

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14593

研究課題名(和文)サル免疫系を持つマウスの作製—ウイルス感染病態解明のための新規小動物モデルの開発

研究課題名(英文)Development of a mice having simian immune systems-Establishment of a new animal model for analysis of pathogenesis in viral infection

研究代表者

伊吹 謙太郎 (Ibuki, Kentaro)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00273524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、免疫不全マウス(NOGマウス)にサル骨髄造血幹細胞(rHSCs)を移植し、サル細胞を体内に持つマウス(サル化マウス)を作製し、このマウスにサル免疫不全ウイルス(SIV)を感染させ、その病態を観察することにより、新たな小動物モデル実験系の確立を目指した。rHSCs移植後、マウス末梢血中にサルCD4陽性T細胞が持続的に検出され、サル化マウスが作製できることがわかった。さらに、病原性の異なるSIVを感染させたところ、各々のSIV感染でサル個体に認められる病態と同様の症状がサル化マウスでも観察された。以上から、AIDSの病態研究にサル化マウスが利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to establish a new animal model for AIDS. To attempt the development of mice having monkey immune cells (simianized mice), rhesus macaque hematopoietic stem cells (rHSCs) were transplanted into immunocompromised mice (NOG mice). After rHSCs transplantation, monkey CD4 positive T cells were persistently detected in mice peripheral blood. When these mice were infected with SIV (SIVmac239 or SIV PBj), SIVDNA / RNA was detected in the peripheral blood of mice, and the presence of the virus was also confirmed in these mice tissues. There were significant differences in pathogenicity between SIVmac239 or SIV PBj inoculated mice similar to those observed in monkeys in each SIV infection. From the above, it was suggested that the simian mouse may be used for the virus research including AIDS pathogenicity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：小動物モデル ウイルス感染症 免疫不全ウイルス サル造血幹細胞 免疫不全マウス

### 1. 研究開始当初の背景

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) や肝炎・肝がんの原因ウイルスである B 型、C 型肝炎ウイルスなどのウイルス感染症では、感染できる宿主域がヒトやチンパンジーなど一部の動物に限られており、個体レベルでの病態解析や抗ウイルス薬の全臨床試験に用いる適切な実験動物モデルが無いことが病気を克服できない一つの障害となっている。現在、HIV-1 の個体レベル研究では、サルに感染しエイズ様症状を引き起こす HIV-1 の近縁ウイルスであるサル免疫不全ウイルス (SIV) とアカゲザルを用いた動物モデル実験系が世界的に用いられている。しかし、サルは実験動物として汎用されるマウスのように遺伝学的にコントロールされていないため、実験データにばらつきを生じることから、多くの研究では 1 実験群毎に多数の個体を用いねばならず、高額な研究費と多くの人手が必要となる。

近年、重症複合免疫不全マウスである NOD/Shi-scid, IL-2R<sup>null</sup> マウス (NOG マウス) にヒト臍帯血の CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞 (hHSCs) を移植したマウス (ヒト化マウス) が作製された。このマウスへの HIV-1 接種により、血漿中にウイルスが検出され、末梢血中のヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞が減少し HIV-1 感染が成立している (Sato K. et al, Vaccine, 28S: B32-B37, 2010)。このことから、ヒト化マウスは HIV-1 病態解明のための小動物モデルとして期待されている。しかし、ヒト臍帯血は容易に入手できるものではなく (研究用ヒト臍帯血の細胞バンクが稼働し始めているが)、また、遺伝的背景の違いからヒト臍帯血は個人毎にウイルス感受性は異なると考えられるため、このマウスモデル実験系の評価については今後さらなる検討が必要だと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、NOG マウスにサル骨髓造血幹細胞 (サル CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞: rHSCs) を移植することにより、サル免疫系細胞を持つマウス (サル化マウス) の作製を試み、さらにこのマウスにサル免疫不全ウイルス (SIV) を感染させ病態経過を解析することによりウイルス感染症の新たな小動物モデル実験系として確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) サル免疫系細胞を体内に持つサル化マウスの作製

