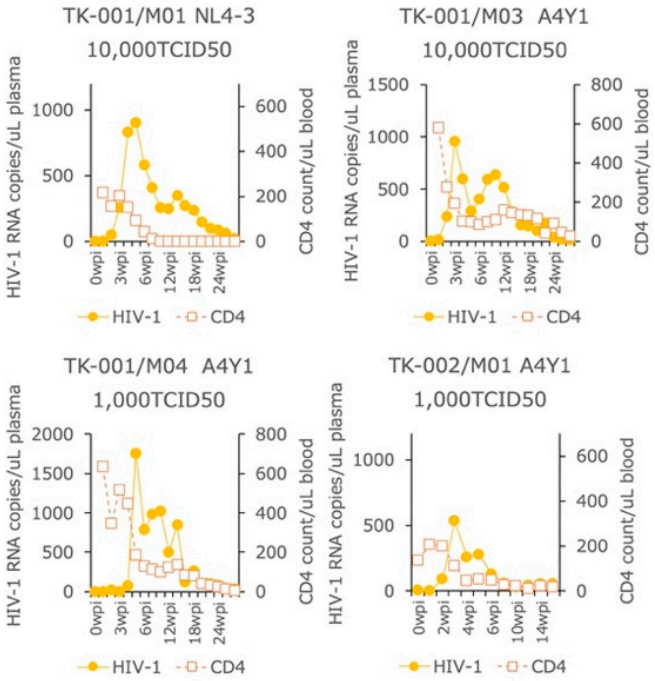
142　ウイルス感染症の克服に向けたヒト化マウスの構築	駒　貴明

【目的】HIV-1 をはじめとする宿主種特異性の高いヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）や Epstein-Barr virus（EBV）はマウス個体には感染できないため、動物モデルの開発が望まれている。超免疫不全マウス（NSG マウスなど）にヒトの臍帯血等由来の CD34 陽性造血幹細胞を移植してヒトの免疫系を構築したマウスを免疫系ヒト化マウス（CD34 マウス）と呼ぶ。ヒトの細胞がマウス内に生着することで、宿主種特異性の高いウイルスもヒト化マウスには感染することが可能となった。開発以降、宿主種特異性の高い病原体の研究に CD34 マウスが使用されてきたが、このマウスのヒト T 細胞はマウスの胸腺で教育されるため HLA 拘束性を持たず、また、細胞障害性 T 細胞（CTL）の誘導などの獲得免疫が十分に惹起されない等の問題点が指摘されている。具体的に、最もヒト化マウスを用いた研究が進んでいる HIV-1 感染においては、持続感染期（ウイルス学的セットポイントの維持）を達成できず、HIV-1 は個体内で増殖し続ける。これは、マウス個体内で細胞性免疫を中心とした獲得免疫が極めて弱いことを示唆する。従って、CD34 マウスはウイルスの病原性や感染病態の研究には不適当であり、現在のヒト化マウスは改良が必要とされ、強く望まれている。本研究では、ウイルスの代表として HIV-1 を用い、ウイルス感染後に獲得免疫を発動する免疫系ヒト化マウスの構築を目指した。

【方法】我々は、NSG マウスへの CD133 陽性造血幹細胞の骨髄腔内移植（IBMI 法）を行った。移植後 6〜7 ヶ月目に HIV-1 NL4-3 株または NL-A4Y1 株を腹腔内感染させた。一週間ごとに採血を行い、血中 HIV-1 コピー数とヒト CD4 陽性細胞数を測定した。

【結果】HIV-1 感染後の血中 HIV-1 コピー数を測定すると、感染 4 週目前後にピークが見られ、その後低下した。血中の CD4 陽性細胞数の著減（10 個／μL 前後）に伴う HIV-1 コピー数の減少は、HIV-1 が増殖可能な CD4 陽性細胞の枯渇によるものと考えられる。一方で、HIV-1 コピー数の低下時に CD4 陽性細胞数が 100 個／μL 前後で推移する個体（TK-001/M03、TK-001/M04）では、獲得免疫の発動により HIV-1 の増殖が抑えられたと考えられた。今後、このマウスの獲得免疫系（特に CTL 活性）について評価を行う。

