

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、マウスモデル系において、ベクターの有効性、毒性について評価を行った。

A. 研究目的

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、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ず、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、HSV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) 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。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。
- 2) 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する。

（倫理面への配慮）本研究は名古屋大学

医学部倫理委員会の基準を満たしている。

C. 研究結果

1. HSVのカプシド形成に必要な遺伝子6種（UL18, UL19, UL26, UL26.5, UL35, UL38）、ウイルスDNAパッケージングに必要な遺伝子7種（UL7, UL15, UL17, UL25, UL28, UL32, UL33）の真核発現を作製し、co-transfection系を用いて相互作用に関して検討した。その結果、機能の全くわかっていなかった必須遺伝子の一つUL14が、カプシド蛋白質（UL35遺伝子産物）及びウイルスDNAパッケージング関連蛋白質（UL33遺伝子産物）の核内への輸送に重要な役割を持っていることが示唆された。また、UL17遺伝子産物の共発現はUL14によるVP26の核内輸送を促進することが示された。

2. ウイルス粒子を構成する主要蛋白質の一つVP16が、シグナル伝達系のプロテインキナーゼJNKを活性化することが確認された。一方、感染初期蛋白質として誘導されるウイルスのUS3プロテインキナーゼはJNKの活性化を抑制する作用を示した。これらの結果は、ベクターとしてVP16を含むウイルス粒子を大量に投与すると、ウイルス増殖がなくてもJNKの活性化を通して、宿主に様々な反応を惹起することを示唆するものである。

3. ヒト膵臓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。同程度の有効性が認められたが、ヌード

マウスに対する毒性は前者が有意に高かった。マウスに対する毒性は前者が有意に高かった。

4. HSVのTKを導入した腫瘍細胞のkillingには、現在ganciclovirが用いられている。グアノシン類似体 (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine (A-5021)は、HSV TKにより特異的にリン酸化され、かつTK移入細胞を効率良くkillingした。また、骨髄毒性がganciclovirと比べ著しく弱かった。

D. 考察

1. UL14遺伝子産物の機能が、カプシド構成蛋白質、ウイルスDNAパッケージング蛋白質の双方を結びつける形で提示されたのは興味深い。粒子構成蛋白でもあるので、その機能、活性を理解することはベクターをデザインする上でも重要である。

2. VP16は粒子構成成分であるとともに、ウイルスの前初期遺伝子の発現を調節する作用をもつことが知られている。JNK活性化のメカニズムはまだ不明であるが、この活性を除去した変異VP16の作製は、ベクター開発に有用だろう。

3. ノードマウスを用いた各種ヒト癌腹腔播種モデルは、悪性腫瘍治療用ベクターとしてのヘルペスウイルスの有効性、毒性を評価するのに有用な系であることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).
2. 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).
3. 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).

4. 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).

5. 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).

7. 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).

8. 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).

9. 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).

10. 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.*, In press.

11. Goshima, F., Watanabe, D., Takakuwa, H., Wada, K., Daikoku, T., Yamada, M. and Nishiyama, Y. Herpes simplex virus UL17 protein is associated with B capsids 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 (ICP6Δ). *J. Surg. Oncol.*, In press.

F. 知的所有権の所得状況
特になし