

図6. 上：抗ヒト CD3 抗体 (OKT3) 投与による EBV 感染後のマウス生存への影響
下：抗ヒト CD8 抗体投与による EBV 感染後のマウス生存への影響

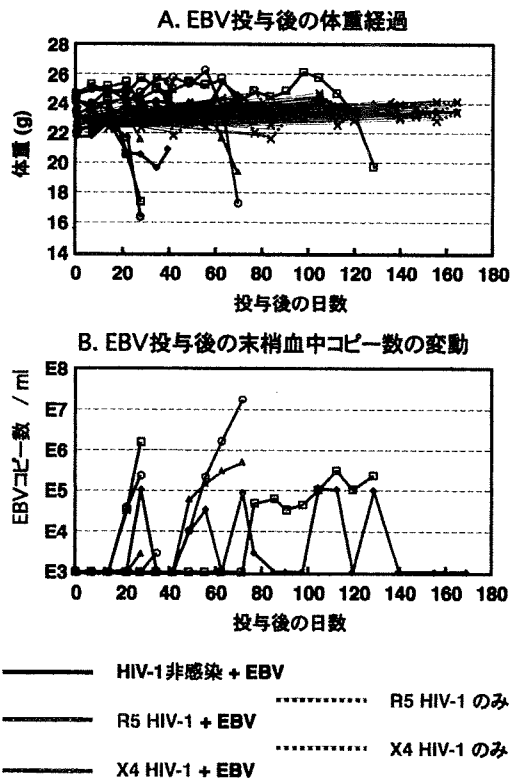


図7. HIV-1 非感染マウスおよび HIV-1 感染マウスにおける EBV 投与後の体重 (A) および末梢血中 EBV コピー数 (B) の経時的解析

「ヒト化マウスの基盤となる免疫不全マウスの開発と供給」に関する研究

研究分担者 伊藤 守 財団法人実験動物中央研究所・免疫研究室室長
(共同研究者 片野いくみ、伊藤亮治、佐々木正史、小倉智幸他 財団法人実験動物中央研究所)

平成 19 - 21 年度研究分担総合報告書

研究要旨：ヒトリンパ球が容易に生着し、HIV-1 感染モデルに適した「ヒト化マウス」作製の基盤となる重度免疫不全マウスの作出と供給をテーマとしてとして研究を実施した。このために、ヒト T 細胞の活性化と HIV-1 感染に関連するヒトサイトカインであるインターロイキン 4 (IL-4)、IL-2 および IL-15 を分泌する免疫不全トランスジェニックマウスを作出した。Human(h) IL-4 に関しては、前期に作出した C.B-17-*scid*、BALB/cA-*RAG2*^{null} *IL-2Rg*^{null} および NOD-*scid*、*IL-2Rg*^{null} (NOG) 系統に導入した hIL-4Tg マウスのうち、今期は後者 2 系統を感染実験のための生産を行い、共同研究者に供給した。また、この生産効率を上げる目的で、Tg ホモ型の選別とホモ型同士の交配による生産法を確立した。hIL-2 および hIL-15 Tg マウスに関しては、ともに Tg マウスが得られ、前者は動物の供給可能となった。加えて、ヒト化マウス作製のためのヒト末梢血単核球 (PBMC) 移入後に起こる移植片対宿主病 (GVHD) の発症について、NOG、BALB/cA-*RAG2*^{null} *IL-2Rg*^{null} および NOD-*scid* マウス間で比較、検討し、NOG マウスでは強い GVHD が起こることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究の目的は、エイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果を調べるために有効なヒトの細胞を生着させた「ヒト化マウス」小型動物モデルを作製することである。HIV-1 感染マウスとして、我々が樹立した BALB/cA-*RAG2*^{null} *IL-2Rg*^{null} (BALB/cA-dKO) -hIL-4Tg 複合マウスは従来の免疫不全マウスよりも HIV-1 感染性に優れていた。このマウスをより広範な HIV-1 感染実験および治療実験に用いるためには、生産の拡大が必要であり、そのために効率的な計画的生産法を確立する。さらに、同じく我々が開発してきた NOD/Shi-*scid*、*IL-2Rg*^{null} (NOG) -hIL-4 Tg マウスは、ヒト末梢血リンパ球および臍帯血幹細胞移植によって、よりヒト細胞の生着や HIV-1 感染性に優れている可能性がある。

さらに、同じく T 細胞の活性化や HIV-1 感染性に関与する hIL-2 や hIL-15 を分泌する新たな免疫不全 Tg マウスの作製を行う。このマウスでの移入ヒト細胞の生着性や体内動態を調べることによって、新しい HIV-1 感染のための「ヒト化マウス」モデルを提供することにある。

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

B. 研究方法

hIL-4 Tg 免疫不全マウスの生産と供給

当研究所で作製した human IL-4 を分泌する 3 系統の免疫不全マウス、C.B-17-*scid*-hIL-4 Tg、

BALB/cA-dKO -hIL-4 Tg および NOG -hIL-4 Tg マウスのうち、C.B-17-*scid*-hIL-4 Tg マウスを凍結保存し、残りの 2 系統については、BALB/cA-dKO -hIL-4 Tg マウスの高分泌系統 (2.10 ng/mL) を、NOG -hIL-4 Tg マウスは繁殖成績が良好な 0.32 ng/mL を分泌する系統を選別し、生産の拡大を企画し、大型アイソレーターによる計画生産を行った。繁殖は、当所 SPF 大型アイソレーター内での hIL-4 Tg と野生型マウスの 1 : 1 の同居交配で行った。得られた産子は 5 週齢で尻尾を採取し、それより DNA を抽出し、hIL-4 特異的な primer set を用いた PCR により、Tg マウスであるか否かを判定した。また、ELISA による血清中の hIL-4 についても定量を適時実施した。この生産で得られた Tg および野生型マウスは共同研究者に搬送し、感染実験に供した。

