

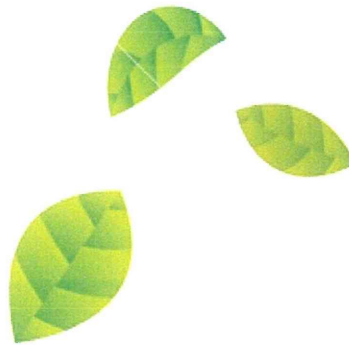
201124036A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業



HLA発現ヒト免疫構築マウスにおけるHIV-1特異的CTLの誘導と
その機能解析に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書



研究代表者 斎藤 益満

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HLA発現ヒト免疫構築マウスにおけるHIV-1特異的CTLの誘導と

その機能解析に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 齋藤 益満

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

HLA発現ヒト免疫構築マウスにおけるHIV-1特異的CTLの誘導とその機能解析 に関する研究	-----	3
---	-------	---

研究代表者 齋藤 益満

II. 分担研究報告

1. HIV-1逃避変異とヒトT細胞受容体の研究に関する研究	-----	8
--------------------------------	-------	---

齋藤 益満

2. ヒト免疫構築マウスにおける抗原特異的細胞傷害性T細胞の研究 に関する研究	-----	15
--	-------	----

佐藤 義則

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21
-----------------	-------	----

I . 総括研究報告

HLA発現ヒト免疫構築マウスにおけるHIV-1特異的CTLの誘導とその機能解析に関する研究

研究代表者：斎藤 益満（熊本大学エイズ学研究センター 特任講師）

研究要旨

ヒト生体内において長期間 HIV-1 増殖を抑制するには、HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による HIV-1 感染細胞の除去が非常に重要であることが知られている。しかしながら、HIV-1 は感染細胞上の HLA クラス I 分子に提示されるウイルス蛋白質の一部(エピトープ)を変異させ、CTL に発現するヒト T 細胞受容体 (TCR) の認識から逃れる。本研究室ではエイズ発症遅延と相関する HLA-B*51 に提示される TAFTIPSI (逆転写酵素の 128~135 番残基) エピトープの 135 番目のアミノ酸の変異が、CTL からの逃避変異であることを明らかにし、またこの逃避変異の出現が生体内におけるウイルス量を増加させるとともに HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL を減少させることを報告した。

これらの現象を実際に *in vivo* で詳細に解析するために、これまでに HLA-B*5101 遺伝子を発現する高度免疫不全マウス (NOK/B51Tg マウス) を作製した。この NOK/B51Tg マウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒト T 細胞の再構築を確認後、HIV-1 感染によってエフェクタータイプのヒト CD8⁺ T 細胞が誘導されたことを確認した。しかしながら、ヒト生体内における免疫反応を NOK/B51Tg マウスにおいて解析を行うためには、ヒト造血幹細胞に発現する HLA と NOK/B51Tg マウスに発現する HLA を一致させる必要があるため、レンチウイルス発現システムを用いて HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立を行い、NOK/B51Tg マウスに移植した。その結果、HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞を移植した NOK/B51Tg マウスにおいてヒト T 細胞の再構築を確認することが出来たものの、HLA-B*51 陽性ヒト T 細胞の存在を検出することは出来なかった。

NOK/B51Tg マウスにおける HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL の誘導を目的に、HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL クローンを樹立し、その CTL クローンに発現する TCR 遺伝子の解析を行った。その結果、感染者間で高い類似性を示す TCR が発現していることを明らかとした。

A. 研究目的

本研究では、HIV-1 の感染に対する免疫応答、免疫システムからの逃避変異 HIV-1 の出現、逃避変異 HIV-1 の蓄積による慢性感染など、HIV-1 が感染した場合にヒト生体内で実際に引き起こされる現象をヒト免疫構築マウス（ヒト造血幹細胞を移植した NOK/B51Tg マウス）で誘導し、その現象の詳細について解析を行う。また同マウスにおいてエイズワクチンの投与による HIV-1 特異的 CTL の誘導や、より強力な HIV-1 増殖抑制能を示す変異を導入した TCR 遺伝子を見出すことは、今後の新規エイズ治療法の開発に極めて重要であると考えられる。

B. 研究方法

ヒト生体内における免疫反応を我々が作製した NOK/B51Tg マウスにおいて解析を行うためには、ヒト造血幹細胞に発現する HLA と NOK/B51Tg マウスに発現する HLA を一致させる必要がある。しかしながら、我々が使用するほとんどのヒト造血幹細胞は、HLA-B*5101 陰性であるために HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法の検討を行った。まずリン酸カルシウム法を用いて、HLA-B*5101 遺伝子発現レンチウイルスベクターとパッケージングベクターを同時に 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養液の回収を行った。その後、超遠心機を用いて培養液中のレンチウイルスの濃縮を行った。濃縮されたレンチウイルスと HLA-B*5101 陰性ヒト造血幹細胞を混和し、一晚培養することによってレンチウイルスを感染させ、HLA-B*51 陽性ヒト造血系幹細胞の樹立を行った。レンチウイルスを感染させた HLA-B*51 陰性ヒト造血幹細胞にお