サル化マウス作製に用いる rHSCs の供給源として 3-10 歳齢のアカゲザルの骨髓、胎盤及び末梢血単核球に注目し、それぞれから移植用細胞を分離し、フローサイトメーターにより表現型の解析を行った。その後、脛骨骨髓腔内移植法 (IBMI 法) を用いて、NOG マウス (6 週齢、雌) に移植を行なった。

#### (2) サル化マウスにおけるサル免疫系細胞の解析

サル造血幹細胞移植後の NOG マウスについて経時的に末梢血を採取し、フローサイトメーターによる末梢血白血球の細胞表面抗原解析によりマウス体内におけるサル免疫細胞の生着について検討した。

#### (3) サル化マウスへの SIV 感染

サル免疫系細胞の生着が認められたマウスに対し、SIV の腹腔内接種を行った。SIV は、サル個体に慢性感染し 1-1.5 年後に AIDS 症状を引き起こす T 細胞指向性分子クローンである SIVmac239 株と急性腸管症状をサル個体に引き起こし、より致死性が高い強病原性 SIV 分子クローンである SIVPBj 株を用い、 $1.5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/匹で接種した。その後、経時的に末梢血の採取を行いウイルス学的・免疫学的検査を行うとともに、マウスの全身状態の変化を観察することで SIV 感染の有無を評価した。また、感染個体については殺処分後、血液、骨髓、脳、肺、肝臓、脾臓、子宮、腸管 (小腸、結腸、直腸)、腸管関連リンパ組織 (GALT) を採取し、各組織におけるサル細胞群の分布並びにウイルスの検出を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) サル組織からの移植用細胞の分離

アカゲザルの骨髓液は NH<sub>4</sub>Cl-Tris 処理により溶血することで移植用細胞である全骨髓細胞を分離した。胎盤についてはコラゲナーゼ処理を行い、移植用細胞として胎盤細胞を得た。末梢血についてはリンパ球分離液を用いた密度勾配遠心法で処理することにより移植用細胞である PBMC を分離した。分離した細胞の表面抗原をフローサイトメーターにより解析した結果、全骨髓細胞中には  $2.63 \pm 0.64\%$ 、胎盤細胞中には  $2.1\%$ 、PBMC には  $0.13 \pm 0.03\%$  の CD34<sup>+</sup> 細胞群が含まれることが分かった (図 1)。

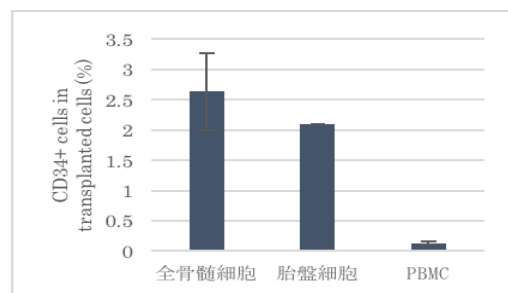


図 1. 移植細胞中の CD34 陽性細胞群

続いて各移植細胞中の CD34<sup>+</sup> 細胞群についてより詳細な解析を行った。その結果、全骨髓細胞中の CD34<sup>+</sup> 細胞群では多能生幹細胞を示す CD38<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> 細胞は 22.4%、T リンパ球前駆細胞である CD3<sup>+</sup> 細胞が 87.3%、単球系前駆細胞を示す、CD14<sup>+</sup> CD33<sup>low</sup> 細胞が 29.0% 含まれていることが明らかとなった。胎盤細胞

中の CD34<sup>+</sup> 細胞群には多能性幹細胞が 5.8%、T リンパ球前駆細胞が 47.1%、単球系前駆細胞が 42.0%含まれており、PBMC 中 CD34<sup>+</sup> 細胞群には多能性幹細胞が 47.7%、T リンパ球前駆細胞が 85.2%、単球系前駆細胞が 43.3%含まれていた。

