

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

分担研究者 山本直樹 国立感染症研究所エイズセンター長

平成 19 年度分担研究報告書

研究要旨：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。

A. 研究目的

ヒト免疫不全症ウイルス (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なされているものの、薬剤耐性株の出現も問題となっており、新たなワクチン、抗ウイルス薬剤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っており、より簡便かつ有用なモデル動物が必要とされている。

最近開発された NOD/SCID/gamma (c) (null) マウス (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 細胞を含む各種リンパ球の発生が起こる。我々はこれまでに、このヒト化マウスが HIV-1 に高い感染感受性をもつことを示しており、薬剤・ワクチン開発の新しい動物モデルとしての有用性が期待されている。本研究では、

マウスへのヒト造血幹細胞移植法を改良し、長期間安定して生存するヒト化マウスを作製するとともに、HIV-1 長期感染によるウイルス動態の解析およびマウスの病態解析を行った。さらにエイズ関連悪性リンパ腫の要因の一つである EB ウイルスを感染させ、B 細胞リンパ腫発症モデルマウスの作製を試みた。

B. 研究方法

ヒト臍帯血造血幹細胞細胞の分離と NOG マウスへの造血幹細胞移植

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。

6-10 週齢の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所および日本大学医学部にて飼育した。2 x 10<sup>4</sup>-1.2 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移植した。

フローサイトメトリー解析

移植後 1-8 ヶ月のマウスから経時的に末梢血

や種々のマウス臓器中におけるヒト血液細胞の出現を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。細胞の絶対数測定は、BD Trucount Tube (BD Pharmingen) を用いた。

#### HIV-1 感染実験

移植後 4-5 ヶ月のマウスに、HIV-1<sub>JRC5F</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) をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 4 ヶ月までに定期的に採血、剖検を行い、血漿中のウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。HIV-RNA は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system (PE Biosystems) で定量した。

#### EBV 感染実験

移植後 3-6 ヶ月のマウスに、Akata 細胞培養上清由来の EBV を尾静脈より投与した。投与後定期的に採血、剖検を行い、ウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。EBV-DNA は QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) にて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system で定量した。

また、感染マウスの脾臓から CD8 陽性 T 細胞を分離し、同ドナー由来の臍帯血細胞から樹立した EBV 感染 B 細胞株 (LCL) を用いて ELISPOT assay を行った。

#### (倫理面への配慮)

研究にはヒト臍帯血、実験動物を使用するため、下記の点を留意して実験を行った。

1. 臍帯血の使用に関しては、国立感染症研究所、日本大学医学部および東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。
2. 研究に用いる臍帯血は、他の研究目的には使

用しない。臍帯血・末梢血は匿名処理を行うため、個人情報が流出することはない。

3. 本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

4. 臍帯血は臍帯を切り離した後で、臍帯・胎盤に残った血液を採取するため、新生児と母体への影響はない。また、臍帯血の採取は母子共に安全な分娩のみに限るとし、臍帯血採取によって分娩時の危険性が増す可能性を排除している。

5. 末梢血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、医師が採血している。採血に伴う身体への危険性はあるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。

6. 臍帯血採取に関しては、協力医療機関の医療スタッフが本研究の趣旨を説明し、臍帯血提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医療スタッフ名を明記し、同意書は協力医療機関において厳重に保管している。

7. 動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。放射線照射、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ている。これは動物実験における実験処置に対する倫理基準のカテゴリー B (動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験) レベルの実験に相当する。

#### C. 研究結果

##### 1. 長期生存するヒト化マウスの確立と発生するヒト細胞の解析

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。従来の SCID マウスや NOG マウスへのヒト造血幹細胞の移植には放射線照射が不可欠とされていたが、NOG マウスでは放射線照射を行わなくてもヒト細胞の生着、発生が十分に起こることが判明した。このヒト化マウスの 80% 以上は移植後 300 日以上生存し(平均生存期間: 387 日)、300cGy の放射線照射したマウス(平均生存期間: 188 日)に比べて明らかな長期生存を示した。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 ヶ月目には T 細胞が検出され(図 1. B)、6 ヶ月目には B 細胞の割合を上回った(図 1. C)。

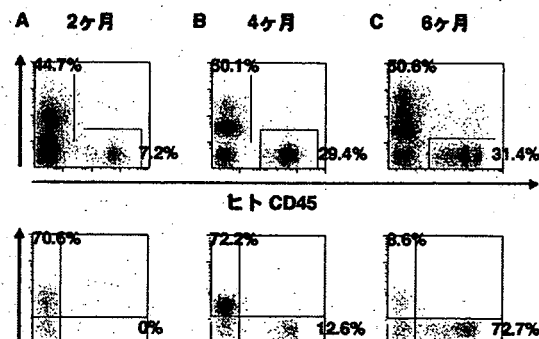
図 1. ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスで発生するヒト T 細胞の解析

- 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

マウス 220 匹の解析結果から、移植後 100 日以降にヒト T 細胞が顕著に増加するのがみとめられた。また、脾臓や骨髄などの組織では単球/マクロファージ、樹状細胞など免疫や HIV-1 感染に重要なヒト細胞群の発生も確認された。

2. 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 匹に対し、R5 指向性 HIV-1<sub>JRC5F</sub> (65,000 TCID<sub>50</sub> /



マウス)および X4 指向性 HIV-1<sub>MNP</sub> (20,000 TCID<sub>50</sub> / マウス)、X4 指向性 HIV-1<sub>NL4-3</sub> (60,000 TCID<sub>50</sub> / マウス)をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 116 日目までの血漿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、3 ヶ月以上にわたって高いウイルスコピー数 (<math>7.8 \times 10^6 \text{ copies/ml}</math>) が持続する慢性感染が成立した(図 2. A)。感染マウスでは、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て末梢血と脾臓中で CD4 陽性 T 細胞の割合が明らかに減少しており、エイズ様の症状になっているのが確認された。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。

