

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト免疫機構を構築した新規「ヒト化マウス」を  
用いたエイズワクチン・治療薬評価系の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 勇悦

琉球大学大学院医学研究科

平成20（2008）年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

田中勇悦：ヒト免疫機構を構築した新規「ヒト化マウス」を用いたエイズワクチン・治療薬評価系の開発

### II. 分担研究報告

- (1) 田中勇悦：「ヒト化マウス」におけるワクチン評価系の簡素化と鋭敏化にむけて
- (2) 小柳義夫：HIV 感染によるリンパ組織破壊メカニズム解析
- (3) 山本直樹：ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた HIV 感染モデルの作製
- (4) 伊藤 守：「ヒト化マウスの基盤となる免疫不全マウスの開発と供給」に関する研究
- (5) 大隈 和：ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染細胞を標的とする組換えウイルス VSV の HIV-1 感染に対する治療効果の評価
- (6) 藤田次郎：C 型肝炎ウイルス増殖に対する HIV protease inhibitor の作用に関する研究

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告

ヒト免疫機構を構築した新規「ヒト化マウス」を用いたエイズワクチン・治療薬評価系の開発

主任研究者 田中 勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

平成 19 年度研究総括報告書

研究要旨：ヒト免疫機構細胞を構築した免疫不全マウス“ヒト化マウス”を HIV 個体感染実験モデルとして、エイズ新規ワクチンや予防治療薬候補の評価系へと開発・普及する目的で研究を行なった。初年度平成 19 年度の班研究では前回までの班研究の成果を生かし、評価系実験系に改良を加えるとともに、マウス体内での HIV と免疫担当細胞の変化や動態を解析し、新規マウスの作製に関する研究を行った。具体的には、(1)ヒト樹状細胞(DC)の新たな分化誘導法と制御性 T 細胞の除去法の確立とその免疫誘導へ応用、(2) ヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウスの開発とその応用範囲の拡大、(3)新たなエイズ治療戦略としての組み換え VSV の調製とヒト化マウスでの評価、(4)ヒト IL-4 を分泌する新たな高度免疫不全マウス作出とその長期 HIV 感染実験への応用、(5)未治療 HIV 感染者からの野生 HIV 株の分離、などに関する研究を行った。

A. 研究目的

エイズが世界的に増加する現在の社会において、HIV の感染予防やエイズ治療を目的とするワクチンならびに新規抗 HIV-1 薬剤の開発には多くの期待がかけられている。しかしながら、現時点でも有効なワクチンは開発されておらず、また臨床で広く使われている種々の抗 HIV 薬においては耐性ウイルスの出現や副作用など様々な問題が浮上してきている。このような問題点を解決するエイズ医薬品等の新規開発過程において、ヒトへの応用の可能性が高い候補を絞る必要がある。特に候補サンプルが実際に生体内でウイルスの増殖や病原性を抑制する効果を発揮するのかどうかを検証することは最低限必要な条件であり、そのための適当な動物感染実験系が必要である。

HIV 感染モデル動物として霊長類（サル）を用いる実験系がある。この系は人体に一番近い環境を提供すると言われていたが、高いコストと十分な頭数の供給に難点があり、多数の検体の評価には不向きである。また、これらサルの系においては、サルエイズウイルス(SIV)が攻撃ウイルスとして使われるがヒトにのみ病

原性をもつ HIV とは性状が必ずしも同じではない。

このような背景の中で、ワクチンを含めた新規医薬品候補が、種々の臨床 HIV 株に対し感染予防ならびに治療効果をもつのかどうかをより簡便に評価する小型実験動物モデルを開発することは、我が国の HIV-1 感染症対策に大いに寄与するものと期待できる。しかも、その評価系では、病原性の高い野生の臨床株 HIV ウイルスを感染できる系であることが望まれる。これらの条件を満たす動物モデルはヒトの免疫担当細胞群を移植した免疫不全マウス、つまりヒト化マウスである。我々の班で研究しているのはヒト末梢血単核球(PBMC)あるいはヒト造血幹細胞を移植し生着させたマウスである。

ヒト PBMC を移植したヒト化マウスでは、試験管内で分化培養した樹状細胞(DC)を HIV 抗原や候補ワクチンで感作し、免疫することにより T 細胞免疫応答を誘導することができる。この系では、樹状細胞の機能が重要であり、目的に沿った DC の分化培養方法の新規開発や改良が必要である。また、免疫応答を促進させる方法を併用することでワクチンの効果を

より高く引き出す方法論も検討課題となる。このマウスにおいては、細胞毒性の強いウイルスでヒトには病原性を持たない VSV を HIV 感染細胞を攻撃するように改変した組み換えウイルスについて、その効果の検証が可能である。一方、NOG とよばれる超免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植する方法で作製したヒト化マウスは、HIV の感染により長期パイレミアの誘導と弱い B 細胞免疫誘導が見られている。したがってこの系では、新規薬剤の長期効果の検証が可能となる。現在も多剤耐性の HIV の分離もてがけており、今後の応用が期待される。また、新規の免疫不全マウスの作製も同時進行している。

本年度の研究成果を以下に総括するが、具体的な結果と学問的な考察については次からの分担報告を参照してもらいたい。

## B. 研究方法（倫理面への配慮）

使用動物は免疫不全マウスであり、BALB/cA-Rag2<sup>-/-</sup>γ<sup>-/-</sup>マウス（BRG マウスと略）および NOG マウスの 2 系統を使用した。新規マウスは NOG マウスにヒト IL-4 遺伝子を導入したマウスである。移植したヒト細胞は、健康人の PBMC および DC、またはヒト臍帯血由来の CD34 陽性造血幹細胞（hCD34）である。PBMC-BRG マウスでは、ヒトの免疫応答を樹状細胞を移植することで誘導した。NOG マウスに造血幹細胞を移植するルートは 2 通りであり、小柳らは新生児 NOG マウスの肝臓に、山本らは成獣の静脈から移植した。感染に用いた HIV はクローン化された HIV であり、CCR5 指向性 JR-CSF と CXCR4 指向性 NL4-3 および IIIIB 株を用いた。大隈らが用いた組み換え VSV は、HIV 受容体である CD4 と CXCR4 を発現するウイルスであり、米国の大学との共同研究である。HIV の増殖は、遺伝子増幅法と p24ELISA で判定した。HIV の病原性は細胞と組織染色法、フローサイトメトリーで解析した。

これら一連の実験は、各機関・施設の動

物実験倫理委員会・感染実験安全委員会等で審査され許可されている。また、PBMC と臍帯血の供与にあたってはドナーに十分な実験の説明を行い、承諾を得ている。

## C. 研究結果

(1) 田中らの研究：ワクチン抗原を提示する樹状細胞（DC）培養の簡素化と免疫誘導を抑制する制御性 T 細胞（Treg）の除去について研究を行った。単球を精製せずにヒト末梢血単核球（PBMC）を GM-CSF と IL-4 を含む培地で培養しても機能的 DC が培養された。自然 Treg（nTreg）は細胞表面に IL-2R alpha（CD25）を発現することから CD25 陽性細胞を除去した PBMC で作製したヒト化マウスを HIV ウイルスで感作した自家 DC で免疫すると、nTreg を除去しなかった場合と比較して HIV 特異的ヘルパー T 細胞の誘導が有意に高かった。したがって、ヒト化マウスでワクチン評価を行う場合、DC は精製しない PBMC から誘導された DC でも有効であり、かつ反応 PBMC から nTreg を除去することでよりワクチンによる T 細胞性免疫が上がることを示された。

