

201029036B

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

平成20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 義則

平成23年(2011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20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 義則

平成23年(2011年)3月

目次

I. 総合研究報告

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	17
--------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	19
------------------	----

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
総合研究報告書

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 感染実験系が確立されていないことが挙げられる。そこで我々はヒト免疫系をマウス生体内に構築したヒト免疫構築マウス(ヒト化マウス)に着目し、そのマウスを用いた HIV 感染実験系の確立を目指した。

1)我々は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))を樹立し、そのマウスにヒト臍帯血由来幹細胞(CD34⁺細胞)を移植してヒト化 NOK マウスを作製した。2)HIV 感染細胞の排除に重要となるヒト CD8T細胞の分化・機能について解析し、ヒト化マウス内で再構成されたヒト CD8T細胞は、細胞傷害活性を示すエフェクター表現型の集団がほとんど含まれず、パーフォリンの発現がヒト PBMC 中に含まれるヒト CD8T細胞に比べ低いことを明らかにした。3)アロ抗原となるヒト PBMC で免疫したヒト化 NOK マウスの脾細胞を *in vitro* で再刺激を加えてもヒト CD8T 細胞の IFN- γ 産生および細胞増殖を誘導できないことを明らかにした。4)一方、ヒト化 NOK マウスに HIV-1 実験株である JR-FL 株または NL43 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。5)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 NL43 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可能であった。6)ヒト化 NOK マウスの解析結果を基に、我々はヒト CD8T 細胞の機能が誘導できると期待される HLA-B*51:01 遺伝子を導入した NOK/B51 トランスジェニックマウス(NOK/B51Tg)を新たに樹立し、このマウスにヒト CD34⁺細胞を移植してヒト化 NOK/B51Tg マウスを作製した。7)ヒト T 細胞の再構築が確認できマウス(ヒト化 NOK/B51Tg マウス)に HIV-1(NL43 株)を腹腔内投与で感染させた結果、ヒト CD4T 細胞の割合は感染 2 週間目以降から非感染群に比べ減少し、血漿中の HIV-RNA 量は感染 14~28 日目から検出できた。8)感染 42 日目の血漿中の HIV-RNA のゲノム全塩基配列を解析した結果、複数の遺伝子変異が見つかった。以上の結果から、我々が作成したヒト化 NOK/B51Tg マウスでは HIV 感染者に見られるようなヒト T細胞の推移と HIV ゲノム塩基配列の遺伝子変異が確認でき、これまでのヒト化マウスより一歩進んだヒト化マウスの樹立と HIV 感染モデルマウスの構築が可能となった。

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が知られている。当研究室においても、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、CTL がウイルス感染細胞の排除に重要であることを報告している。一方で、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、1) 高度免疫不全マウス (NOK マウス) を用いたヒト化マウスを新たに作製し、ヒト化マウスの基礎知見を得るため、発生したヒト T 細胞の分化・機能を解析した。2) HIV 感染モデルマウスを構築するため、HIV-1 (JR-FL 株, NL43 株) をヒト化 NOK マウスに感染させ、HIV-1 の感染条件を検討した。3) 1) の結果を基に、HLA-B51 発現ヒト化 NOK マウス (ヒト化 NOK/B51Tg マウス) を作製した。4) ヒト化 NOK/B51Tg マウスを用いた HIV 感染モデルマウス構築のため HIV-1 を感染させ、ヒト T 細胞への影響と HIV-1 のゲノム塩基配列を解析した。

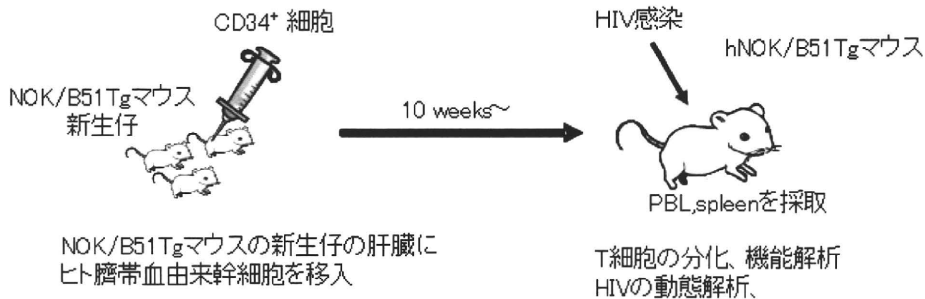
本研究で作製したヒト化 NOK/B51Tg マウスは、ヒトの造血・免疫系を確立した際に問題となる胸

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られる。また、ヒト化 NOK/B51Tg マウスは、CTL の免疫圧から逃避する HIV の逃避メカニズム等を解析できるモデルとなる点が優れており、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

臍帯血単核球から MACS を用いてヒト CD34⁺ 細胞を分離し、NOK マウスの新生仔の肝臓へ移植した。ヒト T 細胞の生着を調べるため、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た。ヒト化 NOK マウスに HIV-1 (JRFL 株, NL43 株) を腹腔から感染させ、HIV-1 の経時的なウイルス量を定量的リアルタイム PCR 法により、ヒト T 細胞の割合はフローサイトメトリーを用いて解析した。NOK/B51Tg マウスは、

