

200902043A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染モデルマウスの樹立および

HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるエイズ発症遅延

機序の解析に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 佐藤 義則

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染モデルマウスの樹立および

HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるエイズ発症遅延

機序の解析に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 佐藤 義則

平成22(2010)年3月

目次

I. 総括研究報告

HIV 感染モデルマウスの樹立および HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるエイズ発症 遅延機序の解析に関する研究	3
研究代表者 佐藤 義則（熊本大学エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト）	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	16
--------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	なし
------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
総括研究報告書

HIV 感染モデルマウスの樹立および HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞による
エイズ発症遅延機序の解析に関する研究

研究代表者：佐藤 義則(熊本大学エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト)

研究要旨

HIV 感染に対する免疫応答の解析が困難である理由のひとつとして、小動物を用いた HIV 感染実験系の確立がされていない点が挙げられる。そこでヒト免疫構築マウス(ヒト化マウス)を用いた HIV 感染実験系の確立を目指し、高度免疫不全マウス(NOD/SCID/Jak3 ノックアウトマウス(以下 NOK マウス))にヒト臍帯血由来幹細胞(CD34⁺ 細胞)を移植したヒト化 NOK マウスを作製し、HIV 感染細胞の排除に重要となるヒト CD8⁺ T細胞の分化、機能について解析した。ヒト化 NOK マウスは移植後 10 週目から、末梢血中にヒト CD19⁺ B細胞およびヒト CD4/CD8T細胞を含むヒト CD3⁺ T細胞の構築が認められた。ヒト CD8⁺ T細胞は、Naive, Central memory, Early effector memory 表現型を示す集団が含まれたが、Late effector memory, Effector 表現形の集団はほとんど含まれなかった。また、ヒト CD8⁺ T細胞は、ヒト PBMC 中に含まれるヒト CD8⁺ T細胞に比べ、グランザイムA/B の発現は同程度であったが、パーフォリンの発現は低かった。PMA/Ionomycin 刺激をしたヒト CD8⁺ T細胞は、各種サイトカイン(TNF- α , IFN- γ , IL-2)を産生し、またサイトカイン産生細胞の割合は Effector memory 細胞集団の割合と相関関係を示した。しかし、アロ抗原となるヒト PBMC でヒト化 NOK マウスを免疫したところ、エフェクターCD8⁺ T細胞の誘導は見られず、*in vitro* でさらに再刺激を加えてもヒト CD8⁺ T細胞の IFN- γ 産生および細胞増殖を誘導できなかった。一方、ヒト化 NOK マウスに HIV-1 実験株である JR-FL 株または NL432 株を腹腔内投与で感染させ T細胞の割合を経時的に調べた結果、CD4/CD8 比率が非感染群に比べ有意に減少した。さらに血中の HIV-RNA 量を経時的に調べた結果、感染 14 日目から JRFL 株および NL432 株ともに検出でき、少なくとも 69 日目まで経時的に検出することができた。HIV 感染後のヒト CD8⁺ T細胞は感染前と比べ、エフェクター細胞を含む個体と表現形に大きな変化はない個体が認められた。以上の結果から、ヒト化 NOK マウスは HIV 感染動態を経時的に解析できるツールとなり得るが、抗原特異的免疫反応が誘導できないため、さらなる改良を加える必要があることを示した。

A. 研究目的

長期にわたって HIV の増殖を抑えるためには

HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるウイルス感

染細胞の排除が重要であることはよく知られてい

る。当研究室では、長期にわたってエイズを発症しない HIV 感染者から非常に強い HIV 増殖抑制能を示す細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の単離に成功した。一方、長期 HIV 感染における免疫応答の解析が困難である理由のひとつとして、小動物を用いた HIV 感染実験系が確立されていない点が挙げられる。そこで我々は、新たに高度免疫不全マウス (NOK マウス) を用いたヒト化マウスを作製し、1. ヒト化 NOK マウスにおける基礎知見を得るため、発生したヒト T 細胞の分化・機能を解析し、免疫細胞のレパートリーについて解析する、2. 長期 HIV 感染における免疫応答の機序を明らかにするため、ヒト化 NOK マウスにおける HIV 感染系の確立、および、HLA 発現ヒト化 NOK マウスを作製し、HIV 感染マウスにおける HIV-1 特異的 CTL の動態を解析する、3. さらに我々の過去の報告に基づく、より効果的な HIV-1 特異的 CTL クローンの移入により、HIV 感染に対する免疫応答および免疫細胞療法の効果について検討する。今回の研究で作製する HLA 発現ヒト化マウスでは、ヒトの造血・免疫系を確立した際に問題となる胸腺での適切な発生・分化が誘導でき、これまでのモデルマウスより成熟したヒト免疫系の構築が可能であると考え。これは HLA ハプロタイプとエイズ進行の相関を動物モデルにおいて検討で