(2) 大隈らの研究：HIV-1 R5 株の受容体であるヒト CD4 及び CCR5 分子を発現する組換え VSV を作製し HIV-1<sub>JR-CSF</sub> を感染させたヒト化マウスでの R5 ウイルス感染に対する抑制効果を検討した。本組換えウイルスを接種したマウス群では、コントロールウイルス接種群と比較して明らかな HIV 感染抑制傾向が認められた。このことから R5 ウイルス感染細胞を標的とする新規組換え VSV の *in vivo* での実効性が示され、本組換えウイルスが新規治療薬候補として有望であることが分かった。また今回用いられたヒト化マウス感染実験モデルは、組換え VSV のような新規開発医薬品候補の生体内効果評価系として有用であることが示された。

(3) 小柳らの研究：ヒト CD34 陽性血液幹細胞移植 NOG（NOG-hCD34）マウスに HIV 感染させたところ、高ウイルス血症と CD4

陽性 T 細胞の減少を再現できた。特に CCR5 をコレセプターとする R5HIV-1 の感染マウスでは、末梢血 T 細胞中の CD4 陽性 CD45RA 陰性のメモリー T 細胞の減少が感染後、7-9 週目以降には顕著になり、脾臓ならびにリンパ節では CD4 陽性 T 細胞の減少、ならびに、きわめて多数の HIV 陽性細胞を検出した。この HIV 陽性細胞の多くは、CD3 陽性 CD4 陰性であること、これらの臓器では、CD25 や CD69 などの活性化マーカーの優位な増加は見られず、一方、CCR5 陽性細胞の著減が確認された。

(4) 山本らの研究：ヒト臍帯血由来造血幹細胞を NOG マウスに移植し、300 日以上安定して生存するヒト化マウスを作成した。このマウスは R5 指向性および X4 指向性両方の HIV-1 に感染し、高い viremia が 3 ヶ月以上持続する慢性感染が成立した。末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の破壊がみられ、エイズモデルとしての有用性が示された。さらに、このヒト化マウスに EBV を感染させ、リンパ腫発症モデルを作製した。

(5) 伊藤らの研究：ヒトリンパ球が容易に生着し、HIV-1 感染に対して高感受性の「ヒト化マウス」作出のための基盤となる重度免疫不全マウスとして、昨年までに作製し、HIV-1 感染実験に有効であることが明らかとなった BALB/cA-RAG2<sup>null</sup> IL-2R $\beta$ <sup>null</sup> -hIL-4Tg 複合マウスの HIV-1 感染実験に供するための計画的生産と供給を行った。これに加え、新たに開発した NOG-hIL-4 Tg マウスについて、このマウスでの移入ヒト細胞の生着とその動態について検討した。

(6) 藤田らの研究：HIV と HCV の重複感染者に関する臨床報告から HIV-PI 剤が HCV 増殖を抑制することが示唆された。本研究では HCV replicon を用いて PI 剤が HCV を抑制、また IFN との相乗効果を示すことを明らかとした。本研究において未治療の HIV 感染者 3 名の血液から感染性 HIV-1 を分離した。

## D. 考察

平成 19 年度は本研究班の開始年度である。到達目標は、ヒト化マウスの HIV 研究への普及を目指してより発展させることである。本研究の柱は 2 本であり、一つは、成人の PBMC を移植したマウスを使う系、もう一つは臍帯血から得た造血幹細胞 hCD34 を移植したマウスを使う系である。それぞれに長所と短所があるが、目的によって使い分けができる。

PBMC を移植する系では、1~3 週間の期間でのワクチンや薬剤の評価が可能である。この系におけるヒトの免疫応答誘導において、田中らの樹状細胞の分化培養の簡素化は今後の発展が期待できる。また、ワクチン効果の最適化を目指して免疫応答を促進させる方法論として nTreg の除去法はマウスの系では証明されているが、ヒト化マウスでは初めての試みであり、今後のさらなるバージョンアップと検証が必要である。また、大隈らは、新たなエイズ治療法の試みとして HIV 感染細胞を標的する VSV の作製に成功した。この組み換え VSV の最適化については、すでに一つのアイデアの検証実験が開始されている。つまり、VSV の表面にヒトの OX40L を発現させ、HIV 感染 CD4+T 細胞の OX40 と接着させる案である。

一方、hCD34 を移植する系では、持続的なヒトの造血がマウス体内でおこることが証明され、ウイルス感染後のバイレミアの誘導に成功している。したがって、この系は、長期の HIV 産生に対しての薬剤の効果の判定に適している。ところで、hCD34 を移植する場合、移植ルート、移植動物の週令を選択すべきであるが、小柳らは放射線処理新生児肝臓への移植を、山本らは放射線未処理成獣の静脈内移植を行っているが、どのマウスでも HIV の増殖と CD4+T 細胞の枯渇の再現することに成功している。この系では、HIV 抗体の誘導が検出されることから、抗原特異的な B 細胞免疫はある程度起こっていると考えられるが、T 細胞免疫応答がヒト胸腺不在の環境で効率よく誘導されるかが不明であり、今後の解決すべき問題であ

る。この系では、自家樹状細胞の応用も一案であろう。免疫誘導を証明する実験システムとして EBV 特異的キラー T 細胞の誘導ができるかどうかについて山本らが研究を開始している。

本研究においては、現状の免疫不全マウスの応用にとどまることなく、HIV 感染症モデルにより適したマウスの系統を新たに作製することも課題の一つである。伊藤らは、超免疫不全マウスの NOG にヒト IL-4 の遺伝子を組み込んだ。昨年度まで、BRG マウスの背景で IL-4 産生するマウスを作製し、このマウスに PBMC を移植した場合、CXCR4 指向性 HIV の有意な増殖と病原性が認められたことから、NOG マウスではより感受性の高いものになる可能性がある。また、とても興味あるデータは、NOG-IL-4 マウスに PBMC を移植した場合、NOG に起きやすい GVHD が起きない(起こりにくい)ことが観察されている。また、hCD34 移植 NOG-IL-4 では、ヒト細胞の正着が起きないこともヒト化マウス研究の上で予想外の現象である。今後のメカニズムの解明がなされる。

最後に、野生型 HIV、つまり実際に HIV の感染した琉球大学医学部附属病院の未治療の患者からの HIV の分離を進めている。これらのウイルスは多剤薬剤耐性の HIV とともに日本人由来のウイルスとし

てヒト化マウス感染に用いられる貴重なウイルス源となるであろう。

#### E. 結論

世界でも最高レベルの免疫不全マウスを使って、ヒト PBMC あるいは CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植して、ヒト化マウスを作製し、その普及化と鋭敏化に挑戦している。これらのマウスを使い分けることによって、HIV 薬剤やワクチンの短期あるいは長期の詳しい評価の可能性が示唆された。この評価系の更なる改良と簡素化と普及化を目指してオリジナリティの高い研究を継続することを班員全体で確認した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## II. 分担研究報告



