマウス FDC はその突起、迷路様構造の発達は十分でない。

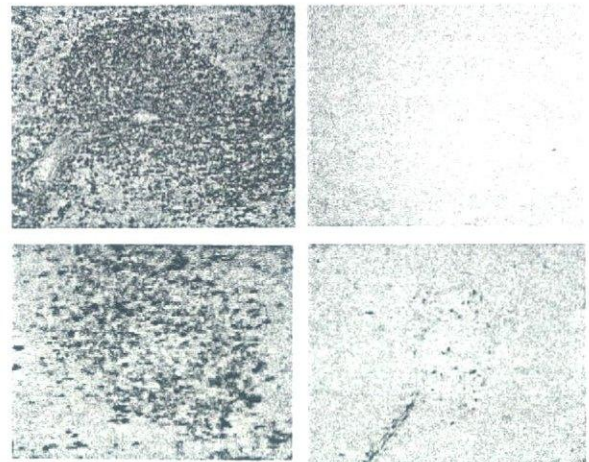


図 5 ヒト化マウスの脾臓の濾胞様構造に存在する FDC の免疫染色像 (左上: 抗ヒト CD45 抗体, 左下: 抗ヒト IgM 抗体, 右上: 抗ヒト CD21 抗体, 右下: 抗マウス FDC 抗体、による染色)

#### D. 考察

##### 1. R5 指向性および X4 指向性 HIV-1 感染モデル

これまでの HIV-1 感染マウスモデルである 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、主に未成熟な胸腺 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 に高い感受性を示すため、従来のマウスモデルよりも幅広い応用が期待される。

## 2. エイズ発症メカニズムの解析モデル

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 が優位となることが統計的に示されている。このため R5 から X4 タイプへ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が、エイズ発症機序については未だ不明な点が多い。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、胸腺細胞の消失が再現されるため、エイズ発症メカニズムの解明に有用である。さらに R5 指向性 HIV-1 と X4 指向性 HIV-1 感染マウスでは、感染するリンパ組織や CD4 陽性 T 細胞の減少などについて異なる病態を示し、それぞれのウイルスがエイズ発症に対して及ぼす影響を解析するのに有用である。

## 3. 長期の抗 HIV-1 薬の評価モデル

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、入手や操作が簡便である反面、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 HIV-1 投与後、3 ヶ月以上も高いウイルス血症が持続し、長期の治療薬の評価に非常に適している。さらに、移植を前提とした造血幹細胞の遺伝子治療のモデルとしても有用である。

## 4. HIV-1 に対するヒト抗体の検出

解析した 8 匹のマウスのうち 2 個体において、HIV-1III B Env gp120、HIV-1MN Env gp120、HIV-1III B Gag p24 に対する特異抗体が検出された。これらのマウスは、他の感染マウスと比較して血漿中に極めて高いウイルスコピー数が検出されており、リンパ組織中にも高いプロウイルス DNA 量が認められことから、活発なウイルス産生が起きている個体では、HIV-1 に対する免疫反応が誘導される可能性が示された。

## 5. エイズリンパ腫モデルの作成と応用

移植後 3 ヶ月後（ヒト B 細胞は十分に検出できるがヒト T 細胞が末梢血中出现してない時期）のヒト化マウスへ EBV を接種すると、末梢血中の EBV コピー数が非常に高値となるとともに、EBV 陽性 B 細胞リンパ腫が高率に出現する。リンパ腫細胞は EBV 陽性で、EBV 遺伝子発現パターンからエイズ患者に発生する EBV 陽性日和見リンパ腫細胞と同様の 3 型の EBV 潜伏感染細胞だった。したがって、ヒト化マウスを使用した EBV 感染系は、活性化 T 細胞による免

疫治療の非常に良いモデル実験系となるだろう。

一方、移植後 6 ヶ月後（ヒト B 細胞と T 細胞が十分に末梢血中出现する時期）に EBV を接種すると末梢血中の EBV コピー数は 3 ヶ月目に接種したときに比べ 10~100 分の一程度にとどまるとともに、CD8 陽性 T 細胞の著しい増加が観察される。予備的な検討では、この CD8 T 細胞の中には同じドナー由来の EBV 感染 B 細胞株 (LCL) に反応するため、EBV 特異的 CD8 T 細胞であることが示唆される（ヒトの EBV 初感染時に発症する伝染性単核症患者の末梢血に増加する CD8 陽性 T 細胞は EBV 特異的キラー細胞であることが知られている）。したがって、マウスには EBV に対する細胞性免疫が成立している可能性が高く、移植後 6 ヶ月目に EBV を感染したマウスには殆ど B 細胞リンパ腫が発生しない事実を良く説明する。また、移植後 6 ヶ月後に EBV を接種したマウスにはリンパ腫は誘発されないが、EBV ゲノムは長期にわたり検出される。したがって、マウス体内で EBV が持続感染しているのは確実で、そのような状態のマウスに HIV-1 を感染すればヒト T 細胞の減少とともに B 細胞リンパ腫の発生が誘導される可能性がある。現在、エイズ患者に発生する日和見 B 細胞リンパ腫モデルとして確立することを目指し、研究を進めている。