図1 方法



NOD/SCID/B51Tg マウスと NOK マウスの掛け合わせにより樹立した。ヒト CD34⁺ 細胞を分離し、NOK/B51Tg マウスの新生仔の肝臓へ移植しヒト T 細胞の生着が確認できたマウスは、HIV-1(NL43 株)を腹腔から感染させた。感染後、系時的に末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いてヒト T 細胞の割合を解析した。また、系時的に末梢血から血漿を分離し、そこに含まれる HIV-1 ゲノム塩基配列を解析した。

(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、末梢血中にヒト B 細胞(CD19⁺)およびヒト T 細胞(CD3⁺)が認められた(図2)。しかし、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) の集団を含んでいた。しかし、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)。ヒト化 NOK マウス中のヒト CD8T 細胞の機能分子を調べた結果、ヒト PBMC 中のヒト CD8T 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)。PMA/Ionomycin で刺激したヒト CD8T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 CD8T 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 CD8T 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 CD8T 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 産生および細胞増殖を誘導できなかった(図7)。

ヒト化 NOK マウスに HIV-1 実験株である JR-FL 株および NL43 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 NL43 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)。

NOD/SCID/B51Tg マウスと NOK マウスとの掛け合わせにより樹立した NOK/B51Tg マウスは、ヒト CD34⁺ 細胞を移植し、移植後10週目の末梢血

中にヒトCD4T細胞およびヒトCD8T細胞のそれぞれを確認できた(図10A)。ヒト化NOK/B51TgマウスにHIV-1(NL43)を感染させると、2週間後からヒトCD4T細胞の割合が減少した(図10A および10B)。HIV-1感染ヒト化NOK/B51Tgマウスの血漿を系時的に採取し、HIV-RNAの検出を行った。血漿中のHIV-RNAは、感染後2週間または4週間で検出できるようになり、ヒト化NOK/B51TgマウスにおけるHIV-1の感染成立が確認できた(図11)。さらに、HIV感染6週間後のヒト化NOK/B51Tgマウスの血漿中からHIV-RNAを分離し、ゲノム塩基配列を解析した。7匹のHIV感染ヒト化NOK/B51Tgマウスから分離したHIV-RNAでは、そのうち4匹からHIV-RNAの遺伝子変異が見つかった(図12)。一方、NOKマウス(B51-)では感染したHIV-1のゲノム塩基配列に遺伝子変異は見つからなかった(図12)。

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。しかしながら、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T細胞が末梢血や脾臓で確認されているものの、その機能については明らかではなかった。今回のヒト化NOKマウスを用いた研究から、ヒト化マウス内で再構築されたヒトT細胞はエフェクター機能を持たないことや、アロ抗原

刺激に対する反応が起きないことから、更なる改良を加えたヒト化マウスの作製の必要性を示唆した(Sato Y., et al., *PLoS ONE*, 2010)。通常、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 α 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CD8T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。そこで我々は、NOKマウスにHLA-B*51:01を組み込んだNOK/B51Tgマウスの樹立を行い、このマウスでヒト化NOK/B51Tgを作製しHIV-1を感染させた。その結果、ヒト化NOK/B51TgマウスではヒトCD4T細胞の減少やHIV-1のゲノム塩基配列の遺伝子変異を確認することが出来た。また、HIV感染者のHIVゲノム塩基配列の解析では、感染2週目から変異が誘導されている報告があるが、ヒト化NOK/B51TgマウスでもHIV-1の遺伝子変異は早い箇所でも感染2週目から変異過程を見ることができた。ヒト化NOK/B51TgマウスはHIVの逃避変異体を解析するツールとなることが期待できる。

一般的にHIVが変異する要因として、中和抗体やCTLによる免疫圧からの逃避が考えられている。今回我々が作製したヒト化NOK/B51TgマウスではHIV-1の変異を感染後の早い段階で誘導できたことから、未だ報告されていないヒト造血幹細胞移植で構築されたヒト化マウスを用いたHIV-1に対するヒトT細胞の免疫誘導が可能であ

ることが期待できる。今後はヒト化 NOK/B51Tg マウスにおける HIV 特異的 CTL が誘導されているかについて詳細な解析を行う必要がある。

E. 結論

今回の研究において我々は、これまでのヒト化マウスにおけるヒトT細胞の免疫誘導の問題点を明らかにした。さらに、その問題点を解決できると期待されるヒト化 NOK/B51Tg マウスを樹立し、HIV を感染させた結果、HIV 感染者と類似したヒトT細胞の減少と、HIV の遺伝子変異を誘導することに成功した。ヒト化マウスを用いた HIV 感染モデルマウスは様々な問題点を克服し、ヒトの免疫系により近いモデルマウスが作られつつある。特に我々の構築したヒト化 NOK/B51Tg マウスは、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と考えられ、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ことができると期待する(図13)。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

Sato Y, Takata H, Kobayashi N, Nagata S, Nakagata N, Ueno T, Takiguchi M. Failure of effector function of human CD8⁺ T cells in NOD/SCID/JAK3^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells. PLoS ONE. 5; e13109, 2010.

