

平成10年度厚生科学研究費補助金  
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

## 総括・分担 研究報告書

「サル等を用いたウイルスベクターの安全性及び  
有効性評価のための実験系の開発に関する研究」

主任研究者 吉倉 廣

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

サル等を用いたウイルスベクターの安全性及び有効性評価のための実験系の開発  
に関する研究

主任研究者 吉倉 廣 国立感染症研究所

研究要旨

アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスを対象に、サルを使用した安全性評価研究を行う事を目的として班を構成した。本年度研究で、本来ヒトに病原性を欠くとされてきたAAVの病原性関与の可能性が否定出来ないことが分かってきた。他方、センダイウイルスベクターについては、サルを使った実験で安全性なワクチンベクターとしての可能性が示唆されるに至った。ヘルペスウイルスについては、遺伝子機能の詳細が解明されつつあり、来年度以降安全性評価を行うこととした。

分担研究者

山田章雄 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター センター長  
佐多徹太郎 国立感染症研究所 エイズ研究センター第3室 室長  
北村義浩 国立感染症研究所免疫部 室長  
神田忠仁 国立感染症研究所遺伝子解析室 室長  
永井美之 国立感染症研究所エイズ研究センターセンター長  
西山 幸廣 名古屋大学医学部附属研究施設ウイルス感染研究部門 教授

ス、AAVについては、神田班員、レトロウイルスについては北村班員、ヘルペスウイルスについては西山班員、センダイウイルスについては永井班員が担当した。サルにおけるウイルス体内分布につき、佐多班員が病理学的解析を行った。実験対象となるサルの免疫学的性質を明らかにしておくことがベクター評価の上で重要であるので、カニクイザルの主要組織適合抗原の解析を山田班員が担当した。最後にこの研究の行政的利用を考慮し、遺伝子治療におけるベクターの使用を再評価する作業を吉倉が行った。

A. 研究目的

遺伝子治療用ウイルスベクターの安全性と有効性の評価の為に系を確立することを研究目標とする。評価系の中で、ヒトに近い霊長類を使用したものは、特に今後重要と思われる。しかし、ベクターの安全性は、ベクターが作られた基となるウイルス自体の性質にも左右される。従って、ベクターとしての改変により基のウイルスとどれくらいヒトへの病原性が低下しているか、又、基のウイルスがヒトに病原性を欠くとされている場合には、ウイルス自体の病原性の再評価が必要である。このような検討を加えつつ、同時に、研究を行政に反映させる為、現在、世界で進行中の遺伝子治療の安全評価を総括し、それぞれのベクターに対する具体的な評価項目の設定を行う事とした。

B. 研究方法

アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスを対象に、サルを使用した安全性評価研究を行う事を目的として班を構成した。サルの実験は、筑波霊長類センターをベースに行った。アデノウイル

C. 研究結果

ヘルペスウイルスベクターの開発と安全性評価：最良のヘルペスウイルスベクター構築の為、ウイルス構造遺伝子のみならずウイルス遺伝子産物の内機能が不明な遺伝子すべてに対する抗体を作成し機能解析をした。US3遺伝子はアポトーシス抑制機能を持ち、UL39は主要抑制機能を持つ事を明らかにした。

センダイウイルスベクターのサル個体レベルでの安全性解析：サル免疫不全ウイルス粒子内蛋白、外皮蛋白及びインフルエンザウイルス血球凝集素蛋白を発現するセンダイウイルスを構築し、サルとマウスに置いてその安全性と良好な免疫誘導性を確認した。

導入効率の良いレトロウイルスベクター系開発：安全なレトロウイルスベクターはマウス白血病ウイルス由来のものであるが、宿主細胞が増殖しないと感染が成立しない。この為、宿主細胞の増殖を誘導する系の確立が必要である。サルでの実験系確立の為にサルのStem Cell Factor とLeptinのcDNAのクローンを分離した。

AAVベクターの安全性有効性の解析：AAVはRep

遺伝子が機能していると染色体の特定部位に組み込まれる。ヒトの組み込み部位配列に対するサルとの相同配列をクローンし、塩基配列を決定した。他方、lacZ遺伝子を持つAAVを独自に開発した。これらは、サルでのAAV体内動態解析に必須なこの2つの道具となる。

ヒト剖検例におけるウイルス抗原存在部位の検索：ベクターの安全性を解析する上で、ベクターが由来した基のウイルスの生体内分布を知る必要がある。この為、種々のウイルス感染におけるアデノウイルス、AAVの臓器内分布を検索した。アデノウイルス感染剖検症例9例の内1例で肺病変部にAAV抗原を検出した。但し、アデノウイルス抗原は何れの症例でも検出し得なかった。種々のウイルス感染症例検体114例につき末梢血のAAV検索を行った処、3例が陽性であった。ヒトパピローマウイルス感染子宮頸部病変につき検索したケースでは、CIN 1、2、3及び頸部がんでそれぞれ25%、8%、21%、63%がAAV陽性であった。これらの結果は導入ベクターと自然感染ウイルスとの相互作用を安全評価の際、考慮しなければならない事を示唆する。

カニクイザル組織適合抗原の解析：医学実験に用いられる頻度の高いカニクイザルのMHCクラスI遺伝子をRT-PCRと塩基配列決定により解析し、新たにA座に3つのアレルを発見した。

ウイルスベクター安全性評価基準の資料作成：本年度からこの作業を開始した。AAVに本当に病原性が無いのか、アデノウイルスベクターの治療中の分泌の問題、パピローマウイルスや肝炎ウイルス感染者におけるウイルスベクターの使用など、幾つかの問題が浮かび上がった。

#### D. 考察

種々のウイルスベクターに関する安全性評価の研究を開始したが、ベクターの基となるウイルスの生物学的性質が、特に生体内での挙動について不明である事が問題であることが認識された。又、生体に自然感染しているウイルスの存在が明らかとなり、これらのウイルスと遺伝子導入ベクターとの遺伝学的相互作用が問題となる可能性が出てきた。最後に、宿主の免疫学的性質が有効性、安全性評価に可成りの影響を及ぼすことが予測されるに至り、安全性評価に於ける宿主の評価の重要性が浮かび上がって来た。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

