

200908008B

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19～21年度 総合研究報告書

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. 総括研究総合報告

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. 分担研究総合報告

- (1) 田中勇悦：ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染防御ワクチンの評価
- (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：沖縄における臨床 HIV 野生株と多剤耐性 HIV 株の分離および新規薬剤
の評価

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. 総括総合研究報告

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19年度～21年度 総括

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19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 藤田次郎
- (5) 国立感染症研究所 大隈和

研究要旨

新規 HIV 抑制薬、新規ワクチンおよび新規治療法開発の基盤をなす創薬の評価系として、新系統の特殊免疫不全マウスを作出し、そのマウスにヒト由来の白血球 (PBMC) やヒト造血幹細胞を移植し生着させたマウス・ヒトキメラ動物 “ヒト化マウス” の作製技術を樹立し、ヒト化マウスを用いた HIV 感染実験による創薬評価の基盤を確立した。本研究成果は、我が国のエイズ戦略に寄与するものと考えられる。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス感染の拡大により、エイズ問題がマスコミ報道から激減したが、日本では HIV 感染者数が増加し続けており、これまで以上にエイズ対策の強化の必要性が叫ばれている。現在、エイズ治療には化学療法が功を奏しているが、エイズ治療薬に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。エイズが最も深刻なアフリカなどの後進国においては、AIDS 薬が高価なため感染者への普及はごく限られているのが現状であり、新たな治療薬やワクチンの開発は世界的なテーマである。

HIV は持続感染するウイルスであり抗原を接種だけの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、国内外では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。

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-dKO マウスや、これらのマウスをベースにして人のサイトカインを産生する遺伝子改変マウスは、実中研で作製、繁殖され供給された。本研究では、成人末梢血単核球 (PBMC) や臍帯血由来造血幹細胞 (CD34+) の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+造血幹細胞は成獣においては静脈内接種、また、新生児マウスにおいては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 であり、クローン化した株を用いた。感染の評価には、抗原測定、ウイルス遺伝子測定、あるいは感染細胞表現形解析を用いた。樹状細胞の分化培養には、種々のサイトカインカクテルの比較を行って決定された培養条件を単球

培養に適用した。動物感染実験は、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。ヒト由来研究材料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

本班の研究では、免疫不全マウス系統の維持と新規マウスの開発、それらのヒト化による HIV 感染実験方法の確立、日本人由来臨床 HIV 株の分離と樹状細胞ワクチンの検討、および HIV 感染細胞を攻撃破壊する新規治療法の開発の基盤作りを進めた。

(1) 使用する基盤マウスの改良では、伊藤らが主体となり、これまで実中研で作製された世界的に知られる超免疫不全マウスである NOG や BALB/cA-dKO に加えて、ヒト免疫環境をコントロールするサイトカインであるヒト IL-4 を分泌する特殊マウスも作製した。さらに新たな用途の候補マウスとして、ヒト T 細胞の生着と増殖を促進すると期待される IL-2 や IL-15 を分泌するマウスを確立しその HIV 研究への応用性について検証に入っている。

(2) HIV 増殖・感染抑制薬の簡易 *in vivo* 評価系として、ヒト PBMC 移植マウスの作製技術を確立した。この系では、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。後者のウイルス感染は IL-4 分泌マウスが適当であることを明らかにした。

(3) CD34⁺造血幹細胞を移植するヒト化マウスは、HIV の慢性持続感染のみならず、種々の日和見感染病態をも再現できるという利点を持ち、今後、エイズ関連日和見腫瘍を伴う HIV 治療を目的とする種々の薬剤や療法の評価への応用が可能である。具体的に本研究班では 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。

(4) 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を通じて得られたノウハウは、昨今、新たなワクチン療法として HIV 治療への応用の可能性が期待されている“樹状細胞ワクチン”の評価への

応用も可能である。そのための基礎準備として、機能的な樹状細胞を *in vitro* で分化誘導するための培養方法の改良、および抗原として用いる自家 HIV ウイルス粒子の調製分離法、および HIV の不活化法と免疫方法の基盤を確立した。つまり、短期間で免疫賦活能を持つ自家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 抑制免疫誘導効果を実際に明らかにした。

