

200808017A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 勇悦

琉球大学大学院医学研究科

平成21(2009)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：ヒト化マウスの HIV 感染抑制研究応用への最適化に向けて：
ヒト化マウスにおける Treg の 2 面性

(2) 小柳義夫：ヒト化マウス内エフェクターメモリー細胞における HIV-1 産生

(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：a) 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

b) AIDS 関連播種性 *Mycobacterium avium* 感染症の免疫学的機序の解明

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

研究代表者 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20年度研究総括報告書

研究要旨：昨年度に引き続き、ヒト免疫担当細胞を移植・生着させた免疫不全マウスである“ヒト化マウス”をHIV-1 個体感染実験モデルとして、我が国のエイズワクチンや予防治療薬候補の効果の評価系として開発・普及させることを目的に本研究を行なった。2年目平成20年度の本研究では、ヒト化マウス評価・実験系の応用範囲の拡張の可能性の検討と、新規マウスの作製と評価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そのワクチン増強効果、(2) 制御性T細胞の人為的コントロールのHIV-1 感染への影響、(3) ヒト造血幹細胞移植マウスの新たな応用展開、(4) ヒト化マウス体内でのHIV 産生細胞の同定、(5) 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、(6) ヒトIL-4を分泌する高度免疫不全マウス作出とそのHIV-1 感染実験への応用、(7) 未治療HIV-1 感染者からの野生HIV-1 株の分離とHCV 重感染対策への治療法の新たな試みなど、オリジナリティのある内容の研究を行った。

A. 研究目的

現在のエイズ治療薬は、HIV-1 の増殖サイクルを標的としてウイルスの増殖を抑制することによりエイズ発症を抑制する。しかし、HIV-1 の遺伝子変異により耐性ウイルスが出現することや薬の副作用等の問題がある。そこで新たな作用機序に基づく新規の薬剤、ワクチンや免疫療法の開発が切望されている。しかし、その進捗は満足のものではない。その原因の一つとして最適で安価な研究動物モデルがないことが挙げられる。そこで、本研究では個体レベルで新規エイズ薬やワクチンおよび免疫療法を評価できる小型動物モデルを開発し、その評価系の最適化と普及化を図ることにより、我が国のエイズ戦略に寄与することを最終目的とする。具体的にはヒトの血液細胞を移植する“2種類のヒト化マウス”をさらに使いやすく改良するとともに、実験範囲の拡張とHIV-1 感染実験をスムーズにするプロトコルを開発し、国内外に提供したいと考えている。

これまで本研究班では、日本が独自に開発した高度免疫不全マウスNOGを用いて、(1) 成人末梢血単核球、または(2) 臍帯血造血幹細胞を移植することにより作製する2種類のヒト化マウスを作出し、HIV-1 感染実験に成功している。これらの系は、使い分けることにより、HIV-1 感染に対する薬剤効果の判定とワクチン評価やHIVの慢性感染に対する薬品の治療効果を評価することが可能である。

本年度では、昨年度の成果の基盤に立ち、当初の計画の通り、ヒト化マウスならびに的確な実験方法論のさらなる改良を継続し、国

内外への普及を目的とした供給システムの確立に向けた研究を行った。

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、分担者ごとの報告をご覧ください。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

使用動物は以下の4系統の免疫不全マウスである。

- (1) BALB/cA-Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウス (BRG マウスと略)
- (2) NOG マウス
- (3) BRG マウスにヒトIL-4 遺伝子を導入したマウス (IL-4 BRG)
- (4) NOG マウスヒトIL-4 遺伝子を導入したマウス (IL-4 NOG)

移植したヒト細胞は、健康人の末梢血単核球(PBMC)および樹状細胞(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-ヒト化マウスでは、ヒトの樹状細胞をマウスの脾臓に移植することで免疫応答を誘導した。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、新生児NOG マウスの肝臓内接種、もう一つは成獣の静脈内接種である。

感染に用いたHIV-1 はクローン化されたHIV-1 であり、CCR5 指向性JR-CSF やJR-FL およびCXCR4 指向性NL4-3 やIIIB株を用いた。組み換えVSV は、HIV-1 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-1 の増殖は、遺伝子増幅法とp24 ELISA 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) 田中らの研究は、ヒト末梢血単核球(hu-PBL)を移植することにより作製するhu-PBLマウスを使用して、HIV-1の抑制薬やDCを使った免疫誘導でワクチンの評価を可能とするモデル作出を目標としている。今回、4系統の免疫不全マウス(BRGマウス、IL-4 BRGマウス、NOGマウス、IL-4 NOGマウス)において、HIV-1の増殖性の比較、および免疫誘導を抑制するヒト由来制御性T細胞(Treg)の存在の有無、および*in vitro*においてTregのHIV感染における関与について研究を行った。hu-PBLを移植し、R5HIV-1JR-FL株を腹腔に接種し、1週間後にマウス体内から得られた細胞の解析を行った。hu-PBL-BRGとhu-PBL-IL-4 BRGマウスおよびhu-PBL-IL-4 NOGマウスでは、R5 HIV-1JR-FLの感染が高頻度(3匹中3匹)で観察されたが、hu-PBL-NOGマウスでは3匹中1匹のみに感染が認められた。NOGマウスでのヒト細胞の生着性が低かった理由は明らかではない。どのhu-PBLマウスでも、CD4+CD25+FoxP3+のTreg様の表現系を示す細胞が存在し、その割合はヒトCD4陽性細胞中1~4%であった。Tregは、有意なT細胞増殖抑制活性を示した。PBMCとTregを抗CD25単クローン抗体とanti-mouse IgG-beadsでTregを除去したCD25(-)PBMCとを並べてOKT-3で3日間刺激培養してHIV-1を感染させた場合、CCR5指向性HIV-1とCXCR4指向性HIV-1の感染増殖を培養上清中のp24産生と比較すると、CD25(-)PBMCではPBMCの場合の約半分に減少した。

(2) 小柳らの研究は、ヒトCD34陽性血液幹細胞移植を新生児NOGマウスの肝臓に移植して得られるヒト化マウスを使用して、HIV-1の増殖性や抑制薬の評価に用いている。このマウスは、ヒトT細胞ならびにB細胞、そしてマクロファージなどの血液細胞造血能を有するので、個体内におけるR5 HIV-1感染細胞の解析実験を行った。その結果、個体内におけるp24陽性、すなわち、HIV-1産生細胞は、脾臓ならびにリンパ節できわめて多く見られ、それらの細胞のほとんどは、CD3陽性CD4陰性CD45陽性CCR7陰性T細胞であった。すなわち、生体内におけるR5ウイルス産生細胞はエフェクターメモリー細胞であること、ま

