

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 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659509

研究課題名（和文） ヒト化 SCID マウスでの可視化 HIV 播種動態の解明と治療による動態
変容の解析研究課題名（英文） Analysis of the early phase dynamics of HIV-1 infection in
hPBM-transplanted SCID mice using infectious HIV-1 carrying fluorescent protein mCherry
and changes with anti HIV drug administration

研究代表者

満屋 裕明 (MITSUYA HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20136724

研究成果の概要（和文）：HIVの初感染プロセスは一定程度明らかにされてきたが、所属リンパ節から全身のリンパ臓器へのHIV伝播の動態、またそのようなHIV伝播が抗HIV剤を用いた治療によってどのように変容するかについては必ずしも明らかにされていない。しかし、本萌芽研究ではhu-PBMC移植SCID マウスに蛍光能を有するHIVを接種することで、ヒトで見られる様な感染細胞の初期生体内播種動態をin vivo imaging装置などで観察する事、また抗HIV剤の投与でもHIV伝播を抑制出来ない原因を検討する事に成功した。

研究成果の概要（英文）：Early phase events in HIV infection have been examined to a certain extent. In particular, the state-of-the-art technologies including *in situ* RNA hybridization have further elucidated a series of events in such early phase of HIV infection. However, detailed dynamics and spreading profiles of HIV at such an early stage of initial infection remain to be elucidated. Here, we have succeeded in imaging the dynamics and spreading of HIV in the humanized mice using an in vivo imaging technology and recombinant infectious HIV containing a fluorescence protein. In addition, we found that HIV-infected humanized mice exhibited symptoms similar to HIV-infected humans. Moreover, we have demonstrated how the dynamics and spreading profiles of HIV infection are altered under the administration of an anti-HIV drug.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症治療学

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、蛍光 imaging の発達により生細胞内の遺伝子発現や分子局在の観察が可能になってきた。我々は最近、cyan または yellow fluorescence protein を結合したプロテアーゼを有する感染性の HIV 株を作成、intermolecular FRET (fluorescence resonance energy transfer)-based HIV expression assay を確立して、世界で初め

て HIV プロテアーゼ二量体化阻害剤を同定した (Koh & Mitsuya, *J Biol Chem* 282: 28709-28720, 2007)。

(2) 他方、我々はヒト末梢血単核球を移植した nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor-g-chain-knocked-out AIDS マウスモデルを用いて新規の CCR5 阻害剤 (aplaviroc, APL) が *in vivo* で強力な抗

HIV 活性を發揮することを示して、APL を米国での第 3 相臨床試験にまで進めて、CCR5 と CCR5 阻害剤の相互作用の構造学的解析に繋いだ (Nakata & Mitsuya, *J Virol* 79: 2087-2096, 2005; Maeda & Mitsuya, *J Mol Biol* 381:956-974, 2008)。

(3) 他方、新規のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤、4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) が上述の様な SCID マウスモデルで HIV 増殖を強力に抑制し CD4 陽性細胞の減少を阻止する事を明らかにし、サルにおける前臨床試験を進めている [Kodama & Mitsuya *et al. Antimicrob Agent Chemother* 45:1539-1546, 2001; Michailidis & Mitsuya *et al. J Biol Chem* 284:35681-35691, 2009]。

(4) 我々は既に蛍光観察可能な赤色蛍光発光リコンビナント HIVmcherry を作成、humanized NOD/Scid/Jack3-/- (NOJ) マウスに投与して、in vivo imaging system (Maestro) を用いて大網、リンパ節などに集積した HIV 感染細胞をイメージングすることに成功している。

(5) すでに確立した蛍光観察可能な HIV 感染モデルマウスを利用して、HIV と HIV 感染細胞の生体内播種と感染拡大のダイナミクスを定量的に仔細に検討し、またそのようなプロフィール・ダイナミクスが抗 HIV 薬剤を用いた治療によってどのように変容するか、またどのような臓器で最も HIV の増殖が抑制され、またどのような部分が HIV にとっての、いわゆる sanctuary になっているかなどを定量的に検討する。

(6) 本申請で計画されている HIV の伝播のダイナミクスやウイルス分布のプロフィールの検討は未だ国内・国際誌で見ると限り報告はない。また、我々がこれまで関わってきた抗 HIV 薬開発の努力の中で得られた種々のクラスの薬剤の単独、或は併用での抗ウイルス効果とその限界の定量的な検討は未だ国内・国際誌で見ると限り皆無である。我々の研究室では既に CCD カメラ装着の Maestro™ 生体イメージングのための種々機器が準備されており、蛍光ラベル HIV、humanized NOD/Scid/Jack3-/- マウス、各種ウイルス学的・分子生物学的技術、各種免疫染色技術、Microtome/Cryostat 等を駆使する multi-disciplinary program (複数の研究領域を糾合したプログラム) は国際的に見ても限られた施設でしか実現されないと考えられるので、極めてユニークでしかも実地臨床に「翻訳」できる文字通りのトランスレーショナル研究として有用なデータが得られる