hIL-4 Tg ホモ型免疫不全マウスの確立

現在の hIL-4 Tg マウスは Tg 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 ヘテロ型との交配となり、産子の遺伝子型を判別する必要があり、生産効率が悪い。生産効率を上げるために、Tg ホモ型の作製を行った。すなわち、+/Tg マウス同士の交配を行い、得られた産子を BALB/cA-dKO に戻し交配することによって、ホモ型マウスの選別をする後代検定を行い、ホモ型マウスの作製を行った。さらに得られたホモ型マウス同士の交配による生産が可能か否かを検討した。

hIL-4 Tg マウスでのヒト単核球移入後の GVHD 発症の解析

マウス体内で hIL-4 が分泌されることによって、移入末梢血単核球の動態と GVHD 及ぼす影響を検討した。すなわち、X 線照射なしの NOG-hIL-4 Tg マウスにインフォームド・コンセントを得た健常人の末梢血液から Ficoll による密度勾配遠心によって分離した単核球 (hPBMCs) 1×10^7 個を静脈より移入した。移

入後の死亡を含む状態観察を行い、また経時的に採血し、抗ヒト抗体染色によるフローサイトメトリー (FACSCanto、BD 社) でマウス血液中のヒト細胞の生着性やその動態を観察した。また、2.5 Gy の X 線照射 NOG-hIL-4 Tg マウスにヒト臍帯血由来 CD34+細胞 (Lonza 社製、Switzerland) 5×10^4 個を尾静脈より移入し、ヒト細胞の増殖と分化についても、末梢血および脾臓中のヒト CD45+細胞の有無を解析した。免疫不全マウス 3 系統における GVHD 発症の比較 免疫不全マウス 3 系統、すなわち NOD-*scid*、BALB/cA-dKO および NOG でのヒト PBMC 移入後の GVHD の動態の検討に関して、上記 3 系統 10~12 週齢マウスに X 線照射 (各々 3.5、3.5 および 2.5 Gy) した後に、インフォームド・コンセントを得た健常人の末梢血より、Ficoll 比重遠心法にて単核球を分離し、その 1×10^7 個を尾静脈または腹腔経由で移入した。移入後、毎週体重を測定し、かつ死亡の有無を確認した。

hIL-2 および hIL-15 Tg 免疫不全マウスの作製

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 および IL-15 遺伝子を免疫不全マウスに導入したマウスの作製を開始した。このために、ヒト IL-2 に関しては、ヒト末梢血より単核球を単離後、PWM の刺激下で 24 または 48 時間培養し、それら単核球より、RNA を抽出し、これより cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとして、5'-CCCGGGTcacattaacctcaactcctgcca-3' および 5'-GCGCGGCCggcctgatatgttttaagtggg-3' の primer set を用いて、hIL-2 cDNA を増幅した。この hIL-2 cDNA を PCR2.1 vector (Invitrogen) でクローニング後、塩基配列を確認し、さらに pCMVb vector (Invitrogen) に挿入した。また、hIL-15 に関しては、末梢血リンパ球での発現は期待できないために、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託された hIL-15 cDNA (RDB1866)

の譲渡を受け、それをテンプレートとして、hIL-15 cDNA を5'-GCGGCCGCGGATTTACC GTGGCTTT-3'および5'-GCGGCCGCGGATTT ACCGTGGCTTTGAGT-3'のprimer setで増幅後、hIL-2と同様にpCMVb vectorに挿入した。これら遺伝子の発現を確認するために、COS-7細胞にLipofectAMINE (Life Technologies)を用いて導入後、上清中に分泌されるhIL-2またはhIL-15をELISA kit (各々BD biosciences、Invitrogen)によって検出した。Tgマウス作製のために、上記遺伝子をHindIIIの酵素切断によって直鎖にした後、(NOG x NOD) F1、NOD-IL-2Rg^{null}または(NOD-IL-2Rg^{null} x NOG) F1マウスの前核期受精卵に顕微注入した。得られた産子でのTg導入の有無は、尻尾より抽出したDNAをテンプレートして上述のprimer setでのPCRおよびマウス血清中のhIL-2またはhIL-15をELISAキットで測定した。得られたTgファウンダーマウスは、NOGマウスに戻し交配し、Tgの伝達を確認して、ラインの樹立を行った。

(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

hIL-4 Tg 免疫不全マウスの生産と供給

本研究期間3年間(平成19~21年度)での、免疫不全マウスの供給動物種および数を表1に示す。本期間での生産は順調に推移し、SPF下で維持された。すなわち、平成19年度は、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを、平成20年度はBALB/cA-dKO-hIL-4 TgマウスおよびNOG-hIL-4 Tgマウスを、そして平成21年度はBALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを主体に、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)に搬送した。これらマウス