### (2) NOG マウスへのサル細胞移植

IBMI 法によりサル全骨髄細胞を移植した NOG マウスを A 群・E 群、同法によりサル胎盤細胞を移植した NOG マウスを B 群、同法によりサル PBMC を移植した NOG マウスを C 群、腹腔内へサル PBMC を移植した NOG マウスを D 群とし、移植後、各群のマウスから経時的に末梢血を採取し、マウス体内におけるサル由来細胞の生着について検討した。マウス末梢血におけるリンパ球分画中のサル由来細胞として、サル白血球マーカーである CD45 抗原を発現する細胞群を調べたところ、A 群・E 群では移植後 1 週目よりサル CD45<sup>+</sup> 細胞が確認され、その割合は日が経つにつれ増加し、3 週目には  $4.1 \pm 1.2\%$  となった。C 群では移植後 5 週目でリンパ球分画中に 0.6%のサル CD45<sup>+</sup> 細胞の生着が確認され、その後 7 週目に 3.2%を示したが、以降徐々に減少し、12 週目で 0.1%、13 週目には確認されなくなった。B 群、D 群では観察期間を通じてサル CD45<sup>+</sup> 細胞の生着は確認されなかった。以上から、サル全骨髄細胞だけでなくサル PBMC をマウス脛骨骨髄腔内へ移植することでも、マウス体内へのサル細胞の生着が確認されることが新たに明らかとなった。しかし、マウス脛骨骨髄腔内へのサル胎盤細胞移植並びにマウス腹腔内へのサル PBMC 移植では観察期間中にサル細胞の生着は確認されなかった。

続いてサル由来細胞の生着が確認された A 群、C 群、E 群について、CD45<sup>+</sup> 細胞群のより詳細な表現型の解析を行った。A 群では SIV 感染の標的細胞である CD4<sup>+</sup> T 細胞が移植後 3 週目で  $55.5 \pm 6.5\%$ 、CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Double Positive: DP) T 細胞が  $27.5 \pm 5.5\%$  であり、細胞傷害性 T 細胞を示す CD8<sup>+</sup> T 細胞が  $9.2 \pm 5.5\%$ 含まれていることが分かった (図 2)。

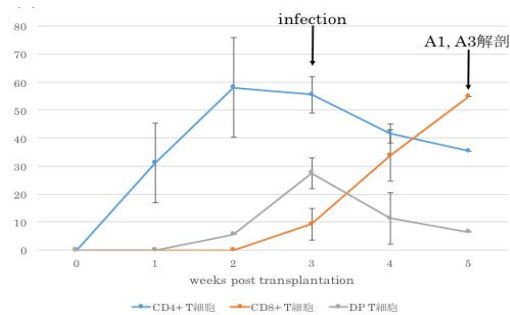


図 2. サル全骨髄細胞移植マウス (A 群) の末梢血中サル由来細胞の解析

C 群では移植後 5 週目までは CD45<sup>+</sup> 細胞群中に CD4<sup>+</sup> T 細胞は含まれていなかったが、6 週目以降に存在が確認され、その割合は最大

で 93.8% (移植後 6 週目) を示した。一方で DP T 細胞および CD8<sup>+</sup> T 細胞の生着は確認されなかった。E 群も C 群と同様に最大 93.8%の CD4<sup>+</sup> T 細胞が検出された (移植後 4 週目) が、DP T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞は確認されなかった。また A 群、C 群、E 群ともに観察期間を通じて B 細胞が検出されることはなかった。

### (3) サル化マウスへの SIV 感染実験

A 群、C 群、E 群のマウスではサル細胞の生着が認められたことから、ウイルス感染病態を観察することが可能な動物モデル実験系となるかどうかを確認するため、これらのマウスに SIV 接種を行った。A 群へは移植後 3 週目に強病原性 SIV である SIVPBj 株 ( $1.5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/匹) の腹腔内接種を行った。C 群へは移植後 18 週目、E 群へは移植後 8 週目に SIVmac239 株 ( $1.5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/匹) の腹腔内接種を行った。