と期待される。さらに我々のグループは開発中の種々の新規の抗 HIV 薬剤を有しており、本萌芽研究で得られるデータは今後の preclinical/clinical trials に有用なデータを提供する可能性がある」と期待される。

2. 研究の目的

(1) HIV が粘膜などから侵入して全身感染が成立する迄のプロセスについては、HIV と免疫担当細胞のリンパ節における相互作用の一部が理解されているものの、HIV の感染拡大の際のリンパ・免疫諸臓器での HIV 及び HIV 感染細胞の挙動は必ずしも十分に理解されていない。またそのような HIV と免疫担当細胞の挙動が抗 HIV 薬剤などによってどのように修飾されるかについては殆ど不明である。

(2) 本挑戦的萌芽プロジェクトでは分子イメージングの手法とヒト末梢血単核球移植 SCID マウスモデル及び種々の抗 HIV 薬剤を用いて HIV と HIV 感染細胞の生体内播種のプロセス及び感染拡大ダイナミクスの解明を試み、次いで抗 HIV 薬のそうしたプロセス・ダイナミクスへの作用を明らかにして更に有効な治療レジメンの構築の方向を探る基礎とする。

3. 研究の方法

本萌芽研究では平成 22 年度萌芽研究プロジェクトで得られた蛍光能/感染能を有する HIVmCherry と蛍光観察可能な AIDS モデルマウスを使用して、さらに改良を加え、細胞レベルで分子イメージングを可能にすることに挑戦しながら、そのようにして観察された HIVmCherry 及び HIVmCherry 感染細胞の動態とウイルスの伝播と分布のプロフィールとダイナミクスが抗 HIV 薬を用いた治療によってどのように抑制されるか、またどのような臓器で最も HIV の増殖が抑制され、またどのような部分が HIV にとって sanctuary になっているかなどを明らかにする。

(1) HIVmCherry を投与した NOJ マウスへの抗 HIV 剤投与。

NOJ mice に hu-PBMC を移植し、定植を FACS にて確認後 HIVmCherry を投与して 24 時間後、マウスへのインテグラーゼ阻害剤 raltegravir (RAL) の投与を開始し、薬剤投与によって臓器・血管・リンパ組織などに播種・増殖・集積する HIVmCherry の量的・質的变化を定量的に検討する。

(2) 薬剤投与マウスにおける治療効果の観察。マウス個体そのものにおける HIV のリンパ節集積の抑制を in vivo imaging system で観察

する。mCherryのシグナルが捕捉された HIV_{mC}感染マウスの臓器（リンパ節など）を凍結、もしくは4%パラフォルムアルデヒド固定後パラフィン包埋し、切片を作製する。種々の抗体（抗-mCherry/Ds Red, -HIV-1 p24, -hCD1a, -hCD3 -hCD4, -hCD8, -hCD57, -hCD68, -hCD95 *etc.*）を用いた免疫染色で HIV_{mC}感染細胞の有無・分布を観察する。

(3)各組織での HIV_{mC} 感染細胞の集積、及び HIV_{mC} の増殖メカニズムの解析。HIV_{mC} 感染マウスと非感染マウス間におけるリンパ節ホーミングに関わるサイトカインなどの産生量の違いなどを ELISA で定量的に測定し、更にホーミングマーカーとして既に報告されている細胞表面マーカー（CD103, CCR, CD49d など）を両群間で flow cytometry を利用して質的・量的に分析し、HIV_{mC} 増殖メカニズムとの関連を解明する。

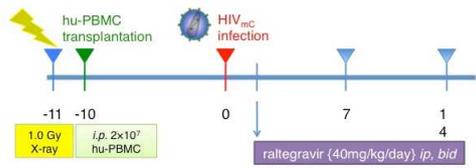


図1. HIV_{mC}をNOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに感染後、Raltegravirを投与するためのプロトコール。ヒトPBMCを移植する前日にマウスに対してX線照射を1.0Gy行う。ヒトPBMCを腹腔内に移植して10日後に、HIV_{mC}を同じく腹腔内に接種する。HIV_{mC}接種の24時間後から Raltegravir (40mg/kg/day, twice a day, ip)の投与を開始した。その後、接種から1週間おきにマウス末梢血中のHIV p24抗原/HIV-RNA コピー数測定、in vivo imaging、免疫染色などを行う。

