

令和元年5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06811

研究課題名(和文) ヒト化マウスモデルにおけるHIV-1感染病態への粘膜局所自然免疫の関与の解明

研究課題名(英文) Examination of innate immune responses in the local mucosal surfaces in the acute phase of HIV-1 infection using a humanized mice model

研究代表者

大倉 定之 (Ohkura, Sadayuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10731036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自然免疫細胞の再構築に主眼を置いたヒト化マウスを作製し、免疫不全ウイルス1型(HIV-1)が感染した直後のウイルスの動態および感染により誘導される自然免疫応答を解析した。間葉系・間質系幹細胞と共培養した造血幹細胞を重度免疫不全マウスに移植することにより、両幹細胞がマウス骨髄内に生着し、皮膚上皮内にヒトランゲルハンス細胞が認められるなど、自然免疫が再構築された。経直腸接種では単層円柱上皮が始まる部位から絨毛数個から十数個分の直腸組織に感染が強く認められ、ウイルス粒子の一部は接種後3時間以内に組織内に取り込まれた。現在、感染細胞の特定およびその周辺に集積する免疫細胞を解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AIDSは世界で毎年数千万人もの新規患者が出る新興感染症で、日本では先進国で唯一患者数が増え続けているが、根本的な治療方法はまだ開発されていない。本研究では、粘膜および皮膚内の自然免疫のヒト化を強化したマウスを確立し、AIDS病態における異常な免疫活性化とそれに続く免疫不全を誘発する原因を自然免疫の観点から探求した。少なくとも経直腸感染では感染後6時間以内にCD4陽性細胞の近傍にウイルスが認められ、ウイルスの体内への侵入は従来考えられていたよりも早いことが明らかとなった。本研究が今後、HIV-1感染がAIDSという病態を引き起こすメカニズムを解明し、早期治療方法の開発に繋がると期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a humanized mouse model where innate immune cells are efficiently reconstituted in order to unveil the viral dynamics and the locally induced innate immunity at very early time points after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inoculation.

We observed the successful reconstitution of human innate immune cells including Langerhans cells in the skin epithelia of the newly established humanized mice by injection of cocultured human haematopoietic and mesenchymal stem cells. After intrarectal inoculation, the challenge virus resided at the anal side of the rectum, and some virus particles were found inside rectal villi as early as three hours after inoculation, suggesting much earlier incorporation of virus particles into the rectum tissue than previously thought. We are currently analyzing systematically the immune cells surrounding the infected cells to clarify the innate immune response to HIV-1 infection at the very early phase of infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：AIDS HIV-1 ヒト化マウス ウイルス感染

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

AIDS がヒトで認識されて以来、数多くの知見が蓄積し抗ウイルス薬も開発されてきた。しかし、原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) が感染した後、この病態に至るメカニズムの正確な理解はまだ達成しておらず、根本的な治療法も開発されていない。本研究の着想の背景には、免疫不全に至らないサル免疫不全ウイルス (SIV) の自然感染ザルを用いた免疫学的研究により、AIDS 患者とは対照的に自然感染ザルでは急性期に活性化した宿主免疫が慢性期移行時に沈静化すること、そしてこの移行期の免疫制御に、粘膜自然免疫が関与することが示唆された点があった。そこで目的とする自然免疫細胞をピンポイントでヒト化することで、ヒト患者の自然免疫を解析する時に着目すべき注目点を提供するヒト化マウスの感染モデルを用いた研究を提案した。

### 2. 研究の目的

HIV-1 感染直後は感染細胞数が極端に少ないことから、感染直後に粘膜で HIV-1 を捕捉または感染する細胞は明らかではなく、感染直後に作動する自然免疫も解析されていない。本研究は自然免疫再構築を系統的に評価して独自の自然免疫ヒト化マウスを確立し、このヒト化マウスを用いて、HIV-1 感染に対する自然免疫の関与を明らかにすることを目的とし、感染直後の生殖器および腸管での HIV-1 感染細胞および感染細胞近傍に集積する自然免疫担当細胞を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスにおけるヒト自然免疫の系統的再構築

(臍帯血採取には本学付属病院産婦人科医師と協力)

