

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 19 - 21 年度研究分担総合報告書

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、ウイルス産生細胞解析と 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。ウイルス産生細胞のほとんどは、CD3 陽性 CD4 陰性 CD45 陽性 CCR7 陰性エフェクターメモリー細胞であることがわかった。さらに、これらの細胞の細胞周期解析の結果、Ki67 陽性 CD69 陽性の分裂細胞が多かった。一方、明らかに、Ki67 陰性の 2 倍体の p24 陽性細胞もあり、生体内におけるウイルス産生細胞は分裂期と休止期の両者の T 細胞であることがわかった。さらに、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、ウイルス感染に伴う 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、ウイルス産生細胞の性状解析、ならびに、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 Ki67, CD69, CD45RO, CD45RA, CCR7 のそれぞれに対する単クローン抗体により染色後、HIVp24 特異的単クローン抗体 (2C2; 琉球大学田中勇悦博士より分与) を用いてその陽性率を測定した。(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 週 15 週目に血漿中の HIV-1 RNA 量は 1ml 当たり $10^3 \sim 10^5$ コピーと高ウイルス血症を維持していた (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% に検出された (図 1 B)。3 週 15 週目の末梢血における 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)。

さらにこれらの細胞は CD3 陽性 CD4 陰性の T 細胞であった (結果示さず)。同時に脾臓、リンパ節、骨髄を抗 p24 抗体と抗 CD4 抗体により免疫組織染色を行ったところ、骨髄と比較して脾臓とリンパ節では CD4 陽性細胞にきわめて多数の p24 陽性細胞が検出された (結果示さず)。すなわち、脾臓やリンパ節の CD4 陽性細胞において活発なウイルス増殖が起きていることがわかったが、CD4 は細胞表面上では検出されないことより、CD4 分子はダウンレギュレーションされていることが考えられた。また、これらの p24 陽性細胞は CD45RO 陽性 CD45RA 陰性 CCR7 陰性のエフェクターメモリー T 細胞であることがわかった (結果示さず)。

2) 活性化ならびに休止期細胞における HIV-1 の産生

次に、これらウイルス産生細胞の細胞内環境を検討するために細胞分裂マーカーである

Ki67 ならびに CD69 染色をおこなった。その結果、p24 陽性細胞は、同じ感染マウス内の p24 陰性細胞、あるいは、非感染 (Mock) マウスの CD4 陽性細胞のそれと比較して、明らかに Ki67 陽性ならびに Ki67 と CD69 いずれも陽性であることがわかった (図 2 A と B)。すなわち、HIV-1 産生細胞は、活性化した T 細胞が多いことがわかった。次に、HIV-1 産生細胞の細胞周期を解析するために、p24、Ki67、Hoechst 33342 の 3 重染色を行った。この染色の陽性コントロールとして用いた非活性化ヒト PBL (non-stimulated human PBL) はほとんどの細胞 (98.6%) が G0/G1a 期に、PHA 活性化ヒト PBL (PHA-stimulated human PBL) は、G1b ならびに S/G2M 期として検出された (図 2 C)。そして、HIV-1 感染マウスの脾臓細胞のなかの p24 陽性細胞は、G1b 期の細胞数が、同じ感染マウスの p24 陰性細胞ならびに Mock マウスの CD4 陽性細胞のそれと比較して、有意に多いことがわかった (図 2 D)。一方、p24 陽性細胞の中には明らかに G0/G1a の休止期の細胞があることがわかり、休止期の細胞からも HIV-1 は産生されている可能性を強く示唆された (図 2 D 右)。

3) 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 2 E と I)。3 週 28 週までの末梢血の解析では非感染マウスでは一例 (図 2 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 2 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 2 J と L)。

D. 考察

NOG-hCD34 マウスにおいては HIV-1 の持続感染が成立し、高ウイルス血症維持と CD4 陽性 T 細胞の持続的減少、特に R5 HIV-1 の感染マウスでは、末梢血 T 細胞中の CD4 陽性 CD45RA 陰性のメモリー T 細胞の感染後時間経過とともに減少することを見出した。この感染マウスの脾臓ではきわめて多くの HIV 陽性細胞を見出した。そして、この HIV 産生細胞の多くは、CD3 陽性 CD4 陰性であること、そして、Ki67 ならびに CD69 陽性の活性化細胞が多いこと、また、細胞周期解析から G1b 細胞が有意に多いことがわかった。この結果は、HIV の Vpr 蛋白質は G2M 期停止を誘導することがよく知られていることと矛盾があり、今後の検討が必要である。さらに、p24、Ki67、Hoechst 33342 の 3 重染色結果、G0/G1a の休止期の細胞からもウイルスが産生される