「ヒト化マウス」におけるワクチン評価系の簡素化と鋭敏化にむけて

主任研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

平成 19 年度主任研究報告書

研究要旨：ヒト化マウスにおいて HIV ワクチンの評価を行うには、マウス体内でワクチンによって誘導されるエフェクター細胞やメモリー T 細胞の数を最大限に引き出すことが要求される。さらにこの評価系を一般化し普及まで改良するにはプロトコルの簡素化と鋭敏化が望まれる。そこで、本年度の研究においては、ワクチン抗原を提示する樹状細胞 (DC) 培養の簡素化と免疫誘導を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) の除去について研究を行った。単球を精製せずともヒト末梢血単核球 (PBMC) を GM-CSF と IL-4 を含む培地で培養しても機能的 DC が培養された。自然 Treg (nTreg) は細胞表面に IL-2R alpha (CD25) を発現することから、自家製の抗 CD25 単クローン抗体ライブラリーの中からマグネットビーズ法で nTreg を除去する抗体を選択した。この抗体を anti-mouse IgG-beads に結合させ、PBMC と混合することにより効率よく CD25 陽性細胞を除去できることが分かった。この CD25(-)PBMC で作製したヒト化マウスを不活化 HIV で感作した自家 DC で免疫すると、nTreg を除去しなかった場合と比較して HIV 特異的ヘルパー T 細胞の誘導が有意に高く認められた。

A. 研究目的

免疫不全マウスの体内にヒトの末梢血単核球 (PBMC) を移植して作製される、いわゆるヒト化マウスは、ヒト免疫不全ウイルス HIV の小型感染実験動物モデルとして極めて有用である。本研究では、免疫不全マウスとして RAG2 遺伝子と IL-2R gamma 遺伝子をノックアウトした BALB/c 系統のマウス (BRG) を用いている。その理由の一つは BRG マウスが移植ヒト細胞による GVHD により耐性であることである。

これまでこのマウスを用いて作製したヒト化マウス体内で樹状細胞免疫 (DC-based immunization) 法により HIV 特異的ヘルパー T 細胞免疫応答の誘導ができる証明してきた。自家 DC で HIV 抗原に対するヒトの免疫応答をこのマウス体内で誘導できることから、この系が

HIV のワクチン評価に応用できることが期待できる。そのためには、普及に向けて本システムをより簡素化および鋭敏化することが必要であり、これが本研究の大きな目標の一つである。

本年度は、未だ熟練と経験が必要な DC の分化培養方法の簡素化と、自己や過度の免疫応答を抑制することが最近報告されている制御性 T 細胞の除去による免疫応答の増幅法、つまりワクチン評価の鋭敏化へ向けた方法論の模索と検証を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

(1) DC の培養：健常者から分離した PBMC をそのまま、あるいは単球に精製して GM-CSF と IL-4 存在下で 5 日間培養し、さらに IFN-beta で一日培養することにより成熟 DC を得た。DC

の生物学的活性は、アロ CD4+T 細胞の増殖誘導能を CSFE 標識法で測定した。

(2) nTreg の除去: 健常者から分離した PBMC を EDTA 入りの 0.1% BSA-PBS で洗浄し、2 mg/ml ヒト IgG で Fc-block をした後に、異なる CD25 エピトープを認識するマウス単クロン抗体と水中 30 分間反応させた。洗浄後、抗マウス IgG を結合した magnet beads (Dynal) を PBMC の 2 倍量 (PBMC100 万個あたり 200 万個) 入れ、氷室で 30 分間ローテーターをもちいてゆっくり攪拌しながら反応させた。専用のマグネットスタンドを利用して、マグネットビーズ・マグネット結合細胞とフリーの細胞を分離した。nTreg の除去効率は、flow cytometry を用いて、他のエピトープを認識する蛍光標識単クロン抗体の染色度合いで判定した。

(3) ヒト化マウスの免疫: BRG マウスの脾臓内に 100  $\mu$ l の培地に浮遊させた PBMC または nTreg 除去 PBMC、および不活化 HIV 感作 DC の混合浮遊液を接種した。7 日後、同様に調整した DC をマウス腹腔内に接種した。7 日後、脾臓と腹腔洗浄液を回収し、ヒト CD4+T 細胞をマグネット法で positive selection 後、単球を APC として、不活化 HIV 抗原の存在、非存在下で刺激培養を 2 日間行った。その後、培養上清中の IFN- $\gamma$  の濃度を ELISA 法で測定し、HIV 特異的免疫応答の誘導を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本動物感染実験は、琉球大学の動物実験倫理委員会、感染微生物取り扱い安全管理委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会にて審査、承認されており、全て P3 実験施設内で行われた。また血液サンプルの供与にあたっては、ドナーに十分な実験の説明を行い、承諾を得た。

## C. 研究結果

(1) 未精製 PBMC を GM-CSF・IL-4 存在下で 5 日間培養すると、全生細胞のおよそ 15% が CD11c+・CD86+ のミエロイド DC へ分化した。得られた DC の収量は、negative isolation 法で分離精製した単球、またはプラスチック接着法で分離したいわゆる adherent cells から分化した DC のものと同程度であった。つまり PBMC に混在する T 細胞や B 細胞等は単球の DC への分化に顕著な影響を及ぼさないことが示された。これらの未精製 PBMC から分化させた DC は、アロ CD4+T 細胞の増殖を誘導する機能をもっていた。

(2) nTreg は特別な刺激なしに末梢組織や末梢血に存在する CD25 抗原陽性の CD4+T 細胞である。種々のエピトープを認識する anti-CD25 単クロン抗体ライブラリーの中から 1 種類の抗体を適任抗体として選択した。CD25 陽性細胞除去 PBMC 中の FoxP3 陽性細胞の頻度は激減したことから CD25 陽性細胞除去は Treg の効果的除去法であることが示唆された。PBMC と CD25 陽性細胞除去 PBMC (CD25-PBMC) の反応性の違いを BRG マウスで比較した。

(3) 上記の PBMC から分化誘導した DC30 万個を不活化した HIV-1 (HIV-1 IIIB, 50 ng p24 当量) で 37 $^{\circ}$  C で一時間感作し、300 万個の PBMC または CD25(-)PBMC と混合し、BRG マウスの脾臓に接種した。7 日後の追加 DC 接種後、7 日目に分離したヒト CD4+T 細胞の収量と HIV 特異性で判断すると CD25(-)PBMC の方が優れていた。つまり、nTreg を除去することにより HIV に対する反応性を増強できることが示唆された。

## D. 考察

本研究において DC の試験管内分化誘導には、一般に行われている単球まで分離精製する

方法を用いる必要がないことが示された。これまでは過去の論文報告や参考書あるいは聞きかじりの情報を参考にして、DC 培養には単球の他の PBMC の混入はできるだけ避けてきた。しかし、単球の negative isolation 精製法においては単球の純度を 90%以上することは不可能である。この場合、10%以上の不純度でも DC は誘導できる。我々がより精製度の高いと言われる positive isolation 法を使わない理由は、単球に anti-CD14 抗体が結合するので間接的な悪影響が懸念されるからである。Negative selection 法で精製した単球と比べても PBMC そのものから誘導した DC は、収量とアロ CD4+T 細胞増殖誘導能において顕著な違いはなかった。また重要な事実、この DC は、不活化 HIV で感作することによりヒト化マウスにおいて自家 HIV 特異的 CD4+T 細胞を誘導できることである。このような基礎データをもとにして、今後の実験では、DC の分化培養はスタート細胞群として PBMC から培養を始め、この簡素化法を検証するデータをより多く集積する必要がある。