## 6. エイズに対する免疫治療法開発への応用

ヒト化マウス末梢血から分離した T 細胞は、ヒト末梢血 T 細胞と同様に CD3-AT 法により 2 週間の培養で約 50~500 倍に活性化増幅でき、CD4 と CD8 陽性 T 細胞をととも同程度の割合で増幅することが可能だった。さらに、HIV-1 感染マウスから得た末梢血 T 細胞は、培養当初の増幅率は未感染 T 細胞に比較して少なかったが、一旦増幅が始まると未感染 T 細胞と同程度の増幅スピードで増幅させることが可能だった。一方、HIV-1 感染マウスから得た T 細胞は CD3-AT 法により HIV-1 陰性の状態で活性化増幅できることが明らかとなった。この結果は、HIV-1 感染患者の末梢血 T 細胞の培養結果と同様であり、エイズ患者の免疫治療の研究にヒト化マウスが十分に利用可能であることが示された。

一方、臍帯血単核球では各 Treg マーカーはほとんど発現していなかったのに対し、活性化培養後の細胞では、そのほとんどの CD4 陽性細胞群は CD25、FoxP3、CTLA-4 を発現する Treg 様細胞であった。Treg は免疫応答を抑制的に制御して免疫系における恒常性の維持に必須の役割を担っており、人為的



に Treg 機能をコントロールすることが可能となれば、臓器移植や造血幹細胞移植時の拒絶反応など免疫反応を抑えることが求められる場面では、Treg の機能を向上させた細胞を用い、悪性腫瘍や本研究の目的としているエイズ患者の日和見感染症など、免疫反応の増強が求められる場面では、Treg 機能を弱めた細胞を用いた免疫療法が可能となる。本研究で我々が示した結果から、抗 CD3 抗体の刺激によって各種 Treg マーカー発現率が増加・減少することから、この方法を用いた免疫療法は、多方面において非常に有用であると考えられる。

#### E. 結論

1. 本研究により、ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスを使用した HIV-1 長期慢性感染モデルの作成法が確立された。感染マウスでは、エイズ患者と同様に CD4 陽性 T 細胞の減少が観察され、エイズモデルとして今後さまざまな研究に利用できると考えられた。

2. 8 匹中他の感染マウスと比較して血漿中とリンパ組織中に高いウイルス RNA およびプロウイルス DNA 量が認められた 2 匹に HIV-1IIIIB Env gp120、HIV-1MN Env gp120、recombinant HIV-1IIIIB Gag p24 に対する特異抗体が検出された。

3. HIV-1 感染マウスの末梢血 T 細胞は HIV-1 増殖陰性の状態で活性化増幅が可能だった。活性化増幅した臍帯血 T 細胞は Treg マーカーを発現し、サイトカイン産生能も Treg に類似する細胞集団であった。また、ヒト化マウスを利用した B 細胞リンパ腫のモデル実験系の作成を行い、エイズ患者に発生する EBV 陽性日和見 B 細胞リンパ腫の免疫治療のモデル実験を行なう準備が完了した。

4. ヒト化マウスに形成される濾胞には多量の p24、virus particles が確認された。しかし、濾胞はヒト FDC、胚中心細胞の分化勾配などを欠いていた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

S.Watanabe, K.Terashima, S.Ohta, S.Horibata, 3. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan Z, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, and Yamamoto N: Hematopoietic stem cell- engrafted NOD/SCID/IL2R $\gamma$ null mice

develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral Immune Responses. *Blood* 109:212 -218, 2007

学会発表

1. Watanabe S, Terashima K, Yajima M, Morio T, Shimizu N, m Honda M, m Yamamoto N Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL-2 gamma c jain -/-mice (NOG) for long-lasting infection of model of both M- and T-tropic HIV-1 in American society nfor cell biology summer meeting The cell biology of HIV-1 and other retroviruses in Emory university , Atlanta , GA, July 20-23, 2006,

2. Fujiwara Y, Lieu AM, Yokoyama M, Terashima K et al. Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structures and estrogen receptor / a case report, International symposium of molecular cell biology of macrophages and dendritic cells 17th 日本樹状細胞学会, 東京, 2006

3. Watanabe S., Terashima K., Yajima M., Honda M., Yamamoto N. Hemtopoietic stem cell-engrafted NOG mice develop human lymphoid system and induced long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses in 2006 日本免疫学会 2- J -W33-4-0/P

4. Satoru Watanabe, Kazuo Terashima, Shinrai Ohta, Misako Yajima, Norio Shimizu, Mitsuo Honda, and Naoki Yamamoto : Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> Mice Develop Human Lymphoid System and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection. 第 7 回熊本エイズセミナー, 熊本, 2006. 9. 21-22.

5. 渡辺哲, 太田信頼, 矢島美彩子, 寺嶋一夫, 渡邊健, 本多三男, 清水則夫, 山本直樹: NOG マウスでみられる HIV-1 長期慢性感染と CD4 陽性 T 細胞の減少. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006. 11. 19-21.

6. Satoru Watanabe, Kazuo Terashima, Misako Yajima, Mitsuo Honda, and Naoki Yamamoto : Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOG Mice Develop Human Lymphoid System and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection with Specific Humoral Immune Responses. 第 36 回日本免疫学会 総会・学術集会, 大阪, 2005. 12. 11-13.

7. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺 哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦。ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製 in 2006 日本免疫学会 2-J-W32-23-0/P
8. Yamamoto N: Humanoid NOG mice and infection models. First international symposium on humanized mice, Tokyo 2006.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

---

平成18年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書  
国際研究グラント事業 研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社