ことも明らかになった。これらの結果は、HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスを用いて、活性化 T 細胞とともに休止期 T 細胞からウイルスは産生されることがわかった。これらの細胞内環境が異なる細胞の寿命ならびに抗ウイルス薬に対する感受性には、当然差異があることが予想され、生体内におけるウイルス感染様式の多様性がこのマウス内では再現されていると考えられる。

さらに、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、生体内におけるウイルス産生細胞は分裂期と休止期の両者の T 細胞であること、さらに、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) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, Terunuma H, Kano S, and Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 2) Futahashi, Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, and Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science* 98:373-379, 2007.
- 3) Miyano-Kurosaki N, Kira J, Barnor JS, Maeda N, Misawa N, Kawano Y, Tanaka Y, Yamamoto N, and Koyanagi Y. Autonomous proliferation of HTLV-CD4+ T cell clones derived from human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy patients. *Microbiol. Immunol.* 51:235-242, 2007.
- 3) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, and Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol.* 82, 1021-1033, 2008.
- 4) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol. Immunol.* 52: 78-88, 2008.
- 5) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. "Humanized Mice", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 324:133-148, 2008. Nomura, Tatsuji; Watanabe, Takeshi; Habu, Sonoko (Eds.).
- 6) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9: 540-558, 2008.
- 7) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82: 2528-2542, 2008.
- 8) Kawamura T, Koyanagi Y, Nakamura Y, Ogawa Y, Yamashita A, Iwamoto T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S. Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: Relevance to occupational transmission of HIV. *J. Immunol.* 180: 3297-3304, 2008.

- 9) Yamaguchi K, Sugiyama T, Kato S, Kondo Y, Ageyama N, Kanekiyo M, Iwata M, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. A novel CD4-conjugated ultraviolet light-activated photocatalyst inactivates HIV-1 and SIV efficiently. *J. Med. Virol.* 80:1322-1331, 2008.
- 10) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let.* 582:4053-4058, 2008.
- 11) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. *Microbes Infect.* 10:1514-1523, 2008.
- 12) 佐藤佳, 小柳義夫. Sputnik Sweetheart □ ウイルスに感染するウイルス. ウイルス (日本ウイルス学会誌), 58 巻, 第 2 号, pp. 219-220, 2008.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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
- 16) 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.
- 17) 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^γnull mice. *Virology* 394:64-72, 2009.
- 18) 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.
- 19) 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^γnull mice infected with CCR5-tropic HIV-1. Vaccine, in press.
2. 学会発表
- 1) Koyanagi Y. HIV-1-infection in humanized mice. Innovation forum of Tohoku University US office, San Francisco, 2007.
- 2) 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.
- 3) Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y. High level of HIV-1 viremia and CD4 depletion in human CD34⁺ cell-engrafted mice. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- 4) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus-1 Vpr inhibits neurite outgrowth via caspase-3-independent pathway, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- 5) 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.
- 6) Sato K, Daikoku E, Sano K, and Koyanagi Y. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity through Incorporation of CD63, Awaji symposium, Awaji, 2007.
- 7) Koyanagi, Y. Foundation and Recent Progresses in Retrovirus Research, Awaji symposium, Awaji, 2007.
- 8) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. 8th AIDS seminar in Kumamoto. 2007.
- 9) Koyanagi, Y.: HIV-1 viral protein R inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone

- an inhibitor of HIV-1-induced cell death. 14th East Asia symposium, Tokyo, 2007.
- 10) Koyanagi, Y.: "Mitochondria and membrane trafficking" implication for HIV infection and pathogenesis. 10th Anniversary symposium of Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, 2007.
 - 11) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. HIV-1 VPR in mitochondria impairs neuronal progenitor cell differentiation, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 12) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Identification of cellular interactors to MoMLV integrase using tandem affinity purification-mass spectrometry analysis. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 17) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 18) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Seoul, 2008.
 - 19) Kitayama H, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y, HIV-1 Vpr in Mitochondria impairs neuronal cell repair. XIV. International Congress of Virology, Istanbul, 2008.
 - 20) 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.
 - 21) Suzuki Y, Ogawa K, Koyanagi Y, Suzuki Y. VRK induces dysfunction of the MoMLV PIC through phosphorylation of BAF. 3rd International Conference on Retroviral Integrase, Woods hole, Massachusetts, 2008.
 - 22) Koyanagi, Y.: HIV and AIDS 日中数理生物学コロキウムシンポジウム、岡山, 2008.
 - 23) Koyanagi, Y.: HIV-1 pathogenesis: productive infection in CD4+ effector memory T lymphocytes and CD4+ depletion in humanized mice, 第11回京都大学国際シンポジウム、上海, 2008.
 - 24) 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.
 - 25) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of HIV-1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. The Kinki AIDS Seminar, Nara, 2008.
 - 26) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of pathogenesis and productive infection of HIV-1 in humanized mice. The 8th Awaji Symposium, Awaji, 2008.
 - 27) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Functional association of HIV-1 and MoMLV integrase with HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2008.
 - 28) 小柳義夫. HIV-1感染ヒト造血マウス. 第31回阿蘇シンポジウム、熊本, 2007.
 - 29) 芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 膜

