

平成11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

要旨

遺伝子治療におけるベクターの安全性を有効性との比較において評価する事を目的とし、研究計画を立てた。ベクターとして、センダイウイルス (SeV)、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスをとり上げた。安全性の確認には種々な予備実験が必要で、*vivo*でのウイルスゲノムの高感度検出法が先ず必要であり、mRNA ないしゲノム RNA の高感度検出法として、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の適用可能な HybrAT 法を確立した。

増殖サイクルに不明の点が多いウイルスについては *vivo*での増殖誘導の危険性の確認が必要である。今回、AAV は潜伏・持続感染した宿主細胞がアポトーシス等で死滅しそうになると、ヘルパーウイルスの共存なしに小規模な増殖をして、周辺部の細胞に感染し、新たに持続感染するという生活環を持つことを明らかにした。又、単純ヘルペスウイルス (HSV) のベクターとしての安全性を明確にする為、機能不明であった遺伝子機能を明らかにした。UL14 がカプシド蛋白質及びウイルス DNA パッケージング関連蛋白質の核内への輸送に関与しており、VP16 がシグナル伝達系のプロテインキナーゼ JNK を活性化し、US3 が JNK の活性化を抑制することを示した。ヒト膀胱癌腹腔播種モデルを用いて US3 欠損ウイルスベクターの抗腫瘍性を UL39 欠損ウイルスベクターと比較した処、後者はヌードマウスに対する毒性は前者より有意に低いにも関わらず同等の有効性を示す。

サルに接種する実験としては、センダイウイルス (SeV) ベクターの有効性及び安全性について検討した。1) サルへのサル免疫不全症ウイルス (SIV) の Gag 蛋白発現ベクター投与、(2) マウスへのヒト免疫不全症ウイルス (HIV) の Env 蛋白発現ベクター投与、(3) マウスへの H5 型インフルエンザウイルス (H5N1) のヘマグルチニン蛋白質 (HA) 発現 SeV ベクター投与、を行い SeV ベクターによる良好な遺伝子発現と感染防御免疫能の獲得および安全性を確認した。又、遺伝子治療に多用されている *amphotropic murine leukemia virus (A-MLV)* の非ヒト霊長類であるサルにおける病原性を明らかにする為、高い力価 ($1 \times 10^7/\text{mL}$) のウイルス標品を作成した。

医学生物学的研究に不可欠なカニクイザルの免疫学的な性状に関し、A ローカスの主要な allele の塩基配列を決定し、少なくとも 5 種類の allele の存在を示した。CD3 に対する単クローン抗体 (FN18) に反応しないカニクイサルは、CD3 分子の遺伝的多形によるものである事を示した。

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
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
西山幸廣	名古屋大学医学部付属病態制御研究施設ウイルス感染研究部門 教授
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部、室長
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長

方法

生体組織内でのベクターの動向を病理学的に検索 する方法を佐多が担当し、高感度検出法 HybrAT の実用化への研究を行った。AAV ベクターと HSV ベ

クターについては、それぞれ神田と西山が担当し、それぞれの増殖サイクルで安全性に関わる部分の解明を担当した。センダイウイルスのサルでの有効性及び安全性試験は永井が担当し、レトロウイルスベクターの安全試験は北村が担当した。又、サルの免疫学的性格付けについては山田が担当した。吉倉は全般的な研究総括と調整を行った。

研究結果

SIV感染サル組織をホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、約4 μ mの切片を作製した。用いた標本はSIV脳炎の脳組織およびリンパ節や脾臓で、脳組織は通常のRNA in situ hybridization法でSIV RNAが検出可能であったもので、またリンパ節や脾臓は検出できなかったものである。またHIVゲノムが1コピーintegrateしているACH-2細胞を用いた。HybrAT法は30-40 mer程度のsense鎖およびanti-sense鎖の両 oligonucleotide をプローブとし、その3'末端にATを10 pair付加したものである。従来のPCR in situ法はシグナルのdiffusionやDNA repairという問題があったが、HybrAT法は、hybridizationの際のTm値とpolymerizationの温度を調整することで、プローブが標的核酸にhybridizeしたまま、AT tail部分の増幅反応が行えるので、diffusionやDNA repairの問題を解決し、さらに30分程度の増幅反応で多くのbiotin-dUTPを取り込むことが可能である。シグナルの検出はstreptavidin-alkaliphosphataseないしstreptavidin

-HRPとtyramide amplification systemの両者を行った。組織切片の前処理法、プローブの濃度、hybridizationの条件、AT tailing反応条件、シグナル検出条件等について検討し、通常のRNA in situ hybridizationで検出可能であった組織切片ではstreptavidin-alkaliphosphataseとBCIP/NBT発色系で十分検出可能であった。リンパ節や脾臓等ではもともと検出できないものであったが、検出系としてstreptavidin-HRPとtyramide amplification systemを応用することで、さらに検出感度を上げることが可能となった。この方法の有用性を考慮し、さらに種々のウイルス感染例において検討を続けている(佐多)。

さらに、抗癌剤として治癒治療に使われているシスプラチンによっても、AAVのレスキューが起こり、この反応もカスパーゼの阻害剤で、ある程度抑制されることがわかった。これらの成績は、AAVがヒト細胞に感染すると潜伏・持続感染状態と小規模な増殖を繰り返しながら生体内に維持される可能性を示している(神田)。

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した。また、機能のわかっていないHSV遺伝子産物について検討を加える。ヒト膵臓癌、ヒト卵巣癌の腹腔播種モデルをヌードマウスを用いて作製し、各種変異ヘルペスウイルスの悪性腫瘍治療用ベクターとしての有効性を評価した(西山)。

(1)昨年度中に、サル免疫不全症ウイルス(SIV)のGag蛋白発現SeVベクター、SeV/SIV-gagを作製し、安全性、至適投与量および体内動態などを検討するため、カニクイザルを用いた動物実験を開始した。SeV/SIV-gagを2頭、対照として異種遺伝子の挿入されていないコントロールSeVベクターを1頭にそれぞれ 10^8 CIU経鼻接種を3回行った。本年度は、SeVベクター非接種のコントロールを1頭追加し、合計4頭とし引き続き実験を行った。これらのサルについて免疫学的解析、SIVチャレンジ接種(100TCID50)を行った。チャレンジ接種後慢性期での血漿中SIV-RNAコピー数は、コントロール群が約 10^5 コピー/mlであるのに対して、SeV/SIVgag投与群では 10^2 から 10^3 コピー/mlと有意に低い値を示した。感染防御機構は明らかに出来なかった。