ウイルスベクターの安全性評価のための研究総括

分担研究者 吉倉 廣 国立感染症研究所・副所長

米国を中心にこれまでに実施された2000以上の遺伝子治療臨床試験では、未だ十分な治療効果をあげた例はない。その最大の原因は遺伝子導入効率の低さにあると考えられ、感染力を強化した新たなベクターの開発や自己増殖能を持ったベクターの研究が進められている。そこで、ウイルスベクターの安全性、有効性評価における問題点を洗い出し、今後どのような前臨床試験のための実験系を作ることが必要かを検討した。既存のベクターの感染力を増強した場合は、生殖細胞を含む非標的臓器への感染の可能性を改めて調べる必要がある。自律複製能を持つ組み換えレトロウイルス（RCR）やアデノ随伴ウイルス（AAV）の病原性の再評価が求められており、レトロウイルスベクターと内在性レトロウイルス、またはAAVベクターと潜伏持続感染している野生型AAVの組み換えによる新たな感染性ウイルス出現の可能性も無視できない。センダイウイルスベクター等の新たなベクターを評価するためには、どのような前臨床試験によって安全性が確保されるのかを明らかにするための検討を始めなければならない。

A. 研究目的

遺伝子治療用ウイルスベクターの安全性、有効性の評価には、動物モデルを使った試験が不可欠である。感染力を高めたベクターが開発されている現状をふまえ、どのような動物モデルの開発と実験系の確立が必要かを整理し、今後のベクターの安全性、有効性評価方法を考える基礎とすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

最新の研究論文、関連学会の要旨集、米国FDA及びNIH/RACの公表文書を集め、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発状況、安全性や有効性評価の問題点を分析した。

C. 研究結果

ウイルスベクターが生殖細胞を含む非標的臓器に感染する可能性については、これまで否定的な成績が多い。しかし、VSV/レ

トロウイルスハイブリッドベクターのように、著しく感染力を強化したベクターの非標的臓器感染については、適切な動物モデルを用いて、改めて検討する必要がある。

これまでの臨床試験の7割以上に使われたレトロウイルスベクターでは、自律複製能を持つ組み換えウイルス（RCR）が、免疫能を低下させたアカゲザルに悪性T細胞性リンパ腫を発症させたことから、RCRの検出と排除に安全性確保の重点が置かれてきた。しかし、RCRの出現が当初の予想を遙かに越えて高頻度であることが判明し、初期の臨床試験では、患者にRCRを含むベクター液を投与していたと推定されている。しかしRCRに起因する病原性についての報告はなく、最近では、ベクター製剤中にどの程度のRCRの混入なら許容できるか議論されている。RCRの病原性について、サルを用いて詳しい解析を行い再評価することが必要である。

今後の発展が期待されている AAV ベクターは、素材となる AAV の生活環に不明な点が多い。最近、早期自然流産と AAV 感染の関連についての報告がなされており、AAV の病原性については再評価が求められる。マウスには認められない AAV 組み込みの標的となる配列がサルに存在するので、サルが AAV の感染モデルとなる可能性は高い。細胞表面のレセプター分子（ヘパラン硫酸と HGF レセプター）が最近明らかにされたので、AAV の体内動態についての詳細な検討が可能となった。

レトロウイルスベクターと AAV ベクターは、それぞれヒト内在性レトロウイルス様配列及び野生型 AAV ゲノムと遺伝子組み換えを起こし、新たな増殖性ウイルスを作る可能性がある。実際レトロウイルスベクターと内在性レトロウイルスとの組み換え体の出現例について最近報告された。この観点からの詳しい研究は殆どないので、今後サルを用いた実験系を作り検討する必要がある。

神経細胞への遺伝子導入ベクターを目指して開発されているヘルペスウイルスベクターは、細胞毒性に関わるウイルス蛋白質がまだ十分明らかにされていない。我が国で開発が進められているセンダイウイルスベクターは、一過性の多量発現が可能な点、組み換え体が生じない点で優れた特色がある。繰り返し投与に対する反応、非標的臓器への遺伝子導入等、安全性に関わる評価を積極的に進める必要がある。

#### D. 考察

遺伝子治療の実用化に向けて、感染力が強化されたウイルスベクターが開発されている。それらのベクターの安全性を、臨床試験を行う研究者とは異なる立場で、ウイルス学的、病理学的に検討する実験系は国内に確立していない。今後、国産ベクターが臨床試験に使われる可能性があることから、ベクターの安全性、有効性を我が国独自に評価するシステムを早急に整備することが求められている。来年度は、欧米の取り組みについて視察し、より詳細な情報を

集める必要がある。

#### F. 研究発表

#### G. 知的所有権の取得

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

## 分担研究報告書

### カニクイザルMHCクラスI遺伝子の解析

分担研究者	山田章雄	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
協力研究者	谷内真由美	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
協力研究者	宇田晶彦	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
協力研究者	向井鎌三郎	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
協力研究者	山田靖子	国立感染症研究所動物管理室

**研究要旨** 我が国で医学実験用に用いられることの多いカニクイザルのMHCクラスI遺伝子をRT-PCRとシーケンシングにより解析した。これまでに報告されているMafa-A01, Mafa-A02とは異なるA座の3alleleが新たに見いだされた。

#### A. 研究目的

医学実験用霊長類を用いた遺伝子治療用ベクターの有効性及び安全性を評価するシステムを確立するうえで、実験に供されるサル類の生理学的、免疫学的特性が明らかにされている必要がある。組織適合抗原複合体(MHC)に関する情報は移植を必要とする実験や、細胞性免疫をパラメーターとする実験系では特に重要である。しかしながら本邦で頻繁に使用されるカニクイザルのMHCに関する研究は乏しい。そこで本研究では、カニクイザルのMHC遺伝子の解析を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

親子関係にある6頭および非血縁関係のカニクイザル末梢血リンパ球からmRNAを抽出し、ヒトHLA特異的プライマーセットを用いてRT-PCRにてcDNAを合成した。得られたPCR産物をプラスミドベクターに挿入し大腸菌に導入、各個体ごとに得られた複

数のクローンをシーケンス解析した。

#### C. 研究結果

父親(208)からは14クローンが得られたが全て同一の塩基配列を示した。この配列は膜貫通領域および細胞質内領域の特徴からA locusであると考えられた。この個体を父親に持つ016からは11クローンが得られ、3種類の異なるalleleの存在が示された。このうち1 alleleは208のものと同じであった。また、016の兄弟である069からは2種類のalleleが得られたがその一方は208と同じであった。これらとは無縁の個体から既に塩基配列のわかっている2 allele (Mafa-A01, Mafa-A02)とこれらのalleleとは異なるものであることが明らかとなった。

#### D. 考察

カニクイザルのクラスI MHCをPCRで増幅し調べたところ5種類のA alleleが検出できた。但し、016で認められた一つのalleleは

RT-PCRの時の人為的な組み替えである可能性もあり、この点に関しては詳細に検討する余地がある。これらはアカゲザルのみならずヒトのHLAとも高い相同性を示した。今回用いたプライマーではB locusは検出できなかったが、これは新たなプライマーを設計すれば恐らく B locus についてもその存在が明らかにできるものと思われる。アカゲザルには存在しないといわれるC locus についても今後調べる予定である。個体数を増やし、霊長類センターで育成しているカニクイザルのMHCタイプが簡便に決定できる方法を開発する予定である。

