

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

アデノ随伴ウイルス Rep 蛋白質の機能と
ベクターの安全性に関する研究

主任研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは治療用遺伝子を非増殖細胞を含む種々の細胞に導入し、細胞染色体に組み込むベクターとして期待されている。しかし、AAVの生活環には不明な点が多く、AAVの潜在的な病原性についても未だ十分明らかにされていない。今年度は、AAV潜伏持続感染細胞でのウイルスゲノムの転写活性を調べて、これまで言われてきたようにゲノムが完全に沈黙するわけではなく、微量のRep蛋白質が発現し続けることを明らかにした。さらに、Rep蛋白質はAAVの増殖を制御するだけでなく、細胞蛋白質の合成を阻害することがわかった。また、AAVは9割以上のヒトに感染していることがわかり、アデノウイルスだけでなくヒトパピローマウイルスが個体でのヘルパーウイルスになっている可能性が示唆された。AAVベクターを作製しマウス脳内に接種したところ、神経細胞へ遺伝子が導入され、直接投与に適したAAVベクターの有用性が確認された。今後AAVの感染様式、増殖機構やRep蛋白質の機能を詳細に調べ、安全にベクターに利用する方法を確立することが求められている。

A. 研究目的

遺伝子治療を真に実用化するために、現在最も必要とされているものは、非増殖細胞を含む様々な細胞に効率良く遺伝子導入が可能で、しかも導入遺伝子を細胞染色体に組み込んで長期間安定に発現させることができる安全なベクターである。AAVはこのようなベクターを作るための素材として優れている。しかし、これまで開発されたAAVベクターには、Rep蛋白質の機能を含むものは無く、遺伝子をヒト19番染色体長腕の特定の領域（AAVS1）に組み込むことができるAAVの特徴は生かされていない。AAVのRep蛋白質機能を利用した実用的なベクターの開発と、その安全性の検討を行う。

実際にGM1ガングリオシドーシスモデルマウス（ β -Galノックアウトマウス）のAAVベクターによる実験的遺伝子治療を行い、AAVベクターの有効性、問題点を検討

すること、AAVの病原性について再評価することも併せて本研究の目的である。

B. 研究方法

AAV潜伏持続感染細胞を新たに樹立し、AAVゲノムの発現と細胞増殖能を調べた。レポーター遺伝子の発現に対するRep蛋白質の影響は、両遺伝子発現プラスミドを同時に細胞へ導入する実験とin vitro転写及び翻訳系に大腸菌で作製したRep蛋白質を添加する実験で検討した。

ヒト血清中の抗AAV抗体は、大腸菌で作製したRep及びCap蛋白質を抗原とするELISAによって測定した。

マウス酸性 β -ガラクトシダーゼ（ β -Gal）遺伝子を発現する組み換えAAVベクターを作り、2日齢の β -Galノックアウトマウス脳内に接種（約100感染単位）した。脳凍結切片を酸性条件下でX-gal染色し、 β -Galの発現を調べた。

C. 研究結果

複数の AAV 持続感染 HeLa 細胞株で、Rep 遺伝子の発現が認められ、細胞増殖能の低下がみられた。Rep 蛋白質は細胞蛋白質合成を抑制することも明らかになり、AAV の細胞毒性の、少なくとも一部はこの活性によるものと考えられた。

血清中の抗 AAV 抗体調査から、日本人の 90% は 10 才頃までに AAV に感染することが示された。また、ヒトパピローウイルス (HPV) 抗体価と抗 AAV 抗体価に相関が見られ、HPV が AAV のヘルパーとなっている可能性が示唆された。

マウス酸性 β -Gal 発現 AAV ベクターを作った。このベクターはマウス細胞に β -Gal 遺伝子を導入するばかりでなく、2 日齢 β -Gal ノックアウトマウス脳内への接種で神経細胞に遺伝子を導入し、安定に発現させた。