(2)昨年度から、マウスにヒト免疫不全症ウイルス(HIV)の構造蛋白Env(gp140, gp160)発現ベクター(SeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160)の接種実験を行っている。本年度おこなった免疫マウス血清でのNL4-3中和試験では、SeV/NL-gp140投与群の3/4で中和能が認められたが、SeV/NL-gp160投与群では中和能は認められなかった(0/6)。(3)昨年度は弱毒H5型インフルエンザウイルス(H5N8)のHA発現SeVベクターを作製し、マウスで感染防御実験を行ったところ良好な結果が得られた。本年度は強毒H5型インフルエンザウイルスA/Hong Kong/156/97(H5N1)のHAを発現するSeV/HKH5作製し、マウスに経鼻接種(10^6 PFU/mouse)、その後チャレンジ接種(100LD50)を行った。コントロールSeVベクターで免疫されたマウスが全例死亡(5/5)したのに対して、SeV/HKH5で免疫したマウスは、A/HK/156/97又はA/HK/483/97の致死量でのチャレンジ後にそれぞれ

4/5、5/5 生残し、ワクチンとしての効果が明らかになった。以上より、SeV ベクターの HIV 感染およびインフルエンザ感染防御のための免疫抗原発現用遺伝子導入ベクターとしての有用性が示唆された（永井）。

amphotropic murine leukemia virus (A-MLV) に基づくベクターは遺伝子治療に多用されている。本研究の目的は A-MLV の非ヒト霊長類であるサルにおける病原性を明らかにすることである。具体的に行うことは A-MLV である 4070A を 108-109/kg 体重でサルに経静脈投与して、急性毒性、発ガン性、及び、生殖細胞への感染の程度を調べることである。本年は、その投与するウイルスを調製する方法について検討を行った。ヒト 293 細胞とサル Vero 細胞に 4070A を感染させた。confluent な状態になったところで培養液を fresh なものに変えて 32C 一晚培養する。培養上清中に放出されたウイルス量を PG-4S+L 細胞を用いてアッセイした。293 細胞においてもっとも高い力価 (1×10^7 /mL) は Vero 細胞のそれ (1×10^5 /mL) のおよそ 100 倍であった。Vero 細胞においては、無血清培地 VP-SFM (Life Technologies, Inc.) で培養した場合に得られたウイルス液の力価は、通常の 10% 血清含 D-MEM で培養した場合のその 1/10 程度でしかなかった（北村）。

家族歴の明らかなカニクイザルから得た末梢リンパ球 (PBL) から直接あるいは cell line を樹立後常法により mRNA を抽出、アカゲザルクラス IMHC の A ローカス特異的プライマーを用い、RT-PCR により cDNA を得た。TA クローニングベクターにクローン化後各サルについて複数のクローンをシーケンシ、塩基配列を決定した。これまでに 7 個体 100 クローン以上を解析した結果、カニクイザルには少なくとも 5 種類の allele が存在する事が明らかになり、これらを Mafa-A01 から Mafa-A05 とした。現在各 allele 特異的プライマーの設定を試みている。一方、CD3 に関しては同様にカニクイザルリンパ球から得た mRNA を鋳型にヒト CD3 各鎖の塩基配列を元に合成したプライマーを用い、RT-PCR にて γ 、 δ 、 ϵ 鎖のクローニングを行いその塩基配列を決定した。その結果、FN18 との反応性の欠如は ϵ 鎖の 72 番目のアミノ酸置換による多型によるものと考えられた（山田）。

考察

遺伝子治療に用いるベクターおよび挿入遺伝子産物の検出は non-human primate (monkey) を用いた安全性評価法の確立が重要であり、単なる PCR によ

るベクター検出だけでなく、組織局在を明らかにすることがその安全性評価に重要である。今回得られた高感度検出法はその点で従来使われてきた方法と比較し、検出感度、信頼性、簡便性において優れており、また種々の応用が容易に可能であり、ほかの目的でも利用されうる。すでに論文として発表した。

AAV の増殖と再感染の繰り返しがヒト体内で頻繁に起こっているならば、患者細胞 DNA に組み込まれた AAV ベクターが野生型 AAV と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可能性がある。AAV ベクターの安全性を考える上で重要な情報である。ヘルペスウイルス遺伝子産物の機能解析の結果から、より毒性の低いヘルペスウイルスベクターを開発するために必要となる情報が得られた。また、ヒト癌に対する腫瘍治療用ベクターとして、ヘルペスウイルスの有効性を評価するモデル系が確立できた。

SeV ベクターは、他のウイルスベクターより *in vitro* 実験系では蛋白発現量が多く、高効率な遺伝子治療用および組み換えワクチン用ウイルスベクターとして研究開発に値すると考えられる。SeV ベクターを遺伝子治療に使用するための安全性及び有効性の検討を目的としてサル、マウスを用いた動物実験を開始し、今年度までの成果で SeV ベクターの有効性が示唆された。293 細胞を用いることによって、 1×10^7 /mL 程度の力価のアンボトロピックウイルスが得られることが分かった。よって安全試験で 108-109/kg 体重で投与する場合、約 10 L のウイルス感染 293 細胞の培養上清から精製を行えば必要なウイルス量が得られる。

MHC に関しては得られた結果から allele 特異的プライマーを合成することにより、少なくともこれらの allele が存在する個体に関してはタイピングが可能になり、MHC の明らかなサルの供給の可能性が出て来た。一方、CD3 に関しては遺伝子多型である事が分かり状況がはっきりした。

結果

安全性の確認には種々な予備実験が必要で、*vivo* でのウイルスゲノムの高感度検出法が先ず必要であり、mRNA ないしゲノム RNA の高感度検出法として、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の適用可能な HybrAT 法を確立した。

AAV は潜伏・持続感染した宿主細胞がアポトーシス等で死滅しそうになると、ヘルパーウイルスの共存なしに小規模な増殖をして、周辺部の細胞に感染し、新たに持続感染するという生活環を持つこと

を明らかにした。

単純ヘルペスウイルス (HSV) のベクターとしての安全性を明確にする為、機能不明であった遺伝子機能を明らかにした。UL14 がカプシド蛋白質及びウイルス DNA パッケージング関連蛋白質の核内への輸送に関与しており、VP16 がシグナル伝達系のプロテインキナーゼ JNK を活性化し、US3 が JNK の活性化を抑制することを示した。ヒト膀胱癌腹腔播種モデルを用いて US3 欠損ウイルスベクターの抗腫瘍性を UL39 欠損ウイルスベクターと比較した処、後者はヌードマウスに対する毒性は前者より有意に低いにも関わらず同等の有効性を示す。

サルに接種する実験としては、センダイウイルス (SeV) ベクターの有効性及び安全性について検討した。1) サルへのサル免疫不全症ウイルス (SIV) の Gag 蛋白発現ベクター投与、(2) マウスへのヒト免疫不全症ウイルス (HIV) の Env 蛋白発現ベクター投与、(3) マウスへの H5 型インフルエンザウイルス (H5N1) のヘマグルチニン蛋白質 (HA) 発現 SeV ベクター投与、を行い SeV ベクターによる良好な遺伝子発現と感染防御免疫能の獲得および安全性を確認した。又、遺伝子治療に多用されている amphotropic murine leukemia virus (A-MLV) の非ヒト霊長類であるサルにおける病原性を明らかにする為、高い力価 (1×10^7 /mL) のウイルス標品を作成した。

