

り十分量の麻酔薬を注入し、動物が眠っていることを確認してから行った。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. HIV-1 長期持続感染モデルの作製

ヒト造血幹細胞を NOG マウスに移植すると、発生初期のヒト細胞のほとんどが B 細胞であり、ヒト T 細胞は移植後 100 日以降に増加してくることが確認されている。そこで、ヒト T 細胞が顕著に増加する移植後 4-5 ヶ月目のマウスに R5 指向性 HIV-1_{JRC5F} (65,000 TCID₅₀ / マウス) および X4 指向性 HIV-1_{M9p} (20,000 TCID₅₀ / マウス)、X4 指向性 HIV-1_{NL4-3} (60,000 TCID₅₀ / マウス) をそれぞれ尾静脈より投与し、血漿中のウイルスコピー数を経時的に解析した。その結果、HIV-1 を投与した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 ($<7.8 \times 10^6$ copies/ml) が持続する慢性感染が成立した (図 1)。次にマウス 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_{M9p} (5 匹) および HIV-1_{NL4-3} (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 2. A)。一方、R5 指向性 HIV-1_{JRC5F} (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 2. 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 2. 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 2. C)。以上の結果から、このヒト化マウスが HIV-1 長期持続感染モデルとしてさまざまなエイズ研究に応用できる可能性が示された。

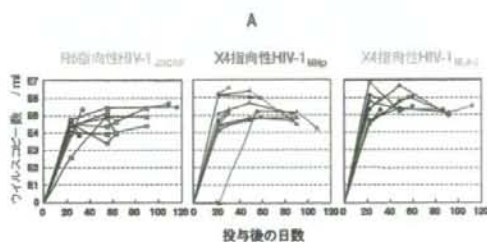


図 1. HIV-1 投与後の血漿中ウイルスコピー数の変動

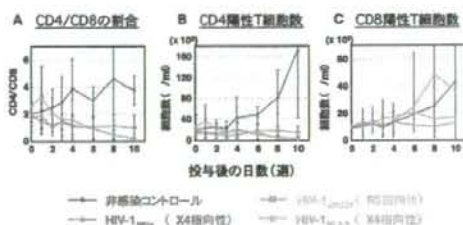


図 2. HIV-1 感染マウスの末梢血における CD4/CD8 比および CD4 陽性 T 細胞数の変動

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

2. 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を示した。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明らかにした。

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 3 週目以降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 3. 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 3 週目以降で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肉腫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のがみられた (図 4)。これは、ヒトの EBV 初期感染にみられる伝染性単核症 (IM) を反映したものと考えられる。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。

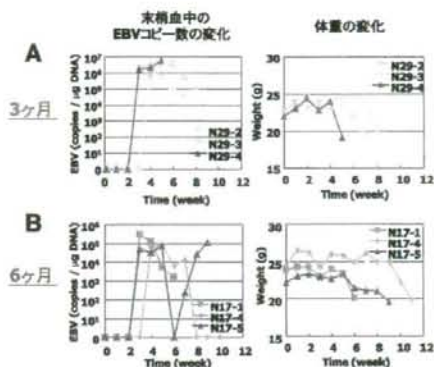


図 3. 末梢血中 EBV コピー数と体重の変化

	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	6.7×10^4	6.0×10^4	5.7×10^4	検出限界以下
脾臓	7.0×10^4	4.2×10^4	2.0×10^4	2.4×10^4
胸腺	未測定	1.7×10^4	2.3×10^4	1.2×10^4
骨髄	4.3×10^4	2.0×10^4	未測定	1.2×10^4
肝臓	未測定	5.7×10^4	2.8×10^4	4.2×10^4
腎臓	未測定	6.7×10^4	1.5×10^4	7.9×10^4
リンパ節	2.0×10^4	7.4×10^4	3.0×10^4	2.4×10^4

表 1. 主要組織における EBV コピー数の定量

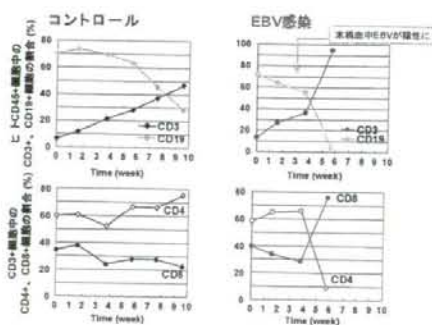


図 4. コントロールマウスおよび EBV 感染マウスにおける CD8 陽性 T 細胞の変動

3. HIV-1 と EBV の重感染実験

エイズ関連悪性リンパ腫の要因の一つとなる EBV は健康人の 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。そこで、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。

まず HIV-1 を感染させ CD4 陽性 T 細胞の減少を再現し、次に EBV を感染させてその後の病態の進行を観察した。その結果、予想に反し HIV-1 非感染マウス (3 匹) で早期に末梢血中 EBV コピー数が検出され、その後顕著な体重減少を示した (図 5A, B)。一方、R5 指向性 HIV-1_{JRCSF} (2 匹) および X4 指向性 HIV-1_{NL4-3} (2 匹) に感染したマウスでは、体重減少および末梢血中の EBV コピー数の増加が遅れてみとめられた (図 5A, B)。EBV 投与後 29 日目のマウス 4 匹を剖検した結果、HIV-1 非感染マウスでは脾臓などの組織にリンパ腫が形成され、全身の組織で高い EBV コピー数が検出されたのに対し、HIV-1 感染マウスでは肉眼的にリンパ腫の形成はみとめられず、全身組織の EBV コピー数も HIV-1 非感染マウスに比べて低い数値を示した (表 2)。このことから、HIV-1 感染マウスにおいては、何らかの要因によって EBV 感染後の病態進行が遅れることが示された。図 6 は末梢血中の CD4 陽性 T 細胞数および CD8 陽性 T 細胞数を経時的に解析した結果を示している。CD4 陽性 T 細胞数は X4 指向性 HIV-1 感染マウスで顕著に減少し、EBV 感染によってその細胞数は変わらないが、CD8 陽性 T 細胞は EBV コピー数

の増加に伴って HIV-1 感染マウスでも顕著に増加するのがみられた。このことから、EBV 感染に対する CD8 陽性 T 細胞の反応は CD4 陽性 T 細胞のヘルプを必要としない宿主応答であることが示唆された。また、以上の重感染の結果は、HIV-1 非感染マウス (4 匹)、R5 指向性 HIV-1 感染マウス (4 匹) および R5 指向性 HIV-1 感染マウス (4 匹) を用いた同様の実験においても再現性が確認された。