D. 考察

AAV の生活環は遺伝子治療用ウイルスベクターの素材として優れているが、ほぼ全てのヒトに感染していると考えられることから、AAV ベクターを投与された患者体内での野生型 AAV とベクターの遺伝子組み換えによるベクターレスキューの可能性について検討する必要がある。また、これまで明確な病原性については知られていないものの、初期自然流産時の子宮内組織での AAV ゲノム検出、ヒトにおいて HPV が AAV のヘルパーになる可能性、HPV 陽性の子宮頸癌での AAV ゲノムの存在等の報告は、改めて AAV の潜在的な病原性について検討する必要性を示している。

AAV の特性を完全に生かしたベクターを作るには、Rep 蛋白質が細胞毒性を示す機構を明らかにし、細胞毒性を除いた Rep 蛋白質を AAVS1 への組み込みに利用する戦略が求められる。Rep 蛋白質による細胞蛋白質合成の阻害活性は、組み込み活性と分離できる可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

β -Gal ノックアウトマウスの AAV ベク

ターによる実験治療では、ベクター接種後少なくとも 6 週まで、導入した β -Gal 遺伝子の発現が認められている。このベクターは、ランダムに遺伝子を組み込むものの、個体への直接接種によって神経細胞への遺伝子導入が可能な点で AAV ベクターの優れた性質を発揮しており、今後導入遺伝子の発現量、発現部位、発現の継続性、治療効果を検討する。

E. 結論

AAV は潜伏持続感染した細胞で完全に沈黙するわけではなく、微量の Rep 蛋白質を発現し続けることがわかった。Rep 蛋白質は細胞蛋白質の合成を阻害するので、少なくともこの活性を取り除いてベクターに利用する必要がある。AAV ベクターは、マウス脳内への直接接種で神経細胞に遺伝子を導入した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomaviruses 16 and 6. J. Virol. 1999. in press.
- 3) Kitamura Y., Ishikawa, T., Okui, N., Kobayashi, N., Kanda, T., Shimada, T., Miyake, K., and Yoshiike, K.: Inhibition of replication of HIV-1 at both early and late stages of the viral life cycle by single-chain antibody against viral integrase. J. AIDS and Human Retrovirology 20, 105-114, 1999.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Yajima, T., Kanda, T., Yoshiike, K., and Kitamura, Y.: Retroviral vector targeting human cells via c-kit-stem cell factor interaction. *Human Gene Therapy* **9**, 779-787, 1998.
- 7) Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshiike, K., and Kanda, T.: A surface Immunodeterminant oh human Papiilomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology* **245**, 353-359, 1998.
- 8) Ogura A, Inoue K and Matsuda J. : Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum Reprod*, in press.
- 9) Mochida K, Wakayama T, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Ogura A and Matsuda J. :Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. *Theriogenology*, 51: 171, 1999.
- 10) Mochida K, Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O and Ogura A. :Birth of pups by transfer of Mastomys (*Praomys coucha*) embryos cryopreserved by vitrification. *Biol Reprod*, 51 Suppl 1:180-181,1998.
- 11) Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y and Matsuda J. : Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5611-5615, 1998.
- 12) 松田潤一郎、ノックアウト動物。高橋迪雄監修: 哺乳類の生殖生物学。東京、学窓社、1999年3月、pp.248-256.
2. 学会発表
- 1) 神田忠仁 : ヒトパピローマウイルスと子宮頸がん。第65回北海道癌談話会。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 柗元 巖、神田忠仁 : ヒトパピローマウイルス E6蛋白質と hMCM7蛋白質の結合。第46回日本ウイルス学会総会。
- 5) 神田忠仁、川名 敬、柗元 巖、松本光司 : HPVによるがんとその予防。第57回日本癌学会総会。
- 6) 神田忠仁 : ヒトパピローマウイルスと子宮頸がん。日本学術会議50周年記シンポジウム。
- 7) 松田潤一郎、大島章弘、鈴木治、小倉淳郎、野口 章、持田慶司、山本美江、高野薫、野口洋子、中山一栄、滝本一広、北村義浩、神田忠仁、伊藤雅之、高嶋幸男、鈴木義之 : GM1-ガングリオシドーシスマウスのアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の試み、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
- 8) 小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木治、種村健太郎、野口洋子、山本美江、持田慶司、野口章、高野薫、中山一栄、関口富士男、小林洋四郎 : マウス一次精母細胞を用いた顕微受精による産子の作出、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
- 9) 山本美江、種村健太郎、鈴木治、松田潤一郎、持田慶司、野口章、中山一栄、野口洋子、高野薫、小倉淳郎 : ネフローゼ発症モデルマウス腎のDD/RT-PCR法による遺伝子発現パターンの解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、