- 輸送変換による HIV-1 感染阻止ストラテジー. 近畿エイズ研究会、大阪、2007.
- 30) 芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. HIV のコレセプターである CXCR4 の細胞内輸送. ウィルス学会湯河原キャンプ、湯河原、2007.
 - 31) 芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. CXCR4 トラフィッキング過程の可視化と遺伝子導入による HIV-1 感染阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007
 - 32) 北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV-1 Vpr 誘導性ミトコンドリア機能障害による神経細胞軸索伸長の阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
 - 33) 小柳義夫、三沢尚子、北山裕子、佐藤佳、渡部匡史、Johnny Chuanyi Nie、伊藤守. HIV-1 感染ヒト造血細胞移植マウス内に維持される長期高ウイルス血症. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
 - 34) 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. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
 - 35) 安藤良徳、北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. HSV-1 感染による中枢神経組織障害の経時的解析. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
 - 36) 北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV 感染による認知障害機構: Vpr によるミトコンドリア機能障害による神経前駆細胞分化抑制. 第 21 回日本エイズ学会、広島、2007.
 - 37) 芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 受容体分子の表面発現を輸送小胞レベルで調節する機構; HIV のコレセプター分子の細胞質膜発現を調節する. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007.
 - 38) 佐藤佳、山元誠司、小柳義夫. HIV-1 の粒子産生過程における Ral GTPase の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007.
 - 39) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. HIV-1 VPR in mitochondria impairs neuronal progenitor cell differentiation, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 40) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 41) 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.
 - 42) Shinoda Y, Suzuki Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. Interferon-w1 is a powerful inhibitor for HIV-1 infection. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 43) 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.
 - 44) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Identification of cellular interactors to MoMLV integrase using tandem affinity purification-mass spectrometry analysis. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 45) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
 - 46) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Seoul, 2008.
 - 47) Kitayama H, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y, HIV-1 Vpr in Mitochondria impairs neuronal cell repair. XIV. International Congress of Virology, Istanbul, 2008.
 - 48) 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.
 - 49) Suzuki Y, Ogawa K, Koyanagi Y, Suzuki Y.