た、CD4分子は細胞表面から強力にダウンレギュレーションされることが示唆された。さらに、これらの細胞の細胞周期解析の結果、Ki67陽性CD69陽性の分裂細胞が多かった。しかしながら、予想されたG2/M期のものは比較的すくなかった。一方、明らかに、Ki67陰性の2倍体のp24陽性細胞もあり、生体内におけるウイルス産生細胞は分裂期と休止期の両者のT細胞であることがわかった。

(3) 山本らの研究は、ヒト臍帯血由来造血幹細胞をNOGマウスの尾静脈から移植し、300日以上安定して生存するヒト化マウスを作成している。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を人為的に感染させることにより、リンパ腫発症モデルを作製した。具体的には、HIV-1感染マウスにEBVを重感染させ、日和見リンパ腫モデルの作製を試みたところ、HIV-1感染マウスでは非感染マウスに比べてリンパ腫の発症が遅れることが判明した。この重感染マウスモデルは、エイズに伴うEBV関連リンパ腫発症のメカニズムについて新たな知見をもたらす可能性がある。

(4) 大隈らの研究は、新規治療法の開発であり、hu-PBLヒト化マウスを用いてHIV-1感染細胞を標的とする新規組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV)を作ること、およびそのHIV-1感染に対する治療効果の評価系を確立することを目的に研究を進めている。本年度は、組換えVSVの感染効率を向上させるために活性化T細胞接着分子であるOX40に注目し、そのリガンド(OX40L)をコードする遺伝子をVSVゲノムに挿入し、HIV-1 R5株受容体に加えてOX40L分子をウイルス粒子上に発現する組換えVSVを作製した。この組換えウイルスの感染性が向上し、その治療効果が増強されたか*in vitro*感染実験系において検討したところ、その組換えVSVはR5ウイルス感染に対して一定の効果を示した。

(5) 伊藤らの研究は、マウスの改良であり、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を示す「ヒト化マウス」を作成するための基盤となる重度免疫不全マウスの作出と繁殖および供給に関する研究である。重度免疫不全マウスとして、BRGおよびNOG、ならびにこれらのマウスでヒト型IL-4を産生するマウスの2系統マウスの計画的生産を行い、HIV-1感染実験に供するための供給を

行った。これに加え、新たなモデルマウスとして、NOG-hIL-2 および hIL-15 Tg マウスの作製を開始した。また、ヒト末梢血単核球 (PBMC) 移入後に起こる対移植片病 (GVHD) の発症について、NOG、BRG および NOD-*scid* マウス間で比較、検討した。

(6) 藤田らの研究は、沖縄県のエイズ拠点病院の担当部署として未治療 AIDS 患者から野生型 HIV-1 を分離するための患者検体を採取し、田中らとの共同で種々の日本の HIV-1 株を分離することと、HIV と HCV の重複感染の治療法の開発に関する研究である。本年度は、新たに未治療の HIV-1 感染者 5 名の血液を得た。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。

HCV の研究では、HCV-replicon 細胞を用い、HIV-1 治療薬である NFV の抗 HCV 活性、細胞傷害性、細胞アポトーシスの誘導作用について評価を行った。NFV は、IFN α の存在下で、濃度依存的に HCV-replicon の増殖を抑制するが (IC50 = 9.88 μ M)、IC50 の濃度において細胞傷害性、細胞アポトーシスの誘導を認めなかった。IFN α も濃度依存的に HCV-Replicon 細胞の複製抑制効果を示した (IC50 = 0.0991 U/ml)。NFV と IFN の HCV-replicon に対する相乗指数 (The combination index) は 0.9 以下とであり、相乗効果を認めた。

D. 考察

平成 20 年度は本研究班の 2 年目の研究年である。到達目標は、昨年に引き続きヒト化マウスの HIV 研究へ適用と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。その応用範囲についてさらに検討を行った。また、免疫不全マウスの新たな作出も行っている。

ヒト末梢血単核球 (hu-PBL) を移植した 4 系統の免疫不全マウスの中で、細胞の生着性は NOG が最も低く 1/3 であり、他は 3/3 であった。この NOG マウスでの細胞生着性の低比率は予想外であった。理由ははっきりしないが、実際に使ったのは、IL-4 遺伝子導入マウスの繁殖において IL-4 陰性の NOG マウスであるが、native な NOG マウスとどこかに違いがあるのかもしれない。あるいは、飼育中の環境に原因があるのかもしれない。IL-4 発現マウスでは R5 HIV-1 の感染増殖性が抑制されることが危惧されたが、今回の移植条件では、そのよ

うな IL-4 の有無による R5 HIV-1 の感染抑制は見られなかった。IL-4 マウスでは、CXCR4 指向性 HIV-1 の感染が助長されるので、このマウスを使った hu-PBL ヒト化マウスは、CCR5 指向性 HIV-1 の両方の重感染モデルとなり得る可能性が期待できる。

今回調べた 4 系統の hu-PBL マウス系統では、どの系統のマウスからも表現系のおよび機能的に Treg と推定される細胞群が同定された。このような細胞が、実際にマウス体内でどのような機能を果たしているのかは今後の解析が必要であるが、ヒト T 細胞のマウスに対する強い GVHD の抑制に関与し、長期の T 細胞の生存に何らかの役目を果たすことが考えられる。Treg 細胞群を 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観察した。今後、我々の系での Treg の除去と HIV-1 感染の関連について明らかにする必要がある。

NOG-hCD34 マウスにおいては HIV-1 感染マウスの脾臓ではきわめて多くの HIV-1 陽性細胞を見出した。そして、この HIV-1 産生細胞の多くは、CD3 陽性 CD4 陰性であること、そして、Ki67 ならびに CD69 陽性の活性化細胞が多いこと、また、細胞周期解析から G1b 細胞が有意に多いことがわかった。この結果は、HIV の Vpr 蛋白質は G2M 期停止を誘導することがよく知られていることと矛盾があり、今後の検討が必要である。さらに、p24、Ki67、Hoechst 33342 の 3 重染色の結果、Go/G1a の休止期の細胞からもウイルスが産生されることも明らかになった。これらの結果は、HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスを用いて、活性化 T 細胞とともに休止期 T 細胞からウイルスは産生されることがわかった。これらの細胞内環境が異なる細胞の寿命ならびに抗ウイルス薬に対する感受性には、当然差異があることが予想され、生体内におけるウイルス感染様式の多様性がこのマウス内では再現され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。我々は HIV-1 感染と並行してエイズ関連癌ウイルスである EBV をヒト化マウスに感染させ、リンパ腫発症モデルを作製することに成功した。この感染マウスでは、CD8 陽性 T 細胞の顕著な増加が起こり、EBV に対する強い免疫応答が誘導されることが明らかとなった。そこで、本研究では HIV-1 と EBV 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」の作製を試み