ける HLA-B*51 の発現の有無をフローサイトメトリーを用いて確認した後、この HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞を NOK/B51Tg マウスに移植した。

10 週間後に HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞を移植した NOK/B51Tg マウスより末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いてヒト T 細胞の割合と細胞数の解析を行い、ヒト T 細胞の再構築を確認した。ヒト T 細胞の再構築が確認できたマウスにおいて、HLA-B*51 を発現するヒト T 細胞の存在をレンチウイルスベクターにコードされている蛍光タンパク質をマーカーとして用いて検討を行った。

単一 T 細胞からの TCR 遺伝子同定法を用いて、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者由来の CTL クローンから HIV-1 TAFTIPSI エピトープを認識する TCR 遺伝子の同定を行った。

（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については、すべてインフォームドコンセントをとり、本人の承諾なく実験に使用・遺伝子解析を行わない。本研究における遺伝子解析の実施の許可については、当大学のヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会にて承認済みである。また、検体提供者の個人情報はネットワークに接続されていない個人情報管理専用のパソコンで厳重に管理され、そのパソコンは研究室内でも限られた者しか利用できないようパスワードで使用が制限されている。臍帯血単核球は理化学研究所（理研）から購入し、この臍帯血単核球は理研がすでに提供者に対してインフォームドコンセントを行い、さらに匿名化されているため、本研究によ

て提供者に危険を及ぼすことは無い。動物実験についてはすでに当大学の動物実験・倫理審査委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

NOK/B51Tg マウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒト T 細胞の再構築を確認後、HIV-1 感染によってエフェクタータイプのヒト CD8⁺ T 細胞が誘導されたことを確認した。さらに実際に引き起こされるヒト生体内の免疫反応に近い免疫反応を NOK/B51Tg マウスにおいて検出するために、レンチウイルスを用いて HLA-B*5101 陽性ヒト造血幹細胞を作製した結果、約 5% の HLA-B*51 陰性ヒト造血幹細胞において、HLA-B*51 の発現を検出した。しかしながら、これらの HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞を移植した 4 匹の NOK/B51Tg マウスにおいて、ヒト T 細胞の再構築を確認することが出来たものの、HLA-B*51 陽性ヒト T 細胞の存在を検出することは出来なかった。

NOK/B51Tg マウスにおける HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL の誘導を目的に、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL クローンを樹立し、その CTL クローンに発現する TCR 遺伝子の解析を行った。その結果、感染者間で高い類似性を示す TCR が発現していることを明らかとした。さらにこれらの TCR 発現レンチウイルスベクターを作製し、その発現を TCR 欠損細胞株表面上において検出した。

D. 考察

ヒト生体内における免疫反応に近い免疫反応を NOK/B51Tg マウスにおいて構築するために、レンチウイルスを用いた HLA-B*51

陽性ヒト造血幹細胞の樹立とその移植を試みたものの、ヒト造血幹細胞におけるレンチウイルスの感染効率が低いために NOK/B51Tg マウスにおいて HLA-B*51 陽性 T 細胞を検出することが出来なかった。そのため、レンチウイルスの感染効率を向上させるために、より高濃度のレンチウイルスの感染あるいはサイトカイン等によるヒト造血幹細胞の刺激が必要であると考えられる。これらの条件・検討は、HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL クローンにおいて見出された TCR を HLA-B*51 陽性 T 細胞に発現させる際に、非常に役立つと考えられる。

E. 結論

HIV-1 に対するヒト免疫反応をモデルマウスにおいて解析するために、HLA をマッチングさせた NOK/B51Tg マウスの作製と HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立を行った。

しかしながら、HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法が不十分であったために、HIV-1 に対するヒト免疫反応を解析することが出来なかった。再度、HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法の検討が必要である。

エイズ発症遅延と相関する HLA-B*51 に提示される TAFTIPSI エピトープを認識する CTL に発現する TCR 遺伝子は、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から樹立された CTL クローン間において、非常に高い類似性を示すことを明らかにした。この研究成果は、ヒト免疫構築マウスにおいて逃避変異型 HIV-1 の誘導に非常に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Phenotypic analysis of reconstituted human T cells in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. SATO Yoshinori, TAKIGUCHI Masafumi. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月 (口頭発表)

2) Elicitation of human effector CD8⁺ T cells in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. SATO Yoshinori, NAGATA Sayaka, TAKIGUCHI Masafumi. 12th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto) 2011年10月 (ポスター発表)