は、Tgと野生型が各々ほぼ半数を占め、その総数は3年間で1,587匹となった。また、小柳班員にも、新生児移植のためのNOGマウスを提供した。

hIL-4 Tg ホモ型免疫不全マウスの確立

hIL-4 Tgマウス生産の効率を上げる目的で、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tgホモ型の作製を行った。表2に示すように、hIL-4 Tgヘテロ型マウス同士の交配で得られたTgマウスは産子43匹中29匹(67.4%)であった。その29匹中にホモ型マウスがいることが想定され、その29匹のうち15匹のTgマウスをBALB/cA-dKOとの後代検定に用いた。表3にその結果を示した。BALB/cA-dKOとの数回交配によって得られた産子が全てTgマウスであった個体は8個体で、そのうち、2産以上で確認された個体は7個体であった。それら得られたホモ型マウス同士の交配の結果を表4に示す。遺伝子型としてはホモ型同士の交配で全てTgが導入されていることから、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。

hIL-4 Tgマウスでのヒト単核球移入後のGVHD発症の解析

NOG-hIL-4 TgマウスおよびNOGマウスを用いて、hPBMCおよびヒトCD34+細胞移植後の一般状態観察とヒト造血細胞の動態をフローサイトメトリーで解析した。図1にhPBMCsの腹腔内移植後のマウスの生存性を示した。図でも明らかなように、移入されたNOGマウス2匹は移入後32日で死亡した。一方で、NOG-hIL-4 Tgマウス3匹は移入後42日でも全例が生存した。現在、それらマウスに一般状態に顕著な悪化は見られていない。移入後1、2、3および4週時でのこれらマウスの末梢血白血球に占めるヒト細胞をフローサイトメトリーで検査したところ、NOGマウスではヒトCD8+

細胞が優位であるが、Tg マウスではヒト CD4+ 細胞が優位であった (図 2)。

ヒト臍帯血由来 CD34+細胞を移入した実験では、移入後 10 週目で NOG および NOG-hIL-4 Tg マウスを剖検し、骨髄のヒト細胞の増減を観察した。NOG マウスでは、従来の結果と一致して、骨髄中にヒト CD45+細胞が 60~70% 占めていることが確認できた。しかし、NOG-hIL-4 Tg マウスについては、末梢血および骨髄中にヒト CD45+細胞が全く検出されなかった。

免疫不全マウス 3 系統における GVHD 発症の比較

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

hIL-2 および hIL-15 Tg 免疫不全マウスの作製

新しいヒト遺伝子導入マウスとして、hIL-2 および hIL-15 Tg マウスの作製を行った。図 4 に、導入遺伝子構築を示す。基本的には、hIL-4 Tg マウスと同様に、サイトメガロウイルスのプロモーターで駆動する導入遺伝子を構築した。これら構築された 2 遺伝子を COS-7 細胞に LipofectAMINE によって導入し、その上清中の hIL-2 および hIL-15 の分泌量を測定した結果を、図 5 に示す。hIL-2 の分泌量は極めて高かったが、hIL-15 はごく少量の分泌量しか検出できな

かった。

この 2 遺伝子をマウス前核期前核期胚へ顕微注入して得られた Tg マウス作製実験の結果を表 5 に示す。(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-4 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によって、最終的に NOG-hIL-2Tg マウスを作出できた (表 6)。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 については 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-scld-hIL-4 TgマウスおよびBALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを樹立し、そのHIV-1感染性が比較検討された。前者マウスでは残存するNK細胞を除去する必要があり、そのために抗IL-2Rb抗体 (TMb-1) を投与する必要があった。しかし、後者マウスではNK細胞が欠失していることから、その投与の必要がないことからその利便性は高く、さらに感染実験の結果から後者マウスの方がより感染効率が良く、感染モデルマウスとして適することが明らかとなった。以上の結果から、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを中心におき、それに新たに作製したNOG-hIL-4 Tgマウスを加え、その維持と大量生産、感染実験への提供を行うことにした。生産は大型アイソレーターを用いたSPF下で行うことで、極めて安定した成績を得ることができ、したがって安定的に供給することができた。

本研究のBALB/cA-dKO-とNOG-hIL-4 TgマウスでのHIV-1感染性の良否を研究代表者である田中教授により比較検討された結果、NOG-TgマウスではGVHDが強く起こるため、最終的にBALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスの方がモデルとしての有用性は高いという結果を得たため、本研究期間はBALB/cA-dKO-hIL-4 Tgマウスを主に提供した。事実、現在までに、NOGマウスの方がBALB/cA-dKOマウスよりもヒト細胞の生着率が高いことが分かっている。一方で、その生着性が高いことが、逆にGVHDを発症しやすく、したがって死亡しやすくなる難点となる。今回の各種免疫不全マウスへのヒトPBMC移入実験によって、NOGマウスは他系統マウスよりもはるかにヒトPBMCの増殖が早くかつ強く、そのためにGVHDで早期に死亡することが確認された。

その一方で、NOG-hIL-4 TgマウスにヒトPBMCを移植した場合、NOGマウスで観察される

GVHDが比較的起こり難く、移植後42日 (6週) までも一般症状としては正常で、健康に推移することが明らかとなった。しかし、このGVHD抑制効果は移入するPBMCのドナーによっても異なり、現在その理由は明らかではないが、ドナーのTリンパ球の組成や活性化の程度が異なっていることが原因と考えられる。NOG-hIL-4 TgマウスGVHDが抑制される理由としては、NOG-hIL-4 Tgマウスでは、NOGと比較して、ヒト細胞が生着、増殖し難いこと、または移植されたヒト細胞のうちでGVHDのエフェクター細胞の増殖が抑えられていることなどが考えられる。一般的にヒトPBMCを移入されたNOD-scldやSCIDマウスなどでは、CD8+細胞が優位となり、最終的にGVHDで死亡する。すなわち、CD8+細胞がGVHDの主要なエフェクター細胞と考えられる。実際に移植後4週の移入マウス末梢血に占めるヒトCD4+およびCD8+細胞の比率を調べると、NOG-hIL-4 Tgマウスでは明らかにCD8+細胞の比率が抑えられていた。このことは、hIL-4が存在することによって、ヒト末梢血CD4+細胞が活性化され、増殖するが、CD8+細胞は相対的に増殖しないことから、その比率が抑えられる結果となることが示唆された。このことによって、GVHDの発症が抑えられていると考えられる。一方で、IL-4はT細胞のTh2細胞への極性化をもたらすと考えられ、このことがアレルギーや自己免疫疾患の発症に深く関わっていると考えられている。このTgマウスにおけるヒトCD4+細胞の極性化—すなわちTh1、Th2細胞への移動等が起こっているのか否か?は現在不明である。これらのことを明らかにすることによって、より有用性の高いHIV-1感染モデルの作製が可能になるかもしれない。

