

200908008A

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21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22(2010)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：ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染・エイズ予防樹状細胞免疫
エイズワクチン評価系の基盤開発
- (2) 小柳義夫：ヒト化マウスを使った HIV-1 感染によるヒト CD8 陽性 T 細胞の増殖
反応解析
- (3) 山本直樹：ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた HIV 感染モデルの作製
- (4) 伊藤 守：「ヒト化マウスの基盤となる免疫不全マウスの開発と供給」に
関する研究
- (5) 大隈 和：ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染細胞を標的とする組換えウイルス
VSV の HIV-1 感染に対する治療効果の評価
- (6) 藤田次郎：C型肝炎ウイルス増殖に対する HIV protease inhibitor の作用に
関する研究
HIV 感染症における病状進行速度の臨床検討
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

研究課題：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21年度総括研究報告書

研究代表者：琉球大学 大学院医学研究科 田中勇悦

課題番号：H19-政策創薬-一般-008

研究期間：平成21年4月～平成22年3月

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所エイズ研究センター 山本直樹
- (2) 京都大学ウイルス研究所 小柳義夫
- (3) (財)実験動物中央研究所 伊藤守
- (4) 琉球大学大学院医学研究科 藤田次郎
- (5) 国立感染症研究所 大隈和

研究要旨

ヒト化マウス作製の基盤となる重度免疫不全マウスの作出・維持・供給、それぞれのマウス系統の特性に基づいたヒト化技術改良、およびこれらヒト化マウスの新規エイズワクチンと治療薬評価系への応用に関する研究において最終年度の研究を行った。まず、2種類の超免疫不全マウス系統の比較研究では、成人の末梢血単核球(PBMC)移植には強いGVHDを起こさないBALB/cA-RAG2^{null} IL-2R γ ^{null}マウスが適当であり、ヒト臍帯血由来造血幹細胞(HSC)移植ではNOD-scid, IL-2R γ ^{null}(NOG)マウスが適当であることを検証した。さらにヒトIL-2やIL-15を分泌する新規免疫不全マウスを作出しその適用を検討している。

我々のヒト化マウスは用途に応じて使い分けることにより、R5指向性およびX4指向性HIV-1の急性感染と慢性感染を再現できるため、エイズワクチン・薬剤の評価系モデルとしてその有用性が示された。さらにHSC移植ヒト化マウスでは、ヒトリンパ腫発症が再現できるためエイズ日和見感染の治療を目的とした薬剤等の評価にも応用できると期待される。

一方、ワクチン評価系としてのヒト化マウスを普及化するため、樹状細胞(DC)の分化培養方法を樹立し、DCを免疫に用いることによりHIV-1感染を抑制するT細胞免疫応答を惹起できることを検証した。また、HIV-1がIFN- α 誘導を介してミエロイドDCの分化阻害を起こすメカニズムを明らかにした。

新規エイズ治療法として開発したHIV-1の受容体とOX40Lを発現する組み換えVSVは、HIV-1感染細胞を破壊することによりHIV-1増殖を著明に抑制することから臨床応用への可能性が示された。基礎研究成果を臨床に応用するため、沖縄県におけるHIV感染症の臨床像を探り最近ではAIDS発症までの進行が早くなっていることが明らかとなりその対応が急がれる。

A. 研究目的

エイズ治療には化学療法が功を奏しているが、耐性ウイルスが出現することや副作用等の重大問題が浮上している。HIVに対するクラシックワクチンはすべて失敗に終わっている。そのため、国内外で新た

な作用機序に基づく新規薬剤、新規ワクチン法や免疫療法の開発が切望されている。本研究は個体レベルで新規エイズ薬やワクチンの評価に不可欠な小型動物モデル“新規ヒト化マウス”を開発し、その最適化と普及化を図ることにより我が国内外でのエイズ戦略に寄与することを最終目

的とする。平成21年度は3年間の総括年であり、HIV感染動物モデルとしてのヒト化マウスのさらなる改良と応用性について検証、組み換えVSVを用いる新規治療法の検証、および最近のエイズの臨床像の特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

これまで日本で独自に開発された“超”免疫不全マウスであるNOGやBALB/cA-RAG2^{tm1.1} IL-2Rγ^{tm1.1}マウス、さらにこれらのマウスをベースにした人のサイトカインを産生する遺伝子改変マウスは、(財)実験動物中央研究所(実中研)で作製、繁殖され供給された。このマウスを用いて成人末梢血単核球(PBMC)や臍帯血由来造血幹細胞(CD34⁺)を移植し、ヒト化マウスを作成するが、本年度も移植技術のさらなる最適化を図った。

PBMCはマウスの脾臓内および腹腔内に移植、CD34⁺造血幹細胞はi.v.または新生児期の肝臓内に移植された。感染に使ったHIVは細胞指向性の異なるHIV-1クローン株を用いた。感染の評価には、抗原測定、ウイルス遺伝子測定、あるいは細胞表現形解析を用いた。樹状細胞の分化培養には、精製単球のみならず、未精製PBMCを用い、比較研究を行って決定された最適なサイトカインカクテルを使って培養した。感染実験は、各施設のP3実験室で行った。

(倫理面への配慮)本研究は各研究機関のバイオハザード委員会、動物実験委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会、倫理委員会の承認を得て行う。ヒトサンプルの使用については各所属機関の倫理委員会の規定に従い、細胞材料入手は提供者の同意を得て行い、遺伝子解析等の解析はHIVの感染定量に限定し、その人の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

C. 研究成果

本研究では、免疫不全マウスシステムの維持と新規マウスの開発、それらのヒト化によるHIV-1感染実験法の確立、日本人由来臨床HIV-1株の分離と樹状細胞ワクチンの検討、およびHIV感染細胞を攻撃する新規治療法の開発への基盤作りを進めた。

(1)動物改良では、これまで日本で作製された免疫不全マウスであるNOGやBALB/cA-RAG2^{tm1.1} IL-2Rγ^{tm1.1}マウスに加えて、ヒト細胞の生着を促進するヒトIL-2やIL-15を分泌するマウスを確立しそのHIV-1研究への応用性について検証に入っている。

(2)HIV抑制薬のin vivo評価系として、ヒトPBMCまたはヒトCD34⁺造血幹細胞を移植するマウスの両システムの作製技術を確立できている。これらの系では、臨床的に重要な2種類のHIVグループ(CCR5指向性およびCXCR4指向性HIV)に対する薬剤効果判定が可能である。CD34⁺造血幹細胞移植マウスの利点は、HIVの慢性持続感染、T細胞異常や日和見感染をも再現できることであり、今後、エイズ関連腫瘍を伴うHIV治療に対する種々の薬剤や治療法の評価が可能である。本研究班では特にEBV腫瘍併発モデルの作製に成功しており、その治療技術開発面への利用が期待できる。

(3)独創的な試みとして、PBMC移植マウスを用いて行ってきたワクチン評価系の開発ノウハウは、新たなワクチン療法としてHIV-1治療への可能性が期待されている“樹状細胞ワクチン療法”評価への応用も可能である。その準備として機能的な樹状細胞をin vitroで分化誘導する培養方法の改良、および抗原として用いる自家HIVの分離法、およびHIVの不活化法と免疫方法の基盤が確立された。つまり、本研究では、短期間で免疫賦活能を持つ樹状細胞を分化培養する方法を開発および簡素化し、そのHIV-1抑制効果を実際に明らかにできた。さらに、日本人由来のHIV-1パネル作製を進めるため、未治療患者から野生型HIV-1株の分離を進め、その効率的増殖と不活化の方法についても検討を加えている。この方法は自家HIVをワクチン源として用いる次世代のエイズ樹状細胞ワクチンへの応用が可能である。

(4)新たな試みとして、米国で考案されたウイルスを使ったHIV感染細胞を攻撃する方法である組換えVSVを用いた治療法の改良とその効果の評価を図っている。既に作製されている、HIV-1 X4株(X4ウイルス)感染細胞を標的とする、X4ウイルス受容体ヒトCD4及びCXCR4分子を発現する組換えVSVをもとにその感染性が向上した新規組

換え VSV の作製を試みた。そのために、活性化 T 細胞接着分子 OX40 に対するリガンド (OX40L) をコードする遺伝子を VSV ゲノムに挿入し、CD4、CXCR4 分子に加えて 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や治療効果を *in vitro* 感染実験系において検討したところ、X4 ウイルス感染細胞に対する感染効率が顕著に向上し、X4 ウイルス感染を著明に抑制することができた。このことから、X4 ウイルス受容体に加えて OX40L を発現する組換え VSV は、より治療効果の高い新規治療薬候補である可能性が見いだされた。

(5) 沖縄県における HIV 感染症の臨床像を探ることを目的とした研究では、まず 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。また HIV 感染後、AIDS 発症までの期間または免疫能低下をきたすまでの期間が従来考えられていたより進行が早くなっている可能性が高いことが示唆された。さらに AIDS 関連播種性非結核性抗酸菌症が播種に至る要因として、末梢組織における細胞性免疫能低下が原因であり、播種は第一にリンパ行性に起きることが明らかとなった。

D. 考察

本年度は、当初の計画に従って研究を進め、基本的な目標の達成ができたと評価したい。とりわけ、使用マウスの改良とヒト化の最適化と簡素化、およびヒト化マウスの実験利用範囲の拡大を図ることができた。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義については、厚生労働省の課題でもある日本のエイズ戦略に貢献するために、新規エイズ医薬品やワクチンの実効性を前臨床試験として評価できる小型汎用動物として応用範囲の広い「ヒト化マウスを用いた評価系」を開発したことは学術的にも社会的にも意義のあることだと考える。同様な評価系としてサルを用いる系があるが、それと比較するとヒト化マウスは、HIV を用いて薬剤の効果が直接観察できること、多数の検体を処理できること、および優れた経済性などから、HIV 感染抑制・エイズ克服を目的としたわが国の新規エイズ医薬品・ワクチンの

開発において貢献度が高いと考える。さらに本研究でなされた評価系開発では、動物とプロトコルの改良とともにモデル全体の簡素化がなされているので、今後の普及と実用が期待できる。したがって本研究成果は、直接的には日本の HIV 研究のレベルアップに寄与し、間接的には将来 HIV 感染症から国民を守ることおよび国際社会への平和貢献にもつながると期待される。

今後は、HIV の変異にも対応する治療を確立するために、患者個人個人の HIV を対象とした治療薬選択やテラーメイド樹状細胞ワクチン等の新規エイズ治療開発に本成果が応用されることを望んでいる。

結論として、平成 21 年度の締めくくり研究をもって、HIV 抑制薬やワクチンおよび新規治療法開発の基盤をなす評価系として、ヒト PBMC およびヒト造血幹細胞を移植した 2 系統のヒト化マウスの作製技術を樹立し、それらを用いた HIV 感染実験による創薬評価の基盤を確立したことを報告できた。

E. 研究発表

- 1) 国内学会発表：38 件
- 2) 論文発表：21 件

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

II. 分担研究報告

研究課題：ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染・エイズ予防樹状細胞免疫エイズワクチン評価系の基盤開発

田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

平成 21 年度研究分担報告書

研究要旨：

単球を精製することなく未精製のままの末梢血単核球（PBMC）を材料に、独自のサイトカインカクテルで培養することによって、2 日間で機能的な免疫刺激樹状細胞（DC）を誘導できること、さらにこの DC（PBMC-DC）を不活化 HIV で感作して免疫に用いるとヒト化マウスにおいて HIV-1 感染を抑制する T 細胞免疫応答を惹起できることを検証した。この方法は、単球を高価なキットを使って精製する必要がないことから単球のロスがなく、機能的 DC 培養の“時間と操作面”においても簡略化された“最良のプロトコル”であると考えられる。また、今回の研究で、一般の方法での DC の分化培養において、HIV-1 が PBMC 中の pDC に作用して 1 型 IFN（特に IFN- α ）を産生させ、それが単球のアポトーシスを引き起こし、最終的にミエロイド DC の分化阻害を起こすことを明らかにした。興味あることに、TNF(α および β) が HIV-1 による PBMC からの DC 分化阻害を解消することを見いだした。

A. 目的

樹状細胞（dendritic cell: DC）は組織学から命名された細胞の名前であるが、DC は抗原提示機能を持ち、後天性免疫応答の誘導・調節機能を担当する。そのため、DC は我々が感染症から身を守るためには不可欠な細胞群である。一般に、DC の働きが弱い患者の末梢血液や骨髄液から単球や骨髄細胞などの DC 前駆細胞を採取し、それらを試験管内で人工的に分化培養させ、同じ患者に戻す療法は“DC 免疫療法”と呼ばれ、特にガンの治療などに応用されていることは周知の通りである。移入された DC は体内のリンパ節等に移動し、T 細胞に抗原提示を行い、免疫応答を惹起あるいは増強すると考えられている。HIV-1 感染者においては、末梢血中の樹状細胞の減少や機能の低下が見られることから、DC 不全が免疫不全と関係するこ

とが示唆されている。

現在、DC の試験管内分化培養は一般の研究室でも可能になったが、手技はまだまだ煩雑であり、かかる費用は決して安くはない。将来、多くの患者を対象とするには、より簡便で安価な方法を開発する必要があると考えられる。そこで、本研究では、ヒト化マウスの実験モデルと *in vitro* の系を用いて、エイズの DC 細胞免疫療法の基盤作りを図るため、まずは DC の分化培養の簡素化を検証した。同時に、HIV がもつ DC 分化抑制効果のメカニズムの解明とその対策を開発することを目的とした。

B. 方法

（1）DC 培養の短期化：健常人の末梢血から密度勾配遠心法により末梢単核細胞（PBMC）を分離し、未精製のまま、あるいは

CD14 陽性細胞を市販の negative beads-selection kit (Dyna) で分離した。これらの細胞を、ヒト GM-CSF、IL-4 および IFN-beta を添加して培養し、1 日目に poly I:C と検討する抗原である KLH、OVA や不活化 HIV-1 (p24 で 50 ng 相当) を加えて成熟および抗原感作をさらに 2 日間行った。免疫不全 BALB/cA-RAG2^{tm1} IL-2R γ ^{tm1} マウスを麻酔し、その脾臓内に (1) 分化誘導し抗原を感作あるいはしない 30 万個の DC (単球由来または PBMC 由来) と (2) 300 万個の自家 PBMC を混合して 0.1 ml の 0.1% BSA-PBS に浮遊させ移植した。アロンアルファで切開した皮を閉じ、麻酔覚醒を確認したのちに飼育ケージに戻した。1 週間後、さらに同様に調製した 30 万個の DC を腹腔内追加免疫した。さらに一週間後、マウス脾臓と腹腔から細胞を調製し、ヒト型の T 細胞免疫応答を IFN-gamma の産生で検討し、抗体の産生は抗原を塗布したプレートを用いる ELISA で検討した。また、感染実験では、1000 万個の PBMC を i. p. 追加接種し、翌日、CCR5 使用 HIV-1JR-FL を攻撃接種した。感染の有無を血中、腹腔洗浄液、および培養細胞上清中の p24 アッセイで検討した。(添付の実験プロトコル図を参照) CD4/CD8 は、多重染色法により、HLA-class I 陽性細胞にゲートした細胞を解析して求めた。

(2) HIV-1 による DC の分化培養阻害実験では、健常人由来 PBMC や単球を GM-CSF と IL-4 培地で 5 日間培養する系に、不活化 (AT-2 処理) 下 HIV-1 IIIB、HIV-1NL4-3 または HIV-1JR-CSF を 50 ng/ml p24 相当を培養初期から添加した。分化阻害は、表現形解析と培養後の生 DC 数で判定した。この系に、種々のサイトカインや抗体を添加培養し、HIV の DC 分化阻害への効果を検討した。DC 分化阻害は、細胞の大きさ、表現形 (FCM 解

析) から示される生 DC の数で判定した。抗体やサイトカイン、ELISA キットは市販のものをを用いた。

C. 結果

(1) 新規 2 日間 DC 分化培養法: 我々の新たな方法は、未精製 PBMC から DC を 2 日間で分化培養する方法である。試験管内の実験では、この方法で調製された DC (PBMC-DC) は一般の方法で 5~7 日間で培養された DC (conventional DC) と比較して機能に大差はなく、むしろ CD8⁺T 細胞の活性化においては勝る活性を示す。FCM で測った表現形は、PB-DC は CD80, 83, 86, MHC-class-I/II を強く発現し、CD14 は陽性である。また、アロ T 細胞の刺激活性も強い。そこで、次にヒト化マウスでその免疫誘導効果を検討した。培養 1 日目に外来抗原 (BSA や KLH) を一晚感作させた DC を自家 PBMC とマウスの脾臓に接種し、一週間目に DC (抗原感作済み) の追加免疫を行うと、次の 1 週間目には、ヒト化マウス体内でヒト型の抗原特異的 T 細胞および B 細胞の誘導が確認された。そこで、次に不活化 HIV-1 抗原に対する応答を検討した。DC 免疫されたマウスから分離した細胞群を調べると、抗原提示細胞と HIV-1 で刺激した場合に IFN-gamma 産生が見られた。つまり、HIV 抗原に対する Th1 細胞免疫応答が誘導されたことが確認できた。HIV-1 で感作しなかった DC 免疫マウスではこのような反応は認められなかった。HIV-1 免疫マウスの血清を ELISA で調べたが、どれも HIV-1 特異的抗体は検出できなかった。興味あることに、これら HIV-1 感作 DC 免疫マウスは、CCR5 を使用する HIV-1 の攻撃感染に対して防御されることが確認できた。したがって、PBMC-DC の in vivo での効果が期待できる。

(2) HIV による DC 分化阻害と対策：精製単球から conventional DC を培養する方法と同様に、PBMC を一般的な DC 誘導サイトカインカクテルである GM-CSF と IL-4 のみを含む培地で培養すると、5 日目までに精製単球の培養と同様に PBMC から CD11c⁺CD83⁺CD86⁺の未熟型の表現形をもつ DC が他の T や B 細胞の混在下ではあるが分化することが確かめられた。DC の収量もほぼ同等であった。次に DC の HIV 抗原感作のタイミングを検討した。この系に、培養初日から不活化 HIV-1 を添加することにより、添加量依存的に DC の分化が阻害された。最終の収量は HIV なしの場合と比較して 1/2 以下に低下した。残存する大型の細胞群は、表現形から推定すると CD11c⁺CD83⁺CD86⁺の成熟 DC であった。残存 DC のアロ T 細胞刺激活性は、conventional DC と比較して Th1 誘導能が有意に低かった。以前より、IFN- α が、DC の分化を阻害することが報告されている。そこで PBMC と単球のそれぞれの培養初期から 1 型 IFN を添加してみると、どちらの細胞群からでも DC の分化阻止が観察された。さらに、同様な効果は、PBMC に TLR-3 のアンタゴニストである poly I:C を添加することでも観察された。したがって、DC の分化阻止の原因は 1 型 IFN にあることが示唆された。さらに DC の分化阻害は、anti-type-I IFN receptor 抗体で解除された。type-I IFN は主に plasmacytoid DC (pDC) が外来抗原の刺激に反応して産生されることから、pDC の関与を調べるために、CD123 ビーズをもちいて PBMC から pDC を除去すると、IFN- α の産生が抑制され、同時に HIV による DC の分化阻害が緩和された。興味あることに、培養液に TNF を添加すると HIV-1 や poly I:C の効果が抑制され DC 前駆細胞のアポトーシスが解除された。その一因として、TNF が IFN- α の産生を抑制すること

が考えられた。

D. 考察

本年度の研究結果は、今後、DC 免疫療法法の基盤をつくる上で重要な結果であると考えられる。具体的には、(1) 精製単球を用いることなく未精製のままの PBMC から独自の方法を用いることによって短期間で DC が誘導できること、(2) この DC は抗原特異的なヒト型の T 細胞および B 細胞をヒト化マウスで誘導すること、(3) さらにこの DC を不活化 HIV で感作して免疫に用いることにより、CCR5 使用 HIV-1 感染を抑制する T 細胞免疫応答を惹起できることを検証した。

現在の DC 免疫療法では克服すべき問題点がいくつか指摘されている。その中には、培養が高価であることと方法が煩雑であることが含まれる。そのため、機能的に優れた DC をより簡単により安価に分化誘導する方法を見だし、普及することが要求される。一般に用いられる 7 日間の DC の培養方法と比較して、今回開発した方法は、DC 分化培養期間は最短で 2 日間であり、単球を高価なキットを使って精製する必要がないことから、単球のロスがなく、機能的 DC 培養の“時間と操作面”においても簡略化された“最良のプロトコル”であると考えている。

今回、ヒト化マウスで誘導された HIV-1 感染阻止免疫は、我々がかつて発表した CD4 因子を含むと考えられる。この因子は未同定であるが、現在もその同定作業を継続して進めている。今後、さらにこの DC 免疫療法をレベルアップしてゆくには、自家 HIV-1 の分離増殖法と感作条件（時期、期間、量、不活化法）の改良が必要である。特に、不活化 HIV-1 による DC の分化および機能阻害には細心の注意が必要である。

今回の研究で、conventional DC の分化培養において、HIV-1 が PBMC 中のプラズマサイトイド DC (pDC) に作用して 1 型 IFN (特に IFN- α) を産生させ、それが単球のアポトーシスを引き起こし、最終的にミエロイド DC の分化阻害を起こすことを明らかにした。このようなメカニズムが生体内でも起きている可能性が十分に考えられる。HIV-1 による PBMC からの IFN- α 産生と DC 分化抑制が抗 CD4 抗体で抑制されること、さらに抗 CD4 抗体は IFN- α による単球からの DC 分化を抑制しないことを考え合わせると、HIV-1 による DC 分化抑制には CD4 は直接関与していないことが示唆される。また、pDC 上の CD4 分子に HIV-1 が結合することにより IFN- α の効率のよい産生が促されると推定される。これは、CD4 依存的に HIV-1 の細胞質内エンドソームへの取り込みがなされ、TLR-7 や 9 の刺激がより効率的に起こるといふ他の論文発表と一致する。興味ある結果は、TNF (α および β) が HIV-1 による PBMC からの DC 分化阻害を解消したことである。その詳細なメカニズムの解明は今後の研究に託されるが、炎症反応を引き起こす TNF が 1 型 IFN 受容体の発現を抑制するのではなく、TNF は pDC に作用して IFN- α 産生を調節していることは明らかである。

E. 結論

樹状細胞免疫を行うことによって、ヒト化マウスをワクチン評価モデルとして応用できる。評価は、実際に HIV-1 感染後のウイルスの増殖抑制と CD4⁺T 細胞の枯渇抑制試験で行う。本研究で開発した樹状細胞の安価、簡便そして短期間で分化培養する方法は、一般の方法に勝る方法であり、今後の普及が期待される。また、HIV-1 は樹状細胞分化を阻止

する活性があるが、本研究では、そのメカニズムと対策も検討できた。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物実験委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全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) Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated HIV-1: involvement of type-I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunol*, in press
- (2) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R^{gnull} mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, in press
- (3) 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* 386:23-31, 2009.
- (4) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and

extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2940-48, 2009.

- (5) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ manull mice. *Virology* 394(1):64-72, 2009
- (6) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol* 183:524-32, 2009.

2. 学会発表

国外

- 1) 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.

国内

- 1) 児玉晃, 張麗峰, 田中礼子, 田中勇悦. HIV-1 によるミエロイド樹状細胞のアポトーシスと成熟促進に関与する宿主細胞因子. *日本エイズ学会誌* 第23回日本エイズ学会学術集会・総会, 2009年、愛知県.
- 2) 田中勇悦, 児玉晃, 張麗峰, 田中礼子. エイズ制御を目的とする樹状細胞(DC)免疫: DCの簡単培養法とヒト化マウスでの評価. *日本エイズ学会誌* 第23回日本エイズ学会学術集会・総会, 2009年、愛知県.
- 3) 田中礼子, 田中勇悦. OX40共刺激を介する活性化PBMCでのCCR5 HIV-1の感染抑制. *日本エイズ学会誌* 第23回日本エイズ学会学術集会・総会, 2009年、愛知県.
- 4) 田中勇悦, 田中礼子. AIDSに対する樹状細胞免疫. 第50回日本熱帯医学会大会シンポジウム, 2009年、沖縄県.
- 5) 田中勇悦. エイズ制御を目的とする樹状細胞免疫: ヒト化マウスを用いた研究. *日本薬学会フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシロジーシンポジウム*, 2009年、沖縄県.

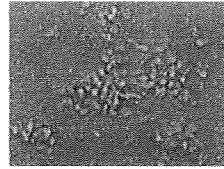
H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

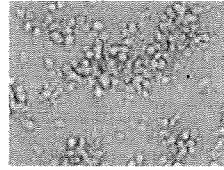
樹状細胞分化培養法におけるソース

(PBMCからの精製コスト)

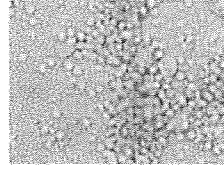
Monocytes from PBMCs
(1×10^7 cells: ~ ¥20,000)



Adherent cells from PBMCs
(1×10^7 cells: ~ ¥100)



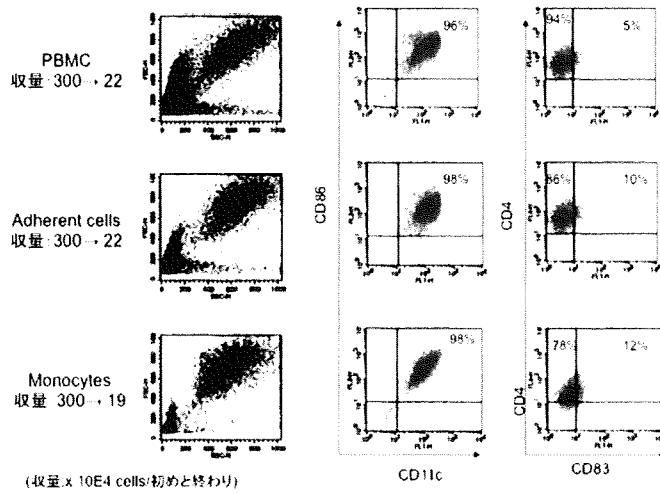
Fresh PBMCs
(¥0)



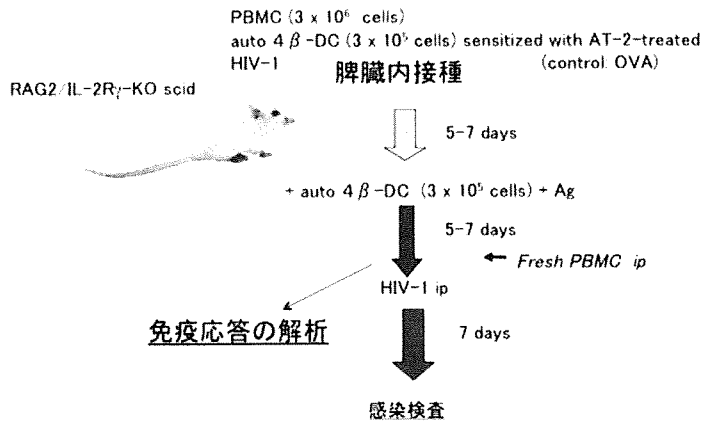
IL-4&GM-CSF
Day 7

(×100)

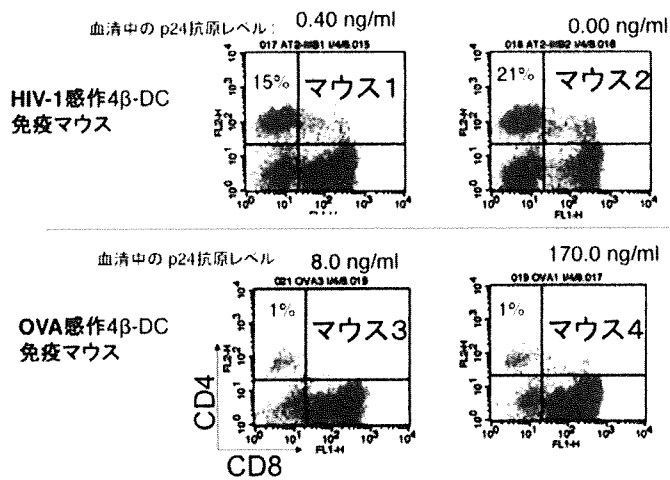
DC分化誘導の簡素化: 単球精製過程のスキップ



不活化HIVで感作した樹状細胞免疫はHIV感染を防御するか？
ヒト化マウスを用いたin vivoモデル



不活化HIV-1で感作した4 β -DCで免疫したヒト化マウスでは
R5 HIV-1感染とCD4⁺T細胞の枯渇が抑制される



厚生労働省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

研究項目：ヒト化マウスを使った HIV-1 感染によるヒト CD8 陽性 T 細胞の増殖反応解析

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 Chuanyi Nie 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 21 年度研究分担報告書

研究要旨

新生児免疫不全マウスにヒト血液幹細胞を移植したヒト化マウス (NOG-hCD34 マウス) に HIV-1 感染実験を行い、ヒト CD4 と CD8 陽性 T 細胞の増殖反応解析を行った。NOG-hCD34 マウスでは、持続的なウイルス増殖の結果、高ウイルス血症と p24 陽性のウイルス産生細胞の検出、CD4 陽性細胞の減少がみられた。そして、この高ウイルス血症の間に、興味あることに CD8 陽性細胞の一過性の増加反応がみられた。本研究は、NOG-hCD34 マウスにおいては、T 細胞の反応性増殖が再現できることがわかった。HIV-1 感染者においては、T 細胞の反応性増殖が報告されているが、どのような作用機序により HIV-1 感染個体内にこの反応を誘導するかこの実験系により解析が可能であることがわかった。

A. 研究目的

HIV の持続感染は 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。本研究の目的は HIV-1 感染によるウイルス病原性の解析とウイルス感染に対する生体反応を解析し、エイズ治療法ならびにワクチン開発の基盤情報を得ることである。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、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、持続感染するために、エイズに対する根治は不可能である。一方、HIV-1 感染者には少数ではあるが、ウイルスに対する免疫応答能が減弱せず、生涯にわたりエイズ発症から免れるエリートコントローラーの存在が以前から知られている。このエリートコントローラーがどのような理由によりエイズ発症から免れているのかを明らかにし、有効な薬剤ならびにワクチンを開発することはきわめて重要である。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-1 を感染させ、HIV の持続的ウイルス産生を誘導した環境において、ヒト CD4 陽性ならびに CD8 陽性 T 細胞の増殖反応を解析した。エイズ治療ならびにワクチンの開発戦略に有益な情報が得られた。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) 新生児 NOG マウスへの臍帯血移植実験

MACS 磁気細胞分離法を用いて臍帯血より

CD34 陽性細胞（陽性率 95%以上）を分画した。そして、放射線照射（0.1 Gy）新生児免疫不全マウス（NOD-SCID とコモン gamma 鎖ノックアウトマウス：NOG）の肝臓へ $0.5-1 \times 10^5$ 個の CD34 陽性細胞を移植した。移植後、28 - 44 週の間に解剖を行い、骨髄、脾臓、リンパ節、胸腺を採取した。

2) HIV-1 感染とウイルス RNA の測定

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。感染後、3 週毎に採血し、ウイルス RNA 量を Amplicor HIV-1 monitor v1.5 according (Roche Diagnostics) にて測定した。

3) flow cytometry 解析

CD45、CD3、CD19、CD4、CD8、CD14、CD34、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。3 週毎に採血を行い、flow cytometry により CD45、CD3、CD19、CD4、CD8 発現細胞の割合を測定した。HIV-1 感染後に脾臓を採取し、Ficoll によりヒト細胞を分離し、CD45、CD3、CD19、CD4、CD8、CD45RA に対するそれぞれの単クローン抗体や 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測定した。

（倫理面への配慮）

本動物実験の施行にあたり、本学実験施設に設置されている実験動物委員会から動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な実験施行を行うように指導を受けた。すべての実験は本委員会より承認されている。

C. 研究結果

1) HIV-1 持続感染マウスの確立

HIV-1 持続感染環境を再現するために、ヒト臍帯血由来の CD34 陽性細胞を移植した NOG-hCD34 マウスを作製した。移植後のマウス末梢血、骨髄、脾臓、リンパ節、そして胸腺には、ヒト CD45 陽性白血球、CD3 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞、CD4 ならびに CD8 陽性 T 細胞、CD14 陽性単球、CD34 陽性細胞が移植後 28 週から 44 週まで、それぞれの臓器に分布していた (表 1)。

この NOG-hCD34 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 - 10^6 コピーと高ウイルス血症を維持していた (図 1 A)。このマウスを 18 週目に解剖し、脾臓ヒト細胞を HIV-1p24 に対する抗体を用いて p24 陽性細胞 (すなわち HIV-1 産生細胞) が約 2-20% 検出された (図 1 B)。3-15 週の末梢血における CD4 と CD8 陽性細胞率は感染マウスでは減少していた (図 1 C)。さらに 18 週の時点での脾臓 CD4 陽性細胞は、非感染マウスでは明らかに増加していたが、感染マウスでは減少していた (図 1 D)。

2) HIV-1 感染マウスにおける CD8 陽性細胞の増加

次に CD8 陽性細胞の割合を検討した。接種後 10 週の末梢血における CD8 陽性細胞は非感染マウスのそれに比べ、感染マウスでの割合は明らかに増えていた (図 1 E と I)。3-28 週までの末梢血の解析では非感染マウスでは一例 (図 1 F と G の矢印) を除いて、増殖は見られなかったが、感染マウスでは全例において CD8 陽性細胞の一過性の増加がみられた (図 1 J)。この CD8 陽性細胞は例外なく、CD45RA 陽性ではなく CD45RA 陰性の細胞であった (図 1 K と L)。

D. 考察

NOG-hCD34 マウスでは HIV-1 の持続感染が成立し、脾臓に HIV 産生細胞が検出され、この多くは 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を昨年報告した。今回はこの感染マウスの末梢血では、CD8 陽性細胞が一過性に増殖することを見出した。そして、この CD8 陽性細胞は例外なく CD45RA 陰性のメモリー細胞に分類される細胞であることがわかった。

これらの結果は、HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスを用いて、CD4 陽性細胞の減少とともに CD8 陽性 T 細胞の活性化が再現されることがわかった。この CD8 陽性 T 細胞がエリートコントローラーに効率よく誘導されている HIV-1 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) であるかの検討は

行っていない。今後の課題である。しかし、ヒト血液幹細胞移植したヒト化マウスに HIV-1 抗原特異的な CTL が誘導できるかは疑問が呈されている。それは、本ヒト化マウスでは、T 細胞分化の場である胸腺はマウス由来の細胞により構成されているので、主要組織適合抗原による選択はマウス胸腺上皮細胞によるものがほとんど考えられる。そのため、抗原特異的 CTL の効率的な誘導は得られないのではないかとされている。実際、HIV ではなく、EBV 感染マウスにおいて増加する CD8 陽性細胞の多くは EBV 抗原を認識するものではなかった (結果示さず)。また、この HIV-1 感染マウスの血漿中には HIV 特異的 IgG 抗体は優位には検出されていない (結果示さず)。これらの結果は、ヒト血液幹細胞移植マウスはウイルスの複製増殖はきわめて効率よく再現されるが、抗原特異的免疫反応の再現には限界があることを示している。今後の胸腺組織のヒト化を含めた改良が必要と考える。

一方、HIV 感染時においては T 細胞の異常反応増殖があることも知られている。今回見出された CD8 の異常増殖がどのような機序によるものか、今後の解析は重要である。

E. 結論

HIV-1 感染モデルマウスを用いて生体内における CD8 陽性細胞の増殖反応がみられることがわかった。すなわち、HIV 解析実験として有用であるとの知見が得られた。

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, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology*, 6: 53, 2009.
- 2) Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J and Uchiyama T. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 9, 1, 2009.
- 3) Shinoda Y, Hieda K, Koyanagi Y, Suzuki Y. Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral

- vector. *Virus Genes*. 25: 165-175, 2009
- 4) Yoshida T, Ebina H, Koyanagi. N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol. Immunol* 53:629-635, 2009.
 - 5) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. HIV-1 productive infection in CD4⁺ effector memory T lymphocytes and CD4⁺ T lymphocyte depletion in humanized NOD/SCID/IL2R^ynull mice. *Virology* 394:64-72, 2009.
 - 6) Inaba K, Fukazawa Y, Matsuda K, Himeno A, Matsuyama M, Ibuki K, Miura Y, Koyanagi Y, Nakajima A, Blumberg RS, Takahashi H, Hayami M, Igarashi T, Miura T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J Gen Virol.* in press.
 - 7) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R^ynull mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, in press.
2. 学会発表
- 1) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 小柳義夫, 佐藤佳, 伊藤守. シンポジウム「ヒト血液幹細胞移植マウスのウイルス病原性解析への利用」第56回日本実験動物学会, 大宮, 2009.
 - 5) 小柳義夫, HIV-1放出抑制分子BST-2の解明第50回日本熱帯医学会大会シンポジウム, 沖縄, 2009.
 - 6) 小柳義夫, 佐藤佳. HIV感染におけるテトラスパニンの意義. 第82回日本生化学会大会, 1S9p-3, 神戸, 2009.
 - 7) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 高橋玲, 伊藤守, 葛島清隆, 高田賢蔵, 小柳義夫. 致死性EBV感染症モデルマウスの作製と病態解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 3WSA5, 東京, 2009.
 - 8) 山元誠司, 大川克也, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, 鈴木陽一. レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子Huwelの同定とHIV-1感染における役割. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 9) 小林朋子, 芳田剛, 佐藤佳, Peter Gee, 蝦名博貴, 小柳義夫. Bst-2とHIV-1Vpuの相互作用メカニズムの解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2C03, 東京, 2009.
 - 10) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顯, 小柳義夫. Rho GTPase familyによるHIV-1複製抑制. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 11) 鈴木康嗣, 小川加那子, 小柳義夫, 鈴木陽一. レトロウイルスゲノムの組み込み機能を阻害する細胞性キナーゼの同定とその作用機序の解析. 第57回ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 12) 蝦名博貴, 小柳義夫. DNA損傷部位へのインテグラーゼ非依存レトロウイルスDNAの遺伝子組込み機構. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 13) 佐藤佳, 山元誠司, 三沢尚子, 小柳義夫. 異種動物細胞株を用いたヒトBST-2/Tetherinの機能比較研究. 第23回日本エイズ学会学術集会, O62-335, 名古屋, 2009.
 - 14) 山元誠司, 大川克也, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, 鈴木陽一, HIV-1インテグラーゼ相互作用因子HuwelによるHIV-1の感染抑制. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009.
 - 15) 小柳義夫, 佐藤佳. テトラスパニンによるレトロウイルス感染制御. 第32回日本分子生物学会年会, 4W9-3, 横浜, 2009.
 - 16) Sato K, Misawa N, Nie C, Takahashi R, Ito M, Kuzushima K, Takada K, and Koyanagi Y. Epstein-Barr virus is productively replicated in humanized NOD/SCID/IL2g^{null} mice simulating severe complications observed in patients with fatal EBV infection, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 3-K-W63-7-O/P, 大阪, 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

Table 1. Reconstitution of human multilineage leukocytes in NOG-hCD34 mice ^{a,b}

Linage marker ^c	CD45 ⁺	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD14 ⁺	CD34 ⁺
PB (12-13 wk old)	34.9±11.3	10.2±6.9	17.5±6.3	4.7±2.9	5.2±3.3	n.a. ^f	n.a.
PB (28-31 wk old)	33.3±14.5	22.4±6.8	8.7±9.1	14.0±6.2	5.4±2.3	0.2±0.2	n.a.
BM ^d	43.2±20.8	7.8±5.7	27.2±24.6	n.a.	n.a.	2.7±3.2	5.4±3.9
Spleen ^d	75.9±16.4	42.9±22.9	25.6±12.3	26.3±10.6	11.5±8.0	n.a.	n.a.
Lymph nodes ^d	94.8±5.1	82.2±8.7	8.0±4.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Linage marker ^e	CD45 ⁺	CD4 SP	CD8 SP	DP	DN		
Thymus ^d	98.5±0.4	12.6±7.7	6.5±4.9	76.3±20.9	10.8±10.6		

表 1. NOG-hCD34 マウスにおけるヒト白血球細胞の分布

a: NOG-hCD34 マウス (個体数 4-8 匹) のそれぞれのヒト白血球割合は flow cytometry により測定した。

b: それぞれの細胞分画の割合の平均値を標準偏差値とともに示す。

c: それぞれの細胞分画マーカーは以下の細胞を示す。CD45, 全白血球、CD3, T 細胞、CD19, B 細胞、CD14, 単球、CD34, 骨髄球。

d: 骨髄は移植後 28-44 週目に採取した。

e: SP: single positive, DP, CD4CD8 double positive, DN, CD4CD8 double negative

f: 解析せず

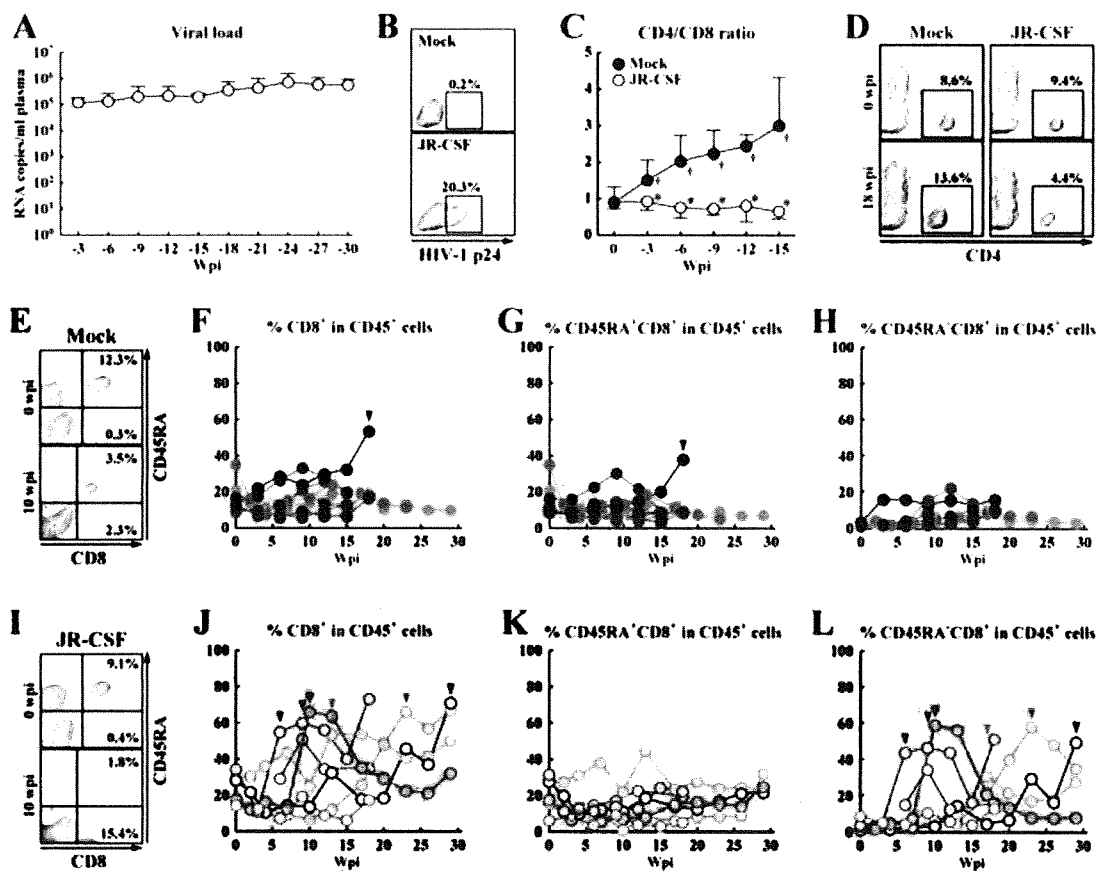


図1. HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスにおける HIV-1 複製増殖と CD8 陽性細胞の増加

12-13 週齢の NOG-hCD34 マウスに HIV-1_{JR-CSF} (JR-CSF、7 匹)、あるいは、RPIM1640 培地 (mock、8 匹) を腹腔接種した。(A) HIV-1 RNA 量の変化、(B) マウス脾臓中の p24 陽性細胞割合、(C) CD4/CD8 比、(D) 末梢血における感染前と 18 週目の CD4 陽性細胞の割合、(E-L) CD8 陽性 (F と J)、CD45RA 陽性 CD8 陽性 (G と K)、CD45RA 陰性 CD8 陽性 (H と L) の割合を示す。Mock のサンプルは E-H、HIV-1_{JR-CSF} 感染のサンプルは I-L である。mock (E) と HIV-1_{JR-CSF} 感染 (I) の flow cytometry 解析の典型的な例を示す。F, G, J, L の矢印は CD8 陽性細胞割合の増加時を示す。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研究センター長

研究分担報告書

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するとともに、HIV-1 と EBV の共感染モデルも作成した。

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。本研究は、このマウスを用いて新しい HIV-1 長期持続感染モデルを作製した。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行った。

B. 研究方法

研究用臍帯血は東京臍帯血バンクより提供を受けた。臍帯血から MACS CD34+ アイソレーションキットで CD34 陽性造血幹細胞を分離し、

6-10 週齢の NOG マウスに移植した。移植後、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で解析した。

移植後 3-6 ヶ月のマウスに、HIV-1 および EBV をそれぞれ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、フローサイトメトリー解析等を行った。また EBV 感染実験では、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD8 抗体、抗ヒト CD4 抗体をヒト化マウスに投与し、抗体依存性に特定の細胞を消失させて病態の解析を行った。

（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、各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、個人情報が流出することはない。
3. 臍帯血採取に関しては、協力医療機関の医