(5) さらに、日本人由来の HIV 野生株パネル作製を進めるため、琉大病院の未治療患者から野生型 HIV 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向けた試みとして重要な手技を提供する。

(6) 加えて本研究では、新たな試みとして米国で考案された VSV ラブドウイルスを使った HIV 感染細胞を攻撃する治療法について、OX40 リガンドを組み込んだ改良型 VSV の作製とその効果の評価を行った。

D. 考察

(1) 達成度について
当初の研究計画に従って班研究を進めたことにより、基本的な目標は達成できたと評価したい。その根拠はとりわけ、使用マウスの改良では世界最先端レベルに到達したこと、これらの改良マウスの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ことである。本研究システムは共同研究として国内外の研究機関へ供与されるので今後の共同利用が大いに期待される。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では、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ことを目的に、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する小型汎用動物として「ヒト化マウスを用いた評価系」を開発した。別の評価系としてサルと猿エイズウイルス (SIV) 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を直接観察できる系であること、使用数の限られるサルよりもはるかに多数の検体を処理できること、および経済性に優れることなどから、本研究システムは、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実験手技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。

(3) 今後の展望について

今後は、HIV の変異にも対応する治療を確立するために、患者個人個人の自家 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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表 81 件
 原著論文による発表 0 件
 それ以外 (レビュー等) の発表 3 件

(その主なもの)

学会発表

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 の単培養法とヒト化マウスでの評価 日本エイズ学会総会 名古屋 平成 21 年 11 月 27 日

2) 海外

口頭発表 44 件
 その主なもの

- (1) Kei Sato, Chuanyi Nie, Naoko Misawa, Yuetsu Tanaka, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. Characterization of HIV-1 pathogenesis and the infected cells in humanized mice, 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, D-179, Montreal, Canada, 2009
- (2) Yamamoto N: Humanized NOD/SCID/IL2Rg^{-/-} (NOG) mice models for human retroviral and EBV infection: Studies on persistent

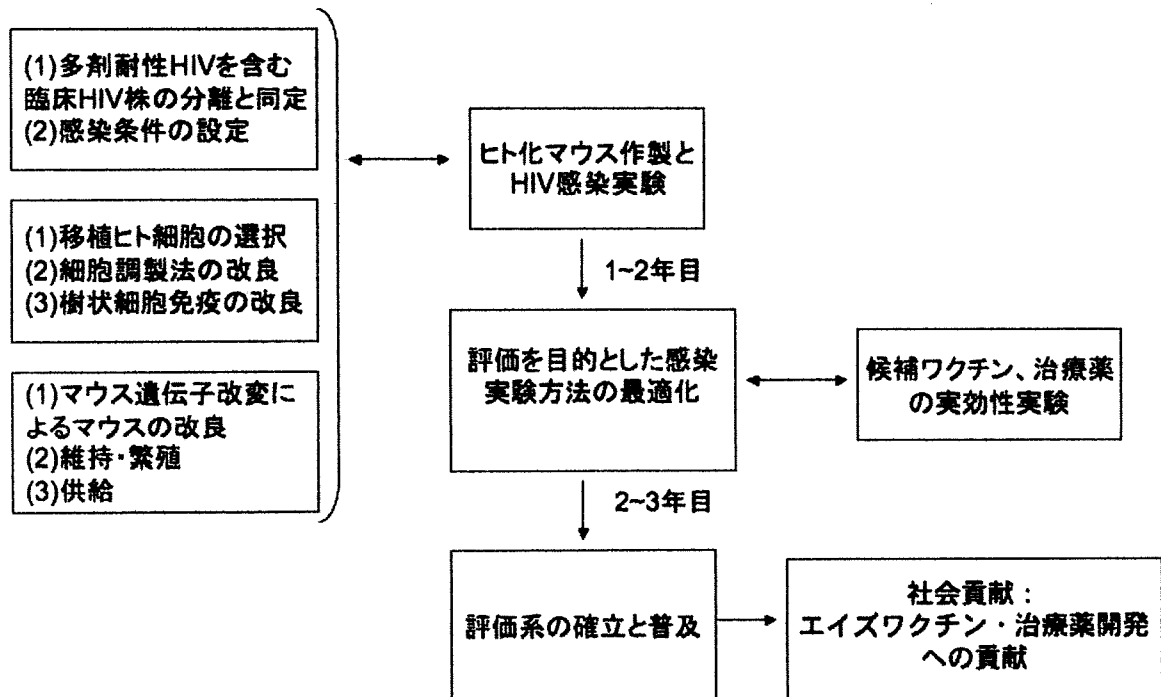
infection, lympho-proliferative/degenerative disorders, and immune responses. 2nd Annual Humanized SCID Mouse Models: Stem Cells, Cancer and Viral Pathogenesis, May 14-15, 2008, Geneva.