きる点が優れており、これらの研究を通じて、HIV 感染に対する免疫応答の解明と新規エイズ治療法の開発に大きく貢献できることが期待できる。

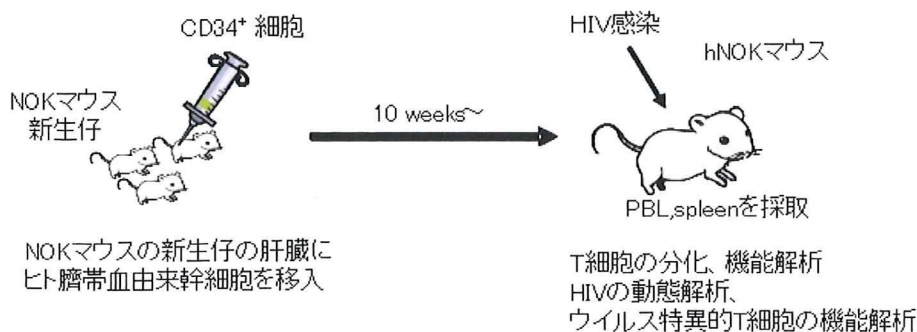
B. 研究方法

MACS を用いて臍帯血単核球より分離されたヒト CD34⁺ 細胞は NOK マウスの新生仔の肝臓へ移植され、T 細胞の生着を調べるためにマウスの尾静脈から末梢血を経時的に採取した (図1)。また移植から 20 週間後のマウスの脾臓と血液を採取し、HIV-1 の標的細胞である CD4⁺ T 細胞や細胞傷害性 T 細胞である CD8⁺ T 細胞を含む免疫細胞の発生、分化・成熟、およびそれらの機能について、CD 抗原、リンパ球の分化マーカー、サイトカイン等に特異的な抗体をもちいてフローサイトメトリーで解析し、ヒト化マウスにおける免疫細胞のレパートリーについて解析した。さらにヒト化 NOK マウスに HIV-1 (JRFL 株, NL432 株) を腹腔から感染させ、HIV-1 の経時的なウイルス量の変動は定量的リアルタイム PCR 法を用いて、ヒト T 細胞の分化、割合はフローサイトメトリーを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト由来の検体の使用と遺伝子解析、および理化学研究所 (理研) から購入した

図1 方法



臍帯血単核球は提供者に対して既にインフォームド・コンセントを行い得たものであり、本研究によって新たに提供者に危険を及ぼすことは無く、当大学の倫理審査委員会にて承認済みである。また、動物実験についても既に当大学の動物実験委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

ヒト CD34⁺ 細胞を移植した NOK マウスでは、図 2 で示すように、末梢血中にヒト CD19⁺ B 細胞およびヒト CD3⁺ T 細胞の発現が認められた。T 細胞の割合は、移植後 17 週でヒト PBMC 中の T 細胞の割合と同程度まで増加した。しかしながら、ヒト T 細胞の発生頻度はヒト B 細胞のそれに比べて約 2 分の 1 程度であることが明らかとなった(表 1)。末梢血中のヒト CD8⁺ T 細胞は、CD27^{high}CD28⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (Naive)、CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CCR7⁺ (Central memory)、CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CCR7⁻ (Early effector memory) の集団を含んだが、CD27^{low}CD28⁻CD45RA^{+/+}CCR7⁻ (Late effector memory)、CD27⁻CD28⁻CD45RA^{+/+}CCR7⁻ (Effector) の集団はほとんど含まれなかった(図 3)。ヒト CD4⁺ T 細胞は、CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (Naive)、CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CCR7⁺ (central memory), CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CCR7⁻ (Th0 effector memory), CD27⁻CD28⁺CD45RA⁻CCR7⁻ (Th1/2 effector memory) の集団を含んでいた。しかし、CD27⁻CD28⁻CD45RA⁻CCR7⁻ (effector) の集団はほとんど含まれなかった

(図 4)。またヒト CD8⁺ T 細胞は、ヒト PBMC 中のヒト CD8⁺ T 細胞と比べ、グランザイム A/B の発現は同程度であったが、パーフォリンの発現は低いことが明らかとなった(図 5)。一方、PMA/Ionomycin で刺激したヒト CD8⁺ T 細胞では、IFN- γ 、TNF、IL-2^{Single+} の産生が確認でき、IFN- γ 、TNF 産生細胞の割合は、Effector memory CD8⁺ T 細胞の割合と正の相関を示し、IL-2^{Single+} 産生細胞の割合は Effector memory CD8⁺ T 細胞の割合と負の相関を示した(図 6)。アロ抗原で免疫したヒト化 NOK マウスでは、ヒト CD8⁺ T 細胞のエフェクター表現形への分化を誘導できず、*in vitro* でのアロ抗原の再刺激に対しても IFN- γ 産生(図 7)および細胞増殖(図 8)を誘導することはできなかった。さらにこのヒト化 NOK マウスに HIV-1 実験株である JR-FL 株および NL432 株を腹腔内に接種し、血中の HIV-RNA 量を経時的に調べた結果、感染 14 日目には JR-FL 株および NL432 株ともに検出でき、そのピークは 21 日目と 49 日目で見られた(図 9)。さらに、CD4/CD8T 細胞の割合を経時的に調べた結果、非感染群に比べ有意な割合減少が見られた(図 10)。HIV 感染後の CD8⁺ T 細胞の表現形は感染前のそれと比べ、エフェクター細胞が誘導された個体と大きな変化はない個体が確認できた(図 11)。

D. 考察

小動物を用いた HIV 感染実験系の確立は、HIV 感染における経時的な免疫応答や治療効果を解析するツールとなるとともに、飼育に大掛かりな施設、設備、高額な飼育費を必要とするサルや

チンパンジーにかわる代替動物として期待され、ヒト化マウスを用いた研究は既に国内外で始まっている。これまでに報告されている高度免疫不全マウスにヒト幹細胞を移植したヒト化マウスでは、ヒト B 細胞およびヒト T 細胞が末梢血や脾臓で確認されている。さらにそのマウスの胸腺では、ヒト DP-T 細胞およびヒト CD4/CD8 SP-T 細胞が確認されており、移植した幹細胞より分化したヒト T 細胞がマウス胸腺の MHC により教育されていることを示唆する。また、我々のヒト化マウスが示す結果からも T 細胞は GVHD を引き起こすことは無く、自己抗原に対する T 細胞の負の選択が行われていることを示す。しかしながら、ヒト T 細胞はアロ抗原刺激に反応する T 細胞の能力を示す報告があるが、マウス MHC による教育であるために抗原特異的な T 細胞の選択が行われているかは不明であった。