HIV-1 感染後の血中 HIV-1 コピー数とヒト CD4 数



142. ウイルス感染症の克服に向けたヒト化マウスの構築

駒　貴明

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 微生物病原学分野

Key words：ヒト化マウス，CD133，獲得免疫，HIV-1，ウイルス

緒　言

HIV-1 をはじめとする宿主種特異性の高いヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）や Epstein-Barr virus（EBV）はマウス個体には感染できないため、動物モデルの開発が望まれている。超免疫不全マウス（NSG マウスなど）にヒトの臍帯血等由来の CD34 陽性造血幹細胞を移植してヒトの免疫系を構築したマウスを免疫系ヒト化マウス（CD34 マウス）と呼ぶ。ヒトの細胞がマウス内に生着することで、宿主種特異性の高いウイルスもヒト化マウスには感染することが可能となった。開発以降、宿主種特異性の高い病原体の研究に CD34 マウスが使用されてきたが、このマウスのヒト T 細胞はマウスの胸腺で教育されるため HLA 拘束性を持たず、また、細胞障害性 T 細胞（CTL）の誘導などの獲得免疫が十分に惹起されない等の問題点が指摘されている［1］。具体的に、最もヒト化マウスを用いた研究が進んでいる HIV-1 感染においては、持続感染期（ウイルス学的セットポイントの維持）を達成できず、HIV-1 は個体内で増殖し続ける（図 2）［2］。これは、マウス個体内で細胞性免疫を中心とした獲得免疫が極めて弱いことを示唆する。従って、CD34 マウスはウイルスの病原性や感染病態の研究には不適当であり、現在のヒト化マウスは改良が必要とされている。

本研究では、ウイルスの代表として HIV-1 を用い、ウイルス感染後に獲得免疫を発動する免疫系ヒト化マウスの構築を目指した。まず近年開発された NSG マウスへの CD133 陽性造血幹細胞の骨髄腔内移植（IBMI 法）に着目した。CD133 陽性造血幹細胞は CD34 陽性造血幹細胞よりも未分化で、骨髄腔内に直接移植するため、マウス個体内でのヒト細胞の生着率・分化率を増加させる。実際、本法を用いた HTLV-1 感染では、ウイルスタンパク質に対する特異的 CTL および抗体が惹起されている［3］。本研究では IBMI 法で CD133 陽性造血幹細胞を移植して構築したヒト化マウスに HIV-1 を感染させ、獲得免疫が惹起されるか否かをウイルス側の動態により評価を行った。

方　法

1. ヒト造血幹細胞の調製

CD133 陽性造血幹細胞を得るために、日本赤十字社近畿さい帯血バンクから譲渡されたさい帯血から白血球を分離して、使用時まで液体窒素内で保存した。移植当日、凍結保存しておいた白血球から Indirect CD133 MicroBead Kit, human（Miltenyi Biotec）を用いて CD133 陽性細胞を分離した。精製した CD133 陽性細胞は純度 80%以上のものを移植に使用した。

2. ヒト化マウスの構築と HIV-1 感染

移植前日、5 週齢のメスの NSG マウス（NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ）に 2.5 Gy の X 線を照射した。移植当日、骨髄腔内に精製した CD133 陽性細胞 5×10^4～1×10^5個を移植した。移植後 1 ヶ月ごとにヒト CD45 陽性白血球、ヒト CD3 陽性 T 細胞、ヒト CD19 陽性 B 細胞の割合を確認した。移植後 6～7 ヶ月目にヒト白血球が生着・分化していることを確認したのち、HIV-1 NL4-3 株（CXCR4 指向性）または NL-A4Y1 株（CCR5 指向性）を腹腔内感染（1,000 $TCID_{50}$または 10,000 $TCID_{50}$）させた。1～2 週間ごとに採血を行い、血中 HIV-1 コピー数とヒト CD4 陽性細胞数を測定した。血漿から QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いてウイルス RNA を抽出し、QuantiFast

SYBR Green RT-PCR Kit（QIAGEN）とプライマー（5'-caggccatatcacctagaactt-3'／5'-gggtggctccttctgataat-3'）を用いてRT-qPCRを行った。

3. フローサイトメトリー

マウスから採血した全血10μLをBioLegend社のAPC/Cy7 anti-human CD45 Antibody（HI30）、APC anti-human CD3 Antibody（HIT3a）、PerCP/Cy5.5 anti-human CD8a Antibody（HIT8a）、FITC anti-human CD4 Antibody（RPA-T4）、PE/Cy7 anti-human CD19 Antibody（HIB19）、PE anti-mouse CD45 Antibody（30-F11）を用いて染色を行った。染色後に赤血球溶解液［0.16 M NH_4Cl と 0.17 M Tris-HCl（pH7.65）を 9：1 で混合したもの］を500μL加え、BD FACSVerse（Becton Dickinson）を用いて解析を行った。

4. 倫理

本実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会、徳島大学病原体等安全管理委員会および徳島大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