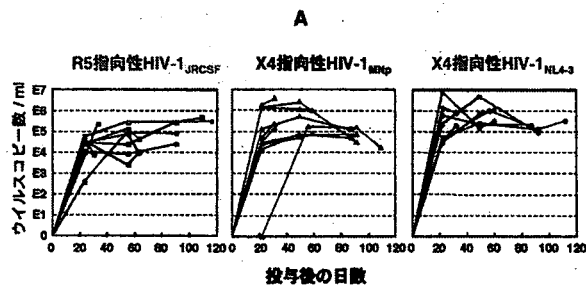


図 2A. HIV-1 投与後の血漿中ウイルスコピー数の変動

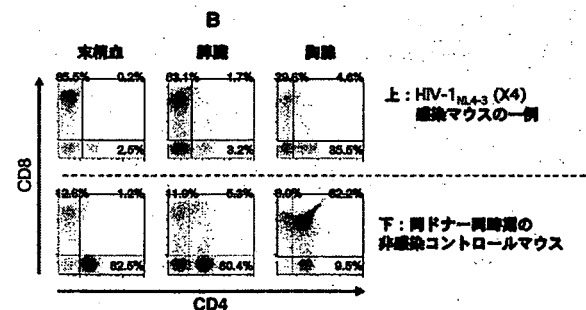


図 2B. HIV-1<sub>NL4-3</sub> 投与後 32 日目の CD4/CD8 解析

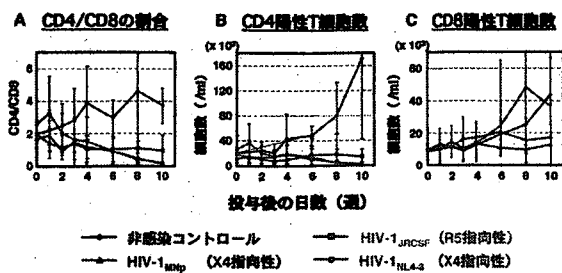


図 3. HIV-1 感染マウスの末梢血における CD4/CD8 比および CD4 陽性 T 細胞数の変動

- A. CD4/CD8 比
- B. CD4 陽性 T 細胞数
- C. CD8 陽性 T 細胞数

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 25 匹を非感染コントロールグループと感染グループにランダムに分け、末梢血 CD4/CD8 の割合、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の絶対数の変動を経時的にモニタリングした。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> (6 匹) に感染した 2 つの個体群では経時的に減少していくのがみられた (図 3. A)。一方、R5 指向性 HIV-1<sub>JRC5F</sub> (7 匹) 感染マウスにおいても CD4/CD8 は減少するもののその減少速度は比較的緩やかであった (図 3. A)。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たが (図 3. B)、CD8 陽性 T 細胞数は主に X4 指向性 HIV-1 においてのみ減少する傾向がみられた (図 3. C)。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。

### 3. EBV 感染後のウイルス動態および免疫反応の解析

本研究でヒト化 NOG マウスが HIV-1 に高い感染感受性を示し、CD4 陽性 T 細胞の減少を伴う慢性感染が成立することが明らかとなった。しかし、一方で免疫機能の構築については明らかではない。我々は HIV-1 感染実験と並行して EBV 感染実験を行い、このヒト化 NOG マウスが EBV に対して強い免疫反応を示すことを突き止めた。

感染実験では、主にヒト B 細胞の割合が多い移植後 3 ヶ月のマウス群とヒト T 細胞の顕著な増加が起こる移植後 6 ヶ月のマウス群に分けて EBV を投与した。移植後 3 ヶ月のマウス群では EBV 投与後 2-3 週間後に血液中に高いウイルスコピー数が検出され、その後体重減少に伴い死亡した (図 4. A)。これらのマウスでは脾臓、肝臓、リンパ節などで大きな B 細胞リンパ腫が形成されていた。一方、移植後 6 ヶ月のマウス群では EBV 投与後 2-3 週間後と同様にウイルスコピー数が増加したが、その後コピー数が減少する個体もみられ (図 4. B)、それらの個体では肉眼的に大きな腫瘍はみとめられなかった。全身組織における EBV コピー数を比較すると、T 細胞が少ない時期に投与したマウスで 10-1000 倍の高いコピー数が検出された (表 1)。末梢血中 T 細胞の変動を解析した結果、EBV が陽性になった直後に CD8 陽性 T 細胞が顕著に増加していることがわかった (図 5)。これはヒトにおける伝染性単核症 (IM) の症状を反映しているものと考えられる。ELISPOT assay の結果、この T 細胞は autologous の EBV 感染 B 細胞 (LCL) に対して強い反応を示し、またこの反応は MHC クラス I 抗体によってブロックされた。このことから、MHC クラス I 拘束性の EBV 特異的 T 細胞が誘導され、EBV 感染細胞の増殖を抑制しているものと考えられる。

本研究では、ヒト造血幹細胞の移植法を改良し、長期生存するヒト化マウスの作製に成功した。このマウスでは R5 指向性および 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感染が成立した。感染マウスでは、CD4 陽性 T 細胞が経時的に減少し、エイズ様の症状がみられた。このことから、エイズ発症メカニズムの解析モデルや長期の抗 HIV-1 薬の評価モデルとして有用であると考えられる。

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 が有意に増殖し、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。本研究で R5 指向性 HIV-1 と X4 指向性 HIV-1 感染マウスでは、CD4 陽性 T 細胞の減少速度が異なっており、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役立つと思われる。また、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 (SCID マウスにヒト末梢血細胞を移植) 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 HIV-1 投与後、3 ヶ月以上も高い viremia が持続し、長期の治療薬の評価に非常に適していると考えられる。

エイズ関連悪性リンパ腫は、HAART 療法により慢性疾患化したエイズの長期予後を脅かし、エイズ患者の直接死因の多くを占める。その要因の一つとなる EBV は健常人の 90%以上が感染しているが、免疫によって潜伏感染状態に抑えられている。一方でエイズや移植などで免疫不

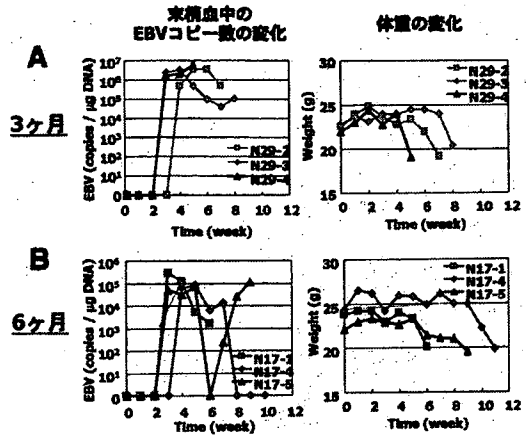


図 4. 末梢血中 EBV コピー数と体重の変化  
 A. 移植後 3 ヶ月のマウスに投与  
 B. 移植後 6 ヶ月のマウスに投与

	EBV (copies / μg human DNA)			
	T細胞が少ない時期		T細胞が十分に発生した時期	
末梢血	6.7×10 <sup>6</sup>	6.0×10 <sup>6</sup>	5.7×10 <sup>4</sup>	検出限界以下
脾臓	7.0×10 <sup>6</sup>	4.2×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>4</sup>	2.4×10 <sup>3</sup>
胸腺	未測定	1.7×10 <sup>6</sup>	2.3×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>2</sup>
骨髄	4.3×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	未測定	1.2×10 <sup>3</sup>
肝臓	未測定	5.7×10 <sup>6</sup>	2.8×10 <sup>4</sup>	4.2×10 <sup>3</sup>
腎臓	未測定	6.7×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>	7.9×10 <sup>6</sup>
リンパ節	2.0×10 <sup>6</sup>	7.4×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>6</sup>	2.4×10 <sup>4</sup>