本研究に必要な免疫不全動物は厳密なSPF条件下の飼育が必須であるが、それと同時に継続的な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、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。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、さらに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存在し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

は、HIV-1感染モデルマウスの開発には極めて有用と考えられる。今回、T細胞やNK細胞の増殖や活性化に強く関与しているhIL-2とhIL-15 Tgマウスの作製を試みた。導入遺伝子であるhIL-2およびhIL-15のDNA構築を行い、その分泌を遺伝子導入COS-7細胞培養上清での濃度をそれぞれのELISA kitで調べることによって確認した結果、hIL-2では極めて高濃度のhIL-2が検出され、Tgマウス作製に十分適う遺伝子が構築できたと考えられる。一方、hIL-15に関しては、予想に反して、培養上清中に少量のhIL-15しか検出できなかった。基本ベクターとして、hIL-2とhIL-15とも同じpCMVbベクターを使っていること、hIL-15の塩基配列に異常は認められなかったことなどから、その低発現の原因は現在のところ明瞭ではない。hIL-15は、分泌型と細胞質型があるとされているが、DNA構造は変わらない。一方で、塩基配列検索では、塩基配列が異なっているとの報告がある。今後は、今回用いたhIL-15のcDNAおよび報告されているcDNAとの相違、分泌型と細胞質型での作用機序等を含めて検討する必要があると思われる。

新しいヒト遺伝子導入免疫不全マウスとして実施されたhIL-2導入マウスの作製は、当初(NOG x NOD) F1前核期胚への遺伝子の注入で実施された。得られた25匹の産子のDNA検査ではTgマウスは得られなかった。しかし、離乳後早期に死亡した個体でTgマウスがいたことから、hIL-2が導入され、発現することで動物が早期に死亡する可能性が考えられた。すなわち、hIL-4とは異なり、hIL-2はヒトとマウスのものが交差することが知られている。hIL-2がマウス内で強発現することでマウスに障害を与え、その結果として発現個体が得にくいことが考えられる。しかし、NOGではIL-2の受容体のサブユニットであるIL-2R β が欠損しているため、hIL-2が機能しないと考えられる。したがって、これらマウスの前核期胚を用いれば、hIL-2が強発現しても

マウスに影響を与えないと考えられる。今回は、(NOG x NOD-IL-2Rg^{null}) F1の前核期胚を用いたが、これは、我々の実験結果、すなわち、scidホモ動物の前核期胚を用いた場合にはTg動物作製効率が極めて落ちることから、scidヘテロ動物を用いたものである。したがって、scid遺伝子がヘテロで、IL-2Rgがホモ型になっているマウスの前核期受精卵を用いれば、効率良くhIL-2が強発現する個体が得られると推定した。このNOD-IL-2Rg^{null}, +/scid

前核期卵を用いた遺伝子注入実験で、4匹のhIL-2 Tgマウスが得られた。そのうち3匹で血清中にhIL-2を分泌する個体が得られた。このTgマウスをNOGマウスと交配することによって、安定的なTgマウスが得ることができた。しかし、NOGマウスではなく、免疫学的に正常な近交系マウスとの交配ではTgマウスは誕生後早期に死亡することが確認された。

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、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg および NOG-hIL-4 Tg マウスの作出と生産を行い、定期的な供給を行った。本研究期間の3年間で上記免疫不全 Tg マウスの1,587匹を提供した。また、生産効率を上げるために、従来の Tg ヘテロ型から Tg ホモ型の動物の作製を行い、より効率良く生産が可能になった。しかし、遺伝子型が Tg であるに係わらず、hIL-4 を分泌しない個体も認め

られ、導入遺伝子の不安定さもまた認められた。3年間の感染実験の結果、BALB/cA-dKO-hIL-4 Tg マウスの方が NOG-hIL-4 Tg マウスよりも GVHD で死亡し難いことが分かり、前者が感染モデルとしてより有用であることが分かった。NOG-hIL-4 Tg マウスでは、NOG マウスに比べ、ヒト PBMC 移入後の GVHD 発症が抑えられることが分かった。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を行った。その結果、hIL-2 では血清中に様々な濃度で分泌するマウスが得られた。その生産を行い、現在供給可能なところまで到達した。hIL-15 に関しても、Tg ファウンダーは得られており、今後の検討を待つ段階にある。