医学生物学的研究に不可欠なカニクイザルの免疫学的な性状に関し、A ローカスの主要な allele の塩基配列を決定し、少なくとも 5 種類の allele の存在を示した。CD3 に対する単クローン抗体 (FN18) に反応しないカニクイザルは、CD3 分子の遺伝的多形によるものである事を示した。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Munehide Kano, Tetsuro Matano, Hiromi Nakamura, Akiko Takeda, Atsushi Kato, Koya Ariyoshi, Kazuyasu Mori, Tetsutaro Sata and Yoshiyuki Nagai: Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant Sendai virus expressing the Gag protein AIDS, in press
2. Sakuo Hoshi, Takashi Odawara, Masamichi Oshima, Yoshihiro Kitamura, Hajime Takizawa, and Hiroshi Yoshikura. The region necessary and sufficient for expression of unspliced viral transcripts in Moloney murine leukemia virus. *in preparation*.
3. Takeuchi, T., Kozuka, T., Nakagawa, K., Aoki,

Y., Ohtomo, K., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Adeno-Associated Virus Type 2 Nonstructural Protein Rep78 Suppresses Translation In Vitro. *Virology* 266, 196-202, 2000.

4. Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S.-I., Arisaka, F., Takayama, M., Suzuki, K., Kato, K., Kanda, T., Watanabe, H., and Handa, H.: Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J. Virol.* 73, 7912-7915, 1999.

5. 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. *J. Gen. Virol.* 80: 51-56 (1999).

6. Watanabe D., Adachi, A., Tomita, Y., Yamamoto, M., Kobayashi, M. and Nishiyama, Y. The role of polymorphonuclear leukocyte infiltration in herpes simplex virus infection of murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* 291: 28-36 (1999).

7. Iwayama, S., Ohmura, Y., Suzuki, K., Ono, N., Nakazawa, H., Aoki, M., Sekiyama, T., Tsuji, T., Okunishi, M., Yamanishi, K. and Nishiyama, Y. Evaluation of anti-herpesvirus activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis (hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine (A-5021) in mice. *Antiviral Res.* 42:139-48 (1999).

8. Hata, S., Koyama, H., Shiota, H., Adachi, A., Goshima, F. and Nishiyama, Y. Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes. Infect.* 1: 601-607 (1999).

9. Yamada, H., Jiang, Y.-M., Zhu, H.-Y., Inagaki, -O. K. and Nishiyama, Y. Nucleolar localization of the UL3 protein of herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* 80: 2157-2164 (1999).

6. Zhu, H.-Y., Yamada, H., Jiang, Y.-M., Yamada, M. and Nishiyama, Y. Intracellular localization of the UL31 protein of herpes simplex virus type 2. *Arch. Virol.* 144: 1923-1935 (1999).

10. Wada, K., Goshima, F., Takakuwa, H., Yamada, H., Daikoku, T. and Nishiyama, Y. Identification and characterization of the UL14 gene product of herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* 80: 2423-2431 (1999).

11. Kasuya, H., Nishiyama, Y., Nomoto, S., Hosono, J., Takeda, S. and Nakao, A. Intraperitoneal delivery of hrR3 and ganciclovir prolongs survival in mice with disseminated pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* 72: 136-141 (1999).

12. Murata, T., Goshima, F., Daikoku, T., Inagaki, K., Takakuwa, H., Kato, K. and Nishiyama, Y. Mitochondrial distribution and function in herpes simplex virus -infected cells. *J. Gen. Virol.* 81: 401-406 (2000).

13. Hasegawa, Y., Nishiyama, Y., Imaizumi, K., Ono, N., Kinoshita, T., Hatano, S., Saito, H. and Shimokata, K. Prevention of bone marrow suppression using A-5021 as nucleoside analog for retrovirus-mediated herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene therapy. *Cancer Gene Ther.*, Inpress.

14. Goshima, F., Watanabe, D., Takakuwa, H., Wada, K., Daikoku, T., Yamada, M. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus UL17 protein is associated with Bcapsids and colocalizes with ICP35 and VP5 in infected cells. *Arch. Virol.*, In press.

12. Kasuya, H., Nakao, A., Nishiyama, Y., Takagi, H., Mizuno, M. and Yoshida, J. A new strategy for gene therapy: transduction of adeno-associated virus (AAV) vector is enhanced by mixed infection with recombinant herpes simplex virus (ICP6D). *J. Surg. Oncol.*, Inpress.

15. Katano H, Sata T.: An attractive relation of HHV-8 with multicentric Castleman's disease. *Int Med* 1999, 38: 221-222.

16. Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T: Detection of adeno-associated virus type 2 in cases with viral infection. *JPN J Infect Dis* 1999, 52: 50-51.

17. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T.: High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped tumor cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 1999, 155: 47-52.

18. Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T.: High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999, 14:201-205.

19. Nakajima N, Sata T, Hanaki K, Kurata T, Yoshikura H.: Application of the hybridization

AT-tailing (HybrAT) method for detection of human or simian immunodeficiency virus RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded cells or tissues. *J Virol Methods* 1999, 81:169-177.

20. Shimizu, Y., Hijikata, M., Kiyohara, T., Kitamura, Y., Yoshikura, H. Replication of GB Virus (Hepatitis G Virus) in interferon-resistant Daudi cells. *J. Virol.* 73, 8411-8414

21. Ohsawa K, Yamada A, Takeuchi K, Watanabe Y, Miyata H, Sato H. Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. *J Vet Med Sci.* 1998 Aug;60(8):919-22.

2 学会発表

1) センダイウイルスベクターのAIDSワクチンへの応用 - 動物モデルによる検討 - : 狩野宗英、俣野哲朗、加藤 篤、森 一泰、大西由佳乃、坂井(田川)優子、塩田達雄、永井美之

第47回日本ウイルス学会総会(横浜)

2) Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda H, Kato A, Mori K, Sata T, Nagai Y: Induction of SIV-Specific Cellular Immune Responses Using Recombinant Sendai Viral Vector. 7th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2000, San Francisco

3) H5型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: 河岡義裕、加藤 篤、朱 亜峰、清谷克寛、吉田哲也、長谷川 護、田代真人、永井美之、第47回日本ウイルス学会総会(横浜)

4) 竹内隆正、小塚拓洋、神田忠仁: アデノ随伴ウイルス(AAV)Rep蛋白質の翻訳系に対する作用の解析。第47回日本ウイルス学会総会。

5) 片野晴隆、佐藤由子、寺井政憲、馬場信吉、倉田 毅、佐多徹太郎: カボジ肉腫におけるHHV8関連タンパクの発現。第88回日本病理学会春期総会、東京、1999年4月。