表 1. 主要組織における EBV コピー数の定量

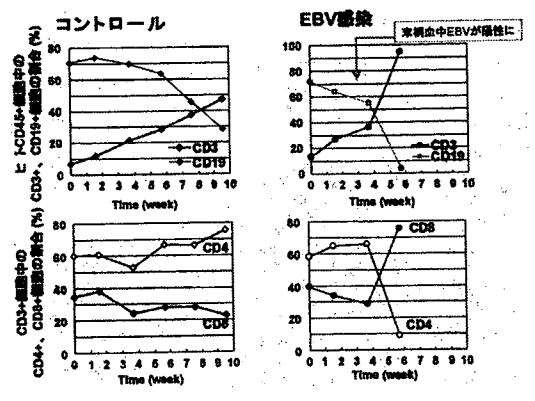


図 5. コントロールマウスおよび EBV 感染マウスにおける CD8 陽性 T 細胞の変動

D. 考察

全状態になるとB細胞リンパ腫を発症することが問題となっている。我々はHIV-1感染と並行してEBV感染実験を行い、リンパ腫発症モデルの作製を試みた。その結果、感染後にCD8陽性T細胞の顕著な増加が起こり、投与時期によってリンパ腫の形成をコントロールできることが明らかとなった。このことから、EBVとHIV-1を重感染させ、免疫不全状態を誘導することにより「エイズに伴う日和見リンパ腫再現モデル」の作製も可能であると考えられる。

#### E. 結論

ヒト造血幹細胞移植NOGマウスで、安定したHIV-1長期慢性感染系が確立された。感染マウスでは、CD4陽性T細胞の経時的な減少がみられ、エイズモデルとしてその発症機序の研究や新規薬剤・ワクチン開発への応用が期待される。さらにEBVと重感染させることで、日和見エイズリンパ腫再現マウスモデルの作製へ発展できると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) 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/IL2Rgamma 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) Watanabe S., Ohta S., Yajima M., Terashima K., Ito M., Mugishima H., Fujiwara S., Shimizu K.,

Honda M., Shimizu N., and Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma null Mice Transplanted with Hematopoietic Stem Cells under Nonmyeloablative Conditions Show Prolonged Life Spans and Allow Detailed Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pathogenesis. *J. Virol.* 2007 Dec;81(23):13259-64.

(3) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y. Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis.* 2008 Jan 1;197(1):134-41.

(4) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(共同研究者; 渡辺哲、今留謙一、矢島美彩子、寺嶋一夫、伊藤守、森尾智宏、清水則夫、本多三男、藤原成悦)

「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

分担研究者 伊藤守 財団法人実験動物中央研究所・免疫研究室室長  
（共同研究者 片野いくみ、伊藤亮治、佐々木正史、小倉智幸他）

平成 19 年度分担研究報告書

研究要旨：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-2Rg<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。

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に有効なヒトの細胞を生着させた「ヒト化マウス」小型動物モデルを作製することである。HIV-1 感染マウスとして、我々が樹立した BALB/cA-RAG2<sup>null</sup> IL-2Rg<sup>null</sup> (BALB/cA-dKO) -hIL-4Tg 複合マウスは従来の免疫不全マウスよりも HIV-1 感染性に優れていた。このマウスをより広範な HIV-1 感染実験および治療実験に用いるためには、生産の拡大が必要であり、そのために計画的生産法を確立する。さらに、同じく我々が開発してきた NOD/Shi-scid, IL-2Rg<sup>null</sup> (NOG) -hIL-4 Tg マウスは、ヒト末梢血リンパ球および臍帯血幹細胞移植によって、よりヒト細胞の生着や HIV-1 感染性に優れている可能性がある。このマウスでの移入ヒト細胞の生着性や体内動態を調べることによって、新しい HIV-1 感染のための「ヒト化マウス」モデルを提供することにある。

B. 研究方法

前期「小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療評価系の開発」（平成 16 年～18 年度）に作製した human IL-4 を分泌する C.B-17-scid-hIL-4 Tg マウス 2 系統および BALB/cA-dKO -hIL-4 Tg マウス 2 系統のうち、後者の高分泌の 1 系統（血中 hIL-4 濃度が  $2.10 \pm 0.79$  ng/mL）について、生産の拡大を企画し、大型アイソレーターによる計画生

産を行った。繁殖は、当所 SPF 大型アイソレーター内での hIL-4 Tg 1: 野生型 1 の同居交配で行った。得られた産子は 5 週齢で尻尾を採取し、それより DNA を抽出し、hIL-4 特異的な primer set を用いた PCR により、Tg マウスであるか否かを判定した。Primer set として、5' -CCCGGGATCGTTAGCTTCT CCTGATAAAA-3' および 5' -GCGGCCGCTATTC AGCTCGAACACTTTGAAT-3' を用いた。

同様に得られていた NOG-hIL-4 Tg マウス 3 系統（血中濃度はそれぞれ 0.07 ng/mL、0.32 ng/mL および 0.66 ng/mL）のうち、繁殖成績が良好な 0.32 ng/mL を分泌する系統を選択して、その系統樹立を行った。

また、0.32 ng/mL 分泌系統由来の産子で 0.39 - 1.37 ng/mL を分泌する Tg マウスを用いて、2 種類の異なるソースのヒト細胞の予備的移植実験を行った。すなわち、一つは 2.5 Gy の X 線照射 NOG-hIL-4 Tg マウスにヒト臍帯血由来 CD34+ 細胞（Lonza 社製，Switzerland） $5 \times 10^4$  を尾静脈より接種した実験で、もう一つは X 線照射なしの NOG-hIL-4 Tg マウスにインフォームド・コンセントを得た健常人の末梢血液から Ficoll による密度勾配遠心によって分離した単核球（hPBMCs） $1 \times 10^7$  を腹腔内より接種した実験である。これらマウスは移入後の状態観察を行い、また経時的に採血し、抗ヒト抗体染色によるフローサイトメトリーでマウス血液中のヒト細胞の生着性やその動態を観察した。