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* 200:1611-1615.
- (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.
- (5) Ogawa, D., Y. Okada, M. Nakamura, Y. Kanemura, H. J. Okano, Y. Matsuzaki, T. Shimazaki, M. Ito, E. Ikeda, T. Tamiya, S. Nagao, and H. Okano. 2009. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J Neurosci Res* 87:307-317.
- (6) Yamane, A., T. Nakamura, H. Suzuki, M. Ito, Y. Ohnishi, Y. Ikeda, and Y. Miyakawa. 2008. Interferon-alpha 2b-induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. *Blood* 112:542-550.
- (7) Yajima, M., K. Imadome, A. Nakagawa, S. Watanabe, K. Terashima, H. Nakamura, M. Ito, N. Shimizu, M. Honda, N. Yamamoto, and S. Fujiwara. 2008. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis* 198:673-682.
- (8) Yahata, T., Y. Murguruma, S. Yumino, Y. Sheng, T. Uno, H. Matsuzawa, M. Ito, S. Kato, T. Hotta, and K. Ando. 2008. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells* 26:3228-3236.
- (9) Terada, Y., Y. Terunuma-Sato, T. Kakoi-Yoshimoto, H. Hasegawa, T. Ugajin, Y. Koyanagi, M. Ito, T. Murakami, H. Sasano, N. Yaegashi, and K. Okamura. 2008. Development of human Graafian follicles following transplantation of human ovarian tissue into NOD/SCID/gammacnull mice. *Am J Reprod Immunol* 60:534-540.
- (10) Suemizu, H., C. Yagihashi, T. Mizushima, T. Ogura, T. Etoh, K. Kawai, and M. Ito. 2008. Establishing EGFP congenic mice in a NOD/Shi-scid IL2Rg(null) (NOG) genetic background using a marker-assisted selection protocol (MASP). *Exp Anim* 57:471-477.
- (11) Suemizu, H., M. Hasegawa, K. Kawai, K. Taniguchi, M. Monnai, M. Wakui, M. Suematsu, M. Ito, G. Peltz, and M. Nakamura. 2008. Establishment of a humanized model of liver using NOD/Shi-scid IL2Rgnull mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377:248-252.
- (12) Ito, M., K. Kobayashi, and T. Nakahata. 2008. NOD/Shi-scid IL2rg<null> (NOG) Mice More Appropriate for Humanized Mouse Models. 53-76, T. Nomura et al. (eds), Humanized mice. Current Topics in Microbiology and Immunology 324, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. In Press.
- (13) Koyanagi, Y., Y. Tanaka, M. Ito, and N. Yamamoto. 2008. Humanized Mice for Human Retrovirus Infection. 133-148 T. Nomura et al. (eds), Humanized mice. Current Topics in Microbiology and Immunology 324, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. In Press.
- (14) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis* 2008;197:134-141.
- (15) 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/IL2R γ null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 2007;109:212-218.
- (16) 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/IL2R γ null Mice Transplanted with Hematopoietic Stem Cells under non-Myeloablative Condition Show Prolonged Lifespans and Allow Detailed Analysis of HIV-1 Pathogenesis. *J Virol* 2007;81:13259-13264.
- (17) Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y: Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18700-18705.
- (18) Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, Umeda K, Yoshimoto M, Ito M, Heike T, Nakahata T: Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/ γ null mice through cell fusion. *Faseb J* 2007;21:3499-3510.
- 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/gnull (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
- (13) Dendritic cells have a suppressive effect on xeno-GVHD in novel immunodeficient NOG mice. Ito R, Katano I, Ogura T, Kawai K, Ito M. 第10回国際樹状細胞シンポジウム、2008年10月1-5日、神戸
- (14) Novel severe immunodeficient NOG mice were excellent models for Xeno-GVHD due to dysfunction of dendritic cells. Ito R, Katano I, Kawai K, Ito M. 第38回日本免疫学会、2008年12月1-3日、京都
- (15) Watanabe Y, Takahashi T, Ishii N, Ito M, Tsuchiya S and Sugamura K. Characterization of human lymphocytes in humanized NOG mice. 第37回日本免疫学会、2007年11月20-22日、東京

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 19 年 4 月～平成 22 年 2 月)

| 年度 | 系統名 | 出荷回数 | 匹数 | | 計 |
|--------|-------------------------|------|-----|-----|------|
| | | | ♀ | ♂ | |
| 平成19 | BALB-dKO,hIL-4 | 8 | 134 | 120 | 254 |
| 平成20 | BALB/cA-dKO,hIL4-Tg | 8 | 204 | 213 | 417 |
| | NOG-hIL-4 Tg | 7 | 194 | 174 | 368 |
| 平成21** | BALB/cA-dKO,hIL4-Tg | 8 | 207 | 195 | 402 |
| | BALB/cA-RAG2KO,IL-2RgKO | 3 | 48 | 44 | 92 |
| | NOG-hIL-4 Tg | 2 | 20 | 29 | 49 |
| | NOG | 1 | 0 | 5 | 5 |
| 計 | | 37 | 807 | 780 | 1587 |