4. 研究成果

(1)我々はヒト末梢血単核球（hPBM）移植 NOD/Scid/Jak3^{-/-} (hNOJ) マウスに赤色蛍光蛋白（mCherry）を標識した HIV (HIV_{mC}) を接種し感染細胞の生体内播種ダイナミクスを in vivo imaging、免疫染色、p24 定量などで解析することに成功しており、得られた知見がヒトで起こる HIV 初期感染の病態、高ウイルス血症、リンパ節腫大などと mimic していたことを 22 年度までに明らかにしていた。

(2)本年度萌芽研究では我々の手法で得られた HIV 初期感染動態が、抗 HIV 薬の一つであるインテグラーゼ阻害剤 raltegravir (RAL) の治療下でどのように変化するか検討した。

(3)hNOJマウスに経腹腔的に HIV_{mC}を感染させ、24 時間後から RAL (40 mg/kg/day, twice a day, ip)の投与を開始し、14 日後に HIV_{mC} 感染 hNOJ におけるウイルス学、蛍光分析、組織免疫学的解析を行った。

(4)HIV_{mC}感染 hNOJ マウスの投与群と非投与群を比較すると、投与群で HIV RNA コピー数の減少などを認めたが、いくつかの個体ではウイルス血症の完全な抑制が見られなかった。しかし、リンパ節の腫脹は投与群で抑制され、さらに免疫染色法によって、リンパ節中の多核形成巨細胞出現の著しい減少も認めた。

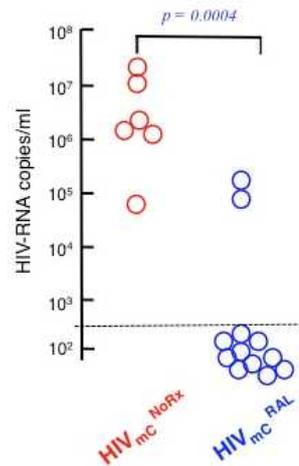


図2. HIV_{mC}感染マウスの Raltegravir 投与、非投与群における末梢血中の HIV-RNA コピー数の比較。HIV_{mC}を接種して14日後に採血された末梢血中の HIV-RNA コピー数について検討した。Raltegravir 非投与群では HIV-RNA コピー数の著しい減少を認めたが ($p = 0.0004$)、いくつかの個体ではウイルス血症の完全な抑制が見られなかった。

(5)RAL 投与群で HIV RNA コピー数が検出されたマウスについて感染細胞の possible sanctuary を仔細に検討したところ、in vivo imaging によって腹腔大網に mCherry 蛍光シグナルが観察され、その蛍光シグナルに一致して mCherry 蛋白発現と HIV p24 産生が免疫染色で確認された。これらの感染細胞の主たる分画は成熟樹状細胞系であることが確認された。同じ time point の RAL 非投与群では腹腔大網に HIV_{mC} 感染成熟樹状細胞が確認されなかったこと、また HIV_{mC} 感染暴露前の hNOJ マウスの大網には未熟樹状細胞のみ検出されたことから、HIV_{mC} に接触・感染を受けた未熟樹状細胞がリンパ節ホーミングの過程を辿る事なく initial infection site である大網に留まり、感染成熟樹状細胞に分化していったのではないかと示唆された。

(6)これらの知見から、RAL 投与開始までの期間に感染が確立した樹状系細胞が持続的にウイルスを産生している可能性が示唆され、

我々の手法が治療によって抑制できないウイルス血症が生じる原因を検討するために有用な情報となると思われた。

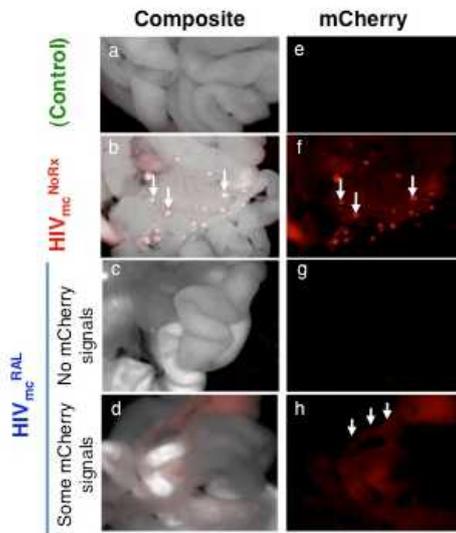


図3 in vivo imaging systemで捕捉された感染マウスにおける腹腔エリアのHIVmC感染細胞の分布。aからdは自家蛍光とmCherry特異的のシグナルのmerge画像。eからhはmerge画像から自家蛍光を除いたmCherry蛍光シグナルだけを捉えた画像。a/eはHIVmC非感染マウス、b/fはHIVmC感染RAL非投与マウス、c/gはmCherry蛍光シグナルが検出されなかったHIVmC感染RAL投与マウス、d/hはmCherry蛍光シグナルが検出され、しかもHIV-RNAコピー数が検出されたHIVmC感染RAL投与マウスにおける画像。HIVmCを感染させて14日後の腹腔内におけるmCherryシグナルは、RAL非投与群では主にリンパ節に、RAL投与群でHIV-RNAコピーが検出されたマウスでは、大網にmCherryシグナルが観察された。