### (倫理面への配慮)

これら実験は、財団法人実験動物中央研究所の研究倫理委員会、遺伝子組換え安全委員会および動物実験委員会の承認を得て、行っている。

### C. 研究結果

本年度より開始した BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスの F3 または F4 世代の 17 ペア 34 匹を用いた SPF 大型アイソレーター内での hIL-4 Tg1: 野生型 1 同居による繁殖成績を表 1 に示す。3 産までの結果から、平均産子数 5.0、離乳率 93.4%であり、それら離乳子の尻尾より Tg マウス率は 54.6%と比較的良好な結果が得られた。この交配方式によって得られた産子は、感染実験のために本研究の主任研究者である田中勇悦教授（琉球大）に搬送された。表 2 に本年度 6 ヶ月間（7 月～12 月）の供給実績を示した。

NOG-hIL-4 Tg マウスの系統樹立と計画生産を試みているが、その過程で得られた NOG-Tg マウスおよび non-Tg マウスを用いて、hPBMCs および CD34+細胞移植後の一般状態観察とヒト造血細胞の動態をフローサイトメトリーで解析した。図 1 に hPBMCs の腹腔内移植後のマウスの生存性を示した。図でも明らかなように、移入された NOG マウス 2 匹は移入後 32 日で死亡した。一方で、NOG-hIL-4 Tg マウス 3 匹は移入後 42 日でも全例が生存した。現在、それらマウスに一般状態に顕著な悪化は見られていない。移入後 1、2、3 および 4 週時でのこれらマウスの末梢血白血球に占めるヒト細胞をフローサイトメトリーで検査したところ、non-Tg マウスではヒト CD8+細胞が優位であるが、Tg マウスではヒト CD4+細胞が優位であった（図 2）。

ヒト臍帯血由来 CD34+細胞を移入した実験では、移入後 10 週目で NOG および NOG-hIL-4 Tg マウスを剖検し、骨髄のヒト細胞の増減を観察した。NOG マウスでは、従来の結果と一致して、骨髄中にヒト CD45+細胞が 60～70%占めていることが確認できた。しかし、NOG-hIL-4 Tg マウスについては、末梢血および骨髄中にヒト CD45+細胞が全く検出されなかった。

### D. 考察

本研究は、HIV-1 感染研究のための新規ヒト化マウス、その基盤になる複合化重度免疫不全マウスの開発およびそれら維持生産・供給システムの構築である。

従来、この目的のために C.B-17-scid hIL-4 Tg マウスおよび BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスを樹立し、その HIV-1 感染性が比較検討された。前者マウスでは残存する NK 細胞を除去する必要があり、そのために抗 IL-2Rb 抗体 (TMb-1) を投与する必要があった。しかし、後者マウスでは NK 細胞が欠失していることから、その投与の必要がないことからその利便性は高く、さらに感染実験の結果から後者マウスの方がより感染効率が良く、感染モデルマウスとして適することが明らかとなった。以上のことから、本年度から後者マウスに焦点を絞り、その維持と大量生産を行うこととした。従来は小型アイソレーターを用いた小規模生産を行ってきたが、今年度は大型アイソレーターを用いて生産を行ったが、その成績は比較的安定しており、安定的に供給することができることが分かった。

新たに開発した NOG-hIL-4 Tg マウスについても生産供給の検討を開始したが、その検討に際して得られた少数の NOG-hIL-4 Tg マウスを用いたヒト化マウスの特徴を検討した。NOG マウスに hPBMCs を移植した場合には NOG マウスで観察される GVHD が起こらず、移植後 42 日（6 週）までも一般症状としては正常で、健康に推移することが明らかとなった。その理由としては、NOG-hIL-4 Tg マウスでは、NOG と比較して、ヒト細胞が生着、増殖し難いこと、または移植されたヒト細胞のうちで GVHD のエフェクター細胞の増殖が抑えられていることなどが考えられる。一般的にヒト PBMCs を移入された NOD-scid や SCID マウスなどでは、CD8+細胞が優位となり、最終的に GVHD で死亡する。すなわち、CD8+細胞が GVHD のエフェクター細胞と考えられる。実際に移植後 4 週の移入マウス末梢血に占めるヒト CD4+および CD8+細胞の比率を調べると、NOG-Tg マウスでは明らかに CD8+細胞の比率が抑えられていた。このことは、hIL-4 が存在することによって、ヒト末梢血 CD4+細胞が活性化され、増殖するが、CD8+細胞は相対的に増殖しないことから、その比率が抑えられる結果となることを示唆している。また、このことによって、GVHD の発症が抑えられていると考えられる。一方で、IL-4 は T 細胞の Th2 細胞への極性化をもたらすと考えられ、このことがアレルギーや自己免疫疾患発症に深く関わっていると考えられている。この Tg マウスにおけるヒト CD4+細胞の極性化—すなわち Th1、Th2 細胞への移動等が起こっているのか否か？は現在



不明である。このことをあきらかにすること、また、それがどのように GVHD 発症に係わっているかは興味深いテーマと思われる。これら NOG-hIL-4 Tg マウスでの移入ヒト細胞の動態を検討すると同時に、この hPBMC 移入ヒト NOG-hIL-4 Tg マウスでの HIV-1 感染性を従来の BALB/cA-dKO マウスとの比較の上で、その有効性、特徴を明確にして行きたい。

NOG マウスで認められるヒト幹細胞分化、増殖は NOG-hIL-4 Tg マウスでは認められないことが明らかにされた。この現象の意味するところは今後の興味深いテーマの一つであるが、HIV-1 感染実験には、当ヒト CD34+幹細胞移植 NOG-hIL-4 Tg マウスは使うことができないと考えられた。

#### E. 結論

本研究の目的であるエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果を調べるために有効な「ヒト化マウス」小型動物モデルの作製のため、既樹立 BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスの大型アイソレーターによる生産法を検討し、良好な繁殖成績を得ることができた。これによって、定期的な供給を行うことができた。また、同様に樹立した NOG-hIL-4 Tg マウスの系統の選別と維持生産法の検討を開始した。また、NOG-hIL-4 Tg マウスへのヒト末梢血単核球およびヒト臍帯血 CD34+幹細胞の移入実験を行い、移入ヒト細胞の生着と動態を検討した。その結果、ヒト末梢血単核球移入 NOG-hIL-4 Tg マウスでは GVHD を起こさず、ヒト細胞が生着することが観察され、HIV-1 感染実験に有効である可能性が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Ito, M., K. Kobayashi, and T. Nakahata. 2008. NOD/Shi-scid IL2rg<null> (NOG) Mice More Appropriate for Humanized Mouse Models. 53-76, T. Nomura et al. (eds), Humanized mice. Current Topics in Microbiology and Immunology 324, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. In Press.
- (2) Koyanagi, Y., Y. Tanaka, M. Ito, and N. Yamamoto. 2008. Humanized Mice for Human Retrovirus Infection. 133-148 T. Nomura et al. (eds), Humanized mice. Current Topics in

Microbiology and Immunology 324, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. In Press.