制御性 T 細胞とは、自己に対する有害な免疫を鎮圧し、外来抗原に対する免疫応答においても過度になることを静める細胞群である。Treg は機能で分類される細胞であり、外来抗原の刺激なしに存在する nTreg の他にも、抗原刺激で誘導される誘導型 Treg も存在する。今回注目したのは、nTreg である。この細胞群は、CD4+CD25+マーカーを持ち、TGF-beta あるいは細胞接触依存性に T 細胞の増殖を抑制することが知られている。この細胞群を反応細胞群（つまり PBMC）から除去することにより、ヒト化マウス体内で抗原刺激に対するヒトの T 細胞の総合的な応答性が高められることを今回の研究で観察できた。今後、この現象を検証す

るために複数のドナーに関するデータを取る必要がある。この研究において私たちのアドバンテージは、CD25 抗体を自家製で持つことである。市販されているキットは高価であり、十分な量の検体を処理できないが、anti-CD25 抗体は自家製抗体なので、anti-mouse IgG マグネットビーズを購入すれば研究が可能となる。

長期的にみれば、ワクチンが HIV 感染に対して有効かどうかを判定する動物実験において、このヒト化マウスの系ではさらに免疫応答を促進・増幅することによりワクチンに備わっている本質的な効能を評価することができると考えている。今回の nTreg 除去に加えて今後の研究成果が期待できるのは免疫賦活法の研究であり、その一つは免疫により誘導された CD4+T 細胞の長期生存を可能にするといわれる OX40/OX40L システムの応用である。この系についても、自家製の単クローン抗体ライブラリーをすでに確立しており、その中にはアゴニスト作用を示すものや中和活性を示すものもある。したがって、このような抗体をワクチン接種後にヒト化マウスに投与することにより、CD4+T 細胞免疫応答の持続を促進できるか、来年度の研究テーマとしている。また、単球から CD8+T 細胞を有意に刺激する機能をもつ樹状細胞の分化培養にすでに成功しており、現在のワクチンの CD4+T 細胞刺激評価系に加えて、ヒト化マウスにおけるワクチンの CD8+T 細胞刺激評価系の立ち上げも平行して行いたい。

## E. 結論

ワクチン抗原を提示する樹状細胞 (DC) 培養法の簡素化と免疫誘導を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) の除去について研究を行った。DC は単球に精製せずともヒト末梢血単核球 (PBMC) を GM-CSF と IL-4 を含む培地で培養する

ことによって誘導できた。自然制御性T細胞を抗 CD25 単クローン抗体とマグネットビーズ法で除去すると HIV 特異的ヘルパーT細胞の誘導が有意に高くなった。以上の成果は、ヒト化マウスを用いたエイズワクチン・治療薬評価系の改良と普及へ向けて重要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, and Tanaka Y. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta. *Experimental Biology and Medicine*, in press.
- (2) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, and Tanaka Y. Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF co-activation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV-1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 24:23-435, 2008.
- (3) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, in press.
- (4) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, and Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, in press.
- (5) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, and Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* 82(2): 1021-33, 2008.
- (6) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, and Tanaka Y. The IL-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for screening of anti-viral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 197(1):134-41, 2008.
- (7) Harada S, Monde K, Tanaka Y, Kimura T, Maeda Y and Yusa K. Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1. *Virology* 370(1):142-50, 2008.
- (8) Monde K, Maeda Y, Tanaka Y, Harada S, and Yusa K. Gp120 V3-dependent impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5. *J Biol Chem* 282(51): 36923-32, 2007.
- (9) Kubo Y, Yokoyama M, Yoshii H, Mitani C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, and Yamamoto N. Inhibitory role of CXCR4 glycan in CD4-independent X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection and its abrogation in CD4-dependent infection. *J Gen Virol*. 88:3139-44, 2007.
- (10) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N,

Ansari AA, and Tanaka Y. Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells. Hum Immunol 68(7): 563-71. 2007.

## 2. 国内学会発表

(1) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦: HIV受容体に加えて活性化T細胞接着分子OX40Lを発現するVSVのHIV-1感染細胞の選択的殺傷. 日本ウイルス学会第55回学術集会プログラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌. 143.

(2) 篠田康彦, 田中勇悦, 鈴木陽一, 三浦義治, 小柳義夫: インターフェロンオメガ1によるHIV-1感染抑制. 日本ウイルス学会第55回学術集会プログラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌. 256.

(3) 高橋良明, 田中礼子, 田中勇悦: CD4陽性T細胞株でのOX40(CD134)分子の新たな機能: OX40/OX40L系により誘導されるアポトーシスのメカニズム. 第37回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22: 東京. 179.

(4) KONDO Kayo, TANAKA Reiko, TANAKA Yuetsu: Activation of primary human T cells in DNA synthesis-arrested states rapidly induces significant amounts of functional OX40 ligands. 第37回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22: 東京. 179.

(5) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: OX40L抗体によるヒト制御性T細胞(Treg)の誘導促進. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 415.

(6) 田中勇悦, 田中礼子, 児玉 晃, 張 麗峰, 近藤佳代, 大隈 和: 細胞結合OX40リガンドによる活性化CD4+T細胞におけるR5 HIV-1の

抑制. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 416.

(7) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦: ヒトIL-4産生免疫不全マウスを用いた多剤耐性HIV-1臨床分離株に対する薬剤評価系の確立. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 457.

(8) 児玉晃, 近藤佳代, 張 麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: エイズ樹状細胞免疫療法にむけて: 未精製末梢血単核球群からの樹状細胞分化誘導. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 525.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む。)なし

HIV 感染によるリンパ組織破壊メカニズム解析

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 伊藤守、三沢尚子 佐藤佳)

平成 19 年度分担研究報告書

研究要旨：マウス個体内でヒト T 細胞造血を構築するヒト CD34 陽性血液幹細胞移植 NOG マウス (NOG-hCD34 マウス) を作製し、HIV 感染実験を行った。その結果、感染後、高ウイルス血症と CD4 陽性 T 細胞の減少を再現できた。とくに CCR5 をコレセプターとする R5HIV-1 の感染マウスでは、末梢血 T 細胞中の CD4 陽性 CD45RA 陰性のメモリー T 細胞の減少が感染後、7-9 週目以降には顕著になり、脾臓ならびにリンパ節では CD4 陽性 T 細胞の減少、ならびに、きわめて多数の HIV 陽性細胞を検出した。この HIV 陽性細胞の多くは、CD3 陽性 CD4 陰性であること、これらの臓器では、CD25 や CD69 などの活性化マーカーの優位な増加は見られず、一方、CCR5 陽性細胞の著減が確認された。本研究は、NOG-hCD34 マウスがエイズウイルスのリンパ組織における感染モデルとなりうることを示唆するものである。