*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。

**21年4月から22年2月までの実績

表 2. BALB/cA-dKO -hIL-4 Tg ヘテロ型マウス同士の交配で得られた産子での Tg マウス出現頻度

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

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

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

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

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

*交配によって得られた産子が全て Tg マウスの場合、背景を灰色とした。

表4. BALB/cA-dKO -hIL-4 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

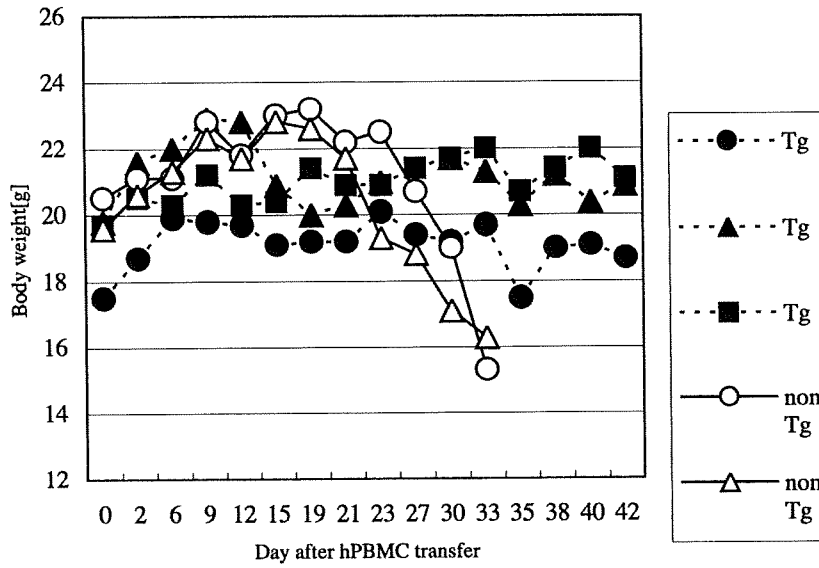


図1 ヒト末梢血単核球移入後のNOGおよびNOG-hIL-4 Tgマウスの生存性の比較

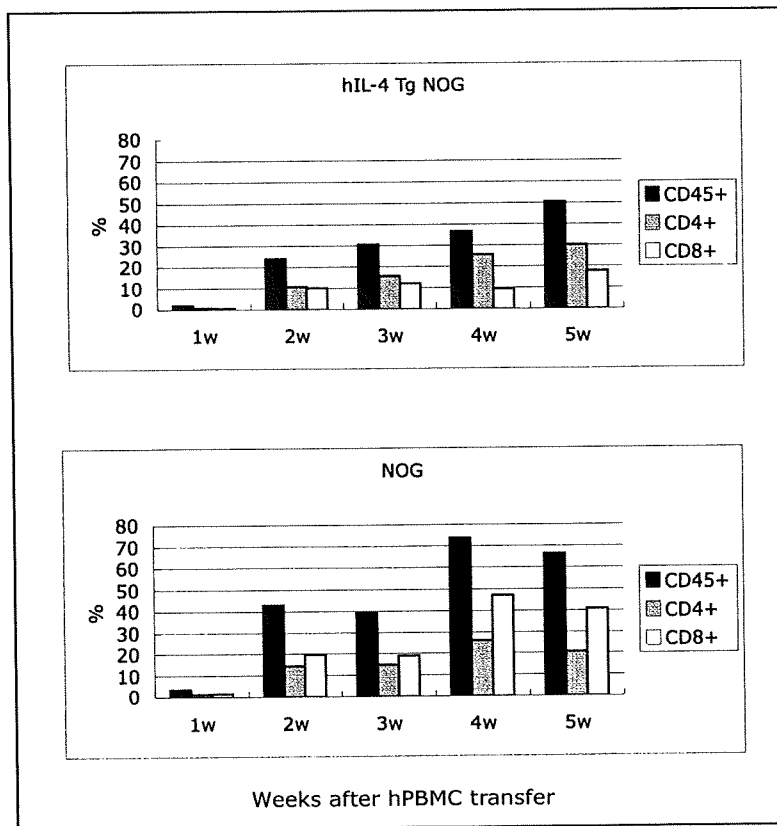


図2 ヒト末梢血単核球移入後のNOGおよびNOG-hIL-4 Tgマウスの経時的なマウス末梢血中のヒトCD45+、CD4+およびCD8+細胞の比率

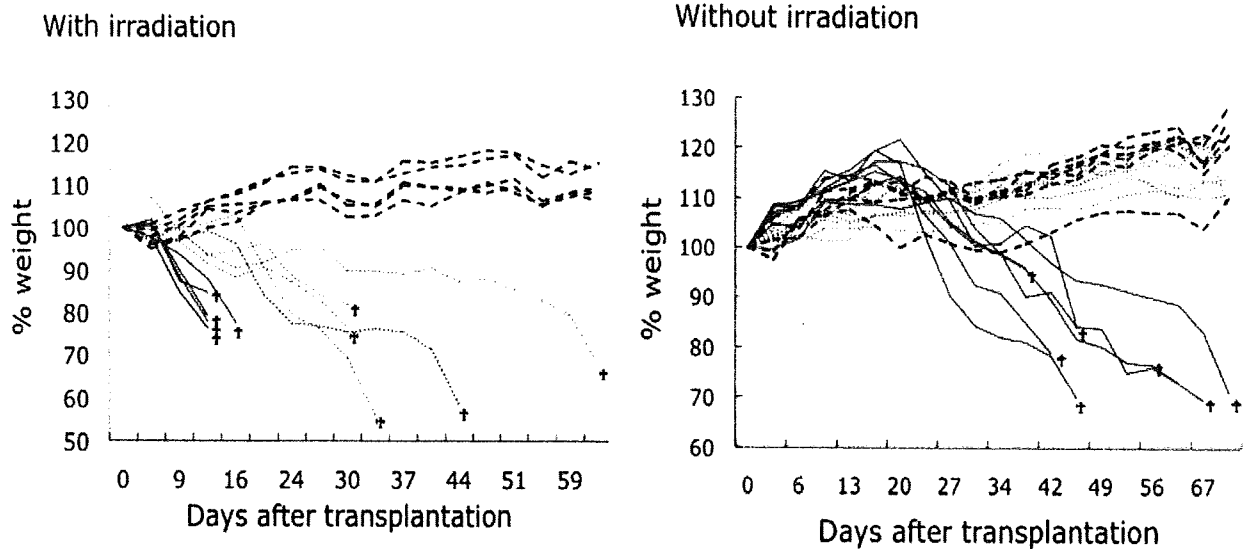
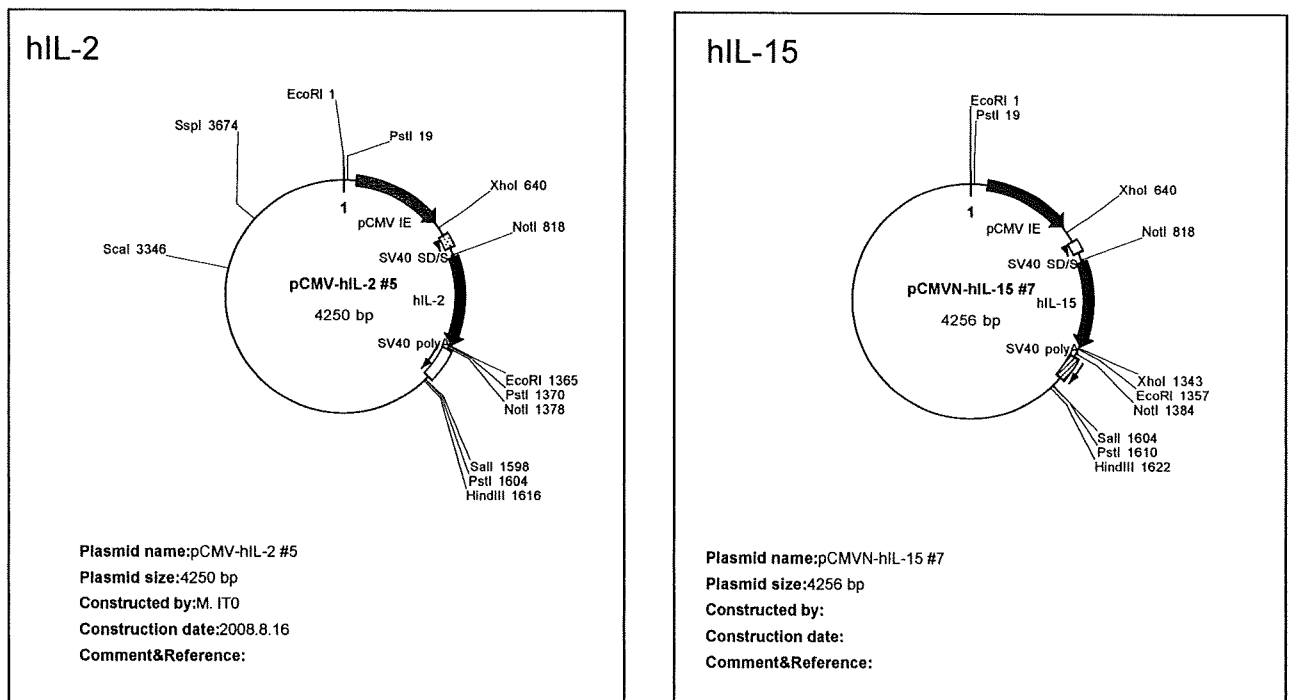