- (3) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. J Infect Dis 2008;197:134-141.
- (4) 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/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. Blood 2007;109:212-218.
- (5) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N: Humanized NOD/SCID/IL2R{gamma}null Mice Transplanted with Hematopoietic Stem Cells under non-Myeloablative Condition Show Prolonged Lifespans and Allow Detailed Analysis of HIV-1 Pathogenesis. J Virol 2007;81:13259-13264.
- (6) Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y: Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:18700-18705.
- (7) Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, Umeda K, Yoshimoto M, Ito M, Heike T, Nakahata T: Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/{gamma}cnull mice through cell fusion. Faseb J 2007;21:3499-3510.

2. 学会発表

- (1) Watanabe Y, Takahashi T, Ishii N, Ito M, Tsuchiya S and Sugamura K. Characterization of human lymphocytes in humanized NOG mice. 第 37 回日本免疫学会、2007 年 11 月 20-22 日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特になし。

表 1. BALB/cA-*Rag2<sup>null</sup>* *IL-2R $\beta$ <sup>null</sup>* (dKO) mice の大型アイソレーターでの繁殖成績

	♀親数	出産♀親数	産仔数(平均)	離乳数(%)	Tg 離乳数(%)	Tg 生産指数
1産目	17	17(100.0)	92(5.4)	81(88.0)	-	-
2産目	16	14(82.3)	68(4.9)	65(95.6)	-	-
3産目	14	14(100.0)	67(4.9)	66(98.5)	-	-
4産目	14	9(64.3)	32(3.6)		-	-
計*	47	45(95.7)	227(5.0)	212(93.4)	106(54.6)**	2.6**

\* 4産目を除いた集計。

\*\* : 離乳した12匹のうち、遺伝子解析が終了した9匹に対して算出した。

表 2 BALB/cA-dKO の供給実績 (平成 20 年 7 月~12 月)

Shipping day	Tg		Non-Tg		Total
	♂	♀	♂	♀	
2007.12.26	11	4	9	12	36
2007.11.21	9	7	6	4	26
2007.10.17	6	5	1	10	22
2007.9.19	12	10	9	7	38
2007.8.22	4	14	9	11	38
2007.7.18	10	11	10	4	35
	52	51	44	48	195