3) Selection of HIV-1 mutants in

HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. SATO Yoshinori, NAGATA Sayaka, TAKIGUCHI Masafumi. IUMS 2011-XV International Congress of Virology (Sapporo) 2011年9月 (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

II. 分担研究報告

HIV-1逃避変異とヒトT細胞受容体の研究に関する研究

研究代表者：齋藤 益満（熊本大学エイズ学研究センター 特任講師）

研究要旨

HIV-1は、感染細胞上のHLAクラスI分子に提示されるウィルス蛋白質の一部(エピトープ)を変異させ、CTLに発現するヒトT細胞受容体(TCR)の認識から逃れる。この免疫逃避機構が、HIV-1を完全に生体内から排除できない理由の一つである。そこでヒト免疫反応によって誘導されるHIV-1逃避変異メカニズムを*in vivo*で解明するために、NOK/B51Tgマウスの作製を行った。このNOK/B51TgマウスにおいてHIV-1に対するヒト免疫反応を解析するためには、HLAが適合するHLA-B*51陽性ヒト造血幹細胞を樹立し、それをNOK/B51Tgマウスに移植しなければならない。そこでレンチウイルス発現システムを用いて、HLA-B*51陽性ヒト造血幹細胞の樹立を行った。しかしながら、HLA-B*51を発現したヒト造血幹細胞の頻度は約5%と低く、この樹立法について再検討を行う必要性が明らかとなった。

エイズ発症遅延と相関するHLA-B*51に提示されるTAFTIPSIエピトープを認識するCTLに発現するTCR遺伝子を解析するために、HLA-B*5101陽性HIV-1感染者からHIV-1TAFTIPSI特異的CTLクローンの樹立を行った。その結果、HLA-B*5101陽性HIV-1感染者間で高い類似性を示すTCRが発現していることを明らかとした。

A. 研究目的

本研究では、HIV-1逃避変異誘導メカニズムを*in vivo*で解明するために、HLA-B*51を発現するNOK/B51TgマウスとHLAが適合するHLA-B*51陽性ヒト造血幹細胞の樹立を行う。またエイズ発症遅延と相関するHLA-B*51に提示されるTAFTIPSIエピトープを認識するCTLに発現するTCR遺伝子の同定を行う。さらNOK/B51TgマウスにおけるHIV-1TAFTIPSI特異的CTLの誘導とHIV-1逃避変異の誘導を目的に、同定したTCR遺伝子の発現システムの構築を行う。

B. 研究方法

- 1) HLA-B*51陽性ヒト造血幹細胞の樹立
ヒト臍帯血より造血幹細胞を分離し、一晚無血清培地で培養した。HLA-B*51:01をコードするをレンチウイルスは形質転換した293T細胞の培養液上清より精製した。この精製したレンチウイルスをヒト造血幹細胞に感染させ、HLA-B*51陽性ヒト造血系幹細胞の樹立を行った。レンチウイルスを感染させたHLA-B*51陰性ヒト造血幹細胞におけるHLA-B*51の発現の有無をフローサイトメトリーを用いて確認した。
- 2) HIV-1TAFTIPSI特異的CTLに発現する

TCR 遺伝子の解析

6人のHLA-B*5101陽性HIV-1感染者由来のHIV-1 TAFTIPSI 特異的CTLクローンの樹立を行った。そのCTLクローンに発現するTCR 遺伝子の同定をわれわれが樹立した方法を用いて行った。

(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については、すべてインフォームドコンセントをとり、本人の承諾なく実験に使用・遺伝子解析を行わない。本研究における遺伝子解析の実施の許可については、当大学のヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会にて承認済みである。また、検体提供者の個人情報はネットワークに接続されていない個人情報管理専用のパソコンで厳重に管理され、そのパソコンは研究室内でも限られた者しか利用できないようパスワードで使用が制限されている。臍帯血単核球は理化学研究所（理研）から購入し、この臍帯血単核球は理研がすでに提供者に対してインフォームドコンセントを行い、さらに匿名化されているため、本研究によって提供者に危険を及ぼすことは無い。動物実験についてはすでに当大学の動物実験・倫理審査委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

1) HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立

レンチウイルス発現システムを用いてHLA-B*5101陽性ヒト造血幹細胞の樹立を試みた結果、約5%のHLA-B*51陰性ヒト造血幹細胞においてHLA-B*51の発現を検出した (Fig 1とFig 2)。

2) HIV-1 TAFTIPSI 特異的CTLに発現するTCR 遺伝子の解析

6人のHLA-B*5101陽性HIV-1感染者からHIV-1 TAFTIPSI 特異的CTLクローンをそれぞれ樹立し、TCR 遺伝子の解析を行った結果、感染者間で高い類似性を示すTCRが発現していることを明らかとした (Table 1、Table 2とFig 3)。さらにこれらのTCR発現レンチウイルスベクターを作製し、その発現をTCR欠損細胞株表面上において検出した (Fig 4)。