そこで我々は、ヒト化 NOK マウスのヒト T 細胞分化の解析から、ヒト CD8⁺ T 細胞はエフェクター機能をもつ集団を含まないことを明らかにした。我々の結果は、ヒト CD8⁺ T 細胞分化における 2 つの可能性を少なくとも示す。一つ目は、ヒト化マウス(実験動物)はクリーンな環境下で飼育されるため、ヒトとは異なり外来抗原の刺激を受けていないので、T 細胞分化が誘導されていないことがあげられる。二つ目は、ヒト TCR とマウス MHC の相互作用を介したヒト T 細胞教育の問題点である。胸腺細胞の教育における TCR 依存的シグナルは、T 細胞の生死を決定する他に CD4/CD8 T 細胞の系統決定を行う。しかし、TCR が MHC+自己抗原のみを認識するだけでは、通常、T 細胞の機能的活性化に十分ではない。T 細胞が機能を

有するためには、TCR と CD8 または CD4 コレセプターによってクラス I またはクラス II MHC-ペプチド複合体との相互作用を必要とする。CD8 とクラス I MHC の $\alpha 3$ ドメインとの相互作用は種特異性を示し、ヒト TCR とマウス MHC の相互作用の親和性がヒト TCR とヒト MHC のそれと大きく異なる。また近年の研究から、末梢においても CD8 と MHC の相互作用が CD8⁺ T 細胞のエフェクター機能の誘導に大きく関係することも明らかとなっている。これらの報告から、マウス内で構築されたヒト CD8⁺ T 細胞はマウス MHC と相互作用をするものの、抗原+MHC に対して応答するアフィニティを持つヒト T 細胞が胸腺で選択されていない可能性が高い。我々のヒト化 NOK マウスのヒト CD8⁺ T 細胞はエフェクター細胞を含まずアロ抗原に対する免疫応答を示さないが、これまでに報告されているヒト化マウスのヒト T 細胞においても CD3⁺CD45RA⁺ T 細胞 (Naive) の高い割合は報告されているものの、エフェクター細胞への分化は報告されていないため、抗原特異的に T 細胞が応答しエフェクター細胞へと分化する可能性は低い。

PMA/Ionomycin で刺激をすると、ヒト化 NOK マウスからのヒト T 細胞はサイトカインを産生し、ヒト PBMC 中のヒト CD8⁺ T 細胞と同じような能力を示した。これまでに報告されているヒト化マウスからのヒト T 細胞でも、PHA や IL-2 による刺激に対してサイトカイン産生や細胞増殖が観察されていることから、ヒト化マウスのヒト T 細胞は TCR シグナル刺激の際に誘導される PKC およびカルシウムイムノフォアを介した細胞活性を誘導できる能力を有することが示唆される。しかし、ヒト化マ

ウスのヒト CD8⁺ T細胞の大部分は、刺激に対して活性化する能力は有するものの、TCRを介した抗原特異的応答を誘導することはできないことが今回の研究の結果から考えられる。近年の報告では、ヒト化マウスにおけるEBVによって誘発されたT細胞の反応は、高いウイルス量でリンパ増殖性疾患を起こすことを明らかにした。これは、ヒトにおける免疫不全宿主のリンパ増殖性疾患と同じ症状であり、ヒト化マウスのウイルス特異的細胞傷害性T細胞の機能が不十分であることを示唆する。ウイルス特異的細胞傷害性T細胞がヒト化マウスでその機能を発揮するならば、ヒトのEBV感染症が通常、無症状を示すように、EBV感染細胞はウイルス特異的細胞傷害性T細胞によって効果的に除去されと考えられる。このことから、ヒト化マウス内のヒトCD8⁺ T細胞は抗原特異的免疫応答が誘導されないことを示唆する(図12)。

E. 結論

今回の研究において、我々はヒト幹細胞を移植したヒト化NOKマウス内に構築したヒトCD8⁺ T細胞は、エフェクター機能を持つ集団への分化がおこらず、抗原特異的免疫応答を有さないことを明らかにした。近年の報告では、HLA発現ヒト化マウスのヒトCD8⁺ T細胞はEBV感染において抗

原特異的細胞傷害活性を有したことを報告している。したがって、ヒト化マウスモデルはさらに改良を加えることにより、ヒト免疫応答を解析できる小動物モデルとして有用なツールとなり得る。それは、ウイルス感染症の病因や予防、治療の研究に大きく貢献する動物モデルとなることが予想される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 学会発表

- 1) Sato Y, Takata H, Takiguchi M. Detailed analysis of reconstituted human CD8⁺ T cells in humanized mice; their functions and differentiation. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年、大阪。(口頭発表)
- 2) Sato Y, Takata H, Tamaki S, Takiguchi M. Impaired differentiation and function of human CD8⁺ T cells in humanized mice. The 10th Kumamoto AIDS Seminar. September 28-29, 2009, Kumamoto, Japan. (ポスター発表)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし。