6) 佐多徹太郎、岩崎琢也、長谷川秀樹、片野晴隆: ヘルペスウイルス感染症における感染病理の役割と欠点。第14回ヘルペスウイルス研究会、志賀島、1999年6月。

7) 佐多徹太郎: HHV8の感染病理および血清疫学。第6回ヘルペス感染症フォーラム、軽井沢、1999年8月。

8) 寺井政憲、佐多徹太郎、高木 実: 乳頭腫、白斑症、扁平上皮癌におけるヒトパピ

ローマウイルス (HPV) 感染について。第 10 回日本口腔病理学会、松戸、1999 年 8 月。

9) 片野晴隆、佐藤由子、倉田 毅、森 茂郎、佐多徹太郎：HHV8 関連タンパクのカポジ肉腫 (KS)、原発性体液性リンパ腫 (PEL)、多巣性キャッスルマン病 (MCD) における発現。第 47 回日本ウイルス学会総会。横浜、1999 年 11 月。

10) 俣野哲朗、狩野宗英、小田原隆、森一泰、佐多徹太郎、永井美之、網康至：マカクサルモデルにおける抗エイズ DNA ワクチン開発研究。第 47 回日本ウイルス学会総会。横浜、1999 年 11 月。

11) 鈴木一義、齋加志津子、木所 稔、大川時忠、堀内 清、小船富美夫、佐多徹太郎、倉田 毅：経鼻麻疹ワクチンのサルにおける安全性と有効性の検討。第三回日本ワクチン学会総会。名古屋。1999 年 11 月。

12) 寺井政憲、佐多徹太郎、岡 慎一：HIV 感染者の口腔における HPV 感染。第 13 回日本エイズ学会総会。東京、1999 年 12 月。

13) 佐多徹太郎：HHV8 とカポジ肉腫。日本癌学会シンポジウム。京都、1999 年 12 月。

G. 知的所有権の取得状況

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

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 国立国際医療センター研究所長

米国を中心にこれまでに実施された3000以上の遺伝子治療臨床試験では、患者への遺伝子導入効率が不十分であったために明確な治療効果が得られなかったとされ、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、有効性に関する情報を分析し、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。遺伝子治療臨床試験で初の死者をだしたアデノウイルスベクターは、接種経路や用量に注意しながら、安全性を改めて調べる必要がある。遺伝子組み込み型ベクターを直接投与する場合は、生殖細胞への遺伝子導入の可能性、組み込まれたベクターがレスキューされる可能性についても慎重に検討する必要がある。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、関連学術集会の要旨集、米国FDA及びNIH/RACの会議資料等を集め、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

1999年9月、米国でアデノウイルスベクターを用いたOTC欠損症に対する遺伝子治療で患者が死亡した。公開された資料によると、肝動脈から 3×10^{13} 粒子のベクターを接種された患者が死亡し、 3×10^{12} 粒子の接種を受けた患者2例に強い副作用が認められている。死亡原因は、激しい免疫反応に伴う多臓器不全とされ、詳細は検討中である。これまで明らかにされた成績から、アデノウイルスベク

ターには急性毒性があり、接種量が閾値を越えると突然強い副作用が生じる可能性が示された。この閾値には個体差があるらしい。これまでアデノウイルスベクターは安全であると考えられ、安全性に充分留意することなく用量を増やす傾向があった。今回の事例は、サル等を用いた厳格な安全性検討が重要であることを改めて示している。

ウイルスベクターが生殖細胞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かったが、レトロウイルスベクターを使って遺伝子導入したラットで、雌の生殖細胞に導入遺伝子が検出されたとする報告があり、注目される。今後、ベクターの直接投与による生殖細胞への遺伝子導入については、適切な動物モデルを用いて、改めて検討する必要がある。

米国で、AAVベクターを用いたA型血友病の遺伝子治療が順調な成績を上げ、今後の発展が期待されている。しかしAAVベクターは、素材となるAAVの生活環に不明な点が多い。AAV単独感染では、速やかに潜伏・持続感染を起こしウイルスは増殖しないとされてきた。しかし、最近AAVはヘルパーウイルス無しにも小規模な増殖を起こせることが明らかになりつつあり、患者染色体に組み込まれたベクターがAAVの重感染でレスキューされる可

能性が否定できない。レトロウイルスベクターとヒト内在性レトロウイルス様配列の遺伝子組み換えについても報告があり、患者体内で起こる遺伝子組み換えによってベクターが環境に放出される可能性を慎重に検討する必要がある。

ヘルペスウイルスベクターは神経細胞への遺伝子導入ベクターとして開発されているが、ヘルペスウイルスの細胞毒性に関わるウイルス蛋白質が未だ十分明らかにされていないため、直ちに実用化されることはないと思われる。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ベクターとして我が国で開発が進められている。感染力の強さと組み換えが生じない点で優れている。今後、作成技術の簡素化と共に、繰り返し投与に対する反応や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。既存のベクターについても、非標的臓器への遺伝子導入やベクターレスキューは、最新の技術で再検討することが必要である。本研究班の成果は、このような厚生行政上の要請にこたえるものである。

F. 研究発表

G. 知的所有権の取得

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 (兼任)
共同研究者	加藤 篤 俣野 哲朗 狩野 宗英	国立感染症研究所ウイルス製剤部ムンプス室長 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官 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と組み換えワクチンに応用する目的で、動物実験にて有効性及び安全性について検討した。AIDSワクチンあるいはインフルエンザワクチンへの応用を念頭におき、(1)サルへのサル免疫不全症ウイルス(SIV)のGag蛋白発現ベクター投与、(2)マウスへのヒト免疫不全症ウイルス(HIV)のEnv蛋白発現ベクター投与、(3)マウスへの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)発現SeVベクター投与を行った。その結果、SeVベクターによる良好な遺伝子発現と感染防御免疫能の獲得および安全性が確認された。SeVベクターは、新規の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ることなく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や組み換えワクチンに使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、未だ有効なワクチンの開発されないAIDSワクチンへの応用として(1)サル免疫不全症ウイルス(SIV)の構造蛋白Gag発現ベクター(SeV/SIV-gag)、(2)ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)の構造蛋白Env(gp140, gp160)発現ベクター(SeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160)を作製し、またニワトリ胚への病原性が強くこれまでの方法ではワクチン生産の困難であった強毒インフルエンザワクチンへの応用として(3)H5型インフルエンザウイルスA/Hong Kong/156/97(H5N1)のヘマグルチニン蛋白質(HA)発現ベクター(SeV/HK H5)を作製し、それぞれ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ものとした。