D. 考察

1) HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立

レンチウイルス発現システムを用いてHLA-B*5101陽性ヒト造血幹細胞の樹立を試みたが、レンチウイルスの感染効率が約5%と低く、このHLA-B*5101陽性ヒト造血幹細胞をNOK/B51Tgマウスに移植したとしてもHLA-B*51を発現するT細胞を検出することは出来なかった (佐藤データ)。そのため、レンチウイルスの感染効率を向上させるために、より高濃度のレンチウイルスの感染あるいはサイトカイン等によるヒト造血幹細胞の刺激が必要であると考えられる。

2) HIV-1 TAFTIPSI 特異的CTLに発現するTCR 遺伝子の解析

6人のHLA-B*5101陽性HIV-1感染者から樹立したHIV-1 TAFTIPSI 特異的CTLクローンに発現するTCR 遺伝子の解析を行った結果、感染者間で高い類似性を示すTCRが発現していることを明らかとし、さらにレンチウイルス発現システムを用いてこれらのTCR発現をTCR欠損細胞株表面上に発現させた。このTCR発現システムを利用し、NOK/B51TgマウスにおけるHIV-1逃避変異の誘導を検討する。

E. 結論

1) HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立

HIV-1 逃避変異誘導メカニズムを NOK/B51Tg マウスで解析を行うために、レンチウイルス発現システムを用いて HLA が適合する HLA-B*5101 陽性ヒト造血幹細胞の樹立を行った。しかしながら、その感染効率が低かったために、NOK/B51Tg マウスにおいて HLA-B*51 陽性 T 細胞を検出することが出来なかった。そのため HIV-1 逃避変異誘導メカニズムの解明までに至らなかった。

2) HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL に発現する TCR 遺伝子の解析

6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から樹立した HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL クローンに発現する TCR 遺伝子は、クローン間

ならびに感染者間において非常に高い類似性を示すことを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

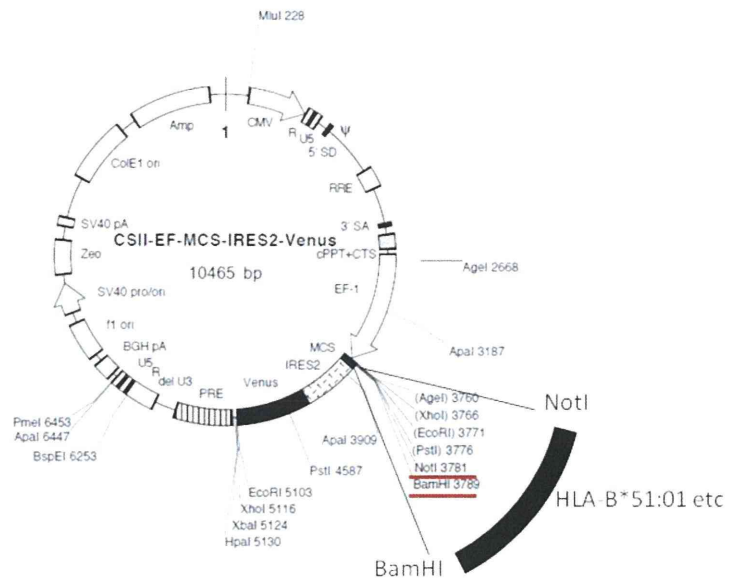
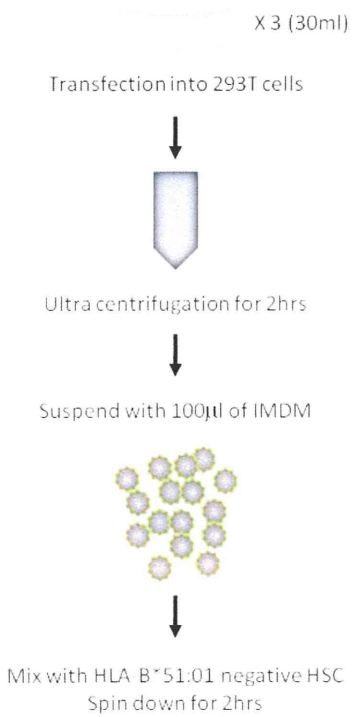