- VRK induces dysfunction of the MoMLV PIC through phosphorylation of BAF. 3rd International Conference on Retroviral Integrase, Woods hole, Massachusetts, 2008.
- 50) Koyanagi, Y.: HIV and AIDS 日中数理生物学コロキウムシンポジウム、岡山、2008.
 - 51) Koyanagi, Y.: HIV-1 pathogenesis: productive infection in CD4+ effector memory T lymphocytes and CD4+ depletion in humanized mice, 第11回京都大学国際シンポジウム、上海、2008.
 - 52) 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.
 - 53) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of HIV-1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. The Kinki AIDS Seminar, Nara, 2008.
 - 54) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of pathogenesis and productive infection of HIV-1 in humanized mice. The 8th Awaji Symposium, Awaji, 2008.
 - 55) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Functional association of HIV-1 and MoMLV integrase with HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2008.
 - 56) 渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫. Small GTPase Rac2によるHIV-1増殖制御. 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008.
 - 57) 鈴木康嗣、小川加那子、小柳義夫、鈴木陽一. 細胞性キナーゼVRK1によるレトロウイルスインテグレーション機能の阻害とその分子メカニズム. 第56回日本ウイルス学会、岡山、2008.
 - 58) 篠田康彦、鈴木陽一、田中勇悦、小柳義夫. インターフェロンオメガ1によるHIV-1感染抑制機構の解析. 第22回日本エイズ学会、大阪、2008.
 - 59) 安藤良徳、北山裕子、小柳義夫. ウイルスに対する海馬組織の脆弱性に関する研究. 第22回日本エイズ学会、大阪、2008.
 - 60) 小林 朋子、芳田 剛、駒野 淳、小柳 義夫. レンチウイルスベクターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会、大阪、2008.
 - 61) 佐藤佳、Chuanyi Nie、三沢尚子、田中勇悦、伊藤守、小柳義夫. ヒト化マウスにおけるHIV-1感染指向性と持続感染細胞の同定. 第22回日本エイズ学会、大阪、2008.
 - 62) 渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫. HIV-1複製制御におけるSmall GTPase Rac2の機能解析. 第22回日本エイズ学会、大阪、2008.
 - 63) 山元誠司、大川克也、小川加那子、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一. TAP-MS法によるインテグラーゼ結合因子Huwelの同定とその解析. 第22回日本エイズ学会、大阪、2008.
 - 64) 佐藤佳、三沢尚子、Chuanyi Nie、高橋玲、伊藤守、小柳義夫. EBV感染モデルマウスの確立と活性化CD8+T細胞の誘導. 第38回日本免疫学会総会、京都、2008.
 - 65) Tadashi Watanabe, Youichi Suzuki, Masaaki Miyazawa, and Yoshio Koyanagi. Rho GTPase Rac2 modulates HIV-1 replication. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2009.
 - 66) 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.
 - 67) Kei Sato, Naoko Misawa, Chuanyi Nie, Rei Takahashi, Mamoru Ito, Kiyotaka Kuzushima, Kenzo Takada, and Yoshio Koyanagi. Epstein-Barr virus is productively replicated in humanized NOD/SCID/IL2gnull mice simulating severe complications observed in patients with fatal EBV infection, 第9回あわじしま感染症・免疫フォーラム, P-017, 淡路島, 2009.
 - 68) Kei Sato, Seiji P Yamamoto, Naoko Misawa, and Yoshio Koyanagi. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species, 第9回あわじしま感染症・免疫フォーラム, P-018, 淡路島, 2009.
 - 69) Kei Sato. EBV lytically replicates and causes hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, P2-14, Kyoto, Japan, 2009
 - 70) Koyanagi Y, HIV and EBV infection model using humanized, Workshop

Taiwan-Japan“Host-Pathogen Interaction”,
Kyoto, 2009.

- 71) 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.
- 72) 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.
- 73) 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.
- 74) 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.
- 75) 佐藤佳、三沢尚子、Chuan yi Nie、高橋玲、伊藤守、葛島清隆、高田賢藏、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.
- 76) 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 Huw1 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.
- 77) 小林朋子、芳田剛、佐藤佳、Peter Gee、蝦名博貴、小柳義夫. Bst-2 と HIV-1 Vpu 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.
- 78) 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.
- 79) 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
- 80) 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 の遺伝子組み込み機構. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
- 81) 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
- 82) 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 Huw1 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.

- 83) 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.
- 84) 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/IL2gnull 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

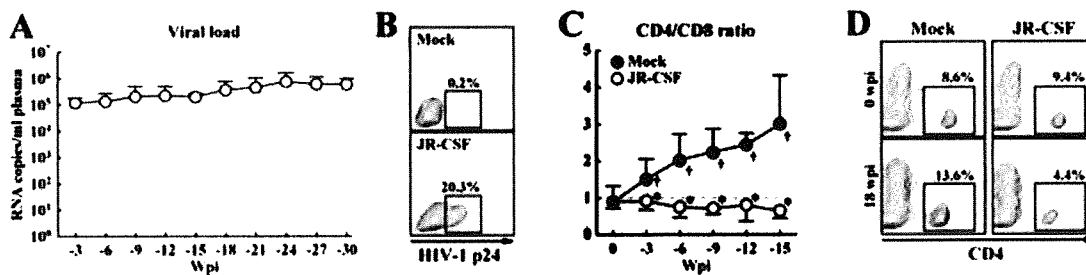


図 1. HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウスにおける HIV-1 複製増殖と CD8 陽性細胞の増加