結果および考察

1. ヒト化マウスのHIV-1感染動態

感染前日（移植後6～7ヶ月目）のマウス血液中のヒト白血球、ヒトT細胞、ヒトB細胞の割合はそれぞれ平均42.7%、55.3%、37.4%であった（表1）。それらのマウスにHIV-1 NL4-3株（CXCR4指向性）またはNL-A4Y1株（CCR5指向性）を感染させると、感染2週目前後から血中ヒトCD4陽性細胞数が減少し始めた（図1）。HIV-1 NL4-3株（CXCR4指向性）を感染させたTK-001/M01では感染8週目以降、血中CD4陽性T細胞はほぼ検出限界以下を推移した。一方でNL-A4Y1株（CCR5指向性）を感染させたマウスのCD4陽性細胞数は緩やかに減少する傾向が認められた。いずれの個体においても4週目前後には血中HIV-1コピー数のピークが見られ、その後、平均55倍の減少が認められた。図2に示すようにCD34マウスにHIV-1を感染させても、CD4陽性T細胞数は減少するにもかかわらずHIV-1は増殖し続け、血中HIV-1コピー数は減少しない。本研究ではいずれの感染マウスでもHIV-1コピー数の減少が認められ、これまでの結果とは大きく異なる点である。血中HIV-1コピー数の減少は獲得免疫によるHIV-1複製の抑制とも考えられるが、ヒトCD4陽性細胞数の著減（10個／μL前後）に伴うHIV-1コピー数の減少は、HIV-1が増殖可能なCD4陽性細胞の枯渇による可能性と考えられた。一方で、HIV-1コピー数の低下時にCD4陽性細胞数が100個／μL前後で推移する個体（TK-001/M03、TK-001/M04）では、獲得免疫の発動によりHIV-1の増殖が抑えられたと示唆された。この血中HIV-1コピー数の減少が本当にヒトの獲得免疫によるものかどうかは今後の課題であるが、少なくとも血中HIV-1コピー数とヒトCD4陽性細胞数の動態は、ヒトのHIV-1感染を模倣していると考えられた。

CD34マウスに代わるヒト化マウスとしてBLTマウス（骨髄/肝臓/胸腺）も開発されたが、中絶した胎児の組織を使用しなければならず、倫理的な問題や移植手術といったハードルがある。またBLTマウスはヒトの胸腺を移植しているにもかかわらず、HIV-1感染後に明確なウイルスコピー数の減少は認められない［4］。ヒトの胸腺を持たないCD133陽性造血幹細胞IBMI移植マウスがどのようなメカニズムによって獲得免疫を構築したのかは議論の余地があるが、CD133陽性造血幹細胞という最も未分化な幹細胞の使用、本来造血幹細胞が存在すべき場所への移植によって適切な教育がなされたのではないかと推測されている［5］。従って、CD133陽性造血幹細胞をIBMI法によって確立したヒト化マウスは、HIV-1感染モデルとしてだけでなく、他のウイルス感染症のモデルとしても期待される。今後、HIV-1感染マウスにおける特異的CTLの検出と特異的抗体の検出を試みる。

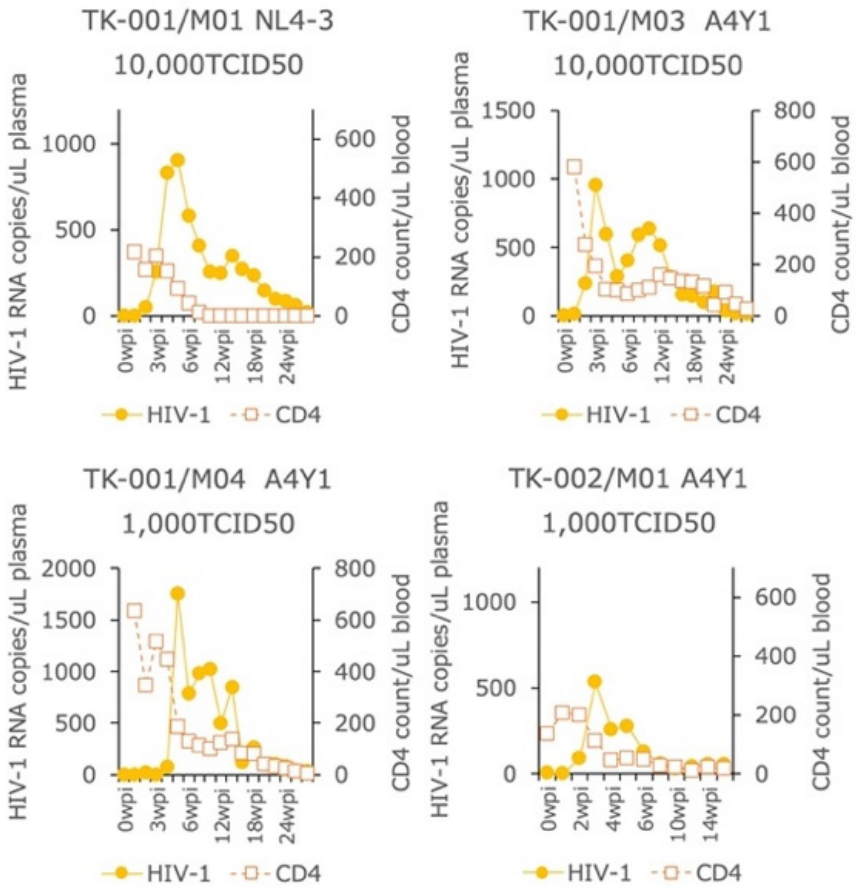


図 1. HIV-1 感染後の血中 HIV-1 コピー数とヒト CD4 数

ヒト化マウスにHIV-1を感染させ、経時的な血中HIV-1コピー数とヒトCD4数をモニターした。感染4週目前後に血中HIV-1コピー数はピークとなる。ヒトCD4数は感染後徐々に低下した。