Fig 1. Construction of lenti-virus vector encoding HLA*B51:01

Method



After 48 hrs post-infection

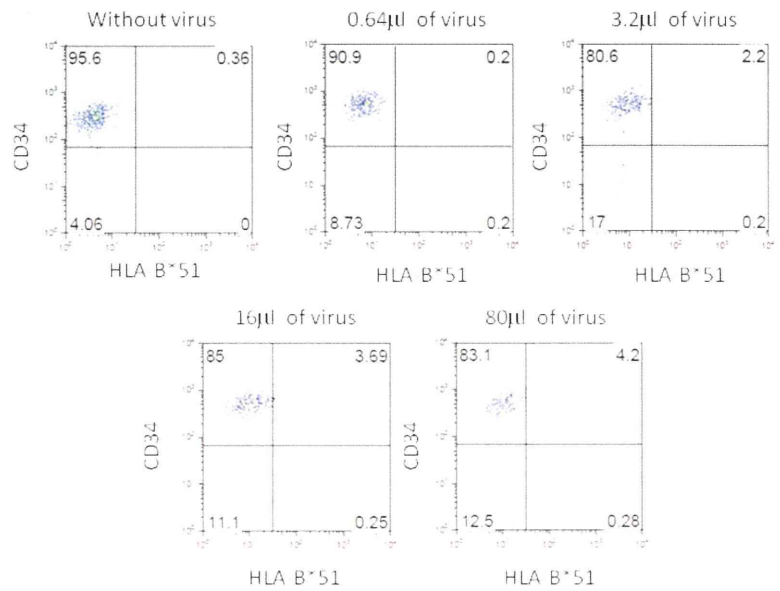


Fig.2 A method to produce lenti-virus and the infection efficiency in hematopoietic stem cells

Table 1. Clinical information and pol283 mutational analysis in HLA-B*51:01 positive HIV-1 infected patients.

Patient ID	CD4 count (cells/ μ l)	Viral load (copies/ μ l)	Therapy	Sampling date	Pol283-8X mutation
KI-051	911	63	-	2002.7.25	I
KI-021	646	<50	-	2005.1.27	V
KI-250	514	<40	+	2010.7.9	V
KI-127	578	800	-	2005.1.27	T
KI-391	153	840000	-	2005.12.28	L
KI-007	427	33000	-	2001.6.14	R

Table 2. Analysis of TCR repertoire in HIV-1 pol283-8I-specific CTL clones obtained from HLA-B*51:01 positive HIV-1 infected individuals

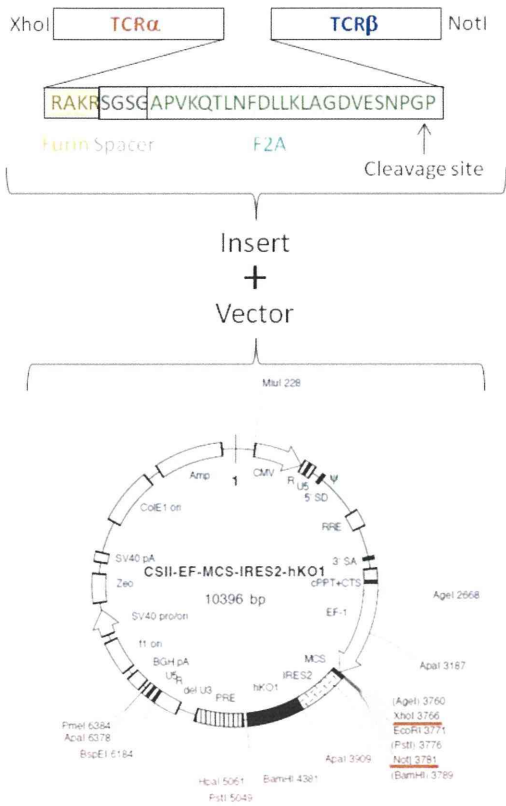
Patient ID	TCR alpha chain			TCR beta chain				Name of CTL clone
	V α	J α	CDR3	V β	D β	J β	CDR3	
KI-051	V17	J22	CATDDDSARQLTF	V7-3	D2	J2-2	CASSLTGGGELFF	1A4(5), 1B3(5), 1G2(5), 2A8(5)
	V8-2	J13	CVVSERAGGYQKVTF	V24-1	D1	J2-1	CATSDLQGVRGVNEQFF	2B5(5), 2C6(5), 2D6(5), 3D1(5)
KI-021	V17	J22	CATDDDSARQLTF	V7-3	D2	J2-2	CASSLTGGGELFF	cl8, cl11, cl15, cl16, cl18
KI-250	V17	J22	CATDDDSARQLTF	V7-3	D1	J1-4	CASSLTGGGKLEFF	32(5), 35(5), 42(5)
KI-127	V17	J22	CATDDDSARQLTF	V7-3	D1	J1-4	CASSLTGGGKLEFF	cl2, cl3, cl6, cl7
KI-391	V17	J5	CATDLAGRRLTF	V7-3	D1	J1-3	CASSLTGGNTIYF	A1, A8, B12, E1, G11, H9
KI-007	V8-6	J56	CAVSLGGANSKLETF	V27	D2	J2-7	CASSPGRGYEQYF	B7, C6, D4