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、

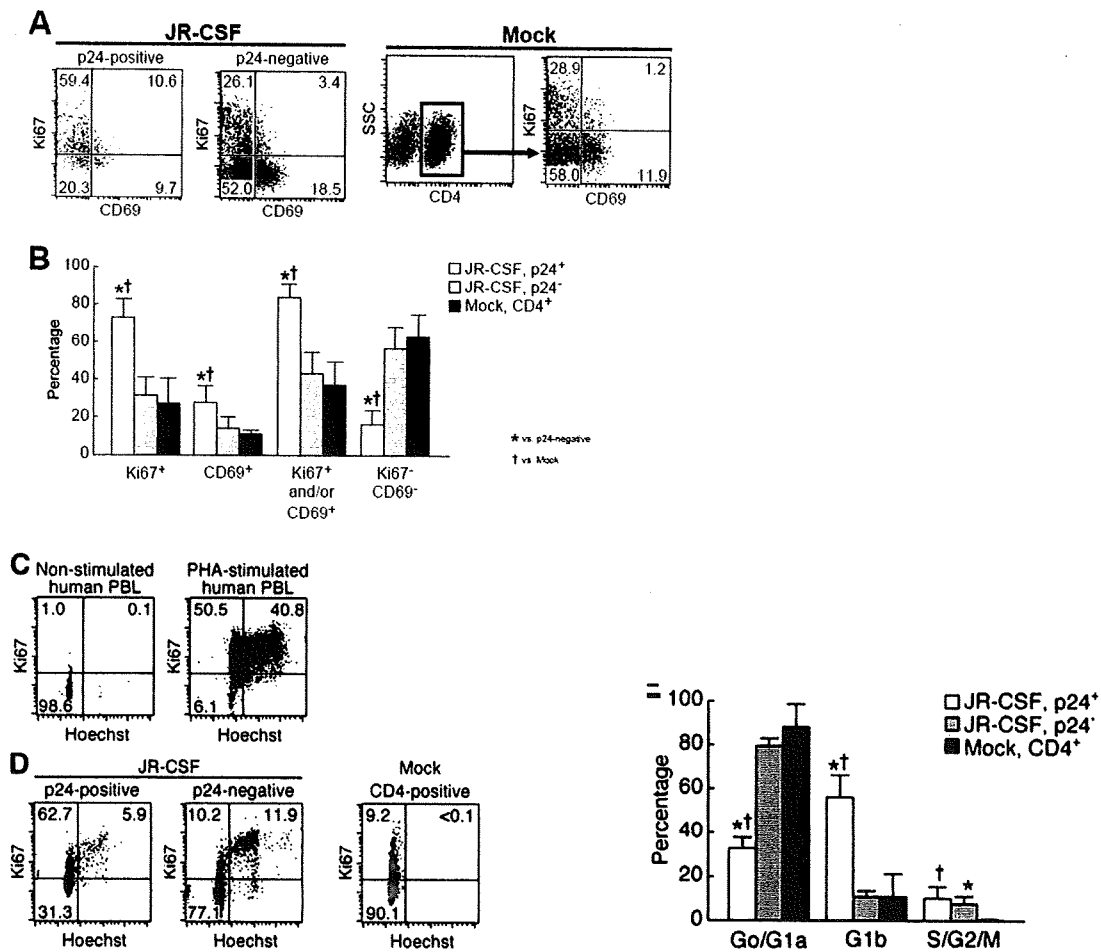


図2. HIV-1 感染 NOG-hCD34 マウス内における HIV-1 産生細胞の細胞内環境

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

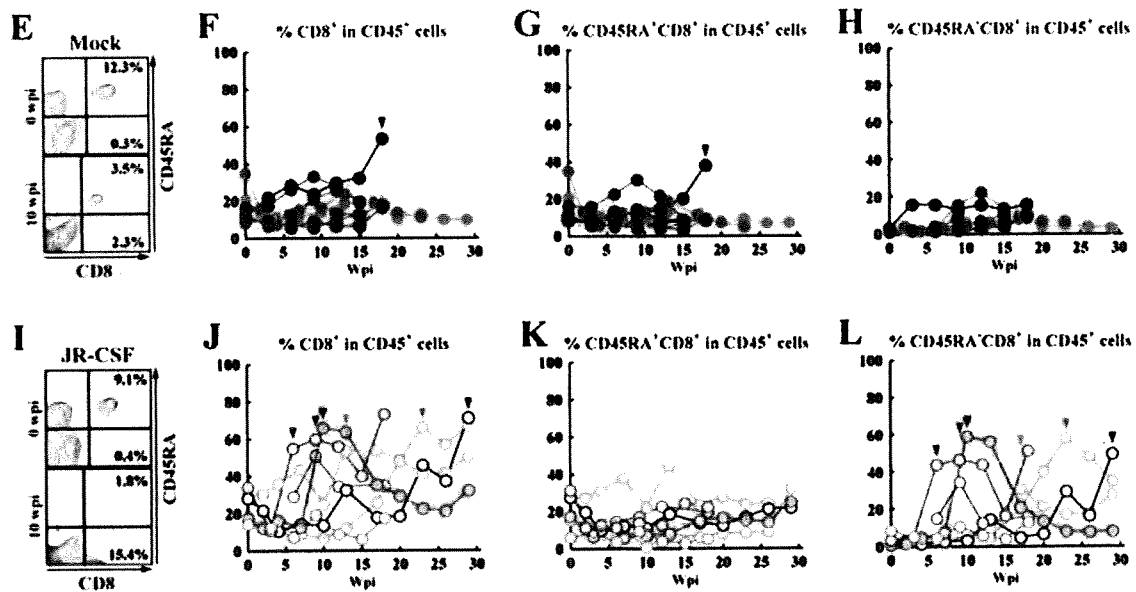


図2. (E-L) CD8 陽性 (F と J)、CD45RA 陽性 CD8 陽性(G と K)、CD45RA 陰性 CD8 陽性 (H と L) の割合を示す。Mock のサンプル は E-H、HIV-1_{JR-CSF} 感染のサンプルは I-L である。mock (E) と HIV-1_{JR-CSF} (I) の flow cytometry 解析の典型的な例を示す。F, G, J, L の矢印は CD8 陽性細胞割合の増加時を示す。Asterisk はそれぞれの細胞間の統計学的有意差 ($p < 0.05$, Student's *t*-test) を表している

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センター長

平成 19 - 21 年度研究分担総合報告書

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。このマウスにおいては 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。さらに、ヒト化マウスに EBV を感染させ、リンパ腫発症モデルを作製した。HIV-1 感染マウスに EBV を重感染させ、日和見リンパ腫モデルの作製を試みたところ、HIV-1 感染マウスでは非感染マウスに比べてリンパ腫の発症が遅れることが判明した。この重感染マウスモデルは、エイズや EBV 関連リンパ腫発症の研究にきわめて有用と考えられる。

A. 研究目的

ヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1) の世界規模での感染拡大が問題とされている中で、未だ有効なワクチンは実用化されておらず、エイズ関連疾患の治療法も確立されていない。HIV-1 やエイズ関連癌ウイルスである EB ウイルス (EBV) は通常の実験動物に感染しないことが治療法確立を妨げる大きな要因となっている。ヒト造血幹細胞を NOD/SCID/gamma (c) (null) マウス (NOG マウス) に移植した「ヒト化マウス」は、長期にわたるヒト免疫系の再構築を可能とし、ヒト感染症の様々な研究に有用であると考えられる。