松本。

- 10) 持田慶司、松田潤一郎、山本美江、野口洋子、高野薫、黒沢重利、小倉淳郎：マストミス胚の移植とガラス化法による凍結保存、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
- 11) 野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、種村健太郎、野口洋子、中山一栄、鈴木治、小倉淳郎、松田潤一郎、大山雄二、浜本敏郎、辻崇一： α 2,3シアル酸転移酵素 (ST3Gal II) 遺伝子導入マウスの作出と解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
- 12) 小倉淳郎、持田慶司、山本美江、野口洋子、種村健太郎、野口章、高野薫、松田潤一郎：一次精母細胞と受精した第一減数分裂中期卵子からの正常産子の発生、第91回日本繁殖生物学会、1998年8月、札幌。
- 13) 滝本一広、松田潤一郎、鈴木 治、大島章弘、小倉淳郎、高野 薫、伊藤雅之、高嶋幸男、浅野敏彦、鈴木義之：GM1 ガングリオシドーシスマウスの病態解析－蓄積物質の加齢変化－、第15回日本疾患モデル学会総会、1998年11月、東京。

G. 知的所有権の取得

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）
分担研究報告書

アデノ随伴ウイルス Rep 蛋白質の機能と
ベクターの安全性に関する研究

主任研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

アデノ随伴ウイルス（AAV）が、ゲノム両端の ITR とウイルスの Rep 蛋白質によってゲノムをヒト 19 番染色体の特定の領域（AAVS1）に組み込む性質を遺伝子治療ベクターに応用する研究が進められている。しかし、Rep 蛋白質が細胞毒性を持つことから、現在までに作られた AAV ベクターでは Rep 蛋白質の機能は使われず、遺伝子を AAVS1 に組み込めるものは無い。そこで、Rep 蛋白質の細胞毒性を担う領域と AAVS1 に遺伝子を組み込むのに必要な領域を明かにし、Rep 蛋白質を AAV ベクターに利用する方法を検討している。今年度は、Rep 蛋白質の C 末端領域が細胞の蛋白質合成を阻害することを明らかにした。この領域は組み込みに必須とされる領域とは異なるので、少なくとも細胞毒性の一部を取り除いた Rep 蛋白質をベクターに利用できる可能性が示された。また、ヒト血清中の抗 AAV 抗体を調べ、我が国では 10 才頃までに 9 割以上のヒトが AAV に感染することを確認した。これは、AAV ベクターを投与された患者体内で、遺伝子組み換えによるベクターレスキューが起こる可能性を示唆しており、今後の検討が必要である。

A. 研究目的

AAV がゲノムをヒト 19 番染色体長腕の特定の領域に組み込む性質を生かした安全な AAV ベクターの開発、及び AAV ベクターの持ちうる病原性を再評価するのが本研究の目的である。

マウス酸性 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)

遺伝子を発現する組み換え AAV ベクターは、Rep/Cap 発現ベクター、アデノウイルス 5 型の VA、E4 領域を利用して 293 細胞で作製し、塩化セシウム平衡遠心を 2 度繰り返して精製した。

B. 研究方法

HeLa 細胞に MOI100 で AAV を感染させ、30 代の継代後、AAV ゲノムが安定に組み込まれた AAV 持続感染細胞株を樹立した。これらの細胞中の Rep 遺伝子由来 mRNA は、RT-PCR (ABI7700) によって定量した。