原著論文による発表 100 件
 それ以外 (レビュー等) の発表 3 件
 (その主なもの)

- (1) Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Suppression of CCR5-tropic HIV-1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of β -chemokines. AIDS Res Hum Retroviruses. 2010 (in press).
- (2) Kodama A, Tanaka R, Zhanng 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-1 interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. Human Immunology. 2010 (in press).
- (3) 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-2Rgnull mice infected with CCR5-tropic HIV-1. Vaccine, in press.
- (4) 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) : 2940-8, 2009.
- (5) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Yamamoto N, Fujiwara S. T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. J Infect Dis. 200(10):1611-5, 2009.
- (6) 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
- (7) 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.

- (8) Humanized mice for human retrovirus infection. Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. *Curr Top Microbiol Immunol.* ;324:133-48, 2008. (review)
- (9) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 109(1): 212-8, 2007.
- (10) Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, and Matsuzaki Y. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007.
- (11) Masuda, H., T. Maruyama, E. Hiratsu, J. Yamane, A. Iwanami, T. Nagashima, M. Ono, H. Miyoshi, H. J. Okano, M. Ito, N. Tamaoki, T. Nomura, H. Okano, Y. Matsuzaki, and Y. Yoshimura. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1925-1930,2007.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし



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

(事業計画平成19年～21年)

ヒト化マウスへの感染性HIV-1の接種
(P3実験室安全キャビネット内)



II. 分担総合研究報告

研究課題：ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染防御ワクチンの評価

田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

平成19-21年度研究分担総合報告書

研究要旨：

感染予防や治療を目的とした HIV-1 ワクチンの開発は世界的にも重要なテーマである。しかし、HIV-1 は持続感染するウイルスであり、抗原を接種するだけのいわゆるクラシックなワクチントライアルはすべて失敗に終わっている。新たな作用機序に基づく新規ワクチン法や免疫療法の開発が渴望されているのが現状である。そこで、本研究では個体レベルでワクチンの評価に不可欠な小型動物モデルとして“新規ヒト化マウス”を開発し、その評価系の最適化と普及化を図るとともに、樹状細胞を用いた新たなエイズワクチン戦略に寄与することを目的とした。ヒト化マウスにおいて HIV-1 ワクチンの評価を行うには、使用するマウス系統の選択、マウス体内でワクチンによって誘導できるエフェクター細胞の数と機能を最大限に引き出すこと、およびこの実験系を普及させるためのプロトコルの簡素化と鋭敏化が必須である。3年間の研究において、本研究で作出された免疫不全マウス系統の評価と選択、ワクチン抗原を提示させる樹状細胞(DC)培養の簡素化と機能検証、免疫誘導を抑制する制御性T細胞(Treg)の除去の効果等を検討した。単球を精製することなく未精製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 DC(PB-DC)を誘導できること、さらにこの PB-DC を不活化 HIV-1 で感作して免疫に用いると、BALB/cA-Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウス (BRG マウスと略) で作製した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。

A. 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として極めて有用なことはこれまで多数の論文で証明されている。我々は、このマウス系統を用いた研究において、ヒト化マウスを樹状細胞を用いる方法で免疫(DC-based immunization)することにより HIV-1 特異的ヘルパーT細胞免疫応答

を誘導法できることを報告した。HIV-1 感染患者においては、自家樹状細胞免疫が HIV-1 に対する特異的な免疫応答を高め、その結果として HIV-1 感染防御や HIV-1 量の軽減化につながるものが 2003 年に報告されている。この成果をサポートする我々の研究は、免疫不全マウスを自家DCを使って不活化HIV抗原で免疫することにより HIV-1 に対するヒト型の感染防御的免疫応答を誘導できることを示した。このヒト化マウスでは HIV-1 の産生的感染増殖を再現できるからである。