表 1

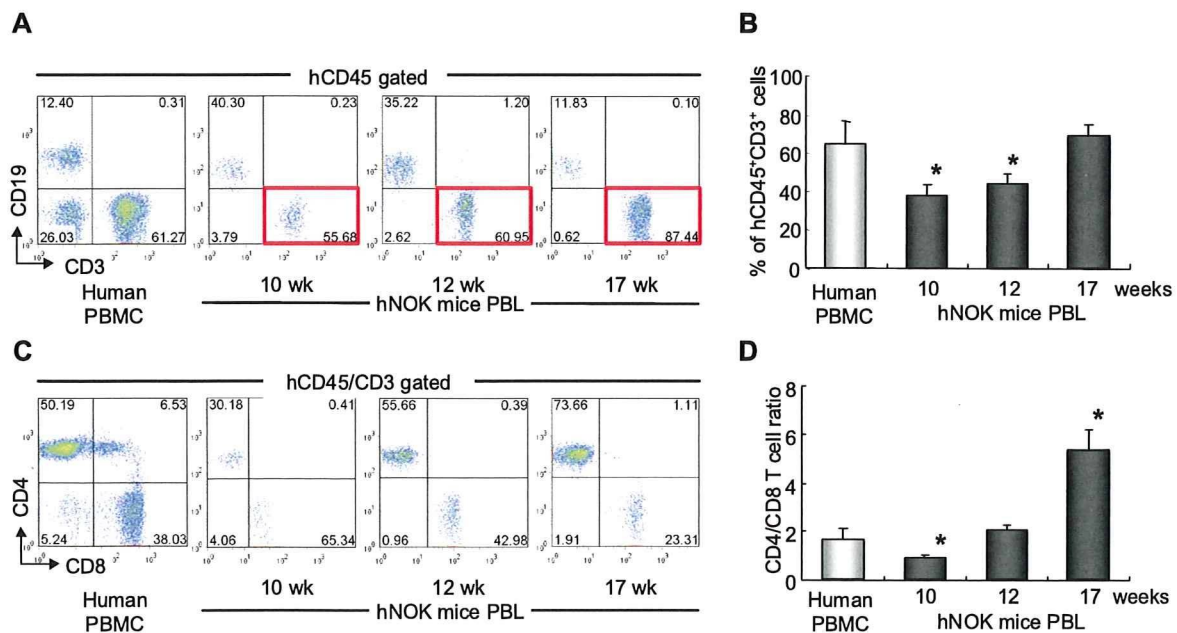
hNOK マウスのヒト免疫細胞の割合

Cord blood		% nucleated cells			Cord blood		% nucleated cells		
		hCD45 ⁺	hCD45 gated				hCD45 ⁺	hCD45 gated	
Mouse No.			CD3 ⁺	CD19 ⁺	Mouse No.		CD3 ⁺	CD19 ⁺	
Donor 1	1	12.8	0.0	54.6	Donor 4	1	62.1	46.7	48.3
	2	32.7	32.3	61.8		2	37.4	37.0	58.8
	3	55.1	55.7	40.3		3	57.4	23.3	67.8
	4	59.1	0.0	89.3		4	47.3	45.0	49.2
	5	5.1	0.5	94.9		5	21.4	0.0	91.0
	6	34.2	38.0	57.5		6	37.1	33.7	57.5
Donor 2	1	4.2	0.0	0.0	Donor 5	1	32.1	0.2	95.0
	2	45.8	0.1	67.9		2	10.3	0.0	92.9
	3	35.1	13.1	57.9		3	64.8	30.2	67.3
	4	55.6	49.7	40.6		4	44.2	0.0	96.5
	5	19.3	0.0	65.5		5	3.5	0.0	81.0
	6	69.4	39.5	48.4	Donor 6	1	6.6	5.2	81.0
Donor 3	1	5.8	0.4	76.2		2	7.7	81.3	13.2
	2	18.9	47.0	43.4	Donor 7	1	10.5	34.1	60.7
	3	37.6	84.1	11.7		2	50.3	42.2	54.0
	4	10.7	0.2	79.7					
	5	58.4	73.6	22.6					

異なった臍帯血 (7 donors) から由来するヒト CD34⁺ 細胞は NOK マウスに移植された。移植後 10 週目のヒト化 NOK マウスの PBMC はヒト免疫細胞の再構築の割合について解析された(n=32)。