Kitano M, Kobayashi N, Kawashima Y, Akahoshi

T, Nokihara K, Oka S, Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-B*5401-restricted HIV-1-Nef and Pol-specific CTL epitopes. Microbes. Infect. 10:764-772, 2008.

1) 学会発表

Sato Y, Takata H, Nagata S, Takiguchi M. Failure of effector function of human CD8⁺ T cells in NOD/SCID/JAK3^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells. 11th Kumamoto AIDS Seminar -GCOE Joint International Symposium, 2010, Kumamoto. (ポスター発表)

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)

Sato Y, Takata H, Tamaki S, Takiguchi M. Impaired differentiation and function of human CD8⁺ T cells in humanized mice. 10th Kumamoto AIDS Seminar -GCOE Joint International Symposium, 2009, Kumamoto. (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

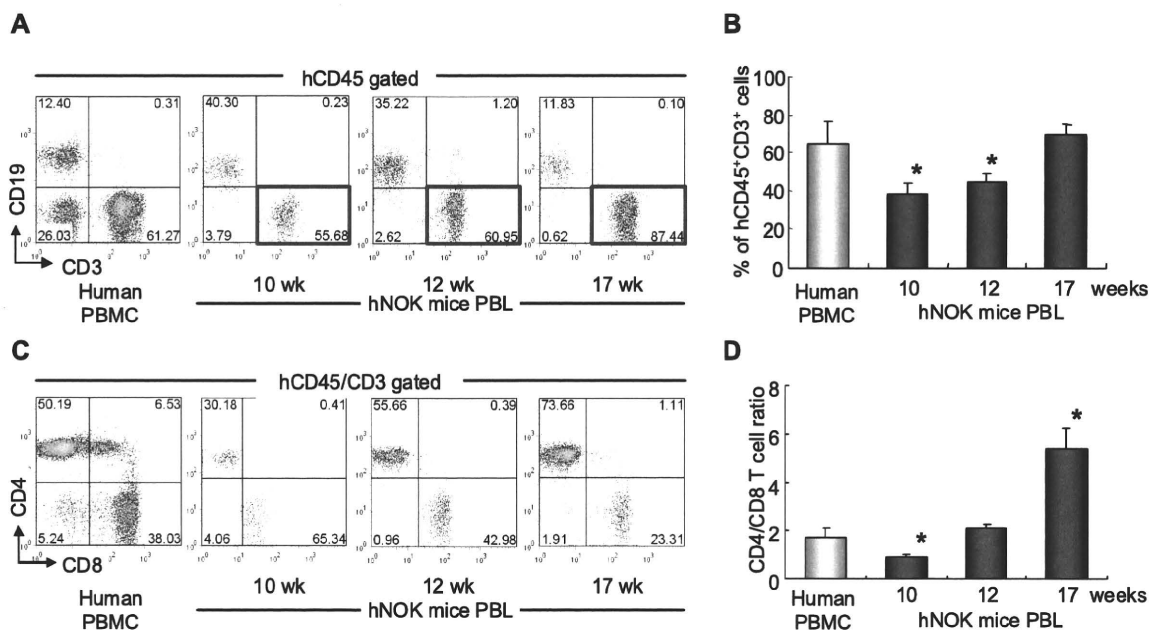
hNOK マウスのヒト免疫細胞の割合

Cord blood	Mouse No.	% nucleated cells			Cord blood	Mouse No.	% nucleated cells		
		hCD45 ⁺	CD3 ⁺	CD19 ⁺			hCD45 ⁺	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		6	6.6	5.2	81.0
Donor 3	1	5.8	0.4	76.2	Donor 6	1	6.6	5.2	81.0
	2	18.9	47.0	43.4		2	7.7	81.3	13.2
	3	37.6	84.1	11.7	Donor 7	1	10.5	34.1	60.7
	4	10.7	0.2	79.7		2	50.3	42.2	54.0
	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⁺ 細胞を NOK マウスに移植した。移植後 10 週目のヒト化 NOK マウスの PBMC を用いてヒト免疫細胞の再構築の割合を解析した(n=32)。