\*上記マウスは、財団法人実験動物中央研究所より主任研究者・田中教授(琉球大)に搬送された。

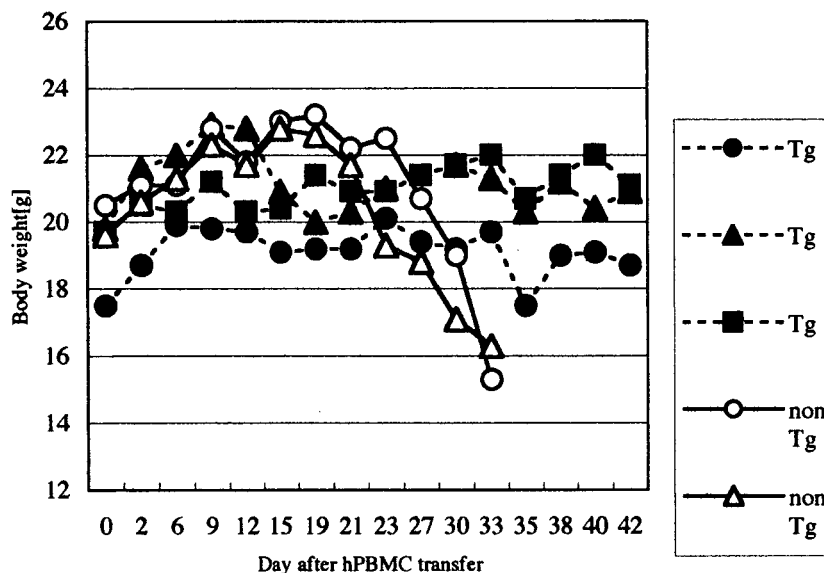


図1 ヒト末梢血単核球移入後のNOGおよびNOG-hIL-4 Tgマウスの生存性の比較

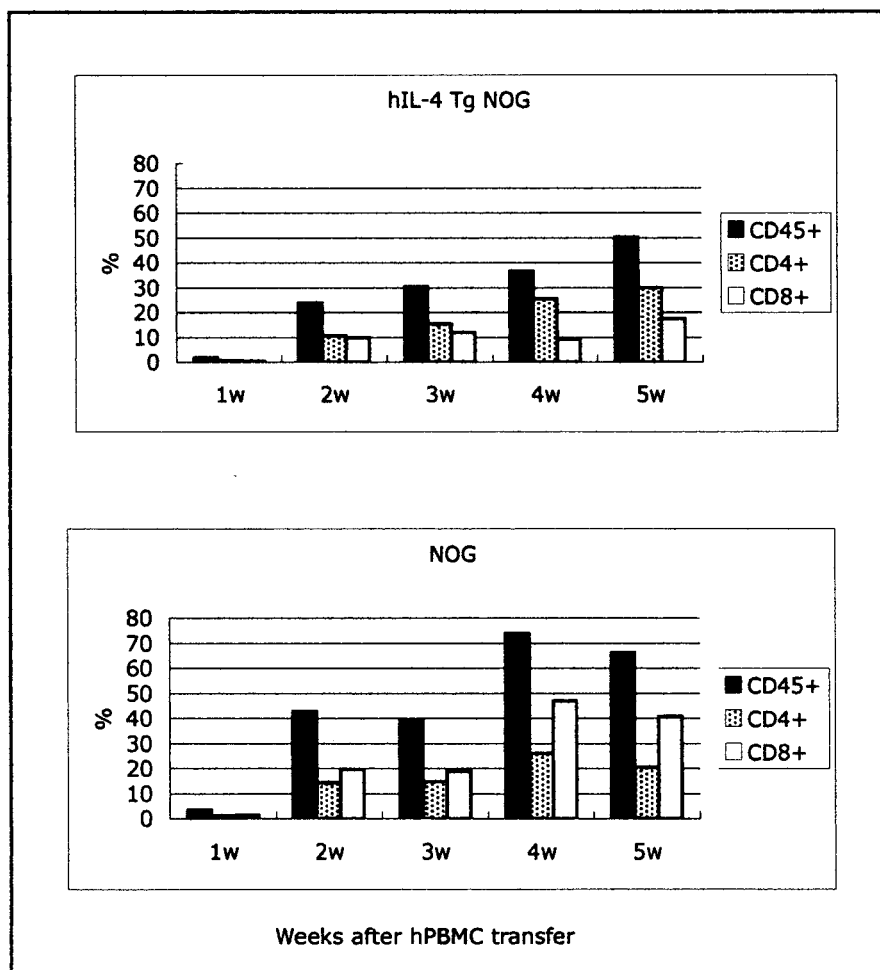


図2 ヒト末梢血単核球移入後のNOGおよびNOG-hIL-4 Tgマウスの経時的なマウス末梢血中のヒトCD45+、CD4+およびCD8+細胞の比率

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

分担研究者 大隈和 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 准教授

平成 19 年度分担研究報告書

研究要旨：ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1) X4 株感染細胞を標的とし攻撃する組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV)は、*in vitro*において、HIV-1 感染細胞数を顕著に減少させ HIV-1 感染を制御できることが知られている。そこで本研究では、HIV-1 R5 株 (R5 ウイルス) 感染細胞を標的とする新規の組換え VSV を作製し、その HIV-1 感染に対する効果を、標的ヒト免疫担当細胞を腹腔内に移植し HIV-1 が感染増殖可能なキメラマウス、いわゆるヒト化マウス感染実験モデルにおいて検討し、組換え VSV による新規抗 HIV-1/エイズ療法をヒト化マウスを用いて開発評価することを主目的とした。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、この組換えウイルスを用いて、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、組換え VSV 未接種群やヒト CD4 及び CXCR4 分子を発現する組換え VSV (コントロールウイルス) 接種群と比較したところ、明らかな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。

A. 研究目的

抗 HIV-1 療法として HAART(逆転写酵素阻害剤等の多剤併用療法)が開発され、その有効性が示されたが、現在でも世界的な HIV-1 の感染者数、エイズによる死亡者数は増加しており、我が国も予断を許さない状況にある。また HAART は薬剤の長期投与の必要性から、副作用、薬剤耐性ウイルスの出現による治療効果の減弱等の問題点が明らかになってきた。そこでこれまでの治

療薬とは作用機序の異なった新規 HIV-1/エイズ医薬品の開発が急務であり熱望されている。

HIV-1 感染/エイズに対する新規治療薬を開発する目的で、水疱性口内炎ウイルス(VSV)に基づいた、HIV-1 X4 株 (X4 ウイルス) の感染細胞を標的として破壊する組換えウイルスが、以前米国 Yale 大学 Rose 博士のグループにより開発された。VSV は遺伝子組換え操作により G 蛋白の代わりに

HIV-1 X4 株の受容体であるヒト CD4 及び CXCR4 分子を発現するように設計された。HIV-1 受容体をウイルス粒子上に発現している組換え VSV は、*in vitro* において HIV-1 感染細胞表面のエンベロープ蛋白とその受容体との結合を通して HIV-1 感染細胞に特異的に接着し、細胞内に侵入/感染後その細胞を死滅させ、その結果、増殖の場を失った HIV-1 X4 株の感染を著明に制御できることができた。我々も同じ手法で、サル免疫不全ウイルス (SIV) の感染細胞を標的として殺傷する組換え VSV (SIV 受容体であるアカゲザルの CD4, CCR5 及び DC-SIGN 分子を発現する組換え VSV) を作製し、*in vitro* において SIV 感染細胞を特異的に破壊することによって SIV の感染価を顕著に低下させることができることを示した。

我々は、Rose 博士との共同研究で、HIV-1 受容体を発現する組換え VSV を用いて HIV-1 感染細胞を選択的に攻撃破壊する新規抗 HIV-1/エイズ療法の開発について研究を進めている。これまで HIV-1 受容体を発現する組換え VSV の効果は、X4 ウイルスに対してしか示されておらず、R5 ウイルスに対する効果はいまだ不明である。また *in vivo* での評価もされておらず、臨床応用に向けたその実際の有効性はよくわかっていない。そこで、本年度我々は、R5 ウイルス感染細胞を標的とする新規組換え VSV を作製し、その組換えウイルスの R5 ウイルス感染に対する効果をヒト化マウス感染実験モデルを用いた *in vivo* アッセイ系において評価判定し、同時にそのヒト化マウスの薬剤評価系としての有用性を検討することも主目的とした。

## B. 研究方法

(1) VSV ゲノムからエンベロープ蛋白 G をコードする遺伝子を切除後、代わりに R5 ウイルス受容体であるヒト CD4 及び CCR5 分子をコードする遺伝子を同一部位に挿入し、そのゲノムから R5 ウイルス受容体を発現する G 蛋白欠損組換え VSV (VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5) をコードするコンストラクトを作製した (Rose 博士より共同研究にて供与)。

(2) そのコンストラクトを、バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼを組換えワクシニアウイルス感染によって発現した BHK-21 細胞にトランスフェクションすることにより、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 を産生した。コントロールウイルスとして、HIV-1 ウイルス受容体を発現しない G 蛋白欠損組換え VSV (VSV  $\Delta$ G) 及び X4 ウイルス受容体を発現する G 蛋白欠損組換え VSV (VSV  $\Delta$ G-CD4/CXCR4) も準備し、実験に応じて VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 と並べて用いた。

(3) VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の感染特異性を *in vitro* において検討した。具体的には、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 或いは VSV  $\Delta$ G を、X4 ウイルス (HIV-1<sub>HXB2</sub>) 又は R5 ウイルス (HIV-1<sub>SF162</sub>) のエンベロープ蛋白を発現する又は未発現の 293T 細胞に接種し、その後細胞内を蛍光免疫染色することによって VSV 感染細胞を検出し、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 が R5 ウイルスのエンベロープ蛋白を発現する細胞に特異的に感染するかどうか調べた。またその感染性が CD4 分子に対する中和抗体や 2 種のアンタゴニスト投与によって阻害されるか検討し、CD4/CCR5 分子を介した感染かどうかも確認した。

(4) 次に VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の R5 ウイルス感染に対する効果を *in vivo* において調べた。そのために、Day 0 に高度免疫不全マウス (BALB/cA-Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma_c$ <sup>-/-</sup>) の腹腔内に健常者の末梢血から分離された単核球を約 1000 万個/匹移植し、ヒト化マウスを構築した