この NOG マウスは、ヒト造血幹細胞の生着に優れ、従来の SCID マウスでは難しいとされていたヒト T 細胞を含む各種リンパ球の発生が起こる。我々はこれまでに、このヒト化マウスが HIV-1 に高い感染感受性をもつことを示しており、薬剤・ワクチン開発の新しい動物モデルとしての有用性が期待されている。本研究では、マウスへのヒト造血幹細胞

移植法を改良し、長期間安定して生存するヒト化マウスを作製するとともに、HIV-1 長期感染によるウイルス動態の解析およびマウスの病態解析を行った。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試みた。

B. 研究方法

ヒト臍帯血造血幹細胞細胞の分離と NOG マウスへの造血幹細胞移植

臍帯血は東京臍帯血バンクより譲渡を受けた。臍帯血を Ficoll で遠心分離し、単核球 (CBMC) 層を回収し、MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) にて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。

6-10 週齢の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所および日本大学医学部にて飼育した。2 x 10⁴-1.2 x 10⁵ 個の CD34 陽性造血幹細胞をマウスの尾静脈より

移植した。

フローサイトメトリー解析

ヒト化マウスから経時的に末梢血や組織を採取し、ヒト細胞の性状をフローサイトメトリー (Beckman Coulter) で解析した。HIV-1 および EB ウイルス感染マウスについては、抗体染色後 1%ホルマリンで固定し、解析を行った。細胞の絶対数測定は、BD Trucount Tube (BD Pharmingen) を用いた。

HIV-1 感染実験

移植後 4-5 ヶ月のマウスに、HIV-1JRCSF (R5 指向性)、HIV-1MNp (X4 指向性) および HIV-1NL4-3 (X4 指向性) をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 4 ヶ月までに定期的に採血、剖検を行い、血漿中のウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。HIV-RNA は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system (PE Biosystems) で定量した。