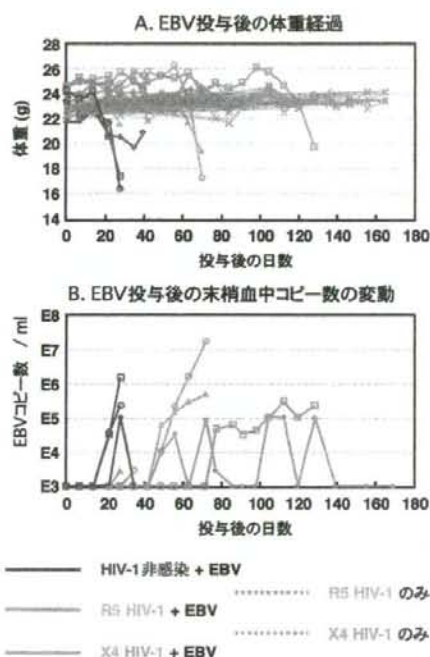


図 5. HIV-1 非感染マウスおよび HIV-1 感染マウスにおける EBV 投与後の体重 (A) および末梢血中 EBV コピー数 (B) の経時的解析

全身の組織における EBV コピー数 / 100ng DNA (EBV 投与後 29 日目)

	HIV-1 非感染	R5 HIV-1 感染	X4 HIV-1 感染	
脾臓	1474,490	2780,583	103,882	検出限界以下
肝臓	191,293	555,368	7,871	検出限界以下
胸腺	19,370	102,298	911	1,478
肺	143,415	165,827	2,426	102
腎臓	229,182	45,717	838	203
副腎	484,415	807,599	348	71
小腸	525	2,450	81	7

表 2. 主要組織における EBV 量の比較

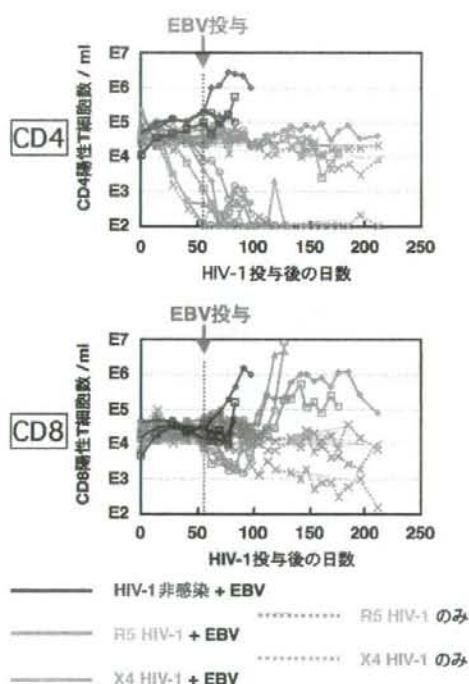


図 6. HIV-1 非感染マウスおよび HIV-1 感染マウスにおける末梢血中の CD4 陽性 T 細胞数と CD8 陽性 T 細胞数の経時的解析

D. 考察

ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスで、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的な感染が成立した。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。

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。その結果、予想に反して 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 細胞の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。

E. 結論

ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスを用い、HIV-1 および EBV 感染モデルを確立した。HIV-1 と EBV の重感染実験により、HIV-1 感染マウスではリンパ腫が遅れて形成されることが明らかとなった。今後 EBV 感染における CD4 陽性 T 細胞の役割について詳しく解析する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):622-9.
- 2) Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, Yamamoto N, Morishita K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol*. 2008 Dec;82(23):11958-63.
- 3) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Microbes Infect*. 2008 Jun;10(7):748-56.
- 4) Terunuma H, Deng X, Dewan Z, Fujimoto S, Yamamoto N. Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev Immunol*. 2008;27(3):93-110. Review.
- 5) Amet T, Nonaka M, Dewan MZ, Saitoh Y, Qi X, Ichinose S, Yamamoto N, Yamaoka S. Statin-induced inhibition of HIV-1 release from latently infected U1 cells reveals a critical role for protein prenylation in HIV-1 replication. *Microbes Infect*. 2008 Apr;10(5):471-80.
- 6) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5118-29.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

「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

研究分担者 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 財団法人実験動物中央研究所）

平成20年度研究分担報告書

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」作出の基盤となる重度免疫不全マウスとして、BALB/cA-RAG2^{ml1} IL-2Rg^{ml1} および NOD-scid-IL-2Rg^{ml1} (NOG) -hIL-4Tg 複合マウスの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 GVHD の発症について、NOG、BALB/cA-RAG2^{ml1} IL-2Rg^{ml1} および NOD-scid マウス間で比較、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^{ml1} IL-2Rg^{ml1} (BALB/cA-dKO) -hIL-4Tg 複合マウスは従来の免疫不全マウスよりもヒト PBMC 移入後の HIV-1 感染性に優れていた。また、その後開発した NOG -hIL-4 Tg マウスも HIV-1 感染性に優れている可能性がある。これら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し、供給を行う。

さらに、HIV-1 感染性に優れたマウスモデルの作出をするために、免疫不全マウスを基礎に置いた新たなヒト遺伝子導入マウスの作製を行う。

また、HIV-1 感染実験のためにヒト PBMC を移入によるヒト細胞の生着性やそれによって引き起こされる GVHD に関しても、基礎情報を集める必要がある。各種免疫不全マウスでのそれらの動態を観察する。

B. 研究方法

当研究所で作製した human IL-4 を分泌する3系統の免疫不全マウス、C.B-17-scid-hIL-4 Tg、BALB/cA-dKO -hIL-4 Tg および NOG -hIL-4 Tg マウスのうち、C.B-17-scid-hIL-4 Tg マウスを凍結保存した。残りの2系統については、BALB/cA-dKO

-hIL-4 Tg マウスは前期で選別した高分泌系統(2.10 ng/mL)を、NOG -hIL-4 Tg マウスは繁殖成績が良好な 0.32 ng/mL を分泌する系統を選別し、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。

これら Tg マウスの Tg 型は heterozygote (+/Tg) であり、そのため現在の生産方式では、野生型と Tg 型との交配となり、産子の遺伝子型を判別する必要があり、生産効率が悪い。生産効率を上げるために、Tg ホモ型の作製を行った。すなわち、+/Tg マウス同士の交配を行い、得られた産子を BALB/cA-dKO または NOG マウスに戻し交配によって、Tg/Tg のマウスの選別をする後代検定を行い、Tg/Tg の作製を行った。

