

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  
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植し、長期間維持する手法を確立した。HIV-1の慢性感染、CD4T細胞の経時的減少、リンパ濾胞様構造へのHIV-1集積と免疫応答が再現でき、エイズモデルマウスとして薬剤・ワクチンおよび新規治療法の開発への応用が期待される。

### 分担研究者

国立感染症研究所 山本直樹、本多三男  
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いるのが現状である。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る。薬剤耐性株の出現や薬剤の重い副作用の問題がクローズアップされてきており、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

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、さらに 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。

最新の免疫不全マウス（NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$  マウス：NOG マウス）にヒト造血幹細胞を移植すると、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が分担研究者の山本らから報告された。われわれヒト造血幹細胞移植 NOG マウス（ヒト化マウス）に HIV-1 を感染し、エイズモデルマウスとしてエイズの発症機序の解明やエイズに対する治療薬、ワクチン、免疫療法の開発へ応用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) 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。

## 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>MNp</sub> (X4 指向性) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) を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>111B</sub> Env gp120、recombinant HIV-1<sub>MN</sub> Env gp120 および 組換え HIV-1<sub>111B</sub> Gag p24 (Immuno Diagnostics) 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 時間固定したのち同様に凍結保存した。それぞれを Cryostatt で厚さ 3 $\mu$ m の切片を作成し、一次抗体を室温 2 時間ないし 4 $^{\circ}$ C 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。

## (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

で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こととし、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した。

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、東京医科歯科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ンブタールを注入し、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. マウスへの造血幹細胞前の前処置法の検討

エイズモデルマウスを作成するためには、安定してヒト造血幹細胞移植マウスを作出し、さらに長期間マウスを安定して生存させる必要がある。従来の移植法ではマウスの生存日数にバラツキが大きく、安定した実験系ではなかった。この点を改善するために死亡したマウスを詳しく解析したところ、マウスの死因は消化管出血が多いことが明らかとなった。原因として GVHD や感染の他、放射線による障害の可能性も考えられたため、移植前の前処置として行なっている放射線照射 (300rad) の線量を変える実験を行なった。その結果、照射線量を落としてもヒト造血幹細胞の生着には大きな変化はなく、全く放射線照射による前処置なしでも、安定してヒト造血幹細胞が生着し、さらに安定して長期間生存させることが可能であることが示された。

### 2. 移植マウスのヒト白血球と T 細胞の経時的解析

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、4 ヶ月以降に T 細胞の増加がみられ、6 ヶ月後には B 細胞の割合を上回った。マウス 220 匹の解析結果をまとめると、平均移植後 100 日以降にヒト T 細胞の顕著な増加がみられた。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。以上の結果から、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 HIV-1 感染実験を行った。

### 3. ヒト化マウスのリンパ濾胞様構造と FDC

移植前の NOG マウスの脾臓は、白色髄は細胞性に乏しく、中心動脈を囲んでストローマ細胞と少数の類円形細胞の集簇が見られるに過ぎない。胸腺、腸間膜リンパ節、頸部リンパ節、腋窩リンパ節、パイエル板などは肉眼的に確認できない。ヒト幹細胞移入後 3-5 ヶ月では脾臓に濾胞様リンパ球の集積をみとめ、胸腺も一對の直径約 1mm の球体として、腸間膜根部などに 1-2 個の直径 2mm 位の球体、頸部には直径 1mm の球体が、腋窩には脂肪組織に包まれて直径 1-2mm の円盤状リンパ節が認められたが Peyer 板は全くみとめられなかった。幹細胞移入後 5 ヶ月の脾臓で B 細胞の集積と共にリンパ濾胞が認められた。ヒト型の FDC はみとめられなかったが、モノクロナール抗体 FDC-M1 で染出されるマウス FDC が、濾胞遠位側に繊細なネットワークとして、そして、中心動脈の周皮細胞の陽性像と連続してみとめられた。濾胞全体に IgM 陽性細胞が大部分を占め、ときにきわめてうすい IgD 陽性、bc1-2 陽性の小リンパ球を伴っていた。また CD38 陽性像が濾胞外の赤色髄に分布する形質細胞細胞に加えて濾胞中心部にも繊細な陽性像を呈する大型細胞が散在性に認められた。ヒトリンパ組織では FDC の分化の早期から最も特異的に良く検出出来るモノクロナール抗体とされる CNA. 42 陽性細胞は濾胞内に少数認められ、濾胞外の赤色髄にも散在性にみとめられた。幹細胞移植後 8-10 ヶ月の脾臓リンパ濾胞の多くには多数の大型 T 細胞がみとめられ、それら細胞の増殖は濾胞に限らず、赤色髄にも多数の小集簇として散在性に認められた。しかし、IgM 陽性の濾胞様構造が確認でき、狭小化した中心部には IgM 陽性リンパ球はむしろ疎で、被殻に相当する小リンパ球層が IgM 陽性であった。