Patient ID	Clone name	V α -J α	CDR3 α	V β -D β -J β	CDR3 β
KI-051	1A4(5), 1B3(5), 1G2(5), 2A8(5)	V17-J22	C A T D D D S A R Q - L T F	V7-3-D2-J2-2	C A S S L T G G G E L F F
KI-021	cl8, cl11, cl15, cl16, cl18	V17-J22	C A T D D D S A R Q - L T F	V7-3-D2-J2-2	C A S S L T G G G E L F F
KI-250	32(5), 35(5), 42(5)	V17-J22	C A T D D D S A R Q - L T F	V7-3-D1-J1-4	C A S S L T G G G K L F F
KI-127	cl2, cl3, cl6, cl7	V17-J22	C A T D D D S A R Q - L T F	V7-3-D1-J1-4	C A S S L T G G G K L F F
KI-391	A1, A8, B12, E1, G11, H9	V17-J5	C A T D E A G R R A - L T F	V7-3-D1-J1-3	C A S S L T G G N T I Y F
KI-007	B7, C6, D4	V8-6-J56	C A V S E G G A N S K L T F	V27-D2-J2-7	C A S S P G R G Y E Q Y F

Fig 3. Conservation of TCRs in HIV-1 pol283-8 specific CTL clones among HLA-B*51:01 positive HIV-1 infected individuals

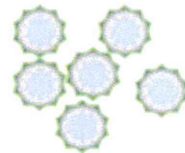
Construction

(TCR α/β genes in HIV-1 pol283 specific CTL)



Method

Culture medium from transfected 293T cells



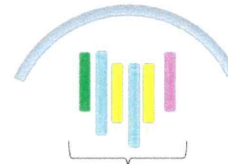
Mix with TG40 cells (TCR deficient cell line)
Spin down 2hrs

Culture 1 week

Sort hKO1 positive cells

Result

In TG40 cell



TCR α/β transduction

TCR
 α
 β

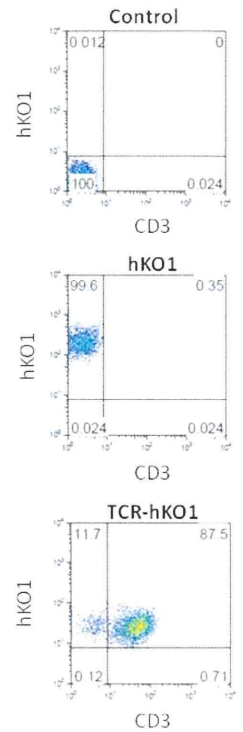
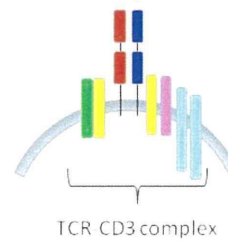


Fig 4. Construction of lenti-virus TCR α/β expression vector

HLA 発現ヒト化マウスを用いた HIV 感染モデルにおける ヒト T 細胞の免疫応答の解析

研究分担者：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。我々は以前からマウス生体内にヒト免疫系を構築したヒト化マウスを用いてHIV感染実験系の確立を目指している。しかし高度免疫不全マウスにヒトCD34⁺細胞を移植したヒト化マウスで構築されるヒトCD8⁺T細胞では、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、これまでのヒト化マウスではHIV-1 に対する免疫応答が誘導できないことを我々は明らかにしている。そこで、ヒトCD8⁺T細胞の免疫応答が誘導できるヒト化マウスを作製するため、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。さらに、このマウスにおけるヒトCD8⁺T細胞のエフェクター機能の誘導について解析した。ヒト化NOK/B51TgマウスにおけるヒトCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、ヒトCD34⁺細胞を移植後 10 週目から確認できた。このヒト化NOK/B51TgマウスにHIV-1(NL4-3 株)を腹腔内投与で感染させ、ヒトT細胞の割合を解析した結果、ヒトCD4⁺T細胞の割合は非感染群に比べ感染 2 週目から有意に減少した。血漿中のウイルス量は感染 2 週目から検出でき、その後もウイルス量は維持された。HIV-1 感染後の末梢血中におけるヒトCD4⁺T細胞の表現型を調べた結果、非感染群のそれと比べ、central memory subset の割合に有意な差が見られた。またヒトCD8⁺T細胞の表現型を調べた結果、非感染群のそれと比べ、late effector memory と effector subsets の割合に有意な増加が見られた。この傾向は、HIV-1 感染ヒト化NOKマウスでは見られなかった。以上の結果は、ヒト化NOK/B51TgマウスではHIV-1 感染によってヒトCD8⁺T細胞のエフェクター機能が誘導される可能性を示し、HIV-1 感染に対するヒト免疫応答の解析に役立つヒト化マウスモデルとなり得ることが期待される。