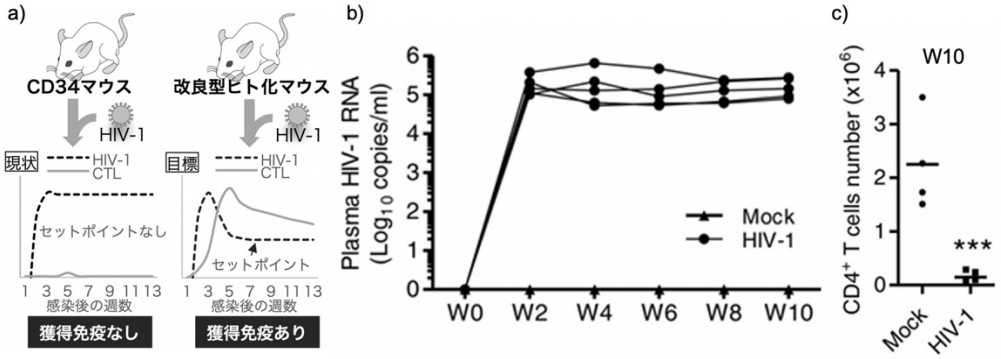


図 2. ヒト化マウスにおける HIV-1 感染

a) CD34 マウスに HIV-1 を感染させても、獲得免疫が無いために血中の HIV-1 コピー数は低下を示さず、セットポイントは認められない。

b) CD34 マウスにおける HIV-1 感染後の経時的な血中 HIV-1 コピー数。セットポイントは認められない。

c) CD34 マウスにおける感染 10 週目の脾臓 CD4 数。

図 2b と 2c は Cheng et al.［2］の図を改変したもの。

表 1. 感染前日のヒト細胞の生着率

ID	%hCD45	%hCD3	%hCD19
TK-001/M01	45.5	34.2	60.1
TK-001/M03	57.3	46.5	46.9
TK-001/M04	45.3	59.1	33.7
TK-002/M01	22.9	81.3	9.0
Ave.	42.7	55.3	37.4
SD	14.4	20.1	21.8

感染前日（移植後6～7ヶ月後）のヒト細胞の生着率をフローサイトメトリーで確認した。$hCD45^+$細胞はFSCとSSCによるリンパ球ゲートの後の割合、$hCD3^+$T細胞と$hCD19^+$B細胞はヒト白血球（$hCD45^+$）中の割合を示す。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、関西医科大学の足立昭夫博士、藤澤順一博士、大高時文博士、李成一博士ならびに徳島大学大学院医歯薬学研究部微生物病原学分野の野間口雅子博士と土肥直哉博士には多大なるご指導、ご支援を頂きました。心より感謝申し上げます。

文　献

1) Ramesh Akkina. New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. Virology. 2013 Jan 5;435(1):14-28. PMID: 23217612 DOI: 10.1016/j.virol.2012.10.007.

2) Liang Cheng, Jianping Ma, Guangming Li, Lishan Su. Humanized Mice Engrafted With Human HSC Only or HSC and Thymus Support Comparable HIV-1 Replication, Immunopathology, and Responses to ART and Immune Therapy. Front Immunol. 2018 Apr 19;9:817. PMID: 29725337 DOI: 10.3389/fimmu.2018.00817

3) Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Takaharu Ueno, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa. An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. Blood. 2014 Jan 16;123(3):346-55. PMID: 24196073 DOI: 10.1182/blood-2013-06-508861

4) Daniel T Claiborne, Timothy E Dudek, Colby R Maldini, Karen A Power, Musie Ghebremichael, Edward Seung, Elizabeth F Mellors , Vladimir D Vrbanac, Katharine Krupp, Abigail Bisesi, Andrew M Tager, David M Knipe, Christian L Boutwell, Todd M Allen. Immunization of BLT Humanized Mice Redirects T Cell Responses to Gag and Reduces Acute HIV-1 Viremia. J Virol. 2019 Sep 30;93(20):e00814-19. PMID: 31375576 DOI: 10.1128/JVI.00814-19

5) Madeleine Duc Dodon. Of mice, men, and HTLV-1. Blood. 2014 Jan 16;123(3):303-4. PMID: 24434991 DOI: 10.1182/blood-2013-11-538272