図 2

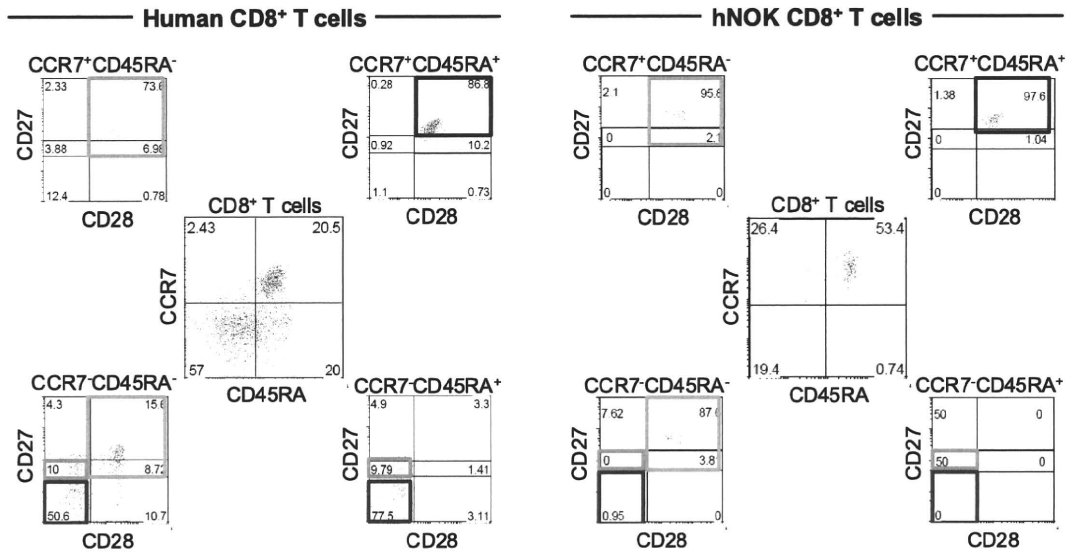
hNOKマウスのヒト T細胞の系時的推移



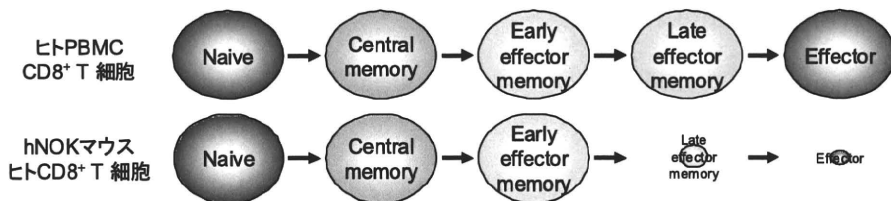
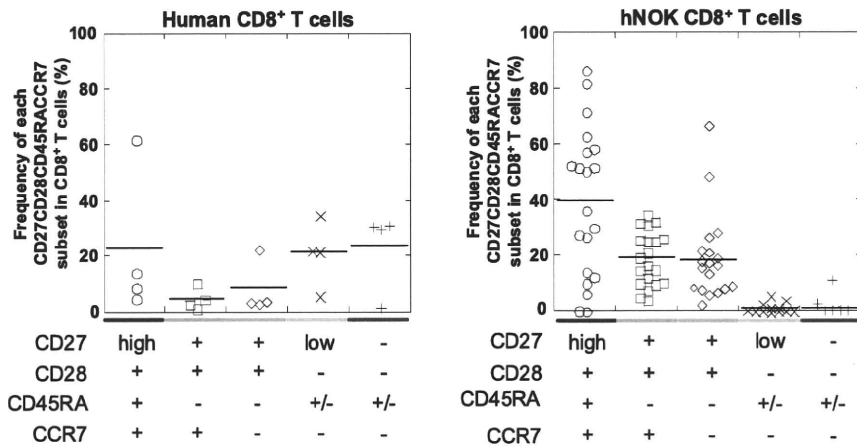
NOKマウスで再構築したヒト T細胞は、長い期間の定着が可能である。

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)



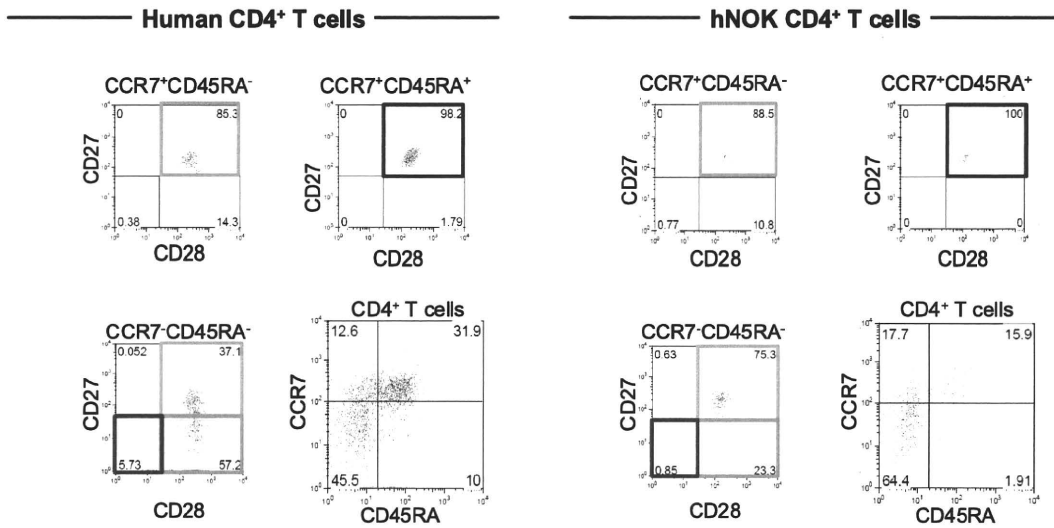
hNOKマウス末梢血中のヒトCD8⁺T細胞におけるT細胞分化の解析(2)