B. 研究方法

SeVベクター (SeV/SIV-gag, SeV/NL-

gp140, SeV/NL-gp160, SeV/HK H5) 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) カニクイサルを4頭用いた。2頭に対してSeV/SIV-gagを 10^8 CIU経鼻投与し、第4週目、第14週目に同量追加投与した。別の1頭には、コントロールSeVベクターを同じスケジュールで投与した。さらにナイーブコントロールとしてSeV未接種の1頭を加え合計4頭に対して、第22週目にSIVmac239を100TCID₅₀経静脈的にチャレンジ接種した。これらのサルについて、末梢血検査、鼻腔ぬぐい液中のSeV発現検索、血漿中抗SeVおよび抗Gag抗体定量、血漿中SIV-RNAコピー数定量等を行った。(2) HIV-1(NL4-3)のgp140, gp160を発現するSeVベクター(SeV/NL-gp140, SeV/NL-gp160)を、各々3週齢のBalb/cマウスに 10^7 CIU経鼻投与した。投与後第2週に同じベクターを同量追加投与した。初回投与後第4週の血清について、抗HIV-1 Env抗体価の定量およびNL4-3中和試験を行った。(3) 6週齢のBalb/cマウスにコントロールSeV、あるいはSeV/HKH5を 10^6 PFU経鼻接種後、2週あるいは4週後に致死量(100LD₅₀)のインフルエンザウイルス(A/HK/156/97及びA/HK/483/97)をチャレンジ接種し、生残率を測定した。チャレンジ直前のマウスの中和抗体価を測定した。

なお、本研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認のもとに行った。

C. 研究成果

(1) SeVベクターを投与したカニクイサルにおい

て、体重減少、呼吸器症状などの病的臨床所見は認められなかった。鼻腔粘膜ぬぐい液中のSeVは、投与開始後5日目までは検出されたが、7日目以降は認められず、追加免疫後にも検出されなかった。SeVベクター投与により、抗SeV抗体が誘導され、追加免疫により抗体価の上昇が認められたが、抗Gag抗体の誘導は認められなかった。しかし、SIVチャレンジ接種後慢性期での血漿中SIV-RNAコピー数は、コントロール群が約 10^5 コピー/mlであるのに対して、SeV/SIV-gag投与群では 10^2 から 10^3 コピー/mlと有意に低い値を示した。(2) SeV/NL-gp140投与群・SeV/NL-gp160投与群ともに、高い抗HIV-1 Env結合抗体価を示した。NL4-3中和試験では、SeV/NL-gp140投与群の3/4で中和能が認められたが、SeV/NL-gp160投与群では中和能は認められなかった(0/6)。(3) SeV/HKH5を経鼻的に接種後にチャレンジ接種を行った。コントロールSeVベクターで免疫されたマウスが全例死亡(5/5)したのに対して、SeV/HKH5で免疫したマウスは、A/HK/156/97又はA/HK/483/97のチャレンジ後にそれぞれ4/5、5/5生残し、ワクチンとしての効果が明らかになった。しかし、チャレンジ直前のマウス血清中には、どちらの免疫群にもインフルエンザウイルスに対する中和抗体が検出されず、またチャレンジ3日目の肺内ウイルス量にも両免疫群で差が認められなかった。

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。明らかな感染防御機構は不明であったが、SeV/SIV-gag投与によりSIV感染防御免疫が獲得できた。

(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、可溶性抗原を発現するSeV/NL-gp140を接種した場合、HIV-1 laboratory strainに対する中和能を誘導することが確認できた。以上(1)と(2)よりHIVに対するlive vectorとしての応用が期待される。

(3) SeVベクターで強毒H5型インフルエンザウイルスHAが発現できることが明らかとなり、マウスを用いたチャレンジ試験の結果よりインフルエンザワクチン作製の道具とすることに期待がもたれた。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

SeVベクターのHIV感染およびインフルエンザ感染防御のための免疫抗原発現用遺伝子導入ベクターとしての有用性が示唆された。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Munehide Kano, Tetsuro Matano, Hiromi Nakamura, Akiko Takeda, Atsushi Kato, Koya Ariyoshi, Kazuyasu Mori, Tetsutaro Sata and Yoshiyuki Nagai: Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant Sendai virus expressing the Gag protein
AIDS, in press

2 学会発表

- 1) センダイウイルスベクターのAIDSワクチンへの応用 - 動物モデルによる検討 - : 狩野宗英、俣野哲朗、加藤 篤、森 一泰、大西由佳乃、坂井(田川)優子、塩田達雄、永井美之第47回日本ウイルス学会総会(横浜)
- 2) Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda H, Kato A, Mori K, Sata T, Nagai Y: Induction of SIV-Specific Cellular Immune Responses Using Recombinant Sendai Viral Vector. 7th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2000, San Francisco
- 3) H5型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: 河岡義裕、加藤 篤、朱 亜峰、清谷克寛、吉田哲也、長谷川 護、田代真人、永井美之第47回日本ウイルス学会総会(横浜)

分担研究報告書

カニクイザルの免疫学的特性に関する研究

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
協力研究者	棚林 清	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター主任研究官
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員
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員
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室長

研究要旨 昨年度に引き続き国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで繁殖育成されたカニクイザルの MHC クラス I 遺伝子の解析を行い、7個体から100を超えるクローンの塩基配列を決定した。その結果、カニクイザルの MHC クラス I 遺伝子はアカゲザル並びにヒトの MHC 遺伝子と高い相同性を示すこと、カニクイザルの A ローカスには少なくとも5種の対立遺伝子 (allele) が存在することが明らかになった。これらの対立遺伝子を、Mafa-A01, Mafa-A02, Mafa-A03, Mafa-A04, Mafa-A05と名付けることとした。Mafa-A03, Mafa-A04, Mafa-A05は親子関係の明らかな5頭のサルから得られた allele であり、メンデルの法則に従い遺伝することが示唆された。一方カニクイザルにおいては一部の個体が CD3に対する単クローン抗体 (FN18) に反応しないことが知られている。我々はこの現象が CD3分子の遺伝的多形性によるものであるとの仮説に従って、解析を行うことを目的とし、今年度は CD3分子を構築する γ 、 δ 、 ϵ 鎖のクローニングと遺伝子配列の決定を試みた。

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上で、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。組織適合性抗原複合体 (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 クラス I 遺伝子に関する研究は乏しいのが実状である。そこで本研究ではカニクイザルの MHC クラス I 遺伝子の解析を行うことを目的とした。また、カニクイザルリンパ球の表面マーカーに関しても重要であるとの認識に立ち、今回は CD3の多型性の機構解析も目的とした。