図 2

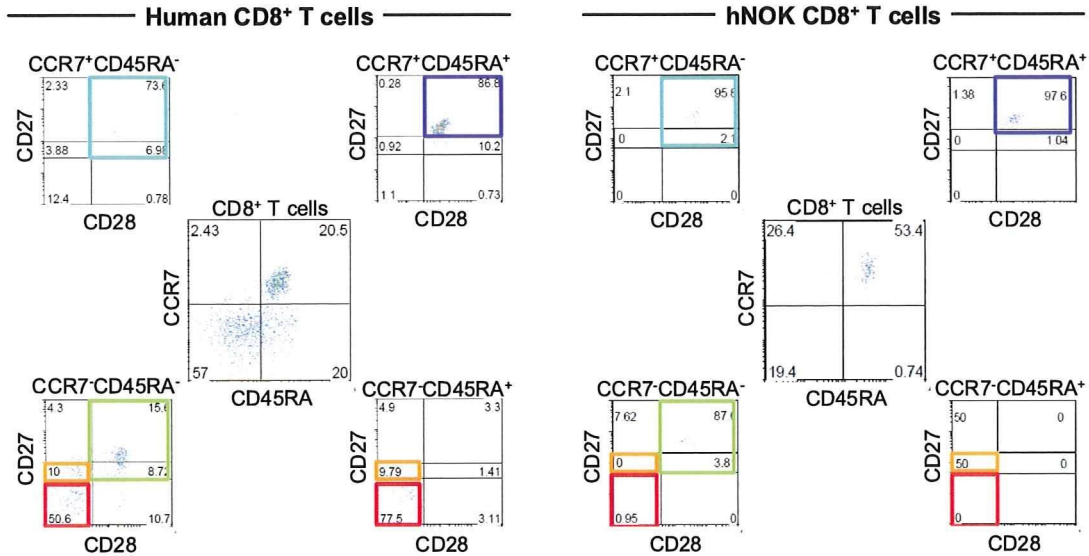
hNOKマウスにおけるヒト T 細胞の再構築についての解析



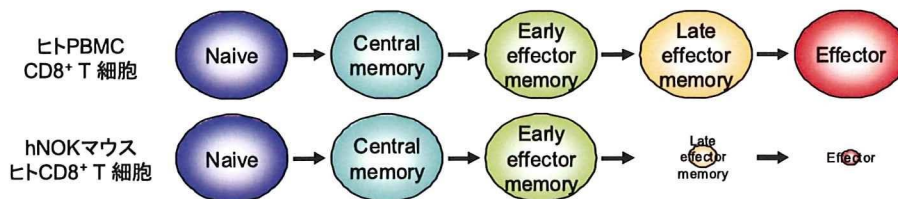
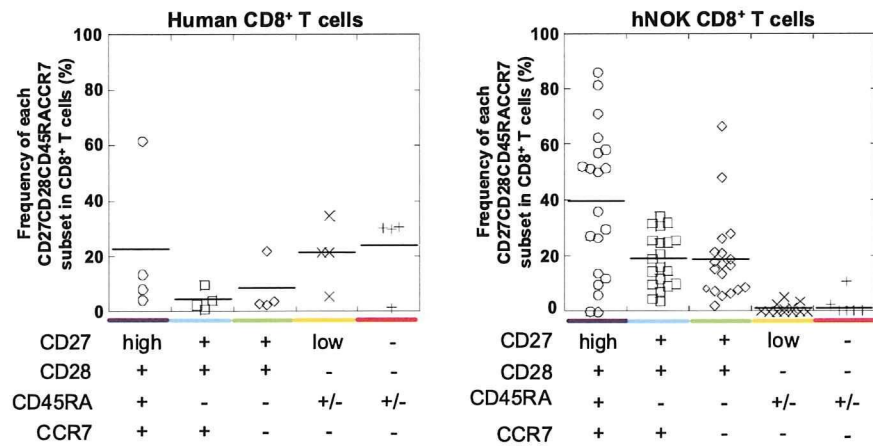
NOKマウスで再構築したヒトT細胞は、長期の間、定着することが確認できた。

図 3

hNOKマウス末梢血中のヒトCD8⁺T細胞におけるT細胞分化の解析(1)



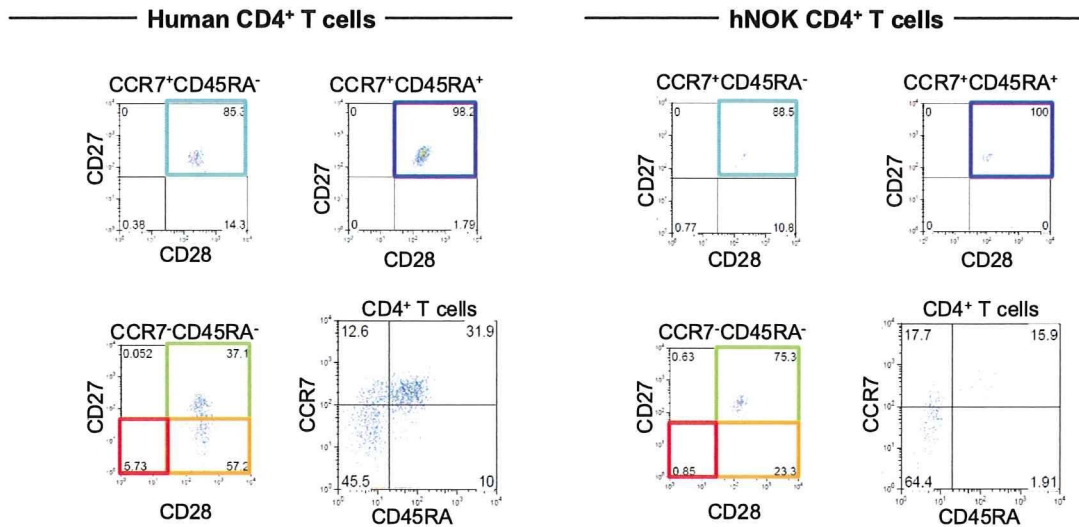
hNOKマウス末梢血中のヒトCD8⁺T細胞におけるT細胞分化の解析(2)



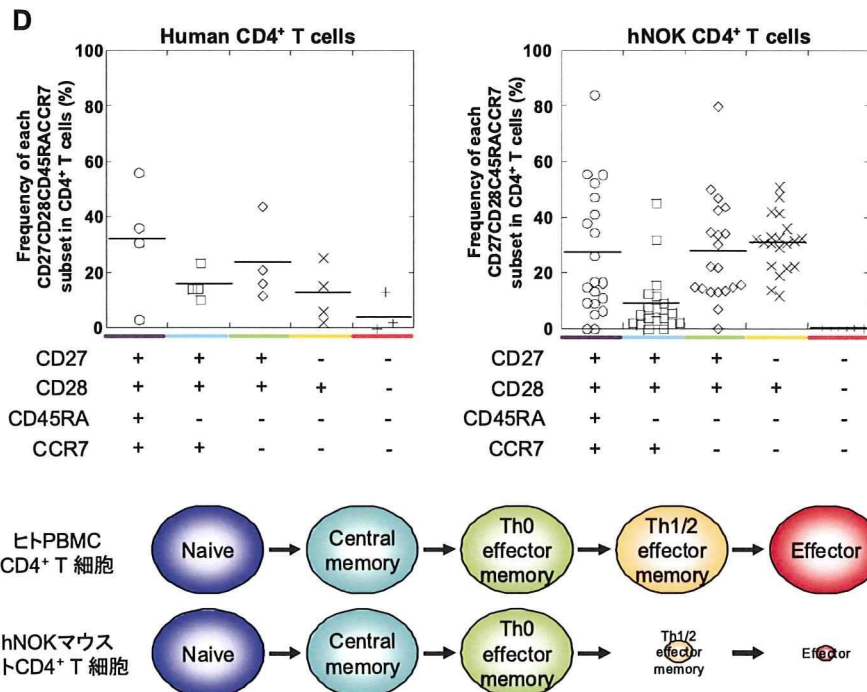
hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、**Early effector memory** 表現型まで分化していることが明らかとなった。

図4

hNOKマウス末梢血中のヒトCD4⁺T細胞におけるT細胞分化の解析(1)