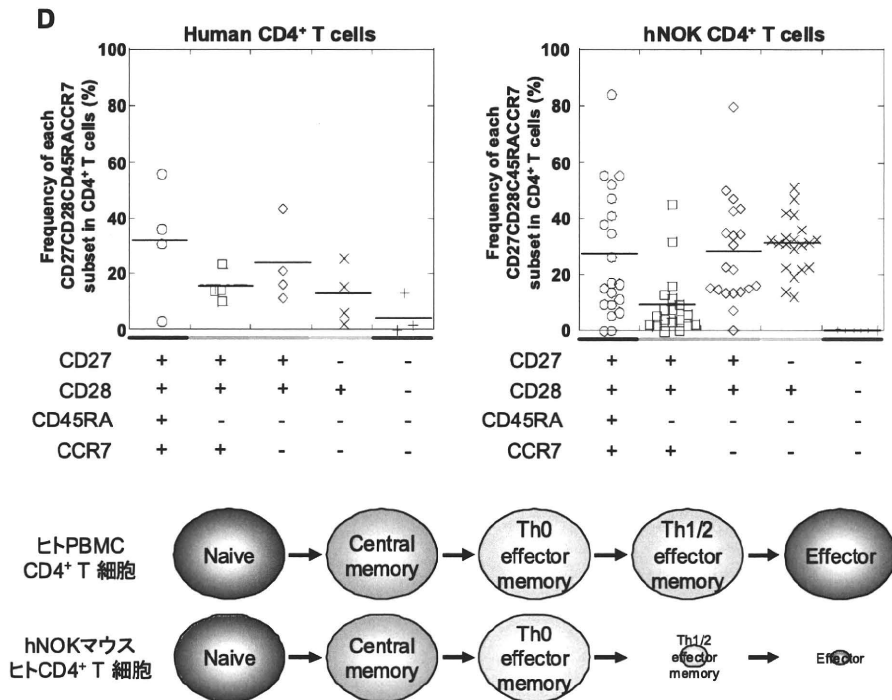
hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞は、Early effector memory 表現型まで分化していることが明らかとなった。

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)



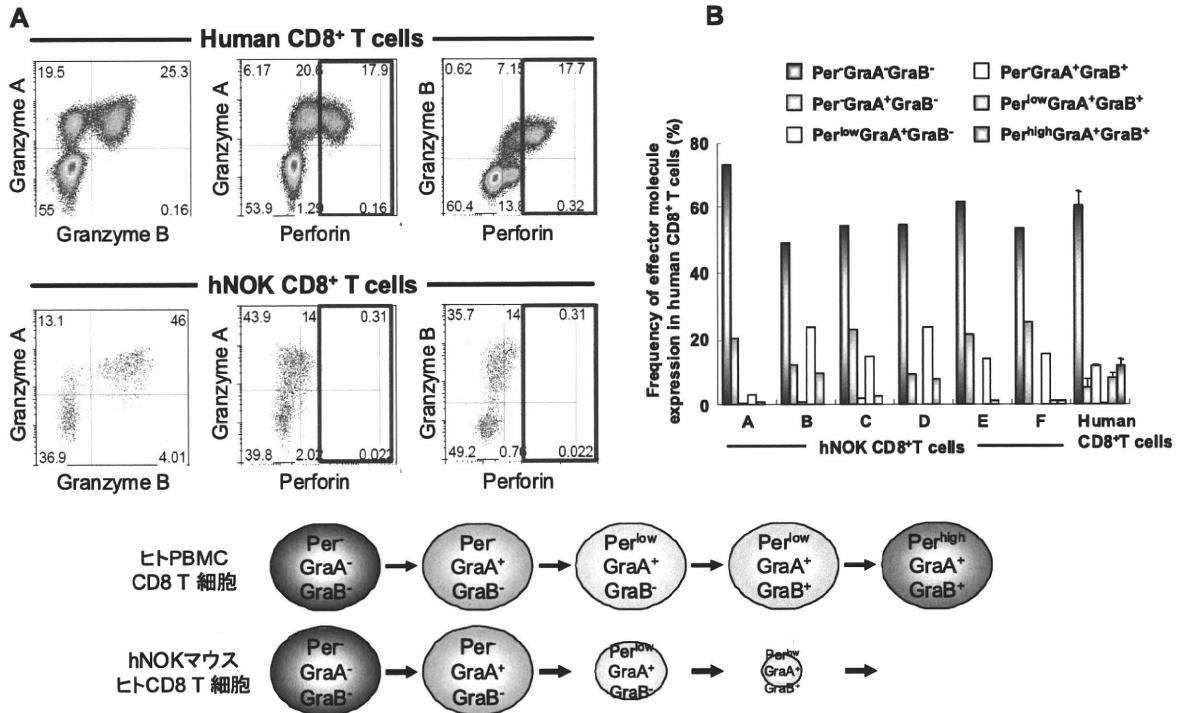
hNOKマウス末梢血中のヒトCD4⁺T細胞におけるT細胞分化の解析(2)