A. 研究目的

長期にわたってHIV-1 の増殖を抑えるためには、HIV-1 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-1感染者から非常に強いHIV-1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-1 感染における免疫応答の解析が困難である理由の1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、高度免疫不全マウス(NOKマウス)を用いてヒト化マウスを作製し、HIV-1 感染細胞の排除に重要なヒトT細胞の分化・機能を解析した。その結果、ヒト化NOKマウス内で再構成されたヒトCD8⁺T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CD8⁺T細胞に比べ低いということを明らかにした。さらに、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CD8⁺T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。

そこで本年度は、ヒトCD8⁺T細胞の分化・機能が誘導されると期待できるHLA-B*51:01 を導入したヒト化NOK/B51Tgマウスを用いてHIV-1 感染モデルを構築し、HIV-1 感染に対するヒトCD8⁺T細胞の分化・機能を解析するため、ヒトT細胞の表現型解析を行った。今回の研究で作製した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える。また、CTLの免疫圧から逃避するHIV-1 の逃避メカニズム等を解析できるモデルとなり得る点が優れており、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。

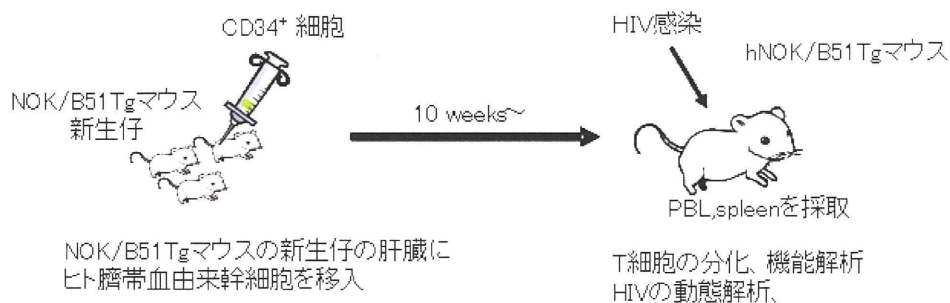
B. 研究方法

NOK/B51Tgマウスは、NOD/SCID/B51TgマウスとNOKマウスの掛け合わせにより樹立した。臍帯血単核球からMACS細胞分離法を用いて分離されたヒトCD34⁺細胞は、NOK/B51Tgマウスの新生仔の肝臓へ移植した。移植10週後、ヒト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、フローサイトメトリーを用いて解析した。(図1) 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、系時的に末梢血から血漿を分離し、そこに含まれるHIV-1 量をリアルタイム定量PCR法で解析した。感染が確認されたマウスのヒトT細胞の系時的な割合と細胞表現分子の発現を、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・コンセントを行ったものであり、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

最初に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マウスの脾細胞を用いて、HLA-B51 の発現を確認した(図2A)。ヒトCD34⁺細胞を移植したNOK/B51Tgマウスでは、移植後10週目の末梢血中にヒトCD19⁺B細胞およびCD3⁺ヒトT細胞が確認でき(図2B)、さらにヒトCD3⁺T細胞はヒトCD4⁺T細胞およびヒトCD8⁺T細胞のそれぞれの集団が確認でき、hNOK/B51Tgマウスを用いたヒト化マウスが構築できた(図2C)。ヒト化NOK/B51TgマウスにHIV-1 を感染させると、感染 2 週間後からヒトCD4⁺T細胞の割合が減少した(図3A)。また、感染マウスにおけるCD4/CD8 細胞比率の割合が非感染マウスのそれと比べ、感染 2 週目から有意に減少した(図 3B)。 HIV-1 感染ヒト化NOK/B51Tgマウスの血漿を系時的に採取し、HIV-1 量を解析した結果、感染 2 週目から検出され(図4A)、その後もウイルス量は維持された(図4B)。 HIV-1 感染におけるヒトCD4⁺T細胞への影響を解析するため、ヒトCD4⁺T細胞の分化マーカーを用いた表現型解析を行った。感染マウス郡のcentral memory CD4⁺T細胞の割合は、非感染郡のそれと比べ有意な差が見られた(図5)。また、HIV-1 感染におけるヒトCD8⁺T細胞の分化が

誘導されるかを解析するため、ヒトCD8⁺T細胞の分化マーカーを用いた表現型解析を行った。図6で示すように、非感染郡のhNOK/B51TgマウスおよびhNOKマウスでは、late effector memory と effector CD8⁺T細胞の割合は数%程度であった。一方、HIV-1 感染hNOK/B51Tgマウスでは、感染4および6週目において、late effector memory と effector CD8⁺T細胞の割合が有意に高くなった。HIV-1 感染 hNOK マウスでは、late effector memory と effector CD8⁺T細胞の割合に変化は無かった。