EBV 感染実験

移植後 3-6 ヶ月のマウスに、Akata 細胞培養上清由来の EB ウイルスを尾静脈より投与した。投与後定期的に採血、剖検を行い、ウイルスコピー数の定量とフローサイトメトリー解析を行った。EBV-DNA は QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) にて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system で定量した。

EBV 特異的免疫反応の有無を調べるため、EBV 感染マウスの組織から CD8 陽性 T 細胞を分離し、IFN-gamma の産生を ELISPOT 法で解析した。CD8 陽性 T 細胞の刺激には、同ドナー由来の臍帯血細胞から樹立した EBV 感染 B 細胞株 (LCL) を用いた。

HIV-1 と EBV の重感染実験

移植後 4-5 ヶ月のマウスに、HIV-1JRCSF (R5 指向性) および HIV-1NL4-3 (X4 指向性) を尾

静脈より投与し、さらに 8 週間後に Akata 細胞培養上清由来の EBV を尾静脈より投与した。その後定期的に採血、剖検を行い、EBV コピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究にはヒト臍帯血、実験動物を使用するため、下記の点を留意して実験を行った。

臍帯血の使用に関しては、研究機関および東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。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、個人情報が出ることはない。臍帯血は臍帯を切り離した後で、臍帯・胎盤に残った血液を採取するため、新生児と母体への影響はない。また、臍帯血の採取は母子共に安全な分娩のみに限るとし、臍帯血採取によって分娩時の危険性が増す可能性を排除している。臍帯血採取に関しては、協力医療機関の医療スタッフが本研究の趣旨を説明し、臍帯血提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。同意書は東京臍帯血バンクにおいて厳重に保管される。したがって本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

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. 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、ヒト造血幹細胞の移植方法の改良を行い、移植後 300 日以上安定したマウスの生存を可能とした。従来の SCID マウスや NOG マウスへのヒト造血幹細胞の移植には放射線照射が不可欠とされていたが、NOG マウスでは放射線照射を行わなくてもヒト細胞の生着、発生が十分に起こることが判明した。マウス 220 匹の解析結果から、このヒト化マウスの 80% 以上は移植後 300 日以上生存し（平均生存期間：387 日）、300cGy の放射線照射したマウス（平均生存期間：188 日）に比べて明らかな長期生存を示した。末梢血のヒト白血球（CD45）、B 細胞（CD19）、T 細胞（CD3）の割合を解析した結果、移植後 2 ヶ月では発生したヒト細胞のほとんどが B 細胞であったが（図 1. A）、4 ヶ月目には T 細胞が検出され（図 1. B）、6 ヶ月目には B 細胞の割合を上回った（図 1. C）。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 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 日以降に増加して行くことが確認されたことから、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-1JRCFSF (65,000 TCID50 / マウス) および X4 指向性 HIV-1MNp (20,000 TCID50 / マウス)、X4 指向性 HIV-1NL4-3 (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 2）。

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-1MNp（5 匹）および HIV-1NL4-3（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 3. A）。一方、R5 指向性 HIV-1JRCFSF（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 3. 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 3. 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 3. 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。

3. 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4. 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5)。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(data not shown)。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た。

マウスにヒトCD3抗体ならびにCD8抗体を投与しCD4陽性T細胞を除去すると、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(図6)。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。

4. 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は健常人の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7. A, B)。一方、R5指向性HIV-1JRCSF(2匹)およびX4指向性HIV-1NL4-3(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。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(data not shown)。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。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。

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こり、EBV に対する強い免疫応答が誘導されることが明らかとなった。そこで、本研究では HIV-1 と EBV を重感染させ、免疫不全状態を誘導することにより「エイズに伴う日和見リンパ腫再現モデル」の作製を試みた。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。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た EBV 感染実験の結果もこのことを強く示唆している。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。

今回樹立した NOG マウスを用いた、HIV-1 と EBV 感染システムは、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。

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。この重感染マウスモデルは、エイズや EBV 関連リンパ腫発症の研究にきわめて有用と考えられる。

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.
 - 6) 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.* 10(7):748-56, 2008.
 - 7) 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.* 10(5):471-80, 2008.
 - 8) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 324:133-48, 2008. Review.
 - 9) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. 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(5):673-82, 2008.
 - 10) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol.* 81(23):13259-64, 2007.
 - 11) 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.

