

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590481

研究課題名(和文) ヒト化マウス薬剤評価系を用いた新規エイズ治療薬の開発とHAARTの改善・強化

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic for AIDS using humanized mouse model and improvement of HAART

研究代表者

大隈 和 (Okuma, Kazu)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長

研究者番号：80315085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：エイズ/ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の標準的な治療法であるHAARTを補完あるいは必要に応じて代替する新規治療薬の開発を目的とした。重度免疫不全マウスにヒト臍帯血由来の造血幹細胞を移植して、ヒト免疫機構を構築したヒト化マウスを作製した後、このマウスにHIV-1を感染させて感染モデル/薬剤評価系を構築した。この感染マウスを用いて、免疫刺激分子OX40LやHIV-1受容体を発現する組換え水疱性口内炎ウイルスVSVの治療効果を評価したところ一定の効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the standard therapy for AIDS/human immunodeficiency virus (HIV) infection, HAART, recombinant vesicular stomatitis viruses (rVSVs) expressing HIV-1 receptors and/or OX40L were generated as candidates for novel drugs. In vitro and in immunodeficient mice transplanted with hematopoietic stem cells from human cord blood (humanized mice) and then infected by HIV-1, the rVSVs could inhibit HIV-1 infection, indicating that they have a therapeutic potential for AIDS/HIV-1 infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ヒト免疫不全ウイルス1型 エイズ 新規治療薬 ヒト化マウス 感染実験動物モデル

1. 研究開始当初の背景

エイズ/ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症の制圧は、本邦のみならず世界中で多くの人々を苦しめている喫緊の課題である。エイズ/HIV 感染症に対しては、現在逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤などの多剤併用療法 HAART が行われている。HAART は、HIV の感染増殖を顕著に抑制しエイズ発症を予防することができるため、感染者の生存率や生活の質を大幅に改善する極めて有効な治療法として普及している。

しかし、HAART には、いくつかの重大な問題点も指摘されている。主要なものとして、(1) HIV の新たな感染増殖を抑制できるが、既に感染している細胞を標的にしないため、潜伏感染細胞 (リザーバー細胞) を効率良く駆逐できず、速やかに HIV を完全に体内から排除するのが困難であること、(2) 治療開始後は一生涯確実に服薬しなければならず患者の負担が大きいこと、(3) 種々の多剤耐性 (MDR) ウイルス株が出現して治療効果が減弱すること、(4) 長期服薬による肝毒性や乳酸アシドーシスなどの重篤な副作用が出現すること、(5) 高額な医療費が必要となることが挙げられる。

そこでこれらの問題点を解決し、より有効かつ安全で低コストの HAART の補完療法の確立が望まれている。そのためには、従来の薬剤とは作用機序の異なった新たなエイズ医薬品の早急な開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト免疫機構を構築したヒト化マウスの HIV-1 感染モデルを用いて、エイズ/HIV の標準的な治療法である HAART を補完あるいは必要に応じて代替する新規治療薬を開発することである。

HAART の問題点には、「ウイルス不完全排除」、「効果を持続させるための生涯にわたる服薬の必要性」、「治療困難な多剤耐性ウイルスの出現」などが挙げられるが、本研究では HAART 薬剤との併用でこれらの問題点を克服/改善し、より有用で高い治療効果を示す新規薬剤の開発に焦点を絞る。そのために、種々の HIV-1 株 (実験室適応株、臨床分離株) をヒト化マウスに感染させた動物モデル/薬剤評価系を用いて、前臨床試験としての *in vivo* の感染実験を重点的に行う。

3. 研究の方法

ヒト化マウスは、ヒトの血液細胞を免疫不全マウス系統に移植して作製されたキメラマウスであり、体内にヒト免疫機構を構築する。そのため、このマウス内では種々の HIV 株がヒトの CD4 陽性細胞に感染することができ、増殖後その細胞を枯渇させる。このことから、ヒト化マウスは、HIV 感染動物モデルとして最適であり、前臨床試験の薬剤評価

系としての応用も可能である。当該研究では、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞を移植したヒト化マウスを作製する。HIV-1 を感染させた本ヒト化マウスでは HIV-1 の急性感染および慢性持続感染を長期的に観察できるため、極めて有用性が高い。

そこで、まず重度免疫不全マウスにヒト臍帯血由来の造血幹細胞を移植してヒト化マウスを作製した後、このマウスに HIV-1 の実験室適応株や臨床分離株を感染させて、種々の HIV-1 感染モデルを構築する。次にこの感染マウスに新規治療薬候補を治療的に投与して、それらの実効性を評価し、新規エイズ医薬品候補としての開発を遂行する。また、それらの薬剤候補に HAART 薬剤を併用して、HAART が抱える問題点を解決しうる新たな治療法を確立し、HAART 改善・強化に向けた研究を推し進める。