A. 研究目的

本研究の目的は HIV 感染による免疫不全発症病態のなかできわめて大きな問題である HIV の持続感染と CD4 陽性 T 細胞減少のメカニズム解明、そして、それに有効な治療法の開発である。逆転写酵素阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤の併用療法により、エイズ発症者ならびに死亡者は格段に減少した。しかし、感染者に対する本併用療法は服薬の持続が必須であり、薬剤による副作用ならびに合併症などの臨床的問題、そして、感染者への生涯にわたる服薬負荷などの社会的問題も大きな課題である。さらに、HIV は、リンパ組織に感染後、持続ならびに潜伏感染するために、エイズに対する根治は不可能である。そして、その免疫不全発症メカニズムについては、その詳細はいまだなぞである。どのようなメカニズムにより、HIV がリンパ組織に潜伏持続破壊するのか明らかにし、有効な薬剤を開発する必要がある。本研究では、ヒト CD34 陽性血液幹細胞移植 NOG マウスを用いて、HIV は脾臓やリンパ節などのリンパ組織において、CD4 陽性 T 細胞に感染し、おそらく CD4 分子ならびに CCR5 分子の発現を低下させ持続感染しているであろうという実験結果を見出した。これらの臓器特異的な感染に対する有効な治療法の開発はエイズ治療の新たな戦略と考える。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) 新生児 NOG マウスへの臍帯血移植実験  
MACS 磁気細胞分離法を用いて臍帯血より CD34

陽性細胞（陽性率 95%以上）を分画した。そして、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  $0.5-1 \times 10^5$  個の CD34 陽性細胞を移植した。移植後、各時点において採血し、末梢血液中の CD45、CD3、CD19、CD4、CD8、CD45RA に対する単クローン抗体によりその陽性細胞率を flow cytometry により測定した。また、各臓器におけるこれらの分子に加え、骨髄ではヒト CD34 細胞率、ならびに、その細胞数を測定した。

2) HIV 感染実験

移植後 12-13 週目に 100,000 tissue culture infective dose<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub>) の HIV<sub>JR-CSF</sub> を腹腔より接種した。感染後、3 週毎に採血し、flow cytometry により末梢血における CD45、CD3、CD19、CD4、CD8、CD45RA 発現細胞の割合を測定した。解剖時には脾臓、骨髄、胸腺、リンパ節の各臓器を採取し、flow cytometry により各マーカー分子の発現細胞率と細胞数を測定した。脾臓細胞は CCR5、CD25、CD69 のヒト細胞率、ならびに細胞数を、また、HIVp24 特異的単クローン抗体（2C2; 琉球大学田中勇悦博士より分与）を用いて HIVp24 陽性率を算出した。また、感染マウスの血漿中の HIV RNA 量をロッッシュ社のアンプリコア法により測定した。

（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から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た。すべての実験は本委員会より承認されている。

### C. 研究結果

#### 1) マウス内におけるヒト T 細胞造血実験系の確立

NOG 新生児マウスへ、ヒト臍帯血由来の CD34 陽性細胞を移植後、12-13 週目ならびに 28-44 週目のいずれの時点においても末梢血中の約 20-60%はヒト CD45 陽性細胞が占めていた。そして、ヒト T 細胞として、12-13 週目には CD4 陽性細胞が約 2-10 %であるが、28-44 週目には 6-30%程度まで増加すること、一方、CD8 については、移植後 12-13 週目ならびに 28-44 週目のその割合の差異は見られなかった（結果示さず）。つぎに、これらのマウスの臓器におけるヒト細胞の分布を検討したところ移植後 28-44 週目の胸腺においては  $10^6$ - $10^7$  個の胸腺細胞が、そしてその多くは CD4 ならびに CD8 double positive (DP) 細胞であり、一部 CD4 ならびに CD8 single positive (SP) 細胞であった。すなわち、正常胸腺組織の細胞構成であることが確認された。一方、骨髄にはヒト CD34 陽性細胞が約  $10^4$ - $5 \times 10^5$  個検出され、NOG-hCD34 マウスでは骨髄におけるヒト造血機能を継続しうることが確認された（結果示さず）。そして、脾臓においては移植後 44 週目では、ヒト CD45 陽性細胞として約  $10^7$  個の細胞が検出され、その割合は脾臓細胞あたり CD4 陽性 CD45RA 陽性細胞が平均値 7%、CD4 陽性 CD45RA 陰性細胞が平均値 20%を占めていた（結果示さず）。

#### 2) HIV 感染後の NOG-hCD34 マウス末梢血ヒト細胞の経時的変化

R5HIV-1 である HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染後の血漿中の HIV RNA 量（図 1A）、ならびに、ヒト CD45 陽性細胞陽性率（図 1B）を示す。これらのマウスでは、1 ミリリットルあたり  $10^4$  から  $10^5$  コピー以上のきわめて高いウイルス血症を 18-30 週以上検出されることより、持続的 HIV の感染が成立すること、また、マウスの個体毎に差があるものの、20 週以上にわたりヒト CD45 陽性のヒト白血球細胞が維持されること、さらに、末梢血中のヒト白血球の割合は減少することを見出した。

#### 3) HIV 感染後の末梢血ヒト CD4 陽性細胞の経時的変化

この HIV 感染マウスにおけるヒト CD4/CD8 比の減少（図 2A）、CD45 陽性細胞中の CD4 陽性細胞率の減少（図 2B i）、そして、その CD4 陽性細胞率の減少している多くは、感染後 7-9 週目（移植後 19-22 週目）に見られる CD4 陽

性 CD45RA 陰性 T 細胞群の割合が非感染マウスのそれと比較して、明らかに減少するからであることがわかった（図 2B iii）。なお、CD4 陽性 CD45RA 陽性 T 細胞群の割合は感染マウスと非感染マウス間に明らかな差異はなかった（図 2B ii）。

#### 4) リンパ臓器における HIV 感染

生体内における HIV 感染増殖の主な場は末梢血よりも、リンパ節などのリンパ臓器であることは、ヒト検体の解析から以前から見出されている。そこで、HIV 感染 NOG-hCD34 マウスの脾臓、リンパ節あるいは、骨髄を解剖時に採取し、免疫組織学的な解析を行った。その結果、これらの臓器のなかで、脾臓ならびにリンパ節においては、きわめて多くの CD4 陽性細胞が分布し、HIVp24 陽性細胞が数多く見出された。一方、骨髄においては、CD4 陽性細胞数は少なく、そのためか HIVp24 陽性細胞数も少数であった（結果示さず）。そこで、HIV 感染細胞を定量的に検出するために HIV-1p24 に対する単クローン抗体を用いて脾臓細胞中の HIV 陽性細胞を検出した。その結果、細胞内染色により HIVp24 陽性細胞は約 2-5%検出され、さらにこの細胞は CD3 陽性 CD4 陰性の T 細胞であった（図 3A）。なお、末梢血では HIVp24 陽性細胞は約 1%以下であり（結果示さず）、脾臓では陽性細胞が多数存在することがわかった。

脾臓における HIV 感染様式を解明するために、さらに細胞表面マーカーの解析を進めた。この臓器では、HIV 感染により、ヒト CD4/CD8 比の減少（図 3B）と CD4 陽性 CD45RA 陰性 CCR5 陽性細胞の減少（図 3Ci, ii, iii）は顕著であるいが、それに比して、CD25 ならびに CD69 両陽性細胞すなわち活性化 T 細胞の増加は検出できなかった（図 3D）。これらの結果は、HIV 感染により脾臓では活発なウイルス感染増殖が再現され、CD4 ならびに CCR5 の down-regulation ならびにこれらの細胞の減少がおきることが示された。ところが、感染増幅は活性化細胞でないことが強く示唆された。