#### E. 結論

カニクイザルのMHC遺伝子の多型性を解析する基礎的条件を確立することができた。今後個体数を増やしカニクイザルMHCに関する情報を蓄積し、タイピングができるようにする予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fukao, T., Hirano, A., Nakamura, K., Yamazaki, Y., Yamada, A., Tshita, H., Inoue, R., and Kondo, N.: Perinatal mumps associated with bronchiolitis and respiratory distress. *Eur. J. Pediatr.*, 157, 952-953, 1998

Saito, H., Takahashi, Y., Harata, S., Tanaka, K., Sato, H., Suto, T., Yamada, A., Yamazaki, S., and Morita, M.: Cloning and characterization of the genomic RNA sequence of the mumps virus strain associated with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol. Immunol.*, 42, 133-137, 1998

Kawana, R., Kitamura, T., Nakagomi, O., Matsumoto, I., Arita, M., Yshihara, N.,

Yanagi, K., Yamada, A., Morita, O., Yoshida, Y., Furuya, Y., and Chiba, S.: Inactivation of Human Viruses by Povidone-Iodine in Comparison with Other Antiseptics. *Dermatol.*, 195, S2, 29-41, 1997

山田章雄：ムンプスのヒトにおける病理と動物モデル、臨床とウイルス、26、13-16、1998

山田章雄：DNAワクチン、治療学、32、1520-1523、1998

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

# 遺伝子治療の安全性評価法の開発研究

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究協力者：佐藤由子、岩崎琢也、倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨：遺伝子治療は、先天性ないし遺伝性疾患だけでなく、後天性疾患あるいはワクチンの目的にも応用されようとしている。遺伝子治療の安全性評価としては、ベクターの安全性に対する指針の作製と前臨床試験時における霊長類を用いた動物実験系による安全性評価法の確立が必要である。同時に、ウイルスベクターを用いる際には、ヒトにおけるそれらウイルス感染動態を把握しておくことが重要と考えられる。今回アデノウイルス感染症例9例について検討し1例に、病変に一致したAAVの増殖を確認した。また種々のウイルス感染例の末梢血単核球から3例の陽性例を確認した。HPV関連子宮病変から比較的高頻度にAAV DNAを検出した。その個体に感染し潜伏しているAAVとのrecombinationの可能性等について考慮が必要なのかどうかについて今後検討を進めたい。

## A. 研究目的

遺伝子治療は、遺伝子欠損による先天性ないし遺伝性疾患、加齢や種々の要因による生体に必要な分子の低下ないし消失に伴う後天性疾患、あるいは外来性因子—病原微生物に対する防御を高める目的、すなわちワクチンなどに応用されようとしている。

遺伝子治療用ベクターには、ウイルス由来のものとしてウイルス以外に由来するものが知られている。ウイルス由来ベクターには、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、レトロウイルス等が、またプラスミッド由来ベクターがある。ウイルス由来ベクターの多くは、ウイルスの増殖に必要な遺伝子を欠損させたものが開発され、改良が重ねられている。問題としてはウイルス由来である故に宿主の免疫反応を惹起することにより1回しか使えないもの、あるいは一旦はウイルスベクターの増殖の時期を経過することにより、目的外の細胞や組織においてその障害が起こる可能性があることである。レトロウイルスベクターではマウス白血病ウイルスやHIVベクターが考えられており、これらは一旦宿主であるヒトの遺伝子に組み込まれるため、発がん性との関連が懸念されている。一般に挿入遺伝子の発現による効果とその安全性は相容れない問題であるが、ベクターの改善により少しずつ安全性が高まりつつある。

遺伝子治療の安全性に取り組む姿勢としては、ベクターの安全性に対する指針の作製と前臨床試験時における霊長類を用いた動物実験系による安

全性評価法の確立が必要であろう。安全性の評価として、一般的には、接種部位での肉眼所見、組織所見および複製の程度（量）の評価、接種後宿主内でのベクターの広がりとその量、主要臓器における細胞・組織障害の有無と程度、そして臓器の機能障害の有無、さらにベクター投与による予期しにくい障害—自己免疫疾患や腫瘍（がん）の発生の有無を評価することが必要となろう。同時に、ウイルスベクターを用いる際には、ヒトにおけるそれらウイルス感染動態を把握しておく必要がある。一方で、霊長類における目的遺伝子の発現の程度、効果に対する評価法の開発も同時に行われるべきであろう。評価に用いるカニクイサルにおけるサイトカイン等の物質の同定と組換えDNA法による産生、細胞障害性の評価としてサルのMHCの解析も重要である。

ベクターおよび挿入遺伝子の検出系としてはおもにPCRが使用されており、有効なプライマーの開発と同時にそのコピー数の定量化が必要と考えられる。レポーター遺伝子の挿入により広がりやその程度の追跡が可能にするシステムの開発も必要となろう。接種部位や伝播による細胞および組織障害の検出には、従来の組織学的検討のほか、挿入遺伝子のコードする蛋白を検出する免疫組織化学、ベクターを検出するin situ hybridization法の確立が必要となるが、一方で組換えベクターの残存量は少ない可能性があることから、その高感度な検出方法の確立が必要となろう。ある一定期間後には、接種動物



の全身の細胞・組織・臓器を、同様な方法で検索することにより、宿主に与える影響を知ることができると考えられる。また経過観察には、接種動物の臨床的観察のほか、血算、血液生化学、尿、免疫マーカー(自己免疫マーカー、抗体、CTLなど)、腫瘍関連マーカーの測定のほか、接種動物のレントゲン検査、CT、MRI等が必要となろう。

以上の検討項目の中で病理学的検討として、本年度はアデノ随伴ウイルスのヒト体内感染動態について明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ヒトウイルス感染症剖検例における検討。

剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、免疫組織化学的に検討した。抗体はAAVのCap蛋白(VP1-3)に対するモノクローナル抗体をつかい、LASB法により検出した。同時にアデノウイルスおよび一部のヘルペス群ウイルスについても同様に検討した。

### 2. PCR

検体のDNAは通常の方法で抽出した。AAVのPCR法としていくつか報告されている中で、Tobiaschら(J Med Virol 1994, 44;215-222)のPan primer setを用いた。プライマーの配列は、Pan 1が5'-AAC TGG ACC AAT GAA AAC TTT CC-3'で、Pan 3が5'-AAA AAG TCT TTG ACT TCC TGC TT-3'そして2回目のPCRプライマーとして、PanNest 1が5'-AAG GTG CGC GTG GAC CAG AAA TG-3'、PanNest 2が5'-AGT TCA AAT TTG AAC ATC CGG TC-3'である。PCRの増幅条件は92C, 1 min; 62C, 4 min; 92C, 15 secを40サイクル行った。2%アガロースゲルで電気泳動し、221 bpのサイズのバンドが見られるものを陽性とし、PCRバンドを精製後、direct sequenceで特異性を確認した。