HIV-1 感染性に優れた新しいマウスモデルの作出のために、新たにヒト IL-2 および IL-15 遺伝子を免疫不全マウスに導入したマウスの作製を開始した。このために、ヒト IL-2 に関しては、ヒト末梢血より単核球を単離後、PWM の刺激下で24または48時間培養し、それら単核球より、RNA を抽出し、これより cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとして、5' -CCCGGGTcacattaacctcaactcctgccca-3' および 5' -GCGCGCCggcctgatatgttttaagtggg-3' の primer set を用いて、hIL-2 cDNA を増幅した。この hIL-2 cDNA を PCR2.1 vector (Invitrogen) でクローニング後、

塩基配列を確認し、さらに pCMVb vector (Invitrogen) に挿入した。また、hIL-15 に関しては、末梢血リンパ球での発現は期待できないために、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託された hIL-15 cDNA (RDB1866) の譲渡を受け、それをテンプレートとして、hIL-5 cDNA を 5' -GCGGCCGCGGATTACCGTGGCTTT-3' および 5' -GCGGCCGCGGATTACCGTGGCTTTGA GT-3' の primer set で増幅後、hIL-2 と同様に pCMVb vector に挿入した。これら遺伝子の発現を確認するために、COS-7 細胞に Lipofectamine (Life Technologies) を用いて導入後、上清中に分泌される hIL-2 または hIL-15 を ELISA kit (各々 BD biosciences, Invitrogen) によって検出した。Tg マウス作製のために、上記遺伝子を HindIII の酵素切断によって直鎖にした後、(NOG x NOD) F1 マウスの前核期受受精卵に顕微注入した。得られた産子での Tg 導入の有無は、尻尾より抽出した DNA をテンプレートとして上述の primer set での PCR で確認した。

また、免疫不全マウス 3 系統、すなわち NOD-scid、BALB/cA-dKO および NOG でのヒト PBMC 移入後の GVHD の動態の検討に関して、上記 3 系統 10~12 週齢マウスに X 線照射 (各々 3.5、3.5 および 2.5 Gy) した後に、informed consent を得た健康人の末梢血より、FicoII 比重遠心法にて単核球を分離し、その 1×10^7 個を尾静脈または腹腔経路に移入した。移入後、毎週体重を測定し、かつ死亡の有無を確認した。(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、行なわれた。

C. 研究結果

本年度は、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg および NOG-hIL-4 Tg マウスの計画生産を行い、両系統 Tg マウスの繁殖成績はともに昨年度に報告したものとほぼ同様の良好な結果が得られた。これら繁殖で得られた動物は、感染実験のために本研究の研究代表者である田中勇悦教授 (琉球大) に搬送された。表 1 に本年度 8 ヶ月間 (4 月~12 月) の供給実績を示した。すなわち、BALB/cA-dKO の野生型および hIL-4 Tg で計 223 匹、NOG については計 260 匹、総計 483 匹を供給できた。

また、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg ホモ型マウスおよび NOG-hIL-4 Tg ホモ型マウスの作製に関して、

BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスでホモ型が得られた。表 2 に示すように、hIL-4 Tg ヘテロ型マウス同士の交配で得られた Tg マウスは産子 43 匹中 29 匹 (67.4%) であった。その 29 匹中にホモ型マウスがいることが想定され、その 29 匹のうちの 15 匹の Tg マウスを BALB/cA-dKO との後代検定に用いた。表 3 にその結果を示した。BAL/cA-dKO との数回交配によって得られた産子が全て Tg マウスであった個体は 8 個体で、そのうち、2 産以上で確認された個体は 7 個体であった。現在はそれらホモ型個体同士の交配で産子の生産が可能か否かを検討中である。また、NOG-hIL-4 Tg マウスについても同様の検討を行っている。

新しいヒト遺伝子導入マウスとして、hIL-4 および hIL-15 Tg マウスの作製を開始した。図 1 に、導入遺伝子構築を示す。基本的には、hIL-4 Tg マウスと同様に、サイトメガロウイルスのプロモーターで駆動する導入遺伝子を構築した。これら構築された 2 遺伝子を COS-7 細胞に Lipofectamine によって導入し、その上清中の hIL-2 および hIL-15 の分泌量を測定した結果を、図 2 に示す。hIL-2 の分泌量は極めて高かったが、hIL-15 はごく少量の分泌量しか検出できなかった。hIL-2 導入遺伝子を用いた前核期胚への顕微注入で得られた産子の Tg の導入の有無を調べた結果を図 3 に示す。今回の顕微注入では hIL-2 Tg マウスは得られなかった。

3 系統免疫不全マウスに対して、尾静脈経路でヒト PBMC 1×10^7 個を移入した場合の GVHD 発症の有無を検討した結果を図 1 に示す。X 線照射した場合には、NOG マウスでは体重が急速に減少し、移入後 2 週程度で死亡した。また、BALB/cA-dKO では移入後徐々に体重が減少し、移入後 4 週から 7 週で死亡した。一方、NOD-scid マウスでは体重の減少も死亡も認められなかった。また、未照射の条件では、NOG マウスのみで GVHD が発症し、移入後 10 週までに全個体が死亡した。他系統では体重の減少も死亡も認められなかった。これら体重が減少した個体の肝臓、肺ではヒトリンパ球の強い浸潤が認められた。

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とそれら維持生産・供給システムの構築、およびそれらマウスの基礎的性状の検討である。

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-2R β 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高く、感染モデルマウスとして適することが明らかとなった。以上の結果から、本年度から後者マウスとそれに加え新たに作製したNOG-hIL-4 Tg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。維持は小型アイソレーターを用い、生産には大型アイソレーターを用いて行ったが、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。

BALB/cA-dKO-hIL-4 と NOG-hIL-4 Tg マウスでの HIV-1 感染性の良否、モデルとしての有用性は現在検討中である。現在までに、BALB/cA-dKO 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難点もある。今回の各種免疫不全マウスへのヒト PBMC 移入実験によって、NOG マウスは他系統マウスよりもはるかにヒト PBMC の増殖が早くかつ強く、そのために GVHD で早期に死亡することが確認された。一步で、この性状を利用して、部位特異的な PBMC の移入や少数の細胞での感染実験が可能となる、または PBMC のドナーを選ぶ必要がないことなどの利点も考えられる。

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。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ことを示す。より効率的な繁殖システムを作製するために、今回 Tg ホモ型マウスを企画し、実施した。その結果、ホモ型マウスが数ペア得られ、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の作製は、HIV-1 感染モデルマウスの開発には極めて有用と考えられる。今回、T 細胞や NK 細胞の増殖や活性化に強く関与している hIL-2 と hIL-15 Tg マウスの作製を試みた。導入遺伝子である hIL-2 および hIL-15 の DNA 構築を行い、その分泌を遺伝子導入 COS-7 細胞培養上清