したがって、この系は、実際の HIV ワクチンの評価に応用できる個体実験系である。

そこでこの系を 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を本研究の大きな目標とした。

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、BALB/cA-Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}マウス (BRG マウスと略) が最適であることを示す。NOG マウスは BRG 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。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と考えた。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でに作製され、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。一般に免疫応答を高めるためには、高い抗原性を有する抗原を調製すること、抗原提示細胞として樹状細胞の機能を高めること (アジュバント等の利用)、また免疫抑制性 T 細胞の沈静化が考えられる。我々の研究室では、現在、DC の試験管内分化培養について種々のトライアルを重ねてきている。DC 分化培養は、今では一般の研究室でも可能になったが、そのための手技はまだまだ煩雑であり、コストは決して安くはない。将来、多くの患者やワクチン希望者を対象とする免疫療法を実現させるには、より簡易的で安価な DC 分化方法を開発する必要があると考えた。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、HIV-1 感染症の DC を用いた細胞免疫療法・ワクチンの基盤作りを図るため、DC の分化培養の簡素化とその検証を行った。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も目的の一つとした。

B. 方法

(1) マウスとキメラマウスの感染性: 実験動物中央研究所から供与された 4 系統のマウス (BRG マウス、human IL-4 発現 BRG マウス、NOG マウス、human IL-4 発現 NOG マウス) の腹腔内に 1 ml の RPMI 1640 培地に浮遊させた 5×10^6 個の PBMC を接種した。1 日後、2000 U 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) ヒト細胞の表現系: 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-gamma、human Ig の量を ELISA で定量した。

(3) Treg の活性: 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。

(4) 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氷中 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、マグネチックビーズ・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。

(5) *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、各々 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。

(6) DC 培養の短期化 : 健康人の末梢血から密度勾配遠心法により末梢血単核細胞 (PBMC) を分離し、未精製のまま、あるいは市販の CD14 陽性細胞を 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。

(7) ヒト免疫応答の誘導 : 免疫不全マウスを麻酔し、その脾臓内に (a) 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 (b) 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 1 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-1 JR-FL を攻撃接種した。感染の有無を血中、腹腔内洗浄液、および培養細胞上清中の p24 アッセイで検討した。

(8) DC の分化阻害 : 健康人由来 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) HIV-1 IIIB、HIV-1 NL4-3 または HIV-1 JR-CSF の 50 ng/ml p24 相当を培養初期から添加した。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) から示される生存 DC の数で判定した。抗体やサイトカインは市販のものを用いた。

C. 結果

(1) 免疫不全マウスの比較

5 x 10⁶ 個のヒト末梢血単核球 (hu-PBL) を移植して 1 日目の 4 系統の各 3 匹の免疫不全マウス (BRG マウス、human IL-4 発現 BRG マウス、NOG マウス、human IL-4 発現 NOG マウス) の腹腔内に CCR5 指向性 JR-CSF を接種した。1 週間後に HIV-1 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。腹腔内洗浄液中の p24 は IL-4 NOG マウスに 10 pg/ml 程度に認められたが、IL-4 BRG と BRG 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⁺ の HIV-1 感染 T 細胞の割合は、NOG マウスでは約 1%、IL-4 発現 NOG と IL-4-BRG マウスでは 0.3~0.6% 程度であったが、BRG 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、BRG 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。どのマウスも R5 HIV-1 感染実験に適用できることが示された。

(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 1×10^7 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プ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無かった。Treg の活性を CFSE 標識法で測定した。具体的には、OKT3 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 OKT3 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 産生で比較すると、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った。

(4) 新規 DC 分化培養法 :

我々が開発した新たな方法は、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 (PB-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した。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、1 週間後に DC (抗原感作済み) の追加免疫を行うと、次の 1 週間後には、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 HIV-1 抗原に対する応答を検討した。同様な免疫スケジュールで処理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-1 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 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-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、PB-DC の *in vivo* での効果は期待できると考える。

(5) 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 の収量はほぼ同等であった。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-1 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 の分化阻害が観察された。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 の分化阻害の原因は 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 ビーズを用いて PBMC から pDC 細胞群を除去すると、IFN- α の産生が有意に抑制され、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