研究に参加するボランティア妊婦の身体的負担を最小限にするために骨髄ではなく臍帯血を使用し、CD133 陽性造血幹細胞を分離・精製した。

臍帯ワルトン膠質から間質系・間葉系幹細胞を分離・樹立した。

臍帯血から分離できる造血幹細胞数は決して多くはないため、必要なサイトカインを添加した特殊培地で *in vitro* 培養した。

造血幹細胞を間質系・間葉系幹細胞と共培養した後、NSG 系統重度免疫不全マウスの生後 48 時間以内の新生仔マウスを X 線照射によりコンディショニングし、肝臓内移植した。

移植後 12 週まで飼育し、末梢血の免疫細胞ヒト化効率を解析した。

#### (2) 上記 (1) で作製したヒト化マウスへの HIV-1 感染実験

ベクターウイルス、感染性 HIV-1 を感染させ、粘膜局所で感染直後の感染細胞や数的・質的に変動する自然免疫細胞を同定し、よりヒト患者に近い感染モデルで自然免疫の動態を解析する。

ウイルス接種直後に感染細胞が局在する組織・臓器を検出する目的で、デュアルレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼおよび GFP) を発現する HIV-1 ベクターを作製した。

オスマウスは経直腸的に、メスマウスは経膈的にウイルスを接種した。

接種後 3 時間および 6 時間後にウイルス接種臓器を摘出し、生体イメージングでルシフェラーゼ発光を検出し、感染部位を固定した。組織はその後凍結保存した。

凍結切片を組織免疫染色し、GFP 陽性細胞 (すなわち感染細胞) およびヒト化された自然免疫細胞の活性化や感染細胞近傍への集積を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト化マウスの作製

ヒト由来自然免疫システムの再構築に主眼を置いた新たなヒト化マウスを構築するために、分離する造血幹細胞種 (CD34 陽性細胞、CD133 陽性細胞)、間質系・間葉系幹細胞の由来および分離、培養方法、造血幹細胞の *in vitro* での増殖に必要なサイトカイン、間質系・間葉系幹細胞と造血幹細胞の共培養の方法、新生仔マウスへの幹細胞の移植方法を細かく最適化し、安定してヒト化を再現できる系を立ち上げた。

造血幹細胞と間質系・間葉系幹細胞を直前に混合して移植すると、間質系・間葉系幹細胞の生着は認められなかったが、両細胞を共培養して造血幹細胞が間質系・間葉系幹細胞と相互作用した状態で移植することでマウス骨髄内に間質系・間葉系幹細胞の生着が認められた。こうしたヒト化マウスでは特異的に皮膚上皮内にヒトランゲルハンス細胞の再構築を認め、一方で移植コントロールである PBS 移植群および造血幹細胞単独移植群ではランゲルハンス細胞は皮膚上皮に認めなかった。この結果から、骨髄内に生着した間質系・間葉系幹細胞が造血幹細胞の骨髄球系細胞への分化をサポートしたと考えられた。

間質系・間葉系幹細胞をマウスに移植して生着させる研究は多く報告されているが、外科的侵襲を伴うなど容易ではなかった。本研究の方法では造血幹細胞と共培養し、相互作用したまま移植することによって、造血幹細胞だけではなく、間質系・間葉系幹細胞の移植も可能に

なった。マウス内に生着したメカニズムは現在解析中であるが、肝臓内移植時について肝臓の損傷部位から造血幹細胞と共に生体内に取り込まれ、造血幹細胞と共に骨髄に移動したと考えられている。現在、この方法によってヒト化したマウスの骨髄を詳細に解析し、ヒト由来間質系・間葉系幹細胞の骨髄内での局在、および同幹細胞から分化誘導した細胞(骨細胞や間質細胞等)を解析している。これにより、今後間質系・間葉系幹細胞をより効率的良く移植するマウスモデルを確立し、このマウスを用いたマウス研究が可能になると考えている。

一方で、間質系・間葉系幹細胞を同時移植することによって末梢血中のヒト由来の免疫細胞の割合が低下することが認められた。間質系・間葉系幹細胞は免疫抑制的に作用することが報告されているが、本研究の結果から、同幹細胞が骨髄内での免疫細胞分化にも影響を及ぼす可能性が示唆された。現在、間質系・間葉系幹細胞の造血幹細胞の分化への影響を解析している。今後本研究によって、間質系・間葉系幹細胞が免疫細胞分化に及ぼす影響を解明できれば、骨髄球系への分化をサポートしながら他系統の免疫分化に影響を及ぼさないヒト化マウスを構築し、自然免疫細胞をより効率よくヒト化したマウスを作製できると考えている。

