

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700513

研究課題名（和文）HLA 発現ヒト免疫構築マウスを用いた HIV 感染モデルマウスの作製と免疫応答の解析

研究課題名（英文）Establishment of HIV-1-infected mouse model using HLA-expressed humanized mice, and the analysis of immune response in the mice.

研究代表者

佐藤 義則（SATO YOSHINORI）

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

研究者番号：90455402

研究成果の概要（和文）：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）を作製し、そのマウスを用いた *in vivo* の HIV 感染実験系の確立を目指した。ヒト化マウスに HIV-1 を感染後、血中から HIV-1 を検出でき、さらに CD4T 細胞の減少を確認できた。また、感染細胞の排除に重要な役割を担うエフェクター CD8T 細胞の誘導を確認できた。以上の結果は、ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染に対する免疫応答の解析が可能となることを示した。

研究成果の概要（英文）：A small animal model for the analysis of HIV-1 infection has not been established yet. To establish the animal model, we generated new humanized mice and investigated the responses of human T cells against HIV-1 in the mice. HIV-1 was detected in plasma of the mice after HIV-1 infection and the number of CD4 T cells in the mice decreased. Also, effector CD8 T cells which are important for the elimination of HIV-1-infected cells were induced in the mice after HIV-1 infection. These results indicate that a humanized mouse model will be available for the analysis of HIV-1 infection.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ヒト化マウス、HIV-1 感染症、ヒト T 細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）はサル免疫不全ウイルス（SIV）に由来すると考えられているが、サルに HIV を接種しても後天性免疫不全症候群（エイズ）を引き起こさない事実はよく知られている。HIV と SIV のキメラウイルスである SHIV をもちいた HIV 感染モデルも開発されたが、*in vivo* による継代を経ないとエイズを発症しない等の問題が生じ、ヒトにおけるエイズの病態とは一致しな

い部分がある。また、サルやチンパンジーの飼育には大掛かりな施設、特殊な設備、高額な飼育費を要する。そこで、近年、感染症に対する薬剤やワクチン開発研究におけるヒトの免疫応答を解析するため、ヒト免疫構築マウスの樹立が求められてきた。これまでにヒト免疫構築マウスを樹立する研究では、おもに高度免疫不全マウスである NOD/SCID/ common γ 鎖ノックアウト (γ c KO) マウスにヒト造血幹細胞を移植するモデル

が検討されてきた。NOD/SCID/ γc KO マウスは、NOD マウス（糖尿病マウス）と SCID マウス（重症複合免疫不全症マウス）を交配させ、さらにリンパ球の分化・増殖に必須であるサイトカイン受容体の共通レセプターである common γ 鎖ノックアウトマウスを交配させた高度免疫不全マウスである。このマウスは T 細胞、B 細胞および NK 細胞の消失、マクロファージ活性および補体活性の減退が認められ、異種移植実験を行う際のモデルマウスとして有用であった。しかしながら、NOD/SCID/ γc KO マウスはヒト造血幹細胞を移植した際、ヒトの B 細胞や NK 細胞等への分化は誘導されるが、HIV-1 感染細胞の排除に重要である抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導ができるか不明であった。そこで我々は、ヒト免疫構築マウスにおけるヒト T 細胞の分化と機能解析を詳細に行うため、リンパ球の分化・増殖に必須であるサイトカイン受容体の共通レセプターである common γ 鎖からのシグナル伝達経路の下流に位置する Jak3 キナーゼを欠損させた Jak3 ノックアウトマウスと NOD/SCID マウスを交配させて、高度免疫不全マウスである NOD/SCID/Jak3 ノックアウトマウス (NOK マウス) を作成し、さらにこのマウスにヒト造血幹細胞を移植して再構築されたヒト T 細胞を解析した。その結果、CTL の役割を担う CD8 T 細胞のエフェクター細胞への分化と抗原特異的免疫応答が NOK マウスでは誘導できないことを明らかにした (Sato Y., et al., PLoS ONE, 2010)。そこで我々は、抗原特異的 CTL の誘導が可能と期待される、ヒト白血球抗原 (HLA) を組み込んだヒト免疫構築マウスの樹立を行うことにした。

2. 研究の目的

HIV 感染において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の役割が重要であることはよく知られている。また、抗原特異的 CTL の活性化とウイルス感染細胞の認識は HLA 依存的に制御されるが、HIV 感染者が持つ HLA ハプロタイプによってエイズ発症までの進行速度が異なることが報告され (O'Brien SJ et al., Trends Mol. Med., 2001)、長期にわたってウイルス増殖を抑えるためには HIV 特異的 CTL の働きが重要であることが示唆された。当研究室では、日本人において高頻度に認められエイズ発症遅延との関連が報告された HLA-B*51

遺伝子を持つ長期エイズ未発症者から、非常に強い細胞傷害活性および HIV 増殖抑制能を示す CTL の単離に成功している (Tomiyama H., et al., J. Immunol., 2005)。また、HIV-1 は T 細胞が認識するエピトープ部位を変異させることで免疫応答から逃避することが知られている。当研究室では HIV の変異獲得に及ぼす HLA クラス I 分子の役割、すなわち HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の役割を世界 9 ヶ所の異なったコホートから解析した結果、逃避変異と HLA-B*51 の間に強い相関を見出した (Kawashima Y., et al. Nature, 2009)。これらの結果は、HIV-1 は HLA 抗原に順応するように変異し進化していることを示し、ウイルスが宿主の免疫に順応するように進化していることを考慮したワクチン開発などの必要性があることを示唆している。しかし、小動物を用いた HIV 感染実験系が確立されていないため、ワクチンや免疫細胞治療の開発をする際に重要となる長期 HIV 感染におけるヒト免疫応答およびウイルス変異機序の解析は困難であった。そこで我々は、HLA-B*51 発現ヒト免疫構築マウス (ヒト免疫構築 NOK/B51Tg マウス) を作製し、このヒト免疫構築マウスにおいて、HIV-1 感染細胞除去に重要な HIV-1 特異的 CTL の誘導と HIV-1 の免疫逃避変異について解析する。ヒト免疫構築マウスをもちいた研究は既に国内外で始まっているが、本研究で解析する HLA-B*51 発現ヒト免疫構築マウスでは、これまでのモデルマウスで誘導できなかった抗原特異的免疫応答について解析できることが期待される。また HLA ハプロタイプとウイルス進化の相関を動物モデルにおいて検討できる点に特色及び独創性があると考えている。