### D. 考察

本研究により、われわれが開発した NOG-hCD34 マウスは HIV 高感受性であり、感染後、高ウイルス血症維持と CD4 陽性 T 細胞の持続的減少、特に R5HIV の感染マウスでは、末梢血 T 細胞中、CD4 陽性 CD45RA 陰性のメモリー T 細胞の減少が再現された。さらに、脾臓ならびにリンパ節ではきわめて多くの HIV 陽性細胞を見出した。この HIV 陽性細胞の多くは、CD3 陽性 CD4 陰性であること、これらの臓器では、

CD25 や CD69 などの活性化マーカーの優位な増加は見られず、一方、CD4 ならびに CCR5 陽性細胞の著減を確認した。すなわち、本マウスは HIV 感染による免疫不全症の大きな要因である CD4 T細胞の破壊とリンパ臓器における活発な複製を再現するものであることがわかった。リンパ組織における持続ならびに潜伏感染の詳細な解析が可能な実験系であろうと考えている。

ヒト血液幹細胞移植免疫不全マウスにおいて、HIV 感染後に免疫反応が誘導されるのか、大きな課題である。すなわち、このモデル動物が HIV ワクチン評価モデルとなりうるのか、議論を呼んでいる。本 NOG-hCD34 マウスに HIV を感染させたマウス血漿サンプル中から、ウエスタンブロットティング法により HIV-1 抗体の検出を試みた。9 匹中 3 匹のマウスの血漿 (10 倍希釈) に gp41 に反応するきわめて薄いバンドを検出したが、他の特異的バンドは検出できず、HIV に対する抗体反応は限定的であることを確認した (結果示さず)。しかし、HIV 感染後、CD8 陽性 CD45RA 陰性の細胞の割合が末梢血中において増加することは、見出している。この細胞群が HIV 抗原反応性の T 細胞群なのかは検討しておらず、今後の課題である。

#### E. 結論

エイズ発症モデルマウスの確立に向けて大きな学問的進歩が得られた。

#### F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物委員会、組換え DNA 委員会の規定に基づき、すべて P3 実験施設で行われた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, Terunuma H, Kano S, and Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23:391-397, 2007.

- ① Futahashi, Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, and Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science* 98:373-379, 2007.
- ② Miyano-Kurosaki N, Kira J, Barnor

JS, Maeda N, Misawa N, Kawano Y, Tanaka Y, Yamamoto N, and Koyanagi Y. Autonomous proliferation of HTLV-CD4+ T cell clones derived from human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy patients. *Microbiol. Immunol.* 51:235-242, 2007.

- ③ Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y. and Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol.* 82, 1021-1033, 2008.
- ④ Kitayama H, Miura Y, Ando Y, and Koyanagi Y, Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol. Immunol.*, in press.
- ⑤ Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N, Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, in press.
- ⑥ Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, and Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, in press.
- ⑦ Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type-1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* in press.

##### 2. 学会発表

- ① Koyanagi Y. HIV-1-infection in humanized mice. Innovation forum of Tohoku University US office, San Francisco, 2007.
- ② Sato K, Aoki J, Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., Koyanagi, Y.: Tetraspanin on HIV-1 virions inhibits its infection. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, 2007.
- ③ Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y. High level of HIV-1 viremia and CD4 depletion in human CD34+ cell-engrafted mice. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- ④ Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus-1 Vpr inhibits neurite outgrowth via caspase-3-independent pathway, *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2007.



- ⑤ Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. CD63 and its mutants inhibit fusion of CXCR4-containing vesicles to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- ⑥ Sato K, Daikoku E, Sano K, and Koyanagi Y. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity through Incorporation of CD63, Awaji symposium, Awaji, 2007.
- ⑦ Koyanagi, Y.: Foundation and Recent Progresses in Retrovirus Research, Awaji symposium, Awaji, 2007.
- ⑧ Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. 8th AIDS seminar in Kumamoto. 2007.
- ⑨ Koyanagi, Y.: HIV-1 viral protein R inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of HIV-1-induced cell death. 14<sup>th</sup> East Asia symposium, Tokyo, 2007.
- ⑩ Koyanagi, Y.: "Mitochondria and membrane trafficking" implication for HIV infection and pathogenesis. 10<sup>th</sup> Anniversary symposium of Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, 2007.
- ⑪ 小柳義夫. HIV-1 感染ヒト造血マウス. 第 31 回阿蘇シンポジウム、熊本.
- ⑫ 芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 膜輸送変換による HIV-1 感染阻止ストラテジー. 近畿エイズ研究会、大阪、2007.
- ⑬ 芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. HIV のコレセプターである CXCR4 の細胞内輸送. ウイルス学会湯河原キャンプ、湯河原、2007.
- ⑭ 芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. CXCR4 トラフィッキング過程の可視化と遺伝子導入による HIV-1 感染阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007
- ⑮ 北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV-1 Vpr 誘導性ミトコンドリア機能障害による神経細胞軸索伸長の阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- ⑯ 小柳義夫、三沢尚子、北山裕子、佐藤佳、渡部匡史、Johnny Chuanyi Nie、伊藤守. HIV-1 感染ヒト造血細胞移植マウス内に維持される長期高ウイルス血症. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- ⑰ 篠田康彦、田中勇悦、鈴木陽一、三浦義治、小柳義夫. インターフェロンオメガ 1 による HIV-1 感染抑制. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- ⑱ 安藤良徳、北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. HSV-1 感染による中枢神経組織障害の経時的解析. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- ⑲ 北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV 感染による認知障害機構：Vpr によるミトコンドリア機能障害による神経前駆細胞分化抑制. 第 21 回日本エイズ学会、広島、2007.
- ⑳ 芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 受容体分子の表面発現を輸送小胞レベルで調節する機構；HIV のコレセプター分子の細胞質膜発現を調節する、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007.
21. 佐藤佳、山元誠司、小柳義夫. HIV-1 の粒子産生過程における Ral GTPase の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007.
3. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得状況  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なしむ。）
  1. 特許取得状況  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