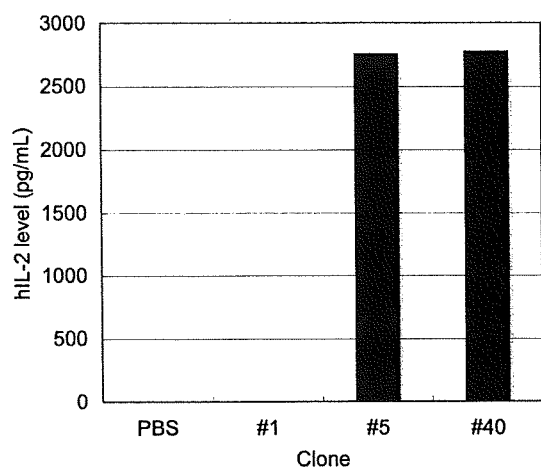
図3. ヒト末梢血単核球移入後のNOG、BALB/cA-dKOおよびNOD-scidマウスの生存性の比較
 1×10^7 個のヒトPBMCをX線未照射または照射NOG (2.5 Gy)、BALB/cA-dKO (3.5 Gy)および
 NOD-scid (3.5 Gy)マウスへ尾静脈より移入した。実線はNOGマウス、細破線はBALB/cA-dKOマ
 ウス、太破線はNOD-scidマウスを各々示す。†は死亡を示す。



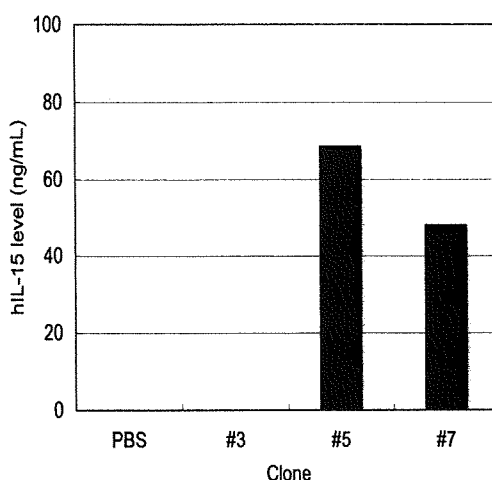
hIL-2: RNA was extracted from PWM-stimulated human PBMCs. cDNA was synthesized by RT-PCR.

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

図4. Tgマウス作製用hIL-2およびhIL-15遺伝子の構築



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



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

図5. 遺伝子導入 COS-7 細胞上清中の hIL-2 および hIL-15 濃度

表5. 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 6. NOG-hIL-2 Tg マウスの系統作製

| 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 19 - 21 年度研究分担総合報告書

研究要旨：ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) X4 株 (X4 ウイルス) 感染細胞を標的とする組換え水疱性口内炎ウイルス (VSV) は、*in vitro* において、X4 ウイルス感染細胞を特異的に殺傷し X4 ウイルス感染を制御することが報告された。本研究では、HIV-1 R5 株 (R5 ウイルス) 感染細胞を標的とする新規の組換え VSV を作製し、この組換え VSV の R5 ウイルス感染に対する治療効果を、ヒト末梢血単核球を腹腔内に移植し HIV-1 が感染増殖可能になったキメラマウス (ヒト化マウス) を用いた HIV-1 感染実験動物モデルにおいて評価し、組換え VSV による新規抗 HIV-1/エイズ療法を開発することを目的とした。またそのデータを基に、ヒト化マウスを用いた薬剤評価系の確立に寄与することも目的とした。まず、R5 ウイルス受容体ヒト CD4 及び CCR5 分子を発現する新規組換え VSV を作製し、この組換え VSV の R5 ウイルス感染に対する抑制効果を、JR-CSF 株を感染させたヒト化マウスを用いて評価した。本組換え VSV を接種したマウス群では、組換え VSV 未接種群や X4 ウイルス受容体を発現する組換え VSV 接種群と比較して、明らかに感染抑制傾向を示した。このことから、新規治療薬候補としての R5 ウイルス受容体を発現する新規組換え VSV、及び薬剤評価系としてのヒト化マウスの有用性が示された。また、組換え VSV による治療効果が 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ため、その感染性を向上させる目的で、活性化 T 細胞接着分子 OX40 に着目し、そのリガンドである OX40L 分子をコードする遺伝子を組換え VSV に追加導入して新規組換え VSV 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、これまでの組換え VSV よりも感染効率が高く、より実効性に優れていることが分かり、OX40L 分子を追加発現させた組換え 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示唆された。

A. 研究目的

抗 HIV-1/エイズ療法として HAART (逆転写酵素阻害剤を含めた多剤併用療法) が開発され、その高い有効性が示されたが、

薬剤の長期投与の必要性から、副作用、薬剤耐性ウイルスの出現による治療効果の減弱など種々の問題点も明らかになってきた。そこでこれまでの治療薬とは作

用機序の異なった新規医薬品の開発が急務と考えられている。

HIV-1 感染症/エイズに対する新規治療薬を開発する目的で、VSV に基づいた、X4 ウイルス感染細胞を標的とする組換えウイルス (VSV Δ G-CC4) が、以前他のグループにより開発された。VSV は遺伝子組換え操作により X4 ウイルス受容体ヒト CD4 及び CXCR4 分子を発現するように設計され、それらの受容体をウイルス粒子上に発現している VSV Δ G-CC4 は、*in vitro* において HIV-1 感染細胞表面のエンベロープ蛋白とその受容体との結合を通して HIV-1 感染細胞に特異的に接着し、重感染後、細胞を死滅させることができた。その結果、HIV-1 感染を著明に制御することが示された。

そこで、我々は本研究において、R5 ウイルス感染細胞を標的とする新規組換え VSV を作製し、この組換え VSV の治療効果を *in vitro* 及びヒト化マウスを用いた感染実験モデル、即ち *in vivo* において評価判定し、新規治療薬を開発すること、またヒト化マウスの薬剤評価系としての有用性を検討することを目的とした。

さらに、組換え VSV は、比較的感染効率が低く、その殺傷能力がまだ十分とは言えないため、HIV-1 の感受性細胞である活性化 CD4 陽性 T 細胞に特異的に高発現する OX40 (CD134) 分子に注目した。そのリガンドである OX40L (CD252) 分子は、OX40 分子と特異的に結合することで接着因子として機能するため、OX40L 分子の組換え VSV への追加発現により感染性が向上するか、その結果、治療効果が増強される

か検討した。

B. 研究方法

(1) R5 ウイルス受容体を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 R5 ウイルス受容体ヒト CD4 及び CCR5 分子をコードする遺伝子を同一部位に挿入することにより、新規組換え VSV コンストラクトを作製した。

(2) R5 ウイルス受容体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 R5 ウイルス受容体を発現する新規組換え VSV (VSV Δ G-CC5) 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、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-CC5 の治療効果の評価：

ヒト末梢血単核球を活性化させ、その細胞にまず JR-CSF 株を 3 日間感染させ、その後 VSV Δ G、VSV Δ G-CC4、或いは VSV Δ G-CC5 を接種し、或いは未接種した。細胞は IL-2 添加培地で培養された。組換え VSV 接種後 4 日目及び 8 日目に、各サンプルの細胞における CD4/CD8 陽性細胞をフローサイトメトリー (FCM) で解析し、

HIV-1 の病原性に対する組換え VSV の効果を比較検討した。また同時に CD3 陽性細胞内の p24 の発現を FCM で解析することで HIV-1 感染細胞を検出し、その感染細胞に対する組換え VSV の殺傷効果を比較検討した。さらに同時に培養上清中の p24 レベルを ELISA で測定することにより、HIV-1 産生（感染増殖複製能）に対する組換え VSV の抑制効果を比較検討した。

(4) ヒト化マウス感染実験モデルにおける VSV ΔG-CC5 の治療効果の評価：

重度免疫不全マウス (BALB/cA-Rag2^{-/-}γ^{-/-}) に末梢血単核球を腹腔内に移植し、ヒト化マウスを構築した。そのヒト化マウスに JR-CSF 株を腹腔内接種し、感染モデルを作製した。3 日後に G 蛋白を一過性に補われた VSV ΔG、VSV ΔG-CC4、或いは VSV ΔG-CC5 を腹腔内に接種、或いは未接種した。さらに 4 日後にマウスから血清や腹腔内洗浄液を採取した。腹腔内洗浄液からは浮遊細胞分画を回収し、その細胞を用いて、(3) の方法と同様に、解析し、組換え VSV の効果を比較検討した。

(5) OX40L 分子を追加発現させた新規組換え VSV の作製：

VSV ゲノムから G 遺伝子を切除し、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。

(6) 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：

(5) で作製したコンストラクトを用いて、(2) と同様の方法で、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 ΔG-CC4XL) を産生した。

(7) *In vitro* における VSV ΔG-CC4XL の感染性の評価：

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 ΔG、VSV ΔG-CC4、或いは VSV ΔG-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。

(8) *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) 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 FCM 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