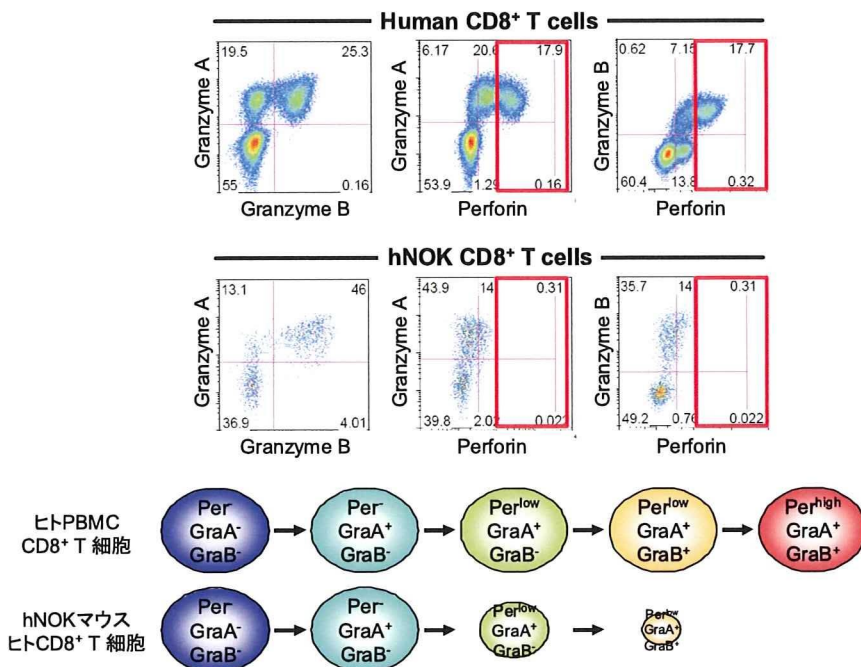
hNOKマウス末梢血中のヒトCD4⁺T細胞におけるT細胞分化の解析(2)



hNOKマウスのヒトCD4⁺T細胞は、Th1/2 effector memory 表現型まで分化していることが明らかとなった。

図5

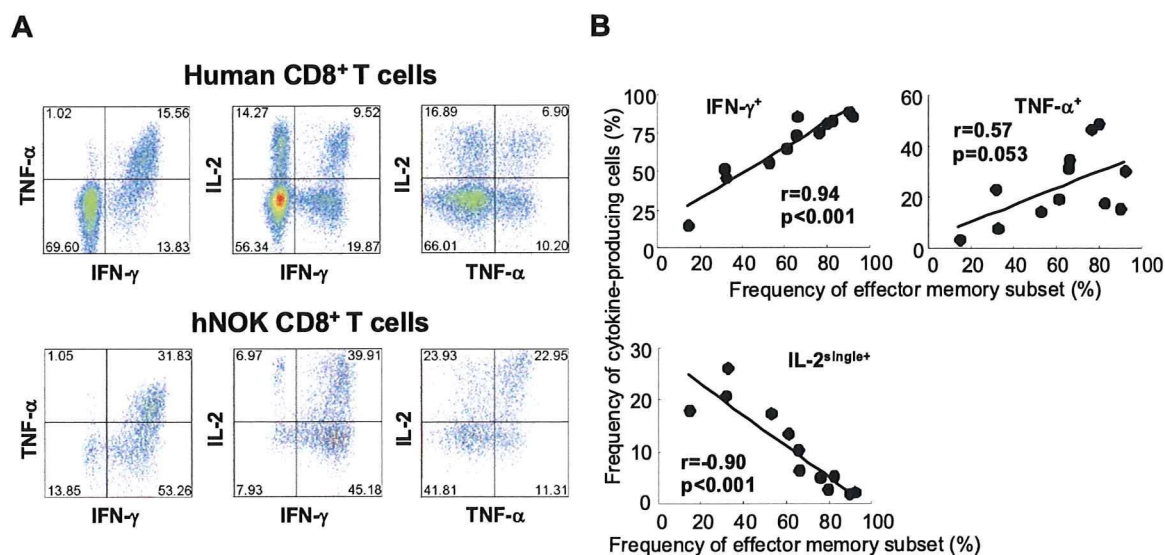
hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞におけるエフェクター機能の解析



hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、ヒトPBMC中のCD8⁺T細胞と比べ **Perforin** の発現が低いことが明らかとなった。

図6

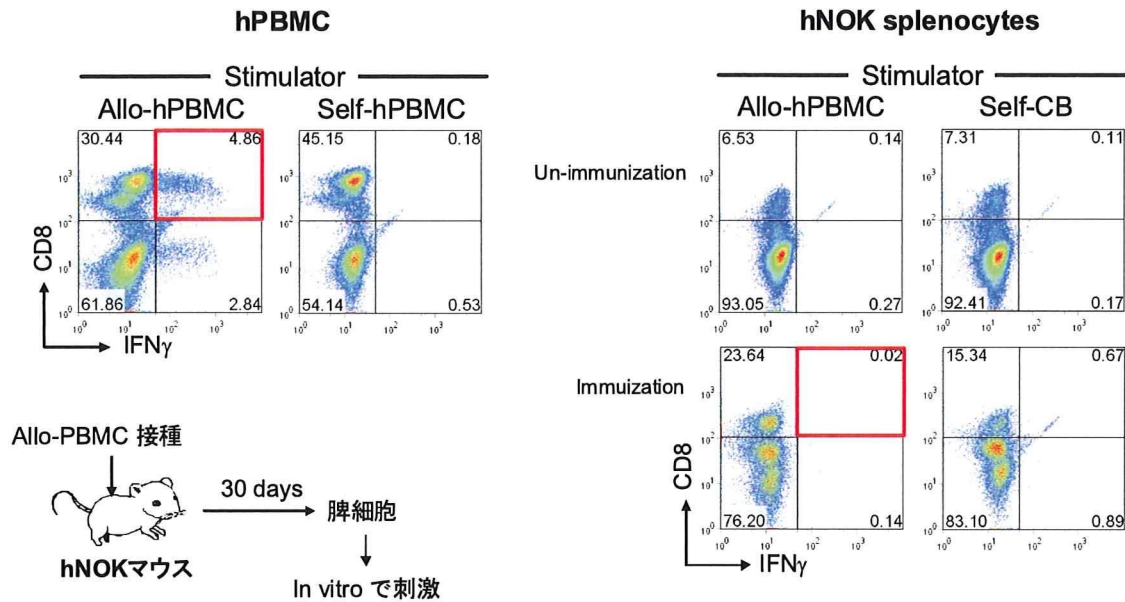
hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞におけるサイトカイン産生能の解析



hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、PMA/Ionomycin の刺激において **各サイトカイン産生を誘導できる**ことが明らかとなった。