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

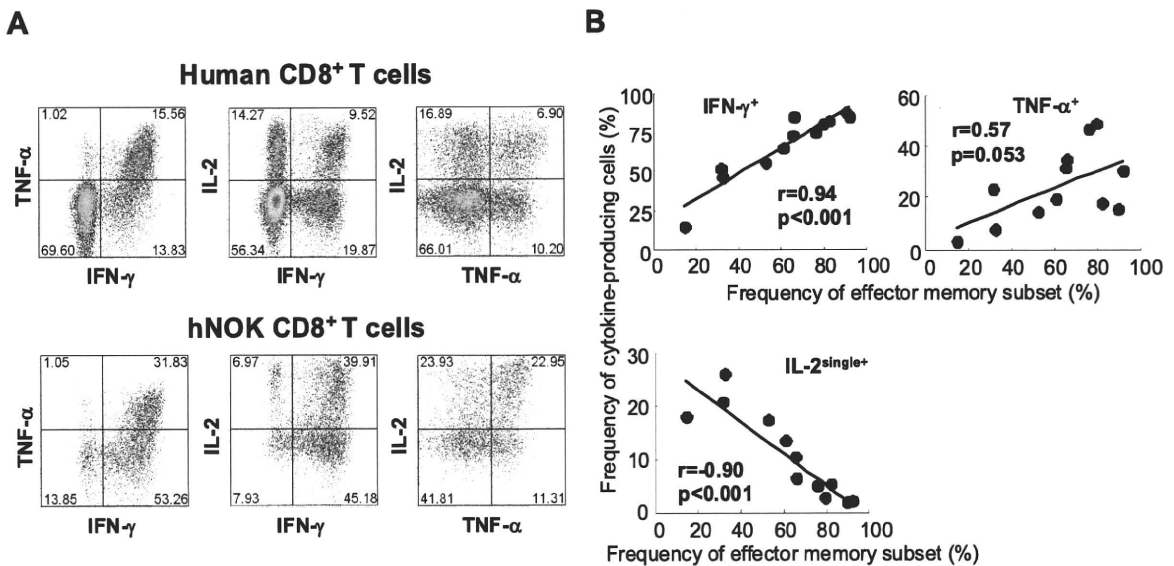
hNOKマウスで再構築されたヒトCD8T細胞のエフェクター機能の解析



hNOKマウスのヒトCD8T細胞は、Perforin の発現が低いことが明らかとなった。

図6

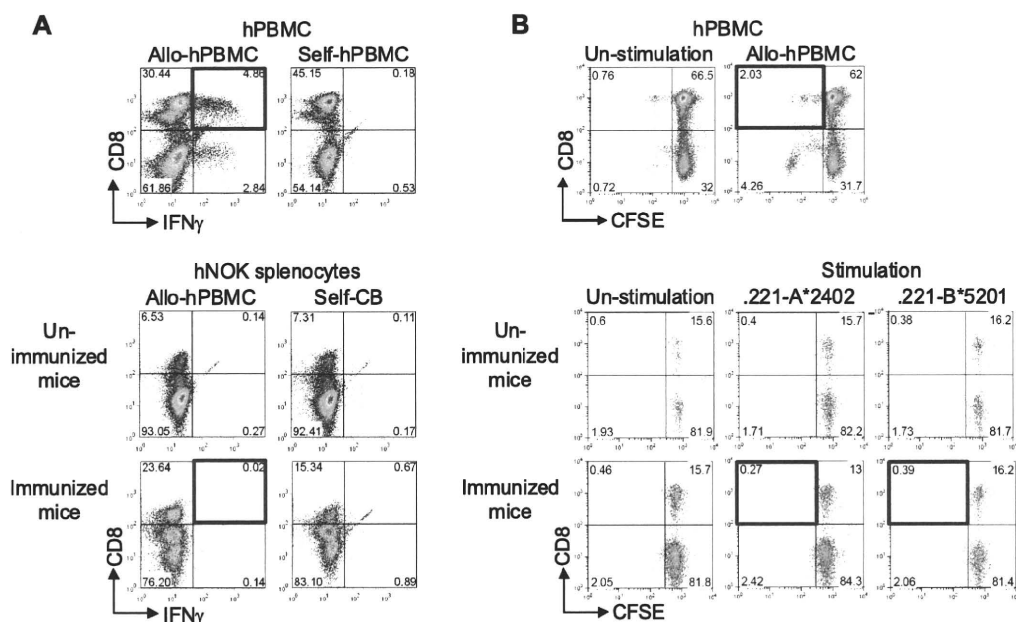
hNOKマウスのヒトCD8⁺ T細胞におけるサイトカイン産生能の解析



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

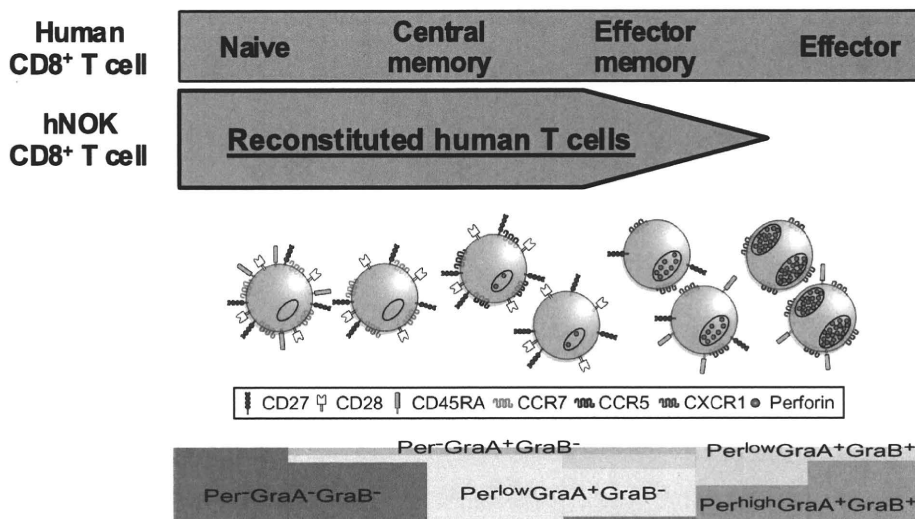
hNOKマウスで再構築されたヒトCD8T細胞のアロ反応性の解析



アロ抗原で免疫したhNOKマウスのヒトCD8T細胞では、アロ刺激に対してIFN- γ 産生および細胞増殖を誘導できなかった。

図8

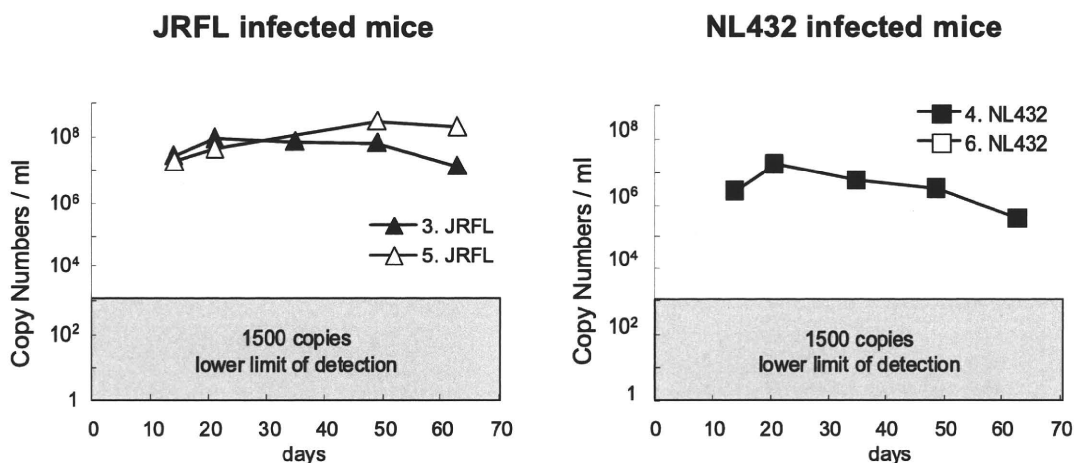
hNOKマウスのヒトCD8⁺T細胞における分化、機能解析のまとめ



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。

図9