たが、結果は予想外であった。つまり、HIV-1 感染マウスでは EBV 投与後の病態進行が遅れることが判明した。現在のところその要因は明らかではないが、HIV-1 感染マウスでは CD4 陽性 T 細胞が減少するため、EBV 感染細胞の増殖とその後のリンパ腫形成に CD4 陽性 T 細胞が促進的に働いている可能性が考えられる。また、HIV-1 感染マウスにおいて、非感染マウスと同様に EBV コピー数の増加に伴って CD8 陽性 T 細胞が顕著に増加するのがみられた。このことから、EBV 感染によって誘導される CD8 陽性 T 細胞の免疫反応は、CD4 陽性 T 細胞のヘルプを必要としないものであると考えられる。今後、抗ヒト CD4 抗体を投与し、CD4 陽性細胞を除去したヒト化マウスを用いて EBV 感染実験を行う予定である。EBV 感染における CD4 陽性 T 細胞の機能と役割が明らかになれば、エイズに伴う EBV 関連リンパ腫発症のメカニズムの解明と治療法開発に重要な知見をもたらすものと考えられる。

VSV の G 蛋白の代わりに HIV-1 受容体を発現する組換え VSV が、新規 HIV-1/エイズ医薬品候補として将来治療面で有望であることが期待されるが、解決すべき問題点が残っている。つまり、組換え VSV の低感染性である。そこで、その点を克服する目的で、VSV ΔG-CC5 のエンベロープに OX40L (細胞接着分子としても機能) を添加した。しかし今回の活性化 PBMCs を用いた *in vitro* における HIV-1 感染実験系では、OX40L (gp34) 分子の追加発現により VSV ΔG-CC5 の効果を増強する結果は得られなかった。これは、感染実験スケジュールの最初に 1 回のみ刺激した PBMC 上では一旦誘導された OX40 分子の発現が、組換え VSV を接種した時期 (PBMC 刺激後約 1 週間) には低下し、そのため組換え VSV 粒子上に発現した OX40L 分子が OX40 分子を介してその機能を発揮できなかった可能性が考えられる。そこで今後は、活性化 PBMC を感染実験中に再刺激することで OX40 分子の発現を再誘導する、OX40 分子を持続的に高発現している細胞株を使用する等により、OX40L 分子の追加発現による組換え VSV の効果増強の可否を検討する必要があると考える。

新たな、免疫不全マウスの作製も同時に進行している。以前より、BRG マウスよりも NOG マウスの方がヒト細胞の生着率が高いことが分かっている。一方で、その生着性が高いことが、逆に GVHD を発症しやすくなるという難点もある。しかし、この性状を利用すれば、様々な利点も考えられる。

継続的な感染実験のための多数動物の安定供給のためには、生産の効率化を図る必要があ

るが、現状の hIL-4 Tg マウスの生産は、ヘテロ型マウスと野生型との交配によって行っている。このことは、得られた動物の半数が Tg マウスであり、また遺伝子導入の有無を DNA 検査によって調べなければならず、経済的にも負担がかかる。そこでより効率的な繁殖システムを作製するために、今回 Tg ホモ型マウスを数ペア作り、現在そのホモ型マウス間の交配によって、生産が可能か否かを検討している。

新しいヒト遺伝子導入免疫不全マウスとして、hIL-2 と hIL-15 Tg マウスの作製に取りかかっている。その前実験として、作製した hIL-2 導入遺伝子系 (NOG x NOD) F1 前核期胚に顕微注射して作製した Tg マウスでは、得られた 25 匹の産子の DNA 検査では Tg マウスは得られなかった。hIL-2 が導入され、発現することで動物が早期に死亡する可能性が考えられた。

HIV-1 感染者の予後が、HAART 療法により改善し、HIV-1、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。今回 HCV-replicon system を用い、HCV の複製に対する NFV と Interferon (IFN) との相乗的な抑制効果を証明した。今後、ヒト化マウスにおいて、HIV-1 と HCV 重複感染モデルの作出によりこの治療法の評価ができればと期待される。

最後に、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が、これらのウイルスは多剤薬剤耐性の HIV-1 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。

E. 結論

世界でも最高レベルの免疫不全マウス体内にヒト PBMC あるいは CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウスを用いた HIV-1 感染モデル動物の作製法と応用法の改善、同時に普及化と鋭敏化に挑戦した。これらのマウスを用途別に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。来年度は、動物とプロトコルの改良、モデル全体の簡素化を図り、実用性の高い研究へと飛躍したい。

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

ヒト化マウスの HIV感染抑制研究応用への最適化に向けて：ヒト化マウスにおけるTregの2面性

研究代表者 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20年度研究代表報告書

研究要旨 ヒト末梢血単核球(hu-PBL-)を移植した4系統の免疫不全マウス[BALB/cA-Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウス(BRGマウスと略)、human IL-4発現RAGマウス、NOGマウス、human IL-4発現NOGマウス]において、HIVの増殖性と免疫誘導を抑制するヒト由来制御性T細胞(Treg)の存在の有無、およびin vitroにおいて自然TregのHIV感染における関与について研究を行った。0.5 x 10⁷個のhu-PBLを移植し、1日目にR5HIV-1のJR-FL株を腹腔に接種し、1週間後にマウス体内から得られた細胞の解析を行った。hu-PBL-RAGとhu-PBL-IL-4 RAGマウスおよびhu-PBL-IL-4 NOGマウスでは、R5 HIV-1JR-FLの感染が高頻度(3匹中3匹)で観察されたが、hu-PBL-NOGマウスでは3匹中1匹のみに感染が認められた。どのhu-PBLマウスでも、CD4+CD25+FoxP3+のTreg様の表現系を示す細胞が存在し、その割合はヒトCD4陽性細胞中1~4%であった。Tregの活性をOKT-3刺激CD25枯渴PBMC(CFSE標識法)の増殖抑制で検討したところ、有意な抑制活性を示した。PBMCとTregを抗CD25単クローン抗体とanti-mouse IgG-beadsでTregを除去したCD25(-)PBMCとを並べてOKT-3で3日間刺激培養してHIV-1を感染させた場合、CCR5指向性HIV-1とCXCR4指向性HIV-1の感染増殖を培養上清中のp24産生で比較すると、CD25(-)PBMCではPBMCの場合の約半分に減少した。以上の観察から、Tregが免疫応答の抑制のみならずHIV-1増殖の制御に関与することが分かり、今後の本研究の目的であるヒト化マウスの系のさらなる改良へ向けた糸口が見いだされた。

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ヒト化マウス、いわゆるhu-PBLマウスは、HIV-1感染の小型感染実験動物モデルとして極めて有用である。これまでこのマウスを用いて作製したヒト化マウスで樹状細胞免疫(DC-based immunization)によりHIV特異的ヘルパーT細胞免疫応答の誘導法を確立してきた。患者において、樹状細胞免疫が免疫応答を高め、その結果としてHIV感染防御やHIV量の軽減化につながる事が2003年に報告されている。我々のマウスでは、自家DCを使ってHIV抗原に対するヒト型の免疫応答を誘導できることから、この系が実際のHIV-1感染実験によりHIVワクチンの評価に応用できることが期待される。この系をHIV-1の薬剤やワクチンの評価系として、現在のものよりさらに簡素化および鋭敏化することが本研究の大きな目標である。