B. 研究方法

筑波医学実験用霊長類センターにおいて繁殖育成されたカニクイザルのうち7頭を対象にした。末梢血から Ficoll 法にてリンパ球を分離し、全 RNA を酸性グアニジン、クロロフォルムで抽出した。これを鋳型にして、オリゴ dT をプライマーにした逆転写反応を行い cDNA を合成した。ヒトあるいはアカゲザルのクラス II MHC 遺伝子の塩基配列を元に合成したプライマーを用い PCR にて MHC 遺伝子を増幅した。今年度は A ローカス特異的プライマーを用いた増幅に成功したため、増幅された cDNA 断片をプラスミドにクローニングし、一個体について複数のクローン、総計100を超えるクローンについて塩基配列をジデオキシ法で決定した。CD3に関しては同様にカニクイザルリンパ球から得た mRNA を鋳型にヒト CD3各鎖の塩基配列を元に合成したプライマーを用い、RT-PCR にて γ 、 δ 、 ϵ 鎖のクローニングを行いその塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮) カニクイザルの採血はケタミンによる麻酔下で行うが、これは通常のカニクイザルの健康管理にも必須の作業でもあり、サルに無用な苦痛を与えないよう十分配慮されている。

C. 研究結果

7個体から100を超えるクローンの塩基配列を決定した。その結果、カニクイザルの MHC クラス I 遺伝子はアカゲザル並びにヒトの MHC 遺伝子と高い相同性を示すこと、カニクイザルの A ローカスには少なくとも5種の対立遺伝子 (allele) が存在することが明らかになった。これらの対立遺伝子を、Mafa-A01, Mafa-A02, Mafa-A03, Mafa-A04, Mafa-A05と名付けることとした。Mafa-A03, Mafa-A04, Mafa-A05は親子関係の明らかな5頭のサルから得られた allele であり、メンデルの法則に従い遺伝することが示唆された。一方カニクイザルにおいては一部の個体が CD3に対する単クローン抗体 (FN18) に反応しないことが知られている。この現象の分子的背景を知るために CD3分子を構築する γ 、 δ 、 ϵ 鎖のクローニングと遺伝子配列の決定を試みた。その結果 FN18との反応性の欠く個体では γ 、 δ 鎖は全く同一であったが、 ϵ 鎖の72番目のアミノ酸が変化しており FN18非反応性の個体では保存されていた。

D. 考察

カニクイザルの MHC クラス I 遺伝子に関しては昨年来の解析により、少なくとも5種類の対立遺伝子が A 座に存在することが明らかになった。これらの allele が筑波医学実験用霊長類センターのカニクイザルで多数を占めていれば、これを元に PCR-SSP によるタイピングが可能になりうる。現在 allele 特異的プライマーの設定作業中である。また、B 座についても解析を行うべく準備を進めている。CD3に関しては FN18との反応性の欠如は ϵ 鎖の72番目のアミノ酸置換で説明され、即ちこの分子の遺伝的多型によるものと考えられた。現在発現系を構築中であり、更に直接的な証明ができるものと期待している。

E. 結論

カニクイザルの免疫学的特性を MHC クラス I 遺伝子に関してと CD3の多型性に関して解析し、前

者については A 座に少なくとも5種の allele が存在することを明らかにした。CD3の多型性は ε 鎖の72番目のアミノ酸置換で説明できることが示唆された。

F. 研究発表

Ohsawa K, Yamada A, Takeuchi K, Watanabe Y, Miyata H, Sato H. Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. J Vet Med Sci. 1998 Aug;60(8):919-22.

G. 知的所有権の取得状況

なし

遺伝子治療の安全性評価法の開発研究—HybrAT法の確立

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：中島典子（同・エイズ研究センター）、椎名香織、榎本喜久子、
佐藤由子、岩崎琢也、倉田 毅（同・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。その際には組織切片上で核酸の検出を行うことが重要である。今回、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上の mRNA ないしゲノム RNA の高感度検出法-HybrAT法-を確立した。この方法は簡便で、組織内局在を明らかにする上で信頼性があり、組織切片内の微量核酸の検出に有用である。

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、本年度はホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上での高感度核酸検出系を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞：HIVDNA を1コピーもつT細胞株であるACH-2および8E5/LAVをRPMI1640-10%FCSで培養し、一方は50ng/mlのTPAおよび2 μ g/mlのPHAで48時間刺激し、一方は刺激しないで培養した。それぞれ10⁶の細胞からPoly AをもつmRNAを抽出した。mRNAをRT-PCRおよびNorthern blot hybridizationそしてHybrAT法で検討した。8E5/LAVは同様に刺激したものおよび刺激しないものを10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、シランをコートしたスライドガラスに細胞切片を作製した。

2. 組織：SIVmac32Hを静注により感染させた4才のアカゲサルで、ウイルス接種後15週で脳炎で死亡し、剖検後の大脳組織を10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、4 μ mの組織切片を作製した。組織学的には大脳皮質下白質と大脳基底核に単球マクロファージの集簇巣がみられ、SIVgag P27 蛋白に対するウサギ抗体を用いた免疫染色でこれらの細胞は陽性であった。これら大脳組織切片と同様に実験感染させたサルのリンパ節や脾臓をHybrAT法およびSIVgagないしSIVnefプローブを用いたRNA in situ hybridization法で検討した。さらにHIV感染者のPGL期のリンパ節生検組織を用いた。

3. HybrAT法：通常のfilter hybridization法と異なるのは、hybridization後のAT tailing反応である。oligonucleotide probeの3'末端にoligo. d(A-T)を付加し、標識dUTP存在下でdelta Tth DNA polymeraseによりd(A-T)部分のself primingにより伸長反応を行った。抽出したmRNA 2 μ gを1%変性アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブランに転写した。prehybridization後に3 pmol/mlのantisense 5'-digoxigenin-HIVnef-(AT)10を60°C一晩反応させ、SSCで洗浄した。一方は各200 μ MのdATPとdTTP、そして10 μ M digoxigenin-11-dUTPとdelta Tth DNA polymeraseとPCR緩衝液中で60°C、2時間反応させた。SSCで洗浄後、ブロッキングし、anti-digoxigeninウサギ抗体を反応させ、BCIP/NBTで呈色反応を行った。組織切片では、prehybridization後に1

pmol/mlのHybrAT probeと10mg/mlのssDNAを混合し、95°C、10分間変性し、また同様に熱変性させた組織切片に50°C一晩反応させた。SSCで洗浄後、biotin-16-dUTPを用いたほかは同様にAT tailing反応を行った。シグナル検出はstreptavidine-alkaliphosphataseとBCIP/NBTないしtyramide signal amplification法とHRP/DAB法により行った。

(倫理面への配慮)

病理解剖組織は診断のために保存されているものであり、より詳細な診断を行う目的で使用し、さらに患者のプライバシーを完全に守るため、個人が特定されないよう配慮し、患者のいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払ってある。研究所動物実験委員会の許可により動物実験を行った。

C. 研究結果

1. Northern blot hybridization法におけるHybrAT法：ACH-2細胞抽出mRNAを用いたRT-PCRではTPAやPHAで刺激した後の検体で陽性となったが、刺激のない検体では陰性であった。この検体をNorthern blot hybridizationで検討すると、刺激していない検体でもAT tailing反応後にHIV-1の転写産物が弱く検出でき、さらに刺激後の検体ではより明瞭なバンドを検出することができた。AT tailing反応の有用性および感度増加が明らかであった。