単純にヒトの PBMC を移植することにより作製されるヒト・マウスキメラ(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 感染の個体モデルである。これまでの本研究により、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 PBMC のドナーに大きく左右されることを明らかにした。特にマウス個体に存在する Natural Killer cell (NK) はヒト細胞の移植片生着を制限する。また、生着においては、マウスに対してマイルドな免疫応答 (GVHD) を惹起するドナーの PBMC が優れている。そこで、本評価系をより普及させるには、最適な系統のマウスを作出しその利用性を検証することが必要であった。本研究で検討した 4 系統のマウスはすべてにおいてマウス NK 細胞を欠損する。これらのマウスにおいて、PBMC の生着性、R5/X4 HIV-1 の増殖性、ヒト由来 Treg の有無を比較検討したところ、R5 HIV-1 に対する免疫誘導と感染実験を行うには、BRG マウスが最適であることを示した。このマウスにヒト IL-4 産生能を賦与したマウス IL-4-BRG マウスは、X4 HIV-1 の実験に最も適していることが示唆された。

自然 Treg は、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺のマーカーを持ち、TGF- β 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が、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。本研究で、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ので、今後、Treg の除去と HIV-1 免疫の増強についてより明らかにしたい。

本研究において DC の試験管内分化誘導には、一般に行われている単球の分離精製は必要がないことが示された。これまでは過去の論文報告や参考書あるいは聞きかじりの情報

を参考にして、DC 培養には単球以外の PBMC の混入はできるだけ避けてきた。しかし、単球の negative isolation 精製法においても単球の純度を90%以上することは不可能である。我々がより精製度の高いと言われる positive isolation 法を使わない理由は、単球に anti-CD14 抗体が結合するので間接的な悪影響が懸念されるからである。Negative selection 法で精製した単球と比べても PBMC から誘導した DC は、その収量とアロ CD4⁺T 細胞増殖誘導能において顕著な違いはなかった。また重要な事実、この DC は、不活化 HIV で感作することによりヒト化マウスにおいて HIV 特異的 CD4⁺T 細胞を誘導できたことである。

本研究成果は、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時間の操作で DC の培養準備が整うこと、(2) この PB-DC は抗原特異的なヒト型の T 細胞および B 細胞の免疫応答をヒト化マウスで誘導できること、(3) さらにこの DC を不活化 HIV-1 で感作して免疫に用いることにより、CCR5 使用 HIV-1 感染を阻止する T 細胞免疫応答を惹起できることを検証した。以上の観点から判断すると、本研究成果は、DC 免疫療法法の基盤をつくる上で重要であると考えられる。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 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。本研究成果は、HIV 感染者から DC を誘導する際における注意点として重要な示唆を与える。

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個体モデルとして応用

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、簡便そして短時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) Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Suppression of CCR5-tropic HIV-1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of β -chemokines. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 (in press).
- (2) 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-1 interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunology*. 2010 (in press).
- (3) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naïve CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with

CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*. 2010 (in press).

- (4) 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*. 2009;386:23-31.
- (5) 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*. 2009;53:2940-48.
- (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*. 2009;183:524-32.
- (7) 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 null mice. *Virology*. 2009 Nov 10;394(1):64-72.

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.

(2) 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.

(3) Shinoda Y, Suzuki Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. Interferon- ω 1 is a powerful inhibitor for HIV-1 infection. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.

(4) 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.

(5) 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.

(6) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Sugiura W, Nishizawa M, Yamamoto N, and Tanaka Y. An Improved Animal Model for X4 HIV-1 Infection: Human IL-4-Transgenic hu-PBL SCID Mice. 14TH Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Los Angeles Convention Center, Los Angeles, California, U. S. A. 25-28 February 2007.

(7) Sato K, Aoki J, Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., Koyanagi, Y. : Tetraspanin on HIV-1 virions inhibits its infection. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, 2007.

(8) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. CD63 and its mutants inhibit fusion of CXCR4-containing vesicles to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.