ウイルス接種後のサル化マウス末梢血リンパ球分画中に存在するサル CD45<sup>+</sup> 細胞群は、A 群では接種後 1 週目で  $4.06 \pm 1.16\%$  から  $10.5 \pm 5.6\%$ まで上昇した。CD45<sup>+</sup> 細胞群中における CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合は  $55.5 \pm 6.5\%$  から  $41.7 \pm 3.4\%$ と減少し、DP T 細胞の割合も  $27.3 \pm 5.5\%$ から  $11.4 \pm 9.2\%$ と減少していたが、CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合は  $9.23 \pm 5.52\%$ から  $33.8 \pm 9.2\%$ へと大きく上昇した。A 群マウス 3 匹のうちウイルス接種後 2 週目までに A1 が死亡し、A3 で毛並みの悪化、運動能力の低下が確認された。A1 に関しては死因の特定を行うことは不可能であったが、発見時に採取したマウス末梢血リンパ球では CD45<sup>+</sup> 細胞群は 34%に増加し、ここに含まれる CD4<sup>+</sup> T 細胞が 35.4%、DP T 細胞が 6.47%と減少、一方で CD8<sup>+</sup> T 細胞は 54.9%と増加していた (図 2)。E 群は SIVmac239 株接種後、CD4<sup>+</sup> T 細胞の減少は確認されたものの、A 群とは異なり、CD45<sup>+</sup> 細胞群の増加は確認されなかった (図 3)。C 群についてはウイルス接種時にはマウス末梢血中からサル CD45<sup>+</sup> 細胞群は消失しており、接種後においても末梢血中にサル CD45<sup>+</sup> 細胞群が検出されることはなかった。

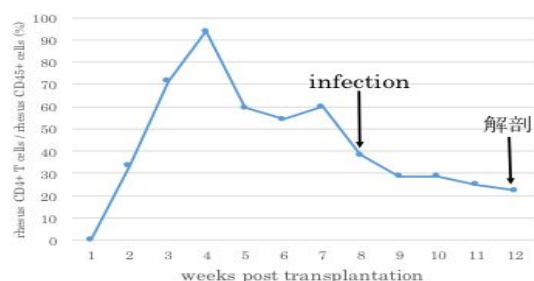


図 3. サル全骨髄細胞移植マウス (E 群) の末梢血中サル由来細胞の解析

次に SIV 感染の有無について検討を行った。SIV 接種後、経時的に採取したマウス末梢血より DNA を抽出し、PCR 法を用いて SIV DNA の検出を行った。A 群・E 群ではウイルス接種後、3 週目までの全ての検体から SIV DNA



が検出された。一方、C 群ではウイルス接種後 3 週目までのいずれの検体からも SIV DNA は検出されなかった。血漿検体を用いた RT-PCR 法による SIV RNA の検出においては、A 群・E 群のマウスは採取した全ての検体中から SIV RNA が検出された。C 群においてもウイルス接種後 3 週目までに採取した検体中から SIV RNA が検出された(図 4)。C 群マウスはウイルス接種時には末梢血中からサル CD45<sup>+</sup> 細胞群が消失しており、さらにウイルス接種後の末梢血リンパ球から SIV DNA が検出されなかったにもかかわらず血漿中に SIV RNA が検出され続けたことから深部リンパ組織中において生着していたサル細胞に SIV が感染・増殖していた可能性を示唆している。

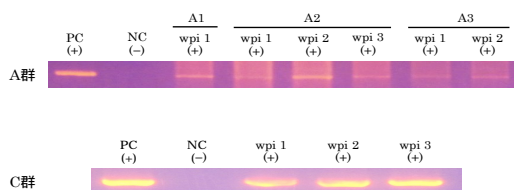


図 4. SIV 接種サル化マウス末梢血からの SIV RNA の検出

ウイルス接種後 2 週目に SIVPBj 株を接種した A1 および A3 (A1 は死後、A3 は毛並みの悪化と運動能力の低下が観察されたため安楽死)を、4 週目と 6 週目に SIVmac239 株を接種した E 群と C 群のマウスを安楽死後剖検し、血液、骨髄、脳、肺、肝臓、脾臓、子宮、小腸、結腸、直腸、GALT を採取した。フローサイトメーターによる解析の結果、A1 では解析できなかった小腸、直腸を除く全ての組織でサル由来 T 細胞が検出された。A3 および C 群では採取した全ての組織においてサル由来 T 細胞が検出された。驚くべきことに、C 群は末梢血中からサル由来細胞が検出されないにも関わらず、全身の組織中にサル由来細胞が長期間にわたって生存していることが明らかとなった。次に組織におけるウイルス感染の有無について SIV DNA の検出により検討したところ、A 群マウスでは採取した全ての組織から SIV DNA が検出され、一方、C 群、E 群では小腸を除いて全ての組織から SIV DNA が検出された。

さらにサル細胞と SIV 感染細胞の組織中の局在を明らかにするために、A 群、C 群、E 群マウスの各組織について HE 染色、PAS 染色および組織免疫染色を行った。A 群では、SIV 非感染マウスや E 群のマウスと比べ、小腸において絨毛の短縮化とパネート細胞の減少が確認された(図 5、上段)。A 群マウスは SIVPBj 株を接種しており、この症状は SIVPBj 株接種サル個体で認められる症状と同様であった。また、結腸においては A 群、E 群ともに SIV 非感染マウスと比較して腸管内腔の平坦化(図 5、中段)および杯細胞の増加(図 5、下段)が確認された。変化の程度は A 群でより顕著であった。

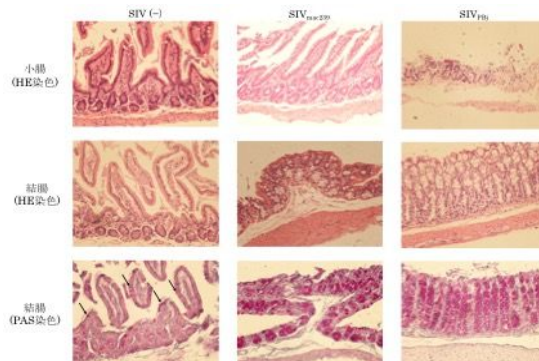


図 5. SIV 接種サル化マウスの組織解析(腸管)

本研究では、アカゲザルの骨髄、胎盤及び末梢血単核球をサル化マウス作製に用いる rHSCs の供給源として用い、そのうちの骨髄及び末梢血単核球より分離した移植用細胞によりサル化マウスの作製が可能であることを明らかにした。また、作製したサル化マウスを用いた SIV 感染実験では、ウイルス株毎の病原性の違いを反映した感染病態を示すことが明らかとなった。今後、SIVPBj 株接種マウスでの症状の悪化の原因並びにその機序についてウイルス側・宿主側の両面から調査し詳細を明らかにするとともに、サル化マウスの AIDS 研究における新規実験動物モデルとしてのさらなる有用性を検討していきたい。

## 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) 陣野萌恵、関根将、横山温香、三浦智行、伊吹謙太郎：免疫不全ウイルス感染病態研究におけるサル化マウスの有用性の検討、第 65 回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2017 年 10 月

2) 関根将、藤田悠平、陣野萌恵、三浦智行、伊吹謙太郎：サル免疫細胞を持つマウス(サル化マウス)へのサル免疫不全ウイルス(SIV)感染、第 159 回日本獣医学会学術集会、神奈川、2016 年 9 月

3) 関根将、藤田悠平、陣野萌恵、三浦智行、伊吹謙太郎：サル骨髄造血幹細胞移植マウスへのサル免疫不全ウイルス(SIV)感染実験、第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会、神戸、2016 年 8 月

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊吹 謙太郎 (Ibuki, Kentaro)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：00273524

##### (2) 研究分担者

三浦 智行 (Miura, Tomoyuki)  
京都大学・ウイルス再生医科学研究所・准教授  
研究者番号：40202337

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

関根 将 (Sekine, Sho)  
陣野 萌恵 (Jinno, Moe)  
横山 温香 (Yokoyama, Haruka)