我々は、免疫応答を誘導する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RAGを用いている。NOGマウスはRAGマウスと比較してより免疫不全性が高く、移植細胞の生着性が高いが、ヒト末梢血単核球を移植した場合、GVHDで死亡する頻度が高い。そこでBRGマウスではGVHDに対してNOGマウスより耐性であることから免疫応答の誘導にはより適性系統である。これらのマウスにヒトIL-4を発現させた新規のマウスもす

に作製され、IL-4 BRGマウスは、CXCR4指向性HIV-1に対し高い感染感受性を持つことを証明してきた。これら4系統のマウスにPBMCを移植し、CCR5指向性HIV-1の感染増殖を比較した研究の報告はいまだない。

最近、制御性T細胞(Treg)がHIV-1感染に感受性であり、かつ病態と深く関連することが報告されている。特にヒト造血幹細胞を移植した免疫不全マウスではTregが産生的感染において中心になるということが言われている。また、免疫応答においてもTregが過度の活性化を沈静化するために必要であることが示唆されている。そこで、本年度は、4系統のhu-PBLマウスにおいて、HIVの増殖性と免疫誘導を抑制するヒト由来Tregの存在の有無を比較検討した。さらに、in vitroにおいてTregがHIV感染増殖に関与するかどうかについて研究を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

(1)ヒト化マウス：実中研から供与された4系統のマウス(RAGマウス、human IL-4発現RAGマウス、NOGマウス、human IL-4発現NOGマウス)の腹腔内に1mlのRPMI 1640培地に浮遊させた5 x 10⁵個のPBMCを接種した。1日後、2000UのHIV-1 JR-CSFをi.p.感染させた。1週間後、血液ならびに脾臓と腹腔内洗浄液から浮遊細胞を回収し、HIVの感染状態を解析した。また、HIV-1を感染させない3匹のマウスからのヒト細胞をプールし、Tregの染色とTreg活性を比較検

討した。

(2) 回収した細胞の表現系は、anti-CD4、CD8、anti-HLA、anti-CD25、anti-FoxP3 抗体等で染色後、フローサイトメトリーで解析した。また、HIV-1 感染細胞は、anti-HIV-1p24 抗体を用いた細胞内染色で同定した。血清は、HIV-1 p24、IL-4、IFN- γ 、human Ig の量を ELISA で定量した。Treg の活性は、予め CFSE で標識した自家 CD25(-)PBMC を固相化 OKT-3 上で刺激する系に段階希釈した細胞検体を加え、4 日後に刺激細胞の分裂増殖抑制で判断した。

(3) Treg 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、H-8 anti-CD25 マウス単クローン抗体と水中 30 分間反応させた。洗浄後、抗マウス IgG を結合した magnet beads (Dyna) 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。Treg の除去結果は、フローサイトメトリーを用いて、他のエピトープを認識する蛍光標識単クローン抗体の染色度合いで判定した。

(4) *in vitro* の HIV-1 感染実験：PBMC と CD25(-)PBMC を固相化 OKT-3 で刺激した 3 日目の細胞群を 2 つに分け、CCR5 指向性 HIV-1 JR-CSF と CXCR4 指向性 HIV-1 NL4-3 を感染させた。培養上清中の p24 を ELISA で定量し、ウイルスの増殖の指標とした。細胞の表現系はフローサイトメトリーで解析した。

(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) R5 HIV-1 の感染増殖：

0.5 x 10⁷ 個のヒト末梢血単核球 (hu-PBL) を移植して 1 日目の 4 系統の免疫不全マウス (RAG マウス、human IL-4 発現 RAG マウス、NOG マウス、human IL-4 発現 NOG マウス) の腹腔に CCR5 指向性 JR-CSF を接種した。1 週間後に HIV の増殖を検討した。細胞の生着性は NOG が最も低く 1/3 であり、他は 3/3 匹であった。腹腔洗浄液中の p24 は IL-4 NOG マウスに 10 pg/ml 程度に認められたが、IL-4 RAG と RAG マウスでは陰性であった。細胞が生着したマウスから得られた新鮮細胞中で CD3+p24+細胞の割合は、NOG マウスでは約

1%、IL-4 発現 NOG と RAG マウスでは 0.3~0.6% 程度であったが、RAG マウスでは低く 0.1% 程度であった。細胞が生着したマウスから得られた細胞を培養した場合、どの例においても培養上清中に p24 の産生が認められた。血清中のヒト Ig の量は、RAG マウスで最も高く、0.3~0.7 mg/ml であった。NOG 系統マウスでは低かった。

(2) ヒト由来制御性 T 細胞 (Treg) の存在

上記 4 系統のマウス一群 3 匹の腹腔に、それぞれ 1 x 10⁷ 個/マウスの hu-PBL を移植し、1 週間後にマウス腹腔と脾臓から得られた細胞をブールし解析を行った。フローサイトメトリー解析により、どの hu-PBL マウスからも CD4+CD25+FoxP3+ の Treg 様の表現系を示す細胞が分離された。その割合はヒト CD4 陽性細胞中 1~4% であった。系統による差は明らかではなかった。Treg の活性を CFSE 標識法で測定した。具体的には、OKT-3 刺激 CD25 枯渇 PBMC (Treg サンプルと同じドナー由来) の増殖は、これらのマウス由来の細胞で有意に抑制された。また、この活性は、サンプル細胞群から CD8+T 細胞ではなく CD4+T 細胞をマグネット法で除去することにより軽減されたことから、主なエフェクター細胞はヒト CD4+T 細胞であることが示された。

(3) Treg 除去の HIV-1 増殖への影響

PBMC そのもの、または、抗 CD25 単クローン抗体と anti-mouse IgG-beads で Treg を除去した CD25(-)PBMC とを並べて OKT-3 で 3 日間刺激培養した。これらの活性化 T 細胞に HIV-1 を感染させて培養した場合、CCR5 指向性 HIV-1 と CXCR4 指向性 HIV-1 の感染増殖を培養上清中の p24 産生と比較すると、CD25(-)PBMC では PBMC の場合の約半分であった。

以上の観察から、自然 Treg が免疫応答のみならず HIV-1 増殖の制御に関与することが分かり、今後の本研究の目的であるヒト化マウスの系のさらなる改良への糸口が見いだされた。

D. 考察

ヒトの PBMC を移植することにより作製されるヒト化マウスは、手技において最も簡単に作製できる HIV-1 感染モデルである。これまでの研究により、ヒト PBMC マウス作出の出来不出来は、用いる免疫不全マウス系統の遺伝的背景とドナーに大きく左右されることが示されてきた。特にマウス NK は移植を制限する。また、マウスに対してマイルドな GVHD を惹起するドナーの PBMC が優れている。そこで、本モデルをより普及させるには、最適な系統のマウスを作出することが必要である。そこで、本研究では、4 系統の hu-PBL マウスにおける HIV の増殖性、ヒト由来 Treg の有無を比較検討した。さらに、本年度は、*in vitro* において Treg が HIV 感染増殖に対してどのよう