AAV の Rep 及び Cap 蛋白質は、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。これを抗原とする ELISA によって、ヒト血清中の抗 AAV 抗体を測定した。in vitro 転写系及び翻訳系へ添加した Rep 蛋白質は、ゲル濾過によって 6 量体として精製したものをを用いた。

C. 研究結果

1) 調べた AAV 持続感染 HeLa 細胞株 (12 株) 全てで、Rep 遺伝子が継続して転写されており、細胞増殖能の低下が認められた。この成績はこれまで明確な記載がなかったもので、AAV も潜在的に細胞毒性を持つことが示された。

2) Rep-78 は各種プロモーターからの遺伝子発現を抑制することが知られている。この活性が細胞毒性を担うと考え、抑制の分子機構を調べた。大腸菌で作製した Rep-78 を in vitro の転写系、翻訳系に加えたところ、転写ではなく翻訳を阻害するこ

とが明らかになった。この活性は Rep78、Rep52 に共通の機能で、C 末端領域 150 アミノ酸領域に担われていた。

3) ヒト血清中の抗 AAV 抗体を測定した。我が国では、10 才頃までにはほぼ 90% のヒトが抗体陽性になり、50 才頃まで年齢につれて抗体価が上昇することがわかった。これは、多くの日本人が 10 才までに AAV に感染すること、その後も感染を繰り返すことを示唆している。また、ヒトパピローウイルス (HPV) 抗体価と抗 AAV 抗体価に相関が見られ、HPV が AAV のヘルパーとなっている可能性が示唆された。

4) マウス酸性 β -Gal 発現 AAV ベクターを作った。このベクターによって遺伝子導入されたマウス細胞は、細胞継代後も安定して β -Gal を発現し続けた。遺伝子導入効率は低線量の放射線で著しく増強された。このベクターを GM1 ガングリオシドーシスのモデルとなる β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) 欠損マウスの新生児脳内への接種実験を開始した (分担研究者松田との共同研究)。

D. 考察

AAV はこれまで明らかな病原性が報告されず、安全なベクターになると期待されている。しかし、AAV 潜伏持続感染細胞での AAV ゲノムの発現は Rep 蛋白質によって制御されており、必要に応じていつでもウイルスが増殖できる状態に維持されていると考えられ、この Rep 蛋白質の継続的発現によって細胞に異常が生じると可能性がある。AAV が初期自然流産時の子宮内組織に高頻度で検出されるとする報告や血清中の抗 AAV 抗体と抗 HPV 抗体が関連することから、性器感染する HPV が AAV のヘルパーとなる可能性を踏まえ、AAV の病原性について慎重に検討することが求められる。

Rep 蛋白質による翻訳系の阻害は、AAV の増殖時に優先的にウイルス蛋白質を合成するための機能と推定されるが、この活性が細胞毒性の少なくとも一部と関連すると考えられる。AAV ゲノムの AA VS1 への組み込みを担う領域は、Rep 蛋白質の N 末端

側にあることが示されているので、翻訳系を阻害する領域は組み込みを担う領域と異なる可能性が高い。今後、この阻害活性を除いた Rep 蛋白質による組み込み反応を検討し、遺伝子治療ベクターに Rep 蛋白質を利用する方法を探る。

E. 結論

AAV 潜伏持続感染細胞で、AAVRep 蛋白質の継続的な発現と細胞増殖の抑制がみられた。Rep 蛋白質は、その C 末端領域で細胞蛋白質合成阻害活性をもち、これが細胞毒性の少なくとも一部を担っていると推定された。