## (2) ヒト化マウスへの感染実験

上記で作製したヒト化マウスに接種するウイルスとして、ルシフェラーゼを Vpr に、また GFP を Gag にそれぞれ融合させ、両遺伝子をデュアルレポーター遺伝子として発現する感染性 HIV-1 を作製した。ウイルス作製の条件の最適化を繰り返したが、ルシフェラーゼの発現効率が極端に低く、発現を回復することができなかった。このため、本研究では生体イメージングは回避し、GFP 単独で解析を行った。

まずウイルス感染のコントロールとしてエンベロープを VSV-g 由来のエンベロープにシュードタイプ化したウイルスを感染させた。経直腸接種したオスマウスでは下部肛門管から上部肛門管、直腸にかけての粘膜表面にウイルスが検出され、直腸内にウイルスを接種後、臓器サンプリングまでの間にウイルス液の一部は排泄されたと推測された。粘膜表面では、肛門直腸結合部から上部肛門管の単層円柱上皮の管腔側表面にウイルスにシグナルが検出され、直腸の粘膜上皮にウイルスが曝露されたことが示された。マウスは人と比較すると腸管全体における直腸部分が相対的に短く、大腸との境界が明瞭ではないが、上記の部分がマウスの直腸に相当する部分と考えた。ウイルスは粘膜上皮の直腸管腔側に広く認められ、特に絨毛の凹部分に強くシグナルが認められた。この傾向は接種後 3 時間でも 6 時間でも差は認められなかった。このことから、少なくとも接種後 6 時間では大部分のウイルスは直腸管腔内に留まっていると考えられた。一方でウイルスの一部は接種後 3 時間で単層円柱上皮内腔でも確認されたことから、ウイルス粒子の一部は接種後 3 時間以内に体内に取り込まれたと考えられた。

次に CCR5 指向性 HIV-1 エンベロープでシュードタイプ化した感染性レポーター HIV-1 を感染させると、上記と同様に肛門直腸結合部から上部肛門管の単層円柱上皮の単層円柱上皮内腔でもウイルスのシグナルを認め、ウイルスの一部が体内に取り込まれたと考えられた。抗 CD4 抗体と共染色すると、ウイルスのシグナルの一部は CD4 陽性細胞と共染色された。これらの CD4 陽性細胞は抗 CD3 抗体とは共局在せず、形態的にも T 細胞とは異なることから、マクロファージ等の抗原提示細胞と考えられた。またウイルスおよび CD4 シグナルは粘膜下組織ではなく粘膜下筋層で認められた。現在、これらの CD4 陽性非 T 細胞の細胞種の特定を進めると共に、これらの細胞が局在する部位の解析を進めている。

経腔感染させたマウスでは、VSV-g 由来のエンベロープにシュードタイプ化したウイルスを接種すると接種後 3 時間、および 6 時間後ともに卵管や卵巣に浮腫が認められた。HIV-1 感染させたメスマウスでは強い浮腫は認められなかったことから、少なくとも VSV エンベロープによる何らかの影響と考えられた。組織染色の結果、主に腔口部位から腔内にかけてウイルスのシグナルが認められ、一部のマウスで子宮頸部の腔側にもウイルスシグナルが認められた。浮腫との有意な相関は認められなかった。現在、生殖器組織での感染細胞の解析を進めている。

今後、感染組織内でのウイルス感染細胞を特定し、経時的に感染実験を進めることによりウイルスが体内に取り込まれてからウイルスが抗原提示される組織を特定するとともに、感染細胞周辺に誘導される自然免疫細胞を明らかにしていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：根岸 靖幸（日本医科大学微生物学・免疫学分野・講師）

ローマ字氏名：(Yasuyuki Negishi)

研究協力者氏名：丸山 基世（日本医科大学実験動物管理施設・助教）

ローマ字氏名：(Motoyo Maruyama)

研究協力者氏名：清水 真澄（日本医科大学微生物学・免疫学分野・技術員）

ローマ字氏名：(Masumi Shimizu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。