3. 研究の方法

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。ヒト化マウスを作製するため、臍帯血単核球から MACS を用いてヒト CD34⁺ 細胞を分離し、NOK または NOK/B51Tg 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。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 CD4T 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

パ球的分化マーカー、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(NL43株)を腹腔から感染させ、その後、系時的に末梢血を採取し、血清中のHIV-1量は定量的リアルタイムPCR法を用いて解析し、さらにHIV-1ゲノム塩基配列も解析した。また、ヒトT細胞の割合と表現形はフローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究成果

NOK/B51Tgマウスは、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。ヒトCD34⁺細胞を移植したNOKおよびNOK/B51Tgマウスでは、移植10週間後の末梢血中にヒトB細胞(CD19⁺)およびヒトT細胞(CD3⁺)が認められた。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。

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。HIV-1感染ヒト化NOK/B51Tgマウスの血清を系時的に採取し、HIV-RNAの検出を行った。血清中のHIV-RNAは、感染2週間後または4週間後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。さらに、HIV感染6週間後のHIV感染ヒト化NOK/B51Tgマウスから分離したHIV-RNAでは、7匹中4匹でHIV-RNAの遺伝子変異が見つかった。一方、NOKマウス(B51-)では感染したHIV-1のHIV-RNAの配列に遺伝子変異は見つからなかった。

NOKおよびNOK/B51Tgマウスの末梢血中のヒトCD8⁺T細胞では、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。ヒトCD4T細胞では、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。

次にHIV-1感染後、ヒト化NOD/SCID/B51TgマウスのヒトCD8⁺T細胞の表現型を解析した結果、感染4週および6週間後の末梢血中にCD27^{low}CD28⁻CD45RA^{+/-}CCR7⁻(Late effector memory)およびCD27⁻CD28⁻CD45RA^{+/-}CCR7⁻(Effector)の各サブセットが確認できた。さらにこのヒトCD8⁺T細胞中には、エフェクター機能をもつCXCR1⁺CX3CR1⁺の集団がみられた。一方、HIV-1感染NOKマウスからは、エフェクター機能をもつこれらの集団は検出されなかった。これらの結果は、NOK/B51Tgマウスの生体内で、HIV-1感染細胞を排除する役割を持つエフェクターCD8⁺T細胞が誘導されたことを強く示唆した。

今までヒトCD34⁺細胞のみを移植したヒト化マウスでは、ウイルス感染に対するヒトエフェクターCD8⁺T細胞の誘導が困難であったが、今回の研究では、HLAを発現させたヒト化マウスでそれが可能であることを示し、さらに改良の余地はあるものの、ヒト化マウスを用いたHIV-1に対する免疫応答の解析が将来可能となることが期待される。

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2件)

- ① Sato Y., Nagata S., Takiguchi M., Effective elicitation of human effector CD8⁺T Cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice after infection with HIV-1. PLoS One, 2012; 7(8), e42776. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0042776.
- ② Sun X., Saito M., Sato Y., et al., Unbiased analysis of TCR α/β chains at the single-cell level in human CD8⁺T-cell subsets. PLoS One, 2012; 7(7): e40386. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0040386.

[学会発表] (計7件)

- ① Yoshinori Sato, et al., Elicitation of human effector CD8⁺T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice after infection with HIV-1. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (Kobe International

Conference Center, Kobe), 2012 年 12 月 5 日～7 日

- ② Yoshinori Sato, et al., Analysis of human CD8⁺ T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice after infection with HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto), 2012 年 10 月 24 日～26 日
- ③ 佐藤義則, ヒト化マウスを用いた HIV 感染モデルマウスの作製 グローバル COE プログラム「エイズ制圧を目指した国際教育研究拠点」、熊本大学エイズ学研究センターグローバル COE 公開シンポジウム (大手町ファーストスクエアカンファレンス、東京)、2012 年 8 月 31 日
- ④ Yoshinori Sato, et al., Elicitation of HIV-1-specific effector CD8⁺ T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice infected with HIV-1. HIV vaccines(x5), Keystone Symposia Conference (Keystone, Colorado, USA), 2012 年 3 月 21 日～26 日
- ⑤ Yoshinori Sato, et al., 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 (幕張メッセ、千葉)、2011 年 11 月 27 日～29 日
- ⑥ Yoshinori Sato, et al., 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 (Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto), 2011 年 10 月 19 日～21 日
- ⑦ Yoshinori Sato, et al., Selection of HIV-1 mutants in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice. IUMS 2011-XV International Congress of Virology (Sapporo Convention Center, Sapporo), 2011 年 9 月 11～16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 義則 (SATO YOSHINORI)
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
研究者番号 : 90455402

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
永田 紗矢香 (NAGATA SAYAKA)
熊本大学・エイズ学研究センター・
技術補佐員
研究者番号 : なし