AAV は、90% 以上の日本人に 10 才頃までに感染し、その後も感染を繰り返すことが示唆された。HPV もヘルパーとなっている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomaviruses 16 and 6. J. Virol. 1999. in press.
- 3) Kitamura Y., Ishikawa, T., Okui, N., Kobayashi, N., Kanda, T., Shimada, T., Miyake, K., and Yoshiike, K.: Inhibition of replication of HIV-1 at both early and late stages of the viral life cycle by single-chain antibody against viral integrase. J. AIDS and Human Retrovirology 20, 105-114, 1999.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Yajima, T., Kanda, T., Yoshiike, K., and Kitamura, Y.: Retroviral vector targeting human cells via c-kit-stem cell factor interaction. Human Gene Therapy **9**, 779-787, 1998.
- 7) Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshiike, K., and Kanda, T.: A surface Immunodeterminant oh human Papiilomavirus type 16 minor capsid protein L2. Virology **245**, 353-359, 1998.

2. 学会発表

- 1) 神田忠仁：ヒトパピローマウイルスと子宮頸がん。第 65 回北海道癌談話会。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 柊元 巖、神田忠仁：ヒトパピローマウイルス E6 蛋白質と hMCM7 蛋白質の結合。第 46 回日本ウイルス学会総会。
- 5) 神田忠仁、川名 敬、柊元 巖、松本光司：HPV によるがんとその予防。第 57 回日本癌学会総会。
- 6) 神田忠仁：ヒトパピローマウイルスと子宮頸がん。日本学術会議 50 周年記シンポジウム。

G. 知的所有権の取得
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）
分担研究報告書

アデノ随伴ウイルスRep蛋白質の機能とベクターの安全性に関する研究

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの有効性、安全性を検討することを目的に、 β -ガラクトシダーゼノックアウトマウスを用い、ヒト β -ガラクトシダーゼを組み込んだ AAV ベクターによる遺伝子治療法を試みた。新生児脳内へ治療用ベクターを投与したところ、投与5週後において脳内での遺伝子発現が認められ治療効果が期待され、また個体レベルでの異常は観察されなかった。今後、長期にわたる有効性および安全性の検討が必要であろう。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、安全で、長期の発現が可能と考えられており、とくに脳神経変性疾患への応用が期待される。私たちの開発した β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) ノックアウトマウスは、進行性の神経症状を呈し、神経細胞の変性、腫大を認めるなど、ヒトのG_{M1}ガングリオシドーシスの良いモデルである。本症は単一遺伝子病であり、有効な治療法がないことから、遺伝子治療が期待されている。本研究では、本モデルマウスを用い β -Galを組み込んだ AAV ベクターによる遺伝子治療法を試み、その有効性、安全性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

ホモ欠損マウスとヘテロ欠損マウスの交配により、産子を得、出産後直ちに、尾の一部を採取し、酵素活性を測定することにより、ホモ欠損およびヘテロ欠損個体を判定した。判定の翌日、2日齢のマウスに、ヒト β -Galを組み込んだ組み換え AAV ベクター (rAAV、約 10^8 particles/ μ l) および対照として野生型 AAV (wAAV) を 3~8 μ l 投与した。投与は 26G の 2 段針を用い、大脳実質内に頭蓋骨から約 4mm の深部に約 1 分間にわたり徐々に行った。遺伝子の発現検索は、凍結切片を用い酸性条件下での X-gal 染色による組織化学的方法によった。

C. 研究結果

2日齢モデルマウス (ホモ欠損マウス) 6 匹に rAAV を脳内投与し、対照として wAAV を 2 匹のモデルマウスに投与した。現在、最長のもので投与後約 6 週を経ているが、体重、行動などで判定する限りは、ウイルス投与による個体レベルでの障害は認められていない。投与 5 週後の rAAV 投与個体の脳を予備的に検索したところ、投与部位での炎症などの異常は認められず、また組織学的検索では、投与部位を中心に β -Gal 活