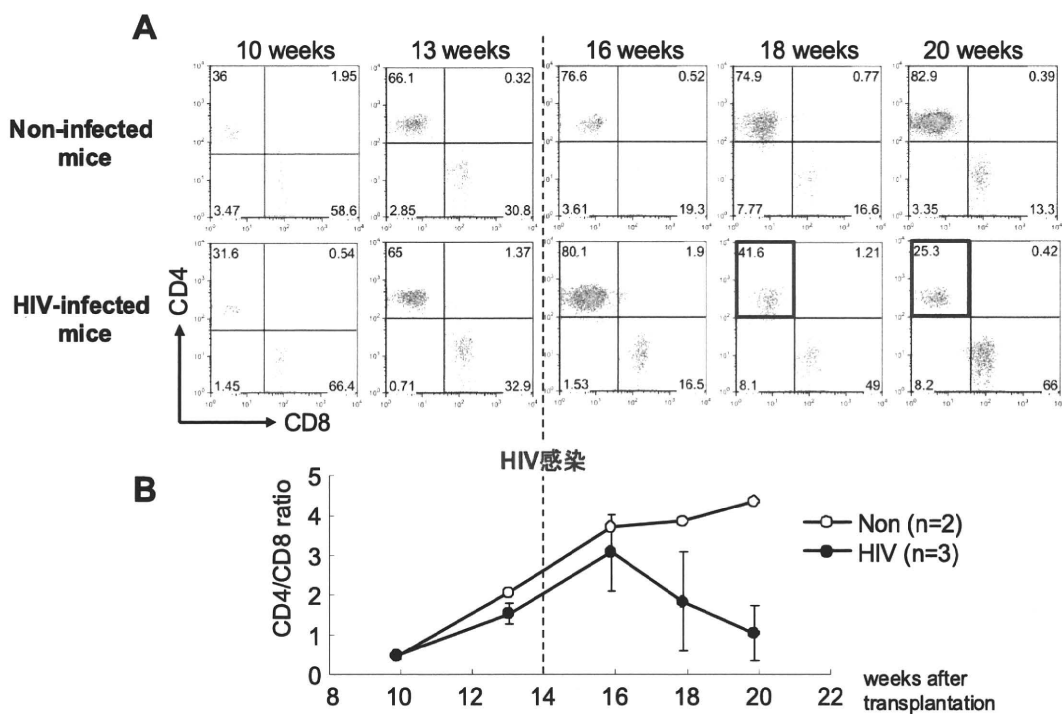
hNOKマウスの末梢血中におけるウイルスRNA量の経時的変化



HIV-1を感染させたhNOKマウスの末梢血中では、HIV-RNAを経時的に検出することができた。

図10

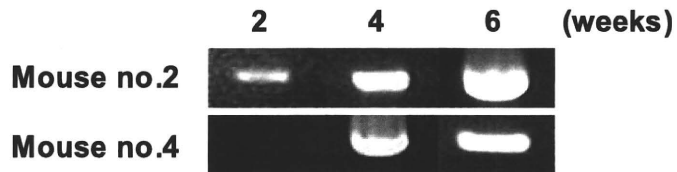
HIV感染hNOK/B51TgマウスのヒトT細胞の割合の系時的な変化



HIV(NL432)を感染させたhNOK/B51Tgマウスでは、ヒトCD4T細胞の割合が感染2週目以降で減少した。

図11

HIV感染hNOK/B51Tgマウスの血漿中に含まれるHIV-RNAの検出



HIV感染hNOK/B51Tgマウスの血漿中では、感染2～4週目以降にHIV-RNA (NL432)が検出された。

図12

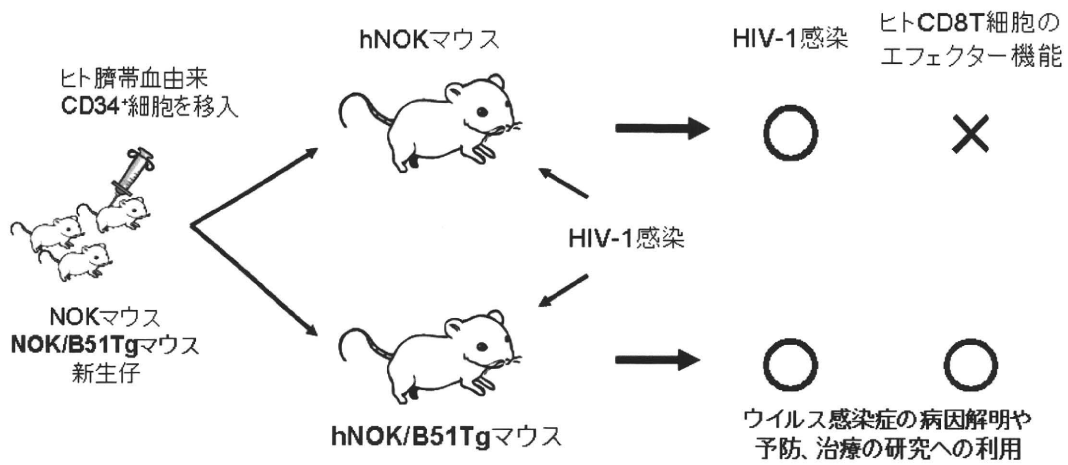
HIV感染hNOK/B51Tgマウスの血漿中から分離したHIVゲノム塩基配列の解析

Experimental Group	Number of mice		
	Total	No mutation	Mutation
B51(+/-)	7	3	4
B51(-/-)	1	1	0

HIV感染hNOK/B51Tgマウスの血漿中から分離したHIV(NL432)では、ゲノム塩基配列にいくつかの変異が見られた。

図13

HLA-B51発現NOK(NOK/B51Tg)マウスの樹立とHIV感染モデルマウスの作製



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
佐藤義則、高田比呂志、小林直樹、永田紗矢香、中潟直己、上野貴将、滝口雅文	Failure of effector function of human CD8 ⁺ T cells in NOD/SCID/JAK3 ^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34 ⁺ hematopoietic stem cells.	<i>PLoS ONE</i>	5	e13109	2010

小林直樹（前研究代表者）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitano M, Kobayashi N, Kawashima Y, Akahoshi T, Nokihara K, Oka S, Takighuchi M.	Identification and characterization of HLA-B*5401-restricted HIV-1-Nef and Pol-specific CTL epitopes.	<i>Microbes. Infect.</i>	10	764-772	2008

III. 研究成果の刊行物・別刷