具体的には、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を重度免疫不全マウスである NOD/SCID/IL2R γ ^{null} (NOG マウス) などに移植して作製されたヒト化マウスに、HIV-1 実験室適応株 (X4 株、R5 株) や臨床分離株 (野生株、MDR ウイルス株) を接種し、HIV-1 の急性・慢性感染を成立させる。この感染マウスに、新規治療薬候補である「免疫刺激分子 OX40L および HIV-1 受容体を発現する組換え水疱性口内炎ウイルス VSV」、「HIV-1 の細胞内侵入を阻害する CXCR4 アンタゴニスト (KRH-1636、その誘導体 KRH-3955)」などを投与する。その後、経時的に ELISA や定量 PCR で血中の p24 やウイルスコピー数などを測定することで、感染抑制効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 新規医薬品候補として我々が創製した、VSV G 遺伝子を欠損させ、その代わりに HIV-1 受容体である CD4、CXCR4 あるいは CCR5、及び活性化 T 細胞免疫刺激分子 OX40L をコードする遺伝子をゲノムに組み込んで発現させた組換え VSV の実効性を評価した。まず、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を重度免疫不全マウス (NOG マウス) に移植し、ヒト化 NOG マウスを構築した。このヒト化マウスに HIV-1 実験室適応野生株 (X4 株あるいは R5 株) を感染させて、感染モデルを作製した。その後、このモデルマウスに上記組換え VSV を接種したところ、CD4/CXCR4 あるいは CCR5 発現組換え VSV と同様に、効果は限定的であるものの、コントロール (組換え VSV 未接種群) に比べ血漿中の HIV-1 ウイルス量、p24 量が低下し感染増殖を抑制することが分かった。また、実験観察期間の最終日に脾細胞を採取し、HIV-1 プロウイルス量を測定したところ、同様の抑制効果が認められた。さらに興味深いことに、CD4/CCR5/OX40L 発現組換え VSV に関しては、CD4/CCR5 発現組換え VSV と比較して、R5 株感染に対しより長期的な抑制効

果を示し、OX40L発現により治療効果が増強することが分かった。

(2)新規医薬品候補として、ゲノム中のG遺伝子を欠損させ、その代わりにHIV-1受容体であるヒトCD4、CXCR4、及びCCR5をコードする3遺伝子を組み込んで発現させた組換えVSVを創製した。この組換えウイルスは、*in vitro*において、HIV-1実験室適応野生株のX4株或いはR5株のエンベロープ蛋白を発現させた細胞のどちらにも特異的に感染することが分かった。

また、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞を重度免疫不全マウスであるNOGマウスに移植し、ヒト化NOGマウスを構築する方法の最適化を検討した。特に、ヒト臍帯血からの造血幹細胞の精製方法や、NOGマウスに細胞を移植する前の放射線照射の必要性の有無について検討した。その結果、造血幹細胞に混在する赤血球を効率良く除去し、造血幹細胞の回収率や精製度を向上させることができた。また放射線照射の必要性については、放射線照射により造血幹細胞のマウスへの生着率はやや向上するようであるが、長期的な観察には適していない場合があり、必ずしも必要ではないことが分かった。

(3)新規医薬品候補として、HIV-1感染細胞を標的化する、ゲノム中のG遺伝子を欠損しその代わりにHIV-1受容体であるヒトCD4、CXCR4、CCR5をコードする遺伝子を組み込んで発現させた組換えVSV(VSV-G-CC4、VSV-G-CC5、VSV-G-CC54)を創製して準備した。OX40Lを追加発現させて標的効率を増強させた組換えVSVも準備した。これらの組換えVSVは、*in vitro*において、HIV-1実験室適応野生株のX4株、R5株、あるいはその両方のエンベロープ蛋白を発現させた細胞にそれぞれ特異的に感染し、殺傷することが分かった。

また、HIV-1の臨床分離株(薬剤耐性株を含む)を入手し、増殖後調製した。これらのHIV-1に対する組換えVSVの感染抑制効果を検討している。

さらに、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞を重度免疫不全マウスであるNOGマウス、あるいはNOD/SCID/JAK3^{null}(NOJマウス)に移植し、ヒト化マウスを構築する方法を最適化した。この最適化された方法でヒト化マウスを構築し、臨床分離株を含めた種々のHIV-1感染モデルを作製し、上記の組換えVSVの*in vivo*における治療効果を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

1. Okuma K, Watanabe S, Tanaka Y, Yamamoto N, Rose JK, Hamaguchi I. Recombinant vesicular stomatitis viruses targeting HIV-1-infected cells control HIV-1 infection in a humanized mouse model. American Society for Virology, 31st Annual Meeting. July 21~25, 2012. Madison, WI, U.S.A.
2. Okuma K, Tanaka R, Hamaguchi I, Rose JK, Tanaka Y. Development of a recombinant vesicular stomatitis virus that targets CCR5-tropic HIV-1-infected cells and inhibits HIV-1 infection. American Society for Virology, 30th Annual Meeting. July 16~20, 2011. Minneapolis, MN, U.S.A.
3. 大隈 和, 深川耕次, 高馬卓也, 渡辺 哲, 田中勇悦, 山本直樹, 浜口 功. ヒト化NOGマウスを用いたR5 HIV-1標的組換えVSVの薬効性評価. 第25回日本エイズ学会学術集会. 2011年11月30日~12月2日. 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

国立感染症研究所ホームページ
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-safety/578-safety3.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者

大隈 和 (OKUMA KAZU)
国立感染症研究所・血液・安全性研究部・
室長
研究者番号：80315085

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
田中 勇悦 (TANAKA YUETSU)
琉球大学・免疫学講座・教授
研究者番号：30163588