## C. 研究結果

### 1. ヒトアデノウイルス感染症剖検例におけるAAVの存在。

国立感染症研究所感染病理部には、14例のアデノウイルス感染症例が収集されている。そのうち9例の肺および全身臓器についてAAVの抗原を検索した。うち1例の肺病変にAAV抗原が病変に一致して検出できた。他の例ではアデノウイルス感染細胞にAAVは検出できなかった。

しかしながら陽性例におけるアデノウイルスは今回確認できず、単純ヘルペスウイルス1型および2型、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルスも確認できなかった。他のヘルペスウイルスについて現在検討している。

### 2. 末梢血単核球におけるAAVDNAの存在。

a) 種々のウイルス感染症例114検体についてAAVのPan primer setを用いたnested PCRにより検索した。うち3例に221 bpの陽性バンドが得られ、direct sequenceでAAVDNAであることを確認した。これらはサイトメガロウイルス陰性でエプシュタインバーウイルスの感染例であった。

b) HIV感染例のPBMC96検体について同様に検討した。その結果、全例陰性であった。

### 3. HPV関連子宮頸部病変におけるAAV

子宮頸部病変由来のDNA検体96例について同様の方法で検討した。子宮病変はCIN 1, 2, 3各24例、および子宮頸癌24例で、それぞれ25%、8%、21%、63%に検出できた。

## D. 考察

アデノ随伴ウイルス(AAV)はワクチン製造のための培養細胞をスクリーニング中に発見された。ParvovirinaeのGenus Dependovirusに分類され、5型(AAV type 1-5)が知られている。AAV-2遺伝子は4,680 bp (GenBank: J01901)からなり、negative senseのlinear single strand DNAで、両端に125 bpのpalindrome sequenceがあり、2種のORFとしてRep (Replication protein)とCap(ウイルス構造蛋白VP1; 87kDa, VP2; 73kDa, VP-3; 62 kDa)からなっている。AAVの細胞内増殖にはヘルパーウイルスの感染が必須であり、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス1型、2型、サイトメガロウイルス、ワクチニアウイルスそして最近ではヒトパピローマウイルスがヘルパーウイルスとして報告されている。これらのウイルス感染細胞でAAVは核内で増殖しウイルス粒子を産生するが、それ以外では19染色体長腕(q)の数100 bpの領域19q13.3-qter(AAVS1)に特異的に、Rep蛋白の作用と関係して1コピーがintegrationする。水平感染で感染しその感染の宿主域は広い。またヒトにおける病気との関連や造腫瘍性は知られていない。

AAVが遺伝子治療用ベクターとして使われてきたのは、19%から70%の高頻度にまた非分裂細胞にもintegrationできること、その染色体部位特異的integrationが可能であること、さらにウイルス自体

によるヒトへの病原性があきらかでないという理由による。しかし実際ヒトではその血清疫学検討から、正常人の85%が抗体を有しているので、多くのヒトがすでにAAVに感染している。また子宮頸癌患者での抗体陽性率は逆に1/3程度であるとも報告されている。AAV DNAは子宮組織や流産組織、子宮頸部組織、子宮頸部病変部にも比較的高頻度に検出されている。*In vitro*では、AAVは子宮頸癌細胞の増殖を抑制し、HPVの造腫瘍性も抑制すること、HPVがAAVのヘルパーとして機能することが報告され、*in vivo*ではHPV関連病変からAAVウイルス粒子が検出されることが報告されている。

ヒト感染組織におけるAAV関連病変についての病理学的報告はほとんどない。さらにそのもとになるヘルパーウイルスの感染病態に与える影響についても全く知られていない。つまり、AAVが非病原性ウイルスであるという根拠はいまだ乏しく完全ではないと考えられる。今回検討した例はアデノウイルス感染症として当感染病理部のファイルに登録されているものに限ったが、1例の陽性例が確認できた。残念ながら、アデノウイルス感染は確認できず、ヘルペスウイルスが考えられたが現在のところヘルパーウイルスは確認できていない。今後、ヘルペス群ウイルス感染症剖検例を中心として、AAV感染例の検索や病態への影響等について検索を進めたい。AAVベクターを用いた遺伝子治療がヒトに行われる際には、ほとんどのヒトが感染している可能性があるため、その個体に感染し潜伏しているAAVとのrecombinationの可能性等について考慮が必要なのかどうかについて、検討を進めたい。HPV感染症との関連については、AAVの腫瘍形成抑制機構に注目されており、*in vivo*での同時感染について若干の報告があるが、わが国におけるAAVの感染状況とともに、HPV関連子宮頸部病変との関連について明らかにしていきたい。

遺伝子治療ベクターの安全性評価系として、ベクターには種々のものが存在するので、それぞれについて検討が必要となるが、まずAAVについて組織学的検討に必要なツールの作製と検討を続け、より高感度の検出系を開発することを目的とした。

## E. 結論

遺伝子治療用ウイルスベクターを用いる際には、ヒトにおけるそれらウイルス感染動態を把握しておく必要がある。今回アデノウイルス感染症例9例

について検討し1例に、病変に一致したAAVの増殖を確認した。また種々のウイルス感染例の末梢血単核球から3例の陽性例を確認した。HPV関連子宮病変から比較的高頻度にAAVDNAを検出した。その個体に感染し潜伏しているAAVとのrecombinationの可能性等について考慮が必要なのかどうかについて、今後検討を進めたい。

## F. 研究発表

### a) 論文発表

1. Ayisi NK, Wiredu EK, Sata T, Nyadedzor C, Tsiagbe VK, Newman M, Cofie CN, Taniguchi K.: T-lymphocytopenia, opportunistic infections and pathological findings in Ghanaian AIDS patients and their sexual partners. *East Afr Med J* 74:784-791, 1997.
2. Brandful JAM, Ampofo WK, Janssens W, Adu-Sarkodie Y, Apeagyei F, Anyomi F, Aidoo S, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Kurata T.: Genetic and phylogenetic analysis of HIV-1 strains from southern Ghana. *AIDS Res Human Retrovirol* 14: 815-818, 1998.
3. Yasuda S, Iwasaki M, Oka S, Naganawa S, Nakasone T, Honda M, Sata T, Kojima A, Matsuda S, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y.: Detection of HIV-Gag p24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol Immunol* 41; 305-311, 1998.
4. Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T, Matsukura T, Manaka I, Nogita T, Ohara K, Kawashima M.: The detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of queyrat invading the urethra. *Br J Dermatol* 138: 188-189, 1998.
5. Requena L, Sarasa JL, Terai M, Sata T, Matsukura T: Lifelong severe verrucosis associated with human papillomavirus type 2. *Br J Dermatol* 139: 1081-1086, 1998.
6. Yanagihara M, Fujii T, Mochizuki T, Ishizaki H, Sata T.: Measles virus was present in the inner cell of the acrosyringium in the skin rash. *Pediatric Dermatol* 15:456-458, 1998.
7. 佐多徹太郎: 新しい腫瘍ウイルスHHV8. 医学のあゆみ. 184; 138-139,1998.
8. 岩崎琢也, 佐多徹太郎, 倉田 毅: 種々の免疫不全におけるサイトメガロウイルス感