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

(共同研究者；渡辺哲、矢島美彩子)

図と表

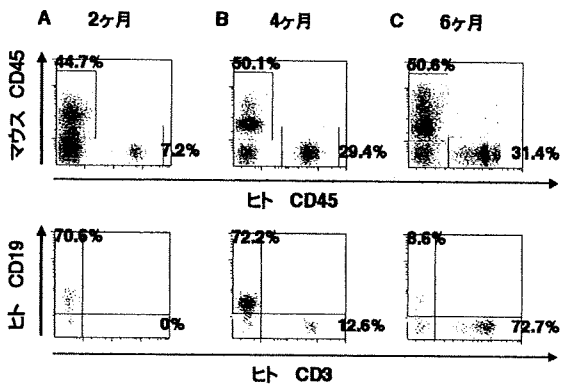


図1. ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスで発生するヒト T 細胞の解析

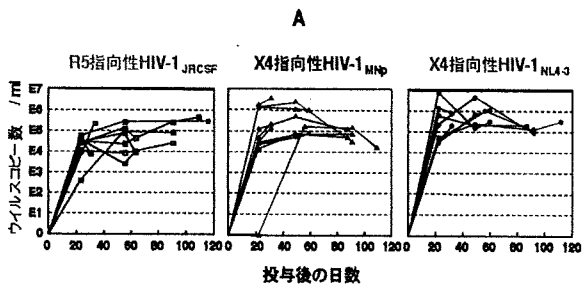


図2. HIV-1 投与後の血漿中ウイルスコピー数の変動

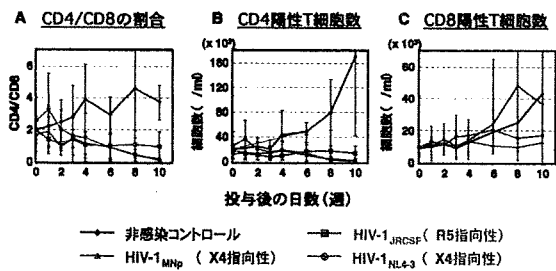


図3. HIV-1 感染マウスの末梢血における CD4/CD8 比および CD4 陽性 T 細胞数の変動

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

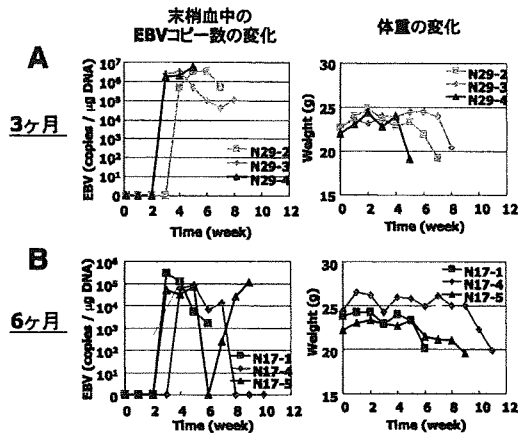


図 4. 末梢血中 EBV コピー数と体重の変化

A. 移植後 3 ヶ月のマウスに投与 B. 移植後 6 ヶ月のマウスに投与

	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	6.7×10^5	6.0×10^5	5.7×10^4	検出限界以下
脾臓	7.0×10^5	4.2×10^5	2.0×10^4	2.4×10^3
胸腺	未測定	1.7×10^5	2.3×10^3	1.2×10^2
骨髄	4.3×10^5	2.0×10^5	未測定	1.2×10^3
肝臓	未測定	5.7×10^5	2.8×10^4	4.2×10^3
腎臓	未測定	6.7×10^5	1.5×10^4	7.9×10^3
リンパ節	2.0×10^5	7.4×10^5	3.0×10^3	2.4×10^4

表 1. 主要組織における EBV コピー数の定量

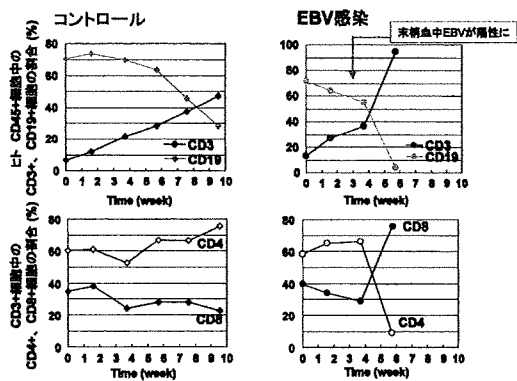


図 5. コントロールマウスおよび EBV 感染マウスにおける CD8 陽性 T 細胞の変動