な影響を及ぼすかについて研究を行った。

ヒト末梢血単核球(hu-PBL)を移植した4系統の免疫不全マウスの中で、細胞の生着性はNOGが最も低く1/3匹であり、他は3/3匹であった。このNOGマウスでの細胞生着性の低比率は予想外であった。理由ははっきりしないが、実際に使ったのは、IL-4遺伝子導入マウスの繁殖においてIL-4陰性のNOGマウスであるが、nativeなNOGマウスとどこかに違いがあるのかもしれない。あるいは、飼育中の環境に原因があるのかもしれない。細胞が生着したNOGマウスでは、CD3+p24+細胞の割合が他のマウスよりも高かった(NOgマウスでは約1%、IL-4発現NOGやRAGマウスで0.3~0.6%程度)。In vitroにおいて、IL-4刺激でTh2型に誘導したCD4+T細胞では、R5 HIV-1の増殖効率が悪いことから、IL-4発現マウスではR5 HIV-1の感染増殖性が抑制されることが危惧されたが、今回の移植条件では、そのようなIL-4の有無によるR5 HIV-1の感染抑制は見られなかった。IL-4マウスでは、CXCR4指向性HIV-1の感染が助長されるので、このマウスを使ったhu-PBLヒト化マウスは、CCR5指向性HIV-1の両方の感染モデルとなり得る。NOGマウスの実験は再度検討する必要がある。

Treg細胞は、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では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見られるTregの他にも、抗原刺激で誘導される他のTregも存在する。今回注目したのは、自然Tregである。この細胞群は、CD4+CD25+FoxP3+のマーカーを持ち、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。今回調べた4系統のhu-PBLマウス系統では、どの系統のマウスからも表現系のおよび機能的にTregと推定される細胞群が同定された。このような細胞が、実際にマウス体内でどのような機能を果たしているのかは今後の解析が必要であるが、ヒトT細胞のマウスに対する強いGVHDの抑制に関与し、長期のT細胞の生存に何らかの役目を果たすことが考えられる。ヒト血液幹細胞を移植した免疫不全マウスでは、HIV-1の第一標的であることが示す論文が最近出たが、hu-PBLマウスにおいてもそのようなHIV-1感染に積極的な役目を果たすかどうか、今後の研究が必要である。昨年度の研究で、Treg細胞群を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観察した。今後、我々の系でのTregの除去とHIV-1感染の関連について明らかにしたい。

また、in vitroで活性化したCD25細胞を除去したCD25(-)PBMCでは、未処理PBMC群と比較してCCR5指向性HIV-1とCXCR4指向性HIV-1の

感染増殖が約半分であった。Treg除去環境では、活性化がより強く起きるため、逆の効果が期待されたが、そのメカニズムは今後、さらに検討すべき課題である。

E. 結論

ヒト末梢血単核球(hu-PBL-)を移植した4系統の免疫不全マウス(RAGマウス、human IL-4発現RAGマウス、NOGマウス、human IL-4発現NOGマウス)においては、IL-4発現RAGマウスがCCR5指向性およびCXCR4指向性HIV-1が増殖するhu-PBLヒト化マウスを作製する目的に叶う系統であることが示唆された。どのhu-PBLヒト化マウスにもヒト由来Tregが存在すること、並びにin vitroでHIV-1を感染させた場合、Treg除去PBMCではHIV-1の感染が减弱することから、今後は、DC免疫による免疫強化法の開発に加えて、Tregの調節法の開発が本研究の目的であるHIV-1感染モデルに適するヒト化マウスの系のさらなる改良へつながることが示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*. 386(1): 23-31, 2009.
- (2) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Matsuzaki G, Ansari A A, Tanaka Y. Rapid induction of OX40 ligand on primary T cells activated under DNA-damaging condition. *Human Immunology* 69:533-54, 2008.
- (3) Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, 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* 233(6):721-31, 2008.
- (4) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4. Trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9(4):540-58, 2008.
- (5) Kubo Y, Yoshii H, Kamiyama H, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Ezrin, Radixin, and Moesin (ERM) proteins function as pleiotropic regulators of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*. 375(1):130-40, 2008.

- (6) 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*. 2(3):423-35, 2008.
- (7) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Current Topics Microbiology and Immunology*. 324:133-48, 2008.
- (8) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *Journal of Virology*. 82:1021-33, 2008.
2. 国内学会発表
- (1) 村上 勉, 大隈 和, 田中礼子, 濱武牧子, 駒野 淳, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955:新規CXCR4アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗HIV-1剤である. 第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録, 2008. 10. 26-28; 岡山. 218.
- (2) 小柳義夫, Chuanyi Nie, 佐藤 佳, 三沢尚子, 田中勇悦, 伊藤 守. 生体内における主要なHIV-1持続産生細胞はエフェクターメモリーCD4陰性T細胞である. 第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2008. 10. 26-28; 岡山. 251.
- (3) 神山陽香, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直. X4-tropic HIV感染におけるCXCR4のラフト局在の重要性. 第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2008. 10. 26-28; 岡山. 323.
- (4) 吉居廣朗, 神山陽香, 佐藤裕徳, 田中勇悦, 山本直樹, 久保嘉直. カテプシン群蛋白質分解酵素のCD4非依存性HIV-1感染における役割. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 401 (179).
- (5) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 仲宗根正, 濱武牧子, 駒野 淳, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 403 (181).
- (6) 佐藤 圭, Chuanyi Nie, 三沢尚子, 田中勇悦, 伊藤 守, 小柳義夫. ヒト化マウスにおけるHIV-1の感染指向性と持続産生細胞の同定. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 430 (208).
- (7) 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 常温保存可能な第5世代HIV血液検査ELISAキットの開発. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 454 (232).
- (8) 篠田康彦, 鈴木陽一, 田中勇悦, 小柳義夫. インターフェロンオメガ1によるHIV-1感染抑制機構の解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 474 (252).
- (9) 児玉 晃, 田中礼子, 田中勇悦. HIV-1による単球の樹状細胞への分化阻害における血小板CD40Lの関与. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 475 (253).
- (10) 高橋良明, 村上 努, 駒野 淳, 吉田篤司, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 宿主由来タンパクOX40L, OX40のHIV-1感染に与える影響. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 505 (283).
- (11) 大隈 和, 田中礼子, 田中勇悦. R5 HIV-1感染細胞を標的とし感染を制御する組換えウイルスVSV. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28; 大阪. 540 (318).
- (12) KONDO Kayo, Matsuzaki Goro, TANAKA Reiko, TANAKA Yuetsu. ヒト細胞上のOX40L発現調節/Regulation of OX40L expression on human T cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2008 12. 1-3; 京都. 169
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