4. 細胞および組織切片におけるHybrAT法：8E5/LAVの細胞切片ではantisense probeにより明瞭なHIV RNAのシグナルが検出でき、sense probeでは全くシグナルを得ることはできなかった。また親株である非感染CEM細胞では両者ともに陰性であった。したがって反応は特異的と考えられた。SIV感染サルの脳炎組織では、単球マクロファージ細胞の集簇巣に明瞭なシグナルが検出でき、sense probeでは陰性であった。RNA in situ hybridizationではgagおよびnef probeでも多核巨細胞の核と細胞質内に陽性のシグナルがえられたので、検出感度は高いとはいえなかった。しかし、このRNA in situ hybridizationでは検出することができなかったリンパ節や脾臓組織では、HybrAT法により陽性細胞が認められ、さらにtyramide signal amplification法とHRP/DAB法により、多くの細胞が陽性となった。またHIV感染者のPGL期のリ

ンパ節においても陽性所見が得られ、streptavidine-alkaliphosphatase と BCIP/NBT による検出系よりも感度が上昇したことが明らかとなった。

D. 考察

今回の実験により、ホルマリン固定パラフィン包埋組織においても HybrAT 法が有効であることを示すことができた。RNA probe として用いた SIVgag および SIVnef probe はそれぞれ 1,533 bp と 792 bp であり、digoxigenin を RNA transcription 法により標識してある。この方法では 100 bp 程度のプローブに 1 個の digoxigenin-dUTP が取り込まれるので、15 個ないし 8 個の biotin-dUTP が標識されていることになる。しかし今回の HybrAT 法ではプローブは 40 mer であり、プローブの長さだけ考えても感度が上昇したことが明らかであり、また AT tailing 反応の際にかなり多くの digoxigenin ないし biotin-dUTP が取り込まれることで、検出感度の上昇がもたらされたと考えられる。

現在使われている高感度検出法には PCR in situ 法があるが、DNA repair による非特異反応や signal の diffusion の問題があるため、特異的シグナルであるというためには多くの陽性および陰性対照を用いた検討が必要となる。また実際検出も安定しないため、最近では使われなくなっている。10 コピー程度の核酸を組織切片上で検出するためには、最近では tyramide signal amplification 法が使われるようになった。これは hybridize した biotin 化プローブに streptavidin-HRP を反応させ、つぎに biotin-tyramide を反応させ、さらに streptavidin-HRP を反応させることで、シグナル自体を増加させている。この場合は核酸の増殖を行わないこと、そして diffusion artifact の問題を解決することができ、実際検出感度は上昇する。今回、通常の alkaline phosphatase 反応だけでなく、さらに tyramide 法を応用することでより高感度な検出系を確立することができた。

高感度検出法の際には非特異反応が必ず伴い、本来のシグナルを覆ってしまうことが多々ある。そのために種々の条件をさらに検討し、プローブの濃度やシグナル検出系についても至適化することができた。hybridization や AT tailing 反応は Northern blot hybridization 法のような検出すべき核酸が少ないものでも、また組織切片のように多くの核酸が含まれているものでも同

じように有効であることが判明した。非特異反応はむしろシグナル検出系にあり、さらに安定した結果は切片の前処理法にあることが判明した。

従来組織内における核酸検出には PCR 法がもっとも高感度であるが、どの細胞に目的核酸が存在するのかという組織内局在を明らかにするために、RNA probe を用いた in situ hybridization 法が使われてきた。PCR 法は 500 ng 程度の鋳型 DNA を検体としてもちいるが、組織切片上では一部の細胞に多量のコピーがあっても全体では低コピーとなると考えられ検出の可能性が考えられてきた。しかしかなり条件を選んでも検出感度は PCR 法には及ばなかった。今回示すことができた HybrAT 法と tyramide signal amplification 法による検出は十分高感度といえるものであり、微量核酸の組織内局在の検討には現在最も有効な方法であると考えられる。今後、遺伝子治療用のベクターを用いた安全性評価の検討に十分使える方法であると考えられ、有用性の高い方法を開発できたと考えられる。

E. 結論

遺伝子治療の安全性評価の一つとして、ベクターおよび挿入遺伝子の検出系にはおもに PCR が使用されているが、組織切片上での高感度検出系の開発は重要である。今回、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上の mRNA ないしゲノム RNA の高感度検出法-HybrAT 法-を確立した。この方法は簡便で、組織内局在を明らかにする上で信頼性があり、組織切片内の微量核酸の検出に有用である。

F. 研究発表

a) 論文発表

1. Katano H, Sata T.: An attractive relation of HHV-8 with multicentric Castleman's disease. *Int Med* 1999, 38: 221-222.
2. Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T.: Detection of adeno-associated virus type 2 in cases with viral infection. *JPN J Infect Dis* 1999, 52: 50-51.
3. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T.: High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped tumor cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 1999, 155: 47-52.
4. Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T.: High prevalence of human

papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. Oral Microbiol Immunol 1999, 14:201-205.

5. Nakajima N, Sata T, Hanaki K, Kurata T, Yoshikura H.: Application of the hybridization AT-tailing (HybrAT) method for detection of human or simian immunodeficiency virus RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded cells or tissues. J Virol Methods 1999, 81:169-177.

b) 学会発表

1. 片野晴隆、佐藤由子、寺井政憲、馬場信吉、倉田 毅、佐多徹太郎：カポジ肉腫における HHV8 関連タンパクの発現。第 88 回日本病理学会春期総会、東京、1999 年 4 月。
2. 佐多徹太郎、岩崎琢也、長谷川秀樹、片野晴隆：ヘルペスウイルス感染症における感染病理の役割と欠点。第 14 回ヘルペスウイルス研究会、志賀島、1999 年 6 月。
3. 佐多徹太郎：HHV8 の感染病理および血清疫学。第 6 回ヘルペス感染症フォーラム、軽井沢、1999 年 8 月。
4. 寺井政憲、佐多徹太郎、高木 実：乳頭腫、白斑症、扁平上皮癌におけるヒトパピローマウイルス(HPV)感染について。第 10 回日本口腔病理学会、松戸、1999 年 8 月。
5. 片野晴隆、佐藤由子、倉田 毅、森 茂郎、佐多徹太郎：HHV8 関連タンパクのカポジ肉腫 (KS)、原発性体液性リンパ腫 (PEL)、多巣性キャスルマン病(MCD)における発現。第 47 回日本ウイルス学会総会。横浜、1999 年 11 月。
6. 俣野哲朗、狩野宗英、小田原隆、森一泰、佐多徹太郎、永井美之、網康至：マカクサルモデルにおける抗エイズ DNA ワクチン開発研究。第 47 回日本ウイルス学会総会。横浜、1999 年 11 月。
7. 鈴木一義、齋加志津子、木所 稔、大川時忠、堀内 清、小船富美夫、佐多徹太郎、倉田 毅：経鼻麻疹ワクチンのサルにおける安全性と有効性の検討。第三回日本ワクチン学会総会。名古屋。1999 年 11 月。
8. 寺井政憲、佐多徹太郎、岡 慎一：HIV 感染者の口腔における HPV 感染。第 13 回日本エイズ学会総会。東京、1999 年 12 月。
9. 佐多徹太郎：HHV8 とカポジ肉腫。日