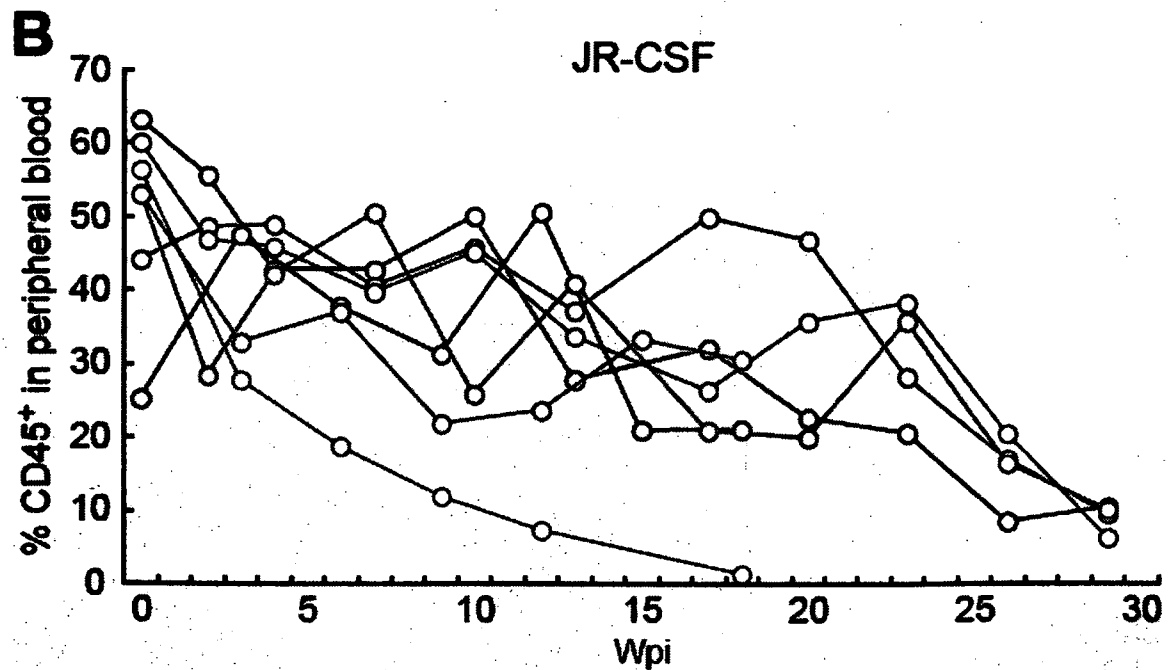
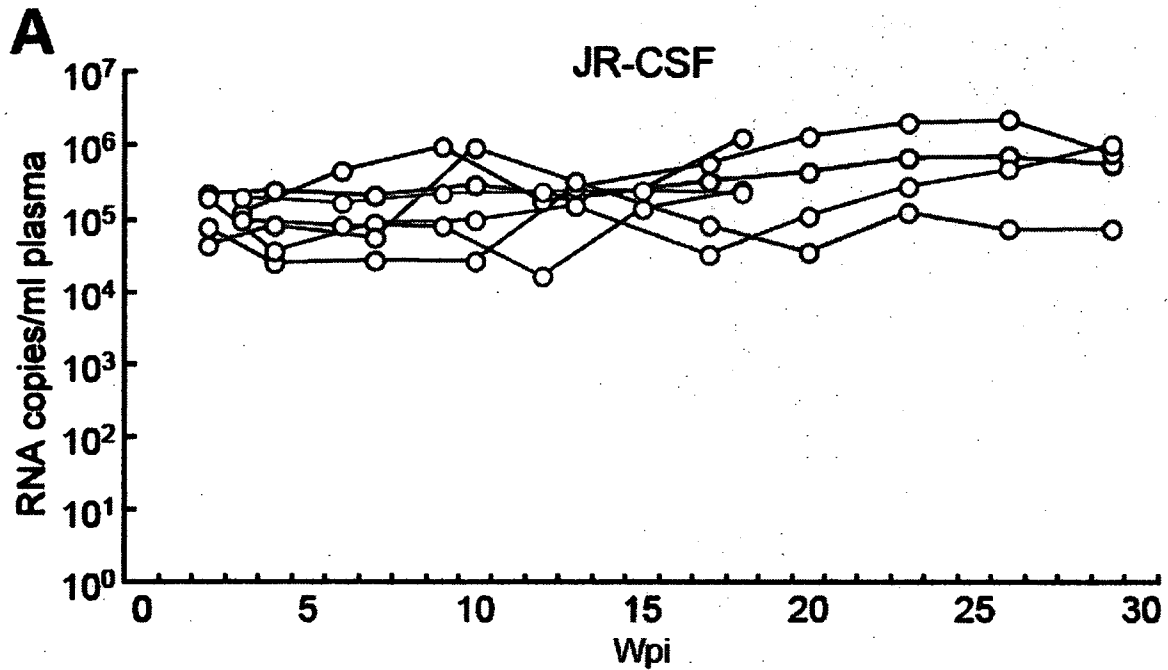


図1. CCR5 指向性 HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスにおける、長期的かつ高度な血漿中 HIV RNA 量の上昇と末梢血中ヒト CD45 陽性細胞の減少. 生後 12-13 週齢の NOG-hCD34 マウス (n=7)に 100,000 TCID<sub>50</sub> の HIV-1<sub>JR-CSF</sub> を腹腔内接種し、血漿中 HIV RNA 量 (A)、および、末梢血中のヒト CD45 陽性細胞の% (B)を長期的に測定した. Wpi, weeks post-infection.