での濃度をそれぞれの ELISA kit で調べることによって確認した結果、hIL-2 では極めて高濃度の hIL-2 が検出され、Tg マウス作製に十分適う遺伝子が構築できたと考えられる。一方、hIL-15 に関しては、予想に反して、培養上清中に少量の hIL-15 しか検出できなかった。基本ベクターとして、hIL-2 と hIL-15 とも同じ pCMV β ベクターを使っていること、hIL-15 の塩基配列に異常は認められなかったことなどから、その低発現の原因は現在のところ明瞭ではない。hIL-15 は、分泌型と細胞質型があるとされているが、DNA 構造は変わらない。一方で、塩基配列検索では、塩基配列が異なっている報告がある。今後は、今回用いた hIL-15 の cDNA および報告されている cDNA との相違、分泌型と細胞質型での作用機序等を含めて検討する必要があると思われる。今回構築できた hIL-2 導入遺伝子を、(NOG x NOD) F1 前核期胚に顕微注射し、Tg マウスの作製を行った。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。しかし、表には示されていないが、離乳後早期に死亡した個体で Tg マウスがいたことから、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。すなわち、hIL-4 とは異なり、hIL-2 はヒトとマウスのものが交差することが知られている。hIL-2 がマウス内で強発現することでマウスに障害を与え、その結果として発現個体が得にくいことが考えられる。しかし、NOG では IL-2 の受容体のサブユニットである IL-2R β が欠損しているため、ヒト IL-2 が機能しないと考えられる。したがって、これらマウスの前核期胚を用いれば、hIL-2 が強発現してもマウスに影響を与えないと考えられる。今回は、(NOG x NOD) F1 の前核期胚を用いたが、これは、我々の実験結果、すなわち、scid ホモ動物の前核期胚を用いた場合には Tg 動物作製効率が極めて落ちることから、scid ヘテロ動物を用いたものである。したがって、scid 遺伝子が欠如し、IL-2R β がホモ型になっているマウスの前核期胚を用いれば、効率良く hIL-2 が強発現する個体が得られると思われる。この目的のため、現在、NOD-IL-2R β KO マウスの前核期胚を用いることを企画し、そのために NOD-IL-2R β KO マウスの増産を行っている。

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、前年度検討した

大型アイソレーターによるBALB/cA-dKO γ -hIL-4 Tg および NOG-hIL-4 Tg マウスの生産を行い、定期的な供給を行うことができた。また、生産効率を上げるために、従来のTgヘテロ型からTgホモ型の動物の作製を行い、現在得られたホモ型同士の交配を実施している。新たにhIL-2およびhIL-15遺伝子を導入した免疫不全マウスの作製を開始した。NOG、BALB/cA-dKO および NOD-scid マウスへのヒトPBMCの移入によって、NOGマウスは強いGVHDの発症によって早期に死亡することが分かった。またX線照射しない場合でも移入によってNOGマウスは死亡し、極めてヒト細胞の生着、増殖性が高いことが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ogawa, D., Y. Okada, M. Nakamura, Y. Kanemura, H. J. Okano, Y. Matsuzaki, T. Shimazaki, M. Ito, E. Ikeda, T. Tamiya, S. Nagao, and H. Okano. 2009. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J Neurosci Res* 87:307-317.
- (2) Yamane, A., T. Nakamura, H. Suzuki, M. Ito, Y. Ohnishi, Y. Ikeda, and Y. Miyakawa. 2008. Interferon-alpha 2b-induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. *Blood* 112:542-550.
- (3) Yajima, M., K. Imadome, A. Nakagawa, S. Watanabe, K. Terashima, H. Nakamura, M. Ito, N. Shimizu, M. Honda, N. Yamamoto, and S. Fujiwara. 2008. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis* 198:673-682.
- (4) Yahata, T., Y. Muguruma, S. Yumino, Y. Sheng, T. Uno, H. Matsuzawa, M. Ito, S. Kato, T. Hotta, and K. Ando. 2008. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells* 26:3228-3236.
- (5) Terada, Y., Y. Terunuma-Sato, T. Kakoi-Yoshimoto, H. Hasegawa, T. Ugajin, Y. Koyanagi, M. Ito, T. Murakami, H. Sasano, N. Yaegashi, and K. Okamura. 2008. Development of human Graafian follicles following transplantation of human ovarian tissue into NOD/SCID/gammacnull mice. *Am J Reprod Immunol* 60:534-540.
- (6) Suemizu, H., C. Yagihashi, T. Mizushima, T. Ogura, T. Etoh, K. Kawai, and M. Ito. 2008. Establishing EGFP congenic mice in a NOD/Shi-scid IL2Rg(null) (NOG) genetic background using a marker-assisted selection protocol (MASP). *Exp Anim* 57:471-477.
- (7) Suemizu, H., M. Hasegawa, K. Kawai, K. Taniguchi, M. Monnai, M. Wakui, M. Suematsu, M. Ito, G. Peltz, and M. Nakamura. 2008. Establishment of a humanized model of liver using NOD/Shi-scid IL2Rgnull mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377:248-252.

2. 学会発表

- (1) Dendritic cells have a suppressive effect on xeno-GVHD in novel immunodeficient NOG mice. Ito R, Katano I, Ogura T, Kawai K, Ito M. 第10回国際樹状細胞シンポジウム、2008年10月1-5日、神戸
- (2) Novel severe immunodeficient NOG mice were excellent models for Xeno-GVHD due to dysfunction of dendritic cells. Ito R, Katano I, Kawai K, Ito M. 第38回日本免疫学会、2008年12月1-3日、京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. BALB/cA-dKO および NOG 背景の hIL-4 TG マウスの供給実績 (平成 20 年 4 月～12 月)

マウス系統	出荷回数	♀	♂	計
BALB-dKO-hIL-4 / BALB-dKO	6	107	116	223
NOG-hIL-4 / NOG	5	139	121	260
計		246	237	483

*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。

表2. BALB/cA-dKO Tg ヘテロ型マウス同士の交配で得られた産子での Tg マウス出現頻度

Day of birth	No.	sex	PCR
071218	f1	♀	+
	f2	♀	+
	f3	♀	+
	f4	♀	-
	f5	♀	+
	f6	♂	-
	f7	♂	+
080512	f8	♂	-
	f9	♂	+
	f10	♂	+
	f11	♂	-
080514	f12	♂	-
080606	f13	♀	+
	f14	♀	+
	f15	♀	+
	f16	♂	+
	f17	♂	+
	f18	♂	+
	f19	♂	+
080607	f20	♀	+
	f21	♀	-
	f22	♀	-
	f23	♂	+
	f24	♂	+
	f25	♂	-