本癌学会シンポジウム。京都、1999 年 12 月。

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

分担研究報告書

レトロウイルスベクターの安全性に関する研究

分担研究者 北村義浩 国立感染症研究所・室長

研究要旨

amphotropic murine leukemia virus (A-MLV) のサルにおける病原性を調べるため、A-MLVの4070Aの大量調製を行う方法について検討した。ウイルス感染細胞の培養上清に放出されるウイルス量は、ヒト胎児腎細胞株293細胞でもっとも多かった。この細胞から得られたウイルスをサルに投与する予定である。

A. 研究目的

amphotropic murine leukemia virus (A-MLV) に基づくベクターは遺伝子治療に多用されている。そこでヒトにおけるA-MLVの危険度(安全性)・病原性の評価が大いに期待されている。本研究の目的はA-MLVの非ヒト霊長類であるサルにおける病原性を明らかにすることである。

/mL程度のカパのウイルスが得られることが分かった。これは、文献的にもほぼA-MLVにおける最大カパと考えられる。従って、 10^8 - 10^9 /kg体重で投与する場合、約10Lのウイルス感染293細胞の培養上清から精製を行えば必要なウイルス量が得られるように思われる。また、ここの細胞においてウイルス産生量を規定している因子について、今後さらに解析を進める。

B. 研究方法

A-MLVである4070Aを 10^8 - 10^9 /kg体重でサルに経静脈投与して、急性毒性、発ガン性、及び、生殖細胞への感染の程度を調べる。本年は、その投与するウイルスを調製する方法について検討を行った。ヒト293細胞とサルVero細胞に4070Aを感染させた。confluentな状態になったところで培養液をfreshなものに変えて32C一晚培養する。培養上清中に放出されたウイルス量をPG-4S⁺L細胞を用いてアッセイした。

E. 結論

A-MLV感染293細胞の培養上清からサルに投与すべきウイルス量を得られると推測される

F. 研究発表

なし

C. 研究結果

293細胞においてもっとも高いカパ(1×10^7 /mL)はVero細胞のそれ(1×10^5 /mL)のおよそ100倍であった。Vero細胞においては、無血清培地VP-SFM (Life Technologies, Inc.)で培養した場合に得られたウイルス液のカパは、通常の10%血清含D-MEMで培養した場合のその1/10程度でしかなかった。

D. 考察

293細胞を用いることによって、 1×10^7

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

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、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が、AAVベクターの安全性の基盤となるAAVの生活環には不明な点が多い。そこで、AAV潜伏・持続感染細胞株を作り、そこからウイルスがレスキューされる分子機構を調べた。AAV持続感染細胞株を抗Fas抗体で処理するとAAVがレスキューされ、この反応はカスパーゼ8の阻害で抑制された。また、これらの細胞をシスプラチンで処理してもAAVのレスキューがみられた。これらの成績は、AAVは潜伏・持続感染した宿主細胞がアポトーシス等で死滅しそうになると、ヘルパーウイルスの共存なしに小規模な増殖をして、周辺部の細胞に感染し、新たに持続感染するという生活環を持つことを示唆している。このようなAAVの増殖と再感染の繰り返しがヒト体内で頻繁に起こっているならば、患者細胞DNAに組み込まれたAAVベクターが野生型AAVと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可能性がある。

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、有効性を評価するための前臨床試験を行うサル実験系の確立を最終目的とする。しかし、前提となるAAVの生活環に多くの不明な点が残されているため、本年度はAAV持続感染細胞からAAVがレスキューされる機構を調べた。

B. 研究方法

相補鎖と共に2本鎖DNAとしてクローン化したAAVのゲノムをヒトHeLa及びHaCat細胞に導入し、アデノウイルス5型の感染でAAVの多量増殖が起こる複数の持続感染細胞を得た。

これらの持続感染細胞からのAAVレスキューは、リアルタイムPCR（ABI7700）によって増幅されるゲノムを定量して検出し、培養上清をアデノウイルス5型と共にHeLa細胞に感染させ、AAVの増殖を調べて確認した。

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と記載されている。しかし、これまでの研究から、安定にAAVが潜伏・持続感染している細胞株の樹立は難しく、また持続感染細胞は継代の途中で一斉に死滅することが、たびたび観察された。

AAVが持続感染しているHeLa及びHaCat細胞株（各2株）の培養液に抗Fas抗体を添加してアポトーシスを誘導すると、AAVがレスキューされた。この反応は、カスパーゼ8の阻害剤を加えると抑制されるが、下流のカスパーゼ1、4やDNAの断片化を起こすカスパーゼ3の阻害では抑制されなかった。従って、カスパーゼ8の活性化が直ちにレスキュー反応を引き起こすことが示された。

AAV持続感染HeLa及びHaCat細胞株をシスプラチン処理すると、やはりAAVのレスキューが起こった。この反応もカスパーゼの阻害剤で、ある程度抑制された。

D. 考察

AAVベクターは、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、今後の臨床応用に向けた取り組みが進められている。しかし、AAV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ほ

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ると、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可能性がある。これらの未解決な問題を解決することが、AAV ベクターの安全性確保に重要である。

今年度の研究で、AAVは潜伏・持続感染した細胞がアポトーシス等で死滅しそうになると、ヘルパーウイルスの共存なしに小規模な増殖をして、周辺部の細胞に感染し、新たに持続感染するという生活環が示唆された。AAVがヒト集団に維持されている機構の一端を示していると思われる。

抗癌剤として臨床に広く使われているシスプラチンが、AAV をレスキューできるという成績は、AAVの小規模な増殖は大きな健康障害の原因とならないことを示しているともいえる。

E. 結論

AAVは潜伏・持続感染した宿主細胞がアポトーシス等で死滅しそうになると、ヘルパーウイルスの重感染がなくても、小規模に増殖する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeuchi, T., Kozuka, T., Nakagawa, K., Aoki, Y., Ohtomo, K., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Adeno-Associated Virus Type 2 Nonstructural Protein Rep78 Suppresses Translation In Vitro. *Virology* 266, 196-202, 2000.

2) Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S.-I., Arisaka, F., Takayama, M., Suzuki, K., Kato, K., Kanda, T., Watanabe, H., and Handa, H.: Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J. Virol.* 73, 7912-7915, 1999.

2. 学会発表

1) 竹内隆正、小塚拓洋、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス (AAV) Rep 蛋白質の翻訳系に対する作用の解析。第47回日本ウイルス学会総会。

G. 知的所有権の取得なし。