- 染の病理像。日本臨床 56: 115-120, 1998.
9. 村木良一、岩崎琢也、佐多徹太郎：带状疱疹の病理—皮膚部の病理組織学的観察から—。日本ペインクリニック学会誌 5;86-91, 1998.
  10. 三石 剛、川島 真、佐多徹太郎：Bowen病とヒト乳頭腫ウイルス。臨床皮膚科 1998
  11. 佐多徹太郎：カポジ肉腫とHHV8。皮膚科診療プラクティス。本田まり子編。文光堂。1998, pp205-207.
  12. 佐多徹太郎、喜納奈緒、寺井政憲：HIVとHPV。病理と臨床 16:832-836, 1998.
  13. 佐多徹太郎：HIV感染者にみられる悪性腫瘍。化学療法の領域 14;2163-2169, 1998.
- b) 学会発表
1. 涌井史典、原 弘之、藤塚章子、野口義久、本多章乃、落合豊子、森嶋隆文、柴田明彦、佐多徹太郎：AIDS関連Kaposi肉腫—HHV8の検出（PCR法）と細胞増殖能の検討—。日本皮膚科学会東京地方会。1998年1月、東京。
  2. 熊坂利夫、佐多徹太郎、岩崎琢也、植草利公、須田耕一、倉田 毅：膠原病肺におけるKSHV(HHV8)の検出。第87回日本病理学会総会 1998年4月、広島。
  3. 岩崎琢也、笠原健弘、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田 毅：VZV感染における前初期蛋白ORF63産物の発現。第87回日本病理学会総会 1998年4月、広島。
  4. 涌井史典、原 弘之、藤塚章子、野口義久、本多章乃、落合豊子、森嶋隆文、柴田明彦、佐多徹太郎：AIDS関連Kaposi肉腫—HHV8の検出。日本皮膚科学会総会。1998年5月、大阪。
  5. 藤塚章子、涌井史典、原 弘之、野口義久、本多章乃、落合豊子、森嶋隆文、柴田明彦、佐多徹太郎：電子線照射が奏功したAIDS関連Kaposi肉腫。皮膚悪性腫瘍学会。1998年5月。
  6. 柏瀬光寿、山内康行、箕田 宏、白井正彦、佐藤由子、岩崎琢也、佐多徹太郎、倉田 毅：AIDS患者に発症したウイルス性網膜炎とその病理学的検索。ヘルペスウイルス研究会。1998年5月、富山。
  7. 余田敬子、荒牧 元、佐多徹太郎、倉田 毅：咽頭扁桃炎とヘルペス群ウイルスの関係についての検討。日本耳鼻咽喉科学会総会。1998年5月、札幌。
  8. 柏瀬光寿、山内康行、箕田 宏、白井正彦、吉田信一、服部雅俊、福武勝幸、佐藤由子、岩崎琢也、佐多徹太郎、倉田 毅：サイトメガロウイルス網膜炎に続発したPORN様単純ヘルペスウイルス1型網膜炎を呈したAIDS患者の1例。眼感染症学会。1998年6月、京都。
  9. 寺井政憲、高木 実、佐多徹太郎：各年齢層の正常口腔粘膜におけるヒトパピローマウイルス(HPV)感染。第9回日本口腔病理学会総会。1998年9月、広島。
  10. 佐多徹太郎：ヒトヘルペスウイルス8型と関連病変。日本ウイルス学会総会シンポジウム。1998年10月、東京。
  11. 中島典子、花木賢一、野崎周英、水野喬介、佐多徹太郎、吉倉 廣：新しい核酸検出系を用いたHCVゲノムの検出。日本ウイルス学会総会。1998年10月、東京。
  12. 寺井政憲、高木 実、佐多徹太郎：正常口腔粘膜におけるヒトパピローマウイルス(HPV)感染について。第57回日本癌学会総会。1998年10月、横浜。
  13. 佐多徹太郎：HPVないしHHV8と皮膚病変。第50回日本皮膚科学会西部支部総会・学術大会。1998年11月、米子。
  14. 佐多徹太郎、寺井政憲、倉田 毅：エイズ剖検例のHIV-1 V3領域の解析。第12回日本エイズ学会総会。1998年12月、東京。
  15. 片野晴隆、倉田 毅、佐多徹太郎、森 茂郎：AIDS合併カポジ肉腫患者におけるHHV8 ORF59の解析。第12回日本エイズ学会総会。1998年12月、東京。
  16. 寺井政憲、高木 実、佐多徹太郎：HIV感染者の口腔におけるHPV感染。第12回日本エイズ学会総会。1998年12月、東京。
  17. 柏瀬光寿、永田洋一、山内康行、佐藤由子、岩崎琢也、佐多徹太郎、望月 學、岩本愛吉、白井正彦、倉田 毅：AIDS患者におけるサイトメガロウイルス網膜炎の眼病理組織学的検討。第12回日本エイズ学会総会。1998年12月、東京。
  18. 石川晃一、Brandful J, 櫻井範子、Barnor J, Ampofo W, 佐多徹太郎、山本直樹、倉田 毅：ガーナにおけるHIVサブタイプの解析。第12回日本エイズ学会総会。1998年12月、東京。
  19. 向井鐮三郎、佐多徹太郎、宇田晶彦、村山裕一、

小松原博文、毒島孝治、小野文子、森 一泰、倉田 毅、山田章雄：サル脳炎組織由来 SIV 持続感染細胞株の樹立とそのエイズ脳症における役割。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。

20. 多田隈圭、大谷 功、小野文子、山田章雄、佐多徹太郎、森 一泰、森豊隆志、出雲周二、納 光弘：Differential localization of SIV in lymph nodes in mokeyes infected with nef+ and nef mutant of SIV. 第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。

# 分担研究報告書

## レトロウイルスベクターの安全性評価に関する研究

分担研究者 北村義浩 国立感染症研究所免疫部免疫細胞室 室長

### 研究要旨

サルの造血幹細胞を培養する上で必要なstem cell factor とleptinのcDNAをクローン化した。

#### A.研究目的

造血幹細胞への遺伝子導入は、その結果としてすべての血液系細胞への遺伝子導入が行われるという点で、最も期待されている。しかし、ベクターに自律増殖可能なウイルス(RCR)が混入していた場合それがどの程度危険かについては全く不明である。そこで、サルの造血幹細胞にマウス白血病ウイルス(MLV)を感染させてサルに移植し、その病原性を調べることを目的とする。