図7

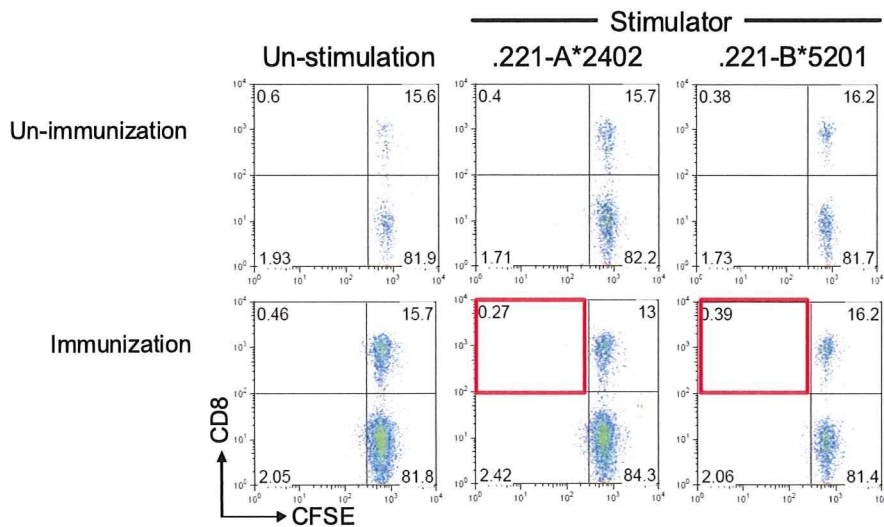
hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞におけるアロ反応性の解析(1)



hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、アロ抗原による刺激によって **IFN γ 産生を誘導できない**ことが明らかとなった。

図8

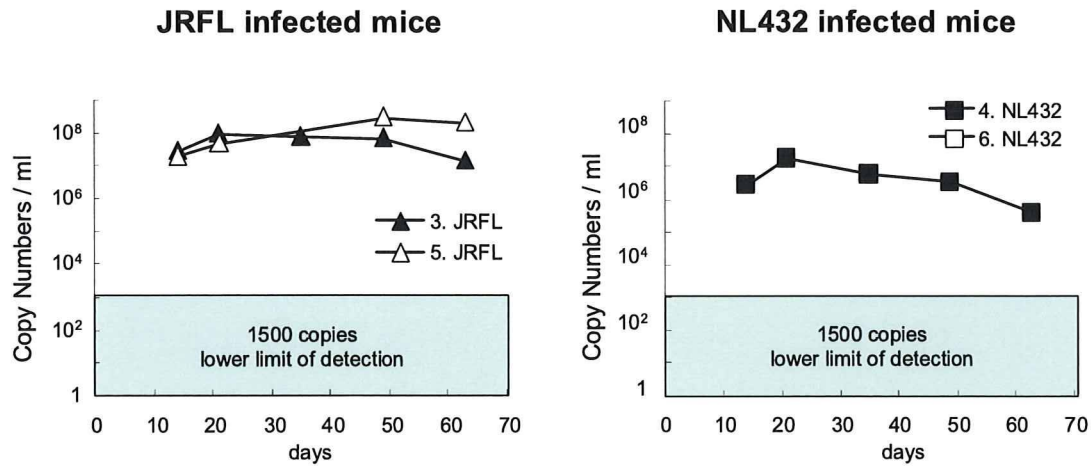
hNOKマウスでのヒトCD8⁺T細胞におけるアロ反応性の解析(2)



hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、アロ抗原による刺激によって **細胞増殖を誘導できない**ことが明らかとなった。

図9

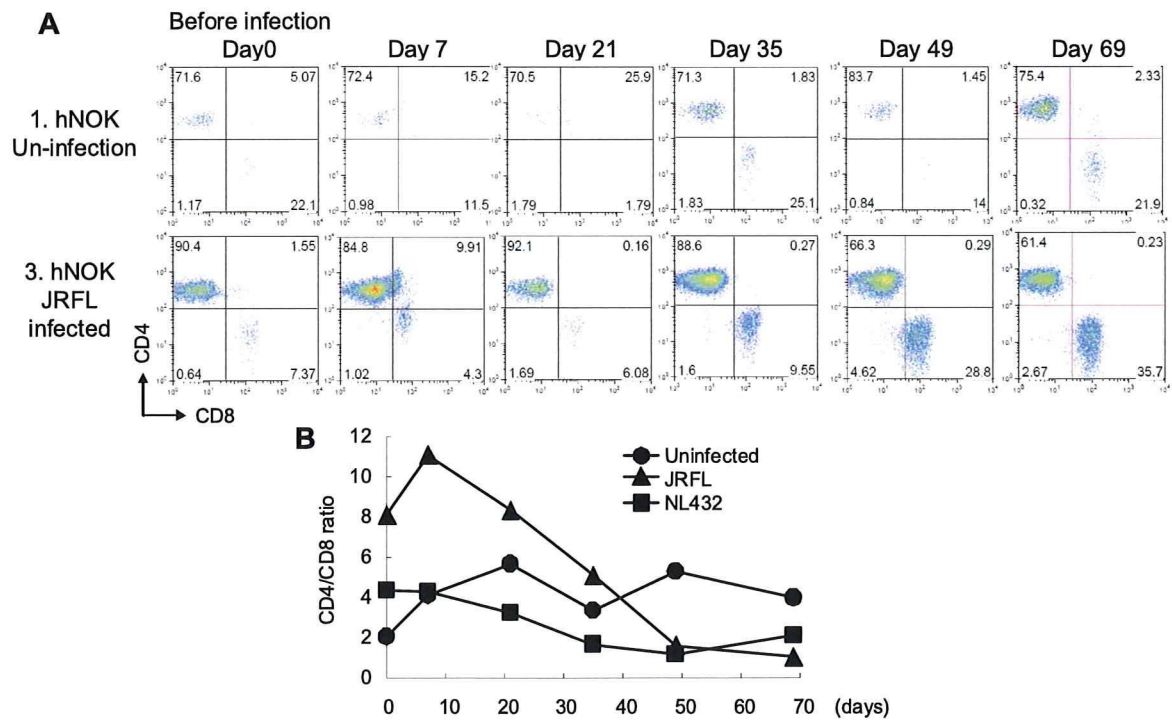
hNOKマウスの末梢血中におけるウイルスRNA量の経時的変化



HIV-1を感染させたhNOKマウスの末梢血中では、ウイルスRNAが経時的に検出されることが確認できた。

図10

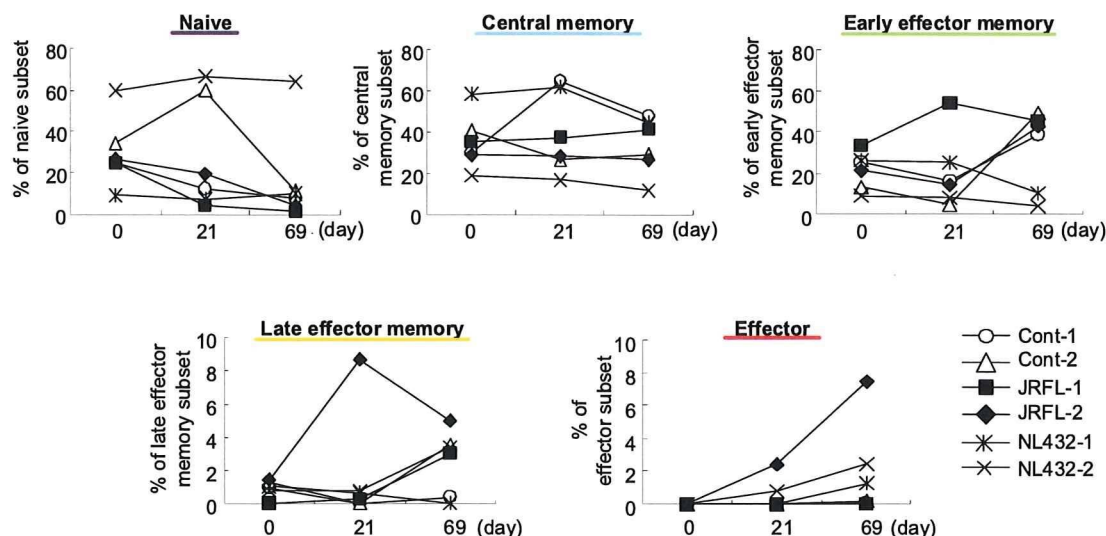
hNOKマウスの末梢血中におけるヒトT細胞比率の解析



HIV-1が感染したhNOKマウスでは、ヒトCD4T/CD8T細胞比率の減少が確認できた。

図 11

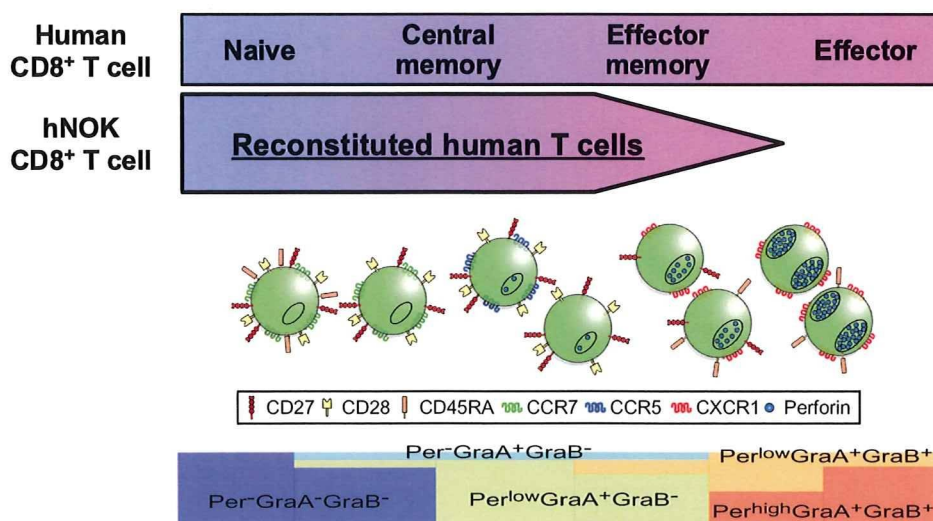
hNOKマウス末梢血中のヒトCD8⁺T細胞における表現型解析



hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、HIV感染に対して **Effector 表現型に分化するもの**としないものがあることが明らかとなった。

図 12

hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞における分化、機能解析のまとめ



hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は再構築された後、エフェクターメモリー表現型まで分化することが明らかとなった。しかし、**エフェクター表現型を示すヒトCD8⁺T細胞はほとんど確認できず**、さらにヒトCD8⁺T細胞は**抗原刺激に対し反応できない**ことが明らかとなった。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

佐藤義則

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