ヒト化マウス内エフェクターメモリー細胞における HIV-1 産生

研究分担者 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 実験動物中央研究所 室長

共同研究者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 研究補助員

共同研究者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 大学院生

平成20年度研究分担報告書

研究要旨

ヒト T 細胞ならびに B 細胞、そしてマクロファージなどの血液細胞造血能を有するヒト CD34 陽性血液幹細胞移植 NOG マウス (NOG-hCD34 マウス) を用いて、個体内における R5 HIV-1 感染細胞の解析実験を行った。その結果、個体内における p24 陽性、すなわち、HIV-1 産生細胞は、脾臓ならびにリンパ節できわめて多く見出され、それらの細胞のほとんどは、CD3 陽性 CD4 陰性 CD45 陽性 CCR7 陰性 T 細胞であった。すなわち、生体内における R5 ウイルス産生細胞はエフェクターメモリー細胞であること、また、CD4 分子は細胞表面から強力にダウンレギュレーションされることが示唆された。さらに、これらの細胞の細胞周期解析の結果、Ki67 陽性 CD69 陽性の分裂細胞が多かった。しかしながら、予想された G2/M 期のものは比較的すくなかった。一方、明らかに、Ki67 陰性の 2 倍体の p24 陽性細胞もあり、生体内におけるウイルス産生細胞は分裂期と休止期の両者の T 細胞であることがわかった。

A. 研究目的

HIV の持続ならびに潜伏感染は、CD4 陽性細胞の著減による免疫不全症であるエイズの発症を誘導し、ヒトを死に陥れる原因となる。本研究の目的は生体内における HIV 産生細胞の同定とその細胞の細胞科学的解析を通じて、HIV 持続感染の阻止法を開発することである。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である HAART 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、リンパ組織において、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。どのようなメカニズムにより、HIV がリンパ組織を持続的に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 (NOG-hCD34 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 HIV を持続的に産生しているであろうという実験結果を見出した。すなわち、臓器における HIV 感染に対する有効なエイズ治療法の開発戦略が必要である。

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。

2) HIV-1 感染

ヒト CD34 陽性細胞移植後 12-13 週目に 100,000 tissue culture infective dose₅₀ (TCID₅₀) の HIV-1_{JR-CSF} を腹腔より接種した。

3) flow cytometry 解析

ヒト CD34 陽性細胞移植後、12 週後に末梢血液中の CD45、CD3、CD19、CD4、CD8、CD45RA に対する単クローン抗体により染色後、その陽性率を FACS Caliber により測定した。HIV-1 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 発現細胞の割合を測定した。感染後 15 週目に解剖し、脾臓、リンパ節、骨髄などの各臓器を採取し、Ki67、CD69、CD45RO、CD45RA、CCR7 のそれぞれに対する単クローン抗体により染色後、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) を用いてその陽性率を同様に測定した。細胞周期の検討のため、Hoechst 33342 を用いて核染色を行った。

（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) HIV-1 産生細胞の同定

HIV-1 感染個体内におけるウイルス産生細胞を見出すために、ヒト臍帯血由来の CD34 陽性細胞を移植後、13 週目のマウスに R5 HIV-1 である HIV-1_{JR-CSF} を感染させた。感染後 3~15 週目に血漿中の HIV-1 RNA 量は 1ml 当たり $10^3 \sim 10^5$ コピーと高ウイルス血症を維持していた。そこで感染後 15 週目に解剖し、脾臓を摘出し、HIV-1p24 に対する単クローン抗体を用いて脾臓細胞中の HIV-1 陽性細胞を検出した。その結果、細胞内染色により p24 陽性細胞は約 2-20% が検出され、さらにこれらの細胞は CD3 陽性 CD4 陰性の T 細胞であった（図 1A, B）。同時に脾臓、リンパ節、骨髄を抗 p24 抗体と抗 CD4 抗体により免疫組織染色を行ったところ、骨髄と比較して脾臓とリン

バ節では CD4 陽性細胞にきわめて多数の p24 陽性細胞が検出された (結果示さず)。すなわち、脾臓やリンパ節の CD4 陽性細胞において活発なウイルス増殖が起きていることがわかったが、図 1B に示す flow cytometry では CD4 は検出されないことより、細胞表面上の CD4 分子はダウンレギュレーションされていることが考えられた。また、これらの p24 陽性細胞は CD45RO 陽性 CD45RA 陰性 CCR7 陰性のエフェクターメモリー T 細胞であることがわかった (図 1C)。

2) 活性化ならびに休止期細胞における HIV-1 の産生

図 1 で示したように、個体内においては、HIV-1 産生細胞のほとんどは、エフェクターメモリー T 細胞であることがわかった。次に、これらの細胞の細胞内環境を検討するために細胞分裂マーカーである Ki67 ならびに CD69 染色をおこなった。その結果、p24 陽性細胞は、同じ感染マウス内の p24 陰性細胞、あるいは、非感染 (Mock) マウスの CD4 陽性細胞のそれと比較して、明らかに Ki67 陽性ならびに Ki67 と CD69 いずれも陽性であることがわかった (図 2AB)。すなわち、HIV-1 産生細胞は、活性化した T 細胞が多いことがわかった。次に、HIV-1 産生細胞の細胞周期を解析するために、p24、Ki67、Hoechst 33342 の 3 重染色を行った。この染色の陽性コントロールとして用いた非活性化ヒト PBL (non-stimulated human PBL) はほとんどの細胞 (98.6%) が G0/G1a 期に、PHA 活性化ヒト PBL (PHA-stimulated human PBL) は、G1b ならびに S/G2M 期として検出された (図 2C)。そして、HIV-1 感染マウスの脾臓細胞のなかの p24 陽性細胞は、G1b 期の細胞数が、同じ感染マウスの p24 陰性細胞ならびに Mock マウスの CD4 陽性細胞のそれと比較して、有意に多いことがわかった (図 2DE)。一方、p24 陽性細胞の中には明らかに G0/G1a の休止期の細胞があることがわかり、休止期の細胞からも HIV-1 は産生されている可能性を強く示唆された (図 2E)。

D. 考察

NOG-hCD34 マウスにおいては HIV-1 の持続感染が成立し、高ウイルス血症維持と CD4 陽性 T 細胞の持続的減少、特に R5 HIV-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 細胞の感染後時間経過とともに減少することを昨年報告した。今回はこの感染マウスの脾臓ではきわめて多くの HIV 陽性細胞を見出した。そして、この HIV 産生細胞の多くは、CD3 陽性 CD4 陰性であること、そして、Ki67 ならびに CD69 陽性の活性化細胞が多いこと、また、細胞周期解析から G1b 細胞が有意に多いことがわかった。この結果は、HIV の Vpr 蛋白質は G2M 期停止を誘導することがよく知られていることと矛盾があり、今後の検討が必要である。さらに、p24、Ki67、Hoechst 33342 の 3 重染色結果、G0/G1a の休止期の細胞からもウイルスが産生されることも明らかになった。これらの結果は、HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスを用いて、活性化 T 細胞とともに休止期 T 細胞からウイルスは産生されることがわかった。これらの細胞内環境が異なる細胞の寿命ならびに抗ウイルス薬に対する感受性には、当然差異が