学会発表国内:

- (1) 田中勇悦. AIDS に対する樹状細胞免疫. 第 50 回日本熱帯医学会大会・プログラム抄録集, 2009.10.22-23:沖繩. 59
- (2) 田中勇悦, 田中礼子. 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. フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー・講演要旨集, 2009.11.5-6:沖繩. 102
- (3) 神山陽香, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤祐徳, 山本直樹, 久保嘉直. HIV-1 感染における標的細胞中のエズリン・リン酸化の重要性. 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. 157
- (4) 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
- (5) 久保嘉直, 吉居廣朗, 神山陽香, 田中勇悦, 佐藤祐徳, 山本直樹. カテプシン B 抑制因子による CD4 非依存性 HIV-1 感染の促進. 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. 420
- (6) 今村志穂子, 田中礼子, 田中勇悦. イムノクロマト法を用いた HIV-1 p24 抗原検出キットの作製. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会・プログラム・抄録集, 2009.11.26-28:愛知県. 440(174)
- (7) 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・プログラム・抄録集, 2009.11.26-28:愛知県. 489(223)
- (8) 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・プログラム・抄録集, 2009.11.26-28:愛知県. 489(223)

- (9) 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・プログラム・抄録集, 2009. 11. 26-28:愛知県. 494(228)
- (10) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦. 新規パ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. 日本エイズ学会誌 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会・プログラム・抄録集, 2009. 11. 26-28:愛知県. 597(331)
- (11) ZHANG Li Feng, TANAKA Reiko, TANAKA Yuetsu. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of IL-4, GM-CSF and IFN-beta.
- (12) 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・抄録集, 2008. 10. 26-28 : 岡山. 218.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 高柳 亮, 大橋 貴, 田中勇悦, 志田壽利. hCRM1Tg ラットモデルを用いた抗 HTLV-1 抗体産生誘導の解析. 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. 331.
- (16) 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).
- (17) 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) .
- (18) 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).
- (19) 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 常温保存可能な第 4 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).
- (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 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008. 11. 26-28:大阪. 474 (252) .
- (21) 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) .
- (22) 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) .
- (23) 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)
- (24) KONDO Kayo, MATUZAKI 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 巻日本免疫学会総会・学術集会記録, 2008 12. 1-3: 京都. 169.
- (25) 久保嘉直, 吉居廣朗, 神山陽香, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: HIV-1 細胞内侵入における ERM ファミリー蛋白質の関与. 日本ウイルス学会第 55 回学術集会プログラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌. 137.
- (26) 門出和精, 遊佐敬介, 前田洋助, 田中勇悦, 原田信志: CCR5 の取り込みによる HIV-1 の V3 loop 依存的な感染性低下の解析. 日本ウイルス学会第 55 回学術集会プログラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌. 142.
- (27) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦: HIV 受容体に加えて活性化 T 細胞接着分子 OX40L を発現する VSV の HIV-1 感染細胞の選択的殺傷. 日本ウイルス学会第 55 回学術集会プログラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌. 143.
- (28) 篠田康彦, 田中勇悦, 鈴木陽一, 三浦義治, 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. 日本ウイルス学会第 55 回学術集会プログラム・抄録集, 2007. 10. 21-23: 札幌. 256.
- (29) 高橋良明, 田中礼子, 田中勇悦: CD4 陽性 T 細胞株での OX40(CD134) 分子の新たな機能: OX40/OX40L 系により誘導されるアポトーシスのメカニズム. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22: 東京. 179.
- (30) KONDO Kayo, TANAKA Reiko, TANAKA Yuetsu: Activation of primary human T cells in DNA synthesis-arrested states rapidly induces significant amounts of functional OX40 ligands. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22: 東京. 179.
- (31) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: OX40L 抗体によるヒト制御性 T 細胞(Treg)の誘導促進. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 415.
- (32) 田中勇悦, 田中礼子, 児玉晃, 張麗峰, 近藤佳代, 大隈和: 細胞結合 OX40 リガンドによる活性化 CD4+T 細胞における R5 HIV-1 の抑制. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 416(174)
- (33) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦: ヒト IL-4 産生免疫不全マウスを用いた多剤耐性 HIV-1 臨床分離株に対する薬剤評価系の確立. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 457.
- (34) 児玉晃, 近藤佳代, 張麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: エイズ樹状細胞免疫療法にむけて: 未精製末梢血単核球群からの樹状細胞分化誘導. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 525. エイズ学会学術集会・総会, 2009 年、愛知県.
- 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