性が認められた。これらの活性を示す細胞は主として神経細胞と思われるが、現在詳細は検討中である。

D. 考察

β -Gal ノックアウトマウスでは、脳内G_{M1}、アシアロG_{M1}の急速な蓄積が1~2週齢より見られ、病理学的な病変もこれとほぼ一致して早期に認められ、1か月齢までに蓄積、病変とも急速に進行する。一方、このマウスは4か月齢以降に明らかな進行性の中枢神経症状を示すようになるが、脂質の蓄積を伴う病変はもっと早くから進行しており、新生児期での治療が必要であり、さらに長期の遺伝子発現が必須と考えられる。そこで、今回、2日齢の新生児脳内へのrAAVの直接投与を試みた。現在、治療後6週までの予備的なデータが得られたところではあるが、治療群において個体レベルでの異常は認められていない。さらに、治療5週後の脳の組織化学的検索で、投与部位を中心に活性発現が確認されており、治療効果が期待される。今後 β -Galの遺伝子発現がどの細胞で、どの程度の量、またどの程度長期に認められるか検討する必要がある。さらに、それによる治療効果を、病理学的、生化学的 (蓄積物質の量の変化)、また、臨床学的 (寿命、神経症状の改善など) に検討するとともに、安全性についても検討する予定である。

E. 結論

G_{M1}ガングリオシドーシスモデルである β -Gal ノックアウトマウスを用い β -Galを組み込んだ AAVベクターによる遺伝子治療法を試み、その有効性、安全性を検討した。有効な治療効果を期待し、新生児脳内へrAAVベクターを投与したところ、投与5週後において脳内での遺伝子発現が認められ、個体レベルでの異常は観察されなかった。今後、長期にわたる有効性および安全性の検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ogura A, Inoue K and Matsuda J, Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum Reprod*, in press.

Mochida K, Wakayama T, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Ogura A and Matsuda J, Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. *Theriogenology*, 51: 171, 1999. (1999年1月)

Mochida K, Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O and Ogura A, Birth of pups by transfer of *Mastomys (Praomys coucha)* embryos cryopreserved by vitrification. *Biol Reprod*, 51 Suppl 1:180-181, 1998. (1998年8月)

Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y and Matsuda J, Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5611-5615, 1998. (1998年5月)

松田潤一郎、ノックアウト動物。高橋迪雄監修：哺乳類の生殖生物学。東京、学窓社、1999年3月、pp.248-256.

2. 学会発表

松田潤一郎、大島章弘、鈴木治、小倉淳郎、野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、野口洋子、中山一栄、滝本一広、北村義浩、神田忠仁、伊藤雅之、高嶋幸男、鈴木義之：GM1-ガングリオシドーシスマウスのアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の試み、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。

小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木治、種村健太郎、野口洋子、山本美江、持田慶司、野口章、高野薫、中山一栄、関口富士男、小林洋四郎：マウス一次精母細胞を用いた顕微受精による産子の作出、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。

山本美江、種村健太郎、鈴木治、松田潤一郎、持田慶司、野口章、中山一栄、野口洋子、高野薫、小倉淳郎：ネフローゼ発症モデルマウス腎のDD/RT-PCR法による遺伝子発現パターンの解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。

持田慶司、松田潤一郎、山本美江、野口洋子、高野薫、黒沢重利、小倉淳郎：マストミス胚の

移植とガラス化法による凍結保存、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。

野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、種村健太郎、野口洋子、中山一栄、鈴木治、小倉淳郎、松田潤一郎、大山雄二、浜本敏郎、辻崇一： α 2,3シアル酸転移酵素(ST3Gal II)遺伝子導入マウスの作出と解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。

小倉淳郎、持田慶司、山本美江、野口洋子、種村健太郎、野口章、高野薫、松田潤一郎：一次精母細胞と受精した第一減数分裂中期卵子からの正常産子の発生、第91回日本繁殖生物学会、1998年8月、札幌。

滝本一広、松田潤一郎、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、高野薫、伊藤雅之、高嶋幸男、浅野敏彦、鈴木義之：GM1ガングリオシドーシスマウスの病態解析－蓄積物質の加齢変化－、第15回日本疾患モデル学会総会、1998年11月、東京。

G. 知的所有権の取得状況

該当無し。