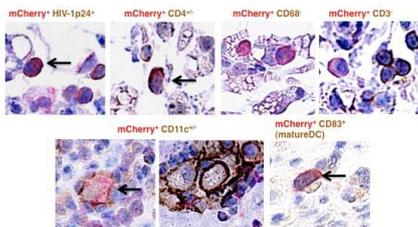


図4 ウイルス血症が確認されたHIVmC感染RAL投与マウスの大網エリアの免疫染色結果。mCherry蛍光シグナルが観察された腹腔内大網エリアに存在する感染細胞の形態を免疫染色で確認したところ、感染細胞の主たる分類は成熟樹状細胞系であることが明らかになった。

(7) 今後は人で見られる経膈・経直腸など他の感染経路で播種様態を検討する予定である。

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10件)

①青木 宏美、鍛田 伸好、服部 真一郎、林 宏典、青木 学、岡田 誠治、満屋 裕明、mCherry可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスと抗 HIV 剤によるその変容の検討、第 13 回白馬シンポジウム、2011. 5. 19-20、北海道大学医学部学友会館 (札幌)

②鍛田 伸好、青木 宏美、服部 真一郎、林 宏典、青木 学、岡田 誠治、満屋 裕明、mCherry可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスと抗 HIV 剤によるその変容の形態学的検討、第 13 回白馬シンポジウム、2011. 5. 19-20、北海道大学医学部学友会館 (札幌)

③林 宏典、青木 宏美、鍛田 伸好、満屋 裕明、蛍光蛋白質タグ可視化 HIV 発現の分子基盤の解明、第 13 回白馬シンポジウム、2011. 5. 19-20、北海道大学医学部学友会館 (札幌)

④青木 宏美、鍛田 伸好、服部 真一郎、林 宏典、青木 学、岡田 誠治、満屋 裕明、mCherry可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスの検討: 抗 HIV 薬を用いた治療による変化、第 21 回抗ウイルス療法研究会、2011. 5. 29-30、金沢市文化ホール (金沢)

⑤青木 宏美、鍛田 伸好、服部 真一郎、林 宏典、青木 学、岡田 誠治、満屋 裕明、mCherry可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスと抗 HIV 剤によるその変容の検討、第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2011. 10. 6-8、北九州国際会議場/ホテルニュータガワ (北九州)

⑥ Nobuyo Higashi-Kuwata, Hiromi Ogata-Aoki, Tahei Nakamura, Shinichiro Hattori, Hironori Hayashi, Manabu Aoki, Seiji Okada, Hiroaki Mitsuya, Alteration of the dynamics of HIVmC dissemination in huPBMC NOJ mice under Raltegravir administration, 12th KUMAMOTO AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium、2011. 10. 19-21、Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel (Kumamoto)

⑦ Hiromi Ogata-Aoki, Nobuyo Higashi-Kuwata, Shinichiro Hattori, Hironori Hayashi, Manabu Aoki, Kenji Maeda, Seiji Okada, Hiroaki Mitsuya, Early Phase Dynamics of HIV Infection in hPBMC-Transplanted NOD/SCID/Jak3^{-/-} Mice Using Infectious HIV Carrying a Fluorescent Protein, mCherry, 12th KUMAMOTO AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium、2011. 10. 19-21、Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel (Kumamoto)

⑧青木 宏美、鍛田 伸好、服部 真一郎、林 宏典、青木 学、岡田 誠治、満屋 裕明、mCherry可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダ

イナミクスと抗 HIV 剤によるその変容の検討
-1、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、
2011. 11. 30-12. 2、ハイアットリージェンシ
ー東京（東京）

⑨林 宏典、青木 宏美、鎌田 伸好、満屋 裕明、
蛍光蛋白質ラベル化 HIV の分子基盤解析、
第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、
2011. 11. 30-12. 2、ハイアットリージェンシ
ー東京（東京）

⑩鎌田 伸好、青木 宏美、服部 真一郎、林 宏
典、青木 学、岡田 誠治、満屋 裕明、mCherry
可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダ
イナミクスと抗 HIV 剤によるその変容の検討
-2、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、
2011. 11. 30-12. 2、ハイアットリージェンシ
ー東京（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満屋 裕明 (MITSUYA HIROAKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20136724

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：