従来、ヒトやマウスでの研究から造血幹細胞への感染効率を上昇させるサイトカイン・成長因子として、造血幹細胞因子(stem cell factor, SCF)、interleukin-6, soluble-interleukin-6 receptor, leptinが知られている。しかし、interleukin-6以外は、サルでのcDNAがクローン化されておらないので本年は、これらをクローン化することとした。

#### B.研究方法

サル末梢血、サル骨髓細胞から、それぞれmRNAを調製し、これらを鋳型として、PCR法で各サイトカインcDNAをクローン化した。

#### C.研究結果

サルの造血幹細胞を培養する上で必要なStem cell factor とleptinのcDNAをクローン化した。

#### D.考察

今後は、我々のクローン化したSCFのcDNAを用いて組み替えSCF大量に合成する方法を確立する。SCFをもちいて造血幹細胞に対しMLVを感染させる方法の確立に向けての基礎的成果が得られた。

#### E.研究発表

Kitamura Y, Tetsuya Ishikawa T, Okui N, Kobayashi N, Kanda T, Shimada T, Miyake K, and Yoshiike K. Intracellular expression of a single-chain antibody against integrase of human immunodeficiency virus type 1 inhibited the viral replication at both early and late steps of the viral

life cycle. *J AIDS and Hum Retrovirol.* **20(2):** 105-114, 1999

Okui N, Kobayashi N, and Kitamura Y. Production of uninfected human immunodeficiency virus type 1 containing viral protein R fused to a single-chain antibody against viral integrase. *J Virol.* **72(8):**6960-6964, 1998.

Yajima T, Kanda, T, Yoshiike, K, and Kitamura, Y. Retroviral vector targeting human cells via c-Kit-stem cell factor interaction. *Hum Gene Ther.* **9:779-787**, 1998.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

アデノ随伴ウイルス及びアデノ随伴ウイルスベクターの  
サルにおける病原性と安全性の評価技術の開発に関する研究

分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

患者体内へ直接投与し、治療用遺伝子を細胞 DNA に組み込むベクターになりうると期待されているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの安全性、有効性を評価するサル実験系の作製を目的としている。AAV が、ゲノムを組み込む領域である AAVS1 のサルホモログの存在を確認し、それを単離した。また、サルに実験的に接種するために lacZ 遺伝子を持つ AAV ベクターを作製し、サル CV-1 細胞への遺伝子導入を確認した。これらの成績は、AAV の体内動態や AAV ベクター、AAV ウイルス及びヘルパーウイルスとの重感染によるベクターレスキュー等を検討するモデルとしてサルを使うことができる可能性を示している。

A. 研究目的

遺伝子治療用ウイルスベクターとして、実用化が進められているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの安全性、有効性を評価する前臨床試験を行うサル実験系の確立を目的とする。

B. 研究方法

野生型 AAV は、完全長ウイルスゲノム（相補鎖と共に 2 本鎖 DNA としてクローン化されているもの）を米国 ATCC から入手し、この DNA を HeLa 細胞に導入後、アデノウイルス 5 型を感染させ、細胞核抽出液から回収した。組み換え AAV ベクターは、CMV 初期プロモーターに lacZ 遺伝子をつないだ発現カセットの両端に AAV の ITR をつなぎ、Rep/Cap 発現ベクター、アデノウイルス 5 型の VA、E4 領域と共に 293 細胞に導入して、96 時間後にやはり細胞核抽出液から回収した。これらの粒子は、必要に応じて、塩化セシウム平衡遠心を 2 度繰り返す方法で精製した。

AAV キャプシド蛋白質（VP-3）をマルトース結合蛋白質との融合体として大腸菌で発現させ、精製したものを抗原としてウサギを免疫し、抗血清を得た。

C. 研究結果

AAV はヒト細胞に感染すると、ウイルスゲノムを AAVS1（19 番染色体の特定の領域）に組み込んで潜伏持続感染し、ヘルパーウイルスが重感染するまで安定して維持される。従って、サルが AAV 感染モデルになりうるか検討するためには、サルにおいても同様な感染様式をとることが重要である。そこで、サル細胞における AAVS1 ホモログの存在を検討した。まず、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーからヒト AAVS1 領域をクローニングした。ついで、これをプローブにサルホモログの存在をサル CV-1 細胞 DNA を対象に、サザンハイブリダイゼーションで検討したところ、極めて塩基配列がよく似たサルホモログの存在が認められたので、その領域をクローニングした。マウスに AAVS1 のホモログは存在しなかった。

アデノ随伴ウイルスは単独で増殖しないため、組織内のゲノムの存在を検出するには高感度の PCR 系が必要である。プライマーや反応条件を最適化し、105 細胞に 1 コピーのウイルスゲノムを検出可能な実験系を作った。

サルに実験的に接種するために lacZ 遺伝

子を持つアデノ随伴ウイルスベクターを複製した。このベクターはサル CV-1 細胞に感染し、lacZ 遺伝子を組み込むことができた。

#### D. 考察

AAV が AAVS1 にゲノムを組み込んで潜伏持続感染する性質は、これまで病原性が報告されていないこと、どのような細胞にも感染すること、ウイルス粒子が物理的に安定なこととあいまって、直接患者体内に接種し治療用遺伝子を細胞 DNA に組み込むベクターに適していると考えられ、実用化に向けた取り組みが進められている。しかし、アデノ随伴ウイルスが細胞 DNA に組み込まれる機構やヘルパーウイルスの感染によって突然増殖を始める機構をはじめ、多くのヒトが感染しているとされるものの体内でどこに潜伏しているのか、実際にどんなウイルスがヘルパーとして働いているのか等は未だ不明である。また、AAV ベクターが臨床応用された際に予想される危険性のひとつは組み込まれたベクターが野生型ウイルスとヘルパーウイルスの重感染でレスキューされ、患者から新たな感染がおこることである。これらを実験的に検討するためには、AAV 感染動物モデルが不可欠であり、AAVS1 サルホモログの存在はサルが有用な実験モデルとなる可能性を示している。

#### E. 結論

サル CV-1 細胞に AAVS1 のホモログが存在することがわかった。AAV ベクターは CV-1 細胞に感染した。これらの成績は、サルが AAV 感染モデルとなる可能性を示している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2

capsids J. Virology. 72, 10298-10300, 1998.

- 2) Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. BBRC 249, 258-262, 1998.
- 3) Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshiike, K., and Kanda, T.: A surface Immunodeterminant of human Papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. Virology 245, 353-359, 1998.
- 4) Kawana, K., Kawana, T., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Correlation between Antibody Titers against Adeno-Associated Virus 2 and Human Papillomaviruses in Women with Cervical Lesions or Condyloma. 投稿中。

#### 2. 学会発表

- 1) 小塚拓洋、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス持続感染細胞でのウイルス遺伝子の発現。第 46 回日本ウイルス学会総会。
- 2) 川名 敬、神田忠仁：ヒト血清中の抗アデノ随伴ウイルス 2 型抗体の検討。第 46 回日本ウイルス学会総会。

#### G. 知的所有権の取得

なし。

## センダイウイルス(SeV)ベクターの個体レベルでの有効性と安全性

分担研究者	永井 美之	国立感染症研究所エイズ研究センター長 東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部教授（併任）
共同研究者	加藤 篤 狩野 宗英	東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部助手 国立感染症研究所エイズ研究センター研究員

### 研究要旨

センダイウイルス(SeV)ベクターを遺伝子治療に応用するための有効性及び安全性に対する検討を以下の3種のベクターを作製し行った。(1)サル免疫不全症ウイルス(SIV)の構造蛋白Gagを発現するベクター、(2)ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)の構造蛋白Envを発現するベクター、(3)H5型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質(HA)を発現するベクターを作製し動物実験を行った[カニクイサル(1)、マウス(2)(3)]。動物実験では、SeVベクターによる良好な遺伝子発現とその効果による免疫能の獲得および安全性が確認された。SeVベクターは、将来的に遺伝子治療用の臨床応用可能なベクターとして有望であると考えられる。

### A. 研究目的

センダイウイルス(SeV)は、マウスを自然宿主とする呼吸器感染症を起こすRNAウイルスである。近年、本ウイルスゲノムcDNAからウイルスを生成する技術が確立し、ウイルスベクター化が開始された。SeVは、独自のRNAポリメラーゼを持ち、細胞質内で核内染色体に影響を与えずに増殖する特徴があり、ヒトに対して明らかな病原性を認めないため、高効率で安全な遺伝子治療用ウイルスベクターとしての発展が期待される。本研究では、SeVベクターを遺伝子治療に応用するための有効性及び安全性の検討を目的とする。

検討内容は、(1)サル免疫不全症ウイルス(SIV)の構造蛋白Gagを発現するベクター(SeV/SIV-gag)、(2)ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)の構造蛋白Env(gp140, gp160)を発現するベクター(SeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160)、(3)H5型インフルエンザウイルス(H5N8)のヘマグルチニン蛋白質(HA)を発現するベクター(SeV/tukH5)を作製し、遺伝子導入後の抗原発現による免疫応答と安全性について動物実験で評価する。

### B. 研究方法

SeVベクター(SeV/SIV-gag, SeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160, SeV/tukH5)を作製し、培養細胞系での感染実験でそれぞれの遺伝子発現を確認した。

(1) 異種遺伝子の挿入されていない組換えセン

ダイウイルスであるSeV/V(-)を1頭、それに異種遺伝子gagを組み込んだSeV/SIV-gagを2頭のカニクイサルに $10^8$  CIU経鼻投与した。発熱、体重、食欲などの臨床症状、気道内と血液中でのウイルスの動態検査、血液検査(血算、CD2/4/8比率)、免疫応答検査を行った。

(2) 3週齢のメスBalb/cマウスにSeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160を $10^7$  CIU気道内投与を行い、4週後に解剖、採血を行った。採取血清を用いてNL4-3 gp140に対する結合抗体の有無をELISAで測定、NL4-3中和試験を行った。

(3) 3週齢のメスICRマウスにSeV/tukH5を $10^7$  CIU/mouse気道内投与を行い、4週後野生型H5インフルエンザ接種を行いインフルエンザ防御能の有無を検討した。

### C. 研究成果

(1) SeV/V(-)およびSeV/SIV-gagを投与されたカニクイサルには、呼吸器症状など臨床症状に特記すべき変化は認められなかった。鼻腔粘膜内でのSeVの増殖は確認されたが、血中では確認できなかった。血液検査では、血算、CD2/4/8比率に変化を認めなかった。血清中の抗SeV IgGの産生が確認された。今後CTL試験、SIV接種試験を行う予定である。

(2) SeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160を投与したマウスでは、投与後初期の体重増加不良、解剖所見では肺炎が全例に認められたが、病死するものはなかった。抗gp140 IgGの産生をELISAで確認した。NL4-3に対する中和試験では、50-



75%の感染性抑制を認めた。SeV/NL-gp140とSeV/NL-gp160に中和能の差は認められなかった。

(3) SeV/tukH5を投与されたマウスでは、投与後初期の体重増加不良、解剖所見では肺炎が全例に認められたが、病死するものはなかった。SeV/tukH5投与マウスは、野生型H5インフルエンザウイルス攻撃に耐えることが出来た。

#### D. 考察

(1) SeV/SIV-gagをカニクイサルに投与する実験では、少なくともカニクイサルに重篤な呼吸器疾患を起こさないことが確認できた。今後のCTL試験、SIV接種試験の結果を考慮して、サルの頭数を増やし有効性と安全性の検討を重ねたい。

(2) SeV/NL-gp140、SeV/NL-gp160をマウスに投与する実験では、投与されたSeVベクターは本来のSeVより弱毒化しており、マウス血清にHIV中和活性も認められた。HIVに対するlive vectorとしての応用が期待される。

(3) SeV/tukH5は、マウスに対して弱毒化しており、投与されたマウスはインフルエンザに対する防御能を獲得した。強毒H5型インフルエンザウイルスはニワトリ胚に対する病原性が強くワクチン生産が困難なため、SeVベクターのインフルエンザワクチン用ベクターとしての応用も期待される。

#### E. 結論

今回の検討では、SeVベクターによる遺伝子導入とその効果による抗原発現により、個体レベルでの良好な免疫応答を確認できた。また、投与された動物に対して重篤な病原性を認めなかった。従来ウイルスベクターよりも、安全で高効率のベクターとなる可能性があると考えられる。

#### F. 研究発表

1 論文発表  
なし

2 学会発表

1) 第46回日本ウイルス学会総会(東京): インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)のセンダイウイルスベクターによる発現、加藤 篤、山口成夫、清谷克寛、塚本健司、河岡義裕、喜田 宏、坂井(田川)優子、塩田達雄、吉田哲也、永井美之

#### G. 知的所有権の取得状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
（統括・分担）研究報告書

サル等を用いたウイルスベクターの安全性及び有効性評価のための実験系の  
開発に関する研究

・分担課題 ヘルペスウイルスベクターの安全性の評価技術の開発に関する研究

分担研究者 西山 幸廣 名古屋大学医学部教授

研究要旨

遺伝子治療の目的に沿った最良のヘルペスウイルスベクターの開発のための基礎研究として、ウイルス遺伝子産物の機能の解明、増殖機構の解析を行うとともに、ベクターの有効性、安全性評価のためのマウスモデル系を確立した。

A. 研究目的

ウイルスを遺伝子治療のベクターとして利用する試みは、米国を中心に臨床応用へと進められており、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスなどがベクターとして用いられている。しかし、いずれの場合も期待した成果が得られているとは必ずしも言えず、今後もベクター改良への継続的努力が要請されている。ヘルペスウイルス群の共通した特徴は、大きなDNAゲノムを有すること、持続感染を起すこと、核内で複製することなどであるが、これらの特徴はベクターへの利用を考える時、負荷しうる情報量が大きく、かつ安定に維持されうることを意味し、利点となる。現在、単純ヘルペスウイルス（HSV）をベースとしたベクターは、二つの方向での利用が考えられている。一つは、HSVの細胞傷害性、およびチミジンキナーゼ（TK）を利用した悪性腫瘍治療用ベクターとしての方向、他の一つは特定の細胞群への遺伝子導入用ベクターとしての方向である。しかし、いずれにしても現在用いられているHSVベクターは、標的細胞の選択、細胞傷害性の制御などに成功しているとはいえ、臨床応用には安全性の上でも問題点が多い。

本研究では、遺伝子治療の目的に沿った最良のヘルペスウイルスベクターの開発を念頭に、単純ヘルペスウイルス遺伝子産物の機能、増殖機構の解析を行い、臨床応用可能なベクター開発のための基本的情報の蓄積を目指す。また、既存の

ヘルペスウイルスベクターの有効性、安全性評価のための実験系を確立する。

B. 研究方法

1) ヘルペスウイルスベクターの安全性評価系の確立を念頭に、単純ヘルペスウイルス（HSV）の毒力（病原性）を定量的に、かつ感度よく測定するマウス実験系を確立したので、この系の有用性についてさらに検討を加える。

2) 実用的なヘルペスウイルスベクターを開発・改良するために、粒子形成に必要な最小ウイルス遺伝子群、細胞傷害に関わるすべての遺伝子群を同定する。HSVのカプシド形成、DNA複製、DNAパッケージングに必須と考えられる遺伝子の真核発現系を作製しco-transfection系でのカプシド形成、DNA複製、DNAパッケージングについて検討する。また、機能の全くわかっていないHSV遺伝子産物の基本的性状についても検討を加える。

C. 研究結果

1. HSVのカプシド形成に必須な遺伝子5種すべて、ウイルスDNAパッケージングに必須な遺伝子7種のうち3種の真核発現系及び特異抗体を作製した。co-transfection系を用いて相互作用に関して検討している。

2. 機能のわかっていないアクセサリ遺伝子5種（UL4, UL16, UL51, UL55, US2）の真核発現系、特異抗体を作製し、それらを用いて遺伝子産物の同定、

基本的性状を明らかにした。

3. HSVのUS3遺伝子はプロテインキナーゼ (PK) をコードするが、このUS3PKはアポトーシスの抑制に関与していることをマウスモデル系において明らかにした。

4. HSVのUL39遺伝子は、リボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニットをコードするが、UL39欠損ウイルスはヌードマウスを宿主としたヒト膀胱癌腹腔播種モデルにおいて腫瘍抑制ベクターとして単独、あるいはGanciclovirとの組み合わせで有効であることが分かった。

#### D. 考察

1. カプシド構成蛋白質およびカプシド形成に関わる蛋白質についてはかなり詳細にわかっているが、DNAパッケージングについては関与している遺伝子の同定はなされてはいるものの個別の機能についてはよくわかっていない点が多い。カプシド蛋白質とパッケージング蛋白質の相互作用について今後検討する必要がある。

2. US3PKを欠損したウイルスは感染細胞にアポトーシスを誘導するし、そこでの増殖は制限される。また、ヌクレオチド系抗ウイルス剤に対して高感受性を示す。この特性をうまく利用した悪性腫瘍治療用ベクターを構築できる可能性が示唆された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Goshima, F., Daikoku, T., Yamada, H., Oshima, S., Tsurumi, T., and Nishiyama, Y. Subcellular localization of the US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2. *Archives of Virology* 143: 1 - 10 (1998)
2. Oshima, S., Daikoku, T., Shibata, S., Yamada, H., Goshima, F., and Nishiyama, Y. Characterization of the UL16 gene product of herpes simplex virus type 2. *Archives of Virology* 143: 863 - 880 (1998)
3. Yamada, H., Jiang, Y. -M., Oshima, S., Wada, K., Goshima, F., Daikoku, T., and Nishiyama, Y. Characterization of the product of the UL4 gene of herpes simplex virus type 2. *Archives of Virology* 143: 1199-1207 (1998).
4. Yamada, H., Jiang, Y. -M., Oshima, S.,

Daikoku, T., Yamashita, Y., Tsurumi, T., and Nishiyama, Y. Characterization of the UL55 gene product of herpes simplex virus type 2. *Journal of General Virology* 79: 1257- 1264 (1998)

5. Iwayama, S., Ono, N., Ohmura, Y., Suzuki, K., Aoki, M., Nakazawa, H., Oikawa, M., Kato, T., Okunishi, M., Nishiyama, Y., and Yamanishi, K. Antiherpesvirus activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine (A-5021) in cell culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:1666-1670 (1998).

6. Ono, N., Iwayama, S., Suzuki, K., Sekiyama, T., Tsuji, T., Okunishi, M., Daikoku, T., Nishiyama, Y. Mode of action of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis (hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl]methyl] guanine (A-5021) against herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2095-2102 (1998).

7. Jiang, Y.-M., Yamada, H., Goshima, F., Daikoku, T., Oshima, S., Wada, K., and Nishiyama, Y. Characterization of the US2 gene product and its defective mutant of herpes simplex virus type 2. *Journal of General Virology* 79: 2777-2784 (1998)

8. Daikoku, T., Ikenoya, K., Yamada, H., Goshima, F., and Nishiyama, Y. Identification and characterization of herpes simplex virus type 1 UL51 gene product. *Journal of General Virology* 79: 3027-3031 (1998)

9. Asano, S., Honda, T., Goshima, F., Watanabe, D., Miyake, Y., Sugiura, Y., and Nishiyama, Y. US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *Journal of General Virology* 80: 51-56 (1999)

10. Watanabe D., Adachi, A., Tomita, Y., Yamamoto, M., Kobayashi, M., and Nishiyama, Y. The role of polymorphonuclear leukocyte infiltration in defending of murine skin against a herpes simplex virus infection. *Archives of Dermatological Research* 291: 28-36 (1999)

#### F. 知的所有権の所得状況

特になし