(1 実験あたり 1 グループ 3-4 匹のマウスを使用した)。そのヒト化マウスに Day 1 に HIV-1<sub>JR-CSF</sub> を約 2,000 IU/匹腹腔内接種し、感染モデルを作製した。Day 4 には Mock 或いは G 蛋白を一過性に補われた組換え VSV (VSV  $\Delta$ G, VSV  $\Delta$ G-CD4/CXCR4 或いは VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5) をヒト化マウス感染モデルの腹腔内に約 10<sup>6</sup> pfu/匹接種した。

(別の実験においては組換え VSV を濃縮し約 4 X 10<sup>6</sup> pfu/匹接種した。) Day 8 に各々のマウスから血清や腹腔洗浄液を採取した。腹腔洗浄液からは浮遊細胞分画を回収し、細胞数をカウントした後、その一部を使って細胞上のヒト CD4 及び CD8 分子の発現をフローサイトメトリー (FCM) で解析し、CD4 陽性 T 細胞数の減少 (HIV-1 の病原性) に対する VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の効果を検討した。残りの細胞は、IL-2 添加培地で培養を開始した。また HIV-1 の産生 (感染増殖複製能) に対する VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の効果を調べるために、血清、腹腔洗浄液、細胞培養後の培養上清 (経時的に採取) 中の HIV-1 Gag p24 濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定し、コントロール組換えウイルス接種群と比較検討した。

(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で審査、承認されており、全て P3 実験施設内で行われている。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、承諾を得ている。

### C. 研究結果

(1) R5 ウイルス受容体を発現する VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の R5 ウイルスのエンベロープ蛋白を発現する細胞への特異的な感染:

293T 細胞に HIV-1<sub>HXB2</sub> 或いは HIV-1<sub>SF162</sub> のエンベロープ蛋白をトランスフェクションにより発現させ、或いは発現させずに、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 或いは VSV  $\Delta$ G (コントロール) を接種したところ、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 は HIV-1<sub>SF162</sub> エンベロープ蛋白発現細胞にのみ感染し、細胞特異性を示した。VSV  $\Delta$ G はどの細胞にも感染しなかった。またその感染は CD4 分子に対する中和抗体や CCR5 アンタゴニスト投与により効率良くブロックされたため、その感染は CD4 及び CCR5 分子を介した感染であることが確認された。CXCR4 アンタゴニスト投与ではその感染は抑制されなかった。またコントロールとして接種した G 蛋白を一過性に補われた VSV  $\Delta$ G は、それらの抗体やアンタゴニストでは効果的に阻害されなかった。

(2) R5 ウイルスを感染させたヒト化マウスモデルにおける VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の CD4 陽性 T 細胞数への効果:

HIV-1<sub>JR-CSF</sub> を感染させたヒト化マウスに G 蛋白を一過性に補った VSV  $\Delta$ G (コントロール) 或いは VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 を接種し、回

収したヒト細胞における CD4 陽性 T 細胞数及び CD8 陽性 T 細胞数に対する組換えウイルスの効果をも FCM で検討した。VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 接種群では、VSV  $\Delta$ G 接種群と比較して、CD4 陽性 T 細胞数減少の明らかな改善傾向が見られた。また CD8 陽性 T 細胞数の増加傾向も認められた。さらに同じ実験系を用いた別の実験において、Mock 或いは約 4 倍に濃縮した G 蛋白を一過性に補った VSV  $\Delta$ G-CD4/CXCR4 (コントロール), VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 を接種したところ、どの接種群においてもその半数のマウスにおいて CD4 陽性 T 細胞数は保持されていた。また VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 接種による CD8 陽性 T 細胞数の増加も再度認められた。

(3) R5 ウイルスを感染させたヒト化マウスモデルにおける VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の HIV-1 感染抑制効果：

HIV-1<sub>JR-CSF</sub> を感染させたヒト化マウスに Mock, G 蛋白を一過性に補った VSV  $\Delta$ G, VSV  $\Delta$ G-CD4/CXCR4 (全てコントロール) 或いは VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 を接種し、採取したマウス血清及び腹腔内洗浄液中の p24 を ELISA で定量したところ、p24 濃度は低く、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 接種による明らかな効果は認められなかった。しかし回収した細胞の培養後経時的に採取した培養上清で調べた p24 産生においては、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 接種マウス群の約半数に抑制傾向を認めた。この結果から、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 の効果がまだ不十分であると考えられたため、この組換えウイルス並びに VSV  $\Delta$ G-CD4/CXCR4 を約 4 倍に濃縮し、Mock と平行して HIV-1<sub>JR-CSF</sub> 感染ヒト化マウスに接種した。上記と同様に培養上清中の p24 産生を検討したと

ころ、Mock 及び VSV  $\Delta$ G-CD4/CXCR4 接種マウス群と比較して VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 接種マウス群において顕著な抑制効果を認めた。

#### D. 考察

本研究課題において、HIV-1 R5 株受容体であるヒト CD4 及び CCR5 分子を発現する組換えウイルス VSV (VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5) は、*in vitro* 実験系において R5 ウイルスのエンベロープ蛋白を発現する細胞を標的化し、ヒト化マウス感染モデルを用いた *in vivo* 実験系においては R5 ウイルスの病原性や感染増殖性に対し一定の効果を示した。このことは、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 が臨床応用に向けた新規 HIV-1/エイズ医薬品候補として有望であることを示唆している。その効果は、組換えウイルスを濃縮し、より多くの組換えウイルスを接種したことにより増強されたことから、接種した組換えウイルス量に依存的であると考えられる。もちろん、接種する組換えウイルス量が多ければ多い程、HIV-1 感染細胞を攻撃する機会が増えると考えられるため、より多くの組換えウイルスを接種した方がより大きな効果が期待されるが、実際の臨床応用に向けてはどの程度までの接種量が少なくとも必要なかを今後検討していく必要がある。また少ないウイルス接種量でも十分効果が発揮できるような新規宿主因子を追加発現する組換え VSV の開発も考慮する必要がある。さらに HIV-1 受容体であるヒト CD4 及び CXCR4/CCR5 分子が単量体であるため VSV 粒子上に取込まれたそれらの分子の発現量は比較的少なく、VSV G 蛋白を外部から補わなければ、HIV-1 受容体を発現する組換え



VSV は高い感染価を得られない。そこで、G 蛋白の補給無しでも高い感染価が得られるように、HIV-1 受容体分子群がより効率良く粒子上に取込まれるような新規組換え VSV の作製法や遺伝子操作技術を開発していくことも必要である。

また VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 を接種したヒト化マウス感染実験モデルにおいて、コントロール組換えウイルス接種に比べ、ヒト CD8 陽性 T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞ばかりでなく) の増殖誘導が認められたが、現在のところその機序は不明である。マウスに移植したヒト末梢血単核球細胞群に混入している抗原提示細胞が VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 (VSV  $\Delta$ G では顕著ではない) によって惹起され、CD8 陽性 T 細胞への増加に向かわせている可能性がある。増加した CD8 陽性 T 細胞が VSV 特異的な細胞傷害性 T 細胞であれば、VSV/HIV-1 重感染細胞を選択的に攻撃し、VSV  $\Delta$ G-CD4/CCR5 による直接的な HIV-1 感染細胞殺傷効果を付加的に (間接的に) 向上させていることが期待される。

さらに組換えウイルス VSV のような新規医薬品候補の HIV-1 感染に対する効果を、前臨床試験として感染実験動物モデルで評価することが非常に重要であることは、周知のとおりである。本研究において用いられたヒト化マウス感染モデルは、組換え VSV の治療効果を明確に評価判定することができた。このことは、ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染実験モデルが、新規薬剤評価系として非常に優れていることを示唆している。今回は、ヒト化マウス構築のために用いられたドナーの末梢血単核球が移植後早期に GVHD を引き起こしたため、HIV-1

の急性感染に対する組換え VSV の効果しか検討できなかった。今後はさらなる実験方法の最適化やドナー細胞を選ばない高度免疫不全マウス等の新規作製によりヒト化マウスを用いた新規薬剤評価系の確立を推進し、HIV-1 慢性 (持続) 感染に対する組換え VSV の効果もヒト化マウスを用いて検討してゆく必要がある。

## E. 結論

本研究課題において、HIV-1 R5 株の受容体即ちヒト CD4 及び CCR5 分子を発現する (R5 ウイルス感染細胞を標的とする) 新規組換えウイルス VSV は、ヒト化マウス感染モデルにおいて R5 ウイルスの病原性や感染増殖性に対し効果を示し、本組換えウイルスが臨床応用に向けた新規 HIV-1/エイズ医薬品候補として有望であることが分かった。またヒト化マウスを用いた HIV-1 感染実験小動物モデルは、組換え VSV の HIV-1 急性感染に対する治療効果を鋭敏に評価判定することができ、このマウスモデルシステムが、組換え VSV のような新規治療薬候補の評価系として非常に有用であることも分かった。今後は、HIV-1 感染に対してさらに効果的な組換え VSV の作製や新規ヒト化マウスモデルの開発さらに実験方法の最適化等により、HIV-1 急性/慢性感染に対する新規医薬品候補のヒト化マウス評価系の確立を目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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):  
134-141, 2008.

Kondo K., Okuma K., Tanaka R., Zhang  
L.F., Kodama A., Takahashi Y., Yamamoto  
N., Ansari A.A. and Tanaka Y.  
Requirements for the functional  
expression of OX40 ligand on human  
activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Hum.  
Immunol., 68(7): 563-571, 2007.

## 2. 学会発表

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. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会プロ  
グラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌.  
143.

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 (173).

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<sup>+</sup>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 (174).

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 (215).

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 (283).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当事項無し。

### 2. 実用新案登録

該当事項無し。

### 3. その他

該当事項無し。

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

-重複感染患者に対するよりよい HAART 薬剤選択を目指して-

分担研究者 藤田次郎 琉球大学大学院医学研究科内科学分野

平成 19 年度分担研究報告書

研究要旨：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。また、HIV 未治療日本人からの HIV 野生株の分離を試みた。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus (HIV) 感染者の予後が、highly active anti-retroviral therapy (HAART) 療法により改善し、HIV、Hepatitis C virus (HCV) 重複感染が多い欧米において、死亡原因として HCV 感染による肝疾患が増加している。重複感染者の肝炎は HCV 単独感染者と比較し重症化しやすく、肝硬変への移行が速いため予後不良である。Protease inhibitor (PI) 剤を含む HAART 療法と含まない HAART 療法では、前者で肝組織内 HCV-RNA 量が有意に低下したとの報告がある。今回 HCV-replicon system を用い、HCV の複製に対する HIV-PI 剤の作用について検討した。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

HCV 非構造蛋白遺伝子上流に luciferase 遺伝子を挿入した replicon が持続複製する HCV-replicon 細胞を用い、maximum plasma

concentration (C<sub>max</sub>) を上限とした HIV-PI 剤希釈液を作製、負荷 24 時間後の luciferase 活性を測定することにより HCV-replicon 複製の評価を行った。また PI 剤による細胞障害性を細胞より遊離する lactate dehydrogenase (LDH) を用い評価した。

PI 剤原末は入手困難であるため、市販薬（Atazanavir (ATV)、Fosamprenavir (FPV)、Indinavir (IDV)、Nelfinavir (NFV)、Ritonavir (RTV)、Saquinavir (SQV)) を無菌的に扱い、実験に使用した。

（倫理面への配慮）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

細胞障害性を認めない濃度で、HCV-replicon 複製に対し、NFV、RTV、SQV は抑制的に、AZT は促進的に作用した。IDV、

FPV は影響を及ぼさなかった。上記結果より、NFV の原末を入手、経時的作用及び IFN との相互作用について検討した。

NFV、IFN を HCV-replicon に投与し、72 時間後の luciferase 活性値から、50% inhibitory concentration (IC50) を算出した。NFV (原末) は HCV-Replicon 複製に対して濃度依存性に抑制効果を示した (IC50 = 9.88mM)。IC50 の濃度において LDH 試験、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) 法、TUNNEL 染色法にて細胞傷害性、細胞アポトーシスの誘導を認めなかった。IFN は濃度依存性に HCV-Replicon 細胞の複製抑制効果を示した (IC50 = 0.0991U/ml)。NFV と IFN に関して classical isobologram を用い、その相乗効果の有無を調べたところ、相乗指数 (The combination index) は 0.9 以下となり、相乗効果を認めた。

#### D. 考察

HCV、HIV 重複感染者に対する HAART 療法の PI 剤として NFV を選択することにより、IFN の効果を上げる可能性が示唆された。NFV の HCV に対する作用点を明らかにすることにより、細胞内における新たな HCV 複製制御機序の発見につながるものと考えられた。

#### E. 結論

HIV-PI 剤は HCV 増殖に対して抑制的に作用し、IFN との相乗効果を認めた。

#### F. 健康危険情報 特記事項なし

#### G. 研究発表

(1) 学会発表：當間 智，山城 剛，健山正男，藤田次郎：C 型肝炎ウイルス増殖に関する HIV Protease Inhibitor の作用。第 49 回日本消化器病学会総会・日本消化器病学会雑誌臨時増刊号，2007. 10. A684：神戸. 104.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。) なし