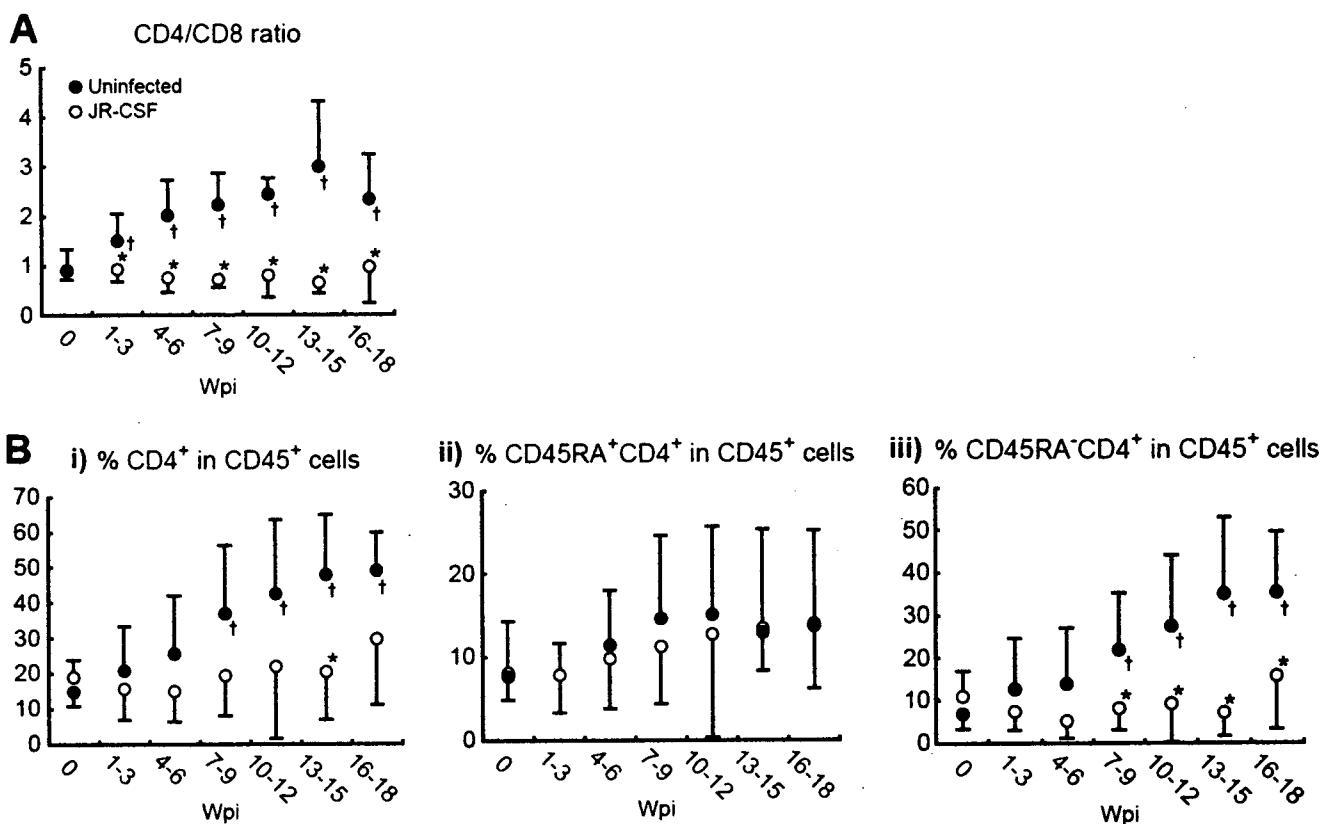


図 2. CCR5 指向性 HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスの末梢血における、ヒト CD4 陽性およびヒト CD8 陽性 T 細胞上ヒト CD45RA 分子の発現の長期的解析. 非感染(n=8)および HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染(n=7)NOG-hCD34 マウス末梢血を定期的 (感染直前 [0]、感染後 [weeks post-infection; wpi] 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18 週) に回収し、ヒト CD4 陽性およびヒト CD8 陽性 T 細胞上のヒト CD45RA 分子の発現を、flow cytometry により解析した. (A) 末梢血中のヒト CD4/ヒト CD8 比の長期的な解析. (B) 末梢血におけるヒト CD45 陽性細胞中の、ヒト CD4 陽性細胞% (i)、ヒト CD4 陽性 CD45RA 陽性細胞% (ii)、ヒト CD4 陽性 CD45RA 陰性細胞% (iii)の長期的な解析. Cross は感染直前と、Asterisk は同時期の非感染マウスとの間の統計学的有意差 ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test) を表している.

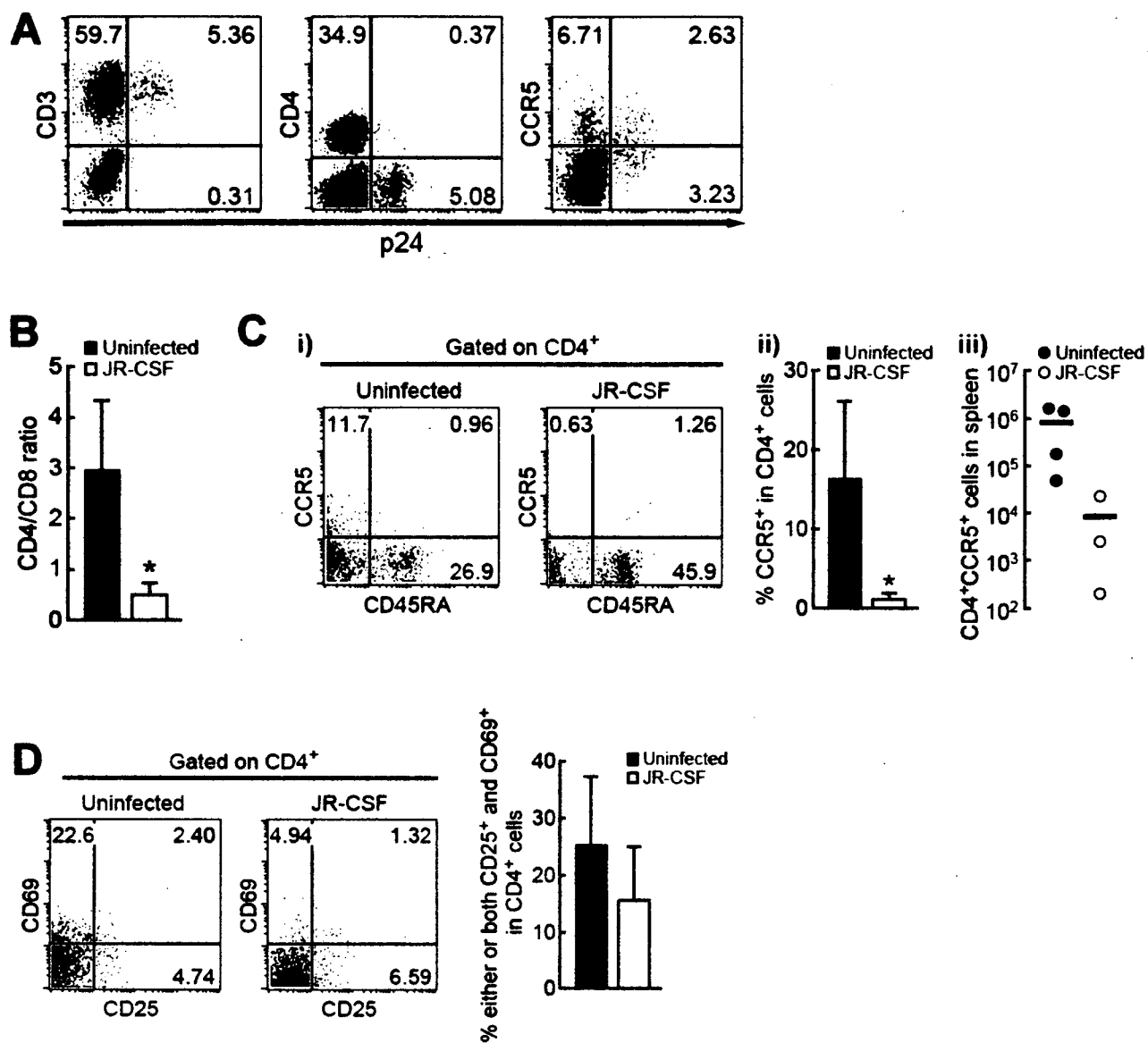


図 3. CCR5 指向性 HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウス脾臓における、HIV-1 持続産生細胞の同定とその病態. (A) 感染後 18 週の HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染(n=7)NOG-hCD34 マウスから脾臓を回収し、抗 p24 抗体 (X 軸)と共に、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD4 抗体、抗ヒト CCR5 抗体 (Y 軸)を用い、HIV-1 持続産生細胞の存在を、flow cytometry により解析した. その一例を示している. 図中の数値は、脾臓細胞中の%を表している. (B) 感染後 18-29 週の HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染(n=6)、および、非感染(n=4)NOG-hCD34 マウス脾臓における、ヒト CD4/ヒト CD8 比. (C) (i) 生後 44 週の非感染マウス、および、感染後 29 週の HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染 NOG-hCD34 マウスの脾臓に存在するヒト CD4 陽性 T 細胞における、ヒト CCR5 およびヒト CD45RA の発現プロファイル. (ii, iii) 感染後 18-29 週の HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染(n=4)、および、非感染(n=3)NOG-hCD34 マウス脾臓に存在するヒト CD4 陽性 T 細胞における、ヒト CCR5 陽性細胞% (ii)と、脾臓中のヒト CD4 陽性ヒト CCR5 陽性細胞数 (iii). (D) 生後 44 週の非感染マウス、および、感染後 28 週の HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染 NOG-hCD34 マウスの脾臓に存在するヒト CD4 陽性 T 細胞における、ヒト CD25 およびヒト CD69 の発現プロファイル. Asterisk は統計学的有意差 ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test) を表している.