Day of birth	No.	sex	PCR
080626	f26	♀	-
	f27	♀	+
	f28	♀	+
	f29	♀	+
	f30	♀	+
	f31	♂	+
	f32	♂	-
	080716	f33	♂
f34		♂	+
080812	f35	♂	+
	f36	♂	+
	f37	♂	+
	f38	♂	+
	f39	♂	-
	f40	♂	+
080830	f41	♂	+
	f42	♂	+
	f43	♂	-
	f44	♂	-
	f45	♂	-

* 交配で得られた 43 匹のうち、29 匹 (67.4%) が Tg 陽性であった。そのうち、15 匹を後代検定に用いた (背景が灰色のカラム)。

表 3. BALB/cA-dKO マウスとの後代検定による hIL-4 Tg ホモ型マウスの選別

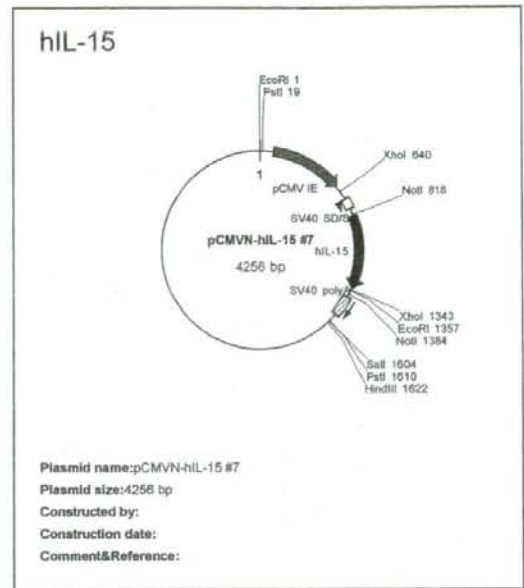
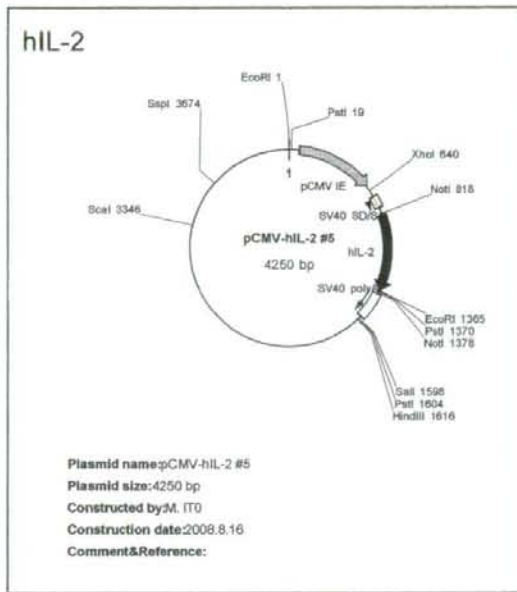
No.	sex	1産	2産	3産	4産	5産
f1	♀	080626 Tg : 2/4 X				
f2	♀	080626 Tg : 5/9 X				
f3	♀	080627 Tg : 5/5	080719 Tg : 8/8	080810 Tg : 7/7	080927 Tg : 6/6	081021 Tg : 6/6
f5	♀	080625 Tg : 4/4	080803 Tg : 7/7	080831 Tg : 3/3	081024 Tg : 6/6	
f7	♂	080625 Tg : 3/4 X				
f9	♂	080912 Tg : 6/6	081031 Tg : 2/2			
f10	♂	080912 Tg : 6/6	081006 Tg : 3/3	081031 Tg : 3/3		
f23	♂	080927 Tg : 5/10 X				
f24	♂	080927 Tg : 5/5	081016 Tg : 5/5			
f27	♀	080917 Tg : 7/7	081016 Tg : 3/3			
f28	♀	080915 Tg : 3/5 X				
f29	♀	080916 Tg : 3/3	081008 Tg : 1/3 X			
f30	♀	080915 Tg : 4/7 X				
f33	♂	081009 Tg : 3/3				
f34	♂	081009 Tg : 7/7	081102 Tg : 3/3	081125 Tg : 6/6		

*交配によって得られた産子が全て Tg マウスの場合、背景を灰色とした。



ホモ同士個体の交配

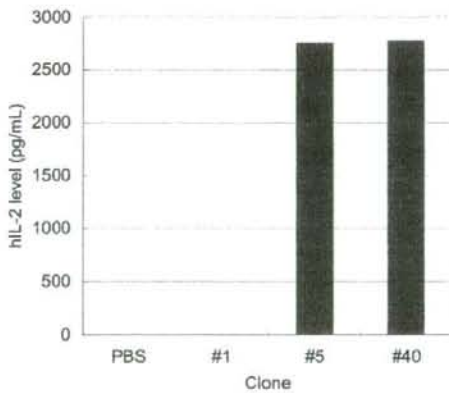
♂		♀
f34	X	f3
f10	X	f5
f24	X	f27



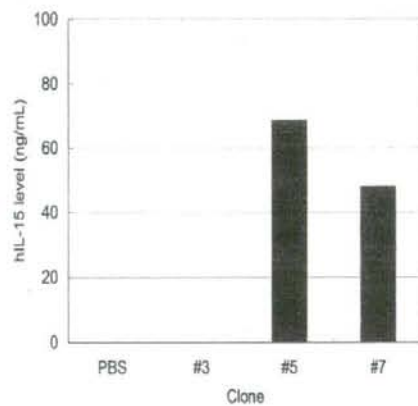
hIL-2: RNA was extracted from PWM-stimulated human PBMCs. cDNA was synthesized by RT-PCR.

hIL-15: cDNA (RDB1866) was obtained from RIKEN BioResource Center

図 1. Tg マウス作製用 hIL-2 および hIL-15 遺伝子の構築



clone	order	pg/mL
PBS	-	0
#1	vector only	2
#5	ordered	> 2,763
#40	ordered	> 2,780



clone	order	pg/mL
PBS	-	0
#3	Inverted	0
#5	ordered	68.7
#7	ordered	48.3

図 2. 遺伝子導入 COS-7 細胞上清中の hIL-2 および hIL-15 濃度

表 4. hIL-2 遺伝子顕微授精による Tg マウス作製実験結果

顕微注入実施日	帝王切開日	受精卵のマウス系統	Injection			
			加温胚数	操作胚数	移植胚数	%
2008.10.15	2008.11.4	NOG x NOD	240	196	110	56.1

産子						
出産子数	奇形または死亡胎子匹数	%	離乳子数	%	Tg陽性数	%
29	1	26.4	25	89.3	0	0.00

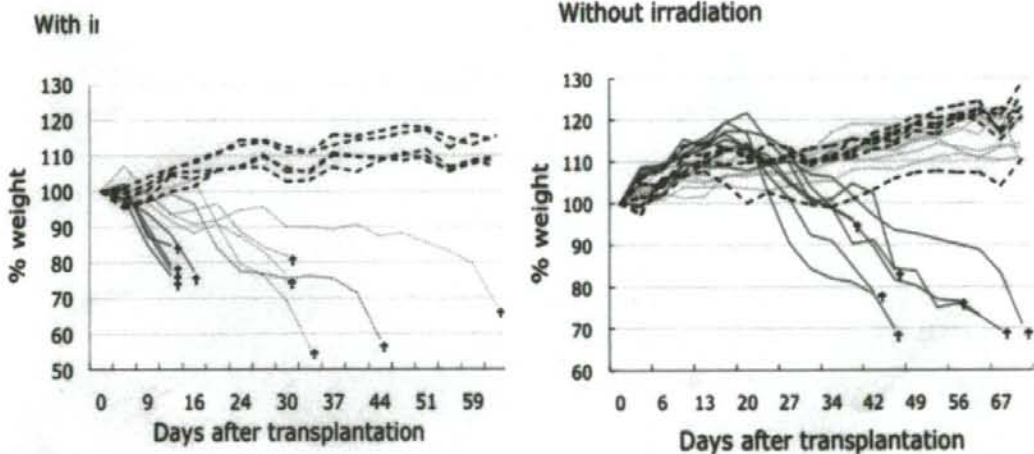


図 3. ヒト末梢血単核球移入後の NOG、BALB/cA-dKO および NOD-scid マウスの生存性の比較
 1×10^7 個のヒト PBMC を X 線未照射または照射 NOG (2.5 Gy)、BALB/cA-dKO (3.5 Gy) および NOD-scid (3.5 Gy) マウスへ尾静脈より移入した。実線は NOG マウス、太破線は BALB/cA-dKO マウス、細破線は NOD-scid マウスを各々示す。† は死亡を示す。

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

研究分担者 大隈和 国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長

平成 20 年度研究分担報告書

研究要旨：昨年度から、ヒト末梢血単核球(PBMCs)を移植しヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)が感染増殖可能になった重度免疫不全マウス（ヒト化マウス）を用いて HIV-1 感染実験モデルを構築し、そのモデルにおいて HIV-1 感染細胞を標的とする組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV)の HIV-1 感染に対する治療効果の評価することにより、組換え VSV を用いた新規抗 HIV-1/エイズ療法を開発し、ヒト化マウスを用いた HIV-1/エイズ医薬品評価系を確立することを目的に研究を進めている。昨年度は、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、この組換え VSV がヒト化マウスモデルにおいて R5 ウイルス感染を抑制することを示したが、組換え VSV の治療効果は HIV-1 感染細胞への感染効率に依存しているにも関わらずその感染性は比較的低いという問題点が残った。そこで本年度は、その問題点を改善するための研究を遂行した。昨年度報告した、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 を用いて、*in vitro*における R5 ウイルスの活性化ヒト PBMCs への感染に対する抑制効果を検討したところ、本組換えウイルスの顕著な抑制効果を確認することができた。次に、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ものの、その評価判定には今後さらに詳細な検討が必要であることが分かった。

A. 研究目的

現在利用可能な HIV-1 感染症/エイズに対する治療法として Highly active anti-retroviral therapy (HAART)が開発され、その有効性が示されたものの、薬剤の長期投与の必要性、その治療法では潜伏感染細胞には効果がなく体内から完全にウイルスを排除できないこと、副作用や薬剤耐性ウイ

ルスの出現による治療効果の減弱が見られる等、種々の問題点が明らかになった。そこでこれらの問題点を克服するために、これまでの治療薬とは作用機序の異なった新規 HIV-1/エイズ医薬品を開発することが必要とされている。

その新規治療薬を開発する目的で、米国 Yale 大学の Rose 博士等のグループにより作

製されたのが、VSVに基づいた、HIV-1 X4株 (X4 ウイルス) 感染細胞を標的とする組換えウイルスである。この組換え VSV は、遺伝子組換え技術によりエンベロープ蛋白 G 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ており、それらの分子をウイルス粒子上に発現している。本組換え 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れら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、細胞死を誘導する。その結果、X4 ウイルスは増殖の場を失うためその感染を制御できるのである。また我々は Rose 博士との共同研究で、サル免疫不全ウイルス (SIV) の感染細胞を標的とする組換え VSV を作製した。この組換え VSV は、G 蛋白の代わりに SIV 受容体であるアカゲザルの CD4、CCR5 及び DC-SIGN 分子を発現しており、*in vitro*において SIV 感染細胞を特異的に殺傷し、SIV 感染を顕著に抑制することができた。

このように、G 蛋白の代わりに HIV-1/SIV 受容体を発現する組換え VSV を用いて、HIV-1/SIV 感染細胞を標的とした新規抗 HIV-1/SIV/エイズ療法の開発研究が推し進められてきたが、これまで R5 ウイルス感染に対する組換え VSV の効果は明らかではなかった。そこで、昨年度は本研究 (Rose 博士との共同研究) において、R5 ウイルス感染細胞を標的とする組換え VSV を作製し、この組換えウイルスの効果をも *in vitro* 及びヒト化マウスを用いた感染実験系において評価判定し、本組換え VSV 及び薬剤評価系としてのヒト化マウスモデルの有用性を示した。感染実験動物モデルは欧米ではサルが主流である

が、その利用には制限があるため、我々はヒト化マウスを応用している。本研究課題においては、組換え VSV の評価を通して、HIV-1/エイズ医薬品の臨床前試験用としての「ヒト化マウスを用いた生体内薬剤評価系」を最適化しその確立を目指している。本年度は、組換え VSV の効果を *in vitro* 感染実験系においてさらに詳細に検討することでその有効性を再評価すると共に、HIV-1 受容体が発現するエンベロープ上に OX40L 分子を追加発現させることで組換え VSV を改良できるか (その効果を増強できるか) 検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 昨年度報告した、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し (ΔG)、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 G 蛋白の代わりに R5 ウイルス受容体を発現する組換え VSV (VSV ΔG -CC5) を使用した。

(2) またそのゲノムの CCR5 分子をコードする遺伝子の下流に OX40L (gp34) 分子をコードする遺伝子を追加挿入し、新規コンストラクトを作製した。このコンストラクトを、組換えワクチニアウイルス感染によってバクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼを発現させた BHK-21 細胞にトランスフェクションすることにより、G 蛋白の代わりに R5 ウイルス受容体及び OX40L (gp34) 分子を発現する組換え VSV (VSV ΔG -CC5gp34) を産生した。

コントロールウイルスとして、G 蛋白も HIV-1 ウイルス受容体も発現していない組換え VSV (VSV ΔG) と G 蛋白の代わりに X4 ウィ

ルス受容体を発現する組換え VSV (VSV Δ G-CC4) を準備し、VSV Δ G-CC5 や VSV Δ G-CC5gp34 と平行して使用した。但し、組換え VSV は全て、1 ラウンド目の感染効率を上げるために、G 蛋白を一過性に補完した。

(3) VSV Δ G-CC5 の R5 ウイルス感染に対する抑制効果を *in vitro* において検討した。具体的には、約 10^7 個のヒト末梢血単核球 (PBMCs) を抗 CD3 及び CD28 抗体で 3 日間刺激し活性化させ、その細胞にまず R5 ウイルスである HIV-1_{JR-CSF} 株を 2,000IU、3 日間感染させ、その後 Mock、VSV Δ G、VSV Δ G-CC4 或いは VSV Δ G-CC5 を *m. o. i.* 0.5 で接種した。細胞の培養液には、IL-2 を 20U/ml 添加した。組換え VSV 接種後 4 日目及び 8 日目に、各サンプルの PBMCs における CD4/CD8 分子の発現をフローサイトメトリー (FCM) で解析し、CD4 陽性細胞数減少 (HIV-1 の病原性) に対する組換え VSV の効果を比較検討した。また同時に CD3 陽性細胞内の HIV-1 Gag p24 の発現を FCM で解析することで HIV-1 感染細胞を検出し、その感染細胞に対する組換え VSV の殺傷効果を比較検討した。さらに同時に各サンプルの培養上清中の p24 値を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定することにより、HIV-1 の産生 (感染増殖複製能) に対する組換え VSV の抑制効果を比較検討した。

(4) 次に VSV Δ G-CC5gp34 の R5 ウイルス感染に対する抑制効果を *in vitro* において検討した。VSV Δ G-CC5 もコントロールに加え、(3) と同様の方法でそれらの組換え VSV の効果を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、琉球大学の感染微生物取り

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、本実験は全て 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) G 蛋白の代わりに R5 ウイルス受容体を発現する VSV Δ G-CC5 の *in vitro* における R5 ウイルス感染に対する効果：

組換え VSV 接種後 4 日目に PBMCs を FCM で解析したところ、Mock、VSV Δ G 或いは VSV Δ G-CC4 を接種した細胞に比べ、VSV Δ G-CC5 接種細胞では CD4 陽性細胞の軽度増加が認められ、HIV-1 の病原性の減弱傾向が見られた。また VSV Δ G-CC5 接種細胞において、Mock、VSV Δ G 或いは VSV Δ G-CC4 を接種した細胞に比べ、CD4 陽性 CD8 陽性細胞の増加が認められ、CD8 陽性細胞の活性化が示唆された。さらに CD3 陽性細胞中の p24 陽性細胞即ち HIV-1 感染細胞は、Mock、VSV Δ G 或いは VSV Δ G-CC4 を接種した細胞に比べ、VSV Δ G-CC5 接種細胞において著明な減少が見られ、VSV Δ G-CC5 のより効率の良い殺細胞効果が認められた。組換え VSV 接種後 8 日目の FCM 解析では、全てのサンプルにおいて細胞数の減少が見られたが、4 日目と同様の VSV Δ G-CC5 の効果が認められた。

次に組換え VSV 接種後 4 日目に p24 ELISA で培養上清中の HIV-1 産生量を測定したところ、Mock、VSV Δ G 或いは VSV Δ G-CC4 接種に比べ、VSV Δ G-CC5 接種により顕著な p24 値の抑制が認められ、VSV Δ G-CC5 のより優れた治療効果が見られた。また組換え VSV 接種後 8 日目の p24 ELISA では、全てのサンプルにお

いて p24 値の上昇が見られたが、4 日目と同様の VSV ΔG-CC5 の効果が認められた。

(2) G 蛋白の代わりに R5 ウイルス受容体及び OX40L (gp34) 分子を発現する VSV ΔG-CC5gp34 の *in vitro* における R5 ウイルス感染に対する効果：

組換え VSV 接種後 4 日目に PBMCs を FCM で解析したところ、Mock、VSV ΔG 或いは VSV ΔG-CC4、を接種した細胞に比べ、VSV ΔG-CC5gp34 接種細胞では CD4 陽性細胞の軽度増加が認められ、HIV-1 の病原性の減弱傾向が見られた。しかし VSV ΔG-CC5 接種細胞ほどは CD4 陽性細胞の増加は認められなかった。また VSV ΔG-CC5gp34 接種細胞において、Mock、VSV ΔG 或いは VSV ΔG-CC4 を接種した細胞に比べ、CD4 陽性 CD8 陽性細胞の増加が認められ、CD8 陽性細胞の活性化が示唆されたが、VSV ΔG-CC5 接種細胞ほどは CD8 陽性細胞の増加は認められなかった。さらに CD3 陽性細胞中の p24 陽性細胞は、Mock、VSV ΔG 或いは VSV ΔG-CC4 を接種した細胞に比べ、VSV ΔG-CC5gp34 接種細胞において著明な減少が見られ、VSV ΔG-CC5gp34 の効率の良い殺細胞効果が認められた。しかし VSV ΔG-CC5 接種細胞ほどは HIV-1 感染細胞の減少は認められなかった。組換え VSV 接種後 8 日目の FCM 解析では、全てのサンプルにおいて細胞数の減少が見られたが、4 日目と同様の結果が得られた。

次に組換え VSV 接種後 4 日目に p24 ELISA で培養上清中の HIV-1 産生量を測定したところ、Mock、VSV ΔG 或いは VSV ΔG-CC4 接種に比べ、VSV ΔG-CC5gp34 接種により著明な HIV-1 産生量の抑制が認められ、VSV ΔG-CC5gp34 の優れた治療効果が見られたが、

VSV ΔG-CC5 接種ほどは p24 値の抑制は認められなかった。また組換え VSV 接種後 8 日目の p24 ELISA では、全てのサンプルにおいて p24 値の上昇が見られたが、4 日目と同様の傾向が認められた。

以上から、VSV ΔG-CC5gp34 は HIV-1 感染に対してある一定の効果を示したけれども、今回の実験条件下では VSV ΔG-CC5 の効果を増強（感染性を改善）できるほどの結果は得られなかった。

D. 考察

本研究において、G 蛋白の代わりに 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 ΔG-CC5) の、*in vitro* における R5 ウイルスの感染・増殖性や病原性に対する治療効果を明らかにした。その効果は、HIV-1 感染細胞を標的とし殺傷する機構によることが示唆された。このことは、昨年度示された、ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染実験モデルにおける VSV ΔG-CC5 の有効性を確かに裏付けるものであり、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有望であることを示している。

またその組換え VSV の問題点（低感染性）を克服する目的で、VSV ΔG-CC5 において以下のことを試みた。HIV-1 の標的細胞である活性化 CD4 陽性 T 細胞に高発現する OX40 分子は、そのリガンドである OX40L 分子 (Tumor necrosis factor スーパーファミリー) との相互作用により細胞接着分子としても機能するため、組換え VSV 表面への OX40L 分子の追加発現は、その OX40L 分子の HIV-1 感染活性化 CD4 陽性 T 細胞上の OX40 分子への結合

により、組換え VSV の標的細胞への接着効率、感染効率を上昇させ、その結果その殺細胞効果を増強し、感染抑制効果をも向上させることが期待された。そこで本研究では、VSV ΔG-CC5 のゲノムに OX40L (gp34) 分子をコードする遺伝子を挿入し、OX40L 分子を追加発現する VSV ΔG-CC5gp34 を作製した。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 PBMCs 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 (PBMCs 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 PBMCs 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。

さらに VSV ΔG-CC5 及び VSV ΔG-CC5gp34 接種は、コントロールウイルス接種に比べ、CD8 陽性 CD4 陽性 T 細胞を増殖させ、CD8 陽性 T 細胞を活性化させることが示唆された。これは、昨年度報告した、ヒト化マウスを用いた感染実験モデル生体内のヒト CD8 陽性細胞に認められた増加現象と同様のものと考えられ、*in vitro* においても再現性が得られた。可能性としては、ヒト PBMCs 中に混在している抗原提示細胞が組換え VSV によって刺激され、サイトカインの産生が促進される等によって、CD8 陽性 T 細胞が活性化されたと考え

られる。もし増加した 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、組換え VSV と協同的に殺細胞効果を発揮したかもしれない。

今後、本実験で得られた結果を「ヒト化マウスを用いた感染実験モデル」で検証していく必要がある。本組換えウイルスのような新規 HIV-1/エイズ医薬品候補の効果を、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。昨年度用いられたヒト化マウス感染実験モデルは組換え VSV の治療効果を簡便に鋭敏に評価することができたので、その感染実験モデルを用いて、さらに OX40L 分子を追加発現させた新規組換え VSV も含めて検討し、新規医薬品候補としての HIV-1 受容体を発現する組換え VSV の開発を進めてゆく。またヒト PBMCs を重度免疫不全マウスに移植した HIV-1 の急性感染モデルだけでなく、ヒト造血幹細胞を移植した慢性 (持続) 感染モデルにおいてもその効果を検討していきたい。さらにそれらによって得られたデータを還元し、ヒト化マウスを用いた生体内薬剤評価系の最適化や確立に役立てたい。

E. 結論

本研究において、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 は、*in vitro* において R5 ウイルスの感染増殖性や病原性に対して顕著な治療効果を示し、ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染実験モデルにおいても同様の効果を示した (昨年度) ため、本組換えウイルスは新規 HIV-1/エイズ医薬品候補として有望であることが示唆された。また本組換え VSV への

活性化T細胞接着分子OX40Lの恒常的な追加発現は、本組換えVSVの効果を増強させる迄には至らなかったが、ある一定の治療効果を示し、さらに検討の余地を残した。今後は、OX40L分子を追加発現する新規組換えVSVを含めて、*in vitro*だけでなくヒト化マウス感染実験モデルにおいても評価を重ね、より効果的にHIV-1感染/エイズを制御する組換えVSVを開発すると共に、その開発研究を通してヒト化マウスを用いた治療薬評価系の最適化・確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Matsuzaki G, Ansari AA, and Tanaka Y. Rapid induction of OX40 ligand on primary T cells activated under DNA-damaging conditions. *Hum Immunol*. 69(9):533-42, 2008.

(2) 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. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233(6):721-31, 2008.

2. 学会発表

(1) Okuma K, Tanaka R, Buonocore L, Rose J, and Tanaka Y. A novel potential

anti-HIV-1 therapeutic based on a vesicular stomatitis virus expressing HIV-1 receptors and OX40 ligand. XVII International AIDS Conference, Mexico City 3-8 August 2008, Conference Programme p130.

(2) 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).

(3) 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).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

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-

研究分担者 藤田次郎 琉球大学大学院医学研究科内科学分野 教授

平成 20 年度研究報告書

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 Nelfinavir 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。

A. 研究目的

HIV 感染者の予後が、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 (Nelfinavir 含む) 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。Nelfinavir (NFV) は PI 剤としての作用以外に、NFkB を介した細胞へ作用を示すことが報告されている。今回 HCV-replicon system を用い、HCV の複製に対する NFV の作用と Interferon (IFN) との相乗作用について検討を行った。

B. 研究方法

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、luciferase 活性値と NSSA 蛋白量で HCV 増殖の評価を行った。NFV の細胞傷害性、細胞アポトーシスの誘導作用について LDH 試験、

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) 法, TUNNEL 染色法にて評価を行った。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。classical isobologram を用い、NFV と IFN の HCV-replicon に対する相乗効果を調べた。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

NFV は、HCV-replicon 増殖を濃度依存性に抑制した (図 1)。その効果は HCV 非構造タンパク NSSA に対する抗体によるウェスタンブロットでも確認した (図 2)。HCV-replicon 増殖を抑える濃度において NFL は細胞傷害性、細胞アポトーシスの誘導を認めなかった。(図 3、図 4、図 5)。IFN は HCV-replicon 増殖を濃度依存性に抑制し (図 6)、NFV の同時投与により、その効果は増強した (図 7)。NFV、IFN の HCV-replicon に対する IC50 はそれぞれ 9.88 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0991U/ml であった (図 8)。NFV と IFN に関して classical isobologram を用い、