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、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が必要となった。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 $\alpha 3$ 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。我々が作製したヒト化hNOK/B51Tgマウスを用いたHIV-1 感染モデルでは、エフェクターCD8⁺T細胞が誘導され、HIV-1 感染に対する免疫応答を解析することができると示唆される。近年、HLA-A*02:01 を導入したヒト化マウスの研究においても、ヒトCD8⁺T細胞の抗原特異的な細胞傷害活性が見られる報告がされている。我々が作成したHLA発現ヒト化マウスは、ヒトのHIV-1 感染に対する免疫応答の解析、さらにはAIDSワクチン治療の基礎的知見を得るための*in vivo* 実験モデルとして今後が期待できる。

E. 結論

今回の研究で我々は、ヒト幹細胞を移植して作製したヒト化NOK/B51TgマウスにHIV-1 を感染させると、HIV-1 感染者と類似したヒトT細胞の減少とエフェクターCD8⁺T細胞の誘導に成功した。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な細胞傷害活性が確認されており、HIV-1 感染においてもヒトCD8⁺T細胞のHIV-1 に対する抗原特異的な細胞傷害活性を今後、解析していきたい。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できると期待する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

なし。

2) 学会発表

Yoshinori Sato, Sayaka Nagata, and Masafumi Takiguchi. Elicitation of HIV-1 specific effector CD8⁺ T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice infected with HIV-1. HIV-1 vaccine (x5), Keystone Symposia Conference (Keystone, Colorado) 2012年3月 (ポスター発表)

Sato Y., Takiguchi M. Phenotypic analysis of reconstituted human T cells in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. 第40回日本免疫学会学術集会 (千葉) 2011年11月 (口頭発表)

Sato Y., Nagata S., Takiguchi M. Elicitation of human effector CD8⁺ T cells in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. 12th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto) 2011年10月 (ポスター発表)

Sato Y., Nagata S., Takiguchi M. Selection of HIV-1 mutants in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. IUMS 2011-XV International Congress of Virology (Sapporo) 2011年9月 (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。

図2

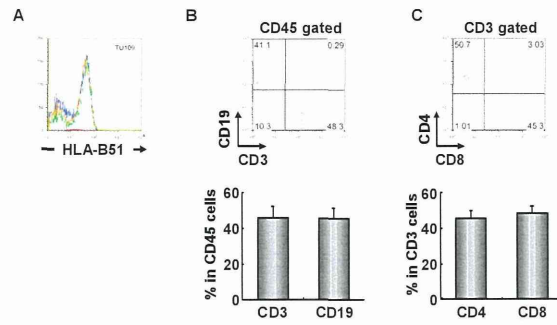
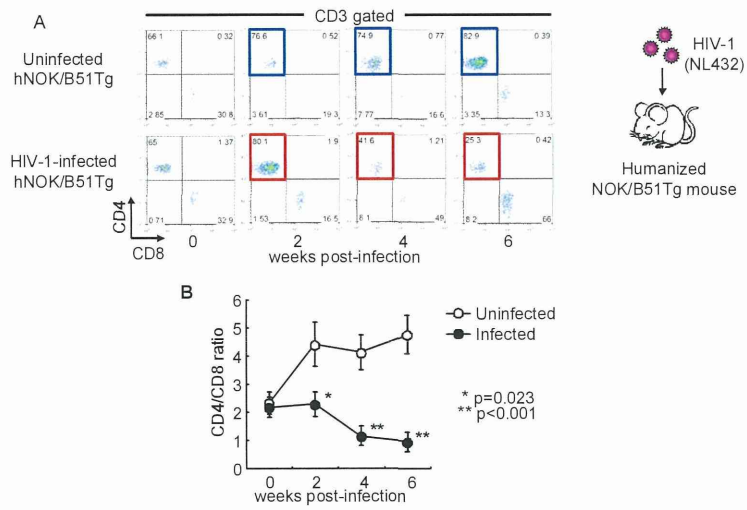
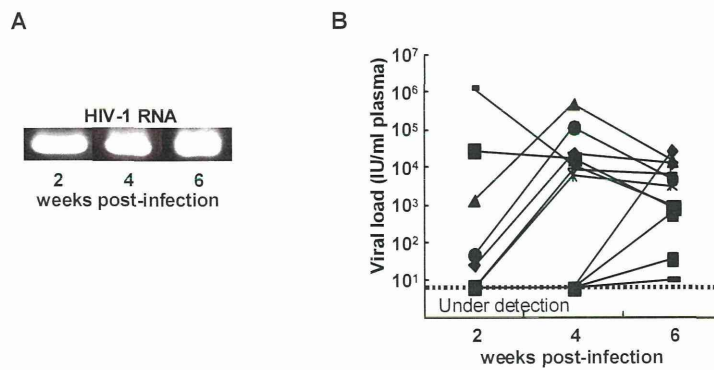


図3



HIV感染したhNOK/B51Tgマウスでは、感染2週目からCD4⁺T細胞の割合が有意に減少した。

図4



HIV感染したhNOK/B51Tgマウスでは、感染2週目からプラズマ中にHIV-1が検出でき、その後もウイルス量が維持された。