### 4. HIV-1 感染後のウイルス動態および病態の解析

造血幹細胞移植後 122-150 日目のマウス 29 匹に、HIV-1<sub>JRC5F</sub> (R5 指向性) および HIV-1<sub>MNp</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ていることが示された。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は、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な減少が確認された。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。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。

### 5. 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。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。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。

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。

### 6. 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>IIIIB</sub> Env gp120、HIV-1<sub>MN</sub> Env gp120、recombinant HIV-1<sub>IIIIB</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。

## 7. 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。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。

## 8. 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。

### D. 考察

#### 1. マウスへの造血幹細胞前の前処置法の検討

NOGマウスをエイズのモデル実験系として使用するためには、造血幹細胞移植後長期間安定して飼育することが必須となる。研究を開始当初は移植後マウスを安定して長期間生存させることが難しく研究の足枷となっていたが、放射線照射を中止しても造血幹細胞の生着は阻害されずに長期間生存することを見出し、安定して研究が進むようになった。NOGマウスはSCIDマウスがベースとなっているが、SCIDマウスは免疫グロブリン遺伝子再構成の際に生じるDNA鎖の切断の繋ぎ直しの過程に不全があるため、放射線誘発DNA二本鎖切断の再結合にも欠陥があり放射線に高感受性となる。このSCID変異はDNA依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット(DNA-PKcs)をコードする遺伝子におきた突然変異であることが報告されており、移植前処置としての放射線照射を中止すると長期生存が得られたことを

良く説明する。

#### 2. リンパ濾胞様構造とFDC

移植後5ヶ月目前後には末梢血中では血液細胞の大部分を占めるヒトB細胞の浸潤に伴って、NOGマウスのFDC前駆細胞がマウスFDCに対するモノクロナール抗体に染出されるようになり、FDCネットワークを形成していた。しかしその後T細胞の過増殖、B細胞の減少により、マウスFDCの機能抗原分子の発現がおさえられ、中心動脈を中心にした血管周皮細胞に陽性像が認められるのみであった。HIV-1に対する免疫応答が安定せず、IgGの産生も弱いため、ヒト型FDCの導入を試みる必要がある。現在、CD34+、CD133+細胞分画の移入や我々が樹立したヒトFDC様細胞(FDCLC)の移入実験を行なっている。

#### 3. R5指向性およびX4指向性HIV-1感染モデル

ナイーブT細胞はCCR5の発現が弱く、活性化T細胞はCCR5を強発現することが知られており、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。ヒト化NOGマウスは両方のHIV-1に高い感受性を示すため、エイズモデルとして優れている。

#### 4. エイズ発症メカニズムの解析モデル

HIV-1感染患者では、感染初期にはR5指向性HIV-1が増殖し、エイズ発症時にはX4指向性HIV-1が優位となるため、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。NOGマウスによるエイズモデルでは末梢血、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。

#### 5. 長期の抗HIV-1薬の評価モデル

抗HIV-1薬の評価として多用されているhu-PBL-SCIDマウスは簡便に実験ができる反面、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。本研究で用いたヒト化マウスは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モデルとしても有用である。

#### 6. 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-1IIIIB Env gp120、HIV-1MN Env gp120、HIV-1IIIIB 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

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 細胞は末梢血中に出現していない時期）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 陽性の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に出現する時期）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。この CD8T 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 CD8T 細胞であることが示唆された。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 細胞をとともに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、培養当初の増幅は遅かったが、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。

### 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を安定して作成することが可能になった。HIV-1 感染マウスでは CD4 陽性 T 細胞の減少が観察され、エイズモデルとしてさまざまな研究への応用が期待される。
2. 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 量が認められたマウスから HIV-1IIIIB Env gp120、HIV-1MN Env gp120、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、ウイルス粒子が確認された。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おり、ヒト FDC の生着を促す手法の開発が必要である。

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

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