あることが予想され、生体内におけるウイルス感染様式の多様性がこのマウス内では再現されていると考えられる。

E. 結論

HIV-1 感染モデルマウスを用いて生体内におけるウイルス産生細胞は分裂期と休止期の両者の T 細胞であることがわかった。すなわち、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

- 1) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol.* 82: 1021-1033, 2008.
- 2) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol. Immunol.* 52: 78-88, 2008.
- 3) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. "Humanized Mice", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 324:133-148, 2008. Nomura, Tatsuji; Watanabe, Takeshi; Habu, Sonoko (Eds.).
- 4) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9: 540-558, 2008.
- 5) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82: 2528-2542, 2008.
- 6) Kawamura T, Koyanagi Y, Nakamura Y, Ogawa Y, Yamashita A, Iwamoto T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S. Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: Relevance to occupational transmission of HIV. *J. Immunol.* 180: 3297-3304, 2008.
- 7) Yamaguchi K, Sugiyama T, Kato S, Kondo Y,

- Ageyama N, Kanekiyo M, Iwata M, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. A novel CD4-conjugated ultraviolet light-activated photocatalyst inactivates HIV-1 and SIV efficiently. *J. Med. Virol.* 80:1322-1331, 2008.
- 8) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let.* 582:4053-4058, 2008.
- 9) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. *Microbes Infect.* 10:1514-1523, 2008.
- 10) 佐藤佳, 小柳義夫. Sputnik Sweetheart : ウイルスに感染するウイルス. ウイルス (日本ウイルス学会誌), 58 巻, 第 2 号, pp. 219-220, 2008.
2. 学会発表
- 1) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. HIV-1 VPR in mitochondria impairs neuronal progenitor cell differentiation, *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 2) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication, *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 3) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits CXCR4 trafficking to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 4) Shinoda Y, Suzuki Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. Interferon- ω is a powerful inhibitor for HIV-1 infection. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 5) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Tetraspanin on HIV-1 virions modulates its infectivity. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 6) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Identification of cellular interactors to MoMLV integrase using tandem affinity purification-mass spectrometry analysis. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 7) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.*
- 8) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. *The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Seoul, 2008.*
- 9) Kitayama H, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y, HIV-1 Vpr in Mitochondria impairs neuronal cell repair. *XIV. International Congress of Virology, Istanbul, 2008.*
- 10) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. CD63 and its mutants inhibit fusion of CXCR4-containing vesicles to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry. *XIII IUMS International Congress of Virology, Istanbul, 2008.*
- 11) Suzuki Y, Ogawa K, Koyanagi Y, Suzuki Y. VRK induces dysfunction of the MoMLV PIC through phosphorylation of BAF. *3rd International Conference on Retroviral Integrase, Woods hole, Massachusetts, 2008.*
- 12) Koyanagi, Y.: HIV and AIDS 日中数理生物学 コロキウムシンポジウム, 岡山, 2008.
- 13) Koyanagi, Y.: HIV-1 pathogenesis: productive infection in CD4+ effector memory T lymphocytes and CD4+ depletion in humanized mice, 第 11 回京都大学国際シンポジウム, 上海, 2008.
- 14) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of HIV-1 pathogenesis and the infected cells in humanized mice. *16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, D-179, Montreal, 2009.*
- 15) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of HIV-1 infectivity through incorporation of

- tetraspanin proteins. The Kinki AIDS Seminar, Nara, 2008.
- 16) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of pathogenesis and productive infection of HIV-1 in humanized mice. The 8th Awaji Symposium, Awaji, 2008.
- 17) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Functional association of HIV-1 and MoMLV integrase with HECT-domain ubiquitin ligase Huw1. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2008.
- 18) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顯, 小柳義夫. Small GTPase Rac2 による HIV-1 増殖制御. 第 56 回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.
- 19) 鈴木康嗣, 小川加那子, 小柳義夫, 鈴木陽一. 細胞性キナーゼ VRK1 によるレトロウイルスインテグレーション機能の阻害とその分子メカニズム. 第 56 回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.
- 20) 篠田康彦, 鈴木陽一, 田中勇悦, 小柳義夫. インターフェロンオメガ 1 による HIV-1 感染抑制機構の解析. 第 22 回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
- 21) 安藤良徳, 北山裕子, 小柳義夫. ウイルスに対する海馬組織の脆弱性に関する研究. 第 22 回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
- 22) 小林 朋子, 芳田 剛, 駒野 淳, 小柳 義夫. レンチウイルスベクターを用いた抗 HIV 因子のスクリーニングとその解析. 第 22 回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
- 23) 佐藤佳, Chuanyi Nie, 三沢尚子, 田中勇悦, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウスにおける HIV-1 感染指向性と持続感染細胞の同定. 第 22 回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
- 24) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顯, 小柳義夫. HIV-1 複製制御における Small GTPase Rac2 の機能解析. 第 22 回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
- 25) 山元誠司, 大川克也, 小川加那子, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, 鈴木陽一. TAP-MS 法によるインテグラーゼ結合因子 Huw1 の同定とその解析. 第 22 回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
- 26) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 高橋玲, 伊藤守, 小柳義夫. EBV 感染モデルマウスの確立と活性化 CD8+T 細胞の誘導. 第 38 回日本免疫学会総会, 京都, 2008.
- 27) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顯, 小柳義夫. Small GTPase Rac2 による HIV-1 増殖制御. 第 7 回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2009.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし

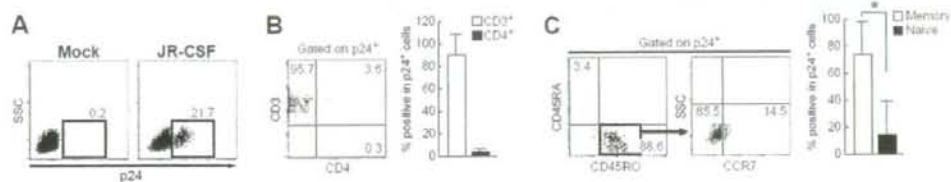


図 1. HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウス内における HIV-1 産生細胞の同定

HIV-1_{JR-CSF} 感染 NOG-hCD34 マウスにおける p24 陽性細胞 (A)、p24 陽性細胞の CD3 ならびに CD4 発現率 (B)、p24 陽性細胞の CD45RA、CD45RO、CCR7 発現率 (C)、CD45RA (naïve) と CD45RO (memory) における p24 陽性率 (C 右カラム)。Asterisk はそれぞれの細胞間の統計学的有意差 ($p < 0.05$, Student's *t*-test) を表している。

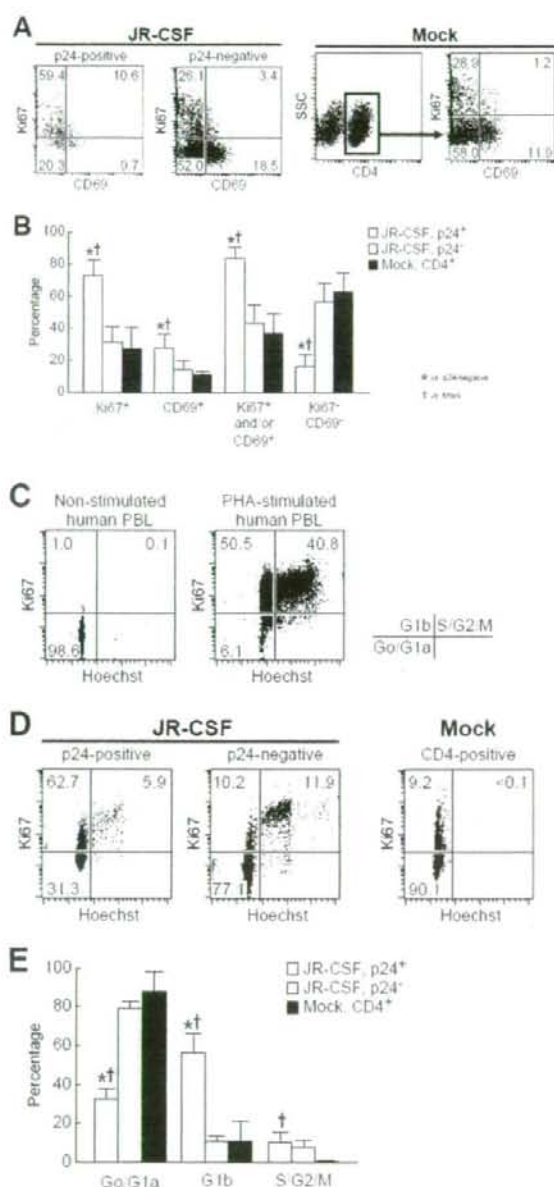


図 2. HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウス内における HIV-1 産生細胞の細胞内環境

HIV-1_{JR-CSF} 感染 NOG-hCD34 マウスの p24 陽性細胞と p24 陰性細胞、ならびに、非感染(mock)マウス内の CD4 陽性細胞における Ki67、CD69 検出実験の一例 (A)、それらの Ki67、CD69 陽性率 (B)、非活性化ヒト PBL(non-stimulated human PBL)と PHA 活性化ヒト PBL(PHA-stimulated human PBL)への p24、Ki67、Hoechst 33342 の 3 重染色による G1b、S/G2M 期を示す (C)、HIV-1_{JR-CSF} 感染 NOG-hCD34 マウスの p24 陽性細胞と p24 陰性細胞、ならびに非感染(mock)マウス内の CD4 陽性細胞における Ki67 と Hoechst 33342 染色の一例 (D)、それらの Ki67、Hoechst 33342 陽性率(E). Asterisk はそれぞれの細胞間の統計学的有意差 ($p < 0.05$, Student's *t*-test) を表している

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

研究分担者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズセンター長

平成20年度研究分担報告書

研究要旨：ヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植したヒト化マウスを用い、CD4 陽性 T 細胞の減少を伴った長期の HIV-1 感染モデルを作製した。さらに、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。HIV-1 感染マウスに EBV を重感染させ、日和見リンパ腫モデルの作製を試みたところ、HIV-1 感染マウスでは非感染マウスに比べてリンパ腫の発症が遅れることが判明した。この重感染マウスモデルは、エイズに伴う EBV 関連リンパ腫発症のメカニズムについて新たな知見をもたらす可能性がある。

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おらず、エイズ関連疾患の治療法も確立されていない。HIV-1 やエイズ関連癌ウイルスである EB ウイルス (EBV) は通常の実験動物に感染しないことが治療法確立を妨げる大きな要因となっている。ヒト造血幹細胞を NOD/SCID/gamma (c) (null) マウス (NOG マウス) に移植した「ヒト化マウス」は、長期にわたるヒト免疫系の再構築を可能とし、ヒト感染症の様々な研究に有用であると考えられる。昨年度までに我々は、(1) 長期間安定して生存するヒト化マウスの作製に成功し、(2) HIV-1 感染実験により、このマウスが R5 指向性および X4 指向性両方の HIV-1 に高い感染感受性をもつことを示した。さらに (3) HIV-1 感染マウスの血漿中では 3 ヶ月以上も高いウイルスコピー数が持続して検出され、長期の HIV-1 感染モデルになることを示してきた。このことは、

このマウスが HIV-1 の薬剤・ワクチン開発に有用であると同時に、エイズ発症のメカニズムを解明するのに役立つ可能性を示している。さらに我々は、このヒト化マウスが (4) EBV に効率よく感染し、リンパ腫発症モデルになること、また (5) EBV 感染後に CD8 陽性 T 細胞の顕著な増加を伴った強い免疫反応が誘導されることを示してきた。今年度は以上の成果をもとに、ヒト化マウスで HIV-1 感染に引き続き EBV を重感染させ、「エイズに伴う日和見リンパ腫再現モデル」の作製を試みたので報告する。

B. 研究方法

ヒト臍帯血造血幹細胞の分離と NOG マウスへの造血幹細胞移植

臍帯血は東京臍帯血バンクより譲渡を受けた。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 10⁴-1.2 x 10⁵ 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

ヒト化マウスから経時的に末梢血や組織を採取し、ヒト細胞の性状をフローサイトメトリー (Beckman Coulter) で解析した。HIV-1 および EB ウイルス感染マウスについては、抗体染色後 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_{JRCSF} (R5 指向性)、HIV-1_{Mip} (X4 指向性) および HIV-1_{NL4-3} (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 EB ウイルス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と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。

EBV 特異的免疫反応の有無を調べるため、EBV 感染マウスの組織から CD8 陽性 T 細胞を分離し、IFN- γ の産生を ELISPOT 法で解析した。CD8 陽性 T 細胞の刺激には、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) を用いた。

HIV-1 と EBV の重感染実験

移植後 4-5 ヶ月のマウスに、HIV-1_{JRCSF} (R5 指向性) および HIV-1_{NL4-3} (X4 指向性) を尾静脈より投与し、さらに 8 週間後に Akata 細胞培養上清由来の EBV を尾静脈より投与した。その後定期的に採血、剖検を行い、EBV 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。

(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、研究機関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. 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。同意書は東京臍帯血バンクにおいて厳重に保管される。
6. 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。細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔よ