

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。

4. 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、必ず腹腔より十分量のネブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。

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、従来行われていたマウスへの放射線照射をなくし、移植後 300 日以上安定して生存するヒト化マウスの作製に成功した。これらのマウスではヒト細胞の安定した生着が確認された。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_{JRC5F} および X4 指向性 HIV-1_{MP}、X4 指向性 HIV-1_{ML4-3} 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 ヶ月以上を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。

感染マウスでは、CD4 陽性 T 細胞の経時的な減少がみられ、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

HIV-1 感染実験と並行してエイズ関連悪性リンパ腫の要因の一つとなる EBV の感染実験を行った。主にヒト B 細胞の割合が多い移植後 3 ヶ月のマウス群では、高い viremia に伴い体重が減少して死亡した。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、ヒト T 細胞が十分に発生した移植後 6 ヶ月のマウス群では、ウイルスコピー数が減少する個体もみられ、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 コピー数は、T 細胞が少ない時期のマウスで 10-1000 倍高かった。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おり、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た。ELISPOT assay の結果、MHC クラス I 拘束性の EBV 特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されていることが明らかとなった。また、ヒト抗体投与によりヒト CD3 陽性 T 細胞およびヒト CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスでは、EBV 感染後により早く死亡した。このことから、このヒト化マウスにおいてヒト CD8 陽性 T 細胞の免疫応答によってリンパ腫の形成がコントロールされることが確認された。

4. HIV-1 と EBV の重感染実験

ヒト化マウスにおいて EBV に対する T 細胞の免疫応答が明らかとなったため、HIV-1 と 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。HIV-1 感染マウスに EBV を感染させた結果、予想に反して HIV-1 非感染マウスの方が早く病態が進行することが明らかとなった。EBV 投与後 29 日目のマウスでは、HIV-1 非感染マウスの方が明らかに高い EBV コピー数を示した。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。ヒト CD4 抗体を投与し CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスでは、HIV-1 感染マウスと同様に病態進行が遅れることがわかった。このことから、CD4 陽性 T 細胞が EBV 関連リンパ腫の形成に促進的に働いているものと考えられた。また、CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスでも CD8 陽性 T 細胞の顕著な増加がみられ、EBV 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と考えられた。

D. 考察

本研究により、HIV-1 長期持続感染モデルおよびエイズ関連リンパ腫モデルが確立された。

本研究のマウスモデルは、エイズ発症の阻止法の開発や新規抗エイズ薬、抗腫瘍薬の評価に貢献できると考えられる。

新しいエイズモデルとして、新規薬剤の評価やエイズ発症阻止法の開発に応用する予定である。一方で HIV-1 に対する免疫応答などに課題が残り、よりヒトに近い症状を反映した HIV-1 感染モデルの開発もさらに必要と考える。

E. 結論

ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスを用い、高い viremia と CD4 陽性 T 細胞の減少を伴った HIV-1 長期持続感染モデルを作製した。さらにエイズ関連 EBV リンパ腫モデルが確立された。

EBV リンパ腫の形成は CD8 陽性 T 細胞の免疫応答によってコントロールされたが、CD4 陽性 T 細胞はリンパ腫の形成に促進的に働いていることが示唆された。以上のことから、このマウスがエイズ発症機序の研究やその阻止法の開発に非常に優れたモデルになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(1):524-32, 2009.
- 2) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis.* 200(10):1611-5, 2009.
- 3) Tomita M, Dewan MZ, Yamamoto N, Kikuchi A, Mori N. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates beta-catenin signaling in B lymphocytes. *Cancer Sci.* 100(5):807-12, 2009.
- 4) Dewan MZ, Takada M, Terunuma H, Deng X, Ahmed S, Yamamoto N, Toi M. Natural killer activity of peripheral-blood mononuclear cells in

breast cancer patients. Biomed Pharmacother. 63(9):703-6, 2009.

- 5) 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. 124(3):622-9, 2009.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(共同研究者；渡辺哲、矢島美彩子)

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）

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^{tm1} IL-2Rg^{tm1} および NOD-scid-IL-2Rg^{tm1} (NOG) -hIL-4 Tg 複合マウス 2 系統を HIV-1 感染実験のために供給した。また、作製の効率化を考慮して、Tg ホモ型マウスの選別とそれ同士の交配による Tg マウスの作製が可能となった。また、昨年度から取り組んだ新たなモデルマウスとしての NOG-hIL-2 Tg マウス作製は成功し、現在供給が可能となった。また、NOG-hIL-15 Tg マウスについても Tg マウスの樹立を行っている。

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^{tm1} IL-2Rg^{tm1} (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末梢血単核球 (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期待された。そのための計画的生産法を確立し、供給を行う。

その作製の効率化を図る目的で、hIL-4Tg ホモ型マウスの作製とそれによる交配の方法を検討する。

さらに、HIV-1 感染性により優れたマウスモデルの作出をするために、免疫不全マウスに新たなヒト遺伝子 hIL-2 および hIL-15 を導入したマウスの作製と系統確立を行う。

B. 研究方法

当研究所で作製した human IL-4 (hIL-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 マウスは昨年度凍結保存した。hIL-4 を 2.10 ng/mL 血清中に分泌する BALB/cA-dKO -hIL-4 Tg マウスラインと 0.32 ng/mL を分泌する NOG -hIL-4 Tg マウスラインを選別し、それを基に大型アイソレーターで計画生産を行い、共同研究者に供給した。

これら Tg マウスの Tg 型はヘテロ型 (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、PCR 等で産子の遺伝子型を判別する必要があり、生産効率が悪い。昨年度、その生産効率を上げるために、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg についてホモ型 (Tg/Tg) の作製を行った。すなわち、ヘテロ型マウス同士の交配を行い、得られた産子を BALB/cA-dKO マウスに戻し交配し、ホモ型のマウスの選別をする後代検定を行った。本年度はこれによって得られたホモ型マウス同士での交配によって得られた Tg マウスでの hIL-4

分泌を検討した。

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 human IL-2 (hIL-2) および IL-15(hIL-15) 遺伝子を免疫不全マウスに導入したマウスの作製を行った。昨年度、作製した hIL-2 および hIL-15 遺伝子断片を NOD-IL-2Rg^{null} マウス、(NOD-IL-2Rg^{null} x NOG) F1 の前核期受精卵に移入して、Tg マウス作製を行った。得られた産子の尻尾より抽出した DNA をテンプレートとした PCR および ELISA による血清中の hIL-2 および hIL-15 の定量により、Tg マウスの判定を行った。

(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主任研究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 10 ヶ月間(平成 21 年 4 月～平成 22 年 2 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 402 匹、NOG-hIL-4 Tg で 49 匹、その他として BALB/cA-dKO を 92 匹、NOG を 5 匹供給し、本年度の供給数は計 548 匹となった。

また、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg ホモ型マウスの作製を継続検討した。BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスについては、昨年度に得られたヘテロ型マウス同士の交配で得られたマウス 29 匹をさらに BALB/cA-dKO に戻し交配することによって、その 2 産以上で得られた産子全てが

Tg 個体であった 7 匹について、さらにそれ同士の交配によってホモ個体が確実にとれるか、または hIL-4 分泌能に問題がないかを検討した。その結果を表 2 に示す。遺伝子型としては、BALB/cA-dKO マウスともにホモ型同士の交配で全て Tg が導入されており、ホモ型であることが確認された。しかし、遺伝子が挿入されているに係わらず、約 23% の個体で hIL-4 が分泌されていない個体が認められた。

新しいヒト遺伝子導入マウスとして、NOD 系を背景に持つ hIL-2 および hIL-15 Tg マウスの作製を行った。その結果を表 3 に示す。当初の(NOG x NOD) F1 前核期胚への hIL-2 遺伝子の導入では、Tg マウスは得られなかった。そのために、NOD-IL-2Rg^{null} マウスを作製し、その前核期胚または(NOD-IL-2Rg^{null} x NOG) F1 前核期胚に注入した結果、hIL-2 では 4 匹の Tg マウスが得られた。また、同様に hIL-15 遺伝子も同様に NOD-IL-2Rg^{null} マウスまたは(NOD-IL-2Rg^{null} x NOG) F1 前核期胚に注入した結果、1 匹の Tg マウスが得られた。hIL-2 Tg マウス 4 匹での血清中の hIL-2 量を ELISA で測定した結果、1 匹は全く hIL-2 を検出されなかったが、3 匹で hIL-4 が検出された。その 3 匹の内訳は極めて高分泌の個体(26.8 ng/mL)と、中分泌の個体(3.54 ng/mL) および低分泌の個体(1.0 ng/mL)であった。また、hIL-15 Tg マウスの 1 匹は PCR で陽性であったが、血清中では判定し難い量しか分泌されていなかった。得られた NOD-IL-2Rg^{null}-hIL-2 Tg マウスを NOG に戻し交配することによって、*scid* 遺伝子を導入し、さらに NOG マウスと掛け合わせることで、最終的に NOG-hIL-2 Tg マウスを作出できた(表 4)。一方で、免疫が正常な近交系 IQI マウスとの交配では、産子の一部が出産後すぐに死亡した。その死亡個体から DNA を抽出して検査した結果、死亡個体全てが Tg マウスであることが確認された。hIL-15 につい

ではTg ファウンダーをNOG マウスと交配し、得られた産子で、hIL-15の分泌を精査する予定である。

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、そのマウスでのHIV-1感染性を比較検討した。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が、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。このことから、C.B-17-*scid*-hIL-4 Tgマウスの受精卵を凍結保存して、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを供給することにした。また、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスに替わる動物として、BALB/cA-dKOマウスよりもさらに移植性が高いNOGマウスにhIL-4を導入したマウスを確立し、その供給を行い、HIV-1感染性が高いか否かが検討された。その結果、NOG背景のhIL-4 TgマウスはBALB/cA-dKO背景のマウスよりもPBMCを移入した場合にGVHDの発症が激しく、動物が死に易いという結果が得られた(琉球大・田中研究代表者)。そのため、今年度はBALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを主に供給することとし、その安定供給を行った。

本研究に必要な重度の免疫不全マウスの飼育管理は厳密な微生物統御下のSPF条件で行わなければならない。この目的のために、我々は大型

のアイソレーターを用いている。また、それと同時に継続的な感染実験のための多数動物の安定供給には、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意味する。より効率的な繁殖システムを作製するために、昨年度よりTgホモ型マウス作製とその間の交配での動物作製を試みた。昨年度のヘテロ型マウス同士の交配で得られた産子の後代検定によって、ホモ型マウスが数ペア得られた。本年度はそれらホモ型マウス間の交配によって、生産が可能かを検討した。ホモ型マウス間の交配で得られた動物は全て、PCRによる遺伝型解析ではTgマウスと判定された。しかし、実際にその動物から血液を採集し、その血清中のhIL-4をELISAで測定した結果、遺伝子型がTgであるに係わらず、hIL-4が検出されない個体が認められた。この理由として考えられるのは、挿入遺伝子の変異である。すなわち、一般的に遺伝子断片を前核期胚に注入すると、2~数十の遺伝子が同じ部位に直列的に挿入される。これら遺伝子は反復して挿入され、しかも不安定な状態で挿入されていると考えられる。しかし、その後の交配によって、不安定な遺伝子が除去されて、最終的に安定的な遺伝子となり、変異が起り難くなると一般的に考えられている。今回のhIL-4遺伝子を導入したホモ型個体は既に少なくとも5世代を経ており、安定的な遺伝子になっていると考えられる。然るにホモ型同士の交配によって、遺伝子が導入されているにもかかわらず、分泌が確認されない個体が認められることから、遺伝子自体が極めて変異しやすく不安定である可能性がある。すなわち、ホモ型個体同士の交配によって得られた個体についても、hIL-4の分泌の有無を確認する操作が必要なる。

しかし、従来のヘテロ型と野生型個体の交配よりもホモ型マウスを得る確率は倍になることになり、それなりの効率が得られると考えられた。

新しいヒト遺伝子導入免疫不全マウスの作製として実施されたhIL-2およびhIL-15導入マウスは、当初 (NOG x NOD) F1前核期胚への遺伝子の注入で実施された。しかし、期待されたTgマウスは得られなかった。その理由として、マウスおよびヒトのIL-2の交差性にあると考えられた。すなわち、昨年度までに作製したhIL-4では、マウスとヒトの間に全く交差性が認められないが、hIL-2とhIL-15に関しては交差性が考えられた。すなわち、NOGではなく (NOG x NOD) F1個体では*scid*遺伝子がヘテロになるため、リンパ球が正常に存在する。従ってリンパ球特にTリンパ球の増殖、活性化に影響があり、しかもマウスとヒトで交差する遺伝子は、成長の過程で発現することによって個体発生に大きく影響すると考えられる。このことから、(NOG x NOD) F1個体で作製するのは難しいと考えられた。

この場合、リンパ球が存在しないNOGマウス前核期胚への直接移入が良い方法と考えられるが、我々のTgマウス作製の経験から、*scid*遺伝子がホモになった場合は極めてTgマウスの作製効率が悪いことが分かっている。*scid*遺伝子はDNA損傷の修復に関わる遺伝子であるため、Tg作製効率が著しく落ちるのであろう。従って、従来我々はNOGマウスへのTg作製については、NOG x NODの交配で得られた*scid*遺伝子がヘテロ型のF1個体の前核期胚を使用し、得られたTg産子をNOGと交配することでNOG Tgマウスを作製してきている。今回、我々は新たにNOD-IL-2Rg^{tm1}マウスを作製し、このマウスの前核期胚に遺伝子を導入することで、hIL-2およびhIL-15 Tgマウスの作製を行った。これは、NOD-IL-2Rg^{tm1}マウスではリンパ球は存在するが、IL-2やIL-15の受容体のユニット(IL-2Rg)が欠如しているため、これらサイトカインがこのマ

ウスで働かないからである。このマウスの前核期胚にhIL-2およびhIL-15遺伝子を注入した結果、Tg産子を得ることに成功した。その後、この産子をNOGマウスに交配することでTgマウスを得ることができたが、免疫学的に正常なIQI近交系マウスと交配してもTgマウスは得られないことが確認でき、その予測が正しいことが確認できた。現在、hIL-2に関しては実験に使用できる動物数を確保できるような生産を確立できるようになってきている。hIL-15に関しては、*in vitro*でのCOS-7へのトランスフェクションの実験からかなり生産量が少ないことが分かっているため、現在NOGマウスとの交配で得られたマウスでの分泌を精査している段階である。

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、大型アイソレーターによるBALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスの計画生産を行い、定期的な供給を行うことができた。NOG-hIL-4 Tg に関しては、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスと比較し、GVHDによって死亡しやすいことから、本年度の供給は余り行わなかった。また、生産効率を上げるために、Tg ホモ型の動物の作製を行い、それらホモ型同士の交配を実施した。得られた産子は全て Tg 個体であるが、少数の Tg マウスで hIL-4 が分泌されない個体が存在し、導入遺伝子に変異が起こり易いことが推定された。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のため、新たに NOD-IL-2Rg^{tm1} マウスを樹立し、その前核期胚に注入した結果、hIL-2 では 4 匹、hIL-15 では 1 匹の Tg マウスが得られた。hIL-2 Tg マウスに関しては、4 匹のうち 3 匹でそれぞれ発現が異なるが、血清中に hIL-2 が分泌されることが確認できた。これらマウスの NOG 背景化を行

い、その生産を開始し、本年度中の実験が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yajima, M., K. Imadome, A. Nakagawa, S. Watanabe, K. Terashima, H. Nakamura, M. Ito, N. Shimizu, N. Yamamoto, and S. Fujiwara. 2009. T cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis* 2009:1611-1615.
- (2) Watanabe, Y., T. Takahashi, A. Okajima, M. Shiokawa, N. Ishii, I. Katano, R. Ito, M. Ito, M. Minegishi, N. Minegishi, S. Tsuchiya, and K. Sugamura. 2009. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol* 21:843-858.
- (3) Nie, C., K. Sato, N. Misawa, H. Kitayama, H. Fujino, H. Hiramatsu, T. Heike, T. Nakahata, Y. Tanaka, M. Ito, and Y. Koyanagi. 2009. 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-2Rgamma(null) mice. *Virology* 394:64-72.
- (4) Ito, R., I. Katano, K. Kawai, H. Hirata, T. Ogura, T. Kamisako, T. Eto, and M. Ito. 2009. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* 87:1654-1658.

2. 学会発表

- (1) Ito M. 「Mouse models as “humanized mice”」 2nd IWHM, 2009. 4. 3-6, Holland.
- (2) Katano I, Ito R, Ogura T, Eto T, Kawai K, Suemizu H, Ando K, Nakahata T, Ito M. 「A novel severe immunodeficient NOG mice with the c-kit,

W^v mutation showing high engraftment of human cells without irradiation」 2nd IWHM, 2009. 4. 3-6, Holland.

- (3) Ito R, Katano I, Kawai K, Ogura T, Ito M. 「High sensitivity to xeno-GVHD in severely immunodeficient NOG mice attributable to dysfunction of dendritic cells.」 2nd IWHM, 2009. 4. 3-6, Holland.
- (4) Koyanagi Y, Nie C, Sato K, Misawa N, Ito M. 「HIV-1 pathogenesis in humanized mice: Predominant infection in effector memory T lymphocytes」 2nd IWHM, 2009. 4. 3-6, Holland.
- (5) Suemizu H, Hasegawa M, Kawai K, Taniguchi K, Monnani M, Wakui M, Suematsu M, Ito M, Peltz G, Nakamura M. 「Establishing a humanized model of the liver using NOG mice」 2nd IWHM, 2009. 4. 3-6, Holland.
- (6) Takahashi T, Watanabe Y, Okajima A, Katano I, Ito R, Ito M, Ishii N, Tsuchiya S, Sugamura K. 「The analysis of the functions of human b and T cells in humanized NOD/Shi-scid/gcnull (NOG) mice (hu-HSC NOG mice).」 2nd IWHM, 2009. 4. 3-6, Holland.
- (7) 片野いくみ、伊藤亮治、平田裕、小倉智幸、上迫努、江藤智生、川井健司、伊藤守：「免疫不全マウス4系統でのヒト造血幹細胞移入後の生着および分化能の比較」日本実験動物学会総会。2009年5月14日～16日。大宮
- (8) 小柳義夫、佐藤佳、伊藤守：「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」日本実験動物学会総会。2009年5月14日～16日。大宮
- (9) 片野いくみ、伊藤亮治、川井健司、伊藤守：「NOG マウスは BALB/c- と NOD/Shi-*rag2*^{null} *il2rg*^{null} mice よりもヒト化マウスの作製に有用である」日本免疫学会。2009年12月2日～4日。大阪
- (10) 伊藤亮治、片野いくみ、川井健司、伊藤守：

「IFN γ producing killer dendritic cells have a suppressive effect on xeno-GVHD in NOG mice.」

日本免疫学会，2009年12月2日～4日，大阪

(11) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤守、山本直樹、藤原成悦：「EBV感染ヒト化マウスにおける T 細胞応答の宿主防御的役割について」日本免疫学会，2009年12月2日～4日，大阪

(12) 佐藤佳、三沢尚子、Chuanyi Nie、高橋玲m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を用いた病態解析」日本免疫学会，2009年12月2日～4日，大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 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 21 年 4 月～平成 22 年 2 月)

系統名	匹数		計
	♀	♂	
BALB/cA-dKO,hIL4-Tg	207	195	402
BALB/cA-RAG2KO,IL-2RgKO	48	44	92
NOG- hIL-4 Tg	20	29	49
NOG	0	5	5
計	275	273	548

*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 ホモ型マウス同士の交配で得られた産子の血清中 hIL-4 測定

Parent		generation	No. of offspring	No. of mice expressing hIL-4 in Tg mice
♂	♀			
f34*	f3	2	6	5
f24	f27	2	10	5
f10	f5	2	6	6
H8	H6	3	10	8
H11	H9	3	30	30
H22	H21	3	6	5
H22	H20	3	4	1
M13	M7	4	7	2
M13	M8	4	7	4
?***	?	4	219	170
Total			305	236 (77.4)**

*ホモ型Tgマウス個体番号

**括弧内の数値は、産子内のhIL-4分泌個体のパーセンテージを示す。

***はホモ個体の産子で、遺伝子型およびIL-4分泌が確認された個体で、生産に用いられたために、正確な個体番号が不明な個体

表 3. hIL-2 および hIL-15 遺伝子の顕微授精による Tg マウス作製実験結果

遺伝子注入前核期胚のマウス系統	Injection				Offspring						
	加温胚数	操作胚数	移植胚数	%	出産子数	奇形or死亡胎子匹数	%	離乳子数	%	Tg陽性数	%
hIL-2											
NOG x NOD	240	196	110	56.1	29	1	26.4	25	89.3	0	0.00
(NOD/Shi-IL-2Rg KO×NOG) F1	180	170	92	54.1	25	6	27.2	18	94.7	0	0.00
(NOD/Shi-IL-2Rg KO×NOG) F1	160	142	75	52.8	22	1	29.3	18	85.7	4	2.82
hIL-15											
NOD/Shi-IL-2Rg KO	151	59	24	40.7	11	1	45.8	9	90.0	0	0.00
(NOD/Shi-IL-2Rg KO×NOG) F1	150	64	39	60.9	13	0	33.3	11	84.6	1	1.56

表 4. NOG-hIL-2 Tg マウスの系統確立

Parents		Generation (N)	No. of offspring	No. of Tg mice (%)	Mean IL-2 conc. (ng/mL)
♂	♀				
High line (2.6 ng/mL)					
Founder (L2-2)*	NOG	1	8	5 (62.5)	36.9
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I2-1)	NOG	2	17	11 (64.7)	14.2
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I2-8)	NOG	2	7	5 (71.4)	25.0
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I2-5)	IQI	2	10	3**	ND***
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I2-6)	IQI	2	10	0	ND
Middle line (3.54 ng/mL)					
Founder (L2-15)	NOG	1	15	13 (86.7)	1.25
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I15-8)	NOG	2	10	7 (70.0)	2.84
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I15-11)	NOG	2	7	7 (100)	1.3
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I15-2)	NOG	2	14	8 (57.1)	0.57
NOD-IL-2Rgnull, scid/+ hIL-2 (I15-4)	NOG	2	8	5 (62.5)	0.61

*括弧内の記号は個体番号

**3匹は出産後すぐに死亡

***検査できず

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 21 年度研究分担報告書

研究要旨：これまで、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) 感染症/エイズに対する新規治療薬候補として、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) を作製し、その組換え VSV の HIV-1 感染に対する治療効果を、ヒト血液細胞を移植し 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) を用いた HIV-1 感染実験モデルにおいて評価することにより、ヒト化マウス HIV-1/エイズ医薬品評価系の確立に寄与することを目的に研究を進めてきた。その中で、組換え VSV の問題点として、その治療効果が 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ことが分かった。そこで本年度は、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 を基に、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。

A. 研究目的

HIV-1 感染症/エイズに対する治療法である Highly active anti-retroviral therapy (HAART) は、ウイルス量を顕著に抑制することができ非常に有効であるが、薬剤の生涯投与が必要、完全なウイルス排除が不可能、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現により治療実施が困難等の種々

の問題点があり、それらを克服することが重要な課題となっている。そのために、我々は、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し、この課題に貢献することを目標に研究を推進している。

具体的には、HIV-1 感染細胞を標的とする新規治療薬としての組換えウイルス

VSV の開発である。これまでの組換え VSV (VSV Δ G-CC4) 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 株の受容体ヒト CD4 及び CXCR4 分子を発現しており、*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 感染細胞に選択的に感染し、細胞を殺傷することが報告された。しかし、この組換え VSV は、比較的感染効率が低く、その殺傷能力はまだ十分とは言えず、新規治療薬候補としてはまだ改良の余地が残っている。そこで、我々は、活性化 CD4 陽性 T 細胞に特異的に高発現する OX40 (CD134) 分子に注目し、そのリガンドである OX40L (CD252) 分子を組換え VSV に追加発現することを検討した。OX40L は、OX40 と特異的に結合することで接着分子として機能するため、組換え VSV への追加発現によりその感染性が増強できるのではないかと期待された。本研究では、この OX40L 分子を追加発現する新規組換え VSV を作製し、その感染性や治療効果を *in vitro* 感染実験系やヒト化マウス感染実験系において評価判定することにより、本組換え VSV と薬剤評価系としてのヒト化マウスモデルの有用性を示すことを目的とした。

B. 研究方法

(1) OX40L 分子を追加発現する新規組換え VSV の作製：

VSV ゲノムから G 遺伝子を切除し (Δ G)、代わりに X4 ウイルス受容体ヒト CD4 及び CXCR4 分子をコードする遺伝子を同一部

位に挿入し、さらにその遺伝子の下流に OX40L 分子をコードする遺伝子を挿入することにより、新規組換え VSV コンストラクトを作製した。

(2) HIV-1 受容体に加えて OX40L 分子を発現する新規組換え VSV の産生：

(1) で作製したコンストラクトを、ヘルパープラスミドと共に、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 X4 ウイルス受容体及び OX40L 分子を発現する新規組換え VSV (VSV Δ G-CC4XL) を産生した。

コントロール組換えウイルスとして、G 蛋白も HIV-1 受容体も発現していない組換え VSV (VSV Δ G) と VSV Δ G-CC4 も産生し、VSV Δ G-CC4XL と平行して使用することで、それらの能力を比較検討した。

(3) *In vitro* における VSV Δ G-CC4XL の感染性及び合胞体形成能の評価：

まず、OX40 分子を発現する細胞 (293T/OX40) に X4 ウイルスのエンベロープ蛋白を強制発現させ、VSV Δ G、VSV Δ G-CC4、或いは VSV Δ G-CC4XL を接種し、或いは接種せずに翌日まで培養した。その後、細胞を固定し、VSV N 蛋白に対する抗体で染色し、蛍光顕微鏡で VSV 感染細胞を検出した。ウェル中の感染細胞数をカウントすることにより、それらの組換え VSV の OX40 陽性 HIV-1 エンベロープ蛋白発現細胞に対する感染性を比較検討した。

次に、OX40 分子を発現する X4 ウイルス持続感染細胞株 (Molt-4/IIIB/OX40) に

VSV ΔG、VSV ΔG-CC4、或いは VSV ΔG-CC4XL を接種し、或いは接種せずに培養した。翌日光学顕微鏡で観察し、誘導された合胞体のサイズ等を比較することにより、組換え VSV の合胞体形成能を評価した。また、合胞体数をカウントすることによりその合胞体形成能を定量化し、より正確に比較検討した。

(4) *In vitro*における VSV ΔG-CC4XL の殺細胞効果及び感染抑制効果の評価：

OX40 分子を発現する X4 HIV-1 感染細胞として、X4 ウイルスが持続感染する Molt-4/IIIB/OX40 細胞と、EGFP を感染時に発現する組換え HIV-1 (NL-E 株)を先に急性感染させた Molt-4/R5/OX40 細胞を使用した。

それらの細胞に VSV ΔG、VSV ΔG-CC4、或いは VSV ΔG-CC4XL を接種し、或いは接種せずに 3 - 8 日間培養した。その後、経時的に HIV-1 持続感染細胞の生細胞数をカウント、或いはフローサイトメトリーにより EGFP 発現細胞 (HIV-1 急性感染細胞)を検出することにより、組換え VSV の殺細胞効果を評価した。また、経時的に回収した培養上清を用いて、上清中の HIV-1 量を測定することにより、組換え VSV の HIV-1 感染抑制効果を比較検討した。HIV-1 ウイルス量の測定は、ELISA による p24 レベルの定量、或いは段階希釈した培養上清を用いたエンドポイントタイトレーションによる HIV-1 感染価の決定により行った。

(5) ヒト化マウス感染実験モデルにおける VSV ΔG-CC4XL の治療効果の評価：

重度免疫不全マウスである NOG マウス

にまずヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植してヒト化マウスを作製した。約 5 ヶ月後に X4 ウイルス NL4-3 株を接種し、HIV-1 感染実験動物モデルを構築した。それから約 3 週間経って、VSV ΔG、VSV ΔG-CC4、或いは VSV ΔG-CC4XL を接種し、或いは接種しなかった。その後、組換え VSV の治療効果を評価するために、経時的に採血し、末梢血中の CD4/CD8 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析し、血漿中の HIV-1 量をリアルタイム RT-PCR により定量化した。また最終日の解剖時に、脾細胞を採取し、DNA を調製後、HIV-1 のプロウイルス量を PCR により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会、動物実験委員会、医学研究倫理審査委員会の審査後、承認を得てから行った。

ヒト臍帯血由来造血幹細胞の供与にあたっては、東京臍帯血バンクに申請し、審査後、承認を受けている。

C. 研究結果

(1) OX40L 分子を追加発現する新規組換えウイルス VSV ΔG-CC4XL の *in vitro* における感染性及び合胞体形成能の向上：

OX40 陽性 HIV-1 エンベロープ蛋白発現細胞において、組換え VSV の感染効率を比較検討した。その細胞に VSV ΔG 接種或いは未接種した場合、蛍光顕微鏡下で VSV 感染細胞は認められなかったが、VSV ΔG-CC4 或いは VSV ΔG-CC4XL を接種した場合には、VSV 感染細胞が明らかに観察され

た。また重要なことに、VSV Δ G-CC4XL 接種では、VSV Δ G-CC4 接種に比べ、約 8 倍の感染効率の向上を示した。

次に、Molt-4/IIIB/OX40 細胞において、組換え VSV の合胞体形成能を比較検討した。その細胞に VSV Δ G 接種或いは未接種した場合、光学顕微鏡下で合胞体形成を観察できなかったが、VSV Δ G-CC4 或いは VSV Δ G-CC4XL を接種した場合は、顕著な合胞体形成を認めた。特に、VSV Δ G-CC4XL 接種では、VSV Δ G-CC4 接種に比べ、よりサイズの大きな合胞体が見られた。また、合胞体数を簡易的にカウントしたところ、VSV Δ G-CC4 接種よりも VSV Δ G-CC4XL 接種においてより多くの合胞体を認めた。

以上のことから、VSV Δ G-CC4XL は、VSV Δ G-CC4 よりも感染性が增強されていることが示され、OX40L 分子の追加発現が組換え VSV の感染性を著明に向上させることが分かった。

(2) VSV Δ G-CC4XL の *in vitro* における殺細胞効果及び感染抑制効果の増強：

Molt-4/IIIB/OX40 細胞と NL-E 株急性感染 Molt-4/R5/OX40 細胞において、組換え VSV の殺細胞効果を比較検討した。VSV Δ G 接種或いは未接種の場合、効果は認められなかったが、VSV Δ G-CC4 接種或いは VSV Δ G-CC4XL 接種の場合では、接種後 HIV-1 感染細胞が減少し、特に Molt-4/IIIB/OX40 細胞では約 5% 以下まで減少し、その効果は観察期間中持続した。重要なことに、VSV Δ G-CC4XL 接種の方が、VSV Δ G-CC4 接種よりも強い殺細胞効果を示し、特に Molt-4/IIIB/OX40 細胞では殆ど検出感度以下まで減少した。

次に、Molt-4/IIIB/OX40 細胞において、組換え VSV の p24 産生に対する効果を比較検討した。VSV Δ G 接種或いは未接種の場合、経時的に上昇傾向が認められたが、VSV Δ G-CC4 接種或いは VSV Δ G-CC4XL 接種の場合では、接種して数日後より低下傾向が認められた。また、VSV Δ G-CC4XL 接種の方が、VSV Δ G-CC4 接種よりも効果的に p24 レベルを低下させる傾向が見られた。

さらに、Molt-4/IIIB/OX40 細胞と NL-E 株急性感染 Molt-4/R5/OX40 細胞において、組換え VSV の HIV-1 感染価に対する効果を比較検討した。VSV Δ G 接種或いは未接種では、効果は認められなかったが、VSV Δ G-CC4 接種或いは VSV Δ G-CC4XL 接種では、明らかな低下が認められた。特に重要なことに、VSV Δ G-CC4 接種よりも VSV Δ G-CC4XL 接種の方が、より効果的な低下が見られた。

以上のことから、VSV Δ G-CC4XL は、感染性の増強等により、VSV Δ G-CC4 よりもより強力な治療効果を発揮することが示され、新規治療薬候補としてのより高い可能性が示唆された。

(3) VSV Δ G-CC4XL のヒト化マウス感染実験モデルにおける治療効果の検討：

現在、ヒト化マウスに NL4-3 株を接種した後、VSV Δ G、VSV Δ G-CC4、或いは VSV Δ G-CC4XL を接種し、或いは未接種し、経時的に採血して、組換え VSV の治療効果を評価しているところである。

D. 考察

本研究では、組換え VSV の低感染性を改

善する目的で、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 分子との相互作用により細胞接着分子として機能するため、組換え VSV 表面に追加発現された OX40L 分子は、HIV-1 が感染した活性化 CD4 陽性 T 細胞上の OX40 分子に結合することにより、組換え VSV の標的細胞への接着効率を向上させ、その結果、標的細胞への感染効率が向上すると考えられた。またそのことにより、VSV 感染自体によって誘導される細胞死が増強され、その結果、より効率の良い感染抑制効果が発揮できるのではないかと期待された。そこで、組換え VSV のゲノムに OX40L 分子をコードする遺伝子を挿入し、X4 ウイルス受容体に加えて OX40L 分子を発現する VSV Δ G-CC4XL を作製した。この組換え VSV の感染性や治療効果を *in vitro* において検討したところ、上記の研究結果のように、VSV Δ G-CC4 よりも顕著に感染性の改善が認められ、優れた治療効果も発揮し、本組換え VSV の新規治療薬候補としての有効性が明らかに示された。

その効果の中で特に興味深かったのは、VSV Δ G-CC4 が HIV-1 持続感染細胞株である Molt-4/IIIB/OX40 細胞を完全に殺傷できなかったのに対し、VSV Δ G-CC4XL はほぼ完全に駆逐できたことである。VSV Δ G-CC4 の攻撃を逃れた Molt-4/IIIB/OX40 細胞のごく一部(約 5%以下)の細胞群は、おそらく表面に HIV-1 エンベロープ蛋白が発現されていなかったために、VSV Δ G-CC4 が標的化することができなかった

と考えられる。しかし、VSV Δ G-CC4XL は、ウイルス表面に OX40L 分子を発現しているために、VSV Δ G-CC4 が攻撃できなかった細胞の表面に発現されていた OX40 分子と結合することにより、それらの細胞をも標的化することができたと考えられる。標的化された細胞の殺傷機序は、現時点では不明であるが、OX40L 分子は細胞の生存や細胞死に関与することも報告されているため、OX40L 分子と OX40 分子との相互作用により、おそらく何らかのシグナルが細胞内に伝達されアポトーシス等が誘導された可能性がある。このように、OX40L 分子は接着分子としての機能だけではなく、細胞死を惹起する機能も備えており、VSV 粒子上で多機能性を発揮している可能性があり、非常に興味深い。

今後は、VSV Δ G-CC4XL を含めた組換え VSV の新規治療薬候補としての有効性を、*in vitro* における HIV-1 感染実験系で評価するだけでなく、現在検討中の、ヒト化マウスを用いた *in vivo* における感染実験系においても十分に評価していく必要がある。その上で、得られたデータを基に、ヒト化マウスを用いた生体内薬剤評価系を最適化し、その確立や普及に貢献していく。

E. 結論

本研究課題において、HIV-1 X4 株受容体 CD4 及び CXCR4 に加えて、活性化 T 細胞分子 OX40L を発現する組換え VSV Δ G-CC4XL を作製し、本組換え VSV が、*in vitro* において、HIV-1 X4 株受容体のみを発現する組換え VSV Δ G-CC4 に比べて、

顕著に高い感染性を有し、より強力な治療効果を発揮することが示された。このことから、今回組換え VSV に導入された OX40L 分子は、組換え VSV の能力を改善するための追加分子としては非常に有効であることが分かった。また、OX40 分子を発現する標的細胞は、OX40L 分子を追加発現する組換え VSV により効率良く攻撃されたため、OX40 分子は組換え VSV 等を用いた新規治療法の分子標的に十分になりうることを示唆された。さらに、今回開発された VSV Δ G-CC4XL は、優れた治療効果を示したため、これまでの組換え VSV 以上に新規治療薬候補として有望であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, and 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(7) : 2940-2948, 2009.

2. 学会発表

(1) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦:新

規バイオ治療薬候補のヒト化マウス感染モデルを用いた評価: CCR5 指向性 HIV-1 感染細胞を選択的に破壊する組換えウイルス VSV. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2009. 11. 26-28: 名古屋. 597 (331).

(2) 大隈和, 鶴野親是, 田中礼子, 田中勇悦, 浜口功: CD4, CXCR4 を併せ持つ新規 HIV 攻撃用 VSV の作製: OX40 リガンド共発現の効果. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2009. 10. 25-27: 東京. 219.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

平成 21 年度研究分担報告書

(1) 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

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 NS5A 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 NS5A 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、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 (図9)。

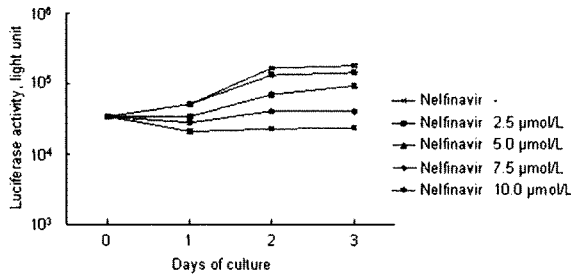


図1. NFV の HCV-replicon に対する抑制作用

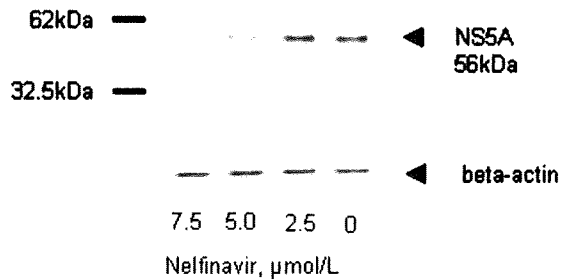


図2. HCV 非構造タンパク NS5A、ベータアクチン発現量

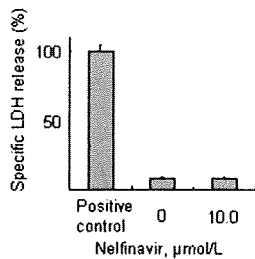


図3. LDH 試験

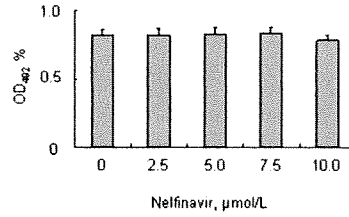


図4. MTS 法

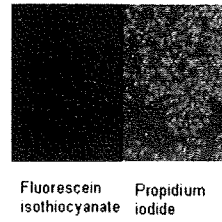


図5. TUNEL 染色

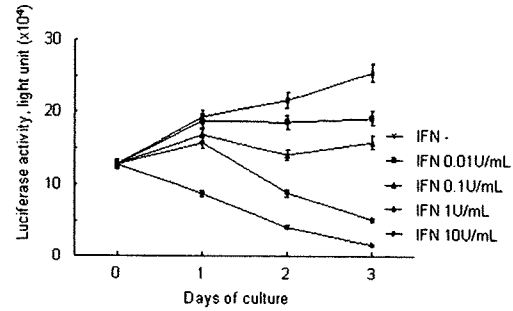


図6. IFN の HCV-replicon に対する抑制作用

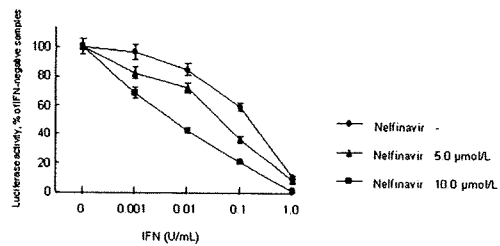


図7. IFN と NFV の同時投与による HCV-replicon に対する抑制作用

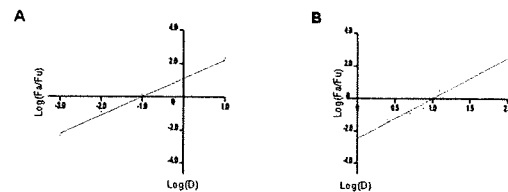


図8. (A)NFV, 線量効果曲線 $y = 2.47x + 0.43$
(B) IFN, 線量効果曲線 $y = 1.12x - 0.14$

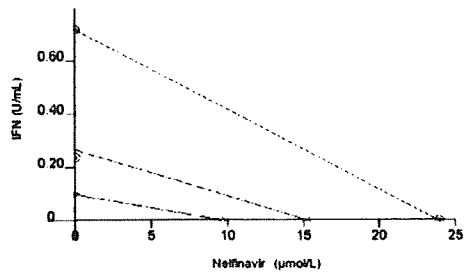


図 9. NFV と IFN の HCV-replicon 増殖に対するアイソログラム解析

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

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。今後の課題は NFV の HCV に対する作用点を明らかにすることである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S.Toma, T.Yamashiro, S.Arakaki, J. Shiroma, T. MAeshiro, K. Hibiya, N. Sakamoto, F. Kinjo, M. Tateyama, J. Fujita. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon-alpha. J Viral Hepat. 2009 Jul; 16: